

红景天提取物 对微粒体 LPO 模型的影响

Effect of Rhodiola on the Peroxidative Damage Model in Microsomes

李嘉琳/海春旭*/梁欣/刘瑞/王鹏
(第四军医大学预防医学系毒理学教研室, 陕西
西安 710032)

LI Jia-lin, HAI Chun-xu*, LIANG Xin, LIU Rui, WANG Peng
(Department of Toxicology, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, Shaanxi, China)

【摘要】背景与目的: 探讨红景天醇提物和水提物的抗氧化作用及其剂量反应关系。材料与方法: 回流法和煎煮法分别制备红景天醇提物和水提物。钙沉淀法提取雄性 SD 大鼠肝微粒体。采用四种激发剂 V_c/Fe^{2+} 、过氧基异丙苯(Cumene hydroperoxide, CHP)、 CCl_4 /辅酶 II (Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADP) 和还原型辅酶 II (Reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)-腺苷二磷酸(Adenosine diphosphate, ADP)/ Fe^{2+} 建立微粒体脂质过氧化(Lipid peroxidation, LPO)模型, 加入浓度为 25 mg/ml、12.5 mg/ml、6.25 mg/ml、3.13 mg/ml、1.56 mg/ml 的红景天醇提物和水提物, 观察在 4 种模型系统中抗氧化作用。在 V_c/Fe^{2+} 、CHP、 CCl_4 /NADP 模型中通过比色法测定对丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的抑制作用, NADPH-ADP/ Fe^{2+} 模型通过氧电极法测定对耗氧量的抑制作用。结果: 红景天水提物在浓度为 6.25~25.00 mg/ml 范围内, 其 CHP 模型中的 MDA 含量显著低于阳性模型对照组。在 V_c/Fe^{2+} 、CHP 和 CCl_4 /NADP 模型中, 红景天醇提物和水提物各浓度组 MDA 含量均非常显著低于对照组, 并且在一定终反应浓度内有剂量-反应关系。在 NADPH-ADP/ Fe^{2+} 模型中, 最高浓度的醇提物和水提物的抑制率分别达到 76% 和 43%。结论: 红景天的两种提取物都具有较强的抗氧化作用, 并存在一定的剂量效应关系。其中红景天醇提物对酶参与性反应的作用强于水提物。该研究初步探讨了红景天抗氧化作用的机制, 其结果为红景天在自由基损伤中的保护作用提供了实验依据。

【关键词】红景天; 抗氧化; 脂质过氧化; 氧电极

中图分类号: R992

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)02-0112-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the antioxidative action of the ethanol and water extract of Rhodiola and their dose relationship. MATERIAL AND METHODS: Sprague-Dawley rats were killed and the livers were removed to isolate the microsomes by calcium ion precipitation. The ethanol and water of Rhodiola were extracted by recirculating and boiling. Four LPO models were built which were stimulated by V_c/Fe^{2+} , CHP, CCl_4 /NADP and NADPH-ADP/ Fe^{2+} . Two different extracts were added into four models and titrated to final concentrations of 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml, 3.13 mg/ml and 1.56 mg/ml. Then the contents of malondialdehyde (MDA) were measured to assess the antioxidative action of Rhodiola extracts in the first three models. The electrode oxygraph was used to determine the inhibition rate of oxygen consumption in NADPH-ADP/ Fe^{2+} model. RESULTS: In CHP model, compared with control group, the content of MDA in group 6.25, 12.5 and 25.00 mg/ml of water extract decreased significantly ($P < 0.05$). In the V_c/Fe^{2+} , CHP and CCl_4 /NADP models, the content of MDA in those groups with different dosages of the two extracts decreased significantly ($P < 0.01$), and there was dose-dependent relationship between the final concentration and the inhibition rate of MDA to some extent. In NADPH-ADP/ Fe^{2+} model, the inhibition rates of the highest concentration of the ethanol and water extracts reached 76% and 43%, respectively. CONCLUSION:

收稿日期: 2005-07-08; 修订日期: 2005-09-26

作者简介: 李嘉琳(1980-), 女, 吉林省长春市人, 硕士研究生, 研究方向: 自由基生物学。E-mail: jay-lin912@163.com

* Correspondence to: HAI Chun-xu Tel: 86-29-83374879, E-mail: cx-hai@fmmu.edu.cn

The two extracts of Rhodiola had good antioxidative effects. The ethanol extract had comparatively stronger effect in the models containing enzymes.

