

知母宁清除活性氧作用的研究

张红雨 王芙媛 李 明¹ 张志义² 李美芬

(中国科学院生物物理所 北京 100101)

(¹深圳银湖南方制药厂三九药业医药研究院生化室 深圳 518029)

摘要 用 ESR 及自旋捕捉技术研究了知母宁 (从中药知母中提取的有四个酚羟基的山酮化合物) 在均相和非均相体系中对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $^1\text{O}_2$ 等几种活性氧的清除、猝灭效果。发现知母宁对 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 均有较强的清除和猝灭作用, 效果好于维生素 E, 并通过动力学方法求得其在均相体系中对 $^1\text{O}_2$ 的猝灭速率常数为 $7.2 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ 。

关键词 知母宁, 活性氧, ESR, 自旋捕捉

近年来, 人们逐渐认识到在辐射损伤、衰老、肿瘤以及免疫性疾病中, 活性氧 ($\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $^1\text{O}_2$) 都起着重要作用^[1]。在肝、肾、脑、肺、消化道等器官缺血再灌注, 特别是在心肌再灌注损伤中活性氧的作用也已受到越来越广泛的重视^[2]。寻找安全有效的氧自由基清除剂, 将可能减轻或避免活性氧引起的心肌再灌注损伤, 提高各种心脏病内、外科治疗的疗效, 对防辐射、抗衰老、防治肿瘤等疾病亦有重要意义。

众所周知, 山酮类化合物有较强的自由基清除作用^[3], 在体内有抗氧化活性。知母宁是从中药知母中分离纯化而来的有四个酚羟基的山酮化合物^[4,5]。以往研究表明它有抑制中枢神经、抗炎、利胆的作用。由于其分子结构与许多天然抗氧化剂相似^[3], 故推测它具有抗氧化作用。因此本文在体外用 ESR 及自旋捕捉技术研究了在均相及非均相体系中知母宁对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $^1\text{O}_2$ 等活性氧的清除和猝灭效果。

1 材料与方法

1.1 材料

知母宁由深圳南方制药厂提供, 纯度为 98%, 淡黄色针状晶体, 微溶于甲醇、乙醇和水。吸收光谱显示在 240、258、318 及 368 nm 有较强吸收, 使用前未作进一步纯化。自旋捕捉剂 2,2,6,6-四甲基哌啶酮 (TEMPONE) 和 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 均为 Aldrich 公司产品。非离子表面活性剂 Triton X-100 (TX-100) 购自英国 FARCO 公司。其余均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用 光照射核黄素或竹红菌乙素 (HB) 产生 $\cdot\text{OH}$, 以 DMPO 捕捉, 生成氮氧自由基 $[\text{DMPO-OH}]^{\cdot[6]}$, 通过测定在加知母宁前后其 ESR 信号 (第二条峰) 强度的

² 通信联系人

变化, 验证知母宁对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用。用同样方法, 即测定加知母宁前后 $[\text{DMPO-OOH}]^{\cdot}$ 自由基信号强度的变化, 研究知母宁对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除效果。

1.2.2 猝灭 $^1\text{O}_2$ 的作用 光照射亚甲基蓝产生 $^1\text{O}_2$, 用 TEMPONE 捕捉, 使生成稳定的氮氧自由基 TAN^[7], 通过测量在加知母宁前后 TAN 的 ESR 信号强度变化, 验证知母宁对 $^1\text{O}_2$ 的清除作用, 并计算猝灭速率常数。

1.2.3 知母宁微乳溶液的配制 由于知母宁在水中溶解性很差, 限制了它的应用, 本文用增溶效果好、对人体损伤小的非离子表面活性剂 TX-100 对知母宁进行增溶。方法是先将一定量的知母宁溶于氯仿中, 然后旋转蒸发去氯仿, 使知母宁附在烧瓶壁上, 加入浓度为 1 mmol L^{-1} 的 TX-100 溶液, 室温下电磁搅拌 40 min, 制得均匀透明的知母宁 TX-100 微乳溶液, 浓度可达 1 mmol L^{-1} 。知母宁在胶束体系中对各种活性氧的清除、猝灭效果也用前述方法研究。

1.2.4 仪器测试条件 顺磁共振测试用 Varian E-109 ESR 波谱仪, X 波段, 100 kHz 高频调制, 调制幅度 $1.0 \times 10^{-4}\text{ T}$, 中心磁场 0.325 T, 时间常数 0.128 s, 微波功率 5 mW, 温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 记录一次微分谱。

光照射用自制的 500 W 卤钨灯光源, 经特制装置滤掉红外线和紫外线, 可见光经透镜聚焦照射样品。用国产 BTY-820 型太阳辐射计测得光照强度为 200 W/m^2 。

