

剂量组:与模型组比较骨小梁稍规则,数目轻度增多,厚度稍增加,断裂少,髓腔间隙稍变小,骨小梁面积稍高于模型组。小剂量组:骨小梁变细,数量减少,断裂增多,碎裂形成纽扣状碎骨片,髓腔扩大,皮质骨变薄;与假手术组比较,同样倍数下骨小梁的连接中断点明显增多,骨小梁髓腔间距增大,病理改变接近模型组。见图 1。

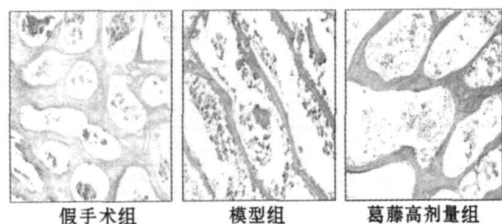


图 1 去卵巢大鼠骨组织病理学

Fig. 1 Pathology of osseous tissue in rat extirpated ovary

4 讨论

前期和国内其他学者的研究结果都证实葛藤和葛根的总黄酮量相近,但其主要成分比例不同。目前,国内均以葛根为原料提取葛根总黄酮,葛藤仍然被视为非药用部位,在葛根采集中被丢弃。因此开展葛藤新药的开发研究具有重要的经济价值。

本研究在药学研究的基础上,结合骨质疏松发病学基础,选择卵巢切除大鼠模型来观察葛藤提取物治

疗骨质疏松的作用,为临床进一步应用提供基础。

连续给药 6 个月后,分别观察各组大鼠所考察指标,葛藤提取物 3 个给药组均明显提高骨组织抗外力作用,增加骨骼中钙的量,不同程度改善造模引起的骨质疏松表现;病理诊断也提示葛藤提取物不同程度改善骨质疏松模型骨组织病理性改变,增加骨小梁数目。葛藤提取物具有明显的干预和治疗雌激素缺乏引起的骨质疏松的药效学作用。

参考文献:

- [1] 郭世祯. 骨质疏松——基础与临床 [M]. 天津:天津科学技术出版社, 2001.
- [2] Marsden J. Hormone replacement therapy and breast cancer [J]. *Maturitas*, 2000, 341 (S2): 11-24.
- [3] Force T. Postmenopausal estrogen replacement and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis for the US [J]. *Prevent Serv Ann Intern Med*, 2002, 136(9): 42.
- [4] 汤丹,金邦荃,吕伶,等. 大豆苷元和葛根素对去卵巢大鼠骨代谢生化指标的影响 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(7): 40-42.
- [5] 刘薇,王亚利,张式暖,等. 葛根素对慢性缺氧心肌保护作用的实验研究 [J]. 山东医药, 2006, 46(5): 15-16.
- [6] 陈训华,危剑安,陈燕平,等. 补肾方药对去卵巢大鼠骨质疏松症防治作用的研究 [J]. 中国骨伤, 1998(2): 12.
- [7] 刘石平,廖二元,伍汉文,等. 绝经后骨质疏松大鼠模型的综合评价 [J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26(2): 111.
- [8] 韦永中,陶松年,杨国平,等. 依普拉芬和雌激素对实验性骨质疏松作用的初步观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(1): 76-78.

黄酮苷元的三维构动关系研究 : Caco-2 细胞渗透性的预测

徐适,陈雕,兰轲*,蒋学华,王战国

(四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

摘要:目的 探索应用计算机虚拟筛选技术进行中药与天然药物早期药动学研究的方法,阐明黄酮苷元的结构与其 Caco-2 细胞渗透性的关系。方法 以 Sybyl 7.3 软件包的 CombiLibMaker 模块构建基于黄酮 (flavone) 骨架的虚拟组合化学库,以 Volsurf 模块定性预测黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性。结果 构建的虚拟组合化学库中包含 26 244 个黄酮苷元。黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性与其取代基的种类和数量有关;羟基取代的增多不利于其透过 Caco-2 细胞,羟基的甲基化则可增加其透过 Caco-2 细胞的能力。结论 研究结果与报道的试验数据具有良好的相关性。