【KEY WORDS】 rhodiola; antioxidative; lipid peroxidation; electrode oxygraph

红景天 (Rhodiola) 系景天科红景天属植物, 大部分生长于海拔 3 500~5 000 m 左右的山地、冰川地等。其重要功能有: 抗缺氧、抗疲劳、对中枢神经的双向调节、延缓衰老作用、抗毒作用、抗辐射作用和防癌作用、对内分泌系统的双向调节作用等。本实验对红景天进行了醇提取和水提取, 应用多种微粒体抗氧化剂筛选模型研究两种提取物的抗氧化剂反应关系。

1 材料与方法

1.1 动物和药材 二级雄性 SD 大鼠 20 只, 体重为 180~200 g, 由第四军医大学实验动物中心提供; 大花红景天一级品 500 g, 购于西安万寿路药材市场。

1.2 主要试剂与仪器 硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric acid, TBA), 过氧基异丙苯 (CHP), 辅酶 II (NADPH, 6-磷酸葡萄糖 (glucose 6-phosphate, G-6-P), 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PD) 均为 Sigma 产品; NADP 为 Genview 分装, MDA 标准品为 Merck 产品; 考马斯亮蓝, 牛血清白蛋白为华美试剂公司产品; 抗坏血酸、硫酸亚铁和 CCl_4 等均为 AR 纯试剂; 3K30 型台式高速冷冻离心机 (Sigma); CY-2 型测氧仪及氧电极 (上海新华仪器厂产); 501 型超级恒温器 (重庆实验设备厂产); 722 型光栅分光光度计 (山东高密分析仪器厂), 台式自动平衡记录仪 (上海大华仪表厂)。

1.3 红景天提取物的制备 采用回流法制备红景天醇提取物^[1]。取大花红景天根茎部, 粉碎机粉碎成 100 目。称取粗粉, 加入 8 倍体积 70% 乙醇, 于圆底烧瓶中经 85 °C 回流提取, 共提取 3 次, 时间分别为 1.5、1、1 h, 得醇提液。采用煎煮法制备红景天水提物^[2]。粗粉加入 8 倍重量的水煎煮 1.5 h 后, 过滤, 沉淀物再经 5 倍重量水煎煮 1 h, 得水提液。醇提液和水提液趁热过滤, 过滤液继续加热, 蒸发掉水分并回收乙醇, 醇提膏和水提膏经 80 °C 烘干备用, 检测水分小于 5%。干燥器内保存。

1.4 微粒体的制备^[3] 大鼠禁食 24 h, 颈椎脱臼处死, 迅速取出肝脏, 用预冷的生理盐水洗去血污, 吸干称重。剪碎, 按 5 ml/g 肝湿重的比例加入 pH = 7.4 的 250 mmol 蔗糖-Tris/HCl 缓冲液, 用电动匀浆器制成匀浆。操作全过程在 (0~4) °C 下进行。采用钙沉淀法提取肝微粒体, -20 °C 保存。用前按 1 ml/g 肝湿重比例用预冷的 0.15 mol/L KCl 悬浮。蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。

1.5 实验方法

1.5.1 微粒体 Vc/Fe²⁺脂质过氧化激发模型 采用本科室的常规方法。反应体系中的基本缓冲液为 Tris/HCl (0.1 mol/L, pH = 7.4) 与 KCl (0.15 mol/L) 按 1:2 比例混合配制。70% 乙醇溶解红景天干粉, 制成 5 个剂量组, 浓度为 25.00、12.50、6.25、3.13、1.56 mg/ml。每组设 5 个平行样。同时, 设 1 个空白对照及 3 个阳性对照 (用蒸馏水替代红景天提取物)。反应体系中含缓冲液 0.8 ml, 50 μmol/L FeSO₄ 0.15 ml, 5 mmol/L Vc 0.15 ml, 微粒体悬液和不同浓度的红景天醇提物各 0.2 ml, 37 °C 水浴 15 min, 10% 三氯醋酸 3.0 ml 终止反应, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清 2 ml 加入 2 ml 0.67% TBA, 100 °C 水浴 15 min, 流水冷却, E535 nm 比色, 读取 OD 值。同时用不同浓度的 MDA 标准品作标准曲线, 拟合标准直线方程, 由此计算各组的 MDA 含量。

1.5.2 微粒体 CHP 脂质过氧化激发模型 缓冲液的配制、分组及步骤同 1.5.1。反应体系中含缓冲液 1 ml, 1 mmol/L CHP 0.15 ml, 微粒体悬液 0.2 ml 和不同剂量的红景天醇提物 0.15 ml。

