# 松节藻醇提物对正常小鼠抗氧化活性的影响

史大永[1],贺 娟[2],许 凤[2],袁兆慧[1],韩丽君[1]* 范 晓[1]
(1. 中国科学院海洋研究所,山东 青岛 266071; 2. 青岛大学医学院附属医院,山东 青岛 266003)

**摘 要**:**目的** 研究松节藻醇提物对正常小鼠抗氧化活性的影响。**方法** 通过单细胞微凝胶电泳法检测松节藻醇提物对 $H_2O_2$ 诱导的正常小鼠淋巴细胞 DNA 损伤的防护作用,分别采用黄嘌呤氧化酶法、DTNB 直接法、TBA 硫代巴比妥酸法检测小鼠血清中的超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性和丙二醛 (MDA) 的量。**结果** 松节藻醇提物对 $H_2O_2$ 诱导的正常小鼠淋巴细胞 DNA 损伤具有一定的防护作用,并且能升高小鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 的量。**结论** 松节藻醇提物具有一定的抗氧化活性。

**关键词**:松节藻; 抗氧化; 彗星电泳
**中图分类号**:R285.5 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2009)01-0097-03

松节藻 *Rhodomela confervoides* (Huds.) Silva 广泛分布于中国、日本、朝鲜半岛及大西洋北岸,化学成分研究发现其中富含溴酚类化合物[1,2],但是对该种海藻的药理活性研究很少有报道[3]。笔者在一些药理模型上对松节藻醇提物的抗氧化活性进行了研究,结果显示其不但具有保护 $H_2O_2$ 诱导的正常小鼠淋巴细胞 DNA 损伤的活性,而且可增强血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性,同时能够抑制血清中脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 的生成,表明松节藻醇提物具有一定的抗氧化作用。

## 1 材料

1.1 试剂与仪器:RPMI-1640 培养液 (Gibico 公司);小牛血清 (Gibico 公司);正常熔点琼脂糖和低熔点琼脂糖 (10 g/L 分别溶于 PBS);淋巴细胞分离液 (爱普生物技术公司),磷酸缓冲液 (PBS,pH 7.4);溶解液 (0.03 mol/L NaOH, 1 mol/L NaCl);解旋液 [2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L $Na_2EDTA$, 10 mmol/L Tris (Amresco 公司),临用前加 10% DMSO, 1% Triton-100];电泳液 [40 mmol/L Tris (Amresco 公司),5 mmol/L EDTA, 20 mmol/L 醋酸, pH 8.3];中和液 (0.4 mol/L Tris-HCl, pH = 7.5); 250 μg/L EB 溶液;300 g/L $H_2O_2$ 溶液;荧光剂 DAPI (Boehringer Mannheim 公司);超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程所)。除标明外,其余试剂均为国产 AR 级 (上海化学试剂厂)。Sigma 3K30 型低温离心机;721 分光光度计 (上海分析仪器厂);DYY—Ⅱ型电泳仪 (北京六一厂);IM20K 型制冰机;Olympas BH—2 型荧光显微镜 (10×40)。

1.2 药物:松节藻 *Rhodomela confervoides* (Huds) Silva,2003 年 4 月采于山东青岛市太平角海湾,由中国科学院海洋研究所邵魁双博士鉴定,标本现存于中国科学院海洋研究所海藻化学研究室,标本号为 2003048。

1.3 动物:青岛市实验动物中心提供纯种昆明小鼠 40 只,雌雄各半,体质量 18～23 g。

## 2 方法

2.1 松节藻醇提物的制备:风干松节藻样品约 5 kg,粉碎;95% 乙醇室温提取 3 次,合并得浸膏 325 g;用约 10 倍量的水混悬浸膏,醋酸乙酯萃取;减压蒸干得棕黑色稠膏 105 g,经 HPLC 法测定松节藻醇提物中含总酚 2.54%。

2.2 动物分组及给药:昆明小鼠 40 只随机分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半。药物组:ig 松节藻醇提物色拉油稀释液,剂量分别为 25、50、100 mg/kg,每日 ig 1 次,连续 20 d;对照组:ig 等量大豆色拉油,每日 1 次;隔日称体质量,观察小鼠生长情况。

