

黄皮酰胺的抑制脂质过氧化和脑保护作用

刘云 石成璋 张均田

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 黄皮酰胺是类似脑复康结构的一种化合物。实验表明 po 能明显延长小鼠断头后的张口呼吸时间和sc 亚硝酸钠225 mg/kg 后的动物存活时间。po 黄皮酰胺100 mg/kg · bid × 3 能抑制由po 50% 乙醇(15 ml/kg)诱发小鼠肝脂质过氧化反应, 使TBA反应值下降, 明显激活肝和脑组织胞浆液中谷胱甘肽过氧化酶的活力。大鼠脑基底动脉条收缩实验结果表明, 黄皮酰胺 10^{-5} mol/L 可明显抑制由5-HT, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 和花生四烯酸引起的血管收缩, 提示黄皮酰胺有缓解血管痉挛, 增加脑血流量的作用。

关键词 黄皮酰胺; 脑保护作用; 脂质过氧化反应; 谷胱甘肽过氧化物酶

黄皮酰胺 (clausenamide) 是从植物黄皮中分离出来的一种吡咯烷酮类化合物, 基本结构类似脑复康 (见图 1)。实验证明, 它能明显改善由缺氧和电休克引起的记忆障碍, 作用比脑复康强 3 ~ 5 倍⁽¹⁾。已有文献报道, 脑血液循环的改善和自由基的清除, 有助于保护脑细胞增强记忆和延缓老化^(1,2)。本文研究了黄皮酰胺的脑保护作用, 改善脑血液循环和抑制脂质过氧化反应。

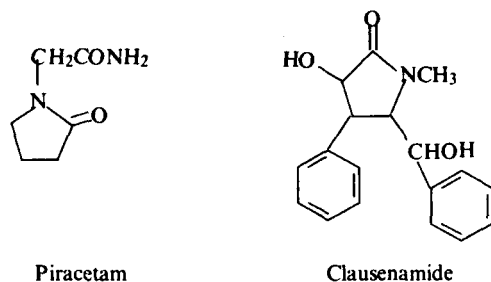


Fig 1. The structure of piracetam and clausenamide.

材 料 和 方 法

动物 昆明种小鼠, 雄性, 体重 20 ± 2 g。Wistar 大鼠 200 ± 50 g, 雌雄不拘。

药物及试剂 黄皮酰胺由本所植化室提供(纯度 100%, 溶于乙醇, 甲醇等); 花生四烯酸(AA)为南京生化制药厂产品; 5-羟色胺(5-HT)为 Research Organics Inc. 产品; 前列腺素($\text{PGF}_{2\alpha}$)由本所合成室提供; NADPH 购于 Sigma; 硫代巴比妥酸(TBA)和十二烷基硫酸钠(SDS)购于北京化工厂。

仪器 国产 721 型分光光度计; 日立 SCR 20 BA 高速冷冻离心机; 岛津 UV 260 紫外可见分光光度计。

一、急性脑缺氧实验:⁽³⁾

(一) **亚硝酸钠引起缺氧致死法** 小鼠随机分成 4 组, 分别 po 生理盐水、黄皮酰胺 50, 100, 200 mg/kg, 1 h 后, sc 亚硝酸钠 225 mg/kg, 记录注射亚硝酸钠后动物死亡时间。

(二) **断头致死法** 小鼠随机分成 4 组, 分别 po 生理盐水、黄皮酰胺 50, 100, 200 mg/kg, 1 h 后断头, 立即记录张口呼吸持续时间。

二、黄皮酰胺对大鼠脑基底动脉收缩的抑制作用

大鼠断头处死, 迅速剥离全脑, 顺基底动脉纵轴, 套进二条“L”型不锈钢钩, 一条悬挂在浴槽底部, 一条连在换能器上, 置于容量为 10 ml 的 37℃ 恒温浴槽中, 内含 Krebs-Henseleit 液(以 mmol/L 计含 KCl 4.96 NaCl 119, CaCl₂ 2.52, KH₂PO₄ 1.17, MgSO₄·7H₂O 1.13, Glucose 10, NaHCO₃ 25) pH 7.4。通 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气, 30~60 min 后开始实验。首先绘制 5-HT 剂量-收缩累积曲线, 浓度由 1×10⁻⁹ mol/L 逐渐递增至 1×10⁻⁵ mol/L, 收缩达最高峰后用 Krebs-Henseleit 液冲洗, 等恢复基线后向浴槽注入黄皮酰胺 1×10⁻⁵ mol/L, 2 min 后按上述 5-HT 浓度再绘制剂量-收缩累积曲线。比较两条曲线计算抑制百分数。按同法求出黄皮酰胺对 PGF_{2α} 和 AA 引起脑基底动脉收缩的抑制强度。

