

一种复合萃取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用研究

赵玲¹,陈旅翼²,李赫宇³

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023;2. 中南民族大学 药学院,湖北 武汉 430074;
3. 天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457)

摘要:一种复合萃取物主要由葡萄皮、葡萄籽、红酒萃取物及人参、枸杞萃取物组成,针对该复合物抑制黄嘌呤氧化酶的体外活性开展了研究,发现该复合物为黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)竞争性抑制剂,其 K_i 值为 $53.0 \mu\text{g}$, IC_{50} 为 $56.86 \mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 复合萃取物;黄嘌呤氧化酶;抑制作用

Study on Inhibition of Xanthine Oxidase of An Extractive Complex

ZHAO Ling¹, CHEN Lü-yi², LI He-yu³

(1. College of Pharmaceutical engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China;
2. College of Pharmacy, South-central University For Nationalities, Wuhan, 430074, Hubei, China;
3. Tianjin Ubasic health Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: An extractive complex contains the extraction of grape skin, grape seed, red wine, ginseng and wolfberry. The complex inhibition in vitro activity of xanthine oxidase conducted research and found that the complex is a xanthine oxidase (xanthine oxidase, XO) competitive inhibitor with K_i values of $53.0 \mu\text{g}$ and IC_{50} $56.86 \mu\text{g/mL}$.

Key words: extractive complex; xanthine oxidase; inhibit effect

高尿酸血症和痛风的生化基础是体液中尿酸浓度过高,降低过高的尿酸是其主要治疗策略^[1]。黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)是尿酸生成的关键酶,其催化次黄嘌呤和黄嘌呤生成尿酸,同时产生大量的超氧阴离子和过氧化氢等活性氧,因此, XO 为良好的高尿酸血症和痛风治疗靶点。XO 抑制剂通过抑制体内 XO 的活性而减少尿酸生成,如别嘌醇,已于 20 世纪 60 年代用于临床,对高尿酸血症和痛风产生良好的防治效果^[2-3]。近年又发现, XO 抑制剂对缺血再灌注损伤、内皮损伤、心功能衰竭具有明显的保护作用,有可能成为心血管系统疾病的治疗药物^[4]。虽然针对该靶点的抑制剂有其现实和潜在的价值,但该类药品种极其少,且均有不同程度的毒副作用,限制了其应用,因此寻找对 XO 有抑制作用的天然复合萃取物对人类健康有着非常重要的意义。

本文中复合萃取物主要由葡萄皮、葡萄籽、红酒

作者简介:赵玲(1982—),女(汉),副教授,博士研究生,研究方向:天然活性成分研究。

萃取物及人参、枸杞萃取物组成,本文针对该复合物抑制 XO 的体外活性开展了研究。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

复合萃取物样品:由天津市益倍建生物技术有限公司提供;黄嘌呤:Sigma, USA;尿酸:Sigma, USA;黄嘌呤氧化酶:Sigma 5U, USA;别嘌醇片(批号:20140908):江苏方强制药厂有限责任公司;磷酸氢二钾、乙二胺四乙酸、氢氧化钠、二甲基亚砷等均为分析级。

1.2 仪器

BS124S 型电子天平: Sartorius Corporation, Germany; Mini-shaker 培养板振荡器: 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; WH-2 型漩涡混合仪: 上海沪西分析仪器厂; DZF-6020 型真空干燥箱: 上海一恒技术有限公司; DG5033A 型酶标仪: 华东电子; 96 孔细胞培养板: Corstar[®] Corporation, USA; 20、200、1000 μL 移液器: Thermo Electron Corporation, USA。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制

称取复合萃取物样品适量,150 μL DMSO 溶解,再用缓冲盐溶液稀释至浓度为 228、114、57、28.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,终浓度为 0.034、0.068、0.136、0.272 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的别嘌呤作为阳性对照。

磷酸缓冲液的配制($\text{pH}=7.5$, 50 mmol/L,按《中华人民共和国药典》2010 年版附录配制):即精密称取在(115 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h~3 h 的无水磷酸氢二钠 3.55 g 与磷酸二氢钾 3.40 g,加水使溶解并稀释至 1 000 mL,用 0.1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.5。

