

加杨雄花序提取物体外抗氧化及对DNA损伤的保护作用研究

王 晓¹, 张红侠², 邓煜光¹, 时新刚¹, 刘建华¹

(1. 山东省科学院测试中心, 山东 济南 250014

2. 济南柴油机股份公司理化实验室, 山东 济南 250014)

摘 要: 利用比色法、化学发光法, 研究了加杨雄花序提取物在体外对 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 活性氧自由基的清除作用, 以及通过 Cu^{2+} -Phen- H_2O_2 -Vit.C-DNA 发光体系研究加杨雄花序提取物对 $\cdot OH$ 引起的 DNA 氧化损伤的保护作用。实验结果表明加杨雄花序提取物对 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 自由基均有明显的清除作用, 其 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.69、1.73、0.23mg/ml, 并能显著抑制 $\cdot OH$ 对 DNA 氧化损伤。

关键词: 加杨雄花序; 活性氧; DNA 损伤

Effects of the Extract of *Populus canadensis* Moench. Male Anthotaxy on Antioxidation and Prevention of DNA Damage Caused by Hydroxyl Radical in vitro

WANG Xiao¹, ZHANG Hong-xia², DENG Yu-guang¹, SHI Xin-gang¹, LIU Jian-hua¹

(1. Test Center, Shangdong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

2. Physics and Chemistry Lab, Jinan Diesel Engine Co. Ltd., Jinan 250014, China)

Abstract: The effects of the extract of male anthotaxy of *Populus canadensis* Moench. on removal of active oxygen species in some modified chemical systems were investigated by chemiluminescence and spectrophotometry. The inhibition of the damage of DNA chain induced by hydroxyl radical by the extract from male anthotaxy was observed by chemiluminescence. The results showed that the extract could efficiently remove $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 and the 50% inhibition concentrations (IC_{50}) were 0.

收稿日期: 2004-05-10

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Q2002b04)

作者简介: 王晓(1971-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为天然产物分离与纯化。

colorectal cancer. Epidemiology and clinical trials[J]. Pure and Applied Chemistry, 2002, 74(8): 1451-1459.

- [11] 方晓阳, 盛伟. 细胞凋亡的概念来源及其研究进展[J]. 生命的化学, 2003, 23(2): 121-123.
- [12] Kerr J F R, Winterford M, C Harmon B N. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy[J]. J Cancer, 1994, 73: 2013-2026.
- [13] 曹世龙, 许良中, 沈镇宙. 肿瘤学新理论和新技术[M]. 上海: 科技教育出版社, 1997. 267-286.
- [14] 吴镭. 药理学科学前沿与发展方向[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 43-53, 85-90, 195-206.
- [15] 陈伟光. 天然药物活性成分诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J].

中国中医药科技, 2002, 9(4): 255-256.

- [16] 刘睿, 顾谦群, 崔承彬. 来源于天然产物的细胞周期抑制剂[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(3): 251-254.
- [17] 汪承亚, 盛瑞兰, 江凡, 等. 吖啶橙/溴乙锭双荧光染色检测细胞凋亡的形态学方法[J]. 中国病理生理杂志, 1998, (1): 104-107.
- [18] 辛华. 细胞生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] 陈力. 生物电子显微术教程[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1998. 175-177.
- [20] 白志英, 王冬梅, 路丙社, 等. 小麦与叶锈菌互作过程中细胞程序性死亡的细胞学观察[J]. 实验生物学报, 2003, 36(5): 353-360.

69, 1.73, 0.23mg/ml, respectively. The extract also protected DNA chains from being damaged by hydroxyl radical.

