

# 长叶胡颓子不同生长部位体内外抗氧化活性 及抗 LDL 氧化修饰的比较

彭璇<sup>1</sup>, 刘琼丽<sup>2</sup>, 朱蕾<sup>1</sup>, 李玉山<sup>1\*</sup>

(1. 湖北民族学院, 湖北 恩施 445000;

2. 湖北恩施土家族苗族自治州中心医院, 湖北 恩施 445000)

**[摘要]** **目的:**比较长叶胡颓子地上部位与地下部位体内外抗氧化作用,进行长叶胡颓子地上部位开发利用价值及抗动脉粥样硬化(AS)的可行性评价。**方法:**测定长叶胡颓子各部位在低、中、高质量浓度(5,10,20 g·L<sup>-1</sup>)对羟自由基(·OH)和超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的清除率;观察各部位在低、中、高质量浓度(5,10,20 g·L<sup>-1</sup>)对铜离子诱导的健康人静脉血低密度脂蛋白(LDL)氧化的影响,测定 LDL 氧化延迟时间(lag time)和达最大氧化速率时间(T<sub>max</sub>),硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定反应液中丙二醛(MDA)含量;选用 KM 小鼠颈背部皮下注射 5% D-半乳糖造模 8 周后,灌胃给予低、中、高剂量(2,5,10 g·kg<sup>-1</sup>)长叶胡颓子各部位提取液,14 d 后眼眶取血,分离血清,观察长叶胡颓子各部位对血清总抗氧化能力(TAC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶活性、丙二醛(MDA)含量的影响。**结果:**长叶胡颓子地上部位低、中、高各剂量组对 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除率分别为(58.26 ± 6.14)%、(68.21 ± 3.47)%和(74.67 ± 4.10)%,对·OH 清除率分别为(48.24 ± 6.24)%、(78.21 ± 7.24)%和(90.17 ± 6.58)%,二者对自由基的清除率均高于地下部位各剂量组,同时长叶胡颓子地上部位和地下部位均能显著增加 LDL 的 Lag time 和 T<sub>max</sub>,其结果与其减少铜离子诱导的 MDA 生成作用相一致;血清 TAC、SOD、GPX 活性均升高,能有效降低小鼠血清 MDA 含量,其地上部位活性升高显著。**结论:**长叶胡颓子各部位具有良好的体内外抗氧化活性,能明显提高血清及 LDL 抗氧化能力,同时长叶胡颓子地上部位抗氧化活性显著优于地下部位。

**[关键词]** 长叶胡颓子;果实;根及根茎;抗氧化;低密度脂蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0138-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014160138

## Antioxidant Activity of Different Part and Anti-LDL Oxidative Modification of *Elaeagnus bockii* in vitro and in vivo

PENG Xuan<sup>1</sup>, LIU Qiong-li<sup>2</sup>, ZHU Lei<sup>1</sup>, LI Yu-shan<sup>1\*</sup>

(1. Hubei Institute For Nationalities, Enshi 445000, China;

2. Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture of Hubei Province, Enshi 445000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study antioxidant activity of the different part of *Elaeagnus bockii* in vitro and in vivo, and evaluate the value of development and utilization of aboveground parts of elaeagnus and anti-atherogenic effects. **Method:** Evaluation of its antioxidant activity in vitro were based on effect of copper ion-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation and ·OH and O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging at low, middle and high concentration (5, 10, 20 g·L<sup>-1</sup>). The model KM mice were induced by injecting subcutaneous 5% D-galactose for 8 weeks. Intragastric administration for 14 days and then the orbital blood was taken to test total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) antioxidant enzymes activities and malonyldialdehyde (MDA) content in serum (2, 5, 10 g·kg<sup>-1</sup>). **Result:** The rate of free radical

