

葛根黄酮对 DNA 氧化损伤的保护研究

裴凌鹏, 惠伯棣, 张 帅, 金宗濂
(北京联合大学应用文理学院, 北京 100083)

摘要: 本文使用不同方法提取葛根黄酮, 并在 CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA 化学发光体系中测定其对 DNA 氧化损伤的保护作用。实验结果表明黄酮作为天然抗氧化剂能够明显抑制 DNA 损伤发光, 并通过量效关系的研究确定在 $0.02 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ 范围内能有效抑制自由基对 DNA 的损伤。

关键词: 黄酮; DNA 损伤; 提取; 化学发光

Study on Protection Against DNA Damage by Flavones from Pueraria wilsonii

PEI Ling-peng, HUI Bo-di, ZHANG Shuai, JIN Zong-lian
(College of Applied Arts and Sciences, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

Abstract: Flavone fraction was extracted from Kudzu with different protocols in this study. Protection against DNA damage by the extracts was demonstrated by CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA reaction. The photon count of the reacts suggested that flavones, a natural antioxidant, at the concentration $0.02 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ could reduce (in amount) and delay DNA damage.

Key words: flavones; DNA damage; extraction; chemiluminescence

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)04-0236-03

葛根为多年生豆科植物葛(Pueraria Leбата(wilsonii))的根。野葛一般生长于山坡、草丛、路旁及较阴湿的地方, 在我国有广泛的分布。已经证明: 葛根含葛根素、葛根素木糖甙、大豆黄酮、大豆黄酮甙及 β -谷甾醇、花生酸, 并含大量淀粉(鲜葛根含淀粉 $19\% \sim 20\%$, 甘葛根含淀粉 37%)。据《本草纲目》记载: “葛根气味甘、辛、平、无毒, 主治消渴、全身大热、呕吐、诸痹、起阴气、解毒。” 现代医学的研究表明: 葛根中的总黄酮, 具有解痉止痛、增强脑及冠状动脉血流量、降低血脂、降血糖、抗氧化和增强机体的免疫力等功效。因此加强对葛根的生物学功能研究, 为开发各种功能性食品具有广阔的前景^[1~3]。

近年来, 有关葛根黄酮的抗氧化作用一直是人们研究的热点, 但利用生物发光检测技术对葛根黄酮抗 DNA 氧化损伤进行研究的国内报道很少。本实验使用 CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA 化学发光体系来测定葛根黄酮对 DNA 损伤的抑制作用及其有效浓度范围。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

BPCL-4 型微弱发光测量仪(中国科学院生物物理研究所设计并制造)、KQ-100 超声波清洗器(昆山市定山湖检测仪器厂)、UV8500 紫外-可见分光光度计(上海天美仪器公司)、Labconco 冰冻真空干燥仪(美国)、G-17 离心机(北京医疗仪器厂)。

1.1.2 试剂

无水乙醇(北京化学试剂公司)、氨水(北京化学试剂公司)、大孔吸附树脂(天津农业股份公司)、硫酸铜(CuSO_4 , 北京化工厂)、邻啡罗啉(1, 10-Phenanthroline, 分析纯, Sigma)、维生素 C(VC, 分析纯, Sigma)、过氧化氢(H_2O_2 , 30%, 优级纯, 北京化工厂)、DNA(分析纯, Sigma)、芦丁(北京化学试剂公司)。

1.1.3 原料 葛根(购于重庆地区)。

1.2 方法

1.2.1 葛根黄酮提取与纯化

使用不同工艺提取葛根中的黄酮, 并对得到的黄褐色粉末总量、总黄酮含量、比较提取率。

1.2.1.1 水煎煮法^[4] 提取流程如下。

10g 葛根原料 → 蒸馏水煎煮两次, 每次 2h → 离心过滤 → 冰冻真空干燥, 制成干粉

收稿日期: 2004-05-10

作者简介: 裴凌鹏(1976-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为天然产物生物化学。

1.2.1.2 回流法^[5] 提取流程如下。

10g 葛根原料→70% 乙醇加热回流两次, 每次 2h →离心过滤→合并滤液→柱分离→水洗脱→乙醇洗脱→减压浓缩→冰冻真空干燥, 制成干粉

1.2.1.3 索氏提取法^[6] 提取流程如下。

10g 葛根原料→70% 乙醇 60ml 回流提取, 提取 4h →离心过滤→柱分离→水洗脱→乙醇洗脱→减压浓缩→冰冻真空干燥, 制成干粉

1.2.1.4 超声波法^[7] 提取流程见图4。

10g 葛根原料→超声提取→离心过滤→柱分离→水洗脱→乙醇洗脱→减压浓缩→冰冻真空干燥, 制成干粉

1.2.1.5 大孔吸附树脂柱的制备

取大孔吸附树脂, 用乙醇加热回流洗脱, 洗至洗脱液蒸干后无残留物。将经乙醇洗净的树脂挥去溶剂备用。用乙醇湿法装柱, 继续用乙醇在柱上流动清洗, 不时检测洗出的乙醇, 至与水混合不呈白色混浊为止, 最后以大量蒸馏水洗去乙醇备用。

