

## 基于环氧合酶抑制作用的人工麝香质量评价方法研究

罗云<sup>1,2,3</sup>, 金城<sup>1\*</sup>, 周健<sup>1</sup>, 温瑞卿<sup>1,3</sup>, 李兴丰<sup>1,4</sup>, 李瑞生<sup>5</sup>,  
杨明<sup>2</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>

- (1. 解放军第三〇二医院解放军中药研究所, 北京 100039;  
2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075;  
4. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 5. 解放军第三〇二医院实验动物中心, 北京 100039)

**摘要:** 采用酶免疫 (EIA) 法, 测定和计算人工麝香对环氧合酶 II (COX-2) 的抑制率, 构建人工麝香对 COX-2 抑制作用的量效关系, 为建立人工麝香的体外抗炎效价测定方法提供研究基础。结果显示, 人工麝香对 COX-2 具有明显抑制作用, 半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 2.26 mg·mL<sup>-1</sup>, 在 0.31~20.0 mg·mL<sup>-1</sup> 内, 具有明显的量效关系。结果表明, 该方法快速、灵敏、准确、重现性好, 可用于建立人工麝香抗炎生物效价检测方法, 同时本文也为人工麝香的生物活性评价提供了新的研究思路和方法。

**关键词:** 人工麝香; 环氧合酶-2; 酶免疫测定; 抗炎; 生物评价

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 04-0438-05

## Quality evaluation of artificial musk based on its inhibitory effect on cyclooxygenase-2

LUO Yun<sup>1,2,3</sup>, JIN Cheng<sup>1\*</sup>, ZHOU Jian<sup>1</sup>, WEN Rui-qing<sup>1,3</sup>, LI Xing-feng<sup>1,4</sup>, LI Rui-sheng<sup>5</sup>,  
YANG Ming<sup>2</sup>, XIAO Xiao-he<sup>1\*</sup>

- (1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;  
2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 4. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 5. Animal Laboratory Center, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The inhibitory ratio (*I*%) of artificial musk on cyclooxygenase-2 (COX-2) was determined by enzyme immunoassay (EIA). The dose-effect relationship between concentrations of artificial musk and *I*% was established. It was found that artificial musk had obvious inhibitory action on COX-2. The concentration for 50% of maximum inhibitory effect (IC<sub>50</sub>) was about 2.26 mg·mL<sup>-1</sup>. There was a good relationship between the logarithm concentrations of artificial musk and *I*% when the concentrations of artificial musk ranged from 0.31–20.0 mg·mL<sup>-1</sup>. The results indicated that this EIA method could be applied to evaluate the anti-inflammatory activity of artificial musk quickly, conveniently, sensitively and exactly. This paper provided a novel method and foundational research for the bioassay of artificial musk.

**Key words:** artificial musk; COX-2; enzyme immunoassay; anti-inflammatory; biological evaluation

收稿日期: 2010-10-20.

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (30625042); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2009ZXJ0904-057, 2009ZX09502-022).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933322, Fax: 86-10-63879915, E-mail: pharmacy302@126.com

Tel: 86-10-66933325, Fax: 86-10-63879915, E-mail: pijincheng@126.com

麝香是我国传统珍稀名贵中药之一, 疗效确切, 常用于治疗疮疡肿毒、咽喉肿痛、跌打损伤等症<sup>[1]</sup>。由于药材来源依靠猎麝取香, 野生麝资源极为短缺, 麝香的药源严重匮乏, 价格昂贵。为此, 我国自主研发了人工麝香 (artificial musk, AM) 作为天然麝香代用品, 人工麝香具有与天然麝香相似的药理作用和生物活性<sup>[2]</sup>。目前, 对于天然麝香的质量控制主要是测定其中麝香酮的含量; 而对于人工麝香, 因其配方复杂, 其中麝香酮为人工添加, 则主要采用常规药理实验方法对其进行质量评价<sup>[3, 4]</sup>。常规药理实验周期长、样品耗量大且精确度和可量化程度均不高, 因此需要建立一种多、快、好、省的麝香质量控制与评价方法。当前, 建立与药效相关的中药质量生物评价模式和质量控制方法已经成为中药质量控制研究和发展的趋势<sup>[5, 6]</sup>。2010版《中国药典》的编写大纲中曾明确指出: 中药的质量标准要逐步由单一指标成分定性定量测定向活性有效成分及生物测定的综合检测过渡。

因此, 对于中药麝香, 优选和建立适宜的生物效价检测方法用于其质量控制和品质评价是对以指标性成分检测为主的质控模式的有益补充, 同时也为麝香品质评价和质量控制标准的建立和完善提供参考。本文以人工麝香为研究对象, 探讨通过生物效价建立其质量评价方法。

