

5 种石斛及其组织培养物对活性氧的清除作用

徐红, 刘峻, 王峥涛, 丁家宜

(中国药科大学, 江苏南京 210038)

摘要: 采用化学发光法, 以 3 种活性氧 ROS($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) 模型检测 5 种药用石斛及其培养物对 ROS 的清除作用。5 种药用石斛及其培养物的氯仿与甲醇提取物均具有清除 3 种 ROS 的作用, 且多超过阳性对照 Vc 的清除能力。氯仿提取物中以杯鞘石斛(*Dendrobium gratiosissimum* Rchb. f.) 药材的清除 ROS 能力最强, 甲醇提取物中以铁皮石斛(*D. officinale* Kimura) 培养物的清除 ROS 能力最强。表明石斛是一类清除 ROS 效果较好的天然药物。

关键词: 石斛; 活性氧(ROS); 化学发光

中图分类号: S567.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)02-0035-03

The scavenging of reactive oxygen species by crude drugs and cultured tissues of five species of *Dendrobium* Sw. XU Hong, LIU Jun, WANG Zheng-tao, DING Jia-yi (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(2): 35-37

Abstract: Using chemiluminescence system for detecting ability of scavenging reactive oxygen species ROS ($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) in five species of *Dendrobium* Sw. The results show that most of chloroform and methanol extracts from crude drugs and cultured tissues have significant scavenging effect on ROS and many of them are higher than positive control (Vc). The chloroform extract from *Dendrobium gratiosissimum* Rchb. f. (crude drug) and methanol extract from *D. officinale* Kimura (cultured tissues) have the best scavenging of ROS ability. This results indicated that *Dendrobium* Sw. are good natural drugs for scavenging of ROS.

Key words: *Dendrobium* Sw.; reactive oxygen species (ROS); chemiluminescence

在需氧生物中, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)及其具有 ROS 样活性的关联物质, 与细胞的凋亡、机体的病变和衰老有密切的联系。体内 ROS 的产生和清除通常呈平衡态, 当由于生理、病理等因素打破这种平衡时, 在机体内可造成多种功能性障碍与疾病的发生, 因此 ROS 代谢失调是很多病症的共同指标^[1,2]。石斛是贵重中药材, 应用历史悠久, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功效, 现代药理研究表明, 石斛还具有抗肿瘤、抗衰老、增强人体免疫力及扩张血管的作用^[3-6]。为进一步探讨中药石斛的药理活性及机理, 本文研究了 5 种药用石斛及其培养物对 ROS 的清除效能。

1 材料与方 法

1.1 仪器和材料

供试材料为杯鞘石斛(*Dendrobium gratiosissimum* Rchb. f.)、密花石斛(*D. densiflorum* Lindl.)、铁皮石斛(*D. officinale* Kimura)、鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*

Lindl.)和石斛(*D. nobile* Lindl.), 种名由作者鉴定, 组培苗由中国药科大学药学研究室提供。仪器为 SHG-C 生物化学发光测量仪(上海上立检测仪器厂)、PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)及微型计算机等, 维生素 C 为北京第二制药厂生产, 其他试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 样品处理 取干燥至恒重的 5 种药用石斛茎部及去根的干燥组培苗各 2.0 g, 50 mL 氯仿索氏提取器提取 5 h, 挥干药材, 加入甲醇 50 mL, 索氏提取器提取 5 h, 将两种提取液浓缩得氯仿及甲醇浸膏。分别称取浸膏各 3 mg, 配成 3、2 和 1 mg/mL 的样品水溶液, 待测。

1.2.2 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力检测^[7] 取待测样品各 20 μL 于测量管中(以蒸馏水作空白对照), 加入 10 μL 1 mmol/L 邻苯三酚溶液, 放入发光仪的反应池内, 原

收稿日期: 2001-01-20

作者简介: 徐红(1966-), 女, 陕西勉县人, 博士, 讲师, 主要从事生药学及中药生物技术研究。

位注入 970 μL 鲁米诺(1 mmol/L)-碳酸缓冲液(pH 10.2), 体积比 1:2, 启动发光(反应总体积为 1 mL), 记录发光强度。

1.2.3 $\cdot\text{OH}$ 清除能力检测^[8] 取待测样品各 50 μL 于测量管中(以蒸馏水作空白对照), 加入 50 μL 1 mmol/L CuSO_4 溶液, 20 μL 1 mmol/L 抗坏血酸溶液, 50 μL 1 mmol/L 邻菲罗啉溶液及 50 μL 0.15 mol/L H_2O_2 溶液, 放入反应池中, 原位注入 780 μL 0.05 mol/L 硼砂溶液(pH 9.24), 启动发光(反应总体积为 1 mL), 记录发光强度。

