

车前子中黄嘌呤氧化酶抑制剂成分的电化学生物传感筛选研究*

王娟¹, 许兵兵¹, 曾金祥^{1**}, 任刚¹, 张丽², 朱继孝¹,
王晓云¹, 梁健¹, 谢雄雄¹, 邹红²

(1. 江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

摘要 目的: 采用电化学生物传感法, 对车前子中分得的 23 个化合物进行黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选, 并对有抑制作用的成分考察其抑制强度及酶动力学特征。方法: 以黄嘌呤氧化酶为生物传感靶标, 采用循环伏安法, 基于不同浓度化合物对黄嘌呤氧化酶电化学催化黄嘌呤的传感电流信号的影响筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂。结果: 共筛选出 7 个黄嘌呤氧化酶抑制剂成分, 分别为木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素、吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3, 4-二羟基苯亚甲基丙酮及二(2-乙基己基)-苯-1, 2-羧酸酯, 且均为竞争性抑制类型。其中木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素 IC_{50} 依次为 4.6、7.7、53.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑制常数 K_i 分别为 4.3、10.1、90.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3, 4-二羟基苯亚甲基丙酮、二(2-乙基己基)-苯-1, 2-羧酸酯最大抑制率分别为 30.2%、22.7%、21.5%、10.3%, 抑制常数 K_i 分别为 68.2、73.0、136.4、141.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。吡啶-3-甲醛、(E)-3, 4-二羟基苯亚甲基丙酮及二(2-乙基己基)-苯-1, 2-羧酸酯为新发现的黄嘌呤氧化酶抑制剂。结论: 车前子中黄嘌呤氧化酶抑制剂有多种化合物类型, 具有很好的开发应用前景。电化学生物传感筛选方法简单快捷, 灵敏度与选择性高, 筛选化合物用量低, 在天然产物黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选中具有很好的应用前景。

关键词: 车前子; 电化学生物传感法; 痛风; 黄嘌呤氧化酶抑制剂; 木犀草素; 毛蕊花糖苷; 金圣草黄素; 吡啶-3-甲醛; 圣草酚; 二羟基苯亚甲基丙酮; 二(乙基己基)-苯-羧酸酯

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)07-1215-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.07.08

Screening of xanthine oxidase inhibitors from Plantaginis Semen using electrochemical biosensor method*

WANG Juan¹, XU Bing-bing¹, ZENG Jin-xiang^{1**}, REN Gang, ZHANG Li²,
ZHU Ji-xiao¹, WANG Xiao-yun¹, LIANG Jian¹, XIE Xiong-xiong¹, ZOU Hong²

(1. The Research Center of Chinese Medicine Resource and National Medicine of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Hanhe Biotechnology Co.Ltd., Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To screen xanthine oxidase inhibitors of Plantaginis Semen using electrochemical biosensor method, and to investigate the enzyme inhibition kinetic characteristics. **Method:** The electrochemical bio-sensing

* 国家自然科学基金(81260630); 江西省卫计委项目(2015B047)

** 通信作者 Tel: 13767164201; E-mail: zjinxiang@163.com

第一作者 Tel: 15083503973; E-mail: 402992107@qq.com.

method was applied to screen xanthine oxidase inhibitors from 23 compounds isolated from Plantaginis Semen. This method is based on the electrocatalytic signals of xanthine oxidase toward oxidation of xanthine using cyclic voltammetry. And the enzyme inhibition kinetic characteristics were also investigated. **Results:** Seven compounds of luteolin, acteoside, chrysoderol, 1H-indolo-3-carbaldehyde, eriodictyol, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one, and bis(2-ethoxyhexyl)-benzene-1,2-dicarboxylate exhibit xanthine oxidase inhibited activities via competitive effects, the IC_{50} of luteolin, acteoside and chrysoderol were $4.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $7.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $53.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the K_i was $4.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $90.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The maximum inhibition rate of 1H-indolo-3-carbaldehyde, eriodictyol, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one, and bis(2-ethoxyhexyl)-benzene-1,2-dicarboxylate was 30.2%, 22.7%, 21.5% and 10.3%, the K_i was $68.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $73.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $136.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $141.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 1H-indolo-3-carbaldehyde, eriodictyol, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one, and bis(2-ethoxyhexyl)-benzene-1,2-dicarboxylate were discovered as xanthine oxidase inhibitors for the first time. **Conclusion:** The inhibitors from Plantaginis Semen obtaining multiple different compounds have good and prospect. The electrochemical biosensing method is selective, sensitive, rapid and convenient, it is hoped to be one of the most promising methods in the field of xanthine oxidase inhibitors research.

