

chondrial calcium ATPase and calcium uptake in selected rat tissues. *Life Sci* 1985; **36**: 427-33.

7 Dowben RM. Contractility with special reference to skeletal muscle. In: Mountcastle VB, editor. *Medical physiology*; vol 1. 14th ed. London: C V Mosby Co, 1980; 82-119.

8 Mannherz HG, Goody RS. Proteins of contractile systems. *Annu Rev Biochem* 1976; **45**: 427-65.

9 Xiong ZG, Sun JJ. Effects of *Panax notoginseng* saponin Rb₁ and Rg₁ on myocardial action potential and slow inward current. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 520-2.

(桂林医学院病理生理教研室, 桂林 541001, 中国)

A 摘要 三七总皂甙 (PNS) 能抑制心肌总 ATP 酶活力, 但对 Na⁺-K⁺-ATP 酶无明显影响。三七皂甙单体 Rb₁ 及 Rg₁ 对心肌总 ATP 酶活力均有抑制作用, 但 Rb₁ 的抑制效力显著大于 Rg₁。Rb₁ 能抑制豚鼠离体心房肌的自律性和收缩性。Rg₁ 也能抑制豚鼠离体心房肌的自律性, 但对心房肌的收缩性却无明显影响。
提示 PNS 抑制心肌收缩力 这一作用的主要有效成份是 Rb₁。

关键词 人参; 皂甙类; 钠-钾-交换腺苷三磷酸酶; 腺苷三磷酸酶; 心肌收缩; 心房

347-350

三七皂甙对心肌腺苷三磷酸酶的影响

陈吉球, 张月光, 李胜联, 曹青, 容明智

R 965.2

350-353

(-)-EGCG

自由基

活性氧

16

(一)表没食子儿茶素没食子酸酯对活性氧自由基的清除作用机制¹

杨贤强, 沈生荣 (浙江农业大学茶学系茶叶生物化学教研室, 杭州310029, 中国)

侯京武, 赵保路, 忻文娟 (中国科学院生物物理研究所, 北京100101, 中国)

R 966

Mechanism of scavenging effects of (-)-epigallocatechin gallate on active oxygen free radicals¹

YANG Xian-Qiang, SHEN Sheng-Rong (Division of Tea Biochemistry, Department of Tea Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China)

HOU Jing-Wu, ZHAO Bao-Lu, XIN Wen-Juan (Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

ABSTRACT The concentration of 50% scavenging ratio (SC₅₀) and the scavenging rate constants (*k*) and stoichiometric factor (*n*)

were determined when (-)-epigallocatechin gallate [(-)-EGCG] scavenging superoxide anion free radical (O₂⁻) and hydroxyl radical (·OH). The mechanism of scavenging active free radicals of (-)-EGCG and the promotion of (-)-EGCG free radical and its structure were analyzed *in vitro*. Our results suggest that the centers of scavenging reaction of (-)-EGCG are B, D, and A cycles, and each (-)-EGCG traps six O₂⁻ or ·OH. It is in accord with the value of stoichiometric factor *n* = 6.

KEY WORDS (-)-epigallocatechin; electron spin resonance; chemiluminescence; free radical scavengers

Received 1991-12-27

Accepted 1993-09-03

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 38970239.

A 摘要 本文研究了(-)表没食子儿茶素没食子

酸酯[(-)-EGCG]清除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的半数清除率 SC_{50} 、清除速率常数 k 和清除反应的化学计量因子 n 。用体外模型分析了药物对活性氧自由基的清除机制和 (-)-EGCG 自由基的启动及结构特点, 推论药物的清除反应中心为 B、D 和 A 环, 每分子药物可捕捉 6 个 O_2^- 或 $\cdot OH$, 与化学计量因子 $n=6$ 相符。

关键词 (-) 表没食子儿茶素没食子酸酯; 电子自旋共振; 化学发光; 自由基清除剂

(-) 表没食子儿茶素没食子酸酯 [(-)-EGCG] (见 Fig 1), 是一种从茶叶 (*Camellia sinensis* L) 中提取的天然多酚类化合物, 占茶叶干物质的 5—10%, 具有很强的清除自由基能力, 比 V_E 和 V_C 强^[1], 同时有抗衰老、抗辐射、抗肿瘤等功效。本文用电子自旋共振 (ESR) 自旋捕集技术研究了 (-)-EGCG 清除活性氧自由基的特性, 用体外模型分析了 (-)-EGCG 的清除机制, 并用化学发光法测定了清除速率常数 k 与清除反应的化学计量因子 n , 以探讨 (-)-EGCG 药理作用机制。

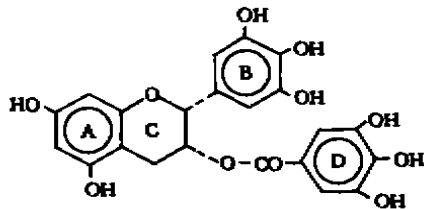


Fig 1. (-)-epigallocatechin gallate (EGCG).

