

欧洲越桔和笃斯越桔体外抗氧化活性比较

卢艳花¹, 邹彦平¹, 秦会玲², 刘建文¹, 魏东芝^{1*}, 於洪建³

(1. 华东理工大学生物工程学院 生物反应器国家重点实验室, 上海 200237; 2. 临沂市仁和堂医药有限公司, 山东 临沂 276003; 3. 天津尖峰天然产物研究开发公司, 天津 300402)

越桔类植物属杜鹃花科越桔属植物, 含多种活性成分, 特别是花色苷类成分。国外对欧洲越桔 *Vaccinium myrtillus* L. 研究报道很多, 其总花色苷对眼科疾病和心血管疾病有显著疗效, 目前已进入临床试验阶段^[1]。我国东北地区广布的笃斯越桔 *V. uliginosum* L. 亦富含花色苷类成分, 但目前并未被充分地开发药用, 仅在当地被酿成葡萄酒上市。为了开发利用我国的药用植物资源, 挖掘笃斯越桔的药用价值, 寻找欧洲越桔的替代品, 本实验对欧洲越桔和笃斯越桔的标准植物提取物 (原花色苷 25%, UV 检测) 进行了清除自由基和体外抗氧化活性比较, 发现笃斯越桔清除 $O_2^{\cdot+}$ 自由基 DPPH 自由基抗小鼠微粒体膜脂氧化的能力优于欧洲越桔。

1 材料

1.1 药物与试剂: 欧洲越桔和笃斯越桔标准提取物: 深紫色粉末, 由天津尖峰天然产物公司提供 (原花色苷 25%, UV 检测), 以缓冲液配成不同浓度的供试液。还原性辅酶 I (NADH)、酚嗪二甲基硫酸盐 (PM S)、四氮唑蓝 (NBT)、1, 1 二苯基-2-苦基苯肼 (DPPH) 为 Sigma 产品; 维生素 E、特丁基对苯二酚 (TBHQ) 为 Fluka Bochemika 产品; 乙醇、硫代巴比妥酸 (TBA)、三氯乙酸 (TCA)、硫酸亚铁 ($FeSO_4$)、抗坏血酸 (Vc) 等均为国产分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 18~22 g, 雄性, 由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 对 $O_2^{\cdot+}$ 生成的影响: $O_2^{\cdot+}$ 由 NADH-PM S-NBT 系统 (16 mmol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 内含 NADH 73 μ mol/L, PM S 15 μ mol/L, NBT 50 μ mol/L) 产生, 空白管不加 PM S, 对照管不加供试样品, 均以等体积的缓冲液代替。供试样品的终浓度分别为 9.375, 18.75, 37.5, 75, 150 μ g/L, 总反应体积为 3 mL, 于波长 560 nm 测定吸光度 (A) 值, 并

计算抑制率。结果显示, 欧洲越桔和笃斯越桔皆能明显清除 NADH-PM S-NBT 系统产生的 $O_2^{\cdot+}$, 且呈量效关系, 笃斯越桔清除 $O_2^{\cdot+}$ 的能力略优于欧洲越桔, IC_{50} 值分别为 13.72, 21.73 μ g/mL。两者的效果皆明显优于阳性对照 Vc (IC_{50} 为 782 μ g/mL), 见表 1。

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

表 1 欧洲越桔和笃斯越桔对 $O_2^{\cdot+}$ 的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Scavenging of *V. myrtillus* and *V. uliginosum* on superoxide radical ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	A 样品 - A 空白	抑制率/%
对照	-	0.491 $\pm$ 0.004	-
Vc	770	0.372 $\pm$ 0.005**	24.24
	780	0.247 $\pm$ 0.003***	49.69
	790	0.141 $\pm$ 0.004***	71.28
	810	0.088 $\pm$ 0.001***	82.08
	830	0.058 $\pm$ 0.002***	88.19
欧洲越桔	9.375	0.374 $\pm$ 0.008**	23.83
	18.75	0.228 $\pm$ 0.006***	53.56
	37.5	0.131 $\pm$ 0.007***	73.32
	75	0.057 $\pm$ 0.006***	88.30
	150	0.003 $\pm$ 0.001***	99.45
笃斯越桔	9.375	0.287 $\pm$ 0.007***	41.55
	18.75	0.193 $\pm$ 0.006***	60.69
	37.5	0.096 $\pm$ 0.008***	80.30
	75	0.042 $\pm$ 0.002***	91.39
	150	0.007 $\pm$ 0.002***	98.57

