

文章编号:1673-1689(2009)06-0840-05

连翘叶水提物保护线粒体及抗衰老研究

李兴泰, 陈瑞, 高明波

(大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 研究连翘叶水提物(FLA)对自由基所致的线粒体损伤的保护作用,并研究其抗氧化能力、活性氧的清除活性及抗衰老机制。采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定丙二醛(MDA)含量、分光光度法测线粒体的肿胀度,并以还原型辅酶 I-氮蓝四唑-吩嗪硫酸甲酯(NADH-NBT-PMS)为超氧阴离子生成系统测定对超氧阴离子的清除能力。利用钼酸胺比色法、黄嘌呤氧化酶法、二硫代二硝基苯甲酸比色法、Fenton 反应显色法分别测定 FLA 对小鼠肝匀浆过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及抗羟自由基活力的影响。FLA 可明显抑制线粒体的损伤及线粒体肿胀,并呈剂量依赖关系,清除超氧阴离子的能力显著,且能明显增强 CAT、SOD、GSH-Px 及抗羟自由基活力。FLA 能通过清除活性氧自由基及提高抗氧化酶活力来保护线粒体,具有一定的抗氧化及抗衰老药用价值。

关键词: 连翘叶;活性氧;抗氧化酶;线粒体;抗衰老

中图分类号:R 285.5

文献标识码:A

Protective Effects on Mitochondria and Anti-Aging Activity of Aqueous Extract of *Forsythia suspensa* Leavies

LI Xing-tai, CHEN Rui, GAO Ming-bo

(College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate protective effects and mechanism of *Forsythia suspensa* leavies (FLA) aqueous extract on mitochondrial injury induced by free radicals. Process: The neck back of mice were injected subcutaneously with D-galactose to induce aging model at a dose of 100 mg/(kg · d) for 7 weeks and a set of interesting results were achieved; FLA efficient inhibit mitochondrial injury and swelling induced by Fe²⁺-L-Cys in a concentration-dependent manner and also had significant O₂^{·-} scavenging effect. Moreover, the activities of CAT, SOD, GSH-Px and anti-hydroxyl radical in mice liver homogenate were increased significantly by FLA. FLA protects mitochondria by scavenging reactive oxygen species, and increasing the activities of antioxidases. The results present here strong suggested that FLA is a potential drug for antioxidant and anti-aging.

Key words: *Forsythia suspensa* leavies, reactive oxygen species, antioxidase, mitochondria, anti-aging

收稿日期:2008-10-28

基金项目:辽宁省教委高等学校科学研究基金项目(994421792)

作者简介:李兴泰(1966-),男,山东菏泽人,医学博士,副教授,主要从事中药药理学研究。Email:xtli@dlnu.edu.cn

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia Suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,始载于《神农本草经》,具有清热解毒、散结消肿、清肝利胆、除湿退黄等功效,主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭等症。连翘味苦,无毒,性微寒,为中医常用的清热解毒药,历来被视为疮家圣药,主要含木脂素类、黄酮及其苷类、萜类等多种成分,具有广谱抗菌、抗炎、解热、镇痛、抗内毒素、抗病毒等作用^[1-3]。连翘叶在我国民间药用已有较长历史,在我国河北、陕西等地有将连翘叶制成珠茶作为保健饮料饮用的习惯,连翘叶中的连翘苷、连翘酯苷、齐墩果酸、木脂素、咖啡碱、糖苷等有效成分含量高于果实^[4],连翘叶中芦丁、氨基酸和矿物元素的含量均较高,具有清热解毒、保肝作用,主治心肺积热、风热感冒、高热烦躁、麻疹斑疹、丹毒乳痈等症。连翘叶茶具有明显的抗菌、抗氧化、降血脂、抗应激、调节免疫功能等药理作用,且抗菌效果优于果实^[5]。为更好地开发利用这一自然资源,作者系统地研究了连翘叶对线粒体损伤的保护作用及对 3 种抗氧化酶—CAT、SOD、GSH-Px 和抗羟自由基活力的影响,为连翘叶资源的科学开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 动物与材料

