

葛根素衍生物抗炎作用及对环氧化酶活性的影响

张毅^{1,2}, 李恒华^{1,3}, 江兵^{1,3}, 张莉^{1,3}, 周志¹, 陈国庆^{1,2}, 蒋渝¹, 杨大坚^{1,2*} (1.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2.重庆市西部中药学开放实验室, 重庆 400065; 3.重庆市药物安全评价中心, 重庆 400065)

摘要: 目的 探讨四乙酰葛根素(4Ac)的抗炎作用以及对环氧化酶(COX)的抑制作用。方法 采用角叉菜胶诱发的大鼠急性足肿胀模型进行抗炎作用研究, 并对环氧化酶的选择性进行了研究。结果 4Ac(40 mg·kg⁻¹)对模型大鼠的足肿胀均有明显的抑制作用; 4Ac对COX-2活性的半数抑制浓度(IC₅₀)约为52.9 μmol·L⁻¹, 与吲哚美辛相比, 无统计学差异(P>0.05)。结论 4Ac有明显的抗炎作用, 对COX-2具有选择性抑制作用, 具有良好的应用前景。

关键词: 四乙酰葛根素; 抗炎; 环氧化酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)01-0008-03

Affects on Cyclooxygenase Activities and Anti-inflammations Effects of Tetra-acetylated Puerarin

ZHANG Yi^{1,2}, LI Henghua^{1,3}, JIANG Bing^{1,3}, ZHANG Li^{1,3}, ZHOU Zhi¹, CHEN Guoqing^{1,2}, JIANG Yu¹, YANG Dajian^{1,2*} (1.Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2.Chongqing Western China Open Laboratory of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 3.Chongqing Center of Drug safety Evaluation, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate anti-inflammatory effects and cyclooxygenase-inhibitory effects of tetra-acetylated puerarin. **METHODS** The anti-inflammatory effect of tetra-acetylated puerarin was observed by using the rat inflammation model induced by Carrageenan, and the cyclooxygenase activity of tetra-acetylated puerarin was observed by radioimmunoassay(RIA). **RESULTS** Tetra-acetylated puerarin (40 mg·kg⁻¹) can significantly decrease the rat paw edema for the inhibition effects on foot edema. Compared with indomethacin, the effect on COX-2 of puerarin derivatives showed no significant difference(P>0.05). And the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of it was about 52.9 μmol·L⁻¹. **CONCLUSION** Tetra-acetylated puerarin has significant anti-inflammatory activity and selective inhibition effect on the COX-2, and it has a good application prospects.

KEY WORDS: tetra-acetylated puerarin; anti-inflammatory; cyclooxygenase

目前, 大多数炎症治疗采用可的松类和非甾体类抗炎药(NSAIDs)等一类环氧化酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂, 对于减少炎症和疼痛能获得较好的疗效, 但长期或者频繁地使用这些药物, 易产生一些严重的不良反应。因此, 发现可替代的、毒性较低的、天然炎症介质阻断剂, 具有重要的意义。中药或天然产物中有丰富的COX抑制剂^[1], 主要为黄酮类或多酚类、五环三萜类、生物碱类、有机酸类等植物成分, 大多以羟基或酚羟基为活性基团的化合物。

葛根素(puerarin, Pu)是豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (wild) Ohwi. 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth.中主要有效成分, 其结构式 7, 4'-二羟基-8-β-D 葡萄糖异黄酮, 在临床上用于治疗心肌缺血、心绞痛等心脑血管用药。但葛根素在水和有机溶剂中溶解度小, 口服生物利用度差, 市场上至今未出

现口服葛根素类制剂。通过对葛根素进行结构修饰制备出葛根素衍生物即四乙酰葛根素(tetra-acetylated puerarin, 4Ac, 结构式见图 1), 提高了口服生物利用度^[2], 有明显的舒张血管作用^[3]。

