

# 儿茶素与金属离子相互作用及其生物学意义

孙世利 杨军国 张岚翠 于海宁<sup>1</sup> 沈生荣\*(浙江大学茶学系, 杭州 310029; <sup>1</sup>浙江工业大学药学院, 杭州 310032)

**摘要** 儿茶素的医学保健功效已经得到广泛证实, 其与金属离子的相互作用也随之成为无机生物化学和医学等交叉研究领域的热点。综述了儿茶素与金属离子的相互作用及其生物学意义, 并对其研究前景进行了展望。

**关键词** 儿茶素; 金属离子; 络合物

茶叶中的儿茶素(catechins)属黄烷醇类化合物, 是茶叶中多酚类物质的主体成分, 被广泛应用于食品、医药、化工等行业。近年来, 儿茶素与金属离子的相互作用及其生物学效应开始成为国内外学者研究的热点。金属离子作为人体生长需要的营养元素, 是众多酶的辅基或代谢过程的催化剂, 其不足或过量皆可导致代谢紊乱, 诱发各种疾病。由于过渡金属外层电子轨道电子分布的特殊性, 表现出特有的生化反应性及参与生物代谢能力。对各种金属离子, 特别是过渡金属离子在人体内的吸收、代谢及其表现出的生物学活性是无机生物化学研究的重要内容。儿茶素与金属离子相遇, 可与金属离子发生络合或氧化还原作用, 形成络合物或氧化还原产物, 这种相互影响体现了儿茶素在体内作用的复杂性及探讨儿茶素生物学活性的多样性。同时, 儿茶素与过渡金属离子形成的络合物可能对某些癌细胞具有抑制生长及诱导凋亡的作用, 二者形成的络合物活性研究不仅对揭示儿茶素体内生物学活性有重大理论意义, 也为儿茶素类药物的开发、确保其生物有效性提供重要的实验依据。

## 1 儿茶素与金属离子的相互作用

### 1.1 儿茶素与金属离子的氧化还原作用

儿茶素的还原电位高, 在一定条件下易自动氧化, 高价的金属离子如  $\text{Cr}^{6+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  都能将其氧化为醌或其他衍生物, 而金属离子则被还原为相应低价的  $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  等。Hoshino 等<sup>[1]</sup>发现儿茶素与  $\text{Cu}^{2+}$  的络合物抗菌活性与儿茶素单体相反, 可能是  $\text{Cu}^{2+}$  被儿茶素还原为  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^+$  酶促氧化后生成大量活性氧和活性氧自由基; Kumamoto 等<sup>[2]</sup>证明儿茶素在碱性条件下, 能够发生自动氧化, 产生自由基; 当铜离子存在时, 铜离子能催化促进儿茶素的自动氧化,

但若改变 pH 值, 则结果正好相反。在微酸性条件下, 选用的十多种金属离子中,  $\text{Cu}^{2+}$  能有效增强儿茶素抗氧化活性,  $\text{Fe}^{2+}$  则明显降低儿茶素抗氧化活性, 他们认为儿茶素抗氧化活性的提高是由于金属离子与之结合而改变儿茶素的电子结构所致。Zago 等<sup>[3]</sup>研究表明锌离子能够增强表儿茶素(EC)的抗氧化活性, 认为锌离子可以与 EC 形成抗氧化循环, 协同起作用。还有实验发现,  $\text{Co}^{2+}$  能降低儿茶素中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的抗氧化活性<sup>[4,5]</sup>。

### 1.2 儿茶素与金属离子的络合作用

事实上, 茶叶中儿茶素抗氧化活性的结构基础是 B 环上的邻位羟基, A 环上 5 和 7 位上的羟基, 以及 C 环 3 位上的羟基, 而儿茶素结构中的 3', 4'-邻二羟基可将游离金属离子络合, 其络合比随外界条件而变化。研究表明<sup>[6-9]</sup>, 不同的儿茶素单体和金属离子络合与其分子结构、含有的可络合活性基团数量、活性基团分布以及作用条件等密切相关, 如配合物比率、pH 值、溶液的浓度等。

