

NBT 光照法测定聚(2-乙基-2-咪唑啉)化超氧化物歧化酶模拟物脂质体的活性

徐缓¹, 于涛¹, 尹朋朋¹, 张伟¹, 王凯乾², 王澈¹, 由忠路¹ (1. 辽宁师范大学化学化工学院, 辽宁 大连 116029; 2. 大连富生天然药物开发有限公司, 辽宁 大连 116600)

摘要:目的 建立聚(2-乙基-2-咪唑啉)[poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEOZ]修饰超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)模拟物脂质体的活性测定方法。方法 以薄膜分散法制备聚(2-乙基-2-咪唑啉)化超氧化物歧化酶模拟物脂质体, 利用氮蓝四唑(NBT)光照法对超氧化物歧化酶模拟物及聚(2-乙基-2-咪唑啉)化超氧化物歧化酶模拟物脂质体的活性进行测定。结果 超氧化物歧化酶模拟物的抑制率曲线方程为 $IR\% = 33.421 \ln p + 49.715$ ($r^2 = 0.9992$), IC_{50} 为 $1.0086 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 聚(2-乙基-2-咪唑啉)化超氧化物歧化酶模拟物脂质体的抑制率曲线方程 $IR\% = 33.521 \ln p + 49.671$ ($r^2 = 0.9991$), IC_{50} 为 $1.0099 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 氮蓝四唑光照法操作简单、稳定可靠、经济实用, 可用于超氧化物歧化酶模拟物聚(2-乙基-2-咪唑啉)脂质体的活性测定; 经脂质体包裹后超氧化物歧化酶模拟物的活性未发生变化。

关键词:聚(2-乙基-2-咪唑啉); 超氧化物歧化酶模拟物; 脂质体; 氮蓝四唑光照法

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2012)21-1732-04

Determination of the Activity of PEOZ Liposomal SOD Mimic Using NBT-Illumination Method

XU Huan¹, YU Tao¹, YIN Peng-peng¹, ZHANG Wei¹, WANG Kai-qian², WANG Che¹, YOU Zhong-lu¹ (1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2. Dalian Fusheng Natural Medicine Development Company Ltd., Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method for determining the activity of [poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEOZ]-modified liposomes encapsulated superoxide dismutase (SOD) mimic (PEOZ-L-SOD). **METHODS** PEOZ-L-SOD was prepared by film dispersion method, and the activities of the SOD mimic and PEOZ-L-SOD were determined by NBT-Illumination method. **RESULTS** The fitted equation of the inhibition rate curve of the SOD mimic was $IR\% = 33.421 \ln p + 49.715$ ($r^2 = 0.9992$) and the IC_{50} was $1.0086 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; the fitted equation of the inhibition rate curve of PEOZ-L-SOD was $IR\% = 33.521 \ln p + 49.671$ ($r^2 = 0.9991$) and the IC_{50} was $1.0099 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The NBT-Illumination method is simple, reliable, economic and practical, and can be used as an efficient method to determine the activity of SOD mimic liposomes. The experiment proves that the activity of SOD mimic did not change after it was encapsulated in the liposomes.

KEY WORDS: poly(2-ethyl-2-oxazoline); superoxide dismutase mimic; liposome; NBT-Illumination method

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种重要的超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)清除剂, 能够平衡机体的氧自由基, 从而避免体内 $O_2^- \cdot$ 浓度过高时引起的不良反应^[1]。由于天然 SOD 提取较为困难, 使用成本较高, 体外稳定性低, 难于推广应用, 因此可利用具有相对分子质量小、消耗能量低、产量不受限制、稳定性高、毒性小等优点的人工合成 SOD 模拟物替代 SOD^[2]。目前 SOD 模拟物已从早期的活性中心金属核壳结构的模拟, 发展到对活性中心金属核壳及次层结构的整体模拟, 从单一体外

生物活性研究发展到体内抗氧化、抗炎症及抗衰老研究^[3]。本实验所采用的 Cu-Zn SOD 模拟物是 SOD 的一种低分子合成模拟物, 分子式为 $C_{25}H_{20}Cl_2CuN_2O_2Zn$, 其分子结构式见图 1。

