

贯叶金丝桃素的化学不稳定性及药理活性

白 洁, 杨得坡*, 王冬梅, 刘朝

(中山大学药学院 生药学与天然药物化学实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 贯叶金丝桃素是贯叶连翘植物的特征成分, 由于其遇光后, 极易发生化学氧化降解, 一直未受重视。最近的研究发现, 该化合物是贯叶连翘及其制剂抗抑郁的重要活性成分之一, 其作用机制可能是多位点, 并且与金丝桃素以及其他临床上常用的抗抑郁化学合成药物不同。通过加入化学保护剂, 可以实现提取物或其制剂的质量控制与药品的安全稳定。贯叶金丝桃素除具有抗抑郁作用外, 还具有抗肿瘤、抗菌与促进学习记忆等药理活性, 是目前国际上研究的热点天然药物之一。

关键词: 贯叶金丝桃素; 抗抑郁; 不稳定性

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0338-03

Chemical instability and pharmacological activity of hyperforin

BAI Jie, YANG De-po, WANG Dong-mei, LIU Chao-sheng

(Laboratory of Pharmacognosy and Natural Drug Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Key words: hyperforin; antidepressant; instability

贯叶金丝桃素(hyperforin, HF)仅发现存在于藤黄科贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 的花和果实中, 为该植物的特征性成分, 首先作为抗菌活性物质由俄国科学家发现并命名, 并在 1975 年测定其化学结构。贯叶金丝桃素具有亲脂性, 对光、氧、温度敏感及其不稳定, 存放几个星期或几个月便完全分解, 因而它的药理学作用常被忽视。由于它在提取物中不能维持一个足够的浓度, 一度被认为不可能是贯叶连翘中的抗抑郁活性成分。然而, 随着对贯叶连翘提取物抗抑郁作用及其机制的深入研究, 发现贯叶金丝桃素为其抗抑郁

的主要活性成分之一, 同时还具有其他神经药理与肿瘤药理活性, 这就极大地激发了研究者对这种结构特异、含量丰富化合物的兴趣, 现就对其近年来在化学不稳定性与药理活性研究方面的进展综述如下。

1 化学结构与其不稳定性

1.1 化学结构: HF 及其衍生物加贯叶金丝桃素(adhyperforin, AHF)是贯叶连翘提取物亲脂性成分中 2 种主要的间苯三酚类物质。HF 的分子式是 $C_{35}H_{50}O_4$, 相对分子质量为 536.77, 熔点 $79 \sim 80$, 结构式如图 1 所示。

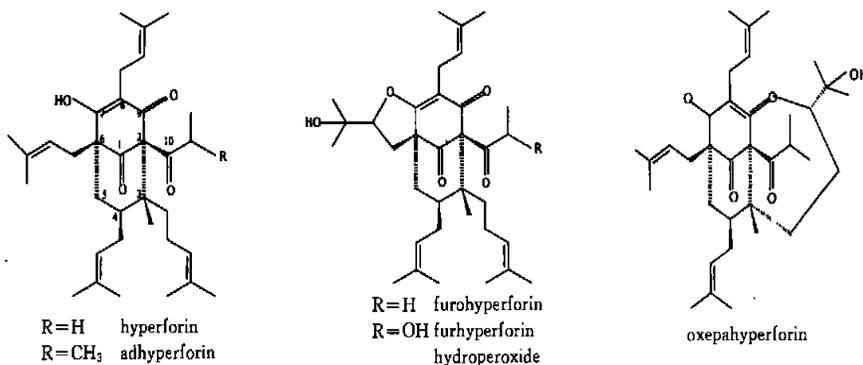


图 1 贯叶金丝桃素、加贯叶金丝桃素及贯叶金丝桃素氧化产物的结构

Fig 1 Structures of hyperforin, adhyperforin, and oxidation products of hyperforin

由于 HF 的结构比较复杂, 化学合成困难, 且在贯叶连翘中的含量较丰富, 现在一般都是从贯叶连翘中提取。应用

二氧化碳超临界萃取技术可得到 HF 含量达 70% 的提取物^[1,2]; Orth 等^[3]通过制备高效液相色谱从贯叶连翘提取物

* 收稿日期: 2003-05-12

基金项目: 国家教育部高等学校骨干教师资助基金项目; 广州市科技局重大项目(2000Z-101-01)

