

诺丽果提取物的抗氧化活性及心肌保护作用研究

胡鸣旭¹, 张洪才², 于纯淼³, 王宇², 刘树民⁴, 刘莉⁵

(1. 黑龙江省中医研究院, 黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150001) (2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江哈尔滨 150040) (3. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (4. 黑龙江中医药大学药物安全性评价中心, 黑龙江哈尔滨 150040) (5. 黑龙江中医药大学附属第一医院心内科, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 研究诺丽果提取物抗氧化活性及其心肌细胞的保护作用, 验证其对于心力衰竭的治疗效果。实验通过 ABTS, DPPH, 羟自由基清除率、铜离子还原力、总还原力等五种抗氧化实验测定诺丽果提取物及从提取物中分离所得两种单体化合物的抗氧化能力。通过流式细胞仪, 倒置荧光显微镜检测诺丽果提取物心肌细胞保护作用, 并应用高效液相色谱检测受损心肌细胞能量生成情况。抗氧化实验结果: 维生素 C > 正丁醇萃取物 > 芦丁 > 黄酮醇。同时在终浓度均为 100 mg/L 条件下, 诺丽果组心肌细胞凋亡率(19.34%±2.24%) 和维生素 C 组(21.51%±3.24%) 效果相当 (P>0.01), 而且诺丽果提取物可促进受损心肌细胞能量生成, 其心肌细胞 ATP 含量 37.26±4.33 μg/g (24 h), 38.247±4.25 μg/g (48 h) 显著优于维生素 C 组 20.14±3.28 μg/g (24 h), 22.441±3.32 μg/g (48 h) (P<0.01)。因此诺丽果提取物是安全的天然抗氧化剂, 具有抗氧化活性和保护心肌细胞作用, 可调节受损心肌细胞能量代谢, 延缓心力衰竭进程。

关键词: 诺丽果; 抗氧化剂; 凋亡; 心力衰竭

文章编号: 1673-9078(2014)2-31-36

Antioxidative Activity and Myocardial Protective Effect of Noni Extracts

HU Ming-xu¹, ZHANG Hong-cai², YU Chun-miao³, WANG Yu², LIU Shu-min⁴, LIU Li⁵

(1. Heilongjiang Academy of TCM, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China) (2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China) (3. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China) (4. Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China) (5. Department of Cardiology, No.1 Hospital of Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

Abstract: The protective effect of Noni extract on myocardial cell were investigated, and verified by the treatment of heart failure. The antioxidative activities of the noni extracts and two compounds separated from the extracts were studied and detected by five methods, namely elimination of ABTS, DPPH and hydroxyl free radical scavenging activities, cupric reducing power and total reducing power. The protective effect of myocardial cell was detected by flow cytometry and inverted fluorescence microscope, meanwhile ATP generation from damaged myocardial cell was detected by HPLC. The order of the antioxidative activities of the four compounds were shown as vitamin C > n-BuOH > rutin > flavonol glycoside. No difference of the myocardial apoptosis rate was found between the noni extracts(19.34%±2.24%) and vitamin C (21.51%±3.24%) at the final concentration of 100 mg/L (P>0.01). The noni extracts promoted the damaged myocardial cells. And myocardial ATP content 37.26±4.33 μg/g (24 h), 38.247±4.25 μg/g (48 h) was significantly higher than vitamin C 20.14±3.28 μg/g (24 h), 22.441±3.32 μg/g (48 h) (P<0.01). Thus noni extracts was a kind of safety antioxidant. The extracts could adjust the energy synthesis of the damaged myocardial cells and delay the process of heart failure.

