

# 苯酚类螯合剂清除氧自由基及抗辐射脂质过氧化作用的研究

陈红红 胡昱兴 张亚妮\* 杨照华 王英华 罗梅初 孙梅贞

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

**摘要** 报道了单分子和双分子取代苯酚类螯合剂对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除作用及对大鼠肝线粒体辐射诱导的脂质过氧化反应的抑制作用。结果表明:取代苯酚类螯合剂具有不同程度的清除氧自由基和抗辐射脂质过氧化作用,其清除羟自由基和抑制辐射诱导的脂质过氧化作用的  $IC_{50}$  为  $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ,清除超氧阴离子自由基的  $IC_{50}$  为  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ,其中 7601(CB-MIDA)、9501、9502 等螯合剂的能力最强,初步观察到其抗氧化作用的强弱与促排活性的构效相关联。

**关键词** 苯酚类螯合剂,羟自由基,超氧阴离子自由基,辐射脂质过氧化作用

放射性核素内污染后,通过电离辐射的直接作用和间接作用,导致机体的严重辐射损伤。目前,防治放射性核素内照射损伤的根本措施<sup>[1]</sup>是将蓄积在体内的放射性核素加速排除,最大限度地减少核素的体内滞留量或缩短滞留时间。电离辐射的直接或间接作用可产生大量自由基,若应用加速排除放射性核素的螯合剂,又有抗自由基作用,则这种具有双重作用的螯合剂有利于减轻对机体的损伤。国外曾报道治疗铁沉着症、铅中毒的螯合剂  $L_1$ 、Lutin 等<sup>[2,3]</sup>具有促排与抗自由基的双重作用。一般认为,具有抗氧自由基活性的化合物结构中存有酚羟基。本工作选择部分具有不同促排效果的单分子和双分子取代苯酚类螯合剂<sup>[4~6]</sup>,观察其清除氧自由基及抗辐射脂质过氧化作用,以清除超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、羟自由基( $\bullet OH$ )和抗大鼠肝线粒体辐射诱导脂质过氧化作用的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )评价其效果<sup>[7]</sup>,为今后进一步研究此类化合物对辐射损伤的防护作用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品和试剂

取代苯酚类螯合剂,由上海医科大学放射医学研究所药物室合成提供;SOD 和 MDA 测定试剂盒,购自南京聚力生物医学工程研究所;细胞色素 C, Sigma 公司产品。其余试剂均为

国家自然科学基金青年基金(编号 39700039)资助课题

\* 上海医科大学 93 级药理专业学生

收稿日期:初稿 1999-02-22,修回 1999-04-29

国产分析纯试剂。

## 1.2 苯酚类螯合剂清除氧自由基的作用

1.2.1 螯合剂对超氧阴离子 ( $O_2^-$ ) 产生量的影响测定  $O_2^-$  产生量的测定用亚硝酸盐显色法<sup>[8]</sup>。利用黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应体系产生  $O_2^-$ ，加入不同浓度的各螯合剂后，在 37 °C 水浴中温育 30min，加入显色剂，用 754 型紫外可见分光光度计测定其在 550nm 处吸光度 ( $A$ )，吸光度的变化反应了螯合剂对  $O_2^-$  产生量的影响。

1.2.2 螯合剂对羟自由基 ( $\bullet OH$ ) 产生量的影响测定  $\bullet OH$  产生量的测定用比色法<sup>[9]</sup>，将不同浓度的各螯合剂加入至产生  $\bullet OH$  的抗坏血酸体系中，25 °C 温育 90min，754 型紫外可见分光光度计测定 550nm 处的透光率 ( $T$ )，观察  $\bullet OH$  形成时和抑制时  $T$  的变化，以评价抑制程度。

