

丹皮酚及其磺化物体外抗氧化作用

吴晓慧¹, 吴国荣¹, 张卫明², 顾龚平², 沈奇¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

(2. 南京野生植物综合利用研究院, 210042, 江苏, 南京)

[摘要] 为比较研究丹皮酚及其磺化物的体外抗氧化作用, 测定了丹皮酚及其磺化物体外清除超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)的活性及对过氧化氢(H_2O_2)、紫外线(UV)诱导红细胞溶血的影响。发现丹皮酚和丹皮酚磺化物均具有较强的清除 O_2^- 、 $\cdot OH$ 及抗 H_2O_2 、UV诱导的红细胞(RBC)溶血的活性, 后者的抗氧化效应更强, 甚至在一定程度超过作为阳性对照物的抗坏血酸。可以认为丹皮酚和丹皮酚磺化物可成为高效的天然抗氧化剂新资源。

[关键词] 丹皮酚, 丹皮酚磺化物, 氧自由基, 溶血, 抗氧化

[中图分类号] Q946, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2005)03-0083-03

Antioxidative Function of Paeonol and Sodium Paeonol Sulfonate

Wu Xiaohui¹, Wu Guorong¹, Zhang Weiming², Gu Gongping², Shen Qi¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Nanjing Institute of Comprehensive Utilization of Wild Plant, 210042, Nanjing, China)

Abstract: In order to investigate the difference of the antioxidative function among paeonol and sodium paeonol sulfonate. The clearing function on superoxide anion(O_2^-) and hydroxy radical($\cdot OH$), and the inhibition on H_2O_2 , UV-induced hemolysis of RBC of paeonol and sodium paeonol sulfonate were evaluated in the paper. And the paper also showed that Paeonol and sodium paeonol sulfonate had strong clearing function on O_2^- , $\cdot OH$ and inhibition on H_2O_2 , UV-induced hemolysis of RBC. The later had a better antioxidative function and exceeds ascorbic acid which is commonly used as positive control drug in some aspect. We can conclude that paeonol and sodium paeonol sulfonate will be new resource of natural antioxidants.

Key words: paeonol, sodium paeonol sulfonate, oxygen free radical, hemolysis, antioxidation

0 引言

丹皮酚(paeonol)是中药丹皮(毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的根皮)和中药徐长卿(萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag 的全草)的主要活性成分^[1], 具有解热、镇痛、解痉、抗菌消炎、抗过敏、免疫调节等多种药理作用。笔者曾报告, 丹皮酚及其磺化物——丹皮酚磺酸钠具有一定的抑制植物病原菌的作用^[2], 本文在此基础上研究并比较了丹皮酚、丹皮酚磺酸钠在化学模拟和细胞培养水平上的抗氧化作用, 并初步探讨了其作用机制, 旨在为进一步拓宽中药丹皮的应用领域提供一些有价值的资料。

收稿日期: 2004-11-30.

基金项目: 江苏省高校省级重点实验室开放研究课题(164070301402).

作者简介: 吴晓慧, 1978—, 女, 硕士研究生, 主要从事植物化学的学习与研究. E-mail: chloe.wu@163.com

通讯联系人: 吴国荣, 1947—, 教授, 主要从事植物生理生化的教学与研究. E-mail: wugorong@njnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

牡丹根皮由南京野生植物综合利用研究院提供,丹皮酚与丹皮酚磺酸钠由实验室自制, HPLC 测定丹皮酚磺酸钠纯度为 99.857 6%^[2].新鲜健康人血购自南京市红十字血液中心.超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所.氯化钠、抗坏血酸(V_C)等均为国产分析纯.

1.2 实验方法

- (1) 丹皮酚及丹皮酚磺酸钠体外去除 O_2^- 的作用:参考文献[3]方法,采用 O_2^- 试剂盒测定.
- (2) 丹皮酚及丹皮酚磺酸钠体外清除 $\cdot OH$ 的作用:参考文献[4]方法,采用活性氧试剂盒测定.
- (3) 丹皮酚及丹皮酚磺酸钠对 H_2O_2 诱导红细胞溶血的影响:参照 Smirnov N 等^[5]和李志孝等^[6]的方法进行.
- (4) 丹皮酚及丹皮酚磺酸钠对 UV 诱导红细胞溶血的影响:参照蒋建伟等^[7]的方法进行.

2 结果与分析

2.1 体外去除 O_2^- 的作用

丹皮酚、丹皮酚磺酸钠均可抑制黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应体系产生 O_2^- ,丹皮酚磺酸钠的作用较丹皮酚强,但弱于 V_C ,三者对 O_2^- 的清除作用有着极显著差异, $P < 0.01$ (表 1).

