

青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用

刘 刚, 王 辉, 张先洲, 罗顺德*

(武汉大学人民医院 药学部, 湖北 武汉 430060)

摘 要: 目的 研究青藤碱体外清除氧自由基与抗脂质过氧化的作用。方法 超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 由邻苯三酚自氧化法产生, 采用 Fenton 体系产生羟自由基 ($\cdot OH$), 研究青藤碱对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的清除作用; 用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定 VC- Fe^{2+} 系统诱导大鼠肝匀浆及肝线粒体产生的脂质过氧化物丙二醛 (MDA), 研究青藤碱抗脂质过氧化的作用。结果 青藤碱能清除 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot-}$, 其 EC_{50} 分别为 1.35 和 0.136 mg/mL, 且呈浓度依赖关系, 青藤碱能抑制大鼠肝匀浆自氧化及 VC- Fe^{2+} 系统诱导引起的脂质过氧化。结论 青藤碱具有清除氧自由基和抗脂质过氧化的作用, 对肝线粒体也有保护作用。

关键词: 青藤碱; 氧自由基; 脂质过氧化

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0084-04

Effect of sinomenine on scavenging oxygen free radical and anti-lipid peroxidation

L U Gang, WANG Hui, ZHANG Xian-zhou, LUO Shun-de

(Department of Pharmacy, Renm Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of sinomenine on scavenging oxygen free radical and anti-lipid peroxidation *in vitro*. **Methods** Superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$) induced by the auto-oxidation of pyrogallol and hydroxyl free radical ($\cdot OH$) induced by Fenton system were determined by spectrophotometry. The inhibition on homogenate and mitochondrial lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA), of rat liver induced by VC- Fe^{2+} system was measured by thiobarbituric acid (TBA) colorimetric method. **Results** Sinomenine could significantly scavenge $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$, its EC_{50} were 1.35 and 0.136 mg/mL respectively. Sinomenine could also remarkably inhibit the lipid peroxidation of rat liver homogenate and mitochondria induced by auto-oxidation and VC- Fe^{2+} system. The scavenging and inhibitory effect exhibited in a concentration-dependent manner. **Conclusion** The results indicate that sinomenine possesses the effect of scavenging oxygen free radicals and anti-lipid peroxidation, which shows the protection of liver mitochondria.

Key words: sinomenine; oxygen free radical; lipid peroxidation

青藤碱 (sinomenine) 是从防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd et Wils 及毛青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd et Wils var. *Cinereum* (Diels) Rehd et Wils 的干燥藤茎中提取的一种生物碱单体, 其结构类似于吗啡。近年来大量研究表明, 青藤碱具有抗心律失常、降压、抗炎、镇痛、免疫抑制等多种药理作用^[1,2], 临床上用于治疗心律失常、类风湿性关节炎等多种疾病。本实验研究青藤碱对体外产生的超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和羟自由基 ($\cdot OH$) 的清除作用和对大鼠肝匀浆及肝线粒体脂质过氧化的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂: 青藤碱购自白云山正青制药股份

有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20030114; 硫代巴比妥酸 (TBA)、三氯乙酸 (TCA)、维生素 C (VC) 为中国医药上海化学试剂公司生产; 考马斯亮蓝、牛血清蛋白由南京建成生物工程研究所生产; 番红花红 T、邻苯三酚等均为市售国产分析纯。

1.2 仪器: UV—2201 型紫外分光光度计 (日本岛津); pH S—25 型 pH 计 (上海精科); DY89—1 电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); SHZ—22 水浴恒温振荡器 (江苏太仓医疗器械厂); TL—4 台式离心机 (湖南仪器仪表总厂离心机厂); 3K30 台式冷冻离心机 (Sigma 公司)。

1.3 动物: Wistar 大鼠, 体重 200~230 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 动物合格

* 收稿日期: 2005-04-02

基金项目: 湖北省自然科学基金资助课题 (2001ABB156)

