

夏枯草对氧化应激损伤的保护作用研究

谭剑斌¹, 赵敏^{1*}, 杨杏芬^{1*}, 黄俊明¹, 张梦娇², 吴仕漩², 熊燧³

(1. 广东省疾病预防控制中心 卫生毒理所, 广州 511430;

2. 中山大学公共卫生学院, 广州 510080; 3. 暨南大学医学院, 广州 510632)

[摘要] 目的:研究夏枯草对小鼠急性束缚应激损伤的保护作用和主要功效成分分析。方法:将雄性 Balb/C 小鼠分为正常组,束缚模型组,1.25,2.50,7.50 g·kg⁻¹夏枯草干预组。连续给药 5 d 后,束缚模型组和夏枯草干预组小鼠急性束缚 2 h,所有小鼠分别检测脑组织的总活性氧(总 ROS),过氧化氢(H₂O₂),丙二醛(MDA),8-羟基鸟嘌呤(8-OHdG)和蛋白质羰基含量,并观察超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。以硝酸铝显色法测定总黄酮,香草醛显色法检测总三萜,硫酸-苯酚法测量总多糖含量,并以 ORAC 法分别检测 3 种物质的总抗氧化能力。结果:与正常组比较,2 h 急性束缚可增加小鼠脑组织中的 H₂O₂,MDA,8-OHdG,蛋白质羰基含量,降低 SOD 酶活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),但总 ROS 含量和 GSH-Px 酶活性变化不明显。与束缚模型组比较,夏枯草能减少小鼠脑组织中 H₂O₂,MDA 和蛋白质羰基含量,增强 SOD 酶活性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。夏枯草的总黄酮、总三萜和总多糖含量分别为 8.91,2.45,10.16 mg·g⁻¹。总黄酮、总三萜和总多糖 ORAC 结果分别为(127.5 ± 1.0),(45.75 ± 2.5),(2.25 ± 0.75) mmol·L⁻¹。结论:夏枯草对急性束缚应激诱发小鼠氧化损伤具有一定的保护作用,黄酮可能是抗氧化应激作用的主要功效成分。

[关键词] 夏枯草; 束缚应激模型; 黄酮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0089-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040089

Protective Effect of *Prunellae Spica* on Oxidative Stress Injury

TAN Jian-bin¹, ZHAO Min^{1*}, YANG Xing-fen^{1*}, HUANG Jun-ming¹,
ZHANG Meng-jiao², WU Shi-xuan², XIONG Yi³

(1. Institute of Toxicology, Guangdong Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China; 2. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. School of Medicine, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To study major functional components of *Prunellae Spica* and its protective effect against the oxidative injury induced by acute restraint stress in mice. **Method:** The male Balb/C mice were randomly divided into negative group and model control group, and 1.25, 2.50, 7.50 g·kg⁻¹ *Prunellae Spica* intervention groups. Mice in the intervention groups were given *Prunellae Spica* by gavage for 5 days, mice in model control group and negative group were given distilled water. After the last administration, intervention groups and model control group received 2 h acute restraint stress, and then the mice in the groups were sacrificed. The following anti-oxidative indicators in brain tissues were detected respectively: oxidative stress reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG),

[收稿日期] 20150127(003)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2010AA023001);广东省科技计划项目(2013B010404033);广东省自然科学基金项目(S2013010013289);广州市科技计划项目(201300000161);广东省中药局课题(20132108, 20121275)

[第一作者] 谭剑斌, 硕士, 副主任技师, 从事卫生毒理学与功效学研究工作, Tel:020-31051935, E-mail:tan - sword@163.com

[通讯作者] * 赵敏, 博士, 主任医师, 从事食品安全风险评估与功效学研究工作, Tel:020-31051540, E-mail:zhaomin72@126.com;

