

# 沙棘籽原花青素体外抗氧化活性研究

徐晓云, 潘思轶\*, 谢笔钧, 曹少谦

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 研究沙棘籽原花青素(SBSPC)体外抗氧化的作用。采用水杨酸法检测沙棘籽原花青素对羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )的清除作用, 用硫代巴比妥酸法测定小鼠肝丙二醛(MDA)的含量, 用分光光度法测定小鼠红细胞溶血和肝线粒体肿胀程度, 研究 SBSPC 的抗氧化效果。结果表明: SBSPC 可以清除  $\cdot\text{OH}$ , 抑制  $\cdot\text{OH}$  所致的丙二醛的产生, 减少  $\cdot\text{OH}$  所致的红细胞溶血, 降低  $\cdot\text{OH}$  所致线粒体肿胀程度, 证明 SBSPC 具有抗  $\cdot\text{OH}$  所致的氧化的作用。

**关键词:** 沙棘籽; 原花青素; 羟自由基; 抗氧化

## The Anti-oxidative Effect of Sea Buckthorn Seed Procyanidins *in Vitro*

XU Xiao-yun, PAN Si-yi\*, XIE Bi-jun, CHAO Shao-qian

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Objective: To study the anti-oxidative effects of Sea Buckthorn Seed Procyanidins (SBSPC). Methods: The hydroxyl radicals scavenging effect was assayed by salicylic acid method, the content of MDA (Malondialdehyde) in liver mitochondria was determined by TBA assay; Hemolysis of RBC and the swelling of mitochondria were detected by spectrophotometric methods. Result: SBSPC had a significant effect on scavenging hydroxyl radicals. It could inhibit the generation of MDA in liver homogenate, swelling of mitochondria and hemolysis of red blood cell induced by  $\cdot\text{OH}$ . The conclusion was that SBSPC had the effect of anti-oxidation induced by  $\cdot\text{OH}$ .

**Key words:** Sea Buckthorn Seed; procyanidins; hydroxyl radical; anti-oxidation

中图分类号: TS255.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0216-03

现代研究表明, 氧自由基是引起多种疾病和老化的重要因素, 也是脂质过氧化的起因, 氧自由基引起的连锁反应经体内代谢后会引起脂质、DNA、细胞膜等体内大分子损伤, 是多种疾病, 如老化、癌症、心血管疾病、发炎肾炎等的诱因<sup>[1,2]</sup>, 因此在动植物中寻找高效低毒的天然抗氧化剂工作深受重视。葡萄籽原花青素(procyanidins, PC)是目前研究较多的一种氧自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂。

沙棘(*Hippophas rhamnoides L.*)为胡颓子科酸刺属的灌木或小乔木, 作为国土整治的先锋树种和具有较高经济价值的经济树种, 在我国三北地区广泛种植。经本室研究证实, 沙棘果、籽、及茎皮中均含有原花青素, 经提纯的沙棘籽原花青素(Sea Buckthorn Seed Procyanidins, SBSPC)具有很强的抗氧化作用。本文研究探讨了沙棘籽原花青素对小鼠红细胞、肝及线粒体的膜脂质过氧化的影响, 为进一步深入开发沙棘提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

昆明种小鼠, 雄性, 体重(g):  $20 \pm 2$ , 由湖北省疾病预防控制中心实验动物中心提供。

#### 1.1.2 沙棘籽原花青素的提取和制备

沙棘籽由西北农林科技大学植保站提供, 经干燥、粉碎、脱脂后, 于  $50^\circ\text{C}$  以 60% 乙醇提取, 减压浓缩除去乙醇, 过滤后经 Sephadex LH-20 柱层析分离纯化后, 冷冻干燥得沙棘籽原花青素, 为浅棕色粉末, 经 Porter 法检测<sup>[3]</sup>, 含量高于 96%。

#### 1.1.3 试剂

硫代巴比妥酸, 肝素为生化试剂, 硫酸亚铁, 抗坏血酸, 过氧化氢, 三氯乙酸为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物样品的制备

