

相互作用不强。根据靶标与疾病的关系^[14], 这些靶标相关的疾病有非胰岛素依赖的糖尿病、自身免疫性疾病、白血病、微生物感染、寄生虫病、神经系统疾病、心血管疾病、呼吸系统疾病、类风湿性关节炎、皮肤病和癌症。文献报道, 苯酞类化合物能够治疗神经系统疾病^[15]、平喘、减慢心率、抗心律失常、增强免疫、抗炎镇痛^[1]。由此可见计算结果与文献报道一致。

萜类化合物作用的靶标有转移酶、水解酶、合成酶、氧化还原酶、激酶、离子通道受体、细胞核受体和功能蛋白。其分级评价结果是“+”。这些靶标相关的疾病有神经系统疾病、癌症、疼痛、糖尿病、心血管疾病、肝硬化、肾病综合征、炎症性疾病、类风湿性关节炎、皮肤病、白血病、微生物感染、自身免疫性疾病和高胆固醇血症。据文献报道, 萜类化合物具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗氧化作用, 治疗脑梗死、局灶性脑缺血, 抗肿瘤, 降低心肌收缩力、增加冠脉血流量、降低血压, 保肝、利胆、促进胰腺分泌、抑制胃酸分泌、泻下作用, 治疗糖尿病及其并发症, 增强免疫, 解除平滑肌痉挛、镇静作用^[16]。计算结果与文献报道一致。对接结果显示当归苯酞类、萜类化合物除具有文献报道的药理效应外, 还可能用于其他疾病治疗, 分子对接中得到的新靶标提供了疾病治疗的新靶点。

本研究利用分子对接和虚拟评价方法研究当归挥发油苯酞类和萜类成分可能的药理作用, 根据理论研究结果这两类成分除具有文献报道的药理效应外, 还可能用于治疗肿瘤、糖尿病、类风湿性关节炎、皮肤病、白血病、肝硬化、肾病综合征。这种多成分、多通道、多靶标作用特点反映了中药作用特点^[17]。本研究提供了苯酞类和萜类化合物可能的治疗作用, 还需要从实验上进行验证, 理论研究结果显示了

一定的实用性。

参考文献:

- [1] 倪竹南, 吕圭源, 楼招欢, 等. 当归挥发油化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(7): 93-95
- [2] 蓝苑元, 姚小军, 潘勤. 当归油自乳化解释药系统的制备 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6): 350-353
- [3] 杜俊蓉, 白波, 余彦, 等. 当归挥发油研究新进展 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1400
- [4] Shang Q, Liu W, Xu W R, et al. Virtual evaluation on the activities of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 142-146
- [5] 朱伟, 陈可冀, 徐筱杰. 计算机药物虚拟筛选技术在中医药领域中的应用前景 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 263-266
- [6] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分手册 [M]. 化学工业出版社, 2004
- [7] Friesner R A, Banks J L, Murphy R B, et al. Glide: A new method for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy [J]. *Med Chem*, 2004, 7(47): 1739-1749
- [8] 刘鹏, 王晶晶, 徐为人, 等. 黄酮苷元类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 48-53
- [9] 刘巍, 邢洁, 徐为人, 等. 查尔酮类衍生物活性作用的虚拟评价 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 110-116
- [10] 邓宏伟, 郭妍, 孙焯, 等. 靶向表皮生长因子靶标的全新小分子配体筛选 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(2): 180-185
- [11] Joy S, Nair P S, Hariharan R, et al. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware [J]. *In Silico Biol*, 2006, 601-605
- [12] 李顺来, 郑艳, 王凤颖. 新型 1,5-二苄基咪唑类制剂的分子对接研究 [J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(4): 75-79
- [13] 邢洁, 徐为人, 刘鹏, 等. 槲皮素和地黄环烯醚萜类成分抗炎作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 930-935
- [14] 符海霞, 刘鹏, 王玉丽, 等. 槲皮素环烯醚萜类成分活性作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 767-771
- [15] 吴丽蓉, 罗勇. 丁基苯酞对神经系统疾病的作用及机制 [J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(11): 936-938
- [16] 郑礼胜, 刘向前. 环烯醚萜类研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(4): 702-711
- [17] 陈可冀. 从实验和临床探讨中药作用机理和安全性评价 [J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(2): 5