2.2 体外清除 $\cdot OH$ 的作用

丹皮酚、丹皮酚磺酸钠对 Fenton 反应产生 $\cdot OH$ 有较强的清除活性,丹皮酚磺酸钠的作用强于丹皮酚,二者存在极显著差异, $P < 0.01$,且浓度 > 0.14 mmol/L 的丹皮酚磺酸钠对 $\cdot OH$ 的清除作用略强于同浓度的 V_C (表 2).

表 1 丹皮酚、丹皮酚磺酸钠对 O_2^- 的清除作用 ($\bar{X} \pm S, n=3$)

药物浓度/ (mmol/L)	清除率/%		
	丹皮酚	丹皮酚磺酸钠	V_C
0.07	10.54 \pm 1.97	30.03 \pm 1.32	52.83 \pm 0.74
0.14	14.84 \pm 1.29	34.59 \pm 1.69	83.28 \pm 0.81
0.28	17.63 \pm 1.17	35.53 \pm 1.63	97.42 \pm 0.94
0.56	29.81 \pm 0.85	61.39 \pm 1.54	98.76 \pm 0.07
1.12	34.11 \pm 0.52	67.66 \pm 0.81	99.23 \pm 0.04

表 2 丹皮酚、丹皮酚磺酸钠对 $\cdot OH$ 的清除作用 ($\bar{X} \pm S, n=3$)

药物浓度/ (mmol/L)	清除率/%		
	丹皮酚	丹皮酚磺酸钠	V_C
0.07	3.44 \pm 1.15	25.88 \pm 3.15	30.08 \pm 0.45
0.14	7.74 \pm 1.55	43.19 \pm 6.66	45.84 \pm 0.81
0.28	15.85 \pm 4.09	85.55 \pm 0.52	85.13 \pm 0.74
0.56	20.04 \pm 0.45	96.83 \pm 0.52	95.57 \pm 0.53
1.12	45.94 \pm 0.89	99.32 \pm 0.53	99.11 \pm 0.30

2.3 对 H_2O_2 诱导红细胞溶血的影响

丹皮酚、丹皮酚磺酸钠及 V_C 均具有较强的抗 H_2O_2 诱导红细胞溶血的效应,且浓度越高,抑制率越大.在 0.07 mmol/L 到 0.56 mmol/L 之间,丹皮酚、丹皮酚磺酸钠和 V_C 对红细胞溶血的抑制率与其浓度之间呈显著正相关($r_{\text{丹皮酚}}=0.924\ 4$; $r_{\text{丹皮酚磺酸钠}}=0.946\ 4$; $r_{V_C}=0.980\ 7$),丹皮酚磺酸钠对红细胞溶血的抑制率高于丹皮酚,二者对抗 H_2O_2 诱导的红细胞溶血作用有着极显著差异,经 t 检验, $P < 0.01$,且浓度 > 0.28 mmol/L 的丹皮酚磺酸钠对红细胞溶血的抑制率略高于 V_C (表 3).

表 3 丹皮酚、丹皮酚磺酸钠对 H_2O_2 诱导红细胞溶血的影响 ($\bar{X} \pm S, n=3$)

药物浓度/ (mmol/L)	溶血抑制率/%		
	丹皮酚	丹皮酚磺酸钠	V_C
0.07	1.97 \pm 0.51	15.26 \pm 0.40	40.12 \pm 0.35
0.14	11.70 \pm 1.12	30.05 \pm 0.49	46.28 \pm 0.40
0.28	20.61 \pm 1.34	53.37 \pm 0.35	53.82 \pm 0.41
0.56	26.60 \pm 0.31	67.13 \pm 0.41	63.09 \pm 0.35
1.12	29.66 \pm 0.92	75.41 \pm 0.30	66.99 \pm 0.44

2.4 对 UV 诱导红细胞溶血的影响

丹皮酚、丹皮酚磺酸钠及 V_C 均具有一定的抗 UV 诱导红细胞溶血的能力,浓度越高,抑制率越大.在 0.07 mmol/L 到 0.56 mmol/L 之间,丹皮酚、丹皮酚磺酸钠和 V_C 对红细胞溶血的抑制率与其浓度之间呈显著正相关($r_{\text{丹皮酚}}=0.882\ 9$; $r_{\text{丹皮酚磺酸钠}}=0.962\ 9$; $r_{V_C}=0.984\ 4$),值得注意的是丹皮酚磺酸钠的作用强于丹皮酚和 V_C ,经 t 检验,三者存在极显著差异($P < 0.01$),表明丹皮酚磺酸钠具有优越的抗 UV 辐射的生物学效应(表 4).

3 讨论

在正常生理情况下,机体细胞内氧自由基产生和清除维持在一个动态的平衡状态上,过多或过少对机体都是不利的.但在某些病理状态下,自由基产生和清除失去平衡,则会对机体造成损伤,导致衰老和多种疾病的发生^[8].

