

【药效学评价】

不同产地枇杷叶粗提物抑制磷酸二酯酶4活性研究

谭冰心¹, 黄仪有², 彭光天¹, 罗海彬², 于思¹, 郭晓蕾³, 何细新^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

3. 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510663

摘要: 目的 研究不同产地枇杷叶醇提物对抗炎靶标磷酸二酯酶4(PDE4)的抑制作用。方法 采用体积分数95%乙醇回流提取法提取药材,以标记液体闪烁计数法检测提取物对PDE4的D2亚型靶标(PDE4D2)的抑制活性。结果 测试体系的药物终质量浓度为5 mg/L时,20个样品中9个测试样品的抑制率在80%以下;11个样品的抑制率大于80%,其中8个样品大于90%。结论 不同产地枇杷叶醇提物抑制PDE4靶标的活性存在明显差异。

关键词: 枇杷叶; 磷酸二酯酶4; 抑制作用**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)06-0769-07**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.007Inhibition of the crude extract of *Eriobotryae Folium* collected from different districts towards phosphodiesterase-4TAN Bing-xin¹, HUANG Yi-you², PENG Guang-tian¹, LUO Hai-bin², YU Si¹, GUO Xiao-lei³, HE Xi-xin¹

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

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

3. Infinitus (China) Co. Ltd, Guangzhou 510663, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of *Eriobotryae Folium* from twenty different districts towards phosphodiesterase 4(PDE4) *in vitro*. **Methods** The *Eriobotryae Folium* were extracted with 95% ethanol reflux and the inhibition rates against PDE4D2 were carried out by liquid scintillation counting method. **Results** All the samples exhibited inhibitory activities towards PDE4 at 5 mg/L. Among them, nine samples were of the inhibition rate less than 80%, eleven samples were of more than 80% inhibition and eight samples were of more than 90% inhibition. **Conclusion** The *Eriobotryae Folium* shows significantly different inhibitory activities towards PED4.

Key words: *Eriobotryae Folium*; phosphodiesterase 4 (pde4); inhibition

枇杷叶来源于蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.的干燥叶,作为传统中药,其性微寒,味苦,归肺、胃经。具有清肺止咳,降逆止呕功效,用于肺热咳嗽、气逆喘急、胃热呕逆、烦热口渴治疗,收载于《中国药典》供中医临床使用^[1]。枇杷叶含有挥发油、三萜酸类、倍半萜类、

黄酮类、多酚类、有机酸类等多种化学成分,具有抗炎止咳、抑菌、抗氧化、降血糖、抗病毒和抗肿瘤等药理活性^[2-3],枇杷叶制剂是常用的止咳平喘中成药。已有研究表明,枇杷叶中三萜酸具有抗炎作用^[4],但枇杷叶作用靶标水平上的抗炎药效物质及作用机制并不清楚。

收稿日期: 2016-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(21103234, 81373258); 广东自然科学基金团队项目(S2011030003190); 广州市科技计划项目(201607010293, 2014J4100165); 国家公益性行业专项(201407002)**作者简介:** 谭冰心(1991—),女,黑龙江人,硕士在读,从事中药及天然药物活性成分研究。E-mail: 1552734463@qq.com***通信作者** 何细新,男,教授。研究方向为天然药物化学。E-mail: mark07@gzucm.edu.cn.

磷酸二酯酶 4 (PDE4) 是一种新型抗炎靶标, 其抑制剂可作为哮喘等呼吸道疾病治疗药物^[5]。本课题组前期研究发现枇杷叶提取物具有体外抑制 PDE4 活性可能与其抗炎作用相关^[6]。本文对不同地产枇杷叶抑制 PDE4 的活性进行了比较研究, 为进一步分析枇杷叶中抑制 PDE4 的活性成分, 保障其用药质量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UP200S 细胞破碎仪 (德国 Hielscher 公司); 6K15 型离心机 (Sigma 公司); Vortexgenie 涡旋仪 (美国 SI 公司); BioPhotomer 分光光度计 (德国 Eppendorf 公司); Ni-NTA 亲和色谱柱 (Qiagen, Valencia 公司); Tricarb2910 液体闪烁计数器 (PerkinElmer 公司)。

Tris (Bio-Rad)、MgCl₂ (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 (Oceanpank Alexative Chemical)、Ba(OH)₂ 溶液 (Sigma 公司); ZnSO₄ (Sigma-Aldrich); 所有试剂均为分析纯。

1.2 药材

本文所用枇杷叶材料均为栽培或野外采集, 凭证标本由广州中医药大学中药学院药用植物教研室彭光天博士鉴定为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 存放于该校药用植物标本室 (GUUM)。

1.3 测试样品的提取

将上述枇杷叶药材晒干, 粉碎。取 10 g (±0.01 g) 生药, 加入 10 倍量的 95%乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 过滤, 旋蒸合并提取液, 浓缩至浸膏, 干燥备用。

1.4 PDE4 活性测试

1.4.1 样品的配制 将上述药材提取物的浸膏, 分别用二甲基亚砜配成质量浓度 50 mg/L 的溶液, 取 0.1 mL 分别稀释 10 倍, 配成质量浓度为 5 mg/L 的溶液。

