

发表)。值得注意的是,单味药和组合药提取物有刺激 DNA 掺入的作用,但 SNT 提取物却没有此作用。提示组方后药物成分的化学性质可能发生了变化,这种变化尚需深入探讨。

本实验 BrdU-ELISA 法测定结果提示, SNT 并不提高 VSMC 的 DNA 掺入水平,而单味药和组合药提取物及 NA, Phe 均可以提高 VSMC 的 DNA 掺入水平。结果提示, SNT 组方后可能是通过促进 VSMC 代谢活性,起到刺激平滑肌收缩的作用。而组方前的单味药和组合药刺激 VSMC 的 DNA 合成也许是一种副作用。同时,对 VSMC 增殖抑制的 ED_{50} 也反映了组方后 SNT 的毒性下降。本实验进一步表明, SNT 组方用药与单味药及组合药的药理作用不尽相同,这可能是组方用药“减毒增效”的作用机制之一。

References:

- [1] Li P, Huang Q F, Li A F, *et al*. Effects of Xinmailing (XML) on pulmonary microvascular permeability and lipo-peroxides in endotoxemia rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 1995, 11(3): 226-229.
- [2] Sun H L, Wu W K. Studies on protective effect of SNI TANG comprising active components combined at different dosage on myocardial ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(4): 333-336.
- [3] Wu W K, Su J W, Lin S G, *et al*. Clinical study on effect of SNI Decoction on ischemia/reperfusion injury by Holter monitoring in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2001, 21(10): 744-746.
- [4] Tan H M, Wu W K, Luo H C, *et al*. Effect of Sini Decoction on GST expression in the ischemic myocardium [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, 18(4): 413-414.
- [5] Hong H S, Chen F R, Zhu Y B, *et al*. A assay of proliferation and metabolic of vascular smooth muscle cells [J]. *Chin J Cell Biol* (细胞生物学杂志), 2001, 23(1): 36-39.
- [6] Pamentier J H, Smelcer P, Pavicevic Z, *et al*. PKC-zeta mediates norepinephrine-induced phospholipase D activation and cell proliferation in VSMC [J]. *Hypertension*, 2003, 41(3 Pt 2): 794-800.
- [7] Sato M, Kawatani M. Effects of noradrenaline on cytosolic concentrations of Ca^{2+} in cultured corpus cavernosum smooth muscle cells of the rabbit [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 324(2): 89-92.
- [8] Liu P, Ge Y C, Li C Y, *et al*. Effect of extracts from Decoction for Resuscitation and its component drugs on prostacyclin release from at vascular endothelial cells under acute hypoxia [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(Suppl): 126-128.
- [1] Li P, Huang Q F, Li A F, *et al*. Effects of Xinmailing (XML) on pulmonary microvascular permeability and lipo-peroxides in endotoxemia rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中

不同产地冬虫夏草清除羟自由基作用的研究

蔡仲军, 陈仕江, 尹定华, 张 艳*

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘 要:目的 比较不同产地冬虫夏草对羟自由基的清除作用。方法 采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测不同产地冬虫夏草水提液对 H_2O_2/Fe^{2+} 体系产生的羟自由基的清除作用。结果 来自西藏那曲地区、云南滇西北地区 and 四川川西北地区的冬虫夏草均对 Fenton 反应产生的羟自由基有显著或极显著的清除作用, 且来自不同微生态环境的样品之间的清除作用差异比来自不同主产区样品之间的清除作用差异更明显。结论 冬虫夏草水提液有明显地清除羟自由基的作用, 且微生态环境对该作用有较大的影响。

关键词: 冬虫夏草; 羟自由基; 微生态环境; 相互变异率

中图分类号: R 285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)01-0057-03

Scavenging effect of Cordyceps growing in different environment on hydroxyl radical

