

## • 论文 •

## 旱柳叶活性成分研究

郑毅男<sup>1</sup>, 徐宝军, 韩立坤<sup>2</sup>, 张晶<sup>3</sup>, 关谷敬三<sup>4</sup>(1. 大连大学医学院, 大连 116622; 2. 日本国爱媛大学医学部医化学第二教室; 3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 130118; 4. 日本国农林水省四试验场)

**摘要:**本文对旱柳叶的化学成分及其生物活性进行了研究,从中分离鉴定出11种单体化合物并对其中3种化合物,即芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷(I)、木樨草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷(II)、间-羟基-苜蓿-吡喃葡萄糖苷(III)的生物活性进行了考察。化合物I、II、III均可选择性抑制花生四烯酸代谢产物12-HETE的生成;化合物(I)水解后的苷元—芹菜素对TXB<sub>2</sub>的生成有一定的抑制作用,但对12-HETE的生成无抑制作用。

小鼠饲喂高脂肪饲料,一周以后体重明显增加。饲喂高脂肪饲料添加旱柳叶活性组分抑制小鼠体重和子宫周围脂肪量的增加,而且还可以降低肝中胆固醇和中性脂肪的含量。化合物III对大鼠脂肪细胞中由去甲肾上腺素(NE)诱导的脂类分解有促进作用。

**关键词:**花生四烯酸代谢;胆固醇;中性脂肪

中图分类号:R284.1 文献标识:A 文章编号:1006-0111(2000)05-0280-04

Studies on Constituents in the leaves of *Salix matsdana*

ZHENG Yi-nan, XU Bao-jun (Medical college, Dalian University, Dalian 116622, China)

**ABSTRACT:** From the leaves of *Salix matsdana*, three known compounds, apigenin-7-O-β-D-glucopyranuronide (I), luteolin-7-O-β-D-glucopyranuronide (II), were isolated at first in the *Salix* spp. Other compound (III), was isolated in the leaves of *Salix matsdana* and proposed as p-phenol-methyl-O-β-D-glycoside. Furthermore, we studied on effect of arachidonic acid metabolism in rat platelets by compound I, II and III with radio-chromatography and found that these compounds can significantly inhibit the production of 12-HETE (12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid), which can induced allergy and atherosclerosis. The production of apigenin-7-O-β-D-glucopyranuroide being hydrolyzed was apigenin, which can inhibit not only 12-HETE but also TXB<sub>2</sub> (thromboxane B<sub>2</sub>) which can induce platelet aggregation.

Feeding a high fat diet for 7 days, weight of mice increased significantly. Feeding a high fat diet containing the active extraction of willow leaves reduced parametrial adipose tissue by 40%. reduced contents of cholesterol and triglyceride in liver.

**KEY WORDS:** arachidonic acid metabolism; cholesterol; triglyceride

柳树不仅可用于园林绿化,也是民间常用的药用植物。柳属植物药用历史悠久,公元前1550年古埃及文献记载,利用白柳(*Salix alba* L.)叶子止痛。《本草纲目》记载<sup>[1]</sup>:“柳为本经下品,性味苦寒,无毒,可治疗风水黄疸,疮痈肿毒等症”。据《中药大辞典》记载<sup>[2]</sup>:“柳树嫩叶或枝叶,其性寒、味苦,无毒,具散风、扶湿、清湿热、治黄疸型肝炎、风湿性关节炎、湿疹、地方性甲状腺肿等功效”。1829年法国药剂师埃埃尔——约瑟夫·勒鲁首次自柳树皮中获得了水杨甙(Salicin)经结构修饰即是现在的阿斯匹林。此后陆续有报道柳属植物的活性成分,其中主要有黄酮类和酚糖甙类。其活性包括中枢神经抑制、抗催眠、促自发运动的作用,治疗心脏疾患、抗炎、利尿、止痛、降压等作用。柳叶磺含量较一般食物高数千倍。微量元素碘能促进人体新陈代谢加速脂肪分解有降压减肥作用。现在我国民间有把柳叶当茶饮,以治疗高血压<sup>[3]</sup>,亦有作为菜肴供食用的。

最近<sup>[4]</sup>我们对银杏叶、蒲公英、白头翁、黄连、人参、柳叶等48种中草药进行筛选,发现柳叶对花生四烯酸代谢产物的产生抑制作用最强。近代医学研究表明,花生四烯酸代谢在人体内发挥着重要的作用。如果失去平衡或者生成过量都会引起许多种疾病。例如12-羟基二十碳四烯酸、血栓烷A<sub>2</sub>如果产生过量,就会引起动脉硬化、血栓和过敏症等疾病<sup>[5][6]</sup>。