具有良好亲水性、柔顺性的聚(2-乙基-2-咪唑啉)[poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEOZ]与胆固醇半琥珀酸酯(cholesterol hemisuccinate, CHEMS)偶联后得到 PEOZ-CHEMS, 利用其修饰脂质体, 可以增加脂质体的稳定性, 延长其体内循环时间。

本实验采用的 Cu-Zn SOD 模拟物微溶于水, 将

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102394)

作者简介: 徐缓, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师 研究方向: 药物递送系统和高分子材料合成 Tel: (0411)82158329 E-mail: huan.xul@163.com

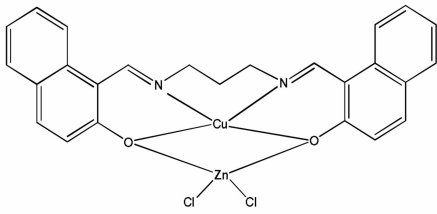


图1 Cu-Zn SOD 模拟物分子结构式
Fig. 1 Structure of Cu-Zn SOD mimic

其溶于有机溶剂中,进一步给药存在难度。利用 PEOZ 脂质体包封后为制成 SOD 模拟物口服、透皮或注射等剂型提供参考。本实验采用改进的 NBT 光照法对 PEOZ 修饰 Cu-Zn SOD 模拟物脂质体的活性进行测定,为 SOD 模拟物体内应用做前期准备。

1 仪器与试剂

RE-85 旋转蒸发器、DF-101S 恒温磁力水浴锅、SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司);AR1140 电子天平(上海奥家斯有限公司);721 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);Nicomp 380 粒度测定仪(Particle Sizing Systems,美国 PSS 粒度分析仪公司)

Cu-Zn SOD 模拟物(辽宁师范大学化学化工学院无机化学教研室合成);S-75 大豆磷脂(上海太伟药业有限公司);胆固醇(药用,温州瓯海食品生化厂);氯化硝基四氮唑蓝、蛋氨酸(国药集团化学试剂有限公司);核黄素(V_{B2})(北京奥博星生物技术有限责任公司);乙二胺四乙酸二钠(EDTA,天津市大茂化学试剂厂);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

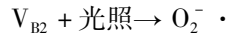
2.1 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体的制备

采用薄膜分散法制备 SOD 模拟物脂质体^[2]。大豆磷脂、胆固醇、PEOZ-CHEMS 和 SOD 模拟物(8:3:0.5:0.2,摩尔比)置于圆底烧瓶中,加 10 mL 氯仿和适量甲醇,室温下振摇使其充分溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,形成均匀类脂薄膜,加入磷酸缓冲溶液(pH 7.4)10 mL,21 °C 水浴超声 10 min 将脂质膜完全洗脱,脂质体初产品探头超声处理,0.45、0.22 μm 微孔滤膜整粒,得到 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体,利用葡聚糖凝胶法测定其包封率为(89.13 \pm

1.58)% ,脂质体的平均粒径为 136.3 nm。

2.2 NBT 光照法测定 SOD 模拟物及其 PEOZ 脂质体的活性

2.2.1 实验原理 实验采用 Beauchamp 传统方法^[5]与改进的核黄素光还原 NBT 法^[5]测定 SOD 模拟物活性。 V_{B2} 在有氧条件下光照产生 $O_2^- \cdot$, $O_2^- \cdot$ 可以使 NBT 还原为蓝紫色的化合物甲贖,而 SOD 模拟物会与 NBT 竞争 $O_2^- \cdot$,从而抑制 NBT 还原为蓝紫色化合物的速度。简单反应如下:



甲贖在 560 nm 处有最大吸收,且吸光度 A_{560} 与甲贖的浓度成正比。反应不同时间的吸光度 A_{560} 对时间 t 作图,可得一直线,直线斜率大小反映了甲贖的生成速度。而 SOD 模拟物的存在会使甲贖的生成速率变小,因此直线的斜率会变小。根据公式(1)即可求出 SOD 模拟物对 $O_2^- \cdot$ 的抑制率(Inhibition Rate, IR%):

$$\text{IR}\% = (1 - k'/k) \times 100\% \quad (1)$$

其中 k' 为加入 SOD 模拟物后直线的斜率; k 为不加 SOD 模拟物时空白反应液直线的斜率,抑制率越大说明 SOD 模拟物活性越高。

2.2.2 分析方法的建立 检测波长的确定:根据文献^[4-7]报道的核黄素光还原 NBT 法利用 721 分光光度计测定 SOD 模拟物及其脂质体的活性,检测波长为 560 nm。

试剂的选择与确定:使用 NBT 法时, V_{B2} 常与四甲基乙二胺、EDTA 混合使用^[7]。在自由基反应中四甲基乙二胺与 V_{B2} 反应可以加快 $O_2^- \cdot$ 产生,加速反应进度,为使反应容易控制应尽量避免 $O_2^- \cdot$ 产生速度过快,故不使用四甲基乙二胺。EDTA 为氨羧络合剂,能掩蔽大多数金属离子对自由基反应的影响,所以本实验选用 EDTA 配制 V_{B2} 。

反应时间的确定:反应开始 1 min 后 V_{B2} 即能产生足够 $O_2^- \cdot$ 与 NBT 生成甲贖,甲贖生成速率随反应时间加快,每隔 0.5 min 进行测定,3.5 min 后体系趋向稳定,时间延长测定值超出测量范围,影响数据准确性,因此总反应时间控制为 3.5 min。

破乳剂的选择:本实验选择 3 种破乳剂进行考察^[8]:无水乙醇、盐酸乙醇混合溶液[HCl (体积分数 37%)-乙醇(体积分数 99%) = 1:39]、10% 曲拉通-100(Triton X-100)溶液。实验过程发现,无水乙醇加入量大,对 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体有一定稀

释作用,降低 SOD 模拟物的抑制活性;盐酸乙醇混合溶液会引起体系 pH 值的波动,影响数据稳定性;Triton X-100 用量少,只需加入 0.1 mL 就可以进行破乳,破乳效果好,且不影响 SOD 模拟物活性的测定,最终选择破乳剂为 10% Triton X-100 溶液。

2.2.3 SOD 模拟物及其 PEOZ 脂质体活性测定
 取 0.9 mL 磷酸缓冲溶液(pH 7.4, 0.05 mol · L⁻¹)、1.5 mL 蛋氨酸(0.01 mol · L⁻¹)、0.3 mL NBT (9.32 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹)、0.3 mL V_{B2} (6.8 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹, 含 1.0 × 10⁻⁴ mol · L⁻¹ EDTA) 作为空白反应液共 3.0 mL,置于双层黑纸套筒试管中,室温下以自制日光灯照射,开始照射 1 min 后,560 nm 波长处测其吸光度,以后每次照射间隔 0.5 min,共计 3.5 min,分别于相同波长测定吸光度。其他条件不变,只改变上述空白反应液中缓冲溶液与待测样品的体积比例,保证总体积 3.0 mL。实验分 3 组进行:①与不同浓度的 SOD 模拟物混合;②与不同浓度的 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体溶液混合,加入 0.1 mL 10% Triton X-100 溶液;③与 1.8 μmol · L⁻¹ PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体溶液(未破乳)混合,按上述相同的操作在波长 560 nm 下测定吸光度。每个样品取 6 个不同浓度,测定结果见图 2、3、4。SOD 模拟物浓度-抑制率曲线方程为:IR% = 33.421 lnρ + 49.715, r² = 0.999 2; PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体(破乳)的浓度-抑制率曲线方程为:IR% = 33.521 lnρ + 49.671, r² = 0.999 1。

由图 2,3 可知,空白组的直线斜率最大,没有抑制率,随着相同浓度 SOD 模拟物与 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体的浓度逐渐增大,直线斜率逐渐变小,抑制率逐渐增大。

由图 4 可知,在测定 SOD 模拟物活性时,相同浓度的 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体的直线斜率最大,没有抑制率,SOD 模拟物活性未能体现,说明

