

玄参中环烯醚萜 Epibueroypyridinium A 对醛糖还原酶的抑制作用

黄才国*, 魏善建, 刘军华

(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)

[摘要] **目的:** 研究 Epibueroypyridinium A 对醛糖还原酶的抑制作用。**方法:** 醛糖还原酶通过硫酸铵分级沉淀从牛眼晶状体中提取, 在含有 DL-甘油醛、醛糖还原酶、NADPH 的反应体系中, 加入一定浓度的 Epibueroypyridinium A, 通过 340 nm 处光密度的变化来反映 Epibueroypyridinium A 对酶活性的抑制作用。阳性对照为依帕司他, 采用双倒数作图的方法确定抑制类型, 二次作图法求 K_i , 以抑制剂浓度对抑制率作图求 IC_{50} 。**结果:** Epibueroypyridinium A 能显著抑制醛糖还原酶的活性, 为竞争性抑制, 其半数抑制剂量 IC_{50} 为 4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, K_i 值为 4.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。**结论:** Epibueroypyridinium A 是醛糖还原酶的竞争性抑制剂。

[关键词] Epibueroypyridinium A; 玄参; 醛糖还原酶; 酶抑制剂

[中图分类号] Q 285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0760-03

Inhibitory effect of Epibueroypyridinium A extracted from *scrophularia ningpoensis* on aldose reductase

HUANG Cai-guo*, WEI Shan-jian, LIU Jun-hua (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Epibueroypyridinium A on aldose reductase. **Methods:** Aldose reductase was extracted from cattle crystalline lens. Besides Epibueroypyridinium A, the reactive system also contained DL-glyceraldehyde, aldose reductase, and NADPH. The activity changes of aldose reductase were detected at 340 nm. Epalrestat was taken as the positive control. The inhibitory type, K_i and IC_{50} were determined by double reciprocal plot, quadratic drawing, and drawing of inhibitor's concentration to inhibitory ratio, respectively. **Results:** Epibueroypyridinium A significantly inhibited the activity of aldose reductase in a competitive manner, with IC_{50} being 4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and K_i being 4.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **Conclusion:** Epibueroypyridinium A is competitive inhibitor of aldose reductase.

[KEY WORDS] Epibueroypyridinium A; *scrophularia ningpoensis*; aldose reductase; enzyme inhibitors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7):760-762]

多元醇代谢通路在高血糖条件下的激活是糖尿病并发症发生与发展的重要原因之一, 该通路的关键限速酶醛糖还原酶(aldose reductase, AR)在高血糖时, 催化葡萄糖大量转化为不易透过细胞膜的山梨醇, 致使山梨醇在晶状体等组织中大量蓄积, 引起细胞渗透性损伤, 最后导致糖性白内障的发生^[1,2], 因此 AR 可以作为糖性白内障药物治疗的作用靶点。本实验研究从传统中药玄参中分离提取的环烯醚萜成分对 AR 的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 新鲜的牛眼购自上海牛羊肉公司, 硫酸铵购自上海化学试剂有限公司, DL-甘油醛和 NADPH(还原型辅酶 II) 为 Sigma 公司产品, 依帕司他片由扬子江药业集团提供(批号: 20050302), 752C 紫外分光光度计为上海分析仪器厂生产。

1.2 玄参中 Epibueroypyridinium A 的分离提取 玄参根细粉经 95%、60% 乙醇回流提取 5 h 后, 合并提取液, 减压浓缩, 浓缩液加水后分别用乙酸乙酯及正丁醇萃取, 正丁醇部分经大孔吸附树脂柱、水以及

30%、60%、95% 乙醇水溶液洗脱, 分为 4 个部分, 30%、60% 乙醇洗脱部分再经 Sephadex LH 20 硅胶柱层析、C18 反相柱(甲醇 : 水 = 3 : 7) 分得单体化合物。

1.3 牛眼晶状体中 AR 的分离 参照 Chakrarti 等^[3] 报道的分离方法, 所有步骤在 $<4^{\circ}\text{C}$ 和 5 mmol/L β -巯基乙醇条件下进行。牛晶状体称质量, 组织匀浆, 离心(18 000 r/min, 30 min), 收集上清, 硫酸铵分离沉淀, 最后硫酸铵的饱和度为 75%, 沉淀溶解后透析, 即得 AR 粗提物。

1.4 酶活性测定^[4] 反应液包括 pH6.2, 67 mmol/L 的钠钾缓冲液, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L 的 DL-甘油醛, 0.2 mmol/L 的 NADPH, 0.6 mmol/L 的硫酸锂, 酶溶液 60 μl , 反应总体积为 720 μl , 反应在 25°C 中进行, 以加入 DL-甘油醛为启

[基金项目] 上海-SK 研究发展基金(2004004-t). Supported by Shanghai-SK Research and Development Foundation(2004004-t).