作者简介: 刘 刚, 男, 博士生, 主管药师。Tel: (027) 62036675 Email: liugang-wh@hotmail.com

证为鄂医动字 19-050 号。

2 方法与结果

2.1 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用: 采用邻苯三酚自氧化法^[3]。取 0.05 mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL 于试管中, 置 25℃ 水浴中预热 20 min, 加入 0.1 mL 不同质量浓度供试液, 2.5 mmol/L 邻苯三酚 0.4 mL, 混匀后在 25℃ 水浴中准确反应 4 min, 立即用 8 mol/L HCl 0.1 mL 终止反应, 并在波长 299 nm 处测定吸光度 (A) 值 (以蒸馏水调零), 对照组用 0.4 mL 蒸馏水代替供试液, 同时设立试剂空白管。计算清除率, 根据对数线性回归获得量效曲线, 计算 EC_{50} , 并进行 t 检验。结果见表 1。结果表明, 青藤碱不同质量浓度对 $O_2^{\cdot -}$ 均有清除作用, 且呈量效关系, EC_{50} 为 1.35 mg/mL ($r=0.9916$); VC 的 EC_{50} 为 0.95 mg/mL。

清除率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$

表 1 青藤碱对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Scavenging effect of sinomenine on superoxide anion free radical ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	A	清除率/%
对照	-	0.895 ± 0.015	-
青藤碱	0.25	$0.798 \pm 0.012^{**}$	10.84
	0.50	$0.751 \pm 0.011^{**}$	16.04
	1.00	$0.556 \pm 0.012^{**}$	37.88
	2.00	$0.301 \pm 0.008^{**}$	66.37
	4.00	$0.163 \pm 0.009^{**}$	81.79

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

2.2 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用: 采用 Fenton 反应体系^[3]。 $\cdot\text{OH}$ 由 $\text{EDTA-Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ 产生, 由于 $\cdot\text{OH}$ 可特异性地使番红花红 T 褪色, 根据褪色程度用比色法来衡量 $\cdot\text{OH}$ 的量。反应体系含 0.15 mmol/L、pH 7.4 PBS 1.0 mL, 40 $\mu\text{g/mL}$ 番红花红 T 1.0 mL, 3% H_2O_2 1.0 mL, 0.954 mmol/L EDTA-Fe^{2+} 1.0 mL, 再加入 1.0 mL 不同质量浓度的供试液, 混匀后于 37℃ 保温 30 min, 然后于 520 nm 波长处测定 A 值。空白组以蒸馏水代替供试液, 对照组以蒸馏水代替供试液和 EDTA-Fe^{2+} , 同时设立试剂空白管, 计算清除率, 根据对数线性回归获得量效曲线, 计算 EC_{50} , 并进行 t 检验。结果见表 2。结果表明, 5 个质量浓度青藤碱对 $\cdot\text{OH}$ 的生成都有较强的清除作用, 且呈现良好的量效关系, EC_{50} 为 0.136 mg/mL ($r=0.9910$); 甘露醇的 EC_{50} 为 3.85 mg/mL。

清除率 = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$

2.3 对大鼠肝匀浆脂质过氧化的影响

2.3.1 对大鼠肝匀浆自发性氧化的影响^[4]: Wistar

表 2 青藤碱对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Scavenging effect of sinomenine on hydroxyl free radical ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	A	清除率/%
空白	-	0.0450 ± 0.0010	-
对照	-	0.2150 ± 0.0029	-
青藤碱	0.031	$0.0780 \pm 0.0016^{**}$	19.41
	0.063	$0.1060 \pm 0.0047^{**}$	35.88
	0.125	$0.1326 \pm 0.0024^{**}$	51.53
	0.250	$0.1534 \pm 0.0027^{**}$	63.76
	0.500	$0.1694 \pm 0.0030^{**}$	73.18

