

漏芦醇提取物的体外抗氧化作用

全吉华¹,金延华²,尹学哲^{2*}

(1. 延边脑康医院,吉林 延吉 133000; 2. 延边大学附属医院,吉林 延吉 133000)

〔摘要〕 目的:研究祁州漏芦醇提取物的抗氧化活性。方法:以高铁还原法检测祁州漏芦醇提取物对肝组织总抗氧化能力的影响,以硫代巴比妥酸(TBA)法检测对肝组织的抗脂质过氧化作用。结果:漏芦醇提取物浓度依赖性地增高肝匀浆总抗氧化能力,同时浓度依赖性地抑制肝组织脂质过氧化作用,其对H₂O₂、·OH和Fe²⁺诱导的肝匀浆脂质过氧化作用的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为56.4,144.2,355.6 mg·L⁻¹;对H₂O₂和Fe²⁺诱导的肝线粒体脂质过氧化作用的IC₅₀分别为781,36.3 mg·L⁻¹。结论:漏芦醇提取物具有体外抗氧化作用。

〔关键词〕 祁州漏芦;醇提取物;抗氧化;脂质过氧化
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2011)06-0197-03

Antioxidative Effect of Ethanol Extract of *Rhaponticum uniflorum*

QUAN Ji-hua¹, JIN Yan-hua², YIN Xue-zhe^{2*}

(1. Yanbian Brain Health Center, Yanji 133000, China; 2. Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the antioxidative effect of ethanol extract of *Rhaponticum uniflorum*. **Method:** The effect of *R. uniflorum* ethanol extract on the total antioxidant capacity of liver was determined by ferric reducing method, and the anti-lipid peroxidative activity was detected by thiobarbituric acid (TBA) method. **Result:** *R. uniflorum* ethanol extract concentration-dependently elevated the total antioxidant capacity of liver homogenate, inhibited the lipid peroxidation of liver homogenate induced by H₂O₂, ·OH and Fe²⁺ with the IC₅₀s of 56.4, 144.2 and 355.6 mg·L⁻¹, respectively, and inhibited the lipid peroxidation of liver mitochondria induced by H₂O₂ and Fe²⁺ with the IC₅₀s of 781 and 36.3 mg·L⁻¹, respectively. **Conclusion:** The ethanol extract of *R. uniflorum* has an antioxidative effect *in vitro*.

〔Key words〕 *Rhaponticum uniflorum*; ethanol extract; antioxidation; anti-lipid peroxidative

漏芦为菊科植物 *Rhaponticum uniflorum* (L) DC. 的根,主治乳腺炎,乳汁不通,腮腺炎,风湿性关节炎和痔疮^[1]。研究表明,漏芦具有提高细胞免疫、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗衰老等作用^[2-3]。本文探讨了漏芦的体外抗脂质过氧化作用,为中药漏芦的开发提供科学依据。

1 材料
总抗氧化能力(TAOC)试剂盒(批号20080612)、丙二醛(MDA)(批号20100319)和蛋白质测试盒(批号20080613)购自南京建成生物工程研究所,试剂均为国产分析纯。U-2010型紫外分光光度仪(日本岛津公司)和HITACHI himac cp 100α超速离心机(日本日立公司)。

漏芦采自吉林省长白山,由延边大学药学院刘勇镇教授鉴定。将2 kg漏芦切碎后,用90%乙醇回流提取2 h,滤液经减压浓缩即得漏芦乙醇提取物0.174 kg,得率为8.7%。

2 方法
2.1 动物及动物样品的制备 家兔12只,4月龄,

〔收稿日期〕 20101029(008)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(30360113);吉林省科技发展计划项目(200705426)
〔第一作者〕 全吉华,护师,研究方向:临床护理教学与科研,E-mail:jihua128@sina.com
〔通讯作者〕 *尹学哲,教授,博士,研究方向:临床医学教学与科研,E-mail:yinxz@ybu.edu.cn

体重 2.0 ~ 2.5 kg,雌雄不限,由延边大学医学部动物科提供,合格证号 SCXK(吉)2007-0004。将家兔肝用冷生理盐水清洗,冰浴制成 10% 肝匀浆悬液,4℃ 保存备用。将肝匀浆悬液于 3 000 × g 离心 20 min,沉淀洗 2 次,合并上清液,再于 1 万 × g 离心 20 min,所得沉淀洗 2 次后,用 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液配成含蛋白质 1.25 g·L⁻¹ 的肝线粒体悬液,4℃ 保存备用。

2.2 总抗氧化能力的测定^[4] 肝匀浆悬浮液 1 mL 中加入不同浓度漏芦醇提取物溶液 0.1 mL,混匀后于 37℃ 预热 10 min。按试剂盒操作方法测定 520 nm 处的吸光度(*A*_{520 nm}),计算 TAOC 单位数。每分钟每毫升样品溶液使反应体系的 *A*_{520 nm} 增加 0.01 定义为一个 TAOC 单位(U)。

