

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)14-1253-04

双功能自由基清除剂原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物对 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot OH$ 自由基的清除作用

王多宁¹ 杨颖¹ 赵雁武² 弥曼¹ 梅琪柄³ 石明娟¹ 苏兴利¹ 商亚娟¹ 刘永英⁴ (¹ 西安医学院科研中心 陕西西安 710021, ² 武警工程学院经济系 陕西西安 710086, ³ 第四军医大学药理学系 陕西西安 710033, ⁴ 西安闫良六三〇医院 陕西西安 710089)

Double-scavenging activities of protocatechualdehyde-thiosemicarbazone-copper(II)complex to superoxide free radical and hydroxyl free radical

WANG Duo-Ning¹, YANG Ying¹, ZHAO Yan-Wu², MI Man¹, MEI Qi-Bing³, SHI Ming-Juan¹, SU Xing-Li¹, SHANG Ya-Juan¹, LIU Yong-Ying⁴

¹Scientific Research Center, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China, ²Department of Economics, Engineering College of Chinese People's Armed Police Forces, Xi'an 710086, China, ³Department of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ⁴Xi'an Yanliang 630 Hospital, Xi'an 710089, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effects of protocatechualdehyde-thiosemicarbazone-copper(II)complex(PTC) on the serum lipids, the aortic tectology and the activity of antioxidation in liver tissues of the hyperlipemia model rats. **METHODS:** Sixty healthy SD rats were randomly divided into 6 groups(10 rats per group), including control group, hyperlipidemia model group, Fenofibrate drug group(0.04 g/kg) and 3 PTC groups, namely small dosage of PTC(0.005 g/kg) group, moderate dosage of PTC(0.05 g/kg) group, large dosage of PTC(0.25 g/kg) group. Control group was fed by ordinary forage, the other groups were fed by high-lipid forage. From the 5th week, besides the above feeding, control group and model group were administrated intragastrically 5 g/L Carboxy Methyl Cellulose(CMC); Fenofibrate drug group and 3 PTC groups were respectively administrated intragastrically suspension with Fenofibrate and CMC, and suspension with PTC and CMC. After 10-week feeding, the levels of serum lipids were determined; aortic histomorphological changes were observed by the pathological section with the HE staining; the activities of superoxide dismutase(SOD) and catalase

(CAT), and the restraining ability to hydroxyl free radical($\cdot OH$) in the liver tissues were measured. **RESULTS:** PTC could restrain $\cdot OH$ ($P < 0.01$) and enhance the activities of SOD ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Every PTC group had tendencies to decrease cholesterol and to increase high-density lipoprotein cholesterol, but there had no significance in statistics ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** PTC can certainly eliminate the superoxide free radical ($O_2^{\cdot -}$) and $\cdot OH$ in experimental animals *in vivo*.

【Keywords】 protocatechualdehyde-thiosemicarbazone copper(II)complex(PTC); free radical scavengers; superoxides; hydroxyl radical

【摘要】目的: 研究原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物(PTC)对高脂血症模型大鼠血脂、主动脉组织形态学及肝组织抗氧化活性的影响。方法: 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组(每组 10 只), 即正常对照组、高脂血症模型组、药物对照组(即费非诺贝特组 0.04 g/kg), PTC 小剂量组(0.005 g/kg), PTC 中剂量组(0.05 g/kg), PTC 大剂量组(0.25 g/kg)。在以高脂饲料喂养 5 wk 开始, 正常对照组和高脂血症模型组给以 5 g/L 羧甲基纤维素钠水溶液 10 mL/kg 体质量灌胃。其他实验组分别给以 5 g/L 羧甲基纤维素钠水溶液配成药物混悬液灌胃, 每日一次。实验到 10 wk 后全自动生化分析仪测定各组动物血脂, HE 染色做病理切片观察大鼠主动脉形态学变化, 同时测定肝组织超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT)活性及抑制羟自由基($\cdot OH$)的能力。结果: 原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物能使模型大鼠肝组织清除羟自由基($\cdot OH$)的能力提高($P < 0.01$), SOD 的活性增强($P < 0.01$ 或 0.05); 各剂量组均有降低血清胆固醇和提高血清高密度脂蛋白(HDL-C)含量的趋势, 但无统计学意义。结论: 原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物在实验动物体内的确有清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)和羟自由基($\cdot OH$)的双功能作用。