葛根素及其衍生物四乙酰葛根素均含有7, 4'位两个酚羟基, 均为活性基团, 它们也均是异黄酮类化合物。本研究旨在探索葛根素衍生物在抗炎方面的活性, 并研究葛根素衍生物对COX的选择抑制活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠46只, SPF级, ♂, 体重160~200 g, 由重庆市中药研究院实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(渝)2007-0006。

基金项目: 重庆市科技攻关项目(2007AB5051); 国家科技部重大新药创制(2009ZX09103-150)

作者简介: 张毅, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (023)89029070
授 Tel: (023)89029081 E-mail: yangdaji@hotmail.com

E-mail: cqzhangyi@hotmail.com *通信作者: 杨大坚, 男, 博士, 教

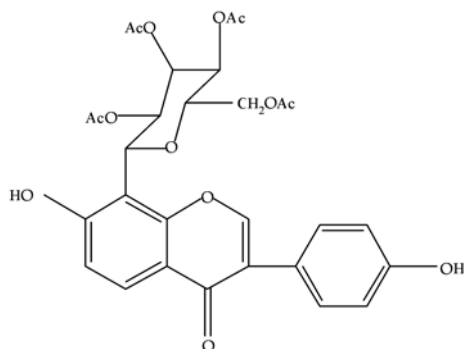


图1 四乙酰葛根素结构式

Fig 1 The structure of tetra-acetylated puerarin

1.1.2 仪器 鼠足容积测定仪 (Ugo Basile srl Biological Research Apparatus Italy)。

1.1.3 药品与试剂 用于抗炎作用研究: 葛根素注射液(受试药 1), 规格为 $0.2 \text{ g} \cdot (5 \text{ mL})^{-1}$, 购于浙江康恩贝制药股份有限公司, 批号: 070504, 实验前用 5% 葡萄糖液配制成 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液; 注射用四乙酰葛根素(受试药 2)由重庆市中药研究院自制, $50 \text{ mg} \cdot \text{支}^{-1}$, 实验前用 5% 葡萄糖液配制成 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。吲哚美辛片, $25 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$, 购于重庆科瑞制药有限责任公司, 批号: 070702, 实验前将其研磨成细粉, 用蒸馏水配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液。角叉菜胶, 由辽宁省药物研究所提供, 临用前 1 d 用研钵研成细粉后, 以无菌生理盐水配制成 1% 浓度, 放置冰箱过夜。

用于 COX 研究: COX-1 和 COX-2 纯酶制品, 美国 Cayman 公司生产, 批号: 99961。Tris(base), Sangon 进口分装(Ultra pure), 批号: 103K5411。高铁血红素, BTBT 进口分装, 批号: 57-F-0417。PGE2 检测试剂盒, 由天津四方化工有限公司生物试剂部提供, 批号: 20080903。四乙酰葛根素(纯度 >98%), 重庆市中药研究院自制。己烷和苯酚, 分析纯, 由川东化工集团提供。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药 将 46 只大鼠随机分为 4 组: 模型对照组 16 只, 阳性药对照组(即吲哚美辛组)10 只, Pu 组 10 只和 4Ac 组 10 只。

各药物给药剂量按人临床用药剂量换算: 以 60 kg 人为标准, 按照体表面积-剂量换算法计算大鼠给药等效剂量。受试药 1 大鼠用量为 $40.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药容积为 $0.5 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$; 受试药 2 大鼠用量为 $40.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药容积为 1

$\text{mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$; 吲哚美辛大鼠用量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药容积为 $0.5 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ 。

1.2.2 大鼠足肿胀模型的制备 大鼠适应性饲养后, 先预防给药 4 d, 第 5 天给药 10 min 后予以造模: 4 组大鼠均予 1% 角叉菜胶液右后足跖皮下注射 0.1 mL 以致炎。

受试药于每天上午 10 点到 11 点尾静脉注射给药 1 次; 吲哚美辛片 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 于每天上午 10 点灌胃给予 1 次, 连续 4 d, 第 5 天造模前给予 1 次, 造模后 4 h 再给予 1 次, 模型组尾静脉注射给予相同容积的生理盐水。

