

弯管列当提取物的抗氧化活性

白贞芳¹, 陆景坤², 王晓琴^{2*}, 刘勇¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 内蒙古医学院药学院, 呼和浩特 010110)

[摘要] 目的: 研究弯管列当不同提取部位对 DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼) 自由基的清除能力及对 H₂O₂ 诱导的人胚肾细胞系 HEK-293 细胞氧化损伤的保护作用。方法: 弯管列当 70% 乙醇粗提物, 依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取后, 得到乙酸乙酯提取部位(gg1)、正丁醇提取部位(gg2)和水部位(gg3)。用清除 DPPH 自由基法测试 gg1, gg2, gg3 的抗氧化活性。用 H₂O₂ 建立人胚肾细胞系 HEK-293 细胞氧化损伤模型, 用 MTT 法检测细胞活力, 观察 gg1, gg2, gg3 对氧化受损细胞活力的影响。结果: DPPH 实验的 IC₅₀ 从小到大依次为: gg1 (0.042 9 g·L⁻¹) < gg2 (0.059 9 g·L⁻¹) < V_c (0.071 8 g·L⁻¹) < gg3 (0.330 3 g·L⁻¹), 表明 gg1, gg2 具有较强的抗氧化活性。研究结果亦表明弯管列当的 gg1, gg2, gg3 均能明显提高受损伤 HEK-293 细胞的活力, 表现出抗氧化活性。结论: 弯管列当以上各提取部位均具有一定的清除自由基、抗氧化的活性。

[关键词] 弯管列当; 清除 DPPH 自由基; 人胚肾细胞系 HEK-293 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0232-04

Anti-oxidant Properties of Extracts from *Orobancha cernua* var. *cumana*

BAI Zhen-fang¹, LU Jing-kun², WANG Xiao-qin^{2*}, LIU Yong¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Inner Mongolia Medical College, Huhehaote 010110, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities of extracts from *Orobancha cernua* var. *cumana*. **Method:** The 70% ethanol extracts from *O. cernua* var. *cumana* was extracted successively with ethyl acetate and *n*-butanol. The three fractions of ethyl acetate, *n*-butanol, and water were tested using assays of the scavenging effects on DPPH. The model of oxidative damage of human embryonic kidney cell line HEK-293 cells was induced by H₂O₂, MTT assay was used to evaluate the cell viability. **Result:** The IC₅₀ in DPPH test were in the following orders: ethyl acetate (0.042 9 g·L⁻¹) < *n*-butanol

[收稿日期] 20120409(284)

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金项目(2010BS1202); 内蒙古医学院科学技术研究项目博士启动基金(NY2010BQ007)

[第一作者] 白贞芳, 博士, 讲师, 从事药用植物学及相关学科的教学和科研, Tel: 010-84738623, E-mail: baizhenfang@sina.com

[通讯作者] * 王晓琴, 博士, 教授, 从事中蒙药活性成分分布规律及质量控制研究, Tel: 13948816535, E-mail: wangxiaogin760519@yahoo.com.cn

[7] Liu J, Jin D Z, Xiao L, et al. Paeoniflorin attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced learning dysfunction and brain damage in rats[J]. Brain Res, 2006, 1089(1):162.

[8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1052.

[9] 李贻奎, 宁可永, 梁嵘, 等. 大鼠冠状动脉结扎心肌缺血模型方法的改进[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(4):427.

[10] 许波华, 许立. 中药抗心肌缺血作用机制的研究进展

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15):265.

[11] 李玉杰. 急性心肌梗死的诊断[J]. 新医学, 2008, 39(11):745.

[12] 王道成, 李七一, 朱萱萱. 冠心平对异丙肾上腺素致心肌缺血的试验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):143.

[13] 王秀丽, 李耿, 赵保胜, 等. 复方丹参冻干粉针的制备及其对急性心肌缺血大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):171.

($0.0599 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) < V_c ($0.0718 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) < water ($0.3303 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). The ethyl acetate fraction showed the strongest scavenging activity to DPPH free radicals. The three fractions of ethyl acetate, n-butanol and water could significantly improve the survival rate of injured HEK-293 cells, showing the antioxidant activities. **Conclusion:** These results demonstrate that the extracts from *O. cernua* var. *cumana* have some anti-oxidant and free radical scavenging activities.