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

2.2 对 DPPH 的清除能力: 参照 Larrauri 和 Yokozawa 等^[2,3]方法进行修改。利用 DPPH 的醇溶液在 517 nm 有最大吸收峰的特征, 以分光光度法测定加抗氧化剂或植物提取物后 A_{517} 的下降来表示其对 DPPH 清除能力。反应体积 5 mL, DPPH 溶于少量甲醇后, 以 50% 乙醇配制为 200 μ mol/L, 植物提取物以 50% 乙醇配制不同浓度, 反应时加 2.5 mL 提取液及 2.5 mL DPPH。室温放置 30 min 后于波长 517 nm 测定 A 值变化。计算抑制率。结果见表 2, 笃斯越桔对 DPPH 自由基的清除能力优于欧洲越桔, IC_{50} 值分别为 5.86, 11.87 μ g/mL。其中

* 收稿日期: 2003-09-19

作者简介: 卢艳花 (1968—), 女, 山东省青岛市人, 1999 年毕业于中国药科大学, 获理学博士学位, 主要从事中药活性成分、药理药效、质量标准方面的研究工作, 已发表论文 20 余篇。

* 通讯作者

芎斯越桔的清除能力优于阳性对照 VE (IC_{50} 为 $12.60 \mu\text{g}/\text{mL}$), 而欧洲越桔的作用效果和 VE 相当。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{样}} - A_{\text{样空}}) / A_1] \times 100\%$$

A_1 为未加样品的 DPPH ($2.5 \text{ mL DPPH} + 2.5 \text{ mL } 50\%$ 乙醇) 的吸光度, $A_{\text{样}}$ 为样品与 DPPH 反应后的吸光度, $A_{\text{样空}}$ 为未加 DPPH 的样品 ($2.5 \text{ mL 样品} + 2.5 \text{ mL } 50\%$ 乙醇) 的吸光度。

表 2 欧洲越桔和芎斯越桔对 DPPH 的清除作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Scavenging of *V. myrtillus* and *V. uliginosum* on DPPH ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$A_{\text{样}} - A_{\text{样空}}$	抑制率/%
对照	-	1.063 ± 0.011	-
VE	6.25	$0.768 \pm 0.007^{***}$	27.75
	12.5	$0.456 \pm 0.007^{***}$	57.20
	25	$0.204 \pm 0.003^{***}$	81.00
	50	$0.149 \pm 0.003^{***}$	85.98
	100	$0.127 \pm 0.006^{***}$	88.05
欧洲越桔	6.25	$0.754 \pm 0.004^{***}$	29.07
	12.5	$0.467 \pm 0.006^{***}$	56.06
	25	$0.109 \pm 0.005^{***}$	89.75
	50	$0.070 \pm 0.004^{***}$	93.41
	100	$0.018 \pm 0.003^{***}$	98.30
芎斯越桔	6.25	$0.575 \pm 0.003^{***}$	45.91
	12.5	$0.310 \pm 0.006^{***}$	70.84
	25	$0.143 \pm 0.004^{***}$	86.55
	50	$0.105 \pm 0.003^{***}$	90.12
	100	$0.061 \pm 0.005^{***}$	94.26

与对照组比较: $***P < 0.001$

$***P < 0.001$ vs control group

2.3 对小鼠肝微粒体膜脂氧化的抑制作用: 参照文献方法^[4], 选用 18~22 g 雄性小鼠, 饥饿过夜, 断颈处死, 迅速取出肝脏放入冰浴 PBS 中, 剪碎洗净, 加入 3 倍 PBS 匀浆后, 9800 r/min 离心 20 min, 取上清液以 PBS 配成 5% 肝脏匀浆液, 4℃ 保存备用。计算样品对小鼠肝微粒体膜脂氧化的抑制率。结果见表 3, 芎斯越桔对小鼠肝微粒体膜脂氧化的抑制作用强于欧洲越桔, IC_{50} 分别为 $12.8, 15.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。略弱于阳性对照 TBHQ (IC_{50} 为 $4.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{样}} - A_{\text{样空}}) / A_1] \times 100\%$$

