

八角茴香总黄酮抗氧化活性研究

王 硕, 司建志, 龚小妹, 周小雷, 缪剑华*

(广西药用植物研究所 西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 广西南宁 530023)

摘要: 本实验采用 Fenton 法测定了八角茴香总黄酮(FIVR)对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除作用,并与维生素 C(V_c)进行了比较,采用 FRAP 法测定了总抗氧化能力(T-AOC);采用腹腔注射 D-半乳糖建立亚急性衰老小鼠模型。动物随机分为正常对照组、模型对照组、阳性对照组、FIVR 高、中、低剂量组(200、100、50 mg/g·d)。实验 48 d 后处死动物,称量体重,计算器官指数,测定小鼠血清、肝脏和脑组织中的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力。结果发现,八角茴香总黄酮(FIVR)对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率和 T-AOC 均随着浓度的增加而上升;模型组小鼠体重、肝脏、脑指数及血清、肝、脑组织中 SOD 和 GSH-Px 活力均明显低于正常组,建模成功;而 FIVR 各给药组及 V_c 组小鼠体重、肝脏、脑指数及血清、肝、脑组织中 SOD 和 GSH-Px 活力均高于模型组。说明八角茴香总黄酮(FIVR)具有明显的抗氧化活性。

关键词: 八角茴香总黄酮, 抗氧化, 超氧化物歧化酶, 谷胱甘肽过氧化物酶

Study on antioxidative effect of total flavonoids from *Illicium verum*

WANG Shuo, SI Jian-zhi, GONG Xiao-mei, ZHOU Xiao-lei, MIAO Jian-hua*

(Institute of Guangxi Medicinal Plant, National engineering laboratory of southwest endangered medicinal resources development, Nanning 530023, China)

Abstract: The clearance effect of total flavonoids from *Illicium verum* (FIVR) on $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ were determined using Fenton method and compared with that of vitamin C. Total antioxidant capacity (T-AOC) were determined using FRAP method to evaluate FIVR *in vitro* antioxidant activity. The aging mice model was established by the intraperitoneal injection of D-galactose. The mice were randomly divided into normal control group, model group, positive control group, FIVR high, medium and low-dose groups (200, 100, 50 mg/g·d). After administrations for 48 d, the body weight of mice were determined, then the organ coefficients were counted. The content of SOD, GSH-Px of liver, brain tissue and in the blood was detected. From FIVR antioxidant experiment *in vitro*, the clearance rate of $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and T-AOC were increased with the increase of concentration. The body weight of mice, liver index, brain index and the activity of SOD, GSH-Px in liver tissue, brain tissue of model group were lower than normal group, which proved successful model; each FIVR dose group mice weight, liver index, brain index and the activity of SOD, GSH-Px in liver tissue and brain tissue were higher than model group. This study shows that FIVR has obvious antioxidation activity.

Key words: total flavonoids from *Illicium verum*; antioxidation; SOD; GSH-Px

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)23-0075-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.23.007

八角茴香(*Illicium verum* Hook.f.)的干燥成熟果实八角为我国特有香辛料和中药材,主要分布于广西、广东、云南等地,其味辛,性温,有温阳散寒,理气止痛功效,用于寒积腹痛,肾虚腰痛等症^[1]。目前八角茴香中已被开发的生物活性成分主要为挥发油、合成雌激素己烷雌酚以及合成抗禽流感药物“达菲”的莽草酸,而八角茴香中具有重要药理作用的黄酮类成分尚未得到研究与开发。

近年来有关植物黄酮作为天然抗氧化剂的研究

备受关注,对竹叶总黄酮^[2]、沙棘叶黄酮^[3]、银杏黄酮^[4]等植物黄酮的抗氧化活性研究表明黄酮类化合物是良好的天然抗氧化剂。研究发现,八角茴香乙醇提取物能清除体外自由基,具有明显的抗氧化活性^[5],而黄酮类化合物作为八角茴香乙醇提取物中的重要成分,其抗氧化活性还未曾有学者进行研究。本实验研究了八角茴香总黄酮(FIVR)体外对好氧自由基的清除率、总抗氧化能力以及体内拮抗腹腔注射 D-半乳糖致衰老小鼠所受氧化损伤,考察八角茴

