

16种伞形科药用植物 对超氧自由基的清除作用

刘峻 丁家宜 黄山 成方卫* 张恩汉

(中国药科大学, 南京 210038)

摘要 采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - NaOH -Luminol 发光体系, 应用智能化学发光法对 16 种伞形科药用植物提取物的自由基清除能力和对酪氨酸酶的抑制能力进行筛选。实验结果表明这些伞形科药用植物大都具有清除自由基的作用, 其中羌活 (*Notopterygium forbesii* de Boiss.) 的“SOD 样作用”达到 29.67 U/mg(原生药量), 提示这些植物具有稳定的非酶类清除自由基物质, 并且“SOD 样作用”强弱与其对酪氨酸酶的抑制能力呈明显正相关。

关键词 伞形科; 自由基; 智能化学发光; “SOD 样作用”

The scavenging of free radical (O_2^-) by sixteen species of commonly used Umbelliferae medicinal plants Liu Jun, Ding Jia-Yi, Huang Shan, Cheng Fang-Wei, Zhang En-Hang (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038), *J. Plant Resour. & Environ.* 1998, 7(4): 29~32

The effect of free radical (O_2^-) in human body has been well known in damaging the membrane causing diseases. Luminol- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - NaOH was used by CAD-Chemiluminescence to determine the scavenging of free radical (O_2^-) by sixteen species of commonly used Umbelliferae medicinal plants. The results indicated that these plants have significant scavenging effect on free radical (O_2^-), the efficacy of scavenging (SOD-like activity) has close correlation with the tyrosinase inhibition.

Key words Umbelliferae; free radical (O_2^-); CAD-Chemiluminescence; SOD-like activity

天然植物应用于化妆品在我国已有数千年的历史,《千金要方》就辟有“面药”专章,《外台秘要》有美容专卷,计 28 类 200 个方剂。由于其中多为复方且成分复杂,很难确定其有效成分。据统计在这些古医籍的记述中当归、白芷、川芎等使用频率较高^[1,2]。体内药理学也证明一些伞形科植物对治疗面部色素沉积(如蝴蝶斑、黄褐斑)有一定效果^[3,4]。这些有疗效的中草药多集中于伞形科,据《本草纲目》记载该科植物多具有活血、化瘀、祛风等功效,现代药理实验也证实具有这些药理作用的有效物质如川芎嗪、柴胡多糖等有较强的清除自由基(O_2^-)的能力^[5,6]。自由基是一种引起机体氧化的重要物质,直接或间接引起脂质过氧化对生物膜造成损伤,与衰老、炎症、放射损伤、癌变有密切关系^[7]。机体内除了有一些特异性自由基清除酶

* 为本校九七届本科实习生

刘峻:男,1971年生,硕士生,主要从事药用植物基因工程、自由基与天然产物方面的研究。

收稿日期 1998-05-15

(如 SOD 等)外,还有一些小分子抗氧化剂(V_E 、 V_C 等),这些物质可有效防止皮肤衰老、祛斑以及治疗一些皮肤炎症。一些中草药的天然有效成分具有类似 SOD 的作用,而且分子量小,能快速渗入皮肤,提高皮肤代谢功能而达到抗衰老的目的。目前对于中草药美白机理的解释多停留在疗效学基础上,由于作用机理不明确,因此在使用上较混乱。Yukimitu Masamotode 等曾发现几种伞形科植物提取物对形成黑色素的酪氨酸酶有抑制作用^[8],但至今未见有关机理的报道。为进一步了解这些天然药物的抗衰老指标及其美白机理,本文对伞形科 16 种常用药用植物的提取物进行了清除自由基能力的初步研究,并与伞形科提取物对酪氨酸酶的抑制能力进行对比实验。

由于超氧化物歧化酶(SOD)是一种公认的自由基清除酶,而一些小分子物质(如酚类、黄酮等)也具相同功效^[7],本研究将提取物中非酶类的清除自由基能力以标准化 SOD 单位量化,称之为该样品的“SOD 样作用”。在化学发光法的基础上^[9],本实验采用改进的智能化学发光法进行测定。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 仪器 化学发光仪(原产厦门大学实验厂,由本校物化、物理及生物技术教研室改进)、多用真空机(郑州长城仪器厂)、486 型微机、数据采集板(八位)、754 型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.1.2 试剂 $Na_2S_2O_4$ (上海硫酸厂)、3-氨基邻苯三酸酐(luminol)(本校物化教研室提供)、EDTA、牛血标准 SOD(4 000 U/瓶,6 000 U/mg Protein,批号:96-3-20,华东理工大学应用生化教研室提供。本品是中国药学会生化药物专业委员会推荐使用的 SOD 参照品)、酪氨酸酶(Sigma 公司,批号 9002-10-2)、I 号储备液[0.05 M pH 7.8 KH_2PO_4 -NaOH(含 0.1 mM EDTA)]、II 号储备液[0.1 M pH 9.4 Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ (含 0.1 mM EDTA)]、III 号储备液(1/15 M pH 6.8 KH_2PO_4 -NaOH)。所用试剂均为分析纯或优级纯。

