

地笋抗氧化活性的研究

聂波¹, 何国荣², 刘勇³, 杜冠华², 梁鑫淼⁴, 肖培根^{5*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 中医内科学教育部暨北京市重点实验室, 北京 100700; 2. 中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 3 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 4. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 5. 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

[摘要] 目的: 对地笋进行抗氧化活性的研究, 并筛选其主要的活性部位。方法: 采用高通量活性筛选技术, 以清除二苯代苦味酰肼(DPPH)和超氧阴离子自由基能力、还原 Fe³⁺ 能力及抑制脂质过氧化能力为指标, 评价地笋乙醇总提取物及不同极性部位的抗氧化能力。结果: 地笋乙酸乙酯部位和正丁醇部位具有较强的清除超氧阴离子自由基能力、抑制脂质过氧化能力和还原 Fe³⁺ 能力。结论: 地笋及其不同极性部位具有一定的抗氧化活性, 这可以用来解释其在传统应用中的抗炎、抗癌作用。本研究为地笋药效物质基础和药理作用机制的研究提供思路, 为其临床应用提供科学依据。

[关键词] 地笋; 抗氧化; 自由基

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0176-03

地笋(*Rhizoma Lycopi*) 异名旱藕、地藕(广东、广西、四川)、地笋等, 为唇形科植物毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Turcz var. *hirtus* Regel. 和地瓜儿苗 *L. lucidus* Turcz. 的地下根茎。始载于《嘉祐本草》, 其味甘, 性辛、温。具有活血、益气、消水的功能。用于治疗吐血, 衄血, 产后腹痛带下等症。由于地笋含有丰富的淀粉、蛋白质、矿物质, 还含有泽兰糖、葡萄糖、丰乳糖、蔗糖、水苏糖等, 是一种药食同源的植物。目前对其作为中药的研究尚属起步阶段, 国内仅有几篇关于地笋抗炎、抗应激能力、改变红细胞压积作用以及抗心脑血管疾病等活性方面的报道^[1]。本文以地笋为研究对象, 以清除 DPPH 自由基和超氧阴离子能力、还原 Fe³⁺ 能力及抑制脂质氧化能力为指标, 对地笋及其不同极性部位进行抗氧化的筛选研究, 旨在确认地笋是否具有抗氧化活性, 并筛选抗氧化活性部位, 指导药效物质基础和药理作用机制的研究, 为其临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 药物和试剂 DPPH(Sigma); 维生素 C(VitC, Sigma); NADH(Sigma); 鲁米诺(Sigma); 十二烷基磺酸钠(SDS, Sigma); 硫代巴比妥酸(TBA, Sigma); 牛血清白蛋白(BSA, Sigma); 福林酚(北京鼎国化学试剂公司); TMS 缓冲液(Tris-HCl 0.05 mmol · L⁻¹, 蔗糖 0.2 mmol · L⁻¹, MgCl₂ 溶液 3 mmol · L⁻¹, pH7.4); TBA 反应液(TBA0.67%, TCA10%, SDS5%); FeSO₄ 溶液, 20 μmol · L⁻¹; L-半胱氨酸溶液: 1 mmol · L⁻¹; α-tocopherol(Sigma); FeCl₃(北京化学试剂公司); 邻菲罗林(北京化学试剂公司), 其它常用试剂均为国产分析纯。地笋产于陕西, 西安德施普生物制品有限公司提供, 经中国医学科学院 & 中国协和医科大学药用植物研究所肖培根院士鉴定为毛叶地瓜儿苗 *L. lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. 的地下根茎。

1.2 仪器 Zenyth200st UV-Vis spectrophotometer (Anthos Co. Austria); Topcount 化学发光测定仪; BMG 96 孔发光测定板; 微量移液枪; 振荡器; 高速冷冻离心机(Hitiachi 公司)。

1.3 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重(200 ± 20) g, 购自中国医学科学院动物研究所, 动物生产许可证 SCXK(京) 2005-0013。

2 方法

2.1 供试品的制备 将地笋药材分别用 70% (V/

[收稿日期] 2010-02-26

[通讯作者] 肖培根, 教授, 院士, 研究方向: 药用植物亲缘学研究和中药信息学, Tel: (010) 62818235, E-mail: xiaopg@public.bta.net.cn

[第一作者] 聂波, 中药学博士, 助理研究员, 研究方向: 中药化学与中药药理, Tel: (010) 84013190, E-mail: nieboww_1977@163.com

V) 乙醇提取两次后, 合并滤液, 浓缩干燥, 得干粉, 为地笋总提物。将总提物水混悬后, 依次用石油醚、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取, 得到石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位。各部位干燥后, 分别用二甲基亚砜(DMSO)溶解, 配制成浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。

