

研究简报

阿糖胞苷对羟自由基的清除作用

鲁纯素 付 蕪 邹安庆*

(北京医科大学药学院, 物理化学教研室)

近年来, 有关自由基与癌的研究已被广泛重视。羟自由基($\cdot\text{OH}$)是最强的氧化剂之一, 甚至能引起连 KMnO_4 都不能引起的反应。 $\cdot\text{OH}$ 具有细胞毒素, 因此 $\cdot\text{OH}$ 自由基抑制剂的研究, 将会对癌的预防和治疗有一定作用。实验证明阿糖胞苷对羟自由基有一定的清除作用, 其清除率随药物浓度的增加而加大, 同时证明它对羟自由基的生成速率也有一定抑制作用。

材料和方法

药品及试剂

阿糖胞苷为我校制药厂生产, 其他试剂如 H_2O_2 , EDTA, 苯甲酸均为市售分析纯。实验用水为去离子水再进行蒸馏。

羟自由基的生成与检测方法

1. Co^{60} 照射法 将含有 30 mmol 苯甲酸的磷酸缓冲溶液 ($\text{pH}=7$), 用 Co^{60} 照射 10 min, 距 Co^{60} 源为 30 cm, 剂量为 1000 rad, 照射后产生的 $\cdot\text{OH}$, 即被苯甲酸捕获。用岛津 RF-540 型荧光分光光度计测量羟基苯甲酸的荧光强度。

2. 化学发生方法 加 H_2O_2 于含有 30 mmol 的苯甲酸及 0.5 mmol 的 $\text{Fe}(\text{II})$ - EDTA 的磷酸缓冲溶液中, 同时通入 N_2 , 赶走 O_2 , 用同样方法测定羟基苯甲酸的荧光强度。

3. 荧光检测 由苯甲酸捕获的羟基生成羟基苯甲酸, 在 300 nm 的激发波长照射下, 荧光峰在 410 nm。由于羟基苯甲酸可以形成 2-, 3-, 和 4-, 三种异构体, 且 2-, 和 3-, 在同一激发波长照射下, 产生的荧光峰也相同, 但 2- 的荧光强度高于 3-⁽¹⁾。因此采用相对的研究方法, 分别测定加入阿糖胞苷与不加时荧光强度的变化, 以苯甲酸溶液为对照, 求得清除率与抑制率。

用化学动力学方法, 检测不同浓度的阿糖胞苷对羟自由基生成速率的抑制作用。采用如上所述的化学发生方法产生羟自由基, 加上 H_2O_2 启动反应, 跟踪反应时荧光强度的变化, 10 s 钟记数一次, 反应 2 min, 将所测荧光强度对时间进行线性回归, 求得直线斜率即此反应的初速度 V_0 。

结 果

一. 阿糖胞苷对羟自由基有明显的清除作用, 其清除能力与加入阿糖胞苷的量有关, 随其浓度的增加而加大。参见图 1 与图 2。

本文于 1986 年 8 月 26 日收到。

* 北京医科大学药学院, 仪器中心

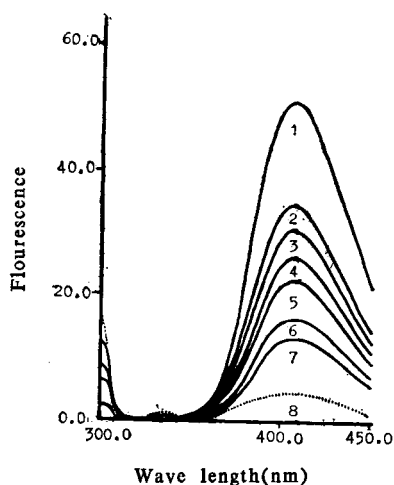


Fig 1. Changes in the fluorescence of $\cdot\text{OH}$, generated by Co^{60} radiolysis which was scavenged by cytosine arabinoside. 1. Benzoic acid as control, 2~7 various concentrations of cytosine arabinoside (mg/ml), 8. Blank. (2=0.144; 3=0.216; 4=0.288; 5=0.36; 6=0.576; 7=0.72)

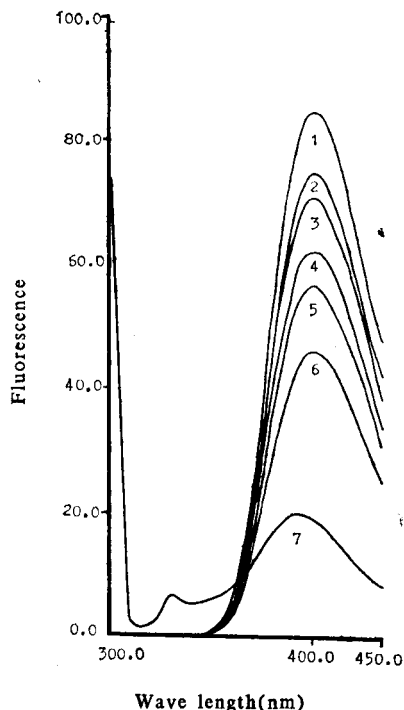


Fig 2. Changes in the fluorescence of $\cdot\text{OH}$, generated by Fe-FDPA with H_2O_2 in aqueous solutions, which was scavenged by cytosine arabinoside. 1. Benzoic acid as control, 2~6 various concentrations of cytosine arabinoside (mg/ml), 7. Blank. (2=0.072; 3=0.144; 4=0.216; 5=0.288; 6=0.36)

$$\text{清除率} = \frac{\text{苯甲酸对照溶液的荧光值} - \text{加入阿糖胞苷后的荧光值}}{(\text{对照} - \text{空白}) \text{荧光值}}$$