2 结果与分析

2.1 均相体系中知母宁抗氧化作用的研究

2.1.1 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果 由于知母宁在标准的产生 $\cdot\text{OH}$ 的体系(H_2O_2 , Fe^{2+})中不稳定, 因此用光照射核黄素产生 $\cdot\text{OH}$ 的方法观察知母宁对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用。由图 1 (b) 可以看出光照射核黄素, EDTA 混合溶液可产生很强的 $\cdot\text{OH}$, 用 DMPO 捕捉后的 ESR 信号波谱参数 ($a\beta^{\text{H}} = 14.9\text{ G}$, $g = 2.0054$) 与 H_2O_2 , Fe^{2+} 体系的相应参数一致。由图 1 (c) 可见, 知母宁对 $\cdot\text{OH}$ 有很强的清除作用。图 2 示出浓度增大, 猝灭作用增强, 符合 Stern-Volmer 方程。在同样实验条件下, V_E 的清除效果不如知母宁, 但 V_c 强于知母宁。抗氧化剂对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效率 E 可按下式计算^[8]:

$$E = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中 h_0 是加抗氧化剂之前产生 $[\text{DMPO-OH}]^{\cdot}$ 的 ESR 信号的第二条峰的高度, h_x 是加抗氧化剂后产生的同样信号的高度。由此可算出此实验条件

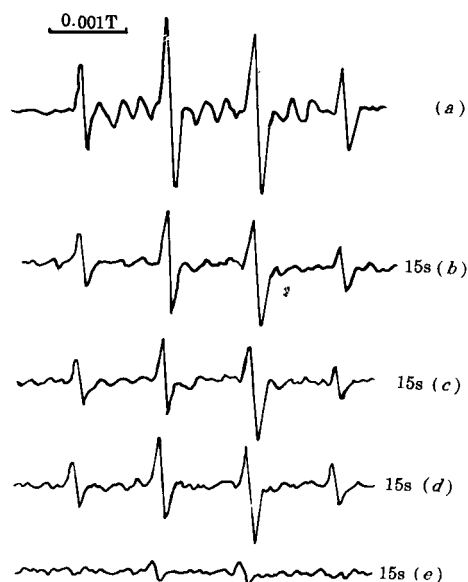


Fig. 1 Scavenging effect of antioxidants on $\cdot\text{OH}$ in DMF- H_2O (1: 4, V: V) system
(a) H_2O_2 (1%), Fe^{2+} (0.1 mmol L^{-1})
(b) Riboflavin (0.25 mmol L^{-1}) EDTA (5 mmol L^{-1}) (c) As in (b), but with chinonin (0.8 mmol L^{-1}) (d) As in (b), but with V_E (0.08 mmol L^{-1}) (e) As in (b) but with V_c (0.08 mmol L^{-1}), DMPO (80 mol L^{-1}) pH 7.4

下知母宁、 V_E 和 V_c 对 $\bullet\text{OH}$ 的清除效果分别为 38.5%、30.8% 和 80.0%。

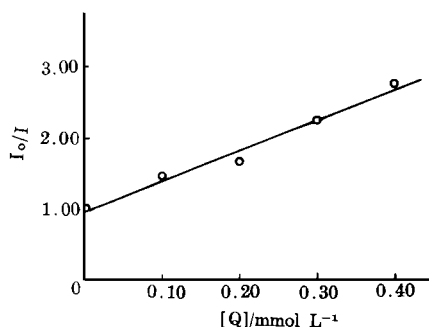


Fig. 2 Stern-Volmer plot of scavenging $\bullet\text{OH}$ of chinonin in DMF- H_2O (1: 4, V: V) system Riboflavin (0.25 mmol L^{-1}), EDTA (5 mmol L^{-1}) DMPO (80 mmol L^{-1}) pH7.4

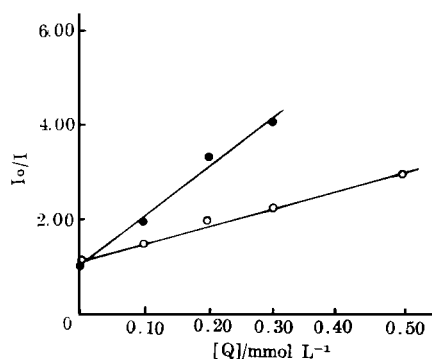


Fig. 4 Stern-Volmer plot of scavenging $^1\text{O}_2$ in DMF- H_2O (1: 4, V: V) system Methylene blue (0.1 mmol L^{-1}), TEMPONE (50 mmol L^{-1}) pH8.0 (•) NaN_3 (°) Chinonin