麝香具有开窍醒神、消肿止痛、活血调经等功效, 抗炎作用是其实现消肿止痛功效的共同途径<sup>[7, 8]</sup>。目前主要采用二甲苯致小鼠耳肿胀模型、角叉菜胶致大鼠足跖肿胀模型等常规药理方法对药物的抗炎活性进行评价, 但用于贵重药材人工麝香抗炎活性评价存在一定的局限性, 如耗费动物、实验周期长、样品耗量大、成本较高、干扰因素多、重现性较差等。

现代研究<sup>[9]</sup>表明, 环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 通路是麝香发挥抗炎作用的机制之一。COX至少有两种亚型: COX-1, 存在于大多数组织细胞中, 其异构酶 COX-2 是一种诱导酶, 仅存在于多种刺激因子如脂多糖 (LPS) 和细胞因子等引起的炎症组织中<sup>[10, 11]</sup>, 是许多抗炎药物的主要作用靶点, 测定 COX-2 抑制效应可用于评价药物抗炎活性<sup>[12-14]</sup>。COX-2 抑制活性的测定, 目前普遍采用的是放射免疫法 (RIA) 或酶免疫法 (EIA) 测定 COX-2 催化花生四烯酸 (AA) 生成前列腺素 (PGs) 的量的变化<sup>[15]</sup>。与 RIA 相比, EIA 法由于便捷、稳定、经济、安全而较为常用<sup>[16, 17]</sup>。EIA 法用于药物的抗炎活性评价, 具有

快速、灵敏、准确、影响因素少、重现性好的特点。

本文采用 EIA 法, 探讨通过测定人工麝香作用后的 COX-2 催化花生四烯酸生成前列腺素量的变化, 研究人工麝香对 COX-2 的抑制作用, 构建人工麝香对 COX-2 抑制作用的量效关系, 以期建立人工麝香抗炎作用的生物效价检测方法提供新的研究思路和方法。

## 材料与方法

**仪器及材料** ZS-3 板式酶标仪 (北京新凤机电技术公司), COX 抑制剂筛选检测试剂盒 (560131, 含有人重组 COX-2、96 孔酶标板、抗 PG 血清、PG-AChE 结合物、PG 对照品、花生四烯酸及各种缓冲液等, 美国 Cayman 化学公司)。阿司匹林对照品 (美国 Cayman 化学公司, 批号: 0407589-11)、人工麝香购于中国药材集团公司 (批号: 0811170)。

**EIA 方法** 基于 PGs 和 PG-AChE 结合物 (PG tracer) 能与有限的抗 PG 血清竞争性结合, 从而得以对 PGs 进行定量检测, 然后再根据药物作用前后产生的 PGs 浓度的变化, 计算出药物对 COX-2 抑制的抑制作用强度。整个测定过程可以分为 4 个步骤: ① 药物 (人工麝香水提物, 阿司匹林等) 与 COX-2 发生抑制反应; ② 加入底物花生四烯酸 (AA), 使反应后的 COX-2 催化花生四烯酸转化为 PG; ③ 利用 PG 与 PG-AChE 结合物与有限的抗 PG 血清竞争性结合, 由于 PG-AChE 结合物的浓度是恒定的, 而 PG 的浓度是变化的, 因此 PG-AChE 结合物与抗 PG 血清的量与酶标孔中 PG 的浓度成反比; ④ 对酶标孔进行显色, 405~420 nm 测定吸收度 A, 根据 PG 标准曲线, 求得各孔 PG 的量; 与空白和全活性孔进行比较, 计算药物对 COX-2 的抑制率。

**阿司匹林对照品溶液制备** 精密称取阿司匹林 20.0 mg, 加反应缓冲液 (含 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、2 mmol·L<sup>-1</sup> 苯酚, pH 8.0) 5.0 mL, 超声使溶解, 制成 4.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 并以反应缓冲液稀释成 2.0、1.0、0.5 和 0.25 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 置 4℃ 保存备用。

**人工麝香供试品溶液制备** 精密称取人工麝香 80.0 mg, 加反应缓冲液 4.0 mL, 冷浸 30 min 后超声提取 10 min, 0.45 μm 滤膜过滤, 即得 20.0 mg·mL<sup>-1</sup> 人工麝香供试品溶液, 并以反应缓冲液稀释成 10.0、5.0、2.5 和 1.25 mg·mL<sup>-1</sup> 的供试品溶液, 置 4℃ 保存备用。

