

二甘氨酸组氨酸对 Cu(II) 催化 抗坏血酸氧化的影响

刘 虎 庞贻慧

(北京医科大学药学院, 北京 100083)

抗坏血酸(H₂A)的主要作用是防治坏血病。然而许多实验证明, 抗坏血酸的缺乏与肿瘤的发生和发展有一定关联⁽¹⁾, 大剂量使用抗坏血酸可以从一定程度上防治实验动物或人类肿瘤^(2,3)。其预防肿瘤作用可能是通过如下作用实现的。抗坏血酸作为一种强还原剂可以阻断食物及药物中亚硝酸盐与胺类生成致癌物亚硝酸铵^(4,5); 抗坏血酸氧化, 特别是在有微量过渡金属离子, 如 Cu²⁺, Fe³⁺ 存在下, 生成各种活性氧对肿瘤细胞产生细胞毒作用⁽⁶⁾。为了探讨抗坏血酸抗肿瘤的机理, 首先要搞清其氧化, 尤其是在过渡金属离子存在下的氧化机理。本文旨在研究生理条件下, 二甘氨酸组氨酸(GGH)对 Cu(II)催化抗坏血酸氧化的抑制, 检测反应中间体, 并对该体系的抗肿瘤活性进行研究。

实 验 部 分

试剂 抗坏血酸(AR), 上海化学试剂分装厂; 抗坏血酸钠(Puriss) Fluka, Switzerland; CuCl₂·2H₂O(AR) 北京红星化工厂; RPMI 1640 培养基, Life Technologies Inc. USA; GGH, 按 Chion 法^(7,8)自己合成, 其结构经红外、质谱、核磁共振氢谱及旋光谱确证。其络合物 (Cu(II)/GGH=1) 的结构, 用质谱 FAB 技术、ESR 谱、CD 谱及旋光谱确证; 实验体系用水, 三蒸水电导率控制在 $1.1 \pm 0.2 \mu\Omega\text{cm}^{-1}$ 。

一. GGH 对 Cu(II) 催化抗坏血酸氧化的抑制作用

紫外分光光度法追踪反应体系中抗坏血酸浓度的变化。反应体系均用 RPMI 1640 培养基为缓冲剂, 用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调至 pH 7.40, 体系中的氧为空气氧所饱和, 浓度约为 10^{-4} mol/L, 测定温度为 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 。

抗坏血酸的起始浓度为 1×10^{-4} mol/L, 在不同 Cu(II) 浓度及 GGH 存在下的氧化如图 1 所示。由图可见, 当 Cu(II) 浓度为 10^{-5} mol/L 时, 即加速抗坏血酸的氧化; 由曲线 3 与 5 比较可知, 虽然 Cu(II) 浓度均为 10^{-4} mol/L, 但由于 GGH 与 Cu(II) 形成络合物, 使溶液中游离 Cu(II) 大大减少, 而络合物本身催化作用很小, 所以 GGH 明显地抑制了 Cu(II) 催化的抗坏血酸氧化。

二. Cu(II)-GGH/抗坏血酸体系的反应活化能

Cu(II)/GGH = 1×10^{-4} mol/L, [H₂A] = 10^{-4} mol/L, 分别于 20°C, 25°C, 30°C, 35°C 测定抗坏血酸浓度的下降, 对所得曲线的初始部分进行线性回归, 求出初速度 V₀。以 lnV₀ 对 1/T 作图, 求得反应活化能 E 为 39.2 kJ/mol。

三. 反应中间体的检测

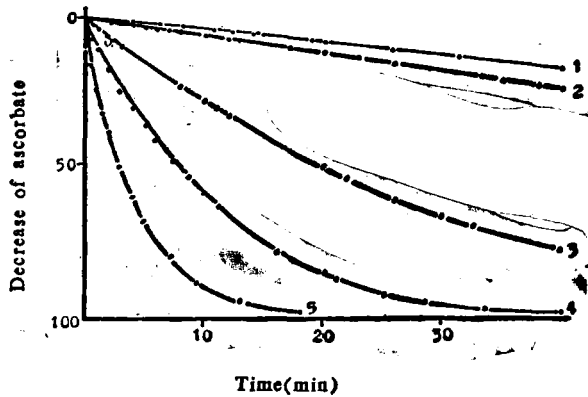


Fig 1. Oxidation of ascorbate in the presence of Cu(II) or Cu(II)/GGH $H_2A=1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1. Autoxidation of ascorbate; 2. $\text{Cu(II)}=1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3. $\text{Cu(II)/GGH}=1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4. $\text{Cu(II)}=1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5. $\text{Cu(II)}=1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