* 杨杏芬, 博士, 教授, 从事食品安全风险评估工作, Tel:020-31051668, E-mail:yangxingfen@21.cn.com

protein carbonyl content, superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity. We analyzed main components of prunella, including total flavonoids (aluminum nitrate chromogenic method), total triterpenoids (vanillin colorimetric method) and total polysaccharides (phenol-sulfuric acid method), and detected their total antioxidant capacity (ORAC). **Result:** Compared with the negative group, content of H_2O_2 , MDA, 8-OHdG and protein carbonyl in model group significantly increased, while SOD activity obviously decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). No obvious difference was found in ROS and GSH-Px contents. Compared with the model control group, SOD activity in the three intervention groups was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), content of H_2O_2 , MDA and protein carbonyl were much decreased. Total flavonoids content was $8.91 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, total triterpene content was $2.45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and total polysaccharide content was $10.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Total ORAC values of total flavonoids, total triterpenoids and polysaccharides were (127.5 ± 1.0) , (45.75 ± 2.5) , $(2.25 \pm 0.75) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Prunellae Spica intervention showed a certain protective effect against the oxidative injury induced by acute restraint stress in mice, and flavonoids may be the major functional ingredient against oxidative stress.

[Key words] Prunellae Spica; restraint stress model; flavone

凉茶在我国尤其是岭南炎热湿润地区被广泛用来改善群众生活中“上火”等不适感觉。“上火”是一种包括中枢、内分泌及免疫系统在内的体内复杂的应激负荷反应过程^[1]。应激主要激活下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴),增加皮质醇类激素释放^[2],引起氧化应激损伤,在活性氧、过氧化产物、抗氧化物和抗氧化酶活性等层面均有明显改变^[3]。因此“上火”与体内氧化应激损伤密切相关。已有研究表明广东凉茶具有一定的抗氧化活性,对这种心理压迫为应激源的损伤有良好的保护作用,但利用束缚应激模型研究凉茶原料的抗氧化活性未见报道,使得凉茶抗氧化功效证据链条欠完整。夏枯草 *Prunella vulgaris* 是广东凉茶主要原料之一,能清火、明目、散结、消肿,杀伤多种肿瘤细胞,临床上用作治疗或辅助治疗甲状腺肿大、肺结核、淋巴结核、高血压等用途。研究发现夏枯草能显著改善免疫功能^[4]。免疫抑制是“上火”症状之一,免疫功能不足时可产生大量的活性氧物质,超过清除能力以后,可损伤线粒体功能,从而引发自由基链式反应^[4]。同时,夏枯草含有黄酮、多糖等具有自由基清除能力的成分^[5-6]。因此,笔者推测抗氧化应激损伤可能是夏枯草参与“降火”途径之一。本实验拟采用束缚应激动物模型,从活性氧、过氧化产物和抗氧化酶 3 个层面上,观察夏枯草对氧化损伤的保护作用,并对夏枯草中黄酮、三萜、多糖 3 种主要功效成分进行定量分析和清除自由基能力检测,为进一步了解夏枯草和凉茶的保健功效机制,筛选主要活性物质提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 50 只 SPF 级雄性 4~6 周龄 Balb/C 小鼠,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(粤)2008-0002。动物实验室为广东省疾病预防控制中心屏障环境动物房,温度 20~26℃,湿度 40%~70%,实验动物使用合格证号 SYXK(粤)2013-0011。基础维持饲料由广东省医学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 夏枯草干膏粉(广州王老吉药业股份有限公司,批号 120401),1.0 g 干膏粉含 12.0 g 药材,实验剂量以药材剂量表示。芦丁、熊果酸、葡萄糖对照品由 FLUKA 提供。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(WST-8法)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(上海碧云天公司),8-羟基鸟嘌呤(8-OHdG)ELISA 试剂盒(美国 Andygene 公司),总蛋白(TP)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司),硫代巴比妥酸(TBA),1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TMP),鲁米诺(Luminol),辣根过氧化物酶 VI(HRP VI,261U/mg),二硝基苯胺(DNPH),硫酸链霉素(streptomycin sulfate)均购自 Sigma 公司;二甲酚橙(XO),D-山梨醇(D-sorbitol solution),盐酸胍(guanidine hydrochloride),2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)二盐酸盐(AAPH),荧光素钠(FL),6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox)均购自上海晶纯生化科技股份有限公司。其余国产试剂均购自广州化学试剂厂。

1.3 仪器 T8 型组织研磨机和 MS2 型漩涡混器(德国 IKA 公司),5804R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),XS225A-SCS 型电子天平(日本

