

槲皮素-7-硫酸酯钠对 H₂O₂ 所致 DNA 氧化损伤的保护作用

陈再蓉¹, 赵小燕², 朱玉新¹, 沈渠深², 戴忠^{2*}

(1. 新疆阿克苏职业技术学院医学系, 新疆 阿克苏 843000

2. 广东医学院药理学教研室, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:**探讨槲皮素-7-硫酸酯钠的体外抗氧化活性及对 DNA 氧化损伤的保护作用。**方法:**通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基(\cdot DPPH)、羟自由基($\text{OH}\cdot$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^-\cdot$)清除实验评价槲皮素-7-硫酸酯钠的体外抗氧化活性;采用紫外扫描法、凝胶电泳技术观察槲皮素-7-硫酸酯钠对 H₂O₂ 所致 DNA 氧化损伤的保护作用。**结果:**自由基清除实验结果显示,槲皮素-7-硫酸酯钠能有效清除 \cdot DPPH、 \cdot OH 和 $\text{O}_2^-\cdot$ 自由基,其清除能力较维生素 C(VC)及槲皮素都强,且呈浓度依赖性。DNA 氧化损伤保护实验结果显示,H₂O₂ 可致小牛胸腺 DNA 出现断裂梯带和浓度下降,槲皮素-7-硫酸酯钠预处理可抑制 H₂O₂ 所致的小牛胸腺 DNA 断裂及浓度下降,且有浓度依赖性。**结论:**槲皮素-7-硫酸酯钠体外有较强的抗氧化能力,并对 H₂O₂ 所致的 DNA 氧化损伤有保护作用。

[关键词] 槲皮素-7-硫酸酯钠; 体外; 抗氧化活性; DNA 氧化损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0243-04

[doi] 10.11653/syfy2013150243

Protective Effect of Sodium Quercetin-7-mono-sulfonate on H₂O₂ Induced DNA Oxidative Damage

CHEN Zai-rong¹, ZHAO Xiao-yan², ZHU Yu-xin¹, SHEN Qu-shen², DAI Zhong^{2*}

(1. Department of Medicine, Aksu Vocational and Technical College, Aksu 843000, China;

2. Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a theoretical basis for clinical application of sodium quercetin-7-mono-sulfonate (SQMS), its antioxidant property and DNA oxidative damage protective effect *in vitro* were studied. **Method:** The antioxidant activity of SQMS was evaluated by 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (\cdot DPPH), hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) and superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) scavenging assays. Gel electrophoresis and spectrophotometry methods were used to study the protective effect of SQMS on H₂O₂ induced DNA oxidative damage *in vitro*. **Result:** SQMS exhibited a concentration-dependent scavenging effect on \cdot DPPH, \cdot OH and $\text{O}_2^-\cdot$, and its scavenging effects are stronger than vitamin C (VC) and quercetin. By gel electrophoresis and spectrophotometry, the DNA ladder disappeared and the DNA concentration obvious increased by treatment with H₂O₂. Pretreatment with quercetin or sodium quercetin-7-sulfonate, the DNA ladder was more clear and the concentration of DNA decreased obviously. **Conclusion:** SQMS has stronger antioxidant activity *in vitro*, and has protective effect on H₂O₂ induced DNA oxidative damage.

[Key words] sodium quercetin-7-mono-sulfonate; *in vitro*; antioxidant activity; DNA oxidative damage

羟自由基(\cdot OH)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)和 H₂O₂ 等自由基是机体代谢过程中产生的中间产物,

[收稿日期] 20130130(018)

[第一作者] 陈再蓉, 副教授, 从事生物化学及乳腺疾病研究, Tel: 0997-2526725, E-mail: 240415891@qq.com.cn

[通讯作者] *戴忠, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事心血管药理及骨药理研究, Tel: 0769-22896364, E-mail: daizhong_dai@yahoo.com.cn

