

三叶人字草总黄酮的抗氧化作用评价

王园美, 张莉萍, 李文武*

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院, 武汉 430033)

[摘要] 目的: 评价三叶人字草总黄酮的抗氧化作用。方法: 用 75% 乙醇提取结合聚酰胺纯化制备三叶人字草总黄酮, 并采用紫外分光光度法对其总黄酮含量进行测定; 以丁基羟基茴香醚(BHA), 水溶性维生素 E(Trolox) 和柠檬酸作阳性对照, 测定三叶人字草总黄酮清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH·)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS⁺·)、超氧阴离子和羟自由基的能力, 以及对 Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 的还原能力和对 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 络合能力, 综合评价其抗氧化作用。结果: 三叶人字草中总黄酮的含量为 (3.26 ± 0.36)% (n = 3), 具有清除自由基, 且具有较好的还原能力和金属络合能力。其对 DPPH·、ABTS⁺·、超氧阴离子和羟自由基、Fe³⁺ 还原、Cu²⁺ 还原、Fe²⁺ 络合以及 Cu²⁺ 络合的 IC₅₀ 分别为 7.84, 2.384, 26.48, 1.878, 24.67, 7.67, 77.67, 70.15 mg·L⁻¹, 且均呈一定的量效依赖关系。结论: 三叶人字草总黄酮具有较强的抗氧化作用。

[关键词] 三叶人字草; 总黄酮; 抗氧化; 自由基; 清除率

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0276-05

[doi] 10.11653/syfy2013140276

Evaluation on Antioxidative Activity of Total Flavones of *Kummerowia striata*

WANG Yuan-mei, ZHANG Li-ping, LI Wen-wu*

(Puai Hospital Affiliated to Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430033, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the antioxidative activity of total flavones of *Kummerowia striata*. **Method:** The total flavones of *K. striata* were extracted by 75% ethanol and purified by polyamide resin. And the contents of total flavones were measured. The antioxidative activity of total flavones of *K. striata* were analyzed by using different assays as 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl (DPPH) radical scavenging, diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS⁺)) radical scavenging, superoxide radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, reducing power and chelating ability, with the positive control of the antioxidative activity of butyl hydroxy anisole (BHA), trolox and citric acid. **Result:** The contents of total flavones of *K. striata* were (3.26 ± 0.36)% (n = 3), with strong free radical scavenging activity, effective reducing power and chelating ability. The IC₅₀ of inhibition for DPPH radical, ABTS⁺ radical, superoxide radical, hydroxyl radical, reducing power (Fe³⁺), reducing power (Cu²⁺), chelating ability (Fe²⁺) and chelating ability (Cu²⁺) were 7.84, 2.384, 26.48, 1.878, 24.67, 7.67, 77.67, 70.15 mg·L⁻¹ respectively. And all were related to the dose. **Conclusion:** The total flavones of *K. striata* has obvious antioxidative activity.

[Key words] *Kummerowia striata*; total flavones; antioxidant; free radical; clearance

[收稿日期] 20120831(011)

[第一作者] 王园美, 硕士, 医师, 从事肿瘤学研究, Tel: 13720162340, E-mail: 913602117@qq.com

[通讯作者] *李文武, 主治医师, 硕士, 从事骨科学研究, Tel: 15072356440, E-mail: Liwenwu0312@sina.com

三叶人字草是豆科鸡眼草属植物, 又称为鸡眼草、人字草、三叶草、掐不齐等。全草供药用, 具清热解毒、健脾利湿、利尿通淋、活血止血等功能, 主治感冒发热、暑湿吐泻、黄疸、痢疾、血淋、咯血、跌打损伤、赤白带下^[1-2]。三叶人字草在民间使用非常广