甘草黄酮对阿霉素细胞毒性的影响及其构效关系研究

何华, 葛志伟, 刘雳, 王书芳

(浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要: 目的 探讨 6 种典型的甘草黄酮化合物(甘草素、异甘草素、甘草苷、异甘草苷、芹糖基甘草苷和芹糖基异甘草苷)的生物活性与化学结构之间的关系, 为寻找新的抗阿霉素心脏毒性药物提供依据。方法 用黄嘌呤-黄嘌呤

①收稿日期: 2009-08-14

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y2080741)

作者简介: 何华(1985-), 女, 浙江省诸暨市人, 硕士, 主要从事中药药理学研究。E-mail: gill_he810@yahoo.com.cn

* 通讯作者 王书芳 E-mail: wangsf@zju.edu.cn

岭氧化酶体系测试化合物清除超氧阴离子自由基(O_2^-)的能力;用 MTT 法测试化合物对心肌细胞 H9c2 和乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 活力的影响,以及对阿霉素细胞毒性的干预作用。结果 6 种甘草黄酮中,只有异甘草素和异甘草苷具有较强的清除 O_2^- 的能力,同时能明显减轻阿霉素心肌细胞毒性;甘草苷几乎没有清除 O_2^- 的能力,但也显示一定的心肌细胞保护活性;芹糖基甘草苷和芹糖基异甘草苷既无清除 O_2^- 的能力,也不能减轻阿霉素心肌细胞毒性,在高浓度时还拮抗阿霉素的抗肿瘤作用。结论 查耳酮类化合物较二氢黄酮类化合物具有更强的心肌细胞保护作用;但如果 A 环的 4'-OH 位被芹糖、葡萄糖取代,不但会失去心肌细胞保护活性,而且可能拮抗阿霉素的抗肿瘤作用。

关键词:甘草;黄酮类化合物;阿霉素;心肌细胞毒性

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)06-0941-05

阿霉素 (Doxorubicin) 属蒽环类抗生素,临床用于治疗多种恶性肿瘤疗效显著。心脏毒性是限制其临床应用的主要不良反应之一^[1]。阿霉素急性心脏毒性反应包括心电图异常、窦性心动过速和心律失常等,而慢性或迟发性心脏毒性有可能导致充血性心力衰竭。目前上市的化学保护剂右丙亚胺 (Dexrazoxane) 虽然能有效预防阿霉素的心脏毒性,但具有一定的骨髓抑制作用和肾毒性^[2]。因此,研究开发新一代心脏保护剂具有重要的临床价值。

甘草为豆科植物乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎,性平味甘,中医上有缓急解毒、调和百药之功效。一般认为,三萜皂苷和黄酮类化合物是甘草中主要的药理活性物质。迄今已在甘草中发现 150 多种黄酮类化合物。文献报道甘草黄酮具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤^[3,4]、保肝、抗心律失常等多方面的药理作用^[5-8]。新近发现甘草乙醇提取物具有体外抑制阿霉素诱导心肌细胞凋亡的作用^[9]。本实验室也通过在体实验证明甘草总苷 (含黄酮量 50%) 能显著降低阿霉素心脏毒性反应^[10]。但是,甘草中具有心脏保护作用的物质具有怎样的结构特征还不清楚。

阿霉素心脏毒性的机制还不清楚,目前提出了自由基损伤、能量代谢障碍、铁代谢失衡、钙超载等多种学说。但大量证据表明,过量氧自由基,特别是超氧阴离子 (O_2^-) 的产生,是此毒性反应的关键环节^[11],已知黄酮是甘草中一类主要活性成分,许多都具有清除氧自由基的能力。甘草黄酮是否因此具有心肌细胞保护作用?对阿霉素的抗肿瘤活性有何影响?理想的心脏保护剂应该具有怎样的结构特征?这些都是令人感兴趣的问题。

本实验以甘草中较为典型、量较高的黄酮化合物甘草素、异甘草素及其糖苷结合物为具体研究对象,试图通过比较它们的抗氧化活性、心肌细胞保护作用及对肿瘤细胞生长的影响,探讨化学结构与生物活性之间的关系,为寻找理想的心脏保护剂提供

