

# 仙茅苷对自由基的清除作用

吴琼<sup>a</sup>,程小卫<sup>a</sup>,雷光青<sup>a</sup>,陈士明<sup>b</sup>,陈家宽<sup>a</sup>,周铜水<sup>a\*</sup> (1.复旦大学 a.生命科学学院天然药物研究中心; b.分析测试中心,上海200433)

**摘要:**目的 研究仙茅 (*Curculigo orchioides* Gaertn.) 主要成分仙茅苷 (curculigoside) 对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用。方法 分别采用比色法及电子顺磁共振技术 (ESR) 测定仙茅苷对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除效果。结果 仙茅苷对羟自由基和超氧阴离子自由基均有良好的清除作用,其清除率略低于茶多酚。结论 仙茅苷对自由基具有明显的清除作用,是一种有效的天然抗氧化剂。

**关键词:**仙茅;仙茅苷;羟自由基;超氧阴离子自由基;清除作用

中图分类号: R282.71.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)01-0006-04

## Effect of Curculigoside on Free Radical Scavenging

WU Qiong<sup>a</sup>, CHENG Xiao-wei<sup>a</sup>, LEI Guang-qing<sup>a</sup>, CHEN Shi-ming<sup>b</sup>, CHEN Jia-kuan<sup>a</sup>, ZHOU Tong-shu<sup>a\*</sup> (a. Research Center of Natural Medicine, School of Life Sciences; b. Research Center of Analysis and Measurement, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the scavenging effects of curculigoside, a main compound isolated from *Curculigo orchioides* Gaertn., on hydroxyl and superoxide anion radicals. **METHODS** Colorimetric method and electron spin resonance (ESR) technique were applied, respectively, to determine the radical clearance ratio of curculigoside on hydroxyl and superoxide anion radicals. **RESULTS** As the data showed, curculigoside exhibited effective antioxidant activities on both hydroxyl and superoxide anion radicals, but the radical scavenging ratios were slightly lower than those of (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG). **CONCLUSION** Curculigoside has the capability to scavenge radicals and serves as one of the active natural antioxidants.

**KEY WORDS:** *Curculigo orchioides*; curculigoside; hydroxyl radicals; superoxide anion radicals; scavenging activities

氧自由基 (Reactive Oxygen Species) 是一类具有高度活性的粒子,能氧化许多重要的生物分子,如蛋白质、脂肪、去氧核糖核酸 (DNA) 等,与人体自然衰老及许多疾病如癌症、心脑血管疾病等有着密切的关系。抗氧化剂能显著性地延缓或抑制氧化损伤,对机体产生保护作用,因此越来越受到人们的关注。抗氧化作用的研究方法除了传统的化学比色法以外,电子顺磁共振 (ESR) 是最直接最有效的方法和技术<sup>[1]</sup>。

仙茅是仙茅科仙茅属植物仙茅 (*Curculigo orchioides* Gaertn.) 的干燥根茎,具有补肾阳,强筋骨,祛寒湿等功效<sup>[2]</sup>。现代植物化学研究揭示仙茅中含有仙茅苷 (curculigo-

side)、仙茅苷 B-C (curculigoside B-C)<sup>[3]</sup>、仙茅皂苷 A-M (curculigosaponins, A-M)<sup>[4]</sup>、苔黑酚葡萄糖苷 (orcinol glucoside)<sup>[5]</sup> 等成分。其中,仙茅苷能增强巨噬细胞的吞噬活性<sup>[6]</sup>,被认为是仙茅的主要活性成分。Venukum ar 等<sup>[7]</sup> 报道仙茅的甲醇提取物具有很强的保肝作用,并提示该作用可能是其抗氧化作用的结果。但仙茅的抗氧化作用及其活性成分,迄今未见报道。本实验采用化学比色法及电子顺磁共振 (ESR) 技术,对仙茅苷的清除自由基作用进行了研究。

### 1 仪器与试剂

UV - 260 型分光光度计 (Shimadzu), 电子天平 (Sartorius), PHB - 3 型酸度计 (Sanxin), ER200D - SRC 型电子顺磁

