

Eupatilin 对黄嘌呤氧化酶活性抑制的实验研究

王海东¹ 谢建祥² 林伟青^{1#}

(1 江西省人民医院 南昌 330006; 2 江西省儿童医院 南昌 330006)

摘要:目的:通过体外酶学试验分析 Eupatilin 对黄嘌呤氧化酶活性的影响及抑制机理。方法:利用紫外分光光度计观测尿酸生成导致的吸光度变化值,测定波长为 292 nm,并以黄嘌呤为底物根据测定结果绘制 Lineweaver-Burk 和 Dixon 图。结果:Eupatilin 对黄嘌呤氧化酶表现很强的抑制作用,其 K_i 值为 0.128 6 $\mu\text{g/ml}$,抑制类型为混合型;而别嘌呤醇作为对照,其 K_i 值为 0.62 $\mu\text{g/ml}$,抑制类型为竞争性抑制。结论:Eupatilin 具有明显的黄嘌呤氧化酶抑制活性。

关键词:异泽兰黄素;黄嘌呤氧化酶;黄嘌呤;活性抑制

Study on Inhibitory Effect of Eupatilin on Xanthine Oxidase Activity

WANG Hai-dong¹, XIE Jian-xiang², LIN Wei-qing^{1#}

(1The People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang330006; 2The Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang330006)

Abstract: Objective: To research the influence and inhibitory mechanism of Eupatilin on the activity of Xanthine Oxidase by vitro enzymatic test. Methods: Determined the absorbance changes caused by the formation of uric acid value by using UV spectrophotometer, the detection wavelength was 292 nm, according to the measured results, draw the Lineweaver Burk and Dixon plots with Xanthine as substrate. Results: Eupatilin had strong inhibition on Xanthine Oxidase, the K_i value was 0.128 6 $\mu\text{g/ml}$, the type of inhibition is of mixed type; and with Allopurinol as a reference, the K_i value was 0.62 $\mu\text{g/ml}$, the type of inhibition was competitive inhibition. Conclusion: Eupatilin has the obvious inhibitory activity of Xanthine Oxidase.

Key words: Eupatilin; Xanthine oxidase (XO); Xanthine; Inhibitory effect

中图分类号:R285.5

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.09.054

随着国民经济发展,人们饮食结构的变化及人口老龄化,近年来我国痛风发病率呈明显上升的趋势。现代医学研究发现痛风的根本病因是嘌呤代谢紊乱,血(尿)中嘌呤代谢最终产物即尿酸水平持续增高。临床治疗痛风多使用秋水仙碱、非甾体类抗炎药、皮质类固醇、黄嘌呤氧化酶及黄嘌呤脱氢酶抑制剂等,虽然能控制症状,在一定程度上延缓病情,但由于对体内病理性产物缺乏清除或转化,而且还有药物的不良反应,所以难以达到理想的治疗效果。别嘌呤醇是临床上最常应用的黄嘌呤氧化酶及黄嘌呤脱氢酶抑制剂,但在临床使用中发现别嘌呤醇可能导致肝炎、超敏变态反应等较为严重的不良反应,导致患者因害怕而依从性差,因此研究出更安全可靠的方法,发挥中医药的优势,是我们面临的一个难题。Eupatilin(异泽兰黄素)是从一种复方制剂中提取出的药物 DA-9601 的主要活性成分,在韩国已应用于护肝、抗氧化、抗炎及抗菌。本研究通过预实验发现 Eupatilin 对黄嘌呤氧化酶有很强的抑制作用,并以此为基础进行了更为详细的体外酶学试验,研究分析其对黄嘌呤氧化酶活性的影响。现报告如下:

1 实验材料

1.1 仪器 紫外分光光度计(岛津 UV1800 型)、R-201 旋转蒸发器(东京理化)、电子天平、876A-2

型数显真空干燥箱。

1.2 试剂 Eupatilin(上海纯优生物科技有限公司),黄嘌呤氧化酶(sigma 公司),黄嘌呤(sigma 公司),别嘌呤醇(sigma 公司),磷酸二氢钾(分析纯),磷酸氢二钠(分析纯)。

2 实验方法

2.1 溶液配制

2.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS)配制 精密称取 Na_2HPO_4 14.20 g 和 KH_2PO_4 2.72 g,加入蒸馏水配成浓度为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 500 ml,将 pH 值调至 7.5。

