

新型蛇葡萄素衍生物 γ -聚谷氨酸蛇葡萄素酯的合成、表征及抗肿瘤作用评价[△]

吴晓珊^{1*},倪峰¹,高毓滢²,黄仁杰^{1#}(1.福建卫生职业技术学院药学系,福州 350101;2.嘉南药理大学生物科技系,中国台湾 71710)

中图分类号 R284.3;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)22-2720-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.22.06

摘要 目的:设计合成 γ -聚谷氨酸蛇葡萄素酯(γ -PGA-AMP),并进行表征和体外抗肿瘤活性评价。方法:利用酯化反应将蛇葡萄素接载在 γ -聚谷氨酸上生成合成产物。采用紫外光谱法、傅里叶红外光谱法、氢-1核磁共振法及元素分析等方法对合成产物的结构进行表征;采用紫外吸收光谱法在293 nm波长处测定合成产物中蛇葡萄素的含量。以5-氟尿嘧啶为阳性对照,采用MTT法检测 γ -PGA-AMP、蛇葡萄素对人乳腺癌细胞MCF-7、人肝癌细胞HepG2、人肺癌细胞A549的抑制作用,计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果:表征结果显示,蛇葡萄素的7位游离羟基与 γ -聚谷氨酸 α 位碳上的羧基已发生了酯化反应,合成产物即为 γ -PGA-AMP(产率为55.7%),其中蛇葡萄素含量为32.3%。 γ -PGA-AMP和蛇葡萄素对MCF-7、HepG2和A549细胞均有明显的抑制作用; γ -PGA-AMP对上述3种肿瘤细胞的IC₅₀分别为40.19、28.29、55.23 μ g/mL,蛇葡萄素的IC₅₀分别为105.30、81.23、130.10 μ g/mL,5-FU的IC₅₀分别为24.72、87.98、30.99 μ g/mL。结论:成功合成具有体外抗肿瘤活性的 γ -PGA-AMP,且抗肿瘤活性强于蛇葡萄素。**关键词** 蛇葡萄素; γ -聚谷氨酸;高分子化合物;合成;表征;抗肿瘤作用

Synthesis, Characterization and Anti-tumor Effect Evaluation of Novel Ampelopsin Derivative Poly (γ -glutamic Acid)-ampelopsin Conjugate

WU Xiaoshan¹, NI Feng¹, Gao Yuying², HUANG Renjie¹ (1. Dept. of Pharmacy, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China; 2. Dept. of Biotechnology, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Taiwan 71710, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To design and synthesize poly (γ -glutamic acid)-ampelopsin (γ -PGA-AMP), and to characterize it and evaluate its anti-tumor activity *in vitro*. METHODS: Synthetic product was produced through an esterification reaction between γ -PGA and ampelopsin. The structure of synthetic product was characterized by the UV spectrophotometry, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, ¹H-NMR spectra and the quantitative elemental analysis. The content of ampelopsin in synthetic product was determined by UV absorption spectrometry at 292 nm. Using 5-FU as positive control, MTT assay was used to determine inhibitory effects of γ -PGA-AMP and ampelopsin on human breast cancer cell MCF-7, human liver cancer cell HepG2 and human lung cancer cell A549. The IC₅₀ was calculated. RESULTS: The results showed that the free 7-hydroxyl group of ampelopsin and the α -carboxyl group of γ -polyglutamic acid had been esterified to obtain γ -PGA-AMP; the yield of γ -PGA-AMP was 55.7%, and the content of ampelopsin was 32.3%. The inhibitory effect of γ -PGA-AMP and ampelopsin on MCF-7, HepG2 and A549 cells was obvious. IC₅₀ of γ -PGA-AMP (to 3 above tumor cells) were 40.19, 28.29 and 55.23 μ g/mL, those of ampelopsin were 105.30, 81.23, 130.10 μ g/mL, those of 5-FU were 24.72, 87.98, 30.99 μ g/mL, respectively. CONCLUSIONS: γ -PGA-AMP with anti-tumor effect *in vitro* is synthesized successfully, and its anti-tumor effect is stronger than that of ampelopsin.

