



海藻提取物环氧加酶-2 抑制活性研究

史大永¹, 李晓红², 李 敬¹, 郭书举¹, 苏 华¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 青岛市市立医院, 山东 青岛 266011)

摘要: 系统采集中国沿海 10 种代表性海藻, 进行有效成分提取与粗分; 利用昆虫杆状病毒表达系统克隆人 COX-2 基因, 并在昆虫 *Spodoptera frugiperda* (sf9) 细胞中表达获得 COX-2 蛋白, 以花生四烯酸为底物, 通过测定前列腺素 PGE₂ 的生成浓度, 测定海藻不同部位对 COX-2 酶的抑制活性。结果表明, 萱藻 (*Scytosiphon lomentarius*) 乙醇提取物、鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*) 和刺松藻 (*Codium fragile*) 乙酸乙酯相、松节藻 (*Rhodomela conferroides*) 正丁醇相表现出良好的 COX-2 酶抑制活性 (质量浓度为 10 μg/mL 时, 抑制率大于 50%)。首次对上述海藻进行 COX-2 酶抑制活性研究, 其中萱藻乙醇提取物、鼠尾藻和刺松藻乙酸乙酯相、松节藻正丁醇相表现出良好的 COX-2 抑制活性。

关键词: 海藻; 环氧加酶-2 (COX-2); 抑制活性

中图分类号: Q949.2, R282.77

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2009) 07-0030-03

环氧加酶(cyclooxygenase, COX), 即前列腺素 H₂ 合成酶 (Prostaglandin H₂ synthase), 是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)的主要代谢酶之一, 也是前列腺素(Prostaglandins)和血栓素(Thromboxanes)合成的限速酶^[1]。COX 至少存在 3 种亚型, 即 COX-1、COX-2 和 COX-3。COX-1 是结构型 COX, 在多数组织细胞中持续浓度表达, 参与保护胃肠道黏膜、调节肾脏血流等正常生理功能; COX-2 是病理状况下诱导型表达的 COX, 在正常生理状态下几乎不表达, 但当受到刺激后便迅速表达, 进而通过对前列腺素 E₂ (PGE₂) 合成的促进作用, 介导疼痛、炎症和发热等反应^[2]; 近年发现的 COX-3 主要分布于中枢神经系统, 其基因编码的氨基酸序列与前两种有较大差异, 具体作用尚有待研究^[3]。由于经典的非甾体抗炎药不加选择的抑制了 COX-1 和 COX-2, 所以在产生正常治疗效应的同时几乎都不可避免地伴随一些不良反应^[4,5], 因而寻找高选择性的 COX-2 抑制剂一直是许多药学工作者的关注焦点。海藻是海洋生物代谢产物的主要来源之一, 能产生丰富多样的生物活性物质, 在海洋独特的生态环境中, 海藻属于被吞食的弱者, 为了对付海洋食草动物的大量吞食来维护自身的生存繁衍, 大多海藻能产生一些很有特色的代谢物质。为了从海藻中

寻找高活性的 COX-2 抑制剂, 作者对采自山东威海和青岛、广东碓洲岛的 10 种海藻提取物进行了活性测试, 发现萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)乙醇提取物、鼠尾藻 (*Sargassum thunbergii*) 和刺松藻 (*Codium fragile*) 乙酸乙酯相、松节藻 (*Rhodomela conferroides*) 正丁醇相表现出良好的 COX-2 抑制活性。

1 海藻样品

依据中国海藻种属与地域分布, 系统采集中国威海海域、青岛海域以及广东碓洲岛具有代表性海藻 10 种, 由中国科学院海洋研究所范晓研究员鉴定, 标本现存于中国科学院海洋研究所海藻化学研究室, 详见表 1。

2 提取与粗分

风干的海藻样品粉碎后用 95% 乙醇提取 3 次

收稿日期: 2008-11-26; 修回日期: 2009-01-20

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA09Z410, 2007AA091604); 中国科学院方向性创新项目(KZCX2-YW-209)

作者简介: 史大永(1977-), 男, 山东烟台人, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋天然产物与海洋药物化学, 电话: 0532-82898719,

E-mail: shidayong@ms.qdio.ac.cn



表 1 实验海藻样品

Tab.1 The samples of marine algae for experiment

序号	拉丁文名称	中文名称	采集地点	采集时间(年.月)
1	<i>Symphocladia latiuscula</i>	鸭毛藻	山东威海	2006.4
2	<i>Leathesia nana</i>	小粘膜藻	山东威海	2006.4
3	<i>Dictyopterus divaricata</i>	叉开网翼藻	青岛太平角	2007.5
4	<i>Polysiphonia urceolata</i>	多管藻	青岛沙子口	2007.5
5	<i>Scytosiphon lomentarius</i>	萱藻	青岛太平角	2007.5
6	<i>Myelophycus simplex</i>	单条肠髓藻	山东威海	2006.4
7	<i>Sargassum thunbergii</i>	鼠尾藻	青岛太平角	2007.4
8	<i>Rhodomela confervoides</i>	松节藻	青岛太平角	2006.5
9	<i>Codium fragile</i>	刺松藻	广州硃洲岛	2003.3
10	<i>Laurencia okamurai</i> Yamada	岗村凹顶藻	广州硃洲岛	2003.3