2.3 血样采集:末次给药 24 h 后,将小鼠称质量,眼眶取血于含 1 mL 肝素的玻璃试管,混匀,3 000 r/min 离心 10 min;收集上层无溶血血浆于 EP 管中,-20 ℃冰箱贮藏备用。

2.4 $H_2O_2$ 诱导的淋巴细胞 DNA 损伤防护作用

①**收稿日期**:2008-04-05
**基金项目**:国家 863 基金项目 (2007AA09Z410; 2007AA091604)
**作者简介**:史大永 (1977—),男,博士,研究方向为海洋天然产物。Tel: (0532) 82898719 Fax: (0532) 82898641 E-mail: shidayong@ms.qdio.ac.cn
*通讯作者 韩丽君 Tel: (0532) 82898702 Fax: (0532) 82898641 E-mail: ljhan@ms.qdio.ac.cn

检测[4,5]

2.4.1 淋巴细胞制备:取各组抗凝血样 35 μL 加入到盛有 1 mL RPMI-1640 和 10% 小牛血清混合液的离心管中,0 ℃冰浴培养 30 min;加入淋巴细胞分离液 100 μL,4 ℃,3 000 r/min 离心 3 min,取粉红色淋巴细胞层移入磷酸缓冲液中,得到淋巴细胞悬液 $2.0 \times 10^6$～$4.0 \times 10^6$ 个/mL;台盼蓝染色计数,成活率应大于 90%。

2.4.2 单细胞微凝胶彗星电泳:采用"彗星"电泳法(SCGE),该方法是较敏感的 DNA 断裂损伤分析技术[6],采用改良的 SCGE[7],将淋巴细胞悬液中加入不同浓度(5、10、20 μmol/L)的 $H_2O_2$ 处理 5 min,离心弃上清,用 PBS 洗 2 次,终止反应。取 85 μL 1% 正常熔点琼脂糖凝胶铺第一层凝胶,取 85 μL 含约 $1 \times 10^4$～$1 \times 10^5$ 个细胞的 0.5% 低熔点琼脂糖凝胶铺第二层凝胶。将凝固好的微凝胶玻片浸入溶解液中约 1 h 取出,蒸馏水冲净。再浸入 pH 为 10 的解旋液中约 60 min 后取出,蒸馏水冲净;呈水平状浸入电泳槽中,电泳液平面高于玻片 3～5 mm;18 V 条件下电泳 30 min 后取出,蒸馏水冲净;水平放置,将 EB 液滴在玻片上染色 10 min,电泳完毕后,将载有琼脂薄板的玻片放入中和液中中和 3 次,每次 5 min,然后用 1 μg/mL 的 DAPI 20 μL 染色 20 min,避光,以上操作均在 4 ℃下进行,在荧光显微镜下观察。

2.5 血清 SOD 活性测定:黄嘌呤氧化酶法测定[8],测定波长 550 nm。

2.6 血清 GSH-Px 活性测定:DTNB 直接法测定[9],测定波长 412 nm。

2.7 血清 MDA 测定:硫代巴比妥酸(TBA)法测定[10],测定波长 532 nm。

2.8 统计学处理:采用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计分析,组间进行单因素方差分析。

## 3 结果

3.1 对 $H_2O_2$ 诱导的淋巴细胞 DNA 损伤的防护作用:根据彗星的尾部与头部的比率大小将 DNA 损伤分为 0～4 级损伤,共 5 个等级,见图 1。本实验采用的专用单位(AU)是一种衡量 DNA 链断裂损伤程度的特有单位,每种处理观察 100 个细胞,计算其损伤单位。DNA 损伤作用(AU)=$\Sigma$nI,其中 I 为淋巴细胞 DNA 损伤级别,n 为 DNA 损伤级别为 I 的淋巴细胞个数。结果表明,松节藻醇提物低剂量组在 $H_2O_2$ 浓度分别为 0、5、10 μmol/L 时,中剂量组在 $H_2O_2$ 浓度分别为 0、5、20 μmol/L 时对淋巴细胞 DNA 损伤有一定的防护作用,其中当 $H_2O_2$ 浓度为 5 μmol/L 时中剂量组与对照组比较差异显著($P < 0.05$),结果见表 1。

