文章编号: 1001-0580(2007)04-0448-02 中图分类号: R 181.3+5 文献标志码: A 【论 著】

丹酚酸抗氧化活性及其对 DNA 损伤保护作用*

柳艳, 李磊, 刘瑛, 陈茂勇, 吴倩

摘 要: 目的 探讨丹酚酸抗氧化活性及其对 DNA 氧化损伤的保护作用机制。方法 运用自由基反应模型观察丹酚酸对二苯代苦味酰肼自由基(DPPH)和羟自由基的淬灭效应,使用邻菲罗啉(Phen)-$CuSO_4$-VC-H_2O_2-DNA 化学发光体系测定丹酚酸对 DNA 损伤的抑制作用。高效液相色谱(HPLC)测定丹酚酸的组成。结果 丹酚酸水提物(AE)、乙酸乙酯萃取物(EE)、大孔吸附树脂纯化物(RE)和对照维生素(VC)、二丁基羟基甲苯(BHT)对 DPPH 自由基的半数清除浓度(IC_{50})分别为 141.2, 15.3, 14.6, 15.8 和 71.5 μg/ml。化学发光体系中,丹酚酸的加入能明显抑制并延迟 DNA 损伤。AE、EE、RE 抑制发光 50% 浓度(IC_{50})值分别为 1 293.6, 62.0, 49.2 μg/ml。丹酚酸清除 DPPH 自由基能力和对羟自由基攻击的 DNA 损伤保护作用受丹酚酸组成和丹酚酸 B 含量的影响。结论 丹酚酸属于预防型和断链型抗氧化剂,并可有效清除 DPPH 和羟自由基,对 DNA 损伤有明显保护作用。丹酚酸的抗氧化活性及对 DNA 损伤的保护作用与丹酚酸 B 含量有关。

关键词: 丹酚酸; 抗氧化; DNA 损伤; 化学发光

Antioxidant activiy and protection effect of salvianolic acids on DNA damage *LIU Yan, LI Lei, LIU Ying, et. al. Department of Health Laboratory Technology, Public Health College, Nanjing Medical University (Nanjing 210029, China)*

Abstract: Objective To study on the antioxidant activity of salvianolic acids and mechanisms of its protection against DNA antioxidative damage. **Methods** Free radical model was employed to investigate the scavenging activity to 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) and hydroxyl free radicals. The mechanisms of the effects of salvianolic acids on protection against DNA damage was measured by chemiluminescence on the reaction system of phenanthroline (Phen)-$CuSO_4$-VC-H_2O_2-DNA. Salvianolic acids composition in samples were determined according to HPLC analysis. **Results** The hemi-inhibitable concentration(IC_{50}) of crude aqueous extract(AE), ethylacetate extract(EE), resin extract(RE), ascorbate (VC) and butylated hydroxytoluene(BHT) to DPPH free radicals were 141.2, 15.3, 14.6, 15.8 and 71.5 μg/ml. Three extracts could obviously inhibit and delay DNA damage caused by hydroxyl free radicals. The IC_{50} valvue of chemiluminescence of AE, EE and RE were 1 293.6, 62.0, and 49.2 μg/ml. The scavenging activity and protective effects against DNA damage were effected by salvianolic acids composition and salvianolic acid B level. **Conclusion** Salvianic acids can effectively scavenge DPPH and hydroxyl free radicals, protect against DNA damage which belongs to preventive and chain-breaking antioxidants, and the effects are related to salvianolic acid B level.

