

9 种中药提取物黄嘌呤氧化酶抑制活性研究

杨道茂^{1*}, 欧阳明安²

¹华侨大学化工学院生物工程系 油脂与天然产物实验室, 厦门 361021;

²福建农林大学生物农药和化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002

摘要: 本文考察 9 种中药植物(葛花、卷柏、卷柏根、猫须草、鹅不食草、高良姜、绞股蓝、鸡骨草、金银花)提取物对黄嘌呤氧化酶抑制活性。结果表明 9 种中药提取物在 2 mg/mL 时均具有较好抑制活性, 抑制率从 33% ~ 79% 不等。葛花、猫须草和金银花半抑制浓度分别是 0.65、0.96、0.74 mg/mL, 且猫须草、葛花抑制类型属于竞争性抑制为主的复合抑制。

关键词: 黄嘌呤氧化酶抑制活性; 中药材; IC₅₀; 复合抑制

中图分类号: R285.1

文献标识码: A

Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Extracts Obtained from 9 Chinese Herbal Medicines

YANG Dao-mao^{1*}, OUYANG Ming-an²

¹Laboratory of Oil and Natural Product, Department of Biotechnology and Bioengineering, Huaqiao University,

Xiamen 361021, China; ²Key Laboratory of Biopesticide and chemistry Biology, Ministry of Education, Fujian

Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: In this study, the xanthine oxidase inhibitory activities of extracts obtained from 9 Chinese herbal medicines (*Flos puerariae*, *Herba selaginellae*, root of *Herba selaginellae*, *Orthosiphonari status*, *Herba centipedae*, *Alpinia officinarum* Hance, *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, *Herba abri*, *Lonicera japonica*) were investigated. The results showed that all extracts had significant inhibitory effects under the concentration of 2 mg/mL, and the inhibition rate ranged from 33% to 79%. The half-inhibitory concentrations (IC₅₀) of *F. puerariae*, *O. status*, *L. japonica* were determined to be 0.65, 0.96, 0.74 mg/mL, respectively. The inhibition type was of competitive-induced mixed inhibition.

Key words: xanthine oxidase inhibitory activity; Chinese herbal plants; IC₅₀; mixed inhibition

黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD, EC1. 1. 3. 22)是人体内核酸代谢中重要的酶,能催化黄嘌呤和次黄嘌呤氧化生成尿酸,同时产生过氧化物自由基,尿酸浓度过高将导致高尿酸血症,可引起痛风发作,且反应中生成的过氧化氢对人体内细胞有严重的损害作用。减少人体内过多尿酸和过氧化氢的方法之一是降低黄嘌呤氧化酶的活性,通过抑制黄嘌呤氧化酶活性,减少黄嘌呤向尿酸的转化,从根本上减少体内尿酸的生成,从而达到治疗痛风的作用^[1]。

黄嘌呤氧化酶抑制剂(xanthine oxidase inhibitor, XODI)类抗痛风药物,主要是上世纪 60 年代上市的别嘌呤醇为代表,虽然一直沿用至今,但是副作

用明显。因此,在天然药物中寻找高效低毒的 XODI 一直是个很有意义的研究课题,相关研究也取得了一定进展,如 Li H 等人^[2]发现桑廷和美苍耳素对 XOD 的 IC₅₀值是 36.5 和 36.0 μM。Nguyen MTT 等人^[3]从菊花青树(*Chrysanthemum sinense*)的花部位甲醇提取物中分离得到 28 种化合物,其中化合物 2 ~ 11 和 22 的 IC₅₀是 0.13 ~ 2.31 μM,效果比阳性对照别嘌呤醇(2.50 μM)更好,显示较好的开发前景。Lin KW 等人^[4]从 *Garcinia subelliptica* 的树皮、心材和种子中分离得到 5 种化合物,其中化合物 1 ~ 3 显示一定的 XODI 活性,IC₅₀在 50 ~ 150 μM 之间。祁鑫等人^[5]考察了 29 种蔬菜提取物的 XODI 效果,结果表明在 200 mg/mL 浓度下,29 种甲醇提取物中有 20 种具有 XODI 效果,并且有 3 种抑制率超过 50%。杨琴芳等人^[6]考察了买麻藤提取物的 XODI

效果,其 IC_{50} 为 254 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本论文从《常用中草药手册》(人民卫生出版社,1969年)中选择民间常用于祛风寒湿、清热解毒等功能的9种中药材,研究其 XODI 效果,为进一步分离药效物质做准备。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

黄嘌呤氧化酶(从奶油提取获得)、黄嘌呤、别嘌呤醇购自 Sigma,其它药品如 EDTA-2Na、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 等均为国产分析纯试剂。Spectra-MAX190 酶标仪(Molecule Device 仪器设备公司)。

