

10种常用平喘中药对磷酸二酯酶4抑制作用的研究

蔡颖红¹, 曹志远², 谢丽霞², 罗海彬¹, 张翠仙², 何细新^{2*}

1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 研究10种常用平喘中药桑白皮、枇杷叶、百部、马兜铃、紫菀、款冬花、苦杏仁、苏子、葶苈子、银杏叶提取物对磷酸二酯酶4(PDE4)的抑制作用。**方法** 分别采用水煎煮、95%乙醇回流提取法提取药材, 采用放射性³H标记液体闪烁计数法检测提取物对靶标PDE4的抑制活性。**结果** 10种平喘中药的水提取物、95%乙醇提取物均显示一定的抑制PDE4活性。总体而言, 平喘中药95%乙醇提取物对PDE4抑制活性高于水提取物。相同浓度下, 桑白皮、枇杷叶、款冬花、马兜铃活性较高。**结论** 平喘类中药对PDE4靶标具有一定的抑制作用, 可能与其平喘作用相关。

关键词: 平喘; 磷酸二酯酶4; 抑制作用; 中药; 桑白皮; 枇杷叶; 款冬花; 马兜铃

中图分类号: R974.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)05-0345-03

Inhibition of crude extracts of ten common anti-asthma traditional Chinese medicines towards phosphodiesterase 4

CAI Ying-hong¹, CAO Zhi-yuan², XIE Li-xia², LUO Hai-bin¹, ZHANG Cui-xian², HE Xi-xin²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, China

Abstract: **Objective** To study the inhibition of ten common anti-asthma traditional Chinese medicines (TCMs) towards phosphodiesterase 4 (PDE4). **Methods** The TCMs were extracted with boiling water and 95% ethanol reflux, respectively. The inhibition against PDE4 was carried out by radioactive ³H liquid scintillation counting method. **Results** Both water extracts and ethanol extracts exhibited obvious inhibition against PDE4. In general, the ethanol extracts of ten TCMs showed more potent activities than those of water extracts. At the same concentration, *Mori Cortex*, *Eriobotryae Folium*, *Farfarae Flos*, and *Aristolochiae Fructus* exhibited obvious activities. **Conclusion** The common anti-asthma TCMs exhibit obvious inhibition towards PDE4, which may be relative to their treatment of relieving asthma.

Key words: anti-asthma; phosphodiesterase 4 (PDE4); inhibition; traditional Chinese medicine (TCM); *Mori Cortex*; *Eriobotryae Folium*; *Farfarae Flos*; *Aristolochiae Fructus*

磷酸二酯酶4(PDE4)是PDE家族的一种同工酶, 主要分布于各种炎症细胞内^[1], 是大多数炎症细胞cAMP浓度的稳态调节者。其抑制剂可通过抑制PDE4活性来抑制炎症细胞^[2]。因此, PDE4抑制剂被认为是作用于细胞内靶点的新型抗炎药物。罗氟司特(Roflumilast)是第一个获FDA批准上市的用于治疗慢性阻塞性肺疾病的PDE4选择性抑制剂, 已于2011年上市。但这类合成的抑制剂具有明显不良反应^[3-4], 主要有恶心、呕吐、眩晕等, 这很大程度上限制了其应用。因此寻找新型PDE4抑制

剂具有重要意义。已有研究发现, 一些中药对PDE4有明显的抑制活性^[5-6]。本文以临床上治疗喘咳具有疗效的平喘类中药为对象, 研究其对PDE4的抑制作用, 为揭示平喘类中药的平喘作用靶标和寻找新型PDE4抑制剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UP200S 细胞破碎仪(Hielscher), 离心机(Sigma, 6K15), 涡旋仪(Vortexgenie), BioPhotomer 分光光度计(德国Eppendorf公司), Ni-NTA(Qiagen,

收稿日期: 2012-07-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21103234); 教育部留学回国人员启动基金(2008[290]); 广东自然科学基金团队项目(S2011030003190); 中山大学青年教师重点培育计划(11ykzd05)

*通讯作者 何细新, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学研究。Tel: (020)39358073 E-mail: gogohe@gmail.com

Valencia, CA)亲和色谱柱,蛋白质自动纯化系统(GE Akta Purifier 100),液体闪烁计数器(PerkinElmer Tricarb2910)。

