

白桦酯醇的研究进展

范桂枝, 詹亚光*

(东北林业大学生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:白桦酯醇以及由白桦酯醇转化的次级产物白桦酯酸及其衍生物具有镇咳祛痰、清热利湿、消肿解毒、提高机体免疫力、调血脂等作用。更重要的是白桦酯醇、白桦酯酸作为天然药物在抗肿瘤和抗HIV等活性方面显示出了与以往药物不同的作用机制, 靶向作用性更强, 不良反应较小。因此, 对于新型天然药物白桦酯醇和白桦酯醇的研究已逐步受到研究者的重视, 就近年来白桦酯醇及其衍生物的制备, 白桦酯醇的生物活性、合成途径及其关键酶等方面的研究追踪前人研究报道, 为今后白桦酯醇相关研究的深入提供理论参考。

关键词:白桦酯醇; 制备; 合成代谢

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)10-1591-04

Advances in studies on betulin

FAN Gui-zhi, ZHAN Ya-guang

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Key words: betulin; preparation; anabolism

白桦酯醇(betulin)存在于酸枣仁、天门冬、石榴树皮和叶、白桦树皮和叶、柿蒂、罗勒、大枣等植物中^[1,2], 是一种重要的天然生物活性物质, 具有消炎、抗病毒、抑制头发纤维中蛋白质溶解、改善受损头发光泽、促进头发生长等活性, 可应用于食品、化妆品及医药等行业^[3]。同时, 白桦酯醇也是一种重要的药物合成中间体, 以白桦酯醇为原料可以通过两步方法直接合成白桦酯酸(betulinic acid)及其多种衍生物^[4], 该衍生物的药理活性和广谱范围均较白桦酯醇强。更重要的是白桦酯醇、白桦酯酸作为天然药物在抗肿瘤和抗艾滋病等方面显示出了与以往药物不同的作用机制, 靶向作用更强, 几乎无不良反应^[5,6]。因此, 白桦酯醇、白桦酯酸作为最有潜力的新型药物制剂, 具有广阔的应用前景。

目前, 对于新型天然药物白桦酯醇和白桦酯醇的研究已逐步受到研究者的重视, 本文主要就近年来白桦酯醇及其衍生物的制备, 白桦酯醇的生物活性、合成途径及其关键酶等方面的研究追踪前人研究报道, 尤其是相关的最新研究进展, 并结合本课题组的研究, 为今后白桦酯醇相关研究的深入提供理论参考。

1 白桦酯醇及其衍生物的制备

1.1 白桦酯醇分离与测定方法:白桦酯醇是具有羽扇豆烷型结构的五环三萜类化合物, 白色结晶, 在桦树皮中质量分数最高(132.45~257.11 mg/g^[7]), 以白桦酯醇为原料可以通过两步方法直接合成白桦酯酸及其多种衍生物^[4]。白桦酯醇结构式见图1。

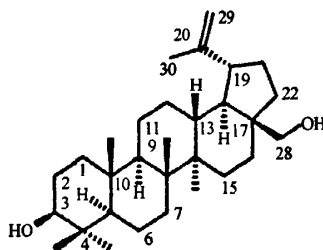


图1 白桦酯醇的结构式

Fig.1 Structure of betulin

作为一种天然产物, 白桦酯醇的提取分离面临许多困难, 如其类似物很多以及实际应用的纯度要求高等。基于上述因素, 寻找高效、经济的分离纯化技术, 越来越成为研究者关注的焦点。目前, 白桦酯醇的提取分离方法主要有5种, 即水蒸气蒸馏法^[8]、溶剂提取法^[8]、液相分配萃取分离法^[9]、超临界流体萃取^[10]、超声波提取法同时结合色谱纯化法^[11]等。另外, Yin等^[8]利用高压脉冲电场提取的白桦酯醇产量较常规方法提取量增加了20%^[12]。可见, 提取方法的选择对于白桦酯醇的最终产量极为重要。

