

从抗氧化角度评价南五味子“醋制入肝”的炮制机制

郑洁, 张萌, 邓翀*, 宋小妹, 韩磊
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:**从体内抗氧化和体外抗氧化相结合角度评价南五味子“醋制入肝”的炮制机制。**方法:**以抗坏血酸为阳性对照,采用紫外分光光度法,于 517 nm 处测定南五味子醋制前后样品对 2,2-二苯基-1-苦味基胍(DPPH)吸光度的影响,考察南五味子醋制前后体外清除自由基能力差异;以四氯化碳(CCl₄)致大鼠急性肝损伤为动物模型,SD 大鼠随机分成正常对照组、CCl₄模型组、五味子炮制前后给药组分别设置高、中、低 3 个剂量组,给药剂量以生药量计算分别为 5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹。连续给药 10 d,每日 1 次。于造模后 24 h 剖取肝脏,测定南五味子醋制前后饮片高、中、低剂量组肝组织中总抗氧化能力(T-AOC)含量变化情况;体内外相结合综合评价南五味子醋制前后抗氧化能力差异。**结果:**体外实验结果显示,醋制南五味子清除 DPPH 自由基(IC₅₀ 1.887 1 g·L⁻¹)的能力比南五味子原药材清除能力(IC₅₀ 4.571 2 g·L⁻¹)强;体内总抗氧化能力测定结果显示五味子炮制前和炮制后各剂量组均可显著升高大鼠肝脏中 T-AOC 活性(与对照组比 $P < 0.05$),炮制后中剂量和小剂量组效果要明显优于炮制前相应剂量组($P < 0.05$)。**结论:**从抗氧化角度揭示醋制南五味子“醋制入肝”的炮制机制。

[关键词] 南五味子; 2, 2-二苯基-1-苦味基胍; 抗氧化; 总抗氧化能力

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0189-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1129.049.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 11:29

Mechanism of ‘Cuzhi Rugan’ of *Schisandra sphenanthera* Based on Anti-oxidation

ZHENG Jie, ZHANG Meng, DENG Chong*, SONG Xiao-mei, HAN Lei
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** In order to elaborate the traditional Chinese medicine (TCM) theory ‘Cuzhi Rugan’ scientifically, we estimated vinegar-steamed *Schisandra sphenanthera* based on anti-oxidation *in vivo* and *in vitro*. **Method:** We estimated the difference in the aspect of anti-oxidation between vinegar-steamed and non-vinegar-steamed *S. sphenanthera* by (DPPH) radicals scavenging *in vitro* through ultraviolet spectrophotometry at 517 nm, ascorbic acid as the positive control. Meanwhile we measured the difference in the aspect of liver tissue (T-AOC), between vinegar-steamed and non-vinegar-steamed *S. sphenanthera*, intragastric administration with high (5 g·kg⁻¹), medium (2.5 g·kg⁻¹) and low (1.25 g·kg⁻¹) doses per day and lasted ten days by rat acute liver injury model caused by CCl₄ *in vivo*. Liver was collected 24 h after modeling. Finally, we comprehensively evaluated the anti-oxidation ability between vinegar-steamed and non-vinegar-steamed *S. sphenanthera* *in vitro* and *in vivo*. **Result:** The *in vitro* results showed that the ability of DPPH radicals scavenging of vinegar-steamed *S. sphenanthera* (IC₅₀ 1.887 1 g·L⁻¹) was better than the non-vinegar-steamed one (IC₅₀ 4.571 2 g·L⁻¹). The *in vivo* results showed that the ability of T-AOC in the rat liver tissue of vinegar-steamed *S. sphenanthera* and non-vinegar-steamed one were much higher than the positive control one in every doses ($P < 0.05$). And the ability of T-AOC in the rat liver tissue of medium and low doses vinegar-steamed *S. sphenanthera*

[收稿日期] 20120405(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30902002);陕西省中医药管理局项目(jc65)

[通讯作者] * 邓翀, 博士, 讲师, 从事中药质量标准及中药体内分析研究, Tel: 029-38185165, E-mail: fmmudz217@126.com

are much higher than the non-vinegar-steamed one ($P < 0.05$). **Conclusion:** The ability of radicals scavenging by *S. sphenanthera* is enhanced by vinegar-steamed which is a frequently-used TCM prepared method, and we also try to elaborate the 'Cuzhi Rugan' in science.