关键词:黄酮类化合物;构动关系;Caco-2 细胞;吸收

中图分类号:R285.61 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)09-1452-04

黄酮类化合物 (flavonoids) 分布广泛,具有多种多样的生物活性。多年来国内外学者致力于其药动学的研究,并取得了一定的进展。截至 1993 年,

已鉴定的天然黄酮类化合物已超过 4 000 个^[1],传统的药动学研究方法难以满足研究的通量需求。计算机虚拟筛选技术可利用组合化学原理构建某一

* 收稿日期:2008-12-19

基金项目:四川大学青年科学研究基金 (校青 07035); 四川大学大学生科研训练计划 (2008—2009 年)

作者简介:徐适,男,四川大学 2006 级本科生。Tel: (028) 85503722

*通讯作者 兰轲 Tel: (028) 85503722 E-mail: lanwoco@scu.edu.cn, lanwoco@163.com

类天然产物的虚拟组合化学库,再以三维构动关系(3D-SPR)研究技术快速对库中化合物进行药动学性质的虚拟筛选,预测其透膜性、口服吸收与代谢稳定性等性质,从而为实验研究提供重要的参考信息。Sybyl 软件包为 Tripos 公司开发的专业分子模拟平台,其中 CombiLibMaker 模块可快捷地构建虚拟组合化学库;Volsurf 模块可方便地构建三维构动关系,阐明化合物的结构与生物学性质之间的关系^[2~4]。

虽然天然黄酮类化合物主要以各种糖苷的形式存在,但是大部分研究已证实,黄酮苷口服给药后在肠道内即发生代谢,水解脱掉糖基后被吸收^[5~7]。因此,对黄酮苷吸收过程的研究应当尤其关注其苷元形式的吸收特征。以骨架结构划分黄酮类化合物可分为黄酮类、黄酮醇类、异黄酮类、黄烷酮类与异黄烷酮类等,其中尤以黄酮类与黄酮醇类化合物在自然界的分布最为广泛。为此,本研究选择具有黄酮骨架结构的黄酮苷元为研究对象,采用 CombiLibMaker 构建虚拟组合化学库;以 Volsurf 预测库中化合物 Caco-2 细胞的渗透性,解释黄酮苷元 Caco-2 细胞渗透性与其化学结构之间的关系。本研究旨在探索利用计算机虚拟筛选技术早期进行天然产物的药动学性质研究的方法,为中药与天然药物的进一步实验研究提供依据。

1 虚拟组合化学库的构建

以黄酮为骨架,使用 Sybyl 7.3 软件包(Tripos, St. Louis, USA) 中的 CombiLibMaker 模块构建组合化学库,定义骨架上的 10 个氢分别可被羟基或甲氧基所取代(图 1)。黄酮骨架中连接 B 环与 C 环的 C-C 键为可旋转键,因此 B 环的 R₂' 位等同于 R₆' 位, R₃' 位等同于 R₅' 位,因此库中化合物的容量为 26 244 个。库中囊括了自然界存在的大部分基于此骨架结构的黄酮苷元,其中常见的黄酮苷元见表 1。

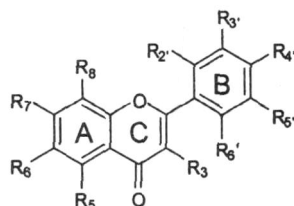


图 1 虚拟组合化学库中黄酮类化合物的骨架

Fig. 1 Flavonoids skeleton of virtual combinatorial chemical library

表 1 虚拟组合化学库中常见的天然黄酮苷元

Table 1 Common natural flavone aglycones presented in virtual combinatorial chemical library