1.2.3 观察指标与方法 观察大鼠右后足外观(有无肿胀及肿胀时间、程度), 肢体活动情况等。造模前及造模后 1, 2, 4, 6, 8, 24 h 分别用足容积测定仪测量各组大鼠右后足容积, 并按如下公式计算各时间点肿胀率:

肿胀率(%) = $(\text{造模后足容积} - \text{造模前足容积}) / \text{造模前足容积} \times 100\%$

1.2.4 COX 选择性抑制实验方法 于 1 mL Tris HCl 缓冲液($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.0)含有高铁血红素($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和苯酚($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入一个单位(unit)的 COX-1 和 COX-2, 并设有空白对照。加入 4Ac、吲哚美辛等药物(对照管加入 $10 \mu\text{L}$ Tris HCl 缓冲液), 37°C 下预孵育 5 min。加入花生四烯酸($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 37°C 下预孵育 2 min 后置 0°C 冰水中中止反应。用己烷抽提以除去过多的花生四烯酸, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃有机相, -40°C 保存, 放射免疫法检测前列腺素 E2(PEG2)含量。

1.2.5 统计学方法 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。数据处理在 Excel 及 SPSS10.0 软件中进行。

2 结果

2.1 一般体征

各组大鼠在造模后 1 h 内, 右后足均出现不同程度的肿胀, 局部皮温增高, 稍发红, 大鼠行走迟缓, 患侧足爪卷曲, 患肢不能着力负重, 个别甚至出现跛行, 模型组大鼠右后足肿胀程度随时间延长逐渐加重, 6 h 左右达到高峰, 8 h 左右开始减轻, 24 h 明显减轻。其中吲哚美辛组大鼠局部症状较同期模型组明显减轻, Pu 组和 4Ac 组大鼠局部症状较模型组也有所减轻。

2.2 足肿胀率统计结果

造模后 1 h, 吲哚美辛组大鼠足肿胀率较模型

组减小($P<0.05$), Pu 组和 4Ac 组大鼠足肿胀率与模型组相比有减小趋势, 但无统计学差异。造模后 2~6 h, Pu 组、4Ac 组和吲哚美辛组大鼠足肿胀率较模型组明显减小($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。造模后 8 h, 4Ac 组和吲哚美辛组大鼠足肿胀率仍较模型组明显减小($P<0.01$), Pu 组足肿胀率与模型组相比有减小趋势, 但无统计学差异($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 大鼠右后足肿胀率($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Swelling rate of rat right hind leg($\bar{x} \pm s$)

组别	模型组 (n=16)	Pu 组 (n=10)	4Ac 组 (n=10)	吲哚美辛组 (n=10)
造模后 1 h	15.32±8.62	12.14±6.75	8.28±8.74	7.97±6.62 ¹⁾
造模后 2 h	27.80±13.81	8.77±6.92 ²⁾	9.09±8.34 ²⁾	2.13±3.18 ²⁾
造模后 4 h	34.54±12.83	19.69±14.47 ¹⁾	6.20±5.33 ²⁾	6.91±7.60 ²⁾
造模后 6 h	36.05±16.70	22.48±13.45 ¹⁾	13.21±8.08 ²⁾	9.43±11.84 ²⁾
造模后 8 h	25.70±12.49	18.31±10.53	10.15±7.16 ²⁾	8.02±10.68 ²⁾
造模后 24 h	13.03±9.36	8.33±7.84	4.59±6.94 ¹⁾	1.49±2.26 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

2.3 对 COX 选择抑制活性影响

吲哚美辛对 COX-1 和 COX-2 的活性都有明显的抑制作用, 对 COX-1 和 COX-2 活性的半数抑制浓度(IC₅₀)约为 43.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 56.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。4Ac(1~500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 COX-1 的活性作用无明显抑制作用, 不能测定 IC₅₀; 对 COX-2 的活性抑制作用较强, 其对 COX-2 活性的 IC₅₀ 约为 52.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其对 COX-2 的活性抑制作用与吲哚美辛相比, 无统计学差异。结果见图 2。

