

文章编号:1001-6880(2014)7-1127-05

金樱子总黄酮体外抗氧化活性的研究

文红波,曹运长*,吴玉兰,张秋菊,冷超群

南华大学药学与生物科学学院,生化与分子生物学教研室,衡阳 421001

摘要:本文研究了金樱子总黄酮(RLTF)体外清除自由基的能力,并观察其对过氧化氢诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)抗氧化作用的影响。采用邻苯三酚自氧化法、水杨酸法、DPPH法分别测定RLTF对超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、二苯代苦味酰基自由基(DPPH \cdot)的清除率;Hoechst染色法分析各组细胞凋亡情况;MTT法测定细胞活力;分光光度法检测各组细胞中SOD、CAT、GSH-Px活性。结果显示,在20~200 μg 范围内,随着样品加入量增大,RLTF对 $\cdot OH$ 和DPPH \cdot 的清除率逐渐增大,而对 O_2^- 的清除率则是先增大后减少;RLTF对 O_2^- 的清除作用偏低,对 $\cdot OH$ 的清除率与芦丁相当,对DPPH \cdot 的清除能力则强于芦丁而弱于Vc。Hoechst染色观察结果表明RLTF预处理细胞后,能明显提高细胞的抗凋亡作用。与 H_2O_2 损伤组比较,不同浓度RLTF预处理组的细胞活力均显著升高($P < 0.01$);不同浓度RLTF预处理组细胞中的SOD、CAT和GSH-Px活性均明显增加($P < 0.01$),且呈剂量依赖性。上述结果表明,RLTF具有较强的自由基体外清除能力,能有效提高氧化损伤HUVEC细胞中SOD、CAT、GSH-Px的酶活性,其可能通过清除细胞内自由基和提高细胞抗氧化酶活性来提高细胞的抗氧化活性。

关键词:金樱子;总黄酮;自由基;清除作用;抗氧化酶

中图分类号:R285

文献标识码:A

Study on Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Rosa laevigata* Michx

WEN Hong-bo, CAO Yun-chang*, WU Yu-lan, ZHANG Qiu-ju, LENG Chao-qun

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy and Life Science, University of South China, Hengyang 421001, China

Abstract: This study aimed to evaluate the antioxidant activity of *Rosa laevigata* Michx total flavonoids (RLTF) and to investigate the antioxidant effects of RLTF on human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) with oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). The scavenging effects of RLTF on superoxide anion radical (O_2^-), hydroxyl radical ($\cdot OH$), and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot) were assayed by pyrogallol autoxidation, Fenton reaction and DPPH method, respectively. HUVECs were cultured and induced to oxidative injury by H_2O_2 , cell nuclear morphological changes of HUVEC were observed by inverted fluorescent microscope after Hoechst 33258 staining, the cell vitality was measured by MTT assay. SOD, CAT and GSH-Px activities of HUVEC were assayed using spectrophotometry. The free radical scavenging experiments indicated that with the concentration increasing from 20 to 200 μg , the scavenging capacities of RLTF on $\cdot OH$ and DPPH \cdot radicals were increased gradually, while its O_2^- clearance activity revealed the tendency of increasing firstly and decreasing afterwards. Hoechst 33258 staining observation showed that RLTF can effectively promote the anti-apoptosis activity of HUVEC injured by H_2O_2 following pre-treated with RLTF for 24 h. The cell vitalities in different RLTF concentration groups were obviously raised compared with those of H_2O_2 groups ($P < 0.01$). The activities of SOD in 0.24 mg/mL and 0.48 mg/mL RLTF groups, and the activities of CAT and GSH-Px in all RLTF groups were significantly higher than those of H_2O_2 oxidative injury group ($P < 0.01$). The results showed that RLTF can protect HUVEC from oxidative damage by scavenging O_2^- , $\cdot OH$ and DPPH \cdot , and by enhancing SOD, CAT and GSH-Px activities of HUVEC.

