

抗结核中药成分的研究

任丽娟,王 丽,文仲书,罗小祥(重庆市胸科医院,重庆 400036)

摘要 结核病是一种传播性疾病,结核病的防治越来越受到重视。目前应用的抗结核化疗药物耐药性、副作用等问题突出,迫切需要开发新的抗结核药物。本文综述了国内外抗结核中药成分的研究情况,对研究中存在的问题作了讨论,希望有助于抗结核新药的开发。

关键词 抗结核;中药成分;新药开发

中图分类号: R28 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006 - 0111(2009)06 - 0015 - 04

结核病是一个非常古老的传染病,近年来由于抗菌药物的广泛应用使结核分枝杆菌产生耐药菌株,导致耐药结核甚至广泛耐药结核出现,使结核病几乎又成了不治之症。由于结核病需要长期系统的治疗,因而高耐药性及不良反应成了抗结核化疗药物的严重不足,新的抗结核化疗药物研发进展缓慢,本文综述了国内外抗结核中药成分的研究情况,对研究中存在的问题作了讨论,为抗结核新药的开发提供一定参考。

1 抗结核中药成分的研究进展

中药成分非常复杂,因此对其活性成分的研究是一项艰巨的任务,国内外越来越多的研究者致力于该项工作,以求找到更多对结核病治疗有效的中药成分,为抗结核新药的研发提供研究基础。

1.1 调节机体免疫力的中药成分研究

1.1.1 黄芪多糖 (astragalus polysaccharides)和黄芪苷 (astragaloside) 中药黄芪 (*Radix Astragali*) 在传统中医学中用来提高免疫力, Xu HD 等^[1]研究了黄芪多糖和黄芪苷对巨噬细胞吞噬结核分枝杆菌的影响。从小鼠身上获得的腹膜巨噬细胞与结核分枝杆菌一起培养,改变培养基中黄芪多糖和黄芪苷的浓度,通过实时的聚合酶链反应检测结核分枝杆菌的 DNA,从而检测巨噬细胞的吞噬活性。培养基上清液中巨噬细胞分泌的白介素 -1、白介素 -6、肿瘤坏死因子 - α 浓度用酶联免疫吸附法测定。结果显示加入黄芪多糖和黄芪苷后巨噬细胞的吞噬活性和分泌细胞因子水平显著地增加,证明黄芪多糖和黄芪苷能促进巨噬细胞对结核分枝杆菌的吞噬作用,促进有活性的巨噬细胞分泌白介素 -1、白介素 -6、肿瘤坏死因子 - α 。

1.1.2 大蒜素 (allicin) Hasan N 等^[2]研究了感染结核分枝杆菌的人类单核细胞中大蒜素对结核分枝杆菌 85B (*MTB 85B*) 基因的早期调节。在感染后的 24 h 内,通过剂量依赖性方式,由谷胱甘肽抑制和 NF-kappaB 途径介导,大蒜素使 *MTB 85B* 细胞内 mRNA 和分泌性蛋白水平显著降低。大蒜素诱导谷胱甘肽和 IFN- γ 的增量调节,同时减少 TNF- α ,证实大蒜素通过诱导保护性的免疫反应而具有抗炎性质。另外,大蒜素是一种天然的抗氧化剂,它可提高谷胱甘肽过氧化物酶活性,向下调节 *MTB* 感染的单核细胞中 TNF- α 和活性氧簇^[3],因此在治疗结核时可以作为一种辅助药物。

1.2 抗结核分枝杆菌的中药成分研究

1.2.1 狼毒 (*Euphorbia fischeriana* Steud) 赵奎君等^[4]对狼毒大戟根的醋酸乙酯提取物进行了柱层析和制备性高效液相层析分离,分离鉴定出狼毒乙素 (2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone)、狼毒乙素-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone-4-O- β -D-glucopyranoside)、大黄素甲醚 (physcion)、没食子酸 (gallic acid) 等 4 个单体成分。采用改良 7H10 琼脂培养基动态观察 4 个单体成分对耐药型和非耐药型结核杆菌的抑制作用。结果显示 4 种单体成分对耐药型和非耐药型结核杆菌均有显著的抑制作用,其中狼毒乙素的作用最显著。