黄嘌呤溶液的配制:称取 2.28 mg 溶解于 100 mL 缓冲液中。

EDTA 配制:称取 0.372 g 溶解于 100 mL 缓冲液中。

XO 配制:5 U 溶解于 25 mL 缓冲液中,得 0.2 U/mL。

1.3.2 体外抑制 XO 活性测定

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 290 nm 处 OD 值来说明药物对酶活力的影响。在酶标板中,加入缓冲溶液、底物溶液、酶溶液,反应 20 min 后,测定 290 nm 处 OD 值。

样品测定:按 1.3.2 的测定方法,在酶促反应体系中加入适量样品溶液,反应 20 min 后,测定 OD 值。每个样品平行操作 3 次,取其平均值计算 IC_{50} 值。

空白对照:同上述操作,加与样品同体积的 DMSO,不加样品和 XO。

XO 对照测定:方法与样品测定相同,不加样品。

阳性对照品:为核对试验方法与结果的可信性,取已配制好的不同浓度的别嘌呤溶液,重复上述试验,计算 IC_{50} 值。

测定顺序如下:

用移液枪按如下顺序吸取试剂于 96 孔板内:① 0.285 mL 缓冲液(50 mmol/L 磷酸氢二钾缓冲液 $\text{pH}=7.5$),② 0.25 mL 样品溶液,③ 0.1 mL EDTA(1 mmol/L 缓冲溶液配制),④ 0.330 mL 黄嘌呤溶液,⑤ 0.035 mL XO 溶液,⑥ 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 后,290 nm 测定吸收值。

1.3.3 尿酸标准曲线建立

按表 1、表 2 制备尿酸系列溶液。

表 1 尿酸系列溶液配制

尿酸/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	DMSO/ μL	双蒸水/ μL
0	20	4 980
0.672	20	4 976
1.344	20	4 972

续表 1 尿酸系列溶液配制

尿酸/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	DMSO/ μL	双蒸水/ μL
2.016	20	4 968
2.688	20	4 964
3.360	20	4 960
4.032	20	4 956
4.704	20	4 952
5.376	20	4 948

表 2 尿酸标准曲线

Table 2 Uric acid standard curve

尿酸/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	吸光度测得值	吸光度(测得值-空白值)
0	0.199	0
0.672	0.230	0.031
1.344	0.253	0.054
2.016	0.280	0.081
2.688	0.305	0.106
3.360	0.326	0.127
4.032	0.352	0.153
4.704	0.381	0.182
5.376	0.404	0.205

每一浓度取 0.2 mL 于 96 孔板中,混匀后,290 nm 处测吸光度,以测得的吸光度为纵坐标,尿酸浓度为横坐标,获得标准曲线 $Y=0.037 6x + 0.003 2$ ($R^2 = 0.999$)。

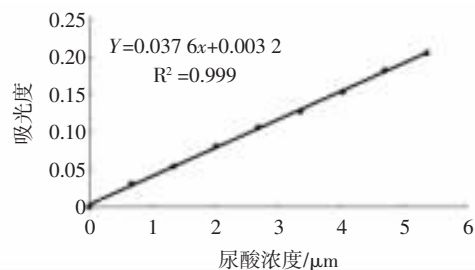


图 1 尿酸标准曲线

Fig.1 Uric acid standard curve

2 结果与分析

2.1 体外 XO 活性测定

以抑制率为因变量,以样品浓度为自变量,采用 SPSS 11.5 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} 。试验结果见表 3。

2.2 酶抑制动力学分析(Lineweaver-Burk plots)

酶抑制动力学实验能进一步确定化合物抑制酶的特性,其测定方法为,同一样品浓度对不同底物(黄嘌呤)浓度(0、0.304、0.456、0.608、1.064、1.216、1.976、3.040 $\mu\text{g}/\text{mL}$),同一底物浓度(黄嘌呤)对不同样品浓

度(228、114、57、28.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在反应体系中进行反应,测得一系列 OD 值。用 Diox 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 11.5 统计软件包计算回归方程。求出四直线的交点,可得到抑制动力学参数 K_i 。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。试验结果表明该复合萃取物为 XO 竞争性抑制剂,其 K_i 值为 53.0 μg ,见表 3。

表 3 复合萃取物抑制 XO 的 IC_{50} 与 K_i ($n=3$)

Table 3 The IC_{50} and K_i of the XO inhibition of the extractive complex

样品	$IC_{50}/(\mu\text{g}/\text{mL})$	$K_i/\mu\text{g}$	抑制类型
复合萃取物	56.86 ± 8.22	53.0	竞争
别嘌呤	0.94 ± 0.07	0.8	竞争

