

黄瑞香中化学成分抑制黄嘌呤氧化酶活性及其机制研究

齐万虎,蒋企洲,蒋建勤*
(中国药科大学天然药物化学教研室,南京 211198)

[摘要] 目的:黄瑞香中化学成分对黄嘌呤氧化酶活性的影响及其机制探讨。方法:以黄嘌呤为底物,别嘌呤醇为阳性药,采用分光光度法测定黄瑞香中的化学成分木犀草素,5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮 daphnodorin A (3),瑞香苷对黄嘌呤氧化酶活性的影响,并进一步对上述化合物进行酶抑制类型考察。结果:黄瑞香中化学成分木犀草素,5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮,daphnodorin A,瑞香苷对黄嘌呤氧化酶有明显的抑制作用,且 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮为非竞争性抑制,木犀草素、瑞香苷为竞争性抑制黄嘌呤氧化酶。结论:黄瑞香中的黄酮类和香豆素类成分能够较好的抑制黄嘌呤氧化酶,为黄瑞香治疗痛风奠定了一定的理论基础。

[关键词] 黄瑞香; 黄酮; 香豆素; 黄嘌呤氧化酶; 抑制剂

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0141-04

[doi] 10.11653/syfy2014050141

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1413.012.html>

[网络出版时间] 2013-12-18 14:13

Effect and Mechanism of Chemical Constituents from *Daphne giraldii* on Inhibiting Xanthinen Oxidase

QI Wan-hu, JIANG Qi-zhou, JIANG Jian-qin*
(Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect and mechanism of chemical constituents from *Daphne giraldii* on xanthine oxidase activity. **Method:** The ultraviolet spectrophotometry was adopted, xanthine as substrate and allopurinol as positive control drug, to measure xanthine oxidase activity affected by four compounds: luteolin (1), 5, 7, 3'-trihydroxy-4'-methoxy-flavone (2), daphnodorin A (3), daphnin (4) which were isolated from *D. giraldii*, and further the type of inhibition through enzyme kinetic was explored. **Result:** The compounds had obvious inhibiting effect on xanthine oxidase, among which 5, 7, 3'-trihydroxy-4'-methoxy-flavone (2) was a noncompetitive inhibitor while luteolin (1), daphnodorin A (3) daphnin (4) were competitive inhibitors. **Conclusion:** Flavonoids and coumarins in *D. giraldii* can effectively inhibit xanthine oxidase activity, which can provide theoretical basis for the clinical usage of *D. giraldii* in treatment of gout.

[Key words] *Daphne giraldii*; flavonoid; coumarin; xanthine oxidase; inhibitor

痛风(gout)是由于嘌呤类物质代谢紊乱,产生尿酸过多和(或)尿酸排泄减少,血尿酸浓度持续增高导致尿酸盐结晶沉积软组织所致的一组代谢性疾病,而高尿酸血症是痛风最重要的生化基础^[1]。近年来,由于我国人民生活水平的提高、饮食结构的改变、生活节奏的加快痛风症的发病率越来越高。大

[收稿日期] 20130728(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072537)

[第一作者] 齐万虎,在读硕士,从事中药化学成分研究及新药开发,Tel:15952052501,E-mail:qiwanhu87@163.com

[通讯作者] *蒋建勤,教授,从事中药及天然药物活性成分的提取分离结构鉴定和天然产物结构改造、全合成,Tel:13913982651,E-mail:cpujq@aliyun.com

量流行病学调查表明,痛风与糖尿病、高血压、肾脏疾病、高脂血症和心血管疾病等多种疾病相关,严重影响了人们的身心健康。黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XOD)可催化体内的嘌呤底物形成尿酸,因此针对此靶点开发出黄嘌呤氧化酶抑制剂,临床上用于治疗高尿酸血症及痛风具有重要的意义。目前临床上治疗痛风的药物只有别嘌呤醇(allopurinol)^[2]和 2009 年美国 FDA 批准的非布索坦(febuxostat)^[3]。但它们有各自不同的副作用,如别嘌呤醇会引起皮疹、过敏反应和肾病等^[4]。非布索坦最常见的副作用为肝功能异常、恶心、皮疹、关节痛等^[5-6]。因此,在中草药中寻找更为安全的抗痛风替代药物已是药学研究的热点^[7-8]。