张泽等^[11,13]应用高效液相色谱法测定白桦树皮中白桦酯醇, 其线性范围为15.0~300.0 µg/mL, 平均回收率为93.93%, 精密度高, 稳定性好。另外, Zhao等^[14]应用反相色谱同时检测到白桦树皮中的白桦酯醇和白桦酯酸, 与方玉栋等^[15]和杨晓静等^[16]报道的气相色谱法相比具有优越性, 气

收稿日期: 2008-05-05

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GA06B301-3-3); 东北林业大学引进人才项目(602023)

作者简介: 范桂枝(1974--), 女, 山西榆次人, 讲师, 博士, 研究方向为植物细胞工程和环境生理。 Tel: (0451)82191752

E-mail: gzf325@126.com

* 通讯作者 詹亚光

相色谱法需要对样品衍生化后才能分析,使体系复杂,增加了定性、定量的难度,且保留时间长。采用比色法和薄层扫描测定,操作繁琐、费时、受仪器及显色剂的限制。

1.2 白桦脂醇衍生物的制备:为了寻找更多、更好的抗HIV和抗肿瘤药物,研究者们以白桦脂醇和白桦脂酸为天然先导物进行了许多结构修饰,获得了不少生物活性优异且作用机制新颖的衍生物。根据白桦脂醇和白桦脂酸的结构特点,修饰部位主要集中于3位羟基、19位异丙烯基和28位羧基。田水清等^[17]通过对桦木醇的3位、28位羟基进行修饰,以吡啶作溶剂,二甲氨基吡啶(DMAP)作催化剂的条件下,与丁二酸酐反应合成桦木醇丁二酸酯。

2 白桦脂醇及其衍生物的生物活性

2.1 抗肿瘤活性:叶银英等^[18]的研究结果发现,白桦脂酸及其衍生物23-羟基白桦脂酸对黑色素瘤和其他7种恶性肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用,细胞生长周期被阻滞,最终导致了大量的细胞凋亡,并呈现出一定的剂量依赖关系。白桦脂酸对黑色素瘤(Mel-1、Mel-2、Mel-4)具有专一的细胞毒性,对神经外胚层肿瘤也具有特异抑制活性。最近研究发现白桦脂醇及其衍生物对食管癌、前列腺癌,多种神经瘤细胞和肉瘤细胞等具有很强的抑制作用^[19~22]。

白桦脂醇及其衍生物抗肿瘤机制研究表明,白桦脂醇及其衍生物对肿瘤细胞通过直接杀伤作用,抑制肿瘤血管生成,调节与肿瘤相关因子的表达,改变线粒体的特征,影响细胞周期,诱导分化肿瘤细胞,改变肿瘤膜上的钙泵,降低一些细胞生长所需酶的活性等方面来发挥其抑制肿瘤作用^[23]。

2.2 抗HIV活性:1994年,Fujioka等首先发现白桦脂酸可抑制H9淋巴细胞中HIV的复制,并且其C-3、C-17、C-19等位取代的衍生物也具有同样的作用,有的甚至更强^[15]。白桦脂酸抑制H9淋巴细胞中HVI的复制ED₅₀值为1.4 μmol/L;抑制未被感染的H9细胞生长IC₅₀为13 μmol/L,是HIV与细胞膜的融合抑制剂^[24]。随着研究的深入,发现白桦脂醇及其衍生物能够在体外抑制HIV的复制,并且发现C-3上的羟基和氢化白桦脂酸均能增强抗HIV活性。此外,研究还发现白桦脂醇及其衍生物可以作为HIV的成熟抑制剂^[25]。

2.3 抗炎活性:大多数五环三萜类化合物都具有抗炎活性,其中包括白桦脂醇和白桦脂酸,这两个化合物已在大量的体外和体内模型体系中得到验证。早在1959年,白桦脂酸即被发现具有抗炎作用。白桦脂醇和白桦脂酸的抗炎机制是对非神经基因路径的抑制。有研究表明白桦脂酸的抗炎活性是与糖皮质激素受体相互作用的结果,但内源性抗炎蛋白的全程合成也扮演重要作用。

