

姜黄素类化合物对体外非酶糖基化的抑制作用^{*}

李满妹¹, 杜志云¹, 刘 忠², 张竹林², 黄成红¹, 马 林¹, 古练权^{1,2}

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州510275;

2. 中山大学药学院, 广东 广州510080)

摘 要: 比较研究了姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和姜黄素衍生物 a 对蛋白质非酶糖基化反应的终末产物 (AGEs) 的抑制作用, 同时测定了它们与牛血清白蛋白的结合作用及其对牛血清白蛋白二级结构的影响。结果表明, 4 种姜黄素类化合物均有抑制作用, 抑制效果依次为姜黄素, 双去甲氧基姜黄素, 去甲氧基姜黄素和姜黄素衍生物 a; 姜黄素类化合物与牛血清白蛋白有较强的结合作用并能引起蛋白质结构的变化。

关键词: 非酶糖基化; 糖基化终产物; 姜黄素类化合物; 结合作用

中图分类号: R931.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 03-0063-04

体内蛋白质糖基化在糖尿病血管并发症的发生占有非常重要的地位。蛋白质和葡萄糖在体内发生非酶促反应形成 Schiff 碱和 Amadori 产物等早期产物, 进而经过氧化、重排、交联等过程, 形成不可逆的非酶糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs)^[1]。研究表明, AGEs 可与蛋白质发生交联, 沉积在长寿蛋白上, 引起一系列病理生理改变, 表现为造成动脉粥样硬化、视网膜微血管瘤形成和肾病的发生等^[2]。因此如何抑制蛋白质非酶糖基化减少 AGEs 的形成是近年来国内外的研究热点。迄今已证明氨基胍 (aminoguanidine, AG)、维生素 B6、维生素 C、阿司匹林及甲福明等药均能抑制非酶糖基化产物的形成。但是这些药物大部分都还处于体外实验和动物实验阶段, 进入临床试验的只有 AG 一种, AG 虽有较好的抑制效果, 但是用量非常大。因此, 寻找具有抑制 AGEs 的形成潜力的先导化合物具有重要的意义。

姜黄是一种传统植物药, 中医认为姜黄能行气、散风活血、通经止痛。实验研究表明: 姜黄素, 去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素是姜黄发挥药理作用的主要成分, 而姜黄素 (curcumin) 是最重要的活性成分。姜黄素具有抗炎、抗氧化、防癌、抗癌, 抗动脉粥样硬化、降血脂等功效^[3]。近年来, 对姜黄素抑制肿瘤及其抗肿瘤机制的研究是一个热点, 但是其对蛋白质糖基化的抑制作用在国内尚未见报道。本文利用提取分离出来的姜黄素类

化合物和改造物, 测试了它们对非酶糖基化产物形成的抑制活性, 研究其与蛋白质之间的结合情况及探究其对蛋白质二级结构的影响, 进一步讨论它们的构效关系和抑制机理。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

FLS 920 时间分辨与稳态荧光光谱仪; 岛津荧光光谱仪; J-810 圆二色光谱仪; 牛血清白蛋白 V (购自华美生物工程公司), 果糖 (购自 Sigma 公司), NaN_3 及其它试剂均为市场分析纯。

1.2 化合物的提取和合成

姜黄素、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素为提取物, 姜黄素衍生物 a 为合成化合物, 纯度均为 100%^[4,5]。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白质的糖化溶液体系 参照文献[6]方法, 稍有修改。牛血清白蛋白 (BSA) 终浓度为 2 g/L, NaN_3 终浓度为 2.5 mmol/L, 果糖终浓度 200 mmol/L, 碳酸缓冲溶液 (pH = 9.0) 终浓度 20 mmol/L, 样品终浓度分别为 0, 10, 25, 50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度设置 2 个平行样; 另设对照: ①以同体积的缓冲溶液代替样品; ②不加果糖和样品溶液的纯蛋白组。溶液配制之后, 置于 50 °C 的恒温箱避光孵育 10 天后取样进行荧光和 CD 光谱分析。

* 收稿日期: 2004-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20074042, 20032021)

作者简介: 李满妹 (1980 年生), 女, 硕士研究生, 现在暨南大学中药与天然药物研究所工作; 通讯联系人: 马林;