## 1.3 苯酚类螯合剂抗辐射脂质过氧化作用的检测

1.3.1 实验动物 Wistar 大鼠，体重  $180 \pm 10$ g，雄性，由上海医科大学放射医学研究所动物房繁殖、提供。

1.3.2 大鼠肝线粒体制备 按常规方法分离新鲜大鼠肝线粒体<sup>[10]</sup>，制备匀浆和悬液的介质均用生理盐水。经两次洗涤后，配制成蛋白含量为 10~20mg/mL 的线粒体悬液，在 0~4 °C 储存、备用。用双缩脲法测定蛋白含量，以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准品。

1.3.3 照射条件 放射源为  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线，剂量率为 0.96Gy/min，照射剂量为 120Gy。

1.3.4 脂质过氧化产物 (LP) 丙二醛 (MDA) 测定 以生理盐水为介质，反应终体积 1mL 含肝线粒体蛋白 1mg 和不同浓度的螯合剂，经  $^{137}\text{Cs}$  放射源  $\gamma$  射线在 37 °C 恒温辐照 120Gy，照后 37 °C 继续恒温 1h，取上述辐照液 0.2mL，以硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法测定 MDA 生成量。以抑制百分率表示各螯合剂对该反应影响程度的差异。

## 1.4 资料统计

每个螯合剂采用 4 种浓度，同一浓度 4 个样品 ( $n=4$ )，以各螯合剂浓度为  $X$  轴，抑制  $O_2^-$ 、 $\bullet OH$ 、MDA 产生的百分率为  $Y$  轴，作线性回归分析，求得各化合物的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。

# 2 结 果

## 2.1 螯合剂对 $O_2^-$ 和 $\bullet OH$ 的清除作用

实验结果显示：取代苯酚类螯合剂对  $O_2^-$  和  $\bullet OH$  的生成均有一定的抑制作用，且有明显的剂量-效应关系，但螯合剂清除  $O_2^-$  和  $\bullet OH$  的强弱有差别，以 7601(CBMIDA)、7603、7730、7711、9502、9501 抑制  $\bullet OH$  生成效果最佳， $IC_{50}$  在 0.61~2.12 $\mu\text{mol/L}$  之间；清除  $O_2^-$  作用以 9501 为最好， $IC_{50}$  为  $0.23 \pm 0.01\text{mmol/L}$ ，次为 9502、7601， $IC_{50}$  分别为  $1.01 \pm 0.03\text{mmol/L}$  和  $2.17 \pm 0.35\text{mmol/L}$  (见表 1)。由表 1 可以看出，取代苯酚类螯合剂抑制 50%  $O_2^-$  生成的浓度 ( $\text{mmol/L}$  水平) 明显高于清除  $\bullet OH$  的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$  水平)。

## 2.2 螯合剂对辐射引起肝线粒体 MDA 生成的影响

大鼠肝线粒体经 120Gy  $\gamma$  射线辐照后，可引起 MDA 生成量显著增加，于照射前预先加入

各螯合剂，结果显示，取代苯酚类螯合剂对 MDA 生成具有明显的抑制作用，在  $\mu\text{mol/L}$  水平螯合剂就能抑制 50%MDA 生成，且也有明显的剂量 - 效应关系，以 7601、9502、9501 为最好，其  $\text{IC}_{50}$  在  $5\sim 10\mu\text{mol/L}$  之间，其次为 7730、9504、9505、9506。实验观察到促排放放射性核素有效的脂肪族促排药 DTPA 抑制效果最差， $\text{IC}_{50}$  为  $517.7\pm 68.3\mu\text{mol/L}$ (见表 1)。

