

中药提取物在肝微粒体和相关 自由基模型中反应性的筛选

海春旭¹, 王文亮²

(1. 第四军医大学毒理学教研室, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学病理学教研室, 陕西 西安 710032)

【摘要】背景与目的: 检验“抗氧化剂复合链”假说指导筛选的复合抗氧化剂在大鼠肝微粒体自由基反应模型中的反应性。材料与
方法: 微粒体模型和动物模型和微粒体脂质过氧化活化体系包括: CCl_4 、 Vc/Fe^{++} 、CHP、耗氧量等模型以及相关自由基反应模型
包括羟胺竞争法发生超氧阴离子自由基和抗坏血酸/铜产生羟自由基等模型, 筛选和测定了中药的水和乙醇提取物的抗氧化活
性, 以及经过筛选组成的复合抗氧化剂对自由基的综合抑制效应。结果: 当归、人参、枸杞、黄芪、党参的水提取液在微粒体 CCl_4 、
 Vc/Fe^{++} 、CHP 激发模型及自由基模型中, 均呈现不同程度的脂质过氧化的抑制作用, 但是, 人参水提取液除了对 Vc/Fe^{++} 激发
模型的抑制作用较弱外, 均表现出较强的抗氧化作用; 枸杞、党参、黄芪水提取液除了对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 模型和枸杞乙
醇提取液对 CHP 模型呈现较强的过氧化刺激作用外, 各种乙醇提取液对 CCl_4 、 Vc/Fe^{++} 、CHP 和耗氧量激发模型均表现为不同程
度的抑制作用。复合抗氧化剂 - 安体欣对所选模型均呈现较强的自由基生成抑制作用。结论: 中药当归、人参、枸杞、黄芪、党参
的水或乙醇单独提取物的抗氧化作用存在局限性, 在不同模型系统中呈现不同的反应性 - 即抑制或刺激作用。经过按“抗氧化剂
复合链假说”筛选组成的复合抗氧化剂 - 安体欣对所选各种过氧化和自由基模型具有较强的抑制活性。

【关键词】微粒体模型; 抗氧化剂; 自由基

中图分类号: R151.41

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)05-0286-04

Study on the Reactivity of Slecting Chinese Hrbal Medicine Extracts in Hepatic Microsomal and Related Free Radical Models

HAI Chun-xu¹, WANG Wen-liang²

(1. Department of Toxicology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 7100 32, China; 2. Department of Pathology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To ascertain the reactivity of multi-antioxidants-ANTIOXIN selected and formed according to hypothesis “Multi-Antioxidant Chain” in hepatic microsomal and chemical modes of lipid peroxidation.
MATERIAL AND METHODS: Lipid peroxidation was stimulated by CCl_4 , Vc/Fe^{++} and cumene hydroperoxide(CHP) in hepatic microsomal models, and superoxide anion free radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$) were generated by assay of hydroxylamine competition and hydroxide free radicals ($\cdot\text{OH}$) generated by Vc/Cu^{++} in chemical models to determine reactivity of the antioxidants. The antioxidative activity of water- or/ and ethanol-extracts, and multi-antioxidants were determined and selected by those models. **RESULTS:** The water-extracts of Chinese angelicae, Ginseng, Wolfberry fruit, Astragalus and Dangshen presented different inhibition on lipid peroxidation of microsomal models stimulated by CCl_4 , Vc/Fe^{++} , CHP and free radical models. The all water-extracts, except that of Ginseng presented weak inhibition on model generated by Vc/Fe^{++} and that of Wolfberry fruit presented strongly stimulation on model generated by CHP, showed potent antioxidation in various models of lipid peroxidation and free radical. The extracts of herbal medicine showed inhibition on models of lipid peroxidation stimulated by CCl_4 , Vc/Fe^{++} , CHP and model of oxygen uptake in dissimilar extent. The multi-antioxidants-ANTIOXIN came strongly forth inhibition on production of free

收稿日期: 2004-02-12; 修订日期: 2004-03-16

作者简介: 海春旭(1955-), 男, 回族, 辽宁省锦州市人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 自由基与分子毒理。

