

(mansmbinoic acid)的成分,无论对急性炎症或慢性炎症均有良好抑制作用,对生物体内引起炎症的主要物质过氧化酶有很强的抑制作用<sup>[12]</sup>。

2.5 刺激潜能:没药树脂挥发油、氯仿萃取物以及其中的 7 种倍半萜烯类化合物,对鼠的耳朵有刺激潜能,在这些被分离的化合物中 curzerenone、furanodien-6-one 和 furanoeudesma-1,3-diene 的刺激潜能非常强且持久,刺激强度比 eupuorbium 弱,但与挥发油的接近。2-Methyl-4,5-dihydrofuranodien-6-one、lindestrene 和 curzerene 的刺激潜能居中,3-methoxy-10-methylenefurano-germacra-1-en-6-one 的刺激潜能最弱<sup>[13]</sup>。

### 3 结语

对于没药的研究已经比较深入,但没药有效成分的提取及进一步制备新剂型工作做的相对还较少,文献报道也很少,因为这方面的研究需要更多的精力和投入。由于有关没药方面的研究还在继续,本文只是总结了一段时期内的研究成果,希望对以后的研究有所帮助。

### References:

- [1] Ye J H. The realize of pharmacological action and clinic application of mastic and myrrh [J]. *Clin J Anhui Tradit Chin Med* (安徽中医临床杂志), 2003, 15(3): 264-265.
- [2] Sun Y Q, Wei G. Naphtha chemical component and content change of mastic myrrh before and after process [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(8): 566-567.
- [3] Tian J G, Shi S M. The research of naphtha chemical component of import savageness and colloid myrrh [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(4): 235-237.
- [4] Wang W, Zhu Y X. The research of chemical component of Kenya myrrh naphtha [J]. *Druggery Anal J*, 1995, 15(6): 33-36.
- [5] Hu S M, Xu X H. The GC-MS analysis of myrrh naphtha chemical component [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(10): 733-734.
- [6] Zhu N Q, Sheng S Q, Sang S M, et al. Isolation and characterization of several aromatic sesquiterpenes from *Commiphora myrrha* [J]. *Flavour Frag J*, 2003, 18(4): 282-285.
- [7] Dekebo A, Dagne E, Sterner O. Furanosesquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa* and related adulterants o true myrrh [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73(1): 48-55.
- [8] Baser K H C, Demirci B, Dekebo Aman, et al. Essential oils of some *Boswellia* spp., myrrh and opopanax [J]. *Flavour Frag J*, 2003, 18(2): 153-156.
- [9] Qin H Z, Xian H M. The research of detumescence function of different kinds of myrrh [J]. *J Guangxi Coll Tradit Chin Med*, 2001, 4(4): 91-93.
- [10] Lian X N, Zhang L. Prevention and cure of coronary heart disease using myrrh [J]. *Shanxi J Chin Tradit Med* (山西中医), 2002, 18(4): 10.
- [11] Zheng H S, Feng N P. The distill technics and easing pain function of mastic and myrrh [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(11): 956-958.
- [12] Six new type medicines from plants [J]. *Med Treat Health Care Impl*, 2001, 4:8.
- [13] Asif Saeed M, Sabir A W. Irritant potential of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora myrrha* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75: 81-84.

## 丹皮酚的制备及药理作用研究进展

邢国胜,房德敏,周咏梅,陈 迪

(天津医院,天津 300211)

丹皮酚(paeonol,简称 Pae),又称牡丹酚,主要是从萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bunge) Kitagawa 干燥根或全草及毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.、芍药 *P. lactiflora* Pall. 的根皮中提取分离出来的活性成分,其化学式为 2-羟基-4-甲氧基苯乙酮,分子式为  $C_9H_{10}O_3$ ,相对分子质量为 166.18,性微寒,味苦、辛,具有熔点低[mp (51+1) °C]、易挥发及水溶性差的特性<sup>[1]</sup>。近年来,随着对 Pae 药理作用不断深入的研究,极大地推动了 Pae 的临床使用。本文对其近年药理研究新进展进行综述。

### 1 Pae 提取、制备方法<sup>[2]</sup>

1.1 徐长卿中 Pae 的提取:主要方法有蒸馏法、有机溶剂浸出法、直接蒸馏-大孔树脂法、超临界流体萃取法等。采用水蒸气蒸馏法提取 Pae 收率可达 1.45%(生药中 Pae 约为 2.27%),在共水蒸馏法、加盐蒸馏法和先加碱后加酸中和的水蒸气蒸馏法 3 种工艺中加盐蒸馏法是从徐长卿中提妈

Pae 的最优方法。

1.2 牡丹根皮中 Pae 的提取:主要方法有蒸馏法、浸出法等。其中热提法明显优于冷浸法;酸水乙醇、碱水乙醇提取法优于醇提法。经酸、碱水解提取液中丹皮酚量升高可能是由于酸、碱增加了 Pae 原苷和次级苷的水解,游离出更多的 Pae。

1.3 人工合成 Pae:从天然药材中提取 Pae 存在成本高、受自然条件限制等缺点,因此人工合成 Pae 可满足日益增长的需要。Pae 的人工合成大体包括将间苯二酚乙酰化制得 2,4-二羟基苯乙酮,再经甲基化制得 Pae 两个步骤,但具体的化学条件、工艺流程和收得率有所差别,包括通过取代、烷化等合成过程,部分方法总收率可达 55%,且纯度较高。