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

大鼠禁食 12 h, 次日断头处死。迅速取出肝脏, 置 4℃ 生理盐水中洗净表面残血, 用滤纸吸干水分, 称质量, 用 pH 7.4 的 PBS 在冰浴条件下制成 10% 肝匀浆备用。取肝匀浆 1.0 mL 于试管中, 加入 1.0 mL 不同质量浓度供试液, 对照组以蒸馏水代替供试液, 混匀后于 37℃ 水浴恒温振荡 1.5 h, 取出后加 10% 三氯乙酸 2.0 mL, 0.67% TBA 1.0 mL, 混匀后沸水浴中反应 15 min, 取出后流水冷却, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液在 532 nm 波长处比色, 以空白管调零, 测定 A 值, 计算丙二醛 (MDA) 的生成量和抑制率, 根据对数线性回归获得量效曲线, 计算 IC_{50} , 并进行 t 检验。结果见表 3。大鼠肝匀浆在 37℃ 恒温振荡孵育自氧化后, 氧化产物 MDA 生成量明显增加。青藤碱与肝匀浆共同温育后, 可明显抑制 MDA 的生成, 且呈浓度依赖性变化, IC_{50} 为 2.32 mg/mL ($r=0.9992$)。

抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$

表 3 青藤碱对大鼠肝匀浆自发性氧化反应的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of sinomenine on auto-oxidation reaction of rat liver homogenate ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	MDA/(nmol $\cdot$ g $^{-1}$)	抑制率/%
对照	-	279.5 ± 22.7	-
青藤碱	0.25	$225.6 \pm 10.7^{**}$	19.3
	0.50	$200.0 \pm 15.1^{**}$	28.4
	1.00	$175.9 \pm 14.0^{**}$	37.1
	2.00	$147.7 \pm 12.2^{**}$	47.2
	4.00	$115.9 \pm 8.6^{**}$	58.5

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

2.3.2 对 VC- Fe^{2+} 诱导的大鼠肝匀浆脂质过氧化的影响: 方法同 2.3.1 项, 但反应体系中加入 VC (1 mmol/L) 50 μL 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol/L) 50 μL , 于 37℃ 水浴恒温振荡 1.5 h, 测定 MDA 的生成量, 并计算抑制率。根据对数线性回归求算 IC_{50} ,

并进行 t 检验。结果见表 4。结果表明,肝匀浆经过 VC-Fe²⁺ 的诱导氧化,氧化产物 MDA 的生成量显著增加,不同质量浓度青藤碱与肝匀浆共同温育后可显著抑制 MDA 的生成量,且呈良好的量效关系, IC₅₀ 为 1.94 mg/mL ($r=0.9917$)。

表 4 青藤碱对 VC-Fe²⁺ 诱导的大鼠肝匀浆脂质过氧化反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 4 Effect of sinomenine on lipid peroxidation of rat liver homogenate induced by VC-Fe²⁺ system ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	MDA/(nmol · g ⁻¹)	抑制率/%
对照	-	317.4 ± 22.2	0
青藤碱	0.25	275.4 ± 16.3 ^{**}	13.2
	0.50	233.3 ± 19.7 ^{**}	26.5
	1.00	193.3 ± 12.8 ^{**}	39.1
	2.00	159.5 ± 8.4 ^{**}	49.8
	4.00	116.4 ± 7.8 ^{**}	63.3

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$

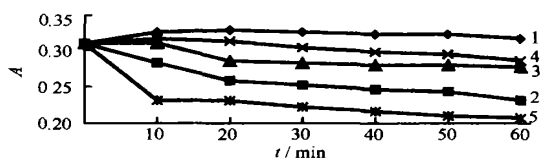
^{**} $P < 0.01$ vs control group

2.4 对 VC-Fe²⁺ 系统诱导的大鼠肝线粒体氧化损伤的影响

2.4.1 线粒体的制备^[5]: 大鼠禁食过夜,次日断头处死,取肝脏于 4℃ 生理盐水中洗净表面残血,滤纸吸干水分,称质量,加入预冷的匀浆介质 (0.01 mol/L 蔗糖, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA-2Na 溶液) 制成 10% 肝匀浆。将匀浆于 4℃、800 × g 离心 20 min, 取上清液于 4℃、10 000 × g 离心 20 min, 沉淀加入预冷的匀浆介质洗涤两次, 每次 4℃、10 000 × g 离心 10 min, 即得纯化的线粒体, 沉淀物用冰冷的匀浆介质制成混悬液, 考马斯亮蓝法测线粒体蛋白的量, 0~4℃ 储存备用。