KEYWORDS Ampelopsin; Poly (γ -glutamic acid); Polymer compounds; Synthesis; Characterization; Anti-tumor effect

蛇葡萄素的化学名为3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3-二氢黄酮,分子式为C₁₅H₁₂O₈,又名二氢杨梅素、双氢杨梅树皮素、福建茶素等,是一种多酚羟基双氢黄酮醇,属黄酮类化合物^[1-2],主要存在于大叶蛇葡萄^[3]、藤茶^[4]等多

种植物中。蛇葡萄素的毒性低,具有抗氧化、镇痛、止咳、抑菌、保肝护肝、改善肝纤维化、降血糖、降血脂、增强免疫力、抗肿瘤等多种药理活性^[5-7]。目前,蛇葡萄素的研究热点在其抗肿瘤活性上,但是在研究过程中,有学者发现该化合物的体内抗癌效果并不理想,分析原因可能与该化合物溶解性和稳定性较差,同时存在较多的作用靶点,选择性不强、药理效应较弱等不足有关^[8-9]。针对上述不足,本课题组拟选用高分子聚合物 γ -聚谷氨酸对蛇葡萄素进行结构修饰。 γ -聚谷氨酸是一种天然高

[△] 基金项目:福建省自然科学基金资助项目(No.2018J01118);福建省中青年教育科研项目(No.JA15784)

* 讲师,博士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: wuxiaoshan2018@sibs.ac.cn

通信作者:教授。研究方向:药物新剂型与新技术开发。电话:0591-22869830。E-mail:hrj2@163.com

分子聚合物,是由谷氨酸重复单元通过 α -氨基与 γ -羧基之间的酰胺键连接而成,是一种可生物降解、无毒、无免疫源性的药物载体^[10-11]。 γ -聚谷氨酸的分子链上具有活性较高的侧链羧基,易与一些抗癌药物形成高分子药物复合物,具有良好的药动学特性,能通过高渗透长滞留效应(Enhanced permeability and retention effect, EPR)使药物在肿瘤组织中积累^[12]。可见, γ -聚谷氨酸是一类较理想的体内药用高分子材料。基于此,本课题组将蛇葡萄素连接在 γ -聚谷氨酸的羧基端以合成 γ -聚谷氨酸蛇葡萄素酯(γ -PGA-AMP),并对合成产物进行表征和抗肿瘤活性评价,旨在提高蛇葡萄素的抗肿瘤活性,并为符合临床需求抗肿瘤新药的研发提供参考,为肿瘤治疗提供新的选择。蛇葡萄素、 γ -聚谷氨酸和 γ -PGA-AMP的结构式见图1。

(FT-IR)仪(美国 Nicolet 公司);Unity 500MHz 型核磁共振(NMR)仪(美国 Varian 公司);Vario EL III 型元素分析仪(德国 Elementar 公司);HF212UV 型 CO₂ 培养箱(香港力康生物医疗科技控股集团);ELX800 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 药品与试剂

蛇葡萄素原料药(张家界生力生物有限公司,批号:160726,纯度:>98.5%); γ -聚谷氨酸原料药(分子量:约 2×10^6 Da,南京轩凯生物科技有限公司,批号:20181004,纯度:>92%);透析袋(透过分子量:8 000~14 000 Da,美国联合碳化物公司);RPMI-1640 培养基(批号:2016-12)、胎牛血清(批号:2017-09)、青-链霉素双抗(批号:2017-05)均购自美国 Gibco 公司;MTT 试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号:20160922);5-氟尿嘧啶原料药(5-FU,美国 Selleck 公司,批号:s1209,纯度:99.97%);二环己基碳二亚胺(DCC,批号:20170314,化学纯)、4-二甲氨基吡啶(DMAP,批号:20160701,分析纯)、盐酸(批号:20161018,分析纯)、二甲基亚砜(DMSO,批号:20160610,分析纯)、乙醚(批号:20160518,分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;G 25×75 型硅胶 G 薄层层析制备板(粒径:100~200 目,青岛海洋化工有限公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为去离子水。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 HepG2、人肺癌细胞 A549 等细胞株均由福建医科大学药学院实验中心提供,其原代细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 小分子 γ -聚谷氨酸的制备

参考文献方法^[13],首先,纯化大分子 γ -聚谷氨酸原料药:取 γ -聚谷氨酸原料药 100 g,用水 500 mL 溶解,加入无水乙醇 1 500 mL,静置得到 γ -聚谷氨酸沉淀;取沉淀,用去离子水 500 mL 重新溶解、超滤,除去不溶物,再次加入无水乙醇 1 500 mL 沉淀后,对所得沉淀进行冷冻干燥,即得白色块状大分子 γ -聚谷氨酸。其次,采用高温降解法降解大分子 γ -聚谷氨酸:取上述大分子 γ -聚谷氨酸 10 g,用水配制成 2% (下同)的水溶液,用盐酸调 pH 至 2~3,高温高压(121 °C、0.1 MPa)处理 20 min 后,立即冰浴冷却;用 NaOH 调 pH 至 7~8,冷冻干燥,即得白色棉絮状小分子 γ -聚谷氨酸钠盐。最后,制备小分子 γ -聚谷氨酸:用水配制 2% 的小分子 γ -聚谷氨酸钠盐水溶液,用盐酸调 pH 至 2.0 左右,用水透析 48 h,冷冻干燥后,即得白色絮状小分子 γ -聚谷氨酸。