CAI Zhong-jun, CHEN Shi-jiang, YIN Ding-hua, ZHANG Yan

(Chongqing Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract: **Object** To investigate and compare the scavenging effect of *Cordyceps* growing in different environment on hydroxyl radical. **Methods** 10-Phenanthroline- Fe^{2+} oxidative assay was used to observe the effect of scavenging hydroxyl radical from H_2O_2/Fe^{2+} system by the aqueous extracts of *Cordyceps*. **Results** *Cordyceps* from Naqu of Xizang, northwest Yunnan, and northwest Sichuan all showed us the significant effect on scavenging of hydroxyl radical produced from Fenton Reaction. The biggest values of MDR among *Cordyceps* specimens from various microecological environment surpassed that among specimens of Naqu of Xizang, northwest Yunnan, and northwest of Sichuan. **Conclusion** The aqueous extracts of *Cordyceps* could scavenge the hydroxyl radical from Fenton Reaction. The microecological envi-

* 收稿日期: 2003-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30240067)

作者简介: 蔡仲军(1957—), 男, 重庆市人, 硕士, 助理研究员, 从事中药研究及开发工作。

ronment for *Cordyceps* growing has an significant effect on its scavenging action

Key words: *Cordyceps*; hydroxyl radical; microecological effect; mutual different rate (MDR)

冬虫夏草系由冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc 寄生于蝙蝠蛾幼虫形成的虫菌复合体^[1], 性味甘平, 归肺、肾经, 具有补肺益肾、止血化痰的功能。由于产地不同, 冬虫夏草细分为藏草 (产于西藏腹地)、川草 (产于川西北高原) 和滇草 (产于滇西北高原), 即使在川草内, 又可再细分为泸草 (产于四川巴塘康定一带) 和灌草 (产于四川小金松番一带)。来自不同产地的冬虫夏草, 其外部形态和内在品质均有明显差异^[2]。冬虫夏草含有丰富的 D-甘露醇, 研究表明甘露醇能有效地清除机体内强毒性羟自由基, 据此, 本实验研究了冬虫夏草对羟自由基的清除作用及产地对该作用的影响。

1 材料

1.1 药品: 藏草样品 6 个, 来自西藏那曲地区; 滇草样品 6 个, 来自云南迪庆和丽江地区; 川草由泸草和灌草构成, 其中泸草样品 6 个, 来自四川康定地区; 灌草样品 6 个, 来自四川小金和马尔康地区。藏草、滇草、泸草和灌草内, 各取样点相距 30~200 km, 相互间地理位置呈不规则分布。药材经尹定华研究员鉴定为冬虫夏草 *C. sinensis* (Berk.) Sacc

1.2 仪器和试剂: FZ102 微型植物试样粉碎机, CS101 型电热鼓风干燥箱, 自制超级恒温水浴箱, 80—2 型离心沉淀器, 721 型分光光度计。pH 7.40 磷酸缓冲液 (PBS) 用 KH_2PO_4 和 NaOH 配制, 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 样品制备: 将虫草样品 65 °C 烘干, 粉碎, 过 20 目筛。精密称取 2.0 g 虫草粉, 置 50 mL 三角瓶中, 加 25 mL 蒸馏水, 置 80 °C 水浴中, 浸提 30 min, 离心沉淀, 浸出液转入 50 mL 量瓶中, 残渣用水洗涤 2 次, 离心沉淀后均转入量瓶中, 定容, 得到浓度为 40 mg/mL (按原生药计) 样品液, 置 4 °C 冰箱存放备用。

2.2 羟自由基的生成及清除率的测定: 参考文献方法^[3], 采用 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系, 通过 Fenton 反应生成羟自由基, 促使邻二氮菲- Fe^{2+} 被氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} , 造成其水溶液在波长 536 nm 处最大吸收消失, 来测算其清除率。考虑样品参比标准的不同, 略作修改, 增设了样品参比和空白参比两个对照, 以消除不同样品本身带来的差异。具体步骤是: 精密量取 5.0 mL PBS (150 mmol/L, 下同) 和 5.0 mL 蒸馏