E-mail: cesmal@zsu.edu.cn

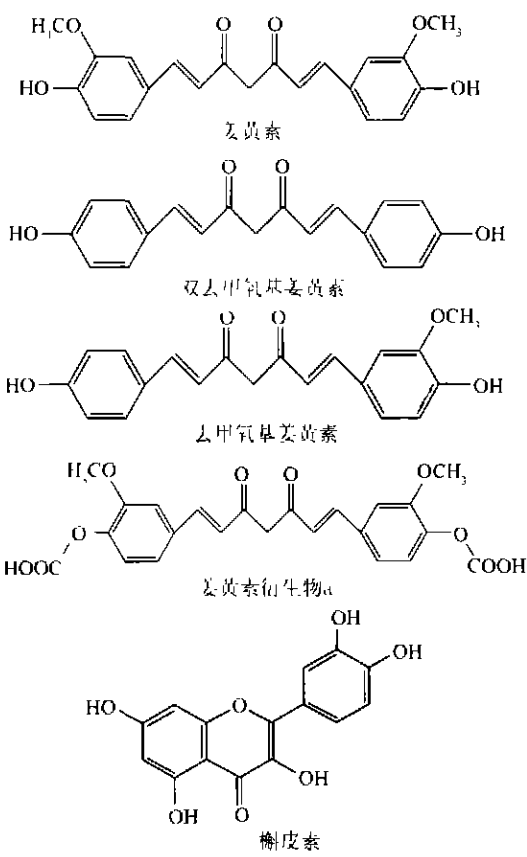


图 1 化合物的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of the compounds

1.3.2 化合物对 AGEs 形成的抑制活性测定 取 1.5 mL 的糖基化溶液用缓冲稀释到 3 mL, 用 FLS920 荧光光谱仪, 激发波长为 340 nm, 发射波长为 420 nm, 狭缝为 1.5 nm, 扫描发射光谱, 读 420 nm 的荧光强度得出样品管 A (F) 值。应用以下公式计算化合物对 BSA 糖基化反应的抑制作用, 用抑制百分率 (R) 表示:

$$R = 1 - \frac{\text{样品管 A}(F) - \text{对照管 2A}(F)}{\text{对照管 1A}(F) - \text{对照管 2A}(F)} \times 100\%$$

然后以抑制百分率对抑制剂浓度作图, 根据抑制曲线求得各种化合物的 IC₅₀ 值。

1.3.3 化合物与牛血清白蛋白 结合作用的测定 2 mL 的溶液中 BSA 终浓度为 1 g/L, NaN₃ 终浓度为 1.25 mmol/L, 碳酸缓冲溶液 (pH=9.0) 浓度为 20 mmol/L, 样品终浓度分别为 0, 5, 12.5, 25, 50, 75 μmol/L。参照组以 400 μL 浓度为 500 mmol/L 的果糖代替姜黄素类化合物溶液。采用岛津荧光光谱仪, 激发波长 282 nm, 发射波长 341 nm, 狭缝为 1.5 nm 进行荧光强度扫描得出 A (F) 值。应用以下公式^[7], 计算出结合常数 K 和结合位点数 n。

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg[\theta]$$

式中, θ 为样品浓度。

1.3.4 化合物对牛血清白蛋白 二级结构影响的测定 溶液配制方法如 1.3.3 所述。取 1 mL 溶液测定其圆二色光谱图, 测量范围为 260~190 nm, 重复 2 次, 狭缝宽度为 1 nm, 环境温度为 28 ℃。

2 结果与讨论

2.1 姜黄素类化合物对 AGEs 形成的抑制作用

把槲皮素、姜黄素、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素衍生物 a 按照 1.3.2 所述方法进行 AGEs 的抑制测试, 以抑制百分比对抑制剂浓度作图而求得它们的 IC₅₀ 值分别为 32.1、30.5、32.0、35.0、58.0 μmol·L⁻¹, P<0.01。同浓度不同物质对 AGEs 形成的抑制效果如图 2。

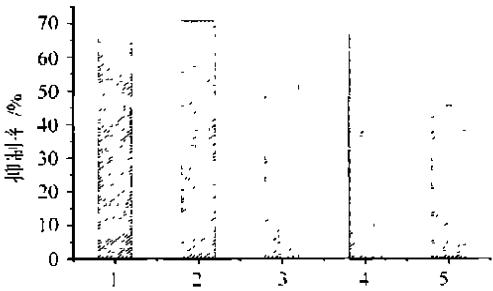


图2 孵育 10 d 后 50 μmol/L 的化合物对 AGEs 的抑制情况

Fig 2 Dose response of inhibition of glycation protein and AGEs after 10 days of incubation with different compounds at concentration of 50 μmol/L (P<0.01)