Tel: 029-83374879, Cx-hai@fmmu.edu.cn

radicals in all models-selected. **CONCLUSION:** There were definite astriction of water-extracts or ethanol-extracts of Chinese angelicae, Ginseng, Wolfberry fruit, Astragalus and Dangshen used individually in antioxidation and scavenging free radical, and they showed distinct reactivity that was inhibition or stimulation on different model system. Those multi-antioxidants -ANTIOXIN selected and formed according to hypothesis-" Multi-Antioxidant Chain" had strong activity of antioxidation and inhibition on free radical in hepatic microsomal and chemical modes of lipid peroxidation. **【KEY WORDS】** microsomal model; antioxidant; free radical

研制高效复合自由基清除剂,清除体内过剩或有害的自由基,一直是国内外许多实验室所追求的目标^[1-4]。在国内外的文献报道中,确有许多实验室报告发现一些抗氧化剂,但能够用到人体并且有效者甚少,其原因主要与下列因素有关:①缺乏合适的代表生物反应性的筛选模型;②进入体内的单一种类的自由基清除剂,不能有效抑制各具特性的多种自由基活性;③自由基反应的“链式”多形态性,限制了单一自由基阻断作用的发挥。我们曾提出“抗氧化剂复合链”的假说^[5-6],在该假说指导下,用大鼠肝微粒体自由基反应模型,筛选测定了近百种单味中药提取物在不同的微粒体自由基模型中的反应性,最终研制成功在体内具有很高抗自由基活性的中药制剂安体欣,现将主要的筛选模型和部分中药提取物在该模型中反应性的测定结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 微粒体模型和动物模型

大鼠肝微粒体的制作^[7]:选用本校动物研究所提供的雄性SD大鼠,体重为200.2~219.5 g,经适应性喂养1周,宰杀前一天断饲断水后断颈处死、立即剖开腹腔、取出肝脏拭干血液,称重,于预冷($\approx 0\text{ }^{\circ}\text{C}$)的0.25 mol/L:10 mmol/L的Tris:HCl(pH 7.4)平衡缓冲液中剪碎后用少量该液洗3次,以肝脏重量的4倍数(ml)加入平衡缓冲液定容,冷冻备用。微粒体的提取为改良钙沉淀法,蛋白测定为Lowry氏法^[27]。

1.2 微粒体脂质过氧化活化体系

1.2.1 CCl_4 活化模型 反应液:90 ml的KCl(0.15 mol/L),60 ml Tris/HCl(40 mol/L,pH 7.4),9.0 ml H_2O ,255 mg 葡萄糖 6-磷酸(G-6-P),30 mg 氧化型辅酶II(NADP^+),1 000 mg 乙酰胺,60 μg 葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH,5 mg/ml),混匀置冰块上备用。取1.0 ml CCl_4 加到4.0 ml DMSO(二甲基亚砜)中避光保存,作为自由基促发剂(当日现配),代表有机物激发的酶参与性反应体系。

1.2.2 Vc/Fe^{++} 活化模型^[8] 反应液:60 ml KCl(0.15 mol/L),40 ml Tris/HCl(40 mmol/L,pH 7.4)。0.15 ml Vc/Fe^{++} (0.15 mol \cdot L⁻¹/0.5 mol \cdot L⁻¹)的

混合液作为自由基促发剂,代表无机物激发的非酶参与性反应体系。

1.2.3 Cumene Hydroperoxide(CHP,过氧基异丙苯)激发模型 反应液:60 ml KCl(0.15 mol/L),40 ml的Tris/HCl(40 mol/L,pH 7.4),代表有机物激发的非酶参与性反应体系。

在各自反应体系总容积为1.5 ml中,加入0.15 ml的微粒体匀浆液,中药提取液0.15 ml,反应15 min,终止反应,以硫代巴比妥酸反应物MDA(比色法)作为自由基作用强度指标。

1.2.4 耗氧量反应模型^[9] 在自制的耗氧量测定系统的反应池内加入下列反应成分:微粒体悬液(蛋白含量 $\approx 20\text{ mg/ml}$)0.1 ml,2.201 ml的缓冲液(Tris/HCl 0.1 mol/L,pH 7.4)和0.15 mol/L的比值为2:1,50 μl 的ADP/ Fe^{++} 混合液,25 μl 的NADPH溶液。表示整个微粒体体系中的有机物激发、并有酶参与的过氧化反应链中的脂质过氧化作用强度^[9]。