1.5.3 微粒体 CCl₄/NADP 脂质过氧化激发模型 反应贮备液含基本缓冲液 100 ml, 4.172 g G-6-P, 50.5 mg G-6-PD, 0.7 g NADP, 0.508 g MgCl₂·6H₂O, 新鲜配制, 应用液为贮备液稀释 10 倍。反应体系中含缓冲液 1.85 ml, 应用液 0.3 ml, CCl₄/乙醇 (3:100) 0.05 ml, 微粒体悬液和不同浓度的红景天醇提物各 0.3 ml。

1.5.4 微粒体 NADPH-ADP/Fe²⁺体系中耗氧量氧电极法的测定 参考文献 [5, 6], 稍加改动。采用 CY-2 型测氧仪及氧电极连接台式自动平衡记录仪, 自制 3 ml 反应池, 循环水温度 37 °C, 磁力搅拌速度恒定在 60 r/min, 灵敏度 1/8, (仪器连接见图 1)。反应体系: NADPH 0.037 5 μmol/L; ADP 0.927 μmol/L; Fe²⁺ 9.375 μmol/L; 微粒体 0.365 mg protein/ml (以上浓度均为终浓度), 用基本缓冲液补足 3 ml。设 3 个剂量组, 每组设 3 个平行样。

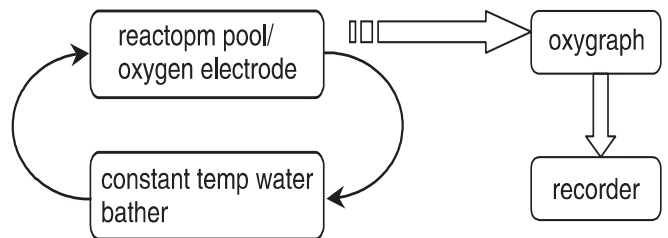


图 1 测定耗氧量仪器连接

Figure 1 The connection of electrode oxygraph for oxygen uptake assay



1.5.5 耗氧量及抑制率的计算^[5] MDA生成抑制率(%)、耗氧量和耗氧抑制率(%)按下列公式计算:

MDA生成抑制率(%) = (阳性对照MDA - 样品MDA) / 阳性对照MDA × 100%

$$\text{耗氧量} (\mu\text{mol/g pro/min}) = \frac{241 (\mu\text{mol/L}) \times \text{斜率} (\text{mm/min})}{\text{扩展} (\text{mm}) \times \text{蛋白浓度} (\text{g/L})}$$

耗氧抑制率(%) = (阳性对照耗氧量 - 样品耗氧量) / 阳性对照耗氧量 × 100%

1.6 统计学方法 数据主要采用SPSS 12.0统计分析软件中的ANOVA进行组与组间的两两比较分析和线性回归分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 红景天对Vc/Fe²⁺激发的LPO模型的影响

如表1所示,与阳性对照组相比,在红景天水提取物各给药浓度下对Vc/Fe²⁺激发的脂质过氧化(LPO)的MDA含量呈现一定的剂量依赖性的降低($P < 0.01$),在12.5 mg/ml浓度下有最大抑制率,而MDA含量醇提取物随剂量的增加而升高。水、醇提取物各给药浓度与抑制率之间的决定系数 R^2 分别为0.116和0.9531。

表1 红景天提取物对Vc/Fe²⁺激发的LPO模型的影响

Table 1 Effect of Rhodiola extract on the content of MDA in the Vc/Fe²⁺ lipid peroxidation model in microsome

Groups (mg · ml ⁻¹)	n	MDA (μmol · L ⁻¹)		Inhibitory rate (× 10 ⁻²)	
		Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
Control	3	5.095 ± 0.115	8.369 ± 0.003	—	—
1.56	3	0.339 ± 0.032**	0.567 ± 0.119**	93.35 ± 0.61	93.23 ± 1.42
3.13	3	-0.417 ± 0.022**	0.750 ± 0.080**	100.84 ± 0.45	91.04 ± 0.96
6.25	3	-0.087 ± 0.060**	0.853 ± 0.011**	101.67 ± 1.16	89.67 ± 0.14
12.50	3	-0.107 ± 0.029**	0.957 ± 0.023**	102.08 ± 0.54	88.57 ± 0.27
25.00	3	0.007 ± 0.103**	1.827 ± 0.083**	99.84 ± 1.99	78.17 ± 1.00

Compared with the control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表2 红景天提取物对CHP激发的LPO模型的影响

Table 2 Effect of Rhodiola extract on the content of MDA in the CHP lipid peroxidation model in microsome

