

## 丹参素抑制过亚硝酸根引发的鲁米诺发光和蛋白质酪氨酸硝化

廖力夫 周 昕(衡阳 421001 南华大学化学化工系)

**摘要** 目的: 研究在生理 pH 条件下丹参素对过亚硝酸根引发的鲁米诺化学发光反应和蛋白质酪氨酸硝化反应的影响, 以便从分子水平上了解丹参素的药理作用机制。方法: 用发光强度和 430nm 处的吸光度分别对鲁米诺发光产物和酪氨酸硝化产物进行定量。结果: 发光反应和硝化反应都剂量依赖地受到丹参素的抑制。丹参素对反应的抑制强于抗坏血酸和半胱氨酸。结论: 丹参素可有效抑制过亚硝酸根引发的反应, 这应是丹参素药理作用的一种重要分子机制。

**关键词** 丹参素; 过亚硝酸根; 鲁米诺; 化学发光; 酪氨酸; 硝化

### Danshensu inhibit peroxynitrite-induced luminescence and protein tyrosine nitration

Liao Lifu (Liao Lf), Zuo Xin (Zuo X) (Department of Chemistry and Chemical Engineering, Nanhua University, Hengyang 421001)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To study the effect of danshensu on the peroxynitrite-induced luminescence and protein tyrosine nitration at physiological pH so as to understand the medicinal mechanism of danshensu on a molecular level. **METHODS:** The chemiluminescent product of luminescence was evaluated with the peak value of light emission and the nitrated product of tyrosine was measured spectrophotometrically at 430nm. **RESULT:** Danshensu inhibited both the chemiluminescence and the nitration in a concentration-dependent manner. The inhibition of danshensu to the reactions is more effective than ascorbate and cysteine. **CONCLUSION:** Danshensu can inhibit the peroxynitrite-induced reactions effectively. This is an important molecular mechanism of pharmacodynamics of danshensu.

**KEY WORDS** Danshensu, peroxynitrite, luminescence, tyrosine, nitration

丹参素是丹参水溶性组分中的一个重要成分, 已证明其具有保护心肌、抗动脉硬化等重要药效。了解丹参素药理作用的分子机制对于丹参素的合理应用具有重要意义。已有研究表明清除自由基和抗氧化是丹参素药理作用的重要分子机制, 但这些研究都是考察丹参素对羟自由基和超氧阴离子引发的反应的抑制作用<sup>[1]</sup>。近年研究发现, 过亚硝酸根(peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>)是体内产生的除羟自由基和超氧阴离子之外的又一重要细胞毒性物质<sup>[2,3]</sup>。过亚硝酸根可以通过氧化反应、过氧化反应和硝化反应攻击许多生理活性物质, 从而造成细胞损伤引发疾病<sup>[3]</sup>。已有研究证明过亚硝酸根是心肌损伤、动脉硬化等疾病的重要介导者<sup>[2,3]</sup>。因此了解丹参素对过亚硝酸根引发的反应的影响有助于进一步阐明丹参素药理作用的分子机制。过亚硝酸根使鲁米诺氧化发光和使蛋白质酪氨酸硝化是两个用以研究过亚硝酸根的常用反应<sup>[4-6]</sup>。为此, 本文研究了丹参素对过亚硝酸根引发的鲁米诺氧化发光反应和蛋白质酪氨酸硝化反应的影响, 并将丹参素对反应的影响与抗坏血酸、半胱氨酸等抗氧化剂对反应的影响进行了比较。

#### 1 材料与方 法

##### 1.1 试剂与仪器

丹参素为上海医科大学产品, 色谱纯, 使用时用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)稀释至所需浓度; 过亚硝酸根按文献方法合成<sup>[6]</sup>, 其浓度根据在 302nm 处的吸光度(摩尔吸光系数 1670L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup><sup>[6]</sup>)进行确定, 使用时用 0.1mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液稀释至所需浓度; 鲁米诺为 Merck 产品, 用 0.1mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液进行配制; 牛血清白蛋白(BSA)为国产, 使用时用 pH 7.4 的 PBS 稀释至所需浓度。实验中所用的其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

SHG-1 型生物化学发光仪; 754 型紫外可见分光光度计; 723 型分光光度计。

##### 1.2 实验方法

1.2.1 鲁米诺发光反应实验 向发光反应管中加入一定量 pH 7.4 的 PBS 和鲁米诺溶液, 再加入一定量丹参素或其他抗氧化剂, 然后将反应管推入发光仪, 注入一定量过亚硝酸根溶液并同时记录发光强度, 根据相对发光强度确定鲁米诺氧化产物的相对生成量。