1.2.2 夏枯草 (*Spica Prunellae*) 夏枯草为唇形科植物,具有清热散结、舒肝化痰、消炎驱肿之功效,副作用小,是用于治疗瘰疬、肝病、淋巴结核等常用中草药。闫晓霞^[5]研究了夏枯草对结核分枝杆菌的药物敏感性。对结核分枝杆菌 H37Rv 菌株用三种夏枯草水煎剂作药物敏感试验,结果显示中药夏枯草对结核分枝杆菌具有较好的抑菌作用。夏枯草水煎剂能使实验性结核病小鼠肺部病变减轻。白洁等^[6]也研究了夏枯草的体外抗结核分枝杆菌

H37Rv的活性,结果显示夏枯草醇提物抗结核菌效果优于水提物,抗结核效果明显。

1.2.3 葎草 (*Humulus lupulus*) Stavri M等^[7]通过测定葎草己烷萃取物的分馏来分离抗分枝杆菌组分。用快速生长的分枝杆菌属偶发分枝杆菌研究其特性。1H核磁共振光谱显示混合脂肪酸和不饱和成分的存在,衍生物的气质联用法测定显示为棕榈硬脂酸 (palmitic, stearic and oleic acids)、少量的木蜡酸 (lignoceric acid)、花生酸 (arachidic acid)、山萘酸 (behenic acid)、亚油酸 (linoleic acid)。将这些组分分别测定抗偶发分枝杆菌作用,所有的饱和脂肪酸在浓度超过 256 mg/L时失活,不饱和脂肪酸和木蜡酸的 MIC为 4~16 mg/L,这些组分的存在有助于筛选抗分枝杆菌的化合物。

1.2.4 莨菪 (*Anethum graveolens*) Stavri M等^[8]从莨菪中分离出的一种新的呋喃香豆素 (furocoumarin)具有抗分枝杆菌活性,同时还分离出氧化前胡内酯 (oxypeucedanin)、水合羟基前胡素 (oxypeucedanin hydrate)、发卡二醇 (faltarindiol),这三种化合物对快速生长的分枝杆菌具有抗菌活性, MIC为 2~128 mg/L。

1.2.5 五桠果科 (*Davilla elliptica* St Hill) 五桠果科为人们所熟知的一类植物,在巴西民间医药中常作为一种滋补剂、收敛剂和泻药应用。用 MABA (microplate alamar blue assay)法测定其氯仿提取物的抗分枝杆菌活性, MIC为 62.5 mg/L,这种植物具有潜在的控制结核特性^[9]。

1.2.6 指甲花 (*Lawsonia inermis* Linn) Shama VK^[10]通过体内体外实验研究了指甲花的抗结核活性。体外试验证实当其浓度为 6 mg/L时,从痰液中分离的结核杆菌和结核分枝杆菌 H37Rv的生长都受到抑制。豚鼠和小鼠的体内实验表明,给药剂量在按体重 5 mg/kg时能够有效的溶解试验性结核分枝杆菌。

1.2.7 天竺葵 (*Pelargonium*) 天竺葵根的水提物在治疗肺结核中有效,以前的研究发现天竺葵属的根提取物显示出适度的抗菌活性和显著的免疫调节能力, Seidel V等^[11]进一步评价了这些药理活性的有效性和作用机理。结果显示正如传统应用中的那样,天竺葵属的提取物有很好的抗分枝杆菌活性。

1.2.8 小芸香木属植物 (*Micromelum hirsutum*) Ma C等^[12]研究发现芸香科小芸香木属植物有较好的体外抗结核杆菌活性,因而以抗结核杆菌活性为导向,从该植物茎皮的二氯甲烷提取物中分离出 6个唑啉生物碱 (carbazole alkaloid)和一种油酸 内酯衍生物 (γ -lactone derivative of oleic acid),并研究

了它们的体外抗结核杆菌活性。其中油酸 内酯衍生物体外抗 H37Rv的 MIC为 1.5 mg/L, J774小鼠巨噬细胞模型里的结核分枝杆菌 90%有效抑制浓度 (EC₉₀)为 5.6 mg/L,表明该化合物抗结核作用明显,具有进一步的研究开发价值。