[**Key words**] *Schisandra sphenanthera*; DPPH; anti-oxidation; T-AOC

南五味子又称华中五味子,为木兰科植物华中五味子的干燥成熟果实,具有益气、敛肺、生津、止渴、止泻、敛汗、壮阳、补肾等功能,是产自我国的名贵中药材^[1]。本课题组前期对南五味子醋制炮制工艺进行了研究,以探讨南五味子“醋制入肝”炮制机制。活性氧自由基引发的氧化应激是多种肝病发病的共同病理生理基础,在各种慢性肝病的形成和发展过程中起重要作用^[2]。本文采用 2,2-二苯基-1-苦味基肼自由基(DPPH)清除体外实验与四氯化碳(CCl_4)急性肝损伤动物模型体内实验相结合的方法评价南五味子炮制前后抗氧化活性的差异,从抗氧化角度探讨南五味子“醋制入肝”的炮制机制。

1 材料

1.1 试药 南五味子药材(采购于陕西省南郑县,经陕西中医学院生药教研室王继涛高级实验师鉴定是木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 的干燥果实);抗坏血酸(天津市天力化学试剂有限公司,批号 2010608);2,2-二苯基-1-苦味基肼自由基(DPPH,批号 CR0032);总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(苏州达尔文生物科技有限公司,批号 20120101A);水为纯净水,其他试剂均为分析纯。 CCl_4 (天津市天力化学试剂有限公司,批号 20111008)。

1.2 动物 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,7~8 周龄,清洁级,体质量(220 ± 20)g,由西安交通大学动物实验中心提供,合格证 2007-01。

1.3 仪器 UV1102 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),电子天平(萨多利斯 GB2042 电子天平,0.01 mg),旋转蒸发仪 RE52-05(上海亚容生化仪器厂),TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂),ELX-808 型自动酶标仪(美国宝特公司)。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 五味子醇提取工艺 分别称取南五味子炮制前后样品粉末(60 目筛)各 2 kg,用 16 倍量 55% 乙醇提取 2 次,每次 60 min,滤过,合并提取液。用旋转蒸发仪浓缩提取液并回收乙醇,所得浓缩浸膏,再经过烘箱干燥,最后得到干膏^[3]。炮制前五味子

出膏率 20.438%,炮制后五味子出膏率 24.668%。

2.1.2 供试品制备 分别精密称取 1 g 南五味子炮制前后醇提浓缩干膏,以 55% 乙醇溶解,定容于 25 mL 量瓶中。储存于 4 °C,冷藏待用于体外抗氧化实验,测定前稀释^[3]。

分别精密称取一定量南五味子炮制前后醇提浓缩干膏,以 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液溶解,从而制成不同给药剂量的灌胃药液,用于 CCl_4 急性肝损伤动物模型体内实验。

精密称取抗坏血酸 25.00 mg,用无水乙醇溶解定容于 50 mL 量瓶中,定容得 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮备液,置于冰箱中冷藏备用。

2.1.3 DPPH 的制备 精密称取 DPPH 约 20.6 mg,用无水乙醇溶解,定容于 50 mL 量瓶中,置于冰箱中冷藏备用(临用时配,只能稳定存在 5 h,深蓝色)。

2.2 五味子体外抗氧化实验

2.2.1 测定方法 清除率计算公式为: $[1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$,式中 A_c 为 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 55% 乙醇混合后的吸光度, A_i 为 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 样品混合后的吸光度, A_j 为 2 mL 样品与 2 mL 55% 乙醇混合后的吸光度。每份样品反应 30 min,于 517 nm 处测 A ^[4],平行操作 3 次计算清除率。

2.2.2 DPPH 自由基稳定性试验 将配制一定浓度的 DPPH 乙醇溶液在室温下放置 60 min,每隔 10 min 测其 A 。

2.2.3 DPPH 线性范围考察 分别精密移取 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mL DPPH 对照品溶液至 10 mL 量瓶,用无水乙醇稀释定容,分别得 0.008, 0.012, 0.017, 0.021, 0.025, 0.029 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液。于 517 nm 处测 A 。以浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线。

2.2.4 阳性对照清除 DPPH 自由基试验 精密量取抗坏血酸对照品溶液 1.0 mL,依次稀释为原对照液的 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80, 1/100,再分别吸取 2 mL,按照 2.2.1 项下测定方法进行测定,平行样本数为 3。

2.2.5 醋制前后样品与 DPPH 反应时间对其清除

率的影响 炮制前后样品同一质量浓度(8.107 7 g·L⁻¹)2.0 mL与DPPH混合后分别在0,10,20,30,40,50,60 min测定其A,计算清除率,考察反应终点及反应稳定性,平行样本数为3。

