

从天然产物中开发新的抗变态反应药物

国家医药管理局天津药物研究院(300193) 张光华*

深圳海王药业有限公司

冯汉林

摘 要 从天然产物中发现了多种对透明质酸酶的激活有抑制作用的活性成分,实验表明,这些成分同时又具有较强的抗变态反应活性,有望作为先导化合物,进一步开发为新的抗变态反应药物。

关键词 天然产物 透明质酸酶 抗变态反应 新药开发

根据医学界 Gell-Coombs 的最新分类法原则,把造成组织损伤的任何有害的免疫反应均称为变态反应(allergy)。按抗原与抗体或细胞反应的方式和补体是否参加等,将变态反应分为 I ~ IV 种基本类型(近年又提出了第 V 和第 VI 型),其中由 IgE 抗体介导的 I 型为速发性超敏反应,是当今为人们了解最早最多的一种变态反应^[1];常见症状为哮喘、枯草热、鼻炎和过敏性休克等,其病理机制为肥大细胞的脱颗粒作用和从这些细胞中释放化学介质,如组胺、白细胞三烯和前列腺素。肥大细胞的脱颗粒作用存在于由细胞膜支配的抗原-IgE 抗体反应的免疫刺激中。

近年来从天然产物中发现了大量的对透明质酸酶(hyaluronidase,以下简称 HAase)的激活有抑制作用的物质,它们同时又表现了较强的抗变态反应活性。事实表明,一些抗变态反应药物的抗 HAase 活性可能包含在对肥大细胞释放组胺的抑制作用中,这使人们得到一种启示:假如发现很强的 HAase 的抑制物,它可能具有抗变态反应活性,也就可能作为先导化合物,开发为新的抗变态反应药物。笔者概述这方面的研究进展。

1 筛选抗变态反应药物常用的几种对照药

HAase 也称玻璃酸酶,是裂解粘多糖的

酶之一,可催化透明质酸(hyaluronic acid, HA)的分解,关系到血管系统的通透性和炎症反应。它通常以灭活形式存在于哺乳动物的睾丸和脾组织中,在活体内可由金属离子,特别是 Ca^{2+} 激活,可能是肥大细胞脱颗粒反应中 Ca^{2+} 的靶酶(target enzyme)。HA 是由糖醛酸和乙酰氨基葡萄糖组成的一种粘多糖,具有多种功能:如在各种组织中起润滑作用,保持眼睛透明液的稳定,调节细胞外液水分和电解质,治愈创伤,使皮肤润湿健康,润滑关节和防止炎症等。抑制 HAase 的激活,可使 HA 不被降解,维持正常的生理机能。HA 以其特有的粘弹性及保湿性已被广泛用于医药和化妆品^[2,3]。

色甘酸二钠(DSCG)和 tranilast(N-3', 4'-二甲氧基肉桂酰基邻氨基苯甲酸)是临床上用作抗变态反应的药物(图 1),可抑制由抗原-IgE 抗体反应诱导的肥大细胞脱颗粒作用,对 HAase 的激活有很强的抑制作用。化合物 48/80 是一种 N-甲基-对-甲氧基苯乙胺和甲醛的缩聚物,是已知的释放组胺的炎症物质,也是一种 HAase 的激活剂。它不需要抗原-IgE 抗体反应的介导即可诱导肥大细胞广泛的脱颗粒作用。在筛选抗变态反应药物时,常以上述 3 种化合物和 HAase 作

* Address: Zhang Guanghua, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, State Pharmaceutical Administration of China, Tianjin

