

# 辣椒碱对生物大分子氧化损伤的保护作用

张月, 刘茜, 肖春霞

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 本文分别采用  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 、AAPH 体系诱导 BSA 氧化和羰基化损伤、Hemin/nitrite/ $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 BSA 硝基化损伤;  $\text{Fe}^{2+}/\text{VitC}$ 、AMVN 诱导亚油酸 (LA) 过氧化及 AAPH 诱导鲱鱼精 DNA 氧化损伤的模型, 研究了辣椒碱对生物大分子在羟自由基和烷氧自由基攻击下发生氧化损伤的保护作用。结果表明: 50  $\mu\text{M}$ ~1000  $\mu\text{M}$  的辣椒碱能显著抑制自由基诱导的蛋白质氧化损伤; 10  $\mu\text{M}$ ~1000  $\mu\text{M}$  的辣椒碱能显著抑制羟自由基诱导的蛋白羰基化、蛋白氧化应激产生的硝基化以及脂质过氧化终产物 TBARS 的生成, 100  $\mu\text{M}$ ~1000  $\mu\text{M}$  的辣椒碱能显著抑制烷氧自由基诱导的蛋白羰基化和 DNA 的氧化损伤。得出结论: 辣椒碱对不同自由基诱导的生物大分子氧化损伤有显著的保护作用, 且其保护作用在一定浓度范围内与辣椒碱浓度呈正相关。本研究为辣椒碱在食品抗氧化剂以及功能食品中的开发与应用提供了基础依据。

**关键词:** 辣椒碱; 自由基; 氧化损伤

**文章编号:** 1673-9078(2017)2-41-47

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.007

## Protective Effect of Capsaicin against Oxidative Damage to Biomolecules

ZHANG Yue, LIU Qian, XIAO Chun-xia

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Oxidative damage was induced using several different systems to study the protective effect of capsaicin (CAS) against damage caused by  $\text{OH}\cdot$  and alkoxy radicals ( $\text{RO}\cdot$ ). Oxidation and carbonylation of bovine serum albumin (BSA) was induced by copper ions/hydrogen peroxide and 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH), respectively. Nitration of BSA was induced by hemin/nitrite/hydrogen peroxide, peroxidation of linoleic acid (LA) was induced by ferrous iron/VitC and 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN), and oxidative damage to herring sperm DNA was induced by AAPH. The results showed that 50~1000  $\mu\text{M}$  CAS could significantly inhibit the oxidative cleavage of protein induced by reactive oxygen species (ROS); 10~1000  $\mu\text{M}$  CAS could significantly inhibit protein carbonylation induced by  $\text{OH}\cdot$ , protein nitration, and the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the final product of LA peroxidation; and 100~1000  $\mu\text{M}$  CAS could significantly inhibit protein carbonylation induced by  $\text{RO}\cdot$  and DNA oxidative cleavage. It was concluded that CAS had a strong protective effect against oxidative damage to biomolecules caused by various types of free radicals, and the protective effects exhibited a concentration-dependent manner to some degree. This study provides scientific evidence for the development and application of CAS in dietary supplements and functional foods.

**Key words:** capsaicin; free radical; oxidative damage

辣椒碱(Capsaicin, CAS)是辣椒果皮中的一种含酚羟基的生物碱, 是辣椒的重要组成成分。其分子式为  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ , 分子量 305.41, 结构式如图 1 所示, 目前主要用作食品添加剂、天然防腐剂、复配农药、防腐涂料以及新型防爆剂等<sup>[1]</sup>。研究表明辣椒碱能通过激活 TRPV1 通路降低小鼠肺组织中的炎症因子水平<sup>[2]</sup>同时能抑制低密度脂蛋白的氧化<sup>[3]</sup>; 另外, 辣椒碱

收稿日期: 2016-01-19

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目 (2015M572603); 陕西省自然科学基金基础研究计划青年人才项目 (2015JQ2039)

作者简介: 张月 (1993-), 女, 本科, 研究方向: 食品功能与营养化学

通讯作者: 肖春霞 (1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品功能与营养化学

可通过对雄激素受体 mRNA 和蛋白水平的下调对前列腺癌起到一定的治疗作用<sup>[4]</sup>。炎症、心血管损伤以及癌症等疾病都与机体内的氧化应激水平密切相关。已研究发现, 辣椒碱可有效清除 DPPH·自由基、超氧阴离子自由基、亚硝基以及羟自由基<sup>[5]</sup>, 然而辣椒碱对氧化损伤保护作用的研究仍需系统探讨。

生物大分子是构成生命的基础物质, 一般是指相对分子量大于 10000, 空间结构复杂, 与生命活动密切相关的物质, 主要包括蛋白质、核酸和脂类等<sup>[6]</sup>。自由基又称为游离基, 是具有未配对电子且可以独立存在的基团或原子。自由基高度活泼且具有极强的氧化反应能力, 能够通过连锁反应不断攻击体内的生物大分子, 使之发生过氧化变性、交联和断裂, 从而破