1.4.2 样品抑制 PDE4 的活性测试^[7-8] PDE4 可分为 PDE4A、PDE4B、PDE4C、PDE4D 4 个亚型, 分别相互独立的 A、B、C、D 4 个基因编码。靶标蛋白 PDE4D2 是 PDE4D 中的一个类别。将表达好的蛋白靶标用于活性测试: 首先, 取 1/100 稀释的氘代 cAMP 4 μL, 加入缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0、10 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇)

稀释至 58 μL, 然后加入质量浓度为 5 mg/L 的药物溶液 2 μL, 混匀, 再加入已用缓冲液稀释的确定浓度的蛋白质溶液 40 μL, 在 25℃静置反应 15 min, 最后依次加入 0.2 mol/L ZnSO₄ 200 μL 和 0.2 mol/L Ba(OH)₂ 溶液 200 μL, 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 μL, 加入闪烁液 2.5 mL, 振荡混合后用液体闪烁计数器测定。按以下公式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{1 - \text{CPM}_{\text{样品加定量靶蛋白}}}{1 - \text{CPM}_{\text{空白样品加定量靶蛋白}}}\right)$$

式中, CPM 为每分钟计数率。

2 结果与分析

各枇杷叶样品对 PDE4 的抑制活性见表 1。结果显示, 不同地区的枇杷叶对 PDE4 靶标抑制活性差异性明显。在测定体系的药物终质量浓度为 5 mg/L 时, 所测定的 20 个样品中有 9 个样品的抑制率低于 80%, 11 个样品的抑制率大于 80%, 8 个样品大于 90%, 其中 20 号样品抑制活性最高 104.95%, 而 1 号样抑制率最低 27.73%。来自广东河源连平县枇杷叶 (1~4 号样) 活性较低, 其抑制 PDE4 活性均低于 60%。若将测试药物终质量浓度换算成对应的生药质量浓度, 在抑制活性大于 90%的 8 个样品中, 需生药浓度最大的为广东省博罗县长宁镇祥岗村的 17 号样 86.0 mg/L, 其抑制活性为 93.08%; 而需生药浓度最低的是福建省龙岩市长汀县古城镇杨梅溪村 16 号样 29.5 mg/L, 其抑制活性为 93.06%。广东省博罗县不同乡镇采集的 5、6、7 样, 抑制活性在 65%~75%, 需生药质量浓度均低于 25 mg/L。

3 讨论

研究结果表明, 来自 20 个不同产地枇杷叶醇提取物均显示一定抑制靶标 PDE4 的作用, 但其抑制活性存在较明显的差异性。对比不同产地枇杷叶粗提取物抑制 PDE4 活性可知, 广东河源连平元善镇、江面村石龙村产枇杷叶活性较弱, 其抑制率低于 30%, 而广东其他地产枇杷叶抑制率均高于 30%, 但其抑制活性高低不齐。总体而言, 有 9 个样抑制率高于 80%, 接近测定药品的一半数; 有 8 个样抑制率高于 90%, 最高的可达 104.95%。由此可见, 枇杷叶的生源地对其抑制 PDE4 活性影响明显。从采集时间来看, 4~5 月份不同产地采收的枇杷叶抑制活性明显优于其他月份, 在所采集的 6 个 4~5 月样品中有 5 个 (14、17、18、19、20 号样) 的抑制率大于 90%; 而 6 月份之后整体活性有降低趋势。在 7 月

表 1 不同地区枇杷叶粗提取物对 PDE4D2 的抑制率

Table 1 Inhibitory rates of the crude extracts of twenty Eriobotrya japonica leaf towards PDE4D2

