

人工种植高山红景天中抑制脯酰氨内酯酶化学成分的抑制率

李俊^{1*}, 李甫¹, 陆园园¹, 范文哲², 门田重利², 温桂清¹, 苏小建¹ (1. 广西师范大学环境与资源系, 广西 桂林 541004; 2. 日本富山医科药科大学和汉药研究所, 日本 富山 2630)

摘要:目的 从人工种植高山红景天中分出具有抑制脯酰氨内酯酶 (Prolyl-endopeptidase, PEP)活性的化合物,测定它们的PEP抑制率。方法 通过柱色谱和薄层色谱等分离手段对具有较高 PEP活性抑制的人工种植高山红景天乙酸乙酯萃取物进行分离,得到八种化合物,通过 Yoshimoto et al建立的方法测定这八种化合物的活性抑制率,计算 IC₅₀。结果 在八种化合物中,有两种化合物显示较好的 PEP活性抑制,它们是表儿茶素没食子酸和表儿茶素。结论 人工种植高山红景天中含有较好的 PEP活性抑制的化合物。

关键词:人工种植高山红景天;脯酰氨内酯酶;抑制剂

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)04-0287-03

Inhibitory activity of the chemical constituents from the underground part of *Rhodiola sachalinensis* (Cultivated)

LI Jun¹, LI Fu¹, LU Yuan-yuan¹, FAN Wen-zhe², Shigetoshi Kadota², WEN Gui-qing¹, SU Xiao-jian¹ (1. Department of Resource & Environmental Science of Gangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Research Institute for Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines), Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani Toyama 930-0194, Japan)

ABSTRACT: OBJECTIVE The inhibitory activity of the compounds that were obtained from cultivated *Rhodiola sachalinensis* were measured. **METHODS** The compounds were isolated by the method of chromatography, and the inhibitory activity against PEP were got by the method of Yoshimoto *et al*. **RESULTS** Two of the eight compounds, including epigallocatechin gallate and epigallocatechin, show strong inhibitory activity against PEP. **CONCLUSION** The underground part of *Rhodiola sachalinensis* (cultivated) contains constituents that exhibit high inhibitory activity against PEP.

KEY WORDS: cultivated *Rhodiola sachalinensis*; prolyl-endopeptidase (PEP); inhibitor

脯酰氨内酯酶 (Prolyl endopeptidase, PEP),是在人的子宫中被发现的,它是一种催产素降解酶,能切断脯酰氨端羧基侧的肽键。脯酰氨内酯酶广泛地分布于各种器官,特别是在人脑中。研究结果显示 PEP水解的酶都参与了学习和记忆过程,当 PEP含量过高时,人体就会产生一些阻碍记忆和学习功能的疾病。同时还发现了一种能切断老年痴呆病人较大前体蛋白质 A_β肽的酶,这种酶被证实是 PEP,因此人们认为人体不正常的 PEP水平与神经病理的紊乱如抑郁、躁狂、精神分裂和老年痴呆等 Alzheimer's 类疾病有关^[1-4]。近年来,人们已经合成了许多供这类神经疾病使用的化学药品^[5-6],为了扩大药源,研究人员也对中草药用于抑制 PEP的活性进行了研究^[7-8]。在利用天然物筛选 PEP抑制剂的过程中,本研究发现人工栽培的高山红景天的甲醇提取物有

很强的 PEP抑制活性。为此,笔者对甲醇提取物用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,对具有较强 PEP活性抑制的乙酸乙酯萃取物进行分离,把所得到的化学成分进行 PEP活性抑制率测定。结果显示,从人工栽培高山红景天分离得到的化合物中表儿茶素没食子酸 (epigallocatechin gallate)和表儿茶素 (epigallocatechin)显示较好的 PEP活性抑制率。

1 仪器与材料

Perkin-Elmer HTS 7000生物分析仪。

人工种植高山红景天为门田重利教授购于河北,经富山医科药科大学生药研究室鉴定。

PEP (Flavobacterium meningosepticum origin),购自日本 Seikagaku 公司, N-Cbz-Gly-L-Pro-P-NITROALANINE (购自 Bachem Fine Chemical Co., Switzerland),两种阳性对照剂 Z-