(一) ESR 光谱的测定 用 Bruker ER 200 电子自旋共振仪, 室温测定。

1. 抗坏血酸自由基 Cu(II) -抗坏血酸体系得到的 ESR 谱, 说明存在抗坏血酸自由基⁽⁹⁾。

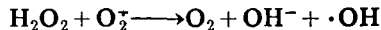
2. 活性氧自由基 加 Cu(II) , 抗坏血酸和自旋捕获剂 BPN (*N*-tert-butyl phenylnitron) 40 min 后, 封毛细管, 得到的 ESR 谱, 说明此反应体系中有活性氧自由基产生, 包括 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ ⁽¹⁰⁾。

3. 无氧条件下检测 Cu(I) 加 Cu(II) 、抗坏血酸和 BPN 后立即封管测定, 每 200 秒扫描一次, 结果发现 ESR 图中 Cu(II) 及 $\text{HA}\cdot$ 信号随时间不断下降以至消失, 但并没有出现活性氧自由基信号。说明绝氧条件下, $\text{Cu(II)} \rightleftharpoons \text{Cu(I)}$ 无法逆转。 Cu(I) 属 d^{10} 结构, 无 ESR 信号, 故 Cu(II) 信号不断下降以至消失。同时, 在无氧情况下, 抗坏血酸自由基的浓度不再增加, 自由基本身十分不稳定, 在水溶液中逐渐消失。同样, 无氧情况下, 无法生成可检测量的氧自由基, 所以活性氧信号一直没有出现。

(二) 荧光分光光度法检测 $\cdot\text{OH}$ 自由基⁽¹¹⁾

1. 在 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Cu/GGH 及苯甲酸 10 nmol, pH 7.4, RPMI 1640 培养液中分别加入 $[\text{H}_2\text{A}]$ $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 结果荧光强度值随 H_2A 浓度增加而增加。

2. 超氧化物歧化酶 (SOD) 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基生成的影响: 在 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ $\text{H}_2\text{A/Cu/GGH}$ 体系中分别加入 SOD 达到 600 ng 时, 荧光强度大大减弱, 说明当 SOD 达到一定浓度时, 则抑制苯甲酸的羟化。因此推断反应经历了 Haber-Weiss 过程⁽¹²⁾, 即,



此结果间接证明在反应系统中有 H_2O_2 生成。

四. Cu(II)/GGH 对抗坏血酸抗肿瘤活性的影响

取接种艾氏腹水癌细胞 7~10 d 后小鼠的腹水 100 μl 于消毒后的刻度试管中, 分别加入不同浓度的 Cu(II) , Cu(II)/GGH 和抗坏血酸, 用 RPMI 1640 培养液稀释至 5 ml, 37°C 保温 2 h 后测定。取 100 μl 反应液加入 0.5% 的锥虫蓝 (trypan blue) 20 μl 立即计数。求出死亡细胞的百分率。每个浓度 5 管, 重复测定 4 次。结果见图 2。当抗坏血酸浓度为 10^{-4} mol/L , Cu(II) 或 $\text{Cu(II)/GGH} \geq 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 抗癌活性较高, Cu(II) 降至 10^{-6} mol/L 时, 抗癌活性明显降低。而当抗坏血酸浓度为 10^{-5} mol/L 时, 即或 Cu(II) 浓度增至 10^{-4} mol/L , 活性亦较弱。

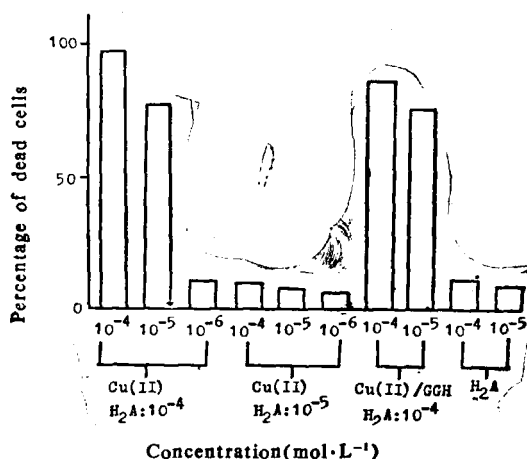
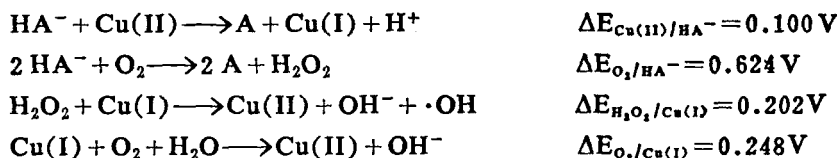


Fig 2. The killing effect of ascorbate/Cu(II) or ascorbate/Cu(II)/GGH systems to Ehrlich ascites tumor cells.

