

荜茇酰胺的药理作用研究进展

张 鹏^{1,3}, 黄启来^{1*}, 华子春^{1,2*}

1. 澳门科技大学中医药学院 澳门药物与健康应用研究所和中药质量研究国家重点实验室, 澳门 中国

2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093

3. 徐州师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116

摘 要: 荜茇酰胺是分离自荜茇的生物碱类化合物, 具有多种药理学作用, 包括抗肿瘤、调节血脂代谢、抗血小板凝集、镇痛等, 是一种极具药用价值的化学物质。着重就荜茇酰胺在抗肿瘤、抗血小板凝集、镇痛、抗真菌、抗血吸虫、抗焦虑以及抗抑郁等方面药理作用的研究进展进行综述。

关键词: 荜茇; 荜茇酰胺; 抗肿瘤; 抗血小板凝集; 抗真菌

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0201-04

Advances in studies on pharmacological effects of piperlongumine

ZHANG Peng^{1,3}, HUANG Qi-lai¹, HUA Zi-chun^{1,2}

1. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Faculty of Traditional Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau, China

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

3. School of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China

Key words: *Piper longum* Linn.; piperlongumine; antitumor; antiplatelet aggregation; antifungal

荜茇酰胺 (piperlongumine) 又称荜茇明碱 (piplartine), 属生物碱类化合物。最初分离自胡椒科植物荜茇 *Piper longum* Linn. 的根, 在长柄胡椒 *P. sylvaticum* Roxb. 及瘤突胡椒 *P. tuberculatum* Jacq. 等的根中也有分得。随着对荜茇酰胺研究的深入, 发现荜茇酰胺具有多种药理学作用, 其中对肿瘤细胞具有显著的细胞毒作用, 可调节高脂血症大鼠的血脂代谢^[1], 并表现出抗血小板凝集、镇痛、抗真菌等诸多药理活性。最新研究表明它对多种肿瘤细胞具有特异性的细胞毒作用, 而对正常细胞的毒性非常小, 因此荜茇酰胺是一种极具潜力的能够选择性杀死肿瘤的中药单体^[2]。本文对其理化性质、生物合成, 以及在抗肿瘤、抗血小板凝集、镇痛、抗真菌、抗血吸虫、抗焦虑、抗抑郁等方面的药理作用的研究进展进行综述。

1 理化性质及生物合成

荜茇酰胺的分子式为 $C_{17}H_{19}NO_5$, 相对分子质量 317.34, 通过 X 射线晶体衍射分析其结构为 5, 6-

二氢-1-[1-氧代-3-(3, 4, 5-三甲氧基苯基)-2-丙烯基]-2(1H) 吡啶酮^[3], 具有反式和顺式两种结构, 其结构式见图 1^[4]。白色闪光针状结晶 (乙醇-乙醚), 熔点 124 °C。

通过放射性同位素标记证明, 在荜茇中赖氨酸和苯丙氨酸是合成荜茇酰胺的前体, 其中 C-3 和 C-6 来源于苯丙氨酸, 杂环部分来自于赖氨酸。此外, 酪氨酸和乙酸钠可以作为荜茇酰胺生物合成的次要前体^[5]。

2 抗肿瘤作用

研究表明, 荜茇酰胺能够通过抑制肿瘤细胞的增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 对多种肿瘤产生抑制作

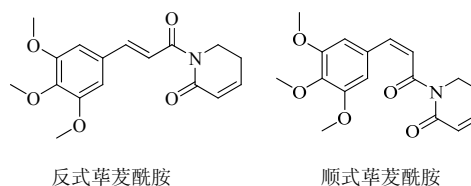


图 1 荜茇酰胺的结构式

Fig. 1 Structures of piperlongumine

收稿日期: 2011-05-23

基金项目: 澳门科技发展基金 (071/2009/A3, 091/2009/A)

作者简介: 张 鹏 (1975—), 男, 山东潍坊人, 博士, 研究方向为抗肿瘤药物研究与开发。E-mail: zhangpengsd2002@yahoo.com.cn