Key words: *Rosa laevigata* Michx; total flavonoids; free radicals; scavenging activity; antioxidative enzyme

金樱子又名糖桔子、蜂糖罐、刺梨子、山石榴等,属蔷薇科蔷薇属,其成熟果实可以入药^[1]。通过对金樱子果实的化学成分分析表明其主要的药效成分有维生素、氨基酸、多糖,黄酮类物质、三萜类及其衍

收稿日期:2013-04-17

接受日期:2013-09-27

基金项目:湖南省自然科学基金项目(06JJ30016);湖南省教育厅青年项目(09B090);衡阳市科技局项目(2009KJ09)

*通讯作者 Tel:86-734-8281372;E-mail:caoychang@163.com

生物^[2]。目前对金樱子多糖的药效研究已有报道,如赵云涛等^[3]提取金樱子多糖进行动物小鼠试验,发现金樱子多糖能显著清除超氧阴离子自由基、抑制羟自由基,有显著的抗氧化作用。而对金樱子另一重要的药效成分黄酮类化合物的研究较少,黄云祥等^[4]通过高效色谱法分析了金樱子黄酮化合物中分别含槲皮素、山柰酚、木犀草素、芹菜素等成分;陈乃富等^[5]从金樱子中分离得到了黄酮类物质,并以亚油酸为底物,初步测定金樱子黄酮类化合物的抗氧化能力。但对金樱子黄酮化合物系统的体外抗氧化作用、药效研究还未见报道。本研究分析评价了金樱子总黄酮体外直接清除自由基的能力,并利用体外细胞培养方法,用过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤,研究金樱子总黄酮对HUVEC抗氧化作用的影响,并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

HUVEC 购自中国科学院细胞生物学研究所上海细胞库;芦丁标准品购自中国药品生物制品检定所;DMEM 培养基和胰蛋白酶干粉购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青;MTT 购自 AMRESCO 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯产品。

1.2 仪器

CO_2 培养箱,美国 Shell-lab 公司;倒置显微镜,日本 Nikon 公司;倒置显荧光显微镜,日本 Olympus 公司;酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;UV2450 紫外可见分光光度计,日本岛津公司。

2 实验方法

2.1 金樱子黄酮类化合物的制备

以乙醇为溶剂浸提法提取金樱子总黄酮(*Rosa laevigata* Michx total flavonoids, RLTF),优化的提取条件为:乙醇浓度 40%、水浴温度 90 ℃、固液比 1:20,浸提时间 2 h。以芦丁为对照品,采用分光光度法对 RLTF 进行定量。RLTF 干预处理细胞时过滤除菌,临用前用 DMEM 培养液配成不同浓度。

2.2 RLTF 对 O_2^- 、·OH、DPPH· 自由基体外清除作用的测定

RLTF 对 O_2^- 的清除作用采用邻苯三酚自氧化

法测定;对 ·OH 自由基的清除活性采用水杨酸法测定;对 DPPH· 自由基的清除能力采用 DPPH 法测定。具体操作参照邹江冰等^[6]的方法。

2.3 HUVEC 的培养

采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养,根据细胞生长情况,给予换液;待细胞融合至 70%,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,按 1:3 或 1:4 传代。

2.4 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡

将细胞以 2×10^4 个/mL 接种在 6 孔培养板中,每孔 2.5 mL。待细胞生长铺满培养板 70% 时,加入含 1% 血清的 DMEM 培养液同步 12 h。实验分组为:(1)正常组;(2)200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组;(3)400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组;(4)600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组;(5)800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组;(6)1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组;(7)RLTF + 600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组;(8)RLTF + 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理组。第(7)与第(8)组先用 0.24 mg/mL RLTF 预处理 24 h 后再用相应浓度的 H_2O_2 处理 24 h。将原培养液吸干,每孔加 1 mL 4% 多聚甲醛于 4℃ 固定 20 min,固定完用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;每孔加 1 mL 染色液于 37℃ 染色 20 min;染色后用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。荧光显微镜观察拍照。