溶液的 pH 值对儿茶素与金属离子的络合作用影响明显。Fernandez 等<sup>[10]</sup>用紫外光谱仪和静电离子光谱测定仪研究发现, 在 pH 5.5 时, 类黄酮和铁离子的络合位点可能在 5-羟基和 4-氧上; 进一步研究类黄酮与铜的络合作用, 结果发现, 在 pH 5.5 和 pH 7.4, 所有的黄酮类与铜离子的络合位点都是一样的, 均在 5-羟基和 4-氧上络合; 儿茶素在 pH 7.4 与铜离子的结合位点是邻-儿茶酚基。Esparza 等<sup>[11]</sup>研究了儿茶素单体与  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的络合物, 结果显示, 儿茶素可与  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  络合, 且以 1:1 形式形成络合物。Ohyoshi 等<sup>[12]</sup>用分光光度法研究了  $\text{Al}^{3+}$  与 EGCG 的络

收稿日期: 2006-08-24 接受日期: 2006-12-20

国家自然科学基金资助项目(No.30470198)

\* 通讯作者。Tel: 0571-86971926, E-mail: shrshen@zju.edu.cn

合物,并证明了绿茶在中性 pH 条件下,  $\text{Al}^{3+}$  与 EGCG 可以形成稳定的络合物,EGCG 可抑制过量  $\text{Al}^{3+}$  的生物毒性。Hynes 等<sup>[13]</sup>研究了  $\text{Fe}^{3+}$  与含有没食子基团的配体反应动力学,发现  $\text{Fe}^{3+}$  与配体初始形成 1:1 的络合物,在高 pH 值条件下可形成 1:2 的络合物,而三价铁又有促进初始形成的络合物的分解作用。郭炳莹等<sup>[14]</sup>用直接观察法、酒石酸亚铁法等对绿茶茶汤组分与 23 种金属离子的络合性能进行研究表明,有 22 种金属离子可与茶汤组分发生配合或还原配合反应,其中有  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Bi}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Sb}^{3+}$ 、 $\text{V}^{5+}$ 、 $\text{W}^{7+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等 10 种金属离子参与了儿茶素的配合;进一步研究发现,钙离子可与茶汤组分生成低溶解度的络合物,络合沉淀中的主要茶汤组分是儿茶素,其中以酯型儿茶素含量最高,其溶解度及稳定性可随反应溶液 pH 值升高而下降,同时,沉淀物及反应液的颜色也随之由浅变深,钙络合物的稳定性逐渐下降,当  $\text{pH}>9.0$  时,钙络合物即迅速被氧化且由黄变红;当  $\text{pH} 9.5$  时,茶汤中 90% 以上的儿茶素都被沉淀。薄层色谱分析结果表明,酯型儿茶素(-)-EGCG 和表儿茶素没食子酸酯[(-)-ECG]几乎全被钙络合而沉淀,未被沉淀的主要是非酯型儿茶素。在中性环境下,大多数酚类化合物很快与  $\text{Ca}^{2+}$  络合并生成沉淀,当 pH 调至 8.0 时,所有的酚类化合物都与  $\text{Ca}^{2+}$  生成低溶解度的沉淀。对 5 种儿茶素的测定表明,酯型儿茶素-钙络合物的溶解度低于非酯型儿茶素-钙的溶解度,简单儿茶素-钙络合物的溶解度约为(-)-EGCG-钙络合物溶解度的 12~15 倍。