1.3 相关自由基反应模型

1.3.1 羟胺竞争法发生超氧阴离子自由基 反应液:① $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液(pH 10.2);②Triton X-100(0.6%);③NBT 0.98 mmol/L,盐酸羟胺15 mmol/L;④甲酸。取中药提取溶液0.2 ml,碳酸缓冲液2.0 ml,加Triton X-100 0.2 ml,加NBT 0.1 ml,再加入盐酸羟胺液0.6 ml充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中准确反应15 min,加入甲酸2.0 ml终止反应,并以不加细胞粉碎液(双蒸水代表之)作为非酶反应对照,590 nm比色定量。

1.3.2 抗坏血酸/铜产生羟自由基 反应成分如下: Vc 100 $\mu\text{mol/L}$, CuSO_4 100 $\mu\text{mol/L}$,水杨酸2 mmol/L,细胞色素C(II) 100 $\mu\text{mol/L}$,SOD 0.081 mg/ml,磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.4) 0.15 mol/L,反应体积为3 ml。加入一定量抗氧化剂,25 $^{\circ}\text{C}$ 温育90 min,颜色不变或变化很小,而不加抗氧化剂的对照组颜色由浅红变成浅黄,550 nm比色定量。

1.4 当归等中药提取液的制备 取当归、人参、枸杞、黄芪、党参分别按【中华人民共和国药典】2000年版(一部)药材标准,选取药材,经8倍量的70%乙醇提取1.5 h,药渣继续用8倍量的水煎煮1.5 h,浓

缩提取液,再经 60 ℃ ~ 80 ℃ 风干,分别按 1 g 生药材加 2 ml 的比例,加三蒸水稀释,低温保存,待测。

2 结果

2.1 中药水提取物在微粒体和相关脂质过氧化模型中的反应性测定

当归、人参、枸杞、黄芪、党参的水提取液在含微粒体的 CCl₄、V_C/Fe⁺⁺、CHP 激发模型和不含微粒体的羟自由基 (·OH) 模型中,均呈现不同程度脂质过氧化的抑制作用,其中人参水提取液除了对 V_C/Fe⁺⁺ 激发模型的抑制作用较弱外,均表现出较强的抗氧化作用;但是,枸杞、党参、黄芪水提取液对于超氧阴离子自由基 (O⁻) 模型和枸杞水提取液对摄氧量 (O₂ uptake) 模型均呈现较强的过氧化刺激作用,测定结果见图 1。

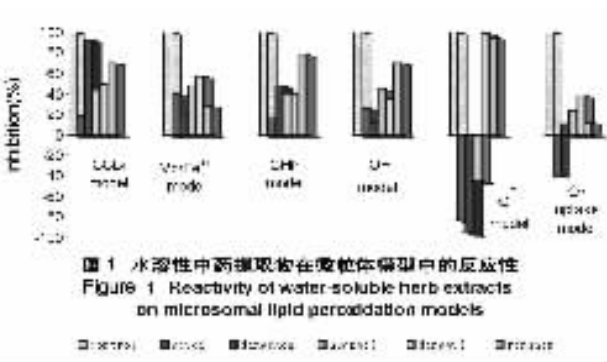


图 1 水溶性中药提取物在微粒体模型中的反应性
Figure 1 Reactivity of water-soluble herb extracts on microsomal lipid peroxidation models

2.2 中药醇提取物在微粒体和相关脂质过氧化模型中的反应性测定

黄芪醇提取液对 CCl₄、V_C/Fe⁺⁺、CHP、摄氧量激发模型,枸杞醇提取液对 CCl₄、V_C/Fe⁺⁺、摄氧量激发模型,当归、党参醇提取液在 CCl₄ 激发模型中和枸杞在 CHP 激发模型中的反应性,则表现为刺激脂质过氧化的不同程度的增强作用,测定结果见图 2。

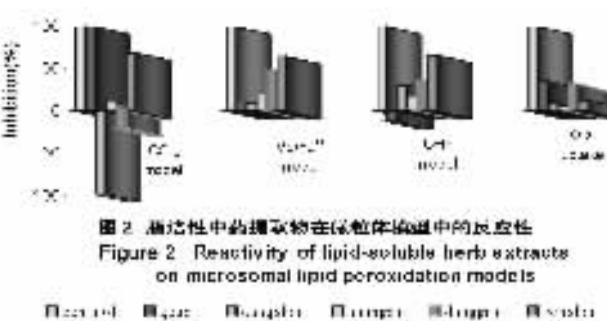


图 2 脂溶性中药提取物在微粒体模型中的反应性
Figure 2 Reactivity of lipid-soluble herb extracts on microsomal lipid peroxidation models