*通讯作者 华子春 Tel: (025)83324605 E-mail: zchua@nju.edu.cn

黄启来 Tel: (0853)88972497 E-mail: qlhuang@must.edu.mo

用。Bezerra 等^[6]通过雌性 Swiss 小鼠移植 S₁₈₀ 模型研究茛菪酰胺的抗肿瘤作用,并对肝、脾、肾等器官进行了组织病理学和形态学分析以评价茛菪酰胺的毒理学性质。结果发现茛菪酰胺可以抑制实体瘤的生长,在 50、100 mg/(kg·d) 时的抑制率分别为 28.7%、32.3%,其抑制率与剂量之间呈正相关;其组织病理学结果表明茛菪酰胺的肾毒性较大,可以导致临近肾小管和肾小球上皮细胞水肿和肾小管出血。用茛菪酰胺处理白血病细胞 HL-60、K562、Jukart、Molt-4,通过台盼蓝染色法研究表明,给药 12 h 以内,各细胞系均未出现生存能力的变化,在处理 24 h 后,生存能力均出现明显下降。茛菪酰胺 10 μg/mL 处理 24 h 后,5-溴尿嘧啶 (5-BrU) 的掺入减少和细胞致死率的增加呈正相关,形态学的变化同样印证了这一发现;而低质量浓度 (2.5 μg/mL) 处理则会引起典型的细胞凋亡,能够检测到 Caspase-3 的活性。因此,低浓度茛菪酰胺可引起白血病细胞的凋亡,而高浓度则可导致细胞坏死^[7]。

Kong 等^[8]研究发现,茛菪酰胺对前列腺癌细胞具有明显的抑制作用,MTT 实验结果表明,3~30 μmol/L 茛菪酰胺可显著抑制雄性激素依赖性的 PC-3 细胞的生长 (IC₅₀ 15 μmol/L),并且在 12~48 h 表现出时间依赖性;24~30 μmol/L 茛菪酰胺处理 24 h,细胞出现空泡化以及染色体浓集现象,而且会出现 DNA 的片段化,凋亡细胞数量增加,导致细胞数量明显减少,可导致细胞阻滞于 G₂/M 期,并在 G₁ 期积累;更高浓度的处理会导致 CDC-2 表达下调,以及聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 表达上调,同时用茛菪酰胺处理的 PC-3 细胞也会检测到升高的 Caspase-3 活性。

茛菪酰胺可以导致中国仓鼠肺成纤维细胞 (V79 细胞株) 中 DNA 链的断裂,细胞周期分析发现,其可以导致细胞停滞于 G₂/M 期,这可能是 DNA 损伤修复的一个结果。同时,茛菪酰胺还可以剂量依赖性地诱导 V79 细胞凋亡,使线粒体膜电位降低,核内 DNA 片段化增加,表明茛菪酰胺产生的 DNA 损伤导致细胞 G₂/M 停滞,进而发生细胞凋亡^[9]。

研究发现,茛菪酰胺与 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 联用后肿瘤治疗效果明显,茛菪酰胺和 5-FU 单独使用对肿瘤的抑制率分别为 28.67% 和 47.7%,而联合应用的抑制率则达到了 68.04%。联用对肾脏仅具有轻微的可恢复的影响,其转氨酶活性和尿素水平均未出现显著变化。血液学分析表明,5-FU 处理会导

致白细胞减少,然而,在与茛菪酰胺联用后白细胞数量的减少得到了缓解。提示与茛菪酰胺联用在增强药效的同时,还可以改善 5-FU 导致的免疫力下降的问题^[10]。

Jyothi 等^[4]研究了顺、反式茛菪酰胺对肿瘤细胞的抑制作用。研究发现,反式茛菪酰胺对大鼠组织细胞瘤细胞 (BC-8)、小鼠胚胎癌细胞 (PCC4)、小鼠巨噬细胞 (P388D1、J774) 和人成神经细胞瘤细胞 (IMR32) 具有细胞毒作用,在 2~24 μmol/L 浓度下这种细胞毒作用表现出明显的剂量依赖性;然而顺式茛菪酰胺即使在 50 μmol/L 的高浓度对这些细胞仍无细胞毒作用。反式茛菪酰胺与姜黄素联合使用可以有效增强茛菪酰胺对肿瘤细胞的细胞毒作用。茛菪酰胺处理的肿瘤细胞停滞在 G₁ 期,姜黄素联用则可以诱导细胞停滞在 G₂/M 期。茛菪酰胺通过诱导 PCC4 细胞中 cdk2 失活和降低 cyclin D1 稳定性使细胞周期阻滞,然而与姜黄素联用后除了抑制细胞周期以外,还抑制了 ERK1/2 和 Raf-1 信号传导通路。研究还发现热休克蛋白 70 (HSP70) 在组织细胞瘤中过量表达可干扰茛菪酰胺的细胞毒性,表明细胞的压力反应可能干扰了抗癌药物的治疗效果。Raj 等利用 6 种人正常细胞和 13 种肿瘤细胞进行了茛菪酰胺的细胞毒性实验,发现茛菪酰胺对肿瘤细胞具有选择性杀伤作用,在浓度为 10 μmol/L 的条件下对肿瘤细胞即可表现出非常强的细胞毒作用,但即使是在 15 μmol/L 的浓度下对正常细胞的生存力影响仍然很小^[2]。