作者简介:吴琼,女,复旦大学生命科学学院生物学专业 02 级硕士研究生

\* 通讯作者:周铜水, Tel: (021) 65642206, Fax: (021) 65642206, E-mail: tzhou@fudan.edu.cn

共振仪, ER4111 - VT变温装置 (Bruker)。

黄嘌呤 (X)、黄嘌呤氧化酶 (XO)、5, 5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 和茶多酚 (EGCG) 购自美国 Sigma 公司, 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 等试剂均为国产分析纯。

实验所用的仙茅苷由本实验室从仙茅 (*Curculigo orchoides* Gaertn.) 的根茎中分离, 其化学结构经质谱、碳谱、紫外光谱和红外光谱确定无误, HPLC 法测定纯度在 95% 以上。

## 2 方法与结果

### 2.1 比色法

羟自由基的检测采用 Fenton 反应体系。Fenton 反应是产生羟基自由基最常用的反应, 是利用  $Fe^{2+}$  被  $H_2O_2$  氧化生成  $Fe^{3+}$ ,  $OH^-$  和  $\cdot OH$ 。反应所产生的  $\cdot OH$  可以与水杨酸反应生成 2, 3-二羟基苯甲酸, 在 510nm 处有最大吸收。测定方法根据贾之慎等<sup>[8]</sup>的方法进行。

超氧阴离子自由基的检测采用黄嘌呤 (X) 与黄嘌呤氧化酶 (XO) 反应体系, 所产生的超氧阴离子自由基可与 NBT 反应形成蓝色, 于 560nm 处测定吸收度<sup>[9]</sup>。

### 2.2 电子顺磁共振 (ESR) 技术

羟自由基的检测也采用 Fenton 反应体系。反应体系含 DMPO 90mmol/L,  $Na_2HPO_4/K_2HPO_4$  缓冲液 (pH 7.4) 20mmol/L,  $H_2O_2$  100mmol/L,  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O + DTPA$  混合液 300 $\mu$ mol/L, 各浓度梯度待测样品 60 $\mu$ L, 空白对照为 1% DMSO。操作时在试管中依次加入 DMPO 缓冲液、样品, 最后加  $Fe^{2+}$  引发反应, 5min 后进行 ESR 测定。ESR 操作参数: 扫场宽度 (SW) 100Gs, 中心磁场 (CF) 3470Gs, 微波频率 (SF) 9.76GHz, 测试温度 (TE) 297K, 调制频率 (MF) 100kHz, 调制幅度 (MA) 1Gs, 微波功率 (SP) 20mW, 时间常数 (TC) 0.1s, 扫场时间 (TI) 100s。

超氧阴离子自由基的检测采用 DMSO/NaOH 反应体系。在室温下, 将含有饱和空气的 DMSO 与  $H_2O$ 、NaOH 溶液定量混匀。NaOH 加入后产生  $O_2^-$  自由基, 立即计时, 反应 30min。测量前, 定量吸取反应液于直径 3mm 的玻璃样品管内, 在温度 130K 时进行 ESR 测定, 此时可检测到的  $O_2^-$  特征信号, 作为空白对照管。当检测样品与  $O_2^-$  作用时, 加入一定量的样品药液于产生  $O_2^-$  的模型体系中, 其他条件同前。ESR 操作参数: 扫场宽度 (SW) 300Gs, 中心磁场 (CF) 3360Gs, 微波频率 9.60GHz, 测试温度 (TE) 130K, 调制频率 (MF) 100kHz, 调制幅度 (MA) 5.0Gs, 微波功率 (SP) 20mW, 时间常数 (TC) 0.1s, 扫场时间 (TI) 100s。

### 2.3 自由基清除率的计算

自由基的抑制率 % =  $[(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

$IC_{50}$  值 (自由基清除率达 50% 的药物浓度) 通过线性回归得到; ESR 图使用 Origin6.0 软件重新绘制。

### 2.4 实验结果

比色法检测仙茅苷对 Fenton 反应体系产生的羟自由基及 X/XO 反应体系产生的超氧阴离子自由基的清除率及  $IC_{50}$  见表 1。结果显示, 不同浓度的仙茅苷对羟自由基均有