关于柳属植物研究报道较多,但对旱柳的化学成分及其生物活性尚未见报道。旱柳叶是杨柳科(Salicaceae)柳属植物旱柳(*Salix matsdana* Koidz)的叶片。本研究以寻找能够有效地降低肝脏和血液中的脂肪以及抑制花生四烯酸代谢产物的活性成分,充分利用我国柳属植物资源,开发抗血栓、抗动脉硬化和过敏性疾病的新药为主要目的,对旱柳叶的化学和生物活性进行了研究。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

旱柳(*Salix matsudana*)叶:5月中旬采自吉林农业大学校园内,室温阴干。Wister 系大鼠(150~200g),Wister 系大鼠(7周龄,220~230g),ICR 系雌性小鼠(3周龄),由日本爱媛大学医学部实验动物中心提供。小鼠饲料:市售固形饲料(日本东方酵母工业),高脂肪食:牛脂40%,玉米淀粉10%,糖9%,微量元素4%,混合维生素1%,酪蛋白36%。<sup>14</sup>C标记花生四烯酸购自New England Nuclear。高效薄层板(HPTLC):Merck 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 柳叶有效部位单体化合物的提取分离

干燥柳叶用乙醚脱脂后,用95%乙醇浸提,减压浓缩乙醇相,将得到的乙醇浸膏溶于水,然后依次用苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水萃取。将正丁醇层浓缩后溶于少量甲醇中,离心去除沉淀,上清液依次上Sephadex LH-20, ODS柱,分别用甲醇,甲醇-水(70:30)洗脱,得到三个化合物,经鉴定分别是芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷(化合物I)、木樨草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷(化合物II)和间-羟基-苜蓿基-吡喃葡萄糖苷(化合物III,暂定结构)。

1.2.2 抑制花生四烯酸代谢活性的测定<sup>[6]</sup> 采大鼠的血,加入10%血液量的3.8%枸橼酸钠抗凝,离心分离富血小板血浆(PRP)。再将PRP离心后取血小板(蛋白含量2~3mg/ml)。将样品20μl与从大鼠血小板130μl混合。在37℃水浴中孵化5min,加入50μl<sup>14</sup>C-标记的花生四烯酸(7.4×10<sup>4</sup>Bq/ml)37℃继续保温5min,加入200μl 0.5ml/L 甲酸使之停止反应。用乙酸乙酯充分提取、离

心,上层液移入离心试管中,N<sub>2</sub>气流干燥。干燥后加入40μl乙酸乙酯并将之全部点于薄层板上,展开,放射自显影。剪下薄层板下TXB<sub>2</sub>及12-HETE位置斑点,用贝克曼液闪计数器进行放射量测定。

1.2.3 脂肪分解活性测定 取大鼠附睾脂肪,除去血管等,用Hank's 缓冲液清洗后,称重,置于缓冲液中,用胶原酶消化,37℃培养1h,过滤,离心(500r/min)得脂肪细胞,参照Rodbell方法<sup>[7]</sup>,取上述制备好的脂肪细胞25μl置于试管中,加4%BSA200μl(2g牛血清白蛋白加50ml Hank's 缓冲液制成);Hank's 缓冲液25μl或者待测样品25μl,然后分别加入去甲肾上腺素25μl,最后反应液的总体积为250μl。留出一组做对照,其余各组37℃培养30min,反应液用3ml萃取液[氯仿-正己烷(1:1)含有2%(V/V)的甲醇],然后加铜试剂振荡10min,离心10min(2500r/min)取上层液0.5ml,加入含0.05%(W/V)的3-(2)-叔丁基-4-羟基茴香醚,其中含有0.1%的bathocuproine 氯仿溶液0.5ml,在480nm处测定吸光度。

1.2.4 高脂肪食及早柳叶活性组分饲喂小鼠 雌性ICR系小鼠(三周龄)投与高脂肪食同时投与早柳叶活性组分。实验分成四组:对照组小鼠普通食(市售固形饲料, Oriental 酵母工业公司制)、高脂肪食组和高脂肪食+2%早柳叶活性组分或5%早柳叶活性组分。饲养9周,自由采食。加早柳叶活性组分的时候,相应减少酪蛋白的量。饲养期间测定小鼠采食量。饲养结束,测定子宫旁脂肪组织的重量、肝脏组织重量和肝脏中脂质的含量。