**[收稿日期]** 20131111(001)

**[基金项目]** 湖北省卫生计生厅科研基金项目(JX2C42)

**[第一作者]** 彭璇,讲师,从事病理学与病理生理学研究,Tel:0718-8437479,E-mail:1732027915@qq.com

**[通讯作者]** \*李玉山,高级实验师,从事基础医学研究,Tel:0718-8437479,E-mail:1902097263@qq.com

scavenging for  $O_2^{\cdot-}$  at different concentration of Root and rhizome (UP) part were  $(58.26 \pm 6.14)\%$ ,  $(68.21 \pm 3.47)\%$ ,  $(74.67 \pm 4.10)\%$ , the radical scavenging for  $\cdot OH$  were  $(48.24 \pm 6.24)\%$ ,  $(78.21 \pm 7.24)\%$ ,  $(90.17 \pm 6.58)\%$ . The free radical scavenging rate of the ground part was higher than that of underground parts. Extracts from different parts significantly increased oxidation of delay time (Lag time) and the maximum rate of oxidation time ( $T_{max}$ ). The result was consistent with reduced MDA formation induced by copper ion. Serum TAC, SOD, GPX activity of antioxidant enzymes could be increased obviously, and decreased the content of MDA in serum of mice. **Conclusion:** Different part of *E. bockii* has good antioxidant activities *in vitro* and *in vivo*, significantly increase LDL and serum antioxidant capacity. Antioxidant activity of elaeagnus on aerial parts is significantly superior to the underground parts, which can be developed from above ground parts of elaeagnus for its great development value.

[**Key words**] *Elaeagnus bockii*; fruit; root and rhizome; antioxidant activity; low density lipoprotein

长叶胡颓子是胡颓子科胡颓子属的一种,其资源丰富,主要分布在长江流域及以南地区<sup>[1]</sup>,主要用于治疗支气管哮喘、感冒咳嗽、肠炎、风湿性关节炎、腰腿痛、腹泻、痢疾、跌打、淤积、肺病等<sup>[1-3]</sup>。其根茎或根、叶、果实均可供药用或食用,是极具开发价值的中草药。其化学成分主要有黄酮、三萜类、甾体类、萜醌类等化合物<sup>[4]</sup>。有关长叶胡颓子抗炎镇痛、抗癌等方面的实验研究较多,而有关其不同部位(果实与根及根茎)提取物体内抗氧化活性评价的研究尚未见报道,本文通过对长叶胡颓子不同部位体内抗氧化活性比较来探讨长叶胡颓子不同部位抗氧化能力,进一步明确长叶胡颓子地上部位开发利用的价值,有利于长叶胡颓子生物资源的综合利用,同时为从中开发抗 AS 的药物提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** UV1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),BS124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),R-201 型旋转蒸发器(上海申胜生物技术有限公司),SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科技工贸有限公司),DG5031 酶联免疫检测仪(上海京工实业有限公司)。

**1.2 动物** KM 小鼠(20~22 g),雌雄各半,由湖北民族学院动物实验中心提供,合格证号 SYXK(鄂)2008-0014。

**1.3 药材** 长叶胡颓子全株于 2012 年 5 月采自利川福宝山,经湖北民族学院生药鉴定教研室朱敏英教授鉴定为长叶胡颓子 *Elaeagnus bockii* Diels 的果实与根及根茎。

**1.4 试剂与试药** 总抗氧化能力(TAC,批号 20110426),谷胱甘肽过氧化物酶(GPX,批号 20120114),丙二醛(MDA,批号 20111230),超氧化物歧化酶(SOD,批号 20120423)及抗 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot-}$ 测

定试剂盒(批号 20120117,20120221)(以上测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供),维生素 C(VC,南京奥多福尼生物科技有限公司,批号 20120114),乙醇、硫酸铜,氯化钠(AR 级,成都市科龙化工试剂厂,批号 20121018,20120528,20120521),D-半乳糖、乙二胺四乙酸二钠(格雷西亚化学技术有限公司,批号 1012988,1018620)。

