

CNIC-01269

SMC-0145

几种制剂清除辐射所致自由基的 ESR 研究

强亦忠 王崇道 邵 源

(苏州医学院放射医学研究所, 苏州, 215007)

孙存普 丛建波 吴 可

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京, 100850)

摘 要

以 5'-TMP 作为 DNA 的模型, t-NB 作为自旋捕集剂, 采用 ESR 方法研究了 DNA 受 γ 射线照射产生自由基, 以及知母宁、槲皮素、单宁酸、海藻硫酸多糖、云芝多糖和螺旋藻等几种制剂对水溶液中胸腺嘧啶核酸的辐射防护作用。结果表明, 受照 5'-TMP 分子的自旋捕集 ESR 信号具有典型的特征性谱线, 证实存在 5'-TMP 自由基, 且上述几种中药制剂均有捕集自由基的作用, 其中尤以知母宁、单宁酸和槲皮素效果为佳。

**The ESR Study of the Clearance of the
Radiation Induced Free Radical
by Some Chemicals**
(*In Chinese*)

QIANG Yizong WANG Chongdao SHAO Yuan
(Suzhou Medical College, Institute of Radiation Medicine,
Suzhou, 215007)

SUN Cunpu CONG Jianbo WU Ke
(Academy of Military Medical Sciences, Institute of Radiation Medicine,
Beijing, 100850)

ABSTRACT

Free radical induced by γ -irradiated DNA, as well as the radioprotection effect on the thymidine solution by chinonin, quercetin, tannic acid, sulfated polysaccharide, polysacchariopeptide and spirulina platensis are investigated by using ESR with 5'-TMP as DNA model and t-NB as spin trapping agent. The results show that spin trapping ESR signal of γ -irradiated 5'-TMP molecule has the typical ESR spectrum. The existence of 5'-TMP free radical is also confirmed. The above mentioned chemicals have the effect of trapping free radical, especially chinonic, tannic acid and quercetin.

引言

我们曾用 γ 射线辐照动物小鼠,对其肝、脾、肾等脏器中脂质过氧化物(LPO)含量的变化以及照后服用知母宁等三种制剂的抗脂质过氧化作用进行了研究,发现知母宁、单宁酸均具有较好的抗脂质过氧化作用^[1]。但由于LPO含量的测定是以丙二醛(MDA)来表征的,特异性较差,而电子自旋共振(ESR)是目前可直接测定自由基最有效并用得最多的方法,因此我们决定改用ESR技术直接研究几种制剂清除自由基的效果,观察它们的辐射防护作用。我们选择制剂的对象以天然中草药的有效成分为主,且已有人把它们当作药物正在进行研究,结果初步显示它们具有清除自由基或潜在的清除自由基的功能^[2~7],这样就减少了将来把它们用作辐射损伤救治药物审批的麻烦。

1 材料与方法

1.1 试剂

(1) 5'-TMP(胸苷酸, Thymidine-5'-monophosphate, free acid), Sigma公司生产(Grade, 99%, 来再纯化, MW322.2)。

(2) t-NB(特亚硝基丁烷, t-Nitrosobutane), Aldrich公司生产(未再纯化, MW174.24)。

(3) 知母宁, 纯度为98%, 由南方制药厂生化所研制并提供。

(4) 单宁酸, 遵义第二化工厂出品。

(5) 螺旋藻(片剂), 由广西医学院提供。

(6) 云芝多糖(PSP₁)及其糖制品(PSP₂), 槲皮素, 均由本院中药研究所提供。

(7) 海藻硫酸多糖(SP), 由军事医学科学院放射医学所提供。

1.2 仪器设备

Bruker-ESP300-ESR波谱仪, 德国Bruker公司生产。

1.3 实验方法

(1) t-NB用重蒸水溶解后制成20 mmol/L水溶液, 避光搅拌一昼夜至浅兰色。

(2) 将5'-TMP, t-NB与不同浓度的七种制剂(对照组不加)充分混匀, 使混合液中5'-TMP终浓度为5 mmol/L, t-NB为10 mmol/L, SP分别为15, 10, 5, 2.5和1 mg/ml; PSP₁和PSP₂分别为7.5, 5和1 mg/ml; 螺旋藻分别为5, 1和0.2 mg/ml; 槲皮素分别为2.5, 0.5和0.1 mg/ml; 单宁酸分别为12.5, 2.5和0.5 mg/ml; 知母宁分别为0.5, 0.1和0.02 mg/ml。