当机体自由基清除机制紊乱时,过量的自由基会破坏体内的大分子如核酸 DNA、蛋白质和脂类等,从而影响细胞物质及能量的正常代谢,导致疾病的发生^[1-2]。大量研究表明黄酮类化合物槲皮素(quercetin, 3,3',4,5,7-五羟基黄酮)具有抗氧化、清除自由基,从而减轻自由基对组织造成的损伤,因而表现有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤和防治心血管疾病等多种药理作用^[3-4]。但由于槲皮素难溶于水,生物利用度低,限制了槲皮素的给药途径和临床应用。

槲皮素-7-硫酸酯钠(SQMS)是新近人工半合成的槲皮素水溶性衍生物,研究证明 SQMS 具有抗血小板凝聚,进而起到抑制血栓形成的作用^[5]。笔者近期研究发现,SQMS 对大剂量维生素 C(VC)所致的 DNA 氧化损伤有保护作用^[6]。本文进一步探讨槲皮素-7-硫酸酯钠的体外抗氧化活性及对 H₂O₂ 所致小牛胸腺 DNA 氧化损伤的保护作用,为其将来药用提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂 SQMS(纯度 93.8%)由广东医学院生化教研室提供;D15000 DNA ladder, TAE 缓冲液,核酸染色剂(北京索莱宝科技有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、小牛胸腺 DNA(美国 Sigma 公司);其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 BT25S 电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],UV-1800PC 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),Bio-Rad GEL-EQ 凝胶成像分析系统(美国),NanoDrop1000 微量分光光度计(美国),SL SHEL LAB 孵育箱(美国),BG-subMIN 水平电泳槽(北京百晶生物技术有限公司)。

1.3 样品处理 SQMS, quercetin 和 VC 用双蒸水配制成相应浓度;小牛胸腺 DNA 溶解于双蒸水中,置 4 ℃ 冰箱中过夜后用 UV 分光光度计测量 DNA 纯度与浓度。

2 方法

2.1 DPPH 自由基(·DPPH)清除 参考 Sarikurcu 等^[7]的方法并稍做改动。取 7 mL 不同浓度的 VC、槲皮素及槲皮素-7-硫酸酯钠溶液分别加入 3 mL DPPH 溶液(3 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹)中,摇匀后置暗室内反应 30 min,分光光度法检测反应液在 515 nm 处的吸光度(A),每个浓度重复 3 次,并计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$$

其中:A₁ 为样品与 DPPH 反应液的吸光值,A₂

为样品与 60% 乙醇混合液的吸光值,A₀ 为 DPPH 溶液与蒸馏水混合液的吸光值。

2.2 超氧自由基(·O₂⁻)清除 参考文献[8]的方法并稍做改动。取 5 mL Thris-HCl 缓冲液(pH 8.2, 0.05 mol·L⁻¹)加入 4 mL 样品溶液,混匀后在 25 ℃ 水浴中保温 20 min,取出后立即加入 25 ℃ 5 mmol·L⁻¹的没食子酸溶液 0.5 mL,混匀后倒入比色皿中,于 325 nm 处每隔 30 s 测 A 1 次,共测 3 min,每个浓度重复 3 次。邻苯三酚自氧化的抑制率计算使用下列公式:

$$\text{抑制率} = (A_0 - A_s/A_0) \times 100\%$$

其中:A_s 为样品的吸光值,A₀ 为空白对照的吸光值。

2.3 羟自由基(·OH)的清除 参考文献[9]的方法,取 2 mL 不同浓度样品溶液置于 25 mL 量瓶中,依次加入 1 mL FeSO₄(含 EDTA,9.0 mmol·L⁻¹)、0.3% H₂O₂(1.0 mL)混匀,接着加入 1.0 mL 水杨酸醇溶液(9.0 mmol·L⁻¹),加双蒸水补充至 25 mL,摇匀,37 ℃ 孵育 30 min 后于 510 nm 测 A,每个浓度重复 3 次。按如下公式计算羟自由基清除率。

$$\text{清除率} = 1 - [(A_s - A_1)/A_0] \times 100\%$$

其中:A_s 为样品反应液的吸光值,A₁ 为未加水杨酸醇溶液组的吸光值,A₀ 为空白对照的吸光值。

2.4 SQMS 抑制羟自由基所致 DNA 损伤 DNA 氧化损伤模型的构建及抗氧化剂对 DNA 氧化损伤的保护作用研究均采用 Fenton 反应^[10]。DNA 加样品混匀,置孵育箱(37 ℃)孵育 30 min。然后取反应物(1 μL)与 loading buffer(5 μL)混匀,加载到 1% 琼脂糖凝胶(含有 GoldView I 染料),立即在一个装有 TAE 缓冲液(1%)的平板凝胶电泳装置中(110 V)电泳 30 min,在紫外透射仪下拍摄凝胶;另取适量反应物用 UV 分光光度计测 DNA 浓度变化,每个浓度重复 3 次。

