

· 药 理 ·

肝胆宁对氧自由基及红细胞氧化性溶血的影响

康九红¹ (兰州大学生物系, 兰州 730000)

张岫兰 (甘肃省人民医院消化科, 兰州 730000)

王 沁 (兰州医学院第一附属医院消化科, 兰州 730000)

李 晶 (山西省晋中地区第二人民医院, 太谷 030800)

摘要 肝胆宁(Oxaphenamidi, Oxa)对Fenton反应生成的羟自由基($\cdot\text{OH}$)有较强的清除作用(SC_{50} 为 $73.1 \mu\text{mol/L}$), 其作用超过 $\cdot\text{OH}$ 的特异性清除剂甘露醇(SC_{50} 为 21.3 mmol/L), 能够清除NBT/PMS/NADH体系产生的超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$), 其 SC_{50} 约为 $145.0 \mu\text{mol/L}$, 相当于 10.3 U 的超氧化物歧化酶(SOD, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的特异性清除剂), 肝胆宁($150 \mu\text{mol/L}$)能有效地抑制由AAPH诱发的红细胞氧化性溶血(抑制 2 h^+ 以上), 显示了较强的防御脂质过氧化的能力。提示肝胆宁对急慢性肝炎、胆囊炎、胆道炎等炎症、促进胆汁分泌及胆结石等的治疗作用可能与其清除自由基及防御脂质过氧化的能力有关。

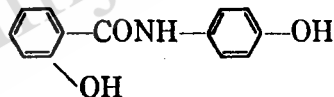
关键词 肝胆宁 羟自由基 超氧阴离子 红细胞溶血

研究表明, 氧自由基以及由它诱导产生的脂质过氧化在急慢性肝炎、胆囊炎、胆道炎等炎症、胆汁分泌及胆色素类结石等生理和病理过程中发挥极其重要的作用, 并发现有些氧自由基清除剂对上述过程有明显改善作用^[1-4]。目前, 肝胆宁(Oxaphenamidi, Oxa)被用于治疗上述诸多有自由基及脂质过氧化物参与的肝胆性疾病。本文报道Oxa对Fenton反应产生的羟自由基(hydroxyl free radicals, $\cdot\text{OH}$)和NBT/PMS/NADH体系产生的超氧阴离子(superoxide anion, $\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除效能, 以及对由AAPH诱发的红细胞氧化性溶血的抑制作用。以其为进一步阐明该药抗肝炎、胆囊炎、胆道炎等炎症, 促进胆汁分泌, 及防治胆结石等作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 肝胆宁(Oxaphenamidi, Oxa)为西安特制药有限公司产品, 结构见下图; 2-脱氧-D-核糖、黄嘌呤氧化酶、硫代巴比妥酸(TBA)、

NADH为美国Sigma公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。



肝胆宁(Oxaphenamidi, Oxa)的分子式

1.2 $\cdot\text{OH}$ 的产生及清除率测定^[5] 利用Fenton反应产生 $\cdot\text{OH}$ 。 $\cdot\text{OH}$ 可使2-脱氧-D-核糖降解, 其降解产物可与TBA反应, 反应产物在 532 nm 处有最大吸收, 该吸收值(A)可以代表 $\cdot\text{OH}$ 生成的相对量。2 ml反应体系中含: $170 \mu\text{L}$ 2-脱氧-D-核糖(30 mmol/L), $40 \mu\text{L}$ 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)(5 mmol/L), $40 \mu\text{L}$ FeSO_4 (2 mmol/L), $200 \mu\text{L}$ 次黄嘌呤(2 mmol/L), 1.5 mL 不同浓度的被测药物及磷酸缓冲液(PBS, 0.15 mol/L , $\text{pH } 7.4$), 空白组不加药物。反应开始加入 $40 \mu\text{L}$ 黄嘌呤氧化酶(0.4 U/mL), 该体系混匀后, 35。反应15 min。取上述培养液1 mL, 加入

1 康九红, 男, 1969年9月生, 博士生。1995年6月毕业于兰州大学生物系生物物理专业, 获硕士学位。同年入兰州大学生物系细胞生物学专业, 攻读自由生物学方向博士学位。

TBA(1% w/v, 溶于0.05 mol/L NaOH) 1 mL, 沸水浴30 min, 迅速冷却, 在532 nm处测A。·OH清除率可按式计算:

$$\text{清除率 (S\%)} = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{药}}}{A_{\text{空}}} \times 100\%$$

A空、A药分别为空白组、药物组在532 nm处A值。

1.3 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生及清除率测定^[6] 产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的反应终体积为3.0 mL, 内含: NADH 73 $\mu\text{mol/L}$, 吩嗪硫酸二甲酯(PMS)15 $\mu\text{mol/L}$, NBT 50 $\mu\text{mol/L}$, Tris-HCl 16 mmol/L, pH 8.0 及不同浓度的药物。反应由PMS引发, 室温下反应进行到不加药空白组在560 nm处A值基本稳定时测定。该吸收值(A)可代表生成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的相对量。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率可按式计算:

$$\text{清除率 (S\%)} = \frac{A_{\text{空}} - A_{\text{药}}}{A_{\text{空}}} \times 100\%$$