1.2.1.1 红细胞悬浮液 小鼠眼眶取血, 肝素抗凝制成抗凝血, 于 3000r/min 离心后得红细胞, 用预冷的生

收稿日期: 2004-03-01

\* 通讯作者

基金项目: 加拿大(Manitoba Rural Adaptation Council)项目

作者简介: 徐晓云(1970-), 女, 在读博士, 研究方向为食品加工化学。

理盐水洗三次，制成0.5%的悬液。

1.2.1.2 肝匀浆液 迅速取上述取血后的小鼠肝，以预冷后的生理盐水洗净，冰浴匀浆，配成一定浓度的匀浆液。

1.2.1.3 肝线粒体悬浮液 取肝组织在冰浴下用0.25mol/L的蔗糖配成10%匀浆，于4℃，3000r/min，离心20min，取沉淀用冷的0.25mol/L的蔗糖洗两次，合并上清液，于4℃，10000r/min，离心20min，取沉淀用冷的0.25mol/L的蔗糖洗两次，所得沉淀即为线粒体<sup>[4]</sup>，用10mmol/L tris-HCl 缓冲液配成蛋白质含量0.5mg/ml的悬浮液，冷藏备用。

1.2.2 SBSPC 清除·OH 效果的测定

根据 Smirnoff 等的方法改进<sup>[5]</sup>，用 FeSO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生·OH，以·OH 氧化水杨酸钠所得产物的吸光值表示·OH 的多少，吸光值越大，·OH 越多。3ml 反应体系中含 1ml 1.5mmol/L FeSO<sub>4</sub>，0.7 ml 6mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，0.3ml 20mmol/L 水杨酸钠及 1 mL 不同浓度的 SBSPC，最后加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应，37℃温浴 1h，于 510nm 测吸光值。清除率以 $[A_0-(A_i-A_{i0})]/A_0 \times 100\%$  计算，其中为 A<sub>0</sub> 为对照，不加 SBSPC，A<sub>i</sub> 为某浓度时的吸光值，A<sub>i0</sub> 为无色剂时的该浓度的本底值。

1.2.3 SBSPC 对小鼠红细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致溶血的影响<sup>[7]</sup>

取 0.5% 红细胞悬液 4ml，加不同浓度的 SBSPC 液 0.5ml，最后加 60mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4ml 启动反应，37℃温浴 1h 后，1000r/min 离心 10min，取上清液于 415nm 处测定吸光度，以对照组为 100% 溶血，同时设正常红细胞组(即未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引发，其它条件相同)，计算溶血度。

1.2.4 SBSPC 对小鼠肝匀浆氧化的影响<sup>[6]</sup>

1.2.4.1 SBSPC 对小鼠肝匀浆自氧化的影响：取 4% 肝匀浆悬液 1ml，加入不同浓度 SBSPC 溶液 0.2ml 在 37℃温浴 1h 后，加入 15% TCA 1ml 终止反应再加 0.67% TBA 1ml，于沸水浴中显色 15min，冷却后离心，测 532nm 上清液吸光度 A，以吸光度表示 MDA 含量的多少。清除率以 $(A_0-A_i)/A_0 \times 100\%$  计算，其中为 A<sub>0</sub> 为对照，不加 SBSPC，A<sub>i</sub> 为某浓度时的吸光值。

1.2.4.2 SBSPC 对 Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的小鼠肝匀浆氧化的影响：取 1% 肝匀浆悬液 1ml，加入不同浓度 SBSPC 溶液 0.2ml，再加入 0.1ml，6mmol/L FeSO<sub>4</sub>，0.1ml 60mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，在 37℃温浴 1h 后，加入 15% TCA 1ml 终止反应，再加 0.67% TBA 1ml，于沸水浴中显色 15min，冷却后离心，于 532nm 测上清液吸光值 A。同时设正常组，即不添加 SBPC 和 Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，清除率的计算方法同上。

1.2.5 SBSPC 对 Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的小鼠肝线体肿胀度的影响<sup>[8]</sup>

用生理盐水配制成肝线粒体悬浮液 1.2ml(约含线粒体

蛋白 0.5mg)，分别加入不同浓度 SBSPC 0.2ml，0.05mmol/L FeSO<sub>4</sub> 0.2ml 和 0.85mmol/L VC 0.1ml，对照组不加 SBSPC，加 0.2ml 生理盐水，正常组只加 0.5ml 的生理盐水，于不同时间，在 520nm 处，测吸光值。

