

# 中國1號天仙液 對氧自由基 的清除作用之完整實驗報告

作者：趙保路教授 忻文娟教授 高仲瑜醫師 張宏博士

研究單位：FRC生物醫學研究中心

*Free Radical Biology & Medical Research Center*

聯絡地址：台北市信義區和平東路三段213號4F

聯絡電話：(02)7390550

# Los Efectos Necrofágicos del FRC001 Líquido Tian Xian China No. 1 Sobre Radicales Libres de Oxígeno

Ba-Lu Zhao<sup>1</sup> Ph.D., Wen-Juan Xin<sup>1</sup> Ph.D., Chung-Yu Kao<sup>2</sup> MD, Hong Zhang<sup>3</sup> MD. Ph.D.

1. Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing

2. FRC Free Radical Biology and Medical Research Center, Taipei

3. Department of Pathology, Univewrsity of Linkoping, Sweden

## ABSTRACTO

Utilizando la VSE, quimioluminiscencia-BJL y otras técnicas, se estudió el efecto necrofágico del FRC001 sobre radicales libres de oxígeno en sistemas celulares, acuosos enzimáticos e irradiados y fueron comparados con las Vitaminas C y E. Se encontró que el FRC001 es eficaz para la necrofagia de radicales libres de oxígeno generados por polimorfonucleares estimulados con PMA, xantina, oxidasa de xantina, irradiación, riboflavina/EDTA y la Reacción de Fenton. También se encontró que podía inhibir los diones conjugados y materiales que han tenido una reacción con TBA, (TBARM) formado durante la peroxidación lípida del ácido linoleico y liposoma respectivamente y es eficaz para la necrofagia de ONOO.

**Palabras clave:** FRC001, radicales libres de oxígeno, peroxidación lípida, VSE, quimioluminiscencia-BJL

## INTRODUCCIÓN

Radicales libres de oxígeno activos pueden dañar los componentes de la célula, aún matar células normales, causar envejecimiento y algunas enfermedades muy serias, tales como cáncer y enfermedades cardíacas. Generalmente la producción y la necrofagia de los radicales libres de oxígeno activos están balanceados en el cuerpo humano sano. Si hay un desbalance en el mecanismo regular de algunas enzimas, tales como la dismutasa superóxido (SOD) o catalasa, pueden haber cantidades excesivas de radicales de oxígeno libres generados en el cuerpo. Es posible que los necrófagos de radicales de oxígeno activos puedan ser de beneficio para la prevención de tales enfermedades y para la salud del humano. Así que es muy importante buscar necrófagos efectivos de radicales activos de oxígeno. En este estudio, utilizando la VSE, quimioluminiscencia-BJL y otras técnicas, se estudió el efecto necrofágico del FRC001 sobre radicales libres de oxígeno en sistemas celulares, acuosos enzimáticos e irradiados. Se encontró que el FRC001 es efectivo para la necrofagia de los radicales libres de oxígeno generados por polimorfonucleares estimulados con PMA, xantina, oxidasa de xantina, irradiación,

riboflavina/EDTA y la Reacción de Fenton. También se encontró que podía inhibir los diones conjugados y TBARM formado durante la peroxidación lípida del ácido linoleico y liposoma respectivamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes DMPO (5,5-dimetil-pirrolina-1-oxido) se compro de Sigma Chem Co. Y purificado con carbon activado antes de ser utilizado. PMA (forbol miristato acetato), ácido linoleico, lipoxidasa, SOD (6500U/mg), xantina/xantina oxidasa (2.125 U/ml) y luminol también se compraron a Sigma Chem Co. Se disolvió el PMA en un poco de acetona y diluido con 50mM de \_\_\_\_\_ fosfato hasta una concentración apropiada antes de ser usada. Otros agentes producidos en China son Niveles AR. La medida de la actividad de SOD fue incluida en FRC001.

Medida de quimioluminiscencia-BJL: La reacción de xantina y xantina oxidasa puede generar radicales libres de oxígeno que dan una quimioluminiscencia dependiente-de-luminol. SOD puede necrofagar la quimioluminiscencia generada por este sistema, por lo tanto la actividad de SOD puede ser medida con este sistema. El sistema de medidas incluye 0.2 mM luminol, 0.32 mM xantina, y 0.09 U/ml de xantina oxidasa. Se mide la quimioluminiscencia con el quimioluminiscenciometro WDD-1.

Se define el efecto necrofágico del FRC001 en O<sub>2</sub> como:

$$E = \frac{h_o - h_x}{h_o} * 100\%$$

H<sub>o</sub> es la quimioluminiscencia del sistema de control de xantina/xantina oxidasa después de añadir solución FRC001.

El sistema de medidas fue el mismo que el mencionado antes, excepto que se añadieron concentraciones diferentes de FRC001 al sistema. Primeramente se desarrollo una curva standard de actividad SOD dentro de este sistema. Luego se midió la curva del efecto necrofágico del FRC001 sobre los radicales libres de oxígeno con este sistema. Utilizando ambas curvas, la actividad SOD incluida en solución FRC001 puede ser determinada

### **El efecto necrofágico del FRC001 sobre radicales libres de oxígeno generados de la Reacción de Fenton.**

Una solución de 50mM DMPO 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 100 mM Fe(II) como sulfato de amonio ferroso se mezclaron y transfirieron a un tubo capilar para medidas de la VSE. Cuando se midió el efecto necrofágico del FRC001 se añadieron diferentes concentraciones de FRC001 al sistema. El efecto necrofágico se calculo como se menciono antes pero aquí la altura del segundo pico se utilizo para el calculo. Condiciones VSE: Todos los espectros del VSE fueron registrados con un espectrómetro VSE Varian E-109. Las condiciones son: potencia microondas 20mW, banda-X,

modulación 100kHz con amplitud 1G, campo magnético central 3250 G, anchura de scan 200 G, constante de tiempo 0.128S, temperatura de ambiente.

### **Efecto necrofágico del FRC001 sobre O<sub>2</sub> generado por la irradiación del sistema riboflavina/EDTA.**

Una mezcla de 0.3 mM de riboflavina, 5 mM de EDTA y 0.1 M DMPO fue trasladada a un tubo capilar de cuarzo y colocado en el espectrometro VSE. Luego de irradiar la muestra por 20 segundos con una lampara de xenon, (500 W, a 70 cm de distancia), se registraron de inmediato las medidas del espectro del VSE. Cuando se midió el efecto necrofágico del FRC001, se añadieron distintas concentraciones de FRC001 al sistema. Se calculó el efecto necrofágico como mencionado antes, pero aquí se uso la altura del primer pico para los cálculos. Las condiciones de la medida del VSE eran iguales a las anteriores.

### **Medida del efecto necrofágico del FRC001 sobre dienos conjugados generados por la peroxidación lípida del ácido linoleico por lipoxidasa.**

Se mezclaron 0.1 mM de ácido linoleico en PBS con 480U/ml de lipoxidasa y medido a 232 nm con el tiempo. Cuando se midieron los efectos inhibitorios del FRC001 sobre la generacion de dienos conjugados, se añadieron distintas concentraciones del FRC001 al sistema. El efecto necrofágico fue calculado como se mencionó antes, pero aquí la h y la hx se uso por la tasa de reacción por el control y la muestra respectivamente.

### **Tasa de medida del efecto necrofágico sobre materiales que han reaccionado al TBA (TBARM) generados de la peroxidación lípida del liposoma iniciado por Fe<sup>2+</sup>.**

Liposoma hecho de lecitina (10 mg/ml) fue peroxidado por adición de Fe<sup>2+</sup>(100 mM), luego calentado a 95°C mezclado con 6.7 mg/ml TBA y 0.05 M Cl. Luego se incubo la muestra durante 60 minutos a 95°C. Luego enfriado hasta temperatura ambiente. Se extrajo el TBARM por butanol:metanol (85:15) y medido a 532 nm. Cuando se midieron los efectos inhibitorios del FRC001, se agregaron diferentes concentraciones de FRC001 al sistema. Se calculó el efecto necrofágico como se hizo anteriormente.

