

植物中的多酚物质对超氧化物自由基的清除作用

罗广华 王爱国

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要

芒果、番石榴、松、龙眼等叶片和绿茶中含有 O_2^- (超氧化物自由基)的非酶促清除剂,仅0.5-1mg鲜重或0.29mg茶叶就相当一个SOD酶单位作用,热处理不能降低清除 O_2^- 的能力。用显示酚类物质的喷洒剂($AgNO_3-NH_4OH$)和显示SOD同工酶带的NBT法对电泳后的凝胶分别染色处理,对比显示结果,表明酚类物质与SOD活性物质有相似的电泳行为,叶片中的酚类物质可能为非酶促清除 O_2^- 的组份。人工合成的酚类化合物(对硝基酚、间苯二酚、愈创木酚)和从植物中分离的鞣酸等,在体外均能有效地清除 O_2^- 。

关键词: 超氧化物歧化酶; 超氧化物自由基; 清除作用; 酚类物质

超氧化物歧化酶(SOD, EC1, 15, 1, 1)是细胞的一种保护酶,它专一地歧化 O_2^- (超氧化物自由基), $O_2^- \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$ 。但是,是否在植物体中只有SOD才能清除 O_2^- 呢?

我们进行食用植物SOD资源调查^[5]时,用NBT法测定植物粗提取液的SOD活性,发现某些植物器官的SOD活性很高,但是,显示其SOD同工酶,却没有可辨认的酶带,我们对此矛盾的事实进行了研究。

实验表明,除了SOD之外,在某些植物中还有一类非酶的物质,它们亦能有效地清除 O_2^- 。酚类是非酶清除剂中的一种,它的酚羟基具有强的供电子能力,能以单电子转移的方式清除 O_2^- 或其它自由基,本身则成为酚羟自由基,新的自由基在链增殖方面是非活性的,它们可由旁支反应而消除^[6]。酚类物质清除 O_2^- 的研究,将为具有自由基清除剂作用的药物和保健食品提供了多种来源^[7]。

材料与方法

植物材料 芒果 *Mangifera indica*、番石榴 *Psidium guajava*、马尾松 *Pinus massoniana*、日本花柏 *Chamaecyparis pisiifera*、龙眼 *Dimocarpus longan*、橄榄 *Canarium album*、蒲桃 *Syzygium jambos*、柠檬桉 *Eucalyptus citriodora*、大豆 *Glycine max* 等在本所路边、坡地等新鲜采集;绿茶(龙井)市售;牛血SOD购自Sigma公司。

植物粗提取液 鲜叶去脉,加适量pH7.8, 0.05mol/L磷酸缓冲液,冷冻剪碎,研磨,1000xg离心10min,清液为粗提取液。

清除 O_2^- 能力的测定 SOD能歧化 O_2^- (由核黄素在光照下产生),抑制NBT(氯代硝基四唑氮蓝)光化还原。抑制NBT光化还原50%的酶量为一个酶单位^[1]。植物粗提取液清除 O_2^- 的能力,

以相当一个SOD酶单位的重量表示。

SOD同工酶显示 用NBT负染法,方法同前^[4]。

凝胶板中植物多酚的显示 利用纸色谱及薄层色谱的喷洒显色剂 $\text{AgNO}_3 - \text{NH}_4\text{OH}$ ^[2], 浸泡电泳后的聚丙烯酰胺凝胶板, 15min后, 生成褐黑色, 表明此处有酚类物质。

实验结果

一、植物粗提取液对 O_2^- 的作用

某些植物如: 芒果、番石榴、马尾松、龙眼、橄榄、蒲桃、柠檬桉等的叶片粗提取液和绿茶(龙井)的开水冲泡液, 在体外清除 O_2^- 的能力很强, 0.5-1mg鲜叶或0.29mg茶叶有相当一个SOD酶单位的作用, 并且经100℃, 1h热处理后, 对 O_2^- 的清除能力维持不变(表1)。用凝胶电泳和活性染色的方法显示SOD同工酶, 加热前后样品的电泳行为一致, 均在凝胶板的前沿附近有一块明亮的活性斑, 以及在原点至前沿之间展现了一大片的SOD活性区(图1:3, 6), 但是, 没有出现迁移率不同的酶谱。这种清除 O_2^- 的能力不因热变性而丧失, 是一种非酶促的作用。另一类植物器官, 如: 大豆叶片或胚轴的提取液, 对 O_2^- 清除能力较低, 2-5mg鲜重有相当一个SOD酶单位的作用, 它们有七条清晰的SOD同工酶带(图1:1), 但是, 经100℃, 1h热处理后, 清除 O_2^- 的能力和SOD同工酶带基本消失(图1:4)。纯化的牛血SOD对 O_2^- 有强的清除能力, 仅0.5 μg 就相当一个SOD酶单位, 经热处理后, SOD的活性和同工酶带全部消失(图1:5)。大豆提取液和牛血SOD的SOD活性与芒果叶

