

中药提取物中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选

黎莉,戴立珍,杨靖,方继德

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘要:用带有酶动力学分析软件的紫外分光光度计,测定多种中药提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制活性。测定波长为294 nm,黄嘌呤氧化酶1.14 units/mL。筛选在体外能抑制黄嘌呤氧化酶活性的中药提取物,并比较了它们的抑制活性。结果表明枳椇子乙醇提取物、高良姜乙醇提取物和葛花乙酸乙酯提取物对黄嘌呤氧化酶显示出较强的抑制活性;说明上述3种提取物是抑制黄嘌呤氧化酶的活性部位,可进一步分离纯化得到有效化合物。

关键词:枳椇子;高良姜;葛花;黄嘌呤氧化酶;动力学分光光度法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2010.03.011

0 引言

黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XOD)是体内核酸代谢中重要的酶,能催化黄嘌呤和次黄嘌呤的氧化生成尿酸,同时产生过氧化物自由基^[1]。尿酸浓度过高将导致高尿酸血症,可引起痛风发作。自由基涉及到炎症等一系列病理过程^[2]。因此,抑制XOD的活性,既可以减少体内尿酸的形成,有效地阻止或延缓痛风及其并发症,又可以减少自由基造成的组织伤害^[3]。目前黄嘌呤氧化酶抑制剂(XOI)别嘌呤醇自上市后沿用至今,是治疗痛风的主要药物。但常伴有发热、过敏性皮疹、腹痛、腹泻、白细胞及血小板减少,肝功能损害等严重副反应^[4]。因此,研制开发新的黄嘌呤氧化酶抑制剂具有实际意义。

黄酮类化合物广泛存在于中草药中,具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗癌、抗心脑血管疾病等多种药理作用。根据有关文献^[5]中黄嘌呤氧化酶抑制剂的构效关系及应用前景,笔者从多种中草药制备提取物,这些提取物主要含有黄酮类化合物^[6-7],并进行了体外黄嘌呤氧化酶抑制实验。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

枳椇子和高良姜购于武汉市雄楚大街三九药店,葛花购于湖北省中医院,这3种药材均经中南民族大学万定荣教授鉴定。枳椇子为鼠李科植物枳椇(*Hovenia dulcis* Thunb)的干燥成熟种

子。高良姜为姜科植物高良姜(*Alpinia officinarum* Hance)的干燥根茎。葛花为豆科植物野葛[*Pueraria lobata* (Will.) Ohwi]的干燥花。

T6新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司),带有动力学/时间软件。黄嘌呤氧化酶(北京世纪山水科技公司),黄嘌呤(Sigma公司),槲皮素(中国药品生物制品检定所),二甲基亚砜(Amresco公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 植物提取物的制备

分别将各种植物材料粉碎成粗粉,称取材料10.0 g用索氏提取器进行提取,溶剂为不同浓度的乙醇和乙酸乙酯。提取液用旋转蒸发器回收溶剂,干燥剩余物,分别得到各种提取物。

1.3 研究方法

1.3.1 溶液配制 缓冲液:取 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、EDTA-2Na溶于500 mL水,配成0.2 mol/L缓冲溶液(pH7.5)。酶溶液:取黄嘌呤氧化酶,用缓冲液配成浓度为1.144 units/mL的溶液。测试过程中利用冰袋保持低温,需每天配制。底物溶液:精密称取黄嘌呤溶于水,制得0.10 mmol/L和0.05 mmol/L底物溶液,室温保存。样品和对照品溶液:精密称取各样品及阳性对照品槲皮素,分别用二甲基亚砜(DMSO)溶解,得到不同浓度的溶液。

1.3.2 酶活力测定 在适宜条件下,黄嘌呤被黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸,产物尿酸290 nm处有特征吸收峰,因此以每分钟290 nm处吸光度的增加来计算酶活力(dA/min)(dA为吸光度的增加值)。在任意一个适当长的时间段内,吸光度随

时间呈线性增加,斜率为反应速率(dA/min),斜率越大,说明酶的活力越强,具体操作参照文献[5].在石英比色皿中,加入缓冲溶液、底物溶液、酶溶液,测定290 nm处吸光度增加值,每隔0.5 s记录一次,共测1 min,得到一条关于吸光度—时间的直线,计算直线斜率 $\text{Rate}(\text{dA}/\text{min})$.