2.3 抗脂质过氧化活性的测定 肝匀浆或肝线粒体悬浮液 1 mL 中加入不同浓度漏芦醇提取物溶液 0.1 mL,混匀后于 37℃ 预热 10 min。按参考文献方法^[4],分别加入 60 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 0.1 mL 或 6 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 0.1 mL 或 6 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 0.1 mL 和 60 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 40 μL 启动脂质过氧化反应。37℃ 孵育 1 h 后,加入 15% 三氯乙酸 1 mL 终止反应。最后加 0.67% TBA 1 mL,煮沸 15 min,冷却后离心,测上清液 *A*_{532 nm},计算 MDA 生成量和抑制率(IR)。

$$IR = (A_{\text{模型}} - A_{\text{测定}}) / (A_{\text{模型}} - A_{\text{正常}}) \times 100\%$$

2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析,*P* < 0.05 具有显著性差异。

3 结果

3.1 漏芦醇提取物对肝匀浆总抗氧化能力的影响 见图 1。在化学模拟体系中,4 g·L⁻¹ 漏芦醇提取物的总抗氧化能力为 13.2 U,是等浓度维生素 C

的 3.5 倍。在此基础上,本试验主要考察了漏芦醇提取物对肝匀浆总抗氧化能力的影响。在供试浓度范围内,漏芦醇提取物可明显提高肝匀浆体系的总抗氧化能力(*P* < 0.01),且肝匀浆总抗氧化能力随漏芦醇提取物浓度升高而增高。漏芦醇提取物质量浓度小于 0.5 g·L⁻¹ 时,回归方程为 *Y* = 54.401*X* + 6.530 5, *R*² = 0.981 1;其在 0.5 ~ 2.0 g·L⁻¹ 时回归方程为 *Y* = 19.535*X* + 23.264, *R*² = 0.999 6;呈明显的量效关系。

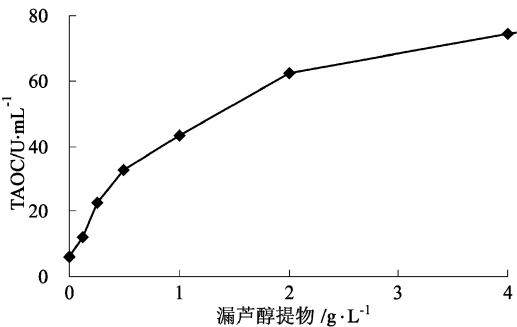


图 1 漏芦醇提取物对肝匀浆总抗氧化能力的影响

3.2 漏芦醇提取物对 H₂O₂、·OH 以及 Fe²⁺ 诱导的肝匀浆脂质过氧化作用的影响 见表 1。经 H₂O₂、·OH 或 Fe²⁺ 诱导后,模型组肝匀浆 MDA 增高,与正常对照组相比,差异均非常显著(*P* < 0.01),说明 H₂O₂、·OH 和 Fe²⁺ 可促使肝匀浆体系中脂质发生过氧化反应。在一定浓度范围内,漏芦醇提取物明显抑制肝匀浆体系 MDA 的生成(*P* < 0.01),且抑制率随漏芦醇提取物浓度的增加而增高,呈浓度依赖性。根据回归方程测得,漏芦醇提取物对 H₂O₂、·OH 和 Fe²⁺ 诱导的肝匀浆体系脂质过氧化作用的 IC₅₀ 分别为 56.4,144.2,355.6 mg·L⁻¹。

表 1 漏芦醇提取物对 H₂O₂、Fe²⁺ 和 ·OH 诱导的肝匀浆脂质过氧化作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物质量浓度 /g·L ⁻¹	H ₂ O ₂ 诱导		Fe ²⁺ 诱导		·OH 诱导	
		MDA/mmol·L ⁻¹	抑制率/%	MDA/mmol·L ⁻¹	抑制率/%	MDA/mmol·L ⁻¹	抑制率/%
对照	—	0.64 ± 0.01	—	0.53 ± 0.00	—	0.80 ± 0.01	—
模型	—	2.79 ± 0.02 ¹⁾	—	0.94 ± 0.01 ¹⁾	—	4.89 ± 0.02 ¹⁾	—
药物	0.025	2.31 ± 0.04 ²⁾	22.3	0.92 ± 0.04 ²⁾	18.6	4.06 ± 0.02	20.4
	0.05	1.82 ± 0.09 ²⁾	45.2	0.85 ± 0.09 ²⁾	22.7	3.45 ± 0.03 ²⁾	32.6
	0.1	1.05 ± 0.04 ²⁾	80.7	0.79 ± 0.04 ²⁾	36.6	2.97 ± 0.02 ²⁾	47.1
	0.2	0.64 ± 0.01 ²⁾	99.7	0.77 ± 0.09 ²⁾	42.8	2.19 ± 0.04 ²⁾	66.2
	0.5	0.24 ± 0.04 ²⁾	109.4	0.71 ± 0.04 ²⁾	56.7	1.52 ± 0.04 ²⁾	82.6
	1.0	0.27 ± 0.03 ²⁾	116.9	0.66 ± 0.03 ²⁾	68.6	0.26 ± 0.01 ²⁾	113.4