### **El efecto necrofágico del FRC001 sobre los radicales libres de oxigeno generados del PMN estimulados por PMA.**

Aislamiento de PMN: Se compró sangre entera fresca de un donante sano del Centro de Sangre de la Cruz Roja de Beijing. Los PMN fueron separados de los demás componentes celulares utilizando sedimentación con dextran al 6%, lisis hipersónica de las células rojas remanentes y separación de las células mononucleares por la centrifugacion de gradientes de densidad de Ficoll.

Producción y medida de radicales libres activos de oxigeno generados de PMN estimulados por PMA:

En un experimento típico, una mezcla que contiene 107 PMN/ml, 0.1mM de DETAPAC (ácido dietilentriaminopentacético) y 100ng/ml de PMA se incubó por 2 minutos a 37°C, luego se le añadió 0.1 de luminal y se mezcló en forma homogénea antes de medirse con quimioluminiscencia-BJL. Cuando se midieron los efectos inhibitorios del FRC001, se agregaron diferentes concentraciones de FRC001 al sistema. Se calculó el efecto necrofágico como se hizo anteriormente.

### **El efecto necrofágico del FRC001 sobre el ONOO**

Síntesis de peroxinitrito: Se realizó la síntesis de peroxinitrito en un reactor de flujo saturado {12}. Soluciones de (i) NaNO<sub>2</sub> 0.5 mol/L, y (ii) 0.6 mol/L de HCl/0.7 mol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron bombeadas a 26ml/min a un conector en T y mezcladas en un tubo de vidrio de 3mm de diámetro por 2.5 cm. La reacción de canalización del ácido nitroso con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar ácido peroxinitroso fue alimentada por medio del bombeo de 15 mol/L de NaOH a la misma razón de flujo a una conexión en T al final del tubo de vidrio. El exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sacó pasándolo sobre una columna de 1x5cm llena con 4 gramos de MnO<sub>2</sub> granulado. Se congeló la solución por una semana a -20°C. El peroxinitrito puede oxidar luminol y dar una fuerte quimioluminiscencia. El efecto necrofágico del FRC001 sobre el peroxinitrito se midió por el método de quimioluminiscencia y el efecto necrofágico se calculó como se hizo antes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efectos necrofágicos del FRC001 sobre los radicales libres de oxígeno generados del sistema xantina/xantina oxidasa.

Una curva del efecto necrofago del SOD sobre los radicales libres generados de xantina/xantina oxidasa se ve en la Figura 1.

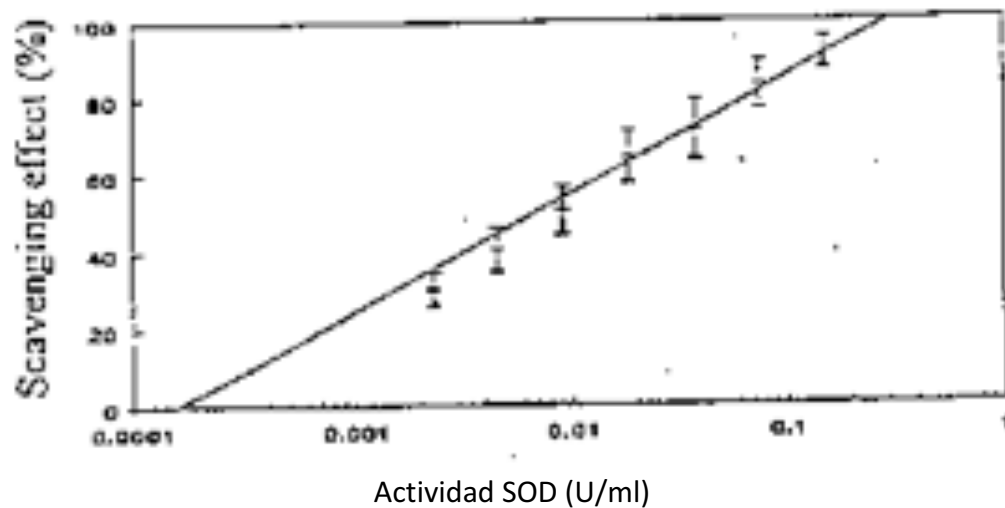


Figura 1. La curva standard del efecto necrofágico del SOD sobre radicales libres de oxígeno generado de la reacción del sistema xantina/xantina oxidasa.

El efecto necrofágico del FRC001 sobre los radicales libres de oxígeno generados del sistema xantina/xantina oxidasa se vio en la Figura 2.

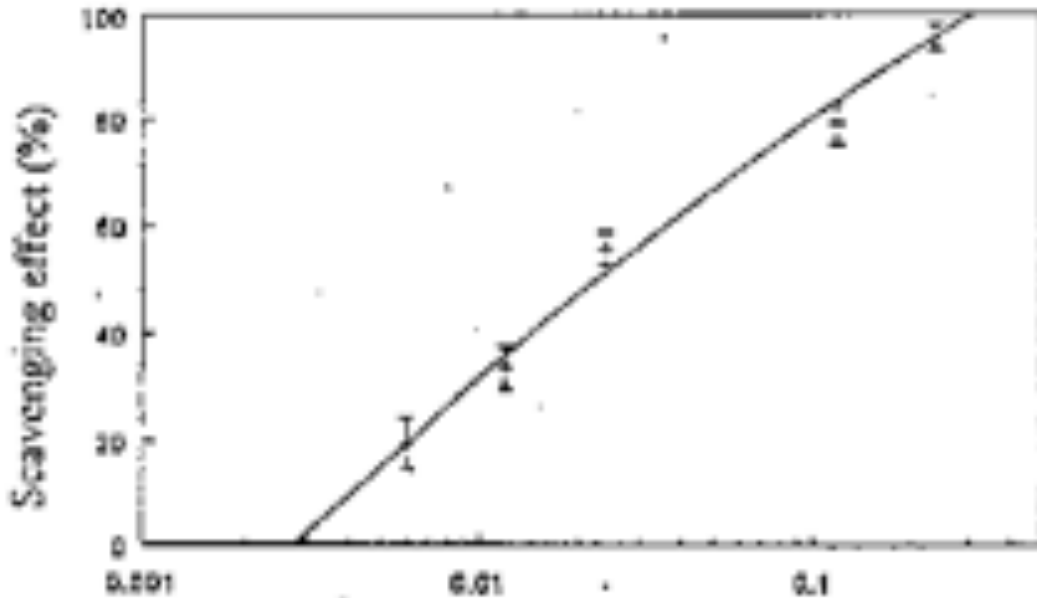


Figura 2. El efecto necrofágico del FRC001 sobre los radicales libres de oxígeno generados del sistema xantina/xantina oxidasa.

De la información generada por las dos curvas anteriores, se puede ver que LA ACITIVIDAD INCLUIDA EN 1G frc001 SE CALCULA QUE SEA DE 300,000 U/ml.

2. Los efectos necrofágicos del FRC001 sobre los radicales libres generados de PMN estimulados con PMA.

Cuando los PMN son estimulados o están dentro de los fagocitos, habrá una descarga respiratoria y la producción de los radicales libres de oxígeno activos. Los radicales activos de oxígeno producidos en este proceso desempeñan un papel importante en procesos microbicidas y tumoricidas y para proteger el cuerpo sano de enfermedades. Pero si hay un exceso de radicales activos de oxígeno en el cuerpo, dañaran los componentes de las células y mataran células normales y causaran envejecimiento y enfermedades muy serias como enfermedades del corazón y cáncer. Aquí fue usado para examinar el efecto del FRC001 sobre los radicales libres de oxígeno. La figura 3 muestra los efectos necrofágicos del FRC001 sobre los radicales libres generados de PMN estimulados con PMA y medidos por quimioluminiscencia-BJL. Se determino que el C50 = 0.62 mg/ml el cual es mayor que el de la Vitamina C (C50 = 0.2 mg/ml) y menor al de la Vitamina E