1.3.3 样品测定 按同样的方法,在酶促反应体系中加入适量样品溶液,每隔0.5 s记录290 nm处吸光度变化值,共计1 min.每个样品平行操作3次,取其平均值计算该样品的抑制率.

1.3.4 空白对照 同上述操作,加与样品同样体积的DMSO,不加样品和XOD.

1.3.5 XOD对照品测定 方法与样品测定相同,不加样品.

1.3.6 阳性对照品 为核对实验方法与结果的可信性,取已配制好的不同浓度的槲皮素溶液,重复上述实验,计算 IC_{50} 值.

1.3.7 抑制动力学常数 K_i 值的测定及计算 使用2个不同浓度的黄嘌呤溶液,获得不同浓度样品溶液对XOD的反应速率,用Dixon绘图法计算 K_i 值[8].

2 结果与讨论

2.1 样品对XOD的抑制率

计算公式为 $[(R_p - R_s)/R_p] \times 100\%$. 式中 R_s 、 R_p 分别表示样品、XOD对照品(已减去空白对照)的反应速率.按照上述方法进行分析,底物浓度为0.10 mmol/L,样品浓度均为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,槲皮素为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,得到对黄嘌呤氧化酶抑制作用较强的植物提取物,分别为枳椇子乙醇提取物、高良姜乙醇提取物和葛花乙酸乙酯提取物.其抑制率如表1所示.

表1 各提取物对XOD的抑制效果

Table 1 Inhibitory activity of extracts on XOD

样品来源	抑制率/%	$IC_{50}/(\mu\text{g}/\text{mL})$	$K_i/(\mu\text{g}/\text{mL})$
枳椇子	88.42	6.49	6.166
高良姜	70.11	47.68	63.958
葛花	62.07	64.78	13.890
槲皮素	94.25	0.718	0.133

2.2 半数抑制浓度 IC_{50}

以抑制率为因变量,以样品浓度为自变量,采用SPSS 15.0统计软件包计算回归方程.根据回归方程计算抑制率为50%的样品浓度 IC_{50} .实验结果如表1所示.

2.3 K_i 值计算和抑制剂类型

用Dixon绘图法计算 K_i 值,判断抑制剂类型.在不同浓度的底物下,以反应速率的倒数为因变

量,样品浓度为自变量,得到一条直线.采用SPSS 15.0统计软件包计算回归方程.求出两直线的交点,可得到抑制动力学参数 K_i [9].再由直线的斜率对相应的底物浓度的倒数二次作图,即可判断抑制剂类型[10].本实验中的植物提取物均为竞争性抑制剂,其动力学参数如表1和图1~4所示.

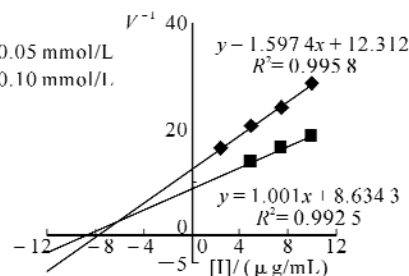


图1 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中枳椇子的Dixon图

Fig. 1 Dixon plots drawn by reciprocal of urate formation rate versus Scmen Hovcnia concentration in xanthine/XOD system

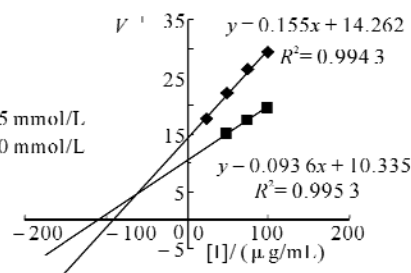


图2 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中高良姜的Dixon图

Fig. 2 Dixon plots drawn by reciprocal of urate formation rate versus Rhizoma Alpinia officinarum concentration in xanthine/XOD system

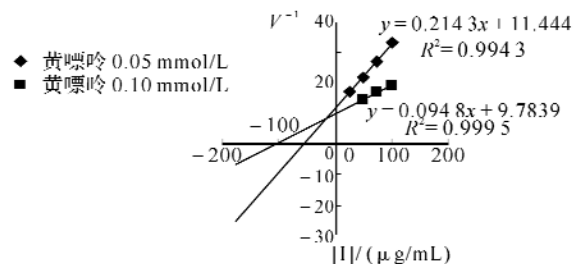


图3 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中葛花的Dixon图

Fig. 3 Dixon plots drawn by reciprocal of urate formation rate versus Flos Pueraria concentration in xanthine/XOD system

