

## 柴胡疏肝散醇提物的抗氧化活性

任鹏, 王林林, 许飞虹, 于亚青, 张丹参, 张万明\*

(河北北方学院药学院, 河北 张家口 075000)

**[摘要]** **目的:**研究柴胡疏肝散醇提物的体外自由基清除能力和体内抗氧化活性。**方法:**体外抗氧化实验测定了柴胡疏肝散醇提物对 1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH)、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )和超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除能力;体内抗氧化实验,小鼠随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散水提组( $8.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、柴 a 组( $1.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、柴胡疏肝散醇提物低、中、高剂量组( $4.1, 8.2, 20.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),除正常组外,其余组小鼠每天接受不可预见性温和应激,共 28 d。造模 1 周后灌胃给药,研究柴胡疏肝散醇提物对小鼠的肝组织中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响,并与水提物做比较,评价其体内抗氧化活性。**结果:**体外抗氧化实验表明,柴胡疏肝散醇提物对 DPPH,  $\cdot\text{OH}$  和  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除率随着浓度的增大而增大,其对自由基清除率达到半数时的抗氧化剂浓度( $\text{EC}_{50}$ )分别为  $0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $35.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $52.17\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;体内实验表明,模型组小鼠肝脏中 SOD, CAT 酶活性显著低于正常组( $P < 0.01$ )。给药剂量越大, SOD, CAT 酶活性越高,在本实验设定的给药浓度范围内,呈现一定的量效关系。与水提组相比,具有同等生药量的醇提物  $8.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  组 SOD, CAT 酶活性显著较高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),说明醇提物的抗氧化作用较水提物高。**结论:**柴胡疏肝散醇提物具有较强的抗氧化生物活性。

**[关键词]** 柴胡疏肝散; 抗氧化活性; 自由基

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0161-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014100161

## Antioxidative Activities of Ethanol Extracts from Chaihu Shugan Powder

REN Peng, WANG Lin-lin, XU Fei-hong, YU Ya-qing, ZHANG Dan-shen, ZHANG Wan-ming\*

(Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate *in vitro* radical scavenging activity and *in vivo* antioxidant activities

**[收稿日期]** 20131107(017)

**[基金项目]** 河北省教育厅基金项目(z2008106);河北北方学院基金项目(2001017)

**[第一作者]** 任鹏,在读硕士生,从事药物分析、药理学研究, Tel:15369333626, E-mail:renpeng201264@163.com

**[通讯作者]** \*张万明,教授,硕士生导师,从事药物分析、药理学研究, Tel:13582638180, E-mail:zwm19650228@163.com

- [9] 孟凡星,王志军,罗瑶,等. 氧诱导视网膜病变小鼠模型的建立与评价[J]. 暨南大学学报, 2011, 32(2):199.
- [10] Ozaki H, Yu A Y, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(1):182.
- [11] 徐寒松,孔德明,向慧. 通脉糖眼明胶囊对单纯型糖尿病视网膜病变患者 VEGF 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):229.
- [12] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- $\alpha$  [J]. J Biol Chem, 2003, 278(18):15911.
- [13] Smith L E, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35:101.
- [14] 付浴东,周占宇,万金娥,等. Avastin 玻璃体腔注射对小鼠氧诱导视网膜病变新生血管的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(11):988.
- [15] Pierce E A, Foley E D, Smith L E, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity [J]. Arch Ophthalmol, 1996, 114(10):1219.

[责任编辑 聂淑琴]

of ethanol extracts from Chaihu Shugan powder (CSPEE). **Method:** The antioxidant activities of CSPEE *in vitro* were measured by the methods of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2, 2-Diphenyl-1- (2, 4, 6-trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH) free radicals scavenging capacity, hydroxyl radicals scavenging capacity, and superoxide anion radicals scavenging capacity. The antioxidant activities of CSPEE was studied *in vivo*, which is compared with the aqueous extracts of Chaihu Shugan powder. Kunming mice were used to study the catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities. **Result:** The antioxidant activities *in vitro* showed that free radical scavenging activity of CSPEE was higher. In the results of the animal experiments, the CAT and SOD activities in liver tissue were increased by CSPEE. It was suggested that the antioxidant ability of CSPEE was better than the aqueous extracts at the same drug concentration. **Conclusion:** The CSPEE owns good antioxidant activities.