Key words: noni; antioxidants; apoptosis; heart failure

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 教育部高等学校博士学科专项科研基金(20102327110002); 黑龙江省中医药科研项目(ZHY12-Z111)

作者简介: 胡鸣旭(1981-), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 天然药物治疗心血管疾病

通讯作者: 刘树民(1963-), 男, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向: 中药药效物质基础; 刘莉(1960-), 女, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向: 中西医结合治疗心血管疾病

自由基是体内组织正常代谢产物, 在正常情况下, 体内自由基的产生和消除处于一种动态平衡状态。由于某种原因使该动态平衡状态被破坏后, 自由基就会攻击组织中的不饱和脂肪酸, 引发一系列自由基反应, 自由基和脂质过氧化损伤可引起体内多种疾病^[1-2], 而心力衰竭的发生, 发展就与以上机制关系密切, 随着人们对心力衰竭的不断研究, 心肌缺血缺氧损伤后自由基攻击及心肌能量代谢紊乱是心力衰竭进展的主要

原因,如心肌细胞线粒体在缺氧情况下受到大量自由基攻击进而造成损伤,引起整个心肌细胞凋亡程序启动。以及心肌细胞在无氧条件下为满足代谢需要通过糖酵解产生能量(ATP),同时产生大量心肌毒性物质也加速了心肌细胞凋亡进程。因此如何保护心肌细胞,避免其在以上因素作用下发生凋亡以抑制心衰进程成为国内外学者研究的重点。

诺丽(noni),又名热带海巴戟、海巴戟天、四季果等。属茜草科巴戟天属植物。如今,它被广泛应用于许多领域。例如:抗癌、抗炎、抗氧化以保护人体器官功能^[3-5]。对于抗氧化活性,尤其是提取物及其分离得到的单体化合物的抗氧化活性比较研究较少。本实验应用ABTS自由基清除率,DPPH自由基清除率,羟自由基清除率、铜离子还原力、总还原力等五种抗氧化方法,评价实验样品的抗氧化能力,并通过抗心肌细胞凋亡实验,线粒体膜电位稳定性试验,受损心肌细胞能量合成检测等试验探究其保护心肌细胞,延缓心衰发展的效果和机理,为寻找安全性更高的天然抗氧化性物质提供试验依据,同时探索治疗心力衰竭新天然药物,为延缓心力衰竭进程提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料、试剂

K₂S₂O₈, ABTS, Tris 缓冲液(16 mM, pH 8.0), 氮蓝四唑, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 吩嗪硫酸二甲酯, FeSO₄, 三氯乙酸, 新铜试剂, 磷酸盐缓冲液(0.2 M, pH 6.6), 铁氰化钾(1%, 1.0 mL), 三氯乙烯(10%), 氯化铁(0.1%), 甲醇, 乙醇, 正丁醇, 乙酸乙酯。维生素 C, DMEM 培养基、Hepes、胰蛋白酶, 胎牛血清, 溴乙锭, 青霉素/链霉素, MTT、DMSO 检测试剂盒, ATP 检测试剂盒, 心肌细胞线粒体膜电位(MMP)试剂盒, 去甲肾上腺素(NE)。

新鲜诺丽果于2010年7月20日采自海南,经黑龙江中医药大学中药鉴定学教研室孙慧峰副教授鉴定为茜草科巴戟天属植物诺丽(noni)的新鲜果实,标本保存在黑龙江中医药大学中医药研究院(编号20100720)。大鼠H9C2心肌细胞株购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 仪器

超净工作台, CO₂ 培养箱, 高速离心机, 全自动生化仪, 酶标仪, 低温冰箱, 分光光度计, 倒置荧光显微镜, 高效液相色谱仪, 流式细胞仪等。

1.2 方法

1.2.1 提取物的制备

新鲜诺丽果5 kg,用95%的乙醇溶液加热回流提取3次,每次2 h,每次乙醇用量5 L,过滤,减压回收溶剂,得浸膏42 g。将浸膏混悬于5 L水中,分别用等体积的乙酸乙酯、正丁醇梯度萃取,每种溶剂萃取3次,减压浓缩,得到乙酸乙酯萃取物1.2 g,正丁醇萃取物(n-BuOH)8 g。将正丁醇萃取物应用硅胶柱色谱,ODS柱色谱得到单体化合物芦丁(rutin)与黄酮醇(flavonol glycoside)。最后将正丁醇萃取物, rutin, flavonol glycoside, 维生素C(Vc)配成实验所需的各个浓度。