2.5 MTT 法检测 RLTF 对细胞活力的影响

将细胞以 2×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μL ;待细胞融合率为 70% 时,加入含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h;根据细胞存活率确定 600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 作用细胞 24 h 为施加条件^[7]。实验分组为:(1)正常组;(2) H_2O_2 损伤组:加 600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理 24 h;(3)Vc 阳性对照组:0.2 mg/ml Vc 预处理 24 h,再加 600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理 24 h;(4) RLTF 处理组:以 0.12 mg/mL、0.24 mg/mL、0.48 mg/mL RLTF 预处理 24 h 后,再加 600 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理 24 h。各组细胞每孔均加入 20 μL MTT 溶液继续培养 4 h,弃培养液,各组细胞每孔加入 150 μL DMSO;放入摇床摇 10 min,充分反应,酶标仪 490 nm 处测吸光值(OD)。

2.6 细胞 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性测定

按 2.5 分组要求处理后,收集细胞,加入细胞裂解液,随后 4 ℃,12000 rpm 离心 10 min。取上清按照试剂盒说明测定各组细胞 SOD、CAT、GSH-Px 活性。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 实验结果

3.1 RLTf 对 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、DPPH· 的清除作用

结果见图 1。实验表明:在 20~200 μg 范围内,随着待测样品加入量的增大,RLTF 和 Vc 对 O_2^- 的清除作用先增大后减小;芦丁对 O_2^- 的清除作用则

随着加入量的增大而逐渐减小;与芦丁和 Vc 比较,RLTF 对 O_2^- 的清除作用偏低。随着待测溶液加入量的增大,RLTF 和 Vc 对 $\cdot OH$ 的清除作用逐渐增大,芦丁对 $\cdot OH$ 的清除作用则先增大后减小,RLTF 对 $\cdot OH$ 的清除能力与芦丁相当。RLTF、芦丁和 Vc 对 DPPH· 的清除能力随着加入量的增加而逐渐增强,RLTF 对 DPPH· 的清除率强于芦丁,但 Vc 对 DPPH· 的清除能力要远高于 RLTf 和芦丁。

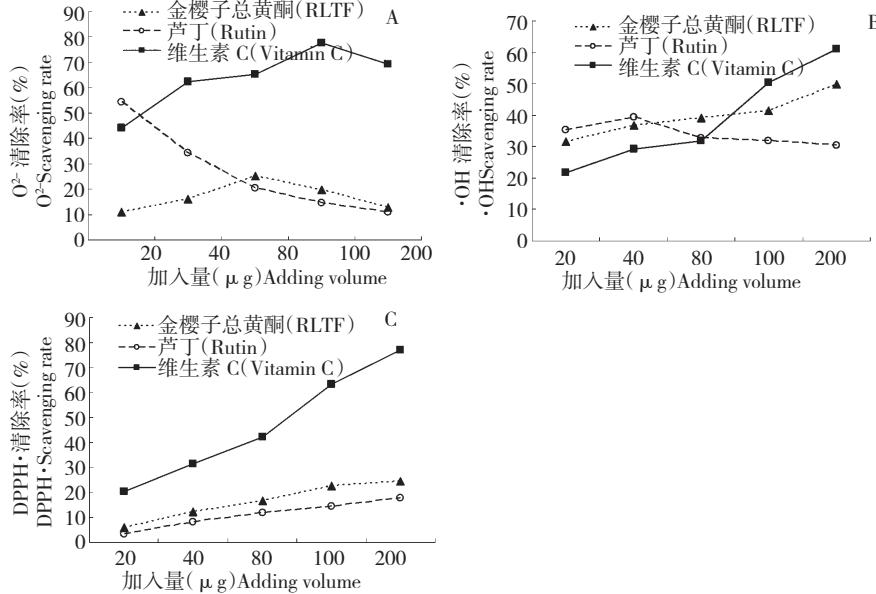


图 1 RLTf 对 O_2^- (A)、 $\cdot OH$ (B)、DPPH· (C) 的清除作用

Fig. 1 Scavenging capacities of RLTf on superoxide anion O_2^- (A), $\cdot OH$ (B) and DPPH· (C)