不管是原癌基因突变还是抑癌基因突变造成的细胞恶性转化,通常都会造成细胞应激反应的增强,如氧化、复制、代谢、蛋白毒性应激和 DNA 损伤等。癌细胞要生存下去就必须适应这种应激性的表型,这就导致癌细胞对某些非原癌基因因素的依赖性,而正常细胞则不具有这种依赖性,因此如果靶向特异性破坏这种恶性转化表型中的非原癌基因因素,就可以选择性的杀死癌细胞。研究表明茛菪酰胺通过靶向调节氧化应激的蛋白来调节氧化还原作用和活性氧的动态平衡,造成肿瘤细胞内的 GSH 水平下降,GSSG 水平上升,最终导致肿瘤细胞的 ROS 浓度升高,使其走向凋亡或者坏死。但在正常细胞中无氧化应激出现,所以茛菪酰胺对正常细胞的影响很小。进一步在小鼠移植肿瘤模型上的研究发现,茛菪酰胺不仅能抑制自发形成的恶性乳腺癌肿瘤的生长,还能抑制肿瘤的转移,更重要的是,

药物并没有对正常小鼠表现出明显的毒副作用^[2]。

3 抗血小板凝集作用

苳萆酰胺具有抗血小板凝集的活性,但是其作用机制尚未彻底阐明。Fontenele 等^[11]研究发现,100 $\mu\text{g/mL}$ 苳萆酰胺对胶原引起的血小板凝集的抑制率达到 30%,200 $\mu\text{g/mL}$ 苳萆酰胺对花生四烯酸、胶原、腺苷二磷酸引起的血小板凝集抑制率分别为 100%、59%、52%,但是对凝血酶引起的血小板凝集则无抑制作用。苳萆酰胺对腺苷二磷酸引起的血小板的凝集作用并未因己酮可可碱(磷酸二酯酶抑制剂)、*L*-精氨酸(一氧化氮合成酶的底物)以及噻氯匹啶(嘌呤受体拮抗剂)的预处理而有所改善。然而,环氧化酶抑制剂阿司匹林显著增强了苳萆酰胺对花生四烯酸引起的血小板凝集的抑制作用。说明苳萆酰胺抗血小板凝集的作用机制可能与抑制环氧化酶活性以及减少凝血烷 A 的形成相关,但还需要更加深入的研究。

Park 等^[12]研究发现苳萆酰胺对胶原蛋白、花生四烯酸和血小板凝集因子等引起的血小板凝集显示出剂量依赖性的抑制作用,但对于凝血酶引起的血小板凝集则没有影响,这与 Fontenele 等人的研究结果一致。Park 等^[13]还对合成的苳萆酰胺的 7 种衍生物进行了抗血小板凝集作用研究。结果表明,1-(3,5-二甲基哌啶-1-基)-3-(3,4,5-甲氧苯基)丙-2-烯-1-酮对血小板凝集的抑制效果最佳。

Iwashita 等^[14-15]研究发现,苳萆酰胺能够浓度依赖性地抑制凝血烷 A₂ 拮抗剂 U46619 引起的血小板凝集作用,但是仅能轻微抑制由凝血酶引起的血小板凝集。研究还发现,苳萆酰胺可以抑制 U46619 诱导的磷脂酰肌醇水解以及 [3H] SQ2958 与凝血烷 A₂ 受体之间的结合,并表现出与抑制血小板凝集作用相似的浓度依赖性。因此,苳萆酰胺可能作为凝血烷 A₂ 受体拮抗剂发挥抑制血小板凝集的作用。