Tab.1 Half inhibition concentration( $\text{IC}_{50}$ ) of phenolic chelating agents on superoxide anions and hydroxyl radicals generation and on lipid peroxidation ( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

| Chelating agents                                       | Scavenging of superoxide anions/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Scavenging of hydroxyl free radical/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Inhibition of LP/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Single molecular substituted phenolic chelating agents |                                                                  |                                                                        |                                                     |
| 7601(CBMIDA)                                           | $2.17\pm 0.35$                                                   | $0.61\pm 0.01$                                                         | $6.63\pm 0.28$                                      |
| 7603                                                   | $9.99\pm 0.11$                                                   | $1.18\pm 0.06$                                                         | $47.23\pm 9.12$                                     |
| 7730                                                   | $18.32^{(1)}$                                                    | $1.15\pm 0.09$                                                         | $38.09\pm 5.77$                                     |
| 7607                                                   | $5.27\pm 0.01$                                                   | $3.43\pm 0.32$                                                         | $143.79\pm 4.17$                                    |
| 7711                                                   | —                                                                | $2.12\pm 0.37$                                                         | $105.45\pm 12.03$                                   |
| Double molecular substituted phenolic chelating agents |                                                                  |                                                                        |                                                     |
| 9501                                                   | $0.23\pm 0.01$                                                   | $2.11\pm 0.08$                                                         | $9.95\pm 1.76$                                      |
| 9502                                                   | $1.01\pm 0.03$                                                   | $1.58\pm 0.37$                                                         | $5.07\pm 0.43$                                      |
| 9002                                                   | $14.53^{(2)}$                                                    | $25.21\pm 1.50$                                                        | $298.15\pm 76.48$                                   |
| 9505                                                   | —                                                                | $3.62\pm 0.40$                                                         | $37.04\pm 0.47$                                     |
| 9506                                                   | $20.83\pm 3.69$                                                  | $4.48\pm 0.08$                                                         | $96.36\pm 2.57$                                     |
| 9504                                                   | —                                                                | $15.29\pm 1.29$                                                        | $38.01\pm 3.75$                                     |
| DTPA                                                   | —                                                                | —                                                                      | $517.72\pm 68.27$                                   |

(1) Only  $36.85\pm 3.44\%$  inhibited at  $18.32\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   
(2) Only  $38.39\pm 0.29\%$  inhibited at  $14.53\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

3 讨 论

本研究的苯酚类螯合剂对清除  $\text{O}_2^-$ 、 $\bullet\text{OH}$  和抗辐射脂质过氧化都具有作用，且有明显的剂量 - 效应关系。其清除  $\bullet\text{OH}$  和抗辐射脂质过氧化作用的  $\text{IC}_{50}$  很低 ( $\mu\text{mol/L}$  水平)，而清除  $\text{O}_2^-$  时所需浓度较高， $\text{IC}_{50}$  在  $\text{mmol/L}$  水平。说明清除  $\text{O}_2^-$  需要在高浓度时才有明显的抑制作用。实验观察到 5 个单分子取代苯酚类螯合剂中以 7601(CBMIDA) 为最好，6 个双分子取代苯酚类螯合剂中以 9501 和 9502 为最好，这 3 个螯合剂在清除氧自由基和抗辐射脂质过氧化作用的  $\text{IC}_{50}$  最低，虽然螯合剂 7730、7711、7607、9505 和 9506 等清除  $\bullet\text{OH}$  的  $\text{IC}_{50}$  较低，但在清除  $\text{O}_2^-$  或抑制辐射诱导肝线粒体脂质过氧化作用时所需浓度较高，其  $\text{IC}_{50}$  与 7601、9501、9502 相比显著增高。众所周知，对超铀核素和稀土核素有效促排药 DTPA 在本研究中对抗脂质过氧化作用虽也有一定的效果，但能力最差，其作用可能是通过螯合脂质过氧化过程中所需的金属元素铁，从而抑制辐射脂质过氧化作用<sup>[11]</sup>。

苯酚类螯合剂 7601、9501、9502 的结构都属邻苯二酚类，在核素促排研究中是促排活性较高的几个化合物<sup>[4~12]</sup>，对  $^{234}\text{Th}$  排出量可达中毒量的 60%~70%，肝、骨蓄积量显著下

