

钩吻素子的药理作用及其分子机制的研究进展

蔡昌涛, 侯文爽, 权泉, 王镜超, 王明鑫智, 金成浩*

黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江大庆

【摘要】钩吻素子是从中草药钩吻中提取的一种吲哚类生物碱单体。近年来大量文献报道, 钩吻素子具有抗癌、抗炎、镇痛及抗焦虑等多种药理作用。本文对钩吻素子的药理作用及其分子机制的相关研究进行综述, 为后续钩吻素子的深入研究与应提供理论参考。

【关键词】钩吻素子; 抗肿瘤; 抗炎; 镇痛; 抗焦虑

【基金项目】黑龙江省重点研发计划指导类项目(GZ20220039), 中央支持地方高校改革发展基金人才培养项目(2020GSP16)

【收稿日期】2024年9月22日

【出刊日期】2024年10月28日

【DOI】10.12208/j.ijcr.20240395

Advances in the study of pharmacological action and molecular mechanism of leptospermatin

Changtao Cai, Wenshuang Hou, Quan Quan, Jingchao Wang, Mingxinzi Wang, Chenghao Jin*

College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang

【Abstract】 Amphorine is an indole alkaloid monomer extracted from Chinese herbal medicine amphorine. In recent years, a large number of literatures have reported that amphorin has many pharmacological effects such as anticancer, anti-inflammatory, analgesic and anti-anxiety. In this paper, the pharmacological action and molecular mechanism of leucochromatin were reviewed, which provided theoretical reference for further research and application of leucochromatin.

【Keywords】 Amphicorhynchus; Anti-tumor; Anti-inflammatory; Analgesia; Antianxiety

前言

钩吻(*Gelsemium elegans* (Gardn. & Champ.) Benth.) 是马钱科蒴藋藤属植物, 又称烂肠草、野葛及朝阳草等, 主要生长在云南、贵州与湖南等地, 具有祛风、攻毒、消肿及止痛等功效, 常用于治疗类风湿关节炎、焦虑以及恶性肿瘤等疾病。钩吻素子(Koumine, KM)是从钩吻(*Gelsemium elegans* (Gardn. & Champ.) Benth.) 中提取的重要活性物质之一, KM呈白色结晶粉末状, 分子式为 $C_{20}H_{22}N_2O$, 相对分子质量为306.407, 易溶于丙酮、乙醚及二甲基亚砜等有机溶剂。近年来研究表明, KM具有抗肿瘤、抗炎、镇痛及抗焦虑等多种药理作用。本文将对KM的药理作用及其分子机制进行综述, 为其深入研究与开发利用提供理论依据。

1 钩吻素子的抗癌作用及其分子机制

癌症(cancer)是机体在各种内部与外部因素的长期共同作用下, 局部组织细胞异常增生, 进而破坏组织、

器官的结构与功能, 最终导致患者因器官功能衰竭而死亡的一种疾病。随着医学技术的不断发展, 癌症患者生存率明显提高, 但目前常用的化疗药物具有毒副作用大、治疗周期长及价格昂贵等缺点, 严重危害患者的生活质量与生命安全。研究发现, KM具有低毒、高效、安全、价廉等优点, 可诱导癌细胞凋亡并抑制癌细胞迁移与侵袭, 进而有效降低多种癌细胞的活力。

Zhang^[4]等人采用MTT法检测KM对人乳腺癌MCF-7细胞的抑制增殖作用发现, KM以剂量依赖性的方式抑制MCF-7细胞增殖, 其 IC_{50} 值为124 $\mu\text{g/mL}$ 。通过Hoechst 33342核染色法观察MCF-7细胞内细胞核的形态学变化情况发现, 经KM处理后MCF-7细胞出现染色质浓缩、细胞核皱缩、荧光强度增强及核碎裂等现象。进一步通过流式细胞术与蛋白质免疫印迹实验探究KM对MCF-7细胞的周期阻滞与诱导凋亡作用发现, KM将MCF-7细胞周期阻滞在G2/M期, 并上调促凋亡蛋白