Key words: *Populus canadensis* Moench; male anthotaxy; active oxygen; DNA damage

中图分类号 Q523

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)05-00216-04

加杨(*Populus canadensis* Moench.)系杨柳科杨属植物, 主要分布于辽宁、华北、西北、华东等地, 资源极为丰富。在《重修政和经史证类备用本草》以及《本草纲目》中记载着杨树皮、花煎汤止痢。杨树雄花序又称杨构花, 具有抑菌、消炎、抗病毒等功效, 被收载于1977年中国药典^[1]。民间常用其水煎剂治疗急性肠炎、细菌性痢疾等, 此外其对皮肤瘙痒及荨麻疹等症也有满意的效果^[1], 黄酮类成分是杨属植物的主要活性成分之一, 主要有芹菜素, 乔松素, 鼠李素, 白杨素, 乔松酮等^[1, 2]。本研究采用比色法和化学发光法研究加杨雄花序提取物(简称PE)在体外清除活性氧($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2)的作用, 并通过 Cu^{2+} -Phen- H_2O_2 -Vit.C-DNA发光体系研究PE对 $\cdot OH$ 引起的DNA氧化损伤的抑制作用, 初步评价了PE的抗氧化作用, 旨在为加杨雄花序的深入研究与开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料 加杨雄花序采于济南市植物园。

1.1.2 试剂 槲皮素、鲁米诺(luminol)、VC、小牛胸腺DNA、邻菲罗啉(Phen)均为Sigma公司产品; 邻苯三酚、Met、NBT、 $CuCl$ 、 Na_2CO_3 、 $NaHCO_3$ 、 H_2O_2 等试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 SHG-D型生物化学发光测定仪 上海上立检测仪器厂, Delta 320 pH计 Mettler-Toledo 仪器公司, 722型光栅分光光度计 上海分析仪器厂, BUCH旋转蒸发仪 BUCH公司。

1.2 方法

1.2.1 加杨雄花序提取物的制备

取40g阴干的样品, 粉碎后加入200ml甲醇回流提取2次, 每次3h, 合并滤液, 减压浓缩得提取物10.08g, 然后用甲醇溶解定溶于250ml的容量瓶中, 供以下分析用。

1.2.2 加杨雄花序提取物总黄酮的测定

参照文献^[3]以槲皮素为标准测定样品中总黄酮的含量。

1.2.3 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)清除活性的测定

参照文献^[4], 在5ml反应液中, 加入Met溶液1.0ml, NBT溶液0.5ml, 最后加入0.5ml VB_2 溶液, 混匀, 使 VB_2 浓度为 $3.0 \times 10^{-6} mol/L$, Met浓度为 $1.0 \times 10^{-2} mol/L$, NBT浓度为 $1.0 \times 10^{-4} mol/L$ 。分别在样品管中加入不同浓度的样品3.0ml, 在20W日光灯下, 距离40cm,

光照20min, 立即在722分光光度计上, 以不光照的试液作校正, 于560nm处测定吸光度为A, 加入样品的溶液测得的吸光度为 A_1 , 则清除率可计算为:

$$\text{清除率} = [(A - A_1) / A] \times 100\%$$

1.2.4 羟自由基($\cdot OH$)清除活性的测定

参考文献^[5], 采用邻菲罗啉- Cu^{+} -VC- H_2O_2 体系检测 $\cdot OH$ 清除能力。向测量管中依次加入50 μl 待测样品(或50 μl 甲醇作空白), 50 μl $1 \times 10^{-3} mol/L$ $CuCl$ 溶液, 20 μl $1 \times 10^{-3} mol/L$ VC溶液, 50 μl $1 \times 10^{-3} mol/L$ 邻菲罗啉溶液, 800 μl 0.05mol/L pH10.5碳酸缓冲液, 放入反应池中。最后注入1%的 H_2O_2 50.0 μl , 摇匀, 启动发光反应, 连续测定发光强度6s, 至出现峰值, 记录发光强度(CL), 清除自由基的物质可以降低发光强度, 根据发光强度的下降可以判断物质清除自由基的能力。

$$\text{发光抑制率} = [(\text{对照CL} - \text{样品CL}) / \text{对照CL}] \times 100\%$$

1.2.5 H_2O_2 清除活性的测定

参考文献^[5], 采用 H_2O_2 -鲁米诺-碳酸缓冲液(pH 9.5)体系检测 H_2O_2 。向测量管中加入50 μl 待测样品(或50 μl 甲醇作空白), 50 μl $1 \times 10^{-3} mol/L$ 鲁米诺溶液, 放入反应池中。800 μl pH9.5碳酸缓冲液, 最后加0.15% H_2O_2 50 μl , (反应总体积为1ml)启动发光反应, 连续测定反应强度6s, 至出现峰值, 记录发光强度(CL), 发光抑制率计算同上。