实验用昆明种清洁级雄性小鼠(20~24 g,6 周龄),由大连大学医学实验动物中心提供(实验动物质量合格证号:2002-5);考马斯亮蓝 G-250 与吩嗪硫酸甲酯(PMS)为 Fluka 产品;牛血清白蛋白、还原型辅酶 I (NADH) 与氮蓝四唑(NBT)为 Boehringer Mannheim 公司产品;硫代巴比妥酸(TBA)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP)为 Sigma 公司产品;HEPES 为 Merck 公司产品;Tris 为 GiBco 公司产品。

过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及抗羟自由基试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;维生素 E(VE)为上海信谊药厂产品;D-半乳糖(D-gal)为上海试剂二厂产品;其它试剂均为国产分析纯。连翘叶采自大连经济技术开发区童牛岭。

1.2 连翘叶水提物(FLA)的制备

称取干燥连翘叶 20 g,加 400 mL 水煮沸 40 min,滤出煎液,药渣中再加 300 mL 水煮沸 30 min,滤出煎液,合并两次滤液,浓缩至 100 mL(0.2 g 生药/mL),置 4 °C 冰箱中备用。

1.3 体内实验动物分组及给药

实验用昆明种清洁级小鼠 60 只,随机分为 6 组,即对照组(Control),模型组(Model),阳性对照组(VE)及各给药组,每组 10 只。采用灌胃给药,FLA1、2、3 组(分别为低、中、高剂量组)灌胃连翘叶水提物 0.4、0.8、1.6 g/(kg·d),阳性对照组灌胃 VE 0.1 g/(kg·d),对照组与模型组灌胃等体积的生理盐水;模型组,阳性对照组及各给药组小鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 100 mg/(kg·d),对照组皮下注射等量注射用水,造模及给药 7 周后测定各项指标。

1.4 鼠肝匀浆及肝线粒体的制备

将小鼠脱臼处死后,立即取出肝脏,用预冷的生理盐水在电动玻璃匀浆机上制成 10% 匀浆,于冰浴中保存备用。差速离心法分离线粒体^[6],小鼠脱臼处死后,立即取出肝脏,于预冷的生理盐水中洗去血迹,分别放入匀浆器中,用预冷的线粒体分离介质(含 0.25 mol/L 蔗糖,0.5 mmol/L EDTA,3 mmol/L HEPES,pH 7.4)匀浆,1 000 g,4 °C 离心 10 min,取上清液于 12 000 g,4 °C 离心 10 min,沉淀用分离介质洗涤二次,每次于 12 000 g,4 °C 离心 10 min,沉淀即为线粒体,悬于一定量分离介质中,冰浴中保存备用。以牛血清白蛋白为标准,Bradford 法测定线粒体蛋白质含量^[7]。

1.5 丙二醛(MDA)的测定

用 TBA 显色法测定^[8]。不同浓度的 FLA (模型组中无药物)与 0.20 mL 10% 组织匀浆液或 0.5 mg 线粒体蛋白预先在 37 °C 温育 5 min,然后加入 50 μmol/L FeSO₄ (正常组不加 FeSO₄) 和 0.2 mmol/L 的 L-Cys,用 pH 值 7.4、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)补充体积至 1 mL(空白参比管不加组织匀浆、线粒体和药物),37 °C 温育 30 min 后,加入 20% 三氯乙酸(TCA) 0.5 mL 终止反应,9 000 g 离心 10 min,取 1 mL 上清,加入 1 mL 0.67% 硫代巴比妥酸(TBA),100 °C 煮沸 10 min,以空白参比管调零,于 532 nm 处测吸光度 A,以 TEP 为外标,经线性回归分析计算 MDA 含量。药物的作用以 MDA 的抑制率(IR%)表示

$$IR\% = (MDA_{\text{模型}} - MDA_{\text{样品}}) / (MDA_{\text{模型}} - MDA_{\text{正常}}) \times 100\%$$