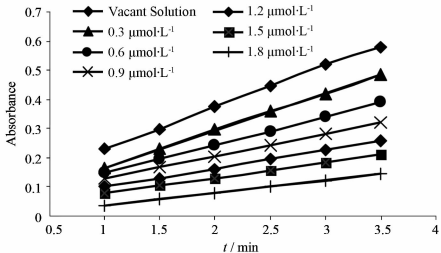


图 2 不同浓度 SOD 模拟物溶液吸光度随时间的变化
Fig. 2 Absorbance-time curves of different concentrations of SOD mimic solution

PEOZ 脂质体稳定性较好;而相同浓度的 SOD 模拟物与破乳后的 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体均有较强的抑制率,说明 SOD 模拟物经脂质体包封后活性依然良好。

把 IR% = 50% 时所需 SOD 模拟物或其 PEOZ 脂质体的浓度作为一个活性单位,即 SOD 模拟物或其脂质体的 IC₅₀ 值。由抑制率对浓度作图可得到 SOD 模拟物或其脂质体的 IC₅₀ 值, pI₅₀ = -lgIC₅₀。结果见表 1,表 1 说明 PEOZ 脂质体包裹的 SOD 模拟物的活性未发生变化,不影响进一步给药。

3 讨论

3.1 催化超氧阴离子自由基 O₂⁻ · 歧化反应测定 SOD 及其模拟物活性,常用的方法有脉冲辐解法、黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶-细胞色素 C 法、邻苯三酚自

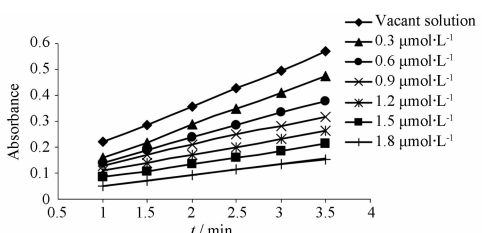


图 3 不同浓度 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体(破乳)吸光度随时间的变化
Fig. 3 Absorbance-time curves of different concentrations of PEOZ-L-SOD (demulsified)

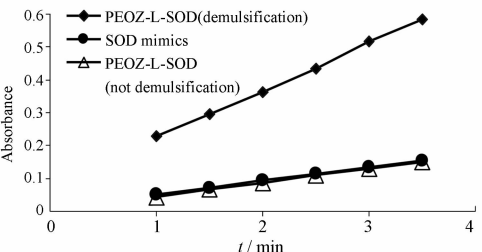


图 4 SOD 模拟物及其脂质体(破乳或未破乳)吸光度随时间的变化
Fig. 4 Absorbance-time curves of SOD mimic and SOD mimic liposomes (demulsified and not demulsified)

表 1 SOD 模拟物与 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体(破乳)的 IC₅₀ 及 pI₅₀ 值

Tab. 1 IC₅₀ and pI₅₀ of SOD mimic and PEOZ-L-SOD (demulsified)

Sample	IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	pI ₅₀
SOD mimics	1.008 6 × 10 ⁻³	2.996 2
PEOZ-L-SOD	1.009 9 × 10 ⁻³	2.995 7

氧化法、NBT 光还原法等^[9]。本实验选择 NBT 光还原法,与其他方法相比该法具有仪器简单、药品易得、起始时间容易控制、数据重现性好、精确度高等优点。

3.2 实验发现测定 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体活性时,如果不进行破乳操作,被 PEOZ 脂质体包裹的 SOD 模拟物对超氧阴离子自由基 $O_2^- \cdot$ 歧化反应无抑制作用,这是由于 SOD 模拟物包封在 PEOZ 脂质体脂质双分子层中,不表现活性,表明 PEOZ 脂质体稳定性良好,能够起到保护 SOD 模拟物的作用。脂质体经口服、透皮或注射进入机体组织后逐渐破膜缓释 SOD 模拟物表现出生物活性,可以改善 SOD 模拟物在体内的半衰期短、生物利用度低的缺点^[10]。