三、黄皮酰胺抑制脂质过氧化反应

(一) 体外实验

1. **大鼠肝、脑微粒体的制备** 大鼠禁食过夜, 次日断头处死, 迅速取肝, 脑称重, 用 TMS 缓冲液(Tris-HCl 0.05 mol/L, Sucrose 0.2 mol/L, MgCl₂ 3 mmol/L, pH 7.5) 配制 20% 的匀浆。离心 10,000×g, 4℃, 20 min, 上清液于 105,000×g, 4℃, 再离心 60 min, 弃去上清液(胞浆液), 收集微粒体沉淀, 用 TMS 配制悬浮液, -20℃ 贮存。Lowry 法测蛋白⁽⁴⁾。

2. **实验步骤^(5,6)** 反应液含肝或脑微粒体(蛋白含量 1 或 0.5 mg/ml), 测试药物, 2×10⁻⁴ mol/L 的 NADPH 或 10⁻³ mol/L 的半胱氨酸, 用 0.05 mol/L 的 PBS 补充至 1 ml。37℃ 温孵 15 min 后, 加 5 μl 5×10⁻³ mol/L 维生素 C 或 10⁻³ mol/L 硫酸亚铁, 再于 37℃ 温孵 15 min, 后加 1 ml 0.53% 硫代巴比妥酸, 煮沸 15 min, 离心 3000 r/min, 10 min, 上清液于 532 nm 比色, 测 MDA 含量。

(二) 体内实验

1. **匀浆的制备** 小鼠随机分为五组, 两组 po 生理盐水, 另三组分别 po 黄皮酰胺 50, 100, 200 mg/kg, bid×3。最后一次给药后, 禁食 8 h, 除生理盐水组为对照外, 其余均喂饲 50% 乙醇 15 ml/kg, 12 h 后断头取肝, 用 PBS 制成 10% 匀浆。

2. **实验步骤** 0.1 ml 肝匀浆加 0.1 ml 10% SDS, 然后加 2 ml 0.1 mol/L HCl 和 1 ml 1% TBA, 煮沸 30 min, 冷却后加 4 ml 正丁醇, 振荡 3~5 min, 离心(3000 r/min) 10 min, 取上层正丁醇液于 532 nm 比色, 测 MDA 含量。

(三) 抗氧化酶的测定

肝、脑组织胞浆液的制备 取小鼠 po 黄皮酰胺 100 mg/kg, bid×3, 最后一次给药后禁食过夜, 次日断头处死, 同肝脑微粒体的制备。

过氧化氢酶(CAT)的测定 测单位时间内 H_2O_2 的消耗,表示过氧化氢酶的活性。方法见文献⁽⁷⁾。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的测定 方法见文献⁽⁸⁾。

超氧化物歧化酶(SOD)的测定 方法见文献⁽⁹⁾。

实验结果

一. 急性脑缺氧实验

po 黄皮酰胺 100, 200 mg/kg 能显著延长小鼠断头后张口呼吸的时间($P < 0.05$)。200 mg/kg 亦能显著增加 sc 亚硝酸钠后的动物存活时间($P < 0.05$)。结果见表 1。

Tab 1. Protective effects of clausenamide from damage of acute cerebral hypoxia in mice ($n = 10, \bar{x} \pm SE$)

Treatment	Dose (mg/kg) po	Gasping duration after decapitation (s)	Survival time after sc $NaNO_2$ (s)
Control	-	15.5 ± 0.8	1373.5 ± 65.2
Clausenamide	50	17.4 ± 0.5	1471.2 ± 50.8
Clausenamide	100	18.7 ± 0.6*	1520.5 ± 106.3
Control	-	16.8 ± 0.6	1522.0 ± 64.7
Clausenamide	200	18.8 ± 0.5*	1803.1 ± 103.8*

* $P < 0.05$ as compared with control.