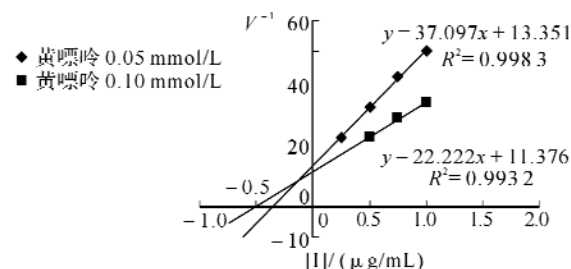


图4 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中槲皮素的Dixon图

Fig. 4 Dixon plots drawn by reciprocal of urate formation rate versus Quercetin concentration in xanthine/XOD system

3 讨论

a. IC_{50} 值反映样品对黄嘌呤氧化酶活性抑制的强弱, 该数值低则抑制作用强。枳椇子乙醇提取物抑制作用最强。 K_i 值是表征抑制剂对酶促反应抑制效率的重要参数, 该值越小, 则表明抑制剂对该酶促反应抑制效果好。与化学单体槲皮素相比, 本实验筛选的 3 种提取物的 IC_{50} 值和 K_i 值较大, 但由于提取物是混合物, 经济且制备容易, 还具有多重作用, 故仍然具有实际意义和应用价值。

b. 枳椇子、高良姜和葛花属常用中药, 长期用于治疗各种疾病, 毒性小。未见其抑制黄嘌呤氧化酶活性而治疗痛风的报导。本实验将对其做后续研究, 有可能发现其新用途, 为充分利用这些植物资源提供依据。

参考文献:

- [1] 吴晓生, 李龙官. 比色法测定黄嘌呤氧化酶[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986(5):65-67.
- [2] Hatliwelt B, Gutteridge J M, Cross C E. Free radicals, all-tioxidants, and human discases: where are we now [J]. J Lab Clin Med, 1992, 119(6):598-620.
- [3] 黎莉, 陈科力, 方继德. 中草药来源的黄嘌呤氧化酶抑制剂的研究进展[J]. 中药材, 2006, 29(12):1386-1389.
- [4] 王春辉. 基于结构的黄嘌呤氧化酶抑制剂的设计、合成和筛选[D]. 沈阳: 沈阳药科大学制药工程学院, 2006.
- [5] Cos P, Ying L, Calomme M, et al. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers[J]. J Nat Prod, 1998, 61:6171.
- [6] 文为, 张洪, 曾嵘. 枳椇子中总黄酮的提取工艺优化[J]. 中国药师, 2007, 10(10): 965-967.
- [7] 罗小平, 梁兆强, 杨晓红. 高良姜中黄酮类化合物的提取及精制研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33): 14593-14595, 14599.
- [8] 陈科力, 叶丛进, Plumb G W, 等. 异叶蛇葡萄和蛇葡萄提取物抑制黄嘌呤氧化酶和脂质氧化酶的活性研究[J]. 中药材, 2004, 27(9):650-653.
- [9] 张海德, 黄玉林, 何继芹. 丹参二萜醌对黄嘌呤氧化酶活性的抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(3):174-178.
- [10] 郭勇, 郑德平. 酶学[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000:109-110.

Study on Xanthine Oxidase inhibitory activity of the extracts from Chinese Herbal Medicines

LI Li, DAI Li-zhen, YANG Jing, FANG Ji-de

(School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology;
Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan 430074, China)

Abstract: Xanthine oxidase inhibitory activity of multiple herbal medicine samples were determined by UV spectrophotometer with enzyme kinetics analysis software, wavelength 294 nm, xanthine oxidase 1.14 units/mL. The extracts of Chinese herbal medicines were screened, which can inhibit the activity of xanthine oxidase in vitro, and their inhibitory activity were compared. The results were that ethanol extracts of Semen Hoveniae, ethanol extracts of Rhizoma Alpiniae officinarum and ethylacetate extract of Flos Puerariae showed some inhibitory activity on xanthine oxidase; and the above-mentioned extracts may be active fraction inhibiting XOD and could get effective compounds by further separation and purification.

Key words: Semen Hoveniae; Rhizoma Alpiniae officinarum; Flos Puerariae; xanthine oxidase; kinetic spectrophotometry

本文编辑: 张 瑞