黄瑞香(*Daphne giraldii* Nische)为瑞香科瑞香属 *Daphne* Linn 植物,主要分布于陕西、甘肃、青海、四川等地,其茎皮和根皮入药。具有祛风通络,散瘀止痛的功效,临床上用于痛风性关节炎、镇痛、消炎、手术麻醉等^[9]。药理学研究表明黄瑞香具有抗炎镇痛、抗疟、抗肿瘤等生物活性^[10-12]。据文献报道腹腔注射瑞香苷(daphnin)能显著地减少高尿酸血症小鼠血清尿酸水平,具有一定量效关系^[13]。然而,目前尚缺乏黄瑞香化学成分对黄嘌呤氧化酶抑制活性的系统深入研究。作者通过紫外分光光度法对从黄瑞香中提取分离的化合物进行体外黄嘌呤氧化酶抑制活性研究,本文报道了 4 个化合物,木犀草素(luteolin,1),5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮(5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxy-flavone,2),daphnodorin A(3),瑞香苷(daphnin,4)对黄嘌呤氧化酶活性的影响,并对上述化合物进一步进行酶动力学抑制机制的探讨,为黄瑞香抗痛风机制研究提供了部分实验依据和理论支持。有关的后续研究将另文报道。

1 材料

1.1 试剂 别嘌呤醇(纯度>98%)购于上海阿拉丁试剂公司,XOD(批号 SLBB1570V,购自 Sigma-Aldrich 公司);黄嘌呤(xanthine,XA,X7375,购自 Sigma-Aldrich 公司);尿酸(批号 BCBJ8674V,购自 Sigma-Aldrich 公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 JH752 紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),Sartorius BS124S1 1/万电子分析天平(北京赛多斯电子仪器厂)。

1.3 受试物 实验样品:木犀草素,5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮,daphnodorin A,瑞香苷。以上实验样品均为本课题组从黄瑞香药材中分离制备,并经 MS,¹H-¹³C-NMR 等波谱手段确认结构,经 HPLC 分

析,纯度均大于 98%。

2 方法

2.1 尿酸标准曲线的绘制 精密称取尿酸对照品 8.4 mg,溶于 PBS 缓冲溶液,定容至 10 mL,制成浓度为 0.50 mol·L⁻¹的母液。

精密吸取 0.50 mmol·L⁻¹的母液于 10 mL 量瓶中配制不同浓度的溶液,取上述不同浓度的溶液于 10 mL 量瓶中,再加 PBS 缓冲溶液至刻度处,摇匀,以缓冲溶液为对照,利用紫外-可见分光光度计在 290 nm 处测定吸光度(A),每个浓度平行测定 3 次,以尿酸的检测浓度(mmol·L⁻¹)作为横坐标,A 作为纵坐标绘制尿酸的标准曲线,得标准方程。

2.2 溶液的配制 对文献[14]中黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选方法进行改良,首先进行溶液的配制。

缓冲溶液配制:精密称取 KH₂PO₄0.478 0 g,K₂HPO₄·3H₂O 3.4730 g,加入纯净水约 240 mL,定容至 250 mL 即得含 75 mmol·L⁻¹磷酸根离子,pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)。

底物配制:精密称取黄嘌呤 3.65 mg,加入 PBS 约 45 mL,定容至 50 mL,加热溶解,即得 0.48 mmol·L⁻¹底物溶液,底物溶液新鲜配制,现配现用。