作者简介: 蔡昌涛(1999-)男, 硕士研究生, 主要从事抗癌中草药活性物质药理研究;

*通讯作者: 金成浩(1977-)男, 教授, 博导, 主要从事癌症发病机理研究及药物研发工作。

Bax 与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 的表达水平, 同时下调抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 的表达水平, 进而诱导 MCF-7 细胞的凋亡。

Yuan^[5]等人通过 MTT 法及流式细胞术检测 KM 对人肝癌 HCC 细胞的活力影响与诱导凋亡作用发现, KM 以剂量依赖性的方式提高 HCC 细胞凋亡率, 进而抑制 HCC 细胞的增殖。通过蛋白质免疫印迹实验检测 KM 对 HCC 细胞中凋亡相关蛋白表达水平的影响发现, KM 可上调 Bax 与 cleaved-caspase3 蛋白的表达水平, 同时下调 Bcl-2 与 Pro-caspase3 的表达水平, 进而诱导 HCC 细胞的凋亡。通过流式细胞术实验检测 HCC 细胞线粒体膜电位变化情况及其对 ROS 累计的影响发现, KM 可有效降低 HCC 细胞内线粒体膜电位, 增加 HCC 细胞内 ROS 的沉积。当加入 ROS 抑制剂后可显著逆转此现象。此外, 为了探究 KM 诱导 HCC 细胞凋亡的分子机制, 通过蛋白质免疫印迹实验检测相关信号通路蛋白表达水平变化发现, KM 可降低 p-ERK、p-p38、p-p65 和 p-I- κ B α 蛋白的表达水平。当加入 ROS 抑制剂后显著逆转 ERK、p38、p65 及 I- κ B α 蛋白的磷酸化水平。

迟德彪^[6]等人采用吖啶橙染色法检测人结肠腺癌 LoVo 细胞凋亡情况发现, KM 以时间依赖性的方式诱导 LoVo 细胞的凋亡。进一步通过流式细胞术检测 KM 对 LoVo 细胞的周期阻滞情况发现, 经 KM 处理 LoVo 细胞 24 h 后, G₀/G₁ 期细胞周期阻滞率从 31.3% 上升到 42.3%, S 期细胞从 62.0% 下降到 38.7%。

Wang^[7]等人通过构建蛋白互作网络 (PPI) 与 GO 富集分析获取钩吻抗直肠癌的潜在活性成分与靶点并进行分子对接进行验证。结果发现, 共有 7 种化合物的对接结果, 其中 KM 在活性位点表现出足够的空间定向, 与丙酮酸脱氢酶激酶 (PDK1) 的结合能力优越, 并与位于激酶结构域中的 Lys111 与 Glu130 的骨架形成氢键, 激酶活性测定同样验证了 KM 对 PDK1 激酶活性具有潜在的抑制作用。通过 MTT 法检测 KM 对人直肠癌细胞的抑制增殖作用发现, KM 可有效抑制 HCT116 与 HT29 细胞的增殖, 其 IC₅₀ 值为分别为 70.56 μ mol/L 与 62.82 μ mol/L。进一步通过 Annexin V-FITC/PI 双染实验、流式细胞术及蛋白质免疫印迹实验检测 KM 对 HCT116 与 HT29 细胞的诱导凋亡作用及其分子机制发现, 经不同浓度 KM 处理后, 人直肠癌 HCT116 与 HT29 细胞的凋亡率从 8.1% 增加到 33.0%。KM 可上调 HCT116 与 HT29 细胞中细胞色素 C (Cyto C)、Bax 及 Caspase-3 的表达水平, 同时下调 Bcl-2 的表达水平, 进而诱导 HCT116 与 HT29 细胞凋亡。

以上结果表明, KM 可将人乳腺癌 MCF-7 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 并通过调控 Bcl-2/Caspase-3 信号通路诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。KM 通过上调肝癌 HCC 细胞内 ROS 的表达水平, 抑制 ERK/p38/MAPK 与 NF- κ B 信号通路的激活, 进而诱导 HCC 细胞凋亡。KM 可将 LoVo 细胞的周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 并诱导 LoVo 细胞的凋亡。KM 可通过调控细胞凋亡相关蛋白表达水平诱导直肠癌细胞凋亡, 进而抑制直肠癌细胞的增殖。