1.2.2 ABTS 自由基清除能力测定

配制终浓度为7 mmol/L的ABTS和2.45 mmol/L过硫酸钾混合溶液,室温避光静置10~16 h,用水稀释,使其在734 nm下的吸光值为0.7±0.02,得ABTS工作液。试管中加入各梯度样品1 mL,ABTS工作液1.5 mL;空白用蒸馏水代替样品溶液;对照用蒸馏水代替ABTS工作液。以上各组室温避光放置1 h,734 nm测定其吸光值。抗坏血酸做阳性对照^[6]。

1.2.3 铜离子还原力

取0.1 mL提取液,依次加入1 mL 5 mmol/L CuSO₄溶液、1 mL 3.75 mmol/L 新亚铜试剂和1 mL NH₄Ac(1 mmol/L, pH 7.0)缓冲液,最后加入1 mL 蒸馏水,37 °C反应30 min,于450 nm波长处测定吸光度,相同浓度梯度Vc代替样品做同样处理,作为对照^[7]。

1.2.4 DPPH 自由基清除能力测定

取1.5 mL不同浓度样品溶于试管中,再加入1 mL浓度为0.04 mg/mL的DPPH溶液,混合均匀,反应20 min后在517 nm处测吸光值为A_i;另各取1.5 mL上述浓度样品于试管中,分别加入1 mL 95%乙醇,反应20 min后在517 nm处测其吸光值为A_j;以1 mL DPPH, 1.5 mL 95%乙醇反应做参比,测其吸光值为A₀。相同浓度梯度Vc代替样品做同样处理,作为对照。清除率=[1-(A_i-A_j)/A₀]×100%

1.2.5 羟自由基清除能力测定

每1 mL样品溶液中加入1 mL浓度为9 mmol/L的FeSO₄和1 mL浓度为9 mmol/L的水杨酸。加入1 mL浓度为9.8 mmol/L H₂O₂开始反应,然后将混合物振荡,放置于37 °C条件下。30 min后,应用分光光度计在562 nm处测定溶液的吸光度。相同浓度梯度Vc代替样品做同样处理,作为对照。清除率=[A₀-(A_i-A_j)/A₀]×100%^[8]。

1.2.6 总还原能力测定

取 1 mL 各梯度样品于试管中, 依次加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L PBS, pH=6.6) 和 1 mL $K_3Fe(CN)_6$, 于 50 °C 水浴保温 20 min, 迅速冷却, 再加入 1 mL 10% 三氯乙酸 (TCA), 以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL, 依次加入 3 mL 蒸馏水, 0.4 mL 0.1% 的 $FeCl_3$ 溶液, 充分混匀, 静置 10 min, 在 700 nm 测其吸光值, 吸光值越大表示还原力越强 [9]。

1.2.7 H9C2 心肌细胞培养:

H9C2 细胞置于 10% 新生牛血清的低糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO_2 条件下传代培养。取对数生长期、生长良好的细胞进行实验, 传代方法 1:2~1:6 传代; 2~3 d 换液 1 次。分组: H9C2 心肌细胞培养 72 h 达融合状态后, 去除原培养液, 随机分为 4 组: ① 正常对照组; ② 模型组 (NE); ③ Vc 组 (NE+Vc); ④ 诺丽果组 (NE+诺丽果正丁醇提取物)。心肌细胞损伤处理方法: 除正常对照组外, 各组均加入 NE (最终浓度均为 2 $\mu\text{mol/L}$)。Vc 组、诺丽果组分别加入 Vc 10 μL 、诺丽果正丁醇提取物 10 μL (最终浓度均为 100 mg/L), 每组设 8 个复孔, 在加药后 24 h, 48 h 进行指标检测。