1.2.6 DNA损伤的化学发光体系

参考文献^[6], 采用 $CuSO_4$ -Phen-VC-DNA- H_2O_2 化学发光体系。该体系生成 $\cdot OH$ 能损伤DNA产生一迟于Phen本身发光信号的滞后的化学发光, 其发光强度与DNA的量成正比关系。具体操作是: 用0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH5.5)配制 $CuSO_4$ -Phen-VC-DNA溶液, 使 Cu^{2+} 、Phen、VC、DNA终浓度分别为 5.0×10^{-5} 、 3.5×10^{-4} 、 3.5×10^{-4} 、1.0 $\mu g/ml$, 加入一定量的PE(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 13%的 H_2O_2 溶液, 立即测量化学发光反应动力学曲线。

2 结果与分析

2.1 PE对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

甲硫氨酸(Met)作用于核黄素时可产生 $O_2^{\cdot-}$, 可还原氮蓝四唑(NBT), 使之转化为 CN_4H_4 , 而黄酮化合物可以抑制该反应, 故可依据抑制率来研究提取物对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果^[4]。如表1所示, 随着PE质量浓度的增加,

表 1 加杨雄花序提取物(PE)对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用(n=3)
Table 1 The scavenging effect of PE on $O_2^{\cdot-}$ (n=3)

提取物浓度(mg/ml)* PE concentration	黄酮浓度(μ g/ml) Flavonoids concentration	抑制率(%) Inhibition
0.10	7.69	7.70
0.20	15.38	30.00
0.50	38.44	44.08
1.00	76.89	53.04
2.00	153.77	72.00
3.00	230.66	82.01

*注: $y=20.466\ln(x) + 57.733$ $R^2=0.9836$, $IC_{50}=0.69\text{mg/ml}$ 。

对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率呈上升趋势。其发光抑制率 50% 的浓度 (IC_{50}) 为 0.69mg/ml (黄酮含量为 53.06 μ g/ml), 而对照实验槲皮素在本体系中的 IC_{50} 为 13.69 μ g/ml (见表 4), 说明 1.73mg/ml 的 PE 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力与之相当。

2.2 PE 对羟自由基($\cdot OH$)的清除作用

通过化学模拟体系研究 PE 对活性氧自由基的清除作用如表 2 所示。PE 的 IC_{50} 为 1.73mg/ml (即黄酮含量为 133.04 μ g/ml), 与 99.50 μ g/ml 的槲皮素的清除能力相当, 且随着浓度的增加, 其清除能力亦增强, 呈现一定的量效关系。众所周知, 羟自由基($\cdot OH$)是最活泼也最具危害性的自由基, 具有极强的反应性, 寿命极短, 在很多的缓冲液中, 只要一产生, 就会同缓冲溶液反应。它几乎可以攻击所用的邻近细胞, 同细胞中的所有成分发生反应, 对机体危害最大。而 PE 富含黄酮化合物, 具有较多的酚羟基, 因此, 可有效的还原羟基自由基, 另一方面由于 PE 可在分子内和分子间形成缔合氢键, 成为一个大的供氢体, 从而达到对羟基自由基清除的目的。

表 2 加杨雄花序提取物(PE)对 $\cdot OH$ 的清除作用(n=8)
Table 2 The scavenging effect of PE on $\cdot OH$ (n=8)

提取物浓度(mg/ml)* PE concentration	黄酮浓度(μ g/ml) Flavonoids concentration	发光峰值(cp6s) Chemiluminescence	抑制率(%) Inhibition
Control		19958 \pm 251	
0.20	15.38	18003 \pm 289	9.80
0.30	23.07	15461 \pm 363	22.53
1.00	76.89	12414 \pm 460	37.80
2.00	153.77	10258 \pm 234	48.60
3.00	230.66	7923 \pm 168	60.30
4.00	307.56	7012 \pm 282	66.00
5.00	384.45	5130 \pm 281	74.29