较好的清除作用, 在低浓度 (120 $\mu$ g/mL) 时, 其清除率为 31.2%, 低于同等浓度的 EGCG (45.1%); 在高浓度 (360 $\mu$ g/mL) 时, 其清除率为 61.0%, 优于同等浓度的 EGCG (53.9%), 其  $IC_{50}$  两者基本相当。仙茅苷对超氧阴离子自由基的清除作用, 无论从低浓度 (160 $\mu$ g/mL)、高浓度 (800 $\mu$ g/mL), 还是  $IC_{50}$  来看, 清除率均明显低于 EGCG。

表 1 比色法实验结果

Tab 1 Results of colorimetric assay

化合物	Fenton 反应 ( $\cdot OH$ )			X-XO 反应 ( $O_2^-$ )		
	终浓度 /( $\mu$ g/mL)	清除率 /%	$IC_{50}$ /( $\mu$ g/mL)	终浓度 /( $\mu$ g/mL)	清除率 /%	$IC_{50}$ /( $\mu$ g/mL)
仙茅苷	360.0	61.0		800.0	58.3	
	300.0	57.7		640.0	53.9	
	240.0	50.4	254.2	480.0	41.7	614.4
	180.0	40.6		320.0	35.8	
	120.0	31.2		160.0	23.3	
EGCG	360.0	53.9		800.0	88.8	
	300.0	52.0		640.0	77.6	
	240.0	49.6	250.3	480.0	70.2	243.7
	180.0	47.5		320.0	53.0	
	120.0	45.1		160.0	44.3	

羟自由基的 ESR 特征图谱及不同浓度的仙茅苷和 EGCG 的清除效果分别见图 1 和 2。超氧阴离子自由基的特征图谱及不同浓度仙茅苷和 EGCG 的清除效果分别见图 3 和 4。实验结果见表 2。结果表明仙茅苷对羟自由基和超氧阴离子自由基均有明显的清除作用, 其清除羟自由基和超氧阴离子自由基的  $IC_{50}$  分别为 296.9 $\mu$ g/mL 和 56.2 $\mu$ g/mL, 其清除效果略低于阳性对照 EGCG。

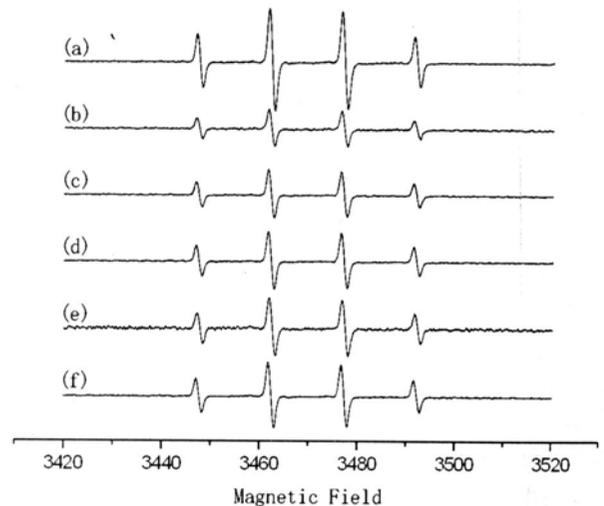


图 1 羟自由基的 ESR 特征图谱及不同浓度仙茅苷的清除效果

Fig 1 ESR spectrum of hydroxyl radicals and scavenging effects of different concentrations of curculigoside

a. 空白对照; b. 600.0 $\mu$ g/mL; c. 480.0 $\mu$ g/mL; d. 360.0 $\mu$ g/mL; e. 240.0 $\mu$ g/mL; f. 120.0 $\mu$ g/mL

