

桦木酸抗炎作用与机制

徐先祥, 秦思, 李琼(华侨大学生物医学学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 目的 对桦木酸的抗炎作用与机制进行综述。方法 检索归纳有关桦木酸抗炎作用的文献, 对其作用途径及机制进行了分析。结果 桦木酸对实验性炎症模型及其他模型有显著的抗炎作用, 桦木酸抗炎作用机制涉及糖皮质激素受体、一氧化氮、氧化应激、免疫调节、细胞因子和黏附分子、炎症信号通路等。此外, 桦木酸与其他天然产物还有协同的抗炎作用。结论 桦木酸通过多途径发挥抗炎作用, 抗炎活性研究对于探讨桦木酸治疗疾病的作用机制有着重要意义。

关键词: 桦木酸; 抗炎; 作用机制; 信号通路; 协同作用

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)10-1284-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.032

Anti-inflammatory Effects and Mechanisms of Betulinic Acid

XU Xianxiang, QIN Si, LI Qiong(School of Biomedical Science, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To review anti-inflammatory effects of betulinic acid and the mechanisms. **METHODS** Literature about anti-inflammatory effects of betulinic acid was summarized and the pathways and mechanisms were analyzed. **RESULTS** Betulinic acid had significant anti-inflammatory effects on experimental inflammatory models and other models. The anti-inflammatory mechanisms involved glucocorticoid receptor, nitric oxide, oxidative stress, immune regulation, cytokines, adhesion molecules and inflammatory signaling pathways. In addition, betulinic acid could perform synergistic anti-inflammatory action with other natural products. **CONCLUSION** Betulinic acid exerts anti-inflammatory effects through multiple pathways. Studies on the anti-inflammatory activities of betulinic acid have important significance for the mechanism of its therapeutic effects.

KEY WORDS: betulinic acid; anti-inflammation; mechanism; signaling pathways; synergistic action

桦木酸又称白桦酸、白桦脂酸, 为羽扇豆烷型五环三萜类化合物。桦木酸因其显著的抗肿瘤和抗 HIV 等活性, 同时不良反应少, 已成为备受关注的先导化合物^[1-2]。炎症是常见的基本病理过程, 调节炎症过程可以干预多种疾病的发生、发展。抗炎作用是桦木酸重要的生物活性之一^[3], 也是桦木酸许多生物活性的基础, 笔者对桦木酸抗炎作用与机制作一综述。

1 桦木酸的抗炎作用

1.1 桦木酸对实验性炎症模型的抗炎作用

桦木酸按 50 mg·kg⁻¹ 和 100 mg·kg⁻¹ 2 种剂量口服, 对角叉菜胶和血清素引起的大鼠足肿胀有明显的抑制作用^[4]; 在佛波酯(TPA)和苯丙炔酸乙酯(EPP)引起的小鼠耳肿胀试验中也显示明显的抗炎作用, 在受试的 3 种三萜化合物(桦木醇、桦木

酸和熊果酸)中, 桦木酸作用最明显^[5]。桦木酸涂抹在小鼠耳廓可显著抑制 TPA 引起的小鼠炎症肿胀, 半数抑制量(ID₅₀)为 0.6 μmol·耳⁻¹, 作用与吲哚美辛(ID₅₀ 为 0.8 μmol·耳⁻¹)相当^[6]。在小鼠醋酸扭体试验和福尔马林试验中, 桦木酸显示明显的镇痛作用^[7]。桦树皮提取物(主要含桦木醇和桦木酸)具有抗炎作用, 能抑制 TPA 引起的小鼠耳肿胀^[8]。从藤黄叶和嫩枝中分离出的桦木酸和桦木醇能抑制 EPP 引起的小鼠耳肿胀^[9]。

1.2 桦木酸在其他模型中的抗炎作用

1 mg 的 TPA 涂抹于小鼠耳可引发肿胀, 5 mg 的 TPA 涂抹于小鼠皮肤则快速引起鸟氨酸脱羧酶(ODC)的聚集, 桦木酸对耳肿胀和 ODC 聚集均有显著抑制作用。对于 50 mg 7,12-二甲基苯并蒽诱发的小鼠皮肤肿瘤形成, 5 μmol 的桦木酸有显著