改变儿茶素与金属离子的配合比率也能影响二者的络合作用。沈生荣等<sup>[15]</sup>用修正的摩尔比法测定了 4 种儿茶素与  $\text{Fe}^{3+}$  的配合比率,试验结果发现,4 种儿茶素与  $\text{Fe}^{3+}$  配合比为:表没食子儿茶素(EGC)与  $\text{Fe}^{3+}$  配合比为 3:2,EGCG、ECG 与  $\text{Fe}^{3+}$  配合比 2:1,EC 与  $\text{Fe}^{3+}$  配合比为 3:1,表明  $\text{Fe}^{3+}$  与儿茶素的配合活性依次为:EGC>ECG-EGCG>EC。戚向阳等<sup>[16]</sup>研究发现:EGCG[2.00%(W/W)]与 Ge(IV) 按摩尔比 3:1,在 pH 6.50~7.00 的缓冲液中,生成 EGCG-Ge(IV) 金属配合物,产物得率约 61.81%,按等摩尔连续变化法及摩尔比法测定 EGCG-Ge(IV) 配合物组成为 [EGCG][Ge(IV)]=2:1(mol/mol),配合物的不稳定常数为  $2.570 \times 10^{-11}$ ,在温度  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  的中性溶液中,配合物对光的稳定性较好。

其他因素也能影响儿茶素与金属离子的络合作用。Chen 等<sup>[17]</sup>用电子顺磁共振和核磁共振等方法研

究了  $\text{Al}^{3+}$  与儿茶素的相互作用,可视分光镜结果表明,  $\text{Al}^{3+}$  可增强儿茶素的颜色效应,X 光衍射结果显示结晶儿茶素与  $\text{Al}^{3+}$  作用变为非结晶的沉淀物,采用其他实验方法证明了儿茶素与  $\text{Al}^{3+}$  络合比为 1:1。Bodini 等<sup>[18]</sup>研究了儿茶素与锌络合物在质子介质中氧化还原反应及与超氧阴离子自由基的相互作用,儿茶素与锌配合物的氧化还原反应是在二甲亚砜(DMSO)中进行的。在介质不存在时,儿茶素首先形成醌亚胺,在介质 1 当量(1 equiv)条件下,1:2 配比络合。在 DMSO 中,配合物与超氧阴离子自由基的相互作用,儿茶素单阴离子的形成导致更多锌配合物的形成,质子化了的过氧化物歧化为分子氧和过氧化氢,导致配合物的氧化。络合反应使氧化电位下降,提高了类黄酮的抗氧化能力。

儿茶素类独特的分子结构,使其能与体内多种金属离子发生络合作用,从而使儿茶素在体内的作用效果远不同于体外所表现的,这直接影响儿茶素的生物利用度和在体内的活性表现,也许进入体内的儿茶素已不再是原来形态的儿茶素,最大可能是结构改变了的儿茶素衍生物,如与金属离子形成的络合物等。而络合产物受环境因素的影响较大,再加上进入体内的数量有限,因此,一些过渡金属离子与其形成的络合物在体内较难分辨,所以,揭示儿茶素体内生物学效应、与金属离子的络合作用是研究的重要内容,尤其是络合物的动态生物学行为值得着重研究。

## 2 儿茶素与金属离子相互作用的生物学意义

迄今为止,国内外的大量研究证实,儿茶素与金属离子形成配合物后,儿茶素的生物学活性显著改变,并且在生物体内有明显不同于体外的生物学效应。形成的配合物,其理化性质与其单体有明显不同,溶解度、熔点、亲脂性、立体构型、紫外和红外光谱等发生显著改变,其药理活性增强,毒副作用降低。随着无机生物化学研究的不断深入,金属元素络合物的特殊药理活性,已逐渐应用于临床。

### 2.1 体外细胞培养体系

儿茶素与金属离子相互作用的体外细胞作用效果明显不同于各种体内实验效果,这可能是由于二者在体内作用受更多环境条件的影响所致。Sakagami 等<sup>[19]</sup>调查研究了钴(Co)存在下 EGCG 对癌细胞及正常细胞毒性的影响,发现加入  $\text{CoCl}_2$  后,EGCG 的细胞毒性明显下降,他们认为主要与 Co 降低 EGCG 抗氧化活性所致。这与 Ishino 等<sup>[5]</sup>的研究结果相同,Co 可以