1.2.4 H_2O_2 清除能力检测^[9] 取待测样品各 50 μL 于测量管中(以蒸馏水作空白对照), 加入 50 μL 0.15% H_2O_2 溶液, 放入反应池中。原位注入 900 μL 鲁米诺(1 mmol/L)-碳酸缓冲液(pH 9.5), 体积比 1:17, 启动发光(反应总体积为 1 mL), 记录发光强度。

1.2.5 发光抑制率计算 化学发光法测定 ROS 时, 一定浓度范围内发光强度(CL)与 ROS 的数量呈相关关系, 故可用 CL 表示 ROS 的产生量。具清除 ROS 作用的物质可以降低 CL, 因此根据 CL 下降可以判断该物质清除 ROS 的能力。

$$\text{发光抑制率}(\%) = \frac{\text{CL}_{\text{空白对照}} - \text{CL}_{\text{样品}}}{\text{CL}_{\text{空白对照}}} \times 100\%$$

1.2.6 样品清除 ROS 能力评价 以发光抑制率为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 可绘出发光抑制曲线。一般用发光抑制率为 50% 时的样品浓度 IC_{50} 衡量样品对 ROS 的清除能力, IC_{50} 值越小, 表明样品清除 ROS 的能力越强, 反之则越弱。以 3 种活性氧 IC_{50} 的乘积衡量样品清除 ROS 的综合能力。

2 结果

2.1 石斛氯仿提取物清除活性氧的能力

5 种石斛及其组培苗氯仿提取物清除 ROS 能力的检测结果见表 1。可以看出, 除密花石斛和鼓槌石斛药材对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 没有清除作用外, 其余提取物均有不同程度的清除 ROS 作用。其中, 杯鞘石斛药材对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力高于阳性对照 Vc; 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力, 除杯鞘石斛组培物外, 其余均高于 Vc, 杯鞘石斛药材的清除能力最强; 对 H_2O_2 的清除能力, 除鼓槌石斛药材外, 其余也均高于 Vc, 杯鞘石斛药材的清除

能力最强。清除 ROS 综合能力的评价结果显示, 杯鞘石斛药材清除 ROS 能力最强, 鼓槌石斛清除 ROS 能力最弱。

2.2 石斛甲醇提取物清除活性氧的能力

5 种石斛及其组培苗甲醇提取物清除 ROS 能力比较见表 2。可以看出, 5 种药用石斛及其培养物的甲醇提取物均有清除 ROS 作用, 清除能力大多超过 Vc, 而且比氯仿提取物的强, 其中以铁皮石斛培养物的清除能力最强, 杯鞘石斛药材清除能力最弱。

3 讨论

(1) 药用石斛在临床及其复方中广泛应用, 具有明目、清热、抗癌、抗衰老等多种功效, 而这些疾病的产生多与 ROS 代谢失调所致的组织细胞损伤有关^[10,11]。不同天然产物对不同类型的 ROS 清除效果各异, 机理也不尽相同, 所以, 应建立不同的 ROS 模型来评价药物的清除作用。本文采用的 3 种活性氧 ROS, 其中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 是体内最早形成的自由基, 也是最主要的 ROS, $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 则是导致体内脂质过氧化的主要 ROS。化学发光法中发光强度(CL)与 ROS 的数量呈负相关, 故可用于检测石斛及其培养物清除 ROS 的作用。

(2) 自然界具有 ROS 清除能力的天然产物成分复杂, 种类繁多, 其化学结构多含酚羟基功能团, 石斛主要含生物碱、菲醌类、联苄类、茛菪类、三萜甙类、多糖类等成分, 其中菲醌类、联苄类、茛菪类化合物结构中有很多酚羟基功能团, 因此推测一些石斛具有清除 ROS 作用可能与这些化合物有关。以氯仿和甲醇作提取溶剂, 石斛中极性较大与极性较小的成分均能够被提取出来, 试验结果也表明甲醇提取的极性较大的成分清除 ROS 的作用高于氯仿提取的小极性物质, 揭示石斛中大极性物质清除 ROS 效果较好。研究还发现, 石斛药材和培养物在 ROS 清除效能上存在差异, 这可能与培养过程中次生代谢产物的变化有关。但具体是哪些化合物在起清除 ROS 作用, 尚需结合化学成分做进一步的研究。

