

白首乌中 C_{21} 甾甙及甾甙元清除羟自由基的功能

宋俊梅 曹霖

(无锡轻工大学食品学院,无锡 214036)

摘要 用化学发光法研究了白首乌中 C_{21} 甾甙及各种甾甙元清除羟自由基的功能,并与具相同骨架的标准品及知名的羟自由基清除剂甘露醇进行了比较。结果表明, C_{21} 甾甙及甾甙元具有较强的清除羟自由基的能力; C_{21} 甾甙元的 C_3-OH 成甙与否并不从根本上影响其活性; C_{21} 甾甙元清除羟自由基的活性与母核上羟基取代的数目有关,而母核无清除作用。

关键词 白首乌; C_{21} 甾甙元;羟自由基;清除作用;化学发光法

中图分类号 R914.2

0 前 言

白首乌为祖国传统中药之一,药源主要来自萝藦科植物耳叶牛皮消 (*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)的块根。研究发现,白首乌有增强免疫功能、抗臭氧损伤、延缓衰老的作用,并认为其主要活性成分为 C_{21} 甾甙^[1]。根据衰老的自由基学说,引起和促进衰老的两类主要自由基即超氧阴离子自由基和羟自由基^[2]。而羟自由基(OH^\cdot)是活性最强的自由基^[3],它几乎能攻击和破坏活细胞的每一个分子,能缓慢引起敏感生物分子的严重损害。因此,鉴于主要活性成分为 C_{21} 甾甙的白首乌的抗老防衰的功能及羟自由基在衰老引发过程中所占的重要位置,作者首次对白首乌中 C_{21} 甾甙及各种甾甙元清除羟自由基的活性进行了探讨,并与知名的羟自由基清除剂甘露醇进行了比较,以客观估价其活性大小;同时与两种具相同骨架的标准品进行了比较,以研究其结构与活性的关系。

1 实验材料与仪器

1.1 材料

白首乌总甾甙、总甾甙元、告达庭 (caudatin)、开德甙元 (kidjolanin)均由本实验室从滨海首乌制品厂生产的首乌饮片中提取、分离、纯化制得。几种甙元均已经结构鉴定,其结构见图 1。孕甾烷 (pregnane)、孕甾烯醇酮 (pregnenolone)为美国 Sigma公司产品,结构见图 2。甘露醇为上海试剂二厂产品,化学纯。

收稿日期: 1997-09-09

第一作者: 宋俊梅,女,1964年 11月生,工学博士

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

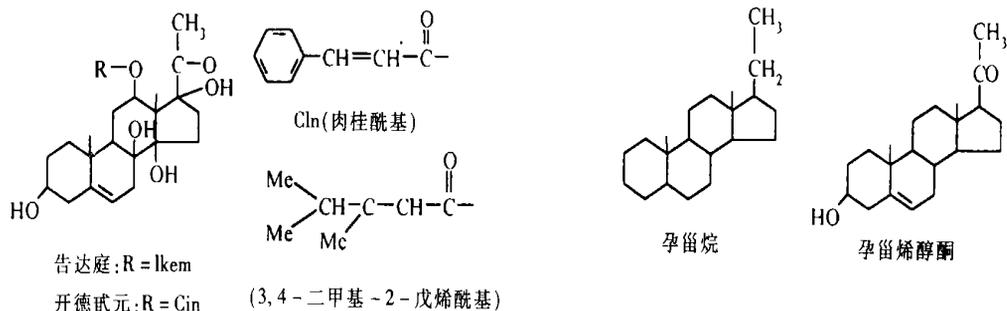
图 1 几种 C_{21} 甾元结构示意图

图 2 孕甾烷和孕甾烯醇酮的结构示意图

各样品先用少量 95% 的乙醇水浴加热溶解,再用蒸馏水配成一定浓度;用于测量发光强度的对照管的乙醇含量与样品管相同,以消除乙醇对发光体系的影响。

1.2 仪器

上海计量局与华东师大生物系合制的 SHG-1 型生物化学发光检测仪,高压 1 000 V,道宽 4 V,甄别电压 0.2 V。

2 实验方法 (清除羟自由基活性的测定)

用化学发光法检测白首乌清除羟自由基的作用^[4]。发光体系为抗坏血酸-硫酸铜-过氧化氢-酵母多糖体系 ($Vc-Cu^{2+}-H_2O_2$ -yeast)

