

[文章编号] 1007-3949(2009)17-05-0349-05

• 实验研究 •

## 姜黄素的微生物转化产物体外抗低密度脂蛋白氧化作用

程东庆, 蔡琴, 李毅, 周芳美, 沃兴德

(浙江中医药大学生命科学学院, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] 姜黄素; 微生物转化; 低密度脂蛋白氧化;  $\text{Cu}^{2+}$ ; 巨噬细胞

**[摘要]** **目的** 利用红曲霉菌对姜黄素进行微生物转化, 研究姜黄素微生物转化总产物对低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用, 为进一步筛选新型高效的姜黄素类抗动脉硬化新药奠定基础。**方法** 利用红曲霉菌固体发酵法对姜黄素进行微生物转化, 设立只加姜黄素不接种菌体的底物对照和只接种菌体不加入姜黄素的菌体对照, 乙酸乙酯提取转化产物。从血浆中分离低密度脂蛋白, 建立低密度脂蛋白在  $\text{Cu}^{2+}$  诱导下的无细胞氧化体系和巨噬细胞氧化体系, 姜黄素转化产物进行氧化干预, 以低密度脂蛋白在琼脂糖凝胶电泳的迁移距离及硫代巴比妥酸反应物含量作为低密度脂蛋白氧化的指标。**结果** 姜黄素转化总产物在 4~500 mg/L 浓度范围内 (相当于含姜黄素 0.04~5 mg/L), 能显著抑制  $\text{Cu}^{2+}$  诱导下的低密度脂蛋白氧化, 与菌体对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ ); 与底物对照比较在 20 mg/L 和 4 mg/L 浓度作用下差异有显著性 ( $P < 0.001$ )。转化总产物作用小鼠巨噬细胞 24 h 能显著抑制低密度脂蛋白的氧化, 其迁移距离比氧化对照组明显缩短 ( $P < 0.001$ ); 姜黄素对照组在 5 mg/L 时有明显的抑制作用; 底物对照组和菌体对照组迁移距离与氧化对照组差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 基本无抑制作用。转化总产物在 4~500 mg/L 浓度范围内, 能显著抑制小鼠巨噬细胞 TBARS 的产生, 其抑制作用随着剂量的增大而增强。而底物对照组只在浓度为 500 mg/L 和 100 mg/L (相当于含姜黄素 5 mg/L 和 1 mg/L)、姜黄素对照组在浓度为 5 mg/L 和 1 mg/L 时有一定的抑制, 菌体对照组则无抑制作用。转化总产物对巨噬细胞氧化体系低密度脂蛋白氧化的抑制作用, 与底物对照组、菌体对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ )。**结论** 姜黄素经红曲霉菌转化后, 对低密度脂蛋白的抗氧化作用显著增强, 有望获得姜黄素类高效抗动脉硬化的新型化合物。

[中图分类号] R93

[文献标识码] A

### Study of Anti-Low Density Lipoprotein-Oxidation Properties of Curcumin Metabolites Transformed by *M. purpureus* Went

CHENG Dong-Qing, CAI Qing, LI Yi, ZHOU Fang-Mei, and WO Xing-De

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[KEY WORDS]** Curcumin; Microbiotransformation; Low Density Lipoprotein-Oxidation; Copper; Macrophage

**[ABSTRACT]** **Aim** To study the new combinatorial compounds of curcumin transformed by *M. purpureus* Went of curcumin and its anti-low density lipoprotein (LDL)-oxidation properties. **Methods** The strain *M. purpureus* Went was used for microbial transformation. A copper-induced human LDL oxidation model and macrophage LDL oxidation model were set to study the anti-LDL-oxidation properties. The antioxidant activities were assessed on the basis of the relative removemobility (REM) on agarose gel electrophoresis and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). **Results** The metabolites of curcumin can significantly inhibit the LDL oxidation at concentration range of 4~500 mg/L compared with substrate control and strain control both in  $\text{Cu}^{2+}$ -induced and macrophage mediated ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Anti-LDL-oxidation properties of curcumin metabolites transformed by *M. purpureus* Went were proved to be enhanced.