1.2.2 微弱发光体系的配制^[8,9]

用 0.1mol/L 醋酸缓冲液(pH5.5)配制 CuSO_4 -Phen-VC-DNA 溶液, 使 Cu^{2+} 、Phen、VC、DNA 终浓度分别为 $5 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 、 $3.5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 、 $3.5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$, 加入一定量的抗氧化剂(对照用缓冲液补齐)。取该溶液 1ml, 放入发光仪样品池中, 加入 200 μl 3% 的 H_2O_2 溶液, 立即测量化学发光反应动力学曲线。每组实验重复三次。

2 结果与分析

2.1 葛根黄酮含量测定

2.1.1 标准曲线绘制

精确称取芦丁对照品 10mg, 放入 50ml 容量瓶中, 加 70% 乙醇溶液, 稀释至刻度。吸取上述溶液 1、2、3、4、5ml 分别置于 50ml 容量瓶中, 以 5ml 70% 乙醇并加水至 50ml。同时以上述溶剂为对照, 在 250nm 处进行比色测定。用最小二乘法, 以对照品芦丁质量浓度与吸光度作线性回归, 得芦丁质量浓度 $c(\text{g/L})$ 与吸光度 A 的关系: $c=0.0217A-0.0007$, $r=0.9982$ 。

2.1.2 葛根提取物中总黄酮的测定

精确称取上述各种流程得到的提取物, 其量相当于 10mg 葛根黄酮, 置 50ml 容量瓶中, 加 5ml 70% 乙醇溶解, 后加水至刻度后摇匀, 同时以 70% 乙醇加水至 10ml 的溶液做空白对照, 在 250nm 波长处测定吸光度。从标准曲线上换算出葛根黄酮的含量(结果见表1)。

2.2 DNA 损伤产物发光测定体系

CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA 化学发光体系生

表1 不同提取方法黄酮产率比较

Table 1 Amount comparison of flavones extracted by different methods

方法 Methods	提取物总量(g) Total extract amount (g)	提取率*(%) Extraction rate(%)	总黄酮量(g) Total flavone amount (g)
水煎煮法 Boiling-water extraction	0.100	1.00	0.0261
回流法 Boiling-alcohol extraction	0.186	1.86	0.0560
索氏法 Soxhlet extraction	0.217	2.17	0.0797
超声波法 Ultrasonic extraction	0.500	5.00	0.2561

注: 提取率(%)=(提取物总量/样品总量)×100。

Note: Extraction rate(%)=(Total extract amount/total sample amount)×100.

成 $\cdot\text{OH}$, 随着 $\cdot\text{OH}$ 损伤 DNA 而产生了一个延迟于 Phen 化学发光峰。如图1所示前峰 I 代表 Phen 自身氧化发光, 后峰 II 代表 DNA 损伤产物发光。

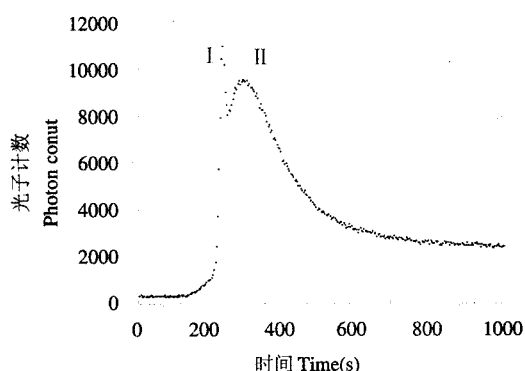


图1 CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA 体系的光子计数

Fig 1 Photon count of CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA reaction

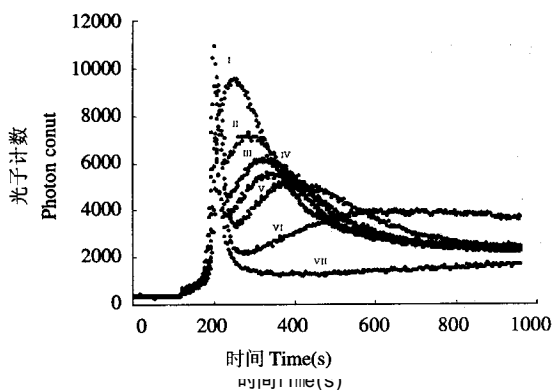
2.3 葛根黄酮对 DNA 的保护作用

选用超声波法制备的黄酮提取物为被测样品。如图2所示, 黄酮的加入使得前后两峰都有明显下降, 且后峰有明显后移现象, 浓度越大, 作用越强, 表明葛根黄酮可以有力地清除 $\cdot\text{OH}$, 降低 DNA 损伤强度且延迟 DNA 损伤发生的时间。当黄酮浓度为 0.02、0.2、2、20、200、1000 $\mu\text{g/ml}$ 时, DNA 损伤产物发光峰延迟时间分别为 39、78、93、150、363、601s(如图3所示), 发光峰强度抑制率(亦称峰高抑制率)分别为 38.5%、51.2%、65.3%、71.9%、81.2%、94.8%(如图4所示)。