2.4 其他:近年来的相关报道指出白桦脂酸及其衍生物有抗革兰阳性菌的活性,而对革兰阴性菌未发现有抑制作用。此外,白桦脂醇及其衍生物还有镇咳祛痰、清热利湿、消肿解毒、提高机体免疫力、调血脂等作用^[26]。

2.5 毒性:给大鼠腹腔内注射剂量为200和400 mg/kg的白桦脂醇、白桦脂酸及其一些衍生物,结果表明,没有明显的毒性。Pisha等^[16]每4天给鼠腹腔内注射白桦脂酸,每次500

mg/kg,共6个剂量,结果也没有显示毒性。

3 白桦脂醇的生物合成途径及其关键酶

3.1 生物合成途径:植物萜类化合物的合成有甲羟戊酸(mevalonate pathway, MVA)和脱氧木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP)两条合成途径^[27](图2)。虽然两条途径同时存在,但处于不同部位,并为不同的萜类化合物提供异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)。其中,MVA途径存在于细胞质中,仅为倍半萜和三萜的生物合成IPP,而DXP途径存在于质体中,为单萜、双萜和四萜的生物合成提供IPP^[28]。由于白桦脂醇属于三萜物质,所以白桦脂醇主要通过MVA途径合成。

3.2 关键酶:根据白桦脂醇生物合成的不同阶段,可将参与合成的酶分成前期、中期和后期。生成IPP和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)以前的酶属于前期酶,其中3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还原酶(3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)是白桦脂醇MVA生物合成途径的关键酶(图2);中期酶为烯丙基转移酶和萜类环化酶,它们是在生成IPP和DMAPP之后,催化形成分子大小不同和环式各异的萜类化合物中间体,是萜类生物合成的关键酶,如法呢基二磷酸合酶(FPP synthase, FPPS)和2,3-氧化鲨烯环化酶(2,3-oxidosqualene cyclases, OSCs)(图2)。目前,HMGR、FPPS和OSCs基因已从不同的植物中被克隆出,并发现其具有较高的保守序列^[29]。

4 白桦脂醇的代谢调控

植物次生代谢不像初生代谢那样相对稳定,受到多种因素的影响,白桦脂醇的合成也不例外。决定细胞中白桦脂醇产量高低的因素有两方面:一为内在因素,主要指细胞的基因型;二为环境因素。虽然起决定作用的为细胞基因型,但白桦脂醇的代谢调控可以通过筛选高产基因型、前体饲喂、营养条件、不同诱发因子的启动等因素来实现。如在一个继代周期中,培养基中添加10~50 g/L的蔗糖、葡萄糖和果糖后,白桦愈伤组织中的白桦脂醇量存在显著差异^[30]。

另外,萜类化合物代谢调控还可从代谢工程调控方面进行,其采用的策略主要有:(1)增加代谢途径中限速步骤酶编码基因的拷贝数或灭活代谢途径中具有反馈抑制作用的编码基因;(2)在不影响细胞基本生理状态的前提下,阻断或抑制与目的途径相竞争的代谢流;(3)利用已有的途径构建新的代谢旁路合成新的萜类化合物^[31,32]。但目前关于白桦脂醇的代谢工程调控研究还未见报道。

5 结语

尽管白桦脂醇及其衍生物代谢生物学方面的研究得到了越来越广泛的关注和兴趣,但现有的研究还不能完全揭示其生理活性机制及在细胞内的作用位置,各种因子对白桦脂醇代谢关键酶的转录、表达及活性的影响研究尚待进行。调控白桦脂醇的信号分子及其调控途径、各转录因子及蛋白质的调控机制也还未明确,关于调控白桦脂醇合成的功能基因组或蛋白质组学等领域也还有待研究。这些问题的解决,将有助于运用基因工程开展白桦脂醇代谢的生态调控,为白