姜黄素 (curcumin) 为姜黄属植物的主要化学成分, 具有降血脂、抗氧化、抗凝血和促纤溶等抗动脉

粥样硬化作用<sup>[1-4]</sup>。但姜黄素水溶性小、口服吸收率低、生物半衰期短、稳定性差, 制约了姜黄素在临床的广泛应用。国内外专家正尝试用化学法对姜黄素进行结构改造, 但由于基团位阻等原因而收效甚微, 未见结构修饰的姜黄素衍生物开发而成的商品面市。微生物转化技术是应用微生物及其产生的酶对天然活性化合物进行合成与结构修饰, 已成为开发新药的一种有效途径。本文利用红曲霉菌对姜黄素进行微生物转化, 研究转化产物体外抗低密度脂蛋

[收稿日期] 2008-10-10 [修回日期] 2009-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30873366)

[作者简介] 程东庆, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药理学、微生物学和免疫学研究, Email为 b2006069@163.com。蔡琴, 硕士研究生, 从事中西医结合研究。沃兴德, 教授, 博士研究生导师, 从事生物化学、中西医结合基础研究。

白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化作用, 为进一步筛选新型高效的姜黄素类新药奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要器材

红曲霉菌 (*M. purpureus w ent*) 系本实验室鉴定和保存。转化底物姜黄素系上海三爱思试剂有限公司产品, 分析纯。斜面培养基: 可溶性淀粉 3%、麦芽糖 3%、蛋白胨 2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%、pH 5.0~5.5 琼脂 2%; 液体培养基: 葡萄糖 1%, 酵母膏 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 麦芽膏 0.3%, pH 6.5。新鲜人血浆购自杭州市中心血站。SDS-PAGE 试剂: SDS (批号 3163B61)、TEMED (批号 0481B88) 和 APS (批号 0944B35) (均系上海生工生物工程有限公司产品)、Acrylamide (scientific research special 0341-500g)、N, N-methylene bisacrylamide (scientific research special 0172-250g)。琼脂糖 [gene tech (shanghai) company 进口分装, 111760]。过氧化脂质测定试剂盒 (凯基生物公司, KGT004)。其它常用试剂均购自华东医药股份公司。水夹套培养箱 (型号 SP-06Q 上海实验总厂); 振荡培养箱 (ZHWY-2102 上海智城分析仪器有限公司); 平板电泳槽 (型号 DYY-III) 和稳压稳流电泳仪 (型号 DYY-6C) 购自北京市六一仪器厂; 超速离心机 (CP80MX, 日立公司)、荧光分光光度计 (RF5000) 和凝胶成像系统 (Tanon410Q 上海天能科技有限公司) 等。

### 1.2 红曲霉菌对姜黄素的微生物转化

将保藏的菌株接种于斜面培养基上, 28~30℃ 恒温培养 4 d 得到新鲜、成熟的培养物。取无菌的液体培养基加入到斜面培养基中制备孢子悬液。孢子悬液以 10% 接种量转种至液体培养基, 28℃ 振荡培养 4 d。上述菌液以 10% 接种量接种到含 1% 姜黄素的转化培养基中, 30℃ 培养 24 h 后转至 28℃ 培养 12 h, 再 30℃ 恒温培养 7 d。设立菌体对照 (菌液接种到不含姜黄素的转化培养基中, 排除菌株的发酵产物和培养基残留成分的干扰) 和底物对照 (培养基中加入 1% 姜黄素而不接种菌液, 考察转化过程中是否存在非微生物引起的药物分解产物)。

### 1.3 转化产物的提取

分别取姜黄素转化产物、底物对照物、菌体对照物各 4 g 加乙酸乙酯 50 mL, 置 30℃ 摇床上摇过夜。次日过滤, 滤渣用乙酸乙酯洗涤数次, 合并滤液, 减压蒸馏, 残留物挥干, 用 8 mL 二甲亚砜溶解成 500 mg/L 备用。