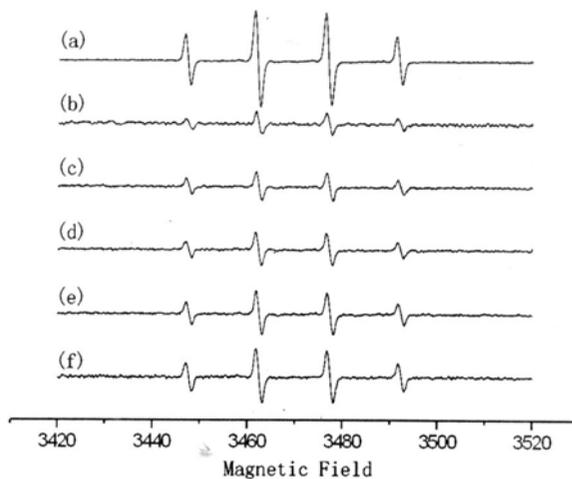


图 2 羟自由基的 ESR 特征图谱及不同浓度 EGCG 的清除效果

Fig 2 ESR spectrum of hydroxyl radicals and scavenging effects of different concentrations of EGCG

a. 空白对照; b. 600.0 μg/mL; c. 480.0 μg/mL; d. 360.0 μg/mL; e. 240.0 μg/mL; f. 120.0 μg/mL

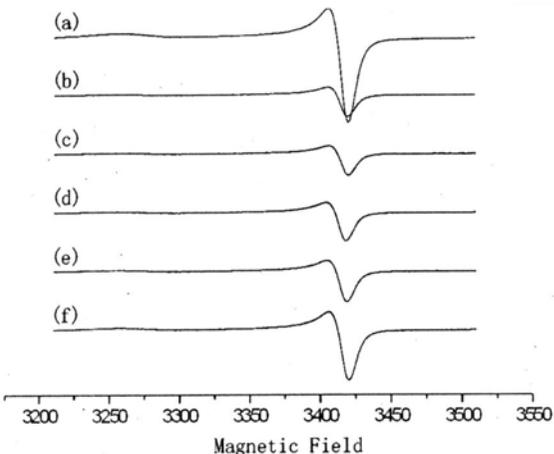


图 3 超氧阴离子自由基的 ESR 特征图谱及不同浓度仙茅苷的清除效果

Fig 3 ESR spectrum of superoxide anion radicals and scavenging effects of different concentrations of curculigoside

a. 空白对照; b. 150.0 μg/mL; c. 120.0 μg/mL; d. 90.0 μg/mL; e. 60.0 μg/mL; f. 30.0 μg/mL

#### 4 讨论

比色法及 ESR 法实验结果均显示,仙茅苷对羟自由基和超氧阴离子自由基均具有明显的清除作用,其清除效果均略低于阳性对照 EGCG。

自由基理论认为衰老是氧自由基过度反应的结果,有机体的新陈代谢速率越高,氧自由基的产生就越快,衰老过程就加快,清除自由基可起到延年益寿的作用<sup>[1]</sup>。仙茅是一种补肾壮阳的常用中药,具有抗衰老作用。以仙茅为主药的二仙胶囊可明显降低小鼠脑的脂褐质含量,肝脏的脂褐质也有下降趋势<sup>[10]</sup>。本实验表明仙茅苷具有明显的抗氧化活性,为仙茅的抗衰老作用提供了科学依据。

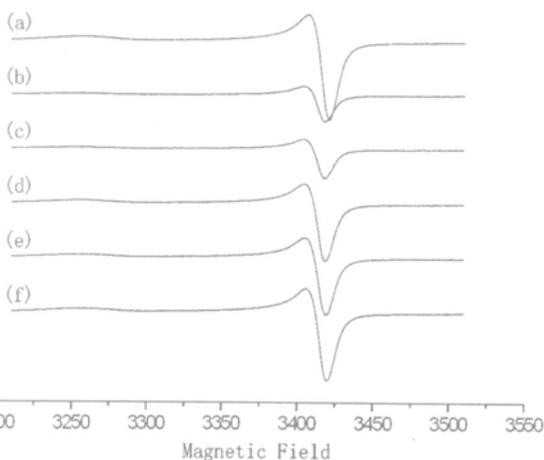


图 4 超氧阴离子自由基的 ESR 特征图谱及不同浓度 EGCG 的清除效果

Fig 4 ESR spectrum of superoxide anion radicals and scavenging effects of different concentrations of EGCG

a. 空白对照; b. 60.0 μg/mL; c. 48.0 μg/mL; d. 36.0 μg/mL; e. 24.0 μg/mL; f. 12.0 μg/mL

