

导致 CM EC 损伤的保护作用,从中发现不同配比的药效变化并寻找两者的最佳比例和各自作用的靶点。Sal B 由三分子丹参素和一分子咖啡酸组成,由于含有酚羟基,有很强的抗氧化作用^[9]。Tan II_A 为樱红色针状结晶,体外研究表明, Tan II_A 有较强的抗炎、抗氧化能力,可降低 TNF- α 诱导的升高的人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达;抑制低密度脂蛋白的氧化^[10,11]。在 TNF- α 损伤条件下, Sal B 与 Tan II_A 各配比组均可提高 CM EC 活力,降低 LDH 释放,但单用的作用不如二者配伍后明显。Tan II_A 增加 NO 合成,减少 ET 释放的作用最显著。各配比组均有增强 SOD 活性,减少 MDA 产生的趋势,但以 Tan II_A 抗氧化的能力最强。提示不同中药组份的不同配比产生不同效应。

本实验重点研究组份的配比,从中分析方剂多组份配比与方剂配伍的相关性,揭示主要药效组份对主要靶点的影响规律及整体综合调节的生物学机制。这为在明确主靶点,强化主效应,降低负效应的基础上,建立以组份配伍研制现代复方中药的新模式,寻求高效可控的现代复方中药提供实验依据。

致谢:天津市南开医院同位素室王民宪主任协助检测 ET。

References

[1] Pan G X, Zhang B L, Qiao Y J. Determination of three war-

ter-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* in Fufang Dan-Shen by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(10): 901-903.

- [2] Zhang J T. New drugs derived from medicinal plants [J]. *Therapie*, 2002, 57(2): 137-150.
- [3] Liu P, Liu C H, Wang H N, et al. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2002, 23(8): 733-738.
- [4] Ng T B, Liu F, Wang Z T. Antioxidative activity of natural products from plants [J]. *Life Sci*, 2000, 66: 709-723.
- [5] Aikawa R, Nitta-Komatsubara Y, Kudoh S, et al. Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF- α [J]. *Cytokine*, 2002, 18(4): 179-183.
- [6] Muller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K. Cardiodepression by tumor necrosis factor- α [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9(4): 689-691.
- [7] Nishida M, Carley W M, Gerritsen M E, et al. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264: H639-H641.
- [8] Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 43: 850-859.
- [9] Liu G T, Zhang T M, Wang B E, et al. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43(2): 147-152.
- [10] Jiang K Y, Ruan C G, Gu Z L, et al. Effects of tanshinone II-A sulfonate on adhesion molecule expression of endothelial cells and platelets *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1998, 19(1): 47-50.
- [11] Niu X L, Ichimori K, Yang X, et al. Tanshinone II-A inhibits low density lipoprotein oxidation *in vitro* [J]. *Free Radic Res*, 2000, 33(3): 305-312.

甘遂醇提取物中 4 种二萜类化合物的体内抗病毒活性研究

郑维发*

(江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:目的 阐明甘遂醇提取物中 4 种化合物: 甘遂大戟萜酯 A (I), 13-十一酰基-3-(2, 4-二甲基丁酰基) 巨大戟萜酯 (II), 3-(癸-2, 4-二烯酰基) 巨大戟萜酯 (III) 及甘遂萜酯 A (IV) 的体内抗病毒活性。方法 采用鼻吸入法以流感病毒亚甲型小鼠肺炎适应株 FM₁ 对小鼠造模, 对病毒感染小鼠分别 ig 4 种二萜类化合物, 以小鼠病毒感染肺指数的抑制率为体内抗病毒活性指标。以 ³H-TdR 渗入法测定 4 种二萜类化合物对小鼠淋巴细胞增殖反应的影响。结果 4 种化合物都表现出一定的体内抗病毒活性, I~IV 分别在 20, 40, 50, 30 mg/(kg·d) 以下, 抗病毒活性随剂量增加而增强; 3 种具有四环结构的 Ingenol 衍生物其体内抗病毒活性呈现出明显的构效关系, 在适当剂量下, C-13, C-20 有长链酰基的 I 和 II 表现出较强的体内抗病毒活性, 而这两个位点没有长链酰基的 III 仅表现出弱的抗病毒活性。在低浓度 ($0.025 \sim 7.85 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$) 下, 4 种二萜类化合物对 Con A 诱导的淋巴细胞增殖有显著的增强作用。结论 甘遂二萜类化合物中, C-13, C-20 有长链酰基的 Ingenol 衍生物有显著的体内抗病毒活性, 其抗病毒的机制可能主要是通过提高机体的细胞免疫来实现的。