### 1.4 人血清低密度脂蛋白的分离纯化

取血浆 400 mL, 经序列超速离心获得 D = 1.019~1.060 kg/L 部分, 经过 Sepharose 6B 凝胶过滤, 收集 LDL 部分, 用 pH 7.4 PBS 透析过夜, 用 SDS-PAGE 凝胶电泳和琼脂糖双扩散法检测 LDL 的纯度, Lowery 法测定蛋白质的浓度, 浓缩到每升 4.3 g 蛋白质, 4℃ 下储存备用。

### 1.5 $\text{Cu}^{2+}$ 诱导的无细胞体系低密度脂蛋白的氧化修饰及鉴定<sup>[5,6]</sup>

上述 LDL 稀释成 3.63, 0.73, 0.36, 0.18, 0.09 g/L, 取 100  $\mu\text{L}$  各浓度 LDL 加入 10 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{L}$  和 0.01 mol/L PBS 10  $\mu\text{L}$ , 37℃ 孵育 17 h 进行氧化, 3.63 g/L LDL 100  $\mu\text{L}$  加 20  $\mu\text{L}$  PBS 作为阴性对照。孵育结束后, 苏丹黑 B 37℃ 染色 30 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 1% 琼脂糖凝胶电泳 ( $U = 100 \text{ mV}$ ,  $I = 400 \text{ mA}$ ) 45 min 左右, 测定迁移距离。

### 1.6 转化产物对 $\text{Cu}^{2+}$ 诱导的无细胞体系氧化低密度脂蛋白的影响

选择最适浓度 LDL 100  $\mu\text{L}$ , 加 10 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$  10  $\mu\text{L}$ , 再加入各浓度转化产物、底物对照物、菌体对照物及阳性对照药物姜黄素 10  $\mu\text{L}$ ; 以 LDL 加 20  $\mu\text{L}$  PBS 作为非氧化阴性对照, LDL 加 10  $\mu\text{L}$   $\text{Cu}^{2+}$  为氧化 LDL 对照; 37℃ 孵育 17 h 进行氧化。孵育结束后, 苏丹黑 B 37℃ 染色 30 min, 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 1% 琼脂糖凝胶电泳 ( $U = 100 \text{ mV}$ ,  $I = 400 \text{ mA}$ ) 45 min, 凝胶成像系统 Tanon4100 分析, 记录迁移距离。吸取上清液, 用硫代巴比妥酸反应比色法测定其过氧化脂质含量, 荧光分光光度计扫描, 响应时间 2 s, 扫描速度 120 nm/min,  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ , 扫描激发波长从 535 nm, 读取同步荧光峰 540 nm 处的荧光强度。

硫代巴比妥酸反应物 TBARS 含量 =  $(F_{\text{测定管}} - F_{\text{空白管}}) / (F_{\text{标准管}} - F_{\text{空白管}}) \times \text{标准样品浓度} \times \text{样品稀释倍数}$

### 1.7 转化产物对小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 氧化修饰低密度脂蛋白的抑制作用<sup>[7,8]</sup>

小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 用 10% 1640 培养液培养, 消化后制成单细胞悬液, 加于 96 孔板中,  $5 \times 10^5$  /孔。试验孔加入 10  $\mu\text{L}$  LDL 及各浓度姜黄素转化总产物、底物对照物、菌体对照物及姜黄素对照 10  $\mu\text{L}$ , 总体积 200  $\mu\text{L}$ ; 氧化 LDL 对照孔细胞加入 10  $\mu\text{L}$  PBS 与 LDL 共同孵育; 无细胞孔中 LDL 与培养液共同孵育作为非氧化阴性对照孔。每组设立 3 复孔, 37℃ 共同孵育 24 h。测定培养液中 LDL 在琼脂