坏细胞结构和功能,最终损坏机体组织。其中,自由基对蛋白的损伤主要包括修饰氨基酸、断裂肽链、使蛋白质交联聚合和改变蛋白构象<sup>[7]</sup>。而自由基导致的脂质过氧化则与肿瘤、化学中毒、炎症、自身免疫降低、动脉粥样硬化(AS)及心脑血管疾病等发生发展密切相关<sup>[8]</sup>。此外,自由基还会攻击DNA造成碱基损伤及DNA链断裂,严重威胁细胞正常生命活动乃至生存<sup>[9]</sup>。

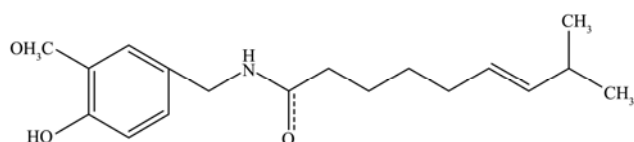


图1 辣椒碱的结构

Fig.1 Chemical structure of capsaicin

本研究通过氧化体系产生羟基自由基和烷氧自由基诱导生物大分子氧化损伤,并研究在此过程中辣椒碱对生物大分子的保护作用,为辣椒碱的食用及药用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

辣椒碱(CAS);牛血清白蛋白(BSA)、鲱鱼精DNA、亚油酸(LA)、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH)、偶氮二异庚腈(AMVN)和血红素(Hemin),美国Sigma-Aldrich公司;鼠抗3-NT(sc-32731)抗体和HRP标记羊抗鼠IgG抗体(sc-2005)美国Santa Cruz公司;pBR322质粒DNA和6×上样缓冲液,Takara公司;胰蛋白酶、β-巯基乙醇、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、甘氨酸、N,N,N',N'-四甲基二乙胺(TEMED)、异丙醇、Tris碱、溴酚蓝、苯甲基磺酰氟(PMSF)、过硫酸铵和二甲基亚砷(DMSO),美国Amresco公司;0.45 μm聚偏二氟乙烯印迹膜(PVDF膜),美国Millipore公司;2,4-二硝基苯肼(DNPH),上海生工生物工程技术有限公司;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、30%双氧水、甲醇和冰乙酸,天津市富士精细化工有限公司;FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,天津市化学试剂六厂;考马斯亮蓝R-250(CBB-R250),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;亚硝酸钠、甘油、Tween-20、氯化钠,天津市科密欧化学试剂有限公司;脱脂奶粉,黑龙江完达山阳光乳业有限公司;硫代巴比妥酸(TBA)和三氯乙酸(TCA),国药集团化学试剂有限公司;维生素C(VitC),西安化学试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

电泳供电装置、伯乐小型垂直电泳槽、Bio-Rad电泳仪和转印仪、化学发光成像系统,美国伯乐公司;高速离心机、微量移液器,德国Eppendorf公司;紫外-可见分光光度计、万分之一天平,日本岛津公司;电子恒温水浴锅,天津泰斯特仪器有限公司;超低温冰箱,青岛海尔集团公司;旋涡混合器,江苏海门仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 辣椒碱对Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系诱导蛋白氧化和羧基化的影响

在BSA终浓度为1 mg/mL的反应体系中加入不同浓度的辣椒碱乳浊液,封口后置于37℃水浴中反应30 min。反应结束后再加入Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,使Cu<sup>2+</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的终浓度分别为100 μM和2.5 mM,封口后置于37℃水浴反应90 min。反应结束后,采用考马斯蓝R-250染色法和DNPH比色法检测BSA氧化损伤程度和BSA羧基化程度。

#### 1.3.2 辣椒碱对AAPH体系诱导蛋白氧化和羧基化的影响

蛋白模型和辣椒碱处理方法与1.3.1相同,反应结束后再加入AAPH体系,使AAPH的终浓度为50 mM,封口后置于37℃水浴反应4 h。反应结束后,采用考马斯蓝R-250染色法和DNPH比色法检测BSA氧化损伤程度和BSA羧基化程度。

#### 1.3.3 考马斯亮蓝R-250染色法

取适量反应液转移至1.5 mL离心管中,加入反应液四分之一体积的5×SDS凝胶电泳上样缓冲液,混匀封口后于100℃沸水煮5 min,进行10% SDS-PAGE凝胶电泳,用1 g/L的考马斯亮蓝溶液染色30 min,脱色液脱色过夜,采用Chemi Doc™ XRS化学发光成像系统进行成像并利用软件分析各蛋白条带的光密度值。

