

文章编号:1673-1689(2010)06-0821-04

金线兰各器官水提液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 的比较研究

龚宁, 邓琳琼, 曾坤

(贵州师范大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 测定了金线兰各器官(花序、叶、地上茎、根状茎、根)水提液对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用, 结果表明:金线兰各器官水提液均能清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$, 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的排序为:叶>根状茎、花序>根>地上茎;清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 能力的排序为:叶、地上茎>花序>根状茎、根。

关键词: 金线兰; $\cdot\text{OH}$; $\cdot\text{O}_2^-$; 清除作用

中图分类号: S 682. 31

文献标识码: A

Comparison of the Effect in Scavenging $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$ by the Aqueous Extraction from Various Organs of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

GONG Ning, DENG Lin-qiong, ZENG Kun

(School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: The scavenging of $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$ by aqueous extractions from Various organs (inflorescence, leaf, aerial stem, rhizome, root) of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl were estimated. The results demonstrated that the aqueous extraction had capacity of scavenging $\cdot\text{OH}$ and $\cdot\text{O}_2^-$. The cleaning effect on $\cdot\text{OH}$ was sorted as: leaf>rhizome, inflorescence>root>aerial stem. The cleaning effect on $\cdot\text{O}_2^-$ was sorted as: leaf, aerial stem>inflorescence>rhizome, root.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., $\cdot\text{OH}$; $\cdot\text{O}_2^-$, scavenging

金线兰 (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) 为兰科开唇兰属植物^[1], 是民间作为“金线莲”药材使用的原植物之一, 具有多种药用和保健作用, 在民间有“神药”、“药王”之称^[2], 但对其药用和保健作用机理却研究较少。有报道称金线兰提

取液对 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 $\cdot\text{OH}$ 两种活性氧具有较强的清除作用, 且其活性主要存在于水提取部位中^[3]。进一步研究金线兰各器官(包括花序、叶、地上茎、根状茎、根)水提液对 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 $\cdot\text{OH}$ 两种活性氧的清除作用, 可为如何有效利用金线兰提供参考。

收稿日期: 2010-01-20

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(20082097); 贵州省科技创新人才团队建设项目(20094007)。

作者简介: 龚宁(1963—), 女, 贵州遵义人, 教授, 主要从事资源植物生理生化及药用植物开发研究。

Email: gn2033@126.com

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料金线兰 (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.) 采集自贵州省荔波县, 经贵州师范大学王承录副教授鉴定, 标本保存于贵州师范大学生命科学学院。

1.2 药品与仪器

NBT: Amresco 公司产品; L-甲硫氨酸、核黄素: 国产生化试剂; 番红花红 T: 国产生物染色剂; 其余为国产分析纯。722 分光光度计: 北京瑞利分析仪器公司产品; 电子恒温水浴锅: 天津市泰斯特仪器有限公司产品; JD200-3 电子天平: 沈阳龙腾电子有限公司产品; THZ-82 数显恒温振荡器: 国华电器有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备金线兰花序、叶、地上茎、根状茎、根均于 40℃ 烘干至恒重, 质量分数分别为: 21.01%、13.06%、8.86%、5.33% 和 57.14%。分别称取干品, 粉碎过 2 号筛, 加入 15 倍蒸馏水 80℃ 恒温震荡提取 1 h, 过滤, 滤渣再加 6 倍蒸馏水 80℃ 恒温震荡提取 1 h, 过滤, 合并两次滤液即得金线兰花序水提液、叶水提液、地上茎水提液、根状茎水提液和根水提液。将上述各水提液置于冰箱备用, 用时根据预实验结果配成不同浓度供试液, 浓度以每毫升相当于多少毫克金线兰干品表示。