2.3 中药一安体欣在微粒体和相关脂质过氧化模型中的反应性测定

根据上述水、醇提取物在各种模型中的呈现抑制或刺激的不同活性,按照抑制活性互补和增强作用,按一定比例选取不同的提取液配制的新药 - 安体欣,分别测定了 CCl₄、V_C/Fe⁺⁺、CHP、摄氧量 (O₂

uptake) 激发模型和不含微粒体的羟自由基 (·OH)、超氧阴离子自由基 (O⁻) 模型中的反应性,结果表明,对各种模型均呈现较强的抗氧化抑制作用,结果见图 3。

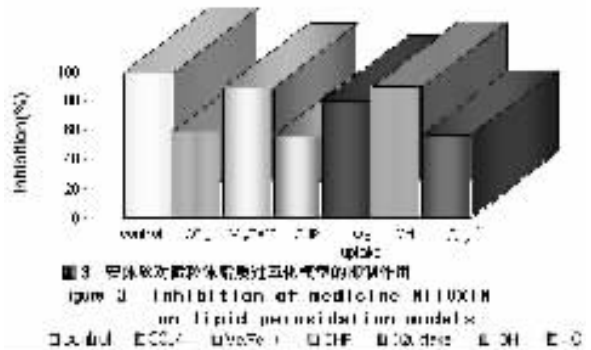


图 3 安体欣对微粒体脂质过氧化模型的抑制作用
Figure 3 Inhibition of medicine ANTI-OXID on lipid peroxidation models

3 讨论

大量研究表明,人参、当归、枸杞、党参和黄芪都含有抗氧化成分^[10-15],它们的许多治疗作用与其含有抗氧化成分有关。除了上述中药外,像茶多酚、维生素 E、黄酮类物质等,在实验室都有很好的抗氧化、清除自由基作用。尽管人们发现了许多抗氧化物质,但以单一成分组成的药物或功能性食品,在机体的整体水平很难看到令人鼓舞的治疗保健作用,当然,这可能与发挥功效启动较慢有关,但也无法否认单一成分作用的局限性,制约了功效发挥。有鉴于此,笔者曾根据自由基研究现状,提出了抗氧化剂复合链假说,认为在生物体内自由基反应与脂质过氧化损伤高度相关、连锁,单一的自由基清除剂或抗氧化剂作用有限,必须由具有不同脂/水溶性质、不同分子量、不同作用位点、不同存在部位、带有不同电荷组成的“复合自由基清除或抗氧化剂”的机体防御体系 - 可形像比喻为“抗氧化剂复合链”,才能达到高效清除自由基损伤作用,防止由于活性氧含量过高诱发各种疾病的发生、发展,才能维护机体在一定水平上的健康状态。

微粒体模型曾经是国际上研究自由基损伤机制常用模型,它能在一定程度上反映机体对于氧化损伤状态。本研究利用此模型筛选抗氧化剂,评价中药提取物在该模型系统中氧化与抗氧化的反应性,表现出很好的实用性,有利于抗氧化剂的筛选和抗氧化的理论研究,为中药的抗氧化研究提供了方便的研究手段,本课题组正是利用这些模型,研制具有很高疗效的治疗自由基损伤密切相关疾病黄褐斑的新药安体欣,提示这些模型系统具备很好的理论成熟性和操作的实用性。

抗氧化剂或自由基清除剂之间存在明显的协同增强作用,其主要机制包括:①化学传递作用,即在

体内生化反应中,自由电子的授予作用,比如, V_E 与 V_C 的相互作用就是在 V_E 清除自由基时接受 1 个电子,自身也变成带有自由基的分子团,若有 V_C 存在则可将游离电子转换给 V_C , V_E 就可继续发挥清除其它自由基作用。②功能替代作用,过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶都有催化无机过氧化氢分解成毫无毒性作用的水。③相互补充作用,比如, V_A 和 V_E 都是脂溶性物质,但 V_A 主要作用于 1O ,而 V_E 则主要作用于脂溶性自由基;再如,外源性 SOD 不容易进入细胞内,因而应用性受到限制,许多具有清除单线态氧的小分子抗氧化剂可弥补此项不足。④其它作用,比如二甲基亚砜(DMSO)自身有抗氧化作用,又有利于促进脂溶性抗氧化剂的溶解吸收等^[16,17]。

本研究结果表明,单一抗氧化成分在不同模型系统中多有不同的反应性,从而有利于解释单一抗氧化剂很难见到机体整体有效性的原因所在。

参考文献:

[1] Weitzman SA, Stossel TP. Effects of oxygen radical scavengers and antioxidants on phagocyte-induced mutagenesis [J]. *J Immunol*, 1982, 128: 2 770-2 772.

