

桑白皮总黄酮的抗氧化与镇痛活性研究

崔 珏, 李 超, 姜中生

(徐州工程学院食品(生物)工程学院, 江苏 徐州 221008)

摘 要:目的: 研究桑白皮总黄酮的抗氧化和镇痛活性。方法: 分别采用 DPPH 自由基法、羟自由基($\cdot\text{OH}$)法研究桑白皮总黄酮的抗氧化性活性, 另外通过小鼠醋酸扭体、热板、甲醛致痛(分别代表 3 种不同的疼痛模型)研究桑白皮总黄酮的镇痛活性。结果: 与 VC 相比, 在体外实验中, 桑白皮总黄酮对 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 具有良好的清除能力; 在体内实验中, 桑白皮总黄酮可显著降低由腹腔注射醋酸引起的小鼠扭体次数, 同时也可减少热刺激和甲醛诱导的小鼠舔足次数, 说明桑白皮总黄酮对化学物质和炎症引起的疼痛均具有一定的缓解作用。结论: 桑白皮总黄酮具有显著的抗氧化和镇痛活性。

关键词: 桑白皮; 总黄酮; 镇痛; 抗氧化

Antioxidant and Analgesia Activities of Total Flavonoids from the Root Bark of *Morus alba*

CUI Jue, LI Chao, JIANG Zhong-sheng

(College of Food (Biology) Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: Objective: To evaluate the antioxidant and analgesic activities of total flavonoids from the root bark of *Morus alba*. Methods: The antioxidant activity was evaluated by DPPH and hydroxyl free radical scavenging assays using VC as reference standard, and the analgesia activity by acetic acid-induced writhing response, formaldehyde-induced feet-licking response, and heat-induced pain threshold in mice. Results: The total flavonoids had obvious scavenging activity *in vitro* against DPPH and hydroxyl free radicals. These compounds resulted in a notable decrease in acetic acid-induced writhing number and feet-licking number induced by heat or formaldehyde and consequently had alleviating effect on pain in mice induced by chemicals and inflammatory reaction. Conclusion: Total flavonoids from the root bark of *Morus alba* have obvious antioxidant and analgesic activities.

Key words: *Morus alba*; flavonoids; analgesia activity; antioxidant activity

中图分类号: S896.6; TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0281-04

桑白皮为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥根皮, 其中主要含有多种黄酮类成分, 包括桑酮、桑酮醇、桑根酮、桑根酮醇、桑素、桑皮根素以及生物碱和多糖类等有效成分, 在中医中有泻肺平喘, 利水消肿之功效。近年来, 由于天然产物中的活性成分被证实具有能有效地改善代谢的作用, 因此越来越受到人们的关注。研究发现, 桑白皮总黄酮不但可显著地降低 II 型糖尿病大鼠血糖和血甘油三酯水平, 改善糖尿病的作用, 并且还具有抗炎、镇咳祛痰的作用^[1-3]。这些研究结果说明桑白皮总黄酮具有多种生物活性作用。目前, 天然产物中的黄酮类化合物在医药品、保健用品、保健食品领域中的应用日益广泛, 但对桑白皮总黄酮活性的研究尚处于起步阶段。为了更有效地开发利用桑白皮

资源, 本实验分别在体外实验中考察桑白皮总黄酮清除 DPPH 自由基活性、清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)活性, 并通过 3 种反映不同疼痛类型的动物实验研究桑白皮总黄酮的体内镇痛活性, 从而为其开发和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑白皮购于安徽亳州药材市场。

芦丁对照品 中国药品生物制品检定所; AB-8 型大孔吸附树脂 安徽三星树脂有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国 Sigma 公司; 其他试剂为国产化学分析纯。

收稿日期: 2011-05-08

基金项目: 徐州工程学院培育项目(XKY2010114)

作者简介: 崔珏(1980—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为天然产物的功能特性。E-mail: cuijue1980@hotmail.com

1.2 仪器与设备

CW-2000 型超声 - 微波协同萃取仪 上海新拓分析仪器科技有限公司; SENCO R201L 旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; 756 紫外 - 可见分光光度计 上海成光仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超声波协同微波法提取桑白皮总黄酮