1.2.8 H9C2 心肌细胞内 ATP 含量的测定 [10]

色谱条件 C18 柱 (250 mm×4.60 mm), 流动相为 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (150 mmol/L KH_2PO_4 , pH6.0), 流速 0.9 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL 。

1.2.9 心肌细胞线粒体膜电位检测

将各组心肌细胞培养 48 h 后, 按照心肌细胞线粒体膜电位 (MMP) 试剂盒说明书操作, 在倒置荧光显微镜观察: 激发波长 490 nm, 散发波长 590 nm, 可见红色荧光; 激发波长 490 nm, 散发波长 530 nm, 见绿色荧光。倒置显微镜图像采集系统采集图像, Image-ProPlus 图像分析软件分析图像, 用红色与绿色荧光强度的比值来表示 MMP, 比值低则受损严重。

1.2.10 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率

将培养后心肌细胞孵育 48 h, 离心并制备单细胞悬液, 溴乙啶染色, 流式细胞仪测定细胞凋亡率

1.2.11 统计学分析

应用 SPSS 11.5 统计软件, 计量资料以 mean±SD 表示, 用方差分析和多重比较 t 检验进行统计学分析, P<0.01 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 ABTS 自由基清除能力

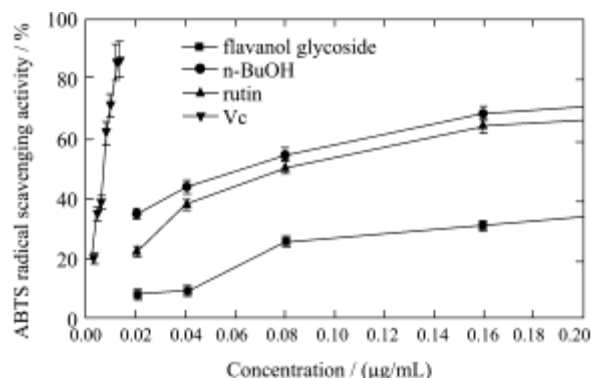


图 1 ABTS 自由基清除能力测定

Fig.1 ABTS radical scavenging activity

从图1可以看出在浓度0→0.02 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 仅 Vc 表现出显著清除能力, 其余提取物未表现出活性, Vc 在浓度 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率达到最大, 且显著高于其他提取物 ($P<0.0$), 在浓度 0.02→0.20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Vc 未再表现出显著活性, 而 n-BuOH 提取物、rutin、flavanol glycoside 清除率随浓度增加而逐渐增强, n-BuOH 提取物与 rutin 清除率显著高于 flavanol glycoside ($P<0.01$), 但三种提取物清除率最大值仍显著低于浓度 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 时 Vc 清除率 ($p<0.01$)。从图1 实验可以看出 n-BuOH 提取物自由基清除能力始终高于 rutin、flavanol glycoside 两种单体, 具有较高自由基清除能力。

2.2 铜离子还原力

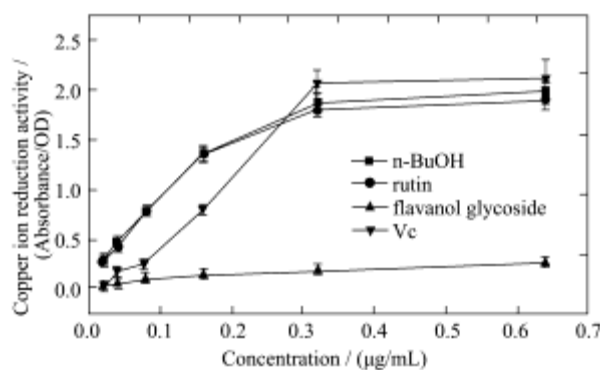


图 2 铜离子还原力

Fig.2 Copper ion (Cu^{2+}) reducing activity

从图2可以看出在浓度 0.02→0.16 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, n-BuOH 提取物与 rutin 还原能力未见明显差异 ($P>0.01$), 二者还原能力显著高于 Vc flavanol glycoside ($P<0.01$), 在浓度 0.16→0.32 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Vc、n-BuOH 提取物与 rutin 还原能力升高, 以 Vc 升高幅度明显, flavanol glycoside 未见明显变化, 在 0.32 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下,

