

迷迭香酸对黄嘌呤氧化酶的抑制作用

尚雁君¹, 黄才国^{1*}, 蒋三好², 朱大元², 魏善建¹, 焦炳华¹

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学和分子生物学教研室, 上海 200433, 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 研究迷迭香酸对黄嘌呤氧化酶的抑制作用。 **方法:** 将 20、40、60 $\mu\text{g/ml}$ 迷迭香酸或 1 $\mu\text{g/ml}$ 阳性对照别嘌呤醇, 分别加入黄嘌呤溶液(测尿酸生成量: 1 mmol/L; 测超氧离子: 50 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.1 U/ml 黄嘌呤氧化酶中, 用生化仪测定 5 min 尿酸生成量和超氧离子生成(NBT 显色法)。在 1 ml $2 \times 10^5/\text{ml}$ HL-60 细胞悬液中加入 100 μl 6 mol/L 黄嘌呤、100 μl 0.1 U/ml 黄嘌呤氧化酶、500 $\mu\text{g/ml}$ 迷迭香酸, 分别以 Annexin V-PI 双标试剂盒(以 1 $\mu\text{g/ml}$ 别嘌呤醇为阳性对照)或细胞周期法(以 100 U/ml SOD 为阳性对照)测定细胞凋亡率。 **结果:** 迷迭香酸显著抑制尿酸生成和超氧离子引起的 NBT 显色, 两种方法测得其 IC_{50} 分别为 56 $\mu\text{g/ml}$ 和 21 $\mu\text{g/ml}$; 对细胞凋亡的抑制率均在 40% 以上。 **结论:** 迷迭香酸是黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂。

[关键词] 迷迭香酸; 黄嘌呤氧化酶; 尿酸; 超氧离子; 细胞凋亡

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0189-03

Inhibition of xanthine oxidase by rosmarinic acid

SHANG Yan-jun¹, HUANG Cai-guo^{1*}, JIANG San-hao², ZHU Da-yuan², WEI Shan-jian¹, JIAO Bin-hua¹ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai 201203)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the inhibitory effect of rosmarinic acid on xanthine oxidase. **Methods:** Xanthine oxidase (0.1 U/ml) was incubated with xanthine (1 mmol/L for determining formation of uric acid; 50 $\mu\text{mol/L}$ for determining superoxide anions) in the presence of 20, 40 and 60 $\mu\text{g/ml}$ rosmarinic acid or allopurinol as positive control. The formation of uric acid was determined by automatic biochemical analyzer 5 min after reaction and the production of superoxide anions was measured by Nitro Blue Tetrazolium (NBT) reduction. HL-60 cells (1 ml, $2 \times 10^5/\text{ml}$) were pretreated with xanthine (100 μl , 6 mol/L) and xanthine oxidase (100 μl , 0.1 U/ml), then rosmarinic acid (500 $\mu\text{g/ml}$) or allopurinol (1 $\mu\text{g/ml}$, as positive control) (Annexin V-PI kit) was added to determine the cell apoptosis rate. HL-60 cells (1 ml, $2 \times 10^5/\text{ml}$) were also pretreated with xanthine (100 μl , 6 mol/L) and xanthine oxidase (100 μl , 0.1 U/ml), then rosmarinic acid (500 $\mu\text{g/ml}$) or SOD (100 U/ml, as positive control) (cell cycle method) was added to determine the cell apoptosis rate. **Results:** Rosmarinic acid obviously inhibited the production of uric acid and superoxide anion-induced reaction in NBT assay, with their IC_{50} being 56 $\mu\text{g/ml}$ and 21 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The rates of apoptosis inhibition by rosmarinic acid were both over 40% by Annexin V-PI kit and cell cycle method. **Conclusion:** Rosmarinic acid is a competitive inhibitor of xanthine oxidase.