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2012Y0049); 泉州市科技计划项目(2011Z8); 华侨大学中央高校基本科研业务费“福建省杰出青年基金培育计划”专项(JB-SJ1012)

作者简介: 徐先祥, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (0595)22692300 E-mail: xuxianxiang@163.com

抑制 2.5 mg TPA 的促肿瘤作用,表明桦木酸对 TPA 诱导的炎症和促肿瘤作用有平行的抑制效应^[10]。注射脂多糖(LPS)引起的大鼠急性肺损伤,肺湿/干重测定和伊文斯蓝测定表明发生肺水肿,肺部组织病理学检查可见明显的炎症反应,25 mg·kg⁻¹的桦木酸口服 7 d 可明显减轻以上症状^[11]。血管炎症是血管性疾病如肿瘤和动脉粥样硬化发展过程中的重要事件,桦木酸可保护肿瘤坏死因子(TNF- α)引起的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)损伤,减少 TNF- α 引起的 HL-60 细胞与 HUVEC 细胞间黏附^[12]。玫瑰果粉可用于治疗骨关节炎,玫瑰果粉的二氯甲烷部位主要含有 3 种三萜化合物:齐墩果酸、熊果酸和桦木酸,可抑制 LPS 引起的 Mono Mac 6 巨噬细胞株产生白细胞介素-6(IL-6),其中齐墩果酸、熊果酸单独也具有抑制作用,而桦木酸无效,但桦木酸与这 2 种三萜合用能增强其免疫调节的协同作用^[13]。对于胶原酶诱导的骨关节炎兔模型,桦木醇、pimaradienoic acid 与桦木酸的组合能有效抑制蛋白聚糖和 II 型胶原释放,而 3 种三萜单体即使高浓度时也没有抑制作用。三者组合显著抑制体外培养的人软骨细胞白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 TNF- α 水平,下调蛋白聚糖酶和基质蛋白酶 ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-1 和 MMP-13 水平,上调基质金属蛋白酶组织抑制物-3 (TIMP-3)。而各个单体对 TNF- α 、蛋白聚糖酶和 TIMP-3 没有影响^[14]。

2 桦木酸抗炎作用机制

2.1 活化糖皮质激素受体

糖皮质激素是机体内源性抗炎成分,桦木酸发挥抗炎作用的部分原因源于它能影响糖皮质激素的受体,通过前列腺素和糖皮质激素受体拮抗剂放线菌素 D 和环己酰亚胺检测其作用机制,表明与糖皮质激素受体活化有关^[5]。

2.2 抑制花生四烯酸代谢途径

花生四烯酸经环氧化酶(COX)代谢途径产生的前列腺素是引起炎症反应的关键活性物质,能增加血管通透性,促进白细胞趋化聚集脱颗粒和产生超氧阴离子,引起和加重炎症反应。桦木酸体外具有抑制前列腺素合成作用,半数有效浓度(IC₅₀)为 0.66 mmol·L⁻¹,作用与乙酰水杨酸相当^[15]。基于质谱技术的酶活性测定结果显示:桦木酸是 COX-1 选择性抑制剂,IC₅₀ 约在 10 mmol·L⁻¹^[16]。苦丁茶(序梗女贞)具有抗炎镇痛作用,其作用物质基础与其中的桦木酸等三萜有关,而作用机制则

与抑制 COX-2 活性、降低微血管通透性等有关^[17]。

2.3 抑制一氧化氮(NO)生成

病理情况下诱生型一氧化氮合酶(iNOS)合成大量的 NO 有细胞毒作用,加重炎症反应。桦木酸体外可抑制 LPS 刺激鼠 RAW 264.7 巨噬细胞株引起的 NO 释放^[18]。2.5~ 20 mg·mL⁻¹ 浓度时,桦木酸在抑制 LPS 引起的巨噬细胞 NO 及 iNOS 产生同时,还可下调 COX-2 表达,20 mg·mL⁻¹ 的桦木酸还可引起 RAW 264.7 细胞 DNA 片段化,增强细胞凋亡^[19]。在体内对于注射 LPS 引起的大鼠急性肺损伤,桦木酸可抑制 iNOS 表达增加^[11]。

