

# 茶多酚和槲皮素清除自由基作用的研究

方若莹\* 陈季武 胡天喜

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

屠铁城 董继荣 王文锋 林念芸

(中科院上海原子核研究所辐射化学开放研究实验室, 上海 201800)

**摘要** 本文用化学发光(CL)、顺磁共振(ESR)及脉冲辐解(PR)三种方法, 研究了茶多酚和槲皮素的清除  $O_2^-$  和  $OH^\cdot$  的能力。结果表明: 茶多酚和槲皮素都能有效地清除自由基, 茶多酚的效果较好。三种方法所得的结果, 完全一致。

**关键词** 茶多酚, 槲皮素, 自由基及清除剂, 化学发光(CL), 顺磁共振(ESR), 脉冲辐解(PR)

自由基生物学和自由基医学研究已阐明: 肿瘤的发生、心脑血管疾病、辐射损伤、衰老都与自由基体威相关<sup>[1]</sup>。寻找清除自由基的药物, 尤其是在植物中寻找无毒性的抗氧化剂, 已经成为医药学家和生物学家所共同追求的目标。有研究指出, 酚类化合物具有清除自由基的作用<sup>[2-5]</sup>。绿茶的有效成份一茶多酚, 和用以治疗高血压的从某些植物中提取的槲皮素, 皆属于酚类化合物。它们与咖啡酸、芥子酸等酚类化合物一样, 应有清除自由基的作用。由于它们结构上的差异, 清除的效果不尽相同。本研究在前人研究的基础上, 采用了化学发光法、顺磁共振法及脉冲辐解法, 研究了茶多酚和槲皮素的清除自由基的能力, 了解它们的异同。

## 1 材料与 方法

### 1.1 材料

人的抗凝全血购自上海市中心血站。

### 1.2 试剂

黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、鲁米诺购自 Sigma 公司;  $FeSO_4$ 、 $H_2O_2$ 、 $Na_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$  皆为分析纯的国产试剂; DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide)购自南京大学第一实验化工厂; 酵母由上海酵母厂赠送, 酵母多糖(OZ)由本实验室自制; 茶多酚购自浙江农业大学茶叶系, 纯度 99%; 槲皮素由南京药科大学徐献本教授慷慨赠送, 纯度 95%。

### 1.3 方法

#### 化学发光测量

1.3.1 黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶—鲁米诺产生  $O_2^-$  的化学发光体系 依次向测量杯中加入 800  $\mu$ l 0.05 mmol/L 黄嘌呤, 50  $\mu$ l 2 mmol/L 鲁米诺 及 100  $\mu$ l 不同浓度的茶多酚或槲皮素溶液, 最后加入 50  $\mu$ l 0.25 U/ml 的黄嘌呤氧化酶去启动化学发光。在 25 $^\circ$ C 下, 由发光计测出峰值 (6 s 的脉冲数)<sup>[6]</sup>。

国家自然科学基金资助项目, 辐射化学开放实验室资助课题

\* 现在浙江大学生命科学系

收稿日期: 初稿 1992-07-06, 修改稿 1993-03-15

1.3.2  $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-}$ 酵母产生  $\text{OH}^\cdot$  的发光体系<sup>[7]</sup> 依次向测量杯中加入 0.2 ml 酵母(15 mg), 0.9 ml pH 为 6.2 的磷酸钠缓冲液, 0.1 ml 不同浓度的茶多酚或槲皮素溶液, 0.2 ml 3.0 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ , 置于发光计中, 原位注入 0.6 ml 33.3 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  启动化学发光, 记下发光的峰值。

1.3.3 全血吞噬细胞化学发光测定体系参见文献[8]。数据处理见文献[9], 以抑制发光强度 50% 的药物浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 来比较茶多酚和槲皮素清除  $\text{O}_2^\cdot$  或  $\text{OH}^\cdot$  的能力大小。

#### 1.4 ESR 测量体系

1.4.1  $\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2\text{-DMPO}$  捕捉  $\text{OH}^\cdot$  的体系。

1.4.2 黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶—DMPO 捕捉  $\text{O}_2^\cdot$  的体系。

1.4.3 全血嗜中性白细胞—调理的酵母多糖—DMPO 捕捉  $\text{O}_2^\cdot$  和  $\text{OH}^\cdot$  的体系。

测试条件: Varian 112 EPR 谱仪, 调制频率 100 kHz, 微波功率 60 mW, 调制幅度 1mT, 室温下以扁平样品管进行试验, 信号强度以方格数计之, 实验结果按下列公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照管峰值} - \text{药物管峰值}}{\text{空白对照管峰值}} \times 100\%$$