桑白皮干燥粉碎后, 准确称取桑白皮粉末 3.0g 加入 100mL 特制的三角瓶中, 再加入一定体积分数的乙醇后, 经过提取、抽滤、定容、测定。在提取的过程中, 超声波处于运行状态。

1.3.2 AB-8 型大孔吸附树脂分离纯化

采用 AB-8 型大孔吸附树脂对超声波协同微波方法提取的桑白皮总黄酮进行纯化, 考察了各种因素对树脂吸附和洗脱效果的影响。通过实验得出吸附的最优的工艺参数分别为: 上样液质量浓度 2mg/mL、上样液 pH5.0、上样液流速 2BV/h; 洗脱的最优工艺参数为: 洗脱液为 75% 乙醇、洗脱液流速 1BV/h。

1.3.3 总黄酮纯度的测定

以芦丁为对照, 根据文献中的亚硝酸钠 - 硝酸铝比色法^[4], 以质量浓度(mg/mL)为横坐标, 以波长 510nm 处所测得的吸光度为纵坐标, 进行标准曲线的绘制。得回归方程: $y = 11.111x - 0.013$, $R^2 = 0.9968$, 结果表明在 0~0.04mg/mL 线性良好。经大孔吸附树脂纯化后的总黄酮产品纯度可达到 60.13%。

1.3.4 抗氧化活性的测定

1.3.4.1 清除 DPPH 自由基活性的测定

DPPH 自由基清除率的测定方法参照文献[5], 以 VC 为阳性对照, 按公式(1)计算桑白皮总黄酮对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_c 为未加试样只加 DPPH 的溶液在波长 517nm 处的吸光度; A_i 为加试样反应后 DPPH 溶液在波长 517nm 处的吸光度; A_j 为未加 DPPH 只加试样的溶液在波长 517nm 处的吸光度。

1.3.4.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 活性的测定

$\cdot\text{OH}$ 清除率的测定方法参照文献[6], 以 VC 为阳性对照。其清除率按公式(2)计算。

$$\text{清除率}/\% = (1 - \frac{A - A_1}{A_0}) \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为未加试样只加硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、双氧水的空白对照在波长 510nm 处的吸光度; A 为加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、双氧水、加入试样后在 510nm 波长处的吸光度; A_1 为加入硫酸亚铁、水杨酸 - 乙醇、加入相同体积的试样, 未加双氧水引发反应的溶液在 510nm 波长处的吸光度, 即本底吸光度。

1.3.5 桑白皮总黄酮镇痛活性的研究

1.3.5.1 桑白皮总黄酮对小鼠热板所致痛阈值的影响

取健康雄性昆明种小鼠 32 只, 平均体质量(23 ± 3)g, 基础饲料适应性喂养 7d 后, 根据体质量随机分为 4 组, 分组及给药剂量如下: 生理盐水组(灌胃体积与处理组相同均为 0.1mL)、阿司匹林组(250mg/(kg·d))、桑白皮总黄酮低剂量组(134mg/(kg·d))、桑白皮总黄酮高剂量组(268mg/(kg·d))。首先测定给药前各组小鼠的痛阈值, 将所测两次正常痛阈平均值作为该鼠给药前痛阈值, 同时剔除痛阈值 < 3s 或 > 30s 的小鼠。随后进行灌胃给药, 1 次/d, 连续灌胃 5d, 末次给药后分别在 30、60、90min 后将小鼠置于(55 ± 0.5)℃热板上, 测定其痛阈值。

1.3.5.2 桑白皮总黄酮对小鼠甲醛致痛的舔足反应的影响

取健康雄性昆明种小鼠 32 只, 随机分为 4 组, 分组及给药剂量同上。连续灌胃 7d 后, 各组小鼠均在其右后足底(或对侧足底)注射 5% 甲醛 10μL, 观察其舔足反应, 并分别在 0~5min 时间段记录小鼠累计舔足次数。

