

怀槐培养细胞中异黄酮分析及其保肝作用

罗建平, 沈国栋, 姜绍通

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

摘 要: 怀槐愈伤组织具有异黄酮合成能力, HPLC 分析表明培养 3 周的愈伤组织中积累芒柄花黄素、染料木素、大豆甾元等三种主要异黄酮含量分别平均为 53.4、12.3、17.4 $\mu\text{g/g}$ FW。愈伤组织经乙醇提取和乙酸乙酯萃取可有效去除杂质, 萃取出的总异黄酮对小鼠四氯化碳急性肝损伤有显著的保护作用, 可以有效降低肝损伤引起的血清 GOT、GPT 升高, 增加血清 TP、Alb 的含量, 效果均好于甘草甜素片。

关键词: 怀槐; 愈伤组织; 异黄酮; 保肝作用

Abstract: Callus cultures induced from hypocotyl and cotyledon segments of *Maackia amurensis* have had the capacity for biosynthesis of isoflavones. HPLC analysis showed that the callus cultures have accumulated formononetin, genistein and daidzein, the three representative isoflavones found in the heartwood of *M. amurensis*. The average contents of formononetin, genistein and daidzein in callus cultured for 3 weeks were 53.4, 12.3 and 17.4 $\mu\text{g/g}$ cell fresh weight, respectively. Extraction of isoflavones by ethyl alcohol and ethyl acetate from callus cultures was an effectively impurity-reducing method. Total isoflavones from callus cultures have had a remarkable hepatoprotective effect against acute CCl₄-hepatitis in mice. Its hepatoprotective effects of attenuating the activities of serum aminotransferases (GOT and GPT) and elevating the content of serum albumin (Alb) were better than those of the glycyrrhizin tablets.

Key words: *Maackia amurensis*; callus; isoflavone; hepatoprotective function

中图分类号: R285.5

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2003)10-0139-04

野生药用植物怀槐(*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.)是豆科马鞍树属的一种落叶小乔木, 是现存于第三植物区系唯一的豆科孑遗树种, 是我国的珍贵植物, 《本草纲目》早有记载, 具有祛风湿、消炎、镇痛、健胃、止血等功效, 民间用于治疗肝脏疾病和胆囊炎^[1]。近十年国外对怀槐的化学成份和生物活性进行了研究, 发现怀槐异黄酮是关键药用成分^[2], 有显著的保肝和抗辐射损伤作用^[3,4]。国内已经注意到怀槐的药用开发前景, 开展了有关化学成分分离鉴定的工作^[5,6]。

由于怀槐生长缓慢, 常见花蕾不育, 一直作为木材和薪材大量砍伐, 使得野生资源遭受破坏^[1]。为积极探索怀槐药用资源的合理利用途径, 既开发其药用价值, 又保护野生资源, 我们成功诱导出怀槐愈伤组织, 期望通过植物次生代谢细胞工程方法可持续开发怀槐药用资源。本文对怀槐愈伤组织异黄酮的提取和含量进行了比较分析, 并研究了怀槐愈伤组织总异黄酮的保肝作用, 为进一步开发怀槐培养细胞作为保肝食品添加剂做了有益的探讨。

1 材料与方法

收稿日期: 2003-02-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170059)

作者简介: 罗建平(1966-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物生物技术。

1.1 材料

愈伤组织由怀槐无苗的的子叶或下胚轴在附加 2,4-D 2.0mg/ml 和 BA 0.5mg/ml 的 B5 培养基上诱导获得, 诱导出的愈伤组织经过反复筛选得到疏松愈伤组织培养系。继代培养时每 100ml 三角瓶内装有 30ml 固体培养基, 接种愈伤组织 5.0 \pm 0.5g 鲜重, 于 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 每 4 周转接 1 次。愈伤组织生长以生长指数(鲜重增加/接种量)表示。

昆明种小白鼠(20 \pm 2g), 雌雄兼用, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 合格证号: 皖医实动准 9901。

1.2 主要仪器与试剂

仪器 Waters 高效液相色谱仪, 包括 515 型泵、UV-2487 检测器、WSC 色谱工作站(中科院大连化物所)、进样器(HAMILTON Co.); RE-52AA 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; UV1600 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; USC202 超声波仪 上海波龙电子设备有限公司; SZ-2 自动双重纯水蒸馏器 上海沪西分析仪器厂; 紫外透射反射分析仪 上海康禾光电仪器有限公司。