对照,比较抗变态反应活性的强弱^[4]。

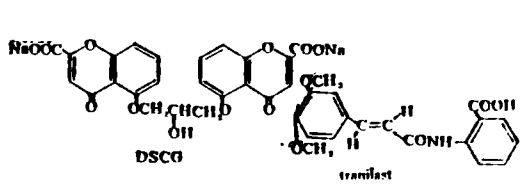


图1 DSCG 和 tranilast 的结构

2 天然产物中的抗变态反应活性成分

2.1 绣球酚及其衍生物:从绣球科绣球属 *Hydrangea* L. 植物的叶子中分离出绣球酚 (hydrangenol), 并经进一步化合得到绣球酚的衍生物, 包括绣球酚的葡萄糖甙、BT-1~BT-7(图2)。实验表明, 绣球酚在 0.05~1.0 mmol/L 范围内, 以剂量依赖方式抑制 HAase 的激活, 其抑制活性强度有时超过 tranilast; BT-2 是已知的半月苔酸, 在上述化合物中, 浓度在 0.015~0.2 mmol/L 范围内, 以剂量依赖方式, 对 HAase 激活的抑制作用最强; BT-1 是 BT-2 的加氢产物, 抑制活性弱于 BT-2, 但强于绣球酚。在由抗原(蛋清)诱导的大鼠腹膜肥大细胞释放组胺的实验中, 发现上述的化合物在浓度 0.1~3.0 mmol/L 范围内, 剂量依赖地抑制组胺的释放, 其中 BT-1 和 BT-2 的抑制活性与 tranilast 近似; 在此浓度范围内, BT-1 和 BT-2 也剂量依赖地抑制了由化合物 48/80 诱导的组胺释放, 其中以 BT-2 最强, 剂量超过 0.3 mmol/L 时就有明显的抑制作用。BT-1 的抑制作用比 BT-2 弱, 但强于 tranilast。在高等动物中, 由抗原-IgE 抗体反应诱导的肥大细胞释放组胺可引起各种过敏性哮喘, 皮肤过敏和过敏性休克, 然而由化合物 48/80 诱导的组胺释放是非免疫现象。BT-1 和 BT-2 能够抑制上述两种不同诱因导致的组胺释放, 其机理可能解释为对大鼠细胞膜的稳定作用不需要抗原抗体对细胞膜的影响。这些结果涉及到他们的抗 HAase 的活性。实验表明, BT-1 和 BT-2 可能作为先导化合物进一步开发为新的抗变态反应药物^[5]。

2.2 异甘草素等化合物:从光果甘草 *Gly-*

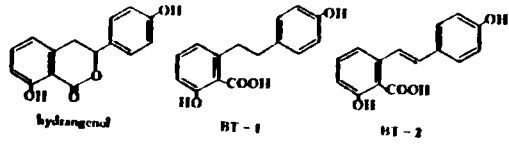


图2 绣球酚与其衍生物 BT-1, BT-2 的结构

cyrrhiza glabra L. 中分离出甘草素 (liquiritigenin, I)、异甘草素 (isoliquiritigenin, II)、甘草甙 (liquiritin, III) 和异甘草甙 (isoliquiritin, IV); 从黄芩中分得黄芩甙元 (baicalein, V); 从芍药中分得芍药甙 (patoniflorin, VI) 并测定了它们各自的抗变态反应活性(图3)。化合物 I、II 和 V 以剂量依赖方式抑制 HAase 的激活, 其中 II 的活性最强, 且强于 tranilast, 但弱于 DSCG。I、II、V、DSCG 和 tranilast 的 IC₅₀ 值分别为 740、64、169、29 和 350 μmol/L。在由抗原-抗体反应诱导的大鼠腹膜渗出细胞释放组胺的实验中, II 的抑制作用最强, V 比 tranilast 活性强, I 与 tranilast 作用强度相同, III 和 IV 的抑制作用极弱, VI 无抑制活性。I、II 和 V 以剂量依赖方式也抑制由化合物 48/80 诱导的释放组胺作用。其中 II 和 V 的活性相近, I 比 II、IV 的活性弱, 但强于 tranilast, 而 III、IV 和 tranilast 的抑制作用很弱。总之, 甘草素、异甘草素和黄芩甙元对 HAase 的激活和对免疫的与非免疫两种刺激诱导的肥大细胞释放组胺均有抑制作用。此外, 异甘草素与 DSCG 和 tranilast 不同, 对致敏豚鼠回肠的 Schultz-Dale 反应(一种检测豚鼠过敏性致敏作用的体外实验) 也表现了抑制作用, 表明异甘草素具有广泛的抗变态反应活性, 可用于开发为新的抗变态反应药物。天然产物保护红细胞膜免于各种抗原的损害, 表明这些化合物可能具有稳定细胞膜的作用, 此项研究尚待进一步深入^[6]。

2.3 其它具有抗变态反应活性的成分:用 50%乙醇提取宽皮桔 *Citrus reticulata* Blanco、*C. tamurana*、夏橙 *C. natsudaidai* Haya-

ta 和温州蜜桔 *C. unshiu* Marc. 的未成熟果实, 所得提取物对由化合物 48/80 诱导的 HAase 的激活显示了明显的抑制作用, 其中以宽皮桔提取物的活性最强, 与 DSCG 的活性几乎相同。经硅胶渗透层析和气质联用色谱表明此活性成分为分子量 1.1×10^5 的果胶, 内含有 58% 的 D-半乳糖醛酸, 具有抗变态反应活性^[7]。