[ **Key words** ] Chaihu Shugan powder; antioxidation activities; free radicals

柴胡疏肝散源于张景岳《景岳全书·古方八阵·散阵》,由柴胡、陈皮、川芎、枳壳、白芍、香附、甘草 7 味中药组成,具有疏肝解郁、行气止痛功能,主治肝气郁滞证。本课题组前期的工作优化了柴胡疏肝散的提取工艺,柴胡疏肝散醇提物有效成分的含量明显优于水提物且物质组成也发生了改变<sup>[1]</sup>。柴胡疏肝散的主要有效成分有皂苷类、黄酮类、酚酸类及萜类成分,而皂苷类、黄酮类、酚酸类成分往往具有明显的抗氧化活性。目前,关于柴胡疏肝散醇提物(以下简称醇提物)的体内外抗氧化活性研究尚未见报道,本实验从体内、外抗氧化方面评价柴胡疏肝散醇提物的抗氧化活性,为进一步研究其抗氧化与抗抑郁作用的潜在关系打下基础。

## 1 材料

**1.1 试药** 柴胡、陈皮、枳壳、白芍、香附、川芎、甘草购于天津中新药业药店,经河北北方学院中药研究所马淑兰教授鉴定。药材于干燥箱中 50 ℃ 干燥 8 h,按柴胡疏肝散复方规定比例(柴胡 60 g, 陈皮 60 g, 枳壳 45 g, 白芍 45 g, 香附 45 g, 川芎 45 g, 甘草 15 g),称量各单味药材,粉碎,过 60 目筛,置干燥器中备用。

1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(DPPH, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, Sigma 公司),抗超氧阴离子试剂盒(20130208)及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(20130208)(南京建成生物工程研究所);其他试剂均为分析纯试剂;实验用水为双重蒸馏水。

**1.2 动物** 昆明种雄性小鼠 84 只,体重(20 ± 2) g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,许可证号 SCXK-(军)2007-004。

**1.3 仪器** UV9100 型紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司),FSH-2A 型可调高速匀浆机(金坛市盛威实验仪器厂),3K30 型高速冷冻离

离心机(Sigma),Forma -86 ℃ 超低温冰箱(Thermo elecceron),DK-8B 型电热恒温水浴槽(上海精宏实验设备有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 柴胡疏肝散提取物的制备

**2.1.1 醇提物的制备**<sup>[1]</sup> 按柴胡疏肝散复方比例,称量各单味药材粉末(过 60 目筛),加入 10 倍量的 80% 乙醇,加热回流提取 90 min,提取 2 次,合并滤液,减压浓缩,冷冻干燥,得冻干粉,得率为 21.25%。将冻干粉置于干燥器中避光保存,使用时用无水乙醇配成适宜浓度,以每 1 mL 溶液中含相当于生药量的质量表示。按文献[1]以 HPLC 法测定柴胡皂苷 a(柴 a)含量。

**2.1.2 水提物制备** 提取溶剂改为水,制备方法同 2.1.1。冻干粉得率为 24.76%。使用时用蒸馏水配制所需浓度,以每 1 mL 中含相当于生药量表示。按文献[1]HPLC 法测定柴 a 含量。

### 2.2 醇提物的体外抗氧化活性研究<sup>[2-4]</sup>

**2.2.1 对 DPPH 自由基的清除作用** 2 mL 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 的 DPPH 乙醇溶液与 3 mL 不同浓度的醇提物溶液混合均匀,避光静置,室温反应 30 min。以同比例空白溶剂作为参比液,在 DPPH 反应液的最大吸收波长 528 nm 处测定吸光度(A)。按公式计算清除率(scavenging rate, SR):

$$SR = [A_1 - (A_2 - A_3)] / A_1 \times 100\%$$

其中,A<sub>1</sub>:空白管吸光度;A<sub>2</sub>:样品反应液吸光度;A<sub>3</sub>:样品液自身吸光度。

用维生素 C(VC)为阳性对照,进行平行实验。

**2.2.2 对羟自由基(·OH)的清除作用** 参考 Fenton 反应体系,用 1 mL FeSO<sub>4</sub>(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)与 1 mL 提取液样品和 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>水杨酸 1 mL 混匀,加入 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2.0 mmol·L<sup>-1</sup>),充分摇匀,在

37 ℃水浴静置 30 min,在最大吸收波长 530 nm 处测定 A。按 2.2.1 公式计算清除率 SR。VC 为对照,进行平行试验。

**2.2.3** 对超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )的清除作用 按照试剂盒说明书方法测定。用 VC 为对照,进行平行实验。以上每个实验处理,均平行测定 5 次,取各浓度下的 5 次清除率平均值绘制清除率曲线。

### 2.3 柴胡疏肝散醇提物的体内抗氧化研究

**2.3.1** 动物分组及造模给药 将小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为正常组、模型组、柴胡疏肝散水提组、柴 a 组、柴胡疏肝散醇提物低、中、高剂量组(4.1,8.2,20.5  $g \cdot kg^{-1}$ )。除正常组外,其余组小鼠每天接受不可预见性温和应激:按照文献方法<sup>[5]</sup>并加以改进,45 ℃热应激 10 min,4 ℃冷应激 5 min,夹尾,30 V 电击,水平摇摆,束缚 9 h 等刺激随机安排,每日 2 种刺激。每 7 d 为 1 个周期,共 28 d。造模 1 周后灌胃给药,水提组给予 8.2  $g \cdot kg^{-1}$  柴胡疏肝散水提物,柴 a 组给予 1.6  $g \cdot kg^{-1}$  柴胡疏肝散醇提物(柴 a 组与水提组中主要有效成分柴胡皂苷 a 的含量相同),醇提物低、中、高剂量组分别给予相应剂量柴胡疏肝散醇提物,正常组和模型组均给予等量蒸馏水,每日 1 次,给药 21 d,于末次给药 1 h 后将动物处死。

