

红腺忍冬叶水提物抗氧化作用研究

李健¹, 朱英², 陈尔阳³, 杨道纳^{3*} (1.杭州第一技师学院, 杭州 310023; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053; 3.浙江省苍南县人民医院, 浙江 苍南 325800)

摘要: 目的 研究红腺忍冬叶水提物的抗氧化作用, 为红腺忍冬叶的开发利用奠定科学依据。方法 对红腺忍冬叶水提醇沉法分离所得各部分的样品进行体内、体外抗氧化研究。以 Vc、二丁基羟基甲苯(BHT)为对照品, 通过 DPPH 法和铁离子还原法考察红腺忍冬叶不同样品的体外抗氧化活性。以 Vc 为阳性对照, 由 D-半乳糖($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)致衰的小鼠为动物模型, 通过测定血清、肝脏组织中 SOD、GSH-PX 活性和丙二醛(MDA)含量, 考察样品的体内抗氧化活性。结果 红腺忍冬叶水提醇沉法分离所得各部分体外抗氧化活性, 在 $0.1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 90%乙醇直接沉淀物、30%乙醇沉淀物以及滤液部分具有较好的抑制 DPPH 自由基的活性和铁还原能力。体内 SOD 活性影响实验表明, 30%乙醇沉淀物高剂量组、90%乙醇直接沉淀物低剂量组对提高小鼠体内 SOD 活性均有良好的效果, 且都略优于 Vc, 但无显著性差异。体内 GSH-PX 活性影响实验表明, 30%乙醇沉淀物高剂量组、90%乙醇直接沉淀物高剂量组和 90%乙醇直接滤液低剂量组为佳。体内 MDA 含量影响实验表明, 30%乙醇沉淀物高、低剂量组和 30%乙醇滤液高剂量组以及 90%乙醇直接沉淀物低剂量组降低 MDA 含量的作用最为显著。结论 红腺忍冬叶水提液进一步醇沉分离所得各部分都具有不同程度的抗氧化效果, 综合考虑以 30%乙醇沉淀物活性最佳, 值得进一步研究。

关键词: 红腺忍冬叶; 水提醇沉法; 抗氧化; 自由基; DPPH; SOD; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛

中图分类号: R285.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)11-1382-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.007

Study on the Antioxidation of Water Extract from Leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq.

LI Jian¹, ZHU Ying², CHEN Eryang³, YANG Daona^{3*} (1.Hangzhou First Technician College, Hangzhou 310023, China; 2.Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 3.Cangnan People Hospital of Zhejiang Province, Cangnan 325800, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antioxidant effects of water extract from leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq. and provide a scientific basis for the development and utilization of the leaves. **METHODS** Study the antioxidant activities of the different ethanol sediments from water extract by the experiments *in vivo* and *in vitro*. Compared with Vc and BHT, the *in vitro* antioxidant activities were studied by DPPH radical scavenging and the reducing capacity of Fe^{3+} . Senile mouse models induced by D-galactose were used. Compared with Vc, the *in vivo* antioxidant activities of sediments were studied by measuring SOD, GSH-PX activity and MDA content of serum and liver tissue. **RESULTS** Experiments *in vitro* ($0.1\sim 5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$): DPPH radical scavenging experiments; the 90% and the 30% ethanol precipitation and the filtrates were better than the others. The reducing capacity of Fe^{3+} : the 90% and the 30% ethanol precipitation and the filtrates had better effect than the other various precipitations. Experiments *in vivo*, the comprehensive results of SOD: the 30% precipitation(high dose group) and the 90% precipitation(low dose group) had the more excellent performance than Vc. Comprehensive GSH-PX activity results: the 30% precipitation(high dose group), the 90% precipitation(high dose group) and the 90% filtrate (low dose group) had good activities than the other groups. Comprehensive MDA activity results: 30% precipitation(both the high and low dose group), 30% filtrate(high dose group) and 90% precipitation (low dose group) were better than the others. **CONCLUSION** The various eparation components all have good antioxidant activities both *in vitro* and *in vivo*. Considering the indicators both *in vitro* and *in vivo*, the 30% achol precipitation is the best and it's antioxidant activity is worthy of further research.

KEY WORDS: leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq.; water-extracting and alcohol-precipitating method; antioxidant; free radical; DPPH; SOD; GSH-PX; MDA

红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq.是中国药典 2010 年和 2015 年版一部中山银花的收载品种,

有清热解毒、凉散风热之功效, 用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等^[1-2]。

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2012ZA119)

作者简介: 李健, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0571)88909132

E-mail: lijian871231@sina.com

*通信作者: 杨道纳, 男, 主任药师

Tel:

(0577)64767302 E-mail: ydndn@163.com

药用部位为干燥花蕾或带初开的花。作为其副产品的叶子,其产量往往数倍于花蕾,却在药材的采集过程中当作废品抛弃,造成了药用资源的极大浪费。浙江省作为红腺忍冬的产区之一,针对浙产红腺忍冬叶的药理活性研究^[3-4]已经有所起步,本实验室前期研究发现红腺忍冬叶的提取物具有较好的抗氧化作用^[5],且水提物的作用优于醇提物,对丙二醛(malondialdehyde,MDA)的清除效果和提高谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase,GSH-PX)活性等体内抗氧化指标方面表现与Vc无显著性差异,或略优于Vc,可见其抗氧化潜力值得进一步挖掘。本研究对红腺忍冬叶水提液进行进一步地醇沉分离,所得各部分样品进行体内、外抗氧化实验研究,以期进一步确定红腺忍冬叶抗氧化活性的有效部位。

1 材料与设备

1.1 材料与试剂

红腺忍冬叶采集于浙江省温州市,经浙江中医药大学药用植物教研室陈锡林副教授鉴定为忍冬科植物红腺忍冬(*Lonicera hypoglauca* Miq.)的叶子;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,日本WAKO公司);Vc(东北制药厂,批号:20080952,规格:每片1mg);二丁基羟甲基苯(BHT)、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、冰醋酸、无水乙醇均为分析纯;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、GSH-Px、考马斯亮蓝试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供;D-半乳糖(上海化学试剂二厂)。

1.2 仪器

UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津);HH-S 型恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);BS224S 电子天平(德国赛多利斯);L-210 型漩涡混合器(北京来亨科贸有限责任公司);Power Wave 340 型酶标仪(美国Bio-TEK公司);Biofuge Stratos 全能台式高速冷冻离心机;XHF-D 高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 动物

132 只 ICR 小鼠,SPF 级,♂,体质量为(20±2)g,来自中国科学院上海实验动物中心,生产许可证:SCXK(沪)2008-0007。小鼠饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心 SPF 级小鼠饲养室:温度为(22±1)℃,湿度为 50%~70%,光照为 150~200 Lx,12 h 明暗交替,噪音<50 dB。

2 方法

2.1 供试液和对照品溶液的制备

2.1.1 水提液的制备 称取干燥红腺忍冬叶粗粉 5.0 g,用 12 倍量的水煎煮 2 次,每次 2 h,合并提取液,用时稀释到 5,2,1,0.5,0.2,0.1 mg·mL⁻¹。

2.1.2 Vc 对照品溶液的制备 将 Vc 片剂 100 mg,用蒸馏水溶解,分别配成 5,2,1,0.5,0.2,0.1 mg·mL⁻¹ 的系列 Vc 对照品溶液。

2.1.3 BHT 对照品溶液的制备 称取 BHT 粉末 200 mg,用 95%乙醇溶解,分别配成 5,2,1,0.5,0.2,0.1 mg·mL⁻¹ 的系列 BHT 乙醇对照品溶液。

2.1.4 水提醇沉法分离所得各部分供试品(体外部分)的制备 按“2.1.1”项下方法制作水提液两等份,其中一等份,加无水乙醇适量至溶液含醇度为 90%,加醇时不断用玻璃棒搅拌,以避免局部醇浓度过高。静置 2 h,减压抽滤,分离滤液和沉淀,得 90%乙醇直接沉淀物和滤液。

取另一等份水提液,加无水乙醇适量,至溶液含醇度为 30%,加醇时不断搅拌。静置 2 h,减压抽滤,得 30%乙醇沉淀物;以此类推,滤液中继续加入无水乙醇依次得到 50%乙醇沉淀物、70%乙醇沉淀物、90%乙醇分段沉淀物及其滤液。

沉淀物低温干燥,滤液回收溶剂至浸膏,各自用蒸馏水溶解,用时均配置成 5,2,1,0.5,0.2,0.1 mg·mL⁻¹。

2.1.5 水提醇沉法分离所得各部分供试品(体内部分)的制备 按“2.1.4”项下方法,制备 90%乙醇直接沉淀物和沉淀后滤液;30%乙醇沉淀物,其滤液不再继续分离,而是直接回收乙醇至浸膏后用蒸馏水溶解,得到相应浓度的 30%乙醇沉淀后滤液。

2.2 体外抗氧化实验

2.2.1 对 DPPH 自由基的抑制作用 准确称取 20 mg DPPH 用 50%乙醇溶解并定容于 250 mL 量瓶中,DPPH 浓度为 2×10^{-4} mol·L⁻¹,取等体积待测液及 2×10^{-4} mol·L⁻¹ DPPH 溶液加入同一具塞试管中,摇匀。30 min 后用 50%乙醇做参比在 525 nm 下测定其吸光度 A_i ,同时测定 2×10^{-4} mol·L⁻¹ DPPH 溶液与等体积 50%乙醇混合液的吸光度 A_c ,以及待测液与等体积 95%乙醇混合液的吸光度 A_j 。根据下列公式计算清除率:清除率=[1-(A_i-A_j)/ A_c]×100%^[6-8]。

2.2.2 对 Fe³⁺的还原作用 物质的还原能力是其潜在抗氧化能力的一个重要体现。取 2.5 mL 的不

同样品溶液, 加入 2.5 mL 的磷酸盐缓冲液 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=6.6$)及 2.5 mL 的 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 于 50°C 水浴反应 20 min 后急速冷却, 加入 2.5 mL 的 10%三氯乙酸溶液, 取反应液 5 mL, 加入 5 mL 的 H_2O 和 0.1% FeCl_3 溶液 1 mL, 混合均匀, 10 min 后于 700 nm 处测定其吸光度值, 以水为空白, 吸光度值越大表示还原能力越强。以上实验均以 Vc 和 BHT 作阳性对照^[5,9]。

2.3 体内抗氧化实验^[4]

2.3.1 动物分组 选取 132 只小鼠, 随机分成 11 组, 每组 12 只。各组分别为正常对照组、模型组、30%乙醇沉淀物的高、低剂量组($8, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、30%乙醇滤液的高、低剂量组($8, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、90%乙醇直接沉淀物的高、低剂量组($8, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、90%乙醇直接滤液的高、低剂量组($8, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 各剂量组均为生药含量, Vc 阳性对照组($0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。小鼠分组适应 5 d 后, 各给药组分别灌胃给药 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$, 每天 1 次, 正常对照组给予同剂量的饮用水, 给药期间, 每周称量小鼠体质量, 并根据体质量变化确定给药量。除正常对照组以外各组, 每天于颈背部皮下注射 *D*-半乳糖 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [10%的 *D*-半乳糖 $0.1 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$], 正常对照组注射等量生理盐水。自由饮水, 自由摄食。持续 42 d^[4], 最后一次给药后禁食 12 h, 但可自由饮水。眼眶取血, 分离血清。取肝脏, 分析肝脏组织和血清中 SOD, GSH-PX(谷胱甘肽过氧化物酶)的活性和 MDA 的含量。

2.3.2 SOD、GSH-PX 活性、MDA 含量的测定 按

照试剂盒说明书测定。

2.4 数据处理

所有数据采用 EXCEL 2003 软件统计分析, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验分析各组间均数差异的显著性。

3 结果

3.1 体外抗氧化实验

3.1.1 对 DPPH 自由基的抑制作用 水提醇沉法分离所得各部分对 DPPH 自由基的抑制率试验中, 除 50%乙醇的沉淀物在低浓度时($0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)抑制率呈下降状态, 高浓度时($1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)抑制率随浓度的上升而呈增长趋势, 其余各组分均始终保持正的量效关系。

水提液的抑制率要大于其中分离出的任一组分, 但小于各组分之和。分离出的各组分之间, 以 90%乙醇直接沉淀物的抑制率为最佳, 其次为 2 种滤液, 在高浓度时($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)90%乙醇直接沉淀物、90%乙醇分段滤液的抑制率已高于常用抗氧化剂 Vc, 略低于 BHT。实验结果表明, 90%乙醇直接沉淀物、30%乙醇沉淀物以及滤液部分均具有较好的抑制 DPPH 自由基活性, 可以考虑进一步体内活性实验。结果见表 1。

3.1.2 对 Fe^{3+} 的还原作用 红腺忍冬叶水提醇沉法分离所得各部分对 Fe^{3+} 的还原作用均随浓度的增大而增大, 呈明显正量效关系。

水煎液的还原能力大于从中分离出的任一组分, 但小于各组分之和。在低浓度时($0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 各组分的还原能力相当, 在浓

表 1 不同分离组分对 DPPH 自由基的抑制率($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Inhibition ratio of the eparation components from the water extract on DPPH radical($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	抑制率/%					
	$0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
水提液组	$47.6 \pm 0.70^{13)}$	$56.4 \pm 1.09^{13)}$	$65.0 \pm 2.21^{1)}$	$65.9 \pm 3.00^{1)}$	$68.3 \pm 2.47^{12)}$	$67.8 \pm 2.58^{13)}$
90%乙醇直接沉淀物组	$38.2 \pm 0.17^{13)}$	$46.1 \pm 2.29^{13)}$	$51.6 \pm 0.68^{13)}$	$57.5 \pm 0.43^{13)}$	$60.8 \pm 1.06^{1)}$	$66.7 \pm 0.60^{12)}$
30%乙醇沉淀物组	$38.2 \pm 1.43^{13)}$	$35.9 \pm 0.79^{13)}$	$52.0 \pm 6.02^{12)}$	$57.3 \pm 0.45^{13)}$	$59.5 \pm 1.09^{1)}$	$57.5 \pm 0.42^{12)}$
50%乙醇沉淀物组	$49.9 \pm 2.09^{13)}$	$42.4 \pm 2.46^{13)}$	$37.9 \pm 1.62^{13)}$	$42.3 \pm 2.14^{13)}$	$55.9 \pm 2.66^{13)}$	$60.8 \pm 0.57^{1)}$
70%乙醇沉淀物组	$17.3 \pm 1.34^{13)}$	$19.1 \pm 0.88^{13)}$	$27.7 \pm 2.12^{13)}$	$34.1 \pm 0.46^{13)}$	$44.8 \pm 0.78^{13)}$	$50.5 \pm 3.59^{13)}$
90%乙醇分段沉淀物组	$26.2 \pm 1.42^{13)}$	$24.3 \pm 1.18^{13)}$	$32.3 \pm 1.01^{13)}$	$43.8 \pm 1.87^{13)}$	$51.9 \pm 1.37^{13)}$	$58.5 \pm 0.60^{12)}$
90%乙醇直接滤液组	$27.0 \pm 1.92^{13)}$	$34.1 \pm 0.88^{13)}$	$46.1 \pm 0.80^{13)}$	$50.8 \pm 0.50^{13)}$	$52.1 \pm 1.03^{13)}$	$58.4 \pm 1.3^{12)}$
90%乙醇分段滤液组	$24.7 \pm 3.58^{13)}$	$38.7 \pm 0.83^{13)}$	$42.5 \pm 2.75^{13)}$	$56.3 \pm 6.70^{1)}$	$62.9 \pm 0.73^{1)}$	$66.8 \pm 1.52^{12)}$
Vc 组	64.5 ± 2.62	63.8 ± 1.36	63.9 ± 0.90	63.8 ± 1.41	63.0 ± 3.34	62.2 ± 2.56
BHT 组	74.2 ± 2.13	81.2 ± 1.26	80.1 ± 1.09	80.8 ± 1.78	81.8 ± 2.04	79.7 ± 0.67

注: 与 BHT 组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 Vc 组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with BHT group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with Vc group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

度增大后(0.5~5 mg·mL⁻¹), 呈现明显的高低层次: 90%乙醇直接沉淀物>90%乙醇直接滤液>90%乙醇分段滤液>30%乙醇沉淀物>70%乙醇沉淀物≈90%乙醇分段沉淀物>50%乙醇沉淀物。由于试药组中药液浓度均为生药含量, 所以与纯品的阳性

对照药相比, 还原能力存在显著性差异, 但其还原能力是随浓度增加而递增, 结果见表 2。结果表明 90%乙醇直接沉淀物、30%乙醇沉淀物和滤液部分还原能力较好, 可以考虑进一步体内实验研究。

表 2 不同分离组分对 Fe³⁺ 的还原作用(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of the eparation components from the water extract on Fe³⁺ reduction(n=5, $\bar{x} \pm s$)

组 别	吸光度					
	0.1 mg·mL ⁻¹	0.2 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹	1 mg·mL ⁻¹	2 mg·mL ⁻¹	5 mg·mL ⁻¹
水提液组	0.03±0.002 ¹⁾²⁾	0.09±0.008 ¹⁾²⁾	0.24±0.02 ¹⁾²⁾	0.41±0.02 ¹⁾²⁾	0.93±0.54 ¹⁾²⁾	1.42±0.12 ¹⁾²⁾
90%乙醇直接沉淀物组	0.05±0.008 ¹⁾²⁾	0.07±0.003 ¹⁾²⁾	0.13±0.011 ¹⁾²⁾	0.27±0.007 ¹⁾	0.41±0.046	0.80±0.132
30%乙醇沉淀物组	0.02±0.001 ¹⁾²⁾	0.02±0.001 ¹⁾²⁾	0.05±0.005 ¹⁾²⁾	0.14±0.038 ¹⁾	0.20±0.017	0.43±0.022
50%乙醇沉淀物组	0.02±0.005 ¹⁾²⁾	0.02±0.003 ¹⁾²⁾	0.02±0.003 ¹⁾²⁾	0.03±0.005 ¹⁾	0.04±0.004	0.14±0.009
70%乙醇沉淀物组	0.06±0.007 ¹⁾²⁾	0.07±0.021 ¹⁾²⁾	0.07±0.011 ¹⁾²⁾	0.08±0.007 ¹⁾	0.13±0.013	0.22±0.057
90%乙醇分段沉淀物组	0.02±0.001 ¹⁾²⁾	0.02±0.002 ¹⁾²⁾	0.03±0.003 ¹⁾²⁾	0.06±0.004 ¹⁾	0.12±0.008	0.24±0.016
90%乙醇直接滤液组	0.05±0.013 ¹⁾²⁾	0.06±0.005 ¹⁾²⁾	0.12±0.004 ¹⁾²⁾	0.23±0.011 ¹⁾	0.38±0.034	0.64±0.060
90%乙醇分段滤液组	0.02±0.001 ¹⁾²⁾	0.04±0.006 ¹⁾²⁾	0.09±0.005 ¹⁾²⁾	0.18±0.017 ¹⁾	0.32±0.165	0.53±0.066
Vc 组	1.37±0.165	3.72±0.148	4.31±0.407	—	—	—
BHT 组	0.96±0.030	1.68±0.075	2.66±0.292	4.33±0.056	—	—

注: 与 BHT 组比较, ¹⁾P<0.01; 与 Vc 组比较, ²⁾P<0.01。

Note: Compared with BHT group, ¹⁾P<0.01; compared with Vc group, ²⁾P<0.01。

3.2 体内抗氧化实验

3.2.1 对小鼠体内 SOD 活性影响 30%乙醇沉淀物高剂量组、90%乙醇直接沉淀物低剂量组对提高小鼠体内 SOD 活性均有良好的效果, 略优于阳性对照药 Vc, 但无显著性差异。结果见表 3。

3.2.2 对小鼠体内 GSH-PX 活性影响 30%乙醇沉淀物高剂量、90%乙醇直接沉淀物高剂量和 90%乙醇直接滤液低剂量为佳, 与阳性对照药 Vc 相比, 在血清中, 3 组样品效果均极显著高于 Vc 组(P<0.01); 在肝脏中, 90%乙醇直接滤液低剂量和 Vc 无显著性差别, 30%乙醇沉淀物高剂量组和 90%乙醇直接沉淀物高剂量组效果均显著优于 Vc(P<0.05)。结果见表 4。

3.2.3 对小鼠体内 MDA 含量的影响 30%乙醇沉淀物高、低剂量和 30%乙醇滤液高剂量以及 90%乙醇直接沉淀物低剂量降低 MDA 含量的作用最为显著, 其中 30%乙醇沉淀物低剂量组的血清 MDA 含量与 Vc 组无显著性差异; 30%乙醇滤液高剂量组的肝脏 MDA 含量显著低于 Vc 组(P<0.05), 90%乙醇直接沉淀物低剂量组极显著优于 Vc(P<0.01)。结果见表 5。

表 3 红腺忍冬叶水提醇沉各分离部分对 SOD 活性的影响(n=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of the eparation components from the water extract on SOD activity(n=12, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	SOD 活性	
		血清/U·mL ⁻¹	肝脏 /U·mg ⁻¹ prot
正常对照组	—	119.8±5.46	125.2±14.8
模型组	—	112.7±7.40 ¹⁾	111.9±14.8 ¹⁾
Vc 组	0.05	124.2±4.87 ⁴⁾	124.4±12.4 ³⁾
90%乙醇直接沉淀物			
低剂量组	4	129.7±23.7 ³⁾	122.1±6.0 ⁴⁾
高剂量组	8	101.7±25.4	113.3±21.2
90%乙醇直接滤液			
低剂量组	4	122.1±8.57 ⁴⁾	99.57±17.3
高剂量组	8	127.5±7.57 ⁴⁾²⁾	123.0±46.5
30%乙醇沉淀物			
低剂量组	4	116.9±4.02	112.5±16.7
高剂量组	8	127.9±6.00 ²⁾⁴⁾	150.2±29.9 ¹⁾⁴⁾
30%乙醇滤液			
低剂量组	4	122.8±15.2	119.4±20.6
高剂量组	8	124.4±5.97 ⁴⁾	102.0±17.0

注: 与正常对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; 与模型组比较, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with normal group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

表 4 红腺忍冬叶水提醇沉各分离部分对 GSH-PX 活力的影响($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of the eparation components from the water extract on GSH-PX activity($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	GSH-PX 活力	
		血清/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	肝脏/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$
正常对照组	—	$658.3 \pm 43.9^{4)6)}$	$489.0 \pm 88.90^{4)}$
模型组	—	$567.8 \pm 51.9^{2)5)}$	$386.3 \pm 61.8^{2)5)}$
Vc 组	0.05	$604.4 \pm 29.4^{2)3)}$	$448.1 \pm 76.94^{3)}$
90%乙醇直接沉淀物			
低剂量组	4	$723.1 \pm 59.1^{2)4)6)}$	432.0 ± 59.6
高剂量组	8	$803.0 \pm 49.3^{2)4)6)}$	$523.6 \pm 90.5^{4)5)}$
90%乙醇直接滤液			
低剂量组	4	$753.0 \pm 43.1^{2)4)6)}$	$437.0 \pm 54.8^{3)}$
高剂量组	8	$730.8 \pm 76.8^{1)4)6)}$	$393.2 \pm 82.9^{1)}$
30%乙醇沉淀物			
低剂量组	4	$498.9 \pm 49.4^{2)4)6)}$	$449.2 \pm 80.8^{3)}$
高剂量组	8	$701.1 \pm 68.9^{4)6)}$	$523.2 \pm 76.5^{4)5)}$
30%乙醇滤液			
低剂量组	4	$449.2 \pm 53.4^{2)4)6)}$	$587.8 \pm 89.9^{1)4)6)}$
高剂量组	8	621.1 ± 80.6	$415.7 \pm 72.4^{1)}$

注: 与正常对照组比较, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; 与模型组比较, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$; 与 Vc 组比较, $^{5)}P<0.05$, $^{6)}P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with model group, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$; compared with Vc group, $^{5)}P<0.05$, $^{6)}P<0.01$.

表 5 红腺忍冬叶水提醇沉各分离部分对 MDA 含量的影响($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of the eparation components from the water extract on MDA content($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	MDA 含量	
		血清/ $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$	肝脏/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$
正常对照组	—	$6.384 \pm 0.86^{4)}$	$11.71 \pm 1.64^{3)}$
模型组	—	$7.632 \pm 0.92^{2)6)}$	$14.75 \pm 4.49^{1)5)}$
Vc 组	0.05	$6.020 \pm 0.57^{4)}$	$11.17 \pm 1.92^{3)}$
90%乙醇直接沉淀物			
低剂量组	4	$6.582 \pm 0.56^{4)5)}$	$8.465 \pm 1.43^{2)4)6)}$
高剂量组	8	$8.688 \pm 1.11^{2)3)6)}$	$17.70 \pm 6.18^{2)6)}$
90%乙醇直接滤液			
低剂量组	4	$9.955 \pm 2.66^{2)4)6)}$	11.40 ± 4.76
高剂量组	8	$7.514 \pm 0.69^{2)6)}$	12.44 ± 5.90
30%乙醇沉淀物			
低剂量组	4	$5.897 \pm 0.85^{4)}$	$10.54 \pm 2.12^{4)}$
高剂量组	8	$6.604 \pm 0.97^{4)5)}$	$11.45 \pm 0.91^{3)}$
30%乙醇滤液			
低剂量组	4	$6.149 \pm 0.67^{4)}$	11.31 ± 3.65
高剂量组	8	$6.603 \pm 1.04^{3)}$	$9.397 \pm 1.26^{2)4)5)}$

注: 与正常对照组比较, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; 与模型组比较, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$; 与 Vc 组比较, $^{5)}P<0.05$, $^{6)}P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$; compared with model group, $^{3)}P<0.05$, $^{4)}P<0.01$; compared with Vc group, $^{5)}P<0.05$, $^{6)}P<0.01$.

4 讨论

4.1 体内抗氧化实验

在 DPPH 实验中同时考察水提液, 和水溶醇沉所得各部分的自由基抑制活性, 发现水提液的活性明显大于各分离部分, 但小于各部分之和, 说明红腺忍冬水提液中可能同时存在抗氧化活性促进剂, 抗氧化活性抑制剂, 具体的成分和含量差别对总提取液的活性影响还有待于进一步的细分研究。

90%乙醇直接沉淀物的活性大于 90%乙醇分段沉淀物组, 但小于各级沉淀活性的总和, 此结果与实验预期相同, 原因可能为直接以高浓度的醇沉淀水溶液时, 也会经历过一个短暂的浓度逐渐增高的过程, 所以, 所含成分应多于从 70%沉淀的滤液中分离出的沉淀物, 但这个过程又是短暂的, 不及逐级沉淀时每步沉淀都相对完全, 所以其成分也远不如逐级沉淀时, 各沉淀的总和。但在滤液部分, 在浓度增大到一定程度($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)后, 却是 90%乙醇分段滤液的活性大于 90%乙醇直接滤液, 这和成分的多少应该是相反的, 究其原因, 结合忍冬中存在激活活性自由基的成分的相关报道^[10], 推测可能在极性相对较小的滤液中, 同时存在着增强自由基和抑制自由基的化学成分, 不同的醇沉操作使两种化学成分的相对含量发生改变, 从而使整体体现的自由基抑制率出现偏差。此推测有待于进一步的研究。

体外两个实验都表明 90%乙醇直接沉淀物>90%乙醇直接、分段滤液>各分段沉淀, 按照一般水提醇沉操作分析, 沉淀部分多为蛋白质和多糖类物质; 结合红腺忍冬药材中化学成分考虑, 滤液部分可能为黄酮苷、绿原酸类等酚酸类物质。目前国内外对天然抗氧化产物的研究中, 多糖类, 酚酸类具有抗氧化活性的报道也屡见报道^[11-12], 因此猜测沉淀和滤液中都可能存在不同类的抗氧化成分, 使其具有不同程度的抗氧化效果。

在考察浓度范围内($0.1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)红腺忍冬叶水提醇沉部分的体外活性以 90%乙醇直接沉淀物、90%乙醇直接、分段滤液以及 30%乙醇沉淀物的活性为佳, 且在自由基清除效果和 Fe^{3+} 还原能力上都是随着浓度上升, 活性呈不同程度的上升趋势。鉴于此, 体内试验选择 90%乙醇直接水溶醇沉所得滤液和沉淀部分, 30%乙醇水溶醇沉所得滤液和沉淀部分做给药组, 进一步考察红腺忍冬