将所测荧光值及求得的清除率列于表 1。

Tab 1. Scavenging effect of cytosine arabinoside hydrochloride on $\cdot\text{OH}$

Drug	Generation of $\cdot\text{OH}$ by Co^{60} radiolysis			Generation of $\cdot\text{OH}$ by Fe-EDTA + H_2O_2		
	Concentrations	Fluorescence	%	Concentration	Fluorescence	%
	mg/ml	Ex. 300nm Em. 410nm	Scavenging	mg/ml	Ex. 300nm Em. 410nm	Scavenging
Cytosine arabinoside	0.72	13.6	81.0	0.36	46.0	58.7
	0.576	16.5	74.7	0.288	56.3	43.0
	0.36	22.7	61.3	0.216	62.0	34.3
	0.288	26.1	54.0	0.144	72.8	20.8
	0.216	30.5	44.5	0.072	74.6	15.0
	0.144	34.4	36.1			
Benzoic Acid (as control)		51.1			84.4	
Blank		4.8			19.0	

二. 阿糖胞苷对羟自由基的生成速率(V_0)有明显的抑制作用, 其抑制率随阿糖胞苷的浓度增加而增加。参看表 2。

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{苯甲酸溶液的反应速率}(V_0) - \text{加入阿糖胞苷的 } V_0'}{V_0}$$

Tab 2. Inhibition ratio of cytosine arabenoside hydrochloride on $\cdot\text{OH}$
 $V_0 = 14.057 \times 10^{-2}$ (benzoic acid as control compound)

Conc. of cytosine arabenoside (mg/ml)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
$V_0' \times 10^2$	11.949	11.489	9.274	6.785	5.927
% Inhibition	15.0	18.3	34.0	51.9	57.8

讨 论

体内很多物质均可形成自由基, 当前研究比较深入的是与氧代谢有关的几种自由基, 最重要的有超氧负离子自由基(O_2^-)和羟自由基($\cdot\text{OH}$)。 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 对一些生物分子的攻击, 又可产生其他自由基, 如脂质过氧自由基, 嘧啶自由基, 嘌呤自由基等。因此体内许多自由基反应都与氧自由基有关^(2,3)。在体内由氧直接变为 $\cdot\text{OH}$ 的反应尚未见到, 但是由 O_2 可生成 O_2^- , O_2^- 又可生成 $\cdot\text{OH}$ ^(4,5)。 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 对机体可造成损害, 如脂质过氧化的损害, DNA, RNA 交联和氧化所造成的损害, 蛋白质、氨基酸交联和氧化所造成的损害等, 而 $\cdot\text{OH}$ 的损害作用要比 O_2^- 强⁽⁶⁾。体内存在许多清除自由基和抑制自由基的体系, 如超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT), 各胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等, 可以有利地清除 O_2^- , H_2O_2 和 ROOH 等活性氧, 使之不能继续发生自由基反应。实验证实, 在肿瘤细胞中 SOD 的含量较正常为低⁽⁷⁾, 这样癌细胞将不能很好地清除 O_2^- , 从而使正常细胞更容易受到 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 的攻击。因此自由基的清除剂可对癌的预防和治疗起一定的作用。从抗自由基作用来对抗癌药物的研究可进一步了解这些药物的抗癌机理。实验证明阿糖胞苷是具有清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用机理。

自由基的反应是非常快的, 且易受各种因素的影响, 采用荧光法测量 V_0 时, 数值容易波动, 故我们测量的数值均为五次实验以上的平均值。由于我们不能求得 2-, 3-, 和 4-, 羟基苯甲酸的绝对量, 故有关此反应的动力学参量不能求出, 这方面尚需进一步研究, 以便进一步探求反应机理。

关键词 阿糖胞苷; 羟自由基

参 考 文 献

1. Baker MS and Cebicki JM. The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals. *Arch Biochem Biophys* 1984;234:4641.
2. Fridovich I. The biology of oxygen radical. *Science* 1978;201:895.
3. Halliwell B. and Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1.
4. McCord JM. and Day ED. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett* 1978;86:139.
5. Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *Ibid* 1978;86:139.
6. Halliwell B, et al. The biological significance of the Haber-Weiss reaction. In: Bannister WH and Bannister JV, eds. *Biological and Clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase*. New York: Elsevier/North-Holland, 1980:32~40.
7. Oberley LW and Bueltner CR. Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Research* 1979; 39:1141.

SCAVENGING EFFECTS OF CYTOSINE ARABINOSIDE HYDROCHLORIDE ON HYDROXYL FREE RADICAL

LU Chun-Su, FU Pin and ZOU An-Qing

(Department of Physical Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing)

ABSTRACT The cell damages caused by superoxide free radical ($O_2^{\cdot-}$) include a series of biochemical processes, including lipid peroxidation, DNA and chromosomal damage as well as deactivation of enzyme. It has been suggested that the intrinsic attacking agent is hydroxyl free radical ($\cdot OH$), which is generated through Fenton reaction. Thus, any $\cdot OH$ scavenging agent may inhibit the relevant cell damage. Cytosine arabinoside was found to be able to scavenge $\cdot OH$ generated by Co^{60} radiolysis and $Fe(II)$ -EDTA with H_2O_2 in aqueous solutions. Determination of the fluorescence of hydroxylated derivatives from benzoate was used to estimate the level of $\cdot OH$. The scavenging percentage and inhibition ratio of $\cdot OH$ by cytosine arabinoside were measured.

Key Words Cytosine arabinoside; Hydroxyl free radical