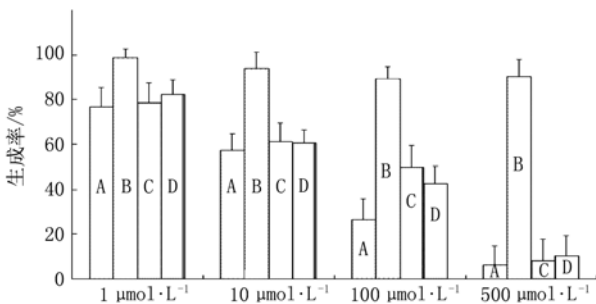


图 2 4Ac 对 COX-1 和 COX-2 抑制作用试验

A-吲哚美辛对 COX-1 抑制作用; B-4Ac 对 COX-1 的抑制作用; C-吲哚美辛对 COX-2 的抑制作用; D-4Ac 对 COX-2 的抑制作用

Fig 2 4Ac on COX-1 and COX-2 inhibition test

A-inhibitory effects of indomethacin on COX-1; B-inhibitory effects of 4Ac on COX-1; C-inhibitory effects of indomethacin on COX-2; D-inhibitory effects of 4Ac on COX-2

3 讨论

炎症是由多因素促成的一个复杂过程, 这些因素包括细胞因子和炎症介质分子, 炎症介质分子属于一类花生四烯酸衍生物, 主要包括前列腺素(prostaglandins, PGs), 一些重要的疾病与促炎的介质分子密切相关^[1]。

COX 抑制剂正是针对花生四烯酸等炎性介质的形成、阻断其转化为炎症介质PGs的COX 途径。COX 有COX-1 和COX-2 两种同功酶, COX-1 为结构酶, 在许多正常组织中存在, 可维持正常胃肠道黏膜的完整性; COX-2 开始被认为诱导酶, 在炎症组织表达显著增加, 抗炎药物对COX-2 的抑制作用越强, 则抗炎效果越好。较之NSAIDs, COX-2 选择性抑制剂抗炎、镇痛作用明显, 胃黏膜损害较少出现。

本实验成功复制了角叉菜胶诱发的大鼠急性足肿胀模型, 并以吲哚美辛为阳性对照药, 初步研究了 Pu 与 4Ac 对该模型的防治作用。结果提示, 4Ac 在剂量为 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时对模型大鼠的足肿胀均有明显的抑制作用。

对 COX 选择抑制活性试验也表明, 4Ac 对 COX-2 的活性抑制作用与吲哚美辛相近, 而对 COX-1 活性无抑制作用, 表现为对 COX-2 显著的选择性抑制。

研究表明, 4Ac 具有与 Pu 相同的抗炎作用。可以通过对 COX-2 显著的选择性抑制作用, 达到抗炎、镇痛的目的; 同时对 COX-1 活性无抑制作用, 避免由于对 COX-1 活性抑制而造成的如胃肠道黏膜损伤等不良反应。其原料易得, 可以采用常规制剂手段制成口服液, 注射剂等常规剂型, 使用方便, 具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] CHEN K L, CHEN G. Distribution and action of natural cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor in traditional Chinese materia medica[J]. J South-Central Univ Nat: Nat Sci(中南民族大学学报: 自然科学版), 2009, 28(1): 42-47.
- [2] GUO D Y, YANG D J, CHEN S L. Pharmacokinetic investigation of pur and derivatives in rats[J]. J Shanxi Coll Tradit Chin Med (陕西中医学院学报), 2008, 31(1): 52-54.
- [3] ZHANG Y, LI H H, JIANG B, et al. Study effects of tetra-acetylated puerarin on isolated rat thoracic aortic rings[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(11): 873-875.

收稿日期: 2010-05-17