

文章编号: 1000-5013(2010)06-0718-03

金线莲多糖的体外抗氧化活性

刘青¹, 刘珍伶², 周娟¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021;

2. 兰州大学 功能有机分子化学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 采用体外分析的方法观察金线莲多糖(AFP)的抗氧化能力, 研究AFP对氧自由基的清除作用及抑制脂质过氧化的作用. 结果表明, AFP能以剂量依赖的方式抑制 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 的活性, AFP在小鼠肝组织匀浆脂质过氧化中也显示出明显的抗氧化作用. 即AFP在体外实验中有清除自由基及抗氧化作用.

关键词: 金线莲多糖; 氧自由基; 脂质过氧化; 抗氧化

中图分类号: R 282.71

文献标识码: A

1 材料与方法

1.1 材料

金线莲多糖(AFP): 金线莲(*Noectochilus formosams*)原植物由福建中医学中药鉴定室杨成梓教授鉴定, 金线莲多糖由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室提取、鉴定并提供.

硫代巴比妥酸(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20080925); 肝素(江苏万邦生化医药股份有限公司, 批号: 0812111); 抗坏血酸(福建福州海王福药制药有限公司, 批号: 0901042); 硫酸亚铁、过氧化氢、三氯乙酸等(市售分析纯试剂).

实验动物为昆明种清洁级小鼠10只, 质量为18~22 g, 雌雄各半, 由福州海王福药制药有限公司提供(许可证号: SCXK(闽)2005-0003).

752N型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); TDL-60B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); BS124S型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); HH-S型数显恒温水浴锅, XH-C型旋涡混合器(江苏常州国立试验设备研究所).

1.2 数据处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行组间 t 检验. 其中: $P < 0.05$ 表示差异有显著性; $P < 0.01$ 表示差异有高度显著性.

2 结果与分析

2.1 金线莲多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用^[1]

$\cdot\text{OH}$ 是活性氧中活性最高且造成损伤最大的一种, 它可以与生物体内的多种分子作用, 造成糖类、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤, 造成细胞坏死或突变. 羟自由基清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标.

改进Smirnoff等提出方法^[1], 用 $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ 产生 $\cdot\text{OH}$, 以 $\cdot\text{OH}$ 氧化水杨酸所得产物的吸光值表示 $\cdot\text{OH}$ 的多少, 即吸光值越大, $\cdot\text{OH}$ 越多. 在4 mL的反应体系中, 含有1 mL的 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 , 1 mL的 $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 , 1 mL的 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸(用50%乙醇作溶剂), 以及1 mL不同浓度的金线莲多糖.

收稿日期: 2010-04-03

通信作者: 刘青(1970-), 女, 副教授, 主要从事药理学的研究. E-mail: liuq@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20972061)

加入 H_2O_2 启动反应, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下温浴 1 h , 测定 510 nm 处的吸光值(A), 结果如表 1 所示. 表 1 中: ρ 为剂量; η 为清除率, 即 $\eta = [A_0 - (A_i - A_{i_0})] \cdot A_0^{-1} \times 100\%$. 其中: A_0 为对照物(不加金线莲多糖)的吸光值, A_i 为某浓度时的吸光值, A_{i_0} 为无水杨酸时该浓度的本底值. 从表 1 可知, 金线莲多糖对 $\cdot\text{OH}$ 有清除作用, 且其清除率随着金线莲多糖的剂量的增加而增大, 呈一定的量效关系.

2.2 金线莲多糖对 O_2^- 的清除作用^[2]

O_2^- 是一种活性氧, 在体内由过氧化物歧化酶清除, 如果体内过氧化物歧化酶活力下降或 O_2^- 产生过量, 都会给机体造成危害.

在每支试管加入 4.5 mL 的 Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH} = 8.2$), 于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下预热 20 min , 加入 1 mL 不同浓度的金线莲多糖, 再加入 0.4 mL 的 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚, 立即摇匀; 准确反应 4 min 后, 立即加入 0.1 mL 的 $8\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HCl}$ 终止反应, 测定 325 nm 处的吸光值(A), 结果如表 2 所示. 表 2 中: 清除率 $\eta = (A_0 - A_i) \cdot (A_0 - A_{i_0})^{-1} \times 100\%$, A_0 为对照物(不加金线莲多糖)的吸光值, A_i 为某浓度时的吸光值, A_{i_0} 为无邻苯三酚时该浓度的本底值.

从表 2 可知, 金线莲多糖对 $\text{O}_2 \cdot$ 的清除作用与金线莲多糖的剂量呈一定的量效关系. 当金线莲多糖的浓度为 $5.0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 可以显著抑制 O_2^- 的产生.

2.3 金线莲多糖对小鼠肝组织匀浆自氧化反应的影响^[3]

丙二醛(MDA)为脂质过氧化产物, 其生成的多少可以反映出组织细胞的受损程度. 首先, 将小鼠颈椎脱臼致死, 迅速分离出肝组织, 用冷的生理盐水洗净后称量; 然后, 于冰浴下匀浆, 制成含蛋白质为 0.5% 的肝匀浆悬浮液.

取 5% 肝匀浆悬浮液 0.2 mL , 加入 1 mL 不同浓度的金线莲多糖溶液, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下温浴 1 h 后, 加入 1 mL , 20% 的 TCA 以终止反应; 然后, 再加入 1 mL , 0.67% 的 TBA , 于沸水浴中显色 15 min . 冷却后, 于 $4\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的离心机中离心 10 min , 测定 532 nm 处的上清液吸光度. 金线莲多糖对小鼠肝匀浆中 MDA 生成的影响, 如表 3 所示. 表 3 中: 清除率 $\eta = (A_0 - A_i) \cdot A_0^{-1} \times 100\%$, A_0 为对照物(不加金线莲多糖)的吸光值, A_i 为某浓度时的吸光值. 以吸光度表示 MDA 含量的多少.