指导和依据。

1 材料

1.1 药物和试剂:甘草苷和异甘草苷购自上海融禾医药科技有限公司,甘草素和异甘草素购自天津一方科技有限公司,质量分数均大于 98%。高糖 DMEM 完全培养基、胎牛血清 (FBS) 为 Gibco 公司产品。超级新生牛血清 (CS) 为杭州四季青生物工程材料有限公司产品,MTT 为 Sigma 公司产品。盐酸多柔比星 (阿霉素) 由浙江海正药业股份有限公司生产,二甲基亚砜 (DMSO) 由浙江杭州双林化工试剂厂生产。超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞株:大鼠心肌细胞 H9c2 购自中国科学院上海细胞所细胞库,乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 由浙江大学药理毒理研究所提供。

1.3 主要仪器:制备用高效液相 (美国 Agilent 1100),¹H-NMR 核磁共振仪 (德国 Bruker 500 MHz),¹³C-NMR 核磁共振仪 (德国 Bruker 125 MHz),二氧化碳细胞培养箱 (美国 Thermo Forma),洁净工作台 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂),Elx 800 UV 酶标仪 (美国 BIO-TEK)。

2 方法

2.1 甘草黄酮化合物的制备和鉴定:乌拉尔甘草 4 kg,粉碎,70% 乙醇回流提取 2 次,合并提取液,减压浓缩至无乙醇。浓缩液用醋酸乙酯萃取 4 次,水相经 D-101 大孔树脂分离,收集 50% 和 70% 乙醇流分,浓缩后拌样用硅胶柱分离,用二氯甲烷和甲醇梯度洗脱,收集流份。然后用制备高效液相色谱 (250 mm × 21.2 mm, Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱,乙腈和水梯度洗脱) 纯化制得甘草素 4'-O-芹糖 (1[→]2)-葡萄糖苷 (简称芹糖基甘草苷) 和异甘草素 4'-O-芹糖 (1[→]2)-葡萄糖苷 (简称芹糖基异甘草苷),并经 NMR 分析验证。芹糖基甘草苷:白色粉末,质量分数大于 98%,得率约为 0.1%,¹H-NMR 数据与文献报道^[12,13]的甘草素 4'-O-芹糖 (1[→]2)-葡萄糖苷的数据基本一致。芹糖基异甘草苷:淡黄色粉末,

质量分数大于 98%，得率约为 0.01%，¹H-NMR 数据与文献报道^[12]的异甘草素 4'-O-芹糖 (1[→]2)-葡萄糖苷的数据基本一致。

2.2 清除 O₂⁻ 自由基能力的测定: 按 SOD 试剂盒说明书方法测定化合物清除 O₂⁻ 自由基能力, 测试浓度为 200、100、50、25、10 μmol/L。实验以 20 μmol/L 维生素 C (VC) 为阳性对照。

2.3 抗阿霉素心肌细胞毒性实验: H9c2 细胞用高糖 DMEM 培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 进行培养。初步实验表明, 除异甘草素在 50 μmol/L 浓度时对细胞生长显示一定的抑制作用 (抑制率 17.5%) 外, 其余化合物在此浓度下对 H9c2 细胞均无明显毒性。正式实验中, H9c2 细胞以 1 × 10⁴/孔的数量接种于 96 孔细胞培养板上, 24 h 后更换培养液, 加入不同终浓度 (50、25、10、2 μmol/L) 的供试药物, 12 h 后加入 1 μmol/L 的阿霉素。另设模型组 (含等量 DMSO)、正常对照组 (不加药物, 不加阿霉素, 含等量 DMSO) 和空白对照组 (没有细胞, 仅含等量培养液和溶剂)。继续培养 48 h, MTT 法^[14] 测定细胞活力。细胞的相对活力按下面的公式计算: 细胞相对活力 = (A_{药物处理组} - A_{空白对照组}) / (A_{正常对照组} - A_{空白对照组}) × 100%。

2.4 化合物单独作用及与阿霉素联合干预对 MCF-7/ADR 细胞活力的影响: MCF-7/ADR 细胞用高糖 DMEM 培养基加 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素进行培养。取状态良好的细胞以 5 × 10³/孔的数量接种于 96 孔细胞培养板中, 24 h 后更换培养液, 加入不同浓度 (100、50、25、10、2 μmol/L) 的供试品, 12 h 后加入 (或不加) 4 μmol/L 的阿霉素。另设阿霉素单独处理组 (含等量 DMSO)、正常对照组 (不加药物, 不加阿霉素, 含等量 DMSO) 和空白对照组 (没有细胞, 仅含等量培养液和溶剂)。培养 48 h 后, 用 MTT 法测定细胞活力。细胞的相对活力按下面的公式计算: 细胞相对活力 = (A_{药物处理组} - A_{空白对照组}) / (A_{正常对照组} - A_{空白对照组}) × 100%。