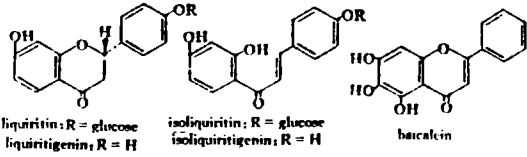


图 3 化合物 1~5 的结构

从匙羹藤 *Gymnema sylvestre* (Retz.) Schult. 中得到 HAase 的抑制剂, 用凝胶过滤法得到 2 个活性组分, 用离子交换层析、气质联用色谱及吡啶法确定了结构, 证实 2 个组分为含 73% D-半乳糖醛酸的果胶类物质, 分子量分别为 4.0×10^4 和 2.0×10^4 ^[8]。

从茶叶中得到的茶多酚, 对 HAase 激活的抑制作用为 99.1%, 可治疗变态反应疾病和一些炎症, 也可作添加剂用于化妆品中^[9]。

狭叶紫锥花 *Echinacea angustifolia* DC. 根的乙酸乙酯, 乙酸丁酯和氯仿的提取物经质谱测定, 抑制 HAase 激活的 IC_{50} 值分别为 0.44、0.50 和 0.62 mg/mL。测定了乙酸乙酯提取物中 4 种主要的咖啡酰基共轭物的活性, 发现 2,3-O-二咖啡酰基酒石酸(菊苣酸)和 2-O-咖啡酰基酒石酸有最强的抑制 HAase 激活的作用, IC_{50} 分别为 0.42 和 0.61 mmol/L; 而 5-O-二咖啡酰基奎尼酸(朝鲜蓟酸)和绿原酸的 IC_{50} 为 1.85 和 2.25 (mmol/L)^[10]。

中药慈菇 *Sagittaria sagittifolia* L. 的干燥茎传统用于治疗皮肤病。从鲜茎中分得 4 个活性二萜酮三叶慈菇酮(trifolione 1~4) (图 4), 可抑制由化合物 48/80 诱导的大鼠肥大细胞的释放组胺作用, 其活性强于 DSCG 和 tranilast^[11]。

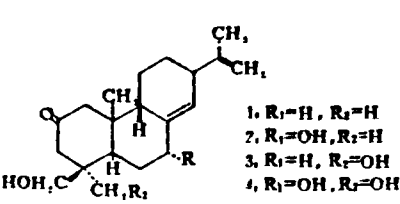


图 4 trifolione 1~4 的结构

从磨盘草 *Abutilon indicum* G. Don、峨眉木荷 *Schima wallichii* (DC.) Choisy、虾子花 *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz 中得到 HAase 的抑制剂, 其活性超过 DSCG、可作为抗炎药物和抗过敏药物使用^[12]。

从诃子 *Terminalia chebula* Retz.、绵马鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的根茎、日本白蜡树 *Fraxinus japonica* Blume 树皮的水或醇的提取物中也得到 HAase 的抑制剂, 它可使 HA 保持细胞间隙的水分和在组织中形成胶冻状间质, 保持皮肤的光滑和弹性, 因此可用作化妆品和保健药的无毒添加剂^[13]。

一些药用植物中的三萜和甾体皂甙及其甙元可有效地治疗和预防脉管功能不全, 现已阐明这些活性组分对 HAase 的抑制作用。小风藤 *Hedera helix* L. 中的常春藤甙元(hederagenin)和石竹素(oleanolic acid)以剂量依赖方式非竞争性地抑制 HAase 活性, 其 IC_{50} 为 280.4 和 300.2 μ mol/L, 而成甙后如常春藤皂甙(hederacoside C)和常春藤素(α -hederin)却是 HAase 的弱抑制剂。欧洲七叶树 *Aesculus hippocastanum* L. 中的皂甙七叶素(escin)对 HAase 的抑制作用 ($IC_{50}=149.9 \mu$ mol/L)也弱于其甙元 escinol ($IC_{50}=1.65 \mu$ mol/L), 其构效关系尚待研究^[14]。

对 130 种韩国传统药用植物的 HAase 抑制活性作了比较, 发现其中的五加、苏木、甘草、桑、夏枯草和地榆的甲醇提取物 (5 mg/mL) 对 HAase 的抑制作用超过 50%^[15]。