MATERIALS AND METHODS

5,5'-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO), xanthineoxidase, luminol 均为 Sigma 产品, DMPO 经活性炭处理后, ESR 检测无杂质信号, luminol 用 Me_2SO 配成 $1\text{ mmol}\cdot L^{-1}$ 的储备液, 使用前以 Hank's 液稀释, 其余试剂均为国产 AR 级。(-)-epigallocatechin gallate [(-)-EGCG] 的制备按文献^[2]法。

O_2^- 和 $\cdot OH$ 的测定 用黄嘌呤(X)/黄嘌呤氧化酶

(XO) 体系产生 O_2^- , Fenton 反应产生 $\cdot OH$, 在这两体系内加入药物, 并用不加药物作对照, 药物混匀后, 吸入石英谐振腔, 1.5 min 后描记 ESR 谱。(-)-EGCG 的清除作用以半数清除率 (SC_{50}) 表征^[4]。

波谱仪为日本 JEOL FE1X 电子顺磁共振仪。测定条件: 微波功率 20 mW, X 波段, 调制幅度 0.1 mT, 时间常数 0.1 s, 中心磁场 324.5 mT, 温度 25 $^{\circ}C$ 。

化学发光仪为北京第二光学仪器厂生产的 WDD-1 型, 测定 $\cdot OH$ 电压为 600 V, 测定 O_2^- 电压为 800 V, 操作方法见文献^[5]。

清除速率常数 k 和化学计量因子 n 的测定 k 和 n 按照文献^[3,6]所述方法进行测定计算。

体外 (-)-EGCG 自由基的启动及其结构特性 在 pH 12.0 的缓冲溶液中, 加入 $218\ \mu\text{mol}\cdot L^{-1}$ 的 (-)-EGCG 和 DMPO, 吸入石英谐振腔, 2 min 内描记 ESR 谱, 由所得波谱计算出超精细分裂常数。

RESULTS AND DISCUSSION

1 (-)-EGCG 对 O_2^- 、 $\cdot OH$ 的清除作用 用 X/XO 体系产生 O_2^- ^[4], Fenton 反应产生 $\cdot OH$ ^[4], (-)-EGCG 对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的最大清除率分别可达 98% 和 99%^[1]。清除率随浓度增加而升高, 清除率 Y 与浓度 X 之间的常用对数线性回归式分别为: $\hat{Y}_{(O_2^-)} = 22.87\lg X_{(O_2^-)} + 43.68$, $r=0.989$, $n=6$ ($X_{(O_2^-)} < 10\ \mu\text{mol}\cdot L^{-1}$) 和 $\hat{Y}_{(\cdot OH)} = 77.52\lg X_{(\cdot OH)} - 127.87$, $r=0.975$, $n=5$ ($X_{(\cdot OH)} < 200\ \mu\text{mol}\cdot L^{-1}$) 由方程计算 (-)-EGCG 对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的半数清除率 SC_{50} 分别为 1.89 和 $197\ \mu\text{mol}\cdot L^{-1}$, 而用相同条件同时测得抗坏血酸的 SC_{50} 分别为 7.4 和 $500\ \mu\text{mol}\cdot L^{-1}$, 分别比 (-)-EGCG 大 3.9 和 2.5 倍, 表明 (-)-EGCG 清除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的能力大于抗坏血酸。

2 清除率随时间的变化 清除率与时间的关系, 是表征清除能力的重要参数, (-)-EGCG 清除 O_2^- 时有较稳定的清除率, 而清除 $\cdot OH$ 时, 随时间先增加后迅速下降 (Fig 2)。因此 (-)-EGCG 作为 $\cdot OH$ 的清除剂时, 必须注意观察时间, 只有在 1 min 左右和 218