Vc还原能力显著高于其余三种提取物 ($P<0.01$)。在浓度0.32→0.64 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 四组还原能力未见明显升高, Vc还原能力仍显著高于其余三种提取物 ($P<0.01$)。抗氧化剂的抗氧化能力与其还原力成正比, 即还原力越大, 抗氧化能力越强。从图2实验可以看出n-BuOH提取物铜离子还原力相对于其他两种单体仍具有明显优势, 甚至在浓度0.02→0.25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内明显高于Vc。从而可以看出n-BuOH提取物较强的抗氧化性。

2.3 DPPH 自由基清除能力

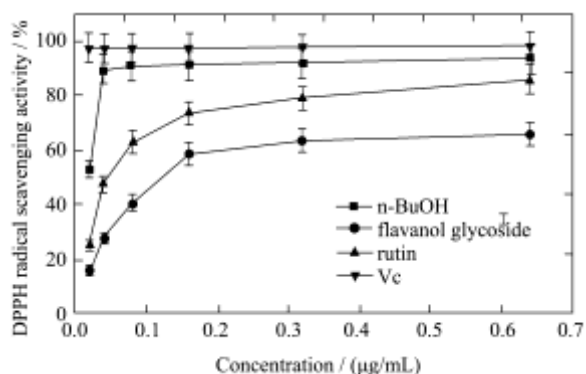


图3 DPPH 自由基清除能力

Fig.3 The DPPH scavenging activity

从图3可以看出在浓度0.02→0.32 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, n-BuOH提取物、rutin、flavanol glycoside各组清除能力逐渐升高。在0.32 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, n-BuOH提取物清除能力显著高于rutin ($P<0.01$), rutin清除能力显著高于flavanol glycoside ($P<0.01$), 在浓度0.32→0.64 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 仅rutin清除能力略有升高, 其余各组未见明显变化。但 rutin清除能力仍显著低于n-BuOH提取物 ($P<0.01$), 显著高于flavanol glycoside ($P<0.01$)。在浓度0.02→0.64 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Vc清除能力未见明显变化, 且始终显著高于其余各组 ($P<0.01$), DPPH自由基在有机溶剂中呈紫色, 是一种相对稳定的自由基, DPPH自由基清除能力更能体现各种化合物的抗氧化性, 在本实验中n-BuOH提取物的自由基清除能力虽然弱于Vc, 但明显高于rutin, flavanol glycoside。在整个过程中体现出与Vc趋势相似的稳定的自由基清除能力。

2.4 羟自由基清除能力

从图4可以看出在浓度0.2→6.4 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 各组清除能力逐渐升高。Vc清除能力始终显著高于其他三组 ($P<0.01$)。在3.2 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, Vc清除能力达到最高值, 在浓度3.2→6.4 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Vc清除能力随浓度增加未见明显变化。n-BuOH提取物清除能力显著高于rutin及flavanol glycoside ($P<0.01$), 而rutin和flavanol glycoside未见明显差异 ($P>0.01$)。