2.1.2 别嘌呤醇(A)液配制 精密称取别嘌呤醇 2 mg,用 PBS(pH=7.5)100 ml 溶解,配制成浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 的别嘌呤醇溶液备用。

2.1.3 黄嘌呤(X)液配制 精密称取氢氧化钠 0.06 g,用 8 ml 蒸馏水溶解,得到氢氧化钠溶液,再加入精密称取的黄嘌呤 0.057 g,即为黄嘌呤氢氧化钠溶液(a 液)。精密称取磷酸二氢钾 0.27 g,用 10 ml 蒸馏水溶解,获得磷酸二氢钾液(b 液)。将 a 液、b 液混合后,加蒸馏水稀释至 40 ml,再用 PBS(pH=7.5)稀释至 100 ml。精密量取 8 ml,加入 PBS 液(pH=7.5)稀释至 66.667 ml,即得到 1 mmol/L 的 X 液。

2.1.4 黄嘌呤氧化酶(XO)液配制 精密量取黄嘌呤氧化酶 40 μl (1 U),加 PBS(pH=7.5)稀释至 2 ml,

即得 0.5 U/ml 的 XO 液。

2.1.5 Eupatilin(异泽兰黄素)液配制 精密称取 1 mg Eupatilin 加入 50 μ l 二甲亚砜 (DMSO) 溶解后 (DMSO 最终浓度<1%),再用 PBS (pH= 7.5) 配制 成 0.4 mg/ml 的 Eupatilin 溶液备用。

2.2 黄嘌呤氧化酶抑制实验

2.2.1 光密度值每分钟变化 A 值测定 取 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 400 μ l, 分别加入浓度为 1 mmol/L 的 X 液 60 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l, 振荡 2 min 后再加入 200 μ l 即 0.1 U 的黄嘌呤氧化酶溶液(已预温至 25 $^{\circ}$ C)涡旋混匀后,用紫外分光光度计观测 292 nm 处该反应体系在不同时间点的吸光度值,连续测定 15 min,每分钟测定 1 次,以时间与吸光度进行线形回归, 计算斜率 Rate 值 (dA/min)。每个样品重复操作 3 次,取其平均值。

2.2.2 光密度值每分钟变化 B 值测定 在 60 μ l、100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l 浓度为 1 mmol/L 的 X 液 的各试管中加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 300 μ l 后再分别加入 Eupatilin 液各 12.5 μ l、25 μ l、50 μ l、100 μ l; 阳性对照加入别嘌呤醇液各 12.5 μ l、25 μ l、50 μ l、100 μ l; 空白对照则加入 DMSO 各 12.5 μ l、25 μ l、50 μ l、100 μ l, 然后在每个试管中加入 200 μ l 的 XO 液,各试管的总体积为 1 ml。

2.2.3 黄嘌呤氧化酶活性的计算 以公式 (1-B/A) $\times$ 100%, 计算黄嘌呤氧化酶活性抑制百分率。

2.2.4 Ki 值计算 用 Dixon 绘图法计算 Ki 值,以样品浓度为自变量,反应速率的倒数为因变量,在两种不同浓度的底物下,获得两条直线,采用 SPSS17.0 统计软件包计算回归方程,求出两直线交点的 X 轴值,即得抑制动力学参数 Ki 值。

3 实验结果

3.1 Eupatilin 对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 Eupatilin 显著抑制了尿酸的生成,明显抑制了黄嘌呤氧化酶,表现为混合型抑制,并与浓度相关,与空白组对照差异性显著, $P<0.01$ 。见图 1。

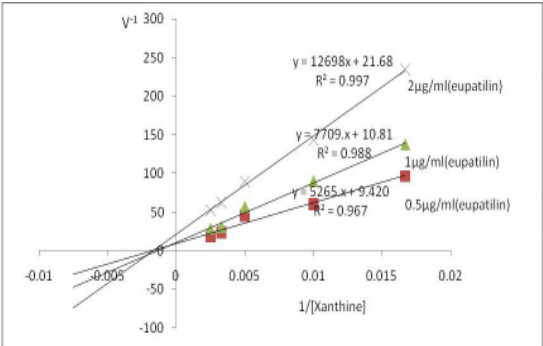


图1 Eupatilin 对黄嘌呤氧化酶的 Lineweaver-Burk 曲线

3.2 各样品对 XO 的抑制效果 将各样品浓度与平均抑制率进行线形回归, 然后根据回归方程计算抑制率 I=50%时 C 的值, 即为半数抑制浓度 IC50。见表 1。