Keywords: Plantaginis Semen; electrochemical biosensor method; gout; xanthine develop oxidase inhibitor; luteolin; acteoside; chrysoderol; indolo-carbaldehyde; eriodictyol; dihydroxyphenyl-buten-one; bis(ethoxyhexyl)-benzene-dicarboxylate

黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)是一种含 Mo、[2Fe-2S]和 FAD⁺ 活性中心的黄素酶,可催化嘌呤类物质生成尿酸,是体内尿酸生成的关键酶。长期尿酸浓度过高可诱发高尿酸血症和痛风。XOD 是目前痛风及高尿酸血症防治的重要靶点,抑制其活性可有效减少尿酸的生成^[1],但现有黄嘌呤氧化酶抑制剂(xanthine oxidase inhibitor, XODI)药物别嘌呤醇及非布索坦等虽疗效尚可,然易引发皮疹、肾功能衰退、心血管疾病等毒副作用^[2]。来源于天然产物的 XODI 疗效显著,毒副作用低,安全性高^[3-5],已成为当前研究热点。

目前 XODI 体外筛选方法主要有紫外分光光度法^[6]、HPLC 法^[7]、质谱法^[8],都是通过检测尿酸的生成量间接测定化合物的活性。这些筛选方法往往所需样品用量大且易引起假性结果^[7],存在较大不足。本课题组前期研究表明车前子提取物在体内具有显著降低血清尿酸水平作用,其机理与抑制 XOD 活性密切相关,但其物质基础不明确,有待进一步研究。

电化学生物传感器是以酶、细胞、组织为敏感元件,以电极为转换器、以电势或电流为特征检测信号的传感器,在筛选 XODI 时具有简单、快速灵敏等特

点^[9]。本研究以 XOD 为靶点,运用电化学生物传感法对课题组前期从车前子中分离得到的 23 个化合物进行 XODI 的初步筛选,以期筛选出高效低毒的黄嘌呤氧化酶抑制剂,为车前子抗痛风药物的开发应用提供参考依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Autolab 多通道电化学工作站(瑞士万通有限公司);FEI Nova Nano SEM 450 场发射电镜(美国);红外干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司);实验采用三电极体系:玻碳电极(GCE,直径 3 mm)为工作电极,Ag|AgCl|KCl(AE, 3 mol·L⁻¹)为参比电极,铂丝为对电极。

黄嘌呤(xanthine, XAN)、XOD(EC 1.17.3.2, I 型, 12.1 U·mg⁻¹)均购于南京建成生物有限公司;别嘌呤醇(AP),购于 Sigma 公司;双壁碳纳米管(DWNTs,纯度大于 97%)购于深圳纳米港责任有限公司;磷酸缓冲溶液(PBS, 1/15 mol·L⁻¹, pH=5.3);其他试剂为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

筛选所用化合物为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、去咖啡酰基毛蕊花糖苷、肉豆蔻酸、二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯、胡萝卜苷、亚油酸、油酸、 α -

亚麻酸、 γ -亚麻酸、去氢催吐萝芙木醇、布卢门醇 A、色原酮、羟基酪醇、环(苯丙-缬)二肽、新橄榄树脂素、(+)-古柯愈创木基甘油- β -阿魏酸乙酯、阿魏酸、木犀草素、金圣草黄素、吡啶-3-甲醛、圣草酚及(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮,由本实验室自制,其结构均经 NMR、MS、UV 等波谱技术鉴定,结果将另文发表。

1.2 实验方法

1.2.1 DWNTs 的处理及溶液配制 DWNTs 于浓硫酸和浓硝酸(体积比 3:1)混合液 100 mL 中超声 10 h,过滤并用水洗至 pH 呈中性,过滤干燥即得。称取 10 mg 处理的 DWNTs,加水定容至 10 mL,超声分散得到

$1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DWNTs 溶液。化合物浓度均为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 DWNTs/GCE、XOD/DWNTs/GCE 电极的构建

GCE 电极依次用直径 0.5 和 0.03 μm 的三氧化二铝在麂皮上抛光,分别在双蒸水和无水乙醇中超声清洗 10 min,打磨好的电极在 PBS 中以 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫描于 $-0.6 \sim 0.8 \text{ V}$ 范围内扫描至稳定,电极表面用高纯氮气吹干。GCE 电极表面滴加 DWNTs 水溶液 4 μL 并置于红外灯下干燥,得 DWNTs/GCE 电极;再滴加 2 μL XOD 溶液至电极表面,红外灯下干燥得 XOD/DWNTs/GCE 电极,电极不用时于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。DWNTs/GCE 电极与 XOD/DWNTs/GCE 电极的电镜扫描图如图 1(放大倍数为 40 000)。

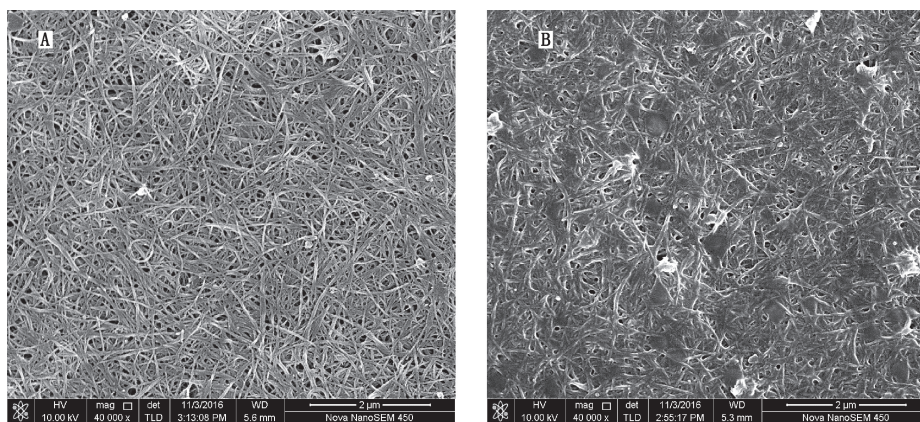


图 1 DWNTs/GCE 电极(A)与 XOD/DWNTs/GCE 电极(B)的电镜扫描图
Fig. 1 SEM images of DWNTs/GCE (A) and XOD/DWNTs/GCE (B)