糖电泳中的迁移速度。培养上清液用硫代巴比妥酸反应比色法测定其过氧化脂质含量。

1.8 统计学处理

用 DPS 9.5 软件 Tukey 法进行多重比较分析<sup>[9]</sup>。

2 结果

2.1 Cu<sup>2+</sup> 对不同浓度低密度脂蛋白的氧化修饰

我们用分离得到的 LDL 在 Cu<sup>2+</sup> 诱导下形成氧化 LDL, 由于 LDL 经氧化修饰后电荷发生改变, 琼脂糖电泳时迁移速度加快, 迁移距离增加。测定不同浓度 LDL 的氧化效果发现, LDL 浓度太高, 不容易完全氧化; 在 0.36~0.09 g/L 范围内效果较理想, 0.18 g/L 的 LDL 氧化效果最佳 (表 1)。

2.2 姜黄素微生物转化产物对 Cu<sup>2+</sup> 诱导的无细胞氧化体系抗低密度脂蛋白氧化的影响

在 0.18 g/L 的无细胞 LDL 氧化系统中, 姜黄素转化总产物在 4~500 mg/L 浓度范围内 (相当于含姜黄素 0.04~5 mg/L), 能显著抑制 LDL 氧化 ( $P < 0.001$ )。姜黄素在 5 mg/L 和 1 mg/L 时有抑制作用 ( $P < 0.001$ ), 在 0.2 mg/L 以下未见影响 ( $P > 0.05$ )。底物对照物、菌体对照物对 LDL 迁移的影

响不明显 ( $P > 0.05$ )。姜黄素转化总产物 LDL 迁移距离与菌体对照比较差异有显著性 ( $P < 0.001$ ), 与底物对照比较在 20 mg/L 和 4 mg/L 时, 差异有显著性 ( $P < 0.001$ ; 表 2 和图 1)。

姜黄素转化总产物组上清液 TBARS 含量与菌体对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ ); 与底物对照组比较在 20 mg/L 和 4 mg/L 浓度作用下差异有显著性 ( $P < 0.001$ ; 表 3)。以上结果表明姜黄素经转化后抗 LDL 氧化作用增强, 且排除底物因素和菌体代谢产物的影响。

表 1 不同浓度低密度脂蛋白经 Cu<sup>2+</sup> 氧化修饰后在琼脂糖电泳中的迁移 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 分 组      | 迁移距离 (mm)               |
|----------|-------------------------|
| 非氧化组     | 9.0 ± 0.2               |
| LDL 浓度   |                         |
| 3.63 g/L | 9.0 ± 0.1               |
| 0.73 g/L | 9.0 ± 0.1               |
| 0.36 g/L | 10.1 ± 0.3 <sup>a</sup> |
| 0.18 g/L | 12.0 ± 0.2 <sup>a</sup> |
| 0.09 g/L | 11.5 ± 0.3 <sup>a</sup> |

a 为  $P < 0.05$  与非氧化组比较。

表 2 Cu<sup>2+</sup> 诱导的无细胞体系氧化低密度脂蛋白的电泳迁移距离 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 作用物浓度<br>(mg/L) | 含姜黄素<br>(mg/L) | 电泳迁移距离 (mm)                 |              |              |                           |              |                           |
|-----------------|----------------|-----------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
|                 |                | 转化产物                        | 菌体对照物        | 底物对照物        | 姜黄素对照物                    | 非氧化对照        | 氧化对照                      |
| 500             | 5              | 12.00 ± 0.06 <sup>bc</sup>  | 15.80 ± 0.11 | 15.00 ± 0.13 | 13.00 ± 0.09 <sup>b</sup> |              |                           |
| 100             | 1              | 12.90 ± 0.09 <sup>bc</sup>  | 15.90 ± 0.08 | 15.00 ± 0.11 | 13.10 ± 0.10 <sup>b</sup> |              |                           |
| 20              | 0.2            | 11.00 ± 0.05 <sup>bed</sup> | 15.90 ± 0.09 | 16.30 ± 0.14 | 15.80 ± 0.13              | 13.10 ± 0.04 | 16.15 ± 0.15 <sup>a</sup> |
| 4               | 0.04           | 12.00 ± 0.07 <sup>bed</sup> | 15.40 ± 0.10 | 16.30 ± 0.09 | 15.90 ± 0.11              |              |                           |

a 为  $P < 0.001$ , 与非氧化对照组比较; b 为  $P < 0.001$ , 与氧化对照组比较; c 为  $P < 0.001$ , 与菌体对照比较; d 为  $P < 0.001$ , 与底物对照比较。