2.2 γ -PGA-AMP 的合成

取蛇葡萄素 0.59 g (约 1.8 mmol)溶于 DMSO 20 mL 中,于室温下搅拌溶解,加入 DCC 0.37 g (约 1.8 mmol)、

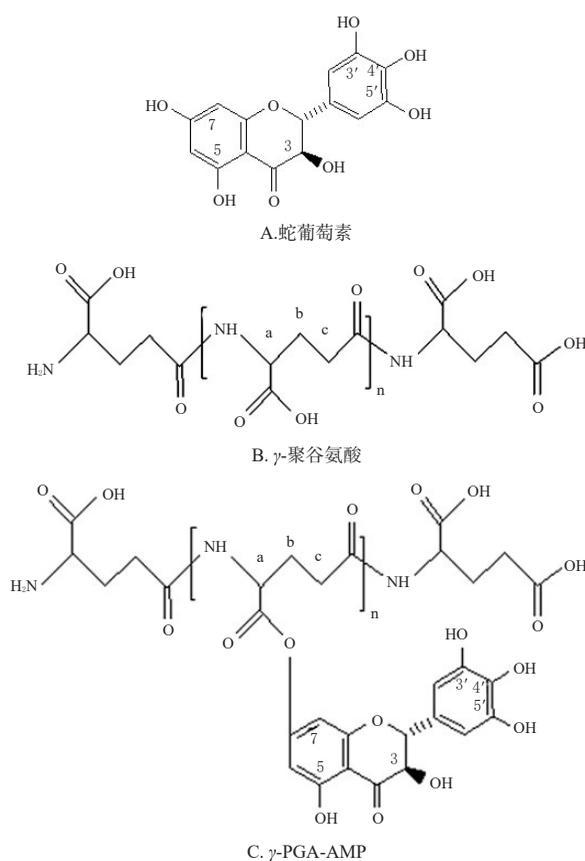


图1 蛇葡萄素、 γ -聚谷氨酸和 γ -PGA-AMP的结构示意图

Fig 1 Structure of ampelopsin, poly (γ -glutamic acid) and γ -PGA-AMP

1 材料

1.1 仪器

FD-1C-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);DF-101S 型集热式磁力搅拌器(常州国华仪器有限公司);1835 型乌氏黏度计(毛细管内径:0.5 mm,上海隆拓仪器设备有限公司);UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);740SX 型傅里叶红外光谱

DMAP 0.1 g(约0.82 mmol),再加入含有小分子 γ -聚谷氨酸 1.24 g(约9.37 mmol)的DMSO 180 mL,置于集热式磁力搅拌器中,于40℃下搅拌反应。利用蛇葡萄素与三氯化铁溶液反应显紫色,采用薄层色谱(TLC)监测酯化反应过程。反应进行24 h时,TLC显示原料蛇葡萄素点消失,停止反应。然后在反应液中加入10倍体积的无水乙醚,洗涤、振荡,4℃下静置过夜待溶液分为两层。收集下层浅黄色溶液,冷冻干燥后,即得黄色粉状合成产物 γ -PGA-AMP 1.02 g,产率为55.7%。

2.3 表征

2.3.1 紫外光谱检测 取合成产物 γ -PGA-AMP、蛇葡萄素原料药各0.005 g,分别用DMSO 1 mL溶解,在200~800 nm波长范围内进行紫外光谱扫描,结果见图2(γ -聚谷氨酸在此范围内无最大吸收,图略)。