Key words: salvianolic acid; antioxidant; DNA damage; chemiluminescence

丹参是我国防治心脑血管病的传统药物,对冠心病、高血压、糖尿病肾病及癌症等疗效确切。近 20 多年来的药效研究表明,丹酚酸是丹参活血化瘀作用的主要功能成分[1]。自由基参与机体多种疾病的发生和发展过程,清除自由基、提高机体抗氧化能力,是许多药物防治慢性疾病的重要途径[2,3]。从化学结构上分析,丹酚酸类化合物是酚羟基的供体,具有抗氧化活性的结构基础。本文研究了丹酚酸对二苯代苦味酰肼自由基(DPPH)的清除效应,并探讨其对体外 DNA 氧化损伤的保护作用及可能机制,为进一步研究丹酚酸药理作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器及色谱条件 LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);DU600 紫外-可见分光光度计(美国 Backman 公司);Orion II 高灵敏度板式化学发光检测仪(德国 Berthold Detection Systems 公司)。Alltima C_{18}(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;流动相为水(0.5% 冰醋酸)(A)-乙腈(B);梯度条件:0~30 min 时 5%~25% B, 30~60 min 时 25%~30% B;流速 1.0 ml/min;柱温为室温;检测波长 280 nm;进样量 20 μl。

1.2 试剂 丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111562-200403);二苯代苦味酰肼自由基(DPPH)、DNA、维生素 C(VC)(美国 Sigma 公司);二丁基羟基甲苯(BHT)(上海凌峰化学试剂有限公司);实验用水为超纯水(18.2 MΩ),其余试剂为分析纯。不同含量和组成的丹酚酸水提取物(AE)、乙酸乙酯萃取物(EE)、大孔吸附树脂纯化物(RE)(本实验室自制)。

1.3 方法

1.3.1 DPPH 自由基清除法 参照文献[4]。反应体积为 3 ml,取 0.5 ml 不同浓度的样品加入 6×10^{-5} mol/L 的 DPPH 乙醇溶液中,混匀后室温下测定 DPPH 反应液在 517 nm 处的吸光度。BHT、VC 作对照比较。样品对 DPPH 的清除率(%)=$[A_0-A_{样})/A_0]\times100\%$。$A_0$ 为 DPPH 对照在时间 $t=0$ 时的吸光度值,$A_{样}$为加有样品的 DPPH $t=30$ min 时的吸光度值。

1.3.2 清除羟自由基及对 DNA 损伤的保护作用 参照文献[5]。采用邻菲罗啉(Phen)-$CuSO_4$-VC-DNA 体系检测清除羟自由基及对 DNA 损伤的保护作用。用 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液(pH5.5)配制 Phen-$CuSO_4$-VC-DNA 溶液,使 Phen、Cu^{2+}、VC 和 DNA 的最终浓度分别为 3.5×10^{-3} mol/L、1.5×10^{-4} mol/L, 2.8×10^{-3} mol/L、150 μg/ml。加入一定量的样品(对照用缓冲液补齐)。取该溶液 1 ml,放入发光仪样品池中,加入 200 μl 30% 的 H_2O_2 溶液,混匀,启动发光反应,连续测定发光强度(CL)。发光强度抑制率(%)=[($CL_{对照}-CL_{样品}$)/$CL_{对照}$]×100。

* 基金项目: 江苏省高校自然科学研究项目资助(05KJB330083)
作者单位: 南京医科大学公共卫生学院卫生检验学系,南京 210029
作者简介: 柳艳(1982-),女,江苏镇江人,硕士在读,研究方向:营养与功能成分分析。
通讯作者: 李磊

2 结 果

2.1 丹酚酸清除DPPH自由基的能力 在本实验条件下，DPPH浓度在5~60μmol/L范围内与517 nm下的吸光度有良好线性关系，Y=0.010 4X+0.005 1(R^2=0.999 9)。不同的丹酚酸在各浓度下对DPPH自由基均有清除作用，其清除能力与浓度在一定范围内呈量效关系。AE、EE、RE、VC、BHT对DPPH自由基的半数清除浓度(IC_{50})分别为141.2，15.3，14.6，15.8，71.5 μg/ml。其中，丹酚酸EE、RE和丹酚酸B在5~25 μg/ml范围内随着浓度的增大，清除DPPH能力呈线性增加。当样品浓度进一步增大到50 μg/ml后，其清除能力增加趋于平稳，清除反应的量效关系与VC相似。在5~200 μg/ml浓度范围内，AE清除DPPH的浓度效应呈线性关系，浓度为200 μg/ml时，AE清除DPPH的能力达到71.0%，接近于同浓度下BHT的水平。实验观察了不同样品在浓度为25 μg/ml时对DPPH自由清除能力的动力学变化(30 min)。AE、EE、RE在30 min内吸收值均不断下降，超过30 min后仍有下降趋势。而对照AsA在反应启动后，能快速清除DPPH自由基(6×10^{-5}mol/L)，并达到平衡。