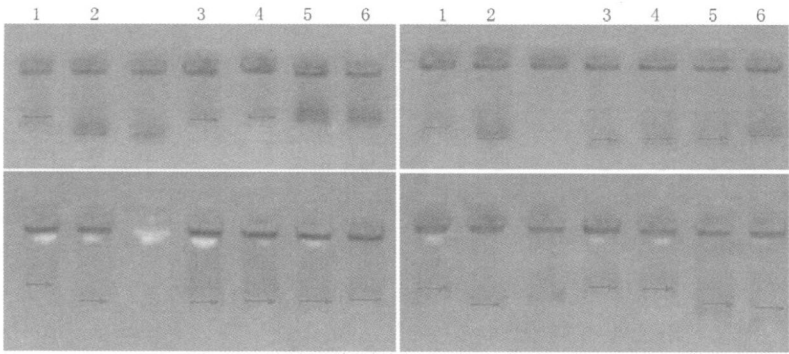


图 1 低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白琼脂糖凝胶电泳图 左上为转化产物, 右上菌体对照, 左下为底物对照, 右下为姜黄素对照; 1 为 LDL, 2 为 ox-LDL, 3~6 分别为作用物以 500、100、20 和 4 mg/L 浓度对抗 LDL 氧化。

表 3 对  $\text{Cu}^{2+}$  诱导的无细胞氧化体系 TBARS 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 作用物浓度<br>(mg/L) | 含姜黄素<br>(mg/L) | TBARS (mmol/L)               |                |                |                |
|-----------------|----------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |                | 转化产物                         | 菌体对照物          | 底物对照物          | 姜黄素对照物         |
| 500             | 5              | 22.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>  | 27.6 $\pm$ 9.0 | 24.4 $\pm$ 1.8 | 25.9 $\pm$ 0.1 |
| 100             | 1              | 22.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>  | 28.4 $\pm$ 3.8 | 25.6 $\pm$ 3.8 | 29.2 $\pm$ 2.5 |
| 20              | 0.2            | 25.2 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup> | 29.9 $\pm$ 1.6 | 30.3 $\pm$ 0.9 | 29.4 $\pm$ 9.8 |
| 4               | 0.04           | 26.7 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup> | 31.4 $\pm$ 1.0 | 30.9 $\pm$ 0.2 | 24.6 $\pm$ 8.0 |

a为  $P < 0.001$ , 与菌体对比较; b为  $P < 0.001$ , 与底物对比较。

### 2.3 对小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 氧化修饰低密度脂蛋白的抑制作用

小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 氧化修饰 LDL 电泳结果表明, 姜黄素转化总产物作用 24 h 能显著抑制 LDL 的氧化, 其迁移距离比氧化对照组明显缩短 ( $P < 0.001$ ); 姜黄素对照组在 5 mg/L 时有明显的抑制作用; 底物对照组和菌体对照组迁移距离与氧化对照组差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 基本无抑制作用。姜黄素转化总产物组与底物对照组、菌体对照相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ ; 表 4)。

转化总产物在 4~500 mg/L (相当于含姜黄素 0.4~5 mg/L) 浓度范围内, 能显著抑制小鼠巨噬细胞 TBARS 的产生, 其抑制作用随着剂量的增大而增强。而底物对照组在浓度为 500 mg/L 和 100 mg/L, 姜黄素对照组在浓度为 5 mg/L 和 1 mg/L 时有一定的抑制, 菌体对照组则无抑制作用。姜黄素转化产物对巨噬细胞氧化体系 LDL 氧化的抑制作用, 与底物对照组、菌体对照相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ ; 表 5)。