### 2 Pae 药理作用

#### 2.1 心脑血管作用

2.1.1 抗心律失常作用:多年来国内、外学者对 Pae 抗心律失常作用及其机制进行了深入研究,发现 Pae 有明显对抗大鼠心肌缺血再灌注模型心律失常作用,80、160 mg/kg Pae

能使大鼠室颤(VF)及室性心动过速(VT)的发生率均有不同程度的降低,并可有效地缩短持续时间,缩小心肌缺血和梗死的范围,拮抗心肌损伤。其中80 mg/kg Pae能明显缩短VF持续时间,降低VT发生率,但是VF发生率无明显影响,缩短VT持续时间作用也较弱,而160 mg/kg Pae对VF及VT的发生率均有显著的降低作用,并缩短它们的持续时间;2个剂量Pae使心律失常分数分别下降了33%和55%,使心肌梗死范围分别缩小10%和20%,从而降低了心律失常发生的严重性<sup>[3]</sup>。

从电生理角度来说,自律性(automaticity, AM)增高、折返及延迟后除极(delay afterdepolarization, DAD)引起的触发活动(triggered activity, TA),是自律失常发生的原因之一。Pae体外显示出抑制豚鼠右心室乳头心肌细胞AM、DAD及TA的作用。其中 $1.8 \times 10^{-4}$  mol/L Pae组,肾上腺素阈浓度由对照组的 $(1.28 \pm 0.57) \mu\text{mol/L}$ 升高为 $(1.56 \pm 0.53) \mu\text{mol/L}$ ,  $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L Pae组,肾上腺素阈浓度由对照组的 $(1.22 \pm 0.62) \mu\text{mol/L}$ 升高为 $(6.22 \pm 2.11) \mu\text{mol/L}$ ,提高了近5倍。同时, $1.8 \times 10^{-3}$  mol/L Pae能明显减小哇巴因诱发的DAD幅值;而当基本刺激周长为220 ms时,TA数量由 $(5.5 \pm 1.0)$ 降至 $(0.7 \pm 0.3)$ <sup>[4]</sup>。另外,400  $\mu\text{g/mL}$  Pae可使分离的单个豚鼠心肌细胞动作电位时程(action potential duration, APD)明显缩短,APD<sub>50</sub>和APD<sub>90</sub>由给药前的 $(352 \pm 27)$ 、 $(416 \pm 33)$  ms缩短至 $(168 \pm 20)$ 、 $(265 \pm 23)$  ms,分别缩短了52.2%和35.6%,而静息电位和动作电位幅值无明显改变。可见从电生理方面显示出Pae抗心律失常作用可能与其抑制心肌细胞AM、DAD及TA有关<sup>[5]</sup>。近年来从膜离子通道水平研究发现,Pae可浓度依赖性阻断钙离子通道电流(I<sub>ca</sub>),并使I<sub>ca</sub>的IV曲线上移,但不发生偏移,也不改变IV曲线的形状,50和400  $\mu\text{g/mL}$  Pae使其峰值由 $(916.7 \pm 197.3)$  pA分别降至 $(583.3 \pm 108.8)$ 和 $(250.0 \pm 120.0)$  pA,抑制率分别为36.4%和72.7%,说明Pae可能对钙离子通道有抑制作用,提示它具有钙拮抗剂作用,从而表明Pae的抗心律失常作用与其对钙离子通道的阻滞作用具有重要的内在联系,对钙离子通道电流的阻断作用可能是其抗心律失常作用的主要机制之一<sup>[5]</sup>。

2.1.2 抗动脉粥样硬化作用:动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是当今严重威胁人类健康的疾病之一,是许多心脑血管疾病的病理基础,也是心血管疾病基础研究焦点之一,寻找能有效对抗AS的药物成为近年来研究的热点之一,经兔、鹌鹑、大鼠等多种动物实验已经发现Pae具有明显抗AS的作用。75、150 mg/kg Pae可明显降低兔动脉粥样硬化模型血清中总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL)水平,延缓动脉粥样硬化进展,显著降低兔主动脉斑块面积、内膜/中膜厚度比及内膜泡沫细胞数,病理学观察显示Pae可不同程度地减轻主动脉的病变<sup>[6]</sup>。

临床显示AS患者脂质过氧化反应增强,其血浆脂质过氧化物量的增加与血浆胆固醇和甘油三酯量的升高呈正相关。LDL可能经修饰损伤血管内皮引起血管内皮细胞(EC)