图 1-A 为 DWNTs/GCE 电极,在电镜下可见电极表面分布均匀的碳纳米管。表明碳纳米管在强酸超声处理后,分散性得到改善,可均匀分散在溶剂中,增强修饰电极的导电性,从而促进电子在电极上的转移。图 1-B 为 XOD/DWNTs/GCE 电极,可见在碳纳米管层上附着的酶分子层。

1.3 电化学生物传感筛选原理

文献[9]的电化学生物传感筛选原理为 XOD 催化 XAN 氧化产生尿酸,利用电极在化合物溶液中产生尿酸的电催化信号响应进行抑制剂筛选。本方法与其有较大不同,即: XOD 在电极上与 XAN 发生作用,黄嘌呤的电子转移到 Mo 活性中心,再经 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 传送至 FAD^+ ,使 FAD^+ 还原成 FADH ,然后 FADH 在电极上失去电子产生灵敏的电化学信号;当有 XOD 抑制剂存在时,此过程中的电子转移将受到阻碍, FADH 在电极上的电化学传感信号将降低,藉此可进行 XOD 抑制剂筛选^[10]。

1.4 抑制剂筛选及抑制率计算方法

实验所用 PBS 溶液均通氮气除氧 15 min,实验在氮气保护中进行。XOD/DWNTs/GCE 电极在空白 PBS 溶液中采用循环伏安法活化至背景电流稳定,然后在含 $28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ XAN 溶液中富集 5 min,用循环伏安法检测响应电流;另取一空白 PBS 溶液,加一定量待测成分,先富集 10 min,加入 XAN 使其质量浓度为 $28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,富集 5 min 后检测。循环伏安法电位设置范围 $-0.6 \sim 0.8 \text{ V}$,扫描速率 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 。所有实验均重复 3 次,根据 610 mV 处的峰电流响应变化观测抑制剂对 XOD 的抑制活性,其抑制率计算公式:
$$\frac{(\Delta I_0 - \Delta I_1)}{\Delta I_0} \times 100\%$$
其中 ΔI_0 是不加样品的峰电流与其背景的电差, ΔI_1 是加样品的峰电流与其背景的电差。

2 结果

2.1 对车前子中 XOD 抑制剂的电化学生物传感法

筛选

以黄嘌呤氧化酶为识别元件,应用电化学生物传感法筛选车前子中分离得到的 23 个化合物。每个样品均取一较高浓度进行初筛,发现其中 7 个对 XOD 具有不同程度抑制活性成分,分别为木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素、吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮、二(2-乙基己基)-苯-1,

2-羧酸酯,其中木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素对黄嘌呤氧化酶的抑制效果较强,抑制率均达 60% 以上,结果见图 2。吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮、二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯的抑制效果较弱,最大抑制率均于 50% 以下,结果见图 3。其余 16 个化合物无抑制作用,见图 4。