3.2 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡

经 Hoechst33258 染色后,在荧光显微镜下观察,发现正常细胞的细胞核会呈现正常的蓝色,而凋亡细胞的细胞核则会呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,颜色发亮。如图 2 所示,正常组 HUVEC 细胞呈浅蓝色荧光,浅染;200 $\mu mol/L H_2O_2$ 损伤组细胞有几个强度很亮的蓝色亮点(即凋亡小体,箭头所示);400、600 $\mu mol/L H_2O_2$ 损伤组与正常组比较细胞数量开始减少,部分细胞的核呈致密浓染,且蓝色亮点数目逐渐增多。800、1000 $\mu mol/L H_2O_2$ 损伤组与正常组相比细胞数目显著减少,且有大量高强度蓝色亮点。经过 RLTf 预处理 24 h 后的 600、800 $\mu mol/L H_2O_2$ 损伤组与 600、800 $\mu mol/L H_2O_2$ 损伤组比较,细胞数目虽都表现明显较少,但高强度蓝色亮点的细胞数比未经 RLTf 预处理的要少,表明

RLTF 对内皮细胞具有一定的保护作用,减少了 H_2O_2 对细胞的损伤,增强了内皮细胞的抗凋亡作用。

3.3 RLTf 对 HUVEC 细胞活力的影响

从表 1 可看出,用 H_2O_2 诱导细胞损伤后,细胞活力显著降低,正常细胞组与 Vc 阳性对照组细胞活力均高于 H_2O_2 损伤组。不同浓度 RLTf 预处理组与 H_2O_2 损伤组比较,各组细胞活力均高于 H_2O_2 损伤组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),且随着 RLTf 浓度的增加,细胞的活力逐渐增大。

3.4 RLTf 对受损内皮细胞 SOD、CAT、GSH-Px 酶活力的影响

结果见表 2。实验结果表明,用 H_2O_2 诱导细胞损伤后,细胞内的 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性与正常组比较显著降低($P < 0.01$)。与 H_2O_2 损伤组比较,

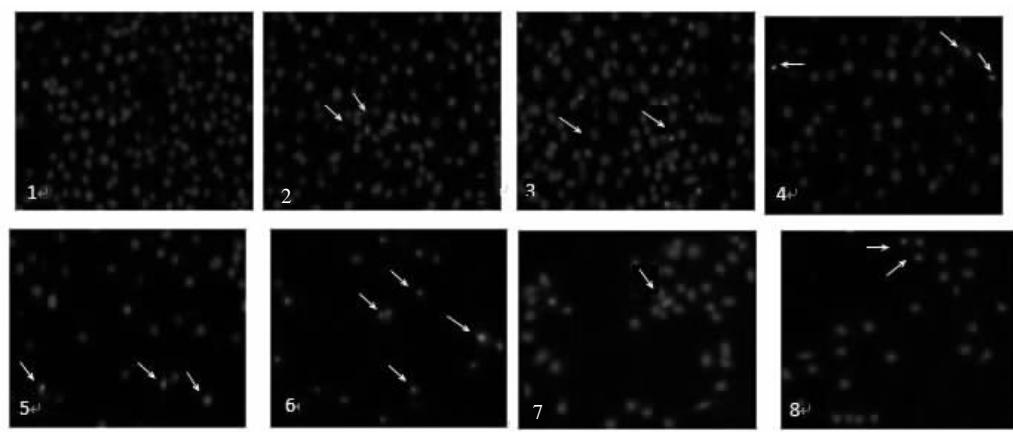


图 2 不同处理组凋亡细胞形态 (Hoechst33258 染色, $\times 100$)

Fig. 2 The apoptosis cell morphology of different treatment groups (Hoechst33258 staining, $\times 100$)

1:正常组;2:200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组;3:400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组;4:600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组;5:800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组;6:1000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组;7:RLTF + 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组;8:RLTF + 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组。

1. Control;2. 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group;3. 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group;4. 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group;5. 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group;6. 1000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group;7. RLTF + 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group;8. RLTF + 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated group.

