

# 青天葵甲醇提取物的体外抗氧化活性

周燕园<sup>1</sup>, 刘清华<sup>2</sup>, 严火连<sup>2</sup>, 常慧敏<sup>1</sup>, 陈思蓉<sup>1</sup>, 宋家乐<sup>2,3,4</sup>

(1. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541100) (2. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541100) (3. 广西高校预防医学重点实验室, 广西桂林 541100) (4. CHA 医科大学食品生命工学系及生物技术研究, 韩国抱川 11160)

**摘要:** 探讨了青天葵甲醇提取物的体外抗氧化活性。对二苯代苦味酰基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和羟自由基(hydroxyl radicals, OH)清除实验评价青天葵提取物体外抗氧化能力。过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 μmol/L)诱发 Caco-2 细胞建立损伤模型评估青天葵提取物的细胞保护效果, MTT 法检测细胞生存率。比色法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活力。硫代巴比妥酸法(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)和 2',7'-二氯二氧荧光黄双乙酸钠(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA)探针分别测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。酶联法(EPnzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定细胞白介素(Interlukin, IL)-8 和 IL-10 水平。青天葵提取物中含总黄酮(4.72±0.13 mg Rutin/g)和总多酚(4.25±0.46 mg GAE/g), 有较好的体外抗氧化能力。青天葵提取物能明显提升细胞生存率及内源性抗氧化物酶活性。降低受损细胞内总 ROS, MDA 及 IL-8 水平, 提高抗炎细胞因子 IL-10 的分泌量。结果提示, 青天葵提取物能显著改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱发的 Caco-2 细胞所氧化应激损伤。

**关键词:** 青天葵甲醇提取物; 自由基清除效果; 肠上皮细胞; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2018)09-122-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.018

## *In Vitro* Antioxidant Activities of *Nervilia Fordii* Methanol Extracts

ZHOU Yan-yuan<sup>1</sup>, LIU Qing-hua<sup>2</sup>, YAN Huo-lian<sup>2</sup>, CHANG Hui-min<sup>1</sup>, CHEN Si-rong<sup>1</sup>, SONG Jia-le<sup>2,3,4</sup>

(1.School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)

(2.School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)(3.Guangxi Colleges and University Key Laboratory of Preventive Medicine, Guilin, 541100, China)(4.Department of Food Science and Biotechnology, and Institute of Biotechnology, CHA Medical University, Pocheon 11160, Korea)

**Abstract:** The *in vitro* antioxidant activities of *Nervilia fordii* methanol extracts (NFME) were investigated. Total polyphenols and flavonoids in NFME were determined by ultraviolet spectrophotometry. The antioxidant capability of NFME was evaluated according to the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals (OH) scavenging assay, respectively. Protective effect of NFME was investigated using a model of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 μmol/L) induced oxidative stress in intestinal epithelial Caco-2 cells. Cell viability was determined by MTT assay. The cellular levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined by commercial assay kits according the manuscripts. The cellular levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) were determined by thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, respectively. The levels of interleukin-8 (IL-8) and IL-10 were determined used an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The NFME were enriched in total flavonoids (4.72 ± 0.13 mg Rutin/g) and poly phenols (4.25 ± 0.46 mg GAE/g). NFME also exhibited a great DPPH and OH radical scavenging activity. NFME was able to increase the cell viability, and significantly increased the activity of SOD, CAT and GSH-Px in oxidative damaged Caco-2 cells. In addition, NFME treatment was also effectively decreased the generation of ROS, MDA and IL-8 secretion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated Caco-2 cells. In contrast, NFME increased the IL-10 secretion in damaged Caco-2 cells. These results suggested that the NFME exhibits a great *in vitro* antioxidant activity and can effectively attenuate the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Caco-2 cells.

收稿日期: 2018-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81860767); 广西自然科学基金资助 (2016GXNSFBA380172); 广西高校中青年教师基础能力提升项目 (KY2016YB321); 2018 年广西教育厅广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助 (桂教人[2018]18 号); 广西壮族自治区级大学生创新创业训练计划立项项目 (201610601084; 201710601105; 201810601109)

作者简介: 周燕园 (1978-), 女, 副教授, 研究方向: 药品与食品的质量与成分分析, 药理活性研究

通讯作者: 宋家乐 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子营养学和功能性食品学

**Key words:** *Nervilia fordii* methanol extracts; radical scavenging activity; intestinal epithelial cells; oxidative stress