试剂 甲醇(色谱纯)、乙醇(分析纯)、乙酸乙

酯(分析纯)、乙酸(分析纯); HSG-F254 薄层硅胶板 烟台化学工业研究所; 三种异黄酮标准品大豆甙元(daidzein)、染料木素(genistein)和芒柄花黄素(formononetin)均购自 Sigma 公司, 纯度 $\geq 98\%$ 。所有色谱用试剂都经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。

1.3 愈伤组织异黄酮的提取

准确称取定量的怀槐愈伤组织充分匀浆后于 95% 乙醇冷浸 24h , 经超声波处理 30min , 过滤。滤液 40°C 下减压浓缩至浸膏, 用乙酸乙酯—水(体积比 $5:1$) 混合溶液萃取 3 次, 乙酸乙酯部分 40°C 下减压蒸干。将乙醇提取物和乙酸乙酯萃取物分别用甲醇溶解定容, $0.22\mu\text{m}$ 膜过滤后用 TLC 和 HPLC 进行定性和定量分析。

1.4 愈伤组织异黄酮的定性与定量分析

分别取大豆甙元、染料木素和芒柄花黄素各 10mg , 用甲醇溶解, 并定容至 100ml , 配成对照品溶液。TLC 分析时, 分别将愈伤组织异黄酮提取物和标准品溶液点到 $5\text{cm} \times 10\text{cm}$ 薄层硅胶板上, 以甲苯—乙酸乙酯—甲酸(体积比 $3:2:0.4$) 为展开剂上行展开, 展距 8cm , 用冷风吹干后, 在 245nm 紫外灯下观察展开情况并照相。HPLC 分析时, 色谱柱为美国 Merck 公司的 Purospher@STARC18 柱($4.6\text{mm i.d.} \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$), 流动相为甲醇—水—乙酸(体积比 $10:10:1$) 溶液, 柱温 25°C , 进样体积 $20\mu\text{l}$, 流速 1.0ml/min , 检测波长 260nm , 灵敏度为 3.0AUFS , 大豆甙元、染料木素和芒柄花黄素三种异黄酮的标准曲线分别是 $Y=4.58(10^4X+1.07 \times 10^4(r=0.9991))$ 、 $Y=6.37 \times 10^4 X - 1.45 \times 10^4(r=0.9992)$ 和 $Y=6.50 \times 10^4 X - 2.92 \times 10^5(r=0.9991)$ 。

1.5 怀槐异黄酮提取物的保肝作用实验

甘草甜素片(江苏黄河药业股份有限公司)、乙酸乙酯萃取的怀槐愈伤组织异黄酮提取物(MIE, 含总异黄酮 346mg/g DW)使用前以 0.5% CMC 配成适当的混悬液。取昆明种小鼠 70 只, 随机分为空白对照组、溶剂对照组、肝损伤模型组、甘草甜素片组、怀槐异黄酮小剂量组、中剂量组及大剂量组, 分别灌胃给药(空白对照组和肝损伤模型组小鼠灌胃等容量生理盐水), 每天 1 次, 共 7d 。末次给药后 1h , 除空白对照组灌胃等容量的麻油外, 其它各组小鼠灌胃 0.1% 的 CCl_4 麻油溶液 10ml/kg , 同时禁食, 自由饮水。 24h 后眼球取血, 离心分离血清, 用检测试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)测定血清谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)含量。统计学方法采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 怀槐愈伤组织异黄酮的提取与分析

怀槐愈伤组织的乙醇提取物经 TLC 展开后, 与标准品对照在紫外光下可见异黄酮蓝紫色斑点(图 1), 进一步用 HPLC 分析, 在提取物中含有芒柄花黄素、染料木素和大豆甙元三种异黄酮组分, 说明怀槐培养细胞具有合成异黄酮的能力。愈伤组织乙醇浸膏 HPLC 图谱中峰多而复杂, 当经过乙酸乙酯萃取后峰明显减少, 芒柄花黄素、染料木素和大豆甙元三种异黄酮峰清晰, 为主要组分峰(图 2)。分析结果表明, 怀槐愈伤组织乙醇浸膏经乙酸乙酯萃取物适合用于怀槐异黄酮的保肝实验研究。