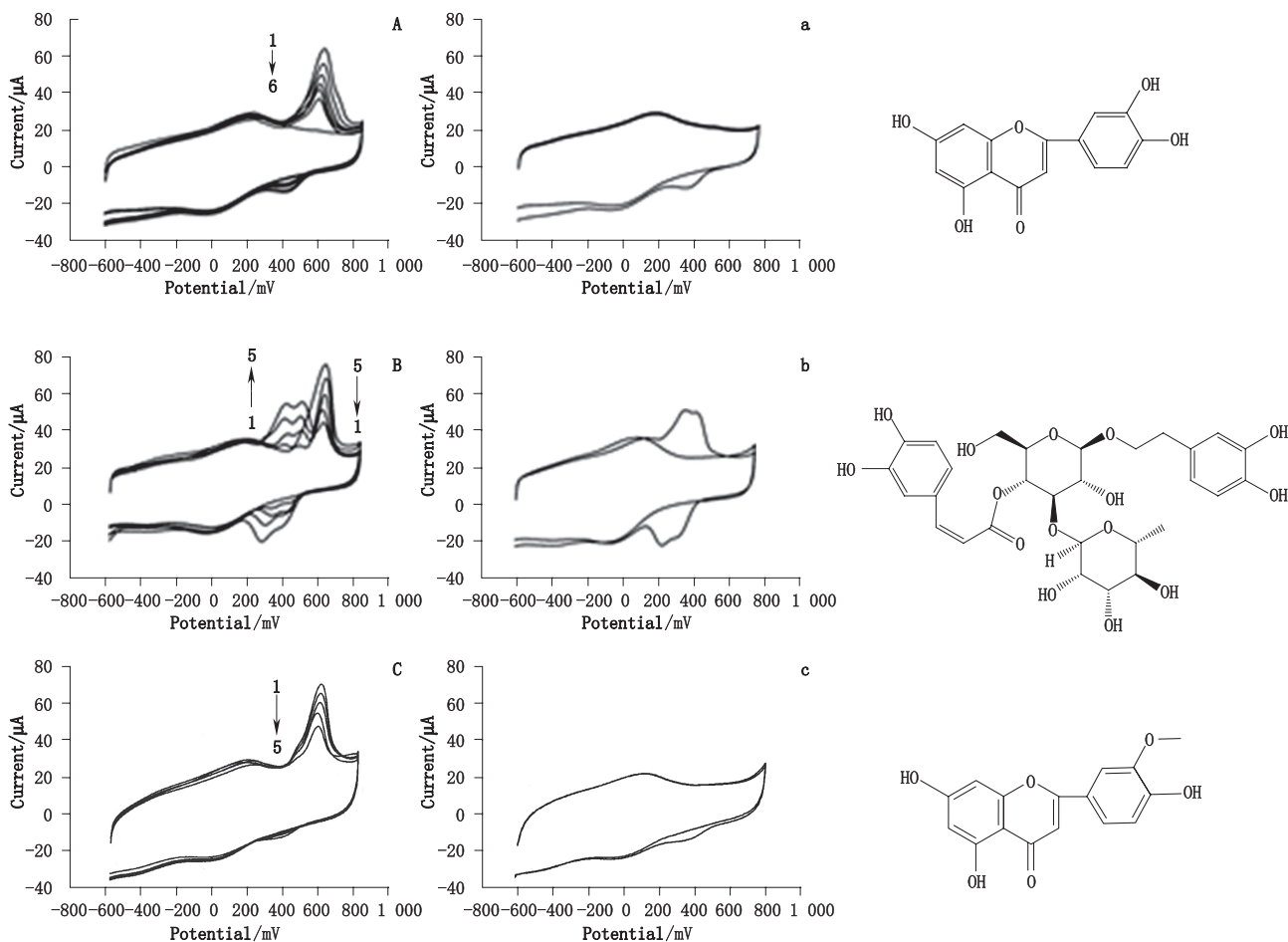


图 2 不同浓度木犀草素 (A)、毛蕊花糖苷 (B)、金圣草黄素 (C) 对相同浓度 XAN 的循环伏安图及其无 XAN 的响应图 (a、b、c)
 Fig. 2 The inhibition effect of different concentrations of luteolin (A), acteoside (B), chrysoderol (C) toward xanthine, and the CV of luteolin (a), acteoside (b), chrysoderol (c) without XAN

图 2-A 为 XOD/DWNTs/GCE 电极在木犀草素 (浓度分别为 0、1.8、3.0、4.2、5.4、7.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 存在时对 XAN ($28.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的响应,可见其在 250~450 mV 电位出现单个还原峰,且该峰随着木犀草素浓度的增加而增加,说明木犀草素是电活性成分。而 610 mV 处的峰电流随着其浓度增加而降低,表现出很好的抑制活性,可得出木犀草素的抑制公式: $Y=30.11 \ln X+4.05$ ($r^2=0.998$),可算得其 IC_{50} 值为 $4.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,与文献 [11] 接近。

图 2-B 为 XOD/DWNTs/GCE 电极在毛蕊花糖苷 (浓度分别为 0、3.6、7.2、10.8、14.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 存在时对 XAN ($28.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的响应,可见毛蕊花糖苷也是电活性成分,但也不干扰阻抑信号。610 mV 处的峰电流随着其浓度增加而降低,说明毛蕊花糖苷可对 XOD 催化反应产生阻抑,其抑制公式: $Y=46.39 \ln X-44.59$ ($r^2=0.987$),其 IC_{50} 计算值为 $7.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,筛选结果与文献 [12] 接近。