关键词: 甘遂; 二萜类化合物; 抗病毒活性; 淋巴细胞增殖

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0065-04

* 收稿日期: 2003-04-27

基金项目: 江苏省政府青年科学基金资助项目 (BQ98040); 江苏省教育厅自然科学基金重点项目 (98KJBZ300001)。

作者简介: 郑维发(1962—), 男, 博士后, 硕士生导师, 教授, 主要从事天然产物成分化学和药理学研究。

Tel: (0516) 3403179 E-mail: yyzw@xznz.edu.cn

Study on in vivo antiviral activity of four diterpenoids from ethanol extracts of *Euphorbia kansui*

ZHEN G W ei-fa

(Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou 221116, China)

Key words: *Euphorbia kansui* L iou; diterpenoids; antiviral activity; lymphocyte proliferation

甘遂 *Euphorbia kansui* L iou 为大戟科植物, 广泛分布于我国西北及华北地区, 根部入药, 毒性大, 药性峻猛。传统医学用来治疗腹水和癌症^[1]。研究表明, 甘遂醇提物中含有镇痛作用的甘遂萜酯 A、B^[2,3], 抗白血病作用的甘遂大戟萜酯 A、B^[1], 细胞毒作用的甘遂大戟萜酯 C、D^[4] 及其衍生物和三萜类化合物。近年研究还表明, 甘遂醇提物对肝炎病毒、流感病毒等有显著抑制作用^[5]。Zheng 等^[6] 从甘遂提取物中筛选出 8 种对鸡新城疫病毒 F48 有体外抑制作用化合物, 其中甘遂大戟萜酯 A (I)、13-十一酰基-3-(2, 4-二甲基丁酰基) 巨大戟萜酯 (II)、3-(癸-2, 4-二烯酰基) 巨大戟萜酯 (III) 以及甘遂萜酯 A (IV) 对所试病毒有显著抑制活性。为证实甘遂二萜类化合物体内抗病毒活性, 本实验以流感病毒亚甲型小鼠肺炎适应株感染小鼠, 以小鼠病毒感染肺指数抑制率为指标, 开展了这 4 种化合物体内抗病毒活性研究, 并以 ³H-TdR 渗入法测定其对小鼠淋巴细胞增殖的影响。

1 材料

甘遂 *E. kansui* L iou 购于南京市药材公司, 由叶定江教授鉴定。流感病毒亚甲型小鼠肺炎适应株 (FM₁) 由南京中医药大学微生物教研室提供。昆明种小鼠由徐州医学院实验动物中心提供。³H-TdR 由上海核工业研究所提供。阳性对照采用抗病毒化合物 Stauvdine (斯他吠啉) 购自 Sigma 公司。

2 方法

2.1 化合物的制备: 甘遂根 5 kg 粉碎后室温乙醇浸泡 72 h, 减压蒸馏回收乙醇, 最后得浸膏 293 g。用硅胶柱色谱 (石油醚-丙酮) 分离, 得 9 个不同极性段组份。TLC 检测表明, 甘遂二萜类化合物主要集中在组份 6 (石油醚-丙酮 10 1, 1 500~2 600 mL)。该组份以 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱 (流速为 6 滴/min), 得组份 6-I (35~41 mL)、6-II (42~48 mL) 和组份 6-III (50~108 mL)。组份 6-I 经 60 型硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂) 制备薄层 (石油醚-丙酮 5 1), 得甘遂大戟萜酯 A^[1] (I, Rf=0.41, 493.45 mg, $[\alpha]_D^{26}$: -27.8° in CHCl₃) 和 13-十一酰基-3-(2, 4-二甲基丁酰基) 巨大戟萜酯^[7]

(II, Rf=0.341, 997.79 mg, $[\alpha]_D^{26}$: -27.9° in CHCl₃); 组份 6-II 经制备薄层 (石油醚-丙酮 5 1) 得 3-(癸-2, 4-二烯酰基) 巨大戟萜酯^[8] (III, Rf=0.31, 971.18 mg, $[\alpha]_D^{26}$: -34.9° in CHCl₃); 组份 6-III 经制备薄层 (氯仿-甲醇 200 1) 得甘遂萜酯 A^[2] (IV, Rf=0.38, 1 209.3 mg, $[\alpha]_D^{26}$: +28° in MeOH)。根据 Bruker 400 FT-NMR 核磁共振仪和 ZAB-MS 质谱仪测定图谱与文献比较确定上述化合物结构。