2 钩吻素子的抗炎作用及其分子机制

炎症 (inflammation) 是具有血管系统的活体组织对各种外界刺激所引发的基本病理过程。炎症通常情况下对机体是有益的, 是针对有害刺激所产生的一种防御反应, 但在一些特殊情况下, 炎症对机体是有害的, 例如对人体自身组织的攻击、发生在透明组织的炎症等, 严重危害人类健康。研究发现, KM 具有良好的抗炎作用, 可治疗多种炎症性疾病。

Luo^[8]等人通过酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 实验检测 BMDM 与 THP-1 巨噬细胞中的炎症细胞因子分泌情况发现, 脂多糖 (LPS) 与三种激活因子 (ATP、尼日利亚菌素、尿酸单钠晶体) 均可刺激 BMDM 巨噬细胞都促进培养物上清液中白介素-1 β (IL-1 β) 的分泌。经 KM 与 MCC 950 (NOD 样受体蛋白 3 (NLRP 3) 炎症体抑制剂) 预处理后, BMDM 巨噬细胞中 IL-1 β 的分泌量显著降低。采用 MTT 法与 CCK-8 法检测 KM 对巨噬细胞的毒性发现, KM 对巨噬细胞无明显毒副作用。进一步通过流式细胞术与 ELISA 实验探究 KM 对腹膜炎小鼠模型体内 NLRP 3 炎症小体激活的抑制作用。结果发现, KM 有效减弱嗜中性粒细胞的募集, 并抑制腹膜炎小鼠中 IL-1 β 的产生。进一步通过蛋白质免疫印迹实验、免疫荧光染色实验以及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 实验探究 KM 对 NLRP 3 炎症小体激活的抑制作用及其机制发现, 对用 LPS 与多种 NLRP3 炎症小体激活剂刺激的 BMDM 和 THP-1 经 KM 处理后, NLRP 3、pro-IL-1 β 蛋白表达水平及 mRNA 水平显著降低, 且 I- κ B α 、p65 磷酸化及 p65 的核定位明显被抑制。随后通过 ELISA 实验发现, KM 显著抑制用 LPS 与 ATP 刺激的巨噬细胞中促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 的分泌。此外, 通过流式细胞术检测 BMDM 与 THP-1 巨噬细胞中的活性氧 (ROS) 水平发现, KM 显著降低由 LPS 与 ATP 处理产生的巨噬细胞中 ROS 水平。

Yuan^[9]等人通过蛋白质免疫印迹实验与 Griess 法检测 KM 对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 蛋白表达水平的影响及一氧化氮

(NO) 产生的影响。结果发现, KM 显著下调 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS 蛋白的表达水平, 同时减少 NO 的产生。此外, 使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 KM 对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中不同炎症细胞因子分泌情况发现, KM 可有效抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 IL-1 β 、白介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的产生。进一步通过蛋白质免疫印迹实验检测 KM 对 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中 NF- κ B 与 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平影响发现, KM 显著降低 LPS 诱导的 NF- κ B 信号通路活化与 I κ B α 、p65、p38 及 ERK 磷酸化。

以上结果显示, KM 处理后, LPS 刺激的巨噬细胞 (BMDM、THP-1、RAW264.7) 中 NLRP3、pro-IL-1 β 蛋白表达水平、ROS 水平及 mRNA 水平显著降低, 且 I- κ B α 、p65、p38、ERK 磷酸化及 p65 的核定位明显被抑制, 同时促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 分泌显著减少。表明 KM 通过调控 ROS 水平抑制 LPS 刺激的巨噬细胞中 p38 与 ERK 的磷酸化, 并抑制 NF- κ B 信号通路活化, 进而降低促炎介质的产生, 最终减弱炎症反应。