#### 1.3.4 DNPH比色法

取400 μL制备好的样品加入4 mL DNPH溶液中,混匀后于室温下避光静置1 h,每10 min振荡一次。加入4 mL、10% (m/V)的TCA溶液,混匀后置于高速离心机中以4000 r/min离心10 min。用移液枪吸尽上清液,加入500 μL乙醇-乙酸乙酯进行清洗,再以4000 r/min离心10 min,如此重复清洗三次。最后一次吸尽上清液后,加入4 mL盐酸胍溶液,涡旋混匀后,采用紫外分光光度计于370 nm处测定吸光

值并根据公式(1)计算羰基含量。

$$\text{羰基含量}(\mu\text{mol}/\text{mg}) = \frac{A_{\text{吸光度}}}{22.0 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})} \times 1000 \quad (1)$$

### 1.3.5 辣椒碱对 Hemin/nitrite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导蛋白硝基化的影响

在 BSA 终浓度为 1 mg/mL 的反应体系中加入不同浓度的辣椒碱乳浊液, 封口后置于 37 °C 水浴中反应 5 min。在避光条件下加入 Hemin、nitrite 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 使 Hemin、nitrite 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在反应体系中的终浓度分别为 15 μM, 1 mM 和 1 mM。震荡混匀, 37 °C 水浴反应 60 min。硝基化反应结束后, 取 100 μL 反应液转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 25 μL 5×SDS 凝胶电泳上样缓冲液, 于 100 °C 水浴锅中加热煮沸 5 min。采用免疫印迹法 (Western Blotting) 检测蛋白硝基化程度

### 1.3.6 免疫印迹法 (Western Blotting)

采用 10% SDS-PAGE 电泳(1.3.3)分离蛋白样品, 并采用半干转印电泳槽将蛋白样品转印至 PVDF 膜上, 控制转印电压为 8 V, 转印时间 12 min。将 PVDF 膜浸入 5% 脱脂奶粉中在摇床上轻摇, 室温封闭 2 h。封闭结束后, 用 TBST 将膜洗涤 4 次, 每次 8 min; 放入 1:300 稀释的鼠抗 3-NT 单克隆抗体, 于 4 °C 孵育过夜; 将 PVDF 膜用 TBST 洗涤 4 次, 每次 8 min; 再放入 1:2000 稀释的山羊抗鼠 HRP 标记 IgG 抗体中, 室温摇床孵育 2.5 h。抗体孵育结束后, 以 TBST 洗膜 4 次, 每次 8 min; 加入 ECL 混合化学液, 采用 Chemi Doc™ XRS 化学发光成像系统进行成像并利用软件分析各蛋白条带的光密度值。

### 1.3.7 辣椒碱对羟自由基诱导亚油酸过氧化的影响

在 LA 终浓度为 1 mM 的反应体系中, 加入不同浓度的辣椒碱乳浊液, 混合均匀后再加入 FeSO<sub>4</sub> 和 VitC, 使得反应体系中 FeSO<sub>4</sub> 和 VitC 的终浓度分别为 50 μM 和 1 mM。37 °C 水浴避光反应 24 h。反应结束后, 以硫代巴比妥酸反应产物 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) 和共轭二烯含量表示亚油酸脂质过氧化水平。

### 1.3.8 辣椒碱对烷氧自由基诱导亚油酸过氧化的影响

在 LA 终浓度为 1 mM 的反应体系中, 加入不同浓度的辣椒碱乳浊液, 混合均匀后再加入 AMVN, 使得反应体系中 AMVN 的终浓度为 1 mM。37 °C 水浴避光反应 12 h。反应结束后, 以 TBARS 和共轭二烯含量表示亚油酸脂质过氧化水平。

### 1.3.9 TBARS 检测

采用 TBA 法来检测亚油酸脂质过氧化水平<sup>[10]</sup>。取 200 μL 反应液, 分别加入 300 μL、0.67% (m/V) 的 TBA 溶液和 300 μL 15% (m/V) TCA 溶液, 100 °C 加热煮沸 30 min。冷却后用微量比色皿测定反应液在 532 nm 处的吸光度, 根据 TBARS 的摩尔吸光系数 1.56×10<sup>5</sup> L/(mol·m) 计算 TBARS 含量<sup>[11]</sup>, 结果用 μM/L 表示。并根据下列公式计算辣椒碱对自由基诱导 TBARS 生成的抑制率:

$$\text{抑制率 } A(\%) = 100\% - (A_2 - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\% \quad (2)$$

其中, A<sub>1</sub> 为诱导组的吸光度; A<sub>0</sub> 为空白组(不加诱导剂和辣椒碱)的吸光度; A<sub>2</sub> 为同时加入辣椒碱和诱导剂后的吸光度。

### 1.3.10 共轭二烯检测

参照 Esterbauer 等报道的方法检测共轭二烯<sup>[12]</sup>。用分光光度计测定样品在 233 nm 处的吸光度, 并根据共轭二烯的摩尔吸光系数 2.8×10<sup>4</sup> L/(mol·cm) 计算共轭二烯含量<sup>[13]</sup>, 结果以 μM 表示, 并根据公式(2) 计算辣椒碱对自由基诱导共轭二烯生成的抑制率。