Groups (mg · ml ⁻¹)	n	MDA (μmol · L ⁻¹)		Inhibitory rate (× 10 ⁻²)	
		Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
Control	3	4.889 ± 0.012	6.957 ± 0.164	—	—
1.56	3	3.147 ± 0.052**	5.181 ± 0.211**	35.63 ± 1.23	25.44 ± 3.59
3.13	3	4.010 ± 0.031**	4.171 ± 0.12**	17.57 ± 0.67	40.04 ± 1.30
6.25	3	4.706 ± 0.023*	2.696 ± 0.072**	3.75 ± 0.24	61.22 ± 1.11
12.50	3	5.038 ± 0.053*	2.290 ± 0.095**	-3.05 ± 1.18	67.02 ± 1.82
25.00	3	5.142 ± 0.086**	1.547 ± 0.035**	-5.17 ± 1.93	77.74 ± 0.63

Compared with the control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表3 红景天提取物对CCl₄激发的LPO模型的影响

Table 3 Effect of Rhodiola extract on the content of MDA in the CCl₄ lipid peroxidation model in microsome

Groups (mg · ml ⁻¹)	n	MDA (μmol · L ⁻¹)		Inhibitory rate (× 10 ⁻²)	
		Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
Control	3	3.312 ± 0.074	8.873 ± 0.308	—	—
1.56	3	0.330 ± 0.000**	1.152 ± 0.084**	72.67 ± 2.33	46.98 ± 1.85
3.13	3	0.430 ± 0.040**	2.452 ± 0.092**	74.33 ± 1.45	50.00 ± 1.79
6.25	3	0.557 ± 0.013**	3.346 ± 0.031**	83.33 ± 0.33	62.19 ± 1.40
12.50	3	0.867 ± 0.052**	4.426 ± 0.042**	87.00 ± 1.15	72.27 ± 1.65
25.00	3	0.091 ± 0.070**	4.693 ± 0.011**	89.33 ± 0.33	87.06 ± 0.5

Compared with the control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 红景天对CHP激发的LPO模型的影响

如表2所示,与阳性对照组相比,红景天醇、水提取物各给药浓度下对CHP激发的LPO的MDA含量均呈现剂量依赖性的降低(醇提取物组 $P < 0.01$,水提取物组 $P < 0.05$)。水、醇提取物各给药浓度与抑制率之间的决定系数 R^2 分别为0.6073和0.7491。

2.3 红景天对CCl₄激发的LPO模型的影响

如表3所示,与阳性对照组相比,红景天醇、水提取物的各给药浓度下对CCl₄激发的LPO的MDA含量显著降低($P < 0.01$),并呈现较好的剂量-反应关系。水、醇提取物各给药浓度与抑制率之间的决定系数 R^2 分别为0.7903和0.9493。

2.4 红景天对NADPH-ADP/Fe²⁺激发的LPO模型的影响

如表4所示,为红景天醇、水提取物的1.56、6.25、25 mg/ml 3个给药浓度下两种提取物对NADPH-ADP/Fe²⁺激发的LPO模型的耗氧量抑制率,其中水提组较醇提组的氧耗抑制作用显著增高($P < 0.05$)。水、醇提取物各给药浓度与抑制率之间的决定系数 R^2 分别为0.9723和0.682。

表 4 红景天提取物对NADPH-ADP/Fe²⁺激发的LPO模型的影响Table 4 Effect of Rhodiola extract on the content of MDA in the NADPH-ADP/Fe²⁺ lipid peroxidation model in microsome

Groups (mg · ml ⁻¹)	n	Oxygen uptake (μmol · g ⁻¹ pro · min ⁻¹)		Inhibitory rate (× 10 ⁻²)	
		Water extract	Ethanol extract	Water extract	Ethanol extract
Control	3	29.190 ± 1.479	13.812 ± 0.316	—	—
1.56	3	25.664 ± 0.742 ^{**}	7.560 ± 0.133 ^{**}	12.03 ± 2.08	45.21 ± 1.56
6.25	3	22.585 ± 0.686 ^{**}	4.681 ± 0.065 ^{**}	22.44 ± 3.87	66.20 ± 1.26
25.00	3	16.566 ± 0.937 ^{**}	3.597 ± 0.080 ^{**}	43.07 ± 4.25	73.90 ± 1.10

Compared with the control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

目前红景天研究多为针对其活性成分单体如红景天苷、百脉根苷^[7]等进行抗氧化作用研究,但是,由于自由基反应具有链式的特性,而使单一的抗氧化剂在体内体外实验中都无法达到预期的效果。本实验主要针对红景天醇提物和水提物在体外微粒体脂质过氧化模型中的反应性,测定抗氧化作用的活性强度,以及剂量反应关系,为进一步探讨其药理作用提供实验与理论依据。