2.4.2 反应系统: 体积 3 mL, 内含 1.0 mg 线粒体蛋白, 100 μmol/L VC, 50 μmol/L Fe²⁺ 及不同质量浓度的药物, 用 pH 7.4 的 PBS 补足至 3 mL, 37℃ 水浴, 观察线粒体悬液在波长 520 nm 处 A 值的变化。结果见图 1。线粒体肿胀是其损伤的表现, 线粒体肿胀导致其浊度降低, 表现为 A 值下降, 由图 1 可见, 大鼠肝线粒体经 VC-Fe²⁺ 诱导后, 模型组肿胀程度增加, 且随时间的延长, 肿胀越明显。加入不同质量浓度青藤碱后, 在相同时间里, 线粒体的肿胀受到明显的抑制, 且呈现一定的量效关系。

2.4.3 对 VC-Fe²⁺ 诱导的大鼠肝线粒体脂质过氧化损伤的影响: 反应体积 1 mL, 内含线粒体蛋白 0.5 mg, 1 mmol/L VC, 1 mmol/L Fe²⁺ 及各种质量浓度的药物或缓冲液, 置 37℃ 恒温振荡水浴, 1 h 后取出 0.1 mL 样品, 测定 MDA 水平。结果见表 5。



1-对照 2~4-青藤碱 0.5、1.0、2.0 mg/mL 5-模型
1-control 2~4-sinomenine 0.5, 1.0, and 2.0 mg/mL
5-model

图 1 青藤碱对 VC-Fe²⁺ 诱导的大鼠肝线粒体形态改变的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig 1 Effect of sinomenine on dilatation of rat liver mitochondria induced by VC-Fe²⁺ system ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 5 青藤碱对 VC-Fe²⁺ 诱导的大鼠肝线粒体脂质过氧化损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 5 Effect of sinomenine on lipid peroxidation of rat liver mitochondria induced by VC-Fe²⁺ system ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	MDA/(nmol · mg ⁻¹)
对照	-	26.87 ± 1.06
青藤碱	0.5	21.23 ± 0.86 ^{**}
	1.0	18.36 ± 0.76 ^{**}
	2.0	16.62 ± 0.28 ^{**}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group

青藤碱能显著抑制 VC-Fe²⁺ 诱导的肝线粒脂质过氧化产物 MDA 的生成, 其抑制作用在一定范围内呈浓度依赖性。

3 讨论

抗自由基的药物研究近年来受到人们的重视, 尤其是在防治心脑血管疾病领域。机体在代谢过程中产生的氧自由基在某些病理条件下因代谢产物过量, 对机体的生物大分子如蛋白质、脂质、核酸等造成氧化损伤。氧自由基可促发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化 (LPO) 反应, 反应产生的各种中间氧化产物也具损伤作用, LPO 反应的终产物 MDA 可使含氨基的蛋白质、核酸、卵磷脂发生交联并丧失活性, 其中 ·OH 的作用更强。许多病理生理现象, 如衰老、肿瘤、炎症、缺血缺氧等均与氧自由基及其诱导的 LPO 反应有密切关系^[6]。

在 VC-Fe²⁺ 自由基发生系统中, 由 VC 引起的 Fe³⁺ 到 Fe²⁺ 的循环促使 O₂^{·+}、H₂O₂ 和 ·OH 的生成, 诱发多不饱和脂肪酸氧化, 产生脂氧自由基和脂过氧自由基, 引发链式和支链式反应, 使多不饱和脂肪酸进一步发生过氧化形成 LPO。LPO 大部分由肝细胞产生, 其分解也主要在肝脏, MDA 是 LPO 的主要降解产物, 其水平可反映 LPO 的程度。

本实验研究结果表明,青藤碱体外可清除 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$; 可显著降低肝匀浆的自氧化与 $VC-Fe^{2+}$ 诱导产生的MDA; 对于肝线粒体经 $VC-Fe^{2+}$ 诱导氧化引起的MDA 的生成及肿胀度的改变有显著的抑制作用。说明青藤碱具有清除自由基和抗脂质过氧化作用,其抗氧化作用可能与其分子结构中的酚羟基有关^[7,8]。提示青藤碱可作为一种天然抗氧化剂,其药效学和作用机制有待进一步研究。