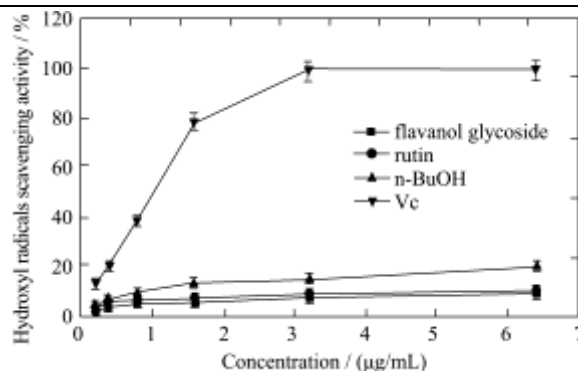


图4 羟自由基清除能力

Fig.4 Hydroxyl free radical scavenging activity

2.5 总还原力

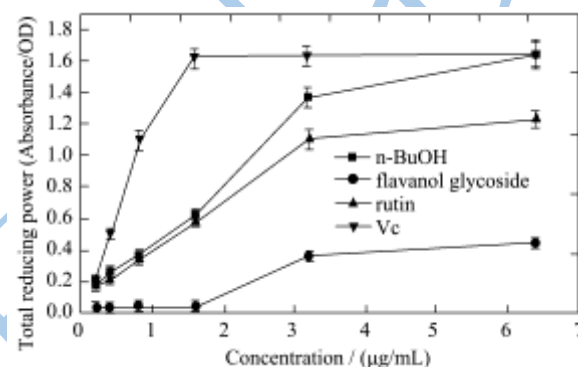


图5 总还原能力

Fig.5 Total reducing power

从图5可以看出在浓度0.02→0.16 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Vc, n-BuOH提取物、rutin、三组总还原力逐渐升高。在0.16 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, Vc总还原力达到最高值, 显著高于其余三组 ($P<0.01$)。n-BuOH提取物与rutin未见明显差异 ($P>0.01$), 但二者显著高于flavanol glycoside ($P<0.01$), 在浓度0.16→0.64 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, Vc总还原力未见明显改变, 其余三组逐渐升高, 在0.64 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, n-BuOH提取物与Vc总还原力持平, 二者显著高于rutin及flavanol glycoside ($P<0.01$), 且rutin总还原力显著高于flavanol glycoside ($P<0.01$)。

诺丽果中含有黄酮、木脂素、香豆素类化合物, 大量实验已证实这几类化合物均有不同程度的抗氧化作用, 本实验从诺丽果浸膏中获取大量正丁醇萃取物 28 g, 并从其中分离单体化合物 rutin 与 flavanol glycoside, 通过 ABTS 自由基清除率、DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率、铜离子还原力、总还原力方法验证评估其抗氧化能力, 抗氧化结果均表示出一致的趋势: Vc>正丁醇萃取物>rutin>flavanol glycoside。在本实验中 rutin 和 flavanol glycoside 是从正丁醇萃取物中分离得到, 并具有与正丁醇萃取物趋势相似的抗氧化性。相关文献^[1]已证实他们的抗氧化

能力与其含有的酚羟基双键关系密切。因此可推测诺丽果的抗氧化能力主要与诺丽果中大量含有酚羟基的黄酮、香豆素及含有双键的其他类化合物关系密切。

2.6 心肌细胞内 ATP 含量的变化

表 1 各组心肌细胞 ATP 含量比较
Table 1 Cardiomyocytes ATP content

组别	24 h ATP 含量/($\mu\text{g/g}$)	48 h ATP 含量/($\mu\text{g/g}$)
正常对照组	49.12 \pm 9.48	46.245 \pm 9.47
模型组	17.15 \pm 3.24 ^A	19.146 \pm 3.41 ^A
维生素 C 组	20.14 \pm 3.28 ^A	22.441 \pm 3.32 ^A
诺丽果组	37.26 \pm 4.33 [*]	38.247 \pm 4.25 [*]

注：表 1 与正常对照组比较 ($\Delta P < 0.01$)，与模型组及维生素 C 组比较 ($*P < 0.01$)。

如表 1 所示与正常对照组比，模型组，维生素 C 组 ATP 含量显著下降 ($\Delta P < 0.01$)；与模型组及维生素 C 组比较，诺丽果组，于 24、48 h 时 ATP 含量显著升高 ($*P < 0.01$)。模型组及维生素 C 未见显著差异。有实验表明^[12]黄酮类化合物可以促进细胞内 ATP 合成，而维生素 C 未见相关报道，在本实验中可见诺丽果组显著的促进受损心肌细胞 ATP 合成作用，在缺血缺氧条件下，为维持心肌细胞能量代谢提供支持，为保护心肌细胞提供基本条件。