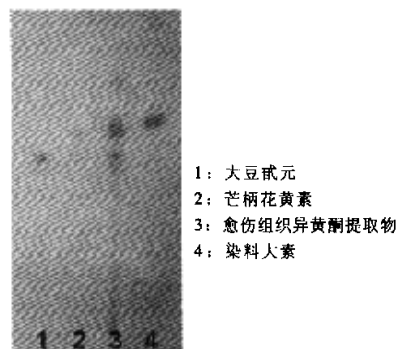


图 1 怀槐愈伤组织中异黄酮的薄层层析分析

2.2 怀槐愈伤组织生长和异黄酮含量

光照条件怀槐愈伤组织生长和异黄酮合成的影响显著(表 1)。光照下培养 3 周的愈伤组织鲜重增加只有暗中愈伤组织鲜重增加的 57.6% , 但光照促进染料木素和大豆甙元的合成, 它们在光照下生长的愈伤组织中含量是暗中愈伤组织的 1.7 倍。光照对芒柄花黄素的合成没有影响。愈伤组织中芒柄花黄素积累大大超过染料木素和大豆甙元的积累, 光照下芒柄花黄素含量分别是染料木素和大豆甙元的 3.6 倍和 2.5 倍, 暗中芒柄花黄素含量分别是染料木素和大豆甙元的 5.6 倍和 4.1 倍。光照下愈伤组织中总异黄酮含量比暗中培养的愈伤组织高 25.3% 。

表 1 光照条件对怀槐愈伤组织生长和异黄酮积累的影响

培养条件	生长指数	异黄酮含量($\mu\text{g/g FW}$)			总异黄酮含量($\mu\text{g/g FW}$)
		芒柄花黄素	染料木素	大豆甙元	
光照	0.9	54.8	15.3	22.1	92.2
黑暗	1.5	51.9	9.2	12.7	73.8
平均异黄酮含量($\mu\text{g/g FW}$)		53.4	12.3	17.4	83.1

表2 怀槐异黄酮对小鼠四氯化碳肝损伤的保肝作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	GOT(% of control)	GPT(% of control)	TP(% of control)	Alb(% of control)
空白对照	10	—	100.0 \pm 8.1	100.0 \pm 9.3	100.0 \pm 5.4	100.0 \pm 10.8
溶剂对照	10	—	183.1 \pm 24.3 ^b	205.7 \pm 16.8 ^b	78.9 \pm 18.1 ^b	86.0 \pm 12.3 ^b
肝损伤模型	10	—	193.3 \pm 10.9 ^b	209.8 \pm 9.1 ^b	77.8 \pm 7.5 ^b	83.2 \pm 17.9 ^a
甘草甜素片	10	0.3	160.1 \pm 10.6 ^{c,e}	189.6 \pm 9.4 ^{c,e}	101.4 \pm 8.3 ^{d,e}	107.6 \pm 7.4 ^{d,e}
MIE 小剂量	10	0.2	158.8 \pm 6.1 ^{c,e}	193.6 \pm 7.3 ^c	95.4 \pm 3.2 ^{c,e}	126.6 \pm 11.5 ^{d,e,f}
MIE 中剂量	10	0.3	152.3 \pm 10.0 ^{d,e}	190.4 \pm 10.4 ^{c,e}	92.5 \pm 7.6 ^c	131.4 \pm 14.6 ^{d,e,f}
MIE 大剂量	10	0.5	141.1 \pm 4.4 ^{d,e,f}	172.4 \pm 7.6 ^{d,e,f}	110.1 \pm 16.5 ^{c,e}	179.6 \pm 41.0 ^{d,e,f}