[2] Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury [J]. *Biochem J*, 1984, 222: 1-15.

[3] Slater TF. Free radicals, lipid peroxidation, and cancer. In: *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease* [M]. New York: Raven Press, 1984. 293-305.

[4] Larry W. Oberley and Terry D. Oberley: Free radicals, cancer, and aging in *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases* [Z] (Alan R. Liss, Inc). 1986. 325-371.

[5] 海春旭. 抗氧化剂协同作用与祛斑类中药研究 [R]. 生命科学和生物技术 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998.

324-327.

[6] 海春旭. 抗氧化剂、抗衰老与疾病控制的研究进展 [J]. 疾病控制杂志(博导专稿), 2002, 6(4): 289-293.

[7] Cheeseman KH. Studies on lipid peroxidation in normal and tumor tissues [J]. *Biochem J*, 1986, 235, 507-514.

[8] Hai CX, Slater TF. Interaction between ascorbate and TPGS in antioxidation of liver microsomal lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride. *Advances in Free Radical Biology and Medicine* [M] (Edited by Fang Y). Beijing: Atomic Energy press, 1991. 385-391.

[9] 海春旭. 微粒体 NADPH-ADP/ Fe^{3+} 体系中耗氧量电极法测定及铁、铜、锌对耗氧量的影响 [J]. 第四军医大学学报, 1992, 12(3): 222-223.

[10] 方芳, 陈晓春, 朱元贵. 抗氧化作用可能是人参皂甙 Rg1 抗细胞凋亡的机制 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2002, 7(5): 412-416.

[11] 王密, 许明荣, 杨柯, 等. 人参二醇组皂甙对游泳训练大鼠抗氧化效应及免疫调节的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2001, 18(4): 479-481.

[12] 阴宏, 李兰芳, 金亚宏, 等. 当归补血汤对小鼠巨噬细胞的活化作用的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(7): 24-27.

[13] 蒋锋. 中药抗氧化作用研究的现状与展望 [J]. 贵阳中医学院学报, 1998, 20(3): 51-53.

[14] 王洁, 沈泳, 苏利民, 等. 杞黄酮类化合物分离及抗氧化研究 [J]. 中国公共卫生, 1999, 9: 795-796.

[15] 韩春姬, 俞善姬, 金丽, 等. 轮叶党参对老年小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 延边大学医学学报, 1999, 22(1): 31-33.

[16] Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation *Chemistry and Physics of Lipids* 1987, 44, 227-253.

[17] Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury [J]. *Lab Invest*, 1982, 47: 412-426.

《癌变·畸变·突变》2005年征订启事

《癌变·畸变·突变》是中国科学技术协会主管、中国环境诱变剂学会主办、科学出版社出版的国家级学术期刊,由汕头大学医学院承办。系“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。设有“专家述评”、“论著”、“专题研究”、“肿瘤防治”、“检测研究”、“相关医学基础与临床”、“技术与方法”和“文献综述”等栏目。主要报道环境因子与肿瘤发生、胎儿畸形、基因突变的关系以及癌变机制、抗癌物与抗突变物开发利用、环境风险因子评价和其他医学基础与临床研究中的成果。读者对象为从事肿瘤学、遗传学、毒理学、药物学研究与肿瘤防治、环境保护、卫生防疫、计划生育、药品及生物制品研制的科技人员、高校师生与临床医生。根据中国学术期刊综合引证报告(2003版)本刊2002年度影响因子为0.4043。

本刊为双月刊,大16开。封面为200克进口铜版纸(单面覆膜),内页为105克进口铜版纸。2005年起增加彩色图版,内页由64页增加至80页。邮发代号:80-285,北京市报刊发行局发行。国外代号:6364(BM),中国国际图书贸易总公司发行。定价每期10.00元,全年订价:60元。可在当地邮局订阅,也可直接向编辑部订阅(免邮资费)。编辑部地址:广东省汕头市新陵路22号(汕头大学医学院内),邮编:515041。电话及传真:(0754)8900267。E-mail: cemsctm@stu.edu.cn