

# 矮垂头菊乙醇提取物的体外自由基清除活性及其对高原缺氧小鼠的保护作用研究

景临林, 马慧萍\*, 樊鹏程, 何蕾, 贾正平

兰州军区兰州总医院药剂科 全军高原环境损伤防治重点实验室, 兰州 730050

**摘要:** 本文对矮垂头菊乙醇提取物(Ethanol extract of *Cremanthodium humile*, EECH)中总黄酮与总多酚含量, 体外自由基清除活性以及对高原缺氧小鼠的保护作用进行研究。结果显示: EECH中总黄酮与总多酚的含量分别为  $378.35 \pm 7.04$  mg 芦丁/g 提取物和  $114.58 \pm 0.99$  mg 没食子酸/g 提取物。其对 DPPH、羟自由基、NO 自由基均表现出一定的清除活性,  $IC_{50}$  值分别为  $80.90 \pm 0.47$ 、 $263.54 \pm 6.82$  和  $285.26 \pm 4.45$   $\mu\text{g/mL}$ , 但均弱于 Vc, 然而其对超氧阴离子的清除作用优于 Vc。此外, EECH 能够显著延长缺氧常压密闭缺氧小鼠的存活时间, 减少低压低氧小鼠心脑血管组织中 MDA 含量, 提高抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活力。以上结果表明: EECH 是一种活性优异的天然抗氧化剂, 对高原缺氧诱导的小鼠心脑血管组织损伤具有明显的保护作用。

**关键词:** 矮垂头菊; 自由基清除; 低压低氧; 抗氧化酶

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.10.023

## *In vitro* Free Radical Scavenging Activity of Ethanol Extract of *Cremanthodium humile* and Its Protective Effect on Mice under Hypobaric Hypoxia Condition

JING Lin-lin, MA Hui-ping\*, FAN Peng-cheng, HE Lei, JIA Zheng-ping

Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command of PLA; Key Lab of PLA for Prevention and Treatment of Injuries Induced by High Altitude, Lanzhou 730050, China

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the content of total phenolics and total flavonoid and free radical scavenging activity of *Cremanthodium humile* (EECH) as well as its protective effect against hypobaric hypoxia (HH) induced injury on mice. According to the results, the contents of total flavonoid and total phenolics in EECH were  $378.35 \pm 7.04$  mg Ru/g extract and  $114.58 \pm 0.99$  mg GAE/g extract, respectively. EECH showed excellent scavenging effect on DPPH, hydroxyl, nitric oxide radical with the  $IC_{50}$  value of  $80.90 \pm 0.47$ ,  $263.54 \pm 6.82$  and  $285.26 \pm 4.45$   $\mu\text{g/mL}$ , but still weaker than Vc. While EECH exhibited stronger scavenging activity on superoxide than Vc. Administration of EECH can prolong the survival time of mice under normobaric hypoxia, decrease the level of MDA in brain and heart of mice under HH condition and increase the activity of SOD, CAT and GSH-Px. All of these results indicated that EECH could be regarded as an excellent source of natural antioxidants and prevented damage from HH induced brain and heart injury.

**Key words:** *Cremanthodium humile*; free radical scavenging; hypobaric hypoxia; antioxidant enzymes

矮垂头菊 (*Cremanthodium humile* Maxim) 是菊科垂头菊属的多年生草本植物, 生长于海拔 2400 ~ 5600 m 的高山草甸和碎石区, 主要分布于西藏、青海、甘肃和云南等地<sup>[1]</sup>。传统藏医理论认为矮垂头菊具有清热解毒、祛风除湿的功效<sup>[1]</sup>。最新研究发现矮垂头菊还具有一定的抗肿瘤活性<sup>[2]</sup>。课题组

前期对多种青藏高原植物筛选发现, 矮垂头菊具有一定的抗缺氧活性<sup>[3]</sup>。本实验拟对矮垂头菊乙醇提取物的总黄酮和总多酚的含量、体外自由基清除活性及其对缺氧小鼠保护作用进行研究, 从抗氧化的角度阐明其抗缺氧作用机制, 为进一步将其开发成为抗高原缺氧药物提供理论依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药物

