

丹参水溶性酚酸类化合物药理及生物合成途径研究进展

赵淑娟, 章国瑛, 刘 涂, 胡之璧*

(上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要: 丹参具有活血化瘀、安神宁息之功效, 是中医临床治疗冠心病、脑血栓、肝炎及肝硬化等的常用药。最新的药理研究表明, 丹参的水溶性酚酸类化合物对肝癌、糖尿型肾病、抑郁和艾滋病(AIDS)等具有潜在的治疗作用, 是有待进一步开发的药用资源。对此类化合物生物合成途径的研究, 可以为更好地利用这一资源奠定基础。

关键词: 丹参; 水溶性酚酸类化合物; 生物合成途径

中图分类号: R284.3, R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0341-04

Advances in research of pharmacological activities and biosynthesis pathway of water-soluble phenolic compounds of *Salvia miltiorrhiza*

ZHAO Shu-juan, ZHANG Guo-ying, LIU Di, HU Zhi-bi

(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; water-soluble phenolic compounds; biosynthesis pathway

丹参水溶性成分是丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的主要活性成分之一, 已分离获得了近 20 种单体化合物。它们均具有很强的抗氧化和清除自由基的功能, 其中尤以丹酚酸 A (salvianolic acid A) 和丹酚酸 B [salvianolic acid B, 又称紫草酸 (lithospermic acid B)] 的含量最高, 活性最强。这些物质含有至少一个苯环与苯环相连的羟基, 表现出不同程度的酸性, 属水溶性酚酸类化合物。在植物体内, 此类化合物由苯丙烷类化合物代谢途径 (phenylpropanoid metabolism pathway) 产生, 是植物的一类次生代谢产物。

1 药理作用

中医临床上, 丹参主要用来治疗冠心病、脑血栓、肝炎及肝硬化等。长期的临床应用背景及其在治疗疾病方面的明显效果, 使得丹参的水溶性酚酸类化合物引起国内外学者的重视。随着人类对相关疾病病理机制的不断了解, 对其药理作用的研究也进一步深入。

1.1 护肝、抗肝纤维化和抗肝癌: 自由基及其引发的脂质过氧化是 CCl_4 导致的肝细胞损伤的主要原因, 丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化的主要产物, 谷胱甘肽 (GSH) 则是清除超氧离子和过氧化氢的清除剂。刘平等^[1]和胡义扬等^[2]报道, 从丹参中提取的丹酚酸 A (SA-A) 能有效抑制 CCl_4 引起的受损大鼠肝细胞中 MDA 的增加和 GSH 的减少, 并能不同程度地降低超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性。结果表明, 抑制脂质体过氧化可能是 SA-A 保护肝功能的主要机制。迷迭香酸 (rosmarinic acid) 也可能是通过清除或降低超氧化物歧化酶和过氧化酶的作用而起到护肝作用的^[3]。固醇醇沉积性肝损伤中, 抗细胞凋亡则可能是丹参水

溶性成分护肝的主要原因。

肝纤维化是肝硬变的早期过程, 抑制肝纤维化是防止肝硬变的主要手段。一般认为, 肝成纤维细胞 (fibroblast) 和肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的增生及肝细胞内胶原的沉积是肝纤维化的主要原因。SA-A 能抑制 NIH/3T3 成纤维细胞的增殖, 抑制胞内胶原的合成和 I 型原胶原蛋白的基因表达。在大鼠的体外实验中^[4], 丹酚酸 B (SA-B) 也可以抑制 HSC 的增殖和胶原的产生, 降低胞内转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 分泌素和分裂素激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的活性。活化的 TGF- β_1 与细胞壁上的受体结合, 使得细胞外信号经 MAPK 由胞质向细胞核内传导, 从而调节基因的表达。原胶原蛋白基因是这一信号传导过程的一个主要靶点, 这可能是 SA-B 抑制胶原产生的主要原因。