(3) 通入氮气, 1 h后立即封管, 室温下⁶⁰Co γ 射线照射, 总剂量1 kGy, 剂量率21 200~21 600 cGy/min。

(4) 照后立即在ESR波谱仪上测量, 确认ESR波谱的特征谱线及其信号幅度。ESR测试条件: 调频25 kHz, 调幅1 G, 时间常数10.24 s, 扫描时间41.94 s, 中心磁场3470 G, 功率10 mW, 扫描宽度100 G。

1.4 数据处理

(1) 以ESR信号特征谱线第二组峰的最高峰值代表ESR信号幅度, 其结果以峰值 $\pm$ 标准差表示。自由基清除率计算公式为:

$$\text{清除率} = \frac{\text{对照组平均峰值} - \text{实验组平均峰值}}{\text{对照组平均峰值}} \times 100\%$$

(2) 统计学处理: 借助 SAS6.03 软件包, 采用 t 检验。

2 结 果

SP、知母宁、PSP₁、PSP₂、单宁酸、槲皮素和螺旋藻的自由基清除率列于表 1~7, 知母宁和 SP 与 5'-TMP 二元水溶液体系自旋捕集 ESR 波谱信号如图 1 和图 2 所示。

表 1 SP 对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

SP 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	4.13 $\pm$ 0.38	
1	3.09 $\pm$ 0.33	25.18 *
2.5	2.39 $\pm$ 0.08	42.13 * *
5	1.80 $\pm$ 0.26	56.42 * *
10	1.27 $\pm$ 0.16	69.23 * *
15	1.04 $\pm$ 0.16	74.82 * *

注 * 与对照组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, 下同。

表 2 知母宁对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

知母宁浓度/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	2.440 $\pm$ 0.180	
0.02	2.250 $\pm$ 0.130	7.79 *
0.1	1.530 $\pm$ 0.320	37.30 *
0.5	1.030 $\pm$ 0.230	57.79 *

表 3 单宁酸对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

单宁酸浓度/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	2.600 $\pm$ 0.020	
0.5	1.250 $\pm$ 0.020	51.92 * *
2.5	0.720 $\pm$ 0.050	72.31 * *
12.5	0.580 $\pm$ 0.104	77.69 * *

表 4 槲皮素对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

槲皮素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	2.420 $\pm$ 0.380	
0.1	1.110 $\pm$ 0.120	54.13 * *
0.5	1.050 $\pm$ 0.220	56.61 * *
2.5	0.590 $\pm$ 0.020	75.62 * *

表 5 PSP₁ 对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

PSP ₁ 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	6.924 $\pm$ 0.089	
1	5.771 $\pm$ 0.154	16.65 * *
5	3.129 $\pm$ 0.415	54.81 * *
7.5	1.904 $\pm$ 0.014	72.50 * *