泛,其黄酮类成分主要有芹菜素、槲皮素、芹菜素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-新橙皮糖苷、山奈酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷等^[3],其含量达3.3%^[4]。文献对三叶人字草的抗氧化研究报道深入不够,只限于不同溶剂提取物^[5]。本实验通过测定其总黄酮(KSTF)对 DPPH·, ABTS⁺·, 超氧阴离子和羟自由基的能力,以及对 Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 的还原能力和对 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 络合能力,综合评价其抗氧化作用,探讨其抗氧化作用机制,同时为三叶人字草作为一种天然高效抗氧化物推广利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent8453E 型紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司),BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius),XS 225A 型分析天平(德国 Sartorius),DFY-200 型粉碎机(浙江温岭市大德中药机械有限公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂),TDL-2B 型离心机(Anke 公司)。

1.2 试剂与药品 三叶人字草购自于广州清平药材市场,经华中科技大学同济医学院附属普爱医院陈贵生主任中药师鉴定为豆科鸡眼草属植物鸡眼草 *Kummerowia striata* (Thunb.) Schindl 的全草;芦丁对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),DPPH(批号 20111024)、BHA(批号 20110021)、Trolox(20110102、批号 20120124);Ferrozin(批号 20111120)、neocuproine(批号 20100115)、murexide(批号 20120103)、ABTS(批号 20110913),以上试剂均为 Amresco 公司产品,连苯三酚(Aladdin chemistry co. Ltd,批号 C1207030),其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品溶液的制备 三叶人字草粉末 50 g,加 10 倍量水,加热提取 45 min 2 次,合并滤液。浓缩至适当体积,用聚酰胺色谱柱纯化,得三叶草总黄酮成分,稀释成含三叶草生药量 1 g·mL⁻¹,备用。

2.2 总黄酮含量测定^[4] 采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色法,在 510 nm 处测定吸光度,以芦丁为对照品计算总黄酮(KSTF)的含量。结果三叶人字草总黄酮含量为(3.26 ± 0.36)% (n = 4)。

2.3 清除 DPPH 自由基试验^[6] 取 DPPH 溶液(0.05 g·mL⁻¹)1.0 mL 加入到小试管中,加相应量的样品溶液(相应量以“X”表示,依次为 20,40,60,80,120 μL,下同),加无水乙醇(500 - X) μL,混匀,室温反应 30 min,以甲醇为空白对照,于 517 nm 处

测定吸光度(A),计算清除率。

$$\text{清除率} = (1 - A/A_0) \times 100\%$$

2.4 清除 ABST⁺ 自由基试验^[7] 取 7.4 mol·L⁻¹ 储备液 1 mL 与 2.6 mol·L⁻¹ K₂S₂O₈ 混匀,黑暗中室温放置 12 h,得 ABST⁺ 自由基溶液,使用时用 95% 乙醇稀释至 A_{734 nm} 为 0.70 ± 0.02 的应用液。相应量样品待测液加入(300 - X) μL 95% 乙醇和 1.2 mL ABST⁺ 自由基应用液,混匀,室温下避光反应 6 min,以 95% 乙醇为空白在 734 nm 处测 A,计算清除率。计算公式同 2.3。

2.5 清除超氧阴离子自由基试验^[8] 在直径 1 cm 的石英比色皿中,加入(2 920 - X) μL Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol·L⁻¹,pH 8.2,含 1 mol·L⁻¹ EDTA)中和相应量样品溶液,再加 80 μL 连苯三酚(11.6 mol·L⁻¹ 的 10 mol·L⁻¹ 盐酸溶液),迅速混匀,开始计时,每隔 30 s 读 A_{325 nm},至 300 s 时为止。计算清除率。计算公式同 2.3。

2.6 清除羟自由基试验^[9] 在小试管中加入相应量样品待测液,挥干溶剂,依次加入 300 μL 磷酸盐 KH₂PO₄-NaHPO₄ 缓冲液(0.2 mol·L⁻¹,pH 7.4),100 μL Na₂EDTA(0.5 mol·L⁻¹),50 μL FeCl₃ 溶液(0.312 5 mmol·L⁻¹),50 μL H₂O₂ 溶液(33.6 mmol·L⁻¹),50 μL 脱氧核糖 DR 溶液(33.6 mmol·L⁻¹),50 μL 维生素 C 溶液(1.2 mmol·L⁻¹),50 °C 水浴 20 min,取出,加三氯乙酸溶液(0.5 g·mL⁻¹)和硫代巴比妥酸溶液 TBA(1%)各 0.5 mL,100 °C 沸水浴 15 min,取出,流水冷却,测 530 nm 处 A,计算清除率。