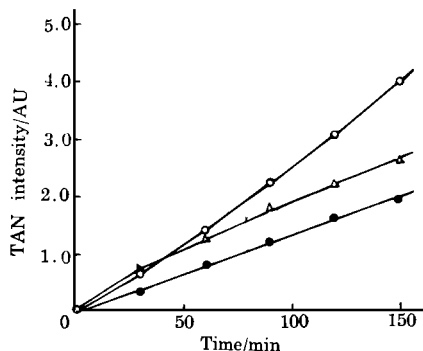


Fig. 3 Scavenging effect of chinonin on $^1\text{O}_2$ (°) Methylene blue (0.1 mmol L^{-1}) ($\triangle$) With chinonin (0.1 mmol L^{-1}) in DMF- H_2O (1: 4, V: V) system (•) With chinonin (0.1 mmol L^{-1}) in TX-100 micelle TEMPONE (50 mmol L^{-1}) pH8.0

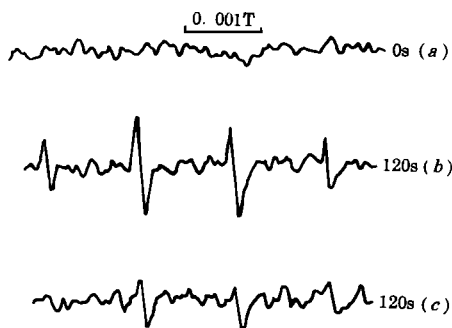


Fig. 5 Scavenging effect of chinonin on $\bullet\text{OH}$ in TX-100 system (a) (b) HB/TX-100 (0.1 mmol L^{-1}) DMPO (80 mmol L^{-1}) pH7.4 (c) As in (b) with chinonin/TX-100 (0.1 mmol L^{-1})

2.1.2 对 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的清除作用 虽然知母宁清除 $\bullet\text{OH}$ 的效率很高, 但它清除 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的作用却不明显, 这与某些天然抗氧化剂清除 $\bullet\text{OH}$ 的能力远高于 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 是相似的^[8], 也与文献 [9] 中知母宁清除 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的能力远低于 SOD 一致。原因可能是与 $\bullet\text{OH}$ 相比, $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的反应活性弱得多有关。

2.1.3 对 $^1\text{O}_2$ 的清除作用 光照射亚甲基兰产生 $^1\text{O}_2$, 用 TEMPONE 捕捉使生成稳定的氮氧自由基 TAN, 其 ESR 信号的强度与 TAN 浓度成正比, 因此在相同光照射时间内, 不同样品 ESR 信号的强度可表示不同体系中 TAN 的相对浓度和间接表示 $^1\text{O}_2$ 的浓度。在相同条件下, 样品中若加入知母宁, TAN 信号变弱, 说明知母宁有猝灭 $^1\text{O}_2$ 的作用 (图 3), 而且如图 4 所示, 猝灭符合 Stern-Volmer 方程。根据文献 [10] 的猝灭动力学公式:

$$I_0/I - 1 = \frac{kq[Q]}{k_T[T] + k_d} \quad (2)$$

式中 I_0 和 I 分别是无猝灭剂和有猝灭剂情况下 ESR 信号的强度, k_q 是猝灭速率常数, $[Q]$ 是猝灭剂浓度, k_T 是捕捉剂的捕捉速率常数, $[T]$ 是捕捉剂浓度, k_d 是被猝灭的物种之衰减速率常数。可知在相同体系中, 相同浓度的两种猝灭剂存在如下关系:

$$(I_0/I - 1)_1 = \frac{kq_1[Q]}{k_T[T] + k_d} \quad (3) \quad (I_0/I - 1)_2 = \frac{kq_2[Q]}{k_T[T] + k_d} \quad (4)$$

而

所以

$$\frac{kq_1}{kq_2} = \frac{(I_0/I - 1)_1}{(I_0/I - 1)_2} \quad (5) \quad kq_1 = \frac{(I_0/I - 1)_1}{(I_0/I - 1)_2} kq_2 \quad (6)$$

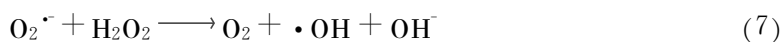
已知 NaN_3 在水中对于 $^1\text{O}_2$ 的猝灭速率常数为 $2.0 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, 应用式 (6) 并结合图 4 结果可求出知母宁对 $^1\text{O}_2$ 的猝灭速率常数 $k^1\text{O}_2 = 7.2 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, 高于 V_E 的猝灭速率常数 $2.6 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1[11]}$ 。