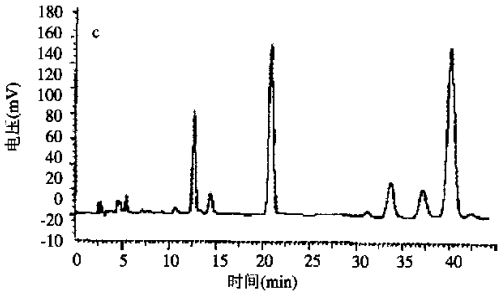
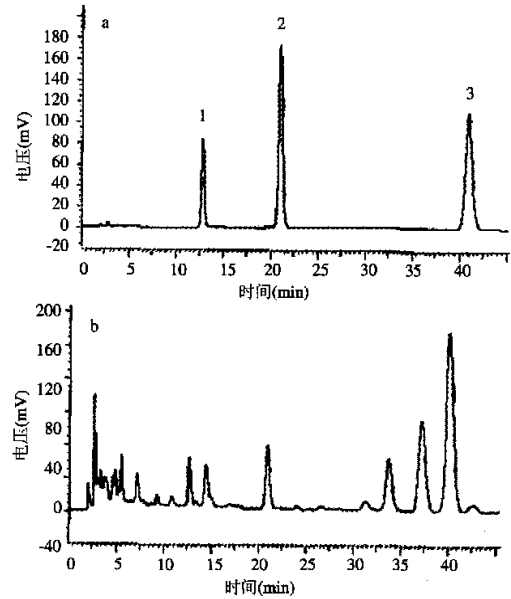
注: a: 与空白对照组比较 $p < 0.05$; b: 与空白对照组比较 $p < 0.01$; c: 与溶剂组比较 $p < 0.05$; d: 与溶剂组比较 $p < 0.01$; e: 与肝损伤组比较 $p < 0.01$; f: 与甘草甜素组比较 $p < 0.01$ 。

2.3 怀槐愈伤组织总异黄酮提取物的保肝作用

小鼠急性肝损伤前连续给药7d, 肝损伤后3种不同剂量的MIE组GOT和GPT活性均显著下降(表2), TP和Alb含量均显著升高, 以0.5g/kg MIE给药组效果最好, 与肝损伤模型组相比, GOT和GPT活性分别降低了52.2%和37.4%, TP和Alb含量分别升高了32.3%和49.9%。结果表明怀槐愈伤组织异黄酮提取物可以有效降低小鼠四氯化碳肝损伤引起的血清GOT、GPT升高、增加血清TP、Alb的含量, 与肝损伤模型组和溶剂对照组比较均有显著性差异, 对小鼠四氯化碳肝损伤有明显的保护作用, 且其对血清转氨酶活性降低和血清Alb含量升高的效果好于甘草甜素片。

3 讨论

怀槐化学成分和药理研究的报道多是以心材为材料, 目前已从心材醇浸出的多酚化合物中分离出包括



1: 大豆甙元 2: 染料木素 3: 芒柄花黄素
图2 三种异黄酮标准品(a)及怀槐愈伤组织乙醇浸膏(b)及其乙酸乙酯萃取物(c)中异黄酮的HPLC色谱图

芒柄花黄素和染料木素为主的共11种异黄酮类组分, 动物实验表明它们具有显著的保肝作用^[2]。但怀槐离体细胞培养物中异黄酮类组分的积累变化及其保肝药理作用尚未见研究。本文研究证明怀槐愈伤组织培养细胞具有合成野生植株心材中所含有的主要异黄酮类组分的能力, 并且培养细胞合成异黄酮的能力受培养环境的调节, 光促进合成。结合TLC和HPLC分析可以看出, 在怀槐愈伤组织异黄酮提取过程中, 用乙酸乙酯萃取乙醇提取物能有效减少杂质, 萃取物中芒柄花黄素、染料木素、大豆甙元占主要部分, 其它成分很少, 适合研究愈伤组织异黄酮类组分的保肝作用。

研究保肝作用的一种常用动物模型是CCl₄急性肝损伤模型。CCl₄进入肝细胞后, 经肝微粒体细胞色素P-450酶激活后生成·CCl₃, 引起肝微粒体脂质过氧化反应, 损伤肝细胞膜的结构和功能, 导致肝脂变和肝坏死^[4], 在血清中表现为转氨酶活性升高、TP和Alb含量下降。本文结果表明, 怀槐愈伤组织总异黄酮组分三个剂量组均可显著降低四氯化碳所致小鼠血清中GOT和GPT活性升高, 增加TP和Alb含量, 提示怀槐愈伤组织异黄酮组分对四氯化碳所致的小鼠急性肝损伤具有较好的保护作用, 其保肝效果明显好于目前常用的护肝药甘草甜素片。研究结果为运用植