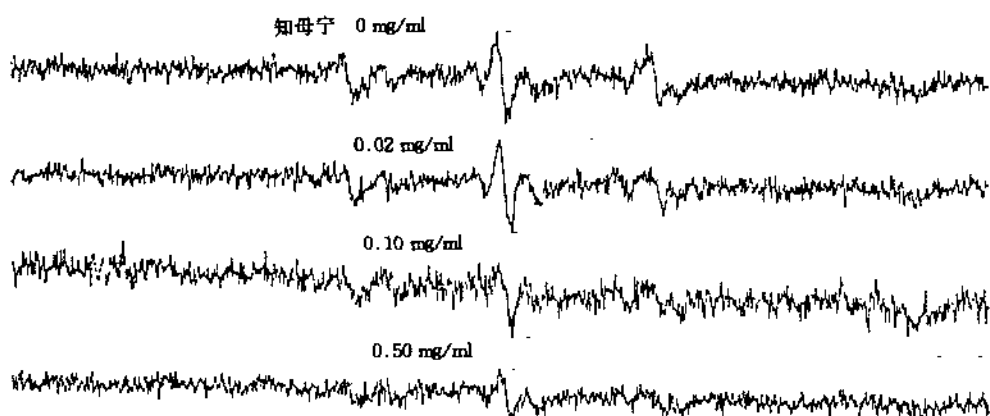


图 1 知母宁-TMP 二元水溶液体系自旋捕集 ESR 波谱信号

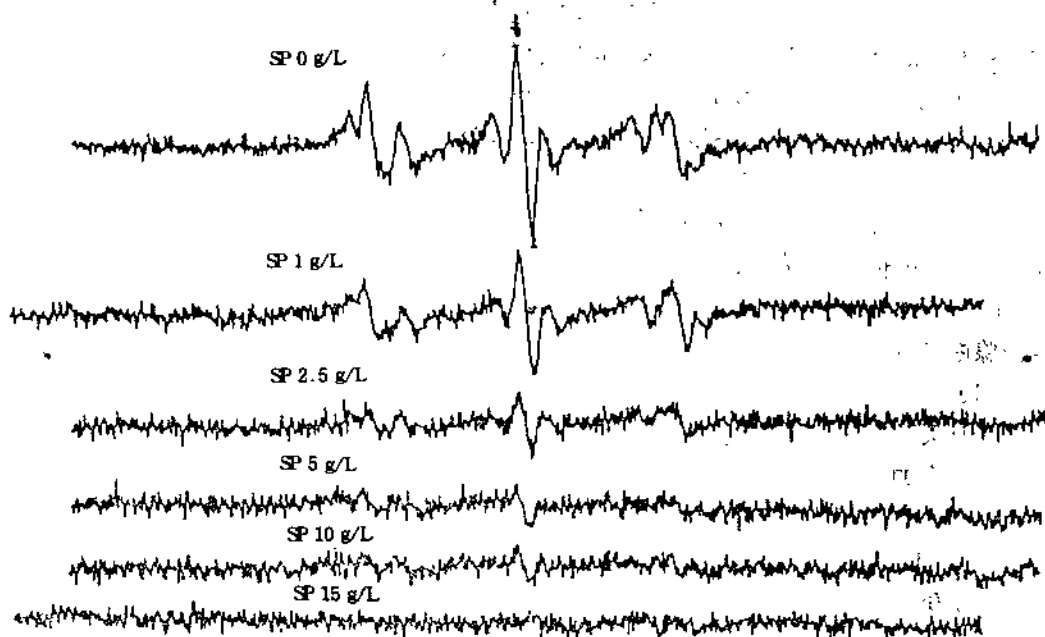


图 2 SP-TMP 二元水溶液体系自旋捕集 ESR 波谱信号

表 6 PSP₂ 对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

PSP ₂ 浓度/mg · ml ⁻¹	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	6.715 ± 0.108	
1	4.530 ± 0.218	32.53 *
5	2.829 ± 0.032	57.87 *
7.5	1.838 ± 0.005	72.63 *

表 7 螺旋藻对 5'-TMP 间接辐射损伤效应的防护作用

螺旋藻浓度/mg · ml ⁻¹	ESR 信号幅度 ($\bar{x} \pm s$)	清除率/%
0	2.360 ± 0.198	
0.2	3.660 ± 0.211	-55.08 *
1	2.917 ± 0.076	-23.02 *
5	1.583 ± 0.076	32.92 *

3 讨 论

电离辐射作用于生物体,可产生直接作用和间接作用^[7]。细胞中 70%是水,在电离辐射作用下会产生 H·, ·OH 及水合电子(e_{aq}⁻)等初始辐射分解自由基,这些自由基攻击生物大分子如 DNA, RNA 和酶等,产生生物大分子自由基。生物大分子自由基进一步攻击其他生物大分子,并将其未偶电子传递给其他生物大分子,同时在生物膜上还会发生脂质过氧化反应,从而引起一系列的辐射损伤过程。此外,电离辐射也可直接作用于生物大分子,生成自由基。因此,生物大分子的辐射化学改变是一切放射生物效应的物质基础。DNA 是对辐射最敏感的生物大分子之一,而自由基是造成 DNA 损伤的主要因素。辐射产生的自由基攻击 DNA,产生 DNA 自由基,导致 DNA 的断裂、损伤,自由基与细胞死亡、突变、转化和致癌作用有关。而自由基清除剂能俘获及钝化自由基,阻断 DNA 遭受自由基的损伤,使 DNA 自由基上的未偶电子发生转移,清除 DNA 自由基,修复 DNA,从而保护了 DNA 的结构和功能。我们以 5'-TMP 为 DNA 的模型^[8,9],采用 ESR 方法在室温下观察了 5'-TMP 受 γ 射线照射所产生的自由基,并用自旋俘获技术观察了几种中药制剂对水溶液中胸腺嘧啶核酸的辐射防护作用。初步研究表明,SP、知母宁、螺旋藻、槲皮素、单宁酸和云芝多糖均具有清除自由基的作用,由此推测它们的辐射防护作用与其俘获和钝化自由基有关。t-NB 作为自旋捕集剂,它与 γ 射线辐照 DNA 水溶液产生的短寿命自由基加合成为稳定的氮氧自由基,借助于 ESR 可鉴别自由基的种类和结构。由图 1 和图 2 可见,受照 5'-TMP 分子的自旋捕集 ESR 信号具有典型的特征性超细分裂结构,与文献 [9] 谱线相符,且 SP-TMP 和知母宁-TMP 二元水溶液体系的自旋捕集 ESR 信号与 5'-TMP 相同,表明确实存在 5'-TMP 自由基,其信号幅度随 SP 或知母宁的加入而明显减弱,证实 5'-TMP 自由基得到清除,其损伤得到了有效保护。

