

硒化合物与脂质过氧自由基作用的研究

徐辉碧* 张罗平 范华汉 孙杰 汪新文 胡松洲

(华中理工大学化学系, 武汉)

本文以卵磷脂、亚油酸和脂质体作为生物膜模型, 鼠红细胞膜作为生物膜实例, 通过 ESR 研究, 观察到包括 RSeR 和 RSeSeR 在内的硒化合物在模拟的和真实的生物膜体系中对脂质过氧自由基的清除作用, 使得硒作为自由基清除剂的假说在体外模型体系实验中被初步证实, 提示占体内总硒量约 2/3 的非 GSH-P_x 硒可能是通过直接清除过氧自由基而发挥其生理功能. 研究表明, 其清除作用是针对生物膜磷脂分子上的不饱和脂肪酸过氧自由基, 其作用部位处于膜磷脂双分子层中部疏水区(脂相)中. 在体外实验的清除效果上, 有机硒优于无机硒. 某些有机硒化合物表现出“奇偶规律”. CNDO/2 计算表明, 硒化合物清除脂质过氧自由基可能是通过硒中心自由基而起作用的.

自 1957 年 Schwarz 发现硒的营养作用以来, 大量研究证实硒是一种人体必需微量元素, 对硒的生理功能及其生物化学基础的研究在不断深入. 80 年代初, 人们逐渐认识到, 硒的生理功能并非仅限于哺乳动物体内目前唯一证实的含硒酶-谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-P_x). Tappel 等发现^[1], 存在于 GSH-P_x 中的硒仅占动物体内总硒的约 1/3. 因此, 揭示另外 2/3 的非 GSH-P_x 硒在机体内的作用成为硒的生物无机化学研究中的重要课题.

Tappel 等^[2,3]曾经提出, 硒化合物抗氧化及对辐射保护作用的机理之一, 可能是作为自由基清除剂, 但长期以来未被实验直接证实. 我们利用电子自旋共振 (ESR) 技术, 研究了生物膜模型体系及真实生物膜中非 GSH-P_x 硒化合物对脂质过氧自由基的清除作用, 合成了具有生物活性的硒化合物, 研究了不同结构的硒化合物的清除效果及其规律性, 并对有关机理进行了探讨.

实 验**

仪器与试剂 JES-FE1XG 型 ESR 谱仪及随机紫外辐照与变温装置, Shimadzu IR-405 型红外光谱仪, Shimadzu UV-240 型紫外可见光谱仪, VG-7070E-HF 型质谱仪. 所用的试剂包括二氧化硒 (SeO_2)、亚硒酸钠 (Na_2SeO_3)、二(羧甲基)硒化物 [$\text{Se}(\text{OH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$]、二(β -羧乙基)硒化物 [$\text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$]、二(β -氰乙基)硒化物 [$\text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})_2$] (后 3 种由北京大学化学系提供)、卵磷脂和亚油酸.

硒化合物对生物膜模型体系及生物膜中脂质过氧自由基作用的实验条件 所有样品均在有氧条件下, 于 -130°C 经紫外 (功率 500 W) 辐照 5—15 min 以产生脂质过氧自由基, 同时作 ESR 检测. 测试参数为: X 波段, 磁场 $(3270 \pm 250) \times 10^{-4}\text{T}$, 微波功率 5—7 mW, 调制频率 100 kHz, 调制幅度 2.5×10^{-4} — $12.5 \times 10^{-4}\text{T}$, 放大倍数 2×1000 — 2.5×1000 , 扫描时间 4 min, 响应时间 1 s. 记录谱图并测量信号幅值 (Y_{max}).

RSeR 和 RSeSeR 的合成及表征 生物体内存在的低分子量硒化合物大多具有 RSeR^1

1987 年 7 月 27 日收到.