矮垂头菊购自青海西宁三江宝商贸有限公司,

收稿日期: 2015-07-09

接受日期: 2015-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(81202458); 全军医药科研“十二五”面上项目(CLZ12JA04); 中国博士后科学基金(2012M521926); 甘肃省自然科学基金(1308RJYA06)

\* 通讯作者 Tel: 86-931-8994671; E-mail: huipingmacyk@163.com

经兰州大学药学院生药研究所杨永建教授鉴定为菊科垂头菊属 *Cremanthodium humile* Maxim 的花;干燥的矮垂头菊 200 g,粉碎后加入 10 倍量 70% 乙醇浸泡过夜,超声提取 1 h,重复三次,合并提取液,过滤,减压浓缩干燥得浸膏 30 g,为矮垂头菊乙醇提取物(Ethanol extract of *Cremanthodium humile*, EECH)。

### 1.2 动物

清洁级 BABL/C 雄性小鼠,体重 18 ~ 22 g,由兰州军区兰州总医院动物实验科提供,许可证号 SYXK(军)2014-0029。

### 1.3 试剂

乙酰唑胺(100114)购自武汉远城科技发展有限公司,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)购自 Sigma 公司;还原型辅酶 I(NADH)、吩嗪硫酸甲酯(PMS)、抗坏血酸(VC)、硫代巴比妥酸(TBA)、硝普钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺购自阿拉丁试剂公司;芦丁标准品(100080-200707)、没食子酸标准品(110831-200804)购自中国食品药品检定研究院;其余均为国产分析纯试剂。丙二醛(MDA)、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。

### 1.4 主要仪器

Spectramax i3 多功能酶标仪(Molecular Devices 公司);RE-3000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SK3300L 超声清洗器(上海精密仪器仪表有限公司);AE204 型电子天平(美梅特勒-托利多仪器有限公司);UV2800SPC 紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),FLYDWC50-IIIC 低压低氧动物实验舱(贵州风雷航空军械有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 DPPH 清除实验

向 125  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的样品溶液中分别加入 125  $\mu\text{L}$  0.1 mmol/L DPPH 70% 乙醇溶液,室温下暗处反应 30 min,以 70% 乙醇溶剂做空白对照,测量其在波长 517 nm 处的吸光度  $A_i$ 。将 125  $\mu\text{L}$  70% 乙醇溶液分别与 125  $\mu\text{L}$  DPPH 70% 乙醇溶液和 125  $\mu\text{L}$  样品溶液混合后,测定其在波长 517 nm 处的吸光度,分别计为  $A_0$  和  $A_j$ 。按式(1)计算其清除率,并计算其  $\text{IC}_{50}$ 。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_i - A_j/A_0) \times 100 \quad (1)$$

### 2.2 羟自由基清除实验

向 500  $\mu\text{L}$  不同质量浓度样品溶液中依次加入 50  $\mu\text{L}$  28 mmol/L 脱氧核糖(溶于 pH = 7.0 的 0.2 mmol PBS)、50  $\mu\text{L}$  EDTA (1 mmol/L)、50  $\mu\text{L}$  的  $\text{FeCl}_2$  (1 mmol/L) 和 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mmol/L),最后加入 50  $\mu\text{L}$  抗坏血酸(1 mmol/L)启动反应,37  $^\circ\text{C}$  水浴孵育 1 h 后依次加入 250  $\mu\text{L}$  三氯乙酸(10%) 和 250  $\mu\text{L}$  TBA (0.5%,溶于 25 mmol/L 的 NaOH 溶液),沸水中孵育 0.5 h,测定 532 nm 处吸光度  $A_i$ ,用 500  $\mu\text{L}$  蒸馏水代替样品溶液,测得吸光度  $A_0$ ,用 PBS 代替脱氧核糖测得吸光度  $A_j$ 。按式(1)计算其清除率,并计算其  $\text{IC}_{50}$ 。

### 2.3 超氧阴离子清除实验

向 100  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的样品溶液中依次加入 50  $\mu\text{L}$  NADH (500  $\mu\text{mol/L}$ ,溶解于 0.2 mol/L pH = 7.4 的 PBS 中)、50  $\mu\text{L}$  NBT (200  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 50  $\mu\text{L}$  PMS (20  $\mu\text{mol/L}$ )。混合均匀后室温下反应 8 min,测定其在 560 nm 处的吸光度  $A_i$ 。用 100  $\mu\text{L}$  70% 乙醇替代样品,混合后测定其 560 nm 处的吸光度  $A_0$ ;用 50  $\mu\text{L}$  水取代 PMS,混合后测定其在波长 560 nm 处的吸光度  $A_j$ 。按式(1)计算其清除率,并计算其  $\text{IC}_{50}$ 。