A空、A药分别为空白组、药物组在560 nm处A值。

1.4 对红细胞氧化性溶血的抑制^[7] 小鼠眼球取血于盛有抗凝剂的离心管中, 1000 r/min × 10 min 离心, 所得红细胞用150 mmol/L NaCl洗3次后, 用PBS (10 mmol/L, pH 7.4, 含125 mmol/L NaCl) 将红细胞制成10%细胞悬液, 同时加入不同浓度的药物。37°C恒温, 加入等体积的2-偶氮(2-咪唑基丙烷)二盐酸盐(AAPH, 100 mmol/L) 溶液, 振摇, 计时。每30 min从相应体系中吸取两份一定量反应液, 一份用20倍体积NaCl溶液稀释(A), 另一份用20倍体积蒸馏水稀释(B)。离心, 在540 nm处测光吸收值。测定量效关系时只在150 min时取一次样进行测定。溶血率以A/B × 100%表示。

2 结果

2.1 表1的结果提示, 甘露醇和肝胆宁对·OH均有明显的清除效应, 利用线性回归法求得它们的半清除浓度 SC_{50} 分别为21.3 mmol/L和73.1 $\mu\text{mol/L}$ (表1)。肝胆宁对·OH的清除作用远强于甘露醇, 其 SC_{50} 约为甘露醇的290倍。

2.2 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用的研究表明, 肝胆宁对NBT/PMS/NADH系统生成的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有显著的清除作用。

利用线性回归法求得其半清除浓度 SC_{50} 为145 $\mu\text{mol/L}$, 相当于10.3 U的SOD活力(表2)。

表1 肝胆宁对羟自由基($\text{OH}\cdot$)的清除作用($\bar{X} \pm s$, n = 3)

药 物	浓 度	吸 光 度 A_{532}	清 除 率 (%)
对 照 组		0.649 ± 0.012	
甘 露 醇	5	0.513 ± 0.031*	21.03
(mmol/L)	10	0.485 ± 0.037*	25.30
	20	0.345 ± 0.026**	46.90
	40	0.150 ± 0.009**	76.96
肝 胆 宁	20	0.391 ± 0.017**	39.75
($\mu\text{mol/L}$)	40	0.382 ± 0.018**	41.40
	80	0.311 ± 0.018**	52.08
	160	0.186 ± 0.012**	71.23

与对照组比较, *P(0.05), **P(0.01)

表2 肝胆宁对超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用($\bar{X} \pm s$, n = 3)

药 物	浓 度	吸 光 度 A_{560}	清 除 率 (%)
对 照 组		0.418 ± 0.018	
SOD	1	0.395 ± 0.017	5.30
(U)	5	0.302 ± 0.019*	27.62
	10	0.217 ± 0.013**	48.01
	20	0.024 ± 0.002**	94.26
肝 胆 宁	25	0.306 ± 0.013**	26.78
($\mu\text{mol/L}$)	50	0.293 ± 0.012**	29.90
	100	0.246 ± 0.009**	41.08
	200	0.163 ± 0.012**	61.02

与对照组比较, *P(0.05), **P(0.01)

2.3 对由AAPH诱发的小鼠红细胞氧化性溶血抑制作用的研究表明, 随着浓度的增加, 肝胆宁对氧化性溶血的抑制作用也在加强, 当浓度达到150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其抑制力达到稳定的高水平, 此后趋于不变(图1)。当浓度为150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 肝胆宁能够使红细胞氧化性溶血被抑制2 h(图2)。以上结果从量效关系和时效关系两个方面说明肝胆宁具有很强的抗脂质过氧化能力。

3 讨论

机体在代谢过程中可以产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}\cdot$, 过氧化氢(H_2O_2), 单线态氧($^1\text{O}_2$), 它们统称为活性氧自由基。在正常生理状态下, 这些活性氧的产生和清除处于生理性低水平的平衡状态, 对人体是必需的、有利的^[8], 但在某些病理情况下, 无论何种原

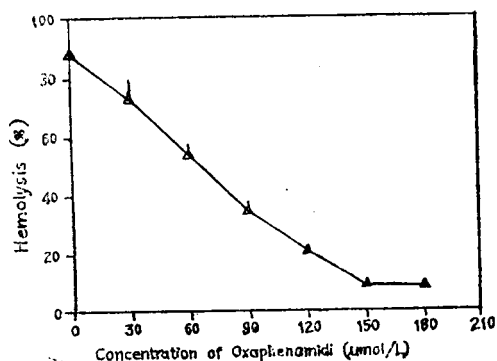


图1 肝胆宁(150 min)抑制小鼠红细胞氧化性溶血的量效关系($n=3, \bar{X} \pm s$)