物细胞工程技术可持续开发怀槐离体培养细胞异黄酮组分作为保肝食品添加剂提供了实验依据, 其应用正在进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘娟, 王良信. 一种新的药用植物资源[J]. 中国野生植物资源, 1997, 16: 22-25.
- [2] Fedoreyev S A, Pokushalova T V, Veselova M V et al. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis* [J]. *Fitoterapia*, 2000, 41: 365-372.
- [3] Vengerovski A I, Kovalenko M Y, Arbuzov A G et al. The influence of hepatoprotectors of plant origin on prednisolone effects in experimental toxic hepatitis[J]. *Rastit Resursy*, 1998, 34: 91-95.
- [4] Palagina M V, Bezdetko G N, Moisejenko L I. Biological activity of extract of *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. wood in correction of irradiation damage of lung surfactant in rats[J]. *Rastit Resursy*, 2000, 36: 78-82.
- [5] 曲香芝, 李景道, 金光洙等. 朝鲜槐化学成分的研究[J]. 中草药, 1997, 28: 72-73.
- [6] 黄文哲, 段金殿, 李正亮. 怀槐的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26: 403-405.
- [7] 王根生, 韩哲武. 甘草类黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的影响[J]. 药学报, 1993, 28: 572-574.

西藏干酪乳酸菌降胆固醇特性研究

肖琳琳, 董明盛*

(南京农业大学食品科技学院, 南京 210095)

摘 要: 从西藏传统发酵乳(西藏灵菇)中分离筛选到 1 株高效降胆固醇乳酸菌 KM-16。应用 VITEK-32 全自动微生物分析系统鉴定该菌为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。在液体培养基中 KM-16 乳酸菌对降胆固醇达 51.8%。用 KM-166 灌胃高脂血症模型小鼠研究其对血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)的影响。结果表明灌胃 14d 后, 实验组小鼠血清中 TC、TG 浓度较对照组显著降低($p < 0.01$), 同时 HDL-C 浓度有所增加, 动脉硬化指数(AI)低于对照的水平。

关键词: 西藏灵菇; 干酪乳杆菌; 降胆固醇; 高脂血症

Abstract: Cholesterol-degrading strains KM-16 was isolated from Tibet traditional koumiss. Using VITEK-32 Automatic Microbe Analytic Systems, the isolate was identified as *Lactobacillus casei*. In MRS medium, KM-16 strain showed 51.8% of cholesterol was degraded. The cholesterol-degrading activities of the strains were mainly due to their bile salt coprecipitation activity and the cholesterol assimilation. The effects of KM-16 on the total serum cholesterol(TC), triglycerids(TG) and high density cholesterol(HDL-C) were investigated in artificially-induced hyperlipemial mice. The results showed that the mean values for TC and TG concentrations decreased significantly after feeding 14d while HDL-C in serum increased at the same time.

Key words: tibet koumiss; *Lactobacillus casei*; cholesterol degradation; hyperlipidemia

中图分类号: TS214.204

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)10-0142-04

胆固醇在人体内具有重要的生理作用, 但血清中胆固醇含量过高容易诱发动脉硬化, 从而导致一系列心血管疾病。近年来国外的研究表明乳酸菌具有较强的降胆固醇作用, 适量饮用乳酸菌及乳酸菌发酵乳可有效降低血液胆固醇含量, 从而减少心血管疾病的发病几率^[1,2]。国内对降胆固醇乳酸菌的开发刚刚起步。本研究从西藏传统发酵乳(谷称西藏灵菇, 藏菇)中分离到 1 株有效降解胆固醇的乳酸菌 KM-16, 并用实验

性高脂血小鼠模型对该菌在体内的降血脂作用进行了实验研究。

1 材料和方法

1.1 分离材料及培养基

1.1.1 材料

西藏灵菇来源于西藏, 本实验室保存。

1.1.2 培养基

收稿日期: 2003-02-15 * 通讯联系人

基金项目: 江苏高技术研究发展计划(BJ2002322); 国家(863)高技术研究发展计划(2002AA248041)

作者简介: 肖琳琳(1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学与生物技术。