2.5 数据处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。数据分析采用单因素方差分析,以 P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 SQMS 清除·DPPH 不同浓度下 SQMS, quercetin 及 VC(0.4 ~ 10 μmol·L⁻¹)对·DPPH 清除能力(图 1)。结果显示,SQMS, Quercetin, VC 均能有效清除·DPPH,清除率高低顺序为:SQMS > VC > quercetin。

3.2 SQMS 清除超氧自由基(·O₂⁻) 不同浓度 SQMS, Quercetin 及 VC(浓度范围 0.16 ~ 0.42

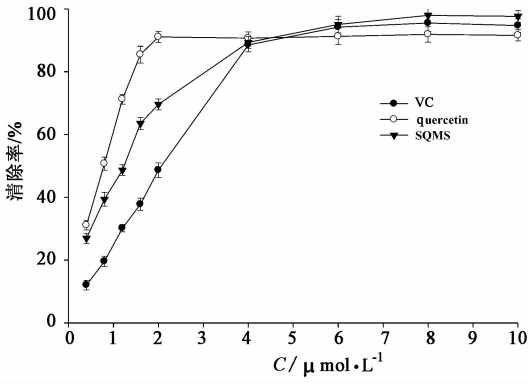


图1 SQMS, quercetin 及 VC 对·DPPH 的清除作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

μmol·L⁻¹)对没食子酸自氧化体系产生的·O₂⁻清除作用实验结果见图2。由图可以看出, SQMS, Quercetin, VC 对·O₂⁻均有很强的清除能力 SQMS 对有很强的清除作用,清除率高低顺序为: SQMS > VC > Quercetin。

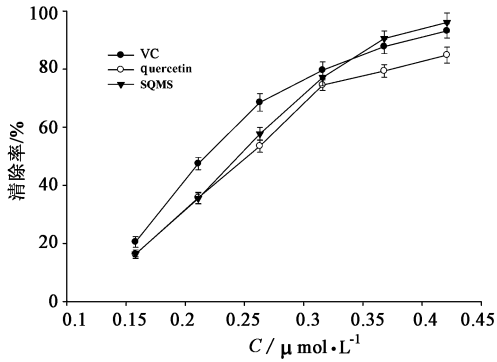


图2 SQMS, quercetin 及 VC 对·O₂⁻ 的清除作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 SQMS 清除羟自由基(·OH) 不同浓度 SQMS, quercetin 及 VC (0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0, 4.8 mmol·L⁻¹) 对·OH 清除实验结果见图3。SQMS, quercetin 及 VC 对·OH 均有清除作用,清除率高、低顺序为: SQMS > quercetin > VC。

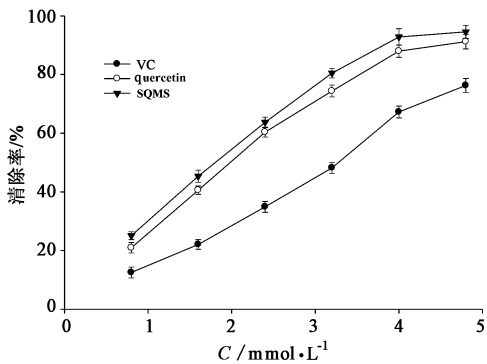
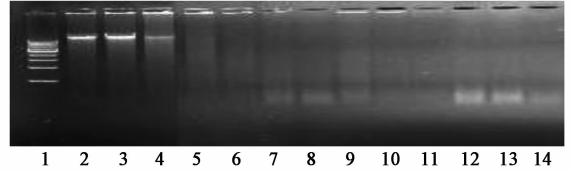