1. 槲皮素; 2. 姜黄素; 3. 双去甲氧基姜黄素;
4. 去甲氧基姜黄素; 5. 姜黄素衍生物 a

动物的体内和体外试验已证实了槲皮素是一种蛋白非酶糖基化反应的黄酮类抑制剂^[8], 实验结果也验证槲皮素在浓度为 50 μmol/L 时具有良好的抑制效果。与槲皮素相比, 同浓度的姜黄素, 双去甲氧基姜黄素和去甲氧基姜黄素等 3 种天然产物的抑制效果又更为显著一点, 姜黄素衍生物 a 的抑制效果较差。结果也显示了姜黄素的抑制效果是最好的, 其次是双去甲氧基姜黄素和槲皮素, 效果最差的是姜黄素衍生物 a。

姜黄素等化合物是通过何种途径抑制体外的糖基化反应, 尚未见有人研究过。从化合物的结构上分析可以看出: 结构中含有羟基的化合物 (姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素) 其抑制效果较好, 说明该类化合物中的羟基对抑制 AGEs 的活性起着重要的作用。化合物结构的对称性对抑制活性可能有一定的影响, 姜黄素和双去甲氧基姜黄素分子结构的对称性好, 其抑制活性高, 推测原因可能和化合物与蛋白质之间结合作用的强弱有关。

2.2 姜黄素类化合物与蛋白质的结合作用

如图 3 所示，在碳酸缓冲溶液（pH 9.0）中，BSA 的最大发射波长 341 nm。含有 0.1 mol/L 果糖的 BSA 溶液其荧光强度没有显著的变化，但是加入姜黄素类化合物的荧光强度发生猝灭，并随着量的增多其猝灭程度加大，这说明姜黄素类化合物比果糖更容易与 BSA 发生作用，引起 BSA 自身的荧光发生猝灭。在蛋白质糖基化的抑制体系中，姜黄素类化合物首先与 BSA 发生作用，阻碍了 BSA 与果糖的结合，从而达到了抑制 AGEs 形成的效果。

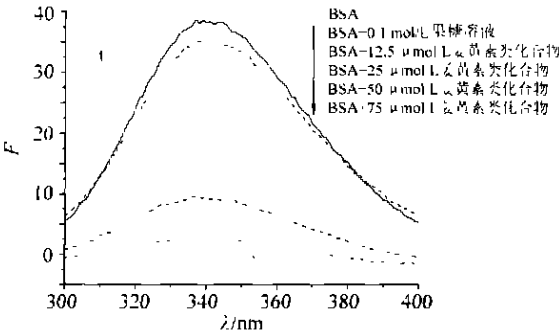


图 3 BSA-不同浓度姜黄素类化合物的
荧光发射光谱图

Fig 3 Fluorescence emission spectra of bovine serum albumin (BSA) with scaled in arbitrary unit as a function of compounds' concentration

为了更进一步研究这些化合物对 AGEs 形成的抑制行为和它们与蛋白质结合作用之间的关系，对 4 种化合物与蛋白质的结合情况进行了实验表征。根据方法 1.3.3 中的公式处理数据得到图 4。

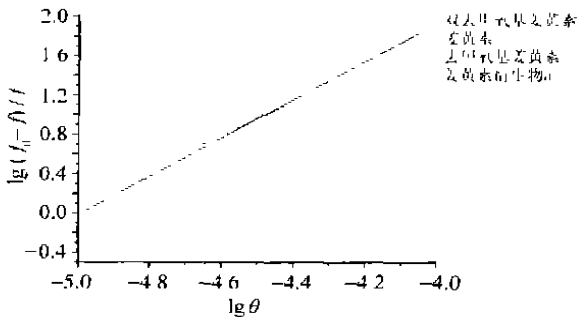


图 4 $\lg (f_0-f) / f$ 与 $\lg [\theta]$ 对应的关系
Fig 4 Plots of $\lg (f_0-f) / f$ vs $\lg [\theta]$