功能障碍,导致AS,这已经日益引起人们的关注。目前在鹌鹑和大鼠实验性动脉粥样硬化形成研究中已经发现Pae具有减轻脂质过氧化和减少血浆LDL氧化修饰(ox-LDL)的作用。口服300、600 mg/kg Pae后,可明显降低鹌鹑血清TC、LDL、极低密度脂蛋白(VLDL)、载脂蛋白B100(apoB100)量,提高高密度脂蛋白(HDL)量和HDL/TC、HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub>、apoA<sub>1</sub>/apoB<sub>100</sub>比值,并不同程度地降低低切变率下全血比黏度、血浆比黏度、凝血因子I比黏度、红细胞聚集性;显著减少主动脉壁及肝脏TC量,缩小粥样斑块面积,抑制动脉脂质斑块形成<sup>[7]</sup>。Pae(150、300 mg/kg)还可明显抑制高脂大鼠血清、主动脉及肝脏脂质过氧化反应,不仅300 mg/kg Pae显著减少高脂大鼠血浆LDL的氧化修饰,而且在40、200、1 000  $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,对健康人血清LDL的体外氧化修饰也有极显著抑制效应。Pae这种较全面的调整脂质代谢,减轻高脂血症动物血清、主动脉及肝脏脂质过氧化反应,降低血浆ox-LDL生成量,抑制LDL体外氧化反应及改善血流状态的功能有效地保护了血管EC,可能是其抗AS的重要环节<sup>[8]</sup>。此外,Pae还可通过升高血清一氧化氮(NO)和血浆前列环素(PGI<sub>2</sub>),降低血管内皮素(ET)作用来保护血管EC,NO在生理浓度下被视为能阻止AS病理发展的内皮保护性分子;ET则是目前所知最强的血管收缩肽,当ET增高到一定程度时,引起冠状动脉痉挛,进一步损害EC,从而促进AS形成。Pae(150 mg/kg)可显著降低血浆ET量,300 mg/kg Pae可使血浆PGI<sub>2</sub>水平明显上升;同时Pae升高6-酮-前列腺素F1a(6-Keto-PGF1a),可使TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1a比值趋于正常对照组,这也有利于保护高脂血症大鼠血管的EC,逆转内皮功能障碍,减轻大鼠动脉病变程度,从而减缓AS进程,这可能是其防治AS的另一重要机制<sup>[9]</sup>。

临床与动物实验已经发现动脉平滑肌细胞(SMC)是AS斑块中最主要的细胞成分,其增殖在AS的发生、发展中起着关键作用<sup>[10]</sup>。利用体外细胞培养技术,通过人高脂血清造成大鼠及人胎儿SMC增殖模型发现50、100、150、200  $\mu\text{g/mL}$  Pae可呈浓度依赖性地抑制SMC的增殖,使大鼠及人主动脉SMC对MTT的代谢率降低,细胞数目减少,并引起其表型的改变,200  $\mu\text{g/mL}$  Pae则可抑制高脂血清对大鼠主动脉SMC的刺激作用。因此,从细胞水平来看,Pae抗AS作用还可能与抑制SMC异常增殖作用有关<sup>[11,12]</sup>。

2.1.3 对脑缺血损伤的保护作用:近年来随着缺血性脑血管病溶栓疗法的开展,再灌注损伤问题已越来越受到重视。研究发现Pae对脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。与对照组比较脑缺血再灌注损伤症状有所改善,脑组织病变减轻;梗死体积 $[(105.25 \pm 9.48) \text{ mm}^3]$ 较对照组 $[(117.26 \pm 7.94) \text{ mm}^3]$ 减小,神经元坏死程度减轻,存活数量增多,间质水肿亦减轻,表明Pae对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有一定的脑保护作用<sup>[13]</sup>。

流行病学和临床研究表明脑缺血再灌注损伤与白细胞数(WBC),尤其是中性粒细胞(NC)数量增多密切相关,

WBC 尤其是 NC 向缺血区的聚集和浸润不仅是对坏死组织的一种病理反应,也可引发缺血组织的炎症反应,增高颅内压,破坏血脑屏障,促进梗死向出血转变;产生大量的氧自由基,加重神经元的损伤;堵塞微循环通道,使缺血区脑血流量降低,并使脑损害进一步加重<sup>[14]</sup>。目前研究发现 50 mg/kg Pae 可降低脑缺血再灌注后增加的周围血 WBC 数量,与对照组高峰期相比下降 21.74%,同时使脑实质中小胶质细胞和 WBC 数量明显减少,再灌注 24 h, WBC 数下降 70.06%<sup>[15]</sup>。另外,大鼠脑缺血再灌注后,100 mg/kg Pae 组 NC 的浸润数较对照组显著减少,表明 Pae 具有抑制脑缺血再灌注后 NC 浸润的作用,随着 NC 浸润数目的减少,治疗组缺血区神经元的坏死数目亦减少,减轻了缺血脑组织神经元的坏死程度<sup>[16]</sup>。

有研究表明,在脑缺血等病理改变时细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是最重要的糖蛋白,其在脑缺血血管内皮细胞的表达明显升高,周围血中 WBC 向缺血区的迁移主要也由 ICAM-1 及 WBC 表面 ICAM 所介导的<sup>[17]</sup>。Pae 对大鼠脑缺血再灌注后 ICAM-1 蛋白表达具有下调作用,100 mg/kg Pae 组 ICAM-1 阳性微血管数较对照组下调,显示 Pae 对脑缺血再灌注后 ICAM-1 表达有一定的抑制作用,从而减轻了神经元损伤,这也为 Pae 防治缺血性脑血管病提供了一定的理论依据<sup>[16]</sup>。

另外,反复脑缺血再灌注,使氧自由基大量产生,超氧化物歧化酶 (super oxide dismutase, SOD) 活性降低,导致氧自由基的堆积,引起血液中大量  $\text{Ca}^{2+}$  进入脑细胞内,使大量  $\text{Ca}^{2+}$  聚集于此,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 受损,使过量  $\text{Ca}^{2+}$  不能泵出胞外,导致细胞功能和结构损伤,甚至死亡。Pae 具有抑制细胞  $\text{Ca}^{2+}$  内流,保护  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及抗自由基的氧化作用,其中 100 mg/kg Pae 明显抑制脑缺血引起的脑组织内  $\text{Ca}^{2+}$  升高及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的下降,抑制率分别为 73% 及 53%; 50 mg/kg Pae 虽能明显抑制  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性下降,但对  $\text{Ca}^{2+}$  增加无显著性,抑制率分别为 20.5% 及 34.9%; 50 mg/kg Pae 还能显著抑制丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 升高,但抑制 SOD 活性下降作用较强,而 100 mg/kg Pae 既能明显抑制脑缺血引起的 SOD 活性下降,也能抑制 MDA 水平升高。Pae 可抑制  $\text{Ca}^{2+}$  超负荷对脑细胞的损伤及超氧自由基对神经细胞的损伤作用,为缺血后脑组织的恢复提供了有利条件,从而减轻迟发性脑损害的严重程度<sup>[18]</sup>。