收稿日期: 2015-01-13

作者简介: 王硕(1973-),男,博士,副主任药师,研究方向: 中药药效筛选与新药研发, E-mail: ws428@163.com。

* 通讯作者: 缪剑华(1962-),男,博士,研究员,研究方向: 药用植物资源学, E-mail: mjh1962@vip.163.com。

基金项目: 国家科技支撑计划“八角饮片及提取物质量评价和生产过程标准研究”(2011BAI01B04)。

香总黄酮的抗氧化活性,旨在为八角茴香的综合利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

昆明种小鼠,体重(20±2)g,广西医科大学实验动物中心提供,许可证号:2009-0002;八角茴香总黄酮(西南濒危药材资源开发国家工程实验室提供,总黄酮含量:87.5%),D-半乳糖(Ruitaibio,CAS:59-23-4),维生素C(广西南宁百会药业集团有限公司,生产批号:140303)。羟自由基试剂盒(生产批号:20140411)、超氧阴离子试剂盒(生产批号:20140410)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(生产批号:20140411)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(生产批号:20140411)、谷胱甘肽过氧化物酶(GXH-Px)试剂盒(生产批号:20140408)、考马斯亮蓝试剂盒(生产批号:20140619),均购自南京建成生物工程研究所,其余试剂均为分析纯。

UVmini-1240 紫外可见分光光度计 日本岛津公司;Sigma 4K15 台式冷冻离心机 德国 Sartorius 公司;HH-4 数显恒温水浴锅 国光电器有限公司;JJ500 型电子天平 常熟市双杰测试仪器厂;CP224S 型电子分析天平 德国 Sartorius 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外抗氧化实验

1.2.1.1 对羟基自由基的清除作用 用双蒸水将 FIVR 配制成 0.1~1 mg/mL 系列浓度的溶液,严格按照试剂盒说明书上操作,双蒸水调零,在 550 nm 处测出对照管 A_j ,测定管 A_i 的吸光度。八角茴香总黄酮对羟基自由基的清除率(%) = $(1 - A_i/A_j) \times 100$ 。

1.2.1.2 对超氧阴离子自由基的清除作用 用双蒸水将 FIVR 配制成 0.1~1 mg/mL 系列浓度的溶液,严格按照试剂盒说明书上操作,双蒸水调零,在 550 nm 处测出对照管 A_j ,测定管 A_i ,空白管 A_0 的吸光度。八角茴香总黄酮对超氧阴离子自由基的清除率(%) = $[1 - (A_i - A_0)/(A_j - A_0)] \times 100$ 。

1.2.1.3 总抗氧化能力的测定 用双蒸水将 FIVR 配制成 0.1~1 mg/mL 系列浓度的溶液,严格按照试剂盒说明书上操作,双蒸水调零,在 520 nm 处测出测定管 A_i 、对照管 A_j 的吸光度,将在 37 °C 每分钟每毫升样品溶液使反应体系的吸光度值每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位。八角茴香总黄酮总抗氧化能力 = $[(A_i - A_j)/0.01 \times 30] \times V_0/V_1$ 。式中: V_0 为反应液总体积; V_1 为样品液体积。

1.2.2 体内抗氧化实验 将 60 只昆明种小鼠(雌雄各半)随机分为正常组(control)、模型组(model)、维生素 C 对照组(V_c)、八角茴香总黄酮高(FIVR-H)、中(FIVR-M)、低(FIVR-D)剂量组,每组 10 只。小鼠适应性饲养一周后,参考文献^[6]制备衰老模型,除 control 组之外,各组小鼠每天腹腔注射 D-半乳糖,注射剂量 100 mg/g,control 组小鼠注射等量的生理盐水;FIVR-H、FIVR-M、FIVR-D 每天灌胃八角茴香总黄酮水溶液,剂量为 200、100、50 mg/g, V_c 组每天灌胃 100 mg/g 剂量的维生素 C 水溶液,control 和

model 组每天灌胃等量的生理盐水,连续给药 48 d,其间实验小鼠自由摄食饮水,每天称量体重,根据体重调整给药量。

末次给药后,禁食 24 h,小鼠摘眼球取血,4 °C 冰箱静置 12 h,3000 r/min 低温离心 10 min,取上层血清,-20 °C 冰箱中保存待测;小鼠取血后,迅速脱颈椎处死,取出脑、肝,预冷生理盐水冲洗后,滤纸拭干表面生理盐水,称重,在冰浴下制备组织匀浆液,于 4 °C,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20 °C 冰箱中保存待测。按照试剂盒说明书上操作,测定并计算血清、脑组织、肝组织中 SOD、GSH-Px 的活性。实验结果采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,结果以($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 体外抗氧化活性

2.1.1 对羟基自由基和超氧阴离子自由基的影响 由图 1、图 2 可以看出,FIVR 对 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率均随着浓度的上升而增加,但效果低于 V_c 。FIVR 对 $\cdot OH$ 的 IC_{50} 为 0.212 mg/mL,FIVR 对 $O_2^{\cdot -}$ 也有一定的清除作用。表明其具有作为天然抗氧化剂的潜在价值。