水于试管中, 混匀作空白参比管; 精密量取 5.0 mL PBS、1.0 mL 邻二氮菲 (7.50 mmol/L, 下同)、1.0 mL FeSO_4 (7.50 mmol/L, 下同) 和 3.0 mL 蒸馏水于试管中, 混匀作未损伤管; 精密量取 5.0 mL PBS、1.0 mL 邻二氮菲、1.0 mL FeSO_4 、2.0 mL 蒸馏水和 1.0 mL H_2O_2 (0.1%) 于试管中, 混匀作损伤管; 精密量取 5.0 mL PBS、2.0 mL 冬虫夏草样品液和 3.0 mL 蒸馏水于试管中, 混匀作样品参比管; 精密量取 5.0 mL PBS、1.0 mL 邻二氮菲、1.0 mL FeSO_4 、2.0 mL 冬虫夏草样品液和 1.0 mL H_2O_2 于试管中, 混匀作样品管。将上述试管同时置于恒温水槽中, 37 °C 保温 60 min, 于波长 536 nm 处测吸光度 (A) 值, 每处理重复 5 次, 用其平均值按下式计算羟自由基清除率。

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{[(A_{\text{样品}} - A_{\text{参样}}) - (A_{\text{损伤}} - A_{\text{空参}})]}{(A_{\text{未损}} - A_{\text{损伤}})} \times 100\%$$

3 结果

本实验条件下, 观察藏草、滇草、泸草和灌草样品对羟自由基的清除效应, 测得对羟自由基的平均清除率分别为 12.14%、15.76%、12.36% 和 9.89%。将泸草和灌草综合, 算出川草对羟自由基的平均清除率为 11.13%, 见表 1~4。

表 1 西藏那曲地区冬虫夏草对羟自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Scavenging effect of *Cordyceps* from Naqu of Xizang on hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	产地	羟自由基清除率/%
损伤对照	-	-
样品 1	泥玛珑	13.04**
样品 2	曲仲山	7.18
样品 3	白嘎	15.42**
样品 4	吾龙沟	20.63**
样品 5	嘉黎	10.62*
样品 6	棉滩山	5.97

与损伤对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs injured control group

4 讨论

4.1 本实验以损伤为对照, 用 t 检验检测来自不同产地的 24 个冬虫夏草样品对羟自由基清除作用的显著性, 共有 13 个样品达到极显著水平 ($P < 0.01$), 4 个样品达显著水平 ($P < 0.05$)。总体平均, 藏草、滇草和川草及川草内的泸草、灌草均了显著或极显著水平, 表明冬虫夏草确有清除羟自由基的作用。

表 2 云南滇西北地区冬虫夏草对羟自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Scavenging effect of Cordyceps from northwest of Yunnan on hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组 别	产 地	羟自由基清除率/%
损伤对照	-	-
样品 1	德钦羊拉乡	18.27**
样品 2	玉龙虫草坪	10.10*
样品 3	中甸东旺乡	19.74**
样品 4	白马雪山	21.40**
样品 5	中甸热旺雪山	17.92**
样品 6	玉龙小索道	7.12

与损伤对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs injured control group

表 3 四川康定地区冬虫夏草对羟自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 3 Scavenging effect of Cordyceps from Kangding of Sichuan on hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组 别	产 地	羟自由基清除率/%
损伤对照	-	-
样品 1	白海子	11.43*
样品 2	九海子	7.74
样品 3	雅家埂	13.50**
样品 4	汪家沟	13.75**
样品 5	色海子	16.08**
样品 6	折多塘	11.68*