2.2.6 南五味子炮制前后样品清除 DPPH 自由基

将各样品溶液按照一定的浓度梯度依次稀释,再分别吸取2 mL样品溶液,按照2.2.1项下测定方法进行测定,平行样本数为3。

2.3 五味子炮制前后体内抗氧化实验

2.3.1 CCl₄致急性肝损伤模型制备及分组给药

取SD大鼠80只,每组10只,每组雌雄各半,随机分成8组,即:正常对照组、CCl₄模型组、五味子炮制前后给药组分别设置高、中、低3个剂量组,ig给药剂量以生药量计算分别为5,2.5,1.25 g·kg⁻¹。空白对照组和CCl₄模型组ig给予等量0.5%羧甲基纤维素钠水溶液,每日1次,连续给药10 d。于末次给药后2 h,除正常对照组外,其余各组ip 1 mL·kg⁻¹ CCl₄原液,于注射CCl₄后禁食不禁水24 h,颈总动脉取血,分离血清(测定其他生化指标),取血后立即脱颈处死大鼠,剖取肝脏,在肝右中叶相同部位取4 g肝组织,放入置有生理盐水的匀浆器中,在冰浴中制备成0.1 g·mL⁻¹肝匀浆,3 500 r·min⁻¹离心10 min,上清液置4℃保存备用。

2.3.2 总抗氧化能力测定 按试剂盒说明测定肝匀浆总抗氧化能力(T-AOC)活性。

2.4 统计方法 试验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 12.0软件作单因素方差分析和独立样本t检验分析, $P < 0.05$ 有统计意义。

3 结果

3.1 南五味子醋制前后体外抗氧化实验

3.1.1 DPPH 自由基稳定性和线性范围考察 测得其吸光度变异系数为0.2%,表明DPPH自由基在60 min内稳定性良好,可用以提取物抗氧化活性的分析。通过绘制标准曲线,得吸光度与DPPH浓度的线性回归方程为 $Y = 0.982 9X - 0.018$, $R^2 = 0.998 1$ 。DPPH在0.008 ~ 0.029 g·L⁻¹呈线性相关。

3.1.2 阳性对照清除 DPPH 自由基试验 抗坏血酸自由基清除作用与浓度相关,随浓度升高而升高,见表1。

3.1.3 醋制前后样品与 DPPH 反应时间对其清除率的影响 反应30 min后,清除率趋于稳定,反应30 min后测定清除率是科学合理的。见图1。

表1 阳性对照抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	质量浓度/g·L ⁻¹	自由基清除率/%
抗坏血酸	0.500 0	96.95 ± 0.68
	0.050 0	96.34 ± 0.35
	0.025 0	92.21 ± 0.98
	0.012 5	85.19 ± 1.46
	0.008 3	71.45 ± 0.66
	0.006 3	50.38 ± 1.61
	0.005 0	26.56 ± 1.79

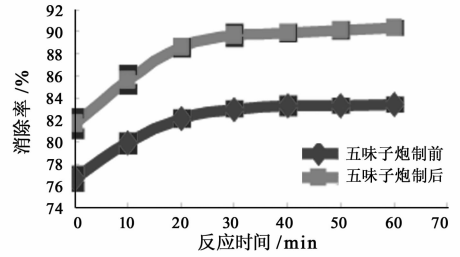


图1 DPPH 反应时间与各提取液对 DPPH 清除率的关系

3.1.4 南五味子炮制前后样品清除 DPPH 自由基

经计算炮制前饮片清除 DPPH 自由基的半数抑制率 IC₅₀ 为 4.571 2 g·L⁻¹,炮制后饮片 IC₅₀ 为 1.887 1 g·L⁻¹。由表2可知,相同剂量下,南五味子炮制后体外抗氧化活性明显强于炮制前。

表2 南五味子炮制前后样品对 DPPH 自由基清除率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度 /g·L ⁻¹	清除率/%	
	炮制前	炮制后
12.161 5	97.31 ± 0.30	100 ± 0.13
10.134 6	88.31 ± 0.20	99.73 ± 0.25
8.107 7	84.36 ± 0.28	91.50 ± 1.21
6.080 8	75.83 ± 0.19	80.88 ± 0.74
4.864 6	66.03 ± 0.24	75.83 ± 0.33
3.648 5	57.03 ± 0.32	66.93 ± 0.92
2.432 3	43.29 ± 0.18	53.52 ± 1.02
1.621 5	37.60 ± 0.15	47.94 ± 1.25

3.2 醋制南五味子体内总抗氧化能力的测定 结果显示 CCl₄致大鼠肝损伤模型成立(模型组与对照组比 $P < 0.05$);五味子炮制前和炮制后各剂量组均可显著升高大鼠肝脏中 T-AOC 活性(与对照组比 $P < 0.05$),说明五味子具有一定的抗氧化能力。且炮制后中剂量和小剂量组效果要明显优于炮制前相应剂量组(炮制后各剂量组与相应炮前各组比较, $P < 0.05$)。见表3。