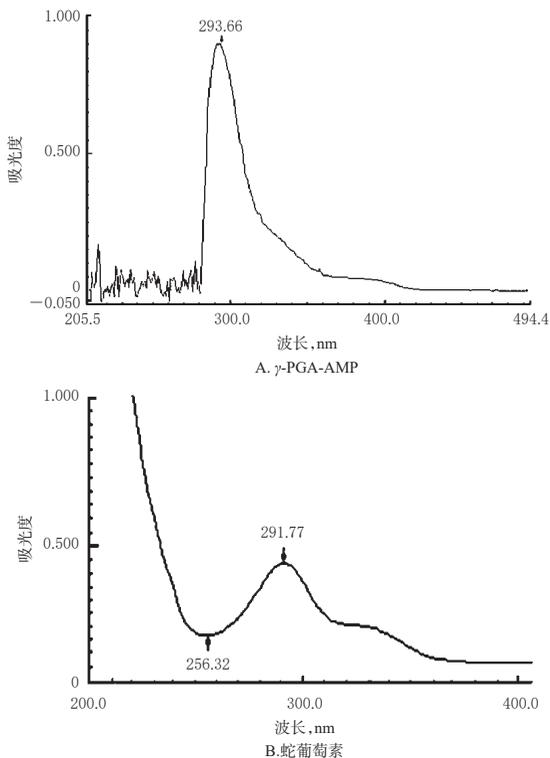


图2 γ -PGA-AMP和蛇葡萄素的紫外光谱图

Fig 2 UV spectra of γ -PGA-AMP and ampelopsin

由图2可见, γ -PGA-AMP苯环上的最大吸收峰位于293.66 nm波长处;与蛇葡萄素相比,苯环上最大吸收峰红移约2 nm。这可能是由于蛇葡萄素的7位羟基与聚谷氨酸 α 位碳上的羧基发生酯化反应,聚谷氨酸酯基团的吸电子能力略强于羟基基团,降低了分子内电子跃迁的能级差,使分子紫外吸收发生了红移^[14-15]。另外, γ -PGA-AMP紫外光谱中200~270 nm波长范围内有多个 γ -聚谷氨酸羧基双键的吸收峰。这可能与 γ -聚谷氨酸结构中处于分子链末端和分子链内部的羧基基团的吸收波长略有差异有关。

2.3.2 FT-IR检测 取合成产物 γ -PGA-AMP、蛇葡萄素原料药各适量,分别与少量KBr混匀后压片,于20~

25℃下,使用FT-IR光谱仪检测400~4 000 cm^{-1} 波数范围内的FT-IR光谱,结果见图3(γ -聚谷氨酸在此范围内无最大吸收,图略)。

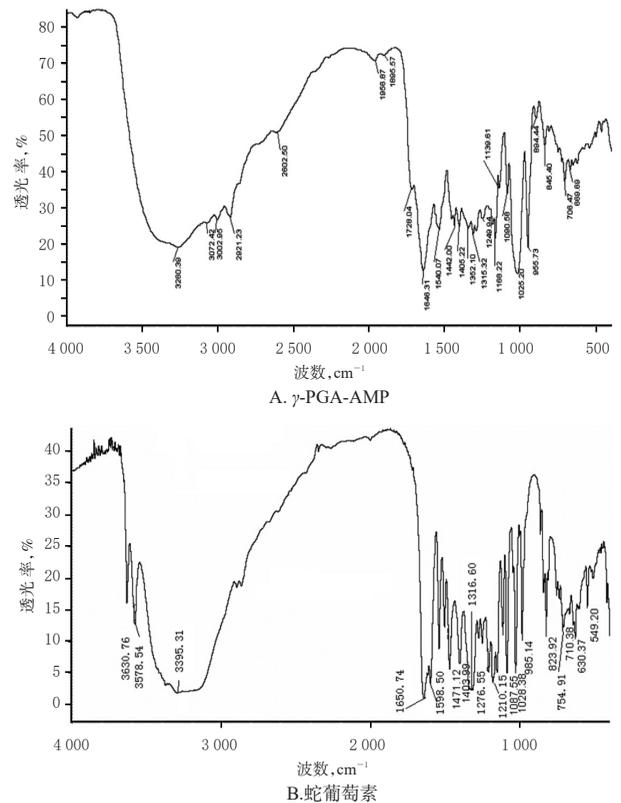


图3 γ -PGA-AMP和蛇葡萄素的FT-IR光谱图(KBr)

Fig 3 FT-IR spectra of γ -PGA-AMP and ampelopsin (KBr)

由合成产物 γ -PGA-AMP的FT-IR光谱图(图3A)可见,酯键上的碳氧单键 $\sigma_{\text{C-O}}$:1 090、1 249 cm^{-1} ;酯键的羰基 $\sigma_{\text{C=O}}$:1 728 cm^{-1} ;羧酸的羰基 $\sigma_{\text{C=O}}$:1 646 cm^{-1} ;亚甲基 $\sigma_{\text{C-H}}$:2 921 cm^{-1} ;芳环 $\sigma_{\text{Ar-H}}$:955 cm^{-1} , $\delta_{\text{Ar-H}}$:1 352、1 315 cm^{-1} (σ :伸缩震动; δ :面内弯曲震动)。对比蛇葡萄素的FT-IR光谱图(图3B),3 630 cm^{-1} 处蛇葡萄素游离羟基的吸收峰已经消失,1 650 cm^{-1} 处的羰基吸收峰由于取代基的改变位移至1 646 cm^{-1} 。这提示蛇葡萄素上的游离羟基与 γ -聚谷氨酸上的羧基可能已发生了酯化反应。

2.3.3 $^1\text{H-NMR}$ 分析 以DMSO为溶剂、四甲基硅烷(TMS)作为内标,使用NMR仪分析合成产物 γ -PGA-AMP和蛇葡萄素原料药的波谱信息,结果见图4。

