

Apigenin 对黄嘌呤氧化酶活性抑制的实验研究

林伟青¹ 谢建祥² 王雅娟³ 王海东^{1#}

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

3 江西省丰城市石滩中心医院 丰城 331100)

摘要:目的:通过体外酶学试验研究 Apigenin 对黄嘌呤氧化酶活性的影响及抑制机制。方法:运用紫外分光光度计测定尿酸生成导致的吸光度变化值,测定波长为 292 nm,以黄嘌呤为底物根据测定结果绘制 Lineweaver-Burk 和 Dixon 图。结果:Apigenin 对黄嘌呤氧化酶具有较强的抑制作用,其 K_i 值为 $0.1513 \mu\text{g/ml}$,抑制类型为混合型;而别嘌呤醇作为参照,其 K_i 值为 $0.62 \mu\text{g/ml}$,抑制类型为竞争性抑制。结论:Apigenin 可明显抑制黄嘌呤氧化酶活性。

关键词:芹菜素;黄嘌呤氧化酶;黄嘌呤;活性抑制

Study on Inhibitory Effect of Apigenin on Xanthine Oxidase Activity

LIN Wei-qing¹, XIE Jian-xiang², WANG Ya-juan³, WANG Hai-dong^{1#}

(1The People's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang330006; 2The Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang330006; 3The Central Hospital of Shitan Town, Fengcheng City, Fengcheng331100)

Abstract: Objective: To research the influence and inhibitory mechanism of Apigenin 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: Apigenin had strong inhibition on Xanthine Oxidase, the K_i values was $0.1513 \mu\text{g/ml}$, 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: Apigenin can inhibit the activity of Xanthine Oxidase.

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

中图分类号:R285.5

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.10.048

随着我国经济发展及人口老龄化,痛风发病率有明显增高趋势。现代医学认为痛风的基本病因是嘌呤代谢紊乱,血(尿)中嘌呤代谢最终产物-尿酸持续增高。治疗痛风多采用秋水仙碱、非甾体类抗炎药、黄嘌呤氧化酶及黄嘌呤脱氢酶抑制剂等西药治疗,这些药物能在一定程度上控制症状、稳定病情,但由于药物的不良反应,及对体内病理性产物缺乏进行清除转化的综合治疗方法,难以达到理想的结果。别嘌呤醇是我们临床上最常使用的黄嘌呤氧化酶及黄嘌呤脱氢酶抑制剂,但是,由于别嘌呤醇可能导致较为严重的不良反应,如肝炎、超敏变态反应等,导致患者因害怕不良反应而依从性较差,因此探寻更安全有效的制剂,充分发挥中医药的优势,是我们面临的一项课题。

Apigenin(芹菜素)即 4,5,7-三羟基黄酮,在各种蔬菜、水果以及中草药中广泛存在,具有抗病毒、抗菌、降压、预防动脉粥样硬化、抑制肿瘤细胞生长等多种生理活性,并且具有无变异、安全无毒的特性。有报道称其具有抑制和治疗多种肿瘤的潜能,在各种肿瘤治疗的研究中广泛使用,而对其它疾病的治疗方面少有研究。本课题通过预实验发现 Apigenin 对黄嘌呤氧化酶有较强的抑制作用,并以

此为基础进行更为详细的体外酶学试验,从而研究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 R-201 旋转蒸发器(东京理化)、紫外分光光度计(岛津 UV1800 型)、电子天平、876A-2 型数显真空干燥箱。

1.2 试剂 Apigenin(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)的配制 精密称取 KH_2PO_4 2.72 g 和 Na_2HPO_4 14.20 g,加蒸馏水 500 ml,配成 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液,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 $20 \mu\text{g/ml}$ 的别嘌呤醇液。

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,得氢氧化钠溶液,再加入精密称取的黄嘌呤 0.057 g,得到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,得到磷酸二氢钾液(b液)。将a液、b液混合后加蒸馏水稀释至40ml,再用PBS(pH=7.5)稀释至100ml。精密量取8ml,再用PBS(pH=7.5)稀释至66.667ml,即得1mmol/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40μl(1U),用PBS(pH=7.5)稀释至2ml,即得0.5U/ml的XO液。