青天葵, 又名独叶莲、独脚莲、青莲是兰科植物毛唇芋兰 (*Nervilia fordii* (Hance) Schltr) 的全草, 主要分布于我国广西、广东、四川和云南等地<sup>[1]</sup>。青天葵也是一种具有较高药用及食用价值的广西特产药材, 具有抗病毒、抗肿瘤、镇痛和抑菌等功效, 也常用于支气管炎和肺炎等的临床治疗<sup>[2,3]</sup>。药理研究表明, 青天葵中主要药效物质为黄酮、多酚及三萜和甾体类化合物, 具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎和清除自由基等作用<sup>[4-8]</sup>, 在医药、食品领域有广阔的应用前景。目前, 青天葵对肠道上皮细胞氧化应激损伤的保护作用研究还未见报道。因此, 本实验以笔者前期研究的最佳工艺条件对青天葵进行提取, 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理诱发 Caco-2 人结肠癌上皮细胞氧化损伤模型上, 研究青天葵甲醇提取物对细胞氧化损伤的保护并探讨可能的机制。

肠道不仅是人体中重要的消化器官, 其同时也在维持人体正常的生命活动和抵御疾病过程中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。肠道屏障是人体常见的物理性防御结构之一, 其可以防止肠腔内的有害细菌及细菌毒素通过侵入肠道黏膜组织进入血液系统, 阻止其对其他脏器的侵犯<sup>[10]</sup>。作为肠道屏障基本构成单位的小肠上皮细胞在遭受于外部氧化应激刺激后会发生细胞内的氧化应激损伤, 最终导致细胞死亡。此外, 氧化应激损伤也是引起肠道屏障功能丧失以及相关肠道疾病的重要致病原因之一<sup>[11]</sup>。作为一株在结构和功能方面类似于人正常小肠上皮细胞的细胞株, Caco-2 人结肠癌上皮细胞具有与正常小肠细胞类似的紧密连接和微绒毛等结构以及其他相关酶系<sup>[12]</sup>。因此, Caco-2 细胞被公认为是用于研究肠上皮损伤修复机制的经典细胞模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

青天葵购买于广西壮族自治区玉林市药材市场, 经广西中医药大学药学院廖月葵高级实验师鉴定为广西产青天葵 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 全草, 阴干备用; 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA)、青霉素-链霉素双抗液、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)和硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)购自美国 Sigma 公司; DMEM 细胞培养液、胎牛血清(FBS)

购自美国 Invitrogen 公司; 抗氧化物酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 细胞总蛋白定量试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; 芦丁(Rutin, 批号: BZP0103)、没食子酸(Gallic acid, 批号: BZP0110)均购于中国药品生物制品检定所。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

765S 型紫外分光光度计: 上海精科实业有限公司; SHZ-亚型循环水真空泵: 上海亚荣生化仪器厂; EYELA N-1001S 旋转蒸发器: 日本东京理化器械株式会社; TDL-80-2B 低速台式离心: 上海安宁科学仪器厂; 三洋 MCO-15AC 二氧化碳细胞培养箱: 日本三洋公司; Centrifuge 5418R 冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司; ELx808 酶标仪: 美国 Bio-Tek 公司; FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪: 德国 BMG 公司; KQ5200DE 型台式数控超声波清洗器: 东莞市科桥超声波设备有限公司。

### 1.3 青天葵甲醇提取物的制备

选阴干的青天葵样品, 除杂粉碎后过 60 目筛备用。室温下, 取 10 g 青天葵粉加入 75% 甲醇(200 mL)超声提取 60 min<sup>[9]</sup>。滤液经 3000 r/min 离心 15 min 后弃渣收集上清, 50 °C 真空减压旋转蒸发后, 制备成青天葵甲醇提取物(收率为 12.24%), -20 °C 储存待用。

### 1.4 青天葵甲醇提取物中总多酚、总黄酮含量的测定

青天葵甲醇提取物中总多酚含量按 Folin-Ciocalteus 法测定。0.1 mL 样品中加入 10% 的碳酸钠溶液(2 mL)反应 5 min 后, 再加入福林酚试剂(0.1 mL)置避光处反应 30 min。测定反应液在 765 nm 处的吸光度值。总酚含量以 GAE 为标准, 通过标准曲线计算并以 mg GAE/g 为单位。总黄酮含量测定采用三氯化铝比色法。取 0.5 mL 样品与 2 mL 蒸馏水混合, 加入 10% 氯化铝溶液(0.15 mL)后测定 420 nm 处吸光度值。总黄酮含量以 Rutin 为标准计算并表示为 mg Rutin/g。