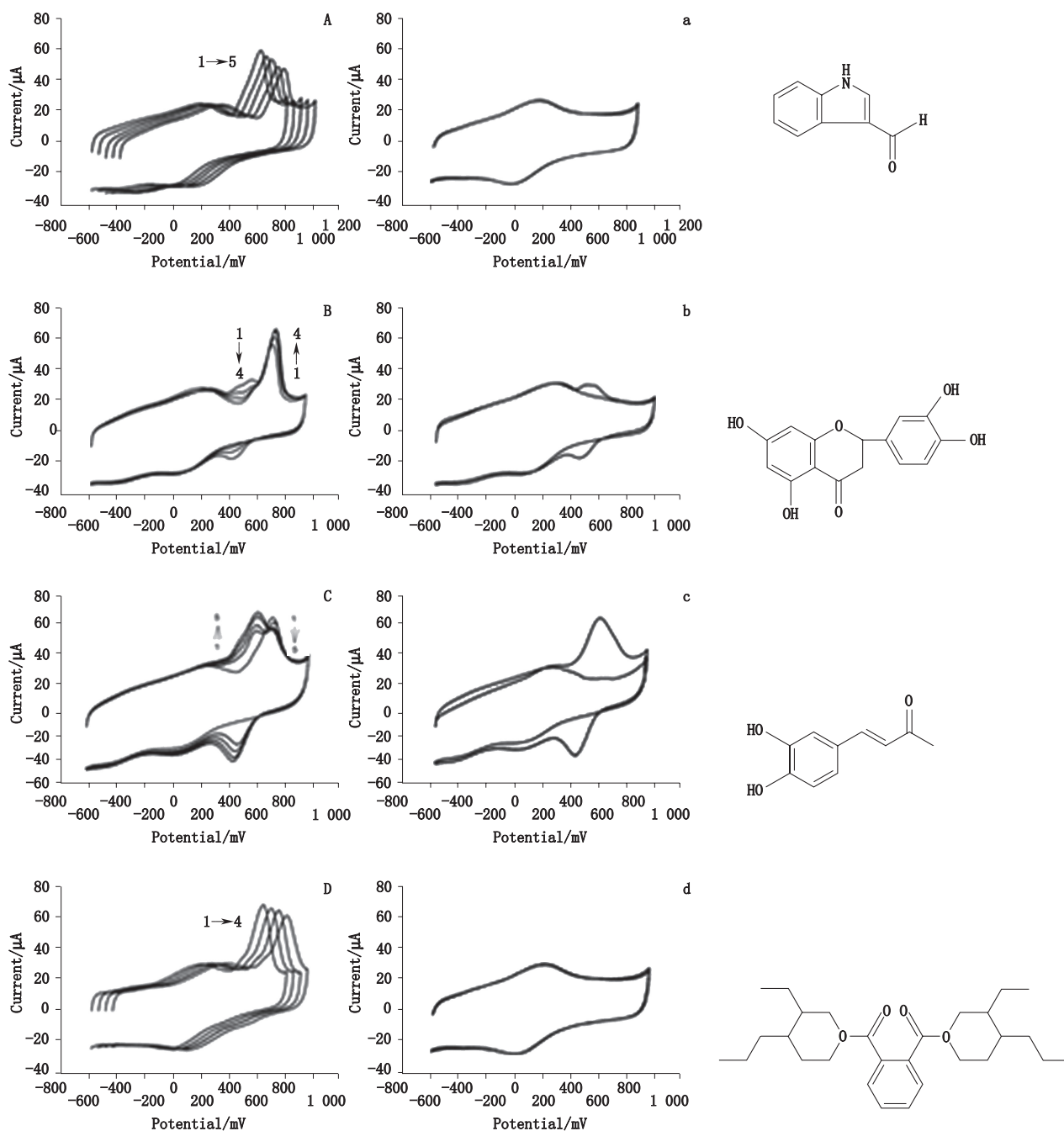


图3 不同浓度吡啶-3-甲醛(A), 圣草酚(B), (E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮(C), 二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯(D)对相同浓度XAN的循环伏安图及其无XAN的响应图(a、b、c、d)

Fig. 3 The inhibition effect of different concentrations of 1H-indolo-3-carbaldehyde (A), eriodictyol (B), 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one (C) and bis(2-ethylhexyl)-benzene-1,2-dicarboxylate (D) toward xanthine, and the CV of 1H-indolo-3-carbaldehyde (a), eriodictyol (b), 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one (c) and bis(2-ethylhexyl)-benzene-1,2-dicarboxylate (d) without XAN

图2-C为XOD/DWNTs/GCE电极在金圣草黄素(浓度分别为0、6、15、36、48、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)存在时对XAN(28.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的响应,可知金圣草黄素的抑制率效果较好,抑制公式: $Y=18.23 \ln X-22.37$

($r^2=0.986$),其 IC_{50} 计算值为53.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,本结果较文献[13]基于尿酸产物法所测的值偏大(1.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),存在一定的误差,这可能是因为紫外筛选方法可能存在较大干扰所致,但具体原因有待进一步研究。