No	名 称	相对分子质量	No	名 称	相对分子质量
1	黄酮 (flavone)	222.24	12	山柰素 (kaempferide)	300.26
2	黄酮醇 (flavonol)	238.24	13	槲皮素 (quercetin)	302.24
3	报春花素 (primetin)	254.24	14	桑色素 (morin)	302.24
4	白杨素 (chrysin)	254.24	15	异鼠李素 (isorhamnetin)	316.26
5	芹菜素 (apigenin)	270.24	16	鼠李素 (rhamnetin)	316.26
6	黄芩素 (baicalein)	270.24	17	小麦黄素 (tricin)	330.29
7	高良姜黄素 (galangin)	270.24	18	阿亚黄素 (ayanin)	344.32
8	汉黄芩素 (wogonin)	284.26	19	坦布林 (tambulin)	344.32
9	漆黄素 (fisetin)	286.24	20	川陈皮素 (nobletin)	402.39
10	山柰酚 (kaempferol)	286.24	21	栀子黄素 (gardenin)	418.39
11	香叶木素 (diosmetin)	300.26	22	月橘素 (noticin)	462.45

2 构效关系研究

2.1 Volsurf 描述符 Volsurf 模块以 GRID 程序将目标分子的三维结构置于三维网络中,通过逐一计算探针与目标分子三维结构网格点上的各个原子的作用力,计算分子作用场 (molecular interaction field, MIF)。Volsurf 中最常用的 GRID 探针为 OH₂、DRY 和 O。OH₂ 探针即水探针,可用于模拟溶解和去溶解过程。DRY 探针即疏水探针,用于寻找目标分子表面的憎水基团,可用于模拟生物膜与药物分子的疏水性相互作用。O 探针即羰基探针,可用于模拟生物膜和药和分子间的氢键的相互作用。

Volsurf 模块将 GRID 获得的分子作用场数值换算为 94 个 VolSurf 描述符 (Descriptors),可分别定量描述出分子的大小、形状、极性、疏水性及其两者之间的平衡等性质。从 GRID MIF 中产生的 Volsurf 描述符较一维或二维描述符具有明显的优越性,对叠合规则不敏感,可克服比较分子场法 (compare molecular field assay, CoMFA) 的不足。VolSurf 程序中通常在由 2D 向 3D 转化前首先进行能量最低优化,因而避免了分子动力学的取样和 Boltzmann 法的平均化问题^[8]。

2.2 构效关系模型的建立: Volsurf 模块的 Caco-2 细胞渗透性模型纳入了 751 个性质各异的化合物的 Caco-2 细胞吸收方向表现渗透系数 (apparent permeability, Papp),这些数据来源于文献以及各个实验室的内部数据。模型首先将 751 个化合物的 Papp 换算为打分值 (score),作为模型的响应值,然后以逐一剔除法 (leave one out, LOO) 或逐一剔除法 (leave two out, LTO) 将 97 个 VolSurf 描述符进行降维处理,随后以偏最小二乘法 (partial least squares, PLS) 拟合预测模型。将所建立的黄酮苷元化合物虚拟组合化学库导入此 PLS 模

型中,即可获得库中黄酮苷元 Caco-2 细胞渗透性的 PLS 投影图,预测其 Caco-2 细胞渗透性并解释其与结构之间的关系。

3 结果与讨论

3.1 黄酮苷元化合物透过 Caco-2 细胞能力的整体趋势:图 2 为预测黄酮苷元 Caco-2 细胞渗透性的 PLS 投影图。图中央的 C 线为高渗透性和低渗透性的分界线;把投影图分成了两个区域,分别是高渗透性区域(C 线右侧)和低渗透性区域(C 线左侧)。C 线左右的 A 线与 B 线分别代表了 PLS 模型的正负标准偏差。深灰色方形点表示虚拟组合化学库中黄酮苷元,可见其分布于横跨 C 线,右侧的化合物约占 60%,左侧约占 40%,说明黄酮苷元化合物的 Caco-2 细胞渗透性中等偏高,另一个方面也说明模型对库中某些分布于模型误差线附近的化合物的预测准确率相对较低。