表1 热处理对植物粗提取液清除 O_2^- 的影响

Table 1 Effect of heat treatment on the scavenging capacity for superoxide anion in plant rude extract

材料 Materials	相当一个SOD酶单位的鲜重(mg) F.W. corresponding to one SOD unit		SOD同工酶(酶带数) SOD isoenzyme bands	
	热处理前 Before heating	热处理后 After heating	热处理前 Before heating	热处理后 After heating
	芒果 (Mango)	0.54	0.56	0
番石榴 (Guava)	0.56	0.55	0	0
柏 (Cypress)	1.06	0.94	0	0
松 (Pine)	0.56	0.58	0	0
龙眼 (Longan)	0.48	0.46	0	0
榄 (White canary tree)	0.52	0.51	0	0
蒲桃 (Roseapple)	0.44	0.43	0	0
桉 (Eucalyptus)	0.48	0.51	0	0
绿茶 (Green tea)	0.29(DW)	0.29	0	0
大豆绿叶 (Soybean leaves)	2.15	失活 (inactivation)	7	0
大豆胚轴 (Soybean embryonal axis)	5.00	失活 (inactivation)	7	0
牛血SOD (SOD from bovine blood)	0.5 μg (D.W)	失活 (inactivation)	1	0

片提取液中的不同, 它们有清晰的, 不同迁移率的酶带, 并且样品经热处理后, 由于蛋白质的热变性, 清除 O_2^- 的能力基本消失, 它们对 O_2^- 的清除是一种酶促的作用。

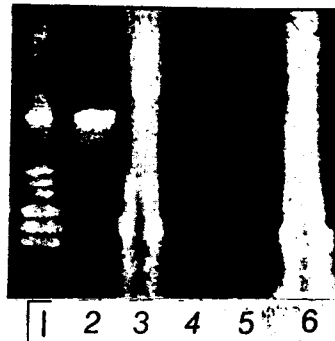


图1 热处理对 SOD 同工酶的影响

Fig.1 Effect of heat treatment on SOD isoenzyme

1,4. 大豆叶提取液; 2,5. 牛血 SOD; 3,6. 芒果叶提取液; 1-3. 热处理前; 4-6. 热处理后

1,4. Extract from soybean leaves; 2,5. SOD from bovine blood; 3,6. Extract from mango leaves;

1-3. Before heating; 4-6. After heating.

二、植物多酚对 O_2^- 的清除

大豆和芒果叶片的粗提取液以及纯化牛血 SOD 作聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后用喷洒显色剂 ($AgNO_3-NH_4OH$) 显示酚类物质在凝胶板中的位置, 从图 2 可见, 加大豆提取液和牛血 SOD 的位置没有显色(图 2: 4,5); 而在加芒果叶片提取液的相对位置上有显示酚类存在的黑褐色, 而且黑褐色的图形和迁移率与 SOD 活性区的位置相似(图 2:3,6), 表明酚类物质与类 SOD 活性物质有相似的电泳行为。由此推测, 类 SOD 活性物质可能是植物次生代谢产物—多酚。凝胶前沿附近深黑褐斑是分子量较小或带负电较强的酚类; 而成片的黑褐区, 是分子量较大或带负电较弱的多酚—蛋白质。多酚与蛋白质结合的方式是多种的, 既可通过单电子转移又可以通过氢键、疏水键、离子键、共价键与蛋白质进行多点结合, 产生交联, 成为形形色色的、分子量大小不等的植物多酚—蛋白质, 而表现出不同的迁移率, 显示出类 SOD 活性的可能是部分未结合的酚羟基。因此, 在实验室中制备 SOD 提取液时, 往往加入能吸附酚类的 PVP 或 PVPP, 就是为了除去植物中类 SOD 组份—酚类物质的干扰, 将类 SOD 和真正的 SOD 分开^[6]。

除了上述的芒果叶片和绿茶等之外, 我们在实验中发现, 植物广泛存在不是 SOD, 但是有 SOD 类似作用(清除 O_2^-) 的物质, 如: 槟榔、刺梨、沙棘、橄榄、番石榴、余甘子等果汁中含类 SOD 组份极其丰富。