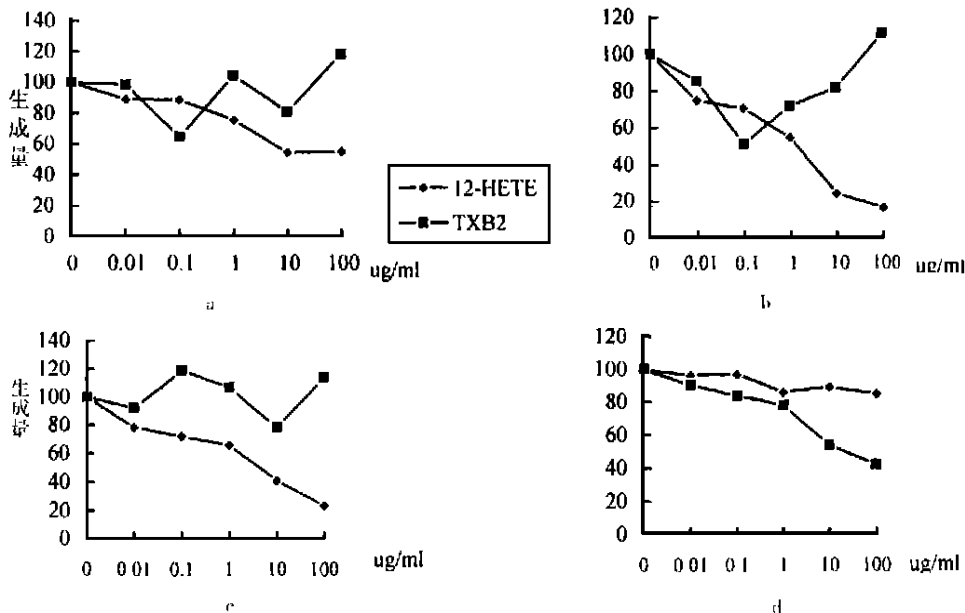


图1 化合物I、II、III对鼠血小板中花生四烯酸代谢的影响

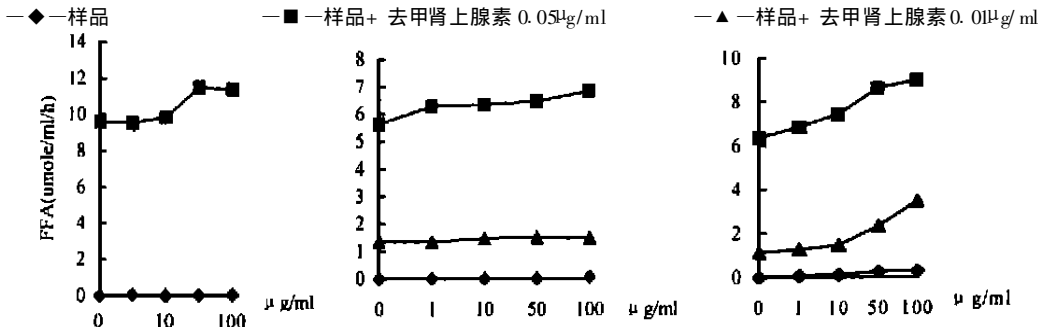
(a) 芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷  
(c) 间-羟基-苜蓿基-吡喃葡萄糖苷

(b) 木樨草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷  
(d) 芹菜素(芹菜素苷的苷元)

**1.2.5 旱柳叶活性组分对大鼠小肠刷状缘膜小囊吸收脂肪酸的影响** 按照 kessler 等人<sup>[8]</sup>的方法,即取雄性大鼠小肠的上部,用干冰急速冻结, - 50℃ 保存。把小肠上部做成小片,置于 12mM Tris - HCl 缓冲液 (pH 7.1, 300mM 甘露醇) 中溶解后,均质。所得到的溶液通过孔径 1mm 的尼龙筛,加入 300ml 冰冷的水混合。加入粉末状 CaCl<sub>2</sub>,使最终浓度成为 10mM,置冰中搅拌 20min,3000 × g 离心 15min 分离,27000 × g 30min 进一步离心分离,在 10mM HEPES - Tris 缓冲液 (pH7.5,含有 50mM 甘露醇) 中小颗粒再度悬浮。然后 27000 × g 离心 30min 分离得到小肠刷状缘膜小囊组分。小颗粒在 10mM HEPES - Tris 缓冲液 (pH7.5,100mM 甘露醇) 中呈悬浊状态,测定脂肪酸和 2- 单酰基甘油醇的小肠吸收活性。