**前列腺素对照品溶液的配制** 取前列腺素对照品冻干粉, 加入 EIA 缓冲液 1 mL 制成  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的储备液, 并用 EIA 缓冲液稀释成 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.3 和  $15.6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液 (分别记为 S1~S8), 备用。

**COX-2 抑制作用测定** 按照试剂盒说明书配制各种浓度的反应溶液。实验设置背景组、COX-2 100% 初始活性 (IA) 组、阿司匹林对照组、人工麝香供试品组。试管中分别加入反应缓冲液  $950 \mu\text{L}$ 、血红素  $10 \mu\text{L}$ 、COX-2 溶液  $10 \mu\text{L}$  和对照品或供试品溶液  $20 \mu\text{L}$ , 涡旋混匀,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴孵育  $10\sim 20 \text{ min}$ ; 加入花生四烯酸  $10 \mu\text{L}$ , 涡旋混匀,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴孵育  $2 \text{ min}$ ; 加入  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl  $50 \mu\text{L}$  终止反应; 将试管从水浴中移出, 加入饱和  $\text{SnCl}_2$  溶液  $100 \mu\text{L}$ , 涡旋混匀, 室温孵育  $5 \text{ min}$ 。将所得背景组溶液以 EIA 缓冲液稀释 100 倍、其他组样品溶液分别以 EIA 缓冲液稀释 1 000 倍和 2 000 倍, 即得前列腺素供试品, 供酶免疫测定用。然后, 在 96 孔酶标板中设置空白孔、非特异性吸附孔、最大结合孔 ( $B_0$ )、全活性孔、PG 对照品孔、背景孔、IA 孔、阿司匹林对照品孔、人工麝香供试品孔。分别非特异性吸附孔中加入 EIA 缓冲液  $100 \mu\text{L}$  和 PG-AChE 结合物  $50 \mu\text{L}$ ; 在  $B_0$  孔中加入 EIA 缓冲液  $50 \mu\text{L}$ 、PG-AChE 结合物  $50 \mu\text{L}$  和抗 PG 血清  $50 \mu\text{L}$ ; 在 PG 对照品孔、背景孔、IA 孔、阿司匹林对照品孔、人工麝香供试品孔中加入前列腺素  $50 \mu\text{L}$  或 PGs 供试品溶液、PG-AChE 结合物  $50 \mu\text{L}$  和抗 PG 血清  $50 \mu\text{L}$ 。室温振荡孵育  $18 \text{ h}$  后; 用缓冲液洗板 5 次, 然后每孔分别加入 Ellman 试剂  $200 \mu\text{L}$ , 全活性孔另加 PG-AChE 结合物  $5 \mu\text{L}$ , 盖好, 暗室中振荡孵育  $30\sim 90 \text{ min}$ , 放入酶标仪, 测定吸收度 ( $405 \text{ nm}$ ),  $B_0$  孔的吸收度应在  $0.3\sim 0.8 \text{ A.U.}$  内 (扣除空白)。

**COX-2 抑制率 ( $I\%$ ) 计算** PG 对照品孔 (S1~S8) 吸收度与最大结合孔 ( $B_0$ ) 吸收度的比值得  $B/B_0$  (%), 以 S1~S8 的  $B/B_0$  值 ( $y$ , %) 对 PG 的浓度 ( $x$ ) 的对数值作图, 拟合得到标准曲线。背景孔、IA 孔、人工麝香供试品孔和阿司匹林对照品孔吸收度与  $B_0$  孔吸收度的比值得  $B/B_0$  (%), 根据标准曲线, 计算各孔中 PGs 浓度, 再乘以各样品的稀释倍数, 即得各供试品 PGs 的浓度。根据与 IA 样品比较, 各供试品 PGs 的浓度生成减少的百分率反映样品对 COX-2 的抑制率<sup>[11]</sup>, 见式 (1)。其中  $C_{IA}$  为 IA 样品中 PGs 的浓度,  $C_{\text{sample}}$  为各供试品 PGs 的浓度。

$$I\% = (C_{IA} - C_{\text{sample}}) / C_{IA} \times 100\% \quad (1)$$

**阿司匹林对照品和人工麝香样品的量效曲线** 分别以阿司匹林对照品和人工麝香样品的 COX-2 抑制率  $I\%$  ( $y$ ) 对阿司匹林对照品和人工麝香浓度的对数值 ( $x$ ) 作图, 得到阿司匹林对照品和人工麝香样品的量效曲线, 并采用 SPSS 13.0 统计软件概率单位回归法 (Probit) 计算半数抑制浓度  $IC_{50}$ 。