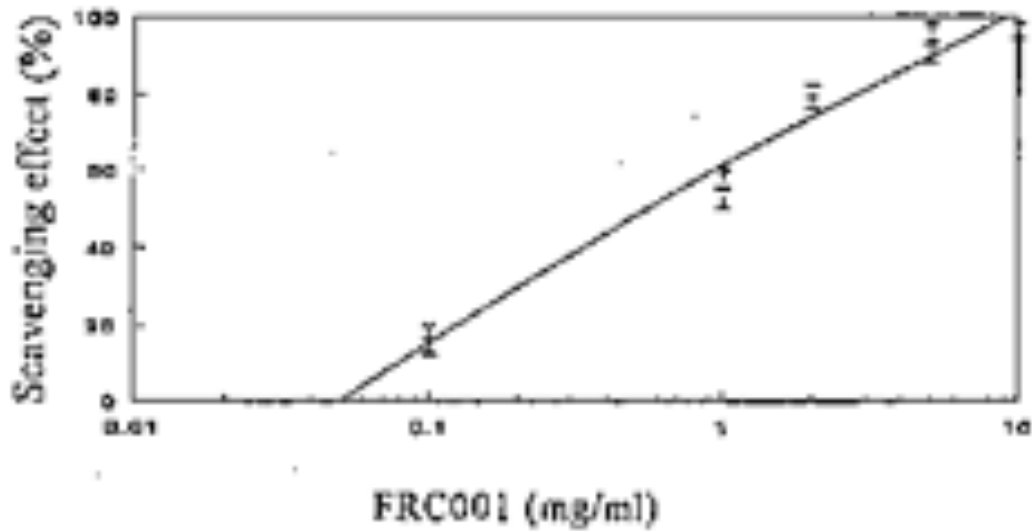
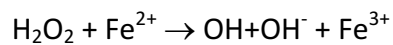


Figura 3. El efecto necrofágico del FRC001 sobre los radicales libres generados de PMN estimulados con PMA.

### 3. Efecto necrofágico del FRC001 sobre radicales libres de OH generados de la Reacción de Fenton.

La Reacción de Fenton puede generar OH y se ha usado para examinar necrófagos de radicales libres de OH.



Aquí se utilizó para el examen del efecto necrófago del FRC001 sobre radicales libres de OH. El espectro VSE del DMPO-OH se vio en la Figura 4b ( $a_n = a_h = 14.9\text{G}$ ).

El efecto necrofágico del FRC001 sobre OH se vio en la Figura 5.



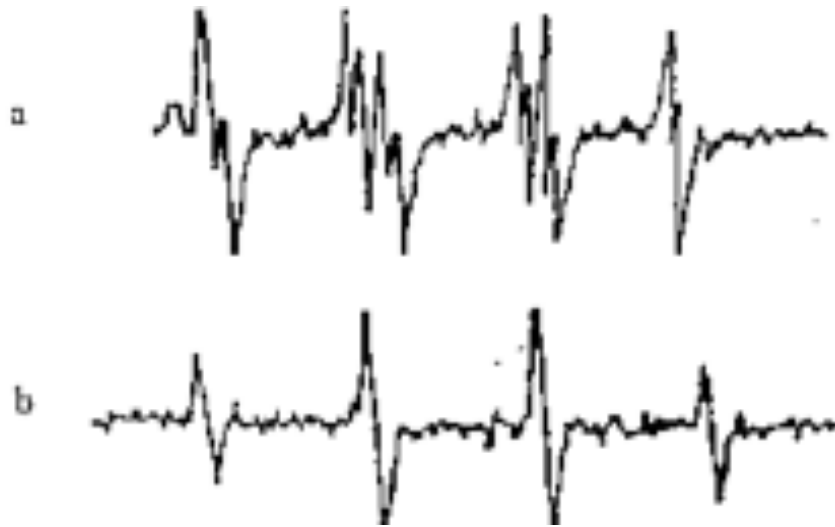


Figura 4. El espectro VSE de la rotación del DMPO atrapó el O<sub>2</sub> generado del sistema irradiado de riboflavina/EDTA (a) y radicales libres de OH generados de la Reacción de Fenton (b).

El efecto necrofágico del FRC001 que se vio en la Figuras 4 y 5 demostró que el FRC001 puede necrofagar los radicales libres de hidroxilo generados de la Reacción de Fenton, pero la Vitamina C solo tiene poco efecto necrofágico sobre el radical libre de hidroxilo. La Vitamina E solo tuvo efecto necrofágico del 37.5% a la concentración de 5mg/ml.

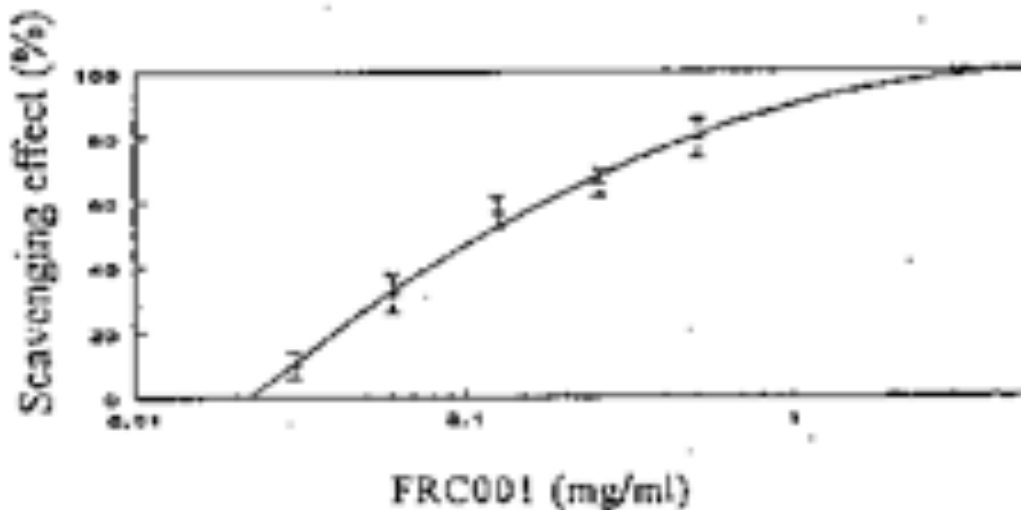


Figura 5. Efecto necrofágico del FRC001 sobre radicales libres de OH generados de la Reacción de Fenton.

#### 4. Efecto necrofágico del FRC001 sobre O<sub>2</sub> generado del sistema irradiado riboflavina/EDTA.

Riboflavina/EDTA irradiado se ha utilizado para la generación de O<sub>2</sub> y para examinar la necrofagia del O<sub>2</sub> en un sistema foto. Aquí se utilizó para examinar el efecto necrofagico del FRC001 sobre el O<sub>2</sub>. El espectro VSE sobre el giro del O<sub>2</sub> aduce CMPO-OOH generado de la riboflavina irradiada se mostró en la figura 4 a (an=14.3, ahb=11.3G, ahg=1.25G)

De acuerdo con la definición del efecto necrofágico, la curva del efecto necrofágico del FRC001 sobre el O<sub>2</sub> generado del sistema irradiado de riboflavina/EDTA se ve en la Figura 6. La concentración del FRC001 para necrofagia del 50% es aproximadamente 17mg/ml. Su efecto necrofágico es menor al de la Vitamina C (C<sub>50</sub>=0.0009 mg/ml) pero mayor al de la Vitamina E.

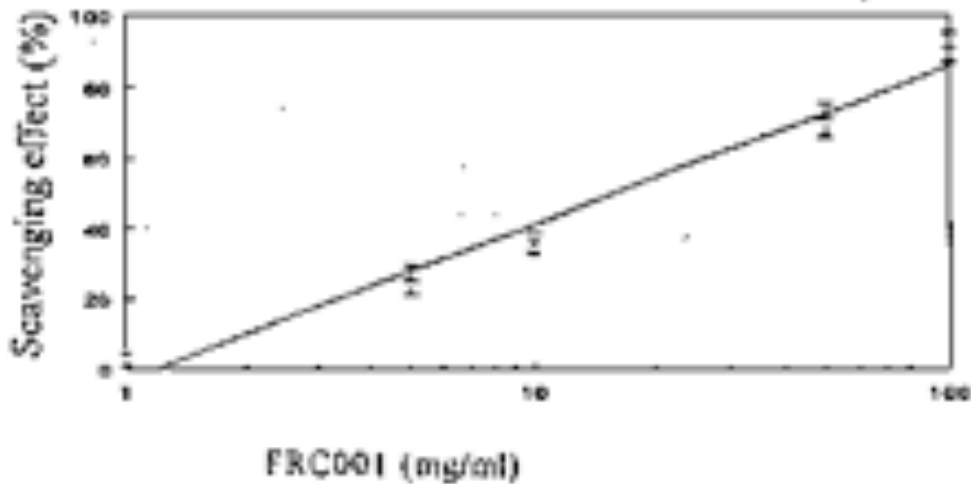


Figura 6. Los efectos necrofágicos del FRC001 sobre el O<sub>2</sub> generado del sistema irradiado riboflavina/EDTA.