AND 公司), Scientific Varioskan Flash 型酶标仪(美国 Thermo 公司), 7600 型全自动生化仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 受试物配制方法 每日称取夏枯草干膏粉 1.25 g, 以纯净水溶解定容至 20.0 mL 制成 $7.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草干预组受试物, 然后用纯净水作 6 倍和 3 倍稀释制成 $1.25, 2.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草干预组受试物。

2.2 急性束缚应激模型的建立 取管壁均匀开有 15 个直径 1 cm 透气孔的 50 mL 尖底离心管, 将小鼠头朝管尖方向快速装入束缚装置内, 以管盖封闭管口且避免夹尾。管尖处插入水瓶饮水管供纯净水。束缚装置平放于动物笼盒内静置 2 h。

2.3 给药及取材 实验将小鼠以体重分层随机法分为正常组, 束缚模型组和 $1.25, 2.50, 7.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草干预组, 每组 10 只。夏枯草干预组每日 *ig* 给药 1 次, *ig* 量为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 连续给药 5 d, 正常组和束缚模型组 *ig* 给予同等容量纯净水, 末次 *ig* 1 h 后束缚模型组和夏枯草干预组束缚 2 h, 正常组不作处理。束缚完毕后处死各组动物, 完整取出脑组织并剔除嗅球和延髓部分, 以冰生理盐水漂洗除去表面血液, 冰浴条件下加入 4 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS 制成脑组织匀浆液。匀浆液以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}, 1500 \times g$ 离心 15 min, 回收上清液于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。匀浆液可直接使用, 或按待检指标要求以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}, 12000 \times g$ 离心 2 min 后使用。

2.4 氧化应激指标检测方法

2.4.1 TP 含量测定 采用双缩脲法(Biuret)分别检测 $1500 \times g$ 和 $12000 \times g$ 离心的组织匀浆中的总蛋白含量, 其中 ROS, H_2O_2 , MDA, 8-OHdG, 蛋白质羰基, GSH-Px 指标采用 $12000 \times g$ 离心的蛋白量来计算单位蛋白中标志物含量, SOD 采用 $1500 \times g$ 离心的蛋白量。

2.4.2 总 ROS 含量测定 在 Saez 等^[7]的方法基础上稍作修改。96 孔板中加入 $10 \text{ }^{\mu}\text{L} 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲁米诺, 再加入 $185 \text{ }^{\mu}\text{L}$ 的组织匀浆, 置于酶标仪内。待升温至 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min 后, 以自动加样器分别加入 $4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRP VI $5 \text{ }^{\mu}\text{L}$ 至终体积达到 $200 \text{ }^{\mu}\text{L}$, 振动 10 s 混匀。每分钟检测 1 次发光强度, 测光时间 100 ms, 连续检测 30 次。以 Integral 积分法计算第 11 ~ 20 min 间的曲线下面积。

2.4.3 H_2O_2 含量测定 试剂配制和反应体系参考李忠光等^[8]方法并作如下修改。分别吸取 $10 \text{ }^{\mu}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

的 H_2O_2 标准溶液 0, 20, 40, 80, 160, 320, 640 $\text{ }^{\mu}\text{L}$, 以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 PBS 稀释至 1.0 mL。分别吸取标准溶液 300 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 至试管中, 每管加入 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液 10.5 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 调节反应体系 pH。每管加入显色液 600 $\text{ }^{\mu}\text{L}$, 反应体系终 pH 1.6。30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 以酶标仪检测 545 nm 处吸光度 *A*, 并计算回归方程。组织匀浆的检测过程与标准溶液一致。

2.4.4 MDA 含量测定 管盖戳一小孔的 EP 管中将组织匀浆, $10 \text{ }^{\mu}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMP 标准分别与 0.5% TBA (500 mg TBA 加 30% HAc 稀释至 100 mL) 混合 (5:3), $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 冰水冷却。4 $^{\circ}\text{C}$, $12000 \times g$ 离心 2 min 取上清液以酶标仪检测 532 nm 处 *A*。

$$\text{MDA} = \frac{A_{\text{组织匀浆}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times 10 \text{ }^{\mu}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

