

活性分析

太子参萃取物抗应激损伤所致炎症反应机制研究^{*}庞海月^{1,2}, 黄立森^{1,2}, 吴贇坦^{1,2}, 陈煜沛^{1,2}, 林逸仪³, 张亚楠⁴, 王雅英^{4**}, 王贵弘^{1,2**}

(1. 厦门医学院医学技术系, 厦门 361000; 2. 福建省天然化妆品工程研发中心, 厦门 361000;

3. 厦门上新日用化学制品有限公司, 厦门 361000; 4. 福建省道地药材生物工程重点实验室, 厦门 361000)

摘要 目的: 研究3种不同萃取方式对太子参萃取物的抗炎症反应功效的差异, 为太子参在抗炎症方面的应用提供参考。方法: 分别采用水加热回流萃取, 95%乙醇超声波萃取和超临界萃取法萃取太子参获得不同萃取物, 利用MTT实验评估萃取物的安全性, 脂氧合酶活性抑制试验和一氧化氮清除实验评估太子参萃取物的抗炎活性, 运用pUC119 DNA质粒模型评估太子参萃取物的DNA保护作用。结果: 太子参水萃取物和醇萃取物具有显著抑制脂氧合酶活性, 活性由强至弱的顺序为水萃取物、醇萃取物; 3种方式所得太子参萃取物均具有清除NO活性, 活性由强至弱的顺序为水萃取物、超临界萃取物、醇萃取物; 太子参水萃取物和醇萃取物均具有一定的DNA保护作用。结论: 太子参萃取物抗应激损伤与其具有抑制脂氧合酶活性, 清除NO和DNA保护功能有关。

关键词: 太子参; 抗炎作用; 脂氧合酶; 一氧化氮; DNA

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)09-1675-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.09.19

Mechanism study of *Pseudostellaria heterophylla* extracts on anti-inflammation induced by stress injuries^{*}PANG Hai-yue^{1,2}, HUANG Li-sen^{1,2}, WU Hong-tan^{1,2}, CHEN Yu-pei^{1,2},
LIN Yi-yi³, ZHANG Ya-nan⁴, WANG Ya-ying^{4**}, WANG Gui-hong^{1,2**}

(1. Department of Medical Technology, Xiamen Medical College, Xiamen 361000, China;

2. Application Technique Engineering Center of Natural Cosmeceuticals, College of Fujian Province, Xiamen 361000, China;

3. XiamenShangxinDaily Chemical Products Co. Ltd., Xiamen 361000, China;

4. Fujian Provincial Key Laboratory of Genuine Regional Drug Bio-engineering, Xiamen 361000, China)

Abstract Objective: To study anti-inflammation effect of *Pseudostellaria heterophylla* extracts by three different extraction methods, providing information for the application to anti-inflammation of *Pseudostellaria heterophylla*. **Methods:** Water heating reflux extraction, 95% ethanol ultrasonic extraction and super critical extraction were used for extraction, separately. MTT method was used to assess the toxicity. Lipoygenase (LOX-1) activity inhibition test

* 厦门医学院校级科研计划项目 (No. K2016-33); 厦门医学院博士科研启动基金 (No. Z2015-12)

** 通信作者 Tel: 13600938458; E-mail: 951428287@qq.com

第一作者 Tel: 18060612247; E-mail: 201500010339@xmmc.edu.cn

and nitric oxide scavenging experiment were used for the analysis of anti-inflammatory activity. The pUC119 DNA plasmid model was applied to examine the DNA protection effect. **Results:** Water extracts and alcohol extracts of *Pseudostellaria heterophylla* significantly inhibited lipoyxygenase activity, and the intensity of aqueous extracts and alcohol extracts were in an descending order. Extracts from *Pseudostellaria heterophylla* in three ways all showed NO-elimination activity, and the intensity of aqueous extracts, supercritical extracts, and alcohol extracts were in descending order. Water extracts and alcohol extracts both had certain protective effect for DNA. **Conclusion:** The ability of *Pseudostellaria heterophylla* extracts in helping stressinjuries is related to its lipoyxygenase activity inhibition, NO-scavenging, and DNA protection activity.