2.1.4 改善血流变:心脑血管血栓性疾病的发生和发展过程中,除血小板聚集活性增高外,常伴随着血液流变学性质的异常,特别是与血液黏度、红细胞压积、红细胞聚集性的升高和红细胞变形性降低等因素有关。Pae 对血液流变学指标具有多方面的影响。Pae (100 mg/kg) 能显著降低低切率条件下的全血黏度,并显著降低红细胞压积、红细胞聚集指数、最大变形时间及血小板黏附率,对红细胞初始表现变形指数和最大表现变形指数与对照组相比明显增大<sup>[19]</sup>。

2.2 抗肿瘤作用:恶性肿瘤是威胁人类健康的主要疾病之

一,在植物中寻找有效的抗肿瘤药物已成为国内、外重要的研究课题。研究显示 Pae 在体内、外对人白血病细胞 K562、人乳腺癌基因细胞 T6-17、肝癌细胞 BEL-7404、移植性肝癌 HepA、人白血病肿瘤细胞株 K562/ADM 细胞、宫颈癌细胞系 HeLa、人大肠癌细胞株 HT-29 细胞等多种肿瘤细胞具有增殖抑制作用。众所周知,肿瘤细胞的重要特征之一是无限性生长,因此,研究抗肿瘤药物首先应观察其抗肿瘤细胞生长作用。与大多数抗肿瘤药物作用特点相同,Pae 对不同的肿瘤细胞株的增殖表现出不同的抑制作用,其半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 也相差较大,对 T6-17、K562、BEL-7404  $\text{IC}_{50}$  分别为 10.81、25.38、93.39 mg/L<sup>[20]</sup>,对 HeLa 细胞抑制作用最差。这一结果提示在临床实践中,抗肿瘤中药制剂也应遵循个体化原则,当治疗无效时应及时停药换用其他药物进行治疗<sup>[21]</sup>。另外, Pae 对体外培养的 T6-17、K562、BEL-7404<sup>[20]</sup>、HT-29<sup>[22]</sup> 的生长抑制率随药物的浓度升高而升高, Pae 在 3.91~250 mg/L 浓度内呈现明显的剂量依赖性;同时 Pae 对细胞的增殖抑制作用显示出明显的时间效应,125、250 mg/L Pae 分别作用于上述细胞,在 24、48、72、96 h 内,作用时间越长,抑制作用越强<sup>[21]</sup>。体内抑瘤试验显示,50、200、800 mg/kg Pae 随剂量的增加,抑制小鼠 Hep 肿瘤增殖作用逐渐增强,抑制率分别为 39.26%~42.55%, 49.69%~55.32% 和 64.42%~72.64%,表明其良好的抗肿瘤活性<sup>[23]</sup>。

Pae 抗肿瘤作用不仅体现在直接抑制肿瘤细胞生长,还表现在逆转肿瘤细胞多药耐药的作用和对多种化疗药物的增敏作用。Pae (4.5、12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 能降低非细胞毒性剂量下化疗药物阿霉素 (ADM)、柔红霉素 (DAU)、长春新碱 (VCR) 及长春花碱 (VLB) 对多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 人白血病肿瘤细胞株 K562/ADM 细胞的  $\text{IC}_{50}$ , ADM、DAU、VCR、VLB 的  $\text{IC}_{50}$  由 6.48、5.90、5.70、2.95  $\mu\text{g/mL}$  分别降到 2.40、2.25、2.35、1.15  $\mu\text{g/mL}$ ,且可以使 K562/ADM 细胞内化疗药物的浓度提高 1~2 倍,表明 Pae 具有逆转 K562/ADM 细胞 MDR 作用,其逆转 MDR 机制可能与阻断 P 糖蛋白的药物排除泵功能,使化疗药物在细胞内浓度增加有关<sup>[24]</sup>。当单独应用时,7.81 mg/L Pae 对 HT-29 细胞的抑制率仅为 18.83%,而与化疗药物 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、顺铂协同应用可产生较强的抑制细胞增殖作用,抑制率分别达到 73.88%、65.27%、53.71%,说明 Pae 与化疗药物同时作用于 HT-29 细胞,对其生长的抑制有显著的协同作用,如在临床抗大肠癌治疗中与 S 期特异性化疗药物联合应用,可能将提高化疗药物抗肿瘤作用,同时也因化疗药物剂量的减少而降低常规化疗药物的不良反应<sup>[25]</sup>。

近年随着对 Pae 抗肿瘤活性的深入研究发现了其多方面的作用机制,其中,诱导细胞凋亡可能是其重要机制之一。在体外可诱导 K562、HT-29 细胞凋亡,不仅经 HE 染色在光镜下可见典型的肿瘤细胞凋亡改变,而且通过流式细胞仪分析, Pae 在 7.81、15.63、31.25、62.5、125 mg/L 质量浓度作用 24 h 可诱导两种肿瘤细胞的凋亡, K562 细胞凋亡率分别为 10.01%、12.46%、17.10%、29.18% 和 34.16%; 同时,