降,分别为对照组的 8%~28% 和 7%~31%。在螯合剂与蛋白质络合竞争的研究中进一步确证 7601、9501 和 9502 为络合力很强的 3 个化合物。它们不仅有较理想的促排活性,且在清除  $O_2^-$ 、 $\bullet OH$  和抑制辐射诱导的脂质过氧化作用中亦为最佳的化合物,有促排和抗自由基的双重功能,这种具有双重功能的螯合剂是否可以增进治疗放射性核素内污染的效果,值得今后进一步研究。

研究的结果显示,苯酚类螯合剂的清除氧自由基、抗辐射脂质过氧化作用的强弱与化合物结构中羟基位置和取代基的性质有关,并与我们报道的取代苯酚氨基酸螯合剂对放射性钆促排活性的构效关系<sup>[4~12]</sup>完全吻合,结构中呈邻苯二酚型(7601、9501、9502),则促排活性高,抗自由基能力也强,间苯二酚型(7607、9506),对苯二酚型(7730、9505)或邻苯三酚型(7711、9504),则活性下降,抗氧自由基的能力也降低,羟基被其它基团取代(7603)或其它基团存在于邻苯二酚结构(9002)中,则抗自由基能力也产生变化,初步观察到抗自由基能力与促排活性相一致,这提示为今后寻找新的高效低毒、且有抗自由基作用的促排药提供了启示。

### 参 考 文 献

- 1 朱寿彭,李 章. 放射毒理学,第二版. 北京:原子能出版社, 1992. 162
- 2 George J K. Analyst, 1995, 120:845~851
- 3 Korkina L G, Cheremisina Z P, Afanas'ev L B *et al.* Plzen Lek Sborn, 1996, Suppl. 71:11
- 4 孙梅贞, 罗梅初, 沈彬源等. 中华放射医学与防护杂志, 1985, 5(8):409~413
- 5 杨照华, 孙梅贞, 倪震黎等. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17(3):178~181
- 6 SUN M Z, YONG Z H, NI Z L. Plzen Lek Sborn, 1996, Suppl. 71:109
- 7 CHEN Y T, ZHENG R L, JIA Z J *et al.* Free Radical Biol Med. 1990, 9:19~21
- 8 Halliwell B, John M C Gutteridge. Free Radical Biol Med. London/New York: Oxford University Press, 1985. 102
- 9 王成莲, 刘 莉. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(6):473~475
- 10 王继峰, 张榕榕, 路雪雅等. 药学学报, 1986, 21(11):857~860
- 11 Wills E D. Int J Radiat Biol, 1970, 17(3):217~228
- 12 孙梅贞, 杨照华, 倪震黎等. 中华放射与防护杂志, 1999, 19(3):183~185

# STUDIES OF PHENOLIC CHELATING AGENTS ON FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITIES AND INHIBITORY ACTION IN RADIATION-INDUCED LIPID PEROXICATION

CHEN Honghong HU Yuxing ZHANG Yani YANG Zhaohua WANG Yihua

LUO Meichu SUN Meizhen

(*Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*)

**ABSTRACT** Effects of single molecular and double molecular substituted phenolic chelating agents on scavenging of superoxide anions and hydroxyl radicals and inhibition of rat liver mitochondria lipid peroxidation induced by irradiation were studied. The phenolic chelating agents were shown to different extent to scavenge oxygen free radicals and to protect against radiation-induced lipid peroxidations, and their half inhibition concentrations ( $IC_{50}$ ) on hydroxyl radicals generation and lipid peroxidation were  $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ , which of scavenging of superoxide anions were  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ . 7601(CBMIDA), 9501 and 9502 were the best among them. The free radical scavenging and antioxidant activities were close related to chemical structure and decorated bioactivity.

**KEYWORDS** Phenolic chelating agents, Superoxide anion radical, Hydroxyl radical, Radiation-induced lipid peroxidation