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,才有较高的清除率。

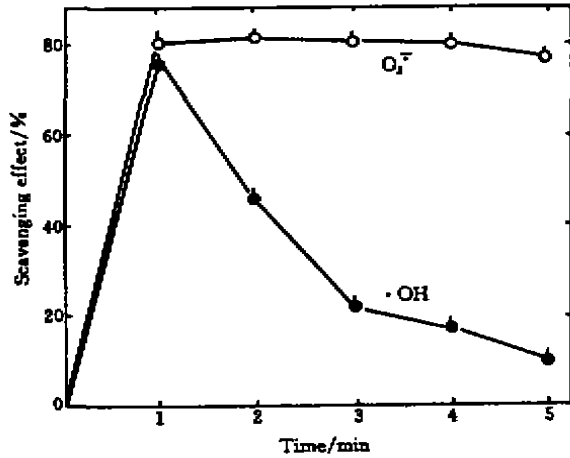
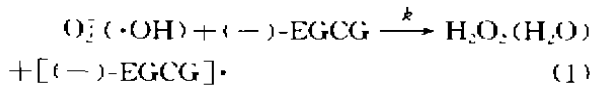


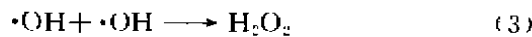
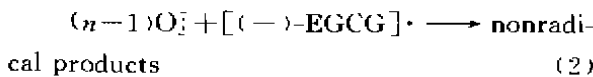
Fig 2. Scavenging effect of (-)-EGCG $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ on $\text{O}_2^{\cdot-}$ (○) and $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ on $\cdot\text{OH}$ (●). $n=5, \bar{x}\pm s$.

3 清除反应的清除速率常数和化学计量因子 (-)-EGCG 与活性氧自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$) 的反应过程可用下式表示:

链抑制



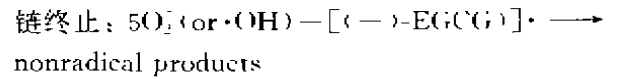
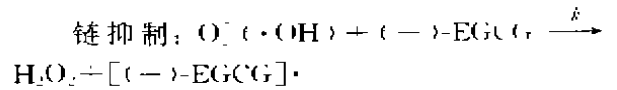
链终止



常数 n 为 (-)-EGCG 的化学计量因子, 在 (-)-EGCG 存在下, 链终止主要通过反应 (1) 和 (2), 而不是反应 (3) 或 (4) 进行的。

本研究用化学发光法测得 (-)-EGCG 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的速率常数 k 分别为 7.71×10^8 和 $3.52 \times 10^{11} \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 化学计量因子 n 分别为 5.98 和 6.23, 表明每个 (-)-EGCG 分子能捕获 6 个 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 或 $\cdot\text{OH}$, 且清除速率 $\cdot\text{OH}$ 大于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。

水溶液均相体系中 (-)-EGCG 清除活性氧的反应可用下式表示:



本文首次报道了 (-)-EGCG 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的 k , n 和 SC_{50} , 这对于探讨 (-)-EGCG 抗氧化机制是极其重要的。此外, 由清除反应速率常数可知, 被清除的自由基活性越高, 清除反应越易进行, 反之则进行缓慢。但是 (-)-EGCG 清除 $\cdot\text{OH}$ 的清除率只有在 $218\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 min 左右方可达到较好值 (Fig 2), 这可能与 $\cdot\text{OH}$ 诱导 (-)-EGCG 的助氧化作用有关。

4 (-)-EGCG 自由基的启动及结构特点

通常, 自由基清除剂在清除自由基后本身会变成自由基, 我们曾试图在 X/XO 体系和 Fenton 反应中检测 (-)-EGCG 自由基, 但是由于生成的 (-)-EGCG 自由基浓度低, 寿命短, 结果无法检测到。为了证实 (-)-EGCG 自由基的存在, 将 (-)-EGCG 加入碱性水溶液 (pH 12.0) 中, 并用 DMPO 捕捉, ESR 检测, 发现 (-)-EGCG 也能产生自由基。

Fig 3 是 (-)-EGCG 自由基的 ESR 信号, 超精细分裂常数 $\alpha_{\text{H}_1} = 0.528 \text{ mT}$, $\alpha_{\text{H}_2} = 0.322 \text{ mT}$ 和 $\alpha_{\text{H}_3} = 0.183 \text{ mT}$ 。由图可以看出, 主要有三重谱线, 说明每分子 (-)-EGCG 有三种可能被自由基抽提的氢原子。