9种中药材(葛花、卷柏、卷柏根、猫须草、鹅不食草、高良姜、绞股蓝、鸡骨草、金银花)购自厦门同仁堂药店,粉碎后备用。

1.2 浸膏制备

将9种中药材 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浸提 7 d,重复3次,合并浸提液,旋转蒸发仪浓缩获得水溶性浸膏,避光保存备用。

将9种中药材室温下甲醇浸提 7 d,重复3次,合并浸提液,旋转蒸发仪浓缩获得脂溶性浸膏,避光保存备用。

1.3 溶液配制^[7]

1.3.1 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配制

精密称取 KH_2PO_4 0.4780 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.4730 g, EDTA-2Na 9.3100 mg,去离子水 240 mL,超声促溶后常温下定容至 250 mL,最终得到 75 mM PBS(pH 7.4,含 200 μM EDTA)。

1.3.2 底物配置

精密称取黄嘌呤 12.20 mg,加入少量 1 M 的 NaOH 溶解,加入约 30 mL 去离子水,超声促溶,室温下用 1 M 的 HCl 调整 pH 至 7.5,定容至 50 mL,即可得到 0.16 mM 的黄嘌呤底物溶液(每天新鲜配制)。

1.3.3 酶液配制

取 24 μL 黄嘌呤氧化酶(5 U/mL),用 216 μL 的 PBS 稀释,获得 0.5 U/mL 酶液母液。母液稀释 5 倍,获得 1.2 mL 工作酶液(0.1 U/mL)。配制完毕立即放入冰盒保存并进行 XODI 活性检测。

1.3.4 对照组溶液配制

选用别嘌呤醇为对照品,精密称取适量药品配制成 7 个浓度(2000、1000、500、200、100、50、12.5 μM)待用。

1.3.5 样品溶液的配制

水溶性样品溶液:精密称取适量样品配制成 3 mL 母液(1~2 mg/mL),装于 1.5 mL 离心管备用。

脂溶性样品溶液:称取适量样品,先用少量甲醇溶解,然后用蒸馏水稀释并定容到 2~5 mg/mL 样品母液(要求甲醇浓度低于 10%)。

1.4 检测方法

黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的催化作用下生成尿酸,产物尿酸在 $OD_{290\text{nm}}$ 处有特征吸收峰,以 $OD_{290\text{nm}}$ 处每分钟吸光度的增加来计算酶活力。酶活性单位定义为:在本实验条件下黄嘌呤氧化酶与黄嘌呤作用后,每分钟催化 1 μmol 黄嘌呤转化为尿酸的酶量为 1 个活性单位(U/L)^[6,8]。

实验参考 Nguyen 等人做法^[3,8,9]并做些调整,具体实验流程如下:将样品(空白组用 PBS 代替) 100 μL 、酶液 50 μL (0.1 U/mL)依次加入 96 孔板,在酶标仪上 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min。加入黄嘌呤底物溶液 50 μL 启动反应。设置酶标仪测量模式为动力学模式,波长为 290 nm,每隔 10 s 检测一次,记录 5 min 内的光度值变化。

实验设置 3 组:样品组(加样品、底物和酶)、空白组(只加底物不加样品不加酶)和酶组(只加底物和酶不加样品),每组实验重复 2 次,每个样品平行设置三个重复孔,阳性对照采用别嘌呤醇。

抑制率(%)的计算:通过计算样品组、空白组和酶组的 $OD_{290\text{nm}}$ 值变化速率,即斜率 K 的大小来计算酶活力,进而求出其抑制率。其抑制率公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{K_{\text{酶}} - K_{\text{样品}}}{K_{\text{酶}} - K_{\text{空白}}} \times 100\%$$

其中, K 为 $OD_{290\text{nm}}$ 斜率。检测时间一般是 0~5 min,从实际的拟合效果来看选取 30~200 s,此时酶活曲线斜率相关性比较好。

2 实验步骤

2.1 水溶性样品的 XODI 初筛

将 9 种植物的水溶性样品进行 XODI 初筛。

2.2 有机溶剂 XODI 影响

考察有机溶剂甲醇对 XOD 活性影响,选择 6 种甲醇浓度(20%、10%、5%、2.5%、1.25%、1%、0.625%),检测 XODI 数值。

2.3 脂溶性样品 XODI 检测

样品母液稀释 10 倍后检测 XODI 活性。检测流程同水溶性样品。

2.4 IC₅₀考察

将初筛时抑制率大于 50% 的样品稀释至 5 个浓度梯度 (500、250、125、62.5、31.25 μg/mL), 考察样品浓度-抑制率关系。根据抑制剂浓度和抑制率关系图进行方程回归, 计算其 IC₅₀。