表 1 各样品对 XO 的抑制效果		
样品	IC50/(μ g/ml)	Ki
Eupatilin	0.133	0.128 μ g/ml (0.373 μ mol/L)
别嘌呤醇	0.73 (5.36 μ mol/L)	0.62 (4.56 μ mol/L)
空白对照组	--	--

3.3 抑制动力学参数 Ki 值计算 采用 Dixon 绘图法计算 Ki 值:以样品浓度为自变量,反应速率的倒数为因变量,在两种不同浓度的底物下,得到两直线,再用 SPSS17.0 统计软件包计算回归方程,求出两直线交点的 X 轴值,即为抑制动力学参数 Ki。见图 2~ 图 3。

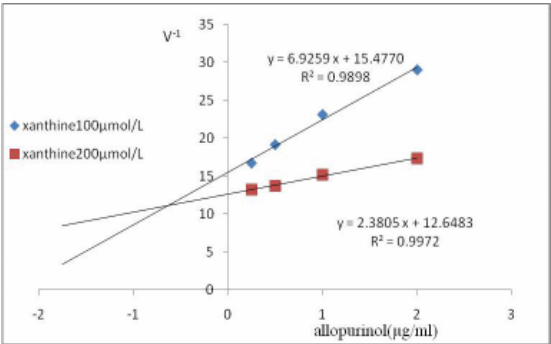


图 2 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中 Eupatilin 的 Dixon 图

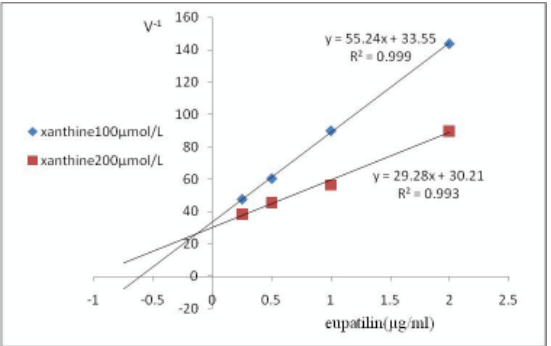


图 3 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中别嘌呤醇的 Dixon 图

4 讨论

本实验研究发现,Eupatilin 能有效抑制黄嘌呤氧化酶活性,且与浓度相关,表现为混合型抑制,为进一步动物实验及临床研究打下了基础。Eupatilin 是中药艾叶里提取的一种重要的黄酮类活性成分,具有治疗胃溃疡和镇痉的作用^[1-2],在韩国已作为抗胃溃疡药上市,另外还具有调控血糖含量^[3]、抗氧化^[4]、抗炎^[5]、抗肿瘤^[6-7]等功能。

近年来国内外许多学者研究报道,一些植物化学成分对黄嘌呤氧化酶具有很强的抑制作用,

Flemmig 等^[8]研究发现一种黄酮类化合物(flavone aglycone apigenin)和木犀草素(luteolin)等对黄嘌呤氧化酶的抑制作用明显强于别嘌呤醇(其 K_i 值远低于别嘌呤醇);Arimboor 等^[9]发现一种提取自印度植物种子中的黄酮类化合物(Tetrahydroamentoflavone)在黄嘌呤氧化酶抑制实验中也有着较强的黄嘌呤氧化酶抑制作用,其 IC_{50} 值为 92 nM, K_i 值为 0.982 μ M,与别嘌呤醇差距不大(别嘌呤醇 IC_{50} 值为 100nM, K_i 值为 0.612 μ M);Lin 等^[10]报道一种二萜类化合物(sugiol)对黄嘌呤氧化酶也有明显的抑制作用,其 IC_{50} 值为 (6.8 ± 0.4) μ M。下一步我们将在此基础上,进一步尝试通过动物实验及临床研究探索其对黄嘌呤氧化酶抑制作用、药代动力学以及药物安全性,希望能找到更安全有效的痛风治疗制剂。