Efecto inhibitorio del FRC001 sobre los diones conjugados que son generados de la peroxidación lípida del Acido Linoleico por la lipoxidasa.

Diones conjugados fueron generados en el primer paso de la peroxidación lípida que tiene absorción a los 233nm. El efecto inhibitorio del FRC001 sobre la generación de diones conjugados de la peroxidación del ácido linléico catalizado por lipoxidasa se vieron en la Figura 7. De las curvas se encuentra que los efectos inhibitorios fueron incrementados con las concentraciones del FRC001 añadidos al sistema. Cuando la concentración del FRC001 fue de 0.35mg/ml hubo una necrofagia del 20% de los diones conjugados. Cuando aumentó la concentración, la absorción a los 233nm también aumento, lo cual afecto la determinación a altas concentraciones.

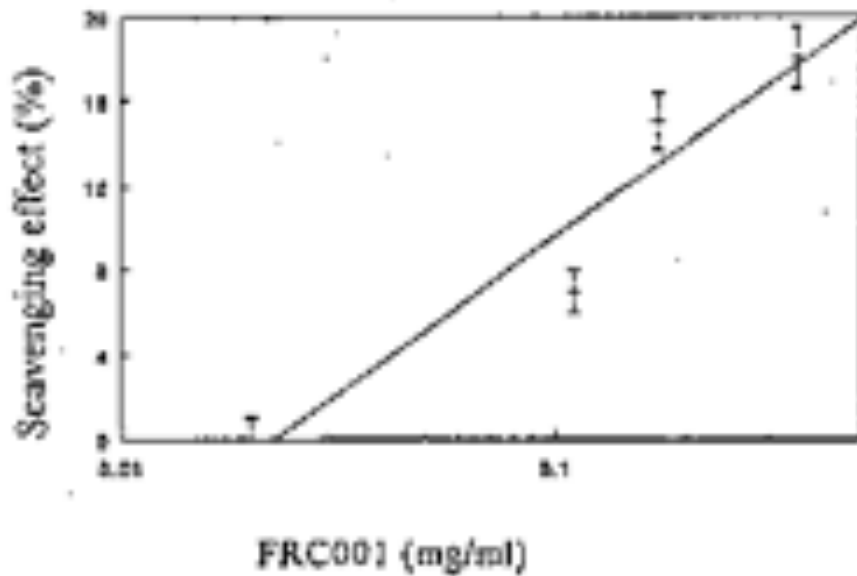


Figura 6. Los efectos necrofágicos del FRC001 sobre el O<sub>2</sub> generado del sistema irradiado riboflavina/EDTA.

6. Efectos inhibitorios del FRC001 sobre los materiales que han reaccionados con TEA (TBARM) generados de la peroxidación del liposoma.

Los efectos inhibitorios del FRC001 sobre los materiales de reacción TBA generados de la peroxidación del liposoma se ven en la Figura 7. De la curva se puede ver que el efecto inhibitorio sobre el TBARM aumento con el aumento de la concentración del FRC001. La concentración para la inhibición del 50% es aproximadamente 19mg/ml. El efecto inhibitorio de los materiales de reacción TBA es menor al de la Vitamina C (C<sub>50</sub>=1mg/ml) pero mayor al de la Vitamina E.

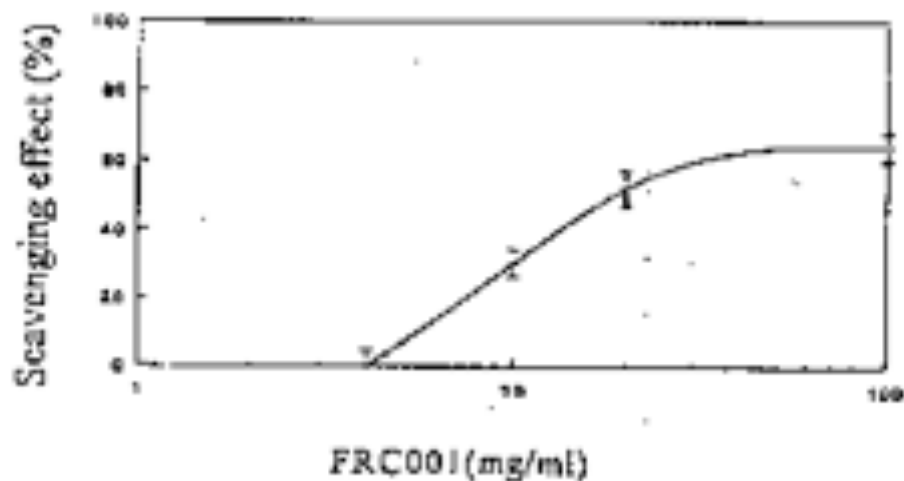
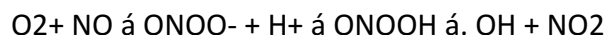


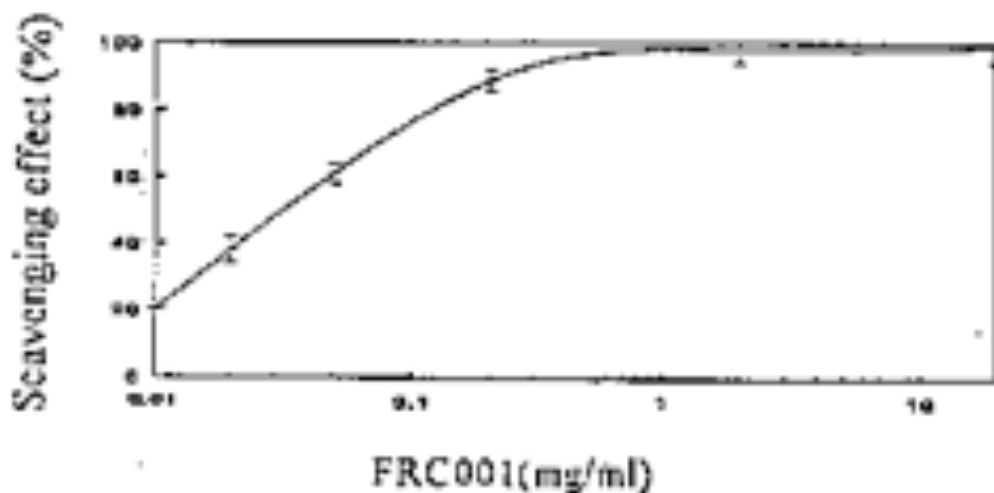
Figura 7 Efectos inhibitorios del FRC001 sobre TBARM generado por la peroxidación lípida del liposoma iniciado por Fe<sup>2+</sup>.

## 7. Efecto necrofágico del FRC001 sobre peroxinitrito.

El ácido nítrico tiene muchas funciones bioológicas, tales como el factor relajante derivado del endotelio (EDRS) el cual puede relajar la musculatura vascular lisa e inhibir la coagulación plaquetaria y revertir la transmisión de la neurona mensajera. La biosíntesis del óxido nítrico de L-arginina puede ser un camino metabólico para la regulación de la función y comunicación celular. Los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus armamentos citotóxicos. Por otro lado, el óxido nítrico, que contiene un electrón suelto, es un radical libre paramagnético y activo, puede reaccionar con O<sub>2</sub> para formar el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). En soluciones alcalinas ONOO<sup>-</sup> es estable pero tiene un pKa de 6.6 a 0 °C y se descompone rápidamente una vez que es protonado, para dar lugar a una especie parecida a radicales de hidroxilo y radicales libres de NO<sub>2</sub> respectivamente de acuerdo con la siguiente reacción.