1.3 中药成分对抗结核化疗药物生物利用度的影响 用于治疗结核的固定剂量复合剂中利福平的生物利用度是一个临床关注的问题,研究者们正开发一些同成分异含量制剂来克服这个问题。而 Sachin BS等^[13]研究了从小茴香 (*Fructus Foeniculi*)中分离得到的一些产物和纯化分子与利福平的药动力学相互作用,这种药理学的方法是利用草药成分的协同作用来调节药物的生物利用度。小茴香籽的水提取物使小鼠体内利福平的血浆浓度显著地提高。经研究这种特性是因为活性成分黄酮苷 (flavonoid glycoside), 3',5-二羟基黄酮 7-O- β -D-半乳糖醛酸 4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (3',5-dihydroxyflavone 7-O-beta-D-galacturonide 4'-O-beta-D-glucopyranoside, CC-1), CC-1使利福平的最大浓度 (C_{max})提高了 35%, 血浆浓度时间曲线下面积 (AUC)提高了 53%。利福平生物利用度的改变可能是因为糖苷的渗透加速作用。

2 中药成分抗结核作用机理研究

猫爪草 (*Radix Ranunculi Temati*)是一种在临床上对耐多药结核有效的传统中药,但其有效成分和作用机理仍然没有探明,研究者通过双向凝胶电泳法来解决此问题。结核分枝杆菌的球状蛋白质组用猫爪草处理,并做对照,发现有 22个蛋白质斑有不同的表达。在实验组有三个蛋白质斑明显缩小,经鉴定是磺基丙氨酸 2 (硫代硫酸硫转移酶),组织编码因子 (延伸因子 EF-Ts),热休克蛋白 X。这些数据有助于进一步研究猫爪草影响结核分枝杆菌存活的作用机制,蛋白表达的差别有可能成为一种新的抗结核药物靶点^[14]。

3 抗结核中药成分研究方法

中药有成百上千种,但只有少数具有药效或毒效应,大量的其他化合物使研究和分析生物活性成分及其困难,因此,许多方法学的研究也日渐增多。Su X等^[15]提到通过色谱和质谱的方法,进行生物学的指纹分析小分子生物大分子在复杂系统里的相互作用,可以从天然产物中筛选多重生物活性的化合物。Case RJ等^[16]应用逆流色谱法从狭叶龙血树 (*Dracaena angustifolia*)中分离抗结核成分,通过以生物学鉴定法引导的分级分离,从狭叶龙血树中

分离出三种较强抗分枝杆菌活性的成分 (MIC 为 1 ~ 2 mg/L)。在该项研究中应用了新的逆流色谱法技术使分离速度加快。梯度阵列逆流色谱法在不同的溶剂系统下应用连续逆流色谱分离粗提物。进一步的分馏则是在溶剂系统为己烷 : 甲基叔丁基醚 : 乙腈 (10 : 1 : 10) 下通过最新设计的 1 L 快速离心分配旋转器进行。结果表明梯度阵列的逆流色谱和高容量快速离心分配色谱能够促进从复杂的天然产物中发现新药物, 增加分离方案的重现性。

4 讨论

4.1 研究有待深入 目前抗结核中药成分的研究较多, 大多是采用体外试验测试其对结核分枝杆菌的抗菌活性。而实验结果表明中药活性成分的最低抑菌浓度普遍较高, 对结核分枝杆菌的抗菌作用不如化学药物明显, 这可能也是阻碍抗结核中药成分进一步研究的因素之一。但是也有一些抑菌浓度较低的中药成分, 例如 Ma C 等^[12]研究的油酸 丙酯衍生物体外抗 H37Rv 的 MIC 为 1.5 mg/L, J774 小鼠巨噬细胞模型的结核分枝杆菌 EC₅₀ 为 5.6 mg/L, 这类活性成分就应该进行深入研究, 测定其体内抗菌活性, 鉴定其明确的化学结构, 研究其抗结核作用机理, 以此作为先导化合物开发新的抗结核药物。

4.2 应用新技术、新方法 中药方面的研究一直以来都处于弱势地位, 目前大部分抗结核中药成分的研究方法还很单一, 尤其是国内的研究大多局限于体外抑菌试验, 而研究成分多数也仅局限于中药水提物或有机溶剂提取物, 其活性成分没有完全分离, 笔者认为这也是导致体外抑菌浓度高、试验结果不理想的原因之一。新的色谱、质谱技术的发展对中药活性成分的纯化分离鉴定有重大的意义, 在研究抗结核中药成分中多应用新技术、新方法有助于开发新的抗结核药物。