[**Key words**] *Orobancha cernua* var. *cumana*; DPPH free radical scavenging activities; human embryonic kidney 293 cells

弯管列当为列当科寄生草本植物^[1],主要分布在内蒙古、吉林、河北、山西、陕西、甘肃、青海和新疆等省区,具有补肾助阳、强筋骨的作用。用于治疗阳痿、腰腿酸软、神经官能症、小儿腹泻等,外用消肿。蒙药主治炭疽^[2]。文献报道其提取物有抑制小鼠体内外肝脏过氧化脂质的生成、抗疲劳、改善脑组织循环、增强免疫及雄性激素样等作用^[3-4]。

研究证明肾脏局部组织氧自由基的产生及消除失衡是慢性肾脏病变发生发展众多因素中的一种重要致病机制^[5],而大多数补肾类中草药具有减少自由基损伤、抗氧化、延缓衰老的功效。本文通过弯管列当不同提取部位对 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical DPPH)自由基清除能力的研究来探讨弯管列当的抗氧化活性。近年来,国内已广泛利用 DPPH 法来评价中草药提取物清除体内自由基和抗氧化的活性^[6-8]。DPPH 是一种稳定的以氮为中心的有机自由基。通过检测物质对 DPPH 自由基的清除能力可以表示其抗氧化性的强弱。DPPH 在 517 nm 波长处有强吸收峰,溶液呈紫色;当 DPPH 溶液中加入抗氧化剂时,由于其自由基清除作用使 DPPH 紫色消退,导致吸收光谱强度随加入的抗氧化剂量的增加而减小,通过加入抗氧化剂前后吸光度的线性变化计算自由基清除率,以达到评价此物质抗氧化活性的大小^[9]。一般用 IC_{50} ,即清除率为 50% 时样品的浓度,来表示清除 DPPH 的能力, IC_{50} 值越小,表示该物质清除 DPPH 能力越强。

本研究也观察了弯管列当不同提取部位对体外培养的氧化受损人胚肾细胞系 HEK-293 细胞的保护作用,以期为更深入的研究利用该植物提供科学依据。

1 材料

1.1 药材 弯管列当药材于 2007 年 8 月采自内蒙古自治区东北地区,由内蒙古医学院药用植物教研室王素巍老师鉴定为列当科植物弯管列当 *Orobancha cernua* Loefl. var. *cumana* (Wallr.) G.

Beck 的干燥全草。样品标本保存于内蒙古医学院药学院生药教研室。

1.2 药品与试剂 DPPH(Sigma Aldrich 公司,批号 STBB0827);抗坏血酸(天津市科盟化工工贸有限公司,批号 15347-1994);人胚肾细胞系 HEK-293 细胞(中国协和医科大学基础医学研究所细胞中心);DMEM 高糖培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,批号 NXB0564);青霉素-链霉素双抗(美国 Hyclone 公司,批号 J112861);胎牛血清(天津灏洋生物公司,批号 20100310);胰蛋白酶(Amresco 公司,批号 0458);甲基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司,批号 298-93-1)。实验所用溶剂均为化学纯或分析纯。

1.3 仪器 EYELA OSB-2100 型旋转蒸发仪(东京理化),KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TU-1901 双光束紫外-可见光分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),DGG-9070B 型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),YP5001N 电子天平,AL204 分析天平(梅特勒-托利多),冷冻干燥机(基因有限公司),ZF-7 型紫外分析仪(日本三洋公司),CO₂ 培养箱(日本三洋公司),低温离心机(Sigma 公司),XDS-100C 倒置显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司),1680 型酶标仪(日本 Model 公司)。

2 方法

2.1 样品制备 弯管列当干燥全草 4.75 kg,用 70% 乙醇回流提取 3 次,合并提取液,回收至无醇味,加入适量水混悬,依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收溶剂,挥干,得乙酸乙酯部位(gg1)浸膏,正丁醇部位(gg2)浸膏和水部位(gg3)。3 份样品均取部分冷冻干燥,备用。

2.2 清除 DPPH·自由基能力的测定

2.2.1 溶液配制 ①精确称取 DPPH 粉末 2.0 mg,用无水乙醇溶解,定容,配成 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无水乙醇溶液,置于(4℃)冰箱内避光保存,待用。②分别精确称取抗坏血酸(V_c)、乙酸乙酯部位(gg1)、正丁

醇部位 (gg2) 和水层 (gg3) 冻干粉末样品各约 2.5 mg, 用无水乙醇溶解定容, 配成 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 依次稀释为 $0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱避光保存, 待用。