Recientemente se propuso que el óxido nítrico reacciona con O<sub>2</sub> en muchos casos patológicos para producir especies citotóxicas. La investigación del peroxinitrito ha recibido mucha atención. Su oxidación de sulfhidrilos y membranas lipídicas, que causan toxicidad celular y algunas enfermedades. Aquí el efecto necrofágico del FRC001 sobre ONOO<sup>-</sup> se midió y se demostró en la Figura 8. Se puede encontrar que el FRC001 puede ser un necrofágico efectivo del ONOO<sup>-</sup> (C<sub>50</sub>=0.03mg/ml). Su efecto necrofágico sobre el peroxinitrito es menor al de la Vitamina C (C<sub>50</sub>=0.00003mg/ml) pero mayor al de la Vitamina E.



FRC001 es un medicamento diseñado en base a la teoría de la necrofagia de los radicales libres. De los resultados de este experimento se puede ver que el FRC001 es un necrofágico efectivo de los radicales libres del oxígeno generados de los PMN estimulados con PMA xantina/xantina oxidasa, riboflavina/EDTA irradiada y la Reacción de Fenton que se forman durante la peroxidación del ácido linoleico y liposomas respectivamente y necrofagar ONOO<sup>-</sup>. Estos

resultados sugieren que el efecto terapéutico del FRC001 sobre las enfermedades, puede pasar por el camino de necrofagar radicales libres de oxígeno en todo el cuerpo.

# SCAVENGING EFFECTS OF FRC001 ( China No.1 Tian Xian Liquid ) ON OXYGEN FREE RADICALS

Bao-Lu Zhao<sup>1</sup> Ph.D., Wei-Juan Xia<sup>1</sup> Ph.D., Chung-Yu Ke<sup>2</sup> MD, Hong Zhang<sup>3</sup> MD, Ph.D.  
1. Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing  
2. FRC Free Radical Biology and Medical Research Center, Taipei  
3. Department of Pathology, University of Linköping, Sweden

## ABSTRACT

With ESR, BIL-chemiluminescence and other techniques, the scavenging effects of FRC001 on oxygen free radicals have been studied in aqueous, enzyme, irradiation and cell systems and compared with Vitamin C and E. It was found that FRC001 could effectively scavenge the oxygen free radicals generated from PMN stimulated with PMA, xanthine/xanthine oxidase, irradiation riboflavin/EDTA and Fenton Reaction. It was also found that it could inhibit the conjugated dienes and TBA reacted materials (TBARM) formed during lipid peroxidation of linoleic acid and liposome respectively and it could effectively scavenge ONOO<sup>-</sup>.

Key words: FRC001, Oxygen free radicals, lipid peroxidation, ESR, BIL-chemiluminescence.

## INTRODUCTION

Active oxygen free radicals can damage components of cell, even kill normal cells and cause aging and some very serious diseases, such as cancer and heart disease. Usually, the production and scavenging of the active oxygen free radicals are balanced in healthy human body. If there is imbalance in regular mechanism of some enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) or catalase, there can be excessive amounts of active oxygen radicals generated in the body. It is possible that scavengers of active oxygen radicals might be beneficial for prevention of such diseases and for human health. So it is very important to search for effective scavengers of active oxygen radicals. In this paper, with ESR, BIL-chemiluminescence and other techniques, the scavenging effect of FRC001 on oxygen free radicals has been studied in aqueous, enzyme, irradiation system and cell system. It was found that FRC001 could effectively scavenge the oxygen free radicals generated from PMN stimulated with PMA, xanthine/xanthine oxidase, irradiation riboflavin/EDTA and Fenton Reaction. It was also found that it could inhibit the conjugated dienes and TBARM formed during lipid peroxidation of linoleic acid and liposome respectively.

## MATERIALS AND METHODS

Agents: DMPO (5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxide) was purchased from Sigma Chem Co. and purified by active charcoal before use. PMA (phorbol myristate acetate), linoleic acid, lipoxidase, SOD (6500 U/mg), xanthine/xanthine oxidase (2.125 U/ml) and luminol were purchased from Sigma Chem Co., PMA was dissolved in a little acetone and diluted with 50mM phosphate buffer to a proper concentration before use. Other agents made in China are AR Levels. FRC001 is supplied by China-Japan Feida Union Co., LTD.

#### Measurement of SOD activity included in FRC001

**BJL-chemiluminescence measurement:** The reaction of xanthine and xanthine oxidase can generate oxygen free radicals which give a luminol-dependent chemiluminescence. SOD can scavenge the chemiluminescence generated from this system, so the SOD activity can be measured with this system. The measurement system includes 0.2 mM luminol, 0.32 mM xanthine, and 0.09 U/ml xanthine oxidase. The chemiluminescence was measured with WDD-1 chemiluminescence meter.

The scavenging effect of FRC001 on  $\cdot O_2^-$  is defined as:

$$E = \frac{h_0 - h_x}{h_0} \times 100\%$$

Here  $h_0$  is the Chemiluminescence of xanthine/xanthine oxidase control system and  $h_x$  is the chemiluminescence of xanthine/xanthine oxidase after addition of FRC001 solution.

The measurement system was the same as above except that different concentrations of FRC001 were added to the system. First, a standard curve of SOD activity was developed with this system. Then the scavenging curve of FRC001 on oxygen free radicals was measured in this system. By using both of these curves, the SOD activity included in FRC001 solution can be determined.

#### Scavenging effect of FRC001 on $\cdot OH$ free radicals generated from Fenton reaction

A solution of 50 mM DMPO 1%  $H_2O_2$  and 100  $\mu M$  Fe(II) as ferrous ammonium sulfate were mixed and transferred to a quartz capillary for ESR measurement. When the scavenging effect of FRC001 was measured, different concentrations of FRC001 solution were added to the system. The scavenging effect was calculated as above but here the height of the second peak was used for calculation. ESR conditions: All ESR spectra were recorded at Varian E-109 ESR spectrometer. The conditions are: microwave power 20 mW, X-band, 100 kHz modulation with amplitude 1G, central magnetic field 3250 G, scan width 200 G, time constant 0.128 S, room temperature.

#### Scavenging effect of FRC001 on $\cdot O_2^-$ generated from irradiation of riboflavin/EDTA system

A mixture containing 0.3 mM riboflavin, 5 mM EDTA and 0.1 M DMPO was transferred to a quartz capillary and put into the cavity of ESR spectrometer. After irradiation of the sample for 20 seconds with a xenon lamp (500 W, distance 70 cm), the ESR spectra were recorded immediately. When the scavenging effect of FRC001 was measured, different concentrations of FRC001 were added to the system. The scavenging effect was calculated as above but here the height of the first peak was used for calculation. The ESR measurement condition was the same as above.

#### Measurement of scavenging effect of FRC001 on conjugated dienes generated from lipid peroxidation of linoleic acid by lipoxidase

0.1mM linoleic acid in PBS was mixed with 480 U/ml lipoxidase and measured at 232 nm with time. When inhibition effects of FRC001 on the generation of conjugated dienes were measured, different concentrations of FRC001 were added into the system. The scavenging effect was calculated as above, but here the  $h$  and  $h_x$  was used by reaction rate of control and sample respectively.

Measurement rate of scavenging effect of FRC001 on TBA reacted materials (TBARM) generated from lipid peroxidation of liposome initiated by  $Fe^{2+}$

Liposome made from lecithine (10 mg/ml) was peroxidized by addition of  $Fe^{2+}$  (100  $\mu$ M), then 95 °C mixed with 6.7 mg/ml TBA and 0.05 M HCL. The sample was incubated for 60 minutes at 95 °C, then cooled to room temperature. The TBARM was extracted by butanol: methanol (85:15) and measured at 532 nm. When the inhibition effects of FRC001 were measured, different concentrations of FRC001 were added in the system. The scavenging effect was calculated as above.

Scavenging effect of FRC001 on oxygen free radicals generated from PMA stimulated PMN

Isolation of PMN: Fresh whole blood of healthy donor was purchased from Red Cross Blood Center of Beijing. PMN were separated from other cellular components by using 6% dextran sedimentation, hypersonic lysis of remained red cells and Ficoll density gradient centrifugation separation of mononuclear cells.