设想 (-)-EGCG 自由基的结构 (Fig 4), 表明在 B 和 D 环上最多能捕捉 4 个自由基, 由于 (-)-EGCG 与 (+)-catechin 的差别主要在 B 环和 D 环上, 已知 (+)-catechin 自由基能在碱性溶液中分裂出两条谱线, $\alpha_{\text{H}_1} = 0.185 \text{ mT}$, $\alpha_{\text{H}_2} = 0.020 \text{ mT}$, 表明 (+)-catechin 能在 A 环捕获自由基¹⁵, 可以推论, 每分子 (-)-EGCG 可以在 A 环和 B, D 环上分别捕获 2 个自由基, 这与本试验得到的化学计量因子 $n=6$ 是一致的。

赵保路等¹⁶ 曾用分子轨道理论 MNDO 法

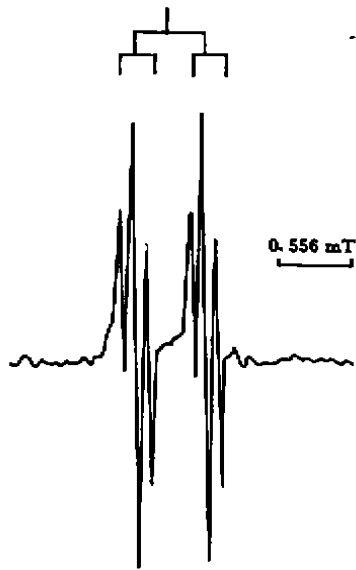


Fig 3. ESR spectra of (-)-EGCG radical in an alkaline solution. Autoxidation condition: (-)-EGCG 218 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in pH 12.0 buffer at $25\pm 1^\circ\text{C}$.

计算了(+)-catechin 的反应中心, 得出产生物 A 环活性大于 B 环, 与上述实验结果相符, 但对于(-)-EGCG, 从以上结果看到, 清除自由基的反应活性应位于 A 环, B 环和 D 环上, (-)-EGCG 捕获自由基的能力比(+)-catechin 大3倍。

REFERENCES

- 1 Shen SR, Yang XQ, Zhao BL, Xin WJ. Scavenging effects of tea polyphenol compound and (-)-EGCG on oxygen free radicals. *J Tea Sci* 1992; **12**: 59-64.
- 2 Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of Vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*.

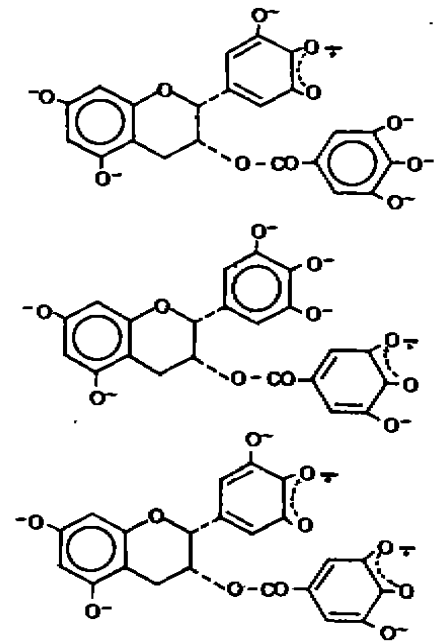


Fig 4. Suggested structures of (-)-EGCG radical formed in an alkaline solution.

- 3 Suzuki N, Mizumoto I, Taya Y, Nonato T, Meshiko S, Juaba H. Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: A Stern-Volmer quenching experiment with luminol, superoxide dismutase, and *Cypripedium* luciferin analogues. *Agric Biol Chem* 1990; **54**: 2783-7.
- 4 Li XJ, Zhao BL, Zhang TM, Xin WJ. Scavenging effects of probucol on active oxygen free radicals by electron spin resonance. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 443-7.
- 5 Ariga T, Hamano M. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from Azuki beans to peroxy radicals. *Agric Biol Chem* 1990; **54**: 2499-504.
- 6 Zhao BL, Liu SL, Chen YS, Xin WJ. Scavenging effect of catechun on free radicals studied by molecular orbital calculation. *Acta Pharmacol Sin* 1992; **13**: 9-13.