表 2 ESR 法实验结果

Tab 2 Results of ESR assay

化合物	ESR- $\cdot\cdot$ OH			ESR- $O_2^{\cdot-}$		
	终浓度 /(μg/mL)	清除率 /%	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)	终浓度 /(μg/mL)	清除率 /%	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)
仙茅苷	600.0	65.4		150.0	72.6	
	480.0	59.4		120.0	66.3	
	360.0	52.5	296.9	90.0	60.0	56.2
	240.0	48.1		60.0	52.6	
	120.0	40.6		30.0	41.4	
	60.0	32.2		15.0	31.2	
EGCG	600.0	85.1		60.0	77.9	
	480.0	72.5		48.0	62.1	
	360.0	61.4	196.1	36.0	44.7	39.8
	240.0	53.5		24.0	27.2	
	120.0	45.1		12.0	11.6	
	60.0	36.8		6.0	5.8	

本实验中,比色法与 ESR 法测得的 IC<sub>50</sub> 在数值上有所不同,原因在于这两种测量方法无论在灵敏度和特异性方面都有所差异。比色法作为间接测量自由基的化学方法,一般是测量氧自由基与某种物质化学反应的产物具有特定的光吸收,以此检测自由基。这种方法特异性不强。而 ESR 法是目前检测自由基最有效的方法,特异性和灵敏度都要高于比色法,实验结果也相对可靠一些。但两种实验方法得出的仙茅苷清除自由基的作用趋势和结论是一致的。

#### 参考文献

[1] ZHAO B L. Oxygen Radicals and Natural Antioxidants (氧自由基和天然抗氧化剂) [M]. Beijing: Science Press, 1999.

- [ 2 ] Ch. P(2000) Vol I (中国药典 2000年版.一部) [ S ]. 2000: 75.
- [ 3 ] FU D X, LEIG Q, CHENG X W, *et al.* Curculigoside C, a new phenolic glucoside from rhizomes of *Curculigo orchioides* [ J ]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2004, 46(5): 621-624.
- [ 4 ] XU J P, XU R S. Cycloartane-type saponins and their glycosides from *Curculigo orchioides* [ J ]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 2455-2458.
- [ 5 ] LI N, ZHAO Y X, JIA A Q, *et al.* Study on chemical constituents of *Curculigo orchioides* [ J ]. *Nat Prod R & S D & V*(天然产物研究与开发), 2003, 15(2): 208-211.
- [ 6 ] KUBO M, NAMBA K, NAGAMOTO N, *et al.* A new phenolic glucoside, Curculigoside from rhizomes of *Curculigo orchioides* [ J ]. *Planta Medica*, 1983, 47: 52-55.
- [ 7 ] VENUKUMAR M R, LATHA M S. Antioxidant activity of *Curculigo orchioides* in carbon tetrachloride induced hepatopathy in rats [ J ]. *Indian J Clin Bioch*, 2002, 17(2): 80-87.
- [ 8 ] JIA Z S, WU J M, TANG S C. Determination of hydroxyl radical in Fenton system by colorimetric method [ J ]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学和生物物理进展), 1996, 23(2): 184-186.
- [ 9 ] ZHAO W, WEI Y H, LUO X P, *et al.* A study on peroxy radical and hydroxy radical scavenging activity of propolis [ J ]. *J Northw Univ (Nat Sci Ed)* (西北大学学报-自然科学版), 2001, 32(2): 146-148.
- [ 10 ] HUANG Y L. Progress in research on *Curculigo orchioides* [ J ]. *J Chin Med Mater*(中药材). 2003, 26(3): 225-229.

收稿日期: 2006-04-20