## 2 方法

**2.1 长叶胡颓子提取液制备** 将新鲜的长叶胡颓子全株植物洗净,自然干燥,分成地下部位(地下部位,Underground parts,UP)、地上部位(Aerial Part,AP),磨碎,过 100 目筛,准确称取 10 g,置 500 mL 的圆底烧瓶中,加 75% 的乙醇 200 mL 回流提取 3 次,1 h/次,合并 3 次回流提取液,制成生药质量浓度为  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的制备液。

### 2.2 体外抗氧化活性评价

**2.2.1 清除超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )** 实验设空白对照组、VC  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组、长叶胡颓子地上部位与地下部位提取液各低、中、高 3 个质量浓度组(5,10,20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),各组 8 个样本,计算清除率。实验操作步骤按试剂盒说明书进行。

**2.2.2 LDL 氧化易感性测定**<sup>[5]</sup> 取健康人静脉血,EDTA 抗凝,分离血浆,超速离心法分离 LDL,并于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  在  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS(pH 7.4)中透析 24 h,Bradford 测定 LDL 中蛋白含量,并调整浓度至  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验设空白对照组、模型组(LDL +  $\text{Cu}^{2+}$ )、实验组(LDL +  $\text{Cu}^{2+}$  + 长叶胡颓子各部位提取物),每组 8 个样本。于 96 孔培养板中分别加入 LDL 和 PBS(终反应体积 0.2 mL,LDL 终质量浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),混匀。实验组加入不同浓度长叶胡颓子各部位提取物(终质量浓度分别为 5,10,20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),空白组和模型组均加入等量 PBS,混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h。

除空白组加入 PBS 外,其余各组均加入  $\text{CuSO}_4$  溶液(终浓度  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $37^\circ\text{C}$  孵育 3 h, 每 10 min 测定 1 次 234 nm 处吸光度( $A_{234}$ ), 计算 LDL 氧化延迟时间(Lag time)和达最大氧化速率时间( $T_{\text{max}}$ )。将上述反应体系继续孵育至 12 h, 加入 EDTA- $\text{Na}_2$  终止反应, TBA 比色法测定反应液中 MDA 含量。

**2.3 体内抗氧化活性评价** 将 KM 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分成空白对照组、模型对照组、长叶胡颓子各部位提取液低、中、高 3 个剂量组(2, 5,  $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 8 只。除空白组外, 其余各组小鼠每天颈背部 *sc* 5% *D*-半乳糖 0.5 mL, 造模 8 周后称其体重, 空白对照组注射等量生理盐水。连续 *ig* 给药 14 d, 实验组分别 *ig* 不同剂量药液, 空白对照组及模型对照组 *ig* 给等容积生理盐水( $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 末次给药 12 h, 眼眶取血, 分离血清。按试剂盒说明书操作测定血清中 TAC, SOD, GPx 及 MDA。

**2.4 统计方法** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件, 组间采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对超氧阴离子自由基清除作用** VC 组对  $\text{O}_2^-$

清除率为  $(58.85 \pm 3.10)\%$ ; 长叶胡颓子各部位提取液呈剂量依赖性地减少反应体系产生的  $\text{O}_2^-$ , 低、中、高各剂量组长叶胡颓子地上部位对  $\text{O}_2^-$  清除率分别为  $(58.26 \pm 6.14)\%$ ,  $(68.21 \pm 3.47)\%$ ,  $(74.67 \pm 4.10)\%$ , 而其地下部位提取液对  $\text{O}_2^-$  清除率分别为  $(35.26 \pm 4.25)\%$ ,  $(48.21 \pm 6.38)\%$ ,  $(54.67 \pm 4.77)\%$ 。

**3.2 对羟自由基清除作用** VC 组对  $\cdot\text{OH}$  清除率为  $(50.34 \pm 2.60)\%$ , 长叶胡颓子各部位提取液呈剂量依赖性地减少反应体系产生的  $\cdot\text{OH}$ , 低、中、高各剂量组长叶胡颓子地上部位对  $\cdot\text{OH}$  清除率分别为  $(48.24 \pm 6.24)\%$ ,  $(78.21 \pm 7.24)\%$ ,  $(90.17 \pm 6.58)\%$ , 长叶胡颓子地下部位提取液对  $\text{O}_2^-$  清除率分别为  $(45.26 \pm 4.56)\%$ ,  $(65.24 \pm 6.31)\%$ ,  $(85.24 \pm 8.54)\%$ 。

