

5 种石斛水提物对活性氧的清除作用

黎 英, 赵亚平*, 陈蓓怡, 蒋思媛, 于文利*

(上海交通大学化学化工学院, 上海 200240)

石斛是一种常用珍贵中药,《神农本草经》中即将其列为上品,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳的功效,用于慢性萎缩性胃炎及降血糖、抗肿瘤、抗衰老等。石斛还有增强人体免疫力及扩张血管的作用^[1]。氧在生物体内通过单电子还原产生化学性质活泼的物质活性氧(reactive oxygen species, ROS),包括超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($\cdot OH$)等。过剩活性氧对生物细胞有巨大的破坏作用,是人体衰老和导致许多疾病发生的诱因之一。在正常情况下,生物体内活性氧的产生和消除呈平衡状态。但在某些病理条件下,活性氧产生与消除失去平衡,在机体内可造成多种功能性障碍与疾病的发生。现已知人体由氧自由基涉及到的疾病有 60 多种。因此,ROS 代谢失调是很多病症的共同指标^[2]。为进一步研究石斛的药理活性及机制,本实验研究了几种石斛的水提物对 ROS 的清除作用。

1 仪器与材料

SHG-D 型生物化学发光测量仪(上海计量局实验工厂)。

铜皮石斛 *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw.、金钗石斛 *D. nobile* Lindl.、铁皮枫斗 *D. officinale* Kimura et Migo、紫皮石斛 *D. devonianum* Paxt.、兜唇石斛 *D. aphyllum* (Roxb.) C. E. C. Fisch. 均为药材店购买的饮片,由本实验室通过化学法提取 DNA,PCR 扩增,并经过基因测序与 GeneBank 对照鉴定。

邻苯三酚(pyrogallol)由上海试剂厂提供,邻菲罗啉(1,10-phenanthroline)和鲁米诺由 Sigma 化学药品公司提供,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 石斛水提物的制备^[3]:将石斛切碎,称取 10 g 药材,用 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h。合并提取液并浓缩至原体积的 1/4。加 3 倍量 95% 乙醇沉淀,放置,离心。沉淀依次用 95% 乙醇、无水乙醇洗涤,减

压滤过,低温干燥,即得石斛水提物(得率为 2%~4%)。

2.2 清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力的检测^[4]:在样品管中加入 100 μL 1 mmol/L 邻苯三酚溶液、100 μL 1 mmol/L 鲁米诺溶液,将所得的石斛提取物配制成 10 mg/mL 的待测样品溶液。取 100 μL 加入样品管,以蒸馏水作空白对照,再加入磷酸缓冲溶液,使反应总体积为 1 mL。放入样品池,立即开始测定。结果见图 1。可见加入铜皮石斛水提物溶液后出现发光峰值的时间延后,且峰值降低;加入金钗石斛、兜唇石斛水提物溶液后发光值明显降低;加入铁皮枫斗和紫皮石斛水提物溶液前后的发光值都无明显的变化。提示铜皮石斛、金钗石斛和兜唇石斛水提物对 $O_2^{\cdot-}$ 有一定的清除作用,而铁皮枫斗和紫皮石斛水提物则对 $O_2^{\cdot-}$ 无清除作用或清除作用不明显。

2.3 清除 $\cdot OH$ 能力的检测^[5]:在样品管中加入 100 μL 1 mmol/L 邻菲罗啉溶液、100 μL 1 mmol/L CuCl 溶液和 100 μL 0.6% H_2O_2 溶液,将所得的石斛提取物配制成 10 mg/mL 的待测样品溶液,取 100 μL 加入样品管,以蒸馏水作空白对照。再加入磷酸缓冲溶液,使反应总体积为 1 mL。放入样品池,立即开始测定。结果见图 2。可以看到,加入样品溶液后,发光值均明显降低,提示 5 种石斛对羟基均有很强的清除作用。

2.4 清除 H_2O_2 能力的检测^[6]:在样品管中加入 100 μL 0.6% H_2O_2 溶液、100 μL 1 mmol/L 鲁米诺溶液,将所得的石斛提取物配制成 10 mg/mL 的待测样品溶液,取 100 μL 加入样品管,以蒸馏水作空白对照。再加入磷酸缓冲溶液,使反应总体积为 1 mL。放入样品池,立即开始测定。结果见图 3。可见铜皮石斛、金钗石斛、紫皮石斛和兜唇石斛对过氧化氢均有较强的清除作用;而加入铁皮枫斗样品溶液后,发光值反而升高,提示加入铁皮枫斗溶液可能促进了过氧化氢的氧化作用。