二. 黄皮酰胺对大鼠脑基底动脉收缩的影响

黄皮酰胺 10^{-5} mol/L 可使 AA, $PGF_{2\alpha}$ 和 5-HT 的剂量-收缩累积曲线明显右移,对以上3种物质收缩最高点的抑制百分率分别为 60, 42 和 27% (见图 2)。

三. 黄皮酰胺的抑制脂质过氧化反应

高浓度(10^{-3} mol/L)的黄皮酰胺对 Vit C-NADPH 和 Fe^{2+} -半胱氨酸诱发的肝、脑微粒体脂质过氧化反应有一定的抑制作用。小鼠 po 黄皮酰胺 50, 100 mg/kg 均能显著抑制由 50% 乙醇引起的肝微粒体 MDA (TBA 反应值) 升高。结果见表 2。

po 黄皮酰胺 100 mg/kg, bid × 3 能显著增强小鼠肝、脑组织中 GSH-Px 的活性,但对肝、脑组织中的 CAT, SOD 的活性无明显影响。结果见表 3。

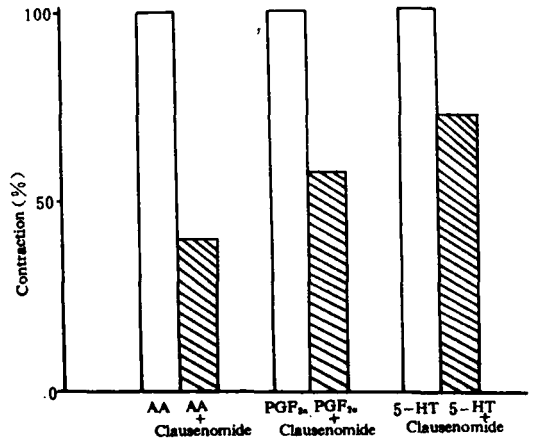


Fig. 2 The inhibitory effect of clausenamide 10^{-5} mol/L on the contraction of rat basilar artery induced by AA, $PGF_{2\alpha}$, and 5-HT.

Tab 2. The inhibitory effect of clausenamamide on 50 % alcohol induced liver lipid peroxidation in mice *in vivo*

Treatment	Dose	MDA	
		nmol/g tissue (mean \pm SE)	P
Control	-	304 \pm 16	
Alcohol	15 ml/kg	853 \pm 51	<0.01
Clausenamamide	50 mg/kg		\approx 0.05
+ Alcohol	15 ml/kg	709 \pm 46	
Control	-	356 \pm 38	
Alcohol	15 ml/kg	766 \pm 61	<0.01
Clausenamamide	100mg/kg		<0.01
+ Alcohol	15 ml/kg	519 \pm 48	
Control	-	457 \pm 48	
Alcohol	15 ml/kg	868 \pm 73	<0.01
Clausenamamide	200 mg/kg		>0.05
+ Alcohol	15 ml/kg	821 \pm 125	

Doses of clausenamamide given orally: 50, 100 and 200 mg/kg, bid for three consecutive days.

Tab 3. Influence of clausenamamide on the activities of liver and brain cytosol antioxidative enzymes in mice (n = 18, $\bar{x} \pm$ SE)

Treatment	Dose (mg/kg)	GSH-PX		CAT		SOD	
		Brain (A 412 nm)	liver	brain (A 230 nm)	liver	brain (A 560 nm)	liver
Control	-	0.03 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	-	0.20 \pm 0.01	0.18 \pm 0.2	0.31 \pm 0.00
Clausenamamide	100	0.06 \pm 0.01**	0.14 \pm 0.02*	-	0.24 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.31 \pm 0.00

*P < 0.05 **P < 0.01 GSH-PX: GSH-peroxidase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase.

