

## 研究论文

## 黄酮类化合物对醛糖还原酶的抑制作用

谢明智 申竹芳

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

**提要** 本文建立了一个微量、简便、快速的醛糖还原酶抑制剂筛选方法, 对 32 个黄酮类化合物进行了筛选。其中黄芩甙元和异金丝桃甙乙酸盐作用较强,  $IC_{50}$  分别为  $3.5 \times 10^{-8} M$  及  $2.2 \times 10^{-8} M$ 。此外, 还对其抑制酶的动力学进行了分析。

**关键词** 醛糖还原酶; 醛糖还原酶抑制剂; 黄酮类化合物

醛糖还原酶 (AR) 是葡萄糖代谢中山梨醇途径的组成酶之一 (图 1), 存在于眼的晶状体、视网膜及外周神经等许多组织<sup>(1)</sup>。此酶活性增高是引起半乳糖白内障和糖尿病性白内障的一个关键因素<sup>(2,3)</sup>, 在还原型辅酶 II (NADPH) 的存在下, 能使醛糖转变成相应的糖醇如葡萄糖变成山梨醇, 后者在晶状体里大量堆积, 使渗透压发生变化, 继而晶状体肿胀, 形成白内障。也有人认为: 醛糖还原酶活性增高与糖尿病的神经病变, 视网膜病变及肾病变等并发症有关<sup>(3,4)</sup>。因此, 醛糖还原酶抑制剂在糖尿病并发症的治疗中有重要意义。

我们建立了一个简便、微量、快速的醛糖还原酶抑制剂筛选方法, 并对 32 个黄酮类化合物进行了筛选, 对抑制酶活性较强的化合物的作用性质进行了初步分析。

## 材 料 和 方 法

## 一. 药品

所有化学试剂均为分析纯, DL-甘油醛为上海九福制药厂生产, NADPH 为 Boehringer mannheim Gm bH 生产, sorbinil 为协和医院眼科胡天圣大夫赠送。黄酮类化合物是我所植物室和植化室提供。由于黄酮类化合物水溶性差, 故用丙二醇或 95% 乙醇溶解成  $10^{-3} M$  溶液, 再根据需要, 稀释成不同浓度的溶液。实验证明微量 95% 乙醇或丙二醇溶液对醛糖还原酶的活性几乎无影响。

二. 大鼠晶状体醛糖还原酶的提取<sup>(5)</sup>

将 150 g 左右的雌或雄性大鼠断头或拉断颈椎处死, 取晶状体, 用冰冷的蒸馏水冲洗后, 加适量冷蒸馏水研成匀浆, 使每只晶状体最终体积为 0.4 ml, 然后以高速冷冻离心机 10,000g 离心 15 min, 上清液供试验用。完整晶状体在  $-70^{\circ}C \sim -80^{\circ}C$  存放, 用时, 室温解冻后按上法制备。

三. 醛糖还原酶活性测定<sup>(6)</sup>

## (一) 溶液配制

1. NADPH 溶液 准确称取一定量 NADPH, 用 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 6.2, 内含 0.4 M 硫酸铵) 配成浓度为 0.08 mM NADPH 溶液。

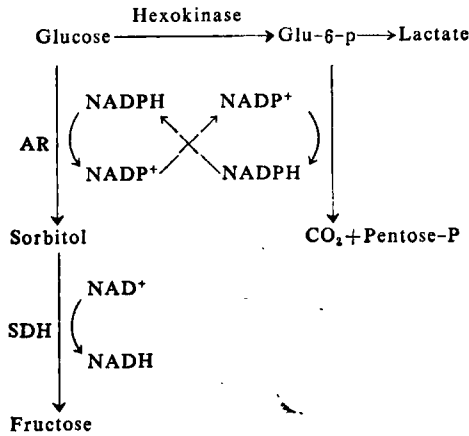


Fig 1. Sorbitol pathway. AR: aldose reductase; SDH: sorbitol dehydrogenase

2. NADPH—甘油醛溶液 称取一定量 DL-甘油醛,用 NADPH 溶液配成 5 mM 甘油醛的 NADPH—甘油醛溶液。

### (二) 实验步骤(表 1)

在冰浴条件下, 加好各成分, 摇匀, 置 30 °C 恒温振荡水浴中温孵 7 min, 放入冰浴中, 同时各管加冷缓冲液 1 ml 终止反应, 用 Cadet(Ames) 血液生化仪在 334  $\mu\text{m}$ (最好 340  $\mu\text{m}$ ) 测定 NADPH 的剩余量, 从而得知酶的活性。