3 钩吻素子的镇痛作用及其分子机制

骨癌痛是肿瘤对骨膜的牵张或对血管、神经、周围组织的压迫, 使骨组织受到侵犯而导致的疼痛症状。近年来, 随着医学的发展与新辅助化疗、靶向药物治疗的应用, 癌痛患者缓解率有所提高, 但骨癌疼痛的治疗方法仍有一定的局限性, 很多患者的骨癌痛并未得到有效的控制。研究发现, KM 具有减轻大鼠骨癌疼痛的效果。

张文杰^[11]通过建立骨癌痛 (BCP) 模型与假手术 (Sham) 模型, 提取小鼠腰膨大处脊髓组织蛋白, 通过蛋白质免疫印迹实验与免疫荧光法检测小胶质细胞的活化情况。结果发现, 与 Sham 组小鼠相比, BCP 组中脊髓中 p-PI3K、p-Akt、Iba1、IL-6、IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高, 小鼠脊髓背角 (Spinal Cord Dorsal Horn, SDH) 中 p-PI3K、p-Akt、Iba1 的免疫荧光阳性面积均显著增加, 且鞘内注射 PI3K 抑制剂 LY294002 可以显著逆转相关蛋白表达水平与免疫荧光阳性面积大小, 缓解小鼠的 BCP。进一步通过痛行为学测定、蛋白质免疫印迹实验、免疫荧光法及病理组织学染色探究 KM 对 BCP 小鼠的镇痛作用机制。结果发现, 经 KM 处理后小鼠机械性刺激缩足阈值 (PWMT) 与热痛缩足阈值 (PWTL) 均显著增加, 而 p-PI3K、p-Akt、Iba1、IL-6、IL-1 β 蛋白表达水平显著降低, 小鼠 SDH 中 p-PI3K、p-Akt、Iba1 免疫荧光阳性面积均显著减小。以上结果表

明, 脊髓 PI3K/Akt 信号通路参与了 BCP 小鼠脊髓的小胶质细胞活化, 从而释放大量炎症因子, 产生和维持 BCP, 且鞘内注射 KM 能够抑制 PI3K/AKT 信号通路活化, 减轻小胶质细胞活化, 减少炎症因子释放从而缓解 BCP。

4 钩吻素子的抗焦虑作用及其分子机制

焦虑症 (anxiety) 又称为焦虑性神经症, 可分为慢性焦虑和急性焦虑两种形式, 常伴有头晕、胸闷、心悸、呼吸急促、震颤等自律神经症状和运动性症状, 是一种发病率高的神经精神性疾病。研究发现, KM 具有显著的抗焦虑作用。

钟志凤^[12]通过小鼠功能组合 (Functional Observational Battery, FOB) 试验探究 KM 对小鼠焦虑状态行为的影响发现, KM 显著降低小鼠出现抓取、头部触碰及惊恐等焦虑行为。进一步通过大鼠旷场试验 (Open Fieldtest, OFT) 与 Vogel 饮水冲突试验 (Vogel Conflict Test, VCT) 发现, 在 OFT 试验中经 KM 处理小鼠后, 小鼠在整个旷场中运动距离和平均速度没有改变, 在中央区运动距离百分率、停留时间百分率及进入次数增加; 在 VCT 试验中经 KM 处理大鼠后, 大鼠舔水次数、舔水时间及电击次数显著增加。进一步通过天敌声音诱发建立啮齿类动物病理性焦虑样模型, 并检测大鼠血浆中促肾上腺皮质激素 (ACTH) 与皮质酮含量探究 KM 抗病理性焦虑作用及其机制。结果发现, KM 可显著提高天敌声音诱发焦虑样模型大鼠前额叶皮质、海马及杏仁核中孕烯醇酮与别孕烯醇酮含量, 降低模型大鼠血中 ACTH 和皮质酮水平。