1.2.2 蛋白质酪氨酸硝化反应实验 向反应管中加入一定量 pH 7.4 的 PBS 和 BSA 溶液, 再加入一定量丹参素或其他抗氧化剂, 然后加入一定量的过亚硝酸根溶液进行反应。将反应后的溶液用氢氧化钠溶液调 pH 至 11, 以未加过亚硝酸根

的空白溶液为参比液在 428nm 处测溶液的吸光度, 根据吸光度值确定酪氨酸硝化产物硝基酪氨酸(摩尔吸光系数  $4200\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )<sup>[6]</sup>的生成量。

## 2 结果

### 2.1 丹参素等物质对发光反应的影响

丹参素、半胱氨酸和抗坏血酸对过亚硝酸根引发的鲁米诺化学发光反应的影响见表 1。在鲁米诺发光反应实验中, 反应物过亚硝酸根的浓度为  $2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 鲁米诺的浓度为  $50\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 反应液的 pH 值保持在  $7.4\pm 0.1$  的范围内。

表 1 丹参素、半胱氨酸和抗坏血酸对发光反应的影响

组别	浓度 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	相对发光强度 %
对照	-	100.0±5.2
丹参素	5	77.6±4.7
丹参素	10	55.8±5.1*
丹参素	15	41.2±3.6*
丹参素	20	27.5±3.2*
丹参素	25	15.0±3.8*
半胱氨酸	20	71.9±5.5
半胱氨酸	30	62.1±4.8*
半胱氨酸	40	52.6±2.9*
半胱氨酸	50	45.1±5.4*
半胱氨酸	60	37.4±3.0*
抗坏血酸	20	86.9±4.8
抗坏血酸	40	72.8±4.5
抗坏血酸	60	59.8±2.5*
抗坏血酸	80	48.7±5.8*
抗坏血酸	100	38.5±3.3*

$\bar{x}\pm s, n=5, * P < 0.01$ , 与对照组比较

从表 1 中数据可以看出, 丹参素能有效抑制过亚硝酸根引发的鲁米诺化学发光反应, 这种抑制作用剂量依赖地随丹参素浓度的增加而增强。同样地, 半胱氨酸和抗坏血酸也均能抑制发光反应且其抑制作用也均剂量依赖地随半胱氨酸和抗坏血酸浓度的增加而增强。但在反应条件相同的情况下, 丹参素对发光反应的抑制作用明显强于半胱氨酸和抗坏血酸。根据实验数据, 以相对发光强度对丹参素等物质的浓度作图(图略), 可求得丹参素、半胱氨酸和抗坏血酸对发光反应的半抑制浓度  $IC_{50}$  分别为  $13.4\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $43.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $77.8\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 丹参素等物质对硝化反应的影响

丹参素、半胱氨酸和抗坏血酸对过亚硝酸根引发的蛋白质酪氨酸硝化反应的影响见表 2。在蛋白质酪氨酸硝化反应中, 反应物过亚硝酸根的浓度为  $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , BSA 的浓度为  $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 反应液的 pH 值同样保持在  $7.4\pm 0.1$  的范围内。

表 2 丹参素、半胱氨酸和抗坏血酸对硝化反应的影响

组别	浓度	
	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	硝基酪氨酸产量 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
对照	-	42.2±3.1
丹参素	20	31.7±3.2
丹参素	40	23.5±2.8*
丹参素	60	17.0±2.2*
丹参素	80	11.3±2.5*
丹参素	100	7.3±2.5*
半胱氨酸	100	30.1±2.7
半胱氨酸	150	26.8±3.3*
半胱氨酸	200	23.4±3.0*
半胱氨酸	250	21.2±2.0*
半胱氨酸	300	18.8±2.3*
抗坏血酸	100	35.2±2.9
抗坏血酸	200	29.5±1.8
抗坏血酸	300	24.0±1.5*
抗坏血酸	400	20.5±3.0*
抗坏血酸	500	16.9±2.4*