表 3 五味子炮制前后各剂量组
对大鼠肝匀浆 T-AOC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T-AOC/U·mL ⁻¹
正常对照	-	1.115 ± 0.470
CCl ₄ 模型	-	0.719 ± 0.233 ¹⁾
炮制前五味子	5	1.076 ± 0.455 ^{1,2)}
	2.5	1.102 ± 0.302 ^{1,2)}
	1.25	1.347 ± 0.347 ^{1,2)}
炮制后五味子	5	1.547 ± 0.712 ^{1,2)}
	2.5	2.095 ± 0.386 ^{1,2,3)}
	1.25	2.463 ± 0.957 ^{1,2,3)}

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.05$;与 CCl₄模型组比²⁾ $P < 0.05$;与炮制前同剂量组比³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

现代医学研究已证实诸多疾病的发生和发展与自由基导致的机体细胞氧化损伤密切相关,因此从天然产物中寻找安全有效的抗氧化剂成为近年来的研究热点之一^[5],采用 DPPH 法评价中药清除自由基能够在某种程度上能够反映该中药的抗氧化能力。生物体内的能量代谢将氧气作为有氧代谢过程中的电子接受体,不可避免地产生活性氧(ROS)自由基。ROS 与某些生理活性物质的调控和炎症免疫过程密切相关,过量的 ROS 容易导致氧化应激^[6]。氧化应激是酒精性肝损伤、非酒精性脂肪肝、病毒性肝炎、药物性肝损伤、肝纤维化发生发展的关键环节^[7-9]。所以采用清除自由基能力作为评价醋制南五味子“醋制入肝”是科学可行的。体外评价结果表明,在相同剂量下,醋制南五味子清除自由基的能力强于其生品,醋制提高了五味子抗氧化能力。

肝脏是体内的重要生物代谢器官,CCl₄ 经肝微粒体细胞色素 P450 代谢生成自由基($\cdot\text{CCl}_3$)攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化,或与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合,破坏肝细胞膜结构和功能的完整^[10]。因此我们做了 CCl₄ 急性肝损伤动物模型的实验,用总抗氧化能力(T-AOC)也能清楚准确的说明炮制前后五味子的抗氧化能力差异。机体抗氧化防御系统主要由抗氧化酶类和抗氧化剂构成,对于单项抗氧化酶或抗氧化成分的测定,只能反映机体抗氧化能力的一个侧面,不能全面反映组织的抗氧化能力,而 T-AOC 的测定能较全面地反映动物机体的抗氧化状态^[11]。采用 T-AOC 作为评价指标能够反映药物的抗氧化能力。

南五味子对 CCl₄ 致急性肝损伤肝组织中 T-AOC 表达的影响情况,醋制南五味子中、小剂量组与炮制前相应剂量组比较,肝组织中 T-AOC 表达具有显著性差异 ($P < 0.05$),表明醋制南五味子肝脏总抗氧化能力明显强于生品。

本研究以体外 DPPH 法与 CCl₄ 致急性肝损伤动物模型肝脏 T-AOC 相结合的评价方法,评价醋制南五味子抗氧化能力,研究结果表明,醋制增强南五味子抗氧化能力,可以改善 CCl₄ 致急性肝损伤的氧化应激状态。从抗氧化角度诠释了南五味子“醋制入肝”的炮制原理。

[参考文献]

[1] 魏景文. 五味子药理研究新进展[J]. 天津药学, 2009, 21(5): 55.

[2] 刘亚锋. 氧化应激与肝脏保护[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(7): 594.

[3] 邓翀, 颜永刚, 梁婷, 等. 多指标综合评价南五味子木脂素提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 4.

[4] 王晶, 李丽, 刘春明, 等. 不同红药提取物中总酚的测定及抗氧化活性的 DPPH 法评价研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(3): 513.

[5] 薛海萍, 朱春赞, 芮欣忆, 等. 半枝莲醇提工艺的优化及体外抗氧化活性评价的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 12.

[6] 马永全, 于新, 黄雪莲, 等. 南药五味子提取物的抗菌及抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 45.

[7] 房龙, 杜时雨, 赵洪川, 等. 氧化应激在大鼠乙醇及四氯化碳致慢性肝损伤中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(3): 234.

[8] Emanuele Albano, Matteo Vidali. Immune mechanisms in alcoholic liver disease [J]. Genes Nutr, 2009, 5(2): 141.

[9] J M Schattenberg, Y Wang, R M Rigoli, et al. CYP2E1 overexpression alters hepatocyte death form menadione and fatty acids by activation of ERK1/2 signaling [J]. Hepatology, 2004, 39(2): 444.

[10] 林兴, 黄权芳, 张士军, 等. 山芝麻对 CCl₄ 诱导小鼠肝损伤的脂质过氧化反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 147.

[11] Bezaire V, Seifert E L. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery [J]. Faseb J, 2007, 21(2): 312.

[责任编辑 聂淑琴]