2.1.5 Apigenin液配制 用二甲亚砜(DMSO)50μl溶解1mg Apigenin后,加磷酸盐缓冲液(pH=7.5)配制成0.4mg/ml的Apigenin溶液(DMSO最终浓度<1%)。

2.2 黄嘌呤氧化酶抑制实验

2.2.1 吸光度值每分钟变化值A值的测定 取400μl 0.2mol/L磷酸盐缓冲溶液分别加入浓度为1mmol/L的X液60μl、100μl、200μl、300μl、400μl,振荡2min后加入0.1U即200μl黄嘌呤氧化酶液(已预温至25℃)涡旋混匀后,用紫外分光光度计测量292nm处该反应体系在不同时间点的吸光度值,连续测定15min,每分钟测定1次,测定吸光度值每分钟变化值(A)。

2.2.2 吸光度值每分钟变化值B值的测定 在60μl、100μl、200μl、300μl、400μl浓度为1mmol/L的X液的各试管中加入浓度为0.2mol/L磷酸盐缓冲溶液300μl,再分别加入Apigenin液各12.5μl、25μl、50μl、100μl,阳性对照加入别嘌呤醇液各12.5μl、25μl、50μl、100μl;空白对照则加入DMSO各12.5μl、25μl、50μl、100μl;然后,在每个试管中加入浓度为0.5U/ml的XO液200μl,各试管的溶液总体积为1ml。

2.2.3 黄嘌呤氧化酶(XO)活性的计算 以公式(1-B/A)×100%,计算各样本对XO的活性抑制百分率。

2.2.4 抑制动力学参数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,得到两条直线,采用SPSS17.0统计软件包计算回归方程,求出两直线的交点的X轴值,即可得到抑制动力学参数Ki值。

3 实验结果

3.1 Apigenin对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 Apigenin显著抑制了尿酸的生成,并与浓度相关,是黄嘌呤氧化酶的混合型抑制剂,与空白组对照差异性显著,P<0.01。见图1。

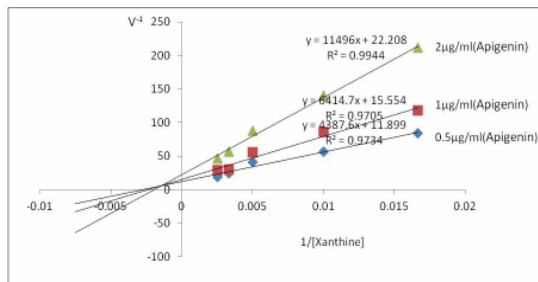


图1 Apigenin对黄嘌呤氧化酶的Lineweaver-Burk曲线

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性回归,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/(μg/ml)	Ki
Apigenin	0.16	0.151 3μg/ml (0.56μmol/L)
别嘌呤醇	0.73 (5.36μmol/L)	0.62(4.56μmol/L)
空白对照组	--	--

3.3 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,得到两直线,再用SPSS17.0统计软件包计算回归方程,计算出两直线的交点的X轴值,可得到抑制动力学参数Ki。见图2~3。

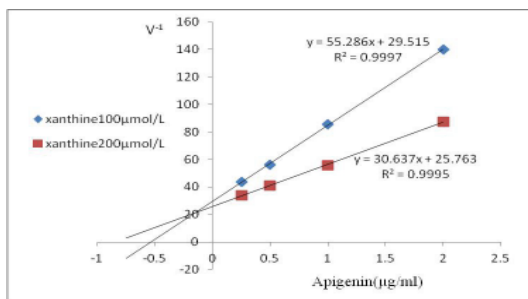


图2 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中Apigenin的Dixon图

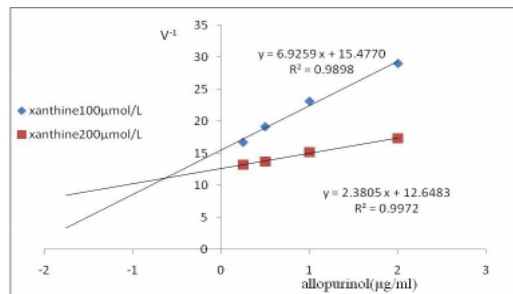


图3 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中别嘌呤醇的Dixon图

4 讨论

本实验研究发现,Apigenin能有效抑制黄嘌呤氧化酶活性,并且与浓度相关,为进一步进行动物实验及临床研究打下了基础。Apigenin是一种广泛存在的黄酮类化合物,在各种植物蔬菜、水果、豆类中含量