合并提取液；提取液减压浓缩得乙醇提取物，10 倍蒸馏水混悬，依次用乙酸乙酯、氯仿、正丁醇萃取，减压浓缩，分别得到乙酸乙酯相、氯仿相、正丁醇相和水相提取物。

3 COX-2 抑制活性检测

3.1 实验原理

COX-2 以花生四烯酸为底物，生成前列腺素 PGE₂，通过测量 PGE₂ 的生成，确定 COX-2 酶活性。

3.2 实验方法

采用 TRIzol 试剂对人单核细胞型淋巴瘤细胞 THP-1 中的总 RNA 进行抽提，利用昆虫杆状病毒表达系统 (Gibco BRL Bac-to-Bac baculovirus expression system) 克隆人 COX-2 基因，并在昆虫 *Spodoptera frugiperda* (sf9) 细胞中表达生成 COX-2 蛋白^[6]。将 1 mL Hank's 液 (内含 1 × 10⁵ 个 COX-2 表达 sf9 细胞与 9 × 10⁵ 个正常 sf9 细胞) 接种至 24 孔细胞培养板中；采用二甲亚砜 (DMSO) 为溶媒，

依次配制质量浓度 0.1, 1.0 和 10 μg/mL 的待测物溶液，取 10 μL 加至上述对应细胞培养板，每个质量浓度平行做 3 个孔，以 DMSO 为阴性对照；Celecoxib 为阳性对照；37 °C, 5% CO₂ 条件下温孵 15 min 后加入 10 μmol/L 花生四烯酸，于 37 °C, 5% CO₂ 温孵 10 min；加入 100 μL HCl (1 mol/L) 终止反应，并用 100 μL NaOH (1 mol/L) 中和，以 ³H-PGE₂ 为标记，采用放免法检测生成的 PGE₂，按如下公式计算抑制率。

抑制率 = (对照组 PGE₂ 浓度 - 药物作用后 PGE₂ 浓度) / 对照组 PGE₂ 浓度 × 100 %。

3.3 实验结果

通过测定 PGE₂ 的生成浓度，分别检测了 10 种海藻的乙醇提取物、乙酸乙酯相、正丁醇相以及水相的 COX-2 酶抑制活性，结果发现萱藻乙醇提取物、鼠尾藻和刺松藻乙酸乙酯相、松节藻正丁醇相表现出良好的 COX-2 酶抑制活性，结果见表 2。

表 2 海藻样品的环氧加酶-2 抑制活性

Tab.2 Inhibitory activity of marine algae against COX-2

待测样品	检测项目	COX-2 酶抑制率 (%)		
		0.1 μg/mL	1.0 μg/mL	10 μg/mL
萱藻	乙醇提取物	0	6.91	91.95
鼠尾藻	乙酸乙酯相	2.55	22.99	71.26
松节藻	正丁醇相	1.23	0	63.22
刺松藻	乙酸乙酯相	8.24	34.48	99.12
Celecoxib	-	24.87	50.24	97.72

注:其余海藻各部位的均无 COX-2 酶抑制活性 (质量浓度为 10 μg/mL 时, 抑制率小于 50%)



4 结论

近年来研究发现,非甾体类抗炎药(NSAIDs)的抗炎作用是由于其抑制了COX-2进而阻止了有炎症效应的前列腺素PGE₂的生物合成^[7],抑制COX-2或直接抑制PGE₂的合成可以减轻炎症症状。通过对10种海藻提取物的不同部位进行COX-2酶抑制活性检测,发现萱藻乙醇提取物、鼠尾藻和刺松藻乙酸乙酯相、松节藻正丁醇相具有较好的生物活性,值得进一步进行活性跟踪,分离纯化,以其得到具有药用价值的先导化合物。

参考文献:

- [1] Chan C C, Rodger I W. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors as potential therapeutic agents for inflammatory diseases[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997,407:157-161.
- [2] Simon L S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation[J]. *Am J Med*, 1999,106(5B):37-42.
- [3] Snipes J A, Kis B, Shelness G S, *et al*. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005,313: 668-676.
- [4] Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Am J Med*, 1998,105(5):413-421.
- [5] 云宇,段为钢,沈志强. 选择性环氧合酶-2抑制剂的疗效和不良反应[J]. *国外医学药学分册*, 2005, 32(3):176-179.
- [6] Zhang W, Yang X Y, Jin D N, *et al*. Expression and enzyme activity determination of human cyclooxygenase-1 and -2 in a baculovirus-insect cell system[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004,25(8):1 000-1 006.
- [7] Chen H F, Li Q, Yao X J, *et al*. CoMFA/CoMSIA/HQSAR and docking study of the binding mode of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors[J]. *QSAR Comb Sci*, 2004, 23: 36-39.

Inhibitory activity against cyclooxygenase-2 enzyme of extraction from algae

SHI Da-yong¹, LI Xiao-hong², LI Jing¹, GUO Shu-ju¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China)

Received: Nov., 26, 2008

Key words : algae; cyclooxygenase-2 (COX-2); inhibitory activity

Abstract: Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a key enzyme that catalyzes the biosynthesis of prostaglandins from arachidonic acid and plays a critical role in inflammation, pain and fever. In order to search for new type inhibitors against COX-2, extractions from 10 algae were screened indirectly by determination of prostaglandin E₂ which was synthesized from arachidonic acid. Human cyclooxygenase-2 genes were cloned from human monocyte cell line THP-1 cells and expressed in *Spodoptera frugiperda* (sf9) insect cell line by Bac-to-Bac baculovirus expression systems. The results showed that ethanolic extraction of *Scytosiphon lomentarius*, EtOAc phase of *Sargassum thunbergii* and *Codium fragile* and butanolic phase of *Rhodomela confervoides* exhibited good bioactivities with inhibitory ratio higher than 50% at a dose of 10 μg/mL.

(本文编辑: 康亦兼)