1.2.6 数据处理

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示，用 SAS 统计软件对数据进行 t 检验和方差分析。

2 结果与分析

2.1 SBSPC 清除·OH 的效果

表 1 SBSPC 清除·OH 的效果, (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 The scavenging effect of SBSPC on ·OH, (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

SBSPC浓度(μg/ml)	A <sub>510nm</sub>	清除率(%)
0 (对照组)	0.527 ± 0.004	--
21	0.435 ± 0.002*	17.46
42	0.324 ± 0.001*	38.52
83	0.245 ± 0.003*	53.51
167	0.193 ± 0.001*	63.57

注：\* 与对照组相比 p < 0.01。

由表 1 可知，添加 SBSPC 各实验组的 A<sub>510nm</sub> 值低于对照组，表明 SBSPC 具有清除·OH 的作用，且随着浓度的增加，其清除·OH 的效果亦增加。T 检验表明，各实验组不仅与对照组相比有极显著性差异 (p < 0.01)，且各实验组之间也有极显著性差异 (p < 0.01)，具有明显的量效关系。

2.2 SBSPC 对小鼠红细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致溶血的影响

表 2 SBSPC 对小鼠红细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致溶血的影响  
Table.2 Effect of SBSPC on RBC Hemolysis Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

SBSPC浓度(μg/ml)	A <sub>540nm</sub>	溶血度(%)
0 (正常组)	0.520 ± 0.0413	38.10
0 (对照组)	1.365 ± 0.0862	100
11	0.578 ± 0.024*	42.34
22	0.207 ± 0.008*	15.16
44	0.156 ± 0.033*	11.43

注：\* 与对照组相比 p < 0.01。

由表 2 所示，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以氧化红细胞膜，导致血红蛋白逸出，从而导致其吸光值的增加。SBSPC 各剂量组均可抑制这种作用，一定剂量的 SBSPC 可以显著降低小鼠红细胞的溶血度。经 t 检验表明，各剂量组与对照组相比均有极显著性差异 (p < 0.01)，且在较低浓度水平(11 μg/ml)，即有很强的抑制作用。值得注意的是，在温浴过程中还有自发性的氧化损伤，当 SBSPC 的剂量增加，22 μg/ml 和 44 μg/ml 剂量组的 A<sub>540nm</sub> 低于正

常组,这说明在这个剂量下,SBSPC不但抑制了由 $H_2O_2$ 引发的氧化而且还抑制了自氧化,表明SBSPC具有很强的抗氧化性。

### 2.3 SBSPC 对小鼠肝匀浆氧化的影响

MDA是自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而引发的脂质过氧化作用的最终分解产物,其含量的多少可反映组织细胞的脂质过氧化速率或强度。MDA含量异常增高会引起细胞损伤。因此通过测定MDA值可以评价机体抗氧化能力。

表3 SBSPC对小鼠肝匀浆自氧化的影响

Table 3 Effect of SBSPC on MDA production in liver homogenate Induced by anti-oxidation (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

SBSPC浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	A <sub>540nm</sub>	清除率(%)
0(对照组)	1.162 $\pm$ 0.026	—
0.83	0.989 $\pm$ 0.015*	14.89
1.67	0.640 $\pm$ 0.011*	44.92
2.5	0.231 $\pm$ 0.008*	80.21
3.33	0.190 $\pm$ 0.006*	83.65

注: \* 与对照组相比  $p < 0.01$ 。

表4 SBSPC对 $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$ 诱导的小鼠肝匀浆氧化的影响

Table 4 Effect of SBSPC on MDA production in liver homogenate Induced by  $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$ (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

SBSPC浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	A <sub>540nm</sub>	清除率(%)
0(正常组)	0.319 $\pm$ 0.004	—
0(对照组)	1.028 $\pm$ 0.060	—
8.57	0.960 $\pm$ 0.046*	6.61
10.71	0.661 $\pm$ 0.019*	35.70
12.86	0.312 $\pm$ 0.014*	69.65
16.07	0.181 $\pm$ 0.009*	82.39