2.7 Fe³⁺ 的还原能力试验^[10-12] 在离心管中加入相应量样品待测液和(350 - X) μL 的磷酸盐缓冲液(0.2 mol·L⁻¹,pH 6.6),再加入 250 μL 的 K₃Fe(CN)₆ 溶液(1 g·mL⁻¹),混匀,50 °C 水浴 20 min,取出,后加入 250 μL 三氯乙酸(TCA)溶液(10%),3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 0.4 mL,加蒸馏水和 FeCl₃ 溶液(0.1%)各 0.4 mL,90 s 后于 700 nm 处测 A,计算还原能力。

$$\text{还原率} = (A - A_0)/(A_{\max} - A_0) \times 100\%$$

式中 A 为样品吸光度,A₀ 为空白溶液吸光度,A_{max} 为 3 组溶液中测定的最大 A,下同。

2.8 Cu²⁺ 的还原能力试验^[12] 在小试管中加入 0.01 mol·L⁻¹ 的 CuSO₄ 溶液 0.125 mL 和 0.125 mL neocuproine (7.5 × 10⁻³ mol·L⁻¹),后加入样品待测液和 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸铵缓冲液 0.75 mL,室温放置

30 min, 测 450 nm 处 A, 计算还原能力, 公式同 2.7。

2.9 Fe²⁺ 的络合能力试验 在小试管中加入相应量的样品待测液和 (200 - X) μL 的甲醇溶液, 再加 250 μmol·L⁻¹ 的 FeCl₂·4H₂O 溶液 0.1 mL, 混匀, 室温静置 3 min, 加 0.55 mL 甲醇和 500 μmol·L⁻¹ 的 Ferrozine 溶液 0.15 mL, 混匀, 静置 5 min, 以 1 g·L⁻¹ 柠檬酸水溶液为阳性对照, 测 A_{562 nm}, 计算络合率。

$$\text{络合率} = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

2.10 Cu²⁺ 的络合能力试验 取 1.2 mL 骨螺紫 murexide 溶液 (0.25 μmol·L⁻¹), 依次加入 (240 - X) μL 乌洛托品盐酸缓冲液 (pH 5.0, 30 mmol·L⁻¹, 含 30 mmol·L⁻¹ KCl), 60 μL CuSO₄ 溶液 (20 mmol·L⁻¹) 至 240 μL, 混匀, 并开始计时, 室温放置 1 min 后, 再加入相应量样品溶液 (空白对照加入相应量乌洛托品盐酸缓冲液), 混匀, 显色稳定后, 分别于 485 nm 和 520 nm 处测定 A。计算 A_{485 nm}/A_{520 nm}。

$$\text{络合率} = \{1 - [(A_{485}/A_{520}) - (A_{485}/A_{520})_{\min}] / [(A_{485}/A_{520})_{\max} - (A_{485}/A_{520})_{\min}]\} \times 100\%$$

3 结果

3.1 清除 DPPH 自由基试验 在所给浓度范围内, 三叶人字草总黄酮 (KSTF) 清除 DPPH 自由基的作用随着质量浓度的增大而增强, 并呈量效关系。在较低质量浓度时, KSTF 对 DPPH 自由基的清除作用 < 阳性对照 BHA 和 Trolox; 而在高浓度时, 其清除率与阳性对照接近。KSTF, BHA, Trolox 对 DPPH 自由基清除的 IC₅₀ 分别为 7.84, 4.76, 4.89 mg·L⁻¹, 提示三叶人字草总黄酮具有一定的清除 DPPH 自由基能力。见图 1。