**2 结果与分析**

**2.1 抑制花生四烯酸代谢的活性研究**



(a) 芹菜素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷 (b) 木樨草素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷 (c) 间- 羟基- 苄基- 吡喃葡萄糖苷

图2 3种单体化合物对大鼠脂肪细胞中去甲肾上腺素诱导的脂类分解的影响

从上图可以看出: 芹菜素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷和木樨草素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷对去甲肾上腺素 (NE) 诱导脂肪分解的促进作用不明显。芹菜素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷在 0.05μg/ml 水平的 NE 诱导脂类分解过程中, 浓度为 50μg/ml 时使 FFA 释放; 当 NE 为 0.01μg/ml 水平时, 50μg/ml 的间- 羟基- 苄基- 吡喃葡萄糖苷即可使 FFA 的释放量增加。当 NE 为 0.05μg/ml 水平时, 间- 羟基- 苄基- 吡喃葡萄糖苷在浓度为 1μg/ml 时即表现有促进脂肪分解作用, 强度随浓度的增大而增强。

**2.3 旱柳叶活性组分对肠道吸收脂肪酸的影响**

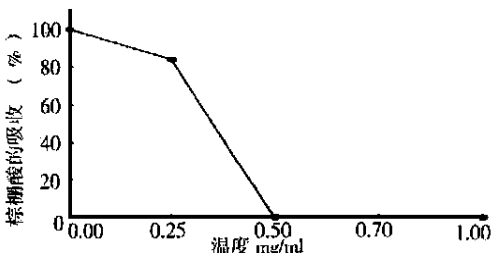


图3 柳叶提取物对小肠刷状缘小囊吸收脂肪酸的影响

利用放射自显影方法研究了化合物 I、II、III 对花生四烯酸代谢途径的影响, 结果如图 1:

实验结果表明: 芹菜素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷 (化合物 I)、木樨草- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷 (化合物 II)、间- 羟基- 苄基- 吡喃葡萄糖苷 (化合物 III) 对花生四烯酸代谢产物-12- HETE 的生成量均有抑制作用, 且抑制作用的强度随样品浓度的增大而增强。将化合物 I 经水解后, 其苷元- 芹菜素对 TXB<sub>2</sub> 的生成量也有较强的抑制性, 作用强度随浓度增大而增强。

**2.2 化合物 I、II、III 对大鼠脂肪细胞中脂类分解的影响**

自旱柳叶中分离出的 3 个化合物 (I、II、III) 测试, 发现它们均可在不同程度上对大鼠脂肪细胞中去甲肾上腺素诱导的脂类分解产生促进作用 (见图 2), 其中化合物 3 作用最强。

小肠刷状缘小囊对脂肪酸的吸收随着提取物浓度的增加而减少, 浓度为 0.25mg/ml 时, 与对照比较吸收活性为 84%, 0.50mg/ml 时吸收活性为零, 具有很强的抑制脂肪酸吸收的活性 (图 3)。

**2.4 柳活性组分对小鼠体重和子宫周围脂肪组织重量的影响**

给小鼠饲喂高脂肪食物, 小鼠体重、子宫旁脂肪组织重量明显增加, 形成肥胖和脂肪肝。喂高脂肪食+ 5% 柳活性组分可明显抑制由高脂肪食造成的小鼠体重增加和子宫旁脂肪组织重量的增加。如图 4、图 5。

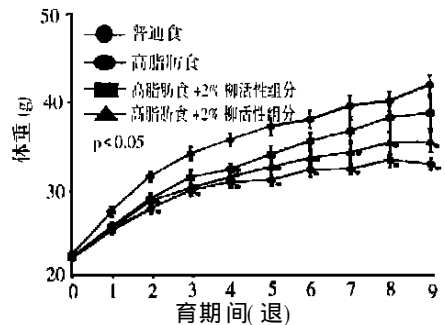


图4 柳活性组分对高脂肪食小鼠体重的影响

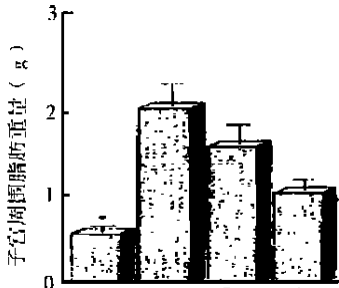


图5 柳活性组分对高脂肪食小鼠组脂肪组织重量的影响

1. 普通食 2. 高脂肪食 3. 脂肪食+ 2% 柳活性组分  
4. 高脂肪食+ 5% 柳活性组分

表1 柳活性组分对高脂肪食小鼠肝脏重量、肝脏中性脂肪和胆固醇的影响

项目	肝脏组织重量 (g/100g 体重)	肝脏中性脂肪含量 (mg/g liver)	肝脏中胆固醇含量 (mg/g liver)
普通食组	48 ± 0.15*	17.5 ± 0.99*	2.9 ± 0.10*
高脂肪食组	6.0 ± 0.25	152.2 ± 8.16	5.6 ± 0.14
高脂肪+ 2%	5.9 ± 0.26	132.5 ± 12.93	4.1 ± 0.14*
柳活性组分组			
高脂肪+ 5%	5.7 ± 0.21	128.0 ± 12.63	3.9 ± 0.15*
柳活性组分组			

