葛根素、大豆素、槲皮素及芦丁体外抗氧化活性与构效关系研究

杨晓敏　张天娇　许可嘉　赵福建　牛建昭　李　健

摘　要　目的　比较大豆素、葛根素、槲皮素及芦丁的体外抗氧化活性，初步探讨类黄酮化合物的构效关系。**方法**　体外培养 RAW264.7 细胞，分别加入大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁对细胞进行处理，4h 后加入脂多糖刺激细胞，采用 DCFH－DA 探针法检测细胞内总活性氧水平，采用 Griess 试剂法检测细胞上清中 NO、MDA 的水平。**结果**　4 种类黄酮化合物处理的 RAW264.7 细胞均可见细胞内总活性氧水平下降，以槲皮素处理效果最为显著；槲皮素可显著降低 NO、MDA 水平（$P<0.01$），葛根素可显著降低 NO 水平（$P<0.01$），芦丁可显著降低 MDA 水平（$P<0.01$），而大豆素对两者均无明显影响。**结论**　在 4 种类黄酮化合物中，槲皮素的抗氧化能力强于大豆素、葛根素和芦丁，这可能与槲皮素含羟基数目多、且羟基未成苷的结构特点有关。

关键词　类黄酮化合物　抗氧化　构效关系

中图分类号　R9　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.015

Antioxidant Activity Comparison of Puerarin and Other Flavonoids in LPS－induced RAW264.7 Cells. *Yang Xiaomin, Zhang Tianjiao, Xu Kejia, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*

Abstract　Objective　To compare the antioxidant activity of puerarin and several other flavonoid compounds, and investigate their structure－activity relationship. **Methods**　RAW264.7 cells were pretreated by four flavonoid compounds (soybean element, puerarin, quercetin and rutin) respectively before lipopolysaccharide stimulation. Then the total level of reactive oxygen species in the cell were tested, and NO and MDA content in the cell culture were observed. **Results**　The total level of reactive oxygen species decreased in all flavonoids treatment groups among which quercetin group showed the strongest effect. Guercetin treatment significantly inhibited both NO and MDA ($P<0.01$), puerarin only inhibited NO, rutin only inhibited MDA, while soybean element showed no significant inhibition for both. **Conclusion**　The antioxidant capacity of quercetin is better than that of soybean element, puerarin and rutin.

Key words　Flavonoids; Antioxidation; Structure－activity relationship

类黄酮化合物泛指两个苯环通过三碳链连接而形成的一系列化合物，主要分为黄酮类、异黄酮类、黄酮醇类等几种。它们广泛存在于多种食品和中草药中，是天然抗氧化剂，具有清除体内自由基、脂质过氧化产物及保护细胞膜等作用，在肿瘤、心脑血管疾病、炎症相关性疾病的治疗中具有广阔应用前景[1~3]。近年来，筛选抗氧化活性高、毒性不良反应小的类黄酮化合物成为人们关注的热点。已有的研究表明，类黄酮化合物结构与活性之间的关系（构效关系）密切，其所含基团的数量、位置和类型都极大影响它们的生物活性[4,5]。

本研究选取 4 种具有代表性结构的类黄酮分子（大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁）作为研究对象，以脂多糖诱导的小鼠单核细胞系 RAW264.7 为实验模型，通过比较体外抗氧化活性差异，初步探索类黄酮化合物抗氧化活性的构效关系。

材料与方法

1. 药物与试剂：大豆素、葛根素、槲皮素及芦丁均购自陕西慧科生物有限公司，纯度≥98%；脂多糖（LPS）购自 Sigma 公司；活性氧检测试剂盒（DCFH－DA）购自上海碧云天试剂公司；NO 检测试剂盒（Griess reagent system）购自 Promega；丙二醛（MDA）检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2. 细胞培养及处理：RAW264.7 细胞（ATCC 号：TIB－71）为小鼠单核细胞系，购自中国医学科学院细胞中心，用含 10% 胎牛血清、青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml 的 DMEM 培养液于 37℃、5% CO_2 条件下培养。细胞分为 7 组：正常对照组、模型组、维生素 E（阳性参照）干预组、大豆素干预组、葛根素干预组、槲皮素干预组及芦丁干预组。细胞处理时，正常对照

基金项目：教育部创新引智计划基金资助项目（B07007）；北京市支持中央高校共建基金资助项目（青年英才计划）（YETP0790）；北京中医药大学自主选题基金资助项目（2013－JYBZZ－JS－001）

作者单位：100029　北京中医药大学基础医学院

通讯作者：李健，副教授，硕士生导师，电子信箱：lijiancn922@126.com

组以无血清培养液孵育,各药物干预组在加入 LPS 之前,分别先以 25μmol/L 的维生素 E、大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁预孵育细胞 4h,再加入 1μg/L LPS(无血清培养液配置)共同孵育 24h。各药物均用 DMSO 新鲜配制,终浓度为 0.1%(v/v),正常对照组和模型组也给予等量的 DMSO。