1) 临用前用 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液分别配制 2 mmol/L 的抗坏血酸溶液、2 mmol/L 的硫酸铜溶液和 33.3 mmol/L 的过氧化氢溶液。以上试剂均为国产分析纯。

2) 称取适量干酵母粉(上海酵母厂产品),悬浮于 10 mmol/L 的磷酸钾缓冲液中,1 500 g 离心 10 min,弃上清液,如此清洗酵母两次,重新悬浮于 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液中,质量浓度为 75 mg/ml,水浴煮沸,冷却后使用。

3) 反应体系:向发光管中加入 200 μ l 抗坏血酸、400 μ l 硫酸铜、200 μ l 酵母和用 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液配制的样品液 600 μ l,上机测本底后,注入 600 μ l 的过氧化氢,快速混匀,启动发光反应,延迟 10 s 后,测出 15 s 的积分发光强度;反应体系最终体积为 2 mL。空白管用 600 μ l 的 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液代替。以峰值读数为准(记作 CP_{15})。

实验表明,随着样品浓度的增加,发光强度随之下降,即 CP_{15} 相应减少。以空白发光强度为 100%,计算加入各浓度梯度样品后发光的抑制率,即可求出抑制 50% 发光强度时的样品浓度,记作 IC_{50} 。以空白发光强度为 100%,测定各样品质量浓度均为 2 mg/ml 和浓度均为 5×10^{-6} mol/L 时对发光的抑制率,确定为相同浓度下各样品对 OH^\cdot 的抑制率。

3 实验结果

3.1 各样品清除羟自由基能力 IC_{50} 的测定结果

由表 1 可见,由总甾酸解去糖基成为总甾元,对 OH^\cdot 的 IC_{50} 有所降低,说明清除羟自由基的能力有所增加。但数据相差不是特别显著,可能与两者的分子大小不同有关,因为活性与结构是紧密相关的,因此活性与浓度的相关性比与质量浓度的相关性更强。

这一结果同时还表明了白首乌甾甙和甾甙元同样具有清除羟自由基的能力,其活性与成甙与否没有显著关系;孕甾烷没有清除羟自由基的活性;而孕甾烯醇酮和几种白首乌甾甙元却能够清除羟自由基,而且具有较强的活性。

表 1 各级提取物清除羟自由基活性的测定结果

		$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	
样 品	IC_{50} on OH^\cdot	样 品	IC_{50} on OH^\cdot
总甾甙	3.14	总甾元	2.89
告达庭	3.11	开德甾元	2.34
孕甾烷	—	孕甾烯醇酮	3.76
甘露醇	1.23		

3.2 相同浓度下几种化合物对 OH^\cdot 的抑制率

由表 2 可看出,相同质量浓度下各样品清除羟自由基活性的差别与相同浓度下的差别是不同的。

表 2 相同质量浓度和相同浓度下几种化合物对 OH^\cdot 的抑制率

		%			
样 品	2 mg /ml 时对 OH^\cdot 的抑制率	5×10^{-6} mol /L 时对 OH^\cdot 的抑制率	样 品	2 mg /ml 时对 OH^\cdot 的抑制率	5×10^{-6} mol /L 时对 OH^\cdot 的抑制率
告达庭	31	39	开德甾元	45	62
孕甾烷	0	0	孕甾烯醇酮	27	29
甘露醇	79	66			

4 讨 论

C_{21} 甾甙是主要存在于萝藦科植物中的一类化合物,因为具有免疫强化^[5]和抗肿瘤^[6]等作用而受到重视,萝藦科植物也因富含 C_{21} 甾甙而倍受关注。羟自由基是目前已知反应活性最强的自由基^[3],它几乎能攻击和破坏活细胞的每一个分子,能缓慢引起敏感生物分子的严重损害。细胞中的许多过程可以产生羟自由基,如吞噬作用,前列腺素生物合成,抗肿瘤药博来霉素和阿霉素的作用等。在 DNA 或其附近产生的羟自由基可导致 DNA 链的断裂。羟自由基还与致癌、突变、细胞毒等许多生物效应有关。羟自由基清除剂能降低羟自由基所造成的损害。因此研究 C_{21} 甾甙类物质清除羟自由基的活性是很有意义的。

由结果可知, C_{21} 甾甙与 C_{21} 甾甙元同样具有清除羟自由基的活性,因此可以说,虽然构成化合物生物活性的主要部分是甾元^[7],但 C_{21} 甾甙元的 $\text{C}_3 - \text{OH}$ 成甙与否并不从根本上影响其活性。