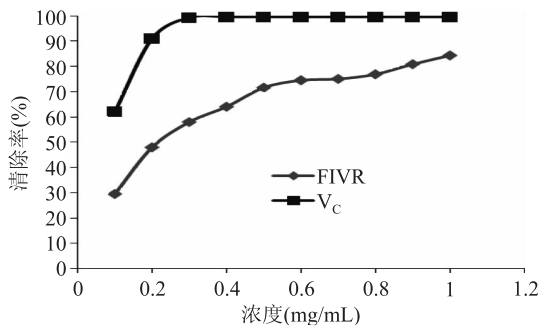


图1 FIVR、 V_c 对 $\cdot OH$ 的清除能力

Fig.1 The clearance rate of FIVR and V_c on $\cdot OH$

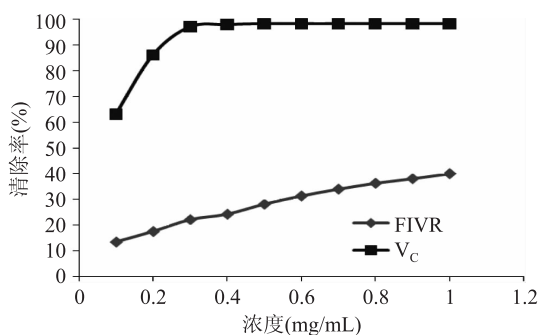


图2 FIVR、 V_c 对 $O_2^{\cdot -}$ 的清除能力

Fig.2 The clearance rate of FIVR and V_c on $O_2^{\cdot -}$

2.1.2 总还原力(T-AOC)的测定 由图 3、图 4 可见,由于所用抗氧化剂 V_c 的纯度很高,所以曲线上升很快。FIVR 总还原力也随着浓度上升而上升,FIVR 的质量浓度为 0.8 mg/mL 时的总还原力相当于 0.05 mg/mL V_c 的总还原力,表明 FIVR 具有较好的抗氧化活性。

2.2 体内抗氧化活性

2.2.1 对衰老小鼠体重及脏器指数的影响 由表 1

表1 对衰老小鼠体重的影响($g, \bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 The effect of FIVR on weight of aging mice($g, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	1 d	11 d	21 d	31 d	41 d
空白组	31.06 ± 3.72	36.58 ± 4.78	37.55 ± 4.15	39.57 ± 5.02	39.98 ± 5.93
模型组	30.07 ± 3.15	34.66 ± 4.49 *	34.71 ± 3.45	35.21 ± 4.36 **	36.19 ± 4.43 **
V _c	31.01 ± 4.50	35.94 ± 6.27	35.83 ± 4.77	35.71 ± 3.72	38.12 ± 6.86
FIVR-H	31.28 ± 3.14	35.32 ± 3.37	35.36 ± 2.45	36.53 ± 3.44 *	37.64 ± 4.20 *
FIVR-M	30.55 ± 3.17	34.61 ± 4.28	35.68 ± 3.75	36.71 ± 4.34 *	38.04 ± 4.67
FIVR-D	31.22 ± 4.5	35.15 ± 3.97	34.13 ± 3.46	35.71 ± 3.72 **	36.75 ± 4.33 *

注:与空白组比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

表3 对衰老小鼠血清、肝组织、脑组织 SOD 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The effect of FIVR on SOD in the blood, liver and brain tissue($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/g·d)	血液(U/mL)	肝(U/mgprot)	脑(U/mgprot)
空白组	-	255.21 ± 22.87	268.12 ± 89.34	117.29 ± 30.75
模型组	-	187.45 ± 13.73 **	154.32 ± 32.94 *	78.93 ± 9.08 **
V _c	100	225.86 ± 11.51 ^{##}	219.04 ± 57.70 [#]	91.99 ± 14.21
FIVR-H	200	220.35 ± 20.32 ^{##}	212.74 ± 47.32 [#]	90.84 ± 6.60 [#]
FIVR-M	100	204.64 ± 10.04 ^{##}	171.58 ± 29.18	87.08 ± 8.90 [#]
FIVR-D	50	195.40 ± 12.97	180.56 ± 25.85	82.38 ± 10.97

注:与空白组比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;与模型组比较: [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$,表2、表4同。