黄慧慧^[13]等人通过建立大、小鼠高架十字迷宫 (EPM) 探究 KM 的抗焦虑作用和发现, 在小鼠急性给药 EPM 与大鼠连续给 EPM 中, KM 可显著提高大小鼠的 EPM 进入开臂次数的百分比 (OE%) 和进入开臂时间 (OT%), 但不影响大小鼠在 EPM 中的运动活性。进一步采用固相萃取结合高效液相色谱-质谱联用技术测定大鼠海马区中神经甾体的含量探究 KM 的抗焦虑作用及其对大鼠海马区神经甾体水平的影响。结果发现, KM 提高海马区神经活性甾体孕烯醇酮与别孕烯醇酮水平。

以上结果显示, KM 处理后, 大鼠脑内前额叶皮质、海马区神经活性甾体孕酮和别孕烯醇酮的水平显著提高 ($P < 0.05$), 同时抑制异常的下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴活性, 表明 KM 通过提高这些甾体水平发挥抗焦虑作用, 且有效剂量远低于其半数致死量 (LD_{50}), 安全性高, 有望开发成为高效、低毒的新型抗焦虑药。

5 展望

钩吻记载于《本草纲目》等众多药学专著中, 其主要的生物活性成分为 KM。KM 不仅具有抗肿瘤、抗炎、镇痛及抗焦虑等多种药理活性, 且具有毒副作用小、高效、来源广泛等优点, 可作为起始原料合成多种具有药用价值的产物与重要医药中间体。但目前 KM 的药理作用研究仍处于起步阶段, 需要继续全面、系统地深入研究 KM 化学成分和药理作用分子机制, 并发掘其更多的潜在药理作用, 为 KM 的进一步开发利用同立论依据和理论基础。

参考文献

- [1] 代佳娣, 张卓亿, 孙志良等. 钩吻药理学作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2016, 35(02): 30-33.
- [2] 刘浩, 俞昌喜. 钩吻的研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2008(05): 469-472.
- [3] 刘雪艳. 钩吻素子的合成研究进展[J]. 中外医疗, 2021, 40(25): 193-198.
- [4] Zhang Xiaohua, Chen Yi, Gao Bo, et al. Apoptotic Effect of Koumine on Human Breast Cancer Cells and the Mechanism Involved[J]. Cell biochemistry and biophysics. 2015, 72(2): 411-416.
- [5] Yuan Z, Liang Z, Yi J, et al. Koumine Promotes ROS Production to Suppress Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation Via NF- κ B and ERK/p38 MAPK Signaling[J]. Biomolecules. 2019, 9(10): 559.
- [6] 迟德彪, 雷林生, 金宏等. 钩吻素子体外诱导人结肠腺癌 LoVo 细胞凋亡的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2003(09): 911-913.
- [7] Lin W, Li H X, Wei J L, et al. An Integrated Network, RNA Sequencing, and Experiment Pharmacology Approach Reveals the Active Component, Potential Target, and Mechanism of Gelsemium elegans in the Treatment of Colorectal Cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 616628.
- [8] Yufei L, Bojun X, Haiping L, et al. Koumine Suppresses IL-1 β Secretion and Attenuates Inflammation Associated With Blocking ROS/NF- κ B/NLRP3 Axis in Macrophages[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 11: 622074.
- [9] Zhihang Yuan, Froilan Bernard Matias, Jing Wu, et al. Koumine Attenuates Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammation in RAW264. 7 Macrophages, Coincidentally Associated with Inhibition of NF- κ B, ERK and p38 Pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 430.
- [10] Gui-Lin J, Rong-Cai Y, Sai-di H, et al. Koumine Decreases Astrocyte-Mediated Neuroinflammation and Enhances Autophagy, Contributing to Neuropathic Pain From Chronic Constriction Injury in Rats[J]. Frontiers in pharmacology, 2018, 9: 989.
- [11] 张文杰. 鞘内注射钩吻素子对小鼠骨癌痛的影响及机制研究[D]. 皖南医学院, 2022.
- [12] 钟志凤. 钩吻素子抗焦虑作用及其机制研究[D]. 福建医科大学, 2016.
- [13] 黄慧慧, 陈超杰, 刘铭等. 钩吻素子抗焦虑作用及其对海马区神经甾体水平的影响[J]. 海峡药学, 2016, 28(02): 21-24.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS