

图 3 胭脂树橙对 PPARY 蛋白表达的影响 Fig. 3 Effect of bixin on expression of PPARY protein 表 1 胭脂树橙对 PPARY 蛋白表达相对强度的影响 Table 1 Relative intensity of bixin on expression

of PPARy protein

组别	别 质量浓度/ (mg • L - 1) 条带强度	
对照	-	1 000±0 050
胭脂树橙	0 4	1 150±0 058
	2 0	1 311±0 066
	4 0	1. 779±0 089*
	8 0	2 511±0 126**

与对照组比较: * P< 0.05 * * P< 0.01
* P< 0.05 * * P< 0.01 vs control group

橙处理后的细胞 PPARY 蛋白的表达量为 1. 779 \pm 0 089 (P < 0 05); 8 0 mg/L 为 2 511 \pm 0 126 (P < 0 01),与对照组相比差异显著,说明经胭脂树橙处理后,PPARY 蛋白的表达量随药物浓度的增加而增加;胭脂树橙可上调 PPARY 蛋白的表达,并呈明显的剂量依赖性。

3 讨论

有关 PPARY 在胭脂树橙诱导 K562 细胞凋亡过程中的作用, 国内尚研究较少。本研究表明, 经胭脂树橙处理的 K562 细胞, 采用台盼蓝拒染法和MTT 法检测显示, 胭脂树橙对 K562 细胞的抑制作用同其浓度和作用时间呈依赖性关系, 即使小剂量的胭脂树橙(0.2 mg/L)作用 K562 细胞 3 d 后, 仍能较显著地抑制细胞增殖。荧光显微镜观察形态学

显示, 对照组呈弥漫性均匀荧光, 核/ 质比例大; 给药组细胞核变小, 浓缩, 荧光加强, 并观察到有大量细胞碎片, 呈现典型凋亡细胞的特征性变化。在此基础上, 进一步研究了胭脂树橙诱导 K562 细胞凋亡的机制, 通过 Western-blotting 检测 PPARY 基因的表达产物, 显示胭脂树橙显著上调 PPARY 基因的蛋白表达, 并呈剂量依赖性, 提示胭脂树橙诱导 K562 细胞凋亡和 PPARY 基因的表达有密切关系。提示胭脂树橙可能是通过上调 PPARY 基因的表达来促进 K562 细胞的凋亡和抑制其增殖的, 其中, 胭脂树橙起着 PPARY 非特异配体的作用。

PPARY 具有调控细胞因子生成, 调节体内糖平衡, 控制炎症形成和影响肿瘤生长等作用。最近有研究显示, PPARY 配体抗肿瘤作用不需激活 PPARY 或 PPARY 激活与其他途径共同起作用^[5]。可见有关胭脂树橙诱导细胞凋亡及 PPARY 表达的分子机制有待进一步研究和证实。

- [1] Woodall A A, Lee S W, Weesie R J, et al. Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity [J]. Biochim Biophys A cta, 1997, 133: 33-42
- [2] Berger J, Moller D E The mechanisms of action of PPARs [J]. Annu Rev Med., 2002, 53: 409-435
- [3] Willson T M, Brown P J, Sternbach D D, et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery [J]. J Med Chen, 2000, 43(4): 527-550
- [4] Baek S J, Wilson L C, His L C, et al. Troglitazone, a per-oxisome proliferator activated receptory (PPARY) ligand, selectively induces the early growth response 1 gene independently of PPARY [J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 5845-5853
- [5] Shen Z N, Nishida K, Doi H, et al. Suppression of chondresarcoma cells by 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is associated with altered exp ression of Bax/Bcl-xL and P21 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328: 375-382

生当归、酒当归和油当归体外清除自由基活性研究

参考文献:

邓红娟, 郭延生, 曲亚玲, 杨小虎, 秦 亮, 魏彦明" (甘肃农业大学动物医学院,甘肃 兰州 730070)

摘 要:目的 研究生当归、油当归和酒当归的水提取液体外对羟自由基(\bullet OH)和氧自由基(O_2^{\pm})的清除作用。方法 应用分光光度法测定生当归、油当归和酒当归水提液对 Fenton 反应产生的 \bullet OH 和邻苯三酚自氧化产生的 O_2^{\pm} 的清除率。结果 生当归、油当归和酒当归水提液在 $5\sim 80~\text{mg/mL}$ 的质量浓度内对 \bullet OH 有明显的抑制作用,随着当归及其炮制品水提液质量浓度的增加,抑制率明显升高。生当归、油当归和酒当归水提液对 \bullet OH 清除

^{*} 收稿日期: 2008-10-06

作用的顺序为: 酒当归> 油当归> 生当归。生当归、油当归和酒当归水提液在 $25 \sim 200 \text{ mg/mL}$ 的质量浓度内对 $0\frac{1}{2}$ 有明显的清除作用,随着当归及其炮制品水提液质量浓度的增加,抑制率明显升高,且呈现剂量依赖性。生当归、油当归和酒当归水提液对 $0\frac{1}{2}$ 清除作用的顺序为: 酒当归> 生当归> 油当归。结论 研究表明生当归、油当归和酒当归水提液体外均具有较好的清除自由基的作用,且药物浓度与清除效果呈明显的量效关系。

关键词: 当归; 炮制品; 水提液; 羟自由基; 氧自由基

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0253 - 2670(2009) 05 - 0784 - 04

自由基是生物分子在体内通过共价键均裂产生 的,正常情况下,生物机体各种自由基的产生和清除 处于一种动态的平衡,如果由于某种原因,使得体内 产生的氧自由基过多,或者体内防护、清除和修复能 力下降,就会出现自由基代谢的失常,导致自由基损 伤,引起疾病的发生。由于体内已无力维持自由基 的平衡,需要补充外源自由基清除剂帮助维持体内 自由基的平衡门。在我国中草药已经有几千年的临 床应用历史,是一个巨大的天然抗氧化剂宝库。当 归 Ang elica sinensis (Oliv.) Diels 是伞形科当归属 多年生草本植物,其干燥的贮藏根是我国常用中药。 主要分布于我国甘肃、四川、云南、湖北、陕西、贵州 等地。历代多以甘肃岷县所产作为道地药材。当归 药用历史悠久, 历代本草均有记载。其性味甘辛、 温、入心、肝、脾经、具有补血活血、调经止痛、润燥滑 肠等作用[2]。现代药理学研究证明当归具有降血 压、镇痛、抗炎、抗菌、抗辐射作用, 以及抗损伤、增强 免疫功能、抗氧化和清除自由基作用, 另外还有利胆 保肝、松弛平滑肌、美容等作用[3]。 当归的炮制方法 历代各有不同, 文献记载有不同的炮制品, 目前临床 常用的炮制品有生当归、酒当归、土当归和当归炭 等,对其炮制品的研究也以上述4种炮制品为主[4]。 当归属甘肃道地药材, 习用油当归, 传统认为可增强 其润肠通便的作用. 主要用于血虚肠燥便秘[5] . 并被 载入《甘肃省中药炮制规范》。有关当归不同炮制品 抗氧化活性及其作用机制的研究报道不多, 尤其关 于油当归清除自由基的报道更是少见。油当归作为 地方炮制品在甘肃中医和中兽医临床用药中属常用 品,且作用明显。为此,本实验以生当归及其两种不 同炮制品油当归和酒当归为研究对象, 对其体外清 除自由基的有关指标进行测定, 旨在为当归及其炮 制品药理作用及其作用机制的进一步研究提供科学 依据。

1 材料

生当归采于甘肃岷县,经甘肃中医学院中药学系龙全江副教授和甘肃农业大学动物医学院中兽医教研组鉴定。取原药材,除去杂质,洗净,润透,切成薄片,晒干或低温干燥。油当归、酒当归由甘肃中医

学院中药学系龙全江副教授指导炮制加工。三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)为进口上海中秦化学试剂有限公司分装(批号 070308),其他试剂均为国产分析纯。OPPON —3000 型紫外可见光分光光度计(韩国)、AL104 电子分析天平(德国)、CW —2000 超声、微波协同萃取仪(上海新拓)。

2 方法

2 1 当归水提液的制备: 取生当归、油当归和酒当归各 100 g, 加水 300 mL, 85 ℃ 超声 微波协同提取 2 次, 每次 30 min。合并两次提取液, 减压浓缩至质量浓度 1 g/ mL。4 ℃保存备用。

2 2 羟自由基(•OH)体系: 参照 Fenton 反应的方法建立反应体系模型^[6,7],采用固定反应时间法^[8,9],在相同体积的反应体系 (6 mmol/L $H_2O_2 I$ mL, 6 mmol/L Fe^{2+} 1 mL, 6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL)分别加入不同质量浓度的生当归、油当归和酒当归水提液(5、10、20、40、80 mg/mL)和阳性对照药物 L-抗坏血酸 1 mL,每个浓度设 10 个平行管。以蒸馏水为参比,在 510 nm 处测定吸光度(A),计算清除率。

清除率= $[A_i - (A_j - A_d)]/A_i \times 100\%$ A_i 为空白对照液的吸光度, A_j 为加入药物溶液后的吸光度, A_d 为不加显色剂 H_2O_2 药物溶液本底的吸光度

2 3 氧自由基(O²)体系^[10,11]:采用邻苯三酚自氧化法^[12-14]。邻苯三酚在弱碱性介质中自氧化分解产生O²,利用O²清除剂能使邻苯三酚自氧化产物在 325 nm 处的吸收峰受到抑制这一特点安排实验,实验分为对照组和加药组,对照组设 5 个平行管,分别加入 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.2,含 1 mmol/L 二乙基三氨基五乙酸) 4 5 mL,加入 4 2 mL 双蒸水,混匀后 25 ℃ 水浴保温 20 min,取出后立即加入 25 ℃ 水浴中预热的 6 mmol/L 的邻苯三酚 0 3 mL (以 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚作为空白),混匀后立即倒入比色杯,于 325 nm 处每隔 30 s 测 A 值 1 次,共测 5 min,以空白管调零。计算对照组溶液吸光度随时间的变化率。加药组设 5 个平行管,在加入邻苯三酚前先加入 1 0 mL 当归提取液 (25、50、100、200 mg/mL)

对照药物 L-抗坏血酸,再加入 3 2 mL 双蒸水,混匀后 25 $\mathbb C$ 水浴保温 20 min,取出后立即加入在 25 $\mathbb C$ 水浴中预热的 6 mmol/L 邻苯三酚 0. 3 mL,混匀后立即倒入比色杯,于 325 nm 处每隔 30 s 测 A 值 1 次,共测 5 min,以空白管调零,计算当归及其炮制品水提取液吸光度随时间的变化率。

清除率= $(\Delta A - \Delta A_0)/\Delta A \times 100\%$

 ΔA 表示对照管邻苯三酚自氧化变化速率, ΔA_0 表示加药管 邻苯三酚自氧化变化速率

2.4 数据统计处理: 用 SPPS 13.0 统计软件进行 方差分析和回归分析, 测定结果以 $\frac{1}{x}$ 表示。

3 结果与分析

3.1 生当归、油当归和酒当归对·OH 的清除作 用: 由表 1 可知不同质量浓度生当归、油当归和酒当 归水提液对 Fenton 反应体系产生的• OH 均有一 定的清除作用, 随浓度增加, 抑制率明显升高, 且呈 现剂量依赖性。其中,生当归、酒当归在5和10,40 和 80 mg/mL 两个浓度梯度差异不显著:油当归只 有 40 和 80 mg/ mL 差异不显著, 其他质量浓度梯 度均差异显著 (P < 0.01)。在 5~80 mg/mL 的质 量浓度内, 随生当归、油当归和酒当归水提液质量浓 度的增加,抑制率呈明显的上升趋势。在 5~ 10 mg/mL,生当归、油当归和酒当归对•OH 清除作 用的上升趋势几乎无差别,但从 10 mg/mL 开始, 随质量浓度的增加,酒当归对•OH 清除作用的上 升幅度要大于生当归和油当归; 80 mg/mL 之后, 生 当归、油当归和酒当归对·OH 的清除作用接近相 同, 趋势趋于平缓。拟合曲线, 计算回归方程, 生当 归水提液: Y= - 1.710+ 3.706 X- 0.046 X²; 油当 归水提液: Y= - 1.691+ 3.878 X- 0 051 X²; 酒当 归水提液: $Y = -6.145 + 4.349 X - 0.06 X^2$; L-抗 坏血酸: Y= 151. 459+ 58. 772 lnX。由回归方程求 得半数抑制率 (IC50)分别为: 生当归 IC50为 18.00 mg/mL,油当归 ICso为 17. 20 mg/mL,酒当归 ICso 为16.80mg/mL, L-抗坏血酸IC50为0.18mg/

表 1 生当归、油当归、酒当归水提液对羟自由基的 清除作用 $(\bar{x}\pm s)$

Table 1 Effect of water extract solution from different precessed products of *Radix Angelicae Sinensis* (raw, oil, and wine) on scavenging • OH $(\overline{x} \pm s)$

组别	清除率/%				
	5 mg• mL ⁻¹	10 mg• mL ⁻¹	20 mg • mL ^{- 1}	40 mg • mL ⁻¹	80 mg • mL - 1
生当归	16 89±3 47	30. 11 ±5. 01	53. 53 ±14. 45	87. 67 ±0. 76	97. 77 ±0. 35
油当归	17. 21 ±3. 82	31. 39 ±5. 30	56 64±0 88	87. 39 ± 1. 65	98 95±0 44
酒当归	16 08 ±8 37	28. 40 ±4. 42	60 02±8 55	89. 71 ±3. 29	99. 07 ±0. 70

mL。因此, 生当归、油当归和酒当归水提液对· OH 清除作用顺序为: 酒当归> 油当归> 生当归。 3.2 生当归、油当归和酒当归对 O_2^{\dagger} 的清除作用: 由表 2 可知,不同质量浓度生当归、油当归和酒当归 水提液对邻苯三酚自氧化反应体系产生的 $O_2^{\frac{1}{2}}$ 均有 一定的清除作用。随质量浓度增加、抑制率明显升 高,且呈现剂量依赖性。生当归、油当归和酒当归只 有 25 和 50 mg/mL 两个浓度梯度之间差异不显 著,其余各浓度梯度之间均差异显著 (P < 0.01)。 在 25~ 200 mg/mL 内, 随生当归、油当归和酒当归 水提液质量浓度的增加,抑制率呈上升趋势。其中 油当归和酒当归对 $O_2^{\frac{1}{2}}$ 清除作用的上升幅度要大于 生当归。100 mg/mL 时,油当归和酒当归两者之间 差异显著 (P < 0.05), 酒当归对 $O_2^{\frac{1}{2}}$ 的清除作用要 明显的好于油当归。浓度达到 200 mg/mL 时, 生 当归和酒当归之间差异呈显著性 (P< 0 05), 此时, 油当归和酒当归对 $O^{\frac{1}{2}}$ 的清除作用接近相同. 且效 果要明显的好于生当归。各炮制品不同质量浓度之 间差异显著 (P< 0 01)。 200 mg/mL 之后清除作 用的趋势趋于平缓。拟合曲线计算回归方程,生当 归: Y= 6.815+ 0.497 X - 0.001 X²; 油当归: Y= $0.320 + 0.275 X + 0.001 X^2$; 酒当归: Y = - 2 406+ 0.699 X - 0 001 X²; L-抗坏血酸: Y= - 8 602+ 564 92 X。由回归方程求得的半数抑制 率 (IC50) 分别为: 生当归 IC50为 112 50 mg/mL, 油当归 IC50为 124. 50 mg/mL, 酒当归 IC50为 85. 50 mg/mL, L-抗坏血酸 ICso 为 0 11 mg/mL。因此, 在生当归、酒当归和油当归水提液对 02 清除作用 的顺序为: 酒当归> 生当归> 油当归。

表 2 生当归、油当归、酒当归水提液对氧自由基的清除作用 $(\bar{x}\pm s)$

Table 2 Effect of water extract solution from different processed products of *Radix Angelicae Sinensis* (raw, oil, and wine) on scavenging O_2^{\pm} ($\overline{x} \pm s$)

组别	40 Dil	清除率/%			
	25 mg • mL ⁻¹ 50 mg • mL ⁻¹ 100 mg • mL ⁻¹ 200 mg • mL ⁻¹				
•	生当归	18 99 ± 11. 78 29 20 ± 15 05 48 69 ± 13 46 73 98 ± 6 70			
	油当归	$7.29 \pm 3.24 + 16.99 \pm 5.28 + 35.95 \pm 10.39 + 90.37 \pm 9.05$			
	酒当归	14 95 ± 4 02 28 75 ±5 23 56 87 ±6 16 92 77 ±1. 27			

4 讨论

国内外研究表明, 当归的化学成分主要有苯酞类、香豆素类、黄酮类、挥发油类、有机酸类、多糖类化合物及其他成分。在当归的这些化学成分中, 除香柑内酯等呋喃香豆素外, 其他类化学成分几乎都与抗氧化有关[15]。目前研究表明, 当归中阿魏酸和

多糖是抗氧化的主要成分, 对羟自由基和氧自由基 都有较强的清除作用[16,17],但当归及其炮制品的有 效成分及其量随着炮制方法的不同也有很大的差 异[18]。有实验报道当归及其炮制品中水溶性粗多 糖的量大小依次为: 酒炒当归> 生当归> 土炒当 归> 清炒当归> 当归炭[19]。当归饮片经油炒后水 溶性浸出物的量略有下降, 但多糖的量升高较为明 显[20], 阿魏酸的量也有所提高[21]。宋金春等[22]报 道, 当归生品与炮制品之间, 阿魏酸的量有一定的差 异, 并且随着炮制温度的升高而降低, 当归炮制后阿 魏酸的量高低依次为: 生当归≈酒当归> 当归炭。 从水溶性成分来看, 当归酒炒后水溶物增高, 阿魏酸 几乎无降低。李明明等[23]报道,5羟甲基2糠醛 (5-HMF) 可延长小鼠在低氧状态下的存活, 具有抗 自由基活性。5-HMF 主要由己糖加热分解产生、 一般中药制剂炮制或加热后 5-HMF 量增加。如上 所述, 当归随炮制方法的不同, 其有效成分的量也存 在一定差别,且其水溶性的成分也有所变化。可见 仅采用一种有效成分来评判当归及其炮制品对自由 基清除能力是不完善的。所以,本实验采用生当归 及其炮制品的水提液作为研究对象,才能全面客观 的评价生当归、油当归和酒当归水溶性成分对自由 基清除作用。

虽然当归及其炮制品对自由基的清除作用已有相关报道,但对甘肃地方特色的油当归清除自由基的作用未见相关报道,因此本实验采用 Fenton 反应体系和邻苯三酚自氧化体系检测生当归、油当归和酒当归水提液对•OH 和 Oź 的清除作用,以期阐明油当归对自由基的清除能力。实验结果表明:油当归水提液对 Fenton 反应生成的•OH 和邻苯三酚自氧化反应产生的 Oź 均有良好的抑制作用,且随药物浓度的增加,抑制率呈明显升高,剂量效应关系显著,对•OH 清除作用的能力介于酒当归和生当归之间;对 Oź 清除能力比酒当归和生当归较差,其原因有待于进一步研究。

综上所述可以推测,生当归、油当归和酒当归水提液中清除自由基的活性物质具有一定的热不稳定性。且随温度和辅料的变化,生当归、油当归和酒当归中的化学成分可能也发生了某些变化,同时它们在炮制品中的分布、在水中的溶解状况以及和不同的自由基的亲和力也不尽相同,从而影响了当归炮制品清除自由基能力。当归及其炮制品水提液清除

自由基的活性成分可能通过多位点、多渠道发挥作用。随着提取工艺的不断进步以及研究的不断深入,当归及其炮制品中清除自由基的单体、化合物以及其作用位点和相关机制将会不断得到阐明。 参考文献:

- [1] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,
- [2] 江苏新医学院,中药大辞典 [M],上海: 上海科学技术出版社、1986
- [3] 康 军. 当归化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 医药产业资讯, 2005 (23): 120
- [4] 孟同风,何 莉. 当归炮制研究初探[J]. 陕西中医学院学报,2001,24(5):52-53
- [5] 甘肃省卫生厅,甘肃中药炮制规范 [M],兰州:甘肃人民出版社、1999
- [6] Halliwell B Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates [J]. FEBS Lett, 1978, 92(2): 321-326
- [7] 贾之慎, 邬建敏, 唐孟成. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 184
- [8] 李贵荣,杨胜圆. 党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 化学世界,2001,42(8):21-22
- [9] 曾小玲. 马齿苋水提物对氧自由基清除作用的研究 [J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(2): 133-135
- [10] Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radicals in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J]. Eur J Biochem, 1974, 47: 469.
- [11] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法 邻苯 三酚自氧化法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进, 1986, 15(4): 71-73
- [12] 静天玉, 赵晓瑜. 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 84-86
- [13] 向 荣, 王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(3): 24-242
- [14] 李贵荣. 枸杞多糖的提取及其对活性氧自由基的清楚作用[J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(2): 94-96
- [15] 李明明, 吴丽颖, 朱玲玲, 等. 当归有效成分抗缺氧损伤作用的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(1): 87-90
- [16] 王 萍, 葛丽花. 阿魏酸低聚糖的体外抗氧化性质的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 8-11.
- [17] 李贵荣, 吕昌银, 杨胜圆. 当归多糖清除活性氧自由基作用的研究[J]. 南华大学学报:理工版, 2002, 16(3): 18-20
- [18] 郁 洋. 当归的炮制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(6): 45-47.
- [19] 刘汉珍,夏咸水. 当归及其炮制品多糖含量的测定 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 393-394
- [20] 龙全江, 刘峰林, 袁 健, 等. 油当归炮制的初步研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2003, 20(1): 5+52
- [21] 龙全江. HPLC 法测定当归及油炒当归中阿魏酸的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(10): 36-37.
- [22] 宋金春, 胡传芹, 刘 红, 等. 炮制对当归药材有效成分的 影响[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(14): 1052-1054
- [23] 李明明, 赵 彤, 吴丽颖, 等. 当归注射液有效成分的抗低 氧保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2008, 24(2): 147-150