2.2 非均相体系中知母宁抗氧化作用的研究

为了改善知母宁的水溶性, 拓宽其应用范围, 并研究在模拟的生物体系中抗氧化剂对自由基的清除作用, 用非离子表面活性剂 TX-100 对知母宁进行增溶, 不仅得到了浓度较高 (1 mmol L^{-1}) 的知母宁水溶液, 也提供了一个在模拟细胞非均相环境中研究抗氧化作用的简便体系。用增溶于微乳体系的光敏剂竹红菌乙素 (HB) 作为非均相体系产生 $\bullet\text{OH}$ 的来源, 由图 5 可以看出, 在微乳囊泡中知母宁对 $\bullet\text{OH}$ 仍有较强的清除作用。而由图 3 可见, 在微乳体系中, 知母宁对 $^1\text{O}_2$ 的猝灭作用也很强。这说明知母宁即使在表面活性剂的包囊中仍保持较强的抗氧化活性。其原因可能是 $\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ 可穿越胶束的 Stern 层进到内核与知母宁反应。因此在应用中可用胶束增溶的方法改善其水溶性, 这时它仍保持一定的抗氧化活性。

3 讨论和结论

$\bullet\text{OH}$ 是非常活泼和不稳定的氧化性很强的自由基, 能够使机体产生广泛的非特异性的氧化性损伤^[12]。而 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 活性相对较低, 对细胞的直接损伤较小, 一般认为其主要危害是通过金属离子催化的 Haber-Weiss 反应产生强氧化性的 $\bullet\text{OH}$ 导致严重的细胞损伤^[12]:



文献 [13] 认为 $\bullet\text{OH}$ 对心肌细胞的结构和功能的损伤比 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 严重。在离体兔心再灌注中观察到 SOD 对心肌无明显保护作用, 而过氧化氢酶 (CAT) 却能保护心肌的结构和功能, 从而认为 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 与心肌损伤并不直接相关^[13]。本实验证实知母宁在体外有很强的清除 $\bullet\text{OH}$ 的能力, 虽然其清除 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的效果不明显, 但仍然是很有实用前景的天然抗氧化剂。

$^1\text{O}_2$ 不但在某些光敏疾病中起重要作用, 也被认为是主要的脂质过氧化起始因子^[14], 由于它有很高的亲电子反应活性, 在对细胞损伤过程中也起很重要的作用。在非均相体系的研究不仅解决了知母宁的非水溶性问题, 而且提示知母宁在嵌入细胞膜后还将保留很高的抗氧化活性, 这对防止脂质过氧化尤其重要。

参 考 文 献

- 1 Bulkley G B. Surgery, 1983, 94: 407
- 2 Becker L C, Ambroio G. Prog Cardiovasc Dis, 1987, 30: 23
- 3 Takuo O, Takashi Y, Ysutomu H. Active Oxygens, Lipid Peroxides, and Antioxidants, Boca Raton, Tokyo/CRC Press, 1993: 333
- 4 孙洪发, 胡柏林, 丁经业等. 植物学报, 1991, 33: 31
- 5 杨雁宾. 云南植物研究, 1980, 2: 345
- 6 Lai C S, Piette L H. Arch Biochem Biophys, 1978, 190: 27
- 7 Lion Y, Delmelle M, Van de Vorst A *et al.* Nature, 1976, 263: 442
- 8 Zhao B L, Li X J, He R G *et al.* Cell Biophys, 1989, 14: 175
- 9 田亚平, 沈文梅, 李明. 自由基生命科学进展 (第三集). 北京: 原子能出版社, 1995: 5~9
- 10 Foote C S. Siglet Oxygen, New York, Academic Press, 1979: 139~171
- 11 Francis W, Brummer J G. J Phys Chem Ref Data, 1981, 10: 809
- 12 McCord J M. Surgery, 1983, 94: 412
- 13 杨卫东, 朱鸿良, 赵保路. 中国药理学通报, 1990, 6: 118
- 14 Kellog E W, Fridorich I. J Biol Chem, 1975, 250: 8812

STUDIES OF SCAVENGING EFFECTS ON ACTIVE OXYGENS OF
CHINONINZhang Hongyu Wang Fuyuan Li Ming¹ Zhang Zhiyi² Li Meifen*(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)**(¹ Shenzhen Yinhu Nanfang Pharmaceutical Factory, Shenzhen 518029)*

ABSTRACT Chinonin, a kind of xanthonoid compound with four phenolic hydroxyls, is extracted from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge, a sort of traditional Chinese medicine. In this paper, ESR and spin trapping techniques are used to study its scavenging effects on $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ and $^1\text{O}_2$ in homogeneous and heterogeneous system. It is found that chinonin possesses fairly strong scavenging activity on $\cdot\text{OH}$ and $^1\text{O}_2$, which is better than that of V_E . Through kinetic method, quenching rate constant of chinonin on $^1\text{O}_2$ is determined as $7.2 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$.

KEYWORDS Chinonin, Active oxygen, ESR, Spin trapping

²To whom correspondence should be addressed