2.5 统计学处理: 实验数据用 SPSS 16.0 进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett-t 检验。

3 结果

3.1 甘草黄酮体外清除 O₂⁻ 的能力: 首先测试了 6 种甘草黄酮化合物清除 O₂⁻ 的能力, 结果见表 1。20 μmol/L 的 VC 对 O₂⁻ 的清除率超过 70%, 甘草黄

酮化合物的活性明显低于 VC, 只有异甘草素和异甘草苷显示相对较强的自由基清除能力, 清除率与浓度呈正相关, 其余化合物活性微弱。

表 1 甘草黄酮清除 O₂⁻ 自由基的能力 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Table 1 O₂⁻ Scavenging activity of *Radix Glycyrrhizae* flavonoids ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	C/ (μmol · L ⁻¹)	A _{550 nm}	清除率/ %
VC	20	0.491 ± 0.003	69.9 ± 2.9
甘草素	100	0.559 ± 0.005	11.9 ± 4.6
	50	0.568 ± 0.002	4.7 ± 1.8
	25	0.572 ± 0.005	0.6 ± 3.9
	10	0.583 ± 0.002	- 8.1 ± 1.5
	5	0.572 ± 0.006	0.6 ± 5.3
甘草苷	100	0.571 ± 0.004	2.1 ± 3.4
	50	0.569 ± 0.003	3.2 ± 2.5
	25	0.577 ± 0.005	- 3.0 ± 4.0
	10	0.575 ± 0.005	- 2.6 ± 3.7
	5	0.576 ± 0.003	- 2.0 ± 1.8
芹糖基甘草苷	25	0.568 ± 0.004	3.7 ± 3.5
	10	0.565 ± 0.005	8.5 ± 3.1
	5	0.500 ± 0.002	61.9 ± 1.5
	25	0.516 ± 0.002	48.3 ± 1.5
	10	0.534 ± 0.003	33.0 ± 2.1
异甘草素	10	0.557 ± 0.003	13.4 ± 2.2
	5	0.520 ± 0.002	45.5 ± 2.0
	25	0.530 ± 0.004	36.6 ± 3.5
	10	0.546 ± 0.004	23.4 ± 3.2
	5	0.560 ± 0.005	11.1 ± 4.3
芹糖基异甘草苷	100	0.574 ± 0.002	- 1.1 ± 1.5
	50	0.578 ± 0.002	- 4.3 ± 1.8
	25	0.568 ± 0.004	4.3 ± 3.3
	10	0.565 ± 0.001	6.6 ± 0.8

3.2 甘草黄酮对阿霉素心肌细胞毒性的影响: 结果见表 2。1 μmol/L 阿霉素处理 48 h 后, H9c2 细胞的存活率只有正常对照组的 40% 左右。细胞用甘草苷、异甘草苷和异甘草素预处理, 细胞存活率显著升高。其保护效应的强弱顺序是: 异甘草苷 > 异甘草素 > 甘草苷。VC 在 20 μmol/L 对心肌细胞也显示一定保护效果。其余几种化合物几乎没有保护作用或者仅有微弱作用。此前的实验发现, 除了异甘草素外, 其余化合物在 50 μmol/L 及以下对 H9c2 细胞没有任何毒性。而异甘草素以 50 μmol/L 单独处理 H9c2 细胞, 48 h 后细胞存活率降低 15% ~ 20%。说明异甘草素虽然对心肌细胞生长和活力有一定抑制作用, 但也能明显降低阿霉素的细胞毒性。

3.3 甘草黄酮对阿霉素抗肿瘤活性的影响: 阿霉素临床上常用于治疗乳腺癌, 故选用乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 考察甘草黄酮对阿霉素抗肿瘤活性的影响, 结果见表 3。异甘草素能增强阿霉素抑制肿瘤细胞增殖的作用, 而芹糖基甘草苷和芹糖基异甘草苷在较高浓度下反而减轻阿霉素的细胞毒性; 其