4 抗焦虑、抗抑郁及镇痛作用

通过迷宫试验、旷场试验、滚轮测试、戊四唑诱导的痉挛试验以及强迫游泳试验评价苳萆酰胺的抗焦虑、镇定、放松肌肉及抗惊厥、抗抑郁作用。结果显示,苳萆酰胺剂量为 50、100 mg/kg 的作用类似于安定。在迷宫试验中进入开放壁的次数分别增加了 100%和 66%,在开放壁中停留的时间分别增加了 104%和 199%,表明苳萆酰胺具有抗焦虑作用。如果预先服用氟马西尼,两种效应都会完全受到抑制,说明苯二氮草型受体可能参与了苳萆酰胺

的抗焦虑作用。在旷场试验中尽管苳萆酰胺在 50、100 mg/kg 的剂量下没有改变小鼠的水平移动格子数,但是显著增加了其直立次数(60%和 23%)和理毛次数(103%和 119%)。在滚轮试验中苳萆酰胺未表现出效果。在戊四唑诱导的痉挛试验中,与对照相比,苳萆酰胺(50、100 mg/kg)未改变第 1 次痉挛发作的潜伏时间,但却显著降低了小鼠死亡的延迟时间(58%和 60%)。在强迫游泳试验中,苳萆酰胺(50、100 mg/kg)可显著减少小鼠的休息时间(41%和 75%),并表现出剂量依赖性,与典型的抗抑郁药物丙咪嗪的效果相当^[16]。

Rodrigues 等^[17]对来源于瘤突胡椒的粗提物、不同溶剂提取部位以及 3 种纯化的生物碱(包括苳萆酰胺)进行了镇痛作用研究。对乙酸引起的小鼠内脏疼痛模型,口服粗提物 and 不同溶剂提取部位(二氯甲烷、醋酸乙酯、甲醇、己烷)均起到了显著的镇痛作用,其中二氯甲烷和醋酸乙酯提取物比甲醇和己烷提取物更有效;3 种生物碱均可以对乙酸引起的内脏疼痛起到显著的镇痛作用。

5 抗真菌及抗血吸虫作用

研究表明苳萆酰胺可以抑制真菌中毒素的产生。Lee 等^[18]研究了苳萆酰胺和胡椒碱对 4 种赭曲霉素 A (OTA) 产生菌 OTA、OTB 和橘霉素生物合成的影响。苳萆酰胺和胡椒碱在 0.001%时可显著抑制所有 4 种菌株中 OTA 的产生,抑制作用发生在 OTA 合成过程中聚酮合成的步骤,并且还抑制了橘霉素的产生。

血吸虫病是世界上未被重视的最严重的热带病之一,其控制完全依赖于吡喹酮。de Moraes 等^[19]研究发现苳萆酰胺对血吸虫具有杀伤作用。在 RPMI 1640 培养基中,15.8 $\mu\text{mol/L}$ 苳萆酰胺能够降低曼氏裂体吸虫成虫体的活动性,并使其在 24 h 内死亡。6.3 $\mu\text{mol/L}$ 苳萆酰胺会引起曼氏裂体吸虫的卵孵化率下降 75%。此外,苳萆酰胺还可以导致虫体外皮形态的变化。共聚焦显微镜分析显示,在其结节处有外皮破坏和损伤,这种损伤在 15.8~630.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下有剂量依赖性。在高于 157.6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时苳萆酰胺可导致口器以及腹吸盘区形态学的改变。

6 致突变作用

有研究表明,苳萆酰胺对哺乳动物和酵母菌具有致突变作用。用沙门氏菌和中国仓鼠肺成纤维细胞(V79 细胞株)通过微核试验、染色体畸变试验、小鼠骨髓微核试验考察了其致突变的可能性。研究结

果表明, 茛菪酰胺对沙门氏菌并未表现出致突作用, 而在 V97 细胞中则可以导致畸变细胞和形成微核细胞的数量增加, 表现出致突作用。而且, 活体动物实验表明, 在给药浓度达到 50 mg/kg 时会导致微核的形成, 当给药浓度达到 100 mg/kg 时则会导致含微核嗜多染红细胞 (MNPCEs) 的增加。因此, 茛菪酰胺可以对真核生物模型产生致突作用^[20]。此外, 茛菪酰胺还可以导致稳定期和对数生长期酵母菌的细胞毒作用, 并表现出剂量依赖性, 对指数生长期的酵母并无致突变作用, 但在生长过程中加入茛菪酰胺会增加点突变、移码突变以及正向突变的几率^[9]。