15.63、62.5、250 mg/L Pae 作用 48 h 后, HT-29 细胞凋亡率分别为 7.6%、16.2%、34.5%, 呈现出明显的剂量效应关系; 而且诱导 K562 和 HT-29 细胞凋亡有明显的时间效应关系<sup>[22,26]</sup>。进一步研究发现 Pae 诱导 HT-29 细胞凋亡机制可能与影响该细胞株的细胞周期有关, 经 1.504  $\mu\text{mol/L}$  Pae 处理的 HT-29 细胞, 细胞周期分布发生明显变化, 经流式细胞仪检测在  $G_1/G_0$  峰之间可见到明显的亚二倍体 (Ap 峰), S 期细胞比例上升,  $G_1$  期和  $G_2/M$  期细胞比例下降, 表明 Pae 能把肿瘤细胞阻滞在 S 期, 并阻止 S 期向  $G_2/M$  期的转变过程, 影响 DNA 的合成, 从而引起细胞凋亡。此外, 免疫组织化学染色显示, HT-29 细胞经 1.504  $\mu\text{mol/L}$  Pae 处理后, Fas/FasL 表达水平上调, 呈棕黄色至棕褐色, 提示 Pae 通过上调 HT-29 细胞 Fas/FasL 蛋白的表达来诱导细胞凋亡可能是其抑制大肠癌细胞增殖的机制之一。当 Pae 作用于 HT-29 细胞 72 或 96 h 时, 出现大量的细胞碎片, 镜下检测为坏死细胞, 提示 Pae 不仅有诱导细胞凋亡的作用, 随着作用时间的延长, 甚至还可能直接杀死癌细胞<sup>[27]</sup>。

除此以外, 也有作者从免疫学机制对 Pae 抗肿瘤作用进行了研究。已有的研究显示 TNF- $\alpha$  和 IL-2 在肿瘤治疗中发挥着重要作用。TNF- $\alpha$  具有直接抑制和杀伤肿瘤细胞的功能, 且可诱导肿瘤细胞凋亡; 而 IL-2 对肿瘤细胞虽无直接细胞毒作用, 但可通过调节机体的免疫系统发挥抗肿瘤效应<sup>[28]</sup>, 且 TNF- $\alpha$  与 IL-2 具有协同抗肿瘤效应<sup>[29]</sup>。Pae (50、200、800 mg/kg) 可使 HepA 荷瘤小鼠血清 IL-2 量恢复至接近正常水平, 使脾细胞产生 IL-2 的能力明显超过正常及模型对照组, 并呈现一定的剂量效应关系; 还可提高其血清 TNF- $\alpha$  水平, 增加腹腔巨噬细胞培养上清液中 TNF 浓度, 提示 Pae 抗肿瘤作用与提高 HepA 荷瘤小鼠 IL-2 及 TNF- $\alpha$  的生成密切相关<sup>[23]</sup>。

2.3 增强免疫力作用: Pae 不仅通过调节肿瘤小鼠某些免疫学指标来发挥抗肿瘤效应, 而且还具有提高正常机体免疫系统功能的作用。与对照组比较, 75.4、37.7、18.9 mg/kg Pae 组小鼠脾脏指数分别增加 28.3%、61.3%、15.1%, 胸腺指数分别增加 67.4%、79.1%、34.9%, 淋巴细胞转化率分别增加 31.4%、57.6%、20.9%。可见, Pae 对小鼠免疫功能具有明显的增强作用<sup>[30]</sup>。通过观察小鼠腹腔巨噬细胞与吞噬功能、血清溶血素的形成和二硝基氯苯 (DNFB) 致小鼠迟发型变态反应发现, 能提高小鼠巨噬细胞的吞噬功能, 使小鼠血清溶血素明显高于对照组, 同时可增强 DNFB 导致的皮肤迟发性变态反应 (delayed cutaneous hypersensitivity, DCH), 说明 Pae 对小鼠特异性体液免疫功能和特异性细胞免疫功能以及非特异性免疫功能均有增强作用, 但 Pae 的免疫效应机制目前尚不清楚<sup>[31]</sup>。

2.4 镇痛作用: Pae 能明显减少醋酸所致小鼠的扭体反应次数, 但扭体反应发生率比对照组减少未达到 50%, 作者认为其对该种疼痛模型作用较弱; 而对热刺激所致小鼠疼痛的痛阈明显提高, 说明 Pae 对热刺激所致小鼠疼痛有明显抑制作用。Pae 对二者镇痛作用的差异, 原因尚需进一步探

讨<sup>[32]</sup>。Pae 还能使角叉菜胶致炎后热刺激引起疼痛的痛阈明显提高, 在大鼠注射角叉菜胶前 30 min, 注射后 165 min 给予 30、50、100 mg/kg Pae 可显著抑制热刺激所致小鼠疼痛。另外, Pae 还具有减轻炎性疼痛的作用, 注射角叉菜胶前 30 min 给予 Pae 可以剂量、时间依赖性地抑制大鼠爪渗出液中某些炎症前因子, 包括: TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及炎性物质 PGE<sub>2</sub> 水平的升高, 而增加 IL-10 水平, 从而导致炎症前因子与抗炎因子的比值降低, 并抑制 NO 的产生和 COX-2、iNOS 蛋白表达水平的升高, 这可能是其抗炎镇痛的作用机制之一。而 Pae 显著性地降低大鼠炎症部位升高的髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性, 抑制 NC 浸润可能是其抗炎、镇痛作用的另一机制<sup>[33]</sup>。