2.2.2 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{样品}}$ 的测定 ①吸取无水乙醇 0.1 mL 与 4.9 mL 的 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液在试管中混合, 摇匀后迅速倒入石英吸收池中, 在 517 nm 处测定吸光度 (A), 记录稳定后的 $A(A_{\text{对照}})$ 。②依次吸取 $0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Vc 对照品溶液和上述待测样品溶液 0.1 mL 分别与 4.9 mL 的 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液在试管中混合, 摇匀后迅速倒入石英吸收池中, 在 517 nm 处测定 A (以 0.1 mL 的待测液与 4.9 mL 无水乙醇做空白), 记录稳定后的 $A(A_{\text{样品}})$ 。③计算各样品对 DPPH 自由基的清除率 (I)。

$$I = [1 - (A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}})] \times 100\%$$

2.3 对 H_2O_2 致人胚肾细胞系 HEK-293 细胞氧化损伤的保护作用

2.3.1 细胞培养 以含 10% 胎牛血清, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 高糖完全培养液培养 HEK-293 细胞株, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱, 定期换液, 待细胞进入对数生长期, 用 0.15% 胰蛋白酶消化传代。生长良好的细胞以 5×10^4 个/mL 密度分别接种于 96 孔板。待生长至 50% ~ 60% 用于实验。

2.3.2 H_2O_2 建立氧化损伤模型 以终浓度为 10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预接种于 96 孔板的 HEK-293 细胞, 每组 8 孔, 干预 12 h 后, MTT 法检测细胞活力, 即每孔加 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 液 10 μL , 培养 4 h 后吸除培养液, 再加 100 μL 二甲基亚砷并震荡 10 min。用酶标仪 (波长 570 nm 和 490 nm) 检测 A 。

2.3.3 最佳给药浓度的选择 以 gg2 筛查安全浓度, 实验考查了 gg2 的 5 个浓度 (10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。用不同浓度 gg2 药物预处理 8 h, 再加终浓度为 200/400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 继续共培养。各组细胞培养 12 h 后用 MTT 法检测细胞活力。

2.3.4 各提取部位对细胞活力的影响 终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ gg1, gg2, gg3 预处理 8 h, 再加终浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 继续共培养。各组细胞培养 12 h 后 MTT 法检测细胞活力。

2.4 数据处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 清除 DPPH· 自由基能力 以清除率 (%) 为纵坐标, 样品溶液的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算 IC_{50} ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。弯管列当 3 个萃取组分对 DPPH 的清除能力随各组分浓度的增大而增强, 乙酸乙酯部位的清除 DPPH· 活性最强。从回归方程得各组分的 IC_{50} 从小到大依次为: 乙酸乙酯部位 ($0.0429 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) < 正丁醇部位 ($0.0599 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) < Vc ($0.0718 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) < 水部位 ($0.3303 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。见图 1, 表 1。

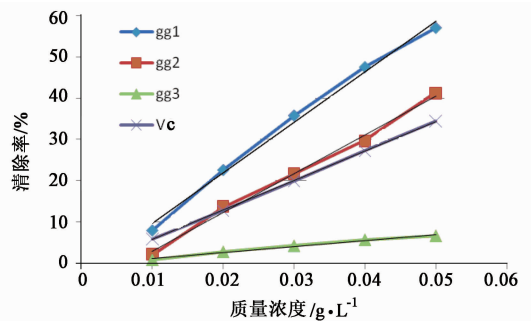


图 1 弯管列当各提取部位对 DPPH 的清除能力

表 1 弯管列当各提取部位对 DPPH· 的清除作用

组分	回归方程	R^2	$\text{IC}_{50}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Vc	$Y = 714.7X - 1.316$	0.999 9	0.071 8
弯管列当 gg1	$Y = 1226X - 2.627$	0.992 8	0.042 9
gg2	$Y = 942.0X - 6.521$	0.994 0	0.059 9
gg3	$Y = 142.8X - 0.190$	0.996 0	0.330 3

3.2 H_2O_2 对氧化损伤 HEK-293 细胞活力的影响

3.2.1 H_2O_2 建立氧化损伤模型 HEK-293 细胞生存率随 H_2O_2 浓度的增加依次降低, 但线性关系不明显, H_2O_2 氧化损伤模型浓度以 200, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较佳, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 能显著降低细胞活力表示氧化损伤模型建立 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.2.2 最佳给药浓度的选择 gg2 各浓度组 (10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 均显著增加细胞活力 ($P < 0.01$), 其中 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 药物组活力最高。因此进一步实验选 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 建模, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 药物浓度给药。