### 2.4 一氧化氮清除实验

将 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品溶液与 100  $\mu\text{L}$  的硝普钠(10 mmol/L,溶解在磷酸缓冲液中 0.05 mol/L, pH 7.4) 混合均匀后,室温下孵育 2.5 h,向混合溶液中加入 900  $\mu\text{L}$  蒸馏水和 0.5 mL 对氨基苯磺酸(33%,溶解在 20% 的乙酸溶液中),室温放置 5 min,最后加入 0.5 mL 盐酸萘乙二胺(0.1%, w/v),室温放置 30 min 后,测定 540 nm 处的吸光度  $A_i$ 。用磷酸缓冲液代替硝普钠时测得吸光度  $A_j$ ,用 70% 乙醇代替样品溶液时测得吸光度  $A_0$ 。按式(1)计算其清除率,并计算其  $\text{IC}_{50}$ 。

### 2.5 总黄酮含量测定

将 50  $\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$  溶液(5%) 加入到 500  $\mu\text{L}$  的不同质量浓度的芦丁标准品溶液(0 ~ 140  $\mu\text{g/mL}$ ) 中,混合均匀。室温下静置 6 min 后加入 50  $\mu\text{L}$   $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液(10%),混匀后再静置 6 min,最后加入 250  $\mu\text{L}$  NaOH 溶液(4%),再次混合均匀后静置 15 min,测定其在 518 nm 处吸光值,每个样品重复三次,取平均值。根据实验结果建立标准曲线。根据芦丁标准曲线,按照相同方法求得样品中总黄酮含量。

## 2.6 总多酚含量测定

将 1 mL Folin-Ciocalteu 试剂分别与 100  $\mu\text{L}$  的不同质量浓度的没食子酸标准品溶液(0 ~ 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )充分混合后,加入 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液(7%),室温放置 5 h,测定其在 760 nm 处吸光值,每个样品重复三次,取平均值。根据实验结果建立标准曲线。根据没食子酸标准曲线,按照相同方法求得样品中总酚含量。

## 2.7 常压密闭缺氧实验

将 50 只清洁级雄性 BABL/C 小鼠随机分成 5 组,缺氧模型组、乙酰唑胺组(300 mg/kg)、EECH 低、中、高剂量组(125、250、500 mg/kg),每组 10 只,连续灌胃给药 5 d,最后一次给药 60 min 后,将小鼠分别放入 250 mL 广口瓶内(瓶内含 5 g 钠石灰),密封瓶口,立即开始计时,待小鼠停止呼吸时记录小鼠存活时间。利用存活时间和延长率评价药物的抗缺氧作用,确定 EECH 最佳给药剂量。延长率 = (药物组存活时间 - 缺氧模型组存活时间) / 缺氧模型组存活时间。

## 2.8 低压低氧实验

将 24 只 SPF 级雄性 BABL/C 小鼠随机分成 4 组,正常组、缺氧模型组、乙酰唑胺组(300 mg/kg)、EECH 高剂量组 500 mg/kg,每组 6 只。给药方式同 2.7。最后一次给药后,除正常组外,将其他 3 组置于低压低氧动物实验舱中,以 100 m/min 的速度减压至模拟 8000 m 海拔高度,并维持低压低氧 9 h,随后快速升压至正常气压。立即将小鼠脱臼处死,取大脑和心脏组织,用 4  $^{\circ}\text{C}$  生理盐水制成 10% 的组织匀浆用于相关生化指标的测定。

## 2.9 指标检测

MDA 含量、SOD、CAT 和 GSH-Px 活性测定按照相应的试剂盒说明书进行。

## 2.10 统计学处理

实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用 SPSS 19.0 统计软件对数据中各组之间进行 one-way ANOVA 统