1.3.5.3 桑白皮总黄酮对冰醋酸致小鼠扭体反应的影响

取健康雄性昆明种小鼠 32 只, 随机分为 4 组, 分组及给药剂量同上。连续灌胃 9d 后, 各组小鼠均腹腔注射 0.6% 的醋酸溶液 0.2mL/20g, 观察、记录注射冰醋酸溶液后 20min 内各组小鼠发生扭体的次数。

1.4 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件, 所有的数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间 t 检验对实验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

VC 是公认的有效的抗氧化剂, 本实验选用 VC 作为阳性对照, 以评估桑白皮总黄酮的抗氧化活性。阿司匹林具有解热、镇痛、抗炎等多方面的药理作用, 是镇痛实验中常用的阳性对照药物, 所以本实验选用了阿司匹林作为阳性对照, 以评估桑白皮总黄酮的镇痛作用。

2.1 桑白皮总黄酮对 DPPH 自由基的清除作用

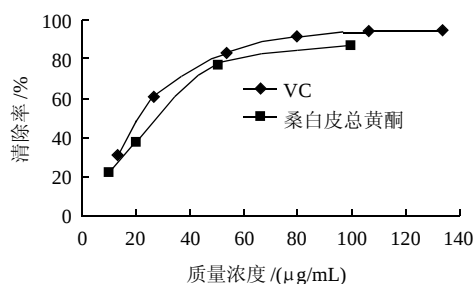


图1 总黄酮质量浓度与 DPPH 自由基清除率的关系

Fig.1 Relationship between DPPH free radical scavenging rate and total flavonoids concentration

由图1所示,与VC相比,桑白皮总黄酮清除 DPPH 自由基的能力相当,具有显著的清除 DPPH 自由基的作用,在 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内,其 DPPH 自由基的清除率为 21.34%~86.88%,并且随着总黄酮质量浓度的增加,对 DPPH 自由基的清除能力逐渐增强,总黄酮的质量浓度与 DPPH 自由基的清除率之间存在量效关系。

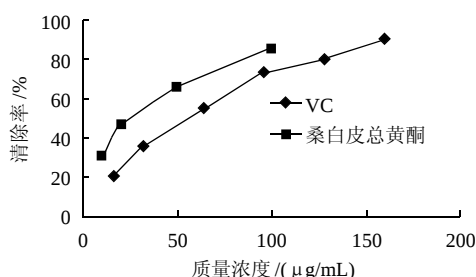
2.2 桑白皮总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用图2 总黄酮质量浓度与 $\cdot\text{OH}$ 清除率的关系

Fig.2 Relationship between hydroxyl free radical scavenging rate and total flavonoids concentration

如图2所示,与VC相比,桑白皮总黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力强于VC,具有显著的清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用,在 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内,其 $\cdot\text{OH}$ 的清除率为 29.92%~85.98%,并且随着总黄酮质量浓度的增加,对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力逐渐增强,总黄酮的质量浓度与 $\cdot\text{OH}$ 的清除率之间存在量效关系。

2.3 桑白皮总黄酮对小鼠热板所致痛阈值的影响

如表1所示,灌胃5d后,末次给药30、60、90min后,与生理盐水组相比,灌胃桑白皮总黄酮高剂量组的小鼠对热刺激的痛阈值均显著延长,差异显著。其中,桑白皮总黄酮高剂量组和阿司匹林组的镇痛效果相当,组间差异不显著,两组均可显著延长小鼠对热刺激的痛阈值,说明桑白皮总黄酮具有有效缓解由热刺激引起的小鼠疼痛的作用。

表1 总黄酮对小鼠热板致痛的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 1 Effect of total flavonoids from the root bark of *Morus alba* on heat-induced pain threshold of mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg/(kg·d))	痛阈值/s			
		给药前	30min	60min	90min
生理盐水组		18.33 $\pm$ 2.01	16.03 $\pm$ 1.32	18.01 $\pm$ 1.49	14.86 $\pm$ 1.71
阿司匹林组	250	17.83 $\pm$ 1.86	22.58 $\pm$ 2.38**	25.82 $\pm$ 2.25*	24.85 $\pm$ 1.74**
桑白皮总黄酮低剂量组	134	16.44 $\pm$ 2.35	19.56 $\pm$ 1.94*	19.32 $\pm$ 1.29	19.15 $\pm$ 1.44*
桑白皮总黄酮高剂量组	268	16.97 $\pm$ 2.60	24.89 $\pm$ 1.51**	28.73 $\pm$ 2.59*	22.96 $\pm$ 2.70**