表 2 甘草黄酮对阿霉素心肌细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of *Radix Glycyrrhizae* flavonoids on Doxorubicin-induced myocardial cytotoxicity ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A _{550 nm}	清除率/ %
正常对照	-	1.985 ± 0.069	100.0 ± 3.6
阿霉素	-	0.839 ± 0.030	40.5 ± 1.5 ^{△△}
VC	20	0.939 ± 0.028	48.2 ± 1.7 ^{**}
甘草素	50	0.929 ± 0.068	45.2 ± 3.5
	25	0.866 ± 0.061	41.9 ± 3.2
	10	0.835 ± 0.049	40.3 ± 2.5
	2	0.776 ± 0.024	37.2 ± 1.2
甘草苷	50	1.031 ± 0.058	50.5 ± 3.0 ^{**}
	25	1.008 ± 0.092	49.3 ± 4.8 [*]
	10	0.915 ± 0.044	44.4 ± 2.3
	2	0.860 ± 0.043	41.6 ± 2.2
蔗糖基甘草苷	50	0.861 ± 0.039	41.6 ± 2.0
	25	0.840 ± 0.034	40.6 ± 1.8
	10	0.848 ± 0.067	40.9 ± 3.5
	2	0.833 ± 0.124	40.2 ± 6.4
异甘草素	50	1.095 ± 0.049	53.8 ± 2.6 ^{**}
	25	1.005 ± 0.034	49.1 ± 1.7 [*]
	10	1.006 ± 0.084	49.2 ± 4.4 [*]
	2	0.766 ± 0.032	36.7 ± 1.7
异甘草苷	50	1.125 ± 0.094	55.3 ± 4.9 ^{**}
	25	1.000 ± 0.047	48.9 ± 2.5 [*]
	10	0.978 ± 0.108	47.7 ± 5.6
	2	0.919 ± 0.192	44.6 ± 10.0
蔗糖基异甘草苷	50	0.797 ± 0.073	38.3 ± 3.8
	25	0.762 ± 0.065	36.5 ± 3.4
	10	0.934 ± 0.140	45.5 ± 7.2
	2	0.926 ± 0.099	45.0 ± 5.1

与正常对照组比较: ^{VV} $P < 0.01$;

与阿霉素组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 表 3 同

^{VV} $P < 0.01$ vs normal control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs Doxorubicin group, Table 3 is same

余 3 种化合物对阿霉素的抗肿瘤活性没有明显影响。进一步考察这 6 种化合物单独对肿瘤细胞的影响,发现只有异甘草素能抑制肿瘤细胞生长,在 50 Lmol/L 浓度下抑制率约 40%,其他化合物在测试浓度范围内对肿瘤细胞的生长没有明显影响。

4 讨论

本实验以 6 种典型的甘草黄酮化合物为研究对象,分别考察了它们对 O₂^{·-} 的清除能力,对阿霉素心肌细胞毒性的保护作用,以及对阿霉素抗肿瘤活性的影响。由于它们化学结构相似,或仅在取代基团上有所差异,故能够提供相当丰富的活性结构信息。

甘草素、甘草苷和蔗糖基甘草苷均属于二氢黄酮类化合物,而异甘草素、异甘草苷和蔗糖基异甘草苷均属于查耳酮类化合物。实验结果表明,异甘草素和异甘草苷具有较强的清除 O₂^{·-} 的能力,相应的二氢黄酮类化合物活性微弱。一般认为,黄酮类化合