[作者简介] 黄才国, 副教授, 硕士生导师。

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

动,以 340 nm 处光密度的下降量表示 AR 活性。上述反应体系中再加入一定浓度(2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 Epibueroypyridinium A 溶液,阳性对照采用依帕司他(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$),空白对照中不加样品,反应同样以加入 DL-甘油醛为开始。

1.5 酶抑制动力学参数的测定 采用双倒数作图的方法,确定抑制剂的抑制类型。利用二次作图法求取 K_i 值。通过抑制剂的不同浓度对抑制率作图,求得半数抑制剂量 IC_{50} 。

2 结果

2.1 化合物的结构鉴定 通过层析,共得到 11 种水溶性成分,运用 IR、FABMS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H HCDSY、HMBC、HMQC、CD 等多种光谱学方法鉴定它们的结构。其中 Bueropyridinium A, Epibueroypyridinium A、Bueropyridinium B、Epibueroypyridinium B 为首次发现的新化合物,经过初步筛选,我们采用 Epibueroypyridinium A 进行药理试验。

2.2 反应体系有效性确定 改变底物 DL-甘油醛的浓度,酶促反应速度变化呈矩形双曲线(图 1),证明此条件下反应体系是有效的。

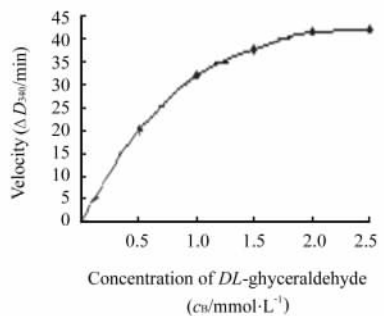


图 1 底物 DL-甘油醛浓度与反应速度的关系

Fig 1 Relationship between concentration of DL-glyceraldehyde and reaction velocity

2.3 Epibueroypyridinium A 对 AR 的抑制作用 固定 DL-甘油醛的浓度为 1 mmol/L,改变 Epibueroypyridinium A 的浓度(2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$),测定 340 nm 处光密度值的变化,通过双倒数作图(图 2),确定 Epibueroypyridinium A 的抑制类型为竞争性抑制。

抑制常数 K_i 通过双倒数图的斜率对抑制剂浓度作图,即二次作图法(图 3),求得 Epibueroypyridinium A 抑制 AR 的 K_i 值为 4.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。通过抑制剂浓度对抑制率作图(图 4),求得半数抑制剂量 IC_{50} 为 4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

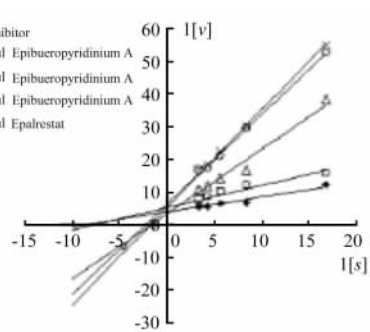


图 2 Epibueroypyridinium A 抑制 AR 双倒数图

Fig 2 Double reciprocal plot of Epibueroypyridinium A inhibiting aldose reductase

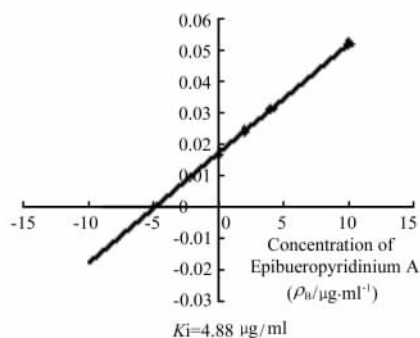


图 3 二次作图法求抑制常数 K_i

Fig 3 K_i was obtained through quadratic drawing

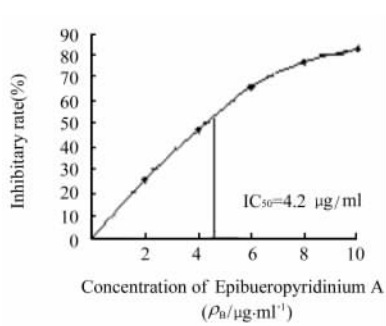


图 4 抑制剂 Epibueroypyridinium A 浓度对抑制率作图

Fig 4 Plot of Epibueroypyridinium A concentration influencing inhibitory rate

3 讨论

AR 作为治疗糖尿病并发症的药物作用靶点,自 20 世纪 70 年代开始有多种 AR 抑制药物面世,1978 年辉瑞公司开发出第一个在体内外均有较高活性的海因类 AR 抑制剂 sorbinil,但由于严重的过敏反应被迫中止了临床试验,继 sorbinil 之后,一些活性更强的同系物也陆续被合成,对治疗糖尿病性白内障起到积极的作用。但由于是化学合成药物,长期应用会有较大的不良反应。

我国科学工作者也长期在天然的中草药中寻找

AR 的有效抑制剂,这类化合物主要为黄酮类,如槲皮素、水飞蓟宾、陈皮苷、葛根素、五味子石油醚的提取物木脂素、笕桥地黄根的甲醇提取物环烯醚萜苷等对 AR 均有抑制作用^[5]。玄参是著名的传统中药,使用历史悠久,本课题组长期从事玄参植物化学成分和药理作用的研究,证明其主要有效成分为环烯醚萜苷类化合物,获得十几个新的化合物,并首次发现 Epi-bueropyridinium A 体外对醛糖还原酶有较强的抑制作用,有望开发成为新的治疗糖性白内障的药物。

[参考文献]

[1] 刘小鹏,文格波. 醛糖还原酶研究进展[J]. 南华大学学报·医

学版,2004,32:94-96.

[2] Mistry KP, Bey MA, Diecke FP. Mechanism for D-glucose inhibition of myo-inositol influr into rat lens[J]. Diabetes,1993, 42:1737-1741.

[3] Chakrabarti S, Sima AA, Nakajima T, et al. Aldose reductase in the BB rat: isolation, immunological identification and localization in the retina and peripheral erve[J]. Diabetologia,1987, 30:244-251.

[4] 杨 喆,余利岩,宋 京,等. 醛糖还原酶抑制剂筛选模型的建立和初步应用[J]. 中国抗生素杂志,2002,27:193-194.

[5] 王 琦,周玲仙,罗晓东. 植物中醛糖还原酶抑制剂的研究进展[J]. 中草药,2005,36:298-303.

[收稿日期] 2006-03-30

[修回日期] 2006-06-26

[本文编辑] 尹 茶