2.2 对羟自由基损伤DNA的保护作用 Phen-$CuSO_4$-VC-H_2O_2-DNA化学发光体系中，Phen在金属离子的催化下与H_2O_2作用，生成羟自由基，产生最大发射在445~450 nm范围内的化学发光。羟自由基引起DNA损伤，能产生一延迟于Phen本身氧化发光信号的慢化学发光。最大发光波长范围在380~420 nm。丹酚酸混合物AE、EE和RE均能有效防止羟自由基引起的DNA损伤。当AE终浓度分别为200，500，1 000，2 000 μg/ml时，DNA损伤产物发光峰延迟时间分别为180，240，400，1 220 s；发光抑制率分别为13.74%，26.64%，46.50%，68.93%。EE终浓度为25，50，160，200，400 μg/ml时，DNA损伤产物发光峰延迟时间分别为320，420，520，940，1 980 s；发光抑制率分别为27.13%，56.17%，71.52%，76.96%，90.67%。RE终浓度为25，50，100，150，200 μg/ml时，DNA损伤产物发光峰延迟时间分别为340，400，800，960，1 040 s；发光抑制率分别为38.24%，48.63%，63.26%，76.49%。丹酚酸的加入能使DNA损伤产物发光峰较空白对照组有明显下降，且有明显后移现象，浓度越大，作用越强。AE、EE、RE的抑制发光50%的浓度(IC_{50})分别为1293.6，62.0，49.2 μg/ml。浓度为200 μg/ml时，丹酚酸AE、EE、RE的延迟时间大小顺序为RE>EE>AE。可见，丹酚酸对DNA氧化损伤的保护能力大小依次为RE>EE>AE。

2.3 丹酚酸组成对抗氧化能力的影响

2.3.1 丹酚酸组份测定 外标法测丹酚酸B标准品在不同浓度下所得的峰面积，以浓度和对应峰面积建立线性回归方程，Y=15 197X+92 80.2(r^2=0.999 8)。测得丹酚酸样品AE、EE、RE中丹酚酸B的纯度分别为5.6%，74.4%，90.5%。AE、EE、RE中除丹酚酸B(保留时间为28.465±0.10 min)外，还存在5个共有峰，保留时间(min)分别为20.748±0.05；22.498±0.06，24.032±0.07，25.265±0.08，32.698±0.20。分析各峰面积可知(AE、EE、RE浓度均为2 mg/ml)，AE各峰面积均明显低于EE、RE，显示AE中总丹酚酸含量低于EE和RE。RE中峰2，3，6的面积分别是EE的1.12，6.55，3.87倍，而峰4，5的面积则低于EE，分别为EE峰面积的69%~40%。

2.3.2 丹酚酸组成与抗氧化能力的关系 丹酚酸对DPPH清除能力测定结果显示，EE、RE在各浓度下的清除率均明显高于AE，同时EE、RE与丹酚酸B标准品(纯度是99.3%)相比较，相同浓度(25 μg/ml)下，EE、RE对DPPH的清除率分别为78.97%和81.94%，丹酚酸B的清除率为82.59%。可见，丹酚酸B的纯度越高，其清除能力越强。在Phen-$CuSO_4$-VC-H_2O_2-DNA化学发光体系中，与DPPH自由基清除能力相似，对DNA氧化损伤的保护能力大小依次为EE>RE>AE。可见，AE的抗氧化能力明显低于EE和RE，这与AE中的总酚含量低于EE和RE相一致。