2.5 抗菌作用: Pae 对黄色八叠球菌、福氏痢疾杆菌、枯草芽孢菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌等细胞均有较强的抑制作用, 且呈现明显的剂量依赖性。5 种供试菌中, 以黄色八叠球菌对 Pae 最为敏感, 10 mg/mL Pae 的抑菌圈达到 181.99 mm<sup>2</sup><sup>[34]</sup>。

2.6 对肾缺血再灌注损伤保护作用: 肾移植、血管外科及体外震波碎石等引起的肾缺血再灌注可以导致不正常的信号传导或细胞功能异常, 激发了细胞凋亡以及坏死, 这种损伤会影响患者肾功能的恢复。目前已经发现血流阻断前或血流开放前应用丹酚磺酸钠对肾缺血再灌注损伤有保护作用, Pae 可以通过降低兔肾缺血再灌注损伤模型血浆 MDA 量, 增加 SOD 活性, 减轻肾脏病理改变, 防止和减轻肾缺血再灌注损伤。缺血再灌注 60 min 时, 100 mg/kg Pae 磺酸钠组血浆 MDA 量低于对照组, SOD 活性高于对照组, 肾脏病理改变有所减轻<sup>[35]</sup>。

## 2.7 其他药理作用

2.7.1 对抗异烟肼和利福平所致的肝损害: 异烟肼为治疗结核病的一线药物, 与利福平联合用药效果良好, 是短程疗法的必需药物, 但二者合用毒性明显增加。Pae 对异烟肼和利福平肝毒性具有一定的减轻作用, 联合使用异烟肼和利福平后, Pae 使小鼠血清谷丙转氨酶 (SGPT) 水平降低; 病理显示 Pae 各剂量组肝损害程度明显减轻; 同时可拮抗异烟肼和利福平引起的 MDA 及细胞色素 P450 水平增加及线粒体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的降低。作者认为 Pae 是通过自由基的清除作用、保护线粒体 Ca 膜的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶以及抑制  $\text{Ca}^{2+}$  内流作用而对抗异烟肼和利福平所致的肝损害<sup>[36]</sup>。

2.7.2 对抗过氧亚硝基阴离子致成骨细胞增殖的抑制作用: 通过体外实验可发现  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  mol/L Pae 具有明显地消除  $1\ 000\ \mu\text{mol/L}\ \text{O}_2^-$  对培养大鼠颅骨成骨细胞 24、48、72 h 增殖的抑制作用。

2.7.3 对 AGEs 所致内皮细胞损伤的保护作用: 糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 在糖尿病慢性并发症血管病发生、发展中的作用正越来越引起广泛关注。AGEs 的形成和沉积可使组织缺氧, 部分细胞因子、生长因子、氧自由基量和相应基因表达水平同时升高, 从而导致血管病变。目前已经证实 Pae 对 AGEs 培养条件下人脐静脉

EC 损伤模型具有一定的保护作用,可不同程度地拮抗 800  $\mu\text{g/mL}$  AGEs 引起的 EC 增殖,此作用可能与其抑制脂质过氧化、清除超氧自由基及抑制醛糖还原酶活性有关,但由于 AGEs 对内皮细胞的影响是多方面的,故 Pae 的具体作用机制有待进一步深入研究<sup>[38]</sup>。

2.7.4 抑制皮肤色素生成:酪氨酸酶是皮肤黑色素生物合成的关键酶,其不仅决定黑色素合成的速率,还是黑色素细胞分化成熟的特征性标志。Pae 对酪氨酸酶具有一定的抑制作用,2 mmol/L Pae 对酪氨酸酶抑制率为  $(11.73 \pm 2.71)\%$ <sup>[39]</sup>。

### 3 结语

随着中药现代化的逐步完善,中药尤其是中药单体成分具有十分广阔的应用前途,Pae 作为一种单体成分,具有较为广泛的生物活性和药理作用,在心血管、肿瘤等疾病方面已经显示出较好的药理活性,具有良好的开发前景和临床应用价值。