2.7 心肌细胞线粒体膜电位比较

表 2 各组心肌细胞线粒体膜电位比较

Table 2 Cardiomyocytes mitochondrial membrane potential

组别	正常对照组	模型组	维生素c组	诺丽果组
红绿强度对比(MMP)	3.84 \pm 0.32	1.21 \pm 0.23 ^A	3.41 \pm 0.36 ^{*#}	2.23 \pm 0.35 [*]

注：表 2 与正常对照组比较 ($\Delta P < 0.01$)，与模型组比较 ($*P < 0.01$)，与诺丽果组比较 ($\#P < 0.01$)。

如表 2 所示心肌细胞线粒体膜电位于培养 48 h 后，模型组显著低于正常对照组 ($\Delta P < 0.01$)，诺丽果组与维生素 c 组显著高于模型组 ($*P < 0.01$)，且维生素 c 组显著高于诺丽果组 ($\#P < 0.01$)。由于维生素 c 及诺丽果具有显著抗氧化性及自由基清除能力，因此在防止自由基攻击心肌细胞线粒体，保护线粒体膜电位方面维生素 c 及诺丽果都体现出显著疗效，与抗氧化实验趋势一致，以维生素 c 效果最为显著。

2.8 心肌细胞凋亡率的比较

从图 6 可以看出与正常对照组 (14.41% \pm 2.32%) 比较，模型组细胞凋亡率 (38.52% \pm 4.33%) 明显上升 ($P < 0.01$)，与模型组比较，诺丽果组细胞凋亡率

(19.34% \pm 2.24%) 及维生素 C 组细胞凋亡率 (21.51% \pm 3.24%) 显著降低 ($P < 0.01$)，且诺丽果组与维生素 C 组未见显著差异 ($P > 0.01$)。

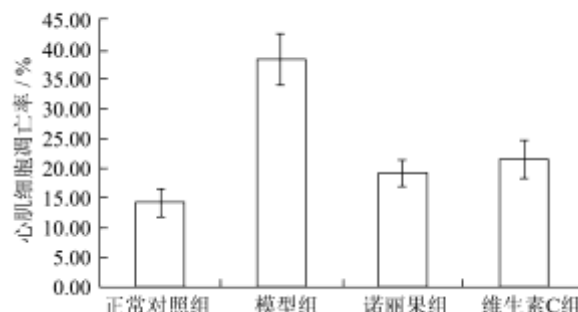


图 6 各组心肌细胞凋亡率

Fig.6 Cardiomyocytes apoptosis rate

近年来随着人们对心力衰竭的不断研究，线粒体受到自由基攻击及能量代谢重构已成为心肌细胞凋亡的两大主因。心肌细胞线粒体在细胞凋亡过程中起启动作用，受到自由基攻击线粒体膜电位 (MMP) 的下降是细胞凋亡早期的主要标志，抑制 MMP 的下降是阻断细胞凋亡的重要途径^[13]。而随着心衰病程的进展，其能量代谢途径由利用脂肪酸为主而转向以葡萄糖为主。以减少脂肪酸代谢所引起的耗氧过多，心肌毒性物质 (乳酸，氢离子) 增加。但该转化途径并不能完全弥补心肌细胞代谢所需能量。而 ATP 的合成减少加速了心力衰竭的进程^[14]。因此如何在抗氧化，抗自由基攻击，保护心肌细胞线粒体免受攻击的同时促进受损心肌细胞能量合成成为治疗心力衰竭延缓其进程的关键。维生素 C 虽然在保护线粒体膜电位方面作用显著，但未见明显促进心肌细胞能量合成作用，因此在保护心肌细胞，抑制心肌细胞凋亡方面与诺丽果组未见显著差异。