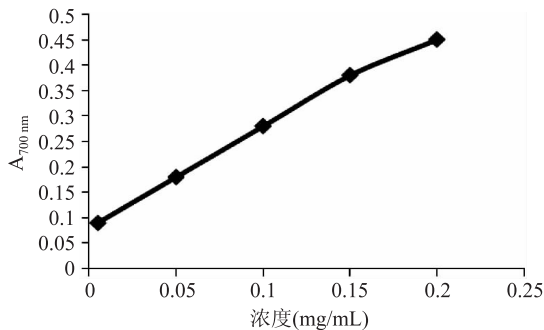


图3 V_c总还原力(T-AOC)

Fig.3 Total antioxidative capacity of V_c

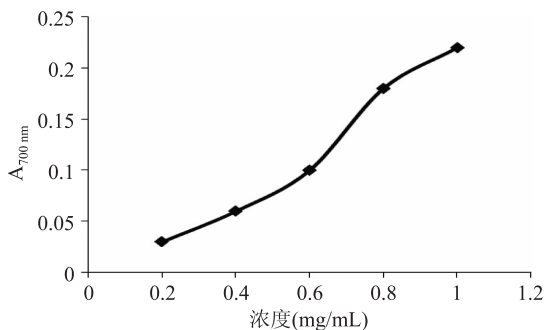


图4 FIVR总还原力(T-AOC)

Fig.4 Total antioxidative capacity of FIVR

可以看出,随着造模、给药天数的增加,各实验组小鼠体重均低于正常组,其中模型组小鼠体重最低,但V_c对照组和高、中、低剂量组小鼠体重与模型组相比均无显著差异($p > 0.05$)。

由表2可以看出,各实验组小鼠肝脏指数均明显低于正常组,与模型组比较,V_c对照组和高、中、低剂量组均有提高。各实验组小鼠脑指数均低于正常组小鼠,与模型组比较,V_c对照组和高、中、低剂量组

均有提高,高剂量组有显著差异($p < 0.05$)。

表2 对衰老小鼠肝脏及脑指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The effect of FIVR on liver index, brain index of aging mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肝指数	脑指数
空白组	3.83 ± 0.26	1.21 ± 0.13
模型组	2.87 ± 0.33 **	1.10 ± 0.13 *
V _c	3.47 ± 0.57	1.14 ± 0.19
FIVR-H	3.31 ± 0.34 ^{###}	1.18 ± 0.08 [#]
FIVR-M	3.47 ± 0.38 ^{###}	1.14 ± 0.12
FIVR-D	3.34 ± 0.35 ^{###}	1.15 ± 0.12

2.2.2 对衰老小鼠体内超氧化物歧化酶(SOD)的影响 由表3可以看出,与正常组比较,模型组血清、肝脏、脑组织中SOD的活性均显著降低,其它各组SOD的活性也显著下降($p < 0.05, p < 0.01$)。与模型组比较,V_c对照组,给药组高、中剂量血清中SOD的活性均有提高;与模型组比较,V_c对照组与给药组高剂量肝脏组织中SOD的活性有显著提高,而中、低剂量组差异不明显;与模型组比较,给药组高、中剂量脑组织中SOD的活性有显著提高,V_c对照组与低剂量组差异不明显。

2.2.3 对衰老小鼠体内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的影响 由表4可以看出,与正常组比较,模型组血清、肝脏、脑组织中GSH-Px的活性均显著降低;其它各组GSH-Px的活性也显著下降。与模型组比较,V_c对照组,给药组高、中剂量血清中GSH-Px的活性均有提高;与模型组比较,V_c对照组,给药组高、中剂量肝脏组织中GSH-Px的活性均有提高;与模型组比较,给药组中剂量脑组织中GSH-Px的活性有显著提高,其余各组差异不明显。

表4 对衰老小鼠血清、肝组织、脑组织 GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 The effect of FIVR on GSH-Px in the blood, liver and brain tissue($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/g·d)	血液(U/mL)	肝(U/mgprot)	脑(U/mgprot)
空白组	-	214.03 ± 42.11	532.44 ± 49.09	111.53 ± 27.12
模型组	-	123.01 ± 24.92**	419.85 ± 32.40**	55.94 ± 16.73**
V _c	100	162.85 ± 16.41 [#]	496.18 ± 39.07 ^{##}	76.28 ± 25.42
FIVR-H	200	179.71 ± 14.49 ^{##}	494.28 ± 52.63 [#]	73.71 ± 28.06
FIVR-M	100	171.47 ± 9.30 ^{##}	499.36 ± 41.64 ^{##}	85.56 ± 20.37 [#]
FIVR-D	50	157.35 ± 39.02	472.14 ± 41.66	73.92 ± 19.17