注: *与生理盐水组比较,有显著性差异($P < 0.05$); **,与生理盐水组比较,有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

2.4 桑白皮总黄酮对甲醛致痛小鼠舔足反应的影响

表2 总黄酮对甲醛致痛的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 2 Effect of total flavonoids from the root bark of *Morus alba* on formaldehyde-induced feet-licking response of mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/(kg·d))	舔足次数
生理盐水组		25.50 $\pm$ 1.87
阿司匹林组	250	17.00 $\pm$ 3.46*
桑白皮总黄酮低剂量组	134	11.67 $\pm$ 2.42**
桑白皮总黄酮高剂量组	268	8.83 $\pm$ 2.04**

如表2所示,与生理盐水组相比,灌胃7d后,桑白皮总黄酮低剂量组和高剂量组均可极显著减少注射甲醛后5min内小鼠的舔足次数,并且其镇痛效果优于阿司匹林组,组间差异显著,表明桑白皮总黄酮具有显著的抑制由甲醛导致的小鼠疼痛反应。

2.5 桑白皮总黄酮对冰醋酸致小鼠扭体反应的影响

表3 总黄酮对冰醋酸致小鼠扭体次数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 3 Effect of total flavonoids from the root bark of *Morus alba* on acetic acid-induced writhing response of mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg/(kg·d))	扭体次数	抑制率/%
生理盐水组		26.67 $\pm$ 1.86	
阿司匹林组	250	14.50 $\pm$ 1.87*	45.63
桑白皮总黄酮低剂量组	134	14.33 $\pm$ 2.16*	46.27
桑白皮总黄酮高剂量组	268	9.00 $\pm$ 1.79**	66.25

如表3所示,连续灌胃9d后,桑白皮总黄酮低剂量组与高剂量组均能显著减少醋酸所致小鼠扭体次数,与生理盐水组相比,差异显著。其中,桑白皮总黄酮低剂量组和阿司匹林组效果相当,组间差异不显著。桑白皮总黄酮高剂量组的镇痛效果优于阿司匹林组,对扭体的抑制率高达66.25%,组间差异显著,表明随着给药天数的延长,桑白皮总黄酮的镇痛效果越来越明显,显著优于阿司匹林的镇痛效果。

3 讨 论

总黄酮类化合物是广泛存在于植物中的由光合作用产生的一类低分子质量化合物,具有降血糖、抗氧化、镇痛、抗炎、抗过敏、抗癌等多种重要的生物活性^[7]。研究发现银杏、黄芩茎叶的总黄酮类化合物可以抑制由化学或热刺激诱导的实验动物疼痛反应,其镇痛的作用机制推测与降低脑组织及血清中的一种重要的疼痛介质前列腺素的含量有关^[8-10]。另外,还有研究发现桑白皮总黄酮具有抗炎的作用,其作用机制主要是通过抑制环氧化酶和脂氧化酶活性以及抑制诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的表达产生起到抗炎的作用^[11-12]。NO是一种性质活泼的自由基,在炎症反应中具有双重作用,既可作为促炎因子又可作为抑炎因子发挥作用^[13-15]。本研究结果表明,桑白皮总黄酮有很好的清除DPPH自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的作用,清除率与总黄酮质量浓度之间存在量效关系,推测桑白皮总黄酮的镇痛、抗炎的作用可能是通过清除自由基来发挥作用。