### 1.5 青天葵甲醇提取物 DPPH 和羟基(OH)自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除率测定:将不同浓度的青天葵甲醇提取物样品液(0.24 mg/mL~0.72 mg/mL)与 DPPH 标准液(150  $\mu$ mol/L)各 100  $\mu$ L 混匀后,室温下避光反应 30 min 后。在 517 nm 波长处用酶标仪测定吸光度。按照公式:  $[1-(OD_{\text{样品}}-OD_{\text{样品空白}})/OD_{\text{空白}}] \times 100\%$  计算清除率(%)。

羟基自由基清除率测定:取 200  $\mu$ L 不同浓度的青天葵甲醇提取物样品液(浓度同 DPPH 清除实验中所述)放入玻璃试管中,随后加入 6 mmol/L 脱氧核糖, 3 mmol/L 过氧化氢, 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4), 400  $\mu$ mol/L 的氯化铁溶液, 400  $\mu$ mol/L 的 EDTA-2Na 溶液和 400  $\mu$ mol/L 的抗坏血酸溶液各 200  $\mu$ L。在 37  $^{\circ}$ C 条件下恒温水浴 1 h 后,加入 1 mL 混合反应液(含 1% TBA 溶液和 2.8% TCA 溶液)并在 90  $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min。使用 765S 紫外分光光度计测定 532 nm 处吸光度值。按照公式:  $[1-(OD_{\text{样品}}-OD_{\text{样品空白}})/OD_{\text{空白}}] \times 100\%$  计算清除率(%)。

## 1.6 青天葵甲醇提取物对氧化损伤细胞的保护效果研究

### 1.6.1 细胞培养及分组

人结肠癌细胞株 Caco-2 系由桂林医学院生物技术学院邹先琼研究员馈赠。细胞用含 10% FBS 与 1% 青-链霉素双抗液的 DMEM 细胞培养液置于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  环境下湿化培养, 2~3d 换液一次。细胞分别接种于 96 孔( $1 \times 10^4$  个/孔)和 6 孔( $2 \times 10^5$  个/孔)细胞培养板后,以 DMEM 培养液(含 250  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ )继续培养 4 h 制备氧化损伤细胞模型。氧化损伤模型细胞以不同质量浓度的青天葵甲醇提取物(10、50、100、200  $\mu$ g/mL)继续培养 24 h 并进行后续实验。正常组为未经过任何处理的正常 Caco-2 细胞。

### 1.6.2 MTT 法测定细胞存活率

Caco-2 细胞先按前述分组处理并进行 24 h 连续培养后,弃去孔内培养基并加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液(100  $\mu$ L)继续培养 4 h。培养结束后弃上清液,每孔加入 DMSO(100  $\mu$ L)避光振荡 30 min,测定  $OD_{490\text{nm}}$  后按公式:  $\text{细胞存活率}(\%) = OD_{\text{样品}}/OD_{\text{正常组}} \times 100$  来计算细胞存活率。

### 1.6.3 细胞内 MDA 生成量的测定

所有细胞依前述分组处理后用冷 PBS 冲洗 3 次,细胞刮刀收集细胞后,加入预冷的细胞裂解液进行细

胞裂解。细胞裂解液(500  $\mu$ L)与 400  $\mu$ L 的 TBARS 反应液(含 15% 的 TCA 与 0.67% TBA 混合液)充分混匀后在 95  $^{\circ}$ C 水浴中保温 20 min。冷却后,加入 3 mL 的异丙醇提取色素并测定  $OD_{532\text{nm}}$ ,蛋白质试剂盒定量细胞总蛋白量。按照公式  $\text{MDA 生成量}(\mu\text{mol}/\text{mg protein}) = [\text{MDA 含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) \times 1.5 \text{ mL}] / \text{总蛋白质含量}(\text{mg})$  计算 MDA 生成量。

### 1.6.4 细胞内 ROS 水平的测定

细胞依前述分组处理后,弃去培养液并加入含 DCFH-DA(20  $\mu$ mol/L)的 DMEM 培养液于 37  $^{\circ}$ C 条件下孵育 20 min, PBS 冲洗细胞 2 次后收集细胞。在激发波长为 485 nm,发射波长为 530 nm 的条件下用 FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪测定荧光强度,按照公式:  $\text{相对 ROS 水平}(\%) = \text{荧光强度}_{\text{样品处理组}} / \text{荧光强度}_{\text{正常组}} \times 100$  进行计算。