表 4 对细胞株 RAW 264.7 氧化低密度脂蛋白的迁移影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 作用物浓度<br>(mg/L) | 含姜黄素<br>(mg/L) | 电泳迁移距离 (mm)                     |                  |                  |                               |                  |                               |
|-----------------|----------------|---------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
|                 |                | 转化产物                            | 菌体对照物            | 底物对照物            | 姜黄素对照物                        | 非氧化对照            | 氧化对照                          |
| 500             | 5              | 12.50 $\pm$ 0.12 <sup>bed</sup> | 16.20 $\pm$ 0.10 | 15.00 $\pm$ 0.15 | 13.80 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> |                  |                               |
| 100             | 1              | 12.50 $\pm$ 0.10 <sup>bed</sup> | 16.20 $\pm$ 0.13 | 15.00 $\pm$ 0.11 | 15.00 $\pm$ 0.13              |                  |                               |
| 20              | 0.2            | 13.10 $\pm$ 0.09 <sup>bed</sup> | 16.20 $\pm$ 0.12 | 16.20 $\pm$ 0.10 | 16.20 $\pm$ 0.12              | 10.00 $\pm$ 0.08 | 16.30 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> |
| 4               | 0.04           | 13.80 $\pm$ 0.14 <sup>bed</sup> | 16.20 $\pm$ 0.09 | 16.20 $\pm$ 0.11 | 16.20 $\pm$ 0.12              |                  |                               |

a为  $P < 0.001$ , 与非氧化对照组比较; b为  $P < 0.001$ , 与氧化对照组比较; c为  $P < 0.001$ , 与菌体对比较; d为  $P < 0.001$ , 与底物对比较。

表 5 对巨噬细胞氧化体系 TBARS 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 作用物浓度<br>(mg/L) | 含姜黄素<br>(mg/L) | TBARS 含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ) |                 |                               |                              |                |                              |
|-----------------|----------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|
|                 |                | 转化产物                           | 菌体对照物           | 底物对照物                         | 姜黄素对照物                       | 非氧化对照          | 氧化对照                         |
| 500             | 5              | 5.13 $\pm$ 0.35 <sup>bed</sup> | 8.13 $\pm$ 0.29 | 7.03 $\pm$ 0.230 <sup>b</sup> | 7.13 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup> |                |                              |
| 100             | 1              | 6.30 $\pm$ 0.20 <sup>bed</sup> | 8.67 $\pm$ 0.12 | 7.33 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>  | 7.20 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup> |                |                              |
| 20              | 0.2            | 6.50 $\pm$ 0.15 <sup>bed</sup> | 8.80 $\pm$ 0.20 | 8.63 $\pm$ 0.31               | 8.20 $\pm$ 0.40              | 4.0 $\pm$ 0.21 | 8.83 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> |
| 4               | 0.04           | 6.83 $\pm$ 0.23 <sup>bed</sup> | 8.73 $\pm$ 0.15 | 9.10 $\pm$ 0.41               | 8.53 $\pm$ 0.31              |                |                              |

a为  $P < 0.001$ , 与非氧化对照组比较; b为  $P < 0.001$ , 与氧化对照组比较; c为  $P < 0.001$ , 与菌体对比较; d为  $P < 0.001$ , 与底物对比较。

## 3 讨论

众所周知, 天然 LDL 核心的脂肪酸中含有大量不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA), 约占 LDL 总脂肪酸含量的 35%~70%, 所以容易发生自身氧化, 形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。ox-LDL 可以促进细胞黏附和巨噬细胞源性泡沫细胞的产生, 诱导平滑肌

细胞增殖移行进而产生平滑肌细胞源性泡沫细胞, 促进血小板黏附、聚集和血栓形成, 损伤内皮细胞, 产生抗 ox-LDL 的自身抗体, 促进动脉粥样硬化的发生、发展。