酶液配制:移液枪取黄嘌呤氧化酶 54 μL,加入 PBS 约 9 mL,定容至 10 mL 即得 0.04 U·mL⁻¹的黄嘌呤氧化酶溶液。

供试药物的配制:精密称取适量对照品,用二甲基亚砜(DMSO)配制成 10 mmol·L⁻¹贮备液,于-20℃避光保存。用时用 PBS 稀释至 1 000,500,250,100,10 μmol·L⁻¹,反应时供试药物溶液浓度为 100,50,25,10,1 μmol·L⁻¹,DMSO 含量小于 1%。

2.3 不同浓度的样品对黄嘌呤氧化酶抑制作用的影响 每个样品的测定由 4 个体系(样品组,空白组,阳性对照组,阴性对照组)组成(表 1),先将不同浓度样品溶液与黄嘌呤氧化酶在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中于 25℃下共保温 10 min,然后加入浓度为 0.48 mmol·L⁻¹黄嘌呤起始反应,25℃下反应 30 min 后,加入 2 mL PBS 缓冲溶液,以空白组调零,在 290 nm 处测定样品组 A,即为 A_I,再以阴性对照组调零,在 290 nm 处测定阳性对照组 A,即为 A_E,每个样品水平重复 4 次。黄嘌呤氧化酶抑制率公式如下:

酶活性抑制率=(A_E-A_I)/A_E×100%,式中 A_E为未加样品的黄嘌呤氧化酶活力;A_I为加入样品的黄嘌呤氧化酶活力。

本实验以别嘌呤醇为阳性对照,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时活性较好的化合物稀释至 5 个浓度,进行梯度复筛。根据抑制剂浓度及其平均抑制率,经非线性回归方法计算得各样品的 IC_{50} 。

表 1 不同浓度的样品对黄嘌呤氧化酶抑制作用反应体系 μL

条件	样品组	空白组	阳性对照组	阴性对照组
PBS 缓冲溶液	800	1 300	1 000	1 500
酶液	500	0	500	0
底物溶液	500	500	500	500
抑制剂溶液	200	200	0	0

2.4 各化合物抑制黄嘌呤氧化酶的动力学特征
在试管中分别加入 PBS 缓冲溶液、一定浓度的抑制剂溶液、黄嘌呤氧化酶溶液,混匀,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴反应 10 min,,再加入不同浓度的黄嘌呤溶液(0.012, 0.024,0.036,0.048,0.06 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min,利用紫外分光光度计在 290 nm 处测定各体系的 A ,根据标准曲线计算反应速率,按 Lineweaver-Burk 的双倒数作图法,确定抑制作用类型。

2.5 酶活力单位定义 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.4 条件下,

1 min水解底物黄嘌呤释放 1 μmol 尿酸的酶量为一个黄嘌呤氧化酶的活力单位。

3 结果

3.1 尿酸的标准曲线 将尿酸稀释成不同浓度,利用紫外分光光度计在 290 nm 处测定吸光度(A),以尿酸浓度为横坐标, A 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 9.819\ 7X + 0.028\ 1$,尿酸在 0.001 ~ 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 A 具有良好的线性关系, $R^2 = 0.999$ 。

3.2 黄瑞香中化学成分对黄嘌呤氧化酶活性的影响 上述化合物有明显的抑制黄嘌呤氧化酶活性,它们在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时对黄嘌呤氧化酶的抑制率大于 70%,稀释至 5 个浓度,进行梯度复筛,结果表明呈明显的量-效关系,活性测定结果见表 2。根据抑制剂浓度及其平均抑制率,经非线性回归方法计算得各样品的 IC_{50} ,为此,进一步对这些化合物进行抑制类型的研究,以期阐明其抑制黄嘌呤氧化酶的分子动力学机制,见表 3。