### References:

- [1] Riley C M, Ren T C. Simple method for the determination of paeonol in human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection [J]. *J Chromatog*, 1989, 489(2): 432-437.
- [2] Zhang Y S, Cheng Y X, He J J, et al. Studies on the extraction process of paeonol from cortex moutan [J]. *J Hebei Acad Sci* (河北省科学院学报), 2005, 22(3): 49-51.
- [3] Zhang G Q, Yu Z L, Zhao H C. Inhibition of paeonol on arrhythmias induced by ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1997, 28(4): 225-227.
- [4] Chen J B, Tang Q Z, Huang C X. Effects of paeonol on automaticity and afterdepolarization of guinea pig papillary muscles [J]. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 1999, 15(4): 332-334.
- [5] Whang T, Tang Q Z, Jiang H, et al. Effect of paeonol on action potentials and calcium channel currents in isolated single ventricular myocyte of guinea pig [J]. *Med J Wuhan Univ: Med Sci* (武汉大学学报:医学版), 2001, 22(4): 331-333.
- [6] Li H K, Dai M, Wang D L, et al. Establishment of atherosclerotic model in rabbit and experiment study on paeonol action [J]. *Chin J Tradit Med Sci Tech* (中国中医药科技), 2005, 12(3): 129-130.
- [7] Dai M, Zhi X M, Peng D Y, et al. Inhibitory effect of paeonol on experimental atherosclerosis in quails [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(8): 488-490.
- [8] Dai M, Liu Q Y, Gu C G, et al. Inhibitory effect of paeonol on lipid peroxidation reaction and oxidative damage of low density lipoprotein [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(10): 625-627.
- [9] Dai M, Liu Q Y, Zi X M. Protective effect of paeonol on artery endothelial cells of the hyperlipidaemia in rats [J]. *Chin J Bas Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2001, 7(2): 38-40.
- [10] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update [J]. *New Engl J Med*, 1986, 314(8): 488-500.
- [11] Zhou X X, Zhou X H, Xu Q, et al. Effect of paeonol on proliferation of cultured smooth muscle cells from rats by hyperlipidemia [J]. *Hebei J Tradit Chin Med* (河北中医), 2000, 22(6): 477-478.
- [12] Zhou X X, Yang H M, Zhou X H, et al. Inhibitory effect of paeonol on proliferation of cultured smooth muscle cells from human by fetus [J]. *J Chengde Med Coll* (承德医学院学报), 2002, 17(4): 96-98.
- [13] Sun W F, Gao S J, Gao J X, et al. Protective effects of paeonol on cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8(16): 3088-3089.
- [14] Emerich D F, Dean R L, Bartus R T. The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct [J]. *Exp Neurol*, 2002, 173(1): 168-181.
- [15] Bao S Y, Fu Q, Zhang Z L, et al. Role of leukocytes in response to experimental cerebral ischemia and effects of ligustrazine and paeonol on it [J]. *Chin J Nerv Ment Dis* (中国神经精神疾病杂志), 1997, 23(1): 7-10.
- [16] Sun W F, Wang Z H, Gao J X, et al. Effect of paeonol on intercellular adhesion molecule-1 expression after cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8(19): 3792-3793.
- [17] Wu G X, Li C Y, Xia J, et al. Changes of the intercellular adhesion molecule-1 expression following cerebral ischemia-reperfusion injury treated by mild hypothermia [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2003, 7(10): 1502-1503.
- [18] Zhang G Q, Yu Z L, Zhao H C. Protective effect of paeonol on repeated cerebral ischemia in rats [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1997, 20(12): 626-628.
- [19] Li W, Wang Y L, Cai S X, et al. Effects of paeonol in comparison with aspirin on hemorrhheological parameters in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(1): 29-31.
- [20] Sun G P, Shen Y X, Zhang L L, et al. Anti-tumor effect of paeonol *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), 2002, 37(3): 183-185.
- [21] Sun G P, Wang H, Shen Y X, et al. Inhibitory effects of paeonol on the proliferation of four tumor cell lines [J]. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 2004, 8(2): 85-87.
- [22] Ji C Y, Tan S Y, Liu C Q. Inhibitory effect of paeonol on the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its synergistic effect with chemotherapy agents [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2005, 9(6): 122-124.
- [23] Sun G P, Shen Y X, Zhang L L, et al. Study on immunomodulation and antitumor activity of paeonol in HepA tumor mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(2): 160-163.
- [24] Sun H J, Wang X Q, Yu L M, et al. The study of paeonol for MDR's reverse action [J]. *Prog Anat Sci* (解剖科学进展), 2000, 6(1): 59-62.
- [25] Ji C Y, Tan S Y, Liu C Q. Inhibitory effect of paeonol on the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its synergistic effect with chemotherapy agents [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 2005, 32(9): 513-515.
- [26] Sun G P, Wang H, Shen Y M, et al. Study on effects of paeonol in inhibiting growth of K562 and inducing its apoptosis [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(5): 550-552.
- [27] Liu C Q, Tan S Y, Ji C Y, et al. The effects of paeonol on inhibiting the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2005, 21(10): 1251-1254.
- [28] Hu Y H, Lin Z B, He Y Q, et al. Polysaccharides isolated from mycelia of *Ganoderma lucidum* induced on HL-60 cell apoptosis by enhancing macrophage activity [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1999, 15(1): 27-30.
- [29] Su Y, Wu Y M. The study of synergistic cytotoxicity of tumor necrosis factor and interleukin 2 against lung adenocarcinoma cell [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2001, 19(8): 779-781.
- [30] Ying K, Wang Y Z. The effect of paeonol phenol on transformation of lymph cells of mice [J]. *J Baotou Med Coll* (包头医学院学报), 2001, 17(2): 92-93.
- [31] Zhang Y M, Liang H, Yang Y M, et al. Effect of paeonol on immunological function in mice [J]. *J Baotou Med Coll* (包头医学院学报), 2003, 19(4): 261-263.
- [32] Liu A X, Wu H J, Yang Y M. Effects of paeonol on analgesia [J]. *J Baotou Med Coll* (包头医学院学报), 2004, 20(2): 99-100.
- [33] Chou T C. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia [J]. *Brit J Pharmacol*, 2003, 139(6): 1146-1152.
- [34] Liu C Y, Wu T Z, Zhou D X, et al. Study on the antibiotic effects of paeonol from peony [J]. *J Biol* (生物学报), 2000, 17(3): 23-24.
- [35] Qiu S P, Wang D H, Liu Z W, et al. Effect of paeonol on renal ischemia/reperfusion injury of rabbit models [J]. *Chin*

- J Nephrol* (中华肾脏病杂志), 2001, 17(3): 185-187.
- [36] Wang J G, Wang X T, Lu X M, *et al.* Protective effect of paeonol on mice hepatic toxic injury induced by isoniazid and rifampicin [J]. *Chin Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 1999, 6(6): 26-27.
- [37] Qi J S, Li E, Wang F. Effect of paeonol on inhibition of peroxynitrite on osteoblast proliferation [J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2003, 23(2): 132-134.
- [38] Han B, Wang J, Zhu Q. The inhibitory effect of paeonol on proliferation of human umbilical vein endothelial cells induced by advanced glycation end products [J]. *Study J Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2002, 20(5): 681-687.
- [39] Yang L Y, Cao Y, Wei Y J, *et al.* Inhibitory effect of extracted components from Chinese medicinal herbs on tyrosinase [J]. *Chin J Dermatol* (中华皮肤科杂志), 2003, 36(4): 207-209.