### 1.6.5 细胞内抗氧化物酶(SOD、CAT 和 GSH-Px)活力的测定

取适量经过处理的细胞裂解液按照 SOD、CAT 和 GSH-Px 测定试剂盒说明书步骤操作。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞总蛋白。细胞内抗氧化物酶活力用细胞内总蛋白量校正并以酶比活力单位(U/mg pro)表示。

### 1.6.6 细胞中 IL-1 $\beta$ 与 IL-8 炎性细胞因子分泌水平的测定

细胞接种到培养板并依前述方法处理后,4  $^{\circ}$ C 下收集细胞培养上清液。取适量培养上清液按照 IL-1 $\beta$  与 IL-8 测定试剂盒说明书步骤操作并用细胞总蛋白质含量作校正。

## 1.7 数据处理与统计分析

本研究中,所有实验均重复 3 次,结果以均值(means)  $\pm$  标准偏差(SD)表示。所得实验数据运用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析与统计处理,  $p < 0.05$  为具有统计差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 青天葵甲醇提取物的总多酚和总黄酮含量

如表 1 所示,青天葵甲醇提取物含有一定量的总黄酮( $4.72 \pm 0.13$  mg/g)和总多酚( $4.25 \pm 0.46$  mg/g)。其总黄酮和总多酚含量均高于许海棠等的研究结果<sup>[11]</sup>。

表 1 青天葵甲醇提取物中总多酚和总黄酮含量

Table 1 Total polyphenols and total flavonoids in *Nervilia fordii* methanol extracts

	标准曲线	R 值	含量
总黄酮/(mg Rutin/g)	Y=72.576X-0.0053	0.999	4.72 ±0.13
总多酚/(mg GAE/g)	Y=99.087X+0.0297	0.999	4.25 ±0.46

## 2.2 青天葵甲醇提取物对体外自由基清除能力

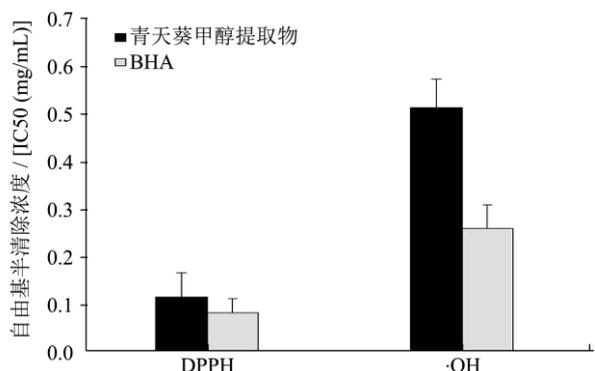


图 1 青天葵甲醇提取物对 DPPH 和 ·OH 自由基的半清除剂量 IC<sub>50</sub>  
Fig.1 Semi-clearing doses of DPPH and ·OH radicals from the methanol extract of *Nervilia fordii*

如图 1 示, 青天葵甲醇提取物具有一定的体外清除自由基能力。其中, 青天葵甲醇提取物对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub>(0.117±0.05 mg/mL) 弱于标准抗氧化剂 BHA(0.084±0.03 mg/mL)。而对 OH 自由基的 IC<sub>50</sub>(0.513±0.06 mg/mL) 也较 BHA(0.260±0.05 mg/mL) 弱。

表 2 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 细胞生存率和细胞 LDH 释放水平的影响

Table 2 Effects of methanol extracts of *Nervilia fordii* on the survival rate and release of LDH from cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

组别	青天葵甲醇提取物浓度/(μg/mL)	细胞生存率/%	LDH 释放水平/(U/mg protein)
正常组		100.00±0.00	10.78±0.37
青天葵甲醇 提取物处理组	0	46.39±3.26*	46.37±1.87*
	10	50.94±3.39*#	40.44±2.48*#
	50	65.87±1.29*#	37.68±3.15*#
	100	72.94±1.42*#	30.57±2.69*#
	200	80.49±2.34*#	26.48±3.01*#