$\bar{x}\pm s, n=5, * P < 0.01$ , 与对照组比较

从表 2 中数据可以看出, 丹参素能有效抑制过亚硝酸根引发的蛋白质酪氨酸硝化反应, 这种抑制作用剂量依赖地随丹参素浓度的增加而增强。同样地, 半胱氨酸和抗坏血酸也均能抑制硝化反应且其抑制作用也均剂量依赖地随半胱氨酸和抗坏血酸浓度的增加而增强。但在反应条件相同的情况下, 丹参素对硝化反应的抑制作用明显强于半胱氨酸和抗坏血酸。根据实验数据, 以硝基酪氨酸产量对丹参素等物质的浓度作图(图略), 可求得丹参素、半胱氨酸和抗坏血酸对硝化反应的半抑制浓度  $IC_{50}$  分别为  $46.2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $255\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $385\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 3 讨论

过亚硝酸根是近年发现的可在体内产生的一种强氧化性物质, 在体内主要由一氧化氮(NO)与超氧阴离子结合生成, 亦可由  $\text{NO}^-$  与氧分子结合生成<sup>[2,3]</sup>。许多研究都认为过亚硝酸根的生成是一氧化氮产生细胞毒性引发疾病的最主要原因, 因为过亚硝酸根是氧化性比过氧化氢强数百倍的物质。

过亚硝酸根反应的机制已有研究报道。过亚硝酸根与有关物质(底物)作用时主要有两种反应方式。第一种反应方式是过亚硝酸根直接与底物碰撞反应, 这种方式反应级数对底物为一级。第二种反应方式是过亚硝酸根先质子化为过亚硝酸(ONOOH)再均裂产生羟自由基和二氧化氮等中间活泼体, 然后中间活泼体再与底物发生作用, 这种方式反应级数对底物则为零级<sup>[2,3,7]</sup>。已有研究表明抗坏血酸和半胱氨酸等抗氧化剂与过亚硝酸根反应时主要是按第一种反应方式进

行<sup>[8,9]</sup>,而过亚硝酸根使鲁米诺氧化发光和使酪氨酸硝化的反应则主要是按第二种反应方式进行<sup>[4-6]</sup>。

本文研究结果表明,丹参素对过亚硝酸根引发的鲁米诺发光和蛋白质酪氨酸硝化反应都有抑制作用,并且这些抑制作用均剂量依赖地随丹参素量的增加而增强,与抗坏血酸和半胱氨酸对过亚硝酸根引发的反应的抑制作用相似。这表明丹参素在抑制过亚硝酸根引发的反应中与过亚硝酸根反应的主要方式是第一种反应方式,即丹参素与过亚硝酸根直接碰撞反应。但丹参素是已知的自由基清除剂,这表明丹参素在与过亚硝酸根直接作用的同时,也可以通过第二种反应方式,即与过亚硝酸根产生的中间活泼体作用的方式进一步抑制过亚硝酸根引发的反应。

实验表明丹参素抑制过亚硝酸根的能力比半胱氨酸和抗坏血酸强得多,过亚硝酸根是心肌损伤、动脉硬化等疾病的重要介导者,半胱氨酸和抗坏血酸是体内的两种基本抗氧化剂。当体内的半胱氨酸和抗坏血酸不足以抑制过亚硝酸根时,将导致过亚硝酸根引发的心肌损伤等疾病。由于丹参素对过亚硝酸根的抑制作用比半胱氨酸和抗坏血酸强得多,当丹参素存在时,就能有效保护机体免受过亚硝酸根损伤。这说明丹参素对过亚硝酸根的抑制是丹参素具有保护心肌等药理作用的又一重要分子机制。

## 参考文献

1 杨春欣. 丹参素的药理研究进展. 中国药理学通报, 1997, 13

(4): 298.

- 2 Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, 1995, 268: L699.
- 3 廖力夫, 袁亚莉, 邓健. 生物活性小分子过亚硝酸根. 化学通报, 1999, (2): 37.
- 4 Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, et al. Peroxynitrite-induced luminal chemiluminescence. *Biochem J*, 1993, 290: 51.
- 5 Beckman JS, Ye YZ, Aneirson P, et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1994, 375: 81.
- 6 廖力夫, 何玉媛, 刘传湘, 等. 柠檬酸铁对过亚硝酸根硝化酪氨酸反应的影响. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24: 450.
- 7 廖力夫, 何玉媛, 刘传湘, 等. 过亚硝酸根分解反应的光度法研究. *衡阳医学院学报*, 1996, 24: 258.
- 8 Bartlett D, Church DF, Bounds PL, et al. The kinetics of the oxidation of ascorbic acid by peroxyxynitrite. *Free Radical Biol Med*, 1995, 18: 85.
- 9 Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J Biol Chem*, 1991, 266: 4244.

收稿日期: 1998-06-29