*注: $y=18.325\ln(x)+39.959$, $R^2=0.9754$, $IC_{50}=1.73\text{mg/ml}$ 。

2.3 PE 对 H_2O_2 的清除作用

H_2O_2 能在有 O_2 和碱性条件下氧化鲁米诺产生化学发光。如表 3 所示, PE 能显著抑制该体系的化学发光, 随着 PE 浓度的增大, 发光值明显下降, 其 IC_{50} 为 0.23mg/ml (黄酮含量为 17.69 μ g/ml), 说明 PE 具有清除 H_2O_2 的作用, 或能竞争性地夺取 H_2O_2 能量, 或者这两个作用兼

表 3 加杨雄花序提取物(PE)对 H_2O_2 的清除作用 (n=8)
Table 3 The scavenging effect of PE on H_2O_2 (n=8)

提取物浓度(mg/ml)* PE concentration	黄酮浓度(μ g/ml) Flavonoids concentration	发光峰值(cp6s) Chemiluminescence	抑制率(%) Inhibition
Control		49556 \pm 416	
0.10	7.69	31050 \pm 545	37.35
0.20	15.38	24884 \pm 331	49.47
0.50	38.44	20086 \pm 470	59.47
1.00	76.89	14128 \pm 283	71.49
2.00	153.77	9388 \pm 237	81.06
3.00	230.66	6461 \pm 237	86.96

*注: $y=14.39\ln(x)+71.048$, $R^2=0.9969$, $IC_{50}=0.23\text{mg/ml}$ 。

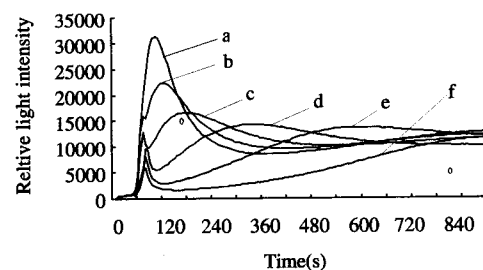
表 4 加杨雄花序提取物(PE)、槲皮素清除活性氧的能力(IC_{50})
Table 4 The scavenging effect of PE and quercetin on active oxygen (IC_{50})

	加杨雄花序提取物 PE(mg/ml)	槲皮素 Quercetin(μ g/ml)
超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)	0.69	13.69
羟自由基($\cdot OH$)	1.73	99.50
过氧化氢(H_2O_2)	0.23	14.20

而有之^[7]。槲皮素在本体系中的 IC_{50} 为 14.2 μ g/ml (见表 4), 在清除 H_2O_2 的能力上, 0.23mg/ml 的 PE 与 14.2 μ g/ml 的槲皮素相当。

2.4 PE 对 $\cdot OH$ 引发的 DNA 损伤的保护作用

$CuSO_4$ -Phen-VC- H_2O_2 化学发光体系生成的 $\cdot OH$ 等自由基引起 DNA 损伤断裂, 产生晚于 Phen 本身氧化发光信号的迟滞化学发光, 最大发光在 380~420nm, 此发光反应为鸟嘌呤的特征反应^[6], 代表 DNA 损伤产物发光。抗氧化剂的加入使 DNA 损伤发光峰值下降, 并使该峰的出现发生了时间的延迟, 峰值下降代表抗氧化剂抑制 DNA 损伤, 发射峰的延时代表抗氧化剂延迟了 DNA 的损伤。实验结果 (如图 1) 显示, PE 能使 DNA 损伤产物发光峰值明显下降, 而且浓度越大峰值下降越多。说明 PE 具有抑制和延迟的 DNA 氧化损伤的双重作用, 是



曲线 a-f, PE 浓度分别为 0、0.20、0.50、1.00、2.00、3.00mg/ml。
Curves a-f, the concentration of PE are 0, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00mg/ml, respectively.