与蛇葡萄素的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱^[16]比较,合成产物 γ -PGA-AMP的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱(图4A)中,2,3,2',3',4',5',6'位的氢信号峰基本不变,蛇葡萄素7位羟基氢信号峰(10.7 ppm)消失,4.90 ppm处出现了酯键邻位叔碳上的氢信号峰;另外,4.12 ppm,1.97、1.73 ppm,2.18 ppm处的信号峰分别归属于聚谷氨酸部分a、b、c位碳上的氢(详见图1),8.09 ppm处的信号峰归属于仲氨上的氢,

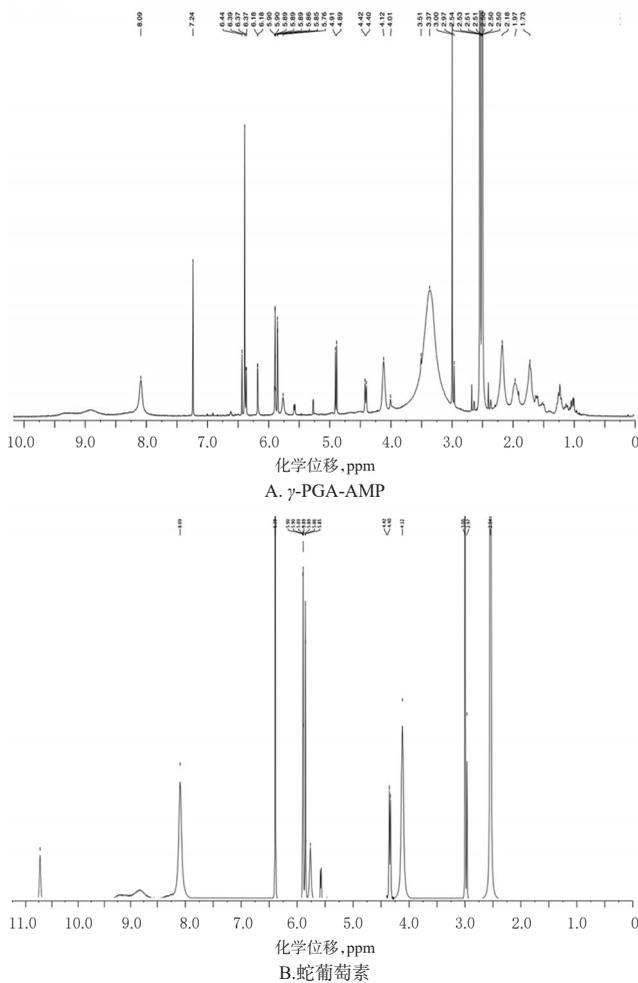


图4 γ -PGA-AMP和蛇葡萄素的 $^1\text{H-NMR}$ 图

Fig 4 $^1\text{H-NMR}$ spectra of γ -PGA-AMP and ampelopsin

2.5 ppm处的信号峰为溶剂DMSO上的氢。合成产物 γ -PGA-AMP的波谱数据—— $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 11.90(1H, s, 5-OH), 8.09(1H, s, NH), 6.39(1H, s, H-2', H-6'), 5.90(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.86(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 5.76(1H, s, 3-OH), 4.90(1H, d, $J=10.9$ Hz, H-a), 4.41(d, $J=11.0$ Hz, H-2), 4.12(1H, s, H-a), 2.18(2H, s, H-c), 1.97(1H, s, H-b), 1.73(1H, s, H-b)。以上数据证实了蛇葡萄素7位羟基与 γ -聚谷氨酸 α 位碳上的羧基发生了酯化反应。

2.3.4 元素分析 使用元素分析仪对合成产物进行C、H、N元素含量分析。结果,理论值:C 50.69%、N 7.39%、H 5.26%,实测值:C 51.49%、N 7.63%、H 5.20%,两者相近。

2.3.5 分子量测定 参考文献方法^[13,17],采用乌氏黏度法分别测定0.1%、0.08%、0.06%、0.04%、0.02% (mg/mL)的合成产物在1.2 mol/L氯化钠水溶液中的比浓黏度,得到拟合线性曲线的截距值,即合成产物的特性黏度($[\eta]$)。测量3次,取平均值。结果,合成产物的平均特性黏度为2.178 970。将其代入Mark-Houwink方程^[17]: $[\eta]=9.824\times 10^{-9}\times Mw^{1.49}$ (其中, Mw 为分子量),求得合成产物

的相对分子质量为399 316,约为399 kDa。

结合“2.3.1”~“2.3.4”及上述结果,确定 γ -PGA-AMP已成功合成。

2.4 蛇葡萄素的含量测定

将合成产物 γ -PGA-AMP溶解在0.5 mol/L碳酸氢钠溶液中得到其钠盐。用透析袋对该钠盐的水溶液进行渗析,以去除分子量小的杂质和剩余的碳酸氢钠,达到初步纯化的目的。将渗析物冷冻干燥,得到白色粉末,采用紫外吸收光谱法检测其中蛇葡萄素的含量。结果,蛇葡萄素的检测波长为293 nm,检测质量浓度的线性范围为2~200 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999 7, n=6$),平均回收率为99.07% ($\text{RSD}=0.78\%, n=6$);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均小于1.0%;合成产物中蛇葡萄素的含量为32.3% (标准曲线法)。