作者简介: 白 洁(1976—), 女(回族), 安徽阜阳人, 中山大学生命科学学院博士生, 主要从事天然药物的研究与开发。

E-mail: cresdi@sina.com

* 通讯作者 E-mail: ls39@zsu.edu.cn Tel: (020)84113967

中分离纯化得到了含量高于 99.9% 的 HF。

1.2 化学不稳定性及其氧化产物: HF 由于其特定的化学结构,在极性和非极性溶剂中溶解度都很高,但在非极性溶剂中很容易被氧化^[4],主要有 3 种氧化产物,如图 1。Fuzzati 等^[5]对 HF 稳定性研究中发现,在极性溶剂如甲醇、乙醇、乙醚中,室温或 4 时能保持稳定;而在 40 时暴露于空气中或是溶解于非极性溶剂如正己烷则会发生氧化。对其稳定性的动力学研究发现,40 时 HF 暴露于空气中 48 h 后有 60% 发生了变化,通过 HPLC-ES/MS 图谱的分析发现主要有 2 种氧化产物: 呋喃并贯叶金丝桃素 (furohyperforin, FHF) 和呋喃并贯叶金丝桃素的过氧化物 (furohyperforin hydroperoxide, FHO) (图 1)。它们也发现存在于贯叶连翘提取物中^[6]。HF 在正己烷溶液中储存 4 h 后只有 30% 未被氧化,20 h 后则完全被氧化,两种主要的降解产物是 FHF 的异构体。AFH 也有着与 HF 相似的不稳定性。在 Orth 等^[1]对 HF 的稳定性研究中,通过比较在 -30, -20, 4, 20

直接暴露于空气中或充氮气保存 8 个月与保存于液氮 (-196) 中 HF 的变化情况发现,充氮条件下较稳定,而在 -20 以上保存 HF 的含量下降显著,-20 充氮气或 -30 暴露于空气中保存的结果与液氮中保存无显著性差异。

HF 对光亦不稳定,将贯叶连翘粗提物置于 1 E/m² 的光照射下 5 min 即有 96% 的贯叶金丝桃素损失^[7]。因此若长期保存还需尽量使之充氮或溶解于极性溶剂中避光保存于 -30 以下的低温环境中。

由于贯叶金丝桃素易被氧化,因此在其分离纯化的过程中需要加入保护剂。如在制备贯叶连翘提取物时,在溶剂中加入 0.01% 抗坏血酸;对亲脂性部位进行硅胶柱色谱时洗脱液中加入 0.1% 抗坏血酸可防止贯叶金丝桃素被氧化^[11]。

2 药理作用

2.1 抗抑郁作用: 贯叶连翘提取物的抗抑郁作用的活性成分普遍被认为是金丝桃素。Chatterjee 等^[8]研究了贯叶连翘乙醇提取物(含 4.5% HF, 0.3% 金丝桃素)和超临界 CO₂ 萃取物(含 38.8% HF)在抗抑郁动物行为绝望实验和获得性无助实验的研究中,发现其抗抑郁作用与 HF 含量呈正相关,因此认为 HF 也可能是抗抑郁的活性成分之一。深入的药理研究发现,HF 是有效的 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NA)、 γ -氨基丁酸(GABA)和 L-谷氨酸(L-glutamate)的摄取抑制剂,且其 IC₅₀ 分别为 50~100 ng/mL (5-HT, DA 和 GABA) 和 500 ng/mL (L-glutamate)^[9]; HF 能提高大鼠脑蓝斑部位 DA, NA, 5-HT 和谷氨酸的细胞外浓度^[10]; 并且临床上应用 HF 含量不同的提取物表现出的抗抑郁作用与其含量呈正相关^[11]。

HF 以相似的效价抑制鼠脑突触体和人血小板的 5-HT, DA, NA 摄取,同时又能抑制 GABA, L-glutamate 的摄取,这种非选择性的作用表明其抗抑郁的机制可能与其他抗抑郁剂不同,可能与不同转运体分子上的特异结合点无关,而是参与了神经递质转运体的整体活性^[12]。HF 对单胺再摄

取这种表现的突触前抑制现象,可能是通过其诱导神经递质从突触囊泡到细胞浆的释放,反映出“利血平样的机制”^[13]。Roz 等^[13]对比了 HF 在突触和囊泡的单胺转运体对单胺类递质的再摄取的抑制作用发现, HF 抑制囊泡的再摄取类似于抑制突触再摄取,也是非竞争性的。HF 抑制囊泡单胺类递质转运体的生化机制还不清楚,认为可能的原因是 HF 阻断了囊泡再摄取的驱动力,而由 H⁺-ATPase 诱导的跨突触囊泡膜的 pH 梯度是囊泡单胺类递质再摄取和储存的主要驱动力, HF 能轻易地翻转由此所产生的 pH 梯度^[7]。另外, HF 可以提高细胞内钠离子浓度 ([Na⁺]_i), 而包括 5-HT 转运体在内的多种神经递质转运体都是由跨膜钠离子浓度梯度驱动的,由此可以解释 HF 对多种神经递质摄取的非特异性抑制作用^[5]。HF 升高 [Na⁺]_i 作用的机制可能是通过激活细胞膜上 Na⁺-H⁺ 交换从而增加 Na⁺ 摄取入神经细胞,或者通过阻断对阿米洛利 (amilofide) 敏感的 Na⁺ 通道从而降低 Na⁺ 从神经元中排出^[15]。