叶提取液的体内抗氧化活性。

4.2 体内抗氧化实验

纵观 3 个指标的显示结果,红腺忍冬叶水提醇沉分离后所得各部分中,多个部分均具有较好的活性效果,但大多为沉淀的活性较高,且 30% 沉淀高剂量组的每个指标效果都较好,说明提取物中不同极性部位均具有一定的抗氧化活性,但以其中极性较大的部位的活性更为显著。参考对金银花多糖的相关研究^[13],推测此部分的主要活性成分可能为多糖部分。后期可以对山银花叶的水提物和 30%醇沉沉淀中的多糖进行相关测定和比较,以进一步明晰其抗氧化作用的有效成分。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 28-29.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 30-31.
- [3] ZHU Y, XU Z L. Studies on correlation between bacteriostasis and total flavonoids, chlorogenic acid content in leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq. [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2014, 21(1): 39-41.
- [4] 朱英, 李姗姗. 红腺忍冬叶抗炎解热作用的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2014, 31(3): 12-17.
- [5] ZHU Y, LI J. Experimental study of antioxidant effect on leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq. [J]. J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报), 2012, 36(10): 1117-1122.
- [6] ZHAO D B, LIU X H, WANG H Q. Scavenging activity of *Dioscorea oppositifolia* to DPPH free radicals [J]. Nat Prod Res Dev, 2005, 17: 272-274.
- [7] MAU J L, TSAI S Y, TSENG Y H, et al. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill [J]. Food Sci Tech/LWT, 2005(38): 589-597.
- [8] SUJA K P, JAYALEKSHMY A, ARUMUGHAN C. Antioxidant activity of sesame cake extract [J]. Food Chem, 2005(91): 213-219.
- [9] ZOVKO KONCIC M, KREMER D, GRUZ J, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tart.) Griseb. flower, leaf and stem infusions [J]. Food Chem. Toxicol, 2010, 48(6): 1537-1542.
- [10] MITSUYOSHI M, NAKO S, KOTARO S, et al. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells [J]. Bio Pharm Bull, 2005, 28(2): 253.
- [11] 曾伟成, 蔡钦榕, 杨辉, 等. 虎杖鞣质抗脂质过氧化作用研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(6): 18-19.
- [12] ZHANG X, XU J K, WANG N L, et al. Studies on antioxidant activity of bibenzyls and phenolic components from *Dendrobium nobile* [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2008, 43(11): 829-832.
- [13] 李尔春. 金银花多糖的分离纯化与生物活性研究[D]. 陕西师范大学, 2008.

收稿日期: 2016-06-17

N-乙酰半胱氨酸活性炭缓释微囊对大鼠肝纤维化中细胞内成纤维信号分子表达的影响

缪樑斌^{1,2}, 包剑锋², 刘寿荣², 方红英², 杨宗信², 黄从想², 潘熠健², 高建青^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 浙江中医药大学附属杭州西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究口服 N-乙酰半胱氨酸活性炭缓释微囊(N-acetylcysteine activated carbon microcapsules, ACNAC)在大鼠肝纤维化治疗中肝细胞内成纤维信号分子表达的影响。方法 以明胶包裹吸附 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)的载药活性炭制备得到 ACNAC, 以四氯化碳(CCl₄)制备大鼠肝纤维化模型, ACNAC 高、中、低剂量组(80, 40, 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 按照 N-乙酰半胱氨酸计算)进行灌胃给药, NAC、水飞蓟宾为阳性对照药物。治疗 8 周后处死大鼠, 通过大鼠肝功能指标、病理切片、免疫组织化学法评价 ACNAC 对胞内信号分子表达中的影响。结果 CCl₄ 大鼠肝纤维化模型制备成功, 其大鼠肝组织病理切片 HE 染色和网状纤维染色表明其肝纤维化程度为 III~IV 期, 免疫组化显示胞内 TGF-β₁/Tβ-R₁ 和 Smad2/3 大量表达。ACNAC、NAC 和 SM 对肝纤维化大鼠血清 ALT、AST 及 Tbil 有显著的治疗作用, ACNAC 高剂量组效果明显优于 NAC 和 SM (P<0.05)。ACNAC 各治疗组大鼠肝组织病理切片表明肝纤维化好转, 免疫组化显示胞内 TGF-β₁/Tβ-R₁ 和 Smad2/3 表达减少, ACNAC 高剂量组表达具显著性差异(P<0.05)。结论 ACNAC 对大鼠肝纤维化胞内成纤维信号分子 TGF-β₁/Tβ-R₁ 和 Smad2/3 有明显抑制作用, 对抗大鼠肝纤维化的疗效明显, 且较等剂量的 NAC 及对照药物水飞蓟宾有更显著的疗效。

关键词: N-乙酰半胱氨酸活性炭缓释微囊; 肝纤维化; 成纤维信号分子

基金项目: 浙江省科技计划项目(2013C33094); 杭州市医药卫生科技计划项目(2011A043)

作者简介: 缪樑斌, 硕士生, 中药师 Tel: 13588743818 E-mail: alex_x2@163.com *通信作者: 高建青, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)88208437 E-mail: gaojianqing@zju.edu.cn