从蒲桃 *Jambosa vulgaris* DC. 和钩状胡椒 *Piper aduncum* 中得到肥大细胞释放组胺的抑制剂, 可控制炎症和变态反应; 对 HAase 有抑制活性, 可用于化妆品和食

品^[16]。

从老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 地上部分的 1,3-丁二醇的提取液中得到 HAase 的灭活剂,能用于变应性疾病,如龈炎及 HAase 引起的丘疹^[17]。从酸模属 *Rumex cyprills* 的干燥茎、刺毛榄仁树 *Terminalia horrida* 干燥果实和英国栎 *Quercus pedunculata* 的乙醇提取物中也得到 HAase 的抑制剂^[18~20]。

此外,人们从海洋生物,特别是各种海藻中发现了多种 HA 合成促进剂,如取干燥的江篱 *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss 的稀醇提取物作活性组分,配以各种辅料制药可用于治疗关节炎和改善皮肤细胞的活性。其它海藻,如爱森藻属 *Eisenia*、裙带菜属 *Undaria Suringar*、羊栖菜属 *Hizikia*、石花菜属 *Gelidium Lamx.* 或黄墨角藻属 *Ascophyllum* 等的醇提物也有同样的活性作用^[21]。

3 新技术新方法在筛选抗变态反应药物中的应用

抗过敏药物是抗变态反应药物之一,在其筛选的实验中,除了采用大鼠腹膜肥大细胞脱颗粒和豚鼠肺组织释放过敏介质的离体实验法外,也采用大鼠或小鼠同种被动皮肤过敏试验法(PCA)的整体实验,对研究抗变态反应药物亦有一定意义^[22]。近年又开发出一种可测定 HAase 活性的灵敏高速的物料通过检定法。它是将 HA 悬浮于微量滴定器的琼脂糖中,将一个微型盘培养在 HAase 溶液中,用十六烷基盐酸吡啶使未消化的 HA 沉淀在微型盘上,沉淀物阻碍光透射,利用可见光透射比的增加来检测 HAase 的活性,并可在显示器上定量读出。此法可检测小到 0.05 U 的 HAase 活性,反应高速,用普通试剂即可运行^[23]。一些新技术,如快速原子轰击质谱(FAB-MS)和利用负离子技术的快速原子轰击串联质谱(FAB-MS/MS)已成功地用于鉴定各种组分对 HAase 活性的反应,上述的狭叶紫锥花中咖啡酰基共轭物抗 HAase 活性的测定就应用了此种方法^[10]。

4 结语

在世界工、农业和科技高速发展的今天,新技术新材料的不断应用,一方面推动了人类的物质文明建设,而另一方面又不可避免地存在着各种污染,造成一些变应源,使变态反应疾病成为一大类威胁人类健康的常见病与多发病,如哮喘、各种外源和隐潜性的纤维性肺炎、职业性呼吸道变应反应等^[24],因此,开发抗变态反应药物有着极为重要的现实意义和长远意义。

近年来日本将对 HAase 活性的抑制实验作为基本方法,从天然产物中大量筛选抗变态反应化合物^[25],并有多篇专利得以报道。韩国也极为重视此类药物的开发^[15]。我国在研制 HA 类产品方面也作了多种努力^[2]。

目前在此项药物的开发中,急需探讨的有以下几个问题:1)对 HAase 激活的抑制作用与抗变态反应活性的关系及机理;2)具有抗变态反应活性的化学组分及其构效关系;3)如何将 HAase 的抑制剂开发为适于工业生产和临床应用的药物等。相信经过人们的不断探索与努力,从天然产物中将会开发出更多新的抗变态反应的药物。

致谢:国家医药管理局天津药物研究院药理一室主任刘昌孝研究员对论文的审阅与指正。

参 考 文 献

- 1 王贤才主编. 英中医学辞海. 青岛: 青岛出版社, 1989. 83、451
- 2 郭连珍, 等. 西北药学杂志, 1987, 2(1): 38
- 3 上海第一医学院主编. 医用生物化学. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1979. 1277
- 4 Kakegawa H, et al. Chem Pharm Bull, 1985, 33(2): 642
- 5 Kakagawa H, et al. Planta Med, 1988, 54(5): 385
- 6 Kakagawa H, et al. Chem Pharm Bull, 1992, 40(6): 1439
- 7 CA, 1991, 115: 155068v
- 8 CA, 1991, 114: 138631k
- 9 CA, 1994, 120: 236182h
- 10 CA, 1994, 120: 294112w
- 11 Yoshikawa M, et al. Chem Pharm Bull, 1996, 44(3):