1.3.2 各器官水提液清除 ·OH 实验 利用 Fenton 反应原理, ·OH 由 EDTANa₂-Fe(Ⅱ)-H₂O₂ 体系产生, 由于 ·OH 可特异地使番红花红褪色, 根据褪色程度用比色法来衡量 ·OH 的含量。实验参照靳菊情等的方法^[5] 略加改进: 反应体系包含 pH 7.4 的 PBS 液 1 mL、番红花红 T (70 μg/mL) 0.5 mL、EDTANa₂-Fe(Ⅱ) (2 mmol/L) 1 mL、不同浓度供试液 0.25 mL 和 H₂O₂ (0.33%) 0.5 mL, 混匀后于 37℃ 水浴保温 30 min, 之后于 520 nm 处测 A 值。加不同浓度供试液的体系其吸光度为 A_{样品}, 以提取介质代替供试液的体系其吸光度为 A_{空白}, 两者均以未加 EDTANa₂-Fe(Ⅱ) (用蒸馏水代替) 作对照, 各自与其对照之差分别记为 ΔA_{样品} 和 ΔA_{空白}。供试液对 ·OH 的清除能力以清除率 E% 表示, 清除率按下式计算: $E(\%) = (\Delta A_{空白} - \Delta A_{样品}) / \Delta A_{空白} \times 100\%$

1.3.3 各器官水提液清除 ·O₂⁻ 实验 参考文献^[4], 加不同浓度供试液的体系为样品, 以提取介质代替供试液的体系为对照, 均以 PBS 液代替 NBT

作空白, 样品管和对照管吸光度与各自空白之差分别记为 ΔA_{样品} 和 ΔA_{对照}。提取液对 ·O₂⁻ 的清除能力以清除率 E% 表示, 清除率按下式计算: $E\% = (\Delta A_{对照} - \Delta A_{样品}) / \Delta A_{对照} \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 金线兰各器官水提液对 ·OH 的清除作用

金线兰各器官水提液对 Fenton 反应体系产生的 ·OH 的清除作用见图 1, 表明金线兰花序、叶、地上茎、根状茎、根均对 ·OH 具有清除作用, 清除率表现出随浓度增加而升高的趋势。根据线性回归方程计算出清除率达 50% 所需提取液质量浓度分别为: 花序 2.046 mg/mL, 叶 0.026 3 mg/mL, 地上茎 3.159 mg/mL, 根状茎 1.636 mg/mL, 根 2.979 mg/mL, 据此, 金线兰各器官提取液对 ·OH 的清除能力从高到低排列为: 叶 > 根状茎 > 花序 > 根 > 地上茎。

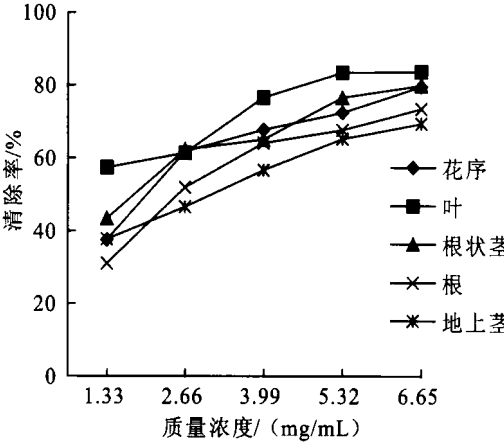


图 1 金线兰各器官水提液对 ·OH 的清除作用
Fig. 1 Scavenging of ·OH by aqueous extractions from various organs of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

方差分析多重比较结果见表 1。从平均值看: 各器官间均存在显著性差异, 叶对 ·OH 的清除作用最好, 极显著高于根状茎、花序、根、地上茎; 根状茎与花序具有显著性差异, 但不存在极显著差异, 与根、地上茎之间存在极显著性差异; 根与地上茎之间也存在极显著性差异。在 0.01 水平上按清除率大小排序, 可将器官分为 4 类: 叶 > 根状茎、花序 > 根 > 地上茎。

2.2 花叶开唇兰各器官水提液对 ·O₂⁻ 的清除作用

金线兰各器官水提液对光照-核黄素体系产生的 ·O₂⁻ 的清除作用见图 2, 图 2 表明: 金线兰花序、叶、根状茎、根、地上茎对 ·O₂⁻ 都具有清除作用, 其清除率均表现出随质量浓度的增加而升高。根据线性回归方程计算出清除率达 50% 所需提取液浓

度分别为:花序 1.595 mg/mL,叶 0.310 mg/mL,地上茎 0.884 mg/mL,根状茎 1.924 mg/mL,根 1.95 mg/mL。据此,金线兰各器官提取液对·O₂⁻的清除能力从高到低排序为:叶>地上茎>花序>根状茎>根。