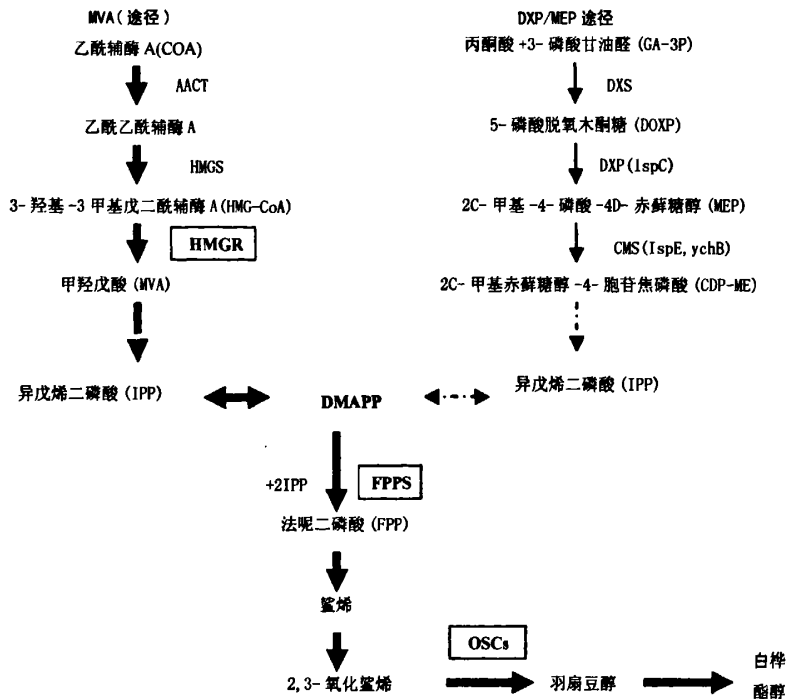


图2 白桦脂醇的生物合成途径

Fig. 2 Biosynthetic pathway of betulin

桦脂醇及其衍生物的产业化生产提供新的途径。同时,随着细胞及分子生物学检测技术手段的不断发展,白桦脂醇将会有越来越多新的活性被认识。

参考文献:

- [1] 陈业高. 植物化学成分 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [2] 李明, 李明润, 高向耘, 等. RP-HPLC 法测定大枣中桦木醇 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 285-286.
- [3] 王石发, 张明光, 李艳苹. 桦木醇提取及纯化工艺的研究 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27(6): 22-26.
- [4] 马慧丽, 姚军, 陈慧. 桦木酸制备的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(4): 551-552.
- [5] Jing Z, Li H, David L, et al. Inhibition of HIV-1 maturation via drug association with the viral gag protein in immature HIV-1 particles [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 42149-42155.
- [6] Wen Z M, Martin D E, Bullock P, et al. Glucuronidation of anti-HIV drug candidate bevirimat: identification of human UDP-glucuronosyltransferases and species differences [J]. Drug Metab Disp, 2007, 35: 440-448.
- [7] 范桂枝, 詹亚光, 王博, 等. 白桦不同部位及种源间白桦脂醇含量的变异分析 [J]. 林产化学与工业, 2007, 4: 104-106.
- [8] 曹丹. 白桦脂醇的纯化及其衍生物的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [9] 韩世岩, 方桂珍, 李珊珊, 等. 四氢呋喃-苯混合溶剂法分离纯化桦木醇 [J]. 林产化学与工业, 2005, 25(增刊): 129-132.
- [10] 丁为民, 王洋, 阎秀峰, 等. 均匀设计法优化桦木醇的超临界二氧化碳萃取工艺 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27: 63-66.
- [11] 张泽, 孙宏. 高效液相色谱法测定白桦树皮中白桦脂醇的含量 [J]. 林产化学与工业, 2004, 24(1): 61-63.
- [12] Yin Y G, Cui Y R, Ding H W. Optimization of betulin extraction process from *Inonotus obliquus* with pulsed electric fields [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2008, 9(3): 306-310.
- [13] Shrishailappa B, Gupta M K, Saravanan R, et al. Determination of betulin in *Grewia tiliaefolia* by HPLC [J]. J Sep Sci, 2004, 27: 129-131.
- [14] Zhao G L, Yan W D, Cao D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC [J]. Pharmacol Bio-med Anal, 2007, 43: 959-962.
- [15] 方玉栋, 刘璐琪, 李和. 油茶种子油不皂化物中的五环三萜醇与四环三萜醇的研究 [J]. 中国粮油学报, 1999, 14(3): 18-26.
- [16] 杨晓静, 王立众, 李和. 紫苏子油不皂化物的分离与分析 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(2): 207-209.
- [17] 田水清, 吕坤, 方桂珍, 等. 桦木醇丁二酸酯的合成 [J]. 林产化学与工业, 2007, 27(增刊): 77-80.
- [18] 叶银英, 何道伟, 叶文才, 等. 23-羟基桦木酸体外和体内抗黑色素瘤作用的研究 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2000, 7(1): 5.
- [19] Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah S K, et al. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors [J]. Cancer Res, 2007, 67: 2816-2823.
- [20] Alakurtti S, Taru M K, Salme K, et al. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin European [J]. J Pharm Sci, 2006, 29: 1-13.
- [21] 蔡唯佳, 祁逸梅, 朱永东, 等. 白桦脂醇对食管癌细胞EC109的抑制作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(1): 16-18.
- [22] 李岩, 金雄杰, 谢湘林, 等. 白桦三萜类物质抗黑色素瘤B16/S180肉瘤作用及其机制的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(3): 279-281.
- [23] 张晶, 张秀娟, 凌莉莉. 桦木酸和2,3-羟基桦木酸抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4(1): 62-64.
- [24] Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie R E, et al. Anti 2AID Sagents11 betulinic acid and platonic acids as anti HIV principles from *Syzgium claviflorum* and the antiHIV activity of structurally related triterpenoids [J]. J Nat Prod, 1994, 57(2): 243-247.
- [25] 张秀娟, 凌莉莉, 季宇彬, 等. 桦木酸生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 508-513.
- [26] 王建华, 黄文哲, 张增辉, 等. 桦树皮挥发油有效成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(5): 268.
- [27] 罗永明, 刘爱华, 李琴, 等. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展 [J]. 江西中医学院学报, 2003, 15(1): 45-49.

- [28] 陈莉. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶[J]. 国外医药:植物药分册, 2004, 19(4): 156-161.
- [29] 张长波, 孙红霞, 巩中军, 等. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关酶[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 779-786.
- [30] 王博, 范桂枝, 詹亚光, 等. 不同碳源对白桦愈伤组织生长和三萜积累的影响[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 97-99.
- [31] 陈晓亚. 植物次生代谢研究[J]. 世界科技研究与发展, 2006, 5: 1-4.
- [32] 阎秀峰, 王洋, 李一蒙. 植物次生代谢及其与环境的关系[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2554-2562.

鱼腥草注射液不良反应研究进展

刘志芳, 孔令义

(中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210038)

摘要:鱼腥草是《中国药典》收载的一味传统中药, 具有清热解毒, 消痈排脓, 利尿通淋的功效。鱼腥草化学成分种类较多, 生物活性高, 疗效确切, 一直以来受到人们的重视。特别是在其注射液出现严重不良反应之后, 吸引了众多国内外学者的注意。现对鱼腥草的化学成分、药理作用, 特别是其注射液不良反应的现状、成因和应对措施等方面的研究进行综述, 为鱼腥草注射液的进一步开发和改进提供参考。

关键词:鱼腥草注射液; 不良反应; 合理用药

中图分类号:R285.63

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1594-03

鱼腥草为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分, 始载于《名医别录》。因其叶具鱼腥气, 故俗称鱼腥草。其味辛, 性微寒, 具有清热解毒, 消痈排脓, 利尿通淋的功效, 主要用于肺痈吐脓、痰热咳嗽、热痢、热淋、痈肿疮毒等病症的治疗。鱼腥草产于我国中部、东南及西南部各省区, 多生于沟边、溪边或林下湿地上。鱼腥草药食兼用, 我国西南地区人民常作熟菜或调味品, 被国家卫生部正式确定为“既是药品, 又是食品”的极具开发潜力的资源之一, 广泛受到人们关注^[1,2]。