注: \* 与对照组  $p < 0.01$ 。

由表3可以看出,SBSPC各浓度均可显著抑制小鼠肝匀浆自发生成MDA,经方差分析,各实验组间有极显著性差异( $p < 0.01$ )。

由表4可知与正常肝匀浆相比, $Fe^{2+}$ - $H_2O_2$ 的诱导产生 $\cdot OH$ ,使小鼠肝匀浆的MDA值显著增加,而SBSPC各浓度均可显著抑制这种作用,且呈量效关系,当浓度达到 $16\mu\text{g/ml}$ 时,加药组的MDA值低于正常组,这说明在温浴时 $\cdot OH$ 诱导的氧化和自氧化同时存在,在这个剂量下,不仅抑制了 $\cdot OH$ 诱导的氧化而且也抑制了一定程度的自氧化。

### 2.4 SBSPC对 $Fe^{2+}$ -VC诱导的小鼠肝线粒体肿胀度的影响

随着时间的延长,线粒体被氧化损伤而发生肿胀,引起吸光值下降。和正常组相比,对照组由于添加了 $Fe^{2+}$ -VC,下降幅度最大,说明 $\cdot OH$ 诱导加速了氧化损伤。而添加了SBSPC的各实验组可以降低这种氧化

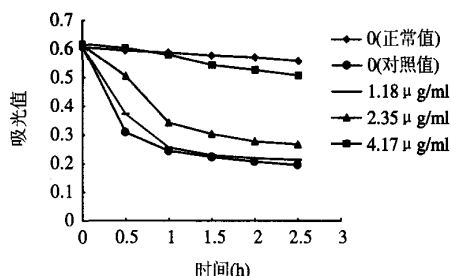


图1 SBSPC对 $Fe^{2+}$ -VC诱导的肝线粒体肿胀度的影响

Fig.1 Effect of SBSPC on mitochondria swelling induced by  $Fe^{2+}$ -VC

损伤,与对照组相比,趋势减缓,当SBSPC浓度达到 $4.71\mu\text{g/ml}$ 时,实验组几乎可以完全抑制这种 $Fe^{2+}$ -VC诱导作用,它的变化与正常组(没有加 $Fe^{2+}$ -VC)的值相当。

### 3 讨论

本文着重研究了沙棘籽原花青素的体外抗氧化作用。羟自由基被认为是毒性很强的自由基,可通过 $Fe^{2+}$ +VC、 $Fe^{2+}$ + $H_2O_2$ 、辐射等处理产生,能诱导膜系统氧化损伤<sup>[9]</sup>。实验证明,SBSPC能够清除Fenton反应产生的羟自由基,并能显著地抑制 $H_2O_2$ 诱导的红细胞溶血。SBSPC对于脂质过氧化反应的终产物MDA的实验表明,SBSPC体外可显著降低肝匀浆的自氧化与诱导氧化所产生的MDA,并且对于肝线粒体肿胀改变有显著的抑制作用。以上表明,SBSPC具有很强的羟自由基的清除能力,对红细胞和组织细胞以及亚细胞膜性结构有保护作用。关于SBSPC对于其它自由基的作用尚待进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] 方允中,李文杰. 自由基与酶-基础理论及其在生物学和医药中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 122-142.
- [2] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 124-134.
- [3] Poter LJ, Rstich LN, Chan B G. The conversion of procyanidin and prodelphinidin to cyanidin and delphinidin [J]. Phytochemistry, 1986, (2): 223-227.
- [4] 李志孝, 黄成钢, 蔡育军, 等. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J]. 药学报, 2000, 35(5): 358.
- [5] Smirff N, Cumbes Q. Gydroyl radica scavengin activityof compaible solues[J]. Hytochemistry, 1989, (4): 1057.
- [6] 王利津, 徐强. 黄莲解毒汤的氧化作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2000, 32 (1): 51-53.
- [7] 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.
- [8] 王建华, 张民, 甘璐. 枸杞多糖-1对羟自由基所致小鼠肝线粒体损伤的作用[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(10): 669-672.
- [9] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 77-153.