Keywords: *Pseudostellaria heterophylla*; anti-inflammatory action; lipoyxygenase; NO; DNA

应激反应是各种内外环境因素及社会、心理因素刺激作用于机体时,会出现的全身性非特异性适应反应。应激的最直接表现即精神紧张,脾虚肺热,精神疲乏,与过度应激诱导机体内源性炎症反应相关^[1]。在内源性炎症发动的过程中,脂氧合酶(LOX)和一氧化氮(NO)起到重要作用。花生四烯酸经过 LOX 途径产生白三烯类(leukotrienes, LTs)炎性介质,参与炎症反应过程。而 NO 在体内由一氧化氮合酶催化左旋精氨酸而产生,具有广泛的生物学功能,是重要的细胞信号分子,同时还参与神经信息传递,心肺功能调节,细胞凋亡以及炎症反应,免疫防御等多个过程^[2]。NO 目前已知的有神经型、内皮型及诱生型,前两者又称为结构型,主要参与正常生理过程,维持细胞的正常生理功能。而诱生型 NO 由巨噬细胞内诱导性一氧化氮合酶催化产生,短期、大量的释放使巨噬细胞参与炎症反应^[3]。适度的炎症反应,对于机体保护自身免受外环境的损伤,有着重要的意义,然而长期、过度的炎症反应会通过损伤 DNA,抑制线粒体呼吸链、活性氮等细胞毒性效应介导细胞和组织的损伤^[4]。中国药典表明太子参具有补益脾肺,益气生津,治肺虚咳嗽,脾虚食少,心悸,怔忡,水肿,消渴,缓解精神疲乏等作用,但具体药理作用机制仍不清^[5]。本研究从抑制应激性损伤诱导的炎症反应方面探讨太子参的药理作用机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

瑞士 Tecan Sunrise 多功能酶标仪(瑞士帝肯(Tecan)集团公司); R-2000 旋转蒸发仪(台湾台大(东莞)有限公司); CO₂ 超临界萃取仪(Jasco 日本分光公司); LE2002E 电子天平(梅特勒托利多科学仪

器有限公司)。

1.2 材料与试剂

太子参购自福建省柘荣产区;乙醇购自景明化工股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO)(CAS 号 67-68-5,阿拉丁);MTT(CAS 号 298-93-1,阿拉丁);亚油酸(CAS 号 60-33-3,阿拉丁);5-脂氧合酶(LOX-5)(CAS 号 JD-1443,上海晶都生物);硝普钠(CAS 号 13755-38-9)、盐酸萘乙二胺(CAS 号 1465-25-4)、磷酸(CAS 号 7664-38-2)、磺胺(CAS 号 57-67-0)、半胱氨酸(CAS 号 52-90-4)、谷胱甘肽(CAS 号 70-18-8),国药集团化学试剂有限公司。

2 试验方法

2.1 太子参(福建省柘荣产区)的萃取

2.1.1 水加热回流萃取法 将太子参粉末与水按 1:(3~5)的比例进行加热回流萃取,经过 5 000 r·min 离心 5 min 后的上层液为太子参萃取液,再利用减压浓缩至膏状,得到不挥发成分介于 10%(质量百分比)的水萃取物。

2.1.2 95%乙醇超声波萃取法 将太子参粉末与 95%乙醇按 1:(5~8)的比例混合,每天以 300 W 超声波破碎机震荡 30 min,第 2 天重复上述操作后过滤,得到第 1 份滤液。过滤后的残渣再重复同样程序,得到第 2 份滤液,2 次滤液再经浓缩及冷冻干燥,即得醇萃取物。

2.1.3 超临界萃取法 先取 485 g 太子参进行破碎前处理,超临界流体萃取条件为压力 3.5×10^7 Pa,温度 30 ℃,最后得到萃取液质量为 13.8 g,得率 2.8%,即得超临界萃取物。

2.2 MTT 实验

采用 MTT 评估萃取物对皮肤细胞是否具有细胞毒性。将人类纤维母细胞株化细胞(1×10^4 /孔)培

养在 96 孔板,加入以 DMSO 配制的不同浓度 ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 萃取物溶液,分别在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养至少 24 h,移除旧的培养液,以 PBS 清洗 1 次,更换培养液,加入 $0.012 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$,于细胞培养箱中作用 4 h,移除培养液,加入 $100 \mu\text{L}$ 的 DMSO 溶解沉淀物,震荡 10 min,采用多功能酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度^[6]。

2.3 脂氧合酶活性抑制试验

用 DMSO 将 3 种萃取物配制成 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;取各浓度的 3 种萃取物溶液各 $1 \mu\text{L}$,对照组取 DMSO $1 \mu\text{L}$,均加入 LOX-5 (135 U) $2 \mu\text{L}$,然后加入 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚油酸 $1.5 \mu\text{L}$ 作为反应底物,并加入 Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH } 9.0$) $95.5 \mu\text{L}$,混合均匀,静置反应 3 min 后,测定 234 nm 波长处吸光度^[7]。

2.4 NO 清除试验

取 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝普钠 (NO 供体) $98 \mu\text{L}$,分别加入用 DMSO 配制的质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3 种萃取物溶液各 $2 \mu\text{L}$,于 25°C 培养 150 min,加入试剂 1 (0.1% 盐酸萘乙二胺、 5% 磷酸和 1% 磺胺) $100 \mu\text{L}$,混合均匀后,测 560 nm 波长处吸光度^[8]。

2.5 DNA 保护功能评估

pUC119 DNA 是一个超螺旋结构 (S-form) 的质粒,经过 UV 或氧化伤害后,超螺旋结构会被打开成线形 (L-form)。将不同浓度的太子参水提取物或醇提取物分别加入到 pUC119 DNA 质粒体系中,予以 UVB+ H_2O_2 处理 30 min,进行 DNA 凝胶电泳^[9]。

3 结果与分析

3.1 太子参萃取物安全性评估

以 3 种不同方法萃取得太子参萃取物,处理 Hs68 纤维母细胞 24 h,MTT 法评估萃取物对 Hs68 纤维母细胞增殖影响 (表 1),结果显示随着 3 种不同萃取方法所得太子参萃取物浓度增加,Hs68 纤维母细胞存活率随之下降,对细胞增殖的影响活性由强至弱的顺序为超临界萃取物、醇萃取物、水萃取物。与常用的细胞毒药物相比,3 种不同萃取方法获得的太子参萃取物对 Hs68 纤维母细胞的增殖影响较弱,表明其应用安全性较高。

表 1 太子参萃取物对 Hs68 纤维母细胞株之毒性影响

Tab. 1 The effect of *Pseudostellaria heterophylla* extracts on Hs68 fibroblast cell lines

萃取物 (extract)	质量浓度 (mass concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率 (cell survival rate)/%
醇萃取物 (alcohol extracts)	20	98.6 ± 5.1
	50	90.3 ± 4.4
	100	77.6 ± 4.8
水萃取物 (aqueous extracts)	20	95.7 ± 1.9
	50	91.0 ± 6.1
	100	86.4 ± 4.8
超临界萃取物 (supercritical extracts)	20	92.4 ± 2.1
	50	80.1 ± 3.4
	100	68.6 ± 2.8

3.2 太子参萃取物抗炎功效

有研究表明复方太子参片可抑制小鼠炎症反应^[10]。采用脂氧合酶抑制率及一氧化氮清除率实验进行抗炎功效评估,结果显示醇萃取物与水萃取物具有显著抑制脂氧合酶活性,而超临界萃取物则没有脂氧合酶活性抑制作用 (表 2)。究其原因,与太子参的脂氧合酶抑制物主要为水溶性成分有关,因为超临界萃取法只能萃取极性低的成分,而水萃取和醇萃取法可以获取更多的太子参水溶性成分。NO 也是炎症反应中的一个重要炎症介质,参与炎症反应的病理生理调控^[11]。NO 清除实验结果表明,3 种太子参萃取物均具有显著的清除 NO 活性,与相同浓度的芦丁活性相当,NO 清除活性由大至小的顺序为水萃取物、超临界萃取物、醇萃取物,表明 NO 清除与太子参非极性成分相关性更大。

