

of the founding of the college, ed. *The 30th anniversary of the founding of the Chinese Academy of Medical Sciences, the 70th anniversary of the founding of the Peking Union Medical College, collection of scientific papers.* Beijing: China Science and Technology Press, 1987: 119-20

- 4 Else A, Christopher CF, Kalyanaraman B. The use of spin label oximetry in the study of photodynamic inactivation of Chinese hamster ovary cells. *Photochem Photobiol* 1986; 44 : 741
- 5 Buettner GR. The spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In: Oberlet ed. *Superoxide dismutase.* Boca Raton: CRC Press, 1982 : 63-81
- 6 Buettner GR, Oberley LM. Consideration in the spin trapping of superoxide and hydroxyl radical in aqueous systems using 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 83: 69
- 7 Lai CS, Hopwood LE, Hyde JS, Lukiewicz S. ESR studies of oxygen uptake by Chinese hamster ovary cell cycle. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1982; 79 : 1160
- 8 Ingold KU. Biological antioxidants. In: Hill H ed. *Inorganic and organic radicals: their biological and clinical relevance.* Cambridge: University Press, 1985 : 565-75

9 Markert M, Andrews PC, Babior BM. Oxygen radicals in biological system. In: Packer L ed. *Methods in Enzymology, Vol 105.* NY : Academic Press, 1984 : 358-65

用电子自旋共振方法检测五味子酚清除自由基活性

林壹俊、刘耕陶 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050, 中国)

李小洁、赵保路、忻文娟 (中国科学院生物物理研究所, 北京 100080, 中国)

摘要 从五味子中提取出的五味子酚(Sal)具有抗脂过氧化作用. 本文用电子自旋共振 electron spin resonance (ESR) 和自旋捕捉技术研究了 Sal 清除自由基的活性. 结果表明: Sal 清除由 tetradecanoylphorbol acetate (TDPA) 刺激人多形核白细胞(Neu)所产生的氧自由基. 自旋探针测氧法结果表明对 TDPA 刺激 Neu 时的氧消耗无影响. 在 Fenton 反应体系中, 对羟自由基的清除率为 34.4%, 在黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶和光照核黄素体系中, 对超氧阴离子的清除作用分别为 26.1%和 21.9%. 在这些体系中, Sal 的作用均比维生素 E 强. 结果提示 Sal 具有直接捕获氧自由基的活性.

关键词 五味子酚; 五味子甲素; 电子自旋共振; 自由基; 嗜中性白细胞

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Nov; 11 (6) : 539-541

小檗胺的抗氧化作用

句海松¹、韩哲武 (内蒙古医学院药理教研室, 呼和浩特 010059, 中国)

Antioxidant effect of berbamine

JU Hai-Song¹, HAN Zhe-Wu

(Department of Pharmacology, Inner Mongolia Medical College, Huhehot 010059, China)

ABSTRACT The antiperoxidant action of berbamine (Ber) was demonstrated by colorimetric estimation of malondialdehyde (MDA) formation, and the scavenging effect of Ber on O₂⁻ was investigated by chemiluminescence method and ESR-spin trapping

technique. Ber 11-100 μmol/L remarkably inhibited MDA formation induced by incubating mice liver homogenate at 37°C with vibration for 1 h. Ber 1-100 μmol/L and 0.2-0.6 mmol/L effectively scavenged O₂⁻ in alkaline DMSO and xanthine/xanthine oxidase systems respectively. The results show that Ber is an antioxidant.

KEY WORDS berbamine; electron spin resonance; luminescence; free radicals; lipid peroxides; antioxidants

Received 1990 Jan 2 Accepted 1990 Jun 27

¹ Now in Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

摘要 用比色法测定丙二醛 (MDA) 研究小檗胺 (Ber) 抗脂质过氧化作用, 并用化学发光法和自旋捕捉技术检测该药对 O₂⁻ 的清除作用. Ber 11-100 μmol/L 对

小鼠肝匀浆在振荡温育条件下生成 MDA 有明显抑制。Ber 1-100 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.2-0.6 mmol/L 分别对碱性二甲基亚砷和黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生的 O_2^- 有明显清除作用。结果提示 Ber 有抗氧化作用。