2.4.5 蛋白质羰基含量 参考段丽菊等^[9]的方法并稍作修改。取 360 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 组织匀浆, 加入 40 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 10% 硫酸链霉素, 室温放置 10 min 后, 以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C} 11000 \times g$ 离心 10 min, 取上清。在 100 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 的上清中加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNPH 400 $\text{ }^{\mu}\text{L}$, 并设不含 DNPH 对照。将各反应体系置于黑暗中放置 1 h, 每隔 10 min 混漩 1 次。反应完毕后, 加入 50% TCA 溶液 500 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 来沉淀蛋白质, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $18000 \times g$ 离心 15 min, 弃去上清。沉淀用 1 mL 乙醇和乙酸乙酯混合物 (1:1) 洗涤 3 次, 每次 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $18000 \times g$ 离心 15 min。最后的沉淀用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍 1.25 mL 溶解。取上清以酶标仪检测 326 nm 处 *A*。羰基浓度用摩尔消光系数 $22.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 来计算。羰基含量用每毫克蛋白中所含羰基来表示。

2.4.6 8-OHdG 含量及 SOD, GSH-Px 活性测定 依照试剂盒方法检测各指标。

2.5 夏枯草主要功效成分及总抗氧化能力检测

2.5.1 总黄酮测定 采用尉芹等^[10]介绍的纸色谱-硝酸铝比色法并稍作修改。精密称取夏枯草干膏粉 8.40 g, 滤纸包裹装入索氏提取器, 用 70% 乙醇 250 mL 于 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热回流提取 6 h, 提取液置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。试剂配制、检测流程和标准曲线制备均依据文献方法, 反应终产物以酶标仪检测 500 nm 处的 *A*, 计算回归方程。样本检测流程与标准曲线制备相似, 其中点样量为提取液 20 $\text{ }^{\mu}\text{L}$ 。

2.5.2 总三萜测定 采用江绍琳介绍的香草醛显色法^[11]检测总三萜的含量。精密称取夏枯草干膏粉 8.39 g, 滤纸包裹装入索氏提取器, 球形瓶内加入无水乙醇 250 mL, 加热回流 6 h, 取提取液以无水乙醇定容至 250 mL, 即得样品溶液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。试剂配

制、检测流程和标准曲线制备均依据文献方法,反应终产物以酶标仪检测 545 nm 的 A, 计算回归方程。样本检测过程与标准曲线绘制过程相同,提取液需稀释 10 倍,加样量为 0.3 mL。

2.5.3 总多糖测定 采用硫酸苯酚导数光谱法检测总多糖的含量。精密称取夏枯草干膏粉 8.40 g, 滤纸包裹,加入蒸馏水 250 mL 于 100 °C 煎煮 50 min, 过滤,滤液为粗多糖溶液,以纯净水调整刻度至 250 mL。标准曲线制备以及一阶导数处理过程参考耿霞^[12]的方法,总多糖检测参考董群等^[13]介绍的方法。反应终产物以酶标仪检测波峰 475, 474 nm, 波谷 506, 505 nm 处的波长, $\Delta\lambda = 1$ 。测量峰谷振幅值作为定量信息,绘制标准曲线并计算回归方程。样本检测过程与标准曲线制备过程一致,多糖提取液稀释 20 倍,加样量 0.2 mL。

2.5.4 总抗氧化能力测定 采用 ORAC 法^[14]测量总黄酮、总三萜和总多糖提取液的总抗氧化能力。以 75 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 7.4)配制 1 μmol·L⁻¹荧光素钠盐和 100 mmol·L⁻¹ AAPH 溶液。用无水乙醇配置 24.43 mmol·L⁻¹ Trolox 标准溶液。96 孔白板中加入 1 μmol·L⁻¹ 荧光素钠盐 160 μL, 样液 20 μL, 置于酶标仪内。以自动加样装置加入 100 mmol·L⁻¹ AAPH 20 μL, 启动反应, 振动混合, 37 °C 孵育。以激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm 连续测定荧光强度, 测定时间设定在荧光衰减呈基线后为止。试验所得的各微孔不同时间点的荧光强度数据计算荧光衰退曲线下面积(AUC)。