(3) 铁皮石斛在传统石斛类药材中药用价值较高, 其药材和培养物均有较高的清除 ROS 能力, 从而在清除 ROS 活性方面证明了铁皮石斛的药理活性。对石斛不同提取物 ROS 作用体系的评价, 也进一步证明石斛通过调节 ROS 平衡失调而起到治疗

疾病的作用,值得结合临床基础研究进行深入探讨。

表1 5种石斛氯仿提取物的清除活性氧作用(n=2)

Table 1 Scavenging ability of ROS of chloroform extracts from five species of *Dendrobium* Sw. (n=2)

样品 Sample	清除 O ₂ ⁻ 能力 ¹⁾ Scavenging of O ₂ ⁻ ¹⁾ (mg/mL)	清除 ·OH 能力 Scavenging of ·OH (mg/mL)	清除 H ₂ O ₂ 能力 Scavenging of H ₂ O ₂ (mg/mL)	清除 ROS 综合能力 Total scavenging ability of ROS (mg/mL)
杯鞘石斛(药材) <i>D. gratiosissimum</i> Rehb. f. (crude drug)	1.158 × 10 ⁻³	9.570 × 10 ⁻⁴	9.240 × 10 ⁻⁴	1.024 × 10 ⁻⁹
杯鞘石斛(组培) <i>D. gratiosissimum</i> Rehb. f. (culture)	2.349 × 10 ⁻³	7.264 × 10 ⁻³	3.676 × 10 ⁻³	6.272 × 10 ⁻⁸
密花石斛(药材) <i>D. densiflorum</i> Lindl. (crude drug)	-	1.750 × 10 ⁻³	2.203 × 10 ⁻³	3.855 × 10 ⁻⁶
密花石斛(组培) <i>D. densiflorum</i> Lindl. (culture)	2.931 × 10 ⁻³	1.748 × 10 ⁻³	2.932 × 10 ⁻³	1.502 × 10 ⁻⁸
铁皮石斛(药材) <i>D. officinale</i> Kimura (crude drug)	2.701 × 10 ⁻³	1.061 × 10 ⁻³	1.858 × 10 ⁻³	5.324 × 10 ⁻⁹
铁皮石斛(组培) <i>D. officinale</i> Kimura (culture)	6.047 × 10 ⁻³	4.488 × 10 ⁻³	1.855 × 10 ⁻³	5.034 × 10 ⁻⁸
鼓槌石斛(药材) <i>D. chrysotoxum</i> Lindl. (crude drug)	-	2.349 × 10 ⁻³	4.526 × 10 ⁻³	1.063 × 10 ⁻⁵
鼓槌石斛(组培) <i>D. chrysotoxum</i> Lindl. (culture)	2.881 × 10 ⁻³	2.324 × 10 ⁻³	2.164 × 10 ⁻³	1.449 × 10 ⁻⁸
石斛(药材) <i>D. nobile</i> Lindl. (crude drug)	1.950 × 10 ⁻³	1.957 × 10 ⁻³	1.644 × 10 ⁻³	6.274 × 10 ⁻⁹
石斛(组培) <i>D. nobile</i> Lindl. (culture)	2.129 × 10 ⁻³	1.283 × 10 ⁻³	1.845 × 10 ⁻³	5.040 × 10 ⁻⁹
维生素 V _C (CK)	1.300 × 10 ⁻³	5.200 × 10 ⁻³	4.400 × 10 ⁻³	2.974 × 10 ⁻⁸

¹⁾ - : 无抑制作用 no effect

表2 5种石斛甲醇提取物的清除活性氧作用(n=2)

Table 2 Scavenging ability of ROS of methanol extracts from five species of *Dendrobium* Sw. (n=2)