### 1.3.11 辣椒碱对 AAPH 诱导 DNA 氧化损伤的影响

在 hsDNA 终浓度为 2 mg/mL 的反应体系中, 加入不同浓度的辣椒碱乳浊液, 再加入 AAPH 溶液, 使 AAPH 在反应体系中的终浓度为 40 mM, 振荡混匀后, 37 °C 恒温水浴 12 h。取 500 μL 反应液转移至 1.5 mL 离心管中, 向每个离心管中加入 250 μL 的 TBA 溶液和 250 μL TCA 溶液。充分混合均匀后, 沸水浴 15 min。冷却后, 用微量比色皿测量其在 532 nm 处的吸光度。

### 1.3.12 统计学分析

所有分析均重复 3 次, 取平均值, 试验数据以平均值±标准差表示。采用 SPSS 统计软件进行数据处理, 各组间的差异比较采用单因素方差分析, 以  $p < 0.05$  表示差异显著, 以  $p < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 辣椒碱对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系诱导蛋白氧化损伤的影响

Cu<sup>2+</sup> 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应能生成羟自由基造成蛋白氧化损伤, 由图 2 可知, 较低浓度的辣椒碱 (10 μM) 对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应体系诱导 BSA 氧化降解不具有显著抑制作用; 在一定浓度范围内 (50~500 μM) 辣椒碱可显著 ( $p < 0.01$ ) 抑制 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应体系诱导的 BSA 氧化降解, 且呈浓度依赖性; 超过一定的浓度范围后 (500 μM), 抑制作用增加不明显。

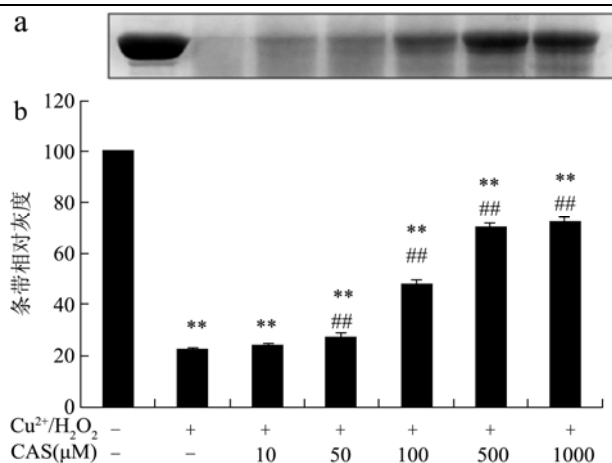


图2 辣椒碱对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 BSA 蛋白氧化损伤的影响

Fig.2 Effect of capsaicin on oxidative damage to BSA induced by copper ions/hydrogen peroxide

注: a 表示考马斯亮蓝 R-250 染色结果; b 表示 BSA 蛋白条带的定量分析; \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组,  $p < 0.01$ 。

## 2.2 辣椒碱对 AAPH 体系诱导蛋白氧化损伤的影响

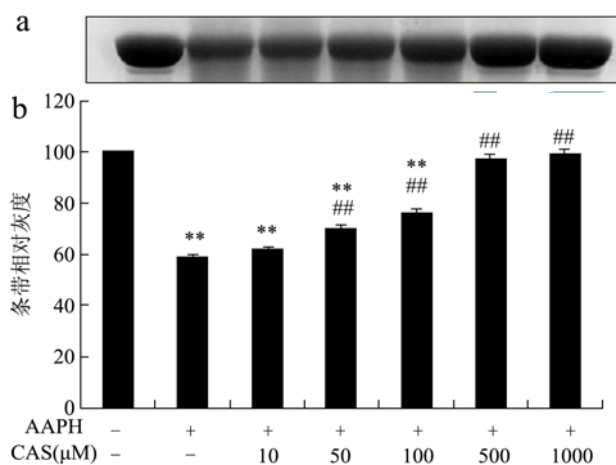


图3 辣椒碱对 AAPH 诱导 BSA 蛋白氧化损伤的影响

Fig.3 Effect of capsaicin on oxidative damage to BSA induced by AAPH

注: a 表示考马斯亮蓝 R-250 染色结果; b 表示 BSA 蛋白条带的定量分析; \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 AAPH 处理组,  $p < 0.01$ 。

AAPH 热分解可产生烷氧自由基造成蛋白氧化损伤, 由图 3 可知较低浓度的辣椒碱 (10 μM) 对 AAPH 反应体系诱导 BSA 氧化降解不具有抑制作用; 在一定浓度范围内 (50~500 μM) 辣椒碱能显著抑制 ( $p < 0.01$ ) AAPH 反应体系诱导的 BSA 氧化降解, 且呈浓度依赖性; 超过一定的浓度后 (500 μM), 抑制作用增加不明显。结果表明, 辣椒碱对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 AAPH 诱导