3 结论

3.1 本实验通过 ABTS 自由基清除率，DPPH 自由基清除率，羟自由基清除率、铜离子还原力、总还原力等五种抗氧化实验方法，评价诺丽果正丁醇萃取物及从中提取单体化合物的抗氧化能力，抗氧化结果趋势为：Vc>正丁醇萃取物>rutin>flavonol glycoside。并应用高效液相色谱法检测心肌细胞内 ATP 含量，倒置显微镜检测心肌细胞线粒体膜电位，流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率，验证诺丽果正丁醇萃取物可以通过抗氧化方式保护心肌细胞线粒体，并促进心肌细胞内 ATP 合成，抑制受损心肌细胞凋亡。

3.2 本实验证实诺丽果是一种安全性较高的天然抗氧化剂，同时具有心肌保护作用。可以调节受损心肌

细胞能量代谢, 维持心肌细胞线粒体膜电位水平, 从多方面延缓心力衰竭进程, 可视为一种全新的治疗心衰天然药物, 为开发天然产物医用价值提供科学依据。

参考文献

- [1] Kaufmann JA, Bickford PC, Tagliatela G. Free radical dependent changes in constitutive nuclear factor kappa B in the aged hippocampus [J]. *Neuroreport*, 2002, 13: 1971-1920
- [2] Victor VM, Rocha M. Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases [J]. *Curr. Pharm. Des.*, 2007, 13: 845-863
- [3] Viriya N, Zhang GD, Benjamin J. Darien, et al. Isolation and synergism of in vitro anti-inflammatory and quinone reductase (QR) inducing agents from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) [J]. *Food Research International*, 2011, 44: 2271-2277
- [4] Wang MY, Nowicki D, Anderson G, et al. Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (Noni) [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2008, 63(2): 59-63
- [5] Periyasamy S, Kasthuraiah M, Christophe M, et al. Studies of HIV Integrase Inhibitory Activity of *Morinda citrifolia* L [J]. *Noni Fruit Extracts. Antiviral Research*, 2010, 86: 45-46
- [6] Bohm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 221-226
- [7] Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir S E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 7970-7981
- [8] Wang H, Gao XD, Zhou GC, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106: 888-895
- [9] Chung Y C, Chen S J, Hsu C K, et al. Studies on the antioxidant activity of *Graptopetal umparaguayense* E Walther [J]. *Food Chemistry*, 2005, 91: 419-424
- [10] 杨娟, 黄敬群, 曹雪滨, 等. 高效液相色谱法测定慢性压力负荷性心衰大鼠心肌组织中腺苷酸的含量 [J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(1): 11-14
- [10] Yang J, Huang J Q, Chao X B, et al. Determinating the myocardial tissue adenosine of heart failure rats with chronic pressure overload by HPLC [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2009, 29(1): 11-14
- [11] Dugas A J, Castaneda-Acosta J, Bonin G C, et al. Evaluation of the total peroxyl radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships [J]. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 327-331
- [12] 彭彦铭, 潘燕. 补充蜂胶黄酮对过度训练小鼠心肌能量代谢酶的影响 [J]. *武汉体育学院学报*, 2010, 44(8): 36-38
- [12] Peng YM, Pan Y. The effect of supplementary propolis flavonoids on myocardial energy metabolism enzymes of overtraining mice [J]. *Journal of Wuhan Institute of Physical Education*, 2010, 44(8): 36-38
- [13] Wang Z, Tang X, Li Y, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits the apoptotic responses in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, 588(1): 9-17
- [14] Hugel S, Horn M, Remkes H, et al. Showing results for preservation of cardiac function and energy reserve by the angiotensin converting enzyme inhibitor quinapril during postmyocardial infarction remodeling in the rat [J]. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, 2001, 3(3): 215-225