#### 1.5 脉冲辐解测量体系

用自制的脉冲辐解动态吸收光谱装置对水溶液样品进行辐射分解, 脉冲电子能量 8 MeV, 脉宽 8 ns, 单脉冲剂量 10—30 Gy。以清除自由基的速率常数为指标, 评价茶多酚和槲皮素的清除  $\text{OH}^\cdot$  的能力大小。

## 2 结 果

### 2.1 药物清除 $\text{O}_2^\cdot$ 的作用

有氧条件下, 黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤产生  $\text{O}_2^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$  使鲁米诺分子激发, 退激时发射 425 nm 的光。茶多酚和槲皮素都能明显地清除  $\text{O}_2^\cdot$ , 抑制化学发光。茶多酚和槲皮素的  $\text{IC}_{50}$  分别为 0.001 mmol/L 和 0.096 mmol/L。

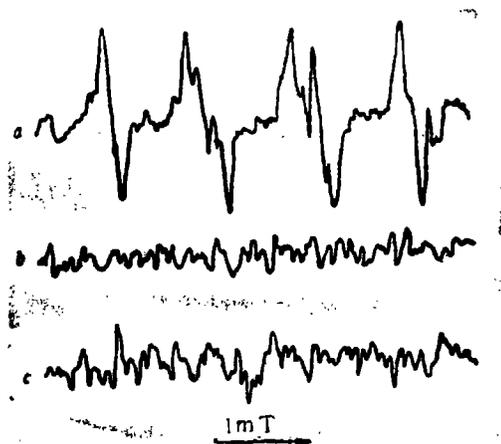


Fig 1. ESR spectra of DMPO spin adducts of  $\text{O}_2^\cdot$  produced from xanthine, xanthine oxidase and DMPO system

- (a) control (b) after scavenging by tea polyphenols (10 mmol/L)  
(c) after scavenging by quercetin (10 mmol/L)

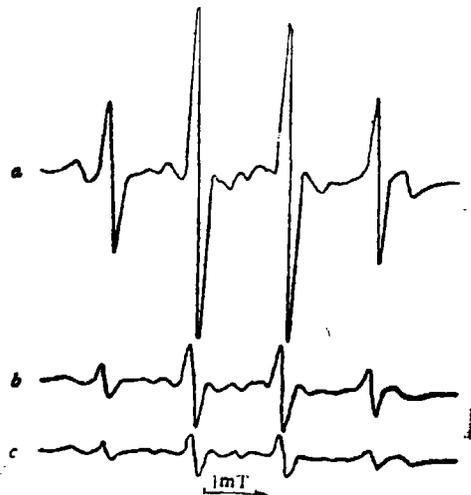


Fig 2. ESR spectra of  $\text{OH}^\cdot\text{-DMPO}$  produced from fenton reaction

- (a) control (b) after scavenging by quercetin (10 mmol/L) (c) after scavenging by tea polyphenols (10 mmol/L)

使用同上产生  $O_2^-$  的体系, 用 DMPO 捕捉  $O_2^-$ 。试剂混合后 2 min 内出现  $O_2^-$ -DMPO 谱, 8 min 内可以见到  $O_2^-$ -DMPO 和  $OH^\cdot$ -DMPO 的 ESR 混合谱线, 8 min 以后全部转化为  $OH^\cdot$ , 出现  $OH^\cdot$  的特征四线谱。加入茶多酚或槲皮素能明显地降低 ESR 信号强度。若不加药的 ESR 信号强度为 14 格, 那么加入 10 mmol/L 茶多酚后降为 2 格, 加入相同浓度的槲皮素后则降为 4 格, 抑制率分别为 85.7% 和 71.4% (见图 1)。

### 2.2 药物清除 $OH^\cdot$ 的作用

茶多酚和槲皮素都能抑制  $FeSO_4-H_2O_2$ -酵母化学发光体系的化学发光强度。它们的  $IC_{50}$  分别为 0.016 mmol/L 和 0.050 mmol/L。

Fenton 反应产生  $OH^\cdot$ , DMPO 捕捉  $OH^\cdot$ , 测得对照管的 ESR 信号强度为 43 格, 加入 10 mmol/L 茶多酚后降为 5 格, 加同等浓度的槲皮素后降至 10 格。两者分别可抑制 ESR 信号强度 88.4% 和 76.9%。CL 法和 ESR 法都证明, 茶多酚和槲皮素皆能高效率地清除  $OH^\cdot$  (见图 2)。

### 2.3 脉冲辐解法测定药物清除 $OH^\cdot$ 的速率常数

脉冲辐射分解动态吸收光谱装置对水溶液药物进行辐射分解, 产生  $OH^\cdot$ , 测得的茶多酚和槲皮素清除  $OH^\cdot$  的速率常数分别为  $1.7 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$  和  $1.5 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ , 茶多酚清除  $OH^\cdot$  的效果优于槲皮素。