蛋白氧化损伤的抑制作用具有一致性。

辣椒碱能显著清除羟自由基和烷氧自由基, 是因为其所具有的酚羟基可提供质子来捕捉自由基, 酚羟基自身转变为酚氧自由基, 并且酚与连接苯环的 p-π 共轭作用可稳定酚氧自由基, 从而减少或阻断氧化反应的进行<sup>[14]</sup>。

## 2.3 辣椒碱对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系诱导蛋白羰基化的影响

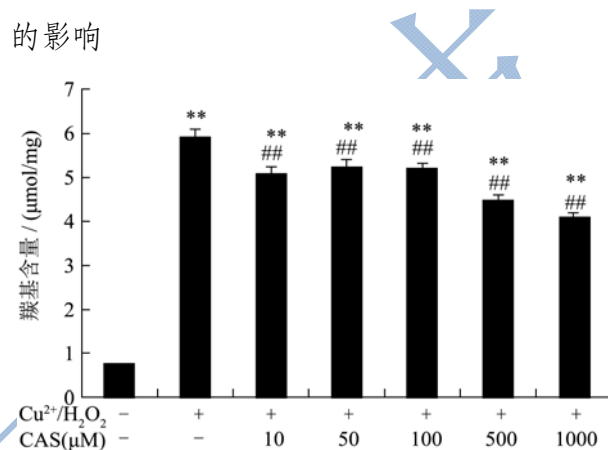


图4 辣椒碱对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系诱导 BSA 蛋白羰基化的影响

Fig.4 Effect of capsaicin on carbonylation of BSA induced by copper ions/hydrogen peroxide

注: \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组,  $p < 0.01$ 。

由图 4 可知, BSA 本身羰基化程度很低。在 Cu<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系诱导产生的羟自由基作用下, BSA 发生明显的羰基化修饰, 加入辣椒碱之后, 羰基化修饰受到抑制, 呈浓度依赖性, 且其抑制效果均具有显著性 ( $p < 0.01$ )。

## 2.4 辣椒碱对 AAPH 体系诱导蛋白羰基化的影响

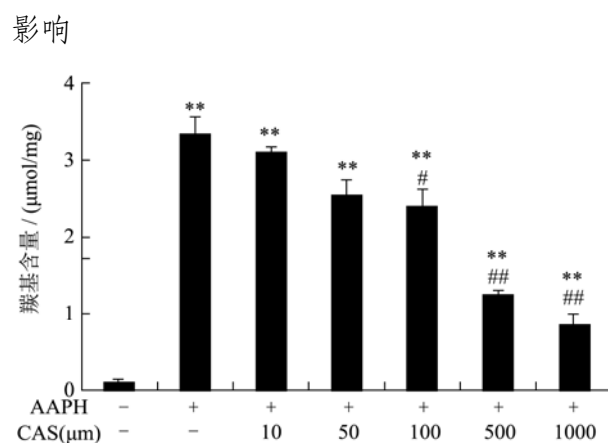


图5 辣椒碱对 AAPH 诱导 BSA 蛋白羰基化的影响

Fig.5 Effect of capsaicin on carbonylation of BSA induced by AAPH

注: \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 AAPH 处理组,  $p < 0.01$ 。

由图 5 可知, BSA 本身羰基化程度很低。在 AAPH 体系诱导产生的烷氧自由基作用下, BSA 发生明显的羰基化修饰, 在一定浓度范围内 (100~000  $\mu\text{M}$ ) 辣椒碱能显著 ( $p < 0.01$ ) 抑制 BSA 的羰基化修饰, 且呈浓度依赖性。

### 2.5 辣椒碱对 Hemin/nitrite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导蛋白硝基化的影响

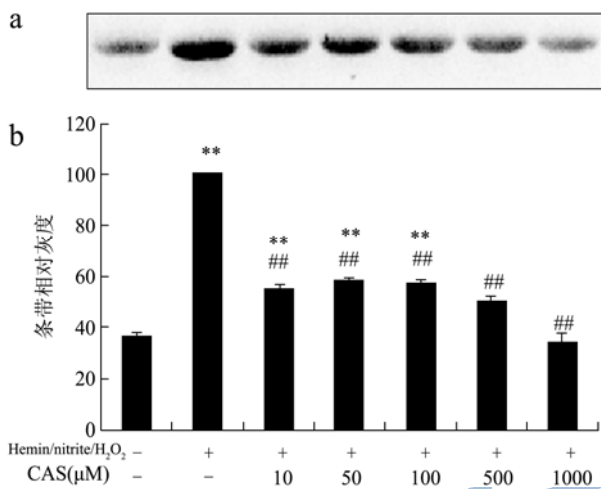


图 6 辣椒碱对 Hemin/nitrite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导蛋白硝基化的影响