鱼腥草注射液是鱼腥草以水蒸气蒸馏法制备的中药注射剂, 有清热、解毒、利尿等功效, 主要用于肺脓疡、痰热咳嗽、白带增多、尿路感染、痈疖等病症的治疗。由于鱼腥草注射液等7个注射剂在临床应用中出现了过敏性休克、全身过敏反应、胸闷、心急、呼吸困难和重症药疹等严重不良反应, 甚至有死亡病例报告, 国家食品药品监督管理局于2006年6月发布了暂停使用和审批鱼腥草注射液等7个品种的公告, 因此对鱼腥草注射液不良反应的研究显得尤为重要。本文就近几年关于鱼腥草化学成分、药理作用及鱼腥草注射液不良反应的现状、成因和应对措施的研究进展进行综述。

1 化学成分研究

鱼腥草全草含挥发油约0.05%, 主要成分为癸酰乙醛(鱼腥草素, decanoyl acetaldehyde), 鱼腥草的鱼腥气味是由该成分所致。尚含月桂烯(myrcene)、 α -蒎烯(α -pinene)、*d*-柠檬烯(*d*-limonene)、甲基正壬酮(2-methylheptenone)、莰烯(camphene)、乙酸龙脑酯(bornyl acetate)、芳樟醇(linalool)、石竹烯(caryophyllene)、月桂醛(dodecyl aldehyde)、癸醛(capraldehyde)、桉油素(cineole)、麝香草酚(thymol)、对聚伞花素(*p*-cymene)、葑草烯(humulene)、龙脑

(borneol)、牻牛儿醇(geraniol)等^[3]。鱼腥草中还含有槲皮素(quercetin)、槲皮苷(quercitrin)、异槲皮苷(isoquercitrin)、瑞诺苷(reynoutrin)、金丝桃苷(hyperin)、阿福豆苷(afzelin)、芦丁(rutin)等黄酮类成分^[2]、3,5-二癸酰吡啶(3,5-didecanoyl pyridine)、2-壬基-5-癸基吡啶(2-noryl-5-decyl pyridine)、金丝吊乌龟酮B(cepharanone B, Aristolactam B I)、去甲头花千金藤二酮B(cepharadione)、7-氯-6-去甲基头花千金藤二酮B(7-choloro-6-demethyl cepharadione B)等生物碱类成分^[4]、绿原酸(chlorogenic acid)、棕榈酸(palmitic acid)、亚油酸(linoleic acid)、油酸(oleic acid)等有机酸成分^[3]、豆甾烷-4-烯-3-酮(stigmastane-4-en-3-one)、豆甾烷-3,6-二酮(stigmastane-3,6-dione)、胡萝卜苷(β -daucosterol)等甾体类成分^[5]。另外还有氨基酸、维生素等成分。

2 药理作用

2.1 抗菌作用:鲜鱼腥草提取物体外有抗金黄色葡萄球菌作用, 最低抑菌浓度(MIC)为1.2 mg/mL, 最低杀菌浓度(MBC)为5.0 mg/mL。体内抗菌实验表明鲜鱼腥草提取物能使金黄色葡萄球菌引起的小鼠死亡率降低^[6]。

2.2 抗病毒作用:鱼腥草注射液具有显著的抗MHV-3病毒作用, 其抑制效应呈剂量依赖性, 并且药物的毒性低, 药物安全范围宽^[7]。另外其具有明显降低甲型流感病毒H₁N₁感染小鼠死亡率, 降低肺指数和抑制肺内增殖作用, 可对抗病毒感染所致动物体质量降低^[8]。

2.3 增强机体免疫能力:研究表明合成鱼腥草素可通过增强脾切后淋巴结的功能及调节T细胞亚群来实现对脾切除动物细胞免疫功能的调节作用, 并且对环磷酰胺致小鼠非特异性免疫、特异性免疫功能低下也有明显的调节作用^[9,10]。