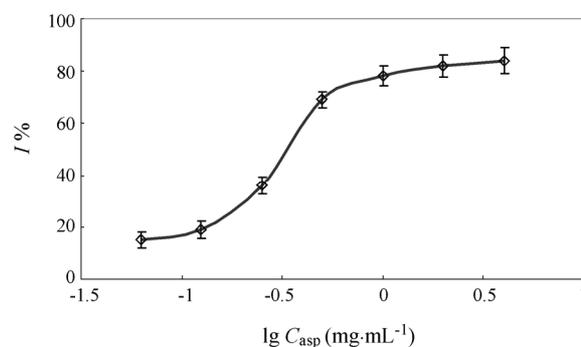
## 结果

### 1 PG 标准曲线的绘制

以 S1~S8 的  $B/B_0$  值 ( $y$ , %) 对 PG 的浓度 ( $x$ ) 的对数值作图, 拟合得到标准曲线, 回归方程为  $y = -38.923x + 140.75$  ( $r = 0.9913$ ), 结果表明, 在  $15.6\sim 2000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内,  $B/B_0$  (%) 值与 PG 浓度的对数值具有良好的线性关系。

### 2 阿司匹林对 COX-2 抑制作用的量效关系考察

阿司匹林对 COX-2 抑制作用的量效曲线见图 1。由图 1 可见, 阿司匹林对 COX-2 抑制作用的量效曲线呈明显的 S 型, 随着浓度的增加, 阿司匹林对 COX-2 的抑制作用增强, 呈明显的剂量依赖关系。采用概率单位回归法计算得阿司匹林对 COX-2 抑制作用的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.39 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

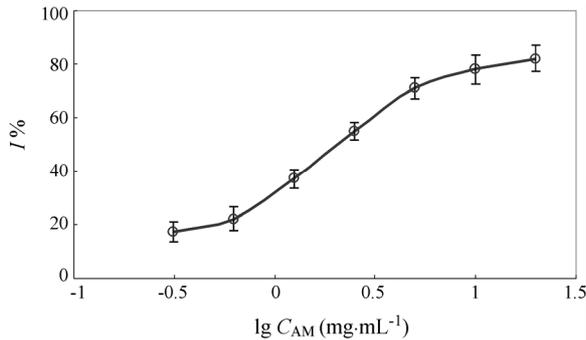


**Figure 1** Dose-effect relationship between logarithm concentrations of aspirin and its inhibitory ratio ( $I\%$ ) on COX-2

### 3 人工麝香对 COX-2 抑制作用的量效关系考察

人工麝香对 COX-2 抑制作用的量效曲线见图 2。由图 2 可见, 人工麝香对 COX-2 抑制作用的量效曲线呈 S 型, 随着浓度的增加, 人工麝香对 COX-2 的抑制作用增强, 呈明显的剂量依赖关系, 表明在  $0.31\sim 20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内, 人工麝香对 COX-2 抑制作用具有明显的量效关系。采用概率单位回归法 计算得人工麝香对 COX-2 抑制作用的半数抑制浓度  $IC_{50}$  为  $2.26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 约为阿司匹林对 COX-2 抑制作用的半数

抑制浓度  $IC_{50}$  的 5.8 倍。



**Figure 2** Dose-effect relationship between logarithm concentrations of artificial musk and its inhibitory ratio (I%) on COX-2

## 讨论

生物活性检测是利用生物模型包括整体动物、离体组织、器官、细胞、微生物、酶等评估药物生物活性(包括药效和毒性)的一种方法,有助于在医药学研究中揭示药物的疗效与毒性,探索药物的作用机制,更好地为药品生物效价测定、微量生理活性物质测定、中药现代化研究等领域的基础和应用研究服务<sup>[18]</sup>。本文以人工麝香为研究对象,研究 COX-2 催化花生四烯酸生成前列腺素的反应中,人工麝香对 COX-2 的抑制作用,探讨建立麝香等药材质量的生物评价方法。结果表明,人工麝香对 COX-2 具有明显的抑制作用,  $IC_{50}$  约为  $2.26 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 且呈剂量依赖关系,同时也为建立人工麝香抗炎生物效价检测方法提供了研究基础。

通过常规药理实验所建立的生物活性检测方法操作烦琐<sup>[18]</sup>, 准确性和重现性也较差。本文通过测定药物对 COX-2 的抑制活性来评价药物抗炎活性, 与常规药理实验相比, 具有快速、灵敏、准确、重现性好、特异性强、干扰因素少的特点, 可用于人工麝香抗炎生物效价检测。同时, 该方法还可用于研究药物对 COX-1 的抑制作用, 评价药物毒性及预测其不良反应, 具有较好的通用性, 相关研究结果将陆续报道。