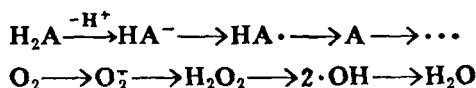
讨 论

根据实验结果：Cu(II)催化抗坏血酸氧化过程中有 Cu(I)，HA·，·OH，O₂⁻ 和 H₂O₂生成，在接近生理条件下，加入 GGH 可以抑制 Cu(II)对抗坏血酸的催化氧化；艾氏腹水癌细胞体外实验表明，当抗坏血酸和 Cu(II)或 Cu(II)/GGH 达到一定浓度时，可产生明显的细胞毒作用。这是由于 Cu(II)催化抗坏血酸氧化过程中有活性氧产生，其对于正常细胞及癌细胞虽均有杀伤作用，但因 GGH 与 Cu(II)络合，抑制 Cu(II) 对抗坏血酸的氧化，致使对正常细胞活性氧毒性减小。而对于癌细胞，因为肽酶活性高于正常细胞⁽¹³⁾，肽酶使 Cu(II)/GGH 解体放出游离的 Cu(II)而表现出抗癌活性与 Cu(II)/HA⁻相当。所以说 GGH 的加入减轻了单独 Cu(II)与抗坏血酸对正常细胞的毒性，而在遇到癌细胞时，放出 Cu(II)，表现出较大杀伤作用。又，这些反应产生的 O₂⁻，H₂O₂，特别是·OH，是生物系统中最强的氧化基因，对细胞和组织的损伤作用极大。因为在正常细胞中有较高活性的自由基消除系统如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶等以分解产生的活性氧^(13,14)，又有维持体内平衡的调节机制来运转抗坏血酸，所以在大量服用时，不会累积超过机体新陈代谢所需要的抗坏血酸量⁽¹³⁾。而在癌变细胞中，体内平衡的调节机制失控，并且超氧化物歧化酶等的活性降低。因此可引起活性氧富集造成癌细胞死亡。

综合上述结果，可以认为抗坏血酸在有 Cu(II) 或其络合物存在下氧化产生细胞毒性作用是通过如下反应实现的：



ΔE 为反应的氧化还原电位。从热力学角度看，上述四个反应均可进行。所以说抗坏血酸及氧分子在反应中各自经历了下列反应历程：



关键词 抗坏血酸; 二甘氨酸组氨酸

参 考 文 献

1. Bodansky O, et al. Concentrations of ascorbic acid in plasma and white cells of patients with cancer and noncancerous chronic disease, *Cancer Res* 1951; 11:238.
2. 王晓怀, 等. 维生素C抑制甲基胆蒽诱发小鼠腺胃癌作用的实验观察. *解放军医学杂志* 1984; 9:91.
3. Cameron E, et al. Ascorbate and cancer *Proc Am Phil Soc* 1979; 123:117.
4. Mirvish SS, et al. Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science* 1972; 177:65.
5. 宋圃菊, 等. 中华猕猴桃汁的防癌作用(二): 在体外模拟胃液中对亚硝酸盐合成的阻断作用——Ames 试验方法检测. *营养学报* 1984; 6:241.
6. Samuni A, On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions *Eur J Biochem* 1983; 137:119.
7. Chiou SH. DNA- and protein-scission activities of ascorbate in the presence of copper ion and a copper-peptide complex. *J Biochem* 1983; 94:1259.
8. 韩广旬, 等. 有机制备化学手册(中册). 北京: 石油化学工业出版社, 1975:85.
9. Kimoto E, et al. Enhancement of antitumor activity of ascorbate against Ehrlich ascites tumor cells by the copper: glycylglycylhistidine complex *Cancer Res* 1983; 43:824.
10. Sugiura Y. The production of hydroxyl radical from copper(I) complex systems of bleomycin and tal'yso mycin comparison with copper(II) and iron(II) systems *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90:375.
11. Baker MS, et al. The effect of pH on the conversion of superoxide to hydroxyl free radicals *Arch Biochem Biophys* 1984; 234:258.
12. Shinar E, et al. The analogous mechanisms of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper *J Biol Chem* 1983; 258:14778.
13. Prasad KN. Modulation of the effects of tumor therapeutic agents by vitamin C. *Life Sci* 1980; 27:275.
14. 郑荣梁. 氧的毒性. *生物化学与生物物理进展* 1984; 1:9.

EFFECT OF DIGLYCYLHISTIDINE ON THE OXIDATION OF ASCORBATE CATALYZED BY CU(II)

H Liu and YH Pang

(Department of Physical Chemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT Glycylglycylhistidine (GGH) was synthesized using mixed anhydride method, and Cu(II): GGH=1:1 complex was identified using UV, ESR, CD, ORD and FAB/MS technique. The oxidation of ascorbate catalyzed by cupric ion in RPMI 1640 medium (pH 7.40) was studied. The activation energy $E=39.2$ kJ/mol. The addition of GGH inhibited the oxidation of ascorbate catalyzed by cupric ion. The investigations with ESR and fluorimetry indicate that there are Cu(I), ascorbate radical (AH), $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and $\cdot OH$ during the oxidation.

Key words Ascorbic acid; Diglycylhistidine