降低 EGCG 诱导的人口腔癌细胞凋亡。Kagaya 等<sup>[19]</sup>研究了 EGCG 及其金属络合物对肝细胞损伤的保护作用, 结果表明, EGCG 不能降低 bromobenzene(BB) 诱导的肝细胞损伤, 包括铁与 EGCG 的络合物, 而锌与 EGCG 的络合物则表现出显著的保护作用效果。该研究发现 EGCG 与锌的浓度比对其络合物的生物学活性影响较大, 当比值低于 0.66 时, 对肝细胞的保护作用随比值的增高而增强, 当比值大于 0.66 时, 其保护作用不再随比值的增加而变化。对锌与 EGCG 的络合物清除自由基能力的研究结果显示, 锌与 EGCG 络合物对 EGCG 清除自由基的能力没有影响。

由儿茶素与金属离子相互作用在前列腺癌细胞中应用的研究表明, 儿茶素与金属离子互作在体外细胞内具有良好的作用效果。Yu 等<sup>[20,21]</sup>利用多种检测方法对儿茶素与金属离子相互作用影响前列腺癌细胞生长进行了较深入的研究, 结果表明, EGCG 与  $\text{Cu}^{2+}$  单独作用均呈剂量依赖性降低前列腺癌细胞 LNCap 细胞和 PC-3 细胞的存活率; 当 EGCG 与  $\text{Cu}^{2+}$  共存时 EGCG 在一定浓度下能够抑制  $\text{Cu}^{2+}$  诱导的细胞毒性; 而  $\text{Cu}^{2+}$  在不同条件下可以促进或抑制 EGCG 的毒性, 并且与 EGCG/ $\text{Cu}^{2+}$  相对浓度密切相关。该试验说明 EGCG、 $\text{Cu}^{2+}$  之间的相互作用及其对前列腺癌细胞生长的影响与多因素有关, 如浓度、存在次序、细胞种类等。陈勋等<sup>[22]</sup>研究了 EGCG 与锌离子互作对前列腺癌细胞 PC-3 生长的影响, 结果表明锌离子能提高 EGCG 抑制前列腺癌细胞 PC-3 生长的活性, 分配系数测定结果显示锌离子能提高 EGCG 的生物利用度。Yu 等<sup>[23]</sup>研究了 EGCG 与  $\text{Cd}^{2+}$  相互作用对前列腺癌细胞 PC-3 的生长影响, 实验发现,  $\text{Cd}^{2+}$  时间剂量性地影响 PC-3 细胞的活性, 而 EGCG 增强了这种作用效果。EGCG 存在条件下, PC-3 细胞对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收减少, 而对  $\text{Zn}^{2+}$  的吸收则增加。

Kostyuk 等<sup>[24]</sup>测定了黄酮类物质对石棉诱导的细胞损伤的保护作用, 并研究了金属离子( $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ ) 对其作用的影响, 试验结果表明, 类黄酮与金属离子的配合能力较强, 在适宜条件下首先形成配合物, 类黄酮的金属配合物比类黄酮在清除自由基、抵抗石棉诱导的巨噬细胞的损伤, 保护红细胞方面更有效, 同时也发现, 所有类黄酮的金属络合物大部分能被温石棉光纤吸收, 能有效治疗因吸入石棉光纤而引起的炎症, 能显著提高活性氧的清除能力, 更好地保护细胞, 减少石棉诱导的溶血。

另有细胞体系研究发现<sup>[25,26]</sup>, 儿茶素诱导细胞损

伤和凋亡的同时, 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度发生了变化。但是儿茶素是否直接参与调节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  代谢还有待于进一步研究。