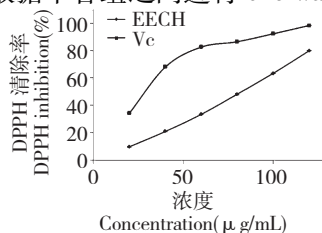


图1 EECH对DPPH自由基的清除率

Fig. 1 DPPH radical scavenging effect of EECH

计学分析, $P < 0.05$  时表示统计学上有显著性差异。

## 3 实验结果

### 3.1 EECH对DPPH清除作用

结果如图 1 所示,EECH 对 DPPH 自由基的清除作用存在较好的剂量依赖性。在浓度为 120 mg/mL 时,其对 DPPH 的清除率达到了 79.92%, EECH 和 Vc 的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $80.90 \pm 0.47$  和  $30.39 \pm 0.43$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以上结果表明,EECH 对 DPPH 自由基具有较好清除能力,但是其活性明显弱于 Vc。

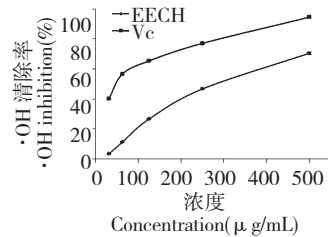


图2 EECH对·OH的清除率

Fig. 2 Hydroxyl scavenging effect of EECH

### 3.2 EECH对羟自由基清除作用

从图 2 结果可以看出:随着 EECH 浓度的升高,其对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力逐渐增强,具有明显的剂量依赖性,经计算其  $\text{IC}_{50}$  为  $263.54 \pm 6.82$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,显著高于 Vc( $50.78 \pm 2.45$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。随着浓度的增加,Vc 对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力增加缓慢,而 EECH 增长迅速,但仍弱于 Vc。

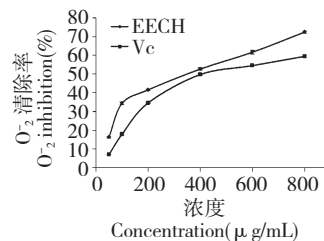


图3 EECH对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率

Fig. 3 Superoxide radical scavenging effect of EECH

### 3.3 EECH对超氧阴离子清除作用

结果如图 3 所示,当浓度低于 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,随着浓度的升高,EECH 和 Vc 对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除能力增加迅速,当浓度大于 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,二者的清除能力增长速度明显放缓,特别是 Vc。总的来说,EECH 对  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的清除能力要高于 Vc。其  $\text{IC}_{50}$  值为  $291.43 \pm 2.45$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,显著低于 Vc 的  $\text{IC}_{50}$  值( $462.81 \pm 3.24$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 3.4 EECH 的对 NO 的清除能力

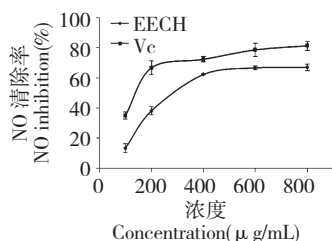


图4 EECH 对 NO 的清除率

Fig. 4 Nitric oxide radical scavenging effect

结果如图4所示,EECH和Vc对NO清除作用与对 $O_2^-$ 的清除作用类似,随着浓度的升高,清除能力逐渐增加,但是增长的幅度越来越小。EECH的 $IC_{50}$  ( $285.26 \pm 4.45 \mu\text{g/mL}$ )明显高于Vc ( $176.33 \pm 5.76 \mu\text{g/mL}$ ),表明其对NO的清除能力弱于Vc。

### 3.5 EECH 中总黄酮与总多酚含量

经检测,EECH中总黄酮的含量高达 $378.35 \pm 7.04 \text{ mg}$ 芦丁/g提取物,多酚含量为 $114.58 \pm 0.99 \text{ mg}$ 没食子酸/g提取物。

### 3.6 EECH 对常压密闭缺氧小鼠存活时间的影响

从表1结果可以看出:缺氧模型组小鼠在250 mL广口瓶内的存活时间为 $32.15 \pm 1.08 \text{ min}$ ,阳性药乙酰唑胺组可以显著延长存活时间至 $42.24 \pm 1.63 \text{ min}$  ( $P < 0.01$ ),延长率为31.38%。EECH三组存在明显剂量依赖性,低剂量组的存活时间略长于模型组,但是低于乙酰唑胺组,中剂量组的存活时间为 $44.12 \pm 3.25 \text{ min}$ ,效果与乙酰唑胺相当,而表1 EECH对常压密闭缺氧小鼠存活时间的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of EECH on the survival time of mice under normobaric hypoxia condition ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	剂量 Dose (mg/kg)	存活时间 Survive time (min)	延长率 Prolong rate (%)
缺氧模型组 Model	-	$32.15 \pm 1.08$	-
乙酰唑胺组 Acetazolamide	300	$42.24 \pm 1.63^{**}$	31.38
EECH 组 EECH	125	$39.24 \pm 1.56^{*#}$	22.05
	250	$43.12 \pm 3.25^{**}$	34.12
	500	$47.37 \pm 2.56^{*##}$	47.34