Fig.6 Effect of capsaicin on nitration of BSA induced by hemin/nitrite/hydrogen peroxide

注: a 表示免疫印迹法检测 BSA 硝基化的条带结果; b 表示 3-NT 条带的定量分析; \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 Hemin/nitrite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组,  $p < 0.01$ 。

由图 6 可以看出, BSA 本身的硝基化程度较低, 在 Hemin/nitrite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应体系的诱导下, BSA 发生了明显的硝基化修饰, 检测到的 3-NT 的条带灰度更深。辣椒碱能显著 ( $p < 0.01$ ) 抑制 BSA 的硝基化, 且在一定的浓度范围内 (100~1000  $\mu\text{M}$ ) 呈浓度依赖性; 另外, 当辣椒碱浓度为 500~1000  $\mu\text{M}$  时, 诱导体系造成的 BSA 硝基化被完全逆转。羰基化和硝基化是蛋白氧化损伤的重要标志, 辣椒碱可通过抑制自由基的生成而降低蛋白羰基化和硝基化水平。

### 2.6 辣椒碱对羟自由基诱导亚油酸过氧化过程中共轭二烯生成的影响

亚油酸 (Linoleic acid, LA) 是一种含有两个双键的  $\omega$ -6 脂肪酸, 极易氧化。在氧化反应进行的早期, 多不饱和脂肪酸的碳链上可形成共轭双键, 可通过共

轭二烯过氧化物法进行测定。Fe<sup>2+</sup>/VitC 体系可诱导产生羟自由基, 羟自由基可夺取不饱和脂肪酸  $\alpha$  碳上的质子, 并通过自由基链式反应的链的引发、传递使得不饱和脂肪酸过氧化生成脂质氢过氧化物<sup>[15]</sup>。由图 7 可知, 较低浓度的辣椒碱 (10~50  $\mu\text{M}$ ) 对共轭二烯的生成没有显著抑制作用, 而较高浓度的辣椒碱 (100~1000  $\mu\text{M}$ ) 能显著抑制 ( $p < 0.01$ ) LA 脂质过氧化过程中共轭二烯的生成。当辣椒碱浓度为 100  $\mu\text{M}$  和 500  $\mu\text{M}$  时, 其对共轭二烯生成的抑制率分别为 34.2%和 40.4%。

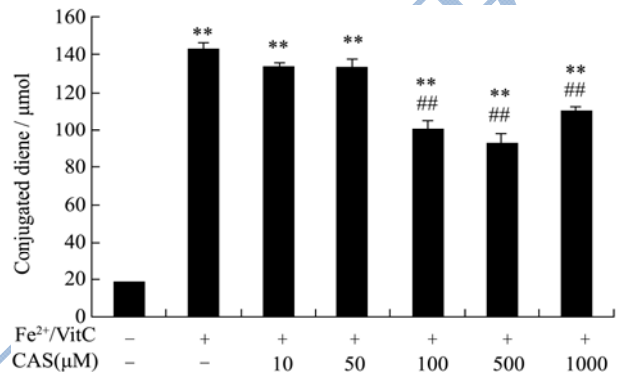


图 7 辣椒碱对羟自由基诱导亚油酸过氧化过程中共轭二烯生成的影响

Fig.7 Effect of capsaicin on hydroxyl radical-induced formation of conjugated diene during LA peroxidation

注: \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 Fe<sup>2+</sup>/VitC 处理组,  $p < 0.01$ 。

### 2.7 辣椒碱对羟自由基诱导亚油酸过氧化过程中 TBARS 生成的影响

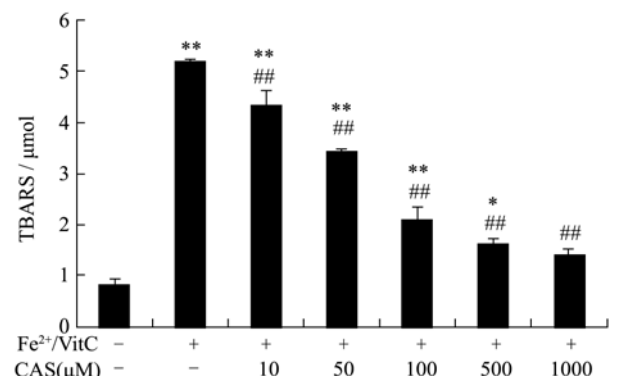


图 8 辣椒碱对羟自由基诱导亚油酸过氧化过程中 TBARS 生成的影响

Fig.8 Effect of capsaicin on hydroxyl radical-induced formation of TBARS during LA peroxidation