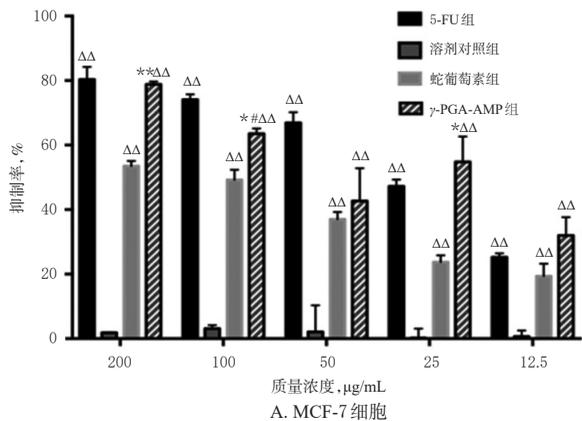
2.5 γ -PGA-AMP的体外抗肿瘤活性评价

采用MTT法检测 γ -PGA-AMP对肿瘤细胞的体外抑制作用。MCF-7、HepG2、A549细胞均采用含10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗的RPMI-1640培养基(以下简称“完全培养基”)复苏培养。细胞传代两次后,取对数生长期的细胞接种于96孔培养板中,每孔细胞密度约为 5×10^3 个,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜培养。3种肿瘤细胞均随机分为溶剂对照组、5-FU组(阳性对照)、蛇葡萄素组和 γ -PGA-AMP组。除溶剂对照组只加入完全培养基外,后3组均加入含相应药物的完全培养基,药物终质量浓度分别均为200、100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$ (给药浓度参照课题组前期预试验结果设置),另外设空白对照组(只加入完全培养基200 μL ,不加细胞),每组设3个复孔。将各组细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后,每孔加入含5 mg/mL MTT的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)溶液20 μL ,继续培养4 h后,每孔加入DMSO 150 μL ,于室温下使用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的吸光度(A)并计算细胞抑制率和半数抑制浓度(IC_{50})。细胞抑制率($\%$)= $(A_{\text{溶剂对照组}} - A_{\text{受试组}})/(A_{\text{溶剂对照组}} - A_{\text{空白对照组}})\times 100\%$ 。试验重复3次,使用Graph Pad Prism 7.0软件对数据进行统计分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用Student's t 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。结果,蛇葡萄素、 γ -PGA-AMP和5-FU对MCF-7、HepG2、A549细胞均有明显的抑制作用,其中 γ -PGA-AMP的抑制作用均强于蛇葡萄素, γ -PGA-AMP的 IC_{50} 均低于蛇葡萄素。各组细胞抑制率比较见图5, IC_{50} 结果见表1。

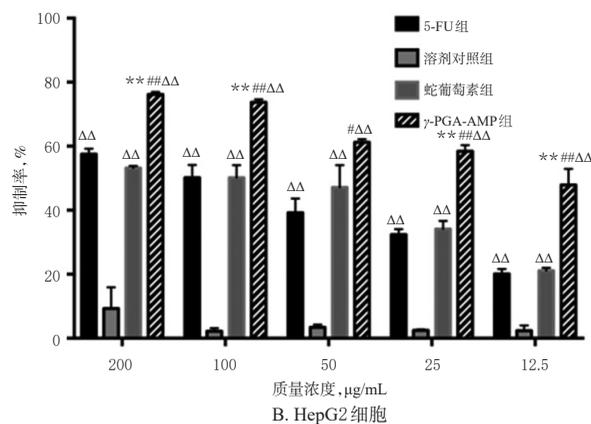
3 讨论

本研究经紫外光谱法、FT-IR法、核磁共振法、元素分析等方法对合成产物进行表征,结果表明合成产物为 γ -PGA-AMP。该制备方法可以在较温和的实验条件下合成 γ -PGA-AMP,合成产物产率达55.7%。该合成反应采用高分子物 γ -聚谷氨酸对蛇葡萄素的羟基进行酯化修