三、酚类化合物对 O_2^- 的清除

植物多酚包括酚类、单宁、木质素、黄酮类等, 总数在几千种以上^[9]。我们以普遍存在于植物中, 而

经人工合成的间苯二酚、对硝基酚、愈创木酚、没食子酸丙酯以及从植物中分离的鞣酸,进行体外清除 O_2^- 的模拟试验,结果表明,它们对 O_2^- 有很强的清除能力,其中愈创木酚和鞣酸仅 $0.12\mu\text{mol}$ 就相当一个 SOD 酶单位的作用(表 2)。

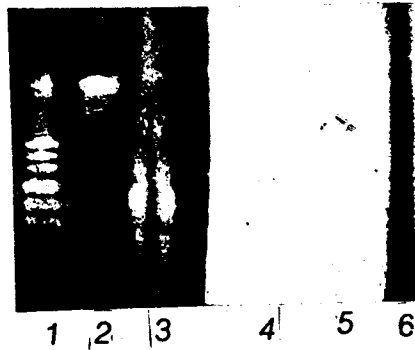


图 2 芒果叶中的 SOD 活性与酚类物质

Fig.2 SOD activity and phenolic compounds in mango leaves

1,4. 大豆叶提取液; 2,5. 牛血 SOD; 3,6. 芒果叶提取液; 1-3. SOD 活性染色; 4-6. 植物多酚染色
1,4 Extract from soybean leaves; 2,5. SOD from bovine blood; 3,6. Extract from mango leaves;
1-3. SOD activity dyeing; 4-6. Phenolic compounds dyeing.

表 2 几种化合物对 O_2^- 的清除能力

Table 2 The capacity for scavenging O_2^- by some organic compounds

化合物 Compounds	相当于一个 SOD 酶单位的量 (μmol) Amount corresponding to one SOD unit
间苯二酚 (Resorcinol)	3.10
对硝基酚 (P-nitrophenol)	0.65
对苯二酚 (P-dihydroxybenzene)	0.35
愈创木酚 (Guaiacol)	0.12
没食子酸丙酯 (Propyl gallate)	0.31
鞣酸 (Digallic acid)	0.12

近来,由于自由基生物学的兴起,不少研究者认为:人体疾病、生物衰老、逆境伤害与 O_2^- 密切相关,因此,很注重体内 O_2^- 的清除。植物多酚具有强的抗氧化作用及阻断自由基反应链的能力,已引起了医学界的广泛兴趣,并且,用 ESR 技术取得了直接证据,在临床应用获得成功^[7]。但是,有机合成的抗氧化剂有一定的毒性,寻找高效无毒的抗氧化剂应用于医药和保健食品是很重要的,目前主要是着重天然的,小分子的提取物。中草药和食物中抗氧化剂的研究,具有我国的特色并且有着广阔的应用前景。

参考文献

- 1 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 1983; 9(1):77-84
- 2 孙达旺. 植物单宁化学. 北京: 中国林业出版社, 1992
- 3 陈考泉. 植物化学分类学. 北京: 高等教育出版社, 1990
- 4 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 同工酶的凝胶电泳及活性显示. 植物生理学通讯, 1983; (6):44-45
- 5 罗广华, 王爱国, 吴航等. 华南食用植物的 SOD 资源. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1993; 9:69-80
- 6 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 同工酶活性显示的某些干扰. 植物生理学通讯, 1993, 29(2):119-122
- 7 王伟, 卢基贵, 陈文为等. 几种含酚羟基化合物抑制自由基损伤的实验. 第三届全国自由基生物学与自由基药化学学术会议论文摘要汇编, 中国生物物理学会自由基生物学与医学专业委员会, 厦门, 1991: 107

THE SCAVENGING EFFECT OF PLANT POLYPHENOLICS ON SUPEROXIDE RADICALS

Luo Guanghua Wang Aiguo

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract

The non-enzymic scavenger for superoxide radicals (O_2^-) was found in leaves of some plants, such as mango (*Mangifera indica*), guava (*Psidium guajava*), pine (*Pinus massoniana*) and green tea. The equivalent scavenging capacity for one unit of SOD activity in these plants was 0.5mg to 1.0mg of fresh weight or 0.29mg of dry tea. Heat treatment of the crude extract could not reduce the scavenging effect. Similar patterns on PAGE-electrophoretogram were identified either by normal NBT-SOD test or phenolic reagent ($AgNO_3-NH_4OH$), it indicated that phenolic compounds might be one of the main components with non-enzymic scavenging effect on O_2^- . Moreover, some synthesized phenolics (guaiacol, propyl gallate, p-nitrophenol) and plant digallic acid could also scavenge the O_2^- in vitro.

Key words: Superoxide dismutase; Superoxide radicals; Scavenging effect;
Phenolic compounds