关键词 小檗胺; 电子自旋共振; 发光; 自由基; 过氧化脂质; 抗氧化剂

小檗胺 (berbamine, Ber) 是一种双苜基异喹啉类生物碱, 它有升高白细胞, 抗心律失常和抗心肌缺血等作用^(1,2), 临床用于防治放疗及化疗引起的白细胞减少症⁽³⁾。Ber 能抑制甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(FMLP) 刺激豚鼠多形核白细胞释放的超氧阴离子自由基 (superoxide anion, O_2^-)⁽⁴⁾。本实验用 O_2^- 的清除剂超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 为对照, 研究 Ber 对脂质过氧化的影响及其对 O_2^- 的直接作用。

MATERIALS

昆明 δ 小鼠由内蒙古大学实验动物研究中心提供, 体重 $27.7 \pm \text{SD } 1.6 \text{ g}$, $n = 9$ 。硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid) 和 3-氨基邻苯二甲酰肼是 E Merck 产品。1,1,3,3-四乙氧基丙烷 (1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP), 黄嘌呤 (xanthine, Xan), 5,5-二甲基吡咯氮氧化物 (5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide, DMPO) 均为 Sigma 产品。二甲基亚砷 (DMSO) 是北京化工厂产品。黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 为中国科学院上海生物化学研究所产品。SOD 是军事医学科学院产品, 3300 IU/mg。其余试剂均为国产 AR 级。Ber 由中国科学院林业土壤研究所提供, mp 268-270 $^{\circ}\text{C}$ 。

METHODS AND RESULTS

Ber 对脂质过氧化的影响 将小鼠断头后取出肝脏, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水经腔静脉灌洗肝脏直到肝脏由红褐色变为黄褐色为止。用 pH 7.4 的磷酸缓冲液制成 5%(wt/vol) 肝匀浆。

取肝匀浆 1.5 ml, 加 Ber 0.1 ml 或等量生理盐水在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温育 1 h。用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛 (malondialdehyde, MDA)。以 TEP 做标准品, 按标准曲线计算 MDA 含量⁽⁵⁾。Ber 11-100 $\mu\text{mol/L}$ 和 SOD 625 ng/L 对振荡温育引起的 MDA 升高均有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。Ber 抑制 MDA 生成呈明显的剂量-效应关系 (Tab 1)。表明 Ber 有抗脂质过氧化作用。

Tab 1. Effect of berbamine on lipid peroxides in mice liver homogenates incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ with vibration for 1 h. $n = 9$, Each value is the $\bar{x} \pm \text{SD}$ of duplicate determinations. * $P < 0.01$ vs control. Ber = berbamine, SOD = superoxide dismutase, MDA = malondialdehyde.**

Drug	Concn	MDA (nmol/g)	Inhibition (%)
Control	-	230 \pm 18	0
Ber	11 $\mu\text{mol/L}$	156 \pm 15***	32.3 \pm 3.2
	33 $\mu\text{mol/L}$	85 \pm 11***	63.4 \pm 3.0
	100 $\mu\text{mol/L}$	30 \pm 3***	86.6 \pm 1.2
SOD	625 ng/ml	126 \pm 8***	45.5 \pm 7.3

Ber 对碱性 DMSO 产生 O_2^- 的影响 将含有 3-氨基邻苯二甲酰肼 0.3 mmol/L 和不同浓度 Ber (对照同上) 的样品管置冰水浴中, 20 min 后加入碱性 DMSO (含 1% 水和 NaOH 5 mmol/L)。并立刻计时。15 min 后用 Beckman LS-5801 型液体闪烁计数器进行单光子测定, 结果用 dpm 表示⁽⁶⁾。结果表明 Ber 对 O_2^- 介导的化学发光有显著的抑制作用, 且此作用呈剂量依赖关系 (Tab 2)。提示 Ber 有清除 O_2^- 的作用。

Ber 对 Xan/XO 系统生成 O_2^- 的影响 将含有 Xan 0.32 mmol/L , 二乙三胺五乙酸 (DETAPAC) 0.16 mmol/L , Ber (对照同上) 及 DMPO 80 mmol/L 的混合物混匀。加入 XO 0.0934 IU/ml 启动反应。将反应液吸入石英毛细管内, 把石英毛细管放入电子自旋共振仪 (electron spin resonance, ESR, Varian

Tab 2. Scavenging effect of berbamine on O_2^- generated in alkaline DMSO system. $n=4$, $\bar{x} \pm SD$. *** $P < 0.01$ vs control, $O_2^- =$ superoxide anion, DMSO = dimethyl sulfoxide.