2.4 抗氧化应激

氧自由基可以促进白细胞趋化,血管通透性升高,产生炎症反应。在二苯基苦酰肼基自由基试验中,500 mg·mL⁻¹ 的桦木酸显示微弱的自由基清除能力,最大抑制可达 26.38 mg·mL⁻¹^[20]。两头尖(竹节香附)可用于治疗关节炎和神经痛,其中的桦木酸对 *N*-甲酰-*L*-甲硫氨酰-*L*-亮氨酰-*L*-苯丙氨酸三肽(fMLP)导致的人中性粒细胞超氧化物产生有弱的抑制作用,而对佛波醇-12-肉豆蔻酯-13-乙酯(PMA)导致的超氧化物无作用,对花生四烯酸导致的超氧化物产生则有弱的增强作用^[21]。桦木酸可抑制 TNF- α 引起的 HUVEC 胞内活性氧簇(ROS)含量增加,达到血管保护作用^[12]。桦木酸还抑制 LPS 引起的 ROS 形成和 LDH 释放,提高内毒素休克小鼠寿命,抑制前列腺素(PGE₂)产生和髓过氧化物酶(MPO)活性^[22]。注射 LPS 引起大鼠急性肺损伤,脂质过氧化增加,谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)活性下降,桦木酸则可提高体内抗氧化能力^[11]。

2.5 免疫调节

调节免疫可影响免疫细胞的抗炎功能和抗炎性细胞因子的分泌,桦木酸能提高小鼠的免疫器官指数,协同促进刀豆素(ConA)或 LPS 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞的增殖活性,提高胸腺淋巴细胞 CD4⁺百分率,脾淋巴细胞的 CD19⁺百分率以及 CD4⁺/CD8⁺的百分比;桦木酸增加绵羊红细胞免疫小鼠溶血空斑数,增强腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力,表明桦木酸对小鼠的细胞免疫、体液免疫功能和非特异免疫有明显的增强作用^[23-24]。

2.6 抑制细胞因子和细胞黏附分子表达

促炎性细胞因子如 IL-1 和 TNF- α 等与炎性细

胞的相互作用在炎症反应发生时发挥主要作用。炎症过程中, 白细胞黏附、穿越血管内皮细胞向炎症部位移动的分子基础在于白细胞与血管内皮细胞表面黏附分子的相互作用, 以及细胞因子等对黏附分子表达的调节。桦木酸对于 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞, 最少能调节 2 组蛋白炎症介质: IL-1 β 和 TNF- α , 桦木酸在 0.625~5 mg·mL⁻¹ 浓度时, 有无 LPS 均可增强巨噬细胞表面 CD₄₀ 分子的表达^[19]。桦木酸抑制小鼠脾细胞分泌细胞因子, 同时抑制 IL-2(Th1 分泌)和 IL-10(Th2 分泌), 表明通过抑制 T 细胞免疫应答发挥抗炎作用^[25]。桦木酸可剂量依赖方式抑制 TNF- α 引起的 HUVEC 表达细胞黏附分子如细胞黏附分子(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 VCAM-1、E-选择素^[12]。LPS 引起的大鼠急性肺损伤, 导致 TNF- α 和转化生长因子(TGF- β 1)表达增加, 桦木酸可下调其表达^[11]。

2.7 抑制炎症性信号通路活化

炎症刺激会激活相关信号通路如核因子- κ B (NF- κ B)通路, 信号通路的活化又会导致细胞因子、黏附分子以及炎症级联效应多种酶的基因表达, 加重炎症反应。桦木酸对神经源性炎症诱导子如树胶脂毒素、二甲苯引发的炎症模型无效, 而对蛋白激酶 C(PKC)激动剂佛波酯类化合物(如 TPA)、藓苔抑制素 1 等引起的炎症模型表现明显抗炎作用, 提示其作用可能依赖体内抑制 PKC^[26]。桦木酸可抑制 TNF、TPA、香烟、冈田酸、IL-1 和 H₂O₂ 不同诱导剂引起的 NF- κ B 活化, 且桦木酸的抑制并非细胞特异性。桦木酸抑制 κ B 抑制蛋白(I κ B α)激酶的活化, 从而去除 I κ B α 的磷酸化和降解。桦木酸抑制 NF- κ B 活化通过肿瘤坏死因子受体(TNFR-1)、TNFR 相关的死亡结构域、TNFR 相关因子 2、NF- κ B 诱导激酶和 I κ B α 激酶, 细胞加入桦木酸可抑制炎症刺激引起的 NF-I κ B α 依赖的报告基因表达及其产物如 COX-2 和基质金属蛋白酶(MMP-9)^[27]。桦木酸阻止 LPS 引起的 I κ B 磷酸化, 从而使得胞浆中 I κ B 水平正常化, 抑制 LPS 引起的人外周血单核细胞(hPBMCs)中 IL-6 产生^[28]。桦木酸血管内皮保护作用也与抑制 TNF- α 引起的 HUVEC 细胞内 NF- κ B 活性增加有关^[12]。桦木酸也可影响 MAPK 和 PI3K-Akt 2 种信号通路, 同时减轻 LPS 引起的 hPBMCs 中 ERK 和 Akt 磷酸化, 从而抑制 COX-2 蛋白表达和 PGE₂ 产生^[22]。