Production and measurement of active oxygen free radicals generated from PMN stimulated with PMA: In a typical experiment, a mixture containing  $10^7$  /ml PMN, 0.1 mM DETAPAC (diethylenetriaminepentaacetic acid) and 100  $\mu$ g/ml PMA was incubated for 2 minutes at 37 °C, then 0.1 M luminal was added and mixed homogeneously before measurement with BCL-chemiluminescence. When the scavenging effect of FRC001 was measured, different concentrations of FRC001 were added into the system. The scavenging effect was calculated as above.

Scavenging effect of FRC001 on ONOO<sup>-</sup>

Peroxynitrite synthesis: Peroxynitrite was synthesized in a quenched flow reactor [12]. Solutions of (i) 0.6mol/L  $NaNO_2$ , and (ii) 0.6 mol/L HCL/0.7 mol/L  $H_2O_2$  were pumped at 26 ml/min into a T-junction and mixed in a 3 mm diameter by 2.5 cm glass tube. The acid catalyzed reaction of nitrous acid with  $H_2O_2$  to form peroxynitrous acid was quenched by pumping 15 mol/L NaOH at the same rate into a second T-junction at the end of the glass tube. Excess  $H_2O_2$  was removed by passage over a 1 X5 cm column filled with 4g of granular  $MnO_2$ . The solution was frozen at -20 °C for as long as a week. Peroxynitrite tended to form a yellow top layer due to freeze fractionation, which was scraped for further studies. The concentration of peroxynitrite was determined by the absorbance at 302 nm in 1mol/L NaOH ( $E_{302nm}^{1cm} = 1670 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Peroxynitrite can oxidize luminol and give a very strong chemiluminescence. The scavenging effect of FRC001 on peroxynitrite was measured by chemiluminescence method and the scavenging effect was calculated as above.

## RESULTS and DISCUSSION

1. Scavenging effects of FRC001 on oxygen free radicals generated from xanthine/ xanthine oxidase system.

A standard curve of scavenging effect of SOD on free radicals generated from xanthine/ xanthine oxidase was shown in Figure 1.



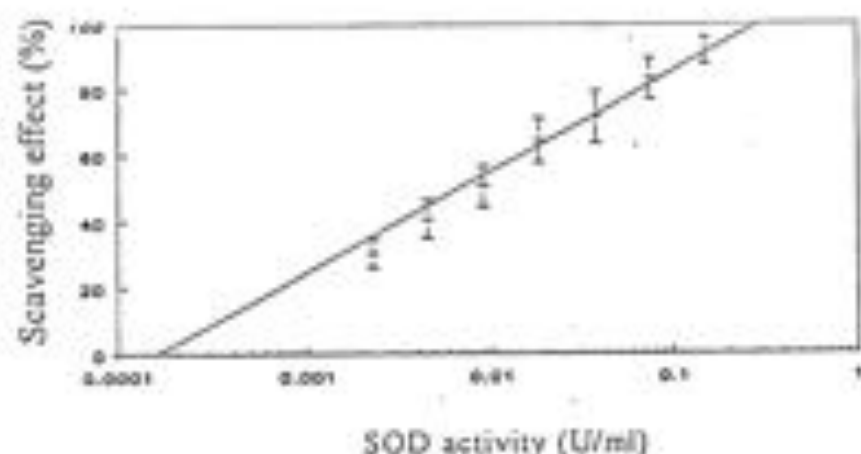


Fig.1. The standard curve of scavenging effect of SOD on oxygen free radical generated from the reaction of xanthine/xanthine oxidase system.

The scavenging effect of FRC001 on oxygen free radicals generated from the reaction of xanthine/xanthine oxidase system was shown in Figure 2.

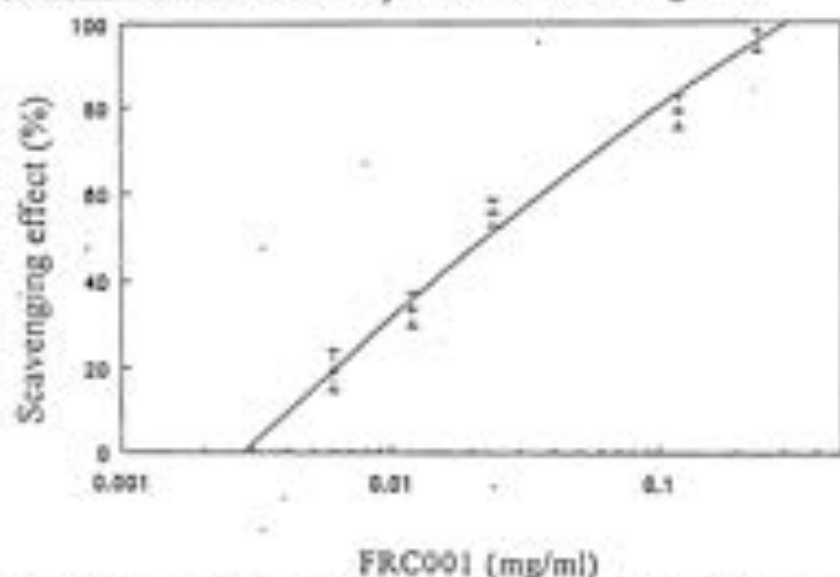


Fig 2 The scavenging effect of FRC001 on oxygen free radicals generated from xanthine/ xanthine oxidase system

From above two curves, the SOD activity included in 1g FRC001 is calculated and equal to 300.000U/ml.

## 2. Scavenging effects of FRC001 on oxygen free radicals generated from PMN stimulated with PMA.

When PMN are stimulated or they are in phagocytes, there will be a respiratory burst and production of active oxygen free radicals. The active oxygen radicals produced in this process play an important role in microbicidal and tumoricidal processes and in protecting the healthy body from diseases. But if there are excess

active oxygen radicals in the body, they will damage the components of cells and even kill the normal cells and cause aging and very serious diseases, such as heart disease and cancer. Here it was used to examine effect of FRC001 on the oxygen free radicals. Figure 3 shows the scavenging effect of FRC001 on oxygen free radicals generated from PMA stimulated PMN measured by BJL-chemiluminescence. It was determined  $C_{50}=0.62$  mg/ml which was smaller than that of Vitamin C ( $C_{50}=0.2$ mg/ml) and bigger than that of Vitamin E.

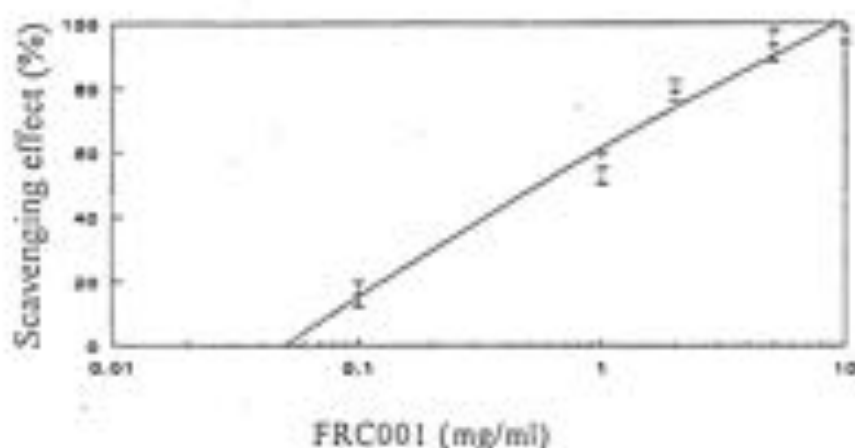
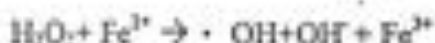


Fig. 3. Scavenging effect of FRC001 on oxygen free radicals generated from PMA stimulated PMN.

### 3. Scavenging effect of FRC001 on $\cdot$ OH free radicals generated from Fenton's Reaction

Fenton's Reaction can generate  $\cdot$ OH and has been used for examination of scavengers of  $\cdot$ OH free radicals



Here it was used for examination of the scavenging effect of FRC001 on  $\cdot$ OH free radicals. The ESR spectrum of DMPO-OH was shown in Fig. 4b ( $a_N = a_H = 14.9$  G). The scavenging effect of FRC001 on  $\cdot$ OH was shown in Figure 5.



Fig.4.ESR spectra of DMPO spin trapped  $\cdot O_2^-$  generated from irradiated riboflavin/EDTA system (a) and  $\cdot OH$  free radicals generated from Fenton reaction (b).