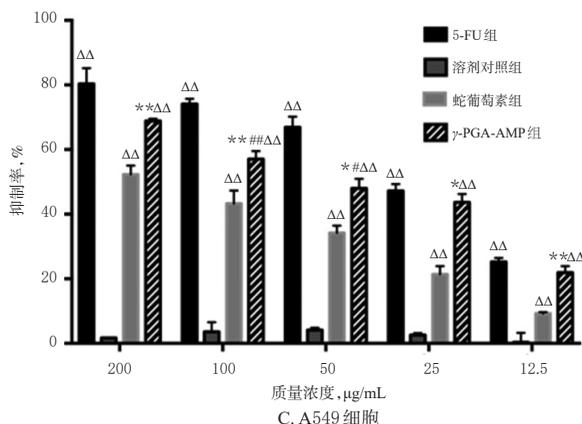
饰,在保留蛇葡萄素活性和黄酮分子特有的结构部分的同时改善了水溶性。



A. MCF-7 细胞



B. HepG2 细胞



C. A549 细胞

注:与蛇葡萄素组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与5-FU组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$;与溶剂对照组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. ampelopsin group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. 5-FU group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, vs. solvent control group, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

图5 各组细胞抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 5 Comparison of inhibitory rate of cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表1 各组细胞的 IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

Tab 1 IC_{50} of cells in each group ($\mu\text{g/mL}$)

组别	IC_{50}		
	MCF-7细胞	HepG2细胞	A549细胞
溶剂对照组	311.45	287.75	310.51
5-FU组	24.72	87.98	30.99
蛇葡萄素组	105.30	81.23	130.10
γ -PGA-AMP组	40.19	28.29	55.23

本研究通过MTT法检测蛇葡萄素、 γ -PGA-AMP和阳性对照药5-FU对3种常见肿瘤细胞的抑制作用。结果,蛇葡萄素和 γ -PGA-AMP对MCF-7、HepG2、A549细胞均有抑制作用,其中 γ -PGA-AMP的抑制作用强于蛇葡萄素(IC_{50} 小于蛇葡萄素)。针对MCF-7、A549细胞, γ -PGA-AMP的 IC_{50} 高于5-FU;针对HepG2细胞, γ -PGA-AMP的 IC_{50} 低于5-FU。此外,与已有文献报道的其他类型的蛇葡萄素衍生物或制剂相比, γ -PGA-AMP对肿瘤细胞的抑制作用更为显著^[7,18-19]。这说明采用高分子物 γ -聚谷氨酸对蛇葡萄素的羟基进行酯化修饰,增强了蛇葡萄素对MCF-7、HepG2、A549这3种肿瘤细胞的体外抑制作用,后期将进一步考察其体内抗肿瘤活性。

综上所述,本研究成功合成了具有体外抗肿瘤活性的 γ -PGA-AMP,且抗肿瘤活性强于蛇葡萄素,为抗肿瘤药物的开发提供了新思路。

参考文献

- [1] MA JQ, SUN YZ, MING QL, et al. Ampelopsin attenuates carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis and hepatic stellate cell activation associated with the SIRT1/TGF- β 1/Smad3 and autophagy pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105984.
- [2] MURAKAMI T, MIYAKOSHI M, ARAHO D, et al. Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of Ampelopsis grossedentata, and ampelopsin[J]. *Biofactors*, 2004, 21(1/4): 175-178.
- [3] CHENG P, GUI C, HUANG J, et al. Molecular mechanisms of ampelopsin from Ampelopsis megalophylla induces apoptosis in HeLa cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 2691-2698.
- [4] KOU X, CHEN N. Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea[J]. *Food Sci Hum Well*, 2012, 1(1): 14-18.
- [5] WU Y, XIAO Y, YUE Y, et al. A deep insight into mechanism for inclusion of 2R, 3R-dihydromyricetin with cyclodextrins and the effect of complexation on antioxidant and lipid-lowering activities[J]. *Food Hydrocoll*, 2020. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105718.
- [6] TONG H, ZHANG X, TAN L, et al. Multitarget and promising role of dihydromyricetin in the treatment of metabolic diseases[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172888.
- [7] QI S, KOU X, LYU J, et al. Ampelopsin induces apoptosis in HepG2 human hepatoma cell line through extrinsic and intrinsic pathways: involvement of p38 and ERK[J]. *Environ Toxicol Phar*, 2015, 40(3): 847-854.
- [8] RUAN LP, YU BY, FU GM, et al. Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(3): 457-464.

五味子甲素对四氯化碳诱导小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究^Δ

王肖辉^{1*}, 周霖^{2,3}, 杜秋争^{2,3}, 师莹莹^{2,3}, 荆自伟^{2,3}, 刘丽伟^{2,3}, 张俊^{2,3}, 李卓伦^{2,3}, 贾雪冬^{2,3}, 楚尧娟^{2,3}, 孙志^{2,3}, 左莉华^{2,3}, 康建^{2,3#a}, 张晓坚^{2,3#b}(1.郑州大学第一附属医院超声科, 郑州 450052; 2.郑州大学第一附属医院药理学部, 郑州 450052; 3.河南省精准医学临床质谱工程研究中心, 郑州 450052)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)22-2725-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.22.07