注: \*\*表示相对空白组,  $p < 0.01$ ; ##表示相对 Fe<sup>2+</sup>/VitC 处理组,  $p < 0.01$ 。

在过氧化反应的中, 脂质氢过氧化物很不稳定最

终被分解成醛、酮类物质，可通过硫代巴比妥酸法测定 TBARS 来表示过氧化程度。由图 8 可知，辣椒碱（10~1000 μM）能显著（ $p < 0.01$ ）抑制 LA 过氧化过程中 TBARS 的生成，且呈浓度依赖性。当其浓度为 10 μM、50 μM、100 μM、500 μM 和 1000 μM 时，对 TBARS 生成的抑制率分别为 25.0%、36.1%、69.8%、80.7%和 87.1%。

## 2.8 辣椒碱对烷氧自由基诱导亚油酸过氧化

过程中共轭二烯生成的影响

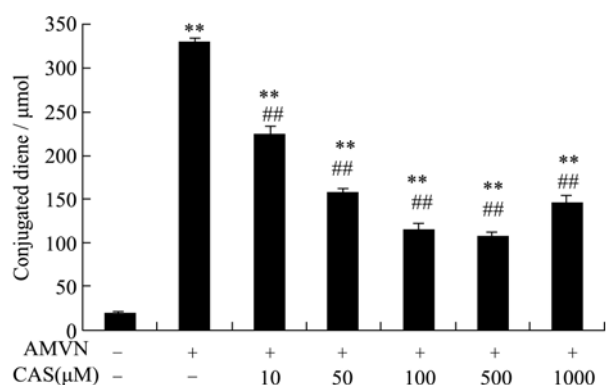


图 9 辣椒碱对烷氧自由基诱导亚油酸过氧化过程中共轭二烯生成的影响

Fig.9 Effect of capsaicin on alkoxy radical-induced formation of conjugated diene during LA peroxidation

注：\*\*表示相对空白组， $p < 0.01$ ；##表示相对 AMVN 处理组， $p < 0.01$ 。

AMVN 热分解可产生烷氧自由基，烷氧自由基也可通过自由基链式反应引发脂质过氧化。由图 9 可知，辣椒碱（10~1000 μM）能显著（ $p < 0.01$ ）抑制共轭二烯的生成，且呈浓度依赖性。当其浓度为 10 μM、50 μM、100 μM 和 500 μM 时，对共轭二烯生成的抑制率分别为 34.4%、55.1%、68.6%和 71.5%。

## 2.9 辣椒碱对烷氧自由基诱导亚油酸过氧化

过程中 TBARS 生成的影响

由图 10 可知，在 AMVN 诱导体系中，辣椒碱（10~1000 μM）可以显著（ $p < 0.01$ ）抑制 TBARS 的生成，且其浓度较低时（10~100 μM），抑制作用呈浓度依赖性，其浓度较高时（100~1000 μM），抑制作用增加不明显。当添加浓度为 10 μM、50 μM 和 100 μM 时，辣椒碱对 TBARS 生成的抑制率分别为 30.0%、47.2%和 53.1%。

脂质的过氧化，主要是指多不饱和脂肪酸中，邻近双键 α 碳上的氢键键能很小，易在羟自由基、烷氧

自由基等自由基的激发下，生成脂质氢过氧化物并最终分解为丙二醛等活性醛类物质<sup>[15]</sup>。辣椒碱的酚羟基可提供质子并捕捉自由基<sup>[14]</sup>，从而抑制脂质的过氧化。

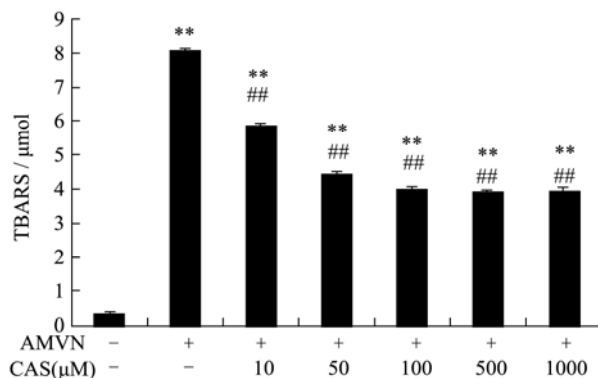


图 10 辣椒碱对烷氧自由基诱导亚油酸过氧化过程中 TBARS 生成的影响

Fig.10 Effect of capsaicin on alkoxy radical-induced formation of TBARS during LA peroxidation