The scavenging effect of FRC001 was shown in Figure 5 FRC001 can effectively scavenge the hydroxyl free radicals generated from Fenton Reaction but Vitamin C just has a little scavenging effect on the hydroxyl free radical Vitamin E only give a scavenging effect of 37.5% at the concentration of 5mg/ml.

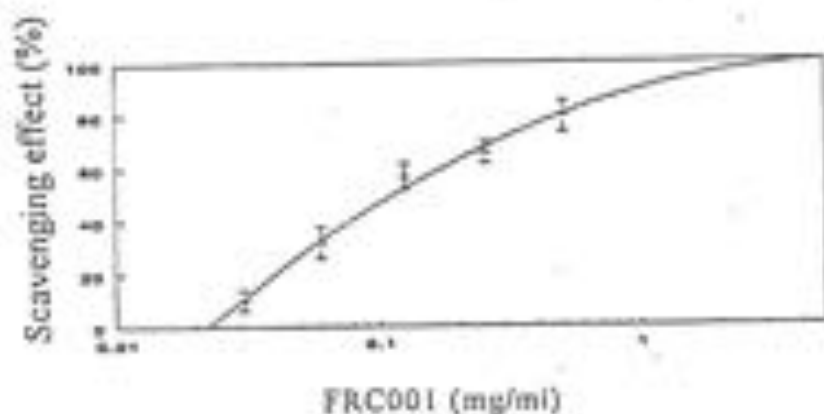


Fig.5. Scavenging effect of FRC001 on  $\cdot OH$  free radicals generated from Fenton reaction

#### 4. Scavenging effect of FRC001 on $\cdot O_2^-$ generated from irradiated riboflavin/EDTA system

Irradiated riboflavin/EDTA has been used for generation of  $\cdot O_2^-$  and examination of scavenger of  $\cdot O_2^-$  in photo system. Here it was used for examining the scavenging effect of FRC001 on  $\cdot O_2^-$ . The ESR spectrum of  $\cdot O_2^-$  spin adducts DMPO-OOH generated from irradiated riboflavin was shown in Figure 4a ( $a_{N1}=14.3$ ,  $a_{N2}=11.3G$ ,  $a_{H1}=1.25G$ ).

According to the definition of the scavenging effect, the curve of scavenging effect of FRC001 on  $\cdot O_2^-$  generated from irradiated riboflavin/EDTA system was shown in Fig.6. The concentration of FRC001 for 50% scavenging is about 17mg/ml. Its scavenging effect is smaller than that of Vitamin C ( $C_{50}=0.0009$  mg/ml) but stronger than that of Vitamin E.

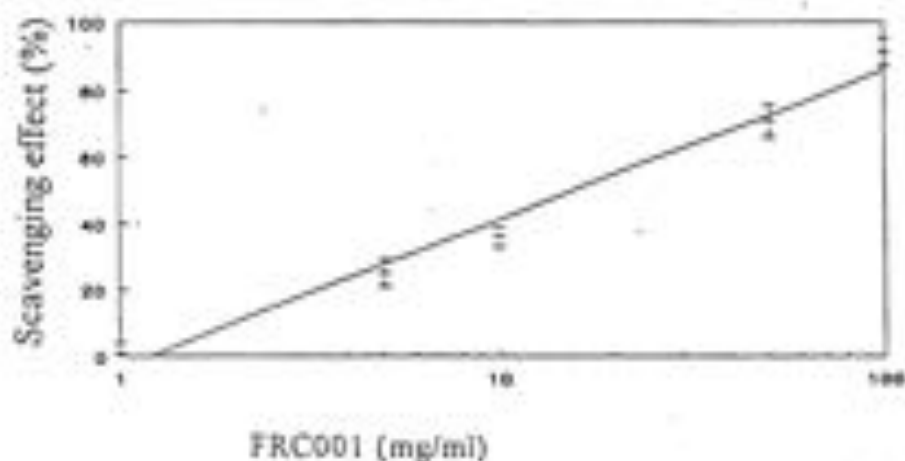


Fig.6. Scavenging effects of FRC001 on  $\cdot O_2^-$  generated from irradiated riboflavin/EDTA system.

#### 5. Inhibition effect of FRC001 on conjugated dienes generated from lipid peroxidation of Linoleic acid by lipoxidase

Conjugated dienes were generated at the first step of lipid peroxidation, which has a absorbance at 233nm. The inhibition effects of FRC001 on the generation of conjugated dienes from lipid peroxidation of linoleic acid catalyzed by lipoxidase were shown in Figure 7. From the curves, it could be found that the inhibition effects were increased with the concentrations of FRC001 added in the system. When the concentrations of FRC001 was 0.35mg/ml, about 20% of conjugated dienes was scavenged. When the concentration was increased, the absorbance at 233nm would increase, which disturbed the determination at high concentration.

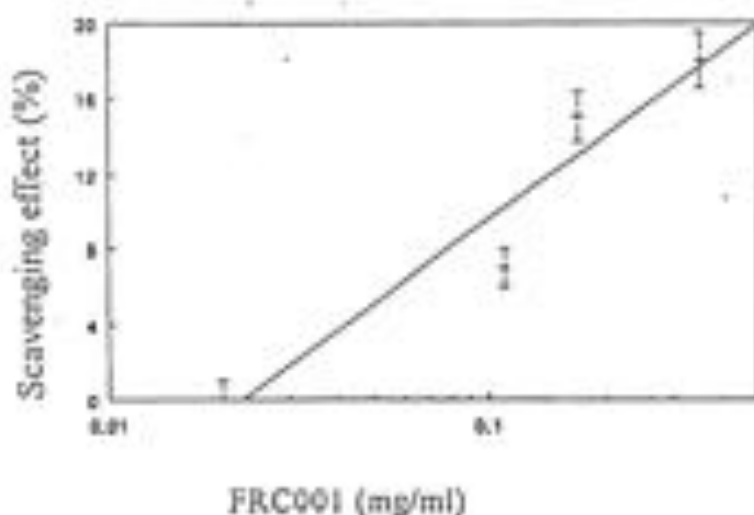


Fig.6. Inhibition effects of FRC001 on the generation of conjugated dienes from the lipid peroxidation of linoleic acid by lipoxidase.

#### 6. Inhibition effects of FRC001 on TEA reacted materials (TBARM) generated from lipid peroxidation of liposome

The inhibition effects of FRC001 on TBA reaction materials generated from lipid peroxidation of liposome were shown in Figure 7. From the curve, it can be found that the inhibition effect on TBARM was increased with the increase of concentration of FRC001. The concentration of inhibition for 50% is about 19 mg/ml. Its inhibitory effect on TBA reaction materials is smaller than that of Vitamin C ( $C_{50}=1\text{mg/ml}$ ) but larger than that of Vitamin E.

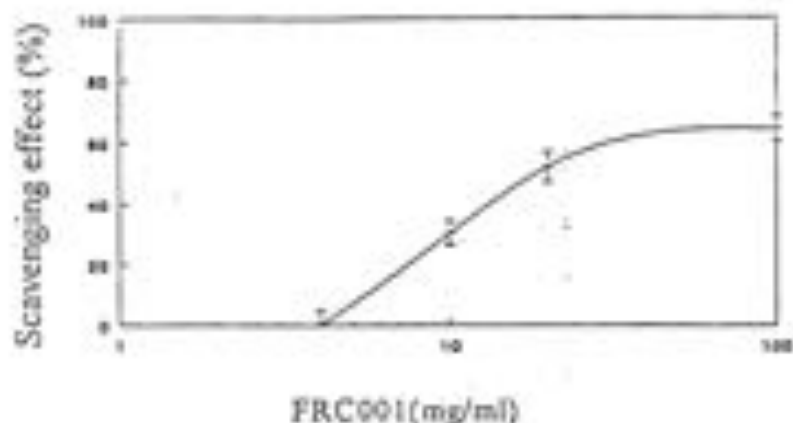


Fig.7 Inhibition effects of FRC001 on TBARM generated from lipid peroxidation of liposome initiated by  $\text{Fe}^{2+}$