图 1 PE 对 $\cdot OH$ 致 DNA 链损伤的抑制作用
Fig.1 Inhibitory effect of PE on the damage of DNA induced by hydroxyl radical

兼有预防型和断链型的抗氧化剂^[6]。

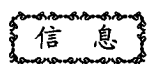
3 讨 论

活性氧自由基包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$)、多种有机氧自由基($RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$)、单线态氧(1O_2)、无机和有机过氧化物(H_2O_2 、 $ROOH$)等,它们有很强的生物活性^[8]。机体中适量的自由基对于细胞的分裂、分化、生长、消炎解毒起积极的作用;而过量则会对机体产生毒害,破坏生物大分子,影响细胞活性,主要损害细胞膜包括血管内皮细胞膜及亚微结构,并引起一系列有害的生化反应。现已明确自由基与许多病理生理现象都有密切的关系,如衰老、肿瘤、炎症、突变、心脑血管缺血、动脉粥样硬化、帕金森病等,尤其 $\cdot OH$ 是最活泼的活性氧自由基,它能与任何生物分子以极快的反应速率反应^[8]。而 H_2O_2 及 $O_2^{\cdot-}$ 等与 $\cdot OH$ 相比其反应活性不高,其对生物体的损伤可能通过与金属离子(Fe^{2+} 、 Cu^{2+})反应形成 $\cdot OH$ 而起作用,因此 $\cdot OH$ 可能是对生物体危害最大的氧自由基,尤其是 $\cdot OH$ 引发的DNA氧化损伤更令人关注^[9]。本实验结果表明,PE对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 等活性氧具有直接清除作用,加杨雄花序中的含有丰富的黄酮类化合物,这些物质在抗氧化反应中不仅能清除链反应引发阶段的自由基,而且可以直接捕捉自由基反应链中的自由基,阻断自由基链反应起到预防和断链的双重作用^[10],提示PE可能在抗衰老、抗炎症等方面发挥作用。据

此推断,加杨雄花序的抗氧化作用可能是民间验方的药理基础之一。

参考文献:

- [1] 王欣,汪红,王强.加杨雄花序的化学成分研究[J].中国药科大学学报,2000,31(3):171-173.
- [2] 王欣,汪红,王强.9种杨属植物雄花序中黄酮类含量的HPLC法测定[J].植物资源与环境学报,2000,9(1):61-62.
- [3] Kelly W, Wu XZ, Liu RH. Antioxidant activity of apple Peels[J]. J of Agric Food Chem. 2003, 51: 609-614.
- [4] 张虹,许钢,张辉,等.六月霜提取物清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 自由基的体外实验研究[J].食品科学,2000,21(7):31-34.
- [5] 胡天喜.自由基生命科学进展第5集[M].北京:原子能出版社,1997.65-71.
- [6] 张健,曹恩华,马文建,等.药物抗氧化作用对DNA发光动力学行为的影响[J].感光科学与光化学,1997,15(2):113-118.
- [7] 陈季武,朱振勤.褪黑素清除活性氧作用的研究[J].发光学报,1998,19:67-70.
- [8] 郑荣梁,黄中洋.自由基医学与农学基础[M].高等教育出版社,2001.
- [9] Dizdaroglu M. Chemistry of Free Radical Damage to DNA and Nucleoproteins. DNA and Free Radical [M]. London: Ellis Horwood, 1993. 19-39.
- [10] 刘莉华,宛晓春,李大祥.黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展[J].安徽农业大学学报,2002,29(3):265-270.



意大利开发出全球第一张有机包装纸

意大利维特波大学的科研人员研制开发出全球第一张完全无毒性、工艺无污染的有机包装纸张。这种有机纸的主要原料为麦、玉米及其他谷类的植物纤维,利用特殊生化科技,生产出浸透力强、微黄色并带有植物香味的纸张。目前,维特波大学已经与意大利生化公司签约,将联手合作在意大利南部开设一家工厂,生产并销售这种有机包装纸张。

加拿大新型益生菌巧克力和谷物食品将投放市场

加拿大益生菌生产公司宣布,他们已经成功研究出一种方法,可以较好地保持益生菌的稳定性,生产出一系列益生菌食品。他们将益生菌与巧克力混合,做成含益生菌的巧克力涂层或微粒,涂布在巧克力上,或添加到谷物食品中。该公司测试了含益生菌巧克力涂层中益生菌的稳定性,在室温下贮存6个月以后,存活率为86%。该公司的技术经理称,巧克力是益生菌良好的携带者,以这种方式将益生菌加入到食品中比将益生菌直接添加到食品中要容易得多。这一发现使公司有可能开发各种涂布巧克力食品或将其制成巧克力微粒加到其他食品中。目前,公司正在试制的其他益生菌食品包括婴幼儿配方食品、果汁等。