7 结语

茛菪酰胺是一种极具药用价值的化学物质。近年来的研究表明, 茛菪酰胺具有抗肿瘤、抗血小板凝集、镇痛、抗真菌、抗血吸虫、抗焦虑以及抗抑郁等作用。虽然其作用机制还未完全得到阐释, 但是, 随着对茛菪酰胺的深入研究, 这些机制将会被逐步阐明, 并且可能会利用茛菪酰胺开发出治疗多种疾病的新药。茛菪酰胺不仅具有抗血小板凝集、镇痛、抗真菌、抗血吸虫、抗焦虑以及抗抑郁等作用, 而且对肿瘤细胞具有选择性的靶向细胞毒作用。在显著抑制肿瘤的生长和转移的同时, 对正常细胞、组织和器官却没有显著的毒副作用, 这使得我们有望看到茛菪酰胺在不久的将来成为抗肿瘤研究的热点, 并以此开发出可以有效治疗肿瘤的药物。

中药在抗肿瘤方面具有良好的效果, 但由于其成分复杂, 作用机制难以明确, 质量难以控制及毒副作用, 限制了其在临床中的广泛应用, 对中药活性单体化合物的深入研究将弥补这些不足, 充分发挥中药的抗肿瘤活性。加强这些活性单体在动物模型上的研究, 进一步明确其药理活性, 作用机制和安全性, 才有可能开发出更多具有自主知识产权的抗肿瘤新药。

参考文献

- [1] 麻春杰, 哈斯阿古拉, 张立全, 等. 茛菪宁对高脂血症大鼠血脂代谢及其相关基因表达的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1039-1043.
- [2] Raj L, Ide T, Gurkar A U, et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS [J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 231-234.
- [3] Bolla P M, Hansen J, Simonsen O, et al. Synthesis and molecular structure of pipartine (piperlongumine) [J]. *Tetrahedron*, 1984, 40(1): 171-175.
- [4] Jyothi D, Vanathi P, Gowri P M, et al. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of pipartine isolated from *Piper chaba* [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23: 1085-1091.
- [5] Chatterjee A, Dutta C P. Alkaloids of *Piper longum* Linn. I. Structure and synthesis of piperlongumine and piperlonguminine [J]. *Tetrahedron*, 1967, 23(4): 1769-1781.
- [6] Bezerra D P, Castro F O, Alves A P, et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper* [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39(6): 801-807.
- [7] Bezerra D P, Militão G C, de Castro F O, et al. Pipartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(1): 1-8.
- [8] Kong E H, Kim Y J, Kim Y J, et al. Pipartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(4): 785-792.
- [9] Bezerra D P, Mour D J, Rosa R M, et al. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkaloid of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells [J]. *Mutat Res*, 2008, 652: 164-174.
- [10] Bezerra D P, de Castro F O, Alves A P, et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with pipartine and piperine [J]. *Appl Toxicol*, 2008, 28(2): 156-163.
- [11] Fontenele J B, Leal L K, Silveira E R, et al. Antiplatelet effects of pipartine, an alkaloid isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity [J]. *Pharm Pharmacol*, 2009, 61(4): 511-515.
- [12] Park B S, Son D J, Park Y H, et al. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(12): 853-855.
- [13] Park B S, Son D J, Choi W S, et al. Antiplatelet activities of newly synthesized derivatives of piperlongumine [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(9): 1195-1199.
- [14] Iwashita M, Oka N, Ohkubo S, et al. Piperlongumine, a constituent of *Piper longum* L., inhibits rabbit platelet aggregation as a thromboxane A₂ receptor antagonist [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 570(1/3): 38-42.
- [15] Iwashita M, Saito M, Yamaguchi Y, et al. Inhibitory effect of ethanol extract of *Piper longum* L. on rabbit platelet aggregation through antagonizing thromboxane A₂ receptor [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(7): 1221-1225.
- [16] Bezerra F C F, Filho J T S, de Oliveira Souza L E. Pipartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14: 605-612.
- [17] Rodrigues R V, Lanznaster D, Longhi Balbinot D T, et al. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(10): 1809-1812.
- [18] Lee S E, Park B S, Bayman P, et al. Suppression of ochratoxin biosynthesis by naturally occurring alkaloids [J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(4): 391-397.
- [19] de Moraes J, Nascimento C, Lopes P O M V, et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine [J]. *Exp Parasitol*, 2011, 127(2): 357-364.
- [20] Bezerra D P, Marne C. Pipartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems [J]. *Mutat Res*, 2009, 677(1/2): 8-13.