3 结论

通过本论文研究发现该复合萃取物具有较好的

抑制 XO 活性,其 IC_{50} 为 56.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。虽然该复合萃取物没有别嘌呤效果明显,但在人们生活质量日益提高及对健康迫切需求的时代,天然健康的食品及复合萃取物已越来越受到人们的喜爱,服用天然植物萃取物作为调节身体健康的补充剂已成为时尚。因此,将该复合萃取物开发为天然防治痛风的保健食品具有极大的前景,其在体内对 XO 的抑制作用,将在后续的试验中进一步验证。

参考文献:

- [1] 朱深银,周远大,刘庆山,等.黄嘌呤氧化酶抑制剂高通量筛选模型的建立及应用[J].中国药学杂志,2007,42(3):187-190
- [2] 祁鑫,王昌禄,李凤娟,等.常见蔬菜提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的筛选研究[J].现代食品科技,2011,27(5):511-514
- [3] 吴新荣,臧路平,刘志刚.抗高尿酸血症药物作用靶点研究进展[J].中国药理学通报,2010,26(11):1414-1417
- [4] BAKER J F, KRISHNAN E, CHEN L, et al. Serum uric acid and cardiovascular disease: recent developments, and where do they leave us[J].Am J Med, 2005, 118(8):816-826

收稿日期:2015-07-17

(上接第 188 页)

- [7] Takeara R,Albuquerque S,Lopes N,et al. Trypanocidal activity of *Lychophora staaivoides* Mart (Vernonieae, Asteraceae) [J]. Phytomed, 2003, 10(6/7):490-493
- [8] Muzitano M F, Tinoco L W, Guette C, et al. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata* [J] Phytochem,2006,67: 2071-2077
- [9] Ustun O, Ozcelik B, Akyon Y, et al. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves Original Research Article[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 108(3):457-461
- [10] Wei F, Ma S C, Ma L Y, et al. Antiviral Flavonoids from the Seeds of *Aesculus chinensis* [J]. J Nat Prod, 2004, 67(4):650-653
- [11] Lall N, Hussein A A, Meyer J J M. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents [J]. Fitoterapia, 2006, 77(3):230-232
- [12] Du J, He Z D, Jiang R W, et al. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L [J] Phytochem, 2003, 62(8): 1235-1238
- [13] Evers D L, Chao C F, Wang X, et al. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action [J]. Antiviral Res, 2005, 68(3):124-134
- [14] 郑晓珂,宁桃丽,王小兰,等.卷柏总黄酮及穗花杉双黄酮对人脐静脉内皮细胞增殖及 VEGF 蛋白表达的影响 [J]. 中国药杂志,2011, 46(13):998
- [15] Ajay M, Achike F I, Mustaf M R. Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid [J]. Pharmacol Res, 2007, 55(5):385-391
- [16] 姜秀娟,王旭辉,李奕,等.木贼总黄酮对 ox-LDL 损伤内皮细胞保护作用的形态学观察 [J]. 时珍国医国药,2012,23(3):637-638
- [17] 孙曙光,李玉洁,李玲玲,等.卷柏黄酮对小鼠中枢神经系统的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版),2014,49(5):678-680
- [18] Dixit M, Tripathi B K, Tamrakar A K, et al. Synthesis of benzofuran scaffold-based potential PTP1B inhibitors [J] Bioorgan & Med. Chem, 2007, 15(2):727-734
- [19] Hamann I, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, et al. Effects of isoflavonoids and other plant-derived compounds on the hypothalamus-pituitary-thyroid hormone axis [J] Maturitas, 2006, 55(S1):14-25
- [20] Choi J S, Choi H K, Shin S C. Enhanced bioavailability of paclitaxel after oral coadministration with flavone in rats [J]. Int J Pharm, 2004, 275(1/2):165-170
- [21] Brand W, Schutte M E, Williamson G, et al. Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients [J]. Biomed & Pharmacother. 2006, 60(9):508-519
- [22] Lee M H, Lin Y P, Hsu F L, et al. Bioactive constituents of *Spatholobus suberectus* in regulating tyrosinase-related proteins and mRNA in HEMn cells [J]. Phytochem, 2006, 67(12):1262-1270

收稿日期:2015-07-01