

山楂核各萃取组分对 H₂O₂ 诱导氧化损伤细胞保护作用的比较及活性组分筛选

彭颖, 胡洁品, 刘峰, 张敏, 彭崇胜, 李晓波

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: 评价山楂核乙醇提取物及其各萃取组分对两种氧化损伤细胞的保护作用并筛选活性组分, 为其开发利用提供数据支持。以 H₂O₂ 诱导永生化的角质形成 (HaCaT) 细胞和人胃黏膜上皮 (GES-1) 细胞为氧化损伤细胞模型, 比较山楂核乙醇提取物 (EE) 及其各萃取组分对氧化损伤细胞存活率的影响, 测定活性组分对氧化损伤细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平的影响, 并对活性组分大类别进行分析。结果显示, EE 及其乙酸乙酯萃取组分 (EAF) 和水萃取组分 (WF) 对 H₂O₂ 诱导氧化损伤细胞均具有一定保护作用。其中, 25 μg/mL EAF 可提高氧化损伤 HaCaT 细胞存活率 21.23%, 使细胞内 SOD 水平增加 9.09%; 25 μg/mL WF 可提高氧化损伤 HaCaT 和 GES-1 细胞存活率 16.20% 和 23.61%, 使细胞内 SOD 水平分别增加 16.62% 和 17.38%, GSH-Px 水平分别增加 1.22 倍和 2.50%。大类别分析表明, EAF 主要含有糖 (32.73%)、黄酮 (15.70%) 和木脂素 (8.09%) 等; WF 主要含有糖 (59.59%) 和黄酮 (1.14%) 等。各组分中, WF 对 H₂O₂ 诱导氧化损伤 HaCaT 和 GES-1 细胞均具有保护作用, 效果较好, 其主要成份为糖, 作用机制可能与调节细胞内抗氧化物酶水平有关, 具有较好开发应用价值。

关键词: 山楂核; 细胞; 氧化损伤

文章编号: 1673-9078(2021)05-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0982

Protection Effect of Hawthorn Kernel Ethanol Extract and Its Derived Fractions on H₂O₂ Induced Oxidative Damaged Cells and Active Fractions Screening

PENG Ying, HU Jie-pin, LIU Feng, ZHANG Min, PENG Chong-sheng, LI Xiao-bo

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: To investigate the protective effect of hawthorn kernel and screen its active fractions on oxidative damaged cells, providing supports for its applications, the oxidative damaged HaCaT cells and GES-1 cells were induced by H₂O₂. MTT assay and biochemical kit were used to detect cell viability and superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the oxidation-damaged cells. The chemical components analysis method was used to study the chemical components of the active fractions. The results showed that hawthorn kernel ethanol extract (EE) and its derived fractions got from ethyl acetate (EAF) and water (WF) had protective activity on oxidative damaged cells. 25 μg/mL of EAF significantly increased the survival rate of oxidation-damaged HaCaT cells 21.23%, the levels of SOD in cells were also increased 9.09%. 25 μg/mL of WF significantly improved HaCaT and GES-1 cells survival rate 16.20% and 23.61%, increased the levels of SOD 16.62% and 17.38%, increased the levels of GSH-Px in cells 1.22 and 2.50%, respectively. The chemical components of ethyl acetate

引文格式:

彭颖, 胡洁品, 刘峰, 等. 山楂核各萃取组分对 H₂O₂ 诱导氧化损伤细胞保护作用的比较及活性组分筛选[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 1-8, +51

PENG Ying, HU Jie-pin, LIU Feng, et al. Protection effect of hawthorn kernel ethanol extract and its derived fractions on H₂O₂ induced oxidative damaged cells and active fractions screening [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 1-8, +51

投稿日期: 2020-10-26

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1701903)

作者简介: 彭颖 (1979-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物活性

通讯作者: 李晓波 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药活性物质与质量标准

fraction were sugar (32.73%), flavonoids (15.70%), lignans (8.09%) etc. The water fraction contained sugar (59.59%) and flavonoids (1.14%) etc. It was suggested that WF can protect HaCaT and GES-1 cells from H_2O_2 induced oxidative damage, and its main component is sugar. The mechanism of WF may be related to the regulation of intracellular antioxidant enzyme levels, which has a good development and application values.

Key words: hawthorn kernel; cell; oxidative damage

山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bunge) 为蔷薇科山楂属植物, 俗称山马林果、野婆婆头、山里红。山楂的果实具有较高的营养及药用价值, 在食品、医药和工业上具有广泛的应用。山楂核为山楂加工过程中的副产品, 约占山楂果实总重的 1/3。山楂核药用历史悠久, 在《滇南本草》中记载其具有消食, 散结的功效, 归胃、肝经^[1]。以往山楂核大多在山楂果实加工过程中被丢弃, 造成资源的浪费, 而近年来山楂核的开发利用越来越受到食品医疗行业的青睐。山楂核干馏油含有大量的醛类、酚类物质^[2], 已被开发成红核洗液和舒痛精等抑菌镇痛相关产品。与干馏油相比, 山楂核醇提取物成分有较大的差异^[3], 具有抗炎^[4]、抗肿瘤^[5]和降血脂^[6]等生物活性。体外抗氧化实验发现, 山楂核醇提取物具有清除 DPPH·、ABTS⁺·、羟自由基、还原 Fe^{3+} 、抑制酪氨酸酶的生物活性^[7], 在抗氧化相关产品开发上具有较强的应用前景。我们前期研究亦证实, 除山楂核醇提取物外, 山楂核醇提取物的乙酸乙酯萃取和水萃取组分均具有一定体外清除自由基的活性, 并通过 UPLC-Q-TOF/MS 从山楂核醇提取物的乙酸乙酯萃取组分中鉴定出 10 个成分, 主要为木脂素和醛类成分^[8], 其中木脂素类化合物 Hawthornin G 和 7S, 8R-Ficusal 具有清除 ABTS 和 DPPH 自由基活性的报道^[4]。