讨 论

黄皮酰胺是从植物中分离的新的脑复康同类物, 其促智作用优于脑复康, 毒副作用小, 有可能成为促智新药。本文实验结果提示: 黄皮酰胺有抗急性脑缺氧作用, 能延长动物在缺氧情况下的存活时间, 而且能够拮抗花生四烯酸、前列腺素 $PGF_{2\alpha}$ 和 5-HT 等引起的脑血管痉挛。由于人脑组织是物质代谢旺盛器官, 当脑缺血、缺氧时, 脑的正常功能受到损伤, 尤以学习、记忆功能对此最为敏感, 易出现智能障碍。因此脑血液循环的改善有利于改善记忆功能。

近年来, 自由基学说在生物衰老问题的研究中占有重要的地位⁽¹⁰⁾。现已证明, 体内的某些抗氧化酶活性随年龄的增长而降低⁽¹¹⁾。另外, 在缺血、缺氧和酒精中毒等有害因素刺激下, 能产生活性氧自由基, 可引起细胞和细胞器膜脂质过氧化反应, 蛋白质变性, 严重时导致细胞死亡和组织损伤⁽¹²⁾。本研究表明, 黄皮酰胺 50 ~ 100 mg/kg 能明显抑制由酒精中毒诱发的肝脂质过氧化反应, 这对于稳定细胞膜脂层, 减少组织损伤, 延缓衰老是有利的。存在于胞浆

液中的 SOD, GSH-PX 和 CAT 是一组抗氧化酶类, 可分别清除氧自由基, 保护细胞免受损害。黄皮酰胺可使肝脑组织胞浆液内的 GSH-PX 活性明显增高, 而对 SOD 和 CAT 活性影响不大, 表明黄皮酰胺的清除自由基作用可能主要通过影响 GSH-PX 的活性而产生的。

最近的研究表明, 黄皮酰胺既能抑制胞外钙内流, 又能抑制内钙释放, 似可对上述两方面作用作出解释。深入的研究工作正在进行中。

参 考 文 献

1. 张均田. 近年国内关于学习、记忆药理学研究概况. 药理学报 1986; 21: 636.
2. Hillered L, et al. Brain ischemia and oxygen radicals. In: Bes A, et al, eds. *Cerebral Ischemia*. New York: Excerpta Medica, 1984: 293.
3. 覃文才、张均田. 尼莫地平、硝苯吡啶和长春胺对大鼠与小鼠化学记忆障碍的改善作用. 中国医学科学院学报 1986; 8: 365.
4. Lowry OH, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
5. Wills ED. Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem J* 1969; 113: 315.
6. Willson RL, et al. Metronidazole (Flagyl): Iron catalysed reaction with sulphhydryl groups and tumour radiosensitization. *Nature* 1975; 255: 498.
7. Brannan TS, et al. Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *J Neurochem* 1981; 36: 307.
8. Hafeman DG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 1974; 104: 580.
9. Beauchamp C, et al. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44: 276.
10. 刘时中. 自由基与衰老. 生理科学进展 1983; 4: 147.
11. Leibovitz BE, et al. Aspects of free radical reactions in biological systems: ageing. *J Gerontol* 1980; 35: 45.
12. Dave JR, et al. Prolactin modifies the fluidity of rat liver membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 100: 45.

ANTI-LIPIDPEROXIDATION AND CEREBRAL PROTECTIVE EFFECTS OF CLAUSENAMIDE

Y Liu, CZ Shi and JT Zhang

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT Clausenamide is a compound isolated from *Clausena lansium* (four) with the structure similar to piracetam. Pharmacological experiments showed that clausenamide po 100 ~ 200 mg/kg prolonged both the duration of gasping after decapitation and the survival time after sc NaNO₂ 225 mg/kg. clausenamide at the concentration of 10⁻⁵ mol/L inhibited the contraction of basilar artery caused by 5-HT, PGF_{2α} and arachidonic acid, indicating that clausenamide is a cerebral protective agent. In addition, multiple doses clausenamide were shown to inhibit the liver lipid peroxidation caused by 50% alcohol and increase the GSH-peroxidase activity significantly in rat liver and brain cytosol.

Key words Clausenamide; Cerebral protective effect; Antilipidperoxidation; GSH-peroxidase