实验证明丹皮酚和丹皮酚磺酸钠都具有一定的清除 O_2^- 的能力,且丹皮酚磺酸钠对 O_2^- 的清除作用强于丹皮酚.在清除羟自由基($\cdot OH$)方面,丹皮酚和丹皮酚磺酸钠的作用均较强,尤其是丹皮酚磺酸钠,其清除 $\cdot OH$ 的能力已高于作为阳性对照的 V_c .丹皮酚、丹皮酚磺酸钠都是一种小分子酚类物质,酚类物质具有清除自由基的作用^[9]:酚羟基易被氧化成醌类物质,其结构上的 X 电子能与氧原子不成对的单电子互相作用,发生共轭效应,使不成对的单电子向苯环靠近,使氧自由基的能量下降^[10],因此能有效阻止氧自由基引起的膜脂质过氧化,DNA 和蛋白质等生物大分子的氧化损伤.丹皮酚磺酸钠对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的清除能力均强于丹皮酚,可能的原因是其在水中的溶解度大大提高;或者可能是由于丹皮酚苯环上磺酸基的接入使得酚羟基 O-H 键强度发生改变,使得抗氧化活性提高.

红细胞(RBC)膜富含对氧自由基诱导的过氧化非常敏感的不饱和脂肪酸.自由基进攻红细胞膜引发脂质过氧化并最终导致溶血,抗红细胞溶血的机理主要是表现在对红细胞膜的保护上,因此红细胞是常用的分析和筛选天然抗氧化剂的实验体系^[11]. H_2O_2 可导致 RBC 溶血,其毒性由 $\cdot OH$ 表达,按 Fenton 反应: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$.我们在抗 H_2O_2 诱导红细胞溶血实验中发现丹皮酚及丹皮酚磺酸钠均具有一定的抗红细胞溶血的能力,且丹皮酚磺酸钠的作用强于丹皮酚,与化学模拟系统中抗 $\cdot OH$ 实验结果一致.丹皮酚磺酸钠可显著抑制 UV 致 RBC 的溶血,作用效果明显好于 V_c .这可能有二个方面的原因:一是 UV 致溶血由于辐射激发水产生 $\cdot OH$,是一种滞后的效应,溶血在照射 18 h 左右才产生,由于 V_c 性质不稳定,经 UV 照射会产生分解,长时间暴露在空气中也易被氧化,因此影响其抗红细胞溶血的能力,而丹皮酚磺酸钠的性质稳定;二是丹皮酚磺酸钠在 230 nm 及 270 nm 处均有较强的吸收,相对减弱了 UV 致红细胞溶血的作用^[2].

我们的研究结果明确显示丹皮酚磺酸钠具有较强的清除包括 $\cdot OH$ 在内的氧自由基的活性和抗 UV 诱导的红细胞溶血作用.丹皮酚磺酸钠作为一种植物源活性物质的修饰产物,水溶性强,性质稳定,和 V_c 一样安全可靠,有望成为经济高效的天然抗氧化剂新资源.

[参考文献]

- [1] 沙世炎,主编.中草药有效成分分析法(上册)[M].北京:人民卫生出版社,1985.
- [2] 吴晓慧,吴国荣,张卫明,等.丹皮酚提取、磺化及对植物病原菌的抑菌试验[J].中药材,2003,26(11):778—780.
- [3] 陈红红,胡显兴,张亚妮,等.苯酚类螯合剂清除氧自由基及抗辐射脂质过氧化作用研究[J].辐射研究与辐射工艺学报,1999,17(4):209—213.
- [4] 董季平,吴珍龄.黑豆皮醇提物清除自由基效果的研究[J].西南农业大学学报,2002,24(5):445—449.
- [5] Smirnoff N, Cumbes Q. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry[J]. 1989,28(4):1057—1060.
- [6] 李志孝,黄成钢,蔡育军,等.天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J].药学报,2000,35(5):358—362.
- [7] 蒋建伟,何文珊,严玉霞,等.茶多酚的离体抗氧化作用[J].中国病理生理杂志,1999,15(6):522.
- [8] 陈媛,主编.自由基医学[M].北京:人民军医出版社,1991.
- [9] 张红雨,陈德展.酚类抗氧化剂清除自由基活性的理论表征与应用[J].生物物理学报,2000,16(1):1—9.
- [10] 陈小夏,何冰.茶多酚清除氧自由基与抗脂质过氧化作用[J].中药材,1998,21(3):141—144.
- [11] 马兰萍,刘在群,周波,等.绿茶多酚对自由基诱导的红细胞氧化性溶血的抑制作用[J].科学通报,2000,45(12):1271.

[责任编辑:孙德泉]