

羟基红花黄色素 A 抗氧化作用的研究

金 鸣, 李金荣, 吴 伟*

(北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院 药理研究室, 北京 100029)

红花 *Carthamus tinctorius* L. 为活血化瘀药, 可活血通经、化瘀止痛, 临床上主要以水煎液入药。组织缺血-再灌注过程中, 自由基引发的氧化反应为许多血液循环障碍疾病的重要损伤机制。红花水提液可清除羟自由基, 抑制小鼠肝匀浆脂质过氧化^[1]。羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 为红花主要水溶性活血化瘀有效成分, 可抑制血小板激活因子诱发的血小板聚集, 为血小板激活因子受体拮抗药^[2]。本实验观察 HSYA 的多种抗氧化作用, 以探讨红花活血化瘀作用机制。

1 材料

硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 为国产生物试剂经活性炭脱色、重结晶处理, 其他试剂均为国产分析纯。HSYA 为本研究室以大孔树脂柱色谱及凝胶柱色谱法从红花水提取液中分离制得^[3], HPLC 面积归一化法分析结果表明其纯度大于 95%。755B 型紫外可见分光光度计。雄性昆明种小鼠, 为本院动物室提供; 雄性新西兰家兔, 为中国药品生物制品检定所提供。

2 方法

2.1 HSYA 清除羟自由基作用: 参考文献^[4]方法, 以邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 HSYA 清除 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系产生的羟自由基。

2.2 HSYA 抑制小鼠肝匀浆脂质过氧化作用: 小鼠处死后取肝脏, 洗净血污, 剪碎, 以生理盐水制成 3% 匀浆, 取匀浆 0.3 mL 加入各种试剂, 反应液总体积为 0.67 mL, 分别含不同浓度 HSYA 及 H_2O_2 0.0024%, FeSO_4 0.03 mmol/L, 37 °C 保温 60 min, 加入 1 mL 20% 三氯醋酸及 1 mL 0.67% TBA, 90 °C 保温 15 min 后水浴冷却, 1 500 × g 离心 20 min, 取上清液于 532 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 以蒸馏水代替 TBA 的平行试验管为各试验管的比色空白。以蒸馏水代替 HSYA 溶液的反应管为对照管, 计算 HSYA 对脂质过氧化抑制率。

$$I_1 = (A_{\text{对照}} - A_{\text{HSYA}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.3 HSYA 抑制羟自由基引发的红细胞膜破裂实验: 兔耳正中动脉取血, ACD (枸橼酸钠 85 mmol/L, 枸橼酸 71 mmol/L, 葡萄糖 110 mmol/L) 与全血以 1:6 (体积比) 抗凝。1 500 × g 离心 10 min, 去除血浆, 加生理盐水至抗凝血 5 倍体积即得红细胞混悬液。各反应管加入此红细胞混悬液 0.2 mL 及其他试剂, 反应液总体积为 1.75 mL, 分别含不同浓度的 HSYA 及 H_2O_2 1.37%, FeSO_4 1.14 mmol/L 及 pH 7.4 Na_2HPO_4 150 mmol/L, 37 °C 振摇 60 min 后取出, 1 500 × g 离心 10 min, 取上清液测定血红蛋白最大吸光度值 (A_{500}), 以蒸馏水代替反应体系中的全血为各反应管比色空白, 以蒸馏水代替 HSYA 溶液的反应管为对照管, 计算 HSYA 对红细胞膜破裂抑制率。

$$I_2 = (A_{\text{对照}} - A_{\text{HSYA}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.4 统计处理: 数据均为 3 个平行试验管的 $\bar{x} \pm s$, 均以 SPSS 10.0 软件用方差分析法进行统计检验。

3 结果

3.1 HSYA 清除羟自由基的作用: 见表 1。结果表明, HSYA 清除羟自由基的作用呈明显量效关系。

表 1 HSYA 清除羟自由基的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Scavenge effect of HSYA on hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	HSYA 浓度 /(mmol · L ⁻¹)	A ₅₃₆	羟自由基 清除率/%
H_2O		0.816 ± 0.007	-
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$		0.554 ± 0.002	-
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} + \text{HSYA}$	2.40	0.571 ± 0.005*	6.5
	3.36	0.638 ± 0.004***	32.1
	4.32	0.695 ± 0.009***	53.8
	5.28	0.755 ± 0.008***	76.7
	6.24	0.803 ± 0.019***	95.0

与 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$ 管比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$ tube

3.2 HSYA 抑制小鼠肝匀浆脂质过氧化的作用:

* 收稿日期: 2003-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171146)

作者简介: 金 鸣 (1957—), 男, 北京人, 北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院药理研究室主任, 研究员, 硕士生导师, 1992 年 7 月博士毕业于北京中医药大学中西医结合专业, 研究方向为中药红花活血化瘀的作用机制。
Tel: (010) 64412431-2308 E-mail: jinzang@public3.bta.net.cn

见表 2。结果表明,离体条件下 HSYA 抑制小鼠肝匀浆脂质过氧化的作用呈明显的量效关系。

表 2 HSYA 对小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Inhibitory effect of HSYA on liver homogenate lipid peroxidation in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A ₅₃₂	I ₁ /%
对照	-	1.856 ± 0.056	-
HSYA	179	1.808 ± 0.056	2.6
	358	1.573 ± 0.072***	15.2
	716	1.216 ± 0.032***	34.5
	1 073	1.036 ± 0.010***	44.2
	1 431	0.930 ± 0.023***	49.9
	1 789	0.808 ± 0.039***	56.5

与对照管比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control tube

3.3 HSYA 抑制羟自由基引发的红细胞膜破裂作用: 见表 3。结果表明,离体条件下 HSYA 抑制羟自由基诱发红细胞膜破裂的作用呈明显量效关系。

表 3 HSYA 对羟自由基引发的红细胞膜破裂的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Inhibitory effect of HSYA on hemocytolysis attenuation induced by hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A ₅₀₀	I ₂ /%
对照	-	0.445 ± 0.016	-
HSYA	274.0	0.411 ± 0.018	7.6
	411.1	0.367 ± 0.038*	17.5
	548.1	0.317 ± 0.023**	28.8
	685.1	0.302 ± 0.071***	32.1

与对照管比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control tube

4 讨论

临床上红花以水煎液入药,可治疗多种血液循环障碍性心脑血管疾病。在组织缺血-再灌注、炎症

反应等过程中,自由基反应为一重要的损伤机制。红花水提液可清除自由基,抑制脂质过氧化反应^[1]。HSYA 为红花主要水溶性有效成分,其抗氧化作用尚未见报道。

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系可通过 Fenton 反应产生羟自由基,引发脂质过氧化、蛋白质交联等反应,造成细胞膜破裂可导致组织坏死等后果。本实验结果表明 HSYA 可清除羟自由基,抑制脂质过氧化反应,保护细胞膜,提示其为红花水溶性抗氧化有效成分。HSYA 为查尔酮类结构,其分子中含多个酚羟基,其抗氧化药效可能与这些酚羟基的作用有关。在多种血瘀病症中,自由基反应对加剧血液循环障碍起了重要的作用,而红花有效成分 HSYA 的抗氧化效应对其活血化瘀的作用具一定的贡献。

红花为常用活血化瘀药,具抗血栓、抗心肌缺血、改善微循环、抗氧化等多方面的药理作用。HSYA 在红花中含量较高,溶解度好,在此基础上开发新型心血管药物,可望获得明显的经济与社会效益。本研究对于进一步阐明红花活血化瘀作用机制,指导红花及其制剂的临床应用具重要的意义。

References

[1] Jin M, Li J R, Cai Y X, et al. Antioxidative effect of aqueous component of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis* (心肺血管病杂志), 1998, 17(4): 277-279.
[2] Zang B X, Jin M, Si N, et al. Antagonistic effect of hydroxysafflor yellow A on the platelet activating factor receptor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2002, 37(9): 696-699.
[3] Jin M, Gao Z C, Li J R, et al. Preparation of safflor yellow and hydroxy safflor yellow A by macroporous resin column chromatography [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 25-28.
[4] Jin M, Cai Y X, Li J R, et al. 1, 10-Phenanthroline- Fe^{2+} oxidative assay of hydroxyl radical produced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1996, 23(6): 553-555.

清开灵有效组份对局灶性脑缺血大鼠脑组织
细胞间黏附分子表达的影响

徐丽荣¹, 马世彬², 李澎涛³, 唐启盛^{4*}

(1. 北京中医药大学 中医内科, 北京 100029; 2. 泰山医学院 免疫教研室, 山东 泰安 271000;
3. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 4. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

脑缺血后脑组织的炎症损伤反应因其预后差, 死亡率高, 而日益受到人们的关注, 已成为该领域的

* 收稿日期: 2003-09-25
基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973) 课题 (G1999054404)
作者简介: 徐丽荣(1972—), 女, 黑龙江人, 讲师, 现为北京中医药大学 2001 级中医内科脑病专业博士研究生, 主要从事中药对缺血性中风干预作用的实验研究。E-mail: maxuli@yaho.com