方差分析多重比较结果见表 2,从平均值看:叶对·O₂⁻的清除作用显著高于地上茎,但两者无极显著差异,而又都与花序、根状茎、根存在极显著性差异;花序与根状茎、根均存在极显著差异;根状茎与根无显著差异。在 0.01 水平按清除率大小排序,可将器官分为 3 类:叶、地上茎>花序>根状茎、根。

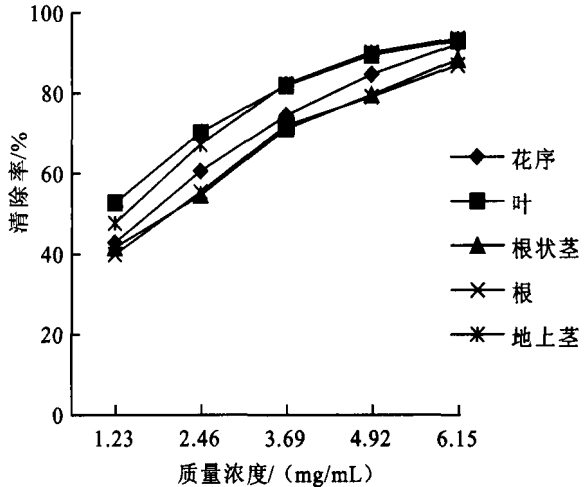


图 2 金线兰各器官水提液对·O₂⁻的清除作用

Fig. 2 Scavenging of ·O₂⁻ by aqueous extractions from various organs of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

表 1 金线兰各器官水提液清除·OH 的多重比较

Tab. 1 Multiple comparisons on the scavenging of ·OH by aqueous extractions from various organs of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

器官	水提液质量浓度/(mg/mL)					均值
	1.33	2.66	3.99	5.32	6.65	
叶	57.45 aA	61.38 aA	76.51 aA	83.37 aA	83.67 aA	72.48 aA
根状茎	43.40 bB	62.29 aA	65.10 cC	76.58 bB	79.92 bB	65.46 bB
花序	37.56 cC	61.83 aA	67.75 bB	72.41 cC	79.52 bB	63.81 cB
根	31.03 dD	51.99 bB	64.05 cC	67.69 dD	73.49 cC	57.65 dC
地上茎	37.71 cC	46.59 cC	56.71 dD	65.19 eE	69.40 dD	55.12 eD

表 2 金线兰各器官水提液清除·O₂⁻的多重比较

Tab. 2 Multiple comparisons on the scavenging of ·O₂⁻ by aqueous extractions from various organs of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

器官	水提液质量浓度/(mg/mL)					均值
	1.23	2.46	3.69	4.92	6.15	
叶	52.75 aA	70.14 aA	81.76 aA	89.37 aA	92.89 abA	77.38 aA
地上茎	47.68 bB	67.18 bB	82.11 aA	89.93 aA	93.45 aA	76.07 bA
花序	42.82 cC	60.56 cC	74.30 bB	84.44 bB	92.04 bA	70.83 cB
根状茎	41.62 dC	54.51 dD	71.04 cC	79.37 cC	88.24 cB	66.96 dC
根	39.93 eD	55.34 dD	71.85 cC	78.94 cC	86.83 dB	66.58 dC

3 讨 论

研究表明,体内超氧负离子自由基(·O₂⁻)、羟基自由基(·OH)和过氧化氢(H₂O₂)等活性氧过量会使机体重要物质受到损伤,从而引起癌症、衰老、心血管疾病等慢性病^[6],许多中药所具有的抗

氧化作用是其用于防治病的重要药理基础^[7]。作者等曾报道^[3]金线兰提取液对·O₂⁻、·OH 和 H₂O₂ 几种活性氧的清除作用,指出金线兰全草水提液对·O₂⁻和·OH 具有较强的清除作用,而对 H₂O₂ 则无明显清除作用,研究表明金线兰各器官对·OH 和·O₂⁻ 都有较高的清除作用,这些结果对于认识金线兰的药用和保健作用机理具有一定价值。

金线兰种子微小,由未成熟的胚及数层种皮细胞构成,自然条件下极难萌发^[10],因此金线兰野生储量较少,而民间用药常连根拔起,整株使用,这样的使用方式导致金线兰资源日趋枯竭。金线兰叶片对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用最高,另有报道指出:金线兰水提液对 NO_2^- 具有清除作用,其中叶水提液的清除作用最强^[11],这些结果可考虑应用到药材使用部位的选择上,即采叶或地上部分入药,通过留