基金项目:教育部重点基金资助项目 (No. 0194), 广西省自然科学基金资助项目 (桂科基 0144025)。

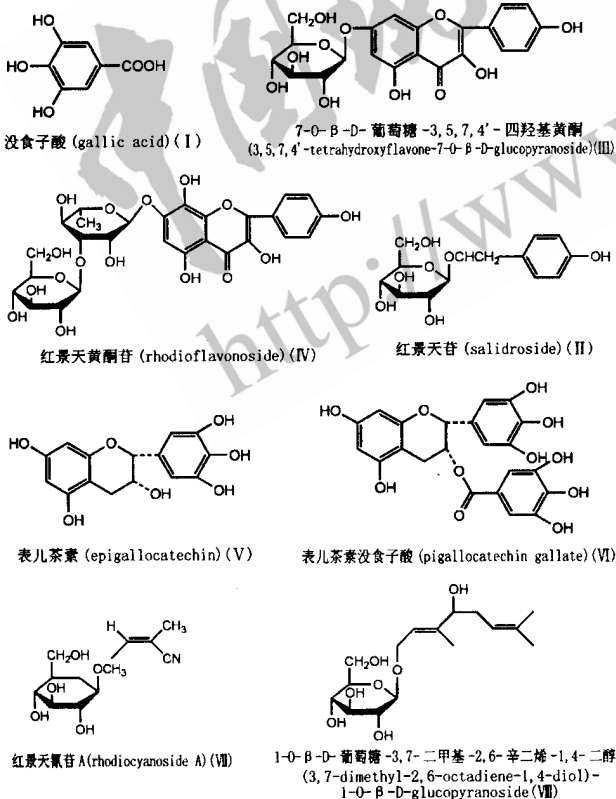
作者简介:李俊,男,1964年生,广西浦北人,硕士生导师,主要从事天然产物的化学成分及其生物活性研究。Tel: 0773 - 5803907; E-mail: lijun9593@163.com

pro-prolinal和 Z-pro-prolinal由范文哲合成。

2 方法与结果

2.1 提取与分离

取人工种植的高山红景天地上部分 3 kg, 切碎, 甲醇回流提取 (6000 mL × 3), 回收甲醇, 得到提取物 210 g。把甲醇提取物悬浮于水, 依次用氯仿 (300 mL × 2)、乙酸乙酯 (300 mL × 2) 和正丁醇 (300 mL × 2) 进行萃取, 各萃取物及水层干燥, 得到氯仿萃取物 53 g, 乙酸乙酯萃取物 13 g, 正丁醇萃取物 75 g, 水溶物 67 g。其中, 乙酸乙酯萃取物显示显著的抑制 PEP 活性, 为此对乙酸乙酯萃取物进行分离。取 12 g 乙酸乙酯萃取物在 600 g 的硅胶柱上进行柱色谱, 用 MeOH-CHCl₃ (5:95 → 30:70) 进行洗脱, 每份 100 mL, 共收集 98 份。经薄层色谱检视合并相同流份, 得到 10 个组份: Fr. 1 (200 mg); Fr. 2 (3.3 g); Fr. 3 (486 mg); Fr. 4 (2.5 g); Fr. 5 (290 mg); Fr. 6 (88 mg); Fr. 7 (167 mg); Fr. 8 (95 mg); Fr. 9 (370 mg); Fr. 10 (100 mg)。其中 Fr. 2 经甲醇反复重结晶得到化合物 I (2.6 g)。取 Fr. 4 组份 2.5 g, 在 Sephadex LH-20 上进行分离, 用 H₂O-MeOH (100:0 → 70:30) 进行洗脱, 得到化合物 III (28.4 mg), 化合物 VI (14.5 mg); 取 Fr. 4 已经过 Sephadex LH-20 分离所得的一组份 1.25 g 过硅胶柱, 用 MeOH-CHCl₃ (5:95 → 25:75) 进行洗脱, 得到化合物 II (53.4 mg), 化合物 VII (78.4 mg), 化合物 VIII (14.5 mg)。组份 Fr. 5 以 CHCl₃-MeOH (2:1) 为展开剂, 经制备硅胶薄层色谱分离, 得到化合物 IV (67.0 mg)。组份 Fr. 6 以 H₂O-MeOH (3:2) 为展开剂, 经制备硅胶反相薄层色谱分离, 得到化合物 V (14.5 mg)。它们的结构如下:



用 Yoshimoto 等^[1]建立的方法对人工种植高山红景天萃取物和由乙酸乙酯萃取物分离得到的 8 种化合物进行 PEP 活性分析。具体操作是: 分别吸取 0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.0) 840 μL, PEP 50 μL (0.1 μg · μL⁻¹) 和试样 10 μL (提取物浓度是 100 μg · mL⁻¹, 化合物浓度见表 2) 在 24 孔的 microplate 上混合, 在 30℃ 下保温 15 min, 加入 100 μL 2 mmol · L⁻¹ Z-pro-prolinal (40% 1,4-dioxane), 使反应开始, 通过 microplate 自动读数仪测定反应所释放出的 p-nitroaniline 在 410 nm 处的吸光度。通过下式计算抑制率:

$$\text{抑制率 \%} = [(A - B) / A] \times 100\%$$

式中 A 表示没有抑制剂时由酶降解所得的 p-nitroaniline; B 表示有抑制剂时由酶降解所得的 p-nitroaniline。

人工种植高山红景天萃取物的 PEP 活性抑制率结果见表 1。

表 1 人工种植的高山红景天萃取物的 PEP 活性抑制率结果

Tab 1 The inhibitory activities against PEP of the extracts of cultivated *Rhodiola sachalinensis*