表 1 RLTF 对氧化损伤 HUVEC 细胞活力的影响

Table 1 Effect of RLTF on the viability of HUVECs injured by hydrogen peroxide

分组 Group	MTT MTT (OD value)	存活率 Survival rate (%)
正常组 Control	0.906 \pm 0.113	100.00
H_2O_2 损伤组 H_2O_2 injury	0.679 \pm 0.106 §	74.95
Vc 阳性对照组 Vitamin C	0.953 \pm 0.084 **	105.18
0.12 mg/mL RLTF 组	0.868 \pm 0.139 **	95.86
0.24 mg/mL RLTF 组	0.871 \pm 0.083 **	96.14
0.48 mg/mL RLTF 组	0.987 \pm 0.192 **	108.95

注: § $P < 0.05$ 与正常组比较; ** $P < 0.01$ 与 H_2O_2 损伤组比较($n = 6$)。

Note: § $P < 0.05$, compared with control group; ** $P < 0.01$, compared with H_2O_2 injury group ($n = 6$).

不同浓度的 RLTF 预处理组细胞中的 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性均出现升高,除 0.12 mg/mL RLTF 处理组细胞 SOD 活性与 H_2O_2 损伤组差异无统计学意义外,其余各组与 H_2O_2 损伤组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。且随着 RLTF 浓度的增大,三种酶活性呈剂量依赖性的升高。

表 2 RLTF 对氧化损伤 HUVEC 中 SOD、CAT、GSH-Px 活性的影响

Table 2 Effect of RLTF on SOD, CAT and GSH-Px activity of HUVECs injured by hydrogen peroxide

组别 Group	SOD (IU/mL)	CAT (IU/mL)	GSH-Px (IU/mL)
正常组 Control	198.78 \pm 9.56	6.05 \pm 0.72	285.35 \pm 34.54
H_2O_2 损伤组 H_2O_2 injury	135.45 \pm 13.21 ##	4.57 \pm 0.61 ##	192.78 \pm 17.73 ##
Vc 阳性对照组 Vitamin C	158.73 \pm 15.38 **	7.81 \pm 1.53 **	348.21 \pm 26.15 **
0.12 mg · mL ⁻¹ RLTF 组	146.86 \pm 10.72	6.79 \pm 0.86 **	267.49 \pm 35.57 **
0.24 mg · mL ⁻¹ RLTF 组	173.64 \pm 14.52 **,a	7.94 \pm 0.93 **	325.18 \pm 23.36 **,a
0.48 mg · mL ⁻¹ RLTF 组	215.27 \pm 18.25 **,b	9.28 \pm 1.57 **,b	357.54 \pm 31.89 **,b

注: ## $P < 0.01$ 与正常组比较; ** $P < 0.01$ 与 H_2O_2 损伤组比较; ^a $P < 0.05$ 与 0.12 mg/mL RLTF 组比较($n = 6$)。

Note: ## $P < 0.01$, compared with control group; ** $P < 0.01$, compared with H_2O_2 injury group; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, compared with 0.12 mg/mL RLTF group ($n = 6$).

4 分析与讨论

自由基是人体在进行生命活动时产生的一种活性分子,自由基的生成和清除处于动态平衡之中。如果自由基产生过多或未及时清除会导致细胞内自由基的积累,其会严重损害生物膜、核酸、蛋白质、酶及活细胞的功能,继而导致细胞和组织器官损伤、诱发各种疾病、加速机体衰老。目前研究表明许多心血管疾病或炎症,都与自由基有关,如细胞内的过量的自由基会导致低密度脂蛋白(LDL)过氧化成为ox-LDL,过量的ox-LDL被巨噬细胞摄取后转化为泡沫细胞并黏附在血管内壁,而后发展为动脉粥样硬化。因此人工化学合成或寻找天然的抗氧化剂对预防和治疗心血管疾病具有重大的现实意义。目前人们先后从植物中提取了许多具有自由基清除能力的天然产物,其中黄酮类化合物是活性较强的一类。本实验结果表明金樱子总黄酮体外对·OH自由基、DPPH·自由基具有较强的直接清除作用,但对O₂⁻自由基的直接清除能力较弱。