2.2 体内抗病毒活性测定: 定量称取上述 4 种化合物, 以聚山梨酯 80 和少许色拉油研磨, 加适量生理盐水充分震荡后定容。各化合物体内抗病毒活性以对病毒感染小鼠肺指数抑制率为指标。选 14~16 g 小鼠, 雌雄兼用, 按体重随机分 7 组: 正常对照组, 病毒感染模型组, stauvdine 组及 4 个化合物给药组, 每组 20 只。除正常对照组, 其余各组用鼻吸入法染毒, 每鼠 50 μL 种毒液 (效价为 640 1)。各组于染毒的前 1 d 小鼠 ig 给药, 各化合物均按 10~70 mg/(kg·d) 7 个梯度连续给药至感染后的第 3 天。正常对照组及病毒感染模型组 ig 等量生理盐水, Stauvdine 组 ig Stauvdine 10 mg/(kg·d)。第 4 天禁食、禁水 8 h 以上, 按文献方法^[9] 剖杀小鼠, 计算肺指数和肺指数抑制率。

肺指数 = 小鼠肺质量 / 小鼠体重 × 100%

肺指数抑制率 = (病毒感染模型组平均肺指数 - 病毒感染给药组平均肺指数) / 病毒感染模型组平均肺指数 × 100%

2.3 对淋巴细胞增殖的作用: 4 种化合物分别用 DM SO 配置成 20 mg/mL 溶液, 再以 10% 胎牛血清 RPM I-1640 培养基稀释成 1 mg/mL 溶液, 置 4 冰箱保存备用。小鼠淋巴细胞按文献方法^[9] 制备, 用 10% 胎牛血清 RPM I-1640 培养基将淋巴细胞稀释至 1×10^7 /mL, 加入 96 孔板中, 每孔 200 μL。药物的起始浓度为 0.1 μg/mL, 二倍体积稀释成 11 个梯度, 每个浓度梯度重复 5 次。每孔加入 10 μg/mL 刀豆蛋白 A (Con A, Sigma) 20 μL。对照孔加入等量 ConA, 在 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 66 h 后, 加入 ³H-TdR 20 μL, 使每孔放射量为 5.55×10^5 Bq/mL, 继续培养 6 h。按文献方法^[9] 用

液体闪烁计数器 (西安国营二六二厂) 测定每孔的脉冲次数 cpm (放射强度), 观察 4 种化合物对小鼠淋巴细胞放射量的影响。

3 结果

3.1 体内抗病毒活性: 4 种化合物都表现出一定的体内抗病毒活性, I ~ IV 分别在 20, 40, 50, 30 mg/(kg · d) 以下, 抗病毒活性随剂量增加而增强; 分别在 30, 50, 60, 40 mg/(kg · d) 以上时, 抗病毒活性

随剂量增加而降低; 到 70 mg/(kg · d) 时, I 和 IV 对小鼠病毒感染肺指数抑制率出现负值, 表明这两种化合物在此剂量下对小鼠病毒性肺炎不仅没有治疗作用, 而且加剧了染毒小鼠肺的肝样性病变。在适当剂量下, I 和 II 表现出较强的体内抗病毒活性, 对小鼠病毒感染肺指数的抑制率与 Stauvdine 相当, 化合物 III 次之, IV 仅表现出弱的抗病毒活性, 见表 1。

表 1 I ~ IV 对流感病毒 FM₁ 感染小鼠肺指数的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n = 20)

Table 1 Inhibitory effect of I—IV on lung index of mice infected by flu-virus FM₁ ($\bar{x} \pm s$, n = 20)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	肺指数	肺指数抑制率/%	组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	肺指数	肺指数抑制率/%
正常对照	-	0.99 ± 0.51	-	III	10	1.49 ± 0.61	4.48
病毒感染模型	-	1.56 ± 0.57	-		20	1.48 ± 0.33	5.12
I	10	1.31 ± 0.21	16.02		30	1.43 ± 0.19	8.33
	20	1.17 ± 0.39*	25.14		40	1.39 ± 0.38	10.89
	30	1.30 ± 0.19	16.60		50	1.28 ± 0.17*	17.94
	40	1.36 ± 0.44	12.82		60	1.37 ± 0.34	16.66
	50	1.41 ± 0.45	9.61		70	1.42 ± 0.16	6.41
	60	1.54 ± 0.67	1.28	IV	10	1.51 ± 0.46	3.21
	70	1.69 ± 0.63	- 8.33		20	1.45 ± 0.16	7.05
II	10	1.45 ± 0.53	7.05		30	1.37 ± 0.51	12.17
	20	1.39 ± 0.29	10.89		40	1.48 ± 0.37	5.12
	30	1.33 ± 0.34	14.74		50	1.48 ± 0.54	5.12
	40	1.23 ± 0.30*	21.15		60	1.53 ± 0.39	1.96
	50	1.38 ± 0.27	11.53		70	1.58 ± 0.44	- 1.28
	60	1.49 ± 0.59	4.48	Stauvdine	10	1.17 ± 0.27*	25.00
	70	1.52 ± 0.38	2.56				