水,乙醇,pET15b-PDE4D2 催化结构域(GENERay),BL21 (Codonplus, Stratagene),酵母提取物、胰蛋白酶(Oxoid Ltd.),氯化钠(天津市致远化学试剂有限公司),葡萄糖(天津市大茂化学试剂厂),氨苄青霉素(广州浩玛生物科技有限公司),氯霉素(Aldrich),异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(科昊生物工程有限责任公司),咪唑(MYM Biological Technology Co. Ltd.),巯基乙醇(Amresco),Tris(Bio-Rad),氯化镁(天津市大茂化学试剂厂),二硫苏糖醇(Bio Basic Inc.),氘代环腺苷酸(GE Healthcare),二甲基亚砜(Oceanpak Alexative Chemical),氢氧化钡溶液(Sigma),硫酸锌(Sigma-Aldrich),所有试剂均为分析纯。

1.2 药材

常用止咳平喘类中药:桑白皮、枇杷叶、百部、马兜铃、紫菀、款冬花、苦杏仁、苏子、葶苈子、银杏叶,购于广州采芝林药店,由广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室周劲松副教授鉴定,标本存放于广州中医药大学中药学院中药化学研究室。

1.3 样品的制备

1.3.1 中药水提取物的制备 将上述药材粉碎,称取10 g,加入8倍量水,浸泡1 h,然后煎煮1 h;过滤后药渣再经8倍量水浸泡1 h,煎煮1 h;合并两次提取液,减压浓缩至10 mL,加入乙醇,调节浓度约为50%乙醇时,放置冰箱24 h,除去蛋白质和多糖等杂质,蒸干得浸膏,备用。

1.3.2 中药乙醇提取物的制备 将上述药材粉碎,称取10 g,加入8倍量95%乙醇,浸泡1 h,然后回流提取1 h;滤过,药渣再经8倍量95%乙醇浸泡1 h,回流提取1 h;合并两次提取液,减压浓缩得浸膏,备用。

1.4 PDE4 活性测试

1.4.1 实验样品的配制 称取一定量上述药材提取物的浸膏,分别用二甲基亚砜配成质量浓度1 g/L的溶液,再取少量分别稀释10倍成0.1 g/L的溶液。

1.4.2 靶标蛋白 PDE4 的表达与纯化 靶标蛋白 PDE4 的表达、纯化及活性测定,参考本课题组已发表的论文^[7]。

先将表达质粒 pET15b-PDE4D2 (催化结构域, 86-413) 转化入大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 BL21

(codonplus) 中。携带重组质粒的 *E. coli* 细胞在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素、20 μ g/mL 氯霉素和 0.4% 葡萄糖的 LB 培养基中在 37 $^{\circ}$ C 下生长至 $A_{600}=0.7$, 然后加入 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,并在 15 $^{\circ}$ C 培养 20 h。离心收集细胞。

重组的 PDE4D2 催化结构域通过 Ni-NTA 亲和柱纯化。先按 8 mL 裂解液/g 细胞将表达了 PDE4D2 的 *E. coli* 细胞悬浮于裂解液中,超声裂解细胞。裂解液配方为: 20 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L 巯基乙醇。细胞裂解液经 14 000 r/min 离心 30 min, 上清上样到 25 mL Ni-NTA 亲和柱,经 Buffer 1 (300 mL 20 mmol/L Tris pH 8.0, 300 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L 巯基乙醇) 和 Buffer 2 (100 mL 20 mmol/L Tris pH 8.0, 50 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L 巯基乙醇) 冲洗后,重组蛋白用 Buffer 3 (20 mmol/L Tris pH 8.0, 50 mmol/L 氯化钠, 200 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L 巯基乙醇) 洗脱。收集洗脱的蛋白,按照 280 nm 处 A 值估算蛋白浓度(由 ProtParam 软件计算)。超滤浓缩蛋白,置 -80 $^{\circ}$ C 储存备用。

经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测试可知 PDE4D2 (催化结构域) 蛋白质的纯度达到 95% 以上。