萃取物	浓度 (μg/mL)	PEP 活性抑制率 (%)	IC ₅₀ (μg/mL)
氯仿萃取物	100	41.1 ± 7.3	
乙酸乙酯萃取物	100	87.6 ± 4.0	10.5
正丁醇萃取物	100	59.5 ± 5.4	70.8
水溶物	100	55.6 ± 4.8	64.3

人工种植高山红景天乙酸乙酯萃取物分离得到的化合物的 PEP 活性抑制率结果见表 2。

表 2 化合物的 PEP 活性抑制率结果

Tab 2 The inhibitory activities against PEP of the compounds

化合物	浓度 (μmol/L)	PEP 活性抑制率 (%)	IC ₅₀ (μmol/L)
没食子酸 (gallic acid)	1000	51.1 ± 4.3	510
	100	27.6 ± 6.0	
	10	9.5 ± 6.4	
红景天苷 (salidroside)	1000	15.6 ± 4.8	
7-O-β-D-葡萄糖-3,5,7,4'-四羟基黄酮 (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside)	100	18.3 ± 3.7	
红景天黄酮苷 (rhodiflavonoid)	1000	16.7 ± 3.3	
表儿茶素 (epigallocatechin)	100	75.5 ± 3.9	28.1
	10	42.7 ± 5.2	
	1	22.0 ± 1.5	
表儿茶素没食子酸 (epigallocatechin gallate)	10	99.1 ± 4.5	1.47
	1	52.6 ± 3.8	
	0.1	30.5 ± 1.6	
红景天氰苷 A (rhodiocyanoside A)	1000	33.5 ± 4.9	
1-O-β-D-葡萄糖-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1,4-二醇 ((3,7-dimethyl-2,6-octadiene-1,4-diol)-1-O-β-D-glucopyranoside)	1000	26.3 ± 5.1	
Z-pro-prolinal (positive control)	100	89.3 ± 3.4	3.6

3 讨论

从表 2 化合物的 PEP 活性抑制率结果来看,从人工种植高山红景天中分得的没食子酸、表儿茶素和表儿茶素没食子酸均具有显著 PEP 抑制活性。根据这三种化合物都含有 1-取代-3,4,5-连苯三酚的化学结构,可推测它们的 PEP 活性抑制部位为 1-取代-3,4,5-连苯三酚结构片断。该结构片断的 1 位取代基团的大小对它们的 PEP 活性抑制有重要影响,1 位取代基团愈大,其 PEP 活性抑制越大;并且,含有 1-取代-3,4,5-连苯三酚结构片断的个数越多,其 PEP 活性抑制越强。这一结论从表 2 没食子酸、表儿茶素和表儿茶素没食子酸的 IC_{50} 可知,由于表儿茶素没食子酸含有两个该结构片断而显示出最强的 PEP 抑制活性,表儿茶素次之,没食子酸则最弱。

参考文献

- [1] Yoshimoto T, Simmons WH, Nishimura T, *et al.* Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain[J]. J Biochem, 1983, 94(10):1179.
- [2] Maes M, Monteleone P, Bencivenga R, *et al.* Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa[J].

Psychoneuroendocrinology, 2001, 26(1):17.

- [3] Fruitier-Audaudin I, Cohen M, Coitioux C, *et al.* In vitro metabolism of LVV-Hemorphin-7 by renal cytosol and purified prolyl endopeptidase[J]. Peptides, 2003, 24(6):1201.
- [4] Mowat AM. Coeliac disease—a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry[J]. Lancet, 2003, 361(4):1290.
- [5] Katsuo T, Masahiko S, Yokko I. A novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, with potential for treating Alzheimer's disease[J]. Behavioural Brain Res, 1997, 83:147.
- [6] Shinoda M, Toide K, Ohsawa I, *et al.* Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid β protein in NG 108-15 cells[J]. Biochemistry and biophysical research communications, 1997, 235(3):641.
- [7] Fan WZ, Tezuka Y, Ni K. Prolyl endopeptidase inhibitors from the underground part of *Rhodiola sachalinensis*[J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(4):396.
- [8] Fan WZ, Tezuka Y, Kadota S. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of fourteen kampo formulas and inhibitory constituents of tokaku-joki-to[J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(7):1055.

收稿日期:2005-04-06