缓解疼痛的主要方法就是药物治疗,根据药物的作用方式和部位,可以把镇痛药物分为外周性镇痛药和中枢性镇痛药。热板实验是由热刺激诱导的疼痛模型,是根据小鼠爪趾对热刺激敏感的特性,考察中枢性镇痛药的疗效。本研究结果表明,短期给药5d,就可显著延长小鼠对热刺激的痛阈值,无论是低剂量还是高剂量的桑白皮总黄酮,对小鼠由热板引起的舔足反应有明显的抑制作用,说明桑白皮总黄酮对由热刺激导致的神经痛有显著的改善作用。甲醛致痛模型模拟的是急性组织损伤所致的持续性疼痛,是研究药物镇痛作用的常用模型,其特点是引起的疼痛分为两个时相,0~5min为I相反应,是由直接刺激神经末梢所致^[10]。本实验结果表明,在注射甲醛后的0~5min内,桑白皮总黄酮低剂量与高剂量组均可显著减少由化学刺激导致的小鼠舔足次数,说明其对急性组织损伤所致的持续性疼痛有明显的抑制作用,其效果优于阿司匹林。醋酸扭体实验是模拟腹腔炎症的病理性内脏痛的实验模型,是将刺激剂注入小鼠的腹腔,引起炎性介质前列腺素的释放,从而

导致疼痛的产生。本研究结果显示,桑白皮总黄酮的两个剂量组均能显著抑制小鼠由内脏性疼痛导致的肢体扭动,其中高剂量组的效果优于镇痛药阿司匹林的效果。从以上3个不同类型的疼痛实验所得的结果说明,桑白皮总黄酮无论是对快痛还是对由化学刺激引起的持续性疼痛都有很明显的缓解作用,可用于镇痛药物的开发,其具体的作用机制还有待于进一步的实验证明。

参考文献:

- [1] 张明发,沈雅琴.桑白皮的药理研究进展[J].上海医药,2006,27(4): 164-167.
- [2] 周锋,董志,李晶.桑白皮总黄酮抗糖尿病作用的初步研究[J].2010,31(5): 93-94.
- [3] 韦媛媛,徐峰,陈侠,等.桑白皮总黄酮的镇咳祛痰作用[J].沈阳药科大学学报,2009,26(8): 644-646.
- [4] 刘北林,董继生,霍红.山楂黄酮最佳提取工艺探讨[J].食品科学,2007,28(6): 167-170.
- [5] 张志国,陈锦屏,邵秀芝.红枣核类黄酮清除DPPH自由基活性研究[J].食品科学,2007,28(2): 67-70.
- [6] 张春生,方玉梅,王毅红,等.野生鱼腥草黄酮化合物对羟基自由基的清除作用[J].食品科技,2009,34(6): 188-190.
- [7] 田永利,许志宇,葛林,等.总黄酮类化合物含量测定方法和药理作用研究进展[J].河北医药,2010,32(8): 2094-2096.
- [8] 赵铁华,杨鹤松,邓淑华,等.黄芩茎叶总黄酮镇痛作用的实验研究[J].中国中医药科技,2001,8(3): 175-177.
- [9] 陈志武,方明,马传庚.银杏叶总黄酮的镇痛作用[J].安徽医科大学学报,1997,32(2): 15-16.
- [10] 宋小平,陈志武,张建华,等.杜鹃花总黄酮的镇痛作用研究[J].山东医药,2007,47(14): 14-16.
- [11] FUKAI T, SATOH K, NOMURA T, et al. Antinephritis and radical scavenging activity of prenylflavonoids[J]. Fitoterapia, 2003, 74(7/8): 720-724.
- [12] YE Yumei, MARINEZ J D, PEREZ-POLO R J, et al. The role of eNOS, iNOS, and NF- κ B in upregulation and activation of cyclooxygenase-2 and infarct size reduction by atorvastatin[J]. AJP-Heart, 2008, 295(1): 343-351.
- [13] NARUMIYA S, FURUYASHIKI T. Fever, inflammation, pain and beyond: prostanoide receptor research during these 25 years[J]. FASEB J, 2011, 25(3): 813-818.
- [14] AKTAN F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation[J]. Life Sciences, 2004, 27(6): 639-653.
- [15] WANGA G J, CHENB Y M, WANG T M, et al. Flavonoids with iNOS inhibitory activity from *Pogonatherum crinitum*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 118(1): 71-78.