3 结论与讨论

活性氧自由基的化学性质非常活跃,超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$),羟自由基($\cdot OH$)是生物体内最主要的活性氧自由基。 $\cdot OH$ 是机体内氧化性最强的自由基,能与任何活细胞中分子产生化学反应,引发机体组织核酸断裂、蛋白质聚合与解聚、脂质过氧化等生化过程,导致机体各类疾病发生和加速进程衰老^[7]。 $O_2^- \cdot$ 与许多疾病有密切联系,能导致不饱和脂肪酸过氧化,核酸、蛋白质等生物大分子氧化受损失活变性,引发酶系失活、线粒体氧化磷酸化以及遗传基因突变等疾病^[8]。

本实验研究发现,随着浓度的上升,八角茴香总黄酮体外对 $\cdot OH$ 与 $O_2^- \cdot$ 的清除率和总抗氧化能力逐渐增加,对 $\cdot OH$ 的清除效果明显优于 $O_2^- \cdot$,质量浓度为0.8 mg/mL时的总还原力相当于0.05 mg/mL V_c的总还原力,表明其具有一定的抗氧化活性,但效果均不及V_c,这可能与所得八角茴香总黄酮纯化率比较低有关,也有可能是八角茴香总黄酮提取物中的其它成分干扰比色反应所致,有待对八角茴香总黄酮进一步纯化精制。

衰老自由基学说认为,自由基在生物体衰老过程中起着重要作用^[9]。自由基的积累导致细胞受到严重的氧化应激损伤,导致细胞衰老死亡。D-半乳糖经糖醛还原酶的作用下生成不能被细胞代谢分解的半乳糖醇大量堆积在细胞内,影响细胞正常渗透压,导致细胞代谢紊乱,加剧氧化应激反应,加深细胞所受的氧化损伤。D-半乳糖衰老模型比较符合自然衰老过程中的多种组织病理变化,是衰老研究中常用的一种衰老实验动物模型^[10]。

超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是生物体内重要的抗氧化酶。SOD能够催化超氧阴离子自由基 $O_2^- \cdot$ 歧化为H₂O和O₂,保护细胞免受氧化损伤,生物体内SOD活性可间接反映机体清除自由基、保护细胞免受自由基损伤的能力^[11]。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)能特异地催化机体内重要的抗氧化剂还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化物的还原反应,催化对生物体有害的H₂O₂的分解,减少氧自由基和过氧化脂质的形成,生物体内GSH-Px的活性可以反映机体的抗氧化能力^[12]。

本实验采用腹腔注射D-半乳糖的方法建立亚

急性衰老小鼠模型,研究了八角茴香总黄酮体内抗氧化活性,结果发现,与模型组比较,八角茴香总黄酮高、中剂量组能提高肝、脑的脏器指数。八角茴香总黄酮各给药组均能提高D-半乳糖致衰老小鼠血清、肝脏与脑组织中SOD、GSH-Px的活性,拮抗D-半乳糖致衰老小鼠受到的氧化损伤,表明八角茴香总黄酮具有良好的抗氧化活性,这为进一步开发八角茴香总黄酮天然抗氧化剂提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2011年版(一部). 北京: 化学工业出版社, 2010: 4. 附录 53, 62.
- [2] 张英, 吴晓琴, 俞卓裕. 竹叶和银杏叶总黄酮含量及其抗氧化活性的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 254-257.
- [3] 赵玉琪, 殷丽君. 沙棘叶黄酮的提取及其对抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 6: 70.
- [4] 姚平, 刘烈刚, 周绍良, 等. 银杏黄酮对雌性小鼠酒精性氧化损伤的保护作用[J]. 营养学报, 2005, 27(3): 228.
- [5] 谢冬惠. 八角茴香提取物抗氧化活性分析[J]. 热带生物学报, 2012, 3(3): 243-246.
- [6] 王少康, 孙桂菊, 张建新, 等. 亚急性衰老动物模型的建立及评价[J]. 东南大学学报: 医学版, 2002, 21(3): 49-52.
- [7] 王宁, 薛源, 孙体健. 苋菜红色素对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 山西医科大学学报, 2009, 40(5): 458-460.
- [8] Perumal S, Klaus B. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 10-19.
- [9] Droge W. Oxidative stress and aging[J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 543: 191-200.
- [10] 许扬, 吴涛, 傅正伟, 等. D-半乳糖诱导衰老动物模型研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(13): 1710-1712.
- [11] Maymon R, Halperin R, Mendlovic S, et al. Ectopic pregnancies in a caesarean scar: Review of the medical approach to an iatrogenic complication[J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(6): 515-523.
- [12] 彭新颜, 孔保华, 熊幼翎. 乳清多肽对D-半乳糖衰老模型大鼠血清和脏器组织抗氧化效果的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 238-242.