## 基因调控技术提高药用植物细胞有效成分产量的研究进展

江 湖<sup>1</sup>, 苏 虎<sup>2\*</sup>

(1. 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 2. 江西科技师范学院生命科学学院, 江西 南昌 330013)

利用植物细胞培养技术生产具有重要经济价值的药用植物次生代谢产物为中药可持续发展提供了一条新的途径。然而, 药用植物细胞培养过程中目的次生代谢产物的低产问题一直困扰着该技术的发展与应用, 传统的克服这一问题的方法主要有优化培养条件、筛选高产细胞株等, 大量的研究表明, 通过上述途径无法从根本上解决植物细胞次生代谢产物的低产问题。

近年来, 随着基因工程等现代生物技术的发展, 人们尝试利用基因调控手段来调节植物细胞的次生代谢, 如采用关键酶基因调控技术、转录因子调控技术等从分子水平上解决药用植物细胞次生代谢产物的低产问题。本文就这方面的研究、发展现状进行综述。

### 1 关键酶基因调控技术

在药用植物次生代谢网络中, 一些关键酶基因表达水平对某些目的产物的生物合成水平有着重要的调节作用。将次生代谢途径中的关键酶基因克隆, 重组后导入到植物细胞中, 通过提高次生代谢途径中关键酶的活性和数量, 增加代谢强度, 提高目的次生代谢产物的产量。目前, 许多种属的关键酶基因, 如紫杉醇合成过程中的 2a-O-benzoyltransferase、taxa-4(5), 11(12)-diene synthase<sup>[1,2]</sup>, 黄连中黄连素合成过程中的 scoulerine-9-O-methyltransferase (SMT)<sup>[3]</sup>等关键酶基因已经被克隆。Sato 等<sup>[4]</sup>在农杆菌介导下将 SMT cDNA 导入黄连悬浮细胞中, 当 SMT 基因过量表达时该酶活力增加 20%, 黄连素在总生物碱中的量提高了 12%。Canel 等<sup>[5]</sup>通过转基因技术使 strictosidine synthase (STR) 基因在长春花中过量表达, 结果该酶的活性比野生型细胞中酶活性提高了 10 倍, 生物碱合成水平也有很大提高。

利用关键酶基因调控技术可以实现对代谢途径中的某个限速步骤进行局部调控, 对提高药用植物细胞中次生代谢产物的量有一定效果, 但也存在不足之处。首先, 由于植物细胞次生代谢是一个复杂的网络, 代谢分支之间彼此交错, 代

谢过程中存在一系列反馈调节机制, 细胞内部会抵制某种次生代谢产物流量的变化, 因此仅仅依靠增加代谢途径中一两个关键酶基因的表达水平往往对产物的代谢流量增加作用效果有限<sup>[6~8]</sup>。其次, 利用该技术对药用植物细胞中目的次生代谢产物的合成进行调控需要清楚掌握其代谢途径。然而目前对许多药用植物次生产物的代谢途径研究尚不深, 因而克隆这一类代谢途径中关键酶基因的难度较大, 制约了该技术在药用植物细胞培养过程中的应用。

### 2 转录因子基因调控技术

转录因子也称为反式作用因子, 是能够与真核基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白。根据转录因子 DNA 结合域的结构可以将其分为 bHLH(basic helix-loop-helix)、bZIP(basic leucine zipper)、zinc-finger、Myb 等几类<sup>[9]</sup>。如从长春花中分离得到的 CrMYC1 转录因子就属于 bHLH 转录因子家族; 金鱼草、欧芹的 Myb 转录因子参与了苯丙氨酸代谢途径的调控<sup>[10~12]</sup>。转录因子对植物次生代谢有着重要的调节作用, 它可以调节生物体内多个功能基因表达水平, 使用合适的转录因子能够提高整条代谢途径中一系列酶基因的表达水平, 因此被认为是一种新的提高次生代谢产物流量的分子调控策略<sup>[13,14]</sup>。

转录因子调控是一种重要的植物次生代谢调控手段<sup>[15]</sup>, 然而以转录因子基因作为调控基因对植物细胞的次生代谢进行调控也存在着一些不足之处。如转录因子基因的作用比较单一, 不同植物次生代谢产物的合成往往需要不同的转录因子基因进行调控, 而且通常情况下需要两种或两种以上不同的转录因子基因共同作用才能有效提高代谢流量。

### 3 反义核酸与 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术

反义核酸是指能够与靶 DNA 或 RNA 片断互补、结合的一段 DNA 或 RNA 序列, 反义核酸技术即利用反义核酸关闭目标基因表达的技术。目前, 应用该技术对植物次生代谢调控常常与关键酶基因技术相结合。在药用植物次生代谢调控过

收稿日期: 2006-01-04

作者简介: 江湖(1980—), 女, 蒙古族, 河北承德人, 助教, 硕士研究生, 2005 年毕业于南昌大学中德联合研究院, 主要从事分子生物学研究。 E-mail: riverhu@163.com

\* 通讯作者 苏 虎 Tel: (0791)3815794 E-mail: suhujiang@163.com