** 冯志明, 伍跃辉同志合成了部分有机硒化合物.

或 $RSeSeR^1$ 结构, 其中 R 和 R' 可相同或不同^[4]。基于此点, 本文合成了具有类似结构的、有生物活性的一系列硒化合物, 研究了其结构对自由基清除作用的影响。利用已有方法^[5]合成了 5 种二烷基二硒化物($RSeSeR$), 其中 R 碳原子数为 2—6; 3 种二烷基硒化物($RSeR$), 其中 R 碳原子数为 2—4; 以及二苄基二硒化物($C_6H_5CH_2Se$)₂; 二苄基硒化物($C_6H_5CH_2$)₂Se; 二(β -羧乙基)二硒化物($HO_2CCH_2CH_2Se$)₂; 二(β -羧乙基)硒化物($HO_2CCH_2CH_2$)₂Se; 二对硝基苯二硒化物($p\text{-NO}_2C_6H_4Se$)₂ 共 13 种已知有机硒化合物。测定了其中部分化合物的沸点和熔点, 并与文献值作了比较(见表 1)。这些硒化合物经紫外、红外、核磁共振和质谱表征, 所得图谱亦与化合物本身分子结构一致。

表 1 硒化合物的沸点和熔点

硒化合物	二乙基二硒	二丙基二硒	二丁基二硒	二戊基二硒	二己基二硒	二乙基二硒	二丙基二硒	二丁基二硒	二苯基二硒	二苄基二硒	二(β -羧乙基)二硒	二(β -羧乙基)二硒
	b. p. (°C/Torr)								m. p. (°C)			
实验值	68/1—5	83/5	102.5/3	118—121/2	140/5	107—107.5	159	200—201	43—44	89—90	142—144	133—134
文献值	85/21	105/11	113—119	134—137/3—4	150—152/6—8	108	161.9	92/17	44—45	92—93	147—148	134.5—135.5
文献	[6]	[6]	[7]	[7]	[7]	[8]	[8]	[9]	[10]	[11]	[11]	[11]

结果与讨论

一、卵磷脂在低温下经紫外辐照可产生脂质过氧自由基的 ESR 信号, 其 g 值($g_1=g_2=2.009$, $g_3=2.034$)及峰形(特征性的不对称吸收峰)均与文献[12, 13]的记载类同。加入硒化合物时, 相同条件下产生的脂质过氧自由基信号幅值明显衰减, 且硒化合物浓度越高, 衰减越大, 但峰形与 g 值均未发生明显变化(图 1)。单独硒化合物及溶剂异丙醇在相同条件下 ESR 信号微弱或无信号出现(图 2), 考虑到混合体系中硒化合物的浓度较小, 可排除脂质过氧自由基信号衰减是由于与硒化合物信号迭加的可能性。卵磷脂与二(羧甲基)硒化合物混合后, 其紫外及红外光谱与单独卵磷脂或二(羧甲基)硒化合物比较, 原特征吸收峰无明显位移, 亦无新的吸收峰出现, 排除了卵磷脂和硒化合物之间形成电荷转移配合物(或大分子化合物)的可能性。故确认脂质过氧自由基信号衰减是硒化合物对自由基的清除作用所致, 从而首次通过实验证实了硒化合物是脂质过氧自由基的清除剂。另外, 观察到有机硒化合物清除自由基的能力大于无机硒化合物, 其顺序为: $Se(CH_2CH_2CO_2H)_2 > Se(CH_2CH_2ON)_2 > Se(CH_2CO_2H)_2 > SeO_2$ (图 3), 这与不同硒化合物电子供体能力及其对卵磷脂分子中不饱和脂肪酸链的亲合力有关。

二、不饱和脂肪酸-亚油酸低温下经紫外辐照可检测到脂质过氧自由基信号, 亦为特征性的不对称吸收峰, 其 $g_1=g_2=2.010$, $g_3=2.032$ 。加入硒化合物时, 谱图形状与 g 值不变, 但

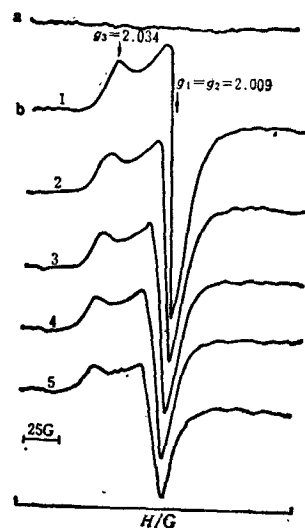


图 1 不同浓度二(羧甲基)硒化合物的卵磷脂异丙醇体系的 ESR 谱

a—照射前; b—照射后
1—0M; 2—0.01M; 3—0.05M;
4—0.10M; 5—0.20M

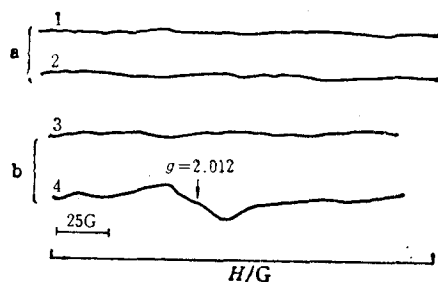


图2 异丙醇与二(羧甲基)硒化物的 ESR 谱

a—异丙醇;
b—0.5M 二(羧甲基)硒化物异丙醇溶液;
1, 3—UV 照射前; 2, 4—UV 照射后;