1.4.3 样品对 PDE4D2 活性的测试 取 4 μ L 1/100 稀释的氘代 cAMP (20 000~30 000 cpm) 加 assay buffer (50 mmol/L Tris pH 8.0, 10 mmol/L 氯化镁, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇) 稀释至 58 μ L。在每管中分别加入 2 μ L 不同浓度的抑制剂溶液(至少 8 个浓度),混匀。然后加入 40 μ L 已用 assay buffer 稀释的确定浓度的蛋白质溶液,在 25 $^{\circ}$ C 下静置反应 15 min。依次加入 200 μ L 0.2 mol/L 硫酸锌和 200 μ L 0.2 mol/L 氢氧化钡溶液,终止 cAMP 和 PDE4D2 的酶促反应,振荡混合,14 000 r/min 离心 5 min。取上清液 430 μ L,加入 2.5 mL 闪烁液,振荡混合后用液体闪烁计数器测定。

2 实验结果

各个实验样品对 PDE4D2 抑制活性见表 1。由表可见,各中药样品的水提取物和 95%乙醇提取物均对 PDE4D2 有一定的抑制作用。在相同浓度下,95%乙醇提取物对 PDE4D2 的抑制活性明显高于水提取物。

表1 10种常用平喘中药粗提取物对PDE4D2的抑制率
Table 1 Inhibitory rates of crude extracts from ten common anti-asthmatic TCMs towards PDE4D2

中药	剂量/(g·L ⁻¹)	抑制率/%	
		乙醇提取物	水提取物
款冬花	0.1	11.14	6.49
	1	81.79	84.71
枇杷叶	0.1	44.18	-1.41
	1	91.04	83.34
马兜铃	0.1	35.32	9.03
	1	90.65	81.31
桑白皮	0.1	73.25	5.10
	1	94.17	89.87
百部	0.1	2.40	0.90
	1	72.34	4.18
苏子	0.1	43.17	4.29
	1	85.53	68.55
紫菀	0.1	9.66	-1.36
	1	79.33	29.03
葶苈子	0.1	37.70	9.21
	1	92.82	76.94
银杏叶	0.1	14.17	—
	1	84.93	
杏仁	0.1	23.80	7.24
	1	61.95	40.76

3 讨论

研究表明10种中药都对PDE4D2有不同程度的抑制作用,其中以桑白皮、款冬花、枇杷叶和马兜铃的作用最为明显。

本研究以中医临床上治疗咳喘的常用中药为对象,通过测试这些中药的提取物对PDE4的抑制作用,验证其作用靶点是否为与咳喘相关的酶PDE4。结果表明,这10个常用于治疗咳喘的中药的粗提取物都对PDE4D2有一定的抑制作用,提示这些中药能

以PDE4为作用靶点来起到缓解或治疗咳喘的作用,为阐明平喘类中药的作用机制提供了参考依据。另一方面,这也说明了这些中药中含有对PDE4有抑制活性的组分,这些有潜力的天然组分可能为寻找新型的PDE4抑制剂提供指引。

桑白皮、款冬花、枇杷叶和马兜铃的粗提取物对PDE4D2的抑制作用最为明显,提示可以先从这几种中药着手研究。在当前研究中,本课题组已对款冬花和枇杷叶进行分段提取,将通过测试分段提取物对PDE4D2的抑制活性确定活性组分所在,再进一步分离,以最终获得活性物质的结构。本研究为揭示平喘类中药的平喘作用靶标和寻找新型PDE4抑制剂提供了科学依据。

参考文献

- [1] Souness J E, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2/3): 127-162.
- [2] Giembycz M A, Field S K. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2010, 4: 147-158.
- [3] Field S K. Roflumilast, a novel phosphodiesterase 4 Inhibitor, for COPD patients with a history of exacerbations [J]. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*, 2011, 5: 57-70.
- [4] 余茜, 闫少杰, 黄汉忠, 等. 慢性阻塞性肺病的新药研发进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(5): 333-338.
- [5] 姜代勋, 陈武, 于同泉, 等. 中草药对磷酸二酯酶4活性影响的初步研究 [J]. *北京农学院学报*, 2006, 21(1): 7-9.
- [6] Xin Z C, Kim E K, Lin C S. Effects for icariin on cGMP-specific PDE5 and cAMP-specific PDE4 activities [J]. *Asian Androl*, 2003, 5(1): 15-22.
- [7] Chen S K, Zhao P, Shao Y X, et al. Moracin M from *Morus alba* L. is a natural phosphodiesterase-4 inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 3261-3264.