样品 Sample	清除 O ₂ ⁻ 能力 Scavenging of O ₂ ⁻ (mg/mL)	清除 ·OH 能力 Scavenging of ·OH (mg/mL)	清除 H ₂ O ₂ 能力 Scavenging of H ₂ O ₂ (mg/mL)	清除 ROS 综合能力 Total scavenging ability of ROS (mg/mL)
杯鞘石斛(药材) <i>D. gratiosissimum</i> Rehb. f. (crude drug)	1.808 × 10 ⁻³	9.710 × 10 ⁻⁴	2.980 × 10 ⁻³	5.231 × 10 ⁻⁸
杯鞘石斛(组培) <i>D. gratiosissimum</i> Rehb. f. (culture)	1.662 × 10 ⁻³	8.720 × 10 ⁻⁴	2.531 × 10 ⁻³	3.668 × 10 ⁻⁹
密花石斛(药材) <i>D. densiflorum</i> Lindl. (crude drug)	1.117 × 10 ⁻³	8.950 × 10 ⁻⁴	1.706 × 10 ⁻³	1.706 × 10 ⁻⁹
密花石斛(组培) <i>D. densiflorum</i> Lindl. (culture)	1.711 × 10 ⁻³	8.400 × 10 ⁻⁴	1.992 × 10 ⁻³	2.863 × 10 ⁻⁹
铁皮石斛(药材) <i>D. officinale</i> Kimura (crude drug)	1.336 × 10 ⁻³	1.328 × 10 ⁻³	2.460 × 10 ⁻³	4.365 × 10 ⁻⁹
铁皮石斛(组培) <i>D. officinale</i> Kimura (culture)	1.022 × 10 ⁻³	7.500 × 10 ⁻⁴	1.241 × 10 ⁻³	9.512 × 10 ⁻¹⁰
鼓槌石斛(药材) <i>D. chrysotoxum</i> Lindl. (crude drug)	1.323 × 10 ⁻³	1.446 × 10 ⁻³	2.055 × 10 ⁻³	3.931 × 10 ⁻⁹
鼓槌石斛(组培) <i>D. chrysotoxum</i> Lindl. (culture)	1.722 × 10 ⁻³	1.163 × 10 ⁻³	2.177 × 10 ⁻³	4.360 × 10 ⁻⁹
石斛(药材) <i>D. nobile</i> Lindl. (crude drug)	1.331 × 10 ⁻³	1.169 × 10 ⁻³	2.282 × 10 ⁻³	3.551 × 10 ⁻⁹
石斛(组培) <i>D. nobile</i> Lindl. (culture)	1.323 × 10 ⁻³	8.260 × 10 ⁻⁴	3.452 × 10 ⁻³	3.772 × 10 ⁻⁹
维生素 C V _C (CK)	1.300 × 10 ⁻³	5.200 × 10 ⁻³	4.400 × 10 ⁻³	2.974 × 10 ⁻⁸

参考文献:

- [1] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京:科学出版社,1994. 44-45.
- [2] 刘峻,丁家宜,黄山,等. 16种伞形科药用植物对超氧自由基的清除作用[J]. 植物资源与环境,1998,7(4):29-32.
- [3] 王宪楷,赵同芳. 石斛属植物的化学成分与中药石斛[J]. 药学通报,1986,21(11):666-669.
- [4] 蔡体育. 石斛多糖对T细胞巨噬细胞活性的影响[J]. 中山医科大学学报,1989,10(2):66-69.
- [5] 马国祥,徐国钧,徐珺珊,等. 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性研究[J]. 中国药科大学学报,1994,25(3):24-26.
- [6] 王天山,陆跃鸣,马国祥,等. 鼓槌石斛中化学成分对K₅₆₂肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(2):1-5.
- [7] 郭嵩光,王振铤. 邻苯三酚自氧化-化学发光法测定SOD活性[J]. 植物生理学通讯,1989,(3):54-57.
- [8] 范小兵,李慈娟,沙大年,等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. 基础医学与临床,1998,18(6):68-71.
- [9] 胡天喜,陈妃,陈克明,等. 荧光分析与医学[M]. 上海:华东师范大学出版社,1990. 48-55.
- [10] Halliwell B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance[J]. Med Biol, 1984; 62(2): 71-77.
- [11] Hippeli S, Heister I, Elstner E F. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants[J]. Plant Physiol Biochem, 1999, 37(3): 167-178.

(责任编辑:宗世贤)