尽管抑制神经递质的再摄取可能是 HF 抗抑郁的主要机制,但它在神经药理其他方面作用也可能与其抗抑郁有关。在大鼠海马锥体神经元和大脑皮层浦肯野神经元中,利用整体细胞膜片钳和浓度膜片钳技术研究了 HF 对电压和配体门控离子传导的作用发现,微摩尔浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 水平的 HF 可抑制 NMDA (N-甲基-D-门冬氨酸), AMPA (α -氨基羟甲基恶唑丙酸) 和 GABA 受体介导的反应及多种离子传导,如 Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 等^[16,17],且在此剂量范围 HF 能显著降低脑膜蛋白附近的脂质的环状(annular)流动性^[6]。HF 在微摩尔浓度范围内对 μ , β , κ 阿片受体和 5-HT₆, 5-HT₇ 受体有亲和力^[18]。且另有报道 HF 能使皮质 β 肾上腺素受体密度下调,尽管这种作用对抗抑郁作用来说不是必需的,但却是多数抗抑郁药具有的普遍的性质^[19]。

由此可见,一方面, HF 同传统的 5-HT, NE 抑制剂一样能够抑制 3 种单胺递质的再摄取;另一方面,它又表现出新的抗抑郁的分子机制。

2.2 抗肿瘤作用: HF 能抑制肿瘤细胞的生长,对人和大鼠多种肿瘤细胞系的生长有抑制作用, IC₅₀ 为 3~15 $\mu\text{mol/L}$ 。在 MT-450 乳癌细胞中, HF 可增加 caspase-9 和 caspase-3 活性, HF 介导的细胞凋亡能被广谱的 caspase 抑制剂 zVAD fmk 所阻滞; 当将 HF 加到 MT-450 细胞中,能诱导产生线粒体跨膜电势 $\Delta\Psi$ (deltapsin) 的快速耗损,且引起线粒体均化作用和空泡形成的形态学改变; 对 $\Delta\Psi$ 的检测发现 HF 介导的线粒体通透性改变不能被 zVAD fmk 所阻滞,表明线粒体通透性改变是 caspase 激活的原因而不是结果。而且 HF 还能促使离体的线粒体释放细胞色素 C, 表明 HF 激活了线粒体介导的信号转导通路从而诱导肿瘤细胞凋亡。在体内, HF 能抑制免疫活性的 Wistar 大鼠的自体同源的 MT-450 乳癌生长,其效果与细胞毒素紫杉醇类似,并且未出现任何急性中毒症状^[20]。由于 HF 具有显著的抗肿瘤活性,体内低毒性,天然资源含量丰富的性质,其有望成为新型的抗肿瘤药物。

2.3 促进学习记忆: Klusa 等^[21]研究了贯叶金丝桃素钠盐对大鼠和小鼠在回避实验中的作用发现, 每日给大鼠 ig HF 1.25 mg/kg, 在连续 7 d 的训练中能显著地提高学习能力, 这种学习所获得的记忆在停药且停止训练的 9 d 后, 仍能大部分的保留, 且学习促进和/或记忆巩固的作用与剂量的关系呈现出倒“U”型曲线。在小鼠的被动回避实验中, 单次 ig 给药 HF 1.25 mg/kg 不仅能提高记忆的获得和巩固, 而且能几乎完全反转由东莨菪碱所致的记忆缺失, 这说明 HF 参与了认知的作用。

Buchholzer 等^[22]采用微透析技术证明了 HF 对体外胆碱(Ch)的摄取和体内纹状体乙酰胆碱(Ach)的释放有双向调节作用。在大鼠脑纹状体突触体中的 HF 抑制高亲和力胆碱的摄取, IC₅₀ 为 8.5 μmol/L, 而对低亲和力胆碱摄取无影响。通过透析探针将 HF (100 μmol/L) 局部输注引起 Ach 释放的减少并伴随着 Ch 水平的增加; 然而低浓度的 HF (10 μmol/L) 能增加 Ach 释放和降低 Ch 水平。腹腔注射 HF 1~10 mg/kg 可达到有效血药浓度, 引起纹状体 Ach 释放的显著增加。Ach 是参与学习记忆的重要的神经递质, HF 促进学习记忆的作用可能与其低剂量增加 Ach 释放相关。

2.4 抗菌作用: 贯叶连翘提取物具有抗菌作用早在 1959 年就有报道。贯叶金丝桃素带有亲脂性的异戊二烯链, 与已知的抗生素结构大不相同, 由于其纯品的不稳定性, 其抗菌活性一直没有进一步的研究。直至 1999 年, Christoph 等对纯度大于 90% 的 HF 的研究发现 0.1 μg/mL 对 G⁺ 菌有抑制作用, 对 G⁻ 菌无生长抑制作用。另有报道, HF 对能耐受甲氧西林(Methicillin)的金黄色葡萄球菌有良好的抗菌活性, MIC 为 1.0 μg/mL^[23]。