3. 细胞内总活性氧水平检测:细胞内活性氧检测采用 DCFH - DA 探针法。DCFH - DA 探针本身无荧光,遇到氧自由基后生成有荧光的 DCFH,激光共聚焦显微镜可在激发波长 502nm、发射波长 530nm 附近探测到荧光。实验前将细胞种植于激光共聚焦显微镜专用培养皿上(1×10^4 个细胞/皿),用细胞培养及处理所述方法处理细胞后再加入 DCFH - DA 探针,置于倒置激光共聚焦显微镜下观察拍照。

4. 细胞培养上清 NO、MDA 含量检测:NO 含量检测采用 Griess 试剂法,操作为:①吸取各处理组细胞培养上清 100μl,加入 30% 硫酸锌 5μl 去除蛋白质,5000r/min 离心 10min 后收集上清;②将标准品(1mmol/L $NaNO_2$)进行倍比稀释;③在所有样品中加入等体积 Griess 试剂,室温下轻轻振荡 10min,用酶标仪于波长 550nm 处读取吸光值。MDA 含量检测采用硫代巴比妥酸染色法,532nm 读取吸光值。每个处理组设 3 个平行孔。

5. 统计学方法:定量数据采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1. 大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞总活性氧影响:正常对照组(图 1 中 A、B)仅在细胞膜周边探测到绿色荧光;模型组(图 1 中 C、D)细胞膜及细胞内均可探测到高强度荧光;维生素 E 干预组(阳性参照,图 1 中 E)与模型组相比,荧光显著降低;大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁干预组(图 1 中 F ~ I)的荧光强度与模型组相比,均有不同程度的减弱,其中以槲皮素干预组(图 1 中 H)的荧光最弱,提示其抗氧化活性最强。

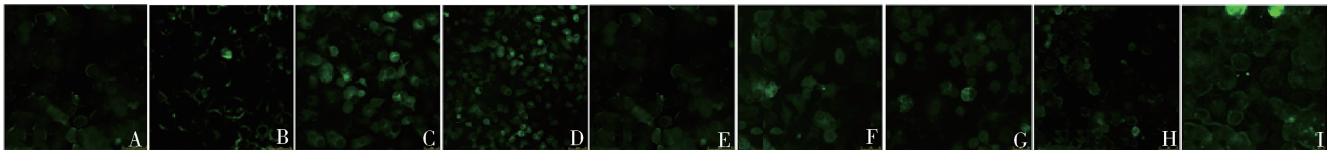

图 1　大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁对 RAW264.7 细胞内总活性氧的影响

DCFH - DA 探针法测 RAW264.7 细胞内的总活性氧水平,DCFH 绿色荧光用激光共聚焦显微镜观察。A、B. 正常对照组;C、D. 模型组;E. 维生素 E 干预组;F. 大豆素干预组;G. 葛根素干预组;H. 槲皮素干预组;I. 芦丁干预组

2. 大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清 NO 和 MDA 的影响:实验结果见表 1。空白对照组 NO 和 MDA 含量较低;模型组 NO 和 MDA 含量均显著增高($P < 0.01$);维生素 E 干预组与模型组比较,NO 和 MDA 含量显著降低($P < 0.01$)。4 种类黄酮化合物干预组与模型组相比,槲皮素干预组 NO 和 MDA 含量均显著降低($P < 0.01$),葛根素干预组仅显著抑制 NO 的生成($P < 0.01$),芦丁干预组仅抑制 MDA 的生成($P < 0.01$),而大豆素干预组对 NO 和 MDA 含量均无显著影响。

表 1　各处理组细胞培养上清液中 NO 和 MDA 含量测定结果($n = 3, \bar{x} \pm s$)

分组	NO 含量(μmol/L)	MDA(nmol/mg)
正常对照组	0.081 ± 0.001	1.04 ± 0.21
模型组	0.152 ± 0.008 *	2.39 ± 0.46 *
维生素 E 干预组	0.083 ± 0.001 #	1.13 ± 0.22 #
大豆素干预组	0.121 ± 0.002	2.52 ± 0.51
葛根素干预组	0.100 ± 0.003 #	2.14 ± 0.48
槲皮素干预组	0.109 ± 0.001 #	1.33 ± 0.21 #
芦丁干预组	0.142 ± 0.002	1.42 ± 0.32 #

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$

这些数据进一步证明,槲皮素干预组由于对 NO 和 MDA 均产生较强的抑制作用,因而其抗氧化活性最强。

讨　论

LPS 可通过氧化应激诱导细胞损伤,而细胞内总活性氧水平是反映细胞受氧化应激程度的重要指标。DCFH - DA 探针法检测细胞内总活性氧,显微镜下观察绿色荧光强度越高,表明活性氧含量越高。NO 和 MDA 是细胞受到氧化应激时最重要的两种产物,检测大豆素、葛根素、槲皮素和芦丁作用后 NO 和 MDA 的含量变化,有助于进一步分析这几种类黄酮化合物的抗氧化作用机制。笔者从两方面实验结果得出结论,在 4 种类黄酮化合物中,槲皮素具有最强的抗氧化能力。