与模型组比较: *P < 0.05

*P < 0.05 vs model group

3.2 对淋巴细胞增殖的作用: 4 种化合物对小鼠淋巴细胞增殖的影响程度随其结构和浓度的不同而表现出一定的差异。在浓度高于 0.05 μg/mL 时, I, II, IV 对淋巴细胞表现出细胞毒性, 即对淋巴细胞增殖表现出抑制作用 (cpm 小于正常对照组); 在 0.025 μg/mL 时, 4 种化合物使增殖的小鼠淋巴细胞增殖强度大幅度增加, I ~ IV 分别在 3.13 ×

10⁻³, 3.13 × 10⁻³, 6.25 × 10⁻³, 3.13 × 10⁻³ μg/mL 时达峰值。随浓度的进一步稀释, 在低于 3.97 × 10⁻⁴ μg/mL 时, 4 种化合物对淋巴细胞增殖没有显著影响, 见表 2。

4 讨论

4 种化合物在适当剂量下都具有一定的体内抗病毒活性。剂量为 20 mg/(kg · d) 以下, I, II, III

表 2 I ~ IV 对小鼠淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Table 2 Effect of I—IV on lymphocyte proliferation of mice ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

浓度/(μg · mL ⁻¹)	I	II	III	IV	对 照
0.1	588.12 ± 39	798.14 ± 229	1 289.74 ± 99	793.12 ± 243	3368.11 ± 375
0.05	890.74 ± 101	2 017.98 ± 316	3 348.35 ± 567	1 897.65 ± 291	
0.025	6 219.78 ± 337**	4 768.99 ± 786	4 878.22 ± 792	3 087.67 ± 433	
0.0125	7 134.89 ± 594**	6 134.55 ± 981**	5 787.66 ± 993	4 432.80 ± 349	
6.25 × 10 ⁻³	7 215.78 ± 399**	6 577.48 ± 1 002**	6 914.30 ± 1 200**	4 057.83 ± 776	
3.13 × 10 ⁻³	7 387.33 ± 337**	6 997.17 ± 347**	6 079.91 ± 1 001**	5 348.90 ± 544	
1.56 × 10 ⁻³	7 259.83 ± 589**	6 123.47 ± 836**	5 879.34 ± 761	4 084.19 ± 671	
7.85 × 10 ⁻⁴	5 009.66 ± 195	5 978.13 ± 479**	4 913.30 ± 799	3 879.79 ± 897	
3.97 × 10 ⁻⁴	4 329.88 ± 755	3 845.97 ± 435	3 519.77 ± 279	3 644.77 ± 411	
1.89 × 10 ⁻⁴	3 547.81 ± 377	3 378.76 ± 388	3 449.76 ± 395	3 412.13 ± 347	
9.42 × 10 ⁻⁵	3 378.67 ± 354	3 565.19 ± 431	3 388.98 ± 377	3 498.50 ± 388	

与对照组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs control group

(ingenol 衍生物) 呈现出明显构效关系, 即 C-13, C-20 位有长链酰基的 I 对小鼠病毒感染肺指数抑制率最大, C-13 位有长链酰基的 II 次之, 而这两个位点无长链酰基的 III 对小鼠病毒感染肺指数仅有很小的抑制作用。随剂量增加, I 对小鼠病毒感染肺指数抑制率逐渐减小, 70 mg/(kg · d) 时, 不表现出体内抗病毒活性。这说明 C-13、C-20 位长链酰基的存在提高体内抗病毒活性的同时, 也增加了毒性。