由以上所得直线斜率计算出它们与蛋白质结合的结合常数和结合位点数如表 1 所示。表中的数据显示 4 种化合物与 BSA 的结合作用均较强，化合物与 BSA 分子的结合比率约为 2 : 1。另外，对照 4 种化合物抑制 AGEs 形成的 IC₅₀ 值，可以发现：双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素衍生物

a 等 3 种化合物的 IC₅₀ 值变化情况和结合常数与结合位点的变化情况基本上成正相关。双去甲氧基姜黄素的抑制效果最好，它与 BSA 的结合常数也最大，结合位点数也最多；姜黄素衍生物 a 的抑制能力差，它与 BSA 的结合也较弱。因此推测：这 3 种化合物的抑制机理可能是依靠化合物与蛋白质的结合，占据蛋白质的结合位点，从而阻止果糖与蛋白质的反应。

表 1 化合物与 BSA 结合的结合常数和结合位点数
Tab 1 The binding constants and the binding site of bovine (BSA) and the compounds

化合物	$K / (L \cdot mol^{-1})$	n	r
姜黄素	4.65×10^{18}	1.71287	0.99418
双去甲氧基姜黄素	3.47×10^{12}	2.57107	0.99863
去甲氧基姜黄素	5.01×10^9	1.94242	0.99084
姜黄素衍生物 a	1.06×10^9	1.88137	0.9979

与其他 3 种化合物相比较，姜黄素的结合常数和结合位点要小，但是它对 AGEs 形成的抑制作用是 4 种化合物中最强的。这就说明：姜黄素抑制 AGEs 的形成不仅仅通过与蛋白质结合的途径，可能还存在其他的抑制途径。早期实验研究表明^[9]：蛋白质发生非酶糖基化的前期阶段会产生超氧阴离子自由基（O₂⁻）、羟自由基（°OH）和过氧化氢（H₂O₂）等。它们能有效地破坏蛋白质，是形成 AGEs 的一个重要因素。同时，Sharma^[10]就报道了：姜黄素是一种非常有效的抗氧化剂，能够清除氧自由基。众多的体外实验和动物实验也表明，姜黄素可以提高大鼠心肌耐缺氧能力，从而对缺血再灌注损伤具有保护作用^[11]。因此，推测姜黄素是通过抗氧化和清除 Maillard 反应过程中产生的自由基，从而抑制 AGEs 的形成。

2.3 姜黄素类化合物对牛血清白蛋白二级结构的影响

根据图 5 的显示，在不加任何抑制剂时，牛血清白蛋白在波长 243 nm 附近会有一个较大的负吸收峰，随着不同浓度的姜黄素类化合物的加入，负吸收峰在不断减少。这就表明：结合了姜黄素类化合物之后，BSA 的二级结构均会发生一定的变化，这种变化并与化合物的浓度相关联。对比 4 种化合物对 BSA 的影响，姜黄素衍生物 a 对蛋白质二级结构的影响是最大的。