A_1 为未加样品的反应液 ($1.95 \text{ mL 肝脏匀浆} + 0.25 \text{ mL 样品} + 0.1 \text{ mL } 4 \text{ mmol/L FeCl}_2 + 0.2 \text{ mL } 6 \text{ mmol/L Vc}$) 的吸光度, $A_{\text{样}}$ 为加样品的吸光度, $A_{\text{样空}}$ 为样品的空白 ($1.95 \text{ mL 肝脏匀浆} + 0.25 \text{ mL 样品} + 0.3 \text{ mL PBS}$) 的吸光度。

3 讨论

自由基是一类反应性强、寿命短、包含一个未成对电子的原子或原子团。活性氧自由基 (ROS) 包括超氧阴离子自由基、羟自由基、过氧化氢、烷氧自由基及一氧化氮自由基等。自由基可通过氧化还原反应而产生, 并被特定的酶如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶所清除。机体内过量的

表 3 欧洲越桔和芎斯越桔对小鼠肝微粒体膜脂氧化的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Inhibition of *V. myrtillus* and *V. uliginosum* on mouse liver microsome lipid peroxidation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$A_{\text{样}} - A_{\text{样空}}$	抑制率/%
对照	-	0.852 ± 0.024	-
TBHQ	1.56	$0.673 \pm 0.011^*$	21.01
	3.13	$0.469 \pm 0.009^{**}$	44.95
	6.25	$0.171 \pm 0.003^{***}$	79.93
	12.5	$0.093 \pm 0.004^{***}$	89.08
	25	$0.034 \pm 0.002^{***}$	96.01
欧洲越桔	6.25	$0.695 \pm 0.018^*$	18.42
	12.5	$0.523 \pm 0.016^{**}$	38.62
	25	$0.204 \pm 0.004^{***}$	76.06
	50	$0.068 \pm 0.002^{***}$	92.02
	100	$0.040 \pm 0.003^{***}$	95.31
芎斯越桔	6.25	$0.640 \pm 0.017^{**}$	24.88
	12.5	$0.421 \pm 0.011^{**}$	49.15
	25	$0.126 \pm 0.004^{***}$	85.21
	50	$0.041 \pm 0.003^{***}$	95.19
	100	$0.024 \pm 0.002^{***}$	97.18

与对照组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$

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

自由基可导致生物大分子如蛋白质、酶等变性和失活, 作用于生物膜上的不饱和脂肪酸引起脂质过氧化而导致生物膜结构和功能改变。许多病理生理现象如衰老、癌症、心血管疾病、辐射损伤等都与体内过剩的自由基有关。因此, 体内自由基的生成与清除保持平衡状态对于机体的正常生命活动具有重要意义。由于合成抗氧化剂有不良反应, 从植物活性成分中寻求天然抗氧化剂已受到越来越广泛的重视。

越桔类植物大多含花色苷类活性成分。国外对欧洲越桔研究报道很多。我国东北地区广布的芎斯越桔亦富含花色苷类成分。本实验对芎斯越桔和欧洲越桔在清除自由基、体外抗氧化方面的活性作了比较研究, 发现芎斯越桔在清除 $O_2^{\cdot -}$ 自由基、DPPH 自由基、抗小鼠微粒体膜脂氧化方面的能力优于欧洲越桔。所以, 国产的芎斯越桔有望作为欧洲越桔的替代品, 成为治疗眼科疾病和心血管系统疾病的新药, 值得进一步研究开发。

Reference:

- [1] Tu P F, Hu Y Q, Liu J Y. The chemical constituents and the value of development of *Vaccinium* plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(9): 565-568.
- [2] Larrauri J A, Sancher-Moreno C, Saura-Calixto F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(7): 2694-2697.
- [3] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, et al. In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(6): 2143-2150.
- [4] Wang J N, Chen Y J, Yoshio H, et al. Antioxidant activity of polyphenols from seeds of *Vitis amurensis* in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2000, 21(7): 633-636.