References

- [1] Jiangsu New Medical Collage. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1996.
- [2] Liu Q, Zhou L L, Li R. General development of sinomenine in chemistry, pharmacology and clinics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(4): 247-249.
- [3] Wang J C, Xin G S, Hu W F, et al. Effects of Ge-132 on oxygen free radicals and lipid peroxidation induced by hydroxyl free radical in vitro [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 1994, 29(1): 23-25.
- [4] Zhao S Q, Sun Y M, Cai Y F, et al. Studies on identification and antioxidative action of banana skin melanin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 496-498.
- [5] Gong G Q, Liu T Z, Li L W, et al. Antioxidative activity of crocetin in vitro [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 306-309.
- [6] Yamamoto M, Shim T. Possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration [J]. *Stroke*, 1993, 24(6): 977-981.
- [7] Hagerman A E, Riedl K M, Alexander J G. High molecular weight plant polyphenolics as biological antioxidants [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(5): 1887-1891.
- [8] Husain S R, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(9): 2489-2492.

葡萄籽原花青素舒张家兔离体主动脉的研究

张团笑¹, 贺 殿², 牛彩琴³, 秦晓民^{1*}

(1. 兰州医学院 生理学教研室, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州医学院 药物化学教研室, 甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃中医学院 内科教研室, 甘肃 兰州 730020)

摘要:目的 研究葡萄籽原花青素(PC)对主动脉环的舒张作用及机制。方法 采用家兔离体主动脉平滑肌标本,以去甲肾上腺素(NA)预收缩主动脉后给予不同剂量PC观察其张力变化,并探讨去除血管内皮、给予NO合酶抑制剂L-NAME、甲烯蓝(MB)、环氧化酶抑制剂吲哚美辛(Indo)和 β 肾上腺素能受体阻断剂普萘洛尔(Prop)对血管张力变化的影响。结果 PC对动脉环静息张力无明显影响,但不同剂量PC可使 1×10^{-6} mol/L NA预收缩的血管出现明显地舒张($r = 0.63$, $P < 0.001$)。去除血管内皮、 1×10^{-4} mol/L L-NAME或 1×10^{-5} mol/L MB可减弱PC的舒张作用,但Indo和Prop无影响。另外,40 μ g/mL PC对无内皮血管环NA和KCl的量效收缩反应明显减弱,且NA和KCl的PD₂分别由对照组的 7.05 ± 2.19 和 1.57 ± 1.37 降低为 6.04 ± 1.77 和 1.01 ± 0.93 。结论 PC对主动脉的舒张作用是通过平滑肌细胞膜上的受体依赖性Ca²⁺通道和电压依赖性Ca²⁺通道抑制Ca²⁺内流,使动脉环舒张,其作用与内皮释放的NO有关。

关键词: 原花青素; 离体主动脉环; 内皮细胞; 血管舒张

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0087-03

Vasodilation of procyanidins from grape seeds on isolated rabbit aorta

ZHANG Tuan-xiao¹, HE Dian², NIU Cai-qin³, QIN Xiao-min¹

(1. Department of Physiology, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Pharmaceutical Chemistry, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China; 3. Department of Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

Key words: procyanidins; isolated aortic rings; endothelial cells; vasodilation

原花青素(procyanidins, PC)是广泛存在于植物中的多酚类化合物,由不同数量的儿茶素或表儿

茶素缩合而成。PC在葡萄属植物种子中的量很高,葡萄盛产于西北,作为药用由来已久,具有补气血

* 收稿日期: 2005-06-20

基金项目: 甘肃省教育厅科研项目(033B-02)

作者简介: 张团笑(1968—),男,甘肃省静宁县人,讲师,1995年毕业于兰州医学院临床系,学士学位,现从事平滑肌生理和药理研究。Tel: (0931) 8611050
E-mail: lanyizhangtx@163.com