3 讨论

3.1 不同葛根黄酮提取方法的比较

3.1.1 黄酮类化合物易溶于有机溶剂, 从表1可见用乙醇法提取效率明显高于水提取, 但后者成本较低, 且作为溶剂的水可回收再利用。



黄酮浓度: I=0.00 μ g/ml; II=0.02 μ g/ml; III=0.20 μ g/ml; IV=2.00 μ g/ml; V=20.00 μ g/ml; VI=200.00 μ g/ml; VII=1000.00 μ g/ml。
Flavone amount: I=0.00 μ g/ml; II=0.02 μ g/ml; III=0.20 μ g/ml; IV=2.00 μ g/ml; V=20.00 μ g/ml; VI=200.00 μ g/ml; VII=1000.00 μ g/ml。

图2 黄酮浓度变化对 CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA体系光子计数的影响
Fig. 2 Influence of variation in flavone amount on the photon count of CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA reaction

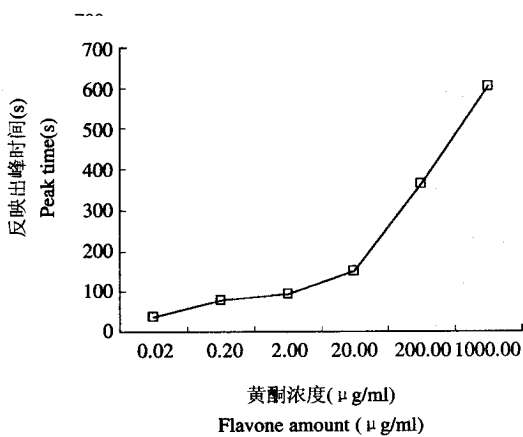
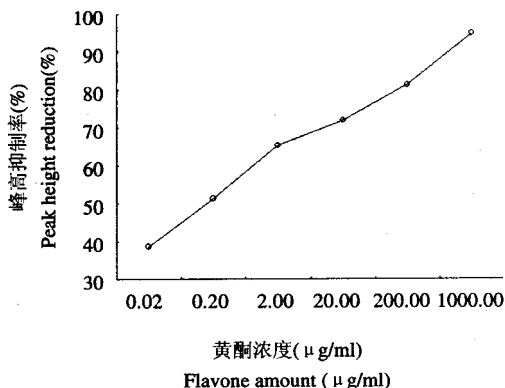


图3 黄酮浓度变化对出峰时间的影响

Fig. 3 Influence of variation in flavone amount on peak time



峰高抑制率=(空白对照峰高-样品峰高)/空白对照峰高 \times 100%

图4 黄酮浓度变化对峰高抑制率的影响

Fig. 4 Influence of variation in flavone amount on peak height reduction

其提取效率高于单纯回流提取。

3.1.3 超声波可产生强烈震动,形成空化效应,可加速黄酮类化合物进入溶剂,从而提高提取效率,缩短提取时间。又由于其环境多为常温,所以不会使淀粉与总黄酮一同浸出,因此比其它三种方法的黄酮提取效率高。

实验结果表明以70%乙醇为溶剂,超声提取经大孔吸附树脂分离,提取效率和总黄酮质量分数最高。

3.2 利用 CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA化学发光体系对黄酮抗氧化作用的量效关系研究,结果表明当黄酮的浓度在0.02~1000 μ g/ml范围内对DNA损伤均有良好的保护作用,并存在一定的剂量依从关系。

综上所述,葛根黄酮是一种有效的天然自由基清除剂,对DNA损伤具有明显的保护作用^[10]。本研究进一步验证了 CuSO_4 -Phen-VC- H_2O_2 -DNA化学发光体系可作为抗氧化的有效研究方法,也为进一步研究和开发天然植物黄酮类产品提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 姚新生. 天然药物化学[M], 第二版 北京: 人民卫生出版社, 1996. 191-195.
- [2] 彭芳. 黄酮类化合物的生物学作用[J]. 大理医学院学报, 1998, 7(4): 52.
- [3] 白凤梅, 蔡同一. 类黄酮生物活性及其机理的研究进展科学[J]. 中草药, 1999, 8: 11-13.
- [4] 李苑, 张敏. 中草药中黄酮类化合物提取工艺的研究概况[J]. 广东药学, 1999, 9(2): 4.
- [5] 郭建平. 葛根总黄酮不同工艺提取工艺的探讨[J]. 中草药, 1995, 26(10): 522.
- [6] 冯映冰, 王娟. 湖南安化山楂几种化学成分的研究[J]. 湖南中医学院学报, 1999(1): 15-16.
- [7] 李峥. 超声波提取银杏叶中总黄酮[J]. 桂林工学院学报, 2001, 21(3): 276-278.
- [8] 张健, 曹恩华. 抗氧化剂对DNA损伤的保护作用机制的研究[J]. 生物物理学报, 1997, 13(1): 123-127.
- [9] Zhang J, Cao EH, Qin JF. Study of mechanism of antioxidant protection against DNA damage[J]. ACTA Biophysica Sinica, 1997, 13(1): 123.
- [10] Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer[J]. Bioessays, 1999, 21(3): 238.