1.1.3 植物材料 伞形科药用植物 16 种(药材购于江苏省药材公司,详见表 1)。所有生药经本校原药用植物园主任张恩汉先生鉴定。

1.2 方法

1.2.1 材料前处理 粉碎后精称 10.00 g,以甲醇-水(1:1)回流 3 h,过滤,残渣以同法再提取 2 次,合并提取液后定容,置于 4℃ 冰箱中待用^[8]。

1.2.2 “SOD 样作用”测定系统 采用 $Na_2S_2O_4$ -NaOH-Luminol 发光体系^[10],发光量经放大后通过与计算机接口的自动数据采集板,送入微机处理后即得到发光量积分值(智能化学发光的仪器原理、性能、计算程序及改进方法另文详述)。

1.2.2.1 “SOD 样作用”标准曲线的制定 吸取 2 μ l I 号储备液和 $Na_2S_2O_4$ -NaOH 混合液(1:3),注入 5 mM luminol-9.4 磷酸缓冲液^[10]中,同时起动反应程序,测量发光面积积分值,即空白值。将空白换成不同浓度 SOD 标准(0.25 U/ml, 0.5 U/ml, 1 U/ml …)液,其余步骤同上,依照公式(1)计算抑制率。绘制 SOD 标品的抑制率曲线(见图 1),在 1 U/ml~8 U/ml 的最佳条件下有较好的线性关系和回收率($y = 16.7 + 2.72x$ $r = 0.998$, 平均回收率

100.2%)。

1.2.2.2 样品测定 提取液用 2 μ l I 号储备液稀释,其余步骤同 1.2.2.1,从标准曲线上查出的 SOD 单位: A_1 即为每 ml 样品中 SOD 的活性单位数 (U), 定义为“SOD 样作用”。依照公式(2)计算出单位原生药量中 SOD 样作用的大小。

1.2.3 酪氨酸酶抑制量的测定方法 伞形科药材提取液用 III 号储备液稀释成所需浓度,测定提取液对酪氨酸酶的抑制率^[8],以 50% 的抑制体积比浓度 (IC_{50}) A_2 评价其抑制能力的大小,按式(3)计算出单位原生药量对酪氨酸酶的抑制能力。

1.2.4 计算公式

$$\text{抑制率}(\%) = (I_0 - I) / I_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: I_0 : 空白发光积分值; I : 样品发光积分值

$$\text{单位原生药量“SOD 样作用”} = A_1 \times B_1 / C \quad (\text{U/mg 原生药量}) \quad (2)$$

式中: A_1 : 取样量中所含的 SOD 单位 (U); B_1 : 提取物总体积/取样量; C : 总生药量 (mg)

$$\text{单位原生药量对酪氨酸酶抑制作用} (IC_{50}) = A_2 \times C / B_2 \quad (\text{mg 原生药量/ml}) \quad (3)$$

式中: A_2 : 提取液的 IC_{50} 浓度 (ml/ml); B_2 : 提取物总体积 (ml); C : 总生药量 (mg)。

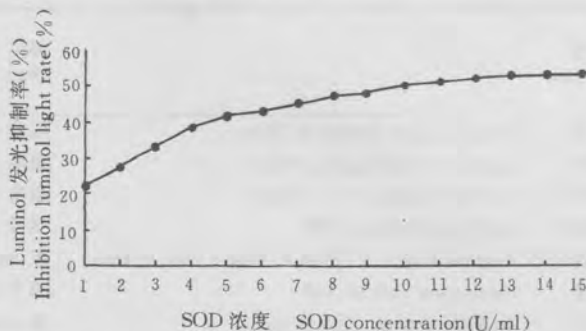


图 1 SOD 对 luminol 发光的抑制曲线

Fig 1 Inhibitory curve of SOD to luminol light

2 结果与讨论

通过对 16 种常用伞形科药用植物“SOD 样作用”的筛选,从结果看大多数种类都具有清除自由基的能力,其中羌活、川芎均超过了 20 U/mg 原生药量,大多数都超过了常用美白剂熊果素的清除自由基的能力 (1 U/mg), 同时进一步证实这些伞形科药用植物提取物对酪氨酸酶确有较强的抑制作用 (详见表 1)。由于皮肤中各种类型的色素障碍,主要是由于机体酪氨酸代谢紊乱,色素的异常沉着造成的。即机体内的酪氨酸在酪氨酸酶的作用下氧化为多巴、多巴醌后经多步反应,最终聚合成色素颗粒 (melanosome)。在酪氨酸反应生成黑色素的过程中,酪氨酸酶的催化作用主要发生在酪氨酸氧化成多巴和多巴氧化为多巴醌这两步反应中,因此自由基增多则氧化作用增强,黑色素形成更多更快。本实验以原生药量作为统一参照系,发现提取物中的“SOD 样作用”和抑制酪氨酸酶能力呈显著正相关,如“SOD 样作用”最高的羌活 (34.67 U/mg) 其抑制酪氨酸酶能力也最强 ($IC_{50} = 6.00$ mg/ml), 而“SOD 样作用”较小的如防风 (0.27 U/mg) 抑制酪氨酸酶能力也较弱 ($IC_{50} > 100$ mg/ml)。表明提取物并非通过直接拮抗酪氨酸酶而是因其具有“SOD 样作用”的非酶类小分子清除自由基物质,抑制了由活性氧自由基和酪氨酸酶参加的酶促反应而达到抑制和减少黑色素的目的,这样有可能减轻对皮肤的