3.2 对血清中 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 的影响:见表 2,结果表明,同对照组比较,低、中、高 3 个剂量组均能显著升高血清中 SOD 及 GSH-Px 活性,降低 MDA 水平,其中低、中剂量组作用较为显著。

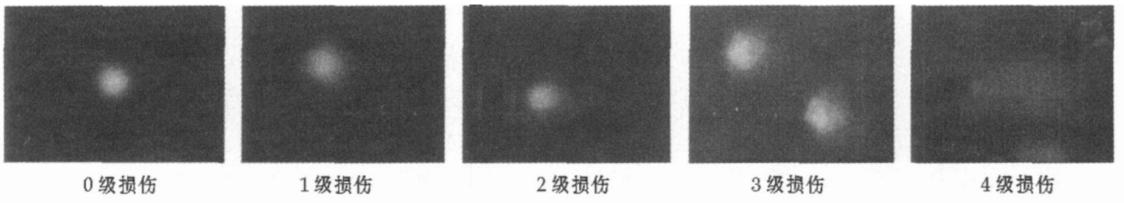


**图 1 彗星电泳不同级别淋巴细胞 DNA 损伤**

**Fig. 1 Comet electrophoregramr different grades DNA damage in lymphocyte**

**表 1 松节藻醇提物对 $H_2O_2$ 诱导的正常小鼠淋巴细胞 DNA 损伤的防护作用($\bar{x} \pm s$, n = 10, AU 值)**

**Table 1 Protection of ethanol extract from R. confervoides against DNA damage induced by $H_2O_2$ in lymphocyte of normal mice ($\bar{x} \pm s$, n = 10, AU value)**

| 组别 | 剂量/(mg·kg$^{-1}$) | $H_2O_2$/(μmol·L$^{-1}$) 0 | 5 | 10 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|
| 对照 | - | 136.4 ±35.8 | 300.5 ±48.9 | 306.7 ±36.8 | 362.5 ±25.8 |
| 松节藻醇提物 | 25 | 108.6 ±28.2 | 280.5 ±37.6 | 276.7 ±18.6 | 374.5 ±15.1 |
| | 50 | 129.0 ±34.2 | 172.8 ±35.2 * | 298.2 ±43.4 | 328.6 ±21.5 |
| | 100 | 158.4 ±31.3 | 307.2 ±35.1 | 343.5 ±12.5 | 345.5 ± 7.8 |

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ *vs* control group

## 4 讨论

机体受到电离辐射、体内酶促或非酶促反应时会产生自由基,自由基性质活泼,很容易与其他物质反应生成新的自由基,因此反应往往以连锁方式进行。活性氧自由基与多种疾病有关,可以与蛋白质、脂肪、核酸发生反应,其中 DNA 是其攻击的重要靶标[10],当作用于不饱和脂肪酶,则生成过氧化脂质,影响细胞膜通透性。正常情况下,自由基会被体内酶系统迅速清除,这类酶包括 SOD、CAT、GSH-Px。

本研究结果表明,松节藻醇提物可有效防护

表 2 松节藻醇提物对正常小鼠血清中 SOD、GSH-Px 活性与 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 2 Effect of ethanol extract from R. confervoides on activities of SOD and GSH-Px, and level of MDA in serum of normal mice ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

| 组别 | 剂量/(mg·kg⁻¹) | SOD/(U·mL⁻¹) | GSH-Px/(U·mL⁻¹) | MDA/(nmol·mL⁻¹) |
|---|---|---|---|---|
| 对照 | - | 178.88±5.17 | 190.19±17.38 | 12.520±1.203 |
| 松节藻醇提物 | 25 | 240.18±22.16 | 241.05±16.04 | 5.027±1.331 * |
| | 50 | 250.50±16.89 * | 252.08±17.19 | 9.583±1.134 |
| | 100 | 234.75±18.77 | 215.62±24.51 | 11.686±0.895 |

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ *vs* control group

$H_2O_2$ 诱导的小鼠淋巴细胞 DNA 损伤,同时提高小鼠体内的 SOD 和 GSH-Px 活性,降低血清中脂质过氧化终产物 MDA 的量,减轻活性氧自由基对机体的攻击,具有一定的抗氧化应用前景。

**参考文献**:


[1] Fan X, Xu N J, Shi J G. Bromophenols from the red alga Rhodomela confervoides [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 455-458.