3 讨论

综上所述, 桦木酸可影响与炎症相关的多种细胞、因子和信号, 具有多途径的抗炎作用。炎症与肿瘤、心血管疾病等关系密切, 大量证据显示, 几乎所有的慢性疾病的形成都与慢性炎症有关, 炎症因子的分泌情况始终贯穿于疾病的全过程^[29-30]。抗炎是抗肿瘤实验研究中的一条有效途径, 抗炎剂可以控制肿瘤的发生和发展^[31]。对于桦木酸的抗肿瘤作用而言, 不仅仅是对肿瘤细胞的毒性作用, 而是通过抗炎等多靶点作用途径实现的^[32]。进一步阐明桦木酸抗炎作用机制, 将更加深刻地揭示桦木酸类药物治疗疾病的本质, 为开发新的适应证、指导临床用药提供依据, 具有广阔的开发与应用前景。

桦木酸在植物中分布广泛, 国外研究报道, 在多种药用植物和日常食物如藕、葡萄、苹果、橄榄、熊果、薰衣草、迷迭香、桉叶、银莲花、苦丁茶等中均有桦木酸存在^[33]; 国内研究报道, 在大枣、连翘、酸枣仁、山茱萸、皂角刺、葫芦巴、木瓜、丁香、泽兰、白头翁、刺五加、桑白皮、杜仲、藤黄、酸枣仁、夏枯草、竹节香附等中草药均发现含有桦木酸。传统药物与日常食物对于很多慢性疾病的防治有益, 与其中含有的包括桦木酸在内的天然产物有关^[34]。桦木酸生物活性显著, 无论在合成药物研究领域还是天然药物研究领域, 以及食品、日化等领域, 桦木酸的药用和保健价值值得广泛关注。特别对于中药而言, 桦木酸及其衍生物是一类目前重视不足的重要药效物质基础。桦木酸的抗炎作用与特点, 特别是与其他天然产物的协同作用, 可能是研究中药多成分、多靶点作用机制的一把钥匙。

REFERENCES

- [1] BI Y, XU J Y, WU X M. The advances of anti-HIV-1 drugs [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(1): 461-465.
- [2] LAN P, ZHANG D M, CHEN W M, et al. Advances in the study of structural modifications and biological activities of betulonic acids [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2010, 45(11): 1339-1345.
- [3] ZHANG X J, LING L L, JI Y B, et al. Bioactivities of betulonic acid [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006, 18(1): 508-513.
- [4] MUKHERJEE P K, SAHA K, DAS J, et al. Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera* [J]. Planta Med, 1997, 63(4): 367-369.
- [5] RECIO M C, GINER R M, MANEZ S, et al. Investigations on