【关键词】 原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物; 自由基清除剂; 超氧化物类; 羟自由基

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A

收稿日期 2006-12-30; 接受日期 2007-03-14

基金项目 陕西省卫生厅科研基金项目(04D15)

作者简介 王多宁, 高级实验师。Tel (029)86177466 Email: wang-duoning@sohu.com

0 引言

研究表明, 许多疾病的发生和发展均涉及自由基的损伤作用。自由基的过度生成会导致人体氧化损

伤,使人出现疾病和衰老加速。人在年轻的时候,过氧化物、自由基和抗氧化剂、自由基清除剂处于一种相对平衡状态,在受外界不良因素的影响或随着年龄增长,体内自由基的生成增加,抗氧化酶、自由基清除剂活性降低或生成减少,使这种平衡紊乱,就会出现疾病、衰老等不健康状态。由于自由基的多态性和反应的多种形式,单一自由基清除剂或抗氧化剂虽在实验室取得明显效果,但转化为有效产品服务人类,一直是个难题。天然酶如 SOD 虽然具有特异的清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的作用,在国外已进行了临床应用,但由于其价格昂贵,且在稳定性、膜穿透性、生物利用度和免疫原性等方面的原因而受到限制;另外 SOD 在歧化 $O_2^{\cdot-}$ 的过程中,有可能通过 Haber-Weiss 反应产生毒性更强的 $\cdot OH$ 而对机体产生更大的危害。因此,寻找高效、低毒、多功能自由基清除剂就成为当前人们很感兴趣的研究课题,尤其以席夫碱为配体的金属 SOD 模型配合物的合成、表征及构效关系的研究倍受关注^[1]。

我们的实验以丹参的有效成分原儿茶醛和氨基硫脲为主要原料,合成了原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物,并初步研究了其体外对氧自由基的清除作用和体内生物学效用^[2-3],本实验用高脂血症大鼠动物模型,观察了原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($\cdot OH$)的清除作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 SD 大鼠,清洁级,体质量 180 ~ 200 g,由第四军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(军)2002-006。

1.1.2 药品 原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物(PTC),由本室合成,非诺贝特,法国利博福尼制药公司生产(批号 84564)。

1.1.3 主要试剂 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、羟自由基($\cdot OH$)测定试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。

1.1.4 仪器 日立 7080 型全自动生化分析仪;721 分光光度计,上海第三分析仪器厂;DG3035 酶联测定仪,华东电子管厂;均质机,上海弗鲁克机电设备有限公司;TDL-5 低速离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 采用高脂饲料喂养 SD 大鼠复制高脂血症模型。选用 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,适应性饲养 1 wk 后,按性别随机分为 6 组:即正常对照组、模型组、非诺贝特组(0.04 g/kg 体

量)、PTC 小剂量组(0.005 g/kg 体质量)、PTC 中剂量组(0.05 g/kg 体质量)、PTC 大剂量组(0.25 g/kg 体质量),每组 10 只。正常对照组喂普通饲料,其他 4 组均喂高脂饲料(高脂饲料配方 20 g/kg 胆固醇、3 g/kg 去氧胆酸钠、75 g/kg 猪油、50 g/kg 蛋黄粉、852 g/kg 基础饲料混均匀压成块料),均自由摄食、饮水。

1.2.2 给药 自实验第 5 周开始,正常对照组、模型组以 5 g/L 羧甲基纤维素钠水溶液 10 mL/kg 体质量灌胃,其他组皆用 5 g/L 羧甲基纤维素钠水溶液配成药物混悬液灌胃,每日一次。实验周期共 10 wk。

1.2.3 样品制备及检测

1.2.3.1 取血及血脂测定 实验 10 wk 后,禁食不禁水 12 h,断头取血,3500 r/min 离心 10 min 取血清。胆固醇(CHOL)及三酰甘油(TG)采用终点法,高密度脂蛋白(HDL-C)采用一步法测定。试剂盒由北京利德曼生化技术有限公司生产。