作者曾采用所建立的 EIA 法对麝香和人工麝香主要成分之一的麝香酮的 COX-2 抑制活性进行了测定, 结果显示麝香酮浓度达到  $9.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 尚未见 COX-2 抑制作用, 这远大于人工麝香中麝香酮完全溶解时的浓度(麝香酮含量以 2.0% 计,  $20.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  人工麝香供试品中麝香酮的浓度为  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。结果表明, 麝香酮并非麝香和人工麝香的主要抗炎有

效成分, 这与文献<sup>[19]</sup>报道结果基本一致。但是, 麝香酮具有扩张冠状动脉及增加冠脉血流量的作用, 可能是麝香发挥开窍醒神作用的有效成分之一。因此, 麝香酮在人工麝香中的作用还有待进一步研究。

将生物检定引入中药质量控制和评价体系, 不仅可以鉴定品种和质量, 而且可以评价药效, 甚至观察毒副作用, 尤其对于结构复杂或理化方法不能表征其含量、理化测定不能反映生物活性和临床疗效的中药产品更能凸显其优越性<sup>[20]</sup>。在现有质控方法和标准的基础上, 增加生物检定方法, 对保证中药的安全、有效、稳定可控具有重要意义, 也必将成为中药质量控制新的重要发展方向<sup>[21, 22]</sup>。

## References

- [1] Yang Q, Meng X, Xia L, et al. Conservation status and causes of decline of musk deer (*Moschus spp.*) in China [J]. *Biol Conserv*, 2003, 109: 333–342.
- [2] Yu DQ. Research on artificial musk [J]. *Bull Med Res (医药研究通讯)*, 2000, 29: 16–17.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol I. 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 266–267.
- [4] Zhu XY. Pharmacological study on artificial musk [J]. *Bull Med Res (医药研究通讯)*, 1999, 28: 20.
- [5] Xiao XH, Jin C, Zhao ZZ, et al. Probe into innovation and development of pattern of quality control and evaluation for Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32: 1377–1381.
- [6] Li HB, Yan D, Wang JB, et al. Biological evaluation of *Radix Isatidis* based on neuraminidase activity assay [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 162–166.
- [7] Zhu XY, Wang WJ, Xu GF, et al. The pharmacological activities of musk II. The anti-inflammatory activity of the active components of musk [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1988, 23: 406–410.
- [8] Kadota S, Orito T, Kikuchi T, et al. Musclide-A1, -A2, and -B, cardiotoxic potentiating principles from musk [J]. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32: 1733–1736.
- [9] Wang SR, Yang W. The effect of re-extract substrate of musk by methanol on cyclooxygenase of rabbit kidney marrow *in vitro* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 1988, 4: 31–33.
- [10] O'Sullivan MG, Huggins EM, Meade EA, et al. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar

- macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187: 1123–1126.
- [11] Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, et al. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 9049–9055.
- [12] Yang QS, Harada Y, Katori M. Induction of cyclooxygenase-2 in rat carrageenin-induced pleurisy and its selective inhibition by NS-398 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1999, 34: 181–184.
- [13] Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition [J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 1425–1441.
- [14] Hu YF, Cheng GF. Establishment of screening models for selective cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35: 343–346.
- [15] Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme-immunoassay of eicosanoids using acetyl-cholinesterase as label: an alternative to radioimmunoassay [J]. *Anal Chem*, 1985, 57: 1170–1173.
- [16] Cheong E, Ivory K, Doleman J, et al. Synthetic and naturally occurring COX-2 inhibitors suppress proliferation in a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by inducing apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 1945–1952.
- [17] Burkhard H, Olga C, Kay B. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man [J]. *FASEB J*, 2008, 22: 383–390.
- [18] Zhou HJ. *Drug Bioassay (药品生物检定)* [M]. Beijing: People's Medical Press, 2005: 9–11.
- [19] Zhu XY, Xu GF, Cheng YS, et al. The pharmacological activities of musk III. on the mechanisms of its anti-inflammatory activity [J]. *Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报)*, 1989, 11: 52–56.
- [20] Xiao XH, Xiao PG, Wang YY. Some key issues about scientific research on traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2009, 34: 119–123.
- [21] Wang JB, Jin C, Li HF, et al. Essential issues of bioassay methods for quality control of laxative traditional Chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 500–505.
- [22] Wang P, Qian ZZ. The readable explanation of the editorial outline of Chinese Pharmacopoeia 2010 edition [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2008, 28: 337–340.