\* 与高脂肪食组比较 P < 0.01

稳定的TXB<sub>2</sub>, 因此抑制TXB<sub>2</sub>的过量生成就可以抑制血栓的形成, 抑制12- HETE 过量生成则可预防动脉硬化和过敏性疾病。早柳叶中分离得到的芹菜素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷、木樨草素- 7- O- β- D- 吡喃葡萄糖醛酸苷、间- 羟基- 苄基- 吡喃葡萄糖苷对花生四烯酸代谢产物- 12- HETE 的生成量均有抑制作用, 说明它们可能是柳叶中防治动脉硬化及过敏性疾病的主要有效成分, 但还需动物体内实验加以进一步证实。芹菜素可抑制TXB<sub>2</sub>的生成, 但对12- HETE 却没有抑制作用。这是芹菜素对于环氧化酶和脂氧化酶具有选择性抑制作用的结果。据报道<sup>[9]</sup>黄酮类化合物具有扩张冠状动脉、抑制血小板由于二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)、胶原等引起的血小板聚集。

3.2 目前人类已经越来越意识到肥胖是一种不健康的病态, 且会导致许多其他严重疾病, 预防及治疗肥胖已成为肥胖症患者和普通人的迫切需要。高脂肪食明显引起小鼠体重和子宫周围脂肪组织重量增加, 但同时饲料中加入柳活性组分则可抑制体重和脂肪组织重量的增加, 并且抑制中性脂肪和胆固醇的增加, 推测可能是胰脂肪酶受到抑制或者脂肪酸的吸收受到抑制。本文研究认为小肠上皮细胞吸收脂肪酸的作用受到了抑制, 也就是说柳活性组分抑制脂肪吸收的机制不是抑制胰脂肪酶活性, 而是抑制脂肪酸的吸收。

### 2.5 柳活性组分对小鼠用脏中胆固醇的影响

与高脂肪食小鼠比较, 添加柳活性组分肝脏中胆固醇含量明显下降, 中性脂肪也呈下降趋势, 但对肝组织重量影响不大。如表1。

### 3 讨论

3.1 近年来, 动脉硬化、血栓症等成人疾病迅速增速, 已成为很大的社会问题。在这些疾病的发生及发展的过程中血小板起着重要的作用。血小板中环氧化酶和脂氧化酶作用于花生四烯酸代谢系统, 可产生形成血栓的血栓烷A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) 及引起动脉硬化、过敏性疾病的12- 羟基- 二十碳四烯酸(12- HETE)<sup>[5,6]</sup>。TXA<sub>2</sub> 不稳定, 迅速生成

3.3 我国柳属植物大约有210多种, 全国分布广泛, 资源非常丰富。如能加以充分利用, 将会为防治血栓、动脉硬化、过敏性疾病以及肥胖症等疾病提供新的途径。

### 参考文献:

[1] 李时珍. 本草纲目(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 2031.  
 [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 1522.  
 [3] 王伟. 柳叶降压袋泡茶[J]. 中药材. 1990, 13(11): 45  
 [4] 郑毅男, 关谷敬三, 崔树玉, 等. 抗血栓、抗动脉硬化中草药的筛选[J]. 吉林农业大学学报, 1997, 19(1): 55  
 [5] 平井爱山. 和汉生药の抗血栓・抗动脉硬化作用とその机序の解明[J]. 和汉医药学杂志, 1994, 11(1): 16  
 [6] SEKIYA K, OKUDA H. Selective inhibition of platelet lipoygenase by baicalin[J]. Biochemical and biochemical research communications. 1982, 105(3): 1090  
 [7] RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells[J], J. Biol. Chem., 1964, 239: 375  
 [8] KESSLER M, ACTO O. A Modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vecicle from small intestinal brush border membranes[J]. Biochem Biophys Act, 1978, 506: 136.  
 [9] 王宪楷. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 276.

收稿日期: 2000- 08- 28