### 2.4 药物对全血吞噬细胞产生活性氧的抑制作用

全血中多型核白细胞 (PMN), 在调理酵母多糖的刺激下, 产生  $O_2^-$ 、 $OH^\cdot$ 、 $H_2O_2$ 、 $^1O_2$ 、 $C=O^*$  等多种自由基和活性氧, 存在鲁米诺时产生化学发光。药物清除了活性氧, 就可明显地降低化学发光强度。茶多酚和槲皮素的清除效果十分明显, 其  $IC_{50}$  分别为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L (见图 3 与表 1)。用 DMPO 捕捉酵母多糖刺激的、纯化的 PMN “呼吸暴发” 产生的自由基,

Tab 1. Inhibitory effects of tea polyphenol and quercetin on PMN cellular CL

	Tea polyphenol/mmol·L <sup>-1</sup>				Quercetin/mmol·L <sup>-1</sup>			
	0.00	0.06	0.12	0.18	0.00	0.18	0.36	0.72
Intensity of CL(cp 6 s)	50.490	32.862	21.595	14.134	50.490	26.911	11.989	6.335
Inhibition of CL(%)	0.0	34.9	57.2	72.0	0.0	46.7	66.3	87.5

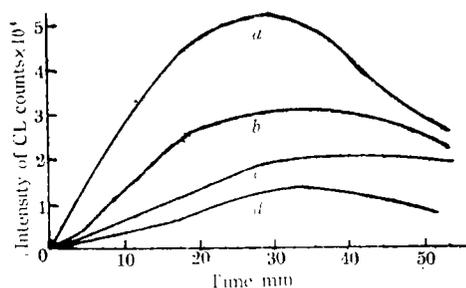


Fig 3. Inhibitory effects of tea polyphenol on PMN cellular CL  
 (a) control (b) tea polyphenol (0.06 mmol/L)  
 (c) tea polyphenol (0.12 mmol/L)  
 (d) tea polyphenol (0.18 mmol/L)

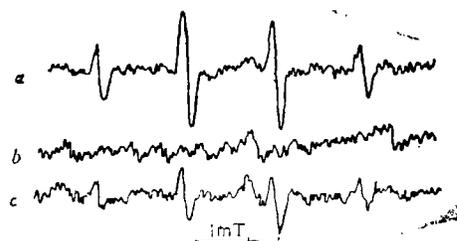


Fig 4. ESR spectra of  $OH^\cdot$ -DMPO produced by human PMN cells in response to  $O_2^-$ , trapped by DMPO  
 (a) control (b) tea polyphenols (10 mmol/L)  
 (c) quercetin (10 mmol/L)

可以看到类似于 ESR 测量黄嘌呤氧化酶—黄嘌呤化学反应产生  $O_2^-$  和  $OH^\cdot$  的情景,  $O_2^-$  转化为  $OH^\cdot$ , 最终 DMPO 捕捉的是  $OH^\cdot$ , 获取典型的四线谱信号。茶多酚和槲皮素同样能清除 PMN 所释放的活性氧, 10 mmol/L 浓度下, 茶多酚和槲皮素清除  $OH^\cdot$  率分别达 87.0% 和 83.0% (见图 4)

### 3 讨 论

本研究从化学反应体系和细胞体系入手, 采用三种检测方法, 探讨了自由基的产生和茶多酚、槲皮素对自由基的清除作用。茶多酚和槲皮素同属于酚类化合物, 都能清除  $O_2^-$  和  $OH^\cdot$  自由基, 是极好的自由基清除剂。从 PMN 细胞“呼吸暴发”能产生多种活性氧,  $Fe^{2+}-H_2O_2$ -酵母发光体系既产生  $OH^\cdot$ , 也产生  $^1O_2$  和  $H_2O_2$ , 茶多酚和槲皮素不仅能清除这两个体系产生的  $O_2^-$  和  $OH^\cdot$  自由基, 而且从能抗  $H_2O_2$ 、 $^1O_2$  等多种活性氧来看, 它们是一种多功能的抗氧化剂。

茶多酚和槲皮素之所以是多功能的抗氧化剂, 与它们的结构有一定的关系。茶多酚的主要成份是表没食子儿茶素没食子酸酯, 它与槲皮素的结构相似, 属于黄酮类化合物(见图 5), 但它在 B 环的 3 位上多了一个没食子酸, 并在 5' 位多一个羟基。Cotelle 等<sup>[9]</sup>指出: 黄酮类 B 环上接上没食子酸, 会增加清除自由基的能力; C<sub>7</sub> 位带上 OH, 成为黄嘌呤氧化酶的抑制剂。茶多酚清除自由基的能力高于槲皮素, 可能与其 B 环 3 位上多了一个没食子酸有关。