1.6 线粒体肿胀测定

反应系统含 0.5 mg 线粒体蛋白,0.5 mmol/L FeSO₄ (正常组不加 FeSO₄),0.2 mmol/L 的 L-Cys 和不同浓度的药物(模型组中无药物),以 pH 值 7.4、0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲体系,反应液终体积为 2 mL,37 °C 温育 0~15 min,在 520 nm 处测定

0.5、10、15 min 每管的吸光度^[9]。

1.7 超氧阴离子(O₂^{·-})的测定

以 NADH-NBT-PMS 为 O₂^{·-} 生成系统,以 NBT 还原法测定 O₂^{·-} 的生成情况^[10]。16 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中含 NADH 73 μmol/L, NBT 50 μmol/L, PMS 15 μmol/L, 空白管不加 PMS, 对照组不加药物, 总体积为 3 mL, 以空白管调零, 于 560 nm 处测定吸光度, 2 min 时准确记录数据, 并计算抑制率。

1.8 过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶以及抗羟自由基活力的测定

按照试剂盒说明书方法测定。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 连翘叶水提物对肝匀浆丙二醛(MDA)的影响

连翘叶水提物对 Fe²⁺-L-半胱氨酸诱发的小鼠脑、肝匀浆及脑、肝线粒体丙二醛生成有抑制作用, 且随浓度升高, 抑制作用明显增强, 并呈剂量-效应关系(见表 1、表 2)。

表 1 连翘叶水提物 (FLA) 对鼠脑及肝匀浆丙二醛 (MDA) 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Effect of FLA on generation of MDA in mice brain and liver homogenate ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ (g/L)	MDA(脑匀浆)/ (nmol/g·脑)	IR/ %	MDA(肝匀浆)/ (nmol/g·肝)	IR/ %
正常组	—	65±13***		58±15***	
模型组	—	166±33		254±63	
FLA	0.15	115±22*	50.50	176±32*	39.80
	0.30	104±18**	61.39	138±29**	59.18
	0.60	86±24***	79.21	113±24***	71.94
	1.20	77±19***	88.12	86±37***	85.71
	2.40	67±25***	98.02	66±26***	95.92

注: *, **, *** 分别表示与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$

表 2 FLA 对鼠脑及肝线粒体 MDA 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2 Effect of FLA on generation of MDA in mice brain and liver mitochondria ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ (g/L)	MDA(脑匀浆)/ (nmol/g·脑)	IR/ %	MDA(肝匀浆)/ (nmol/g·肝)	IR/ %
正常组	—	0.86±0.34***		1.56±0.44***	
模型组	—	4.39±0.68		4.86±0.87	
FLA	0.15	3.58±0.56*	22.95	3.63±0.42*	37.27
	0.30	2.96±0.47**	40.51	3.05±0.61**	54.85
	0.60	2.48±0.55***	54.11	2.62±0.39***	67.88
	1.20	1.87±0.38***	71.39	2.17±0.48***	81.52
	2.40	1.26±0.36***	88.67	1.76±0.34***	93.94

注: *, **, *** 分别表示与模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$

2.2 连翘叶水提物对肝线粒体肿胀的影响

连翘叶水提物对肝线粒体肿胀的抑制作用在 0 min 时不显著, 但随时间的延长抑制作用明显增强, 且高质量浓度 (0.60 g/L) 比低质量浓度 (0.30 g/L)

抑制作用更加显著(见表 3)。

2.3 连翘叶水提物对 NADH-NBT-PMS 系统产生的超氧阴离子(O₂^{·-})的影响

连翘叶水提物可抑制 O₂^{·-} 的生成, 效果显著,

且呈剂量-效应关系(表 4)。

表 3 FLA 对鼠肝线粒体肿胀的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 3 Effect of FLA on mice liver mitochondrial swelling induced by Fe^{2+} -L-Cys($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ (g/L)	A_{520}			
		0 min	5 min	10 min	15 min
正常组	—	0.541±0.095*	0.484±0.086**	0.334±0.069**	0.271±0.054**
模型组	—	0.426±0.069	0.338±0.043	0.218±0.048	0.162±0.023
FLA	0.30	0.465±0.053	0.428±0.056*	0.294±0.032**	0.221±0.029**
	0.60	0.505±0.066	0.463±0.067**	0.318±0.040**	0.265±0.054**