**2.3.2** 肝组织匀浆液的制备 小鼠处死后,迅速取出肝脏,用预冷至 4 ℃的生理盐水冲洗后,用滤纸吸去水分。取部分肝组织,剪碎后置于西林瓶中,添加 9 倍体积生理盐水,制成 10% 的组织匀浆,4 500  $r \cdot min^{-1}$  离心 10 min,取上清液作为待测液备用。

**2.3.3** 肝组织中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)酶活性测定 采用钼酸铵比色法。计算公式:

$$CAT \text{ 活性} = \frac{A \text{ 标准管} - A \text{ 测定管}}{A \text{ 标准管}} \times \frac{65(H_2O_2 \text{ 浓度}) \times 1 \text{ mL(基质液)}}{0.2 \text{ mL(组织匀浆)} \times \text{待测样本蛋白浓度}}$$

SOD 酶活力采用邻苯三酚法。计算公式:

$$SOD \text{ 酶活力} = \frac{A \text{ 标准管} - A \text{ 测定管}}{A \text{ 标准管}} 50\% \times \frac{\text{反应液总体积} \times \text{样品液稀释倍数}}{\text{取样量} \times \text{待测样本蛋白浓度} \times 1\ 000}$$

**2.3.4** 肝组织蛋白浓度测定 按照试剂盒说明书方法测定。

**2.4** 统计分析 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计,数据资料用 *t* 检验,并进行方差分析, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1** 对 DPPH 自由基的清除作用 柴胡疏肝散醇提物对 DPPH 的清除率随着浓度的增大而增大,且几乎呈线性,其对自由基清除率达到半数时质量浓度( $EC_{50}$ )为 0.75  $mg \cdot L^{-1}$ ,阳性对照 VC 的  $EC_{50}$  为 5.79  $mg \cdot L^{-1}$ 。见图 1。

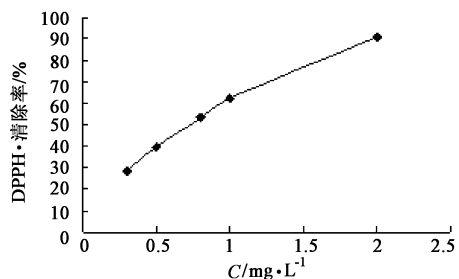


图 1 柴胡疏肝散醇提物对 DPPH 的清除率曲线

**3.2** 对  $\cdot OH$  的清除作用 柴胡疏肝散醇提物对  $\cdot OH$  的清除率随着浓度的增大而增大,随着浓度的增加,清除率增长趋势有所减缓,其  $EC_{50}$  为 35.01  $g \cdot L^{-1}$ ,VC 的  $EC_{50}$  为 0.108  $g \cdot L^{-1}$ 。见图 2。

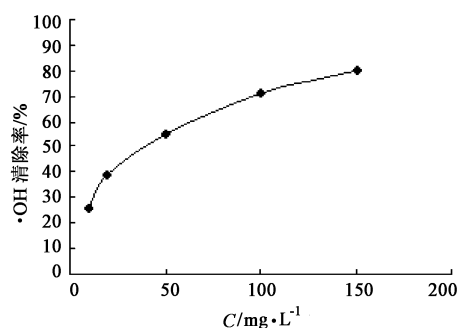


图 2 柴胡疏肝散醇提物对  $\cdot OH$  的清除率曲线

**3.3** 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除作用 柴胡疏肝散醇提物对  $O_2^{\cdot-}$  的清除率随着浓度的增大而增大,随着浓度的增加,清除率增长趋势有所减缓,其  $EC_{50}$  为 52.17  $g \cdot L^{-1}$ ,VC 的  $EC_{50}$  为 0.152  $g \cdot L^{-1}$ 。见图 3。