注:与模型组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与乙酰唑胺组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with Acetazolamide group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

高剂量组的存活时间达到 $47.37 \pm 2.56 \text{ min}$ ,延长率为47.34%,显著高于缺氧模型组 ( $P < 0.01$ )和乙酰唑胺组 ( $P < 0.05$ )。因此,在后续实验中采用高剂量进行相关指标测定。

### 3.7 EECH 对低压低氧小鼠心脑组织中 MDA 含量的影响

结果如图5所示,对所有组别而言,脑组织中MDA含量显著低于心肌组织。与正常组比较,缺氧模型组小鼠心、脑组织MDA含量显著升高 ( $P < 0.01$ ),经乙酰唑胺和EECH预处理后,缺氧小鼠心、脑组织中MDA含量显著降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

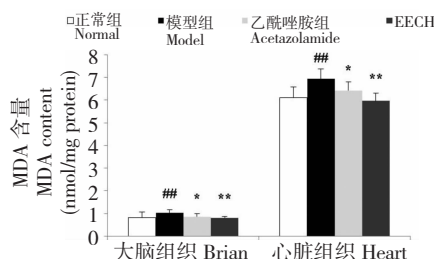


图5 EECH 对低压低氧小鼠心脑组织中 MDA 含量的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 5 Effects of EECH on the MDA content in brain and heart of mice under hypobaric hypoxia condition ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

注:与正常组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note: Compared with normal group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; Compared with model group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3.8 EECH 对低压低氧小鼠心脑组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性的影响

结果如表2所示,与正常组比较,缺氧模型组小鼠心、脑组织中SOD、CAT和GSH-Px活性显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,经乙酰唑胺和EECH预处理后,小鼠心、脑组织中SOD、CAT和GSH-Px活力均显著升高。但是EECH的效果显著优于乙酰唑胺。

## 4 讨论

活性氧簇(ROS),包括羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子( $O_2^-$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和单线态氧( $^1\text{O}_2$ )等是机体正常代谢产物<sup>[4]</sup>。在正常生理状态下,机体内存在内源性抗氧化体系(抗氧化酶和非酶抗氧化剂)能够及时清除体内产生ROS,保持自由基代

表2 EECH对低压低氧小鼠心脑血管组织中SOD、CAT和GSH-Px活性的影响( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Effects of EECH on the levels of SOD, CAT, GSH-Px and T-AOC in brain and heart of mice under hypobaric hypoxia condition ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	SOD (U/mg protein)		CAT (U/mg protein)		GSH-Px (U/mg protein)	
		脑组织 Brain	心肌组织 Heart	脑组织 Brain	心肌组织 Heart	脑组织 Brain	心肌组织 Heart
正常组 Normal	-	98.12 ±6.17	55.62 ±4.12	2.45 ±0.26	6.78 ±0.56	3.65 ±0.34	3.22 ±0.21
模型组 Model	-	70.23 ±3.26 <sup>##</sup>	38.76 ±1.24 <sup>##</sup>	1.66 ±0.48 <sup>##</sup>	3.36 ±0.78 <sup>##</sup>	2.57 ±0.18 <sup>##</sup>	1.46 ±0.12 <sup>##</sup>
乙酰唑胺组 Acetazolamide	300	76.76 ±4.72 <sup>*</sup>	44.34 ±2.66 <sup>*</sup>	1.86 ±0.40 <sup>*</sup>	4.96 ±0.66 <sup>**</sup>	3.22 ±0.22 <sup>**</sup>	2.32 ±0.23 <sup>**</sup>
EECH组 EECH	500	88.42 ±5.46 <sup>**</sup>	48.05 ±2.98 <sup>**</sup>	2.11 ±0.17 <sup>**</sup>	6.33 ±0.64 <sup>**</sup>	3.40 ±0.38 <sup>**</sup>	2.93 ±0.18 <sup>**</sup>