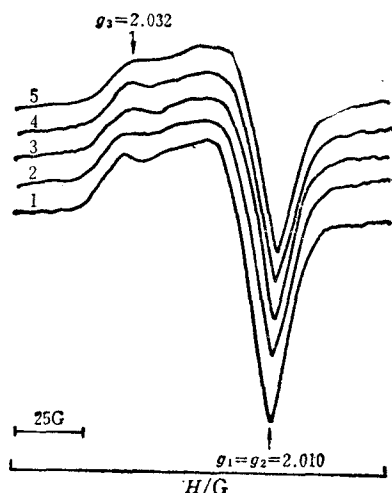


图4 二(β-羧乙基)硒化物对亚油酸过氧自由基的清除作用

[Se]: 1—0M; 2—0.04M; 3—0.08M; 4—0.12M; 5—0.16M

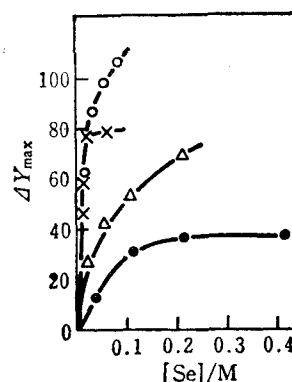


图3 四种硒化合物清除效果之比较

ΔY_{\max} —未加 Se 与加 Se 后信号幅值之差;

•— SeO_2 ; \triangle — $\text{Se}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$;
 \times — $\text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})_2$; \circ — $\text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$;

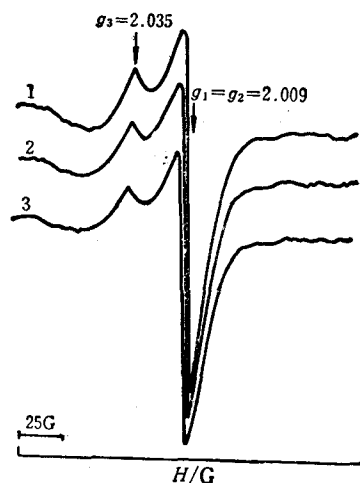


图5 二己基二硒化物对脂质体中过氧自由基的清除作用

[Se]: 1—0M; 2—0.00143M; 3—0.00200M

信号强度减弱(图4), 表明了硒化合物对亚油酸过氧自由基的清除作用。

三、脂质体在低温、有氧条件下经紫外辐照, 可检测出脂质过氧自由基的 ESR 特征信号, $g_1 = g_2 = 2.009$, $g_3 = 2.035$ 。包含有机硒(二己基二硒化物)的脂质体与硒空白脂质体相对照, 可观察到脂质过氧自由基信号衰减(图5)。

四、红细胞膜在低温有氧条件下经紫外辐照亦可检测到脂质过氧自由基的特征信号, 其 $g_1 = g_2 = 2.010$, $g_3 = 2.036$ 。经与包含有机硒脂质体共培养而制得的含硒红细胞膜与硒空白红细胞膜对照, 可见脂质过氧自由基信号衰减(图6), 表明有机硒化合物经脂质体载体作用进入膜脂质, 在真实生物膜中对脂质过氧自由基具有清除作用。

五、所合成的二烷基二硒化物(R 碳原子数 $n=2-6$) 对卵磷脂紫外辐照所产生的脂质过氧自由基均有清除作用, 且表现出清除效果依 R 碳原子数为奇数或偶数而异的“奇偶规律”(图7)。当碳原子数为奇数时, 其清除效果明显大于偶数, 但随碳原子数的增加, 清除效果渐趋一致, 这与 Schwarz 等^[13] 在硒的生物效应研究中发现的奇偶规律相符合。