## 2.2 体内组织器官体系

儿茶素与金属离子在体内组织器官中的相互作用可能与二者的络合作用有密切的关系。Tang 等<sup>[27]</sup>研究了儿茶素在鸡肉中的抗氧化机制, 发现儿茶素单体在 400 ppm 时具有最高的络合  $\text{Fe}^{2+}$  活性, 儿茶素清除过量自由基和络合某些过量金属离子是鸡肉高脂肪食物抗氧化的重要机制之一。Coudray 等<sup>[28]</sup>利用同位素标记技术, 研究了儿茶素对 Zn、Fe 和 Cu 吸收的影响, 在老鼠饲料中添加一定浓度的 Zn、Fe 和 Cu, 同时饲喂儿茶素, 发现儿茶素不影响机体对三种金属元素的吸收, 但两者同时服用, 金属离子的吸收受到阻抑, 而分开服用时, 儿茶素对金属离子的吸收无影响。Kuo 等<sup>[29]</sup>研究证明, 儿茶素能够与人体内  $\text{Cu}^{2+}$  及  $\text{Fe}^{3+}$  发生络合作用, 降低小肠细胞中金属硫蛋白的浓度, 且与剂量和时间呈依存关系, 推断儿茶素影响了金属元素间业已存在的动态平衡和细胞氧化还原状态。

儿茶素的解毒作用也有力地证明了儿茶素与金属离子在机体内的相互作用。众所周知, 金属元素是人体生长需要不可或缺的重要物质之一, 但如果人们长期饮食含有大量金属离子的饮料或食物, 尤其是重金属污染严重地区的饮料或食物, 可能会导致重金属中毒等多种疾病的发生。大量研究显示, 金属离子的毒性与其催化加速体内自由基反应速率有关, 其中  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  是最典型的代表。儿茶素是高效低毒的自由基清除剂、良好的免疫功能调节剂, 能调控多巴胺的合成及钙信号, 且有络合、吸附及还原重金属的功能, 这些性质使其缓解或解除过量重金属离子的毒害作用成为可能。Choi 等<sup>[30]</sup>研究了儿茶素对慢性镉(Cd) 中毒的影响, 发现儿茶素能够有效消除镉过量引起的骨代谢的紊乱, 恢复骨细胞对各种金属离子的正常吸收并维持骨骼中各种金属离子的正常动态平衡。Mandel 等<sup>[31]</sup>综述了绿茶中的儿茶素在治疗因铁引起的神经性紊乱类脑障碍疾病, 证实儿茶素可以通过与铁、铜等金属离子络合消除因这些金属元素引起的相关疾病。

## 3 儿茶素与金属离子相互作用研究展望

随着配位化学、无机生物化学、分子生物学、药理学和临床医学等多学科综合研究的深入, 植物中

有效有机活性成分和微量元素研究的不断深化,以及受金属络合物理论的启示,儿茶素与金属离子相互作用及其生物学活性的研究也取得了一定的进展。研究人员不断改进方法,由原来单纯的化学体系延伸到生物体系,深入探明儿茶素的生物学活性,研究与金属离子的相互作用,探究儿茶素与金属离子相互作用后在体内的循环和代谢途径,以及产物的生物学活性,为儿茶素与金属离子相互作用在医学、药学上的应用打下了良好的基础,为彻底搞清儿茶素的生物生态动力学提供了崭新的研究模式。重金属毒副作用主要在于它能与体内维持正常生理功能的配体结合,使其失去生理作用。而儿茶素能够吸收人体内过量的金属离子,尤其是重金属离子,解除重金属过量引起的中毒等疾病,这些理论研究均为儿茶素的应用提供了新途径。但是儿茶素对金属离子的吸收是通过络合、吸附、还是还原作用不得而知,其机制有待进一步研究。

儿茶素与金属离子相互作用及其络合物生物学活性是目前研究的热点,关于儿茶素与金属离子氧化还原作用及其生物学活性的研究少见报道,这可能与反应后的衍生物较复杂以及儿茶素还原后活性降低有关;相反,儿茶素与金属离子的络合作用受到了学者们较多的关注,因此二者的络合作用研究较多,但是多数实验研究在体外进行,二者在体内形成相应络合物的证据目前尚不充分。由于儿茶素与金属离子作用的络合链较复杂,分离提纯辨别较困难,因此国内外对儿茶素与金属离子络合物的生物学活性的研究报道不多,尚处于起步深入阶段。我们通过试验