表 2 黄瑞香中化学成分对黄嘌呤氧化酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

化合物	黄嘌呤氧化酶抑制率/%				
	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
木犀草素	96.30 $\pm$ 3.89	94.21 $\pm$ 0.80	90.90 $\pm$ 0.40	85.74 $\pm$ 0.62	16.52 $\pm$ 3.29
5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮	96.25 $\pm$ 3.15	94.01 $\pm$ 1.97	93.55 $\pm$ 0.77	89.55 $\pm$ 1.00	14.10 $\pm$ 0.85
daphnodorin	77.08 $\pm$ 6.11	27.70 $\pm$ 6.46	8.24 $\pm$ 5.01	2.36 $\pm$ 0.78	-0.23 $\pm$ 2.03
瑞香苷	95.75 $\pm$ 1.94	94.04 $\pm$ 2.54	76.79 $\pm$ 4.09	31.44 $\pm$ 3.00	0.32 $\pm$ 0.32

注:化合物 1:木犀草素;化合物 2;5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮;化合物 3:daphnodorin A;化合物 4:瑞香苷。

表 3 黄瑞香中各化学成分的 IC_{50} ($n = 4$)

化合物	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制类型
别嘌呤醇	2.48	竞争性抑制
木犀草素	3.32	竞争性抑制
5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮	3.28	非竞争性抑制
daphnodorin A	65.95	竞争性抑制
瑞香苷	20.56	竞争性抑制

3.3 黄瑞香中化学成分对黄嘌呤氧化酶的动力学特征 根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,得到图 1,从图 1 中可以得出 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮对黄嘌呤氧化酶的抑制作用呈非竞争性抑制,说明它与黄嘌呤氧化酶活性中心以外的必需基团结合,这种结合不影响酶与底物的结合,而底物与酶的结合,也不影响酶与抑制剂的结合。但酶-底物-抑制剂复合物(ESI)不能进一步变成产物,此种抑制方式,只要抑制剂存在,ESI 就不能解脱出来,即底物

浓度增加不能降低抑制剂对酶的抑制程度。木犀草素、瑞香苷、daphnodorin A 为竞争性抑制,对于竞争性抑制,随着底物浓度的增大,抑制剂的影响可减弱。

4 讨论

目前未见文献报道关于黄瑞香中化学成分对黄嘌呤氧化酶活性的抑制作用研究,本课题组利用黄嘌呤氧化酶体外筛选模型,对从黄瑞香中提取分离的化合物进行黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选。结果得出木犀草素,5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮,daphnodorin A,瑞香苷具有明显的抑制黄嘌呤氧化酶作用,进一步对上述化合物进行抑制类型的酶动力学考察,得出 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮是通过非竞争性抑制黄嘌呤氧化酶,木犀草素、瑞香苷、daphnodorin A 为竞争性抑制黄嘌呤氧化酶,并且 5,7,3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮、木犀草素活性与临床