[KEY WORDS] rosmarinic acid; xanthine oxidase; uric acid; superoxide anions; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 189-191]

丹参是临床上常用的活血化瘀药, 是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根, 常用于妇科病、冠心病、缺血性脑卒中、动脉粥样硬化等症的治疗。临床上丹参制剂对冠心病、脑血栓、肝炎、肝硬化等有显著的疗效。丹参的活性成分主要分为脂溶性和水溶性两类。中医传统用药方法是用其水煎剂, 即丹参的水溶性部位, 所以研究丹参的水溶性成分更有意义^[1]。研究表明其水溶性成分主要是丹参素、原儿茶醛、丹酚酸。丹酚酸是一类既有咖啡酰缩酚酸结构又有新木脂素骨架的水溶性成分。丹酚酸类化合物包括丹酚酸 A、B、C、D、E、F、G、H、I, 迷迭香酸 (rosmarinic acid), 紫草酸 (lithospermic acid)

等, 其中迷迭香酸是由 1 分子丹参素和 1 分子咖啡酸缩合而成。黄嘌呤氧化酶是人体内产生尿酸过程中的关键酶, 同时也是治疗痛风时药物的作用靶点, 本文研究其对黄嘌呤氧化酶的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 试剂 HL-60 细胞株, 购自上海中国科学院细胞所; Annexin V-PI 双标试剂盒购自晶美公司; 黄

[基金项目] 国家自然科学基金 (29632050)。Supported by National Natural Science Foundation of China (29632050)。

[作者简介] 尚雁君, 硕士生。E-mail: syjsmmu@163.com

* Corresponding author. E-mail: huangcaig@hotmail.com

嘌呤(xanthine) 购自美国 Sigma 公司; 别嘌呤醇(allopurinol) 购自美国 Sigma 公司; 四唑硝基氮蓝(Nitro Blue Btetrazolium) 购自美国 Sigma 公司; 黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase) 购自 Roche 公司; 焦磷酸钠盐(sodium pyrophosphate decahydrate ace reagent) 购自 ICN Biomedical 公司; 迷迭香酸由中国科学院上海药物所提供。

1.2 测定尿酸生成 1 mmol/L 黄嘌呤溶液中加入 20、40 和 60 $\mu\text{g/ml}$ 的迷迭香酸或阳性对照别嘌呤醇(1 $\mu\text{g/ml}$), 加入 0.1 U/ml 黄嘌呤氧化酶, 反应体系中加入焦磷酸钠缓冲液(80 mmol/L、pH 值 8.5) 至终体积 1 ml, 反应以加入黄嘌呤氧化酶为开始, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 在全自动生化分析仪(日立-7600-020)测定尿酸生成量, 以 5 min 的尿酸生成量作为反应速度。

1.3 测定超氧离子生成

1.3.1 NBT 显色反应 反应体系中加入黄嘌呤(50 $\mu\text{mol/L}$)、黄嘌呤氧化酶(0.1 U/ml)、NBT(50 $\mu\text{mol/L}$)和 20、40 和 60 $\mu\text{g/ml}$ 的迷迭香酸或阳性对照别嘌呤醇(1 $\mu\text{g/ml}$), 反应体系中加入磷酸盐缓冲液(50 mmol/L、pH 值 7.2)至终体积 600 μl 。反应以加入黄嘌呤氧化酶为开始, 室温反应 5 min, 用 CE-2021 分光光度计在 560 nm 下测定光密度(D_{560}), 波长 560 nm, 以每分钟的光密度增加量作为反应速度。黄嘌呤溶解于 1 $\mu\text{mol/L}$ NaOH, 其他组分溶解于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 0.1 mmol/L EDTA 所配溶液^[2]。

1.3.2 细胞凋亡测定

1.3.2.1 Annexin V-PI 双标试剂盒测定细胞凋亡 将 HL-60 细胞离心(1 500 r/min, 5 min), 弃上清, 无血清培养基洗涤 2 次, 再用无血清培养将细胞定容至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 取 1 ml 细胞悬液加入 100 μl 6 mmol/L 黄嘌呤和浓度为 500 $\mu\text{g/ml}$ 的迷迭香酸或 1 $\mu\text{g/ml}$ 阳性对照别嘌呤醇, 再加入 100 μl 0.1 U/ml 黄嘌呤氧化酶, 反应 4~6 h, 将反应好的细胞离心(1 500 r/min, 5 min), 用 PBS 充分洗涤, 取出总数约 $(5 \sim 12.5) \times 10^4$ 的细胞待测, 用结合缓冲液重新悬浮细胞并使其密度为 $(2 \sim 5) \times 10^5/\text{ml}$, 取 195 μl 的细胞悬液加入 5 μl 的 Annexin V/FITC, 室温避光 10 min, 用 190 μl 的结合缓冲液洗细胞 1 次, 190 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞, 加入 10 μl 20 $\mu\text{g/ml}$ 的碘化丙啶(PI)溶液, 流式细胞仪分析^[3,4]。