本研究选取的 4 种类黄酮化合物的分子结构如图 2 所示,大豆素属于异黄酮类化合物,其在 A8 位结合葡萄糖苷即形成葛根素(大豆素的碳苷);槲皮素属于黄酮醇类化合物,其在 C3 位羟基上结合芸香糖苷即形成芦丁(槲皮素的氧苷)。国内外现有的研究表明,类黄酮化合物中羟基的数量和位置对类黄酮

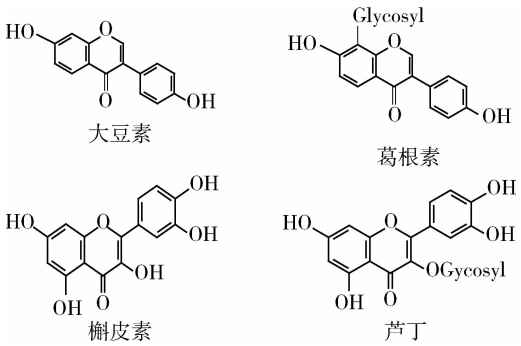

图 2　4 种类黄酮化合物的分子结构

化合物的抗氧化活性有很大影响。除了抗氧化活性必须的功能团(C 环上的 δ2,3 双键与 4 位羰基)外,增加羟基的数量可增加类黄酮化合物的抗氧化活性[6]。

本研究中选取的 4 种化合物,其 C 环上全都具有 δ2,3 双键与 4 位羰基结构,但羟基数目不同,以槲皮素的羟基最多(5 个),芦丁含 4 个羟基,而葛根素和大豆素仅含 2 个羟基。另一些研究表明,羟基的位置对类黄酮化合物的抗氧化活性至关重要,其中以 B 环上羟基对抗氧化活性影响最大,C 环次之,A 环羟基影响最弱[7]。B 环上具有 3′,4′-二羟基(即形成邻位多酚)可以大大增强抗氧化活性,C 环 3 位上的游离羟基也可提高抗氧化活性,在 4 种化合物中,只有槲皮素同时满足这两个特点。

类黄酮化合物的抗氧化活性高低还与其是否被糖基化密切相关。多数研究表明,糖基化会导致类黄酮药物抗氧化活性下降甚至完全消失[8~10]。本研究结果也显示,芦丁(即槲皮素的糖基化产物)抗氧化活性弱于槲皮素。对于类黄酮化合物的抗氧化活性,在不同类型的自由基和组织中存在着选择性作用,在实验测定类黄酮化合物清除自由基效率时,实验体系或考察指标不同会得到不同的结果[11]。因此,单一抗氧化模型并不足以说明某种物质的抗氧化活性,只有多个模型结合进行检验,才能对化合物的活性有一个相对全面的评价。本研究只初步探索了 4 种类黄酮化合物的构效关系,通过后期广泛和深入的实验加以探索和论证,为类黄酮化合物的结构优化、人工合成提供思路,为开发新一代天然抗氧化剂用于临床慢性氧化应激相关的疾病,如肿瘤、冠心病和类风湿性关节炎等具有重要意义。

参考文献

1　Liu QM, Jiang JG. Antioxidative activities of medicinal plants from TCM[J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(11):1154-1172

2　Wang HP, Lu JF, Zhang GL, *et al*. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxant actions and mechanisms induced by total flavonoids of Elsholtziasplendens in rat aortas[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38(2):453-459

3　Yamaki K, Kim DH, Ryu N, *et al*. Effects of naturally occurring isoflavones on prostaglandin E_2 production[J]. Planta Med, 2002, 68(2): 97-100

4　欧阳昌汉,林希,吴丹. 葛花总黄酮有效成分对大鼠胸主动脉血管活性影响及其构效关系[J]. 时珍国医国药,2013,24(11):2655-2657

5　Xu YC, Leung SW, Yeung DK, *et al*. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery [J]. Phytochemistry, 2007, 68(8):1179-1188

6　Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, *et al*. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review[J]. Food Chemistry, 2007, 104(2):466-479

7　Rice-Evans C, Miller NJ, Bolwell GP, *et al*. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids[J]. Free Radic Res, 1995, 22:375-383

8　Laura DM, Teresa M, Emilia M, *et al*. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(5):5406-5419

9　López-Posadas R, Ballester I, Mascaraque C, *et al*. Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF-kappaB in an intestinal epithelial cell line (IEC18)[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(7):1714-1726

10　Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM, *et al*. Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study[J]. Eur J Med Chem, 2014, 72:137-145

11　刘莉华,宛晓春,李大祥,等. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(3):265-270

(收稿日期:2015-04-01)
(修回日期:2015-04-15)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》所有来稿应用远程稿件处理系统投稿,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站:http://www.yxyjzz.cn,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话:010-52328677(路编辑)。

《医学研究杂志》编辑部