注：\*\*表示相对空白组， $p < 0.01$ ；##表示相对 AMVN 处理组， $p < 0.01$ 。

## 2.10 辣椒碱对 AAPH 诱导 DNA 氧化损伤的

影响

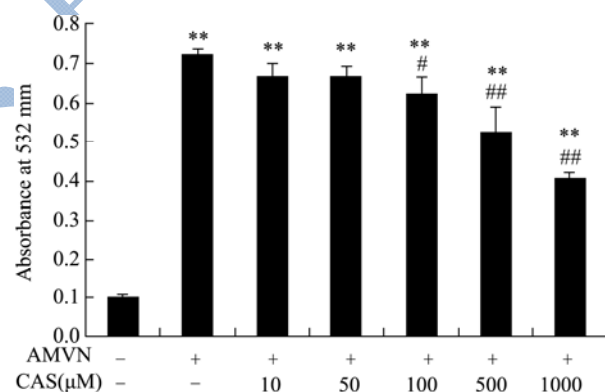


图 11 辣椒碱对 AAPH 诱导 DNA 氧化损伤产物的影响

Fig.11 Effect of capsaicin on oxidative DNA damage induced by AAPH

注：\*表示相对空白组， $p < 0.05$ ；\*\*表示相对空白组， $p < 0.01$ ；##表示相对 AAPH 处理组， $p < 0.01$ 。

AAPH 热分解产生的自由基能攻击 DNA 引发 DNA 氧化损伤，通过测定产物在 532 nm 处的吸光度值可判断 DNA 氧化损伤程度。由图 11 中可以看出，在 AAPH 诱导体系中，较低浓度的辣椒碱（10~50 μM）对 DNA 的氧化损伤没有显著的抑制作用，较高浓度的辣椒碱（100~1000 μM）能呈浓度依赖型的显著（ $p < 0.05$ ）抑制 DNA 的氧化损伤。

### 3 结论

本研究表明辣椒碱对不同种类自由基引发的蛋白质氧化降解、羰基化修饰和硝基化修饰, 脂质过氧化和 DNA 氧化损伤均有显著抑制作用, 且该抑制作用在一定的浓度范围内呈现为浓度依赖型。根据实验推测辣椒碱可能是通过阻断自由基生成的链式反应, 抑制自由基对生物大分子的氧化损伤, 其具体的反应机制还需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 刘菲菲,王兵,曹建新.辣椒碱应用研究进展[J].食品工业科技,2012,33(16):368-371  
LIU Fei-fei, WANG Bing, CAO Jian-xin. Research progress in the application of capsaicinoid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(16): 368-371
- [2] 张克玲,伊恋,黄硕,等.辣椒素对脑血管病危险因素的影响及其镇痛止痒作用[J].中国临床神经科学,2012,20(2):233-235  
ZHANG Ke-ling, YI Lian, HUANG Shuo, et al. Effects of capsaicin on risk factors in cerebrovascular disease and the action of relieving pain and alleviating itching [J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2012, 20(2): 233-235
- [3] Kuo-shuen Chen, Pei-ni Chen, Yih-shou Hsieh, et al. Capsaicin protects endothelial cells and macrophage against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action [J]. Chemico-Biological Interactions, 2015, 228: 35-45
- [4] Long Zheng, Jia-qi Chen, Zhen-kun Ma. Capsaicin causes inactivation and degradation of the androgen receptor by inducing the restoration of miR-449a in prostate cancer [J]. Oncology Reports, 2015, 34(2): 1027-1034
- [5] 刘安,王振,刘林峰,等.辣椒碱体外抗氧化作用研究[J].食品与机械,2015,6:179-181  
LIU An, WANG Zhen, LIU Lin-feng, et al. Antioxidant activity of capsaicin *in vitro* [J]. Food & Machinery, 2015, 6: 179-181
- [6] 费燕.创新药物西那沙星与生物大分子的相互作用机制研究[D].上海:第二军医大学,2008  
FEI Yan. Studies of the interaction mechanisms between sinafloxacin and bio-macromolecules [D] Shanghai: The Second Military Medical University, 2008
- [7] 李培峰,方允中,陈吉中,等.过氧化氢对铜锌超氧化物歧化酶结构损伤作用的进一步研究[J].生物化学杂志,1993,9(4): 417-423  
LI Pei-feng, FANG Yun-Zhong, CHEN Ji-Zhong, et al. Further study on the structure of damage of yak erythrocyte superoxide dismutase by hydrogen peroxide [J]. Biochemical Journal, 1993, 9(4): 417-423
- [8] Hiroshi Maeda. The link between infection and cancer: Tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect [J]. Cancer Science, 2013, 104(7): 779-789
- [9] Sarah J Storr, Caroline M Woolston, Yi-min Zhang, et al. Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, 18(18): 2399-2408
- [10] Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts [J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 21-29
- [11] Silva B A, Ferreres F, Malva J O, et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts [J]. Food Chemistry, 2005, 90(1-2): 157-167
- [12] Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein [J]. Free Radical Research Communications, 1989, 6(1): 67-75
- [13] Sattler W, Malle E, Kostmer G M. Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins [J]. Methods in Molecular Biology, Humana Press New Jersey, 1998, 110: 167-187
- [14] Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols [J]. Nutrients, 2010, 2(12): 1231-1246
- [15] Perluigi M, Coccia R, Butterfield D A. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2012, 217(11): 1590-1609