标号	采集地	采集时间	经纬度	试药终质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	生药质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	抑制率 /%
1	广东省河源市连平县 元善镇江面村	2015.7.15	N24°20'15.92", E114°29'15.47"	5	35.0	27.73
2	广东省河源市连平县 元善镇石龙村	2015.7.18	N24°20'21.83", E114°29'27.85"	5	42.2	33.86
3	广东省广州市白云区 钟落潭镇茅岗村	2015.7.7	N23°20'39.35", E113°27'05.76"	5	46.8	39.61
4	广东省河源市连平县 县城: 连平县人民医院	2015.7.21	N24°22'13.77", E114°29'23.85"	5	50.0	55.04
5	广东省广州市白云区 钟落潭镇茅岗村	2015.7.7	N23°20'39.35", E113°27'05.76"	5	16.8	66.68
6	贵州省盘县保田镇上 保田村	2015.6.23	N25°23'55.96", E104°41'46.72"	5	21.0	67.30
7	广东省博罗县长宁镇 祥岗村	2015.4.6	N23°14'39.53", E114°03'3.15"	5	23.8	73.02
8	湖北省武汉市武昌区 八一路 299 路	2015.7.8	N30°31'48", E113°21'20"	5	50.3	75.22
9	广东省惠州市博罗县 罗阳镇杨梅村	2015.8.4	N23°13'39.83", E114°19'48.34"	5	42.5	76.37
10	广东省韶关市乐昌市 北乡镇东红村	2015.6.15	N25°10'32.19", E113°21'36.31"	5	40.5	83.25
11	贵州省盘县大山镇高 祥村	2015.6.23	N25°25'54.45", E104°39'31.95"	5	54.5	84.89
12	广东省河源市连平县 元山镇南湖村	2015.7.18	N24°20'25.48", E114°29'33.62"	5	59.8	89.60
13	广东省广州中医药大 学大学城校区	2015.7.16	N23°03'40.39", E113°23'56.86"	5	56.3	90.63
14	广东省博罗县湖镇镇 平安山	2015.4.5	N23°18'57.27", E114°19'22.65"	5	49.3	91.48
15	深圳市龙岗区坪山街 道	2015.3.15	N22°41'34.90", E114°20'13.13"	5	60.8	91.53
16	福建省龙岩市长汀县 古城镇杨梅溪村	2014.12.15	N25°44'1.02", E116°11'54.69"	5	29.5	93.06
17	广东省博罗县长宁镇 祥岗村	2015.4.6	N23°20'39.35", E113°27'05.76"	5	86.0	93.08
18	广东省翁源县坝仔镇 中心幼儿园	2015.5.6	N24°31'28.05", E114°07'17.47"	5	65.3	94.92
19	广东省翁源县坝子镇 新梅村腊坑	2015.5.6	N24°28'53.01", E114°09'4.18"	5	44.8	95.11
20	广东省博罗县长宁镇 酥醪村	2015.4.4	N23°20'0.51", E114°0'25.31"	5	50.3	104.95

份采集的不同产地枇杷叶样品中,有6个抑制活性低于80%,4个低于60%。植物在不同生长期,化学成分含量存在一定差异,从而影响活性。枇杷在我国种植范围广,栽培品种多,作为中药的枇杷叶常年可采。但因产地^[9]、采收季节^[10]、叶龄^[11]不同,枇杷叶的化学成分不同,会影响其抑制PDE4的活性。因此,进一步分析枇杷叶的叶龄、采集时间、产地对PDE4抑制活性的影响,建立其化学成分与对应活性的谱效关系对于枇杷叶药材质量控制十分必要。

此外,PDE4抑制剂对慢性阻塞性肺疾病(COPD)和哮喘有效,有望成为一类与吸入型类固醇药疗效相当但较为安全的平喘口服药^[12]。近来,文献报道了一系列天然药物来源的PDE4抑制剂^[7,13-14]。枇杷叶作为止咳平喘传统中药,本文的研究结果进一步肯定其抑制PDE4作用,这提示枇杷叶作为抗炎止咳平喘的药理功效与PDE4相关。本文将为进一步研究枇杷叶活性物质,从中找新型PDE4天然小分子抑制剂提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 刘传安,邹盛勤,陈武,等.枇杷叶化学成分药理作用及其应用研究进展[J].安徽农业科学,2005,33(11): 2117-2118,2171.
- [3] 郭宇,吴松吉,朴惠善.枇杷叶的化学成分及药理活性研究进展[J].时珍国医国药,2006,17(6): 928-929.
- [4] 王立为,刘新民,余世春.枇杷叶抗炎和止咳作用研究[J].中草药,2004,35(2): 174-176.
- [5] Teixeira M M, Gristwood R W. Phosphodiesterase (PDE) inhibitors anti-inflammatory drugs of the future [J]. Trends Pharmacol Sci., 1997, 18(5): 165-171.
- [6] 葛金芳,李俊,金涌,等.枇杷叶三萜酸的镇咳祛痰平喘作用[J].安徽医科大学学报,2006,41(4): 413-416.
- [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(9): 3261-3264.
- [8] 蔡颖红,曹志远,谢丽霞,等.10种常用平喘中药对磷酸二酯酶4抑制作用的研究[J].药物评价研究,2012,35(5): 345-347.
- [9] 吕寒,习超鹏,陈剑,等.不同产地枇杷叶中三萜酸类成分的含量比较[J].时珍国医国药,2010,21(12): 3170-3171.
- [10] 戚雁飞,李鲲.不同采收期枇杷叶的质量评价及其药材稳定性研究[J].中草药,2011,42(6): 1227-1220.
- [11] 郭娜.福建地产枇杷叶的化学品质评价[D].福州:福建中医药大学,2014.
- [12] 王瑞倩,卞涛.选择性磷酸二酯酶抑制剂罗氟司特在慢性阻塞性肺疾病抗炎作用的研究进展[J].中华哮喘杂志,2012,6(6): 441-446.
- [13] Lin T T, Huang Y Y, Tang G H, et al. Prenylated coumarins: natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Toddalia asiatica* [J]. J Nat Prod, 2014, 77(4): 955-962.
- [14] Zhong J S, Huang Y Y, Zhang T H, et al. Natural phosphodiesterase-4 inhibitors from the leaf skin of *Aloe barbadensis* Miller [J]. Fitoterapia, 2015, 100: 68-74.