Liu 等^[5,6]报道, 丹参的水溶性提取物 (SM) 能明显抑制人的肝癌细胞株 HepG2 细胞的增殖, 引起细胞形态的改变, 最终导致癌细胞的凋亡。这种作用具有时间和剂量的依赖性。进一步的研究发现, SM 抑制细胞生长的特性是其引起肝癌细胞凋亡的主要原因。这一过程可能是通过 SM 与 GSH 的直接结合, 造成细胞内 GSH 和蛋白硫 (protein thiol) 含量急剧减少, 进而引起线粒体通透性转移 (mitochondrial permeability transition, MPT), 线粒体膜功能 (mitochondrial membrane potential, MMP) 丧失, 活性氧种类 (reactive oxygen species, ROS) 增加, 最终导致癌细胞的程序性死亡。

1.2 抗心血管疾病: 动脉粥样硬化是常见心血管疾病。白细胞向动脉管壁迁移和黏着是动脉粥样硬化的早期症状, 动脉

* 收稿日期: 2003-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300447)

作者简介: 赵淑娟 (1971—), 女, 2003 年毕业于上海中医药大学, 获博士学位, 现为上海中医药大学中药研究所助理研究员, 主要从事中药生物工程工作。Tel: (021)51322495 E-mail: zhaoshuj@hotmail.com

内皮细胞黏着分子的表达可能在此过程中起着重要的作用。Chen 等^[7]的实验证明,丹参的水溶性抗过氧化成分 SA-B,抑制了肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)中 TNF- α 激活的核因子 κ B 的活性,阻断了此类细胞中白细胞黏着分子——血管黏着分子(vascular adhesion molecular-1, VCAM-1)和胞间的细胞黏着分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达,显著降低了人单核白细胞株 U937 与 HAECs 的结合。SA-B 还可以提高胆固醇饲喂的兔低密度脂蛋白(LDL)中维生素 E 的含量,降低动脉粥样硬化程度^[8]。SA-B 的这种抗炎及其抑制 LDL 的特性可能是其对动脉粥样硬化具有治疗作用的主要原因。

1.3 抗糖尿病肾病:病理研究发现,醛糖还原酶(aldo reductase, AR)催化葡萄糖转化成山梨糖可能与糖尿病肾病(diabetic nephropathy)的一条信号传导途径有关,纤维连结素的积累则导致了该疾病进一步发展。SA-A 和 LAB(SA-B)的镁盐^[9]都可以抑制 AR 的活性。在肾小球细胞的体外实验中,LAB 镁盐对 AR 的活性抑制效果是临床所用的 epalrestat 的 2.5 倍,对纤维连结素的形成积累则具有剂量依赖性。目前,临床用于治疗糖尿病肾病的有效药物并不多。因此,LAB 的镁盐有望在糖尿病肾病的治疗中发挥作用。

1.4 抗神经性疾病:阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的病因有多种,其中脑细胞中淀粉样 β 蛋白(amyloid beta protein)的聚积进而纤维化是其病理机制之一。唐民科等^[10]在实验中发现,SA-B 不仅明显抑制淀粉样 β 蛋白的纤维形成,还可以直接阻断预先老化的淀粉样 β 蛋白对 PC12 细胞的毒性作用。此毒性作用是导致 AD 的直接原因。Hensley 等证明淀粉样 β 蛋白聚积造成的神经细胞毒性可能与自由基的形成有关,SA-B 则是一种有效的自由基清除剂。

Takeda 等^[11]报道,迷迭香酸(RA)和咖啡酸(CA)可以明显缩短强迫游泳小鼠的不安定期限。根据报道,脑中组胺和 NO 的释放是造成紧张和抑郁的主要原因。RA 可以抑制肥大细胞中组胺的释放,CA 可以激活 α -肾上腺素受体系统,抑制 NO 的产生和释放。体外实验还发现^[12],CA 可以抑制蛋白激酶 A 和 C 的活性。因此,CA 和 RA 抗类似抑郁的作用还可能与它们对信号传导中第 2 信使的直接调节有关。