3 结语

贯叶连翘的抗抑郁药作用涉及多种神经传递与受体系统, 是多种化学成分协同作用的结果, 其中贯叶金丝桃素发挥了重要作用, 目前已经成为药材、提取物或其制剂质量控制的指标性成分。贯叶金丝桃素氧化机制、分子药理、化学保护、合成技术、衍生物药理活性, 以及相关的药物研究与临床试验都在进行中。该化合物的抗肿瘤、促进学习记忆与抗菌活性的研究, 也增加了贯叶金丝桃素及其来源植物贯叶连翘在天然药物研究与临床应用中的地位与开发利用前景。

References

- [1] Orth H C, Rentel C, Schmidt P C. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51(2): 193-200
- [2] Gobbi M, Valle F D, Ciapparelli C, et al. *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex [J]. *Nahrungsmittelchemie Arch Pharmacol*, 1999, 360(3): 262-269
- [3] Chatterjee S S, Bhattacharya S K, Wonnemann M, et al. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts [J]. *Life Sci*, 1998, 63(6): 499-510
- [4] Maisebacher P, Kovar K A. Analysis and stability of *Hypericum perforatum* L. [J]. *Planta Med*, 1992, 58(4): 351-354
- [5] Fuzzati N, Gabetta B, Strepponi T, et al. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and multiple mass spectrometry studies of hyperforin degradation products [J]. *J Chromatogr*, 2001, 926(1): 187-198
- [6] Eckert G P, Muller W E. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2001, 34(Suppl 1): 22-25
- [7] Poutaraud A, Lobstein A, Girardin P, et al. Improved procedure for the quality control of *Hypericum perforatum* L. [J]. *Phytochem Anal*, 2001, 12(6): 355-362
- [8] Catchpole O J, Perry N B, Silva da B M T, et al. Supercritical extraction of herbs: Saw Palmetto, St John's wort, Kava root, and Echinacea [J]. *J Supercrit Fluids*, 2002, 22: 129-138
- [9] Muller W E, Singer A, Wonnemann M, et al. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract [J]. *Pharmacopsychiatry*, 1998, 31(Suppl 1): 16-21
- [10] Kaehler S T, Sinner C, Chatterjee S S, et al. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 262(3): 199-202
- [11] Laakmann G, Schule C, Baghai T, et al. St John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy [J]. *Pharmacopsychiatry*, 1998, 31(Suppl 1): 54-59
- [12] Dicarlo G, Borrelli F, Ernst E, et al. St John's wort: Prozac from the plant kingdom [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, 22(6): 292-297
- [13] Roz N, Mazur Y, Hirshfeld A, et al. Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin [J]. *Life Sci*, 2002, 71(9): 2227-2237
- [14] Chatterjee S S, Biber A, Weibezahn C. Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2001, 34(Suppl 1): 11-19
- [15] Wonnemann M, Singer A, Muller W E. Inhibition of synaptosomal uptake of ³H-L-glutamate and ³H-GABA by hyperforin, a major constituent of St John's wort: the role of aniloride sensitive sodium conductive pathways [J]. *Neuropharmacology*, 2000, 23(2): 188-197
- [16] Chatterjee S, Filippov V, Lishko P, et al. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat [J]. *Life Sci*, 1999, 65: 2395-2405
- [17] Fisunov A, Lozovaya N, Tsintsadze T, et al. Hyperforin modulates gating of P-type Ca²⁺ current in cerebellar Purkinje neurons [J]. *Pflug Arch*, 2000, 440(3): 427-434
- [18] Simmen U, Burkard W, Berger K, et al. Extracts and constituents of *Hypericum perforatum* inhibit the binding of various ligands to recombinant receptors expressed with the Semliki Forest virus system [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 1999, 19(1-4): 59-74
- [19] Muller W E, Rollim M, Schafer C, et al. Effects of hypericum extract (LI60) in biochemical models of antidepressant activity [J]. *Pharmacopsychiatry*, 1997, 30(Suppl 2): 102-107
- [20] Schempp C M, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, et al. Inhibition of tumor cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St John's wort that acts by induction of apoptosis [J]. *Oncogene*, 2002, 21(8): 1242-1250
- [21] Klusa V, Gemane S, Noldner M, et al. *Hypericum* extract and hyperforin memory-enhancing properties in rodents [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2001, 34(Suppl 1): 61-69
- [22] Buchholzer M L, Dvorok C, Hilgert M, et al. Dual modulation of striatal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St John's wort [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 30(2): 714-719
- [23] Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2001, 34(Suppl 1): 116-118