Volsurf 主要用于预测化合物以被动转运途径透过 Caco-2 细胞的能力,而大量研究已证实许多黄酮苷元存在 ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporters)介导的外排现象,这可能导致本研究的预测结果与实际试验结果存在一定的偏差。另外,由于 Caco-2 细胞转运试验方法的局限性,同一化合物在不同实验室或不同时期测得的 P_{app} 数据往往存在一定的差异。为此 Volsurf 将模型化合物的 P_{app} 数据换算为打分值, P_{app} 小于 4×10^{-6} cm/s 打分小于 -1, P_{app} 大于 8×10^{-6} cm/s 打分大于 +1, P_{app} 在 $4 \times 10^{-6} \sim 8 \times 10^{-6}$ cm/s 打分介于 -1 与 +1 之间。这种处理方法一方面最大程度地减小了因源数据的变异导致的模型预测误差,另一方面也使得所建立的模型为定性预测模型而非定量预测模型,即仅能定性比较化合物渗透性的高低,而不能定量预测化合物的 P_{app} 数据。

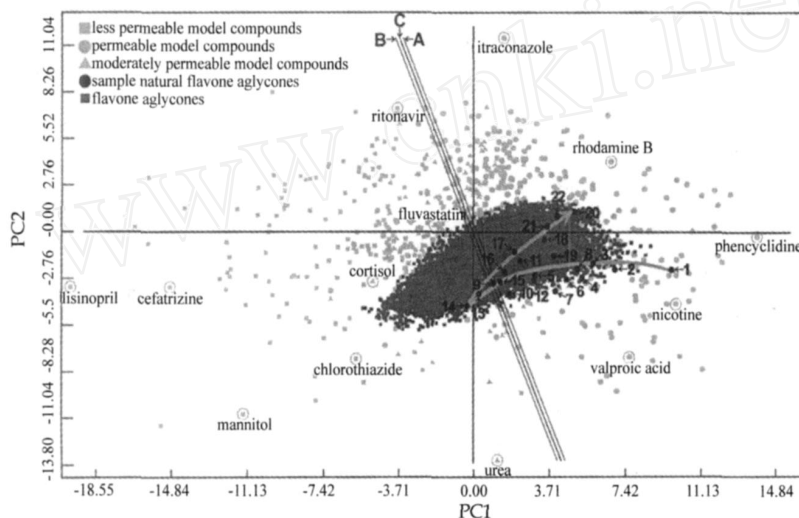


图 2 实验和模型化合物的 PLS 投影图

Fig. 2 PLS Scores plot of experimental and model compounds

3.2 黄酮苷元化合物 Caco-2 细胞渗透性的构效关系:从图 2 可见表 1 中 22 个黄酮苷元的分布趋势,随黄酮苷元相对分子质量的增加其 Caco-2 细胞渗透性先减小再增加,与黄酮苷元分子中的羟基取代数量对相对分子质量的影响规律一致。因此,就取代基的种类与数量而言,黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性随着羟基取代数目的增加而逐渐减小(黄酮无取代,渗透性最高;桑色素分子中存在 5 个羟基,渗透性最低),相反随着甲氧基取代数目的增加而逐渐增大(月橘素分子中存在 8 个甲氧基,渗透性恢复到较高水平)。直观也可发现库中黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性以未取代的黄酮最好,十羟基黄酮最差,

而十甲氧基黄酮又恢复一定的渗透能力。

3.3 分析验证:将本研究的结果与试验研究报道进行对比验证,发现多数文献报道结果均与本研究的结果一致。近期的一项对 36 个黄酮类化合物进行 Caco-2 细胞转运试验的研究(其中包括了 15 个黄酮苷元),其研究结果与本文的预测结果完全一致,表明黄酮分子中羟基取代的数量对其 Caco-2 细胞渗透性具有显著的影响^[9]。另有研究表明,黄酮吸收方向的 P_{app} 高达 3.80×10^{-5} cm/s,而多羟基取代黄酮(如木犀草素、桑色素、槲皮素)在测试浓度下未测得存在吸收方向的转运^[10]。Walle 等^[11]比较了某些羟基取代黄酮与相应甲氧基取代黄酮透过