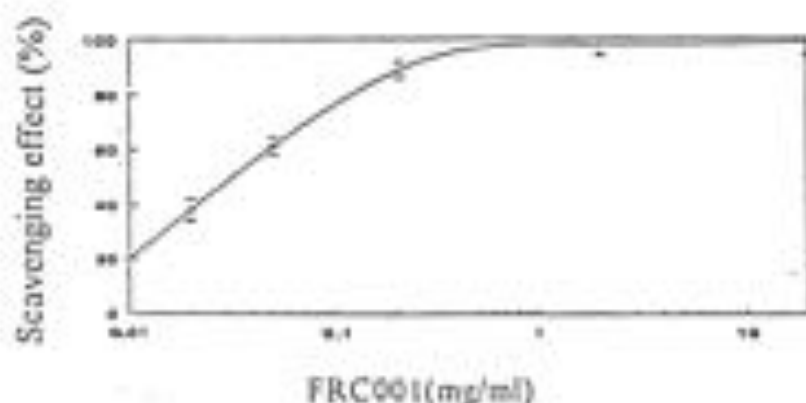
#### 7. Scavenging effect of FRC001 on peroxynitrite

Nitric oxide has many biological functions, such as the endothelium-derived relaxing factor (EDRF), which can relax vascular smooth cell and inhibit platelet coagulation, and reverse messenger in neuron transmission. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine may be a pathway for the regulation of cell function and communication. Macrophages produce nitric oxide as part of their cytotoxic armamentarium. On the other hand, nitric oxide, which contains an unpaired electron, is a paramagnetic and active free radical, it can react with  $\cdot\text{O}_2^-$  to form peroxynitrite anion ( $\text{ONOO}^-$ ). In alkaline solutions,  $\text{ONOO}^-$  is stable but has a pKa of 6.6 at 0 °C and decays rapidly once protonated, to give a species with hydroxyl radical-like and  $\text{NO}_2$  free radicals respectively, according to the following reaction.



Recently, it is proposed that nitric oxide reacts with  $\cdot\text{O}_2^-$  in many pathological

cases to yield cytotoxic species. The investigation of peroxynitrite has been given much attention. Its oxidation of sulfhydryls and membrane lipid, which cause cell toxicity and some diseases. Here the scavenging effect of FRC001 on ONOO<sup>-</sup> was measured and it was showed in Figure 8. It can be found that FRC001 could effectively scavenge ONOO<sup>-</sup> ( $C_{50}=0.03$  mg/ml). Its scavenging effect on peroxynitrite is smaller than that of Vitamin C ( $C_{50}=0.00003$  mg/ml) but stronger than that of Vitamin E.



FRC001 is a drug designed on the basis of the theory of scavenging free radicals. From above experiment results, it can be found that FRC001 can effectively scavenge the oxygen free radicals generated from PMN stimulated with PMA xanthine/xanthine oxidase, irradiation riboflavin/EDTA and Fenton's Reaction. It was also found that it could inhibit the conjugated dienes and TBA reacted materials (TBARM) formed during lipid peroxidation of linoleic acid and liposome respectively and scavenge ONOO<sup>-</sup>. These results suggest that the therapy effect of FRC001 on diseases maybe pass through the pathway of scavenging toxic oxygen free radicals in human body.

## REFERENCE

1. Rice-evans. C. Free radicals, Cell damage and diseases. Richelieu Press London, 1986, p.312.
2. Ju, H-S, Li, X-J, Zhao, B-L, Xia W-J, et al. Scavenging effect of total flavonoids of Hippophae on active oxygen radicals. *Acta pharm Sinica* 6, 97-101, 1990.
3. Zhao, B-L, Li X-J, He, R-G, Jia, W-Y & Xin W-J. ESR studies on oxygen consumption during the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol Intern Report* 13, 317-323, 1989.
4. Zhao, B-L, Li, X-J, & Xin W-J. ESR studies on active oxygen radicals produced in the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol Intern Report* 13, 529-536, 1989.
5. Marx, JL. Oxygen free radicals linked to many diseases *Science* 235, 529-531, 1987.
6. Zhao, B-L, Li, X-J, He, R-G, Cheng, S-J & Xin W-J. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals *Cell Biophys* 14, 175-185, 1989.
7. Ohkawa, H, Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358, 1979.
8. Ju, H-S, Li, X-J, Zhao, B-L, Hou, J-W. & Xin, W-J. Scavenging Effects of Sodium ferulate and 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on oxygen free radicals. *Acta Pharm. Science* 11:466-470, 1990.
9. Zhao, B-L. Oxygen radicals and aging. *Nature J.* 13:511-514, 1990.
10. Xin, W-J, Zhao, B-L, Li, X-J, & Hou, J-W. Scavenging effects of Chinese herbs and natural health products on active oxygen radicals. *Research Chem. Intern* 14:171-183, 1990.
11. Shen, S-R, Yang, X-Q, Yang, F-J, Zhao, B-L & Xin, W-J. Scavenging effects of tea polyphenol compound and (-)-EGCG on oxygen free radicals. *J. Tea Sci* 12:59-64, 1992.
12. Shen, S-R, Yang, F-J, Zhao, B-L. & Xin, W-J. Coordinatingly Synergic effect of catechins during their antioxidation. *J. Tea Sci*, 13:141-146, 1993.
13. Zhao, B-L. & Chen, W-C. Properties and biological function of NO free radicals *Proc. Biochem. Biophys.* 20:409-412, 1993.
14. Shi, H-L, Zhao, B-L, Xin, W-J. Scavenging effect of Baicalin on free radicals and its protection on erythrocyte membrane from radical injury. *Biochem. Mole. Biol. Intern.* 35: 981-994, 1995.
15. Zou, X-L, Wan, Q, Li, M-F, Zhao, B-L, Xin, W-J. Scavenging effect of green tea polyphenols on the oxygen free radicals generated from isolated ischemic reperfused rat myocardium. *Chinese J. Magn. Res.* 12:237-244, 1995.
16. Zhao, B-L, Shen, J-G, Li, M, Li, M-F, Wan, Q & Xin, W-J. Scavenging effect of Chinonin on NO and oxygen free radicals and its protective effect on the myocardium from the injury of ischemia-reperfusion. *Biochem. Biophys. Acta* 1315:131-137, 1996.
17. Zhao, B-L, Jiang, W, Zhao, Y, Hou, J-W. & Xin, W-J. Scavenging effect of salvia miltioriza on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membrane from ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Mole. Biol. Intern* 38:1171-1182, 1996.
18. Zhao, B-L, Shen, J-G, Hu, J-G, & Xin, W-J. Synergic effects of NO and oxygen free radicals in the injury of ischemia-reperfused myocardium -ESR Studies on NO free radicals generated from ischemia-reperfused myocardium. *Science China*

- (Series C) 26:331-338, 1996.
19. Zhao, B-L, Wang, J-C, & Xin, W-J. Scavenging effect of green tea polyphenols on peroxynitrite. *Chinese Scientific Bulletin* 41:923-927, 1996.
  20. Zhao, B-L, Wang, J-C, Hou, J-W & Xin, W-J. Studies on nitric oxide free radicals generated from polymorphonuclear leukocytes (PMN) stimulated by phorbol myristate acetate (PMA). *Cell Biol. Intern.* 20(5):343-350, 1996.
  21. Ni, Y-C, Zhao, B-L, Hou, J-W and Xin, W-J. Protection of cerebellar neuron by *Ginkgobiloba* extract against apoptosis induced by hydroxyl radicals. *Neuron Science Letter* 214:115-118, 1996.
  22. Li, H-T, Zhao, B-L, & Xin, W-J. Two peak kinetic curve of chemiluminescence in phorbol stimulated macrophage. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 223: 314, 1996.
  23. Shen, J-G, Zhao, B-L, Hou, J-W, Xin, W-J. Effect of Yi Qi Tong Luo Ye on oxygen free radicals, nitric oxide and myocardial damage after ischemia reperfusion. *Medical Biophys.* 8:7-11, 1996.
  24. Zhao, B-L, Wang, J-C, Hou, J-W. & Xin, W-J. ONOO is the main poison species of NO generated from phorbol stimulated polymorphonuclear leukocytes (PMN). *Science China (series C)* 26:406- 413. 1996.