当间隔时间为 2 min 时, 公式为:

$$AUC = 2 \times (f_0 + f_1 + \dots + f_n - 1 + f_n) - f_0 - f_n$$

$$ORAC = [(AUC_{\text{sample}} - AUC_{\text{black}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{black}})] \times (\text{Trolox 摩尔浓度} / \text{样本单位})$$

其中 $f_0, f_1, \dots, f_n - 1, f_n$ 等为各时间点的荧光强度, AUC 为荧光曲线下面积, AUC_{sample} 为样本的曲线下面积, AUC_{black} 为荧光素钠中添加 AAPH 的曲线下面积。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较, 方差齐时采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验; 若方差不齐可进行对数转换, 若仍不齐, 则采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 夏枯草对氧化应激损伤的保护作用

3.1.1 对束缚应激小鼠脑组织活性氧含量的影响 束缚应激明显增加小鼠脑组织中 H₂O₂ 含量 ($P <$

0.01)。与束缚模型组小鼠相比, 夏枯草能明显减少小鼠脑组织中的 H₂O₂ 含量 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 夏枯草对小鼠脑组织中活性氧含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of *Prunellae Spica* on active oxygen content in mice brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ROS /RLUs × 10 ⁴ /mg	H ₂ O ₂ /mmol·g ⁻¹
正常	-	5.49 ± 0.76	0.22 ± 0.02
束缚模型	-	6.11 ± 0.96	0.32 ± 0.06 ²⁾
夏枯草	1.25	5.44 ± 1.19	0.25 ± 0.05 ³⁾
	2.50	5.52 ± 0.92	0.23 ± 0.05 ³⁾
	7.50	6.18 ± 1.33	0.28 ± 0.05

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与束缚模型组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.1.2 对束缚应激小鼠脑组织中过氧化产物含量的影响 与正常组比较, 束缚应激明显增加 MDA, 8-OHdG 和蛋白质羰基含量 ($P < 0.05$)。与束缚模型组小鼠比较, 夏枯草干预能明显减少小鼠脑组织中 MDA 和蛋白质羰基含量 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 夏枯草对小鼠脑组织中过氧化产物含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of *Prunellae Spica* on peroxidation product content in mice brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA /μmol·g ⁻¹	8-OHdG /ng·g ⁻¹	蛋白质羰基 /mmol·g ⁻¹
正常	-	11.24 ± 1.15	11.20 ± 1.99	4.32 ± 0.51
束缚模型	-	16.37 ± 2.79 ²⁾	14.57 ± 3.60 ¹⁾	5.52 ± 1.20 ²⁾
夏枯草	1.25	13.10 ± 2.00 ³⁾	12.27 ± 1.56	4.82 ± 0.79
	2.50	11.33 ± 1.66 ³⁾	12.03 ± 1.49	4.18 ± 0.37 ³⁾
	7.50	13.39 ± 2.39 ³⁾	14.01 ± 2.82	4.99 ± 0.77

3.1.3 对束缚应激小鼠脑组织抗氧化酶活性的影响 与正常组比较, 束缚应激明显抑制小鼠脑组织中 SOD 活性 ($P < 0.01$)。与束缚模型组比较, 夏枯草干预能明显升高 SOD 酶活性 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 夏枯草对小鼠脑组织中抗氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of *Prunellae Spica* on antioxidant enzyme activities in mice brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mg 蛋白 ⁻¹	GSH-Px /U·g 蛋白 ⁻¹
正常	-	0.55 ± 0.03	13.12 ± 1.48
束缚模型	-	0.41 ± 0.03 ²⁾	12.12 ± 1.38
夏枯草	1.25	0.57 ± 0.05 ³⁾	12.22 ± 1.53
	2.50	0.58 ± 0.13 ³⁾	12.77 ± 1.79
	7.50	0.61 ± 0.18 ³⁾	13.50 ± 1.46

3.2 夏枯草主要功效成分及总抗氧化能力

3.2.1 总黄酮含量 夏枯草总黄酮 0~90.0 μg , 线性良好, 得回归方程 $Y = 858.346X - 65.0$ ($R^2 = 0.994$)。夏枯草干膏粉总黄酮的含量为 $(107.1 \pm 2.7) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.5%, 加样回收率 99.95%。结果表明夏枯草干膏粉中总黄酮质量分数 10.7%, 即每克药材中含有总黄酮 8.91 mg。