注: 与正常组相比较, \*表示  $p<0.05$ ; 与未经青天葵甲醇提取物处理组比较, #表示  $p<0.05$ 。

## 2.4 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 细胞内 ROS 水平和 MDA 含量的影响

如表 3 示, 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(250 μmol/L) 处理 4 h 后能显著造成正常 Caco-2 细胞内 ROS 水平的升高( $p<0.05$ )。经不同浓度青天葵甲醇提取物(10、50、100 和 200 μg/mL) 处理后, 细胞内 ROS 水平明显下降。经最高浓度 200

## 2.3 青天葵甲醇提取物的对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 细胞生存率和细胞 LDH 释放水平的影响

不同浓度的青天葵甲醇提取物(10 μg/mL~200 μg/mL)与 Caco-2 细胞共同培养 24 h 后, 处理组细胞的生存率均≥95%(结果未显示)。

结果提示, 青天葵甲醇提取物对正常培养状态下的 Caco-2 细胞不造成明显的生长抑制或细胞毒性作用。因此, 10 μg/mL~200 μg/mL 浓度范围内的青天葵甲醇提取物可以用于后续实验。Caco-2 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(250 μmol/L) 直接处理 4 h 后, 其细胞生存率显著下降( $p<0.05$ )。而受损细胞经 10 μg/mL~200 μg/mL 浓度的青天葵甲醇提取物处理 24 h 后, 细胞生存率较未经青天葵提取物处理过的模型组细胞显著提高(表 2), 并呈现出显著的剂量效应关系( $p<0.05$ )。同时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理也显著造成 Caco-2 细胞内的 LDH 大量释放到细胞培养液中。模型组细胞培养液中的 LDH 水平与正常组细胞相比显著升高, 且存在统计学差异( $p<0.05$ )。而青天葵甲醇提取物处理能抑制受损 Caco-2 细胞的 LDH 溢出, 且溢出抑制效果存在显著的剂量效应关系( $p<0.05$ )。

μg/mL 的青天葵提取物处理后, 受损 Caco-2 细胞内 ROS 水平为最低。

250 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的处理同时也能造成 Caco-2 细胞内 MDA 含量显著升高( $p<0.05$ )。青天葵甲醇提取物(10、50、100 和 200 μg/mL) 处理能明显抑制受损细胞内氧化损伤标记物 MDA 的生成( $p<0.05$ )。上述结果提示, 青天葵甲醇提取物可以有效抑制氧化损伤细胞内脂质过氧化产物的生成。

表 3 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 细胞内 ROS 水平和 MDA 含量的影响

Table 3 Effects of methanol extracts of *Nervilia fordii* on ROS and MDA contents in Caco-2 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

组别	青天葵甲醇提取物浓度/(μg/mL)	ROS 水平/%	MDA 含量/(μmol/mg protein)
正常组		100.00 ± 0.00	0.47 ± 0.13
青天葵甲醇 提取物处理组	0	324.89 ± 33.59*	1.67 ± 0.09*
	10	300.81 ± 19.42*	1.16 ± 0.12*#
	50	287.64 ± 26.45*#	0.94 ± 0.11*#
	100	251.23 ± 31.25*#	0.78 ± 0.06*#
	200	211.67 ± 19.58*#	0.67 ± 0.10*#

注: 与正常组相比较, \*表示  $p < 0.05$ ; 与未经青天葵甲醇提取物处理组比较, #表示  $p < 0.05$ 。

表 4 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 氧化损伤细胞内 CAT、SOD 和 GSH-px 酶活力的影响

Table 4 Effects of methanol extracts of *Nervilia fordii* on CAT, SOD, and GSH-px activities in Caco-2 induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

组别	青天葵甲醇提取物浓度/(μg/mL)	CAT 活力/(U/mg pro)	SOD 活力/(U/mg pro)	GSH-Px 活力/(U/mg pro)
正常组		2.24 ± 0.22	25.64 ± 1.68	12.35 ± 0.23
青天葵甲 醇提取物 处理组	0	0.94 ± 0.14*	7.45 ± 0.61*	3.29 ± 0.49*
	10	1.24 ± 0.17*	9.97 ± 0.38*#	5.67 ± 0.76*#
	50	1.58 ± 0.33*	13.48 ± 0.64*#	6.44 ± 0.87*#
	100	1.71 ± 0.28*#	16.87 ± 0.43*#	8.06 ± 0.45*#
	200	1.94 ± 0.34*#	18.49 ± 0.33*#	9.23 ± 0.93*#