1.5 抗艾滋病:艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人类缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)导致人体免疫功能缺损的一种传染性极强的疾病,号称“超级癌症”,目前,尚无有效治疗药物。因此,研发抗 AIDS 新药是国内外许多药物工作者孜孜以求的目标。HIV-1 型病毒是本病的病原体,HIV-1 整合酶则是病毒 DNA 整合到宿主染色体,并在宿主细胞中稳定复制和产生感染所必需的一种酶。该种酶在宿主内没有对应体而成为抗 AIDS 药物设计的理想靶点。Abd-Elazem 等报道^[13],从丹参中提取纯化的紫草酸(LA)和紫草酸 B(LAB)虽不能阻止病毒

DNA 进入宿主 H9 细胞,不能抑制病毒逆转录酶的活性,却可以强烈抑制 HIV-1 整合酶的 3 端加工修饰活性和病毒 DNA 链的转移活性,从而抑制了病毒 DNA 在 H9 细胞中的复制,阻止了急性 HIV-1 对宿主 H9 细胞的感染。与已报道的此类药物相比,LA 和 LAB 具较强的抑制效果(IC_{50} 值分别是 2 和 6.9 μ mol/L)和较高的安全性(CC_{100} 分别为 > 297 和 223 μ mol/L)。LA 和 LAB 在体外实验表现出的强效性和安全性,使它们有可能成为新型的抗 AIDS 药物。

2 生物合成途径

上述药理研究表明,丹参的水溶性酚酸类化合物,尤其是迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A 和丹酚酸 B,是颇有价值的药用资源,均蕴藏着巨大的市场潜力。为了更好地利用这一资源,阐明它们的生物合成途径就具有重要的意义。在植物体中,酚酸类化合物由苯丙烷类化合物代谢途径产生。该代谢途径分为一般途径和分支代谢途径,其一般途径已基本明了,但其分支途径却是非常庞大而复杂的,有待深入研究。

水溶性酚酸类化合物的生物合成分支途径的研究很少,丹参中此类化合物的生物合成途径的研究,更未见报道。同科(唇形科)物种紫草和紫苏培养细胞中进行的迷迭香酸的生物合成代谢的研究,可以为丹参的水溶性酚酸类化合物的代谢研究提供有益的借鉴。

丹参水溶性酚酸类化合物,除丹参素和咖啡酸等几种单苯环物质可由氨基酸直接氧化脱氨生成外,其余均可视为由咖啡酸与丹参素酯化缩合产生。根据 Yamamoto 等^[14-18]的工作,将迷迭香酸生物合成途径加以概括,如图 1 所示。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙氨酸进入此代谢途径的限速酶,4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4CL)催化产生活化形式的 4-香豆酰 CoA 是后续分支途径的前体分子之一。4-香豆酰 CoA 和由酪氨酸经酪氨酸 α -酮戊二酸转氨酶(TAT)的氧化脱氨和羟基苯丙酮酸还原酶(HPR)的还原作用产生的 4-羟基苯乳酸,在迷迭香酸合成酶(RS)作用下首先生成 2-氧-(4-香豆酰)-3-(4-羟基苯)乳酸——迷迭香酸生物合成途径中一个重要的中间产物,最后由细胞色素 P450 蛋白——CYP9A6 的催化生成迷迭香酸。

黎连娘将部分丹酚酸类化合物的骨架结构生源合成途径概念如图 2 所示。这一途径虽然缺少直接的实验依据,却具有一定的理论基础,对我们开展丹酚酸类化合物的生物合成途径工作具有启发意义。

3 结语

从药用植物中筛选药物是新药开发的主要手段之一。丹参水溶性酚酸类化合物的药理研究虽然还只是在体外细胞学水平进行,但这些结果却显示出,此类化合物有着广泛的应用前景,蕴藏着无限商机。现代科技的发展,使得基因工程技术生产有效药用成分成为可能,代谢产物生物合成途径的研究则是基因工程工作的前提。因此,丹参水溶性酚酸类化合物生物合成途径的研究工作,终将会为我们更好地利用这一资源奠定基础。