3.2.2 总三萜含量 夏枯草总三萜在 0~47.06 μg , 线性良好, 得回归方程 $Y = 0.396.236X - 33.549$ ($R^2 = 0.998$)。夏枯草干膏粉总三萜含量为 $(29.4 \pm 0.6) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.0%, 加样回收率 94.6%。结果显示夏枯草干膏粉中含总三萜质量分数 2.94%, 即每克药材中含有总三萜 2.45 mg。

3.2.3 总多糖含量 夏枯草总多糖在 0.0~41.96 μg 线性良好, 得回归方程 $Y = 1026.603X + 0.595$ ($R^2 = 0.996$)。夏枯草干膏粉总多糖含量为 $(121.9 \pm 3.7) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 3.0%, 加样回收率 104.6%。结果显示夏枯草干膏粉中总多糖质量分数 12.2%, 即每克药材含有总多糖 10.16 mg。

3.2.4 总抗氧化能力(ORAC) 夏枯草干膏粉黄酮、三萜、多糖提取物的 ORAC 分别为 (127.5 ± 1.0) , (45.75 ± 2.5) , $(2.25 \pm 0.75) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。提示总黄酮提取物抗氧化能力最强。

4 讨论

急性束缚与人类承受短期心理压力过程相似, 可诱导机体产生生理及病理性反应, 与体内氧化抗氧化失衡引起的损伤关系密切^[15]。应激可通过 HPA 轴增加神经细胞和海马祖细胞内 ROS 含量^[16], 机制与糖皮质激素(GC)激活 GC 受体, 抑制 GSH-Px mRNA 和增强 NADH 氧化酶 mRNA 等调控基因引发 ROS 大量产生的过程有关^[17]。应激还能诱导交感神经系统(SNS), 产生大量的 OH^{\cdot} ^[18]。过量活性氧可消耗体内的抗氧化物(如 GSH), 抑制抗氧化酶活性(如 SOD, CAT, GSH-Px), 直接作用于脂质、蛋白质和核酸等生物大分子, 并形成链式反应扩大伤害, 最终损伤细胞功能, 引发疾病^[19]。在本实验条件下, 小鼠经过 2 h 的单侧束缚应激, 脑组织中的活性氧物质 H_2O_2 含量明显增加, 但总 ROS 含量未观察到明显变化。反映脂质、核酸和蛋白质脂质过氧化程度的 MDA, 8-OHdG 和蛋白质羰基 3 种标志物含量均显著增加。SOD 和 GSH-Px 2 种抗氧化酶类中, 仅 SOD 活性受到明显抑制, 而 GSH-Px 没有明显变化。表明急性束缚应激可通过增加活性氧物质, 升高过氧化产物含量, 抑制抗氧化酶活性, 引起

机体过氧化损伤。

夏枯草具有良好的抗氧化活性。本研究发现 $2.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草能够降低模型动物 H_2O_2 含量, 减少活性氧含量。 $1.25, 2.50, 7.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草均能够减少脂质过氧化产物 MDA 的含量, $2.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草能够降低蛋白质过氧化产物蛋白质羰基含量, 削弱自由基链式反应。同时 $1.25, 2.50, 7.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 夏枯草均能增加抗氧化酶 SOD 的活性, 增强活性氧物质的降解。表明夏枯草可以从活性氧、过氧化产物和抗氧化酶 3 个层面干预束缚应激诱导的氧化损伤, 这与过往研究相似^[20-21], 其对脂质过氧化损伤的抑制作用也与课题组前期发现的广东凉茶对高脂膳食诱导氧化损伤的保护作用一致^[22]。