注: 与正常组相比较, \*表示  $p < 0.05$ ; 与未经青天葵甲醇提取物处理组比较, #表示  $p < 0.05$ 。

## 2.5 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 氧化损伤细胞内 CAT、SOD 和 GSH-Px 酶活力的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后引发的氧化损伤细胞中 SOD, CAT 和 GSH-Px 等内源性抗氧化物的酶活性较正常组显著降低(表 4)。而经不同浓度青天葵甲醇提取物(10、50、100 和 200 μg/mL)处理 24 h 后, 受损 Caco-2 细胞总 SOD, CAT 和 GSH-Px 等酶活性逐渐增高, 且与未经青天葵甲醇提取物处理过的损伤模型组相比具有显著性差异( $p < 0.05$ )。

## 2.6 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 Caco-2 氧化损伤细胞内 IL-8 和 IL-10 分泌水平的影响

依图 2 示, 经浓度为 250 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 4 h 后能明显造成 Caco-2 细胞中炎症细胞因子 IL-8 分泌量的增加( $p < 0.05$ )。经 ELSIA 法检测不同浓度青天葵甲醇提取物(10、50、100 和 200 μg/mL)处理后的 Caco-2 细胞发现, 受损细胞中炎症因子 IL-8 而分泌被显著抑制( $p < 0.05$ )。检测受损细胞中抗炎细胞因子 IL-10 的分泌量时发现, 青天葵甲醇提取物处理能够提高受损 Caco-2 细胞中 IL-10 的分泌量。以上结果提示, 青天

葵甲醇提取物具有一定的抗炎效果。

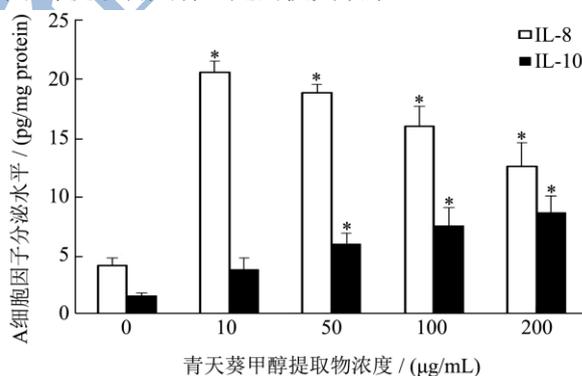


图 2 青天葵甲醇提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 Caco-2 细胞内 IL-8 和 IL-10 分泌水平的影响

Fig.2 Effect of methanol extracts of *Nervilia fordii* on secretion of IL-8 and IL-10 in Caco-2 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

注: \*: 与未经青天葵甲醇提取物处理组比较  $p < 0.05$ 。

## 3 结论

3.1 外源性刺激及感染等所造成的肠道细胞或组织中发生氧化应激反应是导致结肠溃疡、结肠癌等慢性肠道疾病产生的重要病理机制之一<sup>[12]</sup>。过度的氧化应激会造成肠道上皮细胞结构改变, 导致细胞内所含脂质、代谢酶类、功能蛋白等物质的变性失活从而引发细胞的氧化应激损伤<sup>[13]</sup>。在正常生理状态下, 有机生命体由于进行有氧呼吸和相关物质代谢会产生一定量的活性氧与自由基。而细胞内源性的抗氧化物系统,

如 SOD、CAT 和 GSH-Px 等抗氧化酶及非酶性的谷胱甘肽均参与对活性氧和自由基的清除过程以保持体内的氧化-还原平衡稳态。但在某些病理状态条件下, 多余不能被清除的活性氧和自由基会成为引发氧化应激损伤的始动者。

3.2 当细胞遭受强应激后发生细胞损伤时, LDH 会因细胞膜破裂而被释放到细胞外部。因此, LDH 被认为是一种衡量细胞发生应激损伤的指标物<sup>[14]</sup>。在本研究中, 受损的 Caco-2 细胞在经青天葵甲醇提取物处理后, 其细胞生存率明显得到提升。同时, 细胞内部的 LDH 酶漏出水平也得到抑制。该结果提示, 青天葵甲醇提取物能很好地抑制氧化应激对细胞所造成的伤害。另一方面, 细胞内的 ROS 水平以及脂质过氧化产物 MDA 同样也是衡量细胞氧化应激损伤程度的重要指标。细胞内部过度蓄积的 ROS 会直接导致 DNA 断裂, 并造成对正常的细胞周期不同程度的影响。同时, 细胞内 ROS 水平超过正常范围时也能直接诱导细胞凋亡, 甚至直接造成细胞死亡<sup>[15]</sup>。经不同浓度的青天葵甲醇提取物处理之后, 受损 Caco-2 细胞中 ROS 水平及反映细胞发生脂质过氧化程度的指标物 MDA 水平均呈现显著下降趋势。这些结果同时提示, 青天葵甲醇提取物可对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱发 Caco-2 细胞氧化应激损伤有一定的抑制作用。