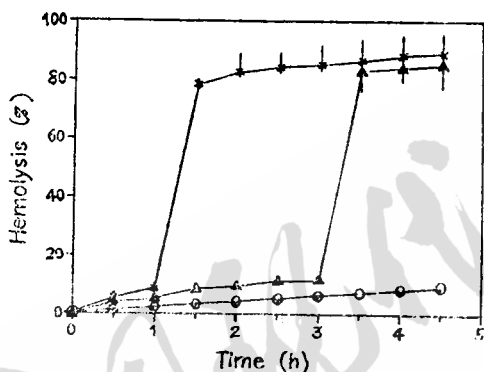


图2 肝胆宁(150 μmol/L)抑制小鼠红细胞氧化性溶血的时效关系($n=3, \bar{X} \pm s$)

* AAPH组; △AAPH+肝胆宁
(150 μmol/L)组; ○对照组

因使这些活性氧代谢失衡,活性氧含量就升高,脂类过氧化水平也升高。这种不平衡就会对机体造成损伤,引发多种疾病,其中有许多属于肝胆性疾病^[1-4]。因此,人们常常想到利用外源性能清除活性氧自由基或防御脂质过氧化的药物来治疗这些与活性氧及脂质过氧化密切有关的疾病。故寻找能应用于临床,且既能清除活性氧自由基,又能有效防御脂质过氧化的药物就显得非常有价值。

本文结果表明,肝胆宁对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 具有显著清除作用。同时,它强烈抑制由AAPH诱发的红细胞氧化性溶血(其根本原因在于红细胞膜发生了严重的脂类过氧化),显示了良好的防御脂质过氧化的能力。作为针对急慢性肝炎、胆囊炎、胆道炎等炎症、胆汁分泌不足及胆结石等疾病的临床用药,

肝胆宁既可以清除活性氧自由基,又能防御脂质过氧化,这就为进一步对肝胆性疾病的发病机理及药物防治与自由基间的关系进行深入研究提供了坚实的实验依据和可能性。肝胆宁是一个带有两个酚羟基结构的化合物,这很可能是有效防御脂质过氧化的根本所在^[9,10]。

参考文献

- 1 沈文梅,田亚平,房征宇. 自由基损伤与肝脏疾病关系的研究. 自由基生命科学进展, 1:35—39, 1993
- 2 郑荣梁. 自由基生物学. 北京,高等教育出版社, 131—135, 248—249, 1992
- 3 刘湘陶,杨正红,王 夔. 胆红素自由基及其与胆色素类结石形成的关系. 自由基生命科学进展, 1:58—63, 1993
- 4 范学工,谭德明,胡国龄,等. 脂质过氧化与病毒性肝炎. 自由基生命科学进展, 1:154—159, 1993
- 5 王爱国,罗广华. 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的TBA反应. 生物化学与生物物理进展, 20(2):150—152, 1993
- 6 Ponti V, Dianzani MV, Cheeseman KJ, et al. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. Chem. Biol. Interact, 23: 281—291, 1978
- 7 Niki E, Komuro E, Takahash M, et al. Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. J. Biol. Chem., 263(36):19809—19814, 1988
- 8 Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys., 280: 1—8, 1990
- 9 Wang PF, Kang JH, Zheng RL, et al. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method. Biochem. Pharmacol., 51: 687—691, 1996
- 10 Li J, Zheng RL, Liu ZM, et al. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides on superoxide and its antioxidation effect. Acta Pharmacol. Sin., 13(5): 427—430, 1992

收稿日期: 1996—06—06

Abstracts in Brief

Effects of Oxaphenamidi on Oxygen Free Radicals and the Oxidative Hemolysis in Erythrocytes

Kang Jiu-hong et al

(Dept. of Biology, Lanzhou Univerisity, Lanzhou 730000)

Abstract The effect of Oxaphenamidi (OXA) on oxygen free radicals and on oxidative hemolysis in mouse erythrocytes were studied. OXA was found to significantly scavenge the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) produced by Fenton reaction ($\text{SC}_{50} = 73.1 \mu\text{mol/L}$), and the scavenging effect of OXA was obviously stronger than that of mannitol, a specific $\cdot\text{OH}$ scavenger ($\text{SC}_{50} = 21.3 \text{ mmol/L}$). OXA was also able to scavenge superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) produced by NBT/PMS/NADH system ($\text{SC}_{50} = 145.0 \mu\text{mol/L}$, which is as strong as 10.3 u of SOD, a specific $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenger). At the same time, OXA was also shown to have strong inhibitory effect on erythrocytes oxidative hemolysis (The hemolysis was inhibited for more than 2hrs). The results suggested that the anti-inflammation activity of OXA, including antihepatitis, anticholecystitis and anticholangitis, and its effects of promoting choleresis and curing cholelithiasis may be, at least partially, related to its scavenging effects on oxygen free radicals and the inhibitory effect on lipid peroxidation.

Key words Oxaphenamidi, Hydroxyl free radical, Superoxide anion, Erythrocytes hemolysis

(on page 8)