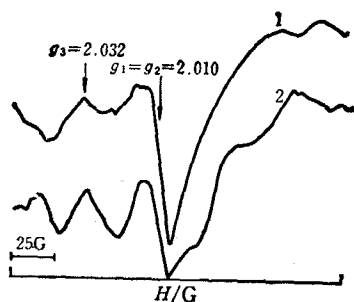


图6 二己基二硒化物对红细胞膜中过氧自由基的清除
1—Se空白样品; 2—含Se样品

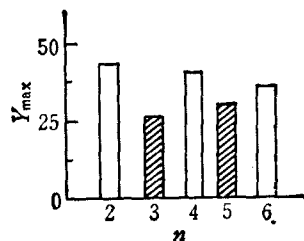


图7 二烷基二硒化物(0.0075M)对脂质
过氧自由基清除效果的奇偶规律

六、有关硒化合物清除脂质过氧自由基作用机理的探讨.

(1) 本文通过质谱获得了硒化合物对脂质过氧自由基的清除可能是通过硒中心自由基而作用的信息. Tappel 等^[2,3]曾提出硒在清除脂质过氧自由基或作为辐射保护剂的过程中, 可能会形成硒中心自由基的假说. 我们观察到, 在 70 eV 电子轰击下, $\text{Se}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ 可裂解为 $\text{SeCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 碎片; 在 20 eV (接近于紫外辐照能量) 的电子轰击下, RSeSeR 也可裂解生成 RSeSe 碎片 (图 8), 均表明硒化合物分子中的硒-碳键断裂生成硒中心自由基 $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{Se}\cdot$ 及 $\text{RSeSe}\cdot$ 的可能性. 同时还观察到当 RSeSeR 的 R 链上碳原子数为奇数时, 有较多的硒-碳键断裂, 大量的 RSeSe 碎片存在; 而为偶数时则较少, 与清除效果的奇偶规律相符合, 表明清除过程可能是通过硒中心自由基进行的.

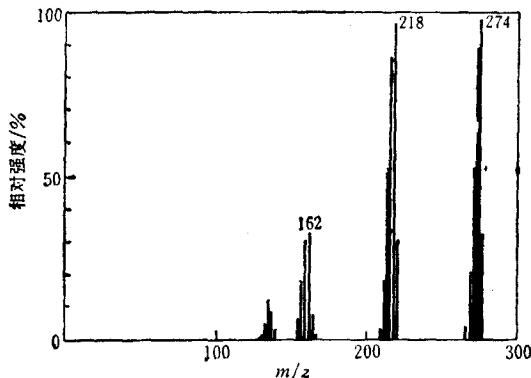


图8 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SeSe}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ 的质谱图 (20 eV)

(2) 硒化合物通过硒中心自由基清除脂质过氧自由基的可能性还得到了量子化学计算的支持. 本文根据重元素 CNDO/2 参量法对硒选择了 CNDO/2 参量的基础上, 采用 $\text{CH}_3\text{Se}\cdot$ 类型的硒中心自由基的构型优选值, 通过自旋非限制性 (UHF) 的 CNDO/2 (s-p-d) 方法^[10] 对二乙酸硒化物、二丙酸硒化物和二丙腈硒化物进行了有关计算 (除与硒原子相连的键长和键角外, 均采用 Pople 的标准平均键长和键角). 计算结果表明, 上述三种硒化合物相应的硒中心自由基在平衡构型时, 硒-碳键长为 1.845 Å, $\angle\text{SeCH} = 109.5^\circ$, 而在相应的 $\text{Se}(\text{OH})_2$ 中, $\angle\text{SeCH} = 105.5^\circ$, 这表明硒中心自由基与相应的硒化合物相比, 在接近亲电自由基时的空间位阻要小. 在上述结果的基础上, 对上述 3 种硒中心自由基进行了进一步计算, 结果表明, 自由基中未成对电子主要定域于硒原子的 p_x 轨道上, 各原子上的净电荷分布如图 9 所示. 这样, 无论从硒原子, 特别是其 p_x 轨道的空间位置, 或是从其上所携带的负电荷来看, 都十分有利于它捕捉亲电的脂质过氧自由基. 硒原子上所带净电荷的大小顺序是 $\text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2 > \text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})_2 > \text{Se}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$, 未成对电子所处轨道 (HOMO) 能级高低顺序也是 $\text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2 > \text{Se}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN})_2 > \text{Se}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ (见表 2), 而 HOMO 能级越高, 就越有利于给出电子以破坏亲电的脂质过氧自由基. 这样, 由量子化学计算所推定的硒化合物清除能力的大小顺序与前述实验观察的结果相符合, 支持了硒化合物通过硒中心自由基发挥清除作用的设想.