Drug	Concn	$10^{-4} \times$ Radio-activity(dpm)	Inhibition (%)
Control	-	542 ± 31	0
Ber	1 μ mol/L	376 ± 18***	30.6 ± 2.9
	10 μ mol/L	103 ± 24***	81.0 ± 1.1
	100 μ mol/L	17 ± 2***	96.8 ± 0.4
SOD	66 ng/ml	273 ± 21***	50.8 ± 1.6

E-109型)的谐振腔内描记ESR波谱⁽⁷⁾。测定条件: X波段, 微波功率15 mW, 调制频率100 kHz, 调制幅度0.1 mT, 中心磁场324 mT, 扫宽20 mT, 扫速5 mT/min, 时间常数0.128, 温度25℃。用自旋加合物DMPO-OOH波谱信号第一峰的峰-峰高度h(mm)表示ESR信号的相对强度⁽⁷⁾。向反应体系加入Ber(终浓度0.2-0.6 mmol/L)后, ESR信号强度明显减弱, 表明Ber有直接捕获 O_2^- 的作用(Tab 3)。

Tab 3. Scavenging effect of Ber on O_2^- generated in xanthine/xanthine oxidase system. $n=3$, $\bar{x} \pm SD$. *** $P < 0.01$ vs control, ESR = electron spin resonance.

Drug	Concn	ESR signal intensity(mm)	Inhibition (%)
Control	-	99.7 ± 1.2	0
Ber	0.2 mmol/L	73.0 ± 1.0***	26.8 ± 1.3
	0.6 mmol/L	53.5 ± 2.9***	46.5 ± 2.7
SOD	9.6 μ g/ml	49.3 ± 4.4***	46.9 ± 2.3

DISCUSSION

小鼠肝匀浆在振荡温育后脂质过氧化反应增强, 加入SOD可明显抑制MDA生成。这表明 O_2^- 在本实验条件下发生的脂质过氧化反应中起重要作用。加Ber后对MDA生成有明显的抑制, 表明该药对诱发的脂质过氧化反应有阻断作用。化学发光测定的结果表明Ber对

O_2^- 有较强的清除作用。进一步用ESR-自旋捕集技术也证实Ber的确能清除 O_2^- 。故推测清除 O_2^- 是Ber抗脂质过氧化的机理之一。据报道⁽⁸⁾, 抗氧化剂维生素E清除 O_2^- 的过程为: 维生素E结构中酚羟基上的氢被 O_2^- 抽取, 维生素E本身生成稳定的苯氧自由基。Ber结构中也有一个酚羟基。它可能是Ber清除 O_2^- 的功能基团。本文结果初步表明Ber有抗氧化作用。

ACKNOWLEDGMENTS 中国科学院生物物理研究所李小洁讲师、赵保路副教授和忻文娟教授协助测定ESR。

REFERENCES

- 1 Yang BF, Wang XH, Li YX, Li WH. Effect of berbamine hydrochloride on experimentally induced arrhythmias. *Acta Pharm Sin* 1987; 22 : 700
- 2 Wang XH, Yang BF, Li YX, Li WH. Protective effect of berbamine on myocardial infarction in rabbits and rats. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7 : 231
- 3 Yang K, Zhao XL, Xiao PG, Liu GS. Clinical trial of berbamine in 405 leucopenia patients. *Chin Pharmaceu Bull* 1982; 17 : 21
- 4 Matsuno T, Orita K, Sato E, Nobori K, Inoue B, Utsumi K. Inhibition of metabolic response of polymorphonuclear leukocyte by biscoclaurine alkaloids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36 : 1613
- 5 Roy D, Pathak DN, Singh R. Effects of chlorpromazine on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the various regions of aging rat brain. *J Neurochem* 1984; 42 : 628
- 6 Hyland K, Voisin E, Banoun H, Auclair C. Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generating system. *Anal Biochem* 1983; 135 : 280
- 7 Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 1989; 14 : 175
- 8 Tajima K, Sakamoto M, Okada K, et al. Reaction of biological phenolic antioxidants with superoxide generated by cytochrome P-450 model system. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 115 : 1002