2.5 抑制类型判断

实验原理参考 Kong L. D. 等人的做法^[10,11]并做些调整。考察在 2 种黄嘌呤底物浓度 (0.08、0.04 mM) 下酶活曲线的交互情况从而判断其抑制类型。

3 结果与分析

3.1 水溶性样品 XODI 初筛。

水溶性样品的初筛结果如图 1 所示。

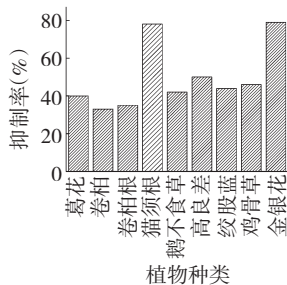


图 1 9 种中药植物水溶性提取物 XODI 结果

Fig. 1 XODI activity of water-soluble extracts of the 9 investigated herbal medicines

注: 样品浓度 2 mg/mL (葛花浓度 1 mg/mL)

Note: The concentrations of samples were 2 mg/mL, except *F. puerariae* (1 mg/mL)

阳性对照别嘌呤醇 IC₅₀ 为 3.164 μmol/L, 即 0.431 μg/mL, 与文献报道数据 4.935 × 10⁻² μg/mL^[12] 接近。

3.2 有机溶剂对酶活影响

甲醇对 XODI 效果见图 2 所示。

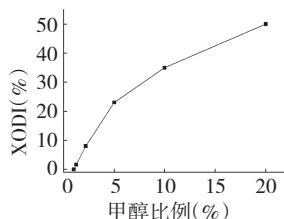


图 2 甲醇对 XOD 抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effect of methanol on XOD

从图 2 可以看出甲醇对 XOD 具有较明显的抑制效果。实验发现当甲醇终浓度降至 1.25% 时, 抑制率为 1.6%, 此时甲醇对酶活抑制干扰较小。因

此, 在检测脂溶性样品时, 控制反应体系甲醇最终浓度低于 1% 从而减少试验误差。

3.3 脂溶性成分的 XODI 效果

抽取 7 种植物的脂溶性样品, 考察其 XODI 效果, 结果见表 1。

表 1 7 种中药植物脂溶性提取物 XODI 活性

Table 1 XODI activity of lip-soluble extracts of 7 herbal medicines

植物名 Herb name	浓度 Concentration (μg/mL)	甲醇含量 Methanol (%)	抑制率 Inhibition rate (%)
葛花 <i>F. puerariae</i>	117	1.0	61
卷柏 <i>H. selaginellae</i>	135	1.0	52
卷柏根 root of <i>H. selaginellae</i>	212	2.0	63
猫须草 <i>O. status</i>	450	1.0	86
	45	0.1	57
鹅不食草 <i>H. centipediae</i>	105	1.0	36
绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>	191	2.0	50
	9.55	0.1	25
鸡骨草 <i>H. abri</i>	122	1.0	61
	12.2	0.1	6.8

从表 1 数据可以看出, 脂溶性提取物在去除甲醇影响后, 抑制率并不高。对比水溶性样品数据, 表明 9 种中药材的 XODI 抑制活性部位主要是水溶性成分, 即高极性部位。

从图 1 和表 1 的数据可以看出, 所选用的 9 种药用植物都具有 XODI 效果, 活性部位以水溶性成分为主, 这与民间治疗风湿性关节炎用途相吻合。9 种中药植物中, 葛花、猫须草和金银花的水溶性组分抑制率分别是 40%、78%、79%。对比相关研究结果, 如朱田密、陈科力等人^[13]从垫状卷柏中分离获得穗花杉双黄酮、罗波斯塔黄酮等双黄酮成分并确定对 XOD 具有明显的抑制作用。李英、陈君等人^[7]则是从金银花中分离到的 20 个单体化合物进行了筛选, 发现 8 个酚酸类成分和 4 个黄酮类成分具有黄嘌呤氧化酶抑制活性, 其中 3,4-二咖啡酰奎宁酸甲酯、槲皮素和木犀草素有很好的活性, 其 IC₅₀ 分别是 8.36、6.46 和 2.08 μmol/L。从化合物角度进一步验证该药用植物具有 XODI 活性。

3.4 IC₅₀ 的计算

通过对 9 种植物水溶性和脂溶性样品抑制活性考察, 结果表明均具有一定 XODI 活性, 其中以葛花、猫须草、金银花抑制数据较高。考察这 3 种植物水溶性提取物的 IC₅₀ 值, 其浓度-抑制率的关系见图 3。