参考文献

[1]Seo HJ,Surh YJ.Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells[J].Mutat Res,2001,496(1-2):191-198
[2]Kim SH, Lee SD, Kim WB, et al.Determination of a new antiulcer agent, eupatilin, in rat plasma, bile, urine, and liver homogenate by high-performance liquid chromatography [J].Res Commun Mol Pathol Pharmacol,1997,97(2):165-170
[3]Kang YJ,Jung UJ, Lee MK, et al.Eupatilin, isolated from Artemisia

princeps Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic beta-cell function in type2 diabetic mice [J].Diabetes Res Clin Pract,2008,82(1):25-32
[4]Choi EJ,Oh HM,Na BR,et al.Eupatilin protects gastric epithelial cells from oxidative damage and down-regulates genes responsible for the cellular oxidative stress[J].Pharm Res,2008,25(6):1355-1364
[5]Joo M,Kim HS,Kwon TH,et al.Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on TNBS-induced Colitis of Rats [J].Korean J Physiol Pharmacol,2015,19(1):43-50
[6]Park BB,Yoon JS,Kim ES,et al.Inhibitory effects of eupatilin on tumor invasion of human gastric cancer MKN-1 cells [J].Tumour Biol,2013,34(2):875-885
[7]Koshihara Y,Neichi T,Murota S,et al.Selective inhibition of 5-lipoxygenase by natural compounds isolated from Chinese plants, Artemisia rubripes Nakai[J].FEBS Lett,1983,158(1):41-44
[8]Flemmig J,Kuchta K,Arnhold J,et al.Olea europaea leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase[J].Phytomedicine,2011,18(7):561-566
[9]Arimboor R,Rangan M,Aravind SG,et al.Tetrahydroamentoflavone (THA) from Semecarpus anacardium as a potent inhibitor of xanthine oxidase[J].J Ethnopharmacol,2011,133(3):1117-1120
[10]Lin CN,Huang AM,Lin KW,et al.Xanthine oxidase inhibitory terpenoids of Amentotaxus formosana protect cisplatin-induced cell death by reducing reactive oxygen species (ROS) in normal human urothelial and bladder cancer cells [J].Phytochemistry,2010,71(17-18):2140-2146

(收稿日期: 2015-03-23)

(上接第 86 页)为其治疗的重要手段。然而由于受到手术创伤、疾病本身等多因素影响,患者多出现抑郁、焦虑状态,对患者正常生活、工作等均带来不利影响^[7]。由于每个个体都有自尊心,对于子宫肌瘤患者来说,由于怕遭医生护士冷眼,且担心子宫切除后会加速衰老、影响女性魅力,而忧心忡忡,再加上对手术方式、手术过程中出现意外、术后康复等多方面的担忧,导致患者焦虑心理更为严重^[8]。本研究在加强基础护理的基础上,充分做好患者心理护理,加强患者心理疏导,并积极帮助患者树立信心,从而能积极配合治疗及护理工作。而术后饮食指导、并发症护理、早期活动锻炼、出院指导等护理措施,使患者能够尽快恢复胃肠功能,保证机体康复需要的营养,提高机体免疫力和抵抗力,同时减少相关并发症的发生,促进患者及早康复出院。本研究结果显示,观察组患者生活质量各项评分均明显高于对照组 ($P<0.05$); 观察组焦虑评分明显低于对照组 ($P<0.01$); 观察组护理总满意率明显高于对照组 ($P<$

0.05)。综上所述,通过对子宫肌瘤切除患者给予综合护理干预措施,可有效缓解患者焦虑情绪,提高生活质量,改善护理质量,促进护患关系和谐,提高护理满意度,值得临床推广应用。

参考文献

[1]王少华,彭巧玲,路遥,等.心理护理对经腹子宫肌瘤切除术患者的影响[J].中华全科医学,2011,9(9):1414-1415
[2]翟红强.临床护理路径在子宫肌瘤围手术期护理中的应用和评价[J].中国现代药物应用,2011,5(15):92-93
[3]周永晴.不同方法治疗子宫肌瘤的临床比较[J].中国当代医药,2011,18(29):57-58
[4]黄树侠.经子宫全切除术治疗 122 例子宫肌瘤的护理分析[J].吉林医学,2012,33(4):830-831
[5]刘慧荣.综合护理对 82 例子宫肌瘤切除患者生活质量临床影响观察[J].医药前沿,2014,1(6):153-154
[6]贾莉芹.综合护理干预在子宫肌瘤切除术中的临床应用分析[J].临床医药实践,2014,23(5):375
[7]刘晓华.护理干预在子宫肌瘤围手术期中的效果[J].吉林医学,2014,35(9):1955-1956
[8]王丽.综合护理干预对子宫肌瘤切除后患者生活质量的影响[J].中国卫生产业,2013,10(33):54-55

(收稿日期: 2015-04-08)