[2] Pederson Marianne. Bromochlorophenols and a brominated diphenylmethane in red algae [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(2): 291-293.

[3] 史大永, 韩丽君, 贺 娟, 等. 松节藻抗肿瘤活性 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 229-233.

[4] 王小红, 江 洪. 单细胞凝胶电泳技术的研究进展及其应用 [J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(1): 5-7.

[5] 陈玮琳, 何继亮. 快速敏感检测 DNA 断裂的方法-彗星实验 [J]. 国外医学: 卫生学分册, 1998, 5(2): 101-104.

[6] 马爱国, 韩秀霞, 刘四朝, 等. 两种 DNA 断裂损伤检测方法敏感性的比较 [J]. 遗传, 1997, 19(1): 32-34.

[7] 袁守军, 韩 锐. 单细胞 DNA 损伤的微凝胶彗星电泳检测法 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14(1): 86-87.

[8] 李益新, 方允中. 超氧化物歧化酶活力测定的新方法-化学发光法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1983, 2: 95-97.

[9] 夏奕明, 朱莲珍, 江泉观. 用硫代巴妥酸法测定脂质过氧化物条件的探讨 [J]. 铁道劳动卫生通讯, 1987, 40: 47.

[10] Bagchi D, Garg A, Krohn R, *et al*. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice [J]. *Gen Pharmacol*, 1998, 30: 771-776.


# 佛手挥发油对支气管哮喘小鼠外周血、肺泡灌洗液及肺组织中嗜酸性粒细胞的影响


施长春[1], 王建英[1], 朱婉萍[2], 黄伟华[2], 施金俏[1], 薛洪燕[1]

(1. 浙江省金华市人民医院, 浙江 金华 321000; 2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310009)



**摘 要**:**目的** 观察支气管哮喘模型小鼠外周血、支气管肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织中嗜酸性粒细胞 (EOS) 的改变以及佛手挥发油对以上指标的影响。**方法** $C_{57}$ 小鼠以卵白蛋白 (OVA) 致敏造成哮喘模型,分为模型组,对照药物组,佛手挥发油高、中、低 3 个剂量组,另外 10 只为健康对照组。分别检测各组小鼠外周血、BALF 中 EOS 的水平并观察肺组织病理切片中 EOS 的浸润情况。**结果** 模型组外周血、BALF 与对照组比较,EOS 均明显增加 ($P < 0.01$);肺组织病理切片显示支气管及血管周围大量 EOS 浸润。各佛手挥发油组与模型组相比外周血 BALF 中 EOS 均有不同程度下降,高剂量组差异尤为显著 ($P < 0.01$)。各组肺组织病理切片中 EOS 浸润较模型组减少,剂量越大此作用越明显。**结论** 佛手挥发油可抑制哮喘小鼠外周血、BALF 中 EOS 水平,减少肺组织 EOS 浸润,拮抗气道炎症而发挥平喘作用,作用强度与剂量有关。



**关键词**:佛手挥发油; 哮喘; 外周血; 支气管肺泡灌洗液 (BALF); 嗜酸性粒细胞 (EOS)

**中图分类号**:R286.43 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2009)01-0099-03


近年来,对支气管哮喘的研究取得了重大进展,哮喘的本质是气道反应性增高为特点的慢性炎症疾病,其治疗以抗炎平喘为主[1]。佛手具有舒肝理气、宽胸化痰等功效,在临床上普遍用于支气管炎和支气管哮喘的治疗,具有较好的疗效。挥发油是佛手所含的主要成分,佛手挥发油及醇提液具有抗炎、平喘、祛痰等作用[2]。本研究旨在利用 $C_{57}$ 小鼠哮喘模型,观察佛手挥发油对致敏 $C_{57}$ 小鼠外周血、肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织中嗜酸性粒细胞 (EOS) 的影响,探讨佛手挥发油平喘的作用机制。


①**收稿日期**:2008-06-18

**基金项目**:浙江省自然科学基金资助项目 (302759)