3.3 青天葵甲醇提取物还能显著提高受损 Caco-2 细胞中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性。这些属于内源性抗氧化酶的 SOD、CAT 和 GSH-Px 在机体对抗氧化应激损伤的过程中发挥着相当重要的作用<sup>[16]</sup>。SOD 通过直接清除细胞内的活性氧自由基, 阻断其攻击细胞膜上多价不饱和脂肪酸后所造成的脂质过氧化反应, 并有助于抑制具有细胞毒作用的 MDA 和 4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal, HNE)的生成<sup>[17]</sup>。而 GSH-Px 则通过催化谷胱甘肽(GSH)转变为氧化型谷胱甘肽, 将有氧的过氧化物还原成羟基化合物, 并进一步与 CAT 作用将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为水<sup>[18]</sup>。这些结果提示青天葵甲醇提取物具有增强机体内源抗氧化系统活性, 有助于维持细胞膜结构完整, 减轻体内氧化应激反应来保证细胞正常生理功能免受氧化应激的干扰。

3.4 此外, 青天葵甲醇提取物对氧化损伤 Caco-2 细胞中的炎性和抗炎性细胞因子的分泌具有一定的调控作用。能抑制受损 Caco-2 细胞中炎症细胞因子 IL-8 的过度分泌, 并提高抗炎性因子 IL-10 的分泌量。抑制 IL-8 的分泌, 对于与炎症反应相关联的肠道疾病有一定的缓解和控制作用<sup>[19]</sup>。属于 Th2 型细胞因子的 IL-10 与其配体 IL-10R 相结合参与调节 T 细胞, B 细胞和天然杀伤细胞等免疫细胞的分化与增值, 从而调

控免疫反应以及抗感染等生理活动<sup>[21]</sup>。IL-10 可以抑制所有的促炎性因子的合成和释放, 因此其在缓解肠道免疫疾病方面具有极其重要的作用<sup>[20-22]</sup>。

3.5 本研究以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为体外氧化应激损伤诱导剂建立人小肠上皮 Caco-2 细胞氧化损伤模型来研究青天葵甲醇提取物对细胞氧化应激损伤的保护作用。研究结果提示, 青天葵甲醇提取物能够通过提升受损细胞内源性抗氧化物(SOD、CAT 和 GSH-Px)等酶的活力来抑制氧化应激损伤所引发的细胞 ROS 水平的升高, 同时抑制细胞膜脂质过氧化物产物 MDA 的生成。此外, 青天葵甲醇提取物还能调控炎症细胞因子 IL-8 与抗炎性因子 IL-10 的分泌平衡来缓解氧化应激所引进的肠道上皮细胞的炎症反应。而青天葵提取物的体外抗氧化能力及对氧化受损细胞的保护作用可能源于其所含有的多酚和黄酮类物质。因此, 后续研究应集中从分子层面来探究青天葵提取物中的黄酮、多酚组分对氧化损伤应激过程中特定信号通路的调控机制。

## 参考文献

- [1] 邓家刚, 韦松基. 广西道地药材[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007  
DENG Jia-gang, WEI Song-ji. Genuine and well-reputed medicinal materials in Guangxi [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007
- [2] 邓家刚, 侯小涛. 桂药化学成分全录[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2012  
DENG Jia-gang, HOU Xiao-tao. The chemical composition of Guangxi materia medica [M]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University Press, 2012
- [3] 蔡乐. 青天葵药材生化成分及药理活性研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 8: 244-246  
CAI Le. Research progress of *Nervilla Fordii* medicines and biochemical constituents and pharmacological activity [J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2014, 8: 244-246
- [4] 王丽, 甄丹丹, 甄汉深, 等. 青天葵的研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(18): 31-33  
WANG Li, ZHEN Dan-dan, ZHEN Han-shen, et al. Research survey of *Nervilia Fordii* [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacology, 2016, 25(18): 31-33
- [5] 周燕园, 甄汉深, 袁叶飞, 等. 青天葵中两种黄酮提取工艺的正交实验优选[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1862-1863  
ZHOU Yan-yuan, ZHEN Han-shen, YUAN Ye-fei, et al. Optimization of extraction process of two flavone compounds from *Nervilia fordii*(Hance) Schltr. by orthogonal design [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medical