1.2.3.2 取组织及做 SOD, CAT 及清除 $\cdot OH$ 活性测定 大鼠断头处死后,立即取肝脏,用生理盐水清洗,立即置低温冰箱(-40℃)备用。在测定之前,在冰浴中用生理盐水制成不同浓度的组织均浆,按试剂盒说明做 SOD, CAT 及清除 $\cdot OH$ 活性测定,同时用考马斯亮蓝法^[4]测定组织均浆中的蛋白含量。

1.2.3.3 病理形态学观察 断头处死动物,快速在主动脉弓与胸主动脉交界处取约 1 cm 血管,用生理盐水轻轻冲洗后,置 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,制备石蜡切片,HE 染色,光镜观察病理改变。

1.2.3.4 数据处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件包进行统计处理,组间比较用方差分析,两两比较用 S-N-K。

2 结果

2.1 PTC 对大鼠血脂含量的影响 高脂血症模型组大鼠血清 CHOL, HDL-C 较正常对照组升高,有显著性差异($P < 0.05$),TG 无显著差异,非诺贝特组与模型组比较,血清 CHOL 降低, HDL-C 升高,有显著性差异($P < 0.05$),其他组无显著性差异;另外,由于实验动物性别差异较大,测定的标准差相对较大,其结果见表 1。

2.2 主动脉壁组织形态学变化 实验大鼠主动脉 HE 染色光镜病理切片显示,正常对照组动脉内膜光滑,内皮细胞完整,内膜下间隙较小,平滑肌细胞排列整齐,胞浆染色红染,模型组内皮细胞广泛损伤脱落,脂质沉积,见平滑肌细胞胞浆空泡状,胞浆疏松淡染,平滑肌细胞排列紊乱,可见有巨噬细胞,药物对照非

诺贝特组内膜光滑完整,平滑肌细胞排列较整齐,有增生,胞核密度增加,一些平滑肌细胞有空泡状改变;PTC各剂量组血管平滑肌均排列整齐,内皮完整,平滑肌细胞脂质沉积模型组比较明显减轻,可见巨噬细胞。见图1。

表1 PTC对大鼠血脂含量的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CHOL	TG	HDL-C
空白对照	10	1.010 ± 0.250	1.625 ± 0.385	1.207 ± 0.508
模型	9(1)	1.729 ± 0.389 ^a	1.542 ± 0.441	0.693 ± 0.261 ^a
非诺贝特	9(1)	1.287 ± 0.414 ^b	1.336 ± 0.446	1.244 ± 1.268 ^b
PTC小剂量 (0.005 g/kg)	9(1)	1.438 ± 0.401	1.452 ± 1.257	0.871 ± 0.236
PTC中剂量 (0.05 g/kg)	9(1)	1.524 ± 0.423	1.673 ± 1.389	1.071 ± 0.365
PTC大剂量 (0.25 g/kg)	7(3)	1.488 ± 0.361	1.170 ± 0.301	0.930 ± 0.390

^a*P* < 0.05 vs 空白对照; ^b*P* < 0.05 vs 模型; ()内为死亡动物数。

2.3 PTC对实验大鼠SOD, CAT活性的影响 实验大鼠肝组织SOD活性,模型组与正常对照组比较,有下降趋势,但无统计学意义;PTC各剂量组与模型组、正常对照组比较均增高,有差异(*P* < 0.05),PTC小剂量组增高更加明显(*P* < 0.01)。而大鼠肝组织CAT活性,模型组与正常对照组比较,有下降趋势,PTC各剂量组与模型组、对照组比较都有增高趋势,但无统计学意义。见表2。

2.4 PTC对大鼠肝组织抑制·OH的活性作用 实验大鼠肝组织抑制·OH的活性测定结果,模型组与正常对照组比较,其抑制·OH的活性降低(*P* < 0.01),而PTC各剂量组及非诺贝特组与模型组比较,其抑制·OH的能力均增强(*P* < 0.01),且PTC组有随剂量的增大而增强的趋势(表2)。