同一质量浓度与同一浓度下,几种样品的活性差别不同,说明活性与分子结构有关。因此,比较同一浓度下各化合物的活性并进行讨论。

1) 孕甾烷的基本骨架与所测几种甾元及孕甾烯醇酮均相同,只是无羟基,无不饱和键,故无清除自由基的能力,说明清除自由基活性与基本骨架上取代的羟基或不饱和键有关。

2) 孕甾烯醇酮与几种甾元比较,基本骨架相同,仅少 3 个游离取代羟基和一个酯基结构,但清除羟自由基的活性相比之下却弱得多,可能清除羟自由基的活性与羟基数目有关。

3) 告达庭与开德甾元的分子骨架和羟基数目相同,只是酯基不同,但两者的活性之间仍有较大的差别,说明活性可能还与分子的其它结构有关,在此主要应是 C_{12} 位羟基上所连酯基的影响。两者的酯基依次为 3,4-二甲基-2-戊烯酰基和肉桂酰基。告达庭与开德甾元比较,后者的活性显著高于前者,可能与分子的空间结构有关。告达庭的 3,4-二甲基-2-戊烯酰基由几个平面组成,空间位阻较大,因而可能对自由基与活性基团的接触有空间阻碍作用;而开德甾元的肉桂酰基却是平面结构,空间位阻小,对清除自由基反应无阻碍作用,因而表现出较强的清除自由基的能力。

4) 经过以上比较还可认为,母核无清除作用,羟基取代是 C_{21} 甾甙类化合物产生清除作用所必不可少的。这与黄酮类化合物清除羟自由基的活性相似^[8]。

5) 与知名的羟自由基清除剂甘露醇相比,几种甾元的抑制率均低于甘露醇,但开德甾元(62%)仅略低于甘露醇(66%),因此可以说, C_{21} 甾甙类是较强的羟自由基清除剂。有研究^[9]认为,云芝和灵芝两种中药均具有清除超氧阴离子自由基的作用,并认为这是其防癌和治癌的原因所在,因此 C_{21} 甾甙具有清除羟自由基的能力可能也与其增强免疫和抑制肿瘤的活性有关。

参 考 文 献

- 1 刘成娣, 龚树生. 抗衰老中药白首乌研究的进展. 北京中医学院学报, 1990, 13(1): 45~ 47
- 2 王永雁, 田清涿, 马瑾瑜. 人类衰老学. 上海: 上海医科大学出版社, 1995. 159
- 3 Okezie I Aruoma, Barry Halliwell. Free radicals and food additives. London: Talor & Francis Ltd, 1991. 38
- 4 陈季武, 胡天喜. 测定产生与清除 O_2^- 的化学发光体系. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2): 136~ 140
- 5 Keiji Wada, Koji Hayashi, Hiroshi Mitsuhashi, et al. Studies on the Constituents of Asclepiadaceae Plants I. Chem Pharm Bull. 1982, 30(10): 3500~ 3504
- 6 Kenichi Yakushijin, Junko Sekikawa, Rika Suzuki, et al. Antitumor Active Glycosides from Condurango Cortex. Chem Pharm Bull. 1980, 28(6): 1954~ 1958
- 7 Димо по А.С. Асперин химФармк. 1985, 19(2): 185~ 186
- 8 Husain SR. Scavenging Activity of Flavonoids on Hydroxyl⁻ radicals. Phytochemistry. 1987, 26(9): 2486~ 2491
- 9 胡天喜, 陈季武, 许建营等. 云芝糖肽和灵芝多糖清除活性氧的作用. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(5): 465~ 470

Study on the Scavenging Effect of Baishouwu's C_{21} Steroidal-Glycosides and Their Aglycones on Hydroxyl-radicals

Song Junmei Ding Xiaolin

(Food College, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Using a chemiluminescence assay we studied the scavenging effect of C_{21} steroidal-glycosides and various aglycones of Baishouwu on hydroxyl-radicals, and compared their scavenging power with the well-known hydroxyl-radical scavenger——mannitol and with the standard compounds having the same skeleton. The results shows that C_{21} steroidal-glycosides and their aglycones have a strong scavenging power on hydroxyl-radicals; and that whether $C-OH$ of the steroidal part is free or combined with glycones will not affect their activity fundamentally; and that the active power of the aglycones is related to the number of the hydroxyl groups linked on the skeletons while the skeletons themselves have no effect.

Key words baishouwu; C_{21} steroidal-aglycones; hydroxyl-radical; scavenging effect; chemiluminescence assay

(责任编辑:秦和平)