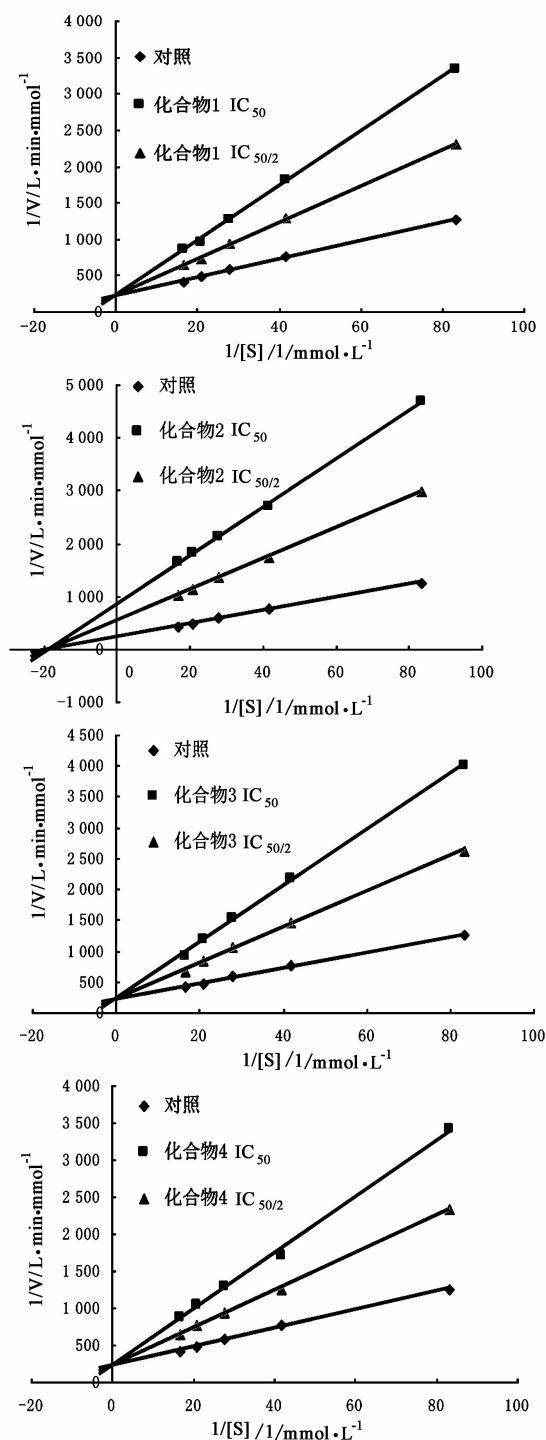


图 1 各化合物对黄嘌呤氧化酶动力学考察
Lineweaver-Burk 双倒数曲线

上使用的别嘌呤醇相当,这为有效利用黄瑞香作为黄嘌呤氧化酶抑制剂以及黄瑞香治疗痛风的进一步研究提供了理论基础。

本研究对李英等^[14]方法的改良,在高通量筛

选的基础上,采用紫外分光光度法,检测尿酸的生成量,避免了高通量筛选带来的某些误差。本方法建立的黄嘌呤氧化酶体外筛选模型,具有操作简单,稳定的特点,可以作为从中草药中寻找高效低毒的黄嘌呤氧化酶抑制剂的方法。

[参考文献]

- [1] 杨田义,杨培民,冯明建,等. 以高尿酸血症小鼠模型优选痛风定颗粒的提取技巧[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):28.
- [2] Hande K, Reed E, Chabner B. Allopurinol kinetics[J]. Clin Pharmacol Ther,1978,23:598.
- [3] 唐春雷,王德才,陈姝,等. 新型抗痛风药物非布索坦[J]. 中国新药杂志,2009,18(7):577.
- [4] Gaffo A L, Saag K G. Febuxostat; the evidence for its use in the treatment of hyperuricemia and gout[J]. Core Evid,2009,4:25.
- [5] Lee M H, Graham G G, Williams K M, et al. A benefit-risk assessment of benzbromarone in the treatment of gout[J]. Drug Saf,2008,31(8):643.
- [6] Fagugli R M, Gentile G, Ferrare G, et al. Acute renal and hepatic failure associated with allopurinol treatment[J]. Clin Nephrol,2008,70(6):523.
- [7] 李新强,王丽芳. 中医药治疗高尿酸血症的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):226.
- [8] 朱继孝,曾金祥,罗光明,等. 栀子降尿酸有效部位研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):140.
- [9] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [10] 王宇华,许惠琴,狄留庆,等. 祖师麻提取物的镇痛与抗炎作用研究[J]. 中草药,2007,38(11):1697.
- [11] Y Z Yang, A Ranz, H Z Pan, et al. Daphnetin: a novel antimalarial agent with *in vitro* and *in vivo* activity[J]. Am J Trop Med Hyg, 1992,46(1):15.
- [12] Finn Gregory J, Creaven Bernadette S, Egan Denise A. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Biochem Pharmacol,2004,67(9):1779.
- [13] 喻志峰,杨澄,仇熙,等. 瑞香苷对高尿酸血症小鼠的影响[J]. 中国药科大学学报,2002,33(2):142.
- [14] 李英,陈君,李萍. 金银花中酚酸类和黄酮类成分的黄嘌呤氧化酶抑制活性[J]. 中国药科大学学报,2011,42(5):407.

[责任编辑 聂淑琴]