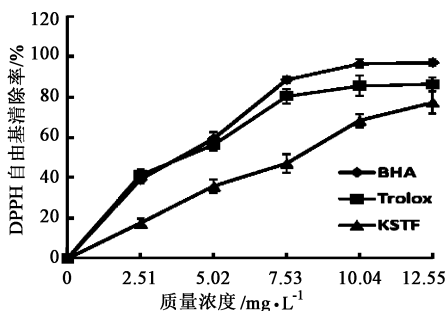


图 1 三叶人字草总黄酮对 DPPH 自由基影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 清除 ABST⁺ 自由基试验 KSTF, BHA, Trolox 对 ABST⁺ 自由基清除的 IC₅₀ 分别为 2.384, 1.237, 1.247 mg·L⁻¹, 提示三叶人字草总黄酮具有较强的清除 ABST⁺ 自由基能力, 且呈明显剂量依赖性。见图 2。

3.3 清除超氧阴离子自由基试验 KSTF, BHA,

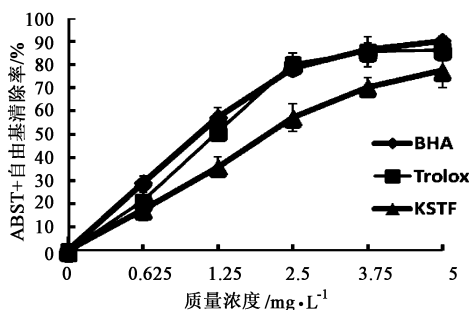


图 2 三叶人字草总黄酮对 ABST⁺ 自由基的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Trolox 对超氧阴离子自由基清除的 IC₅₀ 分别为 26.48, 161.73, 184.57 mg·L⁻¹, 显示三叶人字草总黄酮表现出了很强的超氧阴离子自由基清除作用, 且效果强与阳性对照 BHA 和 Trolox, 并呈明显剂量依赖性。见图 3。

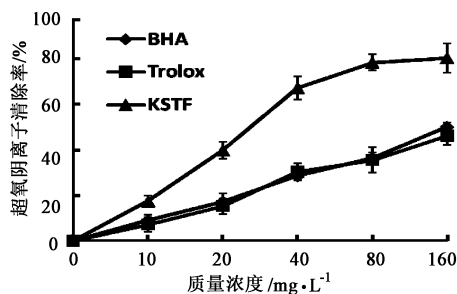


图 3 三叶人字草总黄酮对超氧阴离子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 清除羟自由基试验 KSTF, BHA, Trolox 对羟自由基均具有清除作用, 其清除率 IC₅₀ 分别为 1.878, 1.246, 1.284 mg·L⁻¹, 显示三叶人字草总黄酮表现出了很强的羟自由基清除作用, 且效果与阳性对照 BHA 和 Trolox 相当, 并呈现明显的剂量依赖性。见图 4。

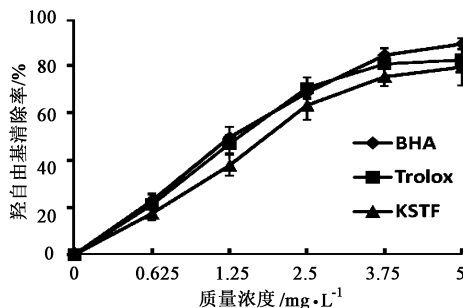


图 4 三叶人字草总黄酮对羟自由基的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 Fe³⁺ 的还原能力试验 KSTF, BHA, Trolox 均能有效还原体外产生的 Fe³⁺ 为 Fe²⁺, 其还原力 IC₅₀ 分别为 24.67, 12.16, 14.87 mg·L⁻¹, 提示三叶人字草总黄酮有较强的 Fe³⁺ 的还原能力, 并呈明显剂量依赖性。见图 5。

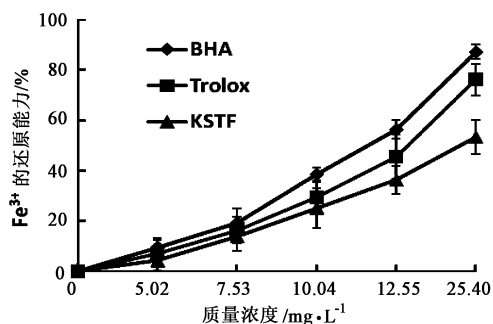


图5 三叶人字草总黄酮对 Fe³⁺ 还原能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 Cu²⁺ 的还原能力试验 KSTF, BHA, Trolox 均能有效还原 Cu²⁺, 其还原力 IC₅₀ 分别为 7.67, 8.15, 24.36 mg·L⁻¹, 显示三叶人字草总黄酮表现出了较强的 Fe³⁺ 的还原能力, 并呈现明显的剂量依赖性。见图 6。