2.3.3 丹酚酸B含量与抗氧化能力的相关性 相关性分析显示显示，在DPPH反应体系中，丹酚酸B含量低于13 μg时，其含量与DPPH自由基清除能力之间有明显相关性(R^2=0.898 4)，含量进一步增大后，清除能力增加缓慢。原因可能是此反应浓度下的丹酚酸B能基本清除反应中的DPPH(6×10^{-5}mmol/L)。在化学发光反应体系中，丹酚酸B的含量与发光抑制率间的关系也有明显的相关性(R^2=0.812 1)。由此推测，丹酚酸B可能是样品中主要抗氧化物质。

3 讨 论

本实验表明，丹酚酸能有效清除DPPH自由基，对羟自由基致DNA损伤具有明显的保护作用，并存在一定的剂量效应关系，是一种有效的天然自由基清除剂。酚酸类化合物具有清除自由基的结构[6,7]，不同组成的丹酚酸，由于各单体间结构的差异引起其清除自由基能力的不同。其中丹酚酸B是由三分子丹参素与一分子咖啡酸缩合合成，结构上含有多个游离酚羟基。因此，具有很强的提供氢质子的能力。从而阻断自由基链式反应，并能通过清除体系中产生的羟自由基消除对DNA的破坏作用。张健等[8]把自由基清除剂对DNA损伤的保护机制分为3种：①延迟DNA损伤，代表断链性作用；②抑制DNA损伤，代表预防性作用；③延迟兼抑制DNA损伤，代表断链兼预防性作用。不同组分的丹酚酸均可有效地清除羟自由基，降低DNA损伤程度且延迟DNA损伤发生的时间，表现出了丹酚酸具有断链兼预防性作用。

本次研究重点观察了丹酚酸在体外2种自由基反应模型中的作用，表明其清除DPPH自由基能力及对DNA损伤的保护作用和丹酚酸B含量有一定相关性。丹酚酸组分表现出的抗氧化能力可能并不仅仅由于丹酚酸B的直接作用，而存在其他丹酚酸类单体提供的作用和相互影响，具体影响程度和原因有待于对未知丹酚酸峰作深入分析而确认。

参考文献

〔1〕 杜冠华，张均田. 丹参水溶性有效成分-丹酚酸研究进展[J]. 基础医学与临床，2000，20(5)：210-214.

〔2〕 刘艳妮，沈新南，黄 ，等. 葡萄籽原花青素对糖尿病鼠抗氧化能力影响[J]. 中国公共卫生，2006，22(8)：992-993.

〔3〕 李玉山，薛慧，李田，等. 银杏叶茶对高脂饮食大鼠血脂、氧自由基影响[J]. 中国公共卫生，2005，21(2)：193-194.

〔4〕 许申鸿，杭瑚. 溶剂及pH值对1，1-二苯基-2-苦肼基自由基分析法的影响[J]. 分析测试学报，2000，19(3)：50-52.

〔5〕 胡天喜. 测量活性氧、自由基及脂质过氧化的化学发光技术[M]. 自由基生命科学进展. 5集. 北京：原子能出版社，1997：65-71.

〔6〕 Chen CP，Yokozawa T，Chung HY. Inhibitory effect of caffeic acid analogues isolated from salviaemiltiorrhizae radix against 1，1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. Exp Toxicol Pathol，1999，51(1)：59-63.

〔7〕 Cai YZ，Mei Sun，Jie Xing，et al. Structure-radical scavenging aetivity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants[J]. Life Sci，2006，78(25)：2872-2888.

〔8〕 张健，曹恩华. 抗氧化剂对DNA损伤的保护作用机制的研究[J]. 生物物理学报，1997，13(1)：123-127.

收稿日期：2006-07-18 (文涛编辑 郭长胜校对)