3 结 论

姜黄素类化合物对非酶糖基化 AGEs 的形成均有抑制作用，效果由强到弱依次为姜黄素，双去甲氧基姜黄素，去甲氧基姜黄素和姜黄素衍生物 a；

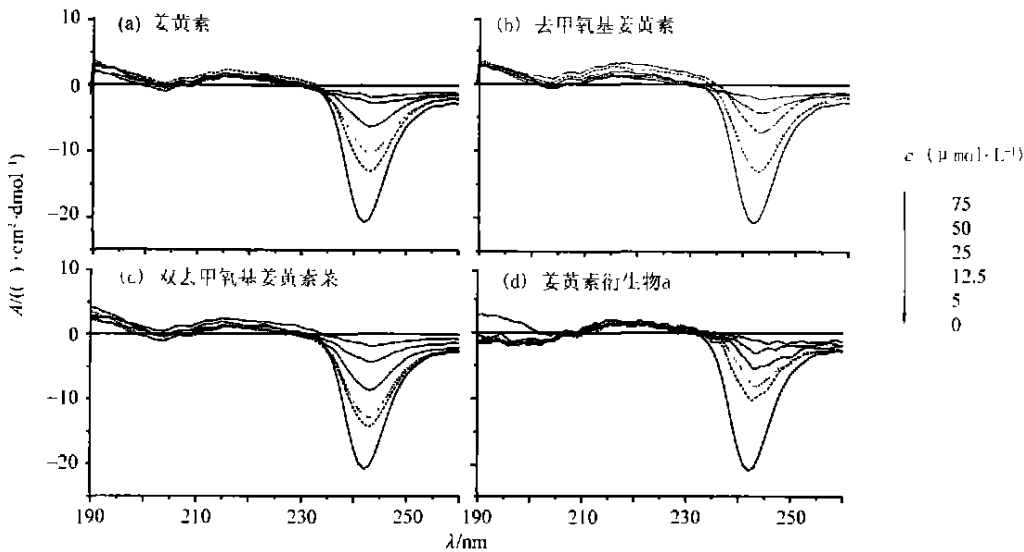


图 5 姜黄素类化合物对牛血清白蛋白二级结构影响的圆二色谱图

Fig 5 Circular dichroism spectra of bovine serum albumin (BSA) as a function of compound concentration

其中结构中含有羟基的姜黄素, 去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素的 LC_{50} 在 $35 \mu\text{mol/L}$ 以下, 表现出较强的抑制作用, 与对照样品槲皮素的抑制能力相当。通过荧光法和圆二色谱法验证了 4 种化合物的抑制效果与其和蛋白质较强的结合作用有关。根据非酶糖基化的发生机理与姜黄素的抗氧化特性, 推测姜黄素的抑制机理可能与其抗氧化性和消自由基的作用有密切的关系^[9, 11]。

参考文献:

[1] METZ T O, ALDERSON N L, THORPE S R. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions; a novel therapy for treatment of diabetic complications[J] . Arch Biochem Biophys, 2003, 419: 41—49.

[2] BIERHAUS A, HOFMANN M A, ZIEGLER R. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I . The AGE concept[J] . Cardiovascular Research, 1998, 37: 586—600.

[3] HONGW K, SPORN B. Recent advances in chemoprevention of cancer[J] . Science, 1997, 278: 1073—1077.

[4] PARK S Y, KIM D S. Discovery of natural products from curcuma longa tha protect cells from beta-amyloid inset; A

drug discovery effort against Alzheimer's disease[J] . J Nat Pro, 2002, 65(9): 1227—1231.

[5] KIM J H, KWON H J. Novel Curcumin Derivatives. WO03105751.

[6] SUN Y X, HAYAKAWA S, IZUMORI K. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the millard reaction; effect on protein structure and gel properties[J] J Agric Food Chem, 2004, 52, 1293—1299.

[7] 冯喜增, 白春礼, 林璋, 等. 吡啶橙与牛血清白蛋白的相互结合作用[J] . 分析化学, 1998, 26(2): 154.

[8] 毛培军, 张家庆, 黄庆玲. 槲皮素对糖尿病大鼠主动脉胶原非酶糖化的抑制作用[J] . 中国糖尿病杂志, 1998, 6(1): 34—37.

[9] SUA' REZL G, WANG X H. Differential inhibition of mail-lard protein fluorescence by nitric oxide donors[J] . Biology and Chemistry, 1998, 2(6): 475—480.

[10] SHARMA O P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds[J] . Biochem Pharmacol, 1976, 25: 1181—1812.

[11] SHAHED A R, JONES E, SHOKES D. Quercetin and curcumin up-regulate antioxidant gene expression in rat kidney after urethral obstruction or ischemia reperfusion injury[J] . Transplant Prog, 2001, 33(6): 2988.

Inhibition Effects of Curcumin Derivatives on Nonenzymatic Glucosylation *in Vitro*

LI Man ma¹, DU Zhi yun¹, LIU Zhong², ZHANG Zhu lin², HUANG Cheng hong¹, MA Lin¹, GU Lian quan^{1, 2}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and another curcumin derivative were investigated for their inhibition effects on nonenzymatic glucosylation *in vitro*, their binding reaction with bovine serum albumin (BSA) and their influence on the conformational changes of BSA. It was found that all of these curcumin derivatives inhibited the formation of AGE. Curcumin showed the strongest inhibition activity, followed by demethoxycurcumin and bisdemethoxy-curcumin. The result also indicated they extensively bound to the protein and induced the conformational changes of BSA.

Key words: nonenzymatic glucosylation; advanced glycation end products; curcumin derivatives; binding reaction