图3 SQMS, quercetin 及 VC 对·OH 的清除作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 SQMS, quercetin 和 VC 预处理对·OH 致 DNA

损伤 DNA 条带的影响 SQMS 抑制羟自由基(·OH)损伤小牛胸腺 DNA 的实验结果见图4。图中 Lane3,4 显示,单独应用 Fe²⁺ 或 H₂O₂,小牛胸腺 DNA 条带没有明显变化;而 Fe²⁺ 与 H₂O₂ 联合应用(Lane5 所示),小牛胸腺 DNA 条带消失,出现了拖尾现象。VC 保护组(Lane 6~8), quercetin 保护组(Lane 9~11)和 SQMS 保护组(Lane 12~14)均可看到 250 kp 附近的条带较损伤组亮,且 SQMS 保护组该条带更亮。



Lane 1. maker; Lane 2. 小牛胸腺 DNA 空白对照;

Lane 3. 小牛胸腺 DNA + H₂O₂ (0.06%);

Lane 4. 小牛胸腺 DNA + FeSO₄ (1.8 μmol·L⁻¹);

Lane 5. 小牛胸腺 DNA + H₂O₂ (0.06%) + FeSO₄ (1.8 μmol·L⁻¹);

Lane 6~8. 小牛胸腺 DNA + VC

(0.1, 0.25, 0.50 mmol·L⁻¹) + ·OH;

Lane 9~11. 小牛胸腺 DNA + 槲皮素

(0.1, 0.25, 0.50 mmol·L⁻¹) + ·OH;

Lane 12~14. 小牛胸腺 DNA + SQMS

(0.1, 0.25, 0.50 mmol·L⁻¹) + ·OH

图4 SQMS, quercetin 和 VC 预处理对 DNA 氧化损伤的保护作用

3.5 SQMS, quercetin 和 VC 预处理对·OH 致 DNA 损伤 DNA 浓度的影响 DNA 浓度变化测试结果见表1,单独应用 Fe²⁺ 或 H₂O₂,小牛胸腺 DNA 浓度与 DNA 空白组比较没有明显变化, Fe²⁺ 与 H₂O₂ 联合应用后 DNA 浓度明显降低(P < 0.05);中、高浓度的 SQMS, quercetin 和 VC 预处理均能明显抑制 Fe²⁺ 与 H₂O₂ 联合应用所致的 DNA 浓度降低(P < 0.05)。

4 讨论

有关槲皮素的化学修饰开展较早,多以槲皮素为先导化合物加以结构修饰,以改善其药效学性质。近来研究发现,槲皮素的儿茶酚结构、3 位羟基和 2, 3-双键是表现高抗氧化活性最重要的基团,7 位羟基没有明显的抗氧化作用,在槲皮素 5 或 7 位上进行的结构修饰能保留大部分抗氧化能力^[11-12]。SQMS 是以槲皮素为先导化合物在 7 位上进行磺化修饰而获得的槲皮素水溶性衍生物,本文研究结果显示, SQMS 在体外对·OH, O₂⁻·, ·DPPH 自由基均有较强的清除能力,表明 SQMS 有较好的抗氧化能力。此研究结果进一步提示,在槲皮素 7 位上进行的磺化修饰能保留其抗氧化活性。

表 1 SQMS, quercetin 和 VC 预处理对 DNA 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	H ₂ O ₂ /%	FeSO ₄ /μmol·L ⁻¹	药物 /mmol·L ⁻¹	DNA 质量浓度 /mg·L ⁻¹
空白对照	-	-	-	117.3 ± 9.8
H ₂ O ₂	0.06	-	-	108.5 ± 13.2
FeSO ₄	-	1.8	-	121.3 ± 14.7
H ₂ O ₂ + FeSO ₄	0.06	1.8	-	68.6 ± 8.6 ¹⁾
VC	0.06	1.8	0.1	57.4 ± 12.1
	0.06	1.8	0.25	81.7 ± 8.2 ²⁾
	0.06	1.8	0.5	97.3 ± 10.6 ²⁾
quercetin	0.06	1.8	0.1	68.6 ± 15.6
	0.06	1.8	0.25	91.1 ± 9.6 ²⁾
	0.06	1.8	0.5	96.7 ± 12.3 ²⁾
SQMS	0.06	1.8	0.1	59.3 ± 7.6
	0.06	1.8	0.25	86.5 ± 6.7 ²⁾
	0.06	1.8	0.5	89.1 ± 7.3 ²⁾