内皮细胞损伤在多种心血管疾病发生和发展过程中起关键作用,而活性氧则是众多诱导内皮细胞损伤的原因之一^[8]。活性氧过氧化氢对细胞的损伤作用近年来一直是研究的热点。有研究表明过氧化氢能诱导细胞凋亡,当将内皮细胞暴露于适度低浓度H₂O₂时,细胞会发生凋亡^[9]。本研究中发现,低浓度的H₂O₂处理组,细胞形态发生改变,细胞存活率也有所下降,少数组细胞的细胞核出现致密浓染,随着H₂O₂浓度的增加,细胞存活率显著下降,核出现致密浓染的比例明显增高,当H₂O₂达到1000 μmol/L时,几乎所有细胞出现核致密浓染,同时大部分细胞已坏死或凋亡。而经过金樱子总黄酮预处理之后的细胞其抗凋亡能力在一定程度上得到增强,并能有效提高细胞的存活率。机体对自由基的清除主要是通过体内的抗氧化酶系,已有研究证实黄酮类化合物能提高机体的抗氧化酶活性^[10]。本研究中过氧化氢损伤组与正常组比较,细胞内的SOD、CAT、GSH-Px三种酶的活性均有所下降,但经过不同浓度的金樱子总黄酮预处理之后,三种抗氧化酶的活性显著升高,表明金樱子总黄酮能明显提高细胞内SOD、CAT、GSH-Px酶活力。

金樱子果肉中黄酮含量较高,其所含有的黄酮类化合物是具有很大开发价值的天然抗氧化剂。金

樱子总黄酮对氧化损伤的人脐静脉内皮细胞具有一定的保护作用,其抗氧化机制可能通过直接清除自由基,抑制细胞凋亡,提高体内抗氧化酶活性有关,但其具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- Lin FH(林芳花), Peng YH(彭永宏), Zeng LD(曾令达). Research status of quality standards of *Rosa laevigata* Michx. *Guangzhou Chem Ind*(广州化工), 2010, 38(4):5-8.
- Min J(闵俊), Li YY(李燕燕), Yu H(余华). Chemical composition, pharmacological effects and advances in Clinical application research of *Rose laevigata* Michx. *Glob Trad Chin Med*(环球中医药), 2008, 1(2):16-18.
- Zhao YT(赵云涛), Guo XM(国兴明), Li FZ(李付振). Anti-oxidative activity of polysaccharide from *Rosa Laevigata* Michx. *J Biol*(生物学杂志), 2003, 20(2):23-24.
- Huang YX(黄云祥), Wang JJ(王锦军), Zhang XM(张秀梅). Simultaneous determination of quercetin, luteolin and apigenin in *Rosa laevigata* by HPLC. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2009, 23:32-35.
- Chen NF(陈乃富), Zhang L(张莉). Study on the antioxidant property of flavonoid compound in *Rosa laevigata* Michx. *Forest By-Prod Specy Chin*(中国林副特产), 2005, 19(5):2-4.
- Zou JB(邹江冰), Yuan J(袁进), Jiang LL(蒋琳兰). Study on antioxidant activity of flavonoid from the leave of 2 Kinds of *Passiflora edulis*. *Chin Pharm*(中国药房), 2010, 21:3280-3282.
- Cao YC(曹运长), Wen HB(文红波), Wu YL(吴玉兰), et al. Protective effect of *Rosa laevigata* Michx total flavonoids on vascular endothelial cells injury induced by hydrogen peroxide. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), 2013, 24:1159-1161.
- Pawlak K, Naumnik B, Brzozko S, et al. Oxidative stress-a link between endothelial injury, coagulation activation, and atherosclerosis in haemodialysis patients. *Am J Nephrol*, 2004, 24:154-161.
- Middleton J, Americh L, Gayon R, et al. Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(2):60-72.
- Ai G, Liu Q, Hua W, et al. Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from flowers of *Abelmoschus manihot*(L.) Medic: *In vitro* and *In vivo* studies. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146:794-802.