3 讨论

* 收稿日期: 2004-01-20

基金项目:上海市经委资助项目(2002-C-009)

* 通讯作者: Tel: (021) 54744417 E-mail: ypzhao@sjtu.edu.cn

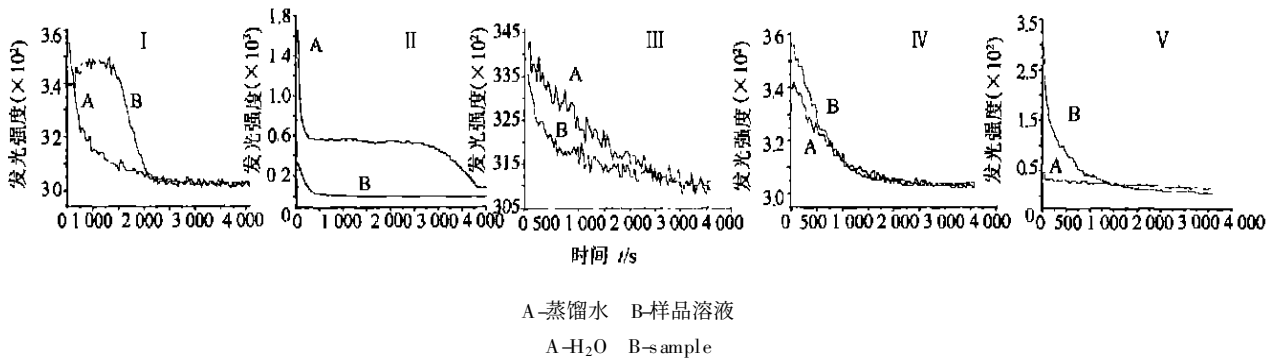


图 1 铜皮石斛 (I)、金钗石斛 (II)、铁皮枫斗 (III)、紫皮石斛 (IV)、兜唇石斛 (V) 水提物清除 $O_2^{\cdot-}$ 时发光强度随时间的变化

Fig. 1 Change of chemiluminescence intensity with time in water extract of *D. moniliforme* (I), *D. nobile* (II), *D. officinale* (III), *D. devonianum* (IV), and *D. aphyllum* (V) on scavenging oxygen free-radical

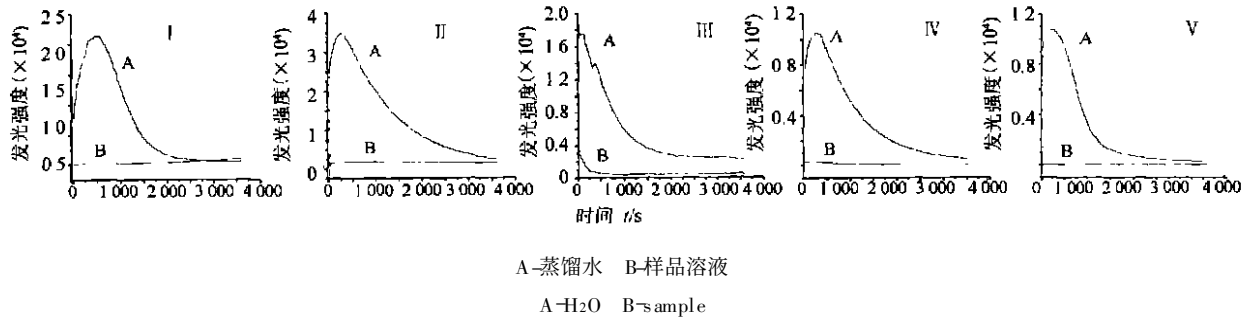


图 2 铜皮石斛 (I)、金钗石斛 (II)、铁皮枫斗 (III)、紫皮石斛 (IV)、兜唇石斛 (V) 水提物清除 $\cdot OH$ 时发光强度随时间的变化

Fig. 2 Change of chemiluminescence intensity with time in water extract of *D. moniliforme* (I), *D. nobile* (II), *D. officinale* (III), *D. devonianum* (IV), and *D. aphyllum* (V) on scavenging hydroxy free-radical