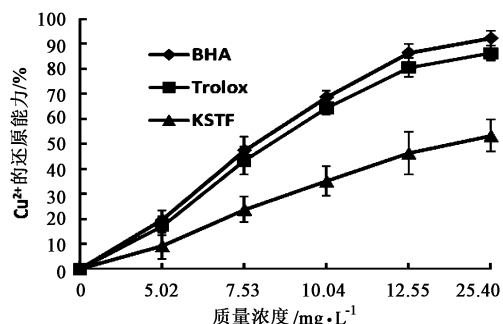


图6 三叶人字草总黄酮对 Cu²⁺ 还原能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 Fe²⁺ 的络合能力试验 KSTF 和 Sodiumcitra 均对 Fe²⁺ 有一定的络合能力, 其还原力 IC₅₀ 分别为 77.67, 14.38 mg·L⁻¹, 显示三叶人字草总黄酮表现出了较强的对 Fe²⁺ 的络合能力, 其值接近阳性对照 Sodiumcitra 的 1/2, 并呈明显剂量依赖性。见图 7。

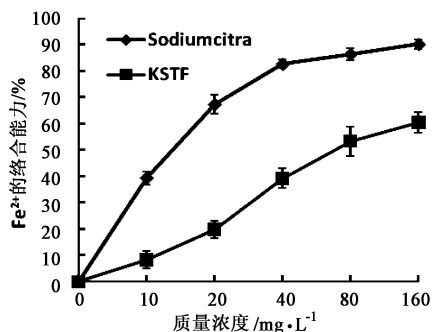


图7 三叶人字草总黄酮对 Fe²⁺ 络合能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.8 Cu²⁺ 的络合能力试验 KSTF 和 Sodiumcitra 均对 Cu²⁺ 有一定的络合能力, 其 IC₅₀ 分别为 70.15, 39.37 mg·L⁻¹, 显示三叶人字草总黄酮表现出了一定的对 Cu²⁺ 络合能力, 并呈明显剂量依赖性。见

图 8。

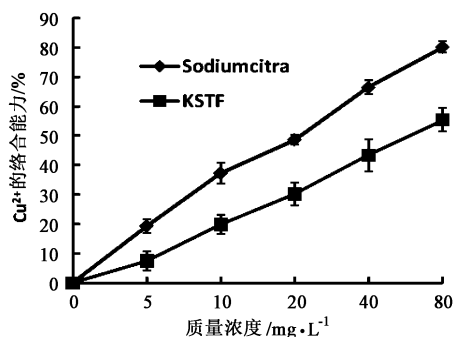


图8 三叶人字草总黄酮对 Cu²⁺ 的络合能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

人体新陈代谢过程中产生的过量自由基可能会引发多种疾病, 如动脉硬化、关节炎、糖尿病、肌肉萎缩和老年痴呆等^[13]。而抗氧化剂可有效清除自由基, 达到预防和治疗某些疾病的目的。近年来, 在植物中寻找天然抗氧化剂已成为研究热点^[14]。本实验结果显示, 三叶人字草总黄酮对 DPPH·, ABTS⁺·, 超氧阴离子和羟自由基等具有不同程度的清除作用, 同时对 Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 具有一定的还原能力, 以及对 Fe²⁺、Cu²⁺ 具有一定的络合能力, 提示三叶人字草总黄酮具有较强的抗氧化作用, 现代药理研究表明具有抗炎镇痛^[15-17]、止血^[18]作用。实验结果提示总黄酮可能是三叶人字草抗炎止血等作用的药效物质基础。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第十卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3239.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 159.
- [3] 唐人九. 人字草黄酮类化学成分研究[J]. 华西药理学杂志, 1996, 11(1): 5.
- [4] 张宝徽, 李芳芳, 周牡娜, 等. 鸡眼草属两种植物中总黄酮的含量测定[J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(1): 33.
- [5] 苏炜, 李培源, 霍丽妮, 等. 三叶人字草抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2438.
- [6] 王燕, 王儒彬, 孙磊, 等. 不同采摘期连翘叶中总黄酮、总酚酸含量与 DPPH 自由基清除能力的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 109.
- [7] 苗爱清, 孙世利, 曾琼, 等. 超声波辅助提取绿茶多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 广东茶叶, 2010, 15(4): 40.
- [8] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36.