3.3 文献[7]报道在不同 pH 值下测定丹酚酸 B 活性,pH 小于 7 时,没有清除速率;pH 大于 7 后,有明显的清除速率。pH 7.8 时清除速率较大,实验时较小的 pH 值变化,导致活性测定值有较大改变。本实验选择 pH 7.4 的缓冲体系进行实验是基于以下考虑:人体生理体液的 pH 7.4,测定 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体活性最好模拟其具体给药环境,验证在体内的条件下 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体可很好发挥其生物活性,为 NBT 光还原法在测定 PEOZ 化 SOD 模拟物脂质体活性时提供参考。

3.4 NBT 光还原法测定实验是在光反应条件下进行的,光源的强度对实验结果有一定的影响,实验采用自制密闭管式日光灯光源,将光源由散光改为光束,顶部留有空隙恰好放入 3 支试管,因管式日光灯

斜插入放置,使 3 支试管中样品所受的光照连续、稳定。

REFERENCES

- [1] YU P. Advances in the research of superoxide dismutase[J]. *Bull Biol*(生物学通报), 2006, 41(1): 4-6.
- [2] CHEN J X, XU H, YU T, et al. Determination of entrapment efficiency of superoxide dismutase mimic liposomes by mini-column centrifugation-UV spectrophotometry[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2011, 20(10): 928-931.
- [3] HU P, HU P, WU G W, et al. Achievement in SOD mimics with antioxidant and anti-inflammation functions[J]. *Progr Chem*, 2009, 21(5): 873-879.
- [4] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 1971, 44(1): 276-287.
- [5] ZI J Q, DENG X X, JIN Q, et al. The modification of NBT-Illumination method and effect of the modified method[J]. *J Beijing Normal Univ* (Nat Sci)[北京师范大学学报(自然科学版)], 1998, 34(1): 101-104.
- [6] LI S Y, WU X J. Discussion of experimental conditions of NBT reduction method in assaying of SOD activity[J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2009, 21(5): 34-45.
- [7] ZHU J B, HAN S H, WANG Y Y, et al. Evaluation of scavenging activity of superoxide free radical using water soluble components of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *J Dalian Polytechnic Univ* (大连工业大学学报), 2009, 28(4): 251-254.
- [8] DONG X H, LI L, SHI L, et al. Study on hemolysis of the curcubitacin B galactosylated liver-targeting liposomes *in vitro*[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2011, 46(3): 194-197.
- [9] LI R Z, YANG Q J, CHEN Y R. Study of determination of superoxide dismutase (SOD) activation and application[J]. *J Qiongzhou Univ* (琼州大学学报), 2004, 11(5): 34-36.
- [10] YAN J L, WANG J Y, ZHAO M. Improved production process of reconstituted liposome-encapsulated super-oxide dismutase[J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1994, 15(2): 79-81.

(收稿日期:2011-12-22)

《中国药理学杂志》2013 年征订启事

《中国药理学杂志》是我国药学界创刊最早、发行量较大、反映我国药理学各学科进展和动态的最具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者群为高、中级药理学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药理学各学科,辟有院士笔谈、专家笔谈、综述、论著(内容包括:重大新药创制、生物技术、中药及天然药物、药理、药剂、临床药理学、药品质量及检验、药物化学)、药物与临床、新药述评、药学史、药学家人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊 59 年来在医药卫生界享有很高声誉。连续三次荣获国家期刊奖,三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖,获“百种杰出学术期刊”称号。2006~2011 年连续六年被评为“中国科协精品期刊工程项目资助期刊”。被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、美国《国际药理学文摘》(IPA)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JSTCh)、《英国皇家化学学会系列文摘》(RSC)、荷兰《斯高帕斯数据库》(Scopus)、美国《乌利希期刊指南》(UPD)、《中国期刊全文数据库》(CNKI)、《中文核心期刊要目总览》(2011 版)收录,加入中国学术期刊光盘版。

地址:北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1805 室,100022。半月刊。电话 010-58698009。传真:010-58699295。网址:www.zgyxzz.com.cn。电子信箱 zgyxzz@cpa.org.cn。邮发代号:2-232,定价:每期 30 元,全年 720 元。

[本刊讯]