注:与正常组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

谢平衡。但当机体处于病理状态时,机体内氧化平衡出现紊乱,产生的ROS无法及时清除,造成ROS蓄积。过量的ROS会攻击蛋白质、核酸等生物大分子,造成细胞凋亡或坏死<sup>[5]</sup>。适当摄取一些抗氧化剂对于氧化应激导致的疾病具有预防和治疗作用。由于人工合成抗氧化剂其存在一定的肝毒性<sup>[6]</sup>,从天然产物当中寻找高效、低毒的天然抗氧化剂越来越受到人们的关注。

矮垂头菊常年生长在低压低氧的环境中,为了抵抗氧化应激,其体内可能含有具有优异抗氧化活性的物质。为了证明上述猜想,本研究首先考察了EECH对DPPH、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和NO的清除作用。DPPH是一种稳定的含氮自由基,其乙醇溶液呈深紫色,自由基清除剂会使其颜色变浅。该法具有操作简便、灵敏度高的特点,已经广泛用于样品,特别是植物提取物样品的抗氧化活性测定<sup>[7]</sup>。 $\cdot\text{OH}$ 被认为是ROS中活性最强的自由基,它能够无选择性的攻击几乎所有生物大分子,造成细胞损伤。研究表明:心血管疾病、肿瘤、糖尿病以及阿尔兹海默病的发生均与 $\cdot\text{OH}$ 有关<sup>[8]</sup>。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自身活性较弱,但是其能够在体内转化成活性更强的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ <sup>[9]</sup>。NO是体内重要的功能分子,发挥着血压调节、神经信号传递、控制血管舒张和松弛平滑肌等众多生理功能。但是NO还会与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应生成氧化性更强的过氧亚硝酸根离子(ONOO<sup>-</sup>),从而导致组织器官氧化损伤<sup>[10]</sup>。从文中结果可以看出:矮垂头菊乙醇提取物对DPPH、 $\cdot\text{OH}$ 和NO的清除能力弱于Vc,但其对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力明显优于Vc。总的来说,EECH对四种自由基均表现出一定的清除活性,尽管活性弱于Vc,但仍是一种非常有前景的天然抗氧

化剂。

黄酮和多酚是植物体内含有的非常重要的次生代谢产物,也是许多植物提取物抗氧化作用的物质基础<sup>[11]</sup>。通过对EECH的总黄酮和总多酚的含量进行测定,结果表明:其高浓度的总黄酮可能其发挥抗氧化作用的物质基础。

尽管低压低氧对机体产生损伤的作用机制尚不完全明确,但是自由基代谢紊乱是损伤产生的重要原因之一。有研究指出:通过摄取抗氧化剂,例如维生素E和乙酰左旋肉碱等能够减轻低压低氧造成的损伤<sup>[12,13]</sup>。为此,本研究首先利用小鼠常压密闭缺氧实验考察了自由基清除剂EECH的抗缺氧能力。结果表明:灌胃给药高、中、低剂量的EECH均能不同程度地延长缺氧小鼠的存活时间,且呈剂量依赖性,其中,EECH最高剂量组表现出显著优于乙酰唑胺的抗缺氧效果。

大脑和心脏是机体中氧代谢最为活跃的器官,这也造成它们对低压低氧非常敏感<sup>[14,15]</sup>。为了阐明EECH对低压低氧小鼠心脑血管组织的保护作用,本研究对心脑血管组织中自由基代谢相关生化指标进行了考察。

MDA是脂质过氧化的最终产物之一,其含量可以反映脂质过氧化的程度<sup>[16]</sup>。低压低氧会导致小鼠心脑血管组织中MDA含量显著升高,经EECH预处理后,小鼠心脑血管组织中MDA含量降低明显,说明EECH对低压低氧诱导的脂质过氧化有抑制作用。

SOD、CAT和GSH-Px是机体内重要的抗氧化酶,被认为是抵抗氧化应激损伤的第一道防线。SOD可以通过歧化反应将 $\cdot\text{OH}$ 转化为 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。生成的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 又可以进一步被CAT和GSH-Px清除,三者协同维持机体内自由基代谢的稳态<sup>[17]</sup>。低压