Caco-2 细胞的能力,结果表明羟基的甲基化可导致其 Caco-2 细胞吸收方向的 Papp 显著增加,进一步验证了本研究的预测结果。也存在一些与本研究结果不符的报道。槲皮素 3 位的羟基甲基化后即为异鼠李素,多项研究均表明异鼠李素透过 Caco-2 细胞的能力显著低于槲皮素^[12,13]。李萍等^[14]报道在 pH 5.5 的转运介质中,5 种黄酮苷元吸收量的大小顺序为:槲皮素(5 羟基取代) > 木犀草素(4 羟基取代) > 染料木素(3 羟基取代) > 芹菜素(3 羟基取代) > 大豆苷元(2 羟基取代),这可能与试验操作的 pH 有关,一般进行 Caco-2 细胞转运试验均要求在 pH 7.4,即生理 pH 值下进行^[15]。这也提示需要进一步深入探讨羟基与甲氧基的取代位置对黄酮苷元 Caco-2 渗透性的影响。

4 结论

本研究构建了具有黄酮骨架结构的虚拟组合化学库,对库中化合物 Caco-2 细胞渗透性的定性预测结果表明,黄酮苷元的 Caco-2 细胞渗透性与其取代基的种类和数量有关,黄酮苷元化合物的 Caco-2 细胞渗透性最高,十羟基取代的黄酮苷元最低;羟基取代的增多不利于其透过 Caco-2 细胞,羟基的甲基化则可增加其透过 Caco-2 细胞的能力。研究结果与文献报道的试验数据具有良好的相关性。本研究所采用的虚拟筛选技术可快速准确地预测黄酮苷元化合物的 Caco-2 细胞渗透性,该方法适用于黄酮类化合物药动学性质的早期虚拟筛选。

参考文献:

- [1] 吴立军,姚新生,吴继洲,等. 天然药物化学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [2] Cruciani G, Pastor M, Clementi S. *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity* [M]. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2000.
- [3] Cruciani G, Crivori P, Carrupt P A, et al. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the volsurf approach [J]. *J Mole Struc*, 2000, 503(1-2): 17-30.
- [4] Crivori P, Cruciani G, Carrupt P A, et al. Predicting blood-brain barrier permeation for three-dimensional molecular structure [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(11): 2204-2216.
- [5] 张国辉,马辰. 黄酮类化合物药动学研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 582-585.
- [6] 吕鹏,黄晓舞,吕秋军. 黄酮类化合物吸收、分布和代谢的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1961-1964.
- [7] 曾佑炜,赵金莲,彭永宏. 黄酮的吸收和代谢研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 460-464.
- [8] 庄笑梅,肖军海,张振清,等. VolSurf 软件及其在药物代谢性质虚拟高通量筛选中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19(2): 156-160.
- [9] Tian X J. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model [J]. *Int J Pharm*, 2009, 367(1-2): 58-64.
- [10] Tammela P, et al. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 425(2): 193-199.
- [11] Wen X, Walle T. Metylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(10): 1786-1792.
- [12] Wang Y, Cao J, Zeng S. Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(6): 751-758.
- [13] Lan K, He J, Tian Y, et al. Intra-herb pharmacokinetics interaction between quercetin and isorhamnetin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(11): 1376-1382.
- [14] 陈丙奎,李松林,李萍,等. 黄酮类化合物在 Caco-2 细胞模型中的吸收规律 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(4): 299-302.
- [15] Enna S J, Williams M, Ferkany John W, et al. *Current Protocols in Pharmacology* [M]. New York: John Wiley & Sons, 2008.

《中草药》杂志售过刊信息

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975 年、1976 年、1979 年、1988 - 1993 年(80 元/年),1996、1997 年(110 元/年)、1998 年(120 元/年)、1999 年(135 元/年)、2000 年(180 元/年)、2001 - 2003 年(200 元/年)、2004 年(220 元/年)、2005 年(260 元/年)、2006 年(280 元/年)、2007 年(280 元/年)、2008 年(280 元/年)。1996 年增刊(50 元)、1997 年增刊(45 元)、1998 年增刊(55 元)、1999 年增刊(70 元)、2000 年增刊(70 元)、2001 年增刊(70 元)、2002 年增刊(65 元)、2003 年增刊(65 元)、2004 年增刊(65 元)、2005 年增刊(65 元)、2006 年增刊(65 元)、2007 年增刊(65 元)、2008 年增刊(55 元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzzbjb@sina.com