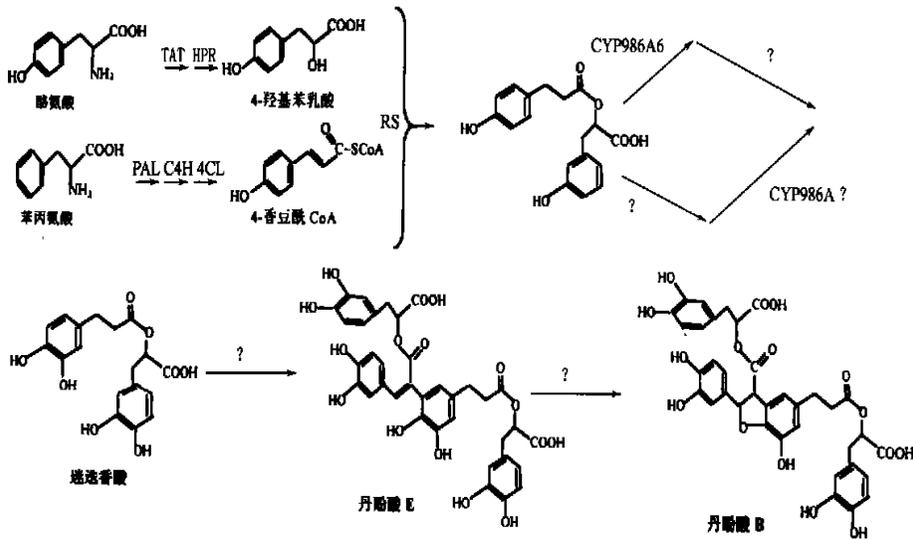


图 1 迷迭香酸的生物合成途径

Fig 1 Biosynthesis pathway of rosmarinic acid

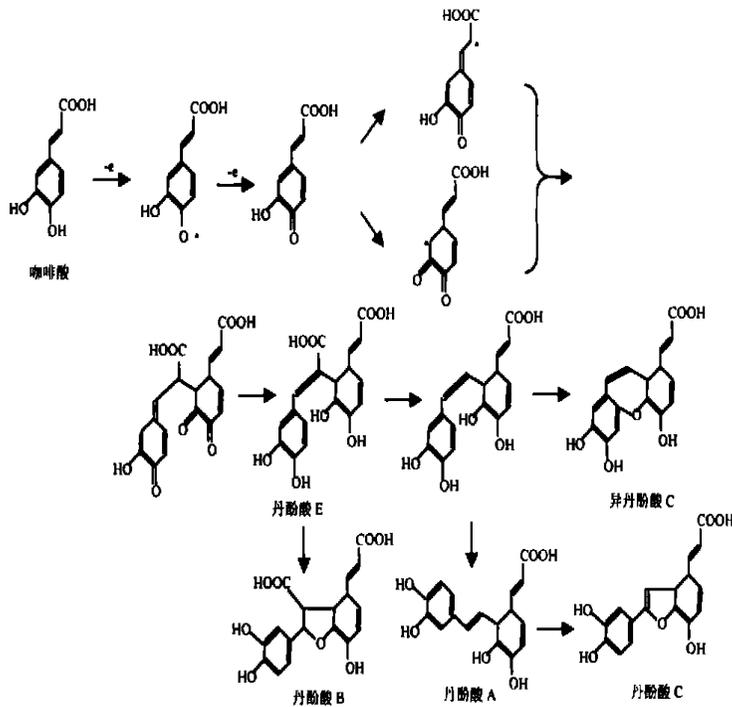


图 2 丹酚酸 A, B, C, E 可能的生源合成途径

Fig 2 Deduced biosynthesis pathway of salvianolic acid A, B, C, and E

References:

[1] Liu P, Hu Y Y, Liu C H, *et al* Effects of salvianolic acid A (SA-A) on liver injury: SA-A action of hepatic peroxidation [J]. *Liver*, 2001, 21: 384-390

[2] Hu Y Y, Liu C H, Wang R P, *et al* Protective actions of salvianolic acid A on hepatocyte injured by peroxidation *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6(3): 402-404

[3] O sakabe N, Yasuda A, Natsum e M, *et al* Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GaN)-sensitized mice [J]. *Fre Rad Biol Med*, 2002, 33(6): 798-806

[4] 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 Phamacol Sin* (药学报), 2002, 23(8): 735-738

[5] Liu J, Shen H M, Ong C N. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2000, 153: 85-93