表 3 甘草黄酮对阿霉素肿瘤细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of *Radix Glycyrrhizae* flavonoids on Doxorubicin-induced cytotoxicity in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	无阿霉素处理		4 Lmol# L ⁻¹ 阿霉素处理	
		A _{550 nm}	存活率/ %	A _{550 nm}	存活率/ %
正常对照	-	11449 ± 01041	100.0 ± 31.0	11490 ± 01039	100.0 ± 21.7
阿霉素	-	-	-	01951 ± 01043	621.3 ± 31.0 ^V
甘草素	50	11441 ± 01009	991.4 ± 016	01910 ± 01103	591.5 ± 71.2
	25	11383 ± 01048	951.2 ± 31.5	01890 ± 01029	581.1 ± 21.0
	10	11425 ± 01035	981.3 ± 21.5	01861 ± 01074	561.0 ± 51.2
	2	11402 ± 01099	961.6 ± 71.2	01887 ± 01021	571.8 ± 11.4
甘草苷	50	11434 ± 01106	981.9 ± 71.6	01956 ± 01111	621.6 ± 71.8
	25	11467 ± 01020	1011.3 ± 11.5	01996 ± 01164	651.5 ± 111.5
	10	11427 ± 01132	981.4 ± 91.5	11004 ± 01142	661.0 ± 101.0
	2	11442 ± 01052	991.5 ± 31.7	01995 ± 01059	621.6 ± 41.1
蔗糖基甘草苷	50	11511 ± 01059	1041.5 ± 41.3	01953 ± 01013	621.5 ± 01.9
	25	11492 ± 01122	1031.1 ± 81.8	11155 ± 01048	761.6 ± 31.4 [*]
	10	11377 ± 01044	941.8 ± 31.1	01974 ± 01104	631.9 ± 71.3
	2	11452 ± 01077	1001.2 ± 51.6	01972 ± 01070	631.8 ± 41.9
异甘草素	50	01947 ± 01066	631.8 ± 41.8 ^V	01417 ± 01041	251.0 ± 21.9 ^{**}
	25	11163 ± 01042	791.4 ± 31.0 ^V	01660 ± 01044	411.9 ± 31.1 ^{**}
	10	11263 ± 01073	861.6 ± 51.3 ^V	01856 ± 01063	551.7 ± 41.4
	2	11338 ± 01111	921.0 ± 81.0	01965 ± 01156	631.3 ± 101.9
异甘草苷	50	11389 ± 01061	951.1 ± 41.4	01871 ± 01066	561.7 ± 41.6
	25	11391 ± 01077	951.8 ± 51.5	01907 ± 01097	591.3 ± 61.8
	10	11402 ± 01059	961.6 ± 41.2	01887 ± 01066	571.8 ± 41.6
	2	11415 ± 01039	971.6 ± 21.8	01880 ± 01113	571.3 ± 71.9
蔗糖基异甘草苷	50	11465 ± 01072	1011.1 ± 51.2	11121 ± 01071	741.2 ± 51.0
	25	11491 ± 01148	1031.0 ± 10.6	11285 ± 01070	851.7 ± 41.9 [*]
	10	11442 ± 01062	991.5 ± 41.5	01984 ± 01083	641.6 ± 51.8
	2	11411 ± 01089	971.2 ± 61.4	11009 ± 01069	661.4 ± 41.8

物清除氧自由基的活性与酚羟基有关,但不同位置的酚羟基贡献不同。二氢黄酮和查耳酮具有相同的母核 2-苯基色原酮,前者的 C 环上 C₂-C₃ 位双键被饱和,在碱性条件下 C 环开环可转化为查耳酮,后者释放的酚羟基可能更有利于 B 环得/失电子后形成稳定结构^[15]。因此异甘草素和异甘草苷清除 O₂^{·-} 的能力强于甘草素和甘草苷。值得注意的是,蔗糖基异甘草苷也拥有相同的苷元,但几乎完全失去了清除 O₂^{·-} 的能力,说明 A 环上的取代基也会对化合物活性产生重大影响,可能是双糖的空间位阻效应降低了酚羟基与 O₂^{·-} 接触的机率。

实验结果还表明,尽管甘草苷直接清除 O₂^{·-} 的作用非常微弱,但对心肌细胞的保护效果却很明显。VC 虽然清除 O₂^{·-} 的活性明显强于上述化合物,但并未显示相应的心肌细胞保护作用。说明清除 O₂^{·-} 的活性并不是甘草黄酮发挥心肌保护效应的前提。另一方面,与甘草苷相比,异甘草素和异甘草苷显示出更强的心肌细胞保护作用,说明拥有较强的清除 O₂^{·-} 的能力的化合物能更有效地减轻阿霉素心脏毒

性。这也与目前对阿霉素心脏毒性机制的认识相符。

理想的心脏保护剂应该在减轻阿霉素心脏毒性的同时,并不削弱后者的抗肿瘤活性。为此对上述化合物的抗肿瘤活性进行了测试。实验表明,只有异甘草素在测试浓度范围内能抑制肿瘤细胞生长。考虑到此前在心肌细胞 H9c2 上进行测试的结果,推测异甘草素的细胞毒性并无选择性^[16]。有趣的是,芹糖基甘草苷和芹糖基异甘草苷对肿瘤细胞的生长没有任何影响,也不显示心肌细胞的保护效果,却在高浓度时拮抗阿霉素的抗肿瘤作用。从理论上来说,阿霉素是通过抑制 DNA 和 RNA 合成发挥抗肿瘤作用的,因此推测上述化合物的拮抗效应可能与阻碍此过程有关,其确切机制也有待进一步研究。