微粒体是细胞内质网的碎片,含有混合功能氧化酶系统包括细胞色素氧化酶 P450(CYP450),黄嘌呤氧化酶等多种同功酶,参与内源性和外源性化合物代谢。微粒体酶系统在代谢反应包括氧化、还原、水解和结合等过程中起着重要的催化作用。生物体在需氧代谢过程中的氧化还原反应伴有超氧阴离子自由基、羟自由基等生成,可以引发生物膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应。损伤膜结构及功能,损伤糖、蛋白质及核酸等生物大分子,导致功能和代谢紊乱。从而导致一些疾病的发生,因而研究中药有效成分的抗氧化作用对预防、治疗这些疾病可能发挥重要作用。

本研究采用的四种微粒体 LPO 模型分别代表了不同的激发体系, Vc/Fe²⁺、CHP 激发体系代表非酶参与性反应,其中 Vc/Fe²⁺代表无机物激发剂, CHP 代表有机物激发剂; NADPH-ADP/Fe²⁺代表酶参与性反应,此体系中包括黄嘌呤氧化酶, NADPH 脱氢酶等酶促反应。其中, CCl₄ 经肝微粒体酶细胞色素 P450 激活后生成 ·CCl₃, 进而攻击肝细胞膜, 是多种酶参与性反应。维生素 C 与二价金属离子, 通过 FENTON 反应, 生成超氧阴离子自由基和羟自由基。

脂质过氧化反应的结果是自由基攻击多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) 裂解生成 MDA 等终产物, 同时伴随氧的消耗, 因此测定 MDA 或耗氧量的变化能较好地反映脂质过氧化的水平。从结果可以看出红景天醇提物和水提物对四种 LPO 模型都有一定的抑制作用。在 CHP 激发模型中, 红景天醇提物对 MDA 的抑制作用强于水提物, 而 Vc/Fe²⁺和 CCl₄ 激发模型中, 其水提物的作用又强于醇提物。结果表明, 两种提取

物虽然对非酶与酶参与性反应均有较强作用, 但是作用机理并不相同。与醇提物相比, 水提物能更好的清除超氧阴离子自由基和羟自由基, 并且对细胞膜的保护作用也强于醇提物。但是, 醇提物对耗氧量的抑制作用要强于水提物, 表明红景天醇提物对 NADPH 参与的酶参与性反应有较强的作用, NADPH 是微粒体 LPO 链式反应的必需环节^[8]: NADPH → FP → CytP450 → Fe²⁺ → R → LPO 的启动环节, 推断红景天醇提物的抗氧化作用机制在于抑制了 NADPH 还原酶的活性。有文献报道^[7], 水提物中红景天苷的含量要高于醇提物, 因此认为, 红景天醇提物中含有除红景天苷以外的抗氧化成分作用于 NADPH。实验结果表明, 红景天是一种有效的抗氧化剂, 应用微粒体脂质过氧化模型是筛选抗氧化剂的可靠的技术平台。

参考文献:

- [1] 胡锦涛. 红景天有效成分的提取[J]. 福州师专学报, 1999, 19(3): 51 - 54.
- [2] 李仪奎, 王钦茂, 周金黄, 等. 中药药理实验方法学[M]. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 36.
- [3] Kim HJ, Chang EJ, Cho SH, et al. Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of Paeonia lactiflora[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(9): 1 990 - 1 993.
- [4] 海春旭, 张文清. 微粒体 NADPH-ADP/Fe²⁺ 体系中耗氧量氧电极法的测定及铁、铜、锌对耗氧量的影响[J]. 第四军医大学学报, 1992, 13(3): 194 - 196.
- [5] 张文清, 海春旭, 龚书明. 锌对大鼠肝微粒体脂质过氧化模型抗氧化作用的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志, 1998, 16(4): 250 - 254.
- [6] Akgul Y, Ferreira D, Abourashed EA, et al. Lotaustralin from Rhodiola rosea roots[J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(6): 612 - 614.
- [7] 刘 菜, 王东凯, 顾艳丽. 红景天提取工艺的优化[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(4): 221 - 222.
- [8] Matthias A, Gillam EM, Penman KG, et al. Cytochrome P450 enzyme-mediated degradation of Echinacea alkylamides in human liver microsomes[J]. *Chem Biol Interact*, 2005, 155(1-2): 62 - 70.