注:与对照组相比¹⁾ *P* < 0.01;与模型组相比²⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

表 2 漏芦醇提取物对 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 诱导的肝线粒体脂质过氧化作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物质量浓度 /g·L ⁻¹	H ₂ O ₂ 诱导		Fe ²⁺ 诱导	
		MDA/mmol·L ⁻¹	抑制率/%	MDA/mmol·L ⁻¹	抑制率/%
对照	—	0.28 ± 0.01	—	0.49 ± 0.00	—
模型	—	3.62 ± 0.02 ¹⁾	—	1.48 ± 0.03 ¹⁾	—
药物	0.01	3.26 ± 0.02 ²⁾	11.4	1.37 ± 0.02 ²⁾	11.0
	0.025	3.19 ± 0.02 ²⁾	12.7	1.13 ± 0.01 ²⁾	35.1
	0.05	3.14 ± 0.03 ²⁾	14.5	0.78 ± 0.02 ²⁾	70.3
	0.1	2.92 ± 0.01 ²⁾	20.9	0.49 ± 0.02 ²⁾	99.8
	1.0	1.63 ± 0.02 ²⁾	59.4	—	—
	10.0	1.11 ± 0.01 ²⁾	75.1	—	—

3.3 漏芦醇提取物对 H₂O₂ 或 Fe²⁺ 诱导的肝线粒体脂质过氧化作用的影响 见表 2。分别经 H₂O₂ 或 Fe²⁺ 诱导后,所有模型组肝线粒体 MDA 生成也均有增高 ($P < 0.01$),而漏芦醇提取物则明显抑制肝线粒体 MDA 生成 ($P < 0.01$),且呈一定浓度依赖性。根据回归方程测得,漏芦醇提取物对 H₂O₂ 和 Fe²⁺ 诱导的肝线粒体脂质过氧化作用的 IC₅₀ 分别为 781,36.3 mg·L⁻¹。

4 讨论

活性氧自由基引发的体内脂质过氧化是机体衰老和癌变的重要原因。在自由基和活性氧作用下,诱发多不饱和脂肪酸氧化,破坏生物膜的结构和功能,从而造成组织细胞及机体的病变和死亡。MDA 是脂质过氧化物的主要分解产物,其含量常常反映组织脂质过氧化程度,也间接反映组织受自由基攻击的严重程度。所以测定 MDA 可以判断受试物是否具有阻断自由基链式反应的能力和抗氧化的损伤效应。本试验结果表明,漏芦醇提取物具有的较强总抗氧化能力,同时可浓度依赖性地抑制 H₂O₂, Fe²⁺ 以及·OH 所诱导的肝线粒体和肝匀浆体系的脂质过氧化发生。漏芦醇提取物对 Fe²⁺ 所致肝线粒体脂质过氧化作用的半数抑制浓度约为 36.3 mg·L⁻¹,以肝线粒体体系中的终浓度来表示,即为 3.3 mg·L⁻¹,体外抗脂质过氧化作用非常显著。

现代研究表明,漏芦含化学成分主要有蜕皮甾酮类、黄酮类、三萜皂苷、挥发油和有机酸等^[8],而黄酮类化合物的抗氧化作用早已被证明。因此,漏芦醇提取物的抗氧化作用的机制之一可能为漏芦醇提取物中所含黄酮、齐墩果酸和蜕皮甾酮等成分通过捕捉脂质过氧化链式反应中产生的活性氧,减少脂质过氧化反应链式反应。而体外抗脂质过氧化的研究只能反映药物抗氧化作用的一个侧面,因此,漏芦作为一种潜在的抗氧化功能食品有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:919.
[2] 邹莉波,杜立阳,董爱梅,等. 祁州漏芦乙醇提取物益智作用的实验研究[J]. 沈阳药学院学报,2003, 20 (2):139.
[3] 张学武,李天洙,孙权. 漏芦提取物抗炎、镇痛、耐缺氧及抗疲劳作用的研究[J]. 四川中医,2005, 23 (7):22.
[4] 尹学哲,李天,汪霞. 大豆皂醇抗脂质过氧化作用的研究[J]. 食品工业科技,2010, 31(7):143.
[5] 布日额,东格尔道尔吉,其其格玛. 漏芦属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国民族民间医药杂志, 2004, 70:291.

[责任编辑 邹晓翠]