**3.3 对 LDL 氧化易感性的影响** Lag time 和  $T_{\text{max}}$  是衡量 LDL 氧化易感性的 2 个重要指标。药用长叶胡颓子地上部位和地下部位均能显著增加 LDL 氧化的 Lag time 和  $T_{\text{max}}$ , 而且地上部位对 Lag time 和  $T_{\text{max}}$  的延迟影响较大。这一结果与其减少铜离子诱导的 MDA 生成作用相一致。见表 1。

表 1 长叶胡颓子各部位提取物对  $\text{Cu}^{2+}$  诱导的 LDL 抗氧化能力( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Lag time/min	$T_{\text{max}}/\text{min}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白对照	-	-	-	$5.21 \pm 4.14$
模型	-	$55.24 \pm 15.14$	$110.11 \pm 12.17$	$20.36 \pm 1.59^{3)}$
长叶胡颓子地上部位	5	$75.47 \pm 25.14^{1)}$	$138.33 \pm 26.44^{1)}$	$15.21 \pm 3.61^{1)}$
	10	$94.21 \pm 24.34^{2)}$	$145.21 \pm 26.44^{2)}$	$10.04 \pm 2.19^{2)}$
	20	$114.14 \pm 24.14^{2)}$	$165.14 \pm 31.14^{2)}$	$6.21 \pm 5.14^{2)}$
长叶胡颓子地下部位	5	$60.21 \pm 21.14^{1)}$	$128.31 \pm 36.14^{1)}$	$18.24 \pm 3.14^{1)}$
	10	$72.17 \pm 34.31^{1)}$	$139.12 \pm 25.14^{1)}$	$15.31 \pm 1.14^{1)}$
	20	$85.23 \pm 5.14^{1)}$	$154.36 \pm 36.18^{2)}$	$10.21 \pm 3.74^{2)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与空白组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**3.4 长叶胡颓子各部位对小鼠血清抗氧化能力的影响** 小鼠在给予长叶胡颓子各部位提取液后, 血清 TAC, SOD, GPX 活性均显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。正常情况下, 小鼠血清 MDA 含量较低, 注射 5% *D*-半乳糖后, 模型组血清 MDA 含量显著增加, 而药物组的小鼠, 其血清 MDA 含量明显低于对照组, 提示长叶胡颓子各部位均能显著提高小鼠血清抗氧化能力。通过比较长叶胡颓子各部位对小鼠血清 TAC, SOD, GPX 活性的影响, 长叶胡颓子地上

部位较地下部位能显著提高 TAC, SOD, GPX 活性, 有效降低小鼠血清 MDA 含量。见表 2。

### 4 讨论

活性氧簇(ROS)是生物体在机体代谢过程中产生的活性基团或分子, 具有高度氧化活性, 引起脂质过氧化而改变生物膜结构及功能, 损伤 DNA, 使蛋白质变性及酶活力丧失等, 并最终导致了炎症、衰老、心血管疾病及肿瘤的发生<sup>[6]</sup>。现代研究表明, ROS 参与多种疾病的病理进程, 其中 ROS 介导的