注:与空白对照, H₂O₂ 组, FeSO₄ 组比较¹⁾ P < 0.05; 与 H₂O₂ + FeSO₄ 组比较²⁾ P < 0.05。

近来研究发现, 机体如不能及时清除体内过多的羟自由基(·OH), ·OH 将直接攻击 DNA 造成 DNA 的损伤, 导致疾病发生^[13]。本文通过 Fenton 反应, 构建体外·OH 所致的 DNA 氧化损伤模型, 进一步探讨了 SQMS 对·OH 所致的 DNA 氧化损伤的保护作用。研究结果显示, 随着·OH 浓度的升高, DNA 条带消失并出现了拖尾现象, DNA 浓度亦明显下降, 提示·OH 能导致 DNA 损伤; 而 SQMS 预处理, 上述现象明显改善, 提示 SQMS 对·OH 所致的 DNA 氧化损伤产生了保护作用。

近来有研究发现, DNA 可与许多化合物特别是一些药物小分子发生可逆性相互作用, 从而影响到 DNA 的生理和物理化学性质, 进而影响 DNA 的稳定性^[14-15]。本文研究结果显示, SQMS 预处理后, DNA 条带变亮, DNA 浓度降低不明显, 表明 SQMS 与 DNA 可能以某种方式结合, 增加了 DNA 的稳定性, 从而减轻 DNA 的氧化损伤。SQMS 与 DNA 具体以何种方式结合以及其体内抗氧化活性和对 DNA 的保护作用还有待进一步研究探讨。

[参考文献]

[1] Srinivasa Rao K, Chaudhury P K, Pradhan A. Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata* [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(2):729.

[2] Dussossoy E, Brat P, Bony E, et al. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.) [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(1):108.

[3] 孙静, 陈嘉艺, 藤丹, 等. 槲皮素对 H₂O₂ 致内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):174.

[4] Uppugundla N, Engelberth A, Vandhana R S, et al. Switchgrass water extracts: extraction, separation and biological activity of rutin and quercitrin [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(17):7763.

[5] 刘文, 梁念慈. 槲皮素-7-硫酸酯钠盐对血栓形成的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3):30.

[6] 赵小燕, 沈渠深, 左长清, 等. 大剂量维生素 C 对 DNA 损伤及槲皮素-7-硫酸酯钠的保护作用[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(3):248.

[7] Sarikurku C, Tepe B, Semiz D K, et al. Evaluation of metal concentration and antioxidant activity of three edible mushroom species from Mugla, Turkey [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(5):1230.

[8] Chen H, Zhang M, Xie B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea [J]. Food Chem, 2005, 90(1/2):17.

[9] Boligon A A, Pereira R P, Feltrin A C, et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss [J]. Bioresour Technol, 2009, 100(4):6592.

[10] Kumar M, Chandel M, Kumar S, et al. Protective effects of *Koelerutaria paniculata* Laxm. on oxidative stress and hydrogen peroxide-induced DNA damage [J]. Phytopharmacology, 2011, 1(5):177.

[11] Magnani L, Gaydou E M, Hubaud J C. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion [J]. Anal Chim Acta, 2000, 411(1/2):209.

[12] Moalin M, Strijdonck G P, Beckers M, et al. A planar conformation and the hydroxyl groups in the B and C rings play a pivotal role in the antioxidant capacity of quercetin and quercetin derivatives [J]. Molecules, 2011, 16(11):9636.

[13] Povirk L F, Steighner R J. Oxidized apurinic/aprimidinic sites formed in DNA by oxidative mutagens [J]. Mutation Research, 1989, 214:13.

[14] Min K, Ebeler S E. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(11):2716.

[15] 康敬万, 卓琳, 卢小泉, 等. 槲皮素与 DNA 的电化学作用研究 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2003, 39(4):57.

[责任编辑 聂淑琴]