注:*,** 分别表示与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$

表 4 FLA 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 4 Scavenging effect of FLA on $\text{O}_2^{\cdot-}$ produced by NADH-NBT-PMS system($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ (g/L)	$A_{560\text{nm}}$	IR/ %
对照组	—	0.306±0.053	
FLA	0.15	0.221±0.038**	27.78
	0.30	0.183±0.042**	40.20
	0.60	0.159±0.036***	48.04
	1.20	0.125±0.027***	59.15
	2.40	0.078±0.028***	74.51

注:*,**,*** 分别表示与模型组比较, $P<0.01$, $P<0.001$

表 5 FLA 对 CAT, SOD, GSH-Px 及抗羟自由基活力的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab. 5 Effect of FLA on the CAT, SOD, GSH-Px and anti-hydroxyl radical activities in mice liver homogenate in vivo. ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g/kg·d)	CAT/ (U/mg·protein)	SOD/ (U/mg·protein)	GSH-Px/ (U/mg·protein)	Anti·OH/ (U/mg·protein)
对照组	—	14.8±3.7**	238±42**	56.8±9.9**	96±22**
模型组	—	9.1±3.3	157±39	40.4±8.3	63±16
Vit E	0.1	12.9±2.3*	223±32**	51.6±7.4**	87±14**
FLA1	0.4	9.4±2.8	194±26*	46.8±6.8	75±25
FLA2	0.8	12.5±2.6*	204±30*	51.2±6.6**	86±22*
FLA3	1.6	14.6±4.0**	242±58**	55.7±6.7**	97±31*

注:*,** 分别表示与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$

3 结 语

线粒体是真核细胞氧化磷酸化产生 ATP 的场所,线粒体还承担血红素的生物合成,氨基酸、脂肪酸代谢,细胞凋亡的主开关等许多重要功能,这些功能主要是通过调整能量代谢和活性氧(ROS)的生成实现的^[11]。线粒体也是所有细胞 ROS 生成的主要来源,机体 95% 以上的活性氧都来自线粒体电子漏。线粒体呼吸所耗氧的 0.2~2% 被复合体 I 和 III 转化为超氧化物。 O_2 是呼吸链的最终电子受体且是高度亲电子的,当 O_2 从复合体 I 或从复合体

2.4 连翘叶水提物对 CAT、SOD、GSH-Px 及抗羟自由基活力的影响

模型组 CAT、SOD、GSH-Px 及抗羟自由基($\cdot\text{OH}$)活力显著降低,说明造模成功,低剂量连翘叶水提物(0.4 g/kg·d)对 CAT、GSH-Px 及抗羟自由基活力的增加不明显,而中、高剂量(0.8, 1.6 g/kg·d)却显著增加,且均呈剂量-效应关系(见表 5)。

III 的泛半醌得到一个电子便生成超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)。正常情况下, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 被线粒体抗氧化酶 CAT、SOD 和 GSH-Px 的综合作用所解毒^[12]。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 被 Mn SOD 迅速歧化为 H_2O_2 , H_2O_2 可能会继续被 GSH-Px 或 CAT 完全还原为羟自由基($\cdot\text{OH}$), $\cdot\text{OH}$ 是自然界最强烈的氧化剂之一, H_2O_2 也可进一步被 CAT 和 GSH-Px 转化为水^[13]。当生成过量的 ROS 不能被抗氧化系统充分清除时便会发生氧化应激。因此,线粒体又是自由基损伤最敏感的靶部位,一些学者称线粒体为衰老的“生物钟”。衰老的一个重要表现是自由基生成增多引发链锁反应并损伤生物大分子,又进一步损伤线粒