- the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(1): 9-12.
- [6] YASUKAWA K, YU S, YAMANOUCHI S, et al. Some lupane-type triterpenes inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin [J]. *Phytomedicine*, 1995, 1(4): 309-313.
- [7] KROGH R, KROTH R, BERTI C, et al. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br [J]. *Pharmazie*, 1999, 54(6): 464-466.
- [8] DEHELEAN C A, SOICA C, LEDTI I, et al. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation [J]. *Chem Cent J*, 2012, 6(1): 137.
- [9] REUTRAKUL V, ANANTACHOKE N, POHMAKOTR M, et al. Anti-HIV-1 and anti-inflammatory lupanes from the leaves, twigs, and resin of *Garcinia hanburyi* [J]. *Planta Med*, 2010, 76(4): 368-371.
- [10] YASUKAWA K, TAKIDO M, MATSUOTO T, et al. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor promotion in mouse skin two-stage carcinogenesis [J]. *Oncology*, 1991, 48(1): 72-76.
- [11] NADER M A, BARAKA H N. Effect of betulinic acid on neutrophil recruitment and inflammatory mediator expression in lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46(1/2): 106-113.
- [12] YOON J J, LEE Y J, KIM J S, et al. Protective role of betulinic acid on TNF-alpha-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 96-101.
- [13] SAABY L, JAGER A K, MOESBY L, et al. Isolation of immunomodulatory triterpene acids from a standardized rose hip powder (*Rosa canina* L.) [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(2): 195-201.
- [14] HUH J E, BAEK Y H, RYU S R, et al. Efficacy and mechanism of action of KHBJ-9B, a new herbal medicine, and its major compound triterpenoids in human cartilage culture and in a rabbit model of collagenase-induced osteoarthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(2): 230-240.
- [15] DUNSTAN C, LIU B, WELCH C J, et al. Alphitol, a phenolic substance from *Alphitonia zizyphoides* which inhibits prostaglandin biosynthesis *in vitro* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(3): 495-497.
- [16] CAO H, YU R, CHOI Y, et al. Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 61(6): 519-524.
- [17] WU CR, HSEU Y C, LIEN J C, et al. Triterpenoid contents and anti-inflammatory properties of the methanol extracts of *ligustrum* species leaves [J]. *Molecules*, 2010, 16(1): 1-15.
- [18] RYU S Y, OAK M H, YOON S K, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris* [J]. *Planta Med*, 2000, 66(4): 358-360.
- [19] YUN Y, HAN S, PARK E, et al. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages [J]. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(12): 1087-1095.
- [20] NGUEMFO E L, DIMO T, DONGMO A B, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of some isolated constituents from the stem bark of *Allanblackia monticola* Staner L.C (Guttiferae) [J]. *Inflammopharmacology*, 2009, 17(1): 37-41.
- [21] YAMASHITA K, LU H, LU J, et al. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 325(1/2): 91-96.
- [22] VIJI V, HELEN A, LUXMI V R. Betulinic acid inhibits endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and pro-inflammatory prostaglandin E(2) production in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(6): 1291-1303.
- [23] YI J E, OBMINSKA-MRUKOWICZ B, DU J Y, et al. Effects of Betulinic acid on immune function and antioxidant activity of mouse peritoneal macrophages [J]. *Acta Nutrim Sin (营养学报)*, 2010, 32(3): 281-285.
- [24] YI J E, YUAN L Y, WEN L X, et al. Effects of betulinic acid on lymphocyte and macrophages in mice [J]. *Acta Vet Zootech Sin (畜牧兽医学报)*, 2011, 42(1): 124-130.
- [25] KU C M, LIN J Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes [J]. *Food Chem*, 2013, 141(2): 1104-1113.
- [26] HUGUET A, DEL CARMEN RECIO M, MANEZ S, et al. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 410(1): 69-81.
- [27] TAKADA Y, AGGARWAL B B. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 [J]. *J Immunol*, 2003, 171(6): 3278-3286.
- [28] VIJI V, SHOBHA B, KAVITHA S K, et al. Betulinic acid isolated from *Bacopa monniera* (L.) Wettst suppresses lipopolysaccharide stimulated interleukin-6 production through modulation of nuclear factor-kB in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(8): 843-849.
- [29] AGGARWAL B B, SHISHODIA S, SANDUR S K, et al. Inflammation and cancer: how hot is the link? [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11): 1605-1621.
- [30] COUSSENS L M, WERB Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.
- [31] SULTANA N, SAIFY Z S. Naturally occurring and synthetic agents as potential anti-inflammatory and immunomodulators [J]. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2012, 11(1): 3-19.
- [32] LASZCZYK M N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy [J]. *Planta Med*, 2009, 75(15): 1549-1560.
- [33] JAGER S, TROJAN H, KOPP T, et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants-rich sources for a new group of multi-potent plant extracts [J]. *Molecules*, 2009, 14(6): 2016-2031.
- [34] YADAV V R, PRASAD S, SUNG B, et al. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer [J]. *Toxins (Basel)*, 2010, 2(10): 2428-246.

收稿日期: 2013-12-18