从表 3 可知, 金线莲多糖可以有效抑制小鼠肝脏组织匀浆脂质过氧化的发生, 且 MDA 的抑制率随着金线莲多糖浓度的增加而提高.

2.4 金线莲多糖对 $\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}_2$ 诱导的小鼠肝线粒体中 MDA 生成的影响^[4]

将肝组织在冰浴下以生理盐水制成 10% 的匀浆, 于 $2\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的离心机中离心 20 min , 取上层液; 然后, 以 $10\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min , 用生理盐水洗涤沉淀 2 次后, 再以生理盐水配成吸光值在 $0.5\sim 0.6$ 的线粒体悬浮液.

取 2.5 mL 肝线粒体悬浮液, 加入 0.4 mL 不同浓度的金线莲多糖溶液, 再加入 0.1 mL , $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{FeSO}_4$ 和 0.1 mL , $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下温浴 1 h ; 然后, 取 0.1 mL 温育后的各管溶液, 加入 1 mL , 20% 的 TCA 以终止反应, 再加入 1 mL , 0.67% 的 TBA , 于沸水浴中显色 15 min , 冷却后离心, 测定 532 nm 处的上清液吸光值, 如表 4 所示.

表 1 金线莲多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

Tab. 1 Scavenging effect of AFP on $\cdot\text{OH}$

组别	$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$A^{①}$	$\eta/\%$
对照组	—	0.615 ± 0.019	—
	0.625	0.543 ± 0.038	15.69
金线莲多糖	1.250	$0.483 \pm 0.014^*$	25.46
	2.500	$0.449 \pm 0.006^{**}$	30.94
	5.000	$0.190 \pm 0.010^{**}$	72.96

① 与对照组比较, * 代表 $P < 0.05$; ** 代表 $P < 0.01$

表 2 金线莲多糖对 O_2^- 的清除作用

Tab. 2 Scavenging effect of AFP on O_2^-

组别	$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$A^{①}$	$\eta/\%$
对照组	—	0.717 ± 0.032	—
	2.5	$0.617 \pm 0.021^*$	13.99
金线莲多糖	5.0	$0.510 \pm 0.040^{**}$	28.87
	10.0	$0.327 \pm 0.026^{**}$	54.44
	15.0	$0.259 \pm 0.032^{**}$	63.92

① 与对照组比较, * 代表 $P < 0.05$; ** 代表 $P < 0.01$

表 3 金线莲多糖对小鼠肝自氧化的影响

Tab. 3 Effects of AFP on lipid peroxidation of extract from rat liver

组别	$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$A^{①}$	$\eta/\%$
对照组	—	0.487 ± 0.009	—
	0.312 5	$0.422 \pm 0.014^*$	13.35
金线莲多糖	0.625 0	$0.304 \pm 0.013^{**}$	37.58
	1.250 0	$0.099 \pm 0.020^{**}$	79.74
	2.500 0	$0.089 \pm 0.018^{**}$	81.79
	5.000 0	$0.059 \pm 0.003^{**}$	87.82

① 与对照组比较, * 代表 $P < 0.05$; ** 代表 $P < 0.01$

从表 4 可知, 5 个不同浓度的金线莲多糖对 Fe^{2+} - H_2O_2 诱导的小鼠肝线粒体中 MDA 生成均有显著的抑制作用, 其抑制率随着金线莲多糖剂量的增加而增加。

3 结束语

多糖	5.000 0	0.067±0.015 ^{**}	90.18
	10.000 0	0.053±0.011 ^{**}	92.24

① 与对照组比较, ** 代表 $P < 0.01$

参考文献:

- [1] SMIMFF N, CUMBES Q. Gydroyl radica scavegin activity of compaible solues[J]. Hytochemitry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [2] 刘青, 薛秀玲, 叶静, 等. 纳米二氧化钛对小鼠肺、脑和肝脏组织的影响[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2009, 30(2): 179-182
- [3] 田京伟, 杨建. 白藜醇苷体外抗氧化活性[J]. 中草药, 2001, 32(10): 978-980.
- [4] 曹炜, 尉亚辉, 杨建雄. 蜂胶对氧自由基和四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用[J]. 中药, 2001, 32(11): 1013-1015.
- [5] 刘贤旺, 黄慧莲, 袁勇. 金线莲多糖的研究进展[J]. 江西中医学院学报, 1999, 11(4): 188-189.
- [6] 林丽清, 黄丽英, 郑艳洁等. 金线莲多糖的提取及清除氧自由基作用的研究[J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(5): 37-39.

Study on Antioxidative Activity of *Anoectochilus formosams* Polysaccharide in Vitro

LIU Qing¹, LIU Zhen-ling², ZHOU Juan¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The antioxidant capacities of *Anoectochilus formosams* polysaccharide (AFP) were investigated by in vitro assay. The scavenging effects of AFP on oxygen radicals and its inhibitory effect on lipid peroxidation were studied. Results showed that AFP exhibited inhibitory effects on the hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion free radical (O_2^-) in a dose-dependent manner. It also showed substantial antioxidant activities in the mice liver tissue homogenate. So AFP had scavenging radicals effect and antioxidant activities in the in vitro experiments.

Keywords: *A. noectochilus formosams* polysaccharide; oxygen radical; lipid peroxide; antioxi dation

(责任编辑:黄仲一 英文审校:陈国华)