刺激,而同样可达到皮肤美白的目的。

表 1 16 种伞形科药用植物“SOD 样作用”及抑制酪氨酸酶作用的比较 (n=3)

Tab 1 Comparison of SOD-like activity and tyrosinase inhibition of 16 species of Umbelliferae plants (n=3)

序号 种名 No. Species	部位 Organ	SOD 样作用 SOD-like activity (U/mg)	抑制酪氨酸酶作用 Tyrosinase inhibition IC ₅₀ (mg/ml)
1 羌活 <i>Notopterygium forbesii</i> de Boiss.	根茎 rhizome	34.67 ± 2.35	6.00
2 川芎 <i>Ligusticum chuangxiang</i> Hort.	根茎 rhizome	20.63 ± 3.03	12.60
3 蛇床子 <i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cuss.	果实 fruit	15.02 ± 0.23	11.00
4 北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i> DC.	茎叶 stem, leaf	14.03 ± 8.17	10.00
5 重齿当归 <i>Angelica biserrata</i> (Shan et Yuan) Yuan et Shan	根 root	10.72 ± 0.23	18.00
6 茴香 <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	果实 fruit	6.60 ± 5.60	40.00
7 当归 <i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	根 root	4.95 ± 0.47	56.00
8 珊瑚菜 <i>Glehnia littoralis</i> Fr. Schmidt ex Miq.	根 root	2.80 ± 1.15	60.00
9 白芷 <i>Angelica dahurica</i> (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. ex Franch et Sav.	根 root	2.50 ± 0.71	70.00
10 藁本 <i>Ligusticum sinense</i> Oliv.	全草 whole plant	1.65 ± 0.93	75.00
11 紫花前胡 <i>Angelica decursiva</i> (Miq.) Franch. et Sav.	根 root	1.65 ± 0.40	>100
12 欧当归 <i>Levisticum officinale</i> Koch.	根 root	0.50 ± 0.30	>100
13 前胡 <i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn.	根 root	0.83 ± 0.23	>100
14 破铜钱 <i>Hydrocotyle sibthorpioides</i> Lam. var. <i>batrachium</i> (Hance) Hand.-Mazz. ex Shan	全草 whole plant	0.50 ± 0.20	>100
15 防风 <i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk.	根 root	0.27 ± 0.20	>100
16 明党参 <i>Changium smyrnioides</i> Wolff	根 root	-	>100

本实验采用智能化学发光法,无需进行分离纯化等工作,很适合中药材粗提物的筛选,另外智能化学发光法具有微量、快速、灵敏、准确等特点,在深入进行化学分离和药理活性研究时可以作为跟踪检测手段。本文仅就一些常用伞形科药用植物提取物进行了自由基与酪氨酸酶的体外检测,有关“SOD 样作用”的活性成分和药理还需深入研究。从自由基理论出发,以中医理论为指导,通过建立合理的方法是研究和筛选中草药中活性成分的有效途径之一。

参 考 文 献

- 袁昌齐. 中草药化妆品的研制. 中国野生植物资源, 1996, (3): 12~13.
- 黄亦琦, 王裕颐. 论中草药在天然化妆品开发中的应用. 中医药信息, 1994, (3): 14~15.
- 王心祥. 化癥褪斑汤治疗面部黄褐斑 55 例. 安徽中医学院学报, 1991, 10(3): 28.
- 汪黔蜀, 余 蕾. 中药面膜治疗黄褐斑 150 例临床小结. 云南中医杂志, 1992, 13(1): 17.
- 黄建邦, 刘雪芬, 陈树元. 川芎嗪对人血多形核细胞呼吸爆发与氧自由基的抑制作用. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(10): 607.
- 骆传环, 王作华, 程鲁榕. 柴胡多糖抗辐射作用的实验研究. 中草药, 1995, 26(12): 645~646.
- 方允中, 李文杰主编. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989. 193~194.
- Yukimitsu Masamoto. Inhibitory effect of Chinese crude drugs on tyrosinase. *Planta Medica*, 1980, 40(4): 361~365.
- 李益新, 方允中. 超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法. 生物化学与生物物理进展, 1983, (2): 59~61.
- 黄 山, 翁元凯, 翁念宇. 用碱性 Na₂S₂O₃ 水溶液产生超氧阴离子自由基. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(3): 209.

(责任编辑: 许定发)