丹参酮 II_A 对血管平滑肌细胞内质网 应激相关基因表达的影响

付强, 张妍, 沈晓君*, 赵君玫
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:研究丹参酮 II_A 对同型半胱氨酸(HCY)诱导增殖血管平滑肌细胞(VSMC)内质网应激(ERS)相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip)表达的影响,探讨丹参酮 II_A 抗动脉粥样硬化的机制。方法:建立 HCY 诱导的兔 VSMC 增殖模型,与不同浓度的丹参酮 II_A 共同培养,Annexin/PI 双染法、原位缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡率,观察凋亡细胞形态;实时荧光定量 PCR 检测 Bip 基因表达。结果:丹参酮 II_A 可显著促进兔 VSMC 凋亡,细胞凋亡率与 HCY 组相比差异显著($P < 0.01$),且存在剂量依赖性;丹参酮 II_A 组 Bip mRNA 表达水平显著升高,与 HCY 组相比差异显著($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:丹参酮 II_A 上调 Bip 基因表达,放大 ERS 信号,诱导兔 VSMC 凋亡,可能是其抗动脉粥样硬化的机制之一。

[关键词] 丹参酮 II_A; 血管平滑肌细胞; 同型半胱氨酸; 免疫球蛋白重链结合蛋白; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0280-04

[doi] 10.11653/syjf2013140280

Effect of Tanshinone II_A on Expression of Genes Related to Vascular Smooth Muscle Cells Endoplasmic Reticulum Stress

FU Qiang, ZHANG Yan, SHEN Xiao-jun*, ZHAO Jun-mei

(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[收稿日期] 20130528(147)

[基金项目] 河南省基础与前沿技术研究计划项目(112300410051);郑州市科技创新团队项目(121PCXTD520)。

[第一作者] 付强,副教授,从事心血管病理及中医药防治研究,Tel:13937163799,E-mail:fuqiang@haictm.edu.cn

[通讯作者] * 沈晓君,教授,从事心血管病理及中医药防治研究,Tel:13526669581,E-mail:shenxiaojun0628@163.com

- [9] 李燕菊,杜浩,李琴山,等. 贵州产天冬醇提液体外氧自由基清除作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):182.
- [10] 张改平,杨建雄,朱玉安,等. 紫草提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5):490.
- [11] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的体外抗氧化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1):313.
- [12] Kumaran A, Karmakaran R J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Celeus aromaticus* [J]. Food Chem, 2006, 97(1):109.
- [13] Suresh Kumar K, Ganesan K, Subba Rao P V. Antioxidant potential of solvent extracts of *kappaphycus alvarezii* (doty) doty-inedible seaweed [J]. Food Chem, 2008, 107(1):289.
- [14] Contini M, Baccelloni S, Massantini R, et al. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature [J]. Food Chem, 2008, 110(3):659.
- [15] 周玖瑶,黄桂英,韩坚. 三叶人字草抗炎镇痛作用研究[J]. 中国医药导报, 2007, 20(4):155.
- [16] 王霞,周玖瑶,孙毅东,等. 三叶人字草对 IgA 肾病模型大鼠的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(2):147.
- [17] 余应嘉,王霞,吴俊标,等. 三叶人字草对小鼠免疫系统及胃肠运动的药效作用[J]. 今日药学, 2010, 20(9):9.
- [18] 周玖瑶,陈蔚文,黄桂英,等. 三叶人字草止血作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3):65.

[责任编辑 李玉洁]