3.2.3 弯管列当各提取部位对 HEK-293 细胞活力的影响 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 能显著降低细胞活力 ($P < 0.01$), 各给药组细胞活力均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 各组间差异不显著。见表 3。

表2 不同浓度 H₂O₂ 对 HEK-293 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞生存率/%
阴性对照	-	100 ±
H ₂ O ₂	400	40.63 ± 9.28
	200	41.90 ± 5.72
	100	49.17 ± 10.45
	50	51.52 ± 9.46
	10	73.85 ± 8.41

表3 弯管列当各提取部位对 HEK-293 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活力/A
阴性对照	-	0.33 ± 0.03
模型	-	0.18 ± 0.01
弯管列当提取物	gg1	0.20 ± 0.02 ¹⁾
	gg2	0.20 ± 0.02 ²⁾
	gg3	0.19 ± 0.01 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

科学研究表明,许多疾病的发生都有自由基的参与,自由基包括活性氧类,存在于体内外,是生物体正常代谢中形成的,体内过量的氧自由基会造成生物膜损伤、蛋白质变性、酶失活及 DNA 复制出现错误等。在慢性肾脏病变的进展过程中,肾组织氧自由基产生过多或肾组织局部清除氧自由基过少,都可造成肾组织的进一步损伤,最终导致病变。有越来越多的证据表明,抗氧化剂可能在预防这些疾病方面起到重要作用。

列当科的传统补益类中药肉苁蓉^[10]和草苁蓉^[11]已经证实具有显著清除自由基活性和抗氧化、抗衰老的作用。肉苁蓉抗氧化的主要活性成分是苯乙醇苷类(phenylethanoid glycosides)化合物,并发现分子中酚羟基越多活性越强^[12]。我们课题组前期的研究也发现列当属的一些种内也富含苯乙醇苷类成分。弯管列当野生植物资源非常丰富,具有补肾助阳、强筋骨的传统功效。根据药用植物亲缘学倡导的植物亲缘关系越近,其含有的活性成分越相似、功效相近的原理,我们推测弯管列当也应有良好的抗氧化活性。

利用目前国内广泛应用的 DPPH 法来评价弯管列当提取物的 3 个不同极性部位抗氧化活性,结果

表明乙酸乙酯部位的清除 DPPH 活性最强,正丁醇部位也有较好的清除 DPPH 活性,均强于 Vc。应用 MTT 法评估了乙酸乙酯、正丁醇、水部位对 H₂O₂ 引起的人胚肾细胞系 HEK-293 细胞氧化损伤的保护作用。结果表明,这 3 个部位都能明显提高受损伤 HEK-293 细胞的活力。综上所述,弯管列当提取物具有良好的清除自由基和抗氧化的活性,但这些提取物中具有较强抗氧化能力的化学成分还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 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,1990,69:109.
- [2] 《内蒙古植物药志》编辑委员会. 内蒙古植物药志. 5 卷 [M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1980:312.
- [3] 刘东春,王芳,崔征,等. 欧亚列当提取物的药效学研究 [J]. 中药材,2000,23(6):341.
- [4] 刘东春,王芳,崔征,等. 欧亚列当抗脂质过氧化作用的研究 [J]. 沈阳药科大学学报,2001,18(3):204.
- [5] 唐政,黎磊石. 氧自由基及抗氧化酶与慢性肾脏疾病的进展 [J]. 国外医学:泌尿系分册,1999,12(4):185.
- [6] 董秀英,吕青涛,张国英,等. DPPH 法测定九州虫草不同极性部位抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):70.
- [7] 曹燕,庞市宾,徐磊,等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):144.
- [8] 谢学明,钟远声,李熙灿,等. 22 种华南地产药材的抗氧化活性研究 [J]. 中药药理与临床,2006,22(1):48.
- [9] Akinmoladun A C, Ibukun E O, Dan-ologe I A. Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* [J]. Scientific Research and Essay, 2007, 2(6):191.
- [10] 曲正义,姚春林,金银萍,等. 列当科植物化学成分与药理作用研究进展 [J]. 特产研究,2010(1):70.
- [11] Tsuda T, Sugaya A, Liu Y Z, et al. Radical scavenger effect of *Boschniakia rossica* [J]. J Ethnopharmacol, 1994, 41:85.
- [12] Xiong Quanbo, Kadota S, Tani T, et al. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola* [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(6):1580.

[责任编辑 何伟]