Tab 1. Experimental process for the assay of rat lens aldose reductase activity

	Exptl tube ( $\mu\text{l}$ )	Control tube ( $\mu\text{l}$ )	Standard tubes ( $\mu\text{l}$ )	Blank ( $\mu\text{l}$ )
Enzyme	100	100	100	—
Drug	10	—	—	10
NADPH-glyceraldehyde solution	900	900	—	—
NADPH solution	—	—	900	—
Buffer	—	—	—	1000

## 结果与讨论

近年来, 国外许多实验室在寻找醛糖还原酶抑制剂方面作了大量工作, 发现几种不同结构类型的化合物对醛糖还原酶有较强的抑制作用, 如黄酮类及 sorbinil 等化合物<sup>(4,7)</sup>。本试验所用黄酮类化合物对醛糖还原酶的抑制活性尚未见报道, 表 2 总结了这些化合物对大鼠晶状体醛糖还原酶活性的抑制百分率, 其中黄芩甙元 (No.1) 和异金丝桃甙乙酸盐 (NO.20) 在几个不同数量级浓度时抑制百分率较高, 对醛糖还原酶活性抑制 50% 所需要的浓度 (IC<sub>50</sub>), 分别为  $3.5 \times 10^{-6} \text{ M}$  及  $2.2 \times 10^{-6} \text{ M}$  (表 3)。

为了研究黄芩甙元和异金丝桃甙乙酸盐对醛糖还原酶的抑制动力学, 按计算法, 不加或加一固定浓度的抑制剂, 测定一系列底物浓度 (甘油醛) 时的初速度, 求出其抑制常数  $k_i$  和  $k_i'$ 。并根据  $k_i$  与  $k_i'$  之间的关系判断抑制作用的性质 (表 4)<sup>(8)</sup>。黄芩甙元为非竞争与竞争混合性抑制, 异金丝桃甙乙酸盐为非竞争与反竞争混合性抑制。

离体和整体动物试验及临床研究表明, sorbinil 是一较强的醛糖还原酶抑制剂<sup>(4,9,10)</sup>, 我们选用 sorbinil 作为阳性对照, 实验中 sorbinil 的抑制率、作用性质与文献报道基本一致<sup>(9)</sup>。

Tab 2. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids

No*	Name	Inhibition (%)		
		10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
1	Baicalein	100	56	15
2	Hispidulin	38	—	—
3	Heperoside	93	23	10
4	Jeceosidin	53	—	—
5	Naringin	55	—	—
6	Eupatilin	36	—	—
7	7-O-Glucoluteolin	73	10	11
8	Farrerol	57	—	—
9	Luteolin	49	—	—
10	Oroxylin-A	0	—	—
11	Triacetate baicalein	50	—	—
12	Tetraacetate baicalein	30	—	—
13	Baicalin	38	18	—
14	Heperoside octaacetate	0	—	—
15	peracetylated rutin	0	—	—
16	Matteucinol	12	—	—
17	Matteucinol diglycoside	8	—	—
18	Acacetin	45	—	—
19	Isohyperoside	64	13	—
20	Isohyperoside acetate	94	65	21
21	Eisetin	48	—	—
22	Naringenin	40	—	—
23	Gahuangenin	21	—	—
24	Octamethyl proanthocyanidin diacetate	22	—	—
25	Octamethyl proanthocyanidin	1	—	—
26	Proanthocyanidin B	26	—	—
27	Epimedeside	0	—	—
28	Licorchalcone A	26	—	—
29	Isorhamnetin-3-o-rutinosyl(1-2) rhamnoside	14	—	—
30	Wogonoside	6	—	—
31	Scullcapflavone	12	—	—
32	Tricin	11	—	—
	Sorbinil	99	65	18