- Research, 2009, 20(8): 1862-1863
- [6] 甄汉深,丘琴,莫绥恒,等.青天葵石油醚部位化学成分研究[J].中药材,2010,33(5):1262-1265
- [7] ZHEN Han-shen, QIU Qin, MO Huan-heng, et al. Studies on the chemical constituents of the petroleum ether portion of *Nervilia fordii* [J]. Traditional Chinese medicine,2010,33(5): 1262-1265
- [8] 许海棠,马少妹,张金彦.青天葵4种提取物抗氧化活性与其总黄酮和总酚含量的相关性[J].中成药,2017,1:121-125  
XU Hai-tang, MA Shao-mei, ZHANG Jin-yan. Correlations between antioxidant activities and contents of total flavonoids and total phenols of four extracts from *Nervilia fordii* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017, 1: 121-125
- [9] Li B, Zani A, Martin Z, et al. Intestinal epithelial cell injury is rescued by hydrogen sulfide [J]. J Pediatr Surg, 2016, 51(5): 775-778
- [10] 方檬丹,温成平.从肠道健康探讨中医“治未病”理论[J].天津中医药大学学报,2016,35(4):221-224  
FANG Meng-dan, WEN Cheng-ping. To explore the disease "prevention theory" from the intestinal health [J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2016, 35(4): 221-224
- [11] König J, Wells J, Cani P D, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2016, 7(10): e196
- [12] Liu M, Gao R, Meng Q, et al. Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats [J]. Plos One, 2014, 9(9): e106412
- [13] Chen S W, Zhu J, Zuo S, et al. Protective effect of hydrogen sulfide on TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers [J]. Inflamm Res., 2015, 64(10): 789-797
- [14] 彭新颜,黄磊,崔云,等.蓝点马鲛鱼皮抗氧化肽段对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 Caco-2 细胞氧化损伤的保护作用[J].水产学报,2017, 41(3):456-464  
PENG Xin-yan, HUANG Lei, CUI Yun, et al. Protective effects of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) skin peptides against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced oxidative stress in Caco-2 cells [J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(3): 456-464
- [15] 张捷,李发弟,李爱军,等.赭曲霉毒素 A 诱导 Caco-2 细胞的细胞毒性及 DNA 损伤[J].甘肃农业大学学报,2016, 51(1): 18-23  
ZHANG Jie, LI Fa-di, LI Ai-jun, et al. The cytotoxic effects and DNA damage induced by ochratoxin A on Caco-2 cells [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2016, 51(1): 18-23
- [16] König J, Wells J, Cani P D, et al. Human intestinal barrier function in health and disease [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2016, 7(10): e196
- [17] Magdalena K, Katarzyna P G, Alicja J, et al. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes [J]. J Muscle Res Cell Motil, 2016, 36(6): 1-17
- [18] Casimirri E, Stendardo M, Bonci M, et al. Biomarkers of oxidative-stress and inflammation in exhaled breath condensate from hospital cleaners [J]. Biomarkers, 2016, 21(2): 115-122
- [19] Zhao P, Zhou R U, Zhu X, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(3): 633-644
- [20] 朱锋,王晓兵,刘适,等.CXC 趋化因子受体 2 和白细胞介素-8 在炎症性肠病患者中的表达及其意义[J].胃肠病学, 2016,21(6):331-335  
ZHU Feng, WANG Xiao-bing, LIU Shi, et al. Expressions and significance of CXC chemokine receptor type 2 and interleukin-8 in patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2016, 21(6): 331-335
- [21] 沈凤,李德中.IL-10 基因多态性与溃疡性结肠炎易感性的关系及对临床预后的影响[J].中国免疫学杂志,2016,32(9): 1369-1373  
SHEN Feng, LI De-zhong. IL-10 gene polymorphism with ulcerative colitis susceptibility and its influence on clinical outcomes [J]. Chinese Journal of Immunology, 2016, 32(9): 1369-1373
- [22] Zhu L, Shi T, Zhong C, et al. IL-10 and IL-10 Receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology Research, 2017, 10(2): 65-69
- [23] Zou L, Wang L, Gong X, et al. The association between three promoter polymorphisms of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): A meta-analysis [J]. Autoimmunity, 2014, 47(1): 27-39