流感病毒进入肺部, 首先感染肺部支气管黏膜和肺泡壁上皮细胞, 触发机体细胞免疫, 引发 T 淋巴细胞和 NK 细胞增殖反应。其中细胞毒淋巴细胞 (CTL) 在外来抗原和被抗原激活的 CD⁺ 4 T 细胞分泌的细胞因子作用下开始增殖与分化, 并对感染病毒的细胞进行杀伤, NK 细胞分泌的细胞因子如 IFN- γ 能有效地增强巨噬细胞增殖和提高其对病毒感染细胞吞噬能力^[10]。实验结果表明 4 种化合物在适当浓度下, 对 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖有十分显著的增强作用, 增强的幅度是对照组的 1~ 2 倍。推测 4 种化合物对小鼠病毒性肺炎的防治作用可能主要是通过提升机体细胞免疫来实现的。

References

- [1] Wu T S, Lin Y M, Haruna M, *et al*. Antitumor agents, 119 Kansuiphorins A and B, two novel antileukemic diterpen esters from *Euphorbia kansui* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54 (3): 823-829.
- [2] Uemura D, Hirata Y. The structure of Kansuine A, a new multi-oxygenated diterpene from *Euphorbia kansui* [J]. *Tetrahedron Letters*, 1975, (21): 1697-1700.
- [3] Uemura D, Katayama C, Uno E, *et al*. Kansuine B, a novel multi-oxygenated diterpene from *Euphorbia kansui* Liu [J]. *Tetrahedron Letters*, 1975, (21): 1703-1706.
- [4] Pan D J, Hu C Q, Chang J J, *et al*. Kansuiphorin-C and kansuiphorin-D, cytotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(3): 1018-1020.
- [5] Zhao J Y. A new antiviral agent with plant origin [J]. *World Phytochemistry* (国外医药·植物药分册), 1996, 11, 138.
- [6] Zheng W F, Cui Z, Zhu Q. Cytotoxicity and antiviral activity of the compounds from *Euphorbia kansui* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(8): 754-756.
- [7] Ott H H, Hecker, E. Highly irritant ingenane type diterpene esters from *Euphorbia kansui* Liu [J]. *Experientia*, 1981, 37: 88-91.
- [8] Matsumoto T, Cyong J C, Yamada H. Stimulatory effects of ingenols from *Euphorbia kansui* on the expression of macrophage Fc receptor [J]. *Planta Med*, 1992, 58: 255-258.
- [9] Chen Q. *Methodology in Pharmacology Study on Chinese Materia Medica* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [10] Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, *et al*. Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 83: 317-322.

西红花酸对过氧化氢诱发心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 改变的作用

余卫平^{1,2}, 钱之玉^{1*}, 绪广林³, 沈成兴^{4*}

(1. 中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009; 2. 东南大学医学院 病理生理教研室, 江苏 南京 210009; 3. 南京师范大学生命科学院, 江苏 南京 210097; 4. 东南大学附属中大医院 心血管内科, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 观察西红花酸对 H₂O₂ 诱发培养心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 改变的效应, 并探讨其机制。方法 应用 Fluo-3/AM 荧光标记技术和激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 检测不同因素处理的单个培养心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。结果 H₂O₂ 呈浓度依赖性地使单个培养心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 并不受细胞外环境是否存在 Ca²⁺ 的影响, L-型 Ca²⁺ 通道阻滞剂维拉帕米也不能完全中止 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加; 不同剂量的西红花酸则能减低 H₂O₂ 引发的单个培养心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高的幅度。结论 西红花酸能明显抑制 H₂O₂ 诱发培养心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的作用, 可能与调整胞内钙库 Ca²⁺ 的释放和摄取、Ca²⁺ 内流等机制有关。

关键词: 西红花酸; 过氧化氢; 心肌细胞; 钙离子

中图分类号: R 286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0068-04

Effects of crocetin on $[Ca^{2+}]_i$ change in myocardium cell induced by H₂O₂

YU Weiping^{1,2}, QIAN Zhiyu¹, XU Guanglin³, SHEN Chengxing⁴

(1. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Pathophysiology, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China; 3. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 4. Department of Cardiovascular Disease Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China)

* 收稿日期: 2003-06-19

基金项目: 江苏省基础研究计划 (自然科学基金) 项目 (BJ198124)

作者简介: 余卫平 (1960—), 男, 蒙古族, 江苏省镇江人, 东南大学医学院副教授, 药理学博士, 1997 年赴美国哥伦比亚大学研究, 研究方向为生化药理学。

* 通讯作者 Tel: (025) 3271322 E-mail: wpy@jlonline.com