\* No. 1~32: 2~5 × 10<sup>-5</sup>M, × 10<sup>-6</sup>M, × 10<sup>-7</sup>M; Sorbinil: 1 × 10<sup>-6</sup>M, × 10<sup>-8</sup>M, × 10<sup>-7</sup>M

Tab 3. LC<sub>50</sub> values of baicalein and isohyperoside acetate for lens aldose reductase

Compd No.	Name	LC <sub>50</sub> (× 10 <sup>-6</sup> M)
1	Baicalein	3.5
20	Isohyperoside acetate	2.2
	Sorbinil	0.19

Tab 4. Inhibition constants and categorization of inhibition of baicalein and isohyperoside acetate for lens aldose reductase

Compd No.	Name	Ki ( $\times 10^{-6}$ M)	Ki' ( $\times 10^{-6}$ M)	Type
1	Baicalein	1.881	2.269	MNCI
20	Isohyperoside acetate	3.78	1.386	MNUI
	Sorbinil	1.117	0.454	MNUI

MNCI: mixed noncompetitive and competitive inhibition; MNUI: mixed noncompetitive and uncompetitive inhibition

体外实验证明, 黄芩甙元与异金丝桃甙乙酸盐对醛糖还原酶的抑制作用较 sorbinil 弱, 尚须进行整体动物实验进行比较。此外, 大量筛选仍在进行中, 以寻找作用更强的抑制剂。

我们认为上述醛糖还原酶抑制剂试验法作为药物的初筛方法是比较理想的, 由于方法简单快速, 用药量很少 (1 mg 以下), 对初筛和寻找醛糖还原酶抑制剂的新药有一定价值。

致谢 协和医院胡天圣大夫及本所植化室刘永隆等同志提供样品

### 参 考 文 献

1. Poulson R and Heath H. Inhibition of aldose reductase in five tissues on the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem Pharmacol* 1983, 32:1495.
2. Kinoshita JH. Mechanism of initiating cataract formation. *Invest Ophthalmol* 1974, 13:713.
3. Kinoshita JH, et al. Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism* 1979, 28:462.
4. Peterson MJ, et al. CP-45, 634: A novel aldose reductase inhibitor. *Ibid* 1979, 28:456.
5. Kador PF and Sharpless NE. Structure-activity studies of aldose reductase inhibitor containing the 4-oxo-4 H-chromen ring system. *Biophys Chem* 1978, 8:81.
6. Hayman S and Kinoshita JH. Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem* 1965, 240: 877.
7. Jun Okuda, et al. Inhibition of aldose reductases from rat and bovine lenses by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1982, 31:3807.
8. 陈惠黎、李文杰. 分子酶学. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1983:260~270.
9. Kador PF, et al. Stereospecific inhibition of aldose reductase. *Eur J Med Chem* 1981, 16:293.
10. Kinoshita JH, et al. Aldose reductase in diabetic cataract. *J Am Med Assoc* 1981, 246:257.

## INHIBITION OF ALDOSE REDUCTASE FROM RAT LENS BY FLAVONOIDS

XIE Ming-Zhi and SHEN Zhu-Fang

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

**ABSTRACT** Thirty two flavonoid compounds were screened for inhibition of rat lens aldose reductase activity, among which baicalein and isohyperoside acetate were found to exhibit markedly enzyme-inhibitory activities with  $IC_{50}$  values of  $3.5 \times 10^{-6}$  M and  $2.2 \times 10^{-6}$  M, respectively. Baicalein displayed a mixed noncompetitive and competitive inhibition, while isohyperoside acetate a mixed noncompetitive and uncompetitive type of inhibition.

Increased aldose reductase activity has been implicated in pathogenesis of diabetic complications so that treatment of these diabetic complications with aldose reductase inhibitors may be a valid approach.

**Key words** Aldose reductase; Aldose reductase inhibitor; Flavonoid