摘要 目的:研究五味子甲素(SA)对四氯化碳(CCl₄)诱导肝纤维化模型小鼠的保护作用及其机制。方法:将小鼠随机分为空白对照组、模型组、水飞蓟素组(阳性对照,100 mg/kg)和SA低、高剂量组(20、40 mg/kg),每组10只。除空白对照组外,其余组小鼠均采用皮下注射CCl₄法建立肝纤维化模型。建模成功后,各给药组小鼠灌胃相应药物,每天1次,连续给药6周;空白对照组和模型组小鼠同法灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠溶液。采用苏木精-伊红染色法观察小鼠肝组织病理学变化;分别采用紫外分光光度法和酶联免疫吸附法检测小鼠血清肝损伤指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)]水平和炎症因子[肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6]含量;采用Western blotting法检测小鼠肝组织中NOD样受体蛋白3(NLRP3)/核因子κB(NF-κB)和转化生长因子β(TGF-β)/Smad信号通路蛋白的表达水平。结果:与空白对照组比较,模型组小鼠肝组织纤维化病变明显;血清肝损伤指标水平和炎症因子含量均显著升高($P < 0.01$);肝组织中NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白、胱天蛋白酶1、IL-1β、TGF-β₁蛋白表达水平以及磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)/NF-κB p65、磷酸化NF-κB抑制蛋白α(p-IκBα)/IκBα、p-Smad3/Smad3比值均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各药物组小鼠肝组织纤维化病变均明显减轻;小鼠血清肝损伤指标水平和炎症因子含量以及肝组织中NLRP3/NF-κB和TGF-β/Smad信号通路蛋白的表达及磷酸化水平均显著降低($P < 0.01$)。结论:SA可有效减轻CCl₄诱导肝纤维化模型小鼠的肝损伤和炎症程度,其可能是通过调节NLRP3/NF-κB和TGF-β/Smad3信号通路从而发挥抑制肝纤维化的作用。

关键词 肝纤维化;五味子甲素;NOD样受体蛋白3/核因子κB信号通路;转化生长因子β/Smad信号通路;小鼠

- [9] SOLANKI SS, SARKAR B, DHANWANI RK. Micro-emulsion drug delivery system: for bioavailability enhancement of ampelopsin[J]. *ISRN Pharm*, 2012. DOI: 10.5402/2012/108164.
- [10] MOHANRAJ R, GNANAMANGAI BM, RAMESH K, et al. Optimized production of gamma poly glutamic acid (γ-PGA) using sago[J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2019. DOI:10.1016/j.bcab.2019.101413.
- [11] FANG Y, ZHU X, WANG N, et al. Biodegradable core-shell electrospun nanofibers based on PLA and γ-PGA for wound healing[J]. *Eur Polym J*, 2019. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.03.050.
- [12] GREISH K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting[J]. *Meth-ods Mol Biol*, 2010. DOI:10.1016/j.bcab.2019.101413.
- [13] 周杰.马来酰亚胺聚谷氨酸天冬氨酸靶向肽聚合物药物载体系统的建立与应用[D].上海:华东师范大学,2013.
- [14] ZHOU WM, HE RR, YE JT, et al. Synthesis and biological evaluation of new 5-fluorouracil-substituted ampelopsin derivatives[J]. *Molecules*, 2010, 15(4):2114-2123.
- [15] 张娜.(5-氟尿嘧啶-1-乙酸)-7-蛇葡萄素酯的合成以及活性的初步研究[D].广州:中山大学,2007.
- [16] ZHANG Y, QUE S, YANG X, et al. Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin[J]. *Magn Reson Chem*, 2007, 45(11):909-916.
- [17] 王庭慰,何小兵,徐虹.生物合成聚谷氨酸的相对分子质量表征[J].南京工业大学学报,2003,25(6):6-10.
- [18] 周永,郑金英,徐小华,等.抑制PKM2介导的糖酵解在蛇葡萄素抗乳腺癌增殖中的作用[J].肿瘤代谢与营养电子杂志,2019,6(2):236-241.
- [19] 刘金河,葛章文,张望明,等.二氢杨梅素对肺癌A549细胞增殖和凋亡的影响[J].贵州医科大学学报,2019,44(10):1140-1144.

(收稿日期:2020-06-16 修回日期:2020-10-15)

(编辑:邹丽娟)

Δ 基金项目:河南省科技发展计划项目(No.202102310191);河南省高等学校重点科研项目计划(No.19A320070)

* 主治医师,硕士。研究方向:中药药理学。电话:0371-66862570。E-mail: fccwangxh2@zzu.edu.cn

#a 通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0371-66862570。E-mail: 2455232597@qq.com

#b 通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:医院药学。电话:0371-66862570。E-mail: zhangxiaojian_yxb@163.com