4.3 研究思路多元化 很多文献报道中药与抗结核化疗药物联用的临床疗效观察结果, 大多数联合应用都对结核的治疗有促进作用。但是中药的作用具体发挥在哪一方面目前还少有实验室的研究论证。Sachin BS 等^[13]证实从中药制剂和小茴香种子中提取的黄酮苷能够提高利福平的血浆浓度, 这个研究结果对临床用药具有指导意义, 有助于临床医师合理的联用中药制剂与化疗药物, 发挥药物最大疗效、减轻药物副作用。这是研究者们值得关注的一个方向。

5 结语

我国的中草药资源丰富, 具有很大的开发潜

力, 明确中药活性成分, 探明中药成分的作用机制, 以此开发新的抗结核药物是所有研究者的一项重大而艰巨的任务。随着现代化科学技术的不断发展, 在西药抗结核研究进展缓慢的局势下, 应用新技术、新方法研究抗结核中药活性成分, 开发出疗效确切的抗结核新药是结核病防治的一条可选之路。

参考文献:

- [1] Xu HD, You CG, Zhang RL, *et al* Effects of Astragalus polysaccharides and astragalosides on the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by macrophages [J]. *J Int Med Res*, 2007, 35 (1): 84.
- [2] Hasan N, Siddiqui MU, Toossi Z, *et al* Allicin - induced suppression of *Mycobacterium tuberculosis* 85B mRNA in human monocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355 (2): 471.
- [3] Hasan N, Yusuf N, Toossi Z, *et al* Suppression of *Mycobacterium tuberculosis* induced reactive oxygen species (ROS) and TNF- α mRNA expression in human monocytes by allicin [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580 (10): 2517.
- [4] 赵奎君, 刘锁兰, 李洪敏. 狼毒大戟中不同组分和成分抗结核杆菌作用的研究 [J]. *中国药师*, 2007, 10 (11): 1063.
- [5] 闫晓霞. 三种夏枯草对结核分枝杆菌的药物敏感性研究 [J]. *长治医学院学报*, 2007, 21 (1): 9.
- [6] 白洁, 孙海峰, 陈翔飞. 4种中药体外抗结核分枝杆菌 H37Rv 的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2007, 18 (1): 77.
- [7] Stavri M, Schneider R, O'Donnell G, *et al* The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication [J]. *Phytother Res*, 2004, 18 (9): 774.
- [8] Stavri M, Gibbons S. The antimycobacterial constituents of dill (*Anethum graveolens*) [J]. *Phytother Res*, 2005, 19 (11): 938.
- [9] Lopes FC, Placeres MC, Jordão Junior CM, *et al* Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St Hill (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007, 102 (6): 769.
- [10] Shama VK. Tuberculostatic activity of henna (*Lawsonia inermis* Linn.) [J]. *Tubercle*, 1990, 71 (4): 293.
- [11] Seidel V, Taylor PW. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 23 (6): 613.
- [12] Ma C, Case RJ, Wang Y, *et al* Anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum* [J]. *Planta Med*, 2005, 71 (3): 261.
- [13] Sachin BS, Shama SC, Sethi S, *et al* Herbal modulation of drug bioavailability: enhancement of rifampicin levels in plasma by herbal products and a flavonoid glycoside derived from *Cuminum cuminum* [J]. *Phytother Res*, 2007, 21 (2): 157.
- [14] He Y, Yue J, Hu CH, *et al* Effects of the *Radix Ranuncoli Ternati* extracts on *Mycobacterium tuberculosis* proteome profiling revealed by 2D electrophoresis [J]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2005, 45 (6): 895.

(下转第 62 页)

1.3 实验方法 空白微球及盐酸布比卡因微球由上海第二军医大学药学院药剂教研室制备,盐酸布比卡因与聚乳酸的物理混合:按盐酸布比卡因微球的比例取两原料,过 120 目筛,混合均匀,取上述样品约 2 g 置测量杯中,以金箔为参比,按实验条件进行扫描,每个样品重复测定 5 次,求平均光谱。

1.4 数据处理 原谱处理:21 点平滑后求一阶导数、25 点平滑后求二阶导数,用 OPUS/NDENT 定性分析软件进行聚类分析,预处理方法:First Derivative + Vector Normalization,谱区范围为 8 717 ~ 3 710/cm,聚类方法为 Ward's Algorithm。