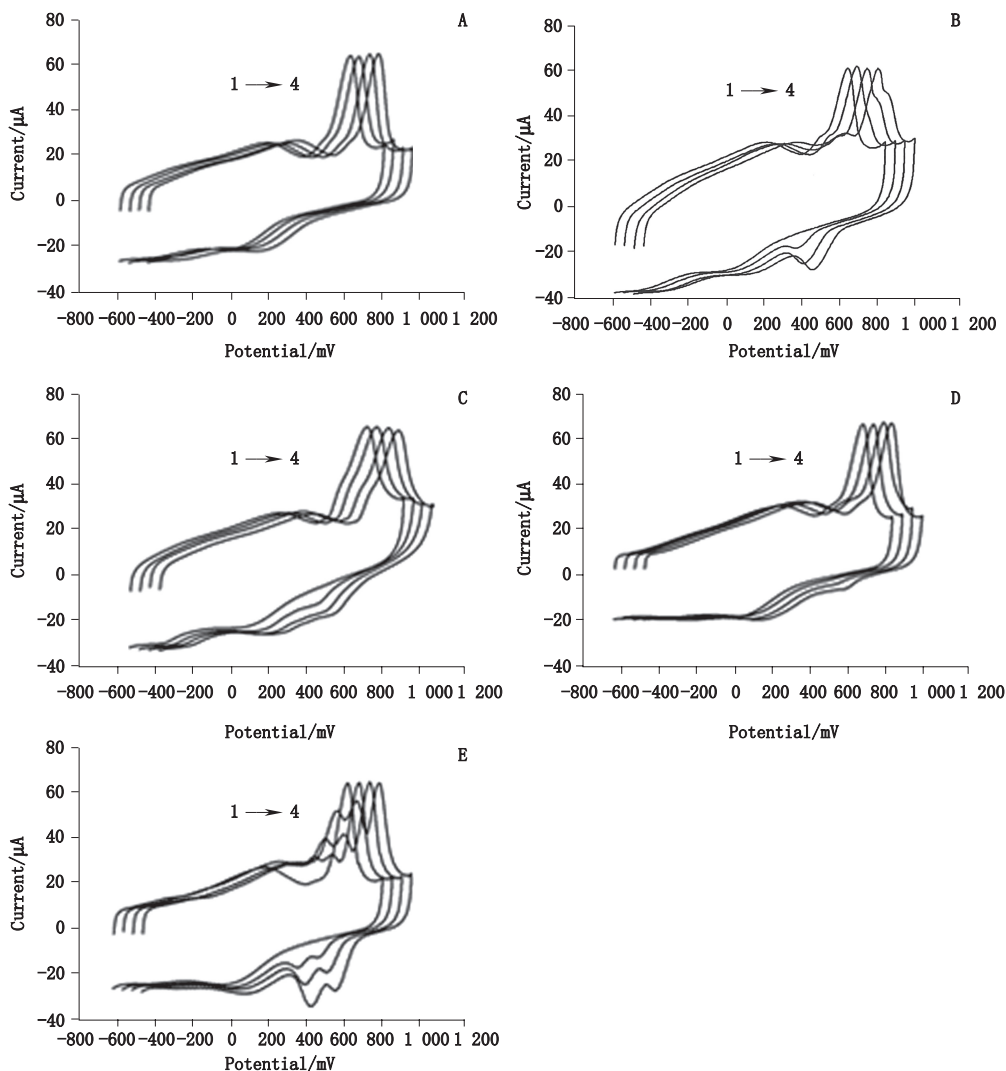


图4 油酸(A)、新橄榄树脂素(B)、(+)-古柯愈创木基甘油-β-阿魏酸乙酯(C)、阿魏酸(D)及异毛蕊花糖苷(E)无XOD抑制活性化合物循环伏安图

Fig. 4 The electrocatalytic behavior of oleic acid (A), (+)-(7R, 7R, 8' S, 8' S)-neo-oolivil (B), (+)-erythro-guaiacylglycerol-β-ferulic acid (C), fercidulic acid (D) and isoacteoside (E) without XOD inhibitory activity

图3-A~D分别为吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮及二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯在不同浓度时对XAN(28.0 μg·mL⁻¹)的响应的循环伏安图及分子结构式,为直观反映催化电流信号变化,将无电活性和无抑制作用的化合物按照浓度的增加依次向右平移。其中吡啶-3-甲醛在浓度为36 μg·mL⁻¹时抑制率达30.2%;圣草酚浓度为30 μg·mL⁻¹时抑制率达22.7%,抑制率与文献较接近^[14];(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮浓度为30 μg·mL⁻¹时抑制率达21.5%;二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯18 μg·mL⁻¹时抑制率达10.3%。吡啶-3-

甲醛、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮及二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯首次发现具有XOD抑制作用。

图4-A为亚油酸在不同浓度(3、12、30 μg·mL⁻¹)时对XAN(28.0 μg·mL⁻¹)的响应图,油酸、α-亚麻酸、γ-亚麻酸、肉豆蔻酸、胡萝卜苷、去氢催吐萝芙木醇、布卢门醇A、色原酮、羟基酪醇、去咖啡酰基毛蕊花糖苷及环(苯丙-缬)二肽图形均与其类似,只在610 mV处存在一尖锐峰,可见这些化合物不是电活性物质,且不抑制电极对XAN的响应。图4-B~E分别为新橄榄树脂素、(+)-古柯愈创木

基甘油-β-阿魏酸乙酯、阿魏酸及异毛蕊花糖苷,可见在不同的电位范围处均存在明显峰电流,且随着成分浓度的增加而增加。而 610 mV 处峰电流并没有下降的趋势,说明这些成分对 XOD 皆无抑制作用。