与损伤对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs injured control group

表 4 四川阿坝地区冬虫夏草对羟自由基的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 4 Scavenging effect of Cordyceps from Aba of Sichuan on hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组 别	产 地	羟自由基清除率/%
损伤对照	-	-
样品 1	马尔康木尔宗乡	12.39**
样品 2	日隆石梯沟	4.75
样品 3	梦笔山大水沟	15.77**
样品 4	小金崇德乡	8.24
样品 5	巴郎山干海子	3.59
样品 6	小金沙龙乡	14.61**

与损伤对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs injured control group

4.2 运用相互变异率 MDR [mutual different rate, $MDR = |x_1 - x_2| / 0.5(x_1 + x_2)$, 其中 x_1 和 x_2 为相互比较两个样本的平均值]分析, 显示藏草样本

之间的 MDR 为 0.16~1.10, 滇草样本之间的 MDR 为 0.019~1.00, 泸草样本之间的 MDR 为 0.018~0.70, 灌草样本之间的 MDR 为 0.076~1.07, 而藏草与滇草之间的 MDR 是 0.26, 藏草与川草之间的 MDR 是 0.087, 滇草与川草之间的 MDR 是 0.34, 泸草和灌草之间的 MDR 是 0.22, 说明藏草、滇草和川草之间以及川草内部泸草和灌草之间, 对羟自由基的清除作用差异并不很大, 而在这些大宗药材内部, 来自不同微生态环境的样品之间, 有的差异却十分明显, 表明冬虫夏草对羟自由基清除作用, 受微生态环境的影响超过受大的地域气候的影响。

4.3 结合我们前期对冬虫夏草样品 D-甘露醇含量测定结果^[4]分析来看, 冬虫夏草对羟自由基的清除率与其 D-甘露醇含量呈正相关, 相关系数为 0.9023, 说明冬虫夏草对羟自由基的清除能力, 主要来自其药效成分 D-甘露醇的作用。

4.4 随着自由基研究不断深入, 已明确羟自由基是最活泼的氧自由基之一, 可介导机体组织脂质过氧化, 蛋白质解聚、聚合、核酸断裂和多糖裂解等生化过程, 引发组织细胞病变而导致各种疾病发生和加速机体衰老。适量补充外源性清除羟自由基药物, 可预防这类损伤和病变的发生与发展。研究结果表明: 来自不同产地的冬虫夏草, 对采用 H_2O_2/Fe^{2+} 体系通过 Fenton 反应产生的羟自由基, 有明显清除作用, 而 Fenton 反应是生物体内产生羟自由基的重要机制, 预示冬虫夏草对羟自由基的清除作用, 可能是它作为中国传统滋补保健药物的原因之一。

References

- [1] Zhu H F. Hepialus amoricanus is the host insect of Cordyceps [J]. Acta Entomol Sin (昆虫学报), 1965, 14(6): 620.
- [2] Cai Z J, Yin D H, Li L, et al. Investigation on quality difference between Cordyceps of Sichuan and those of Xizang [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2001, 26(7): 450.
- [3] Jin M, Cai Y X, Li J R, et al. 10-Phenanthroline- Fe^{2+} oxidative assay of hydroxyl radical produced by H_2O_2/Fe^{2+} [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展), 1996, 23(6): 553.
- [4] Zai Z J, Yin D H, Huang T F, et al. Comparison of the mannitol content in Cordyceps from different growing areas [J]. Chin Pharm (中国药房), 2003, 14(8): 553.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本, 包括: 1974-1975 年, 1976 年, 1979 年, 1985~1994 年(80 元/年); 1995~1997 年(110 元/年), 1998 年(120 元), 1999 年(135 元), 2000 年(180 元), 2001 年(200 元); 2002 年(200 元); 1996 年增刊(50 元), 1997 年增刊(45 元), 1998 年增刊(55 元), 1999 年增刊(70 元), 2000 年增刊(70 元), 2001 年增刊(70 元), 2002 年增刊(65 元), 2003 年增刊(65 元)。欢迎订购, 电话: 022-27474913; 022-23006821(传真)。