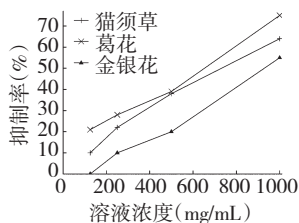


图3 3种植物水溶性组分浓度-抑制率关系图

Fig. 3 Concentration-Inhibition rate curve of water-soluble extracts of 3 herbal medicines

从图3应用 IC_{50} 计算器软件计算,求得各样品的 IC_{50} 值见图4。

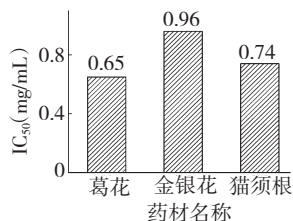


图4 3种药用植物的 IC_{50} 值

Fig. 4 The IC_{50} values of 3 herbal medicines

由图4可以看出,3种药用植物中,葛花的 IC_{50} 最低,抑制效果最好,金银花抑制效果最差,猫须草居中。对比文献,赵雪梅等人^[12]考察了猫须草的不同极性提取物的 XODI 效果,结果发现乙酸乙酯提取物的 IC_{50} 最小,其 IC_{50} 为 $0.881 \mu\text{g}/\text{mL}$,无水乙醇提取物次之, IC_{50} 为 $4.022 \mu\text{g}/\text{mL}$,石油醚提取物的 IC_{50} 为 $19.042 \mu\text{g}/\text{mL}$,水提部位效果最差, IC_{50} 为 $113.099 \mu\text{g}/\text{mL}$,可见猫须草中乙酸乙酯提取物是抑制黄嘌呤氧化酶活性的有效部位。数据有差异的原因估计是作者采用 XOD 试剂盒检测,因此比较精确。但是结果属于微克级别是相同的。

3.5 2种药用植物酶活抑制类型的判断

选择 IC_{50} 最低的两组植物,即葛花和猫须草进行抑制类型的判断实验。做 Dixon 图,结果见图5和图6。

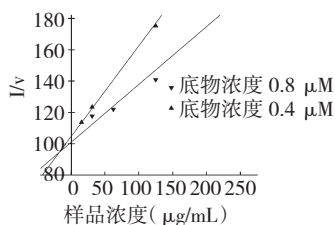


图5 猫须草水溶性粗提取物 Dixon 图

Fig. 5 Dixon plot of water-soluble extract of *O. status*

由图5可知,猫须草水溶性粗提取物的两条 Dixon 直线在第二象限接近 Y 轴的地方相交,由酶抑制类型判断属于竞争性为主的复合抑制类型。

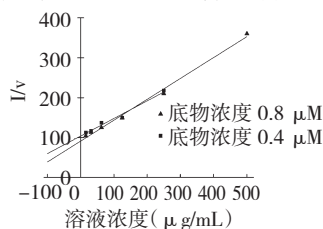


图6 葛花水溶性粗提取物 Dixon 图

Fig. 6 Dixon plot of water-soluble extract of *F. puerariae*

由图6可知,葛花粗提取物的 Dixon 图显示在2种不同底物浓度下2条曲线相交于靠近于 Y 轴的第一象限,属于以竞争性抑制为主的复合抑制。根据已有文献研究结果^[10],2者的结论是一致的。

4 讨论

9种植物作为中草药使用由来已久,如《常用中草药手册》(人民卫生出版社,1969年)记载鸡骨草用于风湿疼痛治疗。通过本实验的研究,发现并证实了9种植物均具有 XODI 活性,其活性部位主要存在于水溶性成分中,即是以高极性部位为主, IC_{50} 在 $0.65 \sim 0.96 \text{ mg}/\text{mL}$ 之间,抑制类型以竞争性抑制为主的复合抑制。

参考文献

- Zhang XH, Wu YD. A theoretical study on the mechanism of the reductive half-reaction of xanthine oxidase. *Inorg Chem*, 2005, 44: 1466-1471.
- Li H, Meng JC, Cheng CK, et al. New guaianolides and xanthine oxidase inhibitory flavonols from *Ajania fruticulosa*. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1053-1055.
- Nguyen MTT, Awake S, Tezuka Y, et al. Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*. *Planta Med*, 2006, 72: 46-51.
- Lin KW, Huang AM, Tu HY, et al. Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human NTUB1 cells through a ROS-dependent mechanism. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 407-414.
- Qi X(祁鑫), Wang CL(王昌禄), Li FJ(李凤娟), et al. Inhibitory effects of the extracts of some common vegetables on xanthine oxidase. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2011, 27: 511-554.