2.2 车前子中抑制剂成分对 XOD 的抑制动力学特征

木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素三者抑制率均大于 50%,分别取其半数抑制浓度 4.6、7.7、53.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 于 PBS 中,吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮、二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯抑制效果较弱。分别取其最大抑制率浓度,依次向其中加入 XAN(质量浓度分别为:11.2、16.8、21.6、28.0、32.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。用 Lineweaver-Burk 双倒数法,以峰电流值代替反应速率 v (μA),以其倒数 v^{-1} 对 XAN 的质量浓度 C ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的倒数 C^{-1} 作图,如图 5,图中 1~8 分别为无 XODI、木犀草素、毛蕊花糖苷、金圣草黄素、吡啶-3-甲醛、圣草酚、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮及二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯。可知各直线均交于纵轴的一点,即当抑制剂浓度一定时,XAN 浓度增大,反应速率趋于最大值,即 XAN 的增加可解除抑制作用,电极反应符合酶催化反应动力学特点。直线与横坐标的截距为 $-1/K_m'$,从图中可知,方程斜率随着抑制强度的增加而增加, K_m' 也随之增大,符合竞争性抑制类型特点。在抑制剂存在的情况下,表观米氏常数 $K_m' = K_m(1 + [I]/K_i)$,由此可得出抑制剂抑制常数,各化合物对 XOD 的抑制效果见表 1。

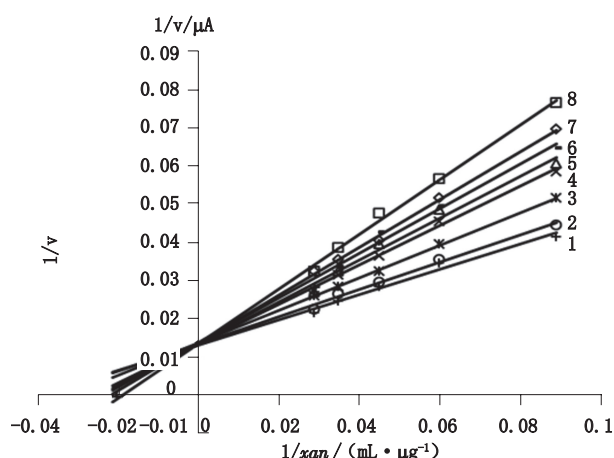


图 5 各化合物对 XOD 抑制动力学 Lineweaver-Burk 双倒数图
Fig. 5 Lineweaver-burk plots of inhibition kinetics of seven compounds on XOD

表 1 化合物对 XOD 的抑制效果

Tab. 1 Inhibitory activity of compounds on XOD

化合物名称 (compound)	抑制率 (inhibitor rate) / %	IC ₅₀ / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	K _i / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
木犀草素 (luteolin)	64.8	4.6	4.3
毛蕊花糖苷 (acteoside)	73.6	7.7	10.1
金圣草黄素 (chrysoderol)	63.9	53.0	90.2
吡啶-3-甲醛 (1H-indolo-3-carbaldehyde)	30.2	—	68.2
圣草酚 (eriodictyol)	22.7	—	73.0
(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮 [4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one]	21.5	—	136.4
二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯 (bis(2-ethylhexyl)-benzene-1,2-dicarboxylate)	10.3	—	141.7

3 讨论

本实验从车前子的 23 个化合物中筛选得到 7 个 XODI 成分,其中 3 个黄酮类,1 个苯丙素类,1 个生物碱类,1 个聚酮类和 1 个苯甲酸类化合物,得到的 3 个黄酮类成分体外均对 XOD 有不同程度的抑制作用,木犀草素的抑制作用最强,金圣草黄素次之,圣草酚抑制作用最弱。有文献^[15]报道,黄酮类化合物 A 环 7 位 -OH 取代, B 环 3', 4' - 邻二羟基及 C 环存在 C2-C3 双键的情况下对 XOD 的抑制效果较强,结果中木犀草素抑制效果大于金圣草黄素及圣草酚,与报道结论一致。金圣草黄素和圣草酚结构与木犀草素相似,但金圣草黄素 B 环 3' 位被 -OCH₃ 取代,圣草酚 C 环无 C2-C3 双键,结果显示金圣草黄素抑制效果强于圣草酚,可推测 C 环 C2-C3 双键的贡献大于 B 环 3', 4' - 邻二羟基。车前子中毛蕊花糖苷对 XOD 具有强烈的抑制活性,且在车前子中的含量高^[16],本课题组前期已证实毛蕊花糖苷可通过抑制肝脏 XOD 活性从而降低尿酸水平,推测毛蕊花糖苷可能为车前子体内降尿酸的主要物质基础。吡啶-3-甲醛(a)、圣草酚(b)、(E)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮(c)、二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧酸酯为新发现的 XODI,虽然抑制强度较弱,但如对其进行结构修饰,可提高其与 XOD 分子结合能力进而提高抑制效果。另外,这些活性成分具有多种化合物结构类型,虽然动力学研究表明这些活性成分都具有竞争性抑制作用特点,但同样提示其与 XOD 可能有不同作用位点或区域。如二(2-乙基己基)-苯-1,2-羧