我们前期研究发现姜黄素经红曲霉菌转化后, 清除自由基和抗氧化的能力增强<sup>[10]</sup>。本文研究证实, 姜黄素转化总产物在无细胞的 LDL  $\text{Cu}^{2+}$  氧化体系及在活体细胞培养体系中均能显著抑制 LDL 的

氧化,上清液中的硫代巴比妥酸反应物也显著降低。

研究姜黄素的转化产物,发现 HPLC 结果存在 6 个代谢产物<sup>[10]</sup>,其光谱图与姜黄素略有差异;LC-MS 结果显示,姜黄素的母核没有发生改变,6 个代谢产物有新的基团,初步认为是姜黄素的转化产物。姜黄素经过红曲霉菌转化,形成了由 6 个不同转化产物组成的新组合型化合物群<sup>[10]</sup>。组合化学是近年来在化学和药物基础研究领域兴起的一门新研究分支。余伯阳教授提出将天然药物的生物转化研究与组合化学理论相结合,建立生物组合化学(bio-combinatorial chemistry)的研究方法,再通过与药理筛选手段结合,可找到新的高活性或低毒性的天然活性先导化合物,或通过对活性组分中不同成分结构变化与活性强度消长关系的分析发现关键活性成分。

$\text{Cu}^{2+}$  能催化 LDL 中微量的脂质过氧化物,生成氧自由基、环氧化物和羰基化合物等,引发脂质过氧化链式反应。在活体细胞培养体系中,细胞内的二硫化物能生成硫醇,金属离子参与分泌到细胞外基质中硫醇的自动氧化,产生的自由基和过氧化物能促进 LDL 的氧化;另外巨噬细胞产生的氮氧化物和硝酸盐也能促进 LDL 的氧化修饰。我们推测,姜黄素经红曲霉菌转化形成的新化合物群,可能通过阻断 LDL 和  $\text{Cu}^{2+}$  的螯合作用、清除氧自由基等多个环节协同作用,从而增强抗 LDL 氧化的作用。

进一步分离纯化这 6 个姜黄素衍生物单体,研

究各组分中不同成分结构变化与活性强度消长关系,深入研究其抗 LDL 氧化的机制,有望获得姜黄素类高效抗动脉硬化的新型化合物。

#### [参考文献]

- [1] 沃兴德,唐利华,李万里,等. 姜黄醇提取物对饮食性高脂血症家兔抗氧化和促纤溶作用的研究[J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23 (2): 25-26
- [2] 沃兴德,崔小强,唐利华. 姜黄素对饮食性高脂血症大鼠血浆脂蛋白代谢相关酶活的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (3): 223-226
- [3] 范春雷,沃兴德,罗艳,等. 姜黄素对爪蟾卵母细胞表达人低密度脂蛋白受体的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25 (5): 432-435
- [4] 窦晓兵,沃兴德,范春雷,等. 姜黄素对人肝细胞 HepG2 中低密度脂蛋白受体基因表达影响的研究[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42 (8): 572-575
- [5] 赵革平,洪行球,李万里,等. 姜黄醇提取物对抗体外 LDL 氧化修饰作用的研究[J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23 (2): 27-28
- [6] Xu BJ, Yuan SH, Chang SK. Comparative studies on the antioxidant activities of nine common food legumes against copper-induced human low-density lipoprotein oxidation in vitro[J]. J Food Sci 2007, 72 (7): S522-S527
- [7] 赵革平,沃兴德,金明敏,等. 姜黄醇提取物对体外培养细胞氧化修饰低密度脂蛋白的抑制作用[J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23 (3): 18-20
- [8] 傅强,刘秉文. 巨噬细胞、内皮细胞对高密度脂蛋白的氧化修饰[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17 (5): 666-670
- [9] 唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统: 实验设计、统计分析 & 数据挖掘[M]. 北京: 科学出版社, 2007, 1-1100
- [10] 程东庆,潘佩蕾,周芳美,等. 红曲霉菌对姜黄素的转化及产物自由基清除和抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2009, 26 (7).

(此文编辑 许雪梅)