1.3.2.2 细胞周期法测定细胞凋亡 取无血清培养基定容细胞密度 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 取 1 ml 细胞悬液加入 100 μl 6 mmol/L 黄嘌呤和浓度为 500 $\mu\text{g/ml}$ 的

迷迭香酸或浓度为 100 U/ml 阳性对照 SOD, 加入 100 μl 0.1 U/ml 黄嘌呤氧化酶反应 12 h 和 24 h, 反应好的细胞离心(1 500 r/min, 5 min), 用 PBS 充分洗涤 1~2 次, 在最后一次洗涤后加入等体积的 75% 乙醇将细胞悬浮、固定。将固定后的细胞离心(1 500 r/min, 5 min), 用 PBS 洗涤 1~2 次, 在最后一次洗涤后加入 300 μl 的 PI 将细胞重新悬浮, 每管中再加入 5 μl RNA 酶, 反应 0.5 h, 流式细胞仪测定^[5,6]。

2 结果

2.1 迷迭香酸对尿酸生成的影响 Lineweaver-Burk 作图(图 1)表明迷迭香酸显著抑制了尿酸的生成, 是黄嘌呤氧化酶的竞争性抑制剂。以抑制剂浓度对抑制率作图得迷迭香酸的半数抑制剂量(IC_{50}) 为 56 $\mu\text{g/ml}$, 其 95% 的可信区间为 53.2~58.8 $\mu\text{g/ml}$ 。

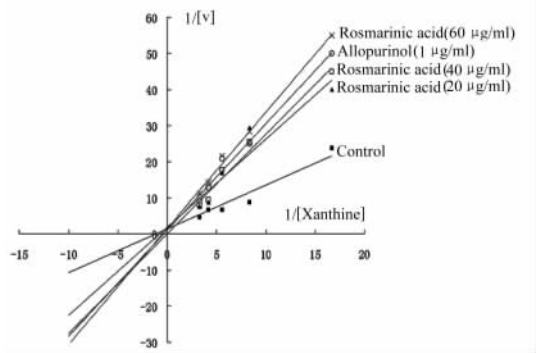


图 1 迷迭香酸对黄嘌呤氧化酶的 Lineweaver-Burk 曲线
Fig 1 Lineweaver-Burk curve of inhibitory effect of rosmarinic acid on xanthine oxidase

2.2 迷迭香酸对超氧离子所致 NBT 显色反应的影响 迷迭香酸显著抑制了黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶反应体系中产生的超氧离子所致的 NBT 显色反应, 同样以抑制剂浓度对抑制率作图得迷迭香酸的 IC_{50} 为 21 $\mu\text{g/ml}$, 其 95% 的可信区间为 19.5~22.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.3 迷迭香酸对超氧离子所致细胞凋亡的影响

2.3.1 通过 Annexin V-PI 双标试剂盒测定 结果表明, 空白细胞的凋亡率为 0.20%, 当在细胞中加入了黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应后细胞凋亡率有了明显的增加(12.22%), 而在加入别嘌呤醇或迷迭香酸后细胞凋亡率就分别下降到 7.21% 和 4.21% ($P < 0.01$), 说明迷迭香酸显著抑制了超氧离子的生成。

2.3.2 细胞周期法测定细胞凋亡 在孵育 12 h 后

空白细胞的凋亡率为 6.78%,加入黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应 12 h,其凋亡率就上升到了 32.43%,而在加入 SOD 和迷迭香酸后其细胞凋亡率分别下降到了 16.18%和 11.70%($P < 0.01$);孵育 24 h 空白组细胞凋亡率为 3.75%,加入黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应 24 h 后其凋亡率上升到了 28.78%,而在加入 SOD 和迷迭香酸后其细胞凋亡率分别下降到了 15.51%和 17.27%($P < 0.01$),同样说明迷迭香酸显著抑制了超氧离子的生成。