酸酯有可能主要通过疏水基团与 XOD 疏水区域发生结合,而吡啶-3-甲酰分子中的 N、O 原子有可能与 Mo 活性中心发生作用,但具体抑制机制有待于进一步研究。

此外,从本文的筛选可以看出,电化学生物传感方法不仅可显示有电活性的抑制剂对 XOD 的抑制强度,还可以直观观测抑制率随抑制剂浓度增加而增大的特性,因此可排除假阳性与假阴性结果。

本研究采用电化学生物传感法筛选出 7 种 XODI 成分,为车前子的抗痛风药用开发提供了理论依据与物质基础。电化学生物传感法具有简单、快捷、高选择性、高灵敏度、化合物需求量低等优势,在天然产物中 XOD 抑制剂的筛选中具有广阔应用前景。

参考文献

- [1] 周建国,马敏,胡猛,等. 黄嘌呤氧化酶抑制剂治疗慢性心衰 39 例[J]. 临床军医杂志, 2014, 42(9): 964
ZHOU JG, MA M, HU M, *et al.* 39 cases of chronic heart failure treatment of xanthine oxidase inhibitors[J]. *Clin J Med Off*, 2014, 42(9): 964
- [2] CASTREJON I, TOLEDANO E, ROSARIO MP, *et al.* Safety of allopurinol compared with other urate-lowering drugs in patients with gout: a systematic review and meta-analysis[J]. *Rheumatol Intern*, 2014, 35(7): 1127
- [3] WANG X, ZHAO M, SU G, *et al.* Antihyperuricemic activities of an ethanolic and aqueous extract of Walnut (*Juglans regia* L.), shell and a new aldehyde xanthine oxidase inhibitor[J]. *In J Food Sci Technol*, 2015, 51(2): 453
- [4] CHEN WJ, WU Y, ZHAO X, *et al.* Screening the anti-gout traditional herbs from TCM using an *in vitro* method[J]. *Chinese Chem Lett*, 2016, 27(11): 1701
- [5] 王雪洁,林志健,张冰,等. 菊苣小分子化合物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的分子对接研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3818
WANG XJ, LIN ZJ, ZHANG B, *et al.* Molecular docking analysis of xanthine oxidase inhibition by constituents of chicory[J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(19): 3818
- [6] UMAMAHESWARI M, ASOKKUMAR K, SIVASHANMUGAM AT, *et al.* *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb.[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(3): 646
- [7] LIN CM, CHEN CS, CHEN CT, *et al.* Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(1): 167
- [8] 孙永丽,赵焕新,白虹. HPLC 法体外筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(8): 1391
SUN YL, ZHAO HX, BAI H. *In vitro* screening of potential xanthine oxidase inhibitors by high-performance liquid chromatography[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(8): 1391
- [9] 周娟,刘敏,丁虹. 丝网电极法体外筛选黄嘌呤氧化酶抑制剂方法研究. 化学学报, 2008, 66(8): 995
ZHOU J, LIU M, DING H. Screening method for xanthine oxidase inhibitor screen printed electrode[J]. *Acta Chim Sin*, 2008, 66(8): 995
- [10] 王娟,许兵兵,曾金祥,等. 构建电子转移通道阻抑法筛选车前子中黄嘌呤氧化酶抑制剂成分[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1816
WANG J, XU BB, ZENG JX, *et al.* Development of an electron transfer channel blocking method for screening of xanthine oxidase inhibitors from *Plantago asiatica* L[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(10): 1816
- [11] 闫家凯. 木犀草素对黄嘌呤氧化酶、 α -葡萄糖苷酶抑制机理的探讨[D]. 南昌: 南昌大学, 2014
YIN JK. Study on the Inhibition Mechanism of Luteolin on Xanthine Oxidase and α -Glucosidase[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014
- [12] 高雁君,李医明,蒋山好. 玄参中苯丙素苷 acetoside 对小鼠高尿酸血症的影响[J]. 解放军药理学学报, 2006, 22(1): 30
SHANG YJ, LI YM, JIANG SH, *et al.* The effect of phenylpropanoid glycosides acetoside of *Scrophularia ningpoensis* on mouse hyperuricemia[J]. *Pharm J Chin PLA*, 2006, 22(1): 30
- [13] The anti-hyperuricemia and xanthine oxidase inhibition effects of chrysoeriol, a component from *Apium graveolens* L. seeds [C]// 中国药学会暨中国药师周. 2012
- [14] 黎莉. 七种卷柏属药用植物抑制黄嘌呤氧化酶、脂氧化酶和环氧化酶的活性作用研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008
LI L. The Active Effect of Seven Species of Selaginella Inhibition of Xanthine Oxidase, Lipoxygenase and Cyclooxygenase in Medicinal Plants[D]. Wuhan: Hubei College Of Traditional Chinese Medicine. 2008
- [15] COS P, YING L, CALOMME M, *et al.* Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers[J]. *J Nat Prod* 1998, 61(1): 71
- [16] 王隶书,王友联,李明洋,等. HPLC 测定市售车前子中毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(11): 1581
WANG LS, WANG YL, LI MY, *et al.* Determination of verbascoside in commercial semen plantaginis by HPLC[J]. *China Pharm*, 2011, 14(11): 1581

(本文于 2016 年 7 月 29 日收到)