体,形成恶性循环。因此线粒体功能变化在衰老的发生发展过程中起重要作用。

$O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 作为生物体内主要的活性氧自由基,不断地通过非酶反应与酶反应产生,介导机体组织脂质过氧化、蛋白质解聚、聚合、核酸断裂等生化过程,引发组织细胞病变而导致各种疾病发生并加速机体衰老。因此,适量补充外源性活性氧清除剂,可预防这类损伤和病变的发生与发展。VE 是哺乳动物主要的脂溶性抗氧化剂,其抗氧化作用得到广泛认可^[14]。服用 VE 可通过保持 SOD、CAT、GSHPx、谷胱甘肽还原酶(GSSG-Rx)活力,GSH 和 VE 水平并下调多氯联苯诱导的大鼠脂质过氧化物、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 的生成水平而维持细胞的氧化还原状态^[15]。体内实验以 VE 为阳性对照,证明了其可明显提高三种抗氧化酶及抗羟自由基活力,显示了其抗氧化作用,中剂量连翘叶水提物(FLA)的抗氧化作用与其相当;FLA 能明显抑制

鼠脑、肝组织及其线粒体 MDA(脂质过氧化标志物)的生成,并在一定浓度范围内呈剂量-效应关系,表明其均能很好地防止机体脂质过氧化。同时观察到 FLA 能有效清除 $O_2^{\cdot-}$,且清除作用随剂量的增加而加强。另外,自由基在机体不断产生的同时,又可被相应的防御机制所清除,二者形成一种动态平衡。当此动态平衡因机体防御系统机能下降而被打破时,将会产生一系列的链式反应而引起机体脂质过氧化损伤。因此,增强自由基防御系统的机能如各种抗氧化酶的活力即可减轻机体的氧化损伤,从而达到延缓衰老的目的。连续灌胃中、高剂量 FLA 的小鼠其肝组织内抗氧化酶(CAT、SOD、GSH-Px)活力及清除羟自由基能力均显著提高,说明连翘叶能通过清除活性氧自由基及提高抗氧化酶活力来保护线粒体,具有一定的抗氧化及抗衰老药用价值。

参考文献(References):

- [1] Zhang GG, Song SJ, Ren J, et al. A new compound from *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl with antiviral effect on RSV [J]. *J Herb Pharmacother*, 2002, 2(3): 35-40.
- [2] Piao X L, Jang M H, Cui J, et al. Lignans from the fruits of *Forsythia suspensa*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(6): 1980-1984.
- [3] Qu H, Zhang Y, Wang Y, et al. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythiaside and forsythidin) isolated from *Forsythia suspensa*[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(2): 261-266.
- [4] 段飞,张双民,杨建雄,等.连翘叶提取物抑菌作用的研究[J].西北药学杂志,2005,20(2):66-67.
DUAN Fei, ZHANG Shuang-min, YANG Jian-xiong, et al. Studies on the anti-bacteria effect of extracts from folium forsythia in vitro[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2005, 20(2): 66-67. (in Chinese)
- [5] 刘静,杨建雄.连翘叶茶对小鼠非特异性免疫及应激作用的实验研究[J].榆林学院学报,2006,16(2):45-47.
LIU Jing, YANG Jian-xiong. The experimental study of the immunological function and anti-stress of forsythia suspensa leaves tea on mice[J]. *Journal of Yulin College*, 2006, 16(2): 45-47. (in Chinese)
- [6] Michele AS, Jhon Z, Alain YF, et al. Ischemic injury to rat forebrain mitochondria and cellular calcium homeostasis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1134: 223-232.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248-254.
- [8] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351-358.
- [9] Hunter FE, Grbicki JM, Hoffsten PE. Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions[J]. *J Biol Chem*, 1963, 238(2): 828-835.
- [10] Ponti V, Dianzani MV, Cheeseman KZ, et al. Studies on the reduction of nitroblue-tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulfate[J]. *Chem Biol Interact*, 1978, 23: 281-291.
- [11] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- [12] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77: 334-343.
- [13] Reddy PH. Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: Implications for the development and progression of Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2006, 96: 1-13.
- [14] Cuddihy SL, Ali SS, Musiek ES, et al. Prolonged α -tocopherol deficiency decreases oxidative stress and unmasks α -tocopherol-dependent regulation of mitochondrial function in the brain[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(11): 6915-6924.
- [15] Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, et al. Role of alpha-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12): 2040-2046.

(责任编辑:杨萌)