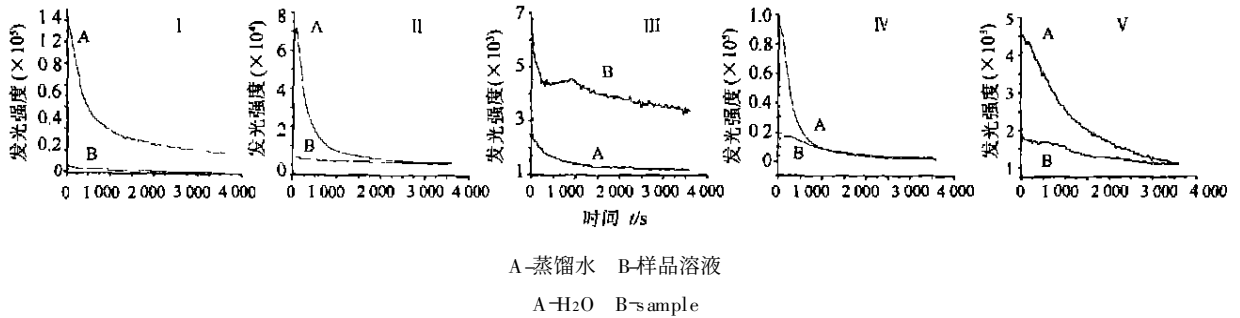


图 3 铜皮石斛 (I)、金钗石斛 (II)、铁皮枫斗 (III)、紫皮石斛 (IV)、兜唇石斛 (V) 水提物清除 H_2O_2 时发光强度随时间的变化

Fig. 3 Change of chemiluminescence intensity with time in water extract of *D. moniliforme* (I), *D. nobile* (II), *D. officinale* (III), *D. devonianum* (IV), and *D. aphyllum* (V) on scavenging H_2O_2

石斛具有抗衰老、抗肿瘤、降血糖等多种功效,而这些疾病的产生在很大程度上与体内活性氧的代谢失调有关。为此,本实验建立了 3 种 ROS 体系(其中 $O_2^{\cdot-}$ 是体内最早形成的自由基, $\cdot OH$ 和 H_2O_2 则是导致体内脂质过氧化的主要 ROS),采用化学发光法研究了 5 种石斛的水提物对他们的清除作用。实验结果表明,铜皮石斛、金钗石斛、铁皮枫斗、紫皮石斛、兜唇石斛水提物对 $\cdot OH$ 均有很强的清除作用;铁皮枫斗和紫皮石斛水提物对 $O_2^{\cdot-}$ 无清除作用或清除作用不明显。铁皮枫斗对 H_2O_2 有促氧化作

用,可能铁皮枫斗从另一个方面起作用:虽然过剩的活性氧会引起人体的许多疾病,但活性氧也能够杀死癌细胞,起到抗肿瘤的作用。因此推测铁皮枫斗的促氧化作用可能与其抗肿瘤的生理功能有关。

由于自然界具有 ROS 清除能力的天然产物成分的化学结构多含酚羟基官能团,石斛中所含的菲醌类、联苄类和茛酮类化合物结构中有很多酚羟基官能团,因此推测石斛具有清除 ROS 的作用可能与这些化合物有关^[7]。另外,由于植物体内的多糖成分有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、增强机体免疫力等作

用^[8], 研究发现, 一些植物的多糖也有清除 ROS 的作用^[9]。推测石斛清除 ROS 的作用也可能与其中的多糖成分有关。具体机制有待进一步研究。

References:

- [1] Zhang J L, He J L. Development of researches on the pharmacological action of *Dendrobium* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(5): 469-470.
- [2] Yang W M. About the generation and poisonous action of reactive oxygen species [J]. *Bull Biol* (生物学通报), 1994, 29(5): 14-15.
- [3] Ni L J, Jiang X P, Chen D H. The optimum preparation procedure for the extracting polyhexose contained in *Herba Dendrobii* [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2000, 12(4): 41-42.
- [4] Bauer V, Nakajima T, Pucovsky V, et al. Effects of superoxide generating systems on muscle tone, cholinergic and NANC responses in cat airway [J]. *J Auton Nerv Syst*, 2000, 79: 34-44.