综上所述,清除 O₂⁻ 的活性并不是甘草黄酮发挥心肌保护效应的前提,但拥有较强自由基清除能力的查耳酮较二氢黄酮显示更强的心肌细胞保护作用。对这两种黄酮来说,如果 A 环被芹糖-葡萄糖取代,不但会失去心肌细胞保护活性,而且有可能拮抗阿霉素的抗肿瘤作用。这说明甘草黄酮化合物在化学结构上的微小差异会对活性造成重大影响,理想的心脏保护剂必须在心肌保护和抗肿瘤两方面都满足要求,因此结构优化问题更具挑战性。研究结果还提示,可通过工艺措施改变黄酮类化合物的类型的比例,从而使甘草提取物发挥最佳的减毒增效作用。

参考文献:

[1] Dorshow J H. Doxorubicin-induced cardiac toxicity [J]. *N*

Eng J Med, 1991, 324(12): 843-845

- [2] Robin L J. Utility of dexrazoxane for the reduction of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6(10): 1311-1317
- [3] 季宇彬,姜薇,尚明,等. 甘草黄酮对 S₁₈₀ 和 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响 [J]. *中草药*, 2005, 36(10): 1518-1520
- [4] 张明发,沈雅琴. 甘草粗提物及其黄酮类成分的抗肿瘤作用 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(2): 124-129
- [5] 管燕,谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(8): 1254-1259
- [6] 梁冰,杨爱馥,黄凤兰,等. 甘草属化学成分及药理作用研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2006, 37(1): 115-119
- [7] 季宇彬,姜薇,范玉玲,等. 甘草黄酮的研究进展 [J]. *中草药*, 2004, 35(9): 附 5-附 6
- [8] 刘巍,邢洁,徐为人,等. 查耳酮类衍生物活性作用的虚拟评价 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(2): 110-116
- [9] Choi H J, Seon M R, Lim S S, *et al.* Hexane/ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* Licorice suppresses Doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 rat cardiac myoblasts [J]. *Exp Biol Med*, 2008, 233(12): 1554-1560
- [10] 刘雳,程翼宇,瞿海斌,等. 一种减轻药物心脏毒性的甘草提取物及应用 [P]. 中国专利, 200810099467.0. 2008-10-15
- [11] Kim S Y, Kim S J, Kim B J, *et al.* Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(5): 535-545
- [12] 孙明谦. 甘草中化学成分研究 [M]. 吉林: 吉林大学, 2006
- [13] 白虹,窦德强,裴玉萍,等. 栽培甘草的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2005, 36(5): 652-654
- [14] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版社, 2004
- [15] 魏朝良,于德红,安利佳. 黄酮类化合物及清除自由基机制的探讨 [J]. *中成药*, 2005, 27(2): 239-241
- [16] Yamamoto S, Aizu E, Jiang H, *et al.* The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin [J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(2): 317-323

茶多酚对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

邓凤君,徐江平,杨迎暴,李茹冰,周丹

(南方医科大学药学院 药理学系,广东广州 510515)

摘要:目的 研究茶多酚 (tea polyphenols, TP) 对 H₂O₂ 所致大鼠嗜铬细胞 PC12 细胞损伤的保护作用。方法 PC12 细胞用 TP 及 H₂O₂ 处理,MTT 法观察细胞活力,乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测细胞膜通透性及完整性,流式细胞术测定细胞周期分布,BrdU 免疫荧光法检测细胞周期相 S 期 DNA 合成。结果 500 Lmo/L H₂O₂ 作用 PC12 细胞 2 h,细胞出现明显损伤,细胞活力下降,培养上清液中 LDH 量增加,DNA 合成减少;5、10、20 Lmo/L TP 预处理可有效提高细胞存活率,减少 LDH 渗漏,提高 S 期 DNA 合成。结论 TP 对 H₂O₂ 所致的 PC12 细胞损伤有保护作用。

关键词: 茶多酚; PC12 细胞; H₂O₂; 乳酸脱氢酶 (LDH)

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0945-05

收稿日期: 2009-11-12

作者简介: 邓凤君(1973),女,湖南益阳市人,博士,讲师,主要从事神经药理学研究工作。

Tel: (020) 61648235 E-mail: hhdsf@tom.com 329746828@qq.com

* 通讯作者 杨迎暴 Tel: (020) 62789417 E-mail: yangyb@fimmu.com