2.2 清除 DPPH 自由基活性试验 抗氧化活性以清除 DPPH 自由基能力大小表示。以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为初筛浓度, 测定地笋及其不同极性部位清除脂性自由基 DPPH 的活性。取一块 costar 96 孔板, 加入新鲜配制的 DPPH 乙醇溶液 ($6.5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $190 \mu\text{L}$ /孔, 加入待测样品 $10 \mu\text{L}$ /孔, 空白孔加 $10 \mu\text{L}$ 生理盐水, 充分混匀, 封板膜封板后室温下避光静置 30 min, Zenyth200st 比色测定仪上测定各孔吸光度值, 测定波长 517 nm。以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为初筛浓度, 对初筛清除率大于 50% 的样品, 进行复筛, 并求半数清除浓度 (IC_{50})。各样品对脂性自由基 DPPH 清除率按下式计算:

$$\text{DPPH 清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$: 空白对照组吸光度值; $A_{\text{样品}}$: 加样品组吸光度值。

2.3 清除超氧阴离子活性试验 采用鲁米诺增强化学发光法测定 PMS/NADH 体系生成的超氧阴离子。实验反应总体积为 $100 \mu\text{L}$, 反应体系中包括: NADH ($73 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), PMS ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), luminol ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 硼砂/盐酸缓冲液 ($0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.91) 及不同浓度的样品。将待测样品及各反应试剂加入 BMG 不透明 96 孔板, 反应由 PMS 引发, 反应液振荡混匀后立即上 Topcount 化学发光测定仪检测发光强度值 (count per second, CPS), 测定温度 19.1°C , 每孔测定 3 s。以 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为初筛浓度, 对初筛清除率大于 50% 的样品, 进行复筛, 并求半数清除浓度 (IC_{50})。各样品对超氧阴离子的清除率按下式计算:

$$\text{清除率} = (\text{CPS}_{\text{空白}} - \text{CPS}_{\text{样品}}) / \text{CPS}_{\text{空白}} \times 100\%$$

$\text{CPS}_{\text{空白}}$: 空白对照组化学发光强度值; $\text{CPS}_{\text{样品}}$: 加样品组化学发光强度值。

2.4 还原 Fe^{3+} 能力测定 待测样品还原能力的测定根据文献^[2]方法改进。以去离子水分别配制 $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 FeCl_3 和邻菲罗林溶液, 于实验前将二者按 1:1 体积比混合。混合液加入 96 孔细胞培养板, $90 \mu\text{L}$ /孔, 然后加入不同浓度的待测样品 $10 \mu\text{L}$ /孔, 阳性对照组加入 Vit C, 空白对照组以去

离子水代替待测样品。振荡混匀后于室温下静置 30 min, 用 Zenyth 200rt 可见/紫外全波长分光光度计测定各孔吸光度值, 测定波长 516 nm。

2.5 抑制脂质过氧化实验

2.5.1 大鼠肝微粒体的提取^[3] 大鼠禁食不禁水过夜, 断头处死。用冷 TMS 缓冲液经肝门静脉冲洗肝脏, 至肝脏变为土黄色。迅速取出肝脏剔除筋膜并剪碎, 于冰浴下用玻璃匀浆器制成肝匀浆 (5mL TMS/g 肝脏)。匀浆于 1000g , 4°C 离心 5 min, 取上清, 于 $1.2 \times 10^4 \text{g}$, 4°C 离心 20 min, 再取上清于 $1.05 \times 10^5 \text{g}$, 4°C 离心 60 min, 沉淀即为肝微粒体。将其重悬于 TMS 缓冲液中, 用 Lowry 法进行微粒体蛋白定量, 并稀释至蛋白含量为 $15 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。肝微粒体储存于 -20°C 冰箱备用。

2.5.2 Fe^{2+} -半胱氨酸反应系统诱导肝微粒体脂质过氧化^[6] TMS 稀释肝微粒体使蛋白浓度为 $1500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 96 孔板测样品抗脂质过氧化活性。反应液总体积 $100 \mu\text{L}$ (肝微粒体 $50 \mu\text{L}$; FeSO_4 $20 \mu\text{L}$; 半胱氨酸 $20 \mu\text{L}$, 不同被试物质 $10 \mu\text{L}$, 空白对照加等体积生理盐水), 混匀后, 37°C 孵育 30 min, 然后加入 $100 \mu\text{L}$ TBA 反应液, 封板膜封 96 孔板后 60°C 水浴加热 30 min, 在 Zenyth200st 上测各孔吸光度值, 测定波长 532 nm。以 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为初筛浓度, 对初筛清除率大于 50% 的样品, 进行复筛, 并求半数清除浓度 (IC_{50})。按以下公式计算样品对硫酸亚铁/半胱氨酸诱导的肝微粒体脂质过氧化反应的抑制活性:

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$: 空白对照组吸光度值; $A_{\text{样品}}$: 加样品组吸光度值。

2.6 统计学分析 数据来自 3 次独立实验, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间采用 t 检验, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

3 结果

地笋及其不同极性部位具有一定的抗氧化活性, 在清除超氧阴离子能力、抑制脂质过氧化及还原 Fe^{3+} 能力方面表现出较强的活性, 而清除 DPPH 自由基活性较弱, 其中乙酸乙酯部位和水饱和正丁醇部位的能力相对较强。清除超氧阴离子能力较强的为地笋总提物、乙酸乙酯部位和水饱和正丁醇部位, 但弱于 Vit C。乙酸乙酯部位和水饱和正丁醇部位在抑制脂质过氧化及还原 Fe^{3+} 能力方面均强于其

他部位。其中, 还原 Fe^{3+} 实验中高浓度活性均强于低浓度活性, 结果见表 1。

表 1 地笋及不同极性部位抗氧化活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

	DPPH		超氧阴离子		脂质过氧化		还原 Fe^{3+} 能力 / A	
	清除率 / %	$\text{IC}_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	清除率 / %	$\text{IC}_{50} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	抑制率 / %	$\text{IC}_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	25	50
总提物	21.07	—	78.34	16.51 \pm 2.76	16.92	—	0.135 8 \pm 0.031 0	0.240 0 \pm 0.039 1
石油醚部位	6.19	—	41.07	—	13.22	—	0.091 3 \pm 0.008 2	0.093 0 \pm 0.020 0
乙酸乙酯部位	40.94	—	79.18	38.30 \pm 5.52	67.14	45.95 \pm 3.97	0.448 3 \pm 0.098 3 ¹⁾	0.644 3 \pm 0.081 0 ¹⁾
正丁醇部位	28.49	—	80.78	27.91 \pm 5.36	58.12	52.97 \pm 1.01	0.202 3 \pm 0.023 3 ¹⁾	0.307 8 \pm 0.057 6 ¹⁾
水部位	5.05	—	25.57	—	22.53	—	0.111 3 \pm 0.004 8	0.172 3 \pm 0.069 7
Vitc	86.53	15.03 \pm 1.57	90.88	3.43 \pm 0.38	—	237.8 \pm 8.45	0.878 7 \pm 0.043 0	0.966 3 \pm 0.012 2
正常对照	—	—	—	—	—	—	0.190 9 \pm 0.004 8	—

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$

4 讨论

地笋目前作为一种药食同源的植物, 广泛被我国人民食用。西安德施普生物制品有限公司从地笋中提取大量的低聚糖并开发出泽兰低聚半乳糖和泽兰水苏糖等产品, 通过增殖体内有益菌, 恢复或重建肠道微生态平衡, 对于提高机体免疫力、改善肠道菌群失调和糖尿病具有良好的防病治病功效, 作者以前的研究工作表明其地上部位泽兰具有良好的抗氧化活性, 本文对地笋进行了初步的药理作用探讨, 证明地笋具有较强的抗氧化作用。

地笋及其不同极性部位在清除 DPPH 自由基和超氧阴离子能力、抑制脂质过氧化及还原 Fe^{3+} 能力实验中表现出明显不同的活性。总体看, 乙酸乙酯部位和正丁醇部位在 4 个抗氧化活性实验中表现出一致的活性能力, 均强于总提物和其他部位, 说明地笋抗氧化活性成分是中等极性或稍高极性的化合物, 且总提物经过该萃取后, 活性成分得到了有效富集, 由此, 筛选出地笋抗氧化活性部位是乙酸乙酯和正丁醇部位。地笋在传统应用中的抗炎、抗癌作用

可能与其对自由基的清除作用有关, 并且其活性成分可能主要集中在乙酸乙酯部位和正丁醇部位。本文为地笋的药效物质基础和药理作用机制的研究提供了思路, 为其临床应用提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 周宁娜, 杨秀英, 淤泽溥. 地笋的急性毒性和部分药效学实验 [J]. 云南中医学院学报, 1998, 21(1): 6.
- [2] Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species [J]. Free Radic Res Commun, 1991, 15(5): 255.
- [3] Balanehru S, Nagarajan B. Intervention of adriamycin induced free radical damage [J]. Biochem Int, 1992, 28(4): 735.
- [4] Sun S Y, Xu B, Li Q J, et al. One-step microassay for the measurement of anti-lipid peroxidation in 96-well plate [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1995, 22(2): 165.

[责任编辑 何伟]