3 讨论

迷迭香酸的抗炎、抗过氧化作用已有报道^[7],而其对黄嘌呤氧化酶的抑制作用未见国内外文献报道。我们首次发现其为较强的黄嘌呤氧化酶抑制剂,已申请了国家发明专利(申请号:200410084620),最近日本学者也发现迷迭香酸的类似物咖啡酸也有较强的黄嘌呤氧化酶抑制作用^[8],而且这类化合物与黄嘌呤的结构有相似之处,推测这类结构的物质对黄嘌呤氧化酶的活性中心有竞争性的结合,动力学作图也证明其为竞争性抑制剂。尿酸在体内沉积不仅会导致高尿酸血症和痛风,还会通过多种机制如:刺激呼吸系统中中性粒细胞的大量浸润和白三烯的大量生成等,引起炎症反应^[9],其中呼吸作用过程中产生的超氧离子也是导致炎症的原因之一,所以在实验中对迷迭香酸对超氧离子的清除作用做了进一步的研究,以证明迷迭香酸在缓解炎症作用的效果。本实验初步证实迷迭香酸有可能成为治疗高尿酸血症和痛风的药物。

通过尿酸生成法测定的迷迭香酸对黄嘌呤氧化酶的 IC_{50} 为 56 $\mu\text{g}/\text{ml}$,而通过超氧离子生成法测定的迷迭香酸对黄嘌呤氧化酶 IC_{50} 为 21 $\mu\text{g}/\text{ml}$,从理

论上讲两者的值应该是一致的,但显然后者值要低很多,可能的原因是迷迭香酸除了对黄嘌呤氧化酶有抑制作用之外,还有直接清除自由基的作用,这在我们设计的迷迭香酸对邻苯三酚产生的自由基清除作用中得到证实(结果另文发表)。

[参考文献]

- [1] 李朝霞,王地. 丹参水溶性成分的研究进展[J]. 北京中医药大学学报,2004,23:176-178.
- [2] Valenta P, Fernandes E, Carvalho F, et al. Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity [J]. J Agric Food Chem, 2001,49:3476-3479.
- [3] Lin CM, Chen CS, Chen CT, et al. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,294:167-172.
- [4] Cimanga K, Ying L, De Bvuyne T, et al. Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from *Bridelia ferruginea* stem bark [J]. J Pharm Pharmacol, 2001,53:757-761.
- [5] 李立宏,高国栋,王学廉,等. 多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的免疫组织化学及超微结构分析 [J]. 第四军医大学学报, 2001,22(4):326-329.
- [6] 吴俊芳,王洁,苏丹,等. 神经生长因子大鼠脑皮质神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 1999,15:80-83.
- [7] 吴建章,郁建平,赵东亮. 迷迭香酸的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2005,17:383-387.
- [8] 吉積一真,西岡信雄,辻智子. プロポリスのキサントキシンダーゼ活性阻害作用及び血漿尿酸値低下作用 [J]. 薬学雑誌, 2005,125:315-321.
- [9] Nguyen MTT, Awale S, Tezuka Y, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of vietnamese medicinal plants [J]. Biol Pharm Bull, 2004,27:1414-1421.

[收稿日期] 2005-07-21

[修回日期] 2005-10-13

[本文编辑] 尹茶

Three new asterosaponins from the starfish *Culcita novaeguineae* and their bioactivity

Tang HF, Yi YH, Li L, Sun P, Zhang SQ, Zhao YP (Research Center for Marine Drugs, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Bioassay-guided fractionation of the active n-BuOH extract of the starfish *Culcita novaeguineae* resulted in the isolation of three new sulfated steroidal glycosides (asterosaponins) 1, 2 and 3, as active compounds causing morphological abnormality of *Pyricularia oryzae* mycelia. Compounds 1-3 possess the same pentasaccharide moiety, beta-D-fucopyranosyl-(1→2)-alpha-L-arabinopyranosyl-(1→4)-[beta-D-quinovopyranosyl-(1→2)]-beta-D-xylopyranosyl-(1→3)-beta-D-quinovopyranosyl, linked to C-6 of 3beta-sulfated steroidal aglycones and differ from each other in the side chains. Their structures were elucidated by extensive spectral studies and chemical evidences. Saponins 1 and 3 showed significant cytotoxicity against two cancer cell lines (IC_{50} values for 1: 3.57 microg/ml [K-562], 2.55 microg/ml [BEL-7402]; for 3: 3.75 microg/ml [K-562], 1.89 microg/ml [BEL-7402]), as well as hemolytic activity to rabbit erythrocytes (ED_{50} values: 16 and 31 microg/ml, respectively), while 2 was inactive in these bioassays.

[Planta Med, 2005,71: 458-463]