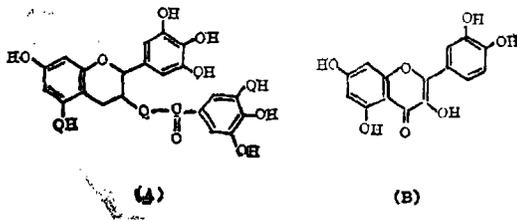


Fig 5. Structure of major component of tea polyphenols (EGCG) (A) and quercetin (B)

ESR 法是研究自由基的最直接的、也是最标准的方法。忻文娟等<sup>[4]</sup>已用该法肯定了茶多酚清除自由基的作用, 本文结果与之相似。用 ESR 法测得槲皮素清除自由基的效果略逊于茶多酚。用脉冲辐解法测定茶多酚和槲皮素清除  $OH^\cdot$  的反应的速率常数, 国内尚未见有报道, 国外报道也不多<sup>[10,11]</sup>, 本文测得的茶多酚和槲皮素清除  $OH^\cdot$  的速率常数明显地高于合成的抗氧化剂 BHT 和 BHA<sup>[11]</sup>, 其中茶多酚

也优于槲皮素。化学发光法是一种测量自由基的最新技术, 除了可测  $O_2^-$ 、 $OH^\cdot$  自由基之外, 还可测量  $^1O_2$ 、 $H_2O_2$  及激发的羰基等活性氧。化学发光法测得的茶多酚和槲皮素的清除自由基的性能, 与 ESR、PR 法完全一致。化学发光法与 ESR 法、PR 法互补, 但它更为灵敏、简便、易于推广应用。

绿茶有明显的延缓衰老的作用, 其有效成份茶多酚有防癌、抗癌的作用<sup>[12,13]</sup>。槲皮素有扩张冠状动脉、降血脂、抗炎等作用<sup>[14,15]</sup>。它们的这些作用都可能与清除活性氧的性能相关联。缺血性心脑血管疾病是一种自由基所致的疾病, 使用茶多酚和槲皮素来预防实验动物大脑缺血重灌的氧化损伤, 已初见结果(另行发表)。因此这两种药物将会有临床应用的前景。

### 参 考 文 献

- 1 Marx J L. Science, 1987, 235: 529
- 2 徐贻本, 李耐三, 邵鹤生. 南京药学院学报, 1980, 4(1): 24
- 3 胡天喜, 陈季武, 黄振东, 盛民立. 林念芸主编. 辐射研究与辐射工艺学术论文集, 上海: 上海医科大学出版社, 1990: 52-55
- 4 Zhao B L, Li X J, Xin W J, Cell Biophysics, 1989, 14: 175
- 5 林念芸, 李学鹏, 屠铁城, 谢继东. 辐射研究与辐射工艺学报, 1983, 1 (1): 1

- 6 胡天喜, 陈季武, 杨保津, 李承珠. 上海中医药杂志, 1988; 9: 28
- 7 陈季武, 胡天喜, 生物化学与生物物理进展, 1992, 2: 136
- 8 李益新, 董元林. 上海免疫学杂志, 1985, 5(1): 25
- 9 Cotellet N et al., Free Radical Biology & Medicine, 1992, 13: 211
- 10 Wang W F et al., Radiat. Phys. Chem., 1993, 42: 985
- 11 Erben-Russ M. Bors M. Saran M. Int. J. Radiat. Biol. 1987, 52: 393
- 12 Simic M G. Hunter E P L. In Radioprotectors and Anticarcinogenesis (O. F. Nygaard and M. G. Simic) p 499-460, Academic Press New York, 1983
- 13 程书钧. 癌变·畸变·突变, 1989, 1(1):1
- 14 周玉森. 茶叶科学, 1989, 9(2): 161; 1990, 10(1): 79
- 15 谢梅林, 顾振纶, 钱曾年. 现代应用药学, 1992, 9(1): 1

## THE SCAVENGING EFFECTS OF TEA POLYPHENOL AND QUERCETIN ON ACTIVE OXYGEN SPECIES

Fang Ruoying Cheng Jiwu Hu Tianxi

*(The Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)*

Tu Tiechen Dong Jirong Wang Wenfeng Lin Nianyun

*(Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear  
Research, Academia Sinica, Shanghai 201800)*

**ABSTRACT** The abilities of scavenging active oxygen species,  $O_2^{\cdot-}$  and  $OH^{\cdot}$ , by tea polyphenols and quercetin have been studied by chemiluminescence, ESR and pulse radiolysis. Tea polyphenols and quercetin are all phenolic antioxidants. The synergistic studies show that both tea polyphenols and quercetin are strong free radical scavengers. Tea polyphenols are better than quercetin. The results from CL studies are in good accord with those from ESR and PR studies.

**KEYWORDS** Tea polyphenols, Quercetin, Free radical scavenger, Chemiluminescence(CL), Electron spin resonance(ESR), Pulse radiolysis(PR)