- [5] Zhao B L, Li X J, He R G, et al. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals [J]. *Cell Biophys*, 1989, 14: 175.
- [6] Hu T X, Chen F, Chen K M, et al. *Fluorescence Analysis and Medicine* (荧光分析与医学) [M]. Shanghai: East China Normal University Press, 1990.
- [7] Xu H, Liu J, Wang Z T, et al. The scavenging of reactive oxygen species by crude drugs and cultured tissues of five species of *Dendrobium* Sw. [J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2001, 10(2): 35-37.
- [8] Cao J H, Li H. Research advances of polysaccharides immunomodulation [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1999, 20(2): 104-106.
- [9] Zhang L R, Zou G L, Yang T M. Studies on extraction of water-soluble polysaccharides and the function of cleaning oxygen free-radical function of *Ephedra* [J]. *Amino Acids Biol Resor* (氨基酸和生物资源), 2000, 22(3): 24-26.

桑叶黄酮的提取及其降糖作用的研究

原爱红¹, 黄哲², 马骏¹, 蒋晓峰¹, 孔宪涛², 李素^{1*}

(1. 同济大学附属同济医院 肾内科, 上海 200065; 2. 第二军医大学长征医院 临床免疫中心, 上海 200003)

桑叶始载于《神农本草经》, 为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 味苦、甘, 性寒, 归肺、肝经; 功能疏散风热、清肺润燥、清肝明目; 主治风热感冒、头昏头痛、目赤昏花等症。后代中医药书籍中有桑叶治疗消渴病的记载, 如《本草纲目》记载: 桑叶“煎汁代茗, 能止消渴”; “炙熟煎饮, 代茶止渴”。近代医家也常将桑叶用于治疗糖尿病且得到了满意的疗效。现代药理研究证实桑叶可抑制血糖的升高, 可预防和治疗糖尿病^[1]。桑叶中有很多成分如黄酮、生物碱、多糖、氨基酸、维生素和微量元素等^[2], 其中黄酮、多糖、生物碱是主要活性成分。本实验对桑叶总黄酮的提取、含量测定及其降糖作用进行了研究。

1 材料与仪器

桑叶购于上海童涵春药店, 由第二军医大学药学院生药教研室鉴定; AB-8 树脂购于南开大学化工厂; 芦丁(纯度 95%)、槲皮素(纯度 98%) 和链脲霉素(STZ) 购于 Sigma 公司; 拜唐苹购于拜耳医药保健有限公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂; ICR 小鼠购于上海西尔普-必凯实验动物有限公司; 日本岛津 UV-2000 紫外-分光光度仪, 强生公司 Onethchi

血糖测定仪。

2 方法和结果

2.1 桑叶黄酮的提取: 称取桑叶 1 kg, 以 10 倍量水煎煮 2 h, 共 2 次, 合并煎液, 浓缩至一定体积, 离心去除沉淀, 上清液上大孔树脂柱。色谱柱用 AB-8 大孔树脂湿法填充, 用蒸馏水洗脱至无色后, 以 30%、50%、70%、90% 乙醇分别洗脱至无色并收集, 再将洗脱液低温浓缩, 真空干燥, 分别得样品 I~IV。

2.2 桑叶总黄酮的测定

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取干燥至恒重的芦丁和槲皮素对照品各 4.1 mg 置 25 mL 量瓶中, 加入 60% 乙醇使之溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。取 15 mL 溶液置 25 mL 量瓶中, 加入 60% 乙醇再稀释至刻度, 摇匀备用(最终质量浓度为 0.098 mg/mL)。

2.2.2 标准曲线的制备: 精密吸取芦丁、槲皮素对照品溶液 0.01、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀后放置 6 min; 加入 10% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 摇匀后放置 6 min; 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 4 mL 并加入 60% 乙醇稀释至 10 mL, 摇匀, 放置 15

* 收稿日期: 2004-02-28

基金项目: 上海市卫生局中医药科研基金(2002Q003)

作者简介: 原爱红(1971—), 女, 山西太原人, 副主任医师, 副教授, 博士, 1999—2001 年在第二军医大学附属长征医院肾内科解放军肾脏病中心作博士后, 主要从事糖尿病及其原发性、继发性肾脏病的中西医防治研究。

Tel: (021) 56051080 Fax: (021) 56050502 E-mail: aihongyuan@hotmail.com