表 2 长叶胡颓子各部位对小鼠血清抗氧化能力的测定( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TAC/ $U \cdot mL^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	GSH-Px/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
空白对照	-	12.35 ± 1.14	185.04 ± 22.14	317.24 ± 26.14	11.24 ± 4.14
模型	-	5.21 ± 3.74 <sup>3)</sup>	101.32 ± 35.14 <sup>3)</sup>	225.14 ± 36.34 <sup>3)</sup>	18.21 ± 5.14 <sup>3)</sup>
长叶胡颓子地上部位	2.0	14.31 ± 2.14 <sup>1)</sup>	223.21 ± 35.74 <sup>1)</sup>	354.46 ± 36.14 <sup>1)</sup>	9.34 ± 4.73 <sup>1)</sup>
	5.0	16.34 ± 1.34 <sup>2)</sup>	254.14 ± 35.18 <sup>2)</sup>	374.61 ± 24.19 <sup>2)</sup>	7.21 ± 3.14 <sup>2)</sup>
	10.0	18.38 ± 2.04 <sup>2)</sup>	284.31 ± 31.94 <sup>2)</sup>	394.14 ± 36.14 <sup>2)</sup>	6.87 ± 6.14 <sup>2)</sup>
长叶胡颓子地下部位	2.0	13.21 ± 1.17 <sup>1)</sup>	203.21 ± 15.14 <sup>1)</sup>	334.32 ± 35.15 <sup>1)</sup>	9.49 ± 2.14 <sup>1)</sup>
	5.0	15.24 ± 1.24 <sup>1)</sup>	224.46 ± 35.44 <sup>1)</sup>	356.14 ± 34.19 <sup>2)</sup>	8.47 ± 1.14 <sup>1)</sup>
	10.0	16.16 ± 0.94 <sup>2)</sup>	259.14 ± 27.34 <sup>2)</sup>	375.21 ± 35.04 <sup>2)</sup>	7.14 ± 1.04 <sup>2)</sup>

LDL 氧化修饰,是 AS 形成与发展的关键环节<sup>[6]</sup>。临床资料显示,正常人血清及 LDL 抗氧化能力显著高于 AS 患者,其 Ox-LDL 水平升高与 AS 病变程度密切相关<sup>[6-7]</sup>。适当摄入抗氧化剂如维生素 C、维生素 E、及  $\beta$ -胡萝卜素可以明显降低 AS 性心血管病的发病率。补充抗氧化剂、增强机体及 LDL 抗氧化能力可以有效防治 AS 及其相关性心脑血管疾病<sup>[8-9]</sup>。

本研究结果显示长叶胡颓子果实具有很好的抗氧化能力,能有效降低 LDL 氧化易感性及血清 Ox-LDL 水平,首次明确了其果实的抗氧化活性显著优于根及根茎,提示从长叶胡颓子果实中挖掘抗氧化药物的可行性。多糖、黄酮、蒽醌、生物碱、皂苷、维生素等天然产物是常见的天然抗氧化成分<sup>[10]</sup>。长叶胡颓子化学成分复杂,而阐明长叶胡颓子果实中抗氧化活性物质基础,将是本课题组下一步研究重点。从中开发出防治 AS 及心脑血管疾病的药物,不仅对于其生物资源的综合开发利用具有重要意义,而且有助于新药发现。

#### [参考文献]

- [1] 陈新. 川渝地区长叶胡颓子属药用植物资源研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(2): 40.  
 [2] 赵鑫. 长叶胡颓子(长叶胡颓子科), 短肋羽藓(藓纲):

羽藓科)和假柴龙树(茶茱萸科)的化学成分和生物活性[D]. 上海:华东师范大学, 2006.

- [3] 郭明娟, 江洪波, 田祥琴, 等. 长叶胡颓子果实的化学成分[J]. 华西药学杂志, 2008, 23(4): 381.  
 [4] 李孟顺, 葛月宾, 梅之南, 等. 胡颓子叶水溶性化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1224.  
 [5] 石磊. 西红花酸体内外抗氧化作用的研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(15): 118.  
 [6] Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(10): 1649.  
 [7] Ehara S, Ueda M, Naruko L, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2001, 103(5): 1955.  
 [8] Rimm E B, Stampfer M J. Antioxidants for vascular disease [J]. Med Clin North Am, 2000, 84(3): 239.  
 [9] Yang C S, Lambert J D, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols [J]. Arch Toxicol, 2009, 83(1): 11.  
 [10] 王忠雷, 杨丽燕, 张小华, 等. 天然产物抗氧化活性成分研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(5): 386.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎投稿

欢迎订阅