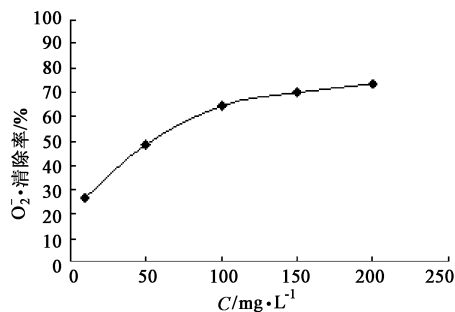


图 3 醇提物柴胡疏肝散对  $O_2^{\cdot-}$  的清除率曲线

**3.4** 小鼠体内抗氧化指标 模型组小鼠肝脏中 SOD,CAT 酶活性显著低于正常组,说明造模成功。灌胃剂量越大,SOD,CAT 酶活性越高,表明在本实

验设定的给药浓度范围内,呈现一定的量效关系。与水提组相比,具有同等生药量的中剂量组 SOD, CAT 酶活性显著较高,说明醇提物的抗氧化作用较水提物高。见表 1。

表 1 柴胡疏肝散醇提物对小鼠体内  
抗氧化指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	SOD /kU·mg <sup>-1</sup>	CAT /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	27.55 ± 5.44	278.93 ± 19.77
模型	-	20.45 ± 3.25 <sup>1)</sup>	143.22 ± 23.54 <sup>1)</sup>
柴胡疏肝散水提	8.2	23.21 ± 3.25	177.72 ± 33.40 <sup>2)</sup>
柴 a	1.6	22.65 ± 7.06	170.99 ± 28.74 <sup>2)</sup>
柴胡疏肝散醇提物	4.1	23.69 ± 4.74	204.70 ± 34.80 <sup>3)</sup>
	8.2	26.75 ± 3.58 <sup>3, 4)</sup>	246.22 ± 26.81 <sup>3, 5)</sup>
	20.5	27.19 ± 4.81 <sup>3, 4)</sup>	261.80 ± 22.09 <sup>3, 5)</sup>

注:与正常组比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与水提组比<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

柴胡疏肝散的主要有效成分有皂苷类、黄酮类、酚酸类及萜类成分,而皂苷类、黄酮类、酚酸类成分往往具有明显的抗氧化活性<sup>[6-8]</sup>。中药复方的提取方法不同,提取物的成分及含量都可能会有一定的差异,本课题组前期研究表明,醇提物的皂苷类、黄酮类、酚酸类成分含量高于水提物。本实验从抗氧化角度入手,探讨柴胡疏肝散醇提物对自由基的清除作用及对小鼠体内抗氧化酶活性的调节。

在自由基清除能力方面采用了 3 个体系:DPPH 体系、·OH 体系和 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·体系。在 3 个体系中,醇提物都呈现了明显的清除自由基活性,其中清除 DPPH 自由基效果尤为显著,EC<sub>50</sub>为 0.75 mg·L<sup>-1</sup>。

在生理状态下,SOD 和 CAT 是防止自由基反应的酶防御系统,对机体产生的自由基进行清除,保护机体免遭损伤。在本实验中,抑郁模型组小鼠肝组织内 SOD 和 CAT 活性较正常组明显下降,可能是由于小鼠长期处于应激状态生成的大量自由基,过度消耗了正常机体产生的 SOD 和 CAT,呈现 SOD

和 CAT 显著下降趋势<sup>[9]</sup>。CSPEE 能提高抑郁模型小鼠肝组织内的 SOD 和 CAT 活性,提高机体的抗氧化能力,而氧化能力提高的同时,小鼠抑郁状态也得到改善(另文报道)。同等生药量的醇提物组(中剂量组)与水提组相比,两种酶活性均有显著差异,说明醇提物的抗氧化药效强于水提物。

#### [参考文献]

[1] 王春艳. 柴胡疏肝散有效成分含量测定及组方关系研究[D]. 张家口:河北北方学院, 2010.

[2] Li Shu-qi, Su Zhi-heng, Peng Jing-bo, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant effects and the possible relationship between the antidepressant efficacy of traditional Chinese medicine formulation Chaihu Shugan San[J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(5):0353.

[3] Liu L X, Sun Y, Laura T, et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(1):35.

[4] 姚卫峰,陈汀,张丽,等. 女贞子醇提物不同极性部位的体外抗氧化活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22):138.

[5] 王海涛,薛黎明,秦雪梅,等. 慢性不可预知和慢性束缚应激抑郁模型大鼠行为学研究[J]. *山西大学学报:自然科学版*, 2010, 33(1):157.

[6] 陈丛瑾,王琪,李欣. 黄酮类化合物抗氧化和抑菌生物活性研究进展[J]. *中国药房*, 2011(35):3346.

[7] 袁亚男,陈承瑜,杨滨,等. 31 种黄酮、酚酸类化合物和 10 种中药清除 DPPH 能力考察[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(13):1695.

[8] Li C R, Zhou Z, Zhu D, et al. Protective effect of paeoniflorinon irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogen-activated protein kinases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39:426.

[9] 汪玉芳. 心达欣胶囊对抑郁模型小鼠行为学的影响及抗抑郁作用机理的研究[D]. 广州:暨南大学, 2009.

[责任编辑 聂淑琴]