得到EGCG与Zn<sup>2+</sup>的络合物,并检测了其结构以及应用于体外培养的前列腺癌细胞中,结果表明其生物学活性明显不同于儿茶素单体EGCG。

### 参考文献 (References)

- [1] Hoshino N *et al.* *Lett Appl Microbiol*, 2000, **31**: 213
- [2] Kumamoto M *et al.* *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, **65**: 126
- [3] Zago MP *et al.* *Free Radic Biol Med*, 2001, **31**: 266
- [4] Sakagami T *et al.* *Anticancer Res*, 2000, **20**: 3143
- [5] Ishino A *et al.* *Anticancer Res*, 1999, **19**: 5197
- [6] Yamanaka N *et al.* *FEBS Lett*, 1997, **401**: 230
- [7] Hu C *et al.* *Mol Cell Biochem*, 2001, **218**: 147
- [8] Navarro RE *et al.* *J Inorg Biochem*, 2005, **99**: 584
- [9] Tang DS *et al.* *J Zhejiang Univ Sci*, 2004, **5**: 668
- [10] Fernandez MT *et al.* *J Inorg Biochem*, 2002, **92**: 105
- [11] Esparza I *et al.* *Anal Chim Acta*, 2005, **543**: 267
- [12] Ohyoshi E *et al.* *J Inorg Biochem*, 1999, **73**: 31
- [13] Hynes MJ *et al.* *J Inorg Biochem*, 2001, **85**: 131
- [14] 郭炳莹等. *茶叶科学*, 1991, **11**: 39
- [15] 沈生荣等. *茶叶科学*, 1997, **17**: 119
- [16] 戚向阳等. *天然产物研究与开发*, 1994, **6**: 35
- [17] Chen MY *et al.* *J Agric Food Chem*, 2006, **54**: 212
- [18] Bodini ME *et al.* *Polyhedron*, 2001, **20**: 1005
- [19] Kagaya N *et al.* *Eur J Pharmacol*, 2002, **450**: 231
- [20] Yu HN *et al.* *J Zhejiang Univ Sci B*, 2005, **6**: 125
- [21] Yu HN *et al.* *J Agric Food Chem*, 2004, **52**: 462
- [22] 陈 勋等. *茶叶科学*, 2006, **26**: 219
- [23] Yu HN *et al.* *Food Chem*, 2006, **95**: 108
- [24] Kostyuk VA *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2001, **385**: 129
- [25] Mazzio E *et al.* *Neurotoxicology*, 2001, **22**: 283
- [26] Kang WS *et al.* *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001, **38**: 875
- [27] Tang SZ *et al.* *Food Chem*, 2002, **76**: 45
- [28] Coudray C *et al.* *Br J Nutr*, 1998, **80**: 575
- [29] Kuo SM *et al.* *Biol Trace Elem Res*, 1998, **62**: 135
- [30] Choi JH *et al.* *Life Sci*, 2003, **73**: 1479
- [31] Mandel S *et al.* *Mol Nutr Food Res*, 2006, **50**: 229

## Interactions of Catechins with Metal Ions and Their Biological Significance

Shi-Li Sun, Jun-Guo Yang, Lan-Cui Zhang, Hai-Ning Yu<sup>1</sup>, Sheng-Rong Shen\*

(Department of Tea Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>1</sup>College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

**Abstract** With widely investigations of the preventive effects of catechins from many kinds of diseases, interactions of catechins with metal ions are being become the novel hotspot in inorganic biochemistry and medicine or other subjects. In the present paper, we reviewed the interactions of catechins with metal ions and their biological significance. Also, we estimated their prospects in the coming day in this paper.

**Key words** catechins; metal ions; complex

Received: August 24, 2006 Accepted: December 20, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470198)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971926, E-mail: shrshen@zju.edu.cn