株法再生叶片或通过留根法再生植株,或许可以在一定程度上缓解金线兰资源匮乏的现状。

研究结果表明叶片对 $\cdot\text{OH}$ 、和 $\cdot\text{O}_2^-$ 的清除作用最高,但中草药对有效成分的积累有可能随着季节^[8]、发育阶段^[9]的变化而变化,本研究材料采于7月,植株已开始生殖生长,有了花序,金线兰在其它季节、其它发育阶段是否也有同样的规律则有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第五册) [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 郑纯, 黄以钟, 季莲芳. 金线莲文献考证、原植物及商品调查[J]. 中草药, 1996, 27(3): 169—171.
ZHENG Chun, HUANG Yi-zhong, JI Lian-fang. Pharmacognostic studies on jinxianlian I. Bencaologic Riview, Resource Survey and Taxonomic Identification[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 1996, 27(3): 169—171. (in Chinese)
- [3] 龚宁, 邓琳琼, 唐兰秀, 等. 花叶开唇兰清除活性氧作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(2): 39—41.
GONG Ning, DENG Lin-qiong, TANG Lan-xiu. Scavenging of reactive oxygen species by the extraction of *Anoectochilus roxburghii*(Wall.) Lindl. [J]. **Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica**, 2006, 22(2): 39—41. (in Chinese)
- [4] 靳菊情, 丁东宁, 边晓丽, 等. 银杏叶多糖的化学及清除羟自由基作用[J]. 西安医科大学学报, 2000, 21(5): 417—419.
JIN Ju-qing, DING Dong-ning, BIAN Xiao-li, et al. The study of chemical and scavenging action to hydroxyl free radical of polysaccharides of *Ginkgo biloba* leaf[J]. **Journal of Xian Medical University**, 2000, 21(5): 417—419. (in Chinese)
- [5] 周志刚, 刘志礼, 刘雪娴. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 77—81.
ZHOU Zhi-gang, LIU Zhi-li, LIU Xue-xian. Study on the isolation, purification and anti-oxidation properties of polysaccharides from *Spirulina maxima* [J]. **Journal of Integrative Plant Biology**, 1997, 39(1): 77—81. (in Chinese)
- [6] 崔剑, 李兆陇, 洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2000, 4(6): 9—12.
CUI Jian, LI Zhao-long, HONG Xiao-yin. Bio-antioxidants with ill therapy[J]. **Tsinghua Science and Technology (Science)**, 2000, 4(6): 9—12. (in Chinese)
- [7] 李仪奎. 中药药理世纪回眸[J]. 中成药, 2000, 22(1): 59—70.
LI Yi-kui. The century review of pharmacology of Chinese materia medica[J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2000, 22(1): 59—70. (in Chinese)
- [8] 陈裕, 林坤瑞, 管其宽, 等. 金线莲生物学特性及生境特点的研究[J]. 亚热带植物通讯, 1994, 23(1): 18—24.
CHEN Yu, LIN Kun-rui, GUAN Qi-kuan, et al. Biological characteristic and habitat characters of *Anoectochilus roxburghii* [J]. **Subtropical Plant Science**, 1994, 23(1): 18—24. (in Chinese)
- [9] 龚宁, 蔡宜伶, 莫稳方, 等. 金线兰提取液清除 NO_2^- 作用的实验研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(6): 57—58+124.
GONG Ning, CAI Yi-ling, MO Wen-fang, et al. Scavenging of NO_2^- by the extraction of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2007, 28(6): 57—58+124.
- [10] 杨虹, 毕志明, 项素云, 等. 不同采收期鼓槌石斛中酚类化合物的测定[J]. 中草药, 2005: 1885—1886.
YANG Hong, BI Zhi-ming, XIANG Su-yun, et al. Determination of phenols in *D. chrysotoxum* collected in different times[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2005: 1885—1886. (in Chinese)
- [11] 江蔚新. 三花龙胆不同器官中獐芽菜苦苷含量变化研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, (13): 101—103.
JIANG Wei-xin. Study on contents of swertiamarin in overground and underground organ of *Gentiana Triflora* [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**, 2005, (13): 101—103. (in Chinese)

(责任编辑: 朱明)