丰富,尤其在芹菜中含量最高。研究发现其具有抗炎^[1]、降低血压^[2]、抗焦虑^[3]、抗菌^[4]、抗病毒^[5]、抗氧化^[6]以及抗肿瘤^[7-8]等作用。

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^[9]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 Ki 值远低于别嘌呤醇);Arimboor 等^[10]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 IC₅₀ 值为 92 nM, Ki 值为 0.982 μM,与别嘌呤醇差距不大(别嘌呤醇 IC₅₀ 值为 100 nM, Ki 值为 0.612 μM);Lin 等^[11]报道有一种二萜类化合物(sugiol)对黄嘌呤氧化酶也有明显的抑制作用,其 IC₅₀ 值为 (6.8± 0.4) μM。下一步我们将在此基础上,尝试通过动物实验及临床研究进一步研究其黄嘌呤氧化酶抑制作用、药代动力学以及安全性,以期能找到更安全有效的痛风治疗方法。

参考文献

- [1] Mascaraque C, González R, Suárez MD, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of apigenin K in two rat colitis models induced by trinitrobenzenesulfonic acid and dextran sulphate sodium [J]. Br J Nutr, 2015, 113(4): 618-626
- [2] Farzaei MH, Abbasabadi Z, Ardekani MR, et al. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(6): 815-826
- [3] Kumar S, Madaan R, Sharma A. Pharmacological evaluation of Bioactive Principle of Turnera aphrodisiaca [J]. Indian J Pharm Sci, 2008, 70(6): 740-744
- [4] Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant Enterobacter cloacae [J]. Phytomedicine, 2013, 20(3-4): 262-269
- [5] Shibata C, Ohno M, Otsuka M, et al. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels [J]. Virology, 2014, 462-463: 42-48
- [6] Xu H, Hu G, Dong J, et al. Antioxidative activities and active compounds of extracts from Catalpa plant leaves [J]. Scientific World Journal, 2014: 857982
- [7] Suh YA, Jo SY, Lee HY, et al. Inhibition of IL-6/STAT3 axis and targeting Axl and Tyro3 receptor tyrosine kinases by apigenin circumvent taxol resistance in ovarian cancer cells [J]. Int J Oncol, 2015, 46(3): 1405-1411
- [8] Tong X, Mirzoeva S, Veliceasa D, et al. Chemopreventive apigenin controls UVB-induced cutaneous proliferation and angiogenesis through HuR and thrombospondin-1 [J]. Oncotarget, 2014, 5(22): 11413-11427
- [9] 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
- [10] 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
- [11] 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: 2015-04-07)

药学服务对糖尿病患者用药依从性的影响

赵阳媚

(山东省单县中医院 单县 274300)

摘要:目的:分析探讨药学服务对糖尿病患者用药依从性的影响。方法:对 2014 年 1~12 月收治的 44 例血糖控制不理想、用药依从性差的糖尿病患者进行健康教育及药学服务,观察患者的依从性变化。结果:三药治疗的患者治疗依从性差的发生率明显高于单药治疗及两药治疗患者, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义;年龄越大的患者用药依从性越差, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义;患者第一次药学服务的治疗依从性明显高于第二次药学服务、第三次药学服务,第二次药学服务略高于第三次,但不具备显著性差异, $P > 0.05$ 。结论:为糖尿病患者开展药物服务有利于提高患者的用药依从性,可有效控制血糖水平,值得临床推广。

关键词:糖尿病;药学服务;依从性

中图分类号: R587.1

文献标识码: B

doi: 10.13638/j.issn.1671-4040.2015.10.049

糖尿病为临床常见病与多发病,发病率呈逐年升高趋势^[1]。糖尿病患者用药时间长,再加上患者对疾病的认识不足等,易导致患者的用药依从性较差^[2]。为了提高糖尿病患者的用药依从性,我院近年来对糖尿病患者加强了药学服务,效果较为理想。现

报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2014 年 1~12 月我院收治的 44 例血糖控制不理想、用药依从性差的糖尿病患者作为研究对象。依从性较差标准^[3]: 用药种类数 / 处方