低氧会导致小鼠心脑血管组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性显著降低,抗氧化系统被破坏,导致自由基代谢紊乱和 ROS 大量蓄积。EECH 能够提高低压低氧条件下小鼠心脑血管组织中抗氧化酶的活性,维持机体内自由基代谢稳态,减少低压低氧诱导的氧化应激损伤。

综上所述,矮垂头菊乙醇提取物表现出优异的体外自由基清除活性,是一种高效的天然抗氧化剂,其含有的高浓度总黄酮,可以作为获得黄酮类化合物的天然来源。体内实验研究表明:矮垂头菊乙醇提取物能够显著延长缺氧小鼠的存活时间,缓解低压低氧对小鼠心脑血管组织的损伤,其机制可能与维持机体抗氧化酶的活性、调节自由基代谢有关。

#### 参考文献

- 1 State Administration of Traditional Chinese Medicine "Chinese Materia Medica" Editorial Board(国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Materia Medica · Tibetan Medicine(中华本草·藏药卷). Shanghai:Shanghai Science and Technology Press,2012. 345-346.
- 2 Li H, Wang LJ, Qiu GF, *et al.* Apoptosis of HeLa cells induced by extract from *Crematodium humile*. *Food Chem Toxicol*,2007,45:2040-2046.
- 3 Ma HP, Fan PC, Jing LL, *et al.* Anti-hypoxic activity at simulated high altitude was isolated in petroleum ether extract of *Saussurea involucrata*. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137: 1510-1515.
- 4 Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 2014, 224: 164-175.
- 5 Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Persp*,1994,102(Suppl 10):17-24.
- 6 Liu J, Jia L, Kan J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Chem Toxicol*,2013,51:310-316.
- 7 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free rad-

ical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*,1995,28:25-30.

- 8 Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*,1990,186:1-85.
- 9 Girgih AT, He R, Hasan FM, *et al.* Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem*,2015,173:652-659.
- 10 Taira J, Tsuchida E, Katoh MC, *et al.* Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chem*,2015,166:531-536.
- 11 Chavan JJ, Gaikwad NB, Kshirsagar PR, *et al.* Total phenolics, flavonoids and antioxidant properties of three *Ceropegia* species from Western Ghats of India. *South Afr J Bot*,2013,88:273-277.
- 12 Bautista-Ortega J, Ruiz-Feria CA. L-arginine and antioxidant vitamins E and C improve the cardiovascular performance of broiler chickens grown under chronic hypobaric hypoxia. *Poult Sci*,2010,89:2141-2146.
- 13 Wu YC, Wang YJ, Tseng GF. Ascorbic acid and alpha-tocopherol supplement starting prenatally enhances the resistance of nucleus tractus solitarius neurons to hypobaric hypoxic challenge. *Brain Struct Funct*,2011,216:105-122.
- 14 Rauchova H, Vokurkova M, Koudelova J. Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiol Res*,2012,61:89-101.
- 15 Karar J, Dolt KS, Mishra MK, *et al.* Expression and functional activity of pro-oxidants and antioxidants in murine heart exposed to acute hypobaric hypoxia. *FEBS Lett*, 2007, 581: 4577-4582.
- 16 Suji G, Sivakami S. Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. *Toxicol In Vitro*,2008,22:618-624.
- 17 Wu JH, Xu C, Shan CY, *et al.* Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. *Life Sci*,2006,78:622-630.

(上接第 1747 页)

- 15 Bu LN(卜令娜), Zhang J(张佳), Xu YM(徐月敏), *et al.* Screening of active fractions about scavenging free radicals from *Olea europaea* L. leaves. *Food Ind*(食品工业), 2013, 34:131-133.
- 16 State Food and Drug Administration(国家食品药品监督管理局). Antioxidant function evaluation method. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0847/71257.html>,2012-04-23.
- 17 Wang XF(王晓飞), Li C(李辰), Zheng YY(郑媛媛), *et*

*al.* Polyphenols from leaves of *Olea europaea*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药),2011,42:848-851.

- 18 Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, *et al.* Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*,2000,68:457-462.
- 19 Mylonaki S, Kiassos E, Makris D P, *et al.* Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem*,2008,392:977-985.