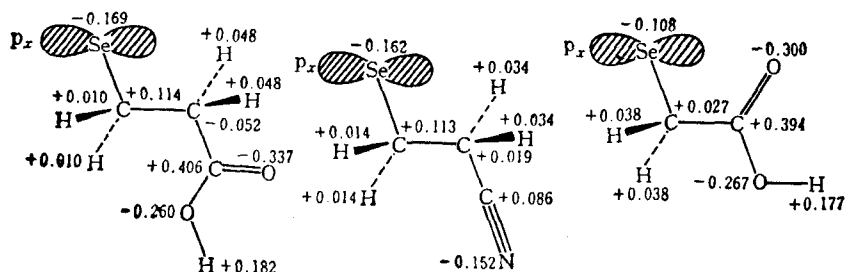
图9 各硒中心自由基的 p_x 轨道和各原子上的净电荷分布

表2 硒中心自由基的 HOMO 能级

硒中心自由基	$\cdot\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	$\cdot\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	$\cdot\text{SeCH}_2\text{CO}_2\text{H}$
HOMO 能级	-0.467713	-0.488065	-0.493805

有关硒化合物清除自由基是通过硒中心自由基而作用的机理, 虽有质谱研究和量子化学计算结果作为初步证据, 但尚需进一步通过实验直接证实, 其具体作用方式亦需作更深入的探讨。

本文系国家自然科学基金资助的项目。

参 考 文 献

- [1] Tappel, A. L., "Abstracts of Third International Symposium on Selenium in Biology and Medicine, Beijing", 1984, p. 11.
- [2] Slater, T. S., Abstracts of International Workshop Symposium on Basic Mechanisms of Chemical Carcinogenesis, Shanghai, 1982, p. 4.
- [3] Hamilton, J. W.; Tappel, A. L., *J. Nutrition.*, **1963**, 79, 493.
- [4] Shimazu, F.; Tappel, A. L., *Radiation Research.*, **1964**, 23, 210.
- [5] Swartz, H. M.; Bolton, J. R.; Borg, D. C., "Biological Applications of Electron Spin Resonance", Wiley-Interscience, New York, **1978**, p. 529.
- [6] Bird, M. L. *J. Chem. Soc.*, **1942**, 570.
- [7] Stoner, G. G.; Williams, R. W., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 1113.
- [8] Anderson, H., *J. Chem. Eng. Data*, **1964**, 92, 272.
- [9] Arase, A.; Masuda, Y., *Chem. Lett.*, **1975**, 1331.
- [10] Klayman, D. L.; Griffin, T. S., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 197.
- [11] Painter, E. P.; Frauke, K. W.; Gortner, R. A., *J. Org. Chem.*, **1940**, 5, 579.
- [12] Shields, H. W., "Experimental Methods in Biophysical Chemistry", John Wiley, New York, **1973**, p. 443.
- [13] Schwarz, K.; Fredga, A., *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244, 2103.
- [14] Pople, J. A.; Beveridge, D. L., "Approximate Molecular Orbital Theory", McGraw-Hill, New York, **1970**, p. 65.

A Study on the Interaction between Selenium Compounds and Lipid Peroxy Radical

Xu Hui-Bi* Zhang Luo-Ping Fan Hua-Han Sun Jie

Wang Xin-Wen Hu Song-Zhou

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan)

Abstract

Lecithin and linoleate were used as models for membranes and erythrocyte ghosts from rats as an example of real membranes. In a series of experiments, we observed that selenium compounds including RSeR and RSeSeR can scavenge peroxy radicals, which is the preliminary evidence in vitro to Tappel's proposal. It is suggested that two-thirds of selenium may exert its biological functions by directly acting as a scavenger of peroxy radicals. The scavenging effect of organic selenium is greater than that of inorganic selenium. Some of the organic forms exhibit the "odd-even regularities". CNDO/2 calculation indicated that it was quite possible for selenium compounds to scavenge lipid peroxy radicals through selenium radicals.