[6] Liu J, Shen H M, Ong C N. Role of intracellular thiol depletion, mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in *Salvia miltiorrhiza*-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Life Sci*, 2001, 69: 1833-1850

[7] Chen Y H, Lin S J, Hu H H, *et al* Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- α treated hu-

- man aortic endothelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 82: 512-521.
- [8] Wu Y J, Hong C Y, Lin S J, *et al* Increase of Vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Arterioscler Thromb*, 1998, 18: 481-486
- [9] Jung M, Lee H C, Ahn C W, *et al* Effective isolation of magnesium lithospermate B and its inhibition of aldose reductase and fibronectin on Mesangial cell line [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(8): 1135-1136
- [10] Tang M K, Zhang J T. Salvianolic acid B inhibits fibril formation and neurotoxicity of amyloid beta-protein *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(4): 380-384
- [11] Takeda H, Tsuji M, Inazu M, *et al* Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449: 261-267.
- [12] Nardini M, Scaccini C, Packer L, *et al* *In vitro* inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1474: 219-225
- [13] Abd-Elazem I S, Chen H S, Bates R B, *et al* Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55: 91-106
- [14] Yamamoto H, Inoue K, Yazaki K. Caffeic acid oligomers in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53: 651-657.
- [15] Yamamoto H, Zhao P, Yazaki K, *et al* Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(8): 1086-1090
- [16] Matsuno M, Nagatsu A, Ogihara Y, *et al* Synthesis of 2-O-(4-coumaroyl)-3-(4-hydroxyphenyl) lactic acid, and important intermediate of rosmarinic acid biosynthesis [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(12): 1644-1646
- [17] Matsuno M, Nagatsu A, Ogihara Y, *et al* CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis [J]. *FEBS Lett*, 2002, 514: 219-224
- [18] Kim K H, Petersen M. cDNA-cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cell suspension cultures of *Coleus blumei* [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 1001-1009.

重楼化学成分和药理作用研究进展

武珊珊, 高文远*, 段宏泉, 贾伟*

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要: 重楼主产于我国云南省, 具有重要的药用价值。其主要化学成分为甾体皂苷, 并含有 β 蜕皮激素、多糖、黄酮苷及氨基酸; 具有较强的生理和药理活性, 包括抗肿瘤、止血止痛、抑菌消炎、免疫调节等作用, 广泛应用于临床。现归纳近年来重楼化学成分、药理作用和临床应用等研究成果, 指出重楼良好的开发前景, 特别是作为抗肿瘤药和妇女用药, 值得进一步的开发研究。

关键词: 重楼; 化学成分; 药理作用

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0344-04

Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Rhizoma Paris*

WU Shan-shan, GAO Wen-yuan, DUAN Hong-quan, JIA Wei

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: *Rhizoma Paris*; chemical constituent; pharmacological effect

重楼属植物是一类极具药用价值的植物, 全世界共有 24 种, 我国拥有 19 种, 其中西南各省区种类和资源极为丰富^[1]。国内外学者很重视对重楼的研究, 其具有较强的生理活性及独特的药用价值。重楼在李时珍所著的《本草纲目》中以蚤休之名记载, 为下品; 并以重台根(《日华子》)等异名被历代本草古籍记载。《中华人民共和国药典》1995 年版和 2000 年版记载该药为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var.

yunnanensis (Franch.) Hand-Mazz 和七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎。重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效, 用于臃肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、凉风抽搐等症。现已从该属植物中分离鉴定了 50 余种化合物, 主要有 C₂₇ 甾体皂苷、C₂₁ 孕甾烷苷、脂肪酸酯、甾醇及其苷、黄酮苷、 β 蜕皮激素及多糖。其中甾体皂苷 44 种, 占总化合物的 80% 以上, 甾体皂苷元

* 收稿日期: 2003-05-25

作者简介: 武珊珊(1980—), 女, 天津人, 天津大学药物科学与技术学院 2002 级硕士研究生, 主要从事中成药质量标准 and 中药指纹图谱的研究工作。

* 通讯作者 Tel: (022)87402071 E-mail: phamgao@hotmail.com