3 讨论

心脑血管疾病是导致人类死亡的首位原因,而动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是众多心脑血管病的主要病理基础。多年来,对于动脉粥样硬化的发病机制和预防治疗,医学科学工作者进行了不懈的探讨,已取得了很大成就。但是,由于动脉粥样硬化是一个十分复杂的病理过程,其详细的发病机制至今尚未完全明确。代谢综合征(MetS)是早期动脉粥样硬化患者发生血管疾病的高风险状态。MetS患者体内的脂蛋白中低密度脂蛋白(LDL)增高,这对氧化条件更加敏感。脂蛋白氧化在体外通过酶的或非酶的抗氧化剂可以被抑制,但高密度脂蛋白(HDL)在保护

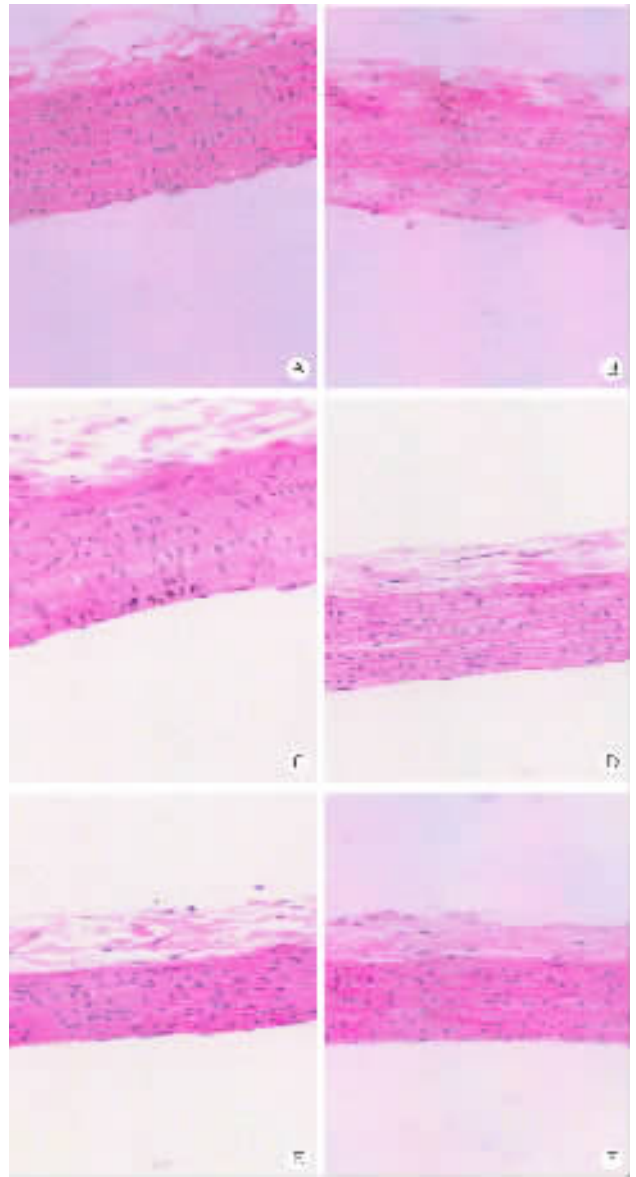


图1 实验大鼠主动脉组织病理改变 HE ×40
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 非诺贝特组; D: PTC小剂量组; E: PTC中剂量组; F: PTC大剂量组。

表2 PTC的清除自由基作用 (U/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD	CAT	·OH
正常对照	10	365.6 ± 111.8	19.55 ± 6.09	602.36 ± 118.09
模型	9(1)	300.6 ± 116.0	17.22 ± 4.37	237.48 ± 117.93 [°]
非诺贝特	9(1)	277.7 ± 105.3	23.39 ± 7.44	645.55 ± 87.09 ^b
PTC小剂量 (0.005 g/kg)	9(1)	542. ± 113.4 ^{bc}	22.85 ± 7.75	756.25 ± 159.94 ^b
PTC中剂量 (0.05 g/kg)	9(1)	437.3 ± 115.5 ^{ac}	21.29 ± 4.46	764.42 ± 198.52 ^b
PTC大剂量 (0.25 g/kg)	7(3)	471.6 ± 149.4 ^a	22.05 ± 11.41	938.01 ± 145.21 ^b