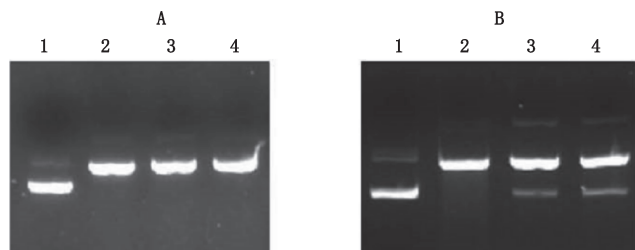
3.3 太子参萃取物 DNA 保护功效

DNA 严重的损伤会导致肿瘤的生成,因此天然抗氧化剂的研究越来越受到注目。过去的研究亦发现多种不同天然抗氧化剂有效保护 DNA 的裂解,如熊果酸、齐墩果酸、香草醛、姜黄等^[12-13],将安全性高及抗炎功效较好的水萃取物及醇萃取物进一步进行 DNA 保护能力评估,结果表明太子参水萃取物和醇萃取物均表现出一定的 DNA 保护作用,能减轻质粒 DNA 经过 UVB 和过 H_2O_2 损伤后的 DNA 断裂。醇萃取物的 DNA 保护作用强于水萃取物 (图 1)。

表2 太子参萃取物抑制脂氧合酶(LOX-1)活性及清除NO能力评估

Tab. 2 The effect of *Pseudostellaria heterophylla* extracts on inhibition rate of lipoxygenase (LOX-1) activity and NO scavenging

萃取物 (extract)	质量浓度 (mass concentration) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制脂氧合酶率 (inhibition rate of LOX-1) /%	抑制NO率 (inhibition rate of NO) /%
超临界萃取物 (supercritical extracts)	50	0.0 ± 0.2	35.3 ± 1.5
	100	0.0 ± 0.1	34.7 ± 0.7
醇萃取物 (alcohol extracts)	50	66.1 ± 0.3	10.7 ± 3.3
	100	77.3 ± 0.9	24.1 ± 2.2
水萃取物 (aqueous extracts)	50	6.6 ± 0.5	40.9 ± 1.3
	100	74.5 ± 0.1	39.6 ± 1.1
咖啡酸 (caffeic acid)	100	98.4 ± 1.0	—
芦丁(rutin)	100	—	31.8 ± 1.6



1. 控制组 pUC119 DNA (control pUC119 DNA) 2. pUC119 DNA 经 UVB+H₂O₂ 处理 (pUC119 DNA treated by UVB+H₂O₂) 3. pUC119 DNA+太子参萃取物 (50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 经 UVB+H₂O₂ 处理后 (pUC119 DNA+extracts (50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) treated by UVB+H₂O₂) 4. pUC119 DNA+太子参萃取物 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 经 UVB+H₂O₂ 处理后 (pUC119 DNA+extracts (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) treated by UVB+H₂O₂)

图1 太子参水萃取物(A)与醇萃取物(B)对DNA保护力评估

Fig. 1 The evaluation of DNA protection ability with *Pseudostellaria heterophylla* extracts using water (A) and ethanol (B) extraction methods

4 讨论

太子参具有不同的生理活性,也因此显现出广泛的药理功效,目前的研究多集中于太子参的水萃取物、醇萃取物及多糖类,利用水萃取方法获得的粗提物对于抗应激、抗疲劳及改善心肌梗死等,具有显著的功效^[14-15],而以醇萃取方法所得的粗提物则在增强免疫功能及抗氧化方面获得证实^[14-15]。本研究针对其安全性进行评估测试,发现利用水萃取或醇萃取方法得到的萃取物质量浓度在 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下,细胞存活率可达 90% 以上,表明太子参萃取物应用安

全性高,毒性低,并且在此浓度下,太子参水萃取物或醇萃取物表现出良好的抗炎功效,与其抑制脂氧合酶活性和清除NO活性有关。太子参醇萃取物和水萃取物具有明显的DNA保护作用,表明其在炎症损伤的修复方面具有一定的辅助作用,可以对应激损伤诱导的炎症反应起到减轻损伤和促进损伤修复的双重作用,为太子参相关美容和保健品开发提供科学依据。