从表 5 和表 6 的数据可以看出,PSP₁ 和 PSP₂ 对自由基的清除效果较好,但两者之间无明显的差别,只是在较低浓度 (1 mg/ml) 时,精制 PSP₂ 优于 PSP₁ 的清除率。SP 对自由基的清除率 (见表 1) 与 PSP 也基本相仿。从表 2~4 的数据可以看出,知母宁、槲皮素和单宁酸对自由基的清除效果比 PSP 和 SP 更佳,且在较低浓度 (0.5 mg/ml) 就能达到 50% 以上的清除率。知母宁和槲皮素为天然黄酮类,它们均含有多个酚羟基,能进行自旋捕集,

因此是很好的自由基清除剂^[10]。丹宁酸又称鞣酸，是茶叶中的有效组分，它可生成儿茶酚或焦五倍子酚，均含有多元酚，其酚羟基也具有良好的捕集自由基的功效^[10]。SP 和 PSP 属植物多糖类，它们有多种药效作用，而多糖类是一大类辐射防护剂^[11]。我们的研究表明，SP 和 PSP 具有辐射防护作用的机制可能与它们清除了水辐射产生的自由基及随后产生的 5'-TMP 自由基有关。螺旋藻具有辐射防护作用，已被人们所证实^[3,12]，但我们的结果（见表 7）不甚理想，与我们预测的结果有较大的距离，这是否与我们所用的片剂中有其它成分（如赋形剂及其它添加剂）在 γ 射线照射下可能产生自由基有关，有待证实。

我们的研究只是初步的。对这几种制剂清除自由基的机理，它们分别对哪类自由基的清除有效，哪类无效，是否对 5'-TMP 的直接辐射损伤有防护作用，是否对细胞中的 DNA 有辐射防护作用，有待进一步研究。初步的印象是这几种制剂对去除自由基均有一定效果，PSP、SP、槲皮素、单宁酸和知母宁效果较好，特别是后 3 种效果更佳，应重点深入研究。

参 考 文 献

- 1 强亦忠，王崇道，劳勤华等. 辐射防护，1995，15（6）：457
- 2 邵源，强亦忠，孙存普等. 苏州医学院学报，1996，16（5）：805
- 3 张成武，曾昭琪，张媛贞等. 营养学报，1996，18（3）：327
- 4 Yoshizawa K, Anetani A, Tsunhiro J, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59: 1933
- 5 Droze I, et al. Aviksm Ekolog Med, 1993, 27: 77
- 6 Xie meilin, Lu Qun, Gu Zhenlun. Acta Pharmacologica Sinica, 1996, 17: 334
- 7 金为翘. 自由基与辐射损伤. 见陈瑗，周玫主编：自由基医学. 北京：人民军医出版社，1991. 360~389
- 8 Miki nori K, Wakako H. Biochem, 1989, 28: 9625
- 9 Shiro K. Radiat Res, 1997, 28: 9625
- 10 王钢. 自由基与中医中药. 南京：南京大学出版社，1993，65~74
- 11 Frang G. Planta Medica, 1989, 55: 493
- 12 Carr NG. Antultraviolet and anti-irradiation properties of blue green, In Carr NG ed: The Biology of Cyanobacteria. London: Blackwell Scientific Publications, 1982. 263~305