夏枯草的抗氧化活性与其含有抗氧化功效物质的含量与抗氧化能力有关。定量分析结果显示, 夏枯草总多糖与总黄酮含量相近, 且均高于总三萜。3 种物质总抗氧化能力存在较大差异, 总黄酮抗氧化能力最强, 是总三萜的 2.79 倍, 多糖的 56.7 倍。在综合含量和抗氧化能力后可知总黄酮是夏枯草抗氧化的主要活性成分。黄酮是具有酚羟基的还原型化合物, 在抗氧化反应中通过酚羟基与自由基反应生成共振稳定的半醌式结构, 从而消除自由基反应链引发阶段的自由基, 也能直接捕捉反应链中自由基, 阻断自由基链反应^[23]。研究表明, 夏枯草黄酮清除 DPPH 和 OH 能力与含量一致, 在抗氧化成分中占主导位置^[5], 对 MDA 和 SOD 等氧化应激标志物均有调节作用^[24], 表明黄酮可能是凉茶原料夏枯草抗氧化应激作用的主要功效成分, 并提示黄酮可能是广东凉茶的主要活性物质。

[参考文献]

- [1] 何蓉蓉, 栗原博. 论“上火”与应激反应[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2009, 10(5): 37-41.
- [2] 唐已婷, 陈家旭. 慢性束缚应激动物模型的研究进展[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(1): 25-28.
- [3] Liu J, Wang X, Shigenaga M, et al. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats[J]. FASEB J, 1996, 10(13): 1532-1538.
- [4] Huang R, Zhao M, Yang X, et al. Effects of prunella vulgaris on the mice immune function[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77355.
- [5] 张森, 白月梅, 苗芳, 等. 夏枯草生殖生长期总黄酮积累规律及抗氧化活性研究[J]. 华北农学报, 2012, 27(2): 170-174.

- [6] 张德华. 夏枯草多糖的分离纯化与抗氧化活性研究[J]. 云南植物研究, 2006, 28(4):410-414.
- [7] Saez F, Motta C, Boucher D, et al. Antioxidant capacity of prostasomes in human semen[J]. Molecular human reproduction, 1998, 4(7):667-672.
- [8] 李忠光, 宋玉泉, 龚明. 二甲酚橙法用于测定植物组织中的过氧化氢[J]. 云南师范大学学报:自然科学版, 2007, 27(3):50-54.
- [9] 段丽菊, 刘英帅, 朱燕, 等. DNPH 比色法:一种简单的蛋白质羰基含量测定方法[J]. 毒理学杂志, 2006, 19(4):320-322.
- [10] 尉芹, 马希汉. 杜仲叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2001, 29(5):119-123.
- [11] 江绍琳, 江绍玫, 曾令聪. 分光光度法快速测定灵芝中总三萜含量[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4):634-636.
- [12] 林黎明. 差示导数光谱法测定金银花及银翘解毒片中总绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(5):282-284, 318.
- [13] 董群, 郑丽伊. 改良的苯酚—硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9):550-553.
- [14] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8):1015-1021.
- [15] 何蓉蓉, 姚新生, 栗原博. 拘束应激动物模型的研究现状与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11):80-80.
- [16] McIntosh L J, Sapolsky R M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture[J]. Exp Neurol, 1996, 141(2):201-206.
- [17] You J M, Yun S J, Nam K N, et al. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2009, 87(6):440-447.
- [18] 黄林邦, 韩光, 申力, 等. 黄嘌呤氧化酶来源的自由基参与应激性损伤[J]. 赣南医学院学报, 1992, 12(4):200-204.
- [19] Cochrane C G. Mechanisms of oxidant injury of cells [J]. Mol Aspects Med, 1991, 12(2):137-147.
- [20] Vostálová J, Zdařilová A, Svobodová A. Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCat keratinocytes[J]. Arch Dermatol Res, 2010, 302(3):171-181.
- [21] Psotova J, Chlopčíková S, Miketova P, et al. Cytoprotectivity of Prunella vulgaris on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes [J]. Fitoterapia, 2005, 76(6):556-561.
- [22] 张梦娇, 杨杏芬, 赵敏, 等. 王老吉凉茶对高脂膳食喂养小鼠氧化应激状态的影响[J]. 华南预防医学, 2014, 40(1):78-81.
- [23] 孙庆雷, 王晓, 刘建华, 等. 黄酮类化合物抗氧化反应性的构效关系[J]. 食品科学, 2005, 26(4):69-73.
- [24] Feng L, X. Jia, M, Zhu M, et al. Antioxidant activities of total phenols of *Prunellae spica* in vitro and in tumor-bearing mice [J]. Molecules, 2010, 15(12):9145-9156.

[责任编辑 周冰冰]