参考文献

- [1] 宋李桃,刘贵先,林洲,等.不同产地太子参多糖含量测定和对小鼠抗应激作用研究[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(3):25
SONG LT, LIU GX, LIN Z, et al. Experimental study on anti-stress function and content determination of Radix Pseudostellariae from different habitats [J]. J Liaoning Univ TCM, 2014, 16(3): 25
- [2] 谭剑斌,赵敏,杨杏芬,等.夏枯草对氧化应激损伤的保护作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(4):89
TAN JB, ZHAO M, YANG XF, et al. Protective effect of *Prunellae Spica* on oxidative stress injury [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(4): 89
- [3] 王军红.太子参抗脂质氧化作用的研究[J].中国医药指南,2013,11(22):83
WANG JH. Study on effects of lipid oxidation resistance from Radix Pseudostellariae [J]. Guide Chin Med, 2013, 11(22): 83
- [4] 贾颐,代晓杰,董素娟.急性心肌梗死患者血清线粒体DNA与炎症反应的关系及临床意义[J].心肺血管病杂志,2016,35(8):606
JIA Y, DAI XJ, DONG SJ. Correlation of mitochondrial DNA and inflammatory mediators in acute myocardial infarction patients [J]. J Cardiovasc Pulm Dis, 2016, 35(8): 606
- [5] 赵美惠,詹麒平,戴宇峰,等.海地瓜岩藻聚糖硫酸酯抑制慢性低度炎症反应及机制研究[J].中国海洋药物,2016,35(4):40
ZHAO MH, ZHAN QP, DAI YF, et al. The inhibition of chronic low-grade inflammation and the mechanism of fucoidan from *Acaudina molpadioidea* [J]. Chin J Mar Drugs, 2016, 35(4): 40
- [6] 方蓉,李芳秋,武建国. MTT 比色法的条件探讨[J].临床检验杂志,2003,21(1):34
FANG R, LI FQ, WU JG. To investigate conditions of MTT colorimetric method [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2003, 21(1): 34
- [7] 李铭韧,史国安.牡丹花瓣脂氧合酶测定方法的研究[J].山东农业科学,2010(9):91
LI MR, SHI GA. Determination method of lipoxygenase activity in peony petal [J]. Shandong Agric Sci, 2010(9): 91
- [8] 楼宜嘉,陈奕,杨隽.生理溶液中硝普钠释放一氧化氮通路及其动力学研究[J].浙江大学学报(医学版),2000,29(6):241
LOU YJ, CHEN Y, YANG J. Nitric oxide releasing pathway and kinetics from sodium nitroprusside in ringer-locke's solution [J]. J

- Zhejiang Univ (Med Sci), 2000, 29 (6): 241
- [9] 刘国安,杨燕,丁兰,等. 几种天然抗氧化剂对 DNA 氧化损伤的保护作用[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2006, 43 (1): 238
LIU GA, YANG Y, DING L, *et al.* Several kinds of natural antioxidants protection effect from DNA oxidative damage[J]. J Sichuan Univ (Nat SciEd), 2006, 43 (1): 238
- [10] 汪涛,胡卫东,曾凡波,等. 复方太子参片的药效学实验研究[J]. 中国疗养医学, 2013, 22 (5): 386
WANG T, HU WD, ZENG FB, *et al.* Study on pharmacodynamics of compound *Pseudostellaria heterophylla* tablets[J]. Chin J Convalescent Med, 2013, 22 (5): 386
- [11] ILYAS U, KATARE DP, AERI V, *et al.* A review on hepatoprotective and immunomodulatory herbal plants[J]. Pharmacogn Rev, 2016, 10 (19): 66
- [12] RAJAN I, RABINDRAN R, JAYASREE PR, *et al.* Antioxidant potential and oxidative DNA damage preventive activity of unexplored endemic species of *Curcuma*[J]. Indian J Exp Biol, 2014, 52 (2): 133
- [13] 王文凯,贾静,仁伟,等. 太子参近年研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (12): 264
WANG WK, JIA J, REN W, *et al.* Recent advances in studies on *Pseudostellariae Radix*[J]. ChinJ Exp Tradit Med Form, 2011, 17 (12): 264
- [14] 汪剑飞. 太子参药理研究新进展[J]. 实用药物与临床, 2013, 16 (4): 333
WANG JF. New progress of pharmacological research of *Pseudostellaria heterophylla*[J]. Pract Pharm Clin Remed, 2013, 16 (4): 333
- [15] 侯娅,马阳,邹立思,等. 基于气相色谱 – 质谱的闽产太子参挥发性成分动态变化研究[J]. 天然产物与研发, 2016, 28 (3): 371
HOU Y, MA Y, ZOU LS, *et al.* Comparative analysis of volatile components of *Pseudostellariae Radix* from Fujian Province in different development stages by GC-MS[J]. Nat Prod Res Dev, 2016, 28 (3): 371

(本文于 2016 年 10 月 24 日收到)