2 结果与讨论

2.1 3 种样品的 NIRDRS 图谱 聚乳酸是 3 种样品的主要基质,因此其 NIRDRS 图谱都很相似,但由于其粒子的物理状态存在很大的差异,造成散射系数(S)的变化,且成分上也有一定差异,所以光谱图还是存在着细微的差别,三种样品的原谱及一阶导数谱见图 1、2。

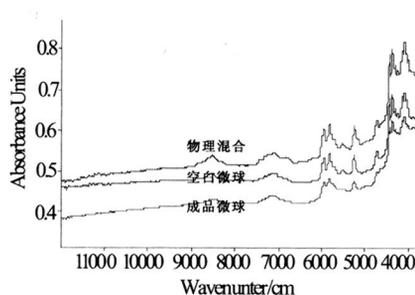


图 1 3 样品的 NIRDRS 原谱图

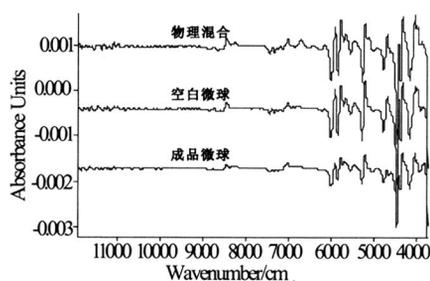


图 2 3 样品的 NIRDRS 一阶导数谱图

2.2 3 种样品的聚类分析 从图谱上我们很难发现其细微差别,所以运用聚类分析的方法对其进行了鉴别,聚类分析结果见树状图 3。

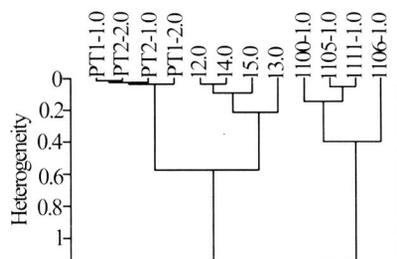


图 3 3 种样品的聚类分析结果

由于 3 种样品存在成分、粒径及其对光的漫反射等的差异,这些差异隐藏在各自的 NIRDRS 中,通过聚类分析,找出不同种之间的信息特征,可达到鉴别的目的。将原谱进行求导变换,将隐藏的信息突出出来,能获得最佳分类效果。从上图我们可以看出,聚类分析能够通过距离的大小,将 3 种样品明显地各自聚为一类,通过该方法可以很快地对空白微球、盐酸布比卡因与聚乳酸的物理混合、盐酸布比卡因聚乳酸微球进行鉴别。此法鉴别快速、结果准确、专属性强。

2.3 讨论

2.3.1 微球的常规分析方法,不仅需要一系列的预处理,操作繁琐,更遗憾的是将样品破坏,对于成本昂贵的药物和辅料,摸索制剂条件时制备的样品量一般较少,但要检测的指标较多,样品量往往不能满足常规的分析方法的要求,而无损伤的 NRS 分析方法可以同时测定多个指标,完全满足品质分析的需要。在批量生产过程中,NRS 分析仪器可以达到在线分析,人们根据在线分析结果及时调整制剂工艺条件,简化分析程序,节约时间,可以带来显著的经济效益和社会效益。

2.3.2 本实验在达到快速、无损鉴别目的同时,为微球包封率的定量考察提供一定依据,由于时间关系和没有微球包封率的标准值,NRDRS 法测定微球包封率的定量模型研究有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴瑾光. 近代傅立叶变换红外光谱技术及应用(上卷 第八章) [M]. 北京:科学技术文献出版社,1994,251.
- [2] 毕殿洲. 药剂学(第 4 版) [M]. 北京:人民卫生出版社,1999,461.
- [3] 朱 斌,王荣恩,林培英,等. NRDRS 法对微球的粒径及跨度的研究 [J]. 药物分析杂志,2005,25(1): 8.

收稿日期:2008-02-25

(上接第 17 页)

- [15] Su X, Kong L, Lei X, *et al* Biological fingerprinting analysis of traditional Chinese medicines with targeting ADME/Tox property for screening of bioactive compounds by chromatographic and MS methods[J]. Mini Rev Med Chem, 2007, 7(1): 87.

- [16] Case RJ, Wang Y, Franzblau SG, *et al* Advanced applications of counter-current chromatography in the isolation of anti-tuberculosis constituents from *Draacaena angustifolia* [J]. J Chromatogr A. 2007, 1151 (1-2): 169.

收稿日期:2008-06-30