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 模型; [°]*P* < 0.01 vs 正常对照; ()内为死亡动物数。

LDL 不被氧化过程中也发挥了关键性的作用^[5]。高脂血症与 AS 有密切的关系,尤其是胆固醇与三酰甘油皆增高的,患 AS 的危险性更大。目前关于 AS 起因的一个流行的理论认为,AS 开始于血管内皮细胞的损伤,引起一些血循环中的单核细胞浸润到内膜下,并在血管壁上成为巨噬细胞,活化了的单核细胞和巨噬细胞分泌 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 和水解酶损伤邻近细胞。巨噬细胞释放因子可以刺激平滑肌细胞增生。巨噬细胞释放血小板刺激因子使血小板黏附到损伤的内皮细胞上,进一步引起释放其他使平滑肌细胞增生的因子^[6]。在生物体内自由基的产生与消除是一个动态平衡的过程,自由基充当了普通反应介质的作用,它受到生物反应网络中其他生物活性分子的作用和调控^[7],自由基的产生与消除失衡,可能导致疾病的发生,如动脉粥样硬化。

关于高脂蛋白血症,按照高脂血症的定义,无论是胆固醇含量增高,还是三酰甘油的含量增高,或是两者皆增高,统称为高脂血症(hyperlipemia)。对于高脂蛋白血症模型,本实验采用高脂饲料喂养的方法,到实验的第 10 wk 结束测定,模型组血清胆固醇、高密度脂蛋白含量均增高,较正常对照组比较,相差显著($P < 0.05$),三酰甘油变化不大,且实验动物的性别间差异较大。从实验大鼠主动脉组织形态学变化看,高血脂症模型组内皮细胞广泛损伤脱落,脂质沉积,见平滑肌细胞胞浆空泡状,胞浆疏松淡染,平滑肌细胞排列紊乱,内膜可见巨噬细胞,说明模型复制成功。

我们的实验设计是基于,原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物从其分子结构上看,酚羟基和铜离子,具有清除 $O_2^{\cdot-}$ 的作用,而硫脲具有清除 $\cdot OH$ 的作用,设想二者在体内具清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的双功能作用。

我们的实验结果表明,PTC 确能显著提高模型大

鼠肝组织抑制 $\cdot OH$ 的能力,增强 SOD 活性,且其作用随剂量的增大而增强;而对 CAT 的活性作用影响较小,只有升高趋势,但无统计学意义;从组织形态学变化看,PTC 各剂量组血管平滑肌均排列整齐,内皮完整,平滑肌细胞脂质沉积与模型组比较明显减轻,这说明原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物在体内确有清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 自由基的能力;给与适当剂量的原儿茶醛缩氨基硫脲铜(II)配合物可以减轻高脂血症大鼠血管内皮细胞的病理性损伤。

【参考文献】

- [1] Zhu XD, Wang CG, Le ZF, et al. Synthesis, characterization and scavenger effect on $O_2^{\cdot-}$ of copper(II) complexes derived from thiosemicarbazide[J]. Synth React Inorg Met Org Chem, 1991, 21(9): 1365-1373.
- [2] 王多宁,莫简,孙淑芬,等. SOD 模拟物 PTC 对 $O_2^{\cdot-}$ 介导的氧化损伤的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(7): 580-582.
- [3] 王多宁,田芙蓉,赵雁武,等. PTC 对 2Gy 全身照射小鼠辐射损伤的防护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2001, 21(1): 45-46.
- [4] 王多宁,田芙蓉,赵雁武. 考马斯亮蓝微盘比色法测定蛋白质含量[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(6): 528-529.
- [5] Hansel B, Kontush A, Bonnefont-Rousselot D, et al. Alterations in lipoprotein defense against oxidative stress in metabolic syndrome[J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(6): 501-509.
- [6] 孙存普,张建中,段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社, 1999: 249-250.
- [7] Mo J. A novel theory: Biological processes mostly involve two types of mediators, namely general and specific mediators endogenous small radical such as superoxide and nitric oxide may play a role of general mediator in biological processes[J]. Med Hypotheses, 2005, 65: 728-735.

编辑 许福明