生物机体的代谢会产生大量自由基, 在遭遇刺激或在病理状态下, 自由基产生和消除的动态平衡被打破后, 自由基会对蛋白质、核酸、糖类、脂质等生物大分子的结构和功能造成损伤。一些疾病的产生, 例如癌症、神经退行性疾病、糖尿病、白内障、炎症等都与自由基有关^[9]。表皮是皮肤的第一道屏障, 主要由棘层、颗粒层和位于表皮最外层的角质层组成, 表皮受到外界的一些刺激, 例如紫外线、氧化因子等会形成氧化应激, 参与皮肤老化、炎症性皮肤病、表皮肿瘤等一系列皮肤疾病^[10,11]。外源性 H_2O_2 可引起氧化应激, 增加细胞内活性氧的种类。HaCaT 细胞是永生化的角质形成细胞, 常用于构建表皮模型, 其氧化损伤后会产生大量 ROS, 引发细胞的衰老、凋亡, 而 SOD 和 GSH-Px 是机体内清除自由基的酶, 是维持机体氧化平衡的重要成分。此外, 氧自由基被认为在胃炎或胃癌的形成和发展中起着重要的作用^[12,13]。GES-1 细胞是人胃黏膜上皮细胞, 是胃黏膜遭受外界

刺激的第一道屏障, 常用于构建胃黏膜保护作用筛选模型。为进一步开发利用山楂核资源, 发掘山楂核抗氧化方面的新应用, 本研究通过建立 H_2O_2 诱导的 HaCaT 和 GES-1 细胞氧化损伤模型, 比较山楂核醇提取物及其不同萃取组分对 H_2O_2 诱导氧化损伤的 HaCaT 和 GES-1 细胞的保护活性, 以期能为山楂核抗过氧化皮肤衰老和胃黏膜保护等方面的开发提供科学依据, 为山楂核种子资源的开发和综合利用提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

人永生 HaCaT 细胞: 北京北纳创联生物科技有限公司; GES-1 细胞: 上海中乔新舟生物科技有限公司; 山楂核: 由山西振东制药有限公司提供。噻唑蓝 (Thiazoyl blue tetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、双氧水: 美国 sigma 公司; 胰酶、北美胎牛血清: 美国 Gibco 公司; DMEM 培养基、磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer saline, PBS)、双抗: 美国 Hyclone 公司; SOD 试剂盒、GSH-Px 试剂盒、BCA 试剂盒: 南京建成科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

BS-500A 电子分析天平: 赛多利斯科学仪器有限公司; LD2X-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器: 上海申安医疗器械厂; 3020-910 酶标仪: 美国赛默飞世尔公司; SB-5200 超声波细胞粉碎机: 宁波新芝生物科技股份有限公司; 5418 高速离心机: 德国 EPPENDORF 股份公司。

1.3 实验方法

1.3.1 山楂核醇提取物及其不同萃取组分制备

7 kg 山楂核粉碎过 1 号筛。按料液比 1:10 加入 95% 的乙醇回流提取, 80 °C 恒温回流提取 3 次, 每次 3 h, 过滤, 合并滤液, 减压干燥得山楂核醇提取物浸膏 (EE)。上述提取物浸膏与水混悬, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 得到山楂核醇提取物石油醚萃取组分 (PEF)、乙酸乙酯萃取组分 (EAF)、正丁醇

萃取组分 (BF) 和水萃取组分 (WF), 经减压干燥后保存于 4 °C。

1.3.2 氧化损伤细胞模型造模条件考察

取对数生长的 HaCaT 细胞, 配置成 1×10^5 个/mL 的细胞溶液, 每孔 100 μ L 接种到 96 孔板中。当细胞铺满 96 孔板的 80% 时, 换液, 继续培养 12 h。实验组加入 100 μ L 的 H_2O_2 溶液作用于 HaCaT 细胞, H_2O_2 终浓度为 0.20、0.18、0.14、0.12、0.10、0.08 mg/mL, 空白组加入 100 μ L 的培养基。培养 4 h 后, 采用 MTT 法检测细胞活力并计算细胞存活率^[14], 将存活率在 50% 左右的 H_2O_2 浓度作为 HaCaT 细胞造模浓度。取对数生长的 GES-1 细胞, 配置成 8×10^4 个/mL 的细胞溶液, 每孔 100 μ L 接种到 96 孔板中。当细胞铺满 96 孔板的 80% 时, 换液, 继续培养 24 h。实验组加入 100 μ L 的 H_2O_2 溶液作用于 GES-1 细胞, H_2O_2 终浓度为 0.20、0.18、0.16、0.14、0.10 mg/mL, 空白组加入 100 μ L 的培养基。培养 4 h 后, 采用 MTT 法检测细胞活力并计算细胞存活率, 将存活率在 50% 左右的 H_2O_2 浓度作为 GES-1 细胞造模浓度。

1.3.3 不同样品对细胞毒性考察

将 1×10^5 个/mL 的 HaCaT 细胞溶液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 当细胞铺满 96 孔板的 80% 时, 给药组加入配置好的 250、125、62.5 μ g/mL 的山楂核醇提取物及其不同萃取组分, 每孔 100 μ L, 空白组加入 100 μ L 的培养基。培养 16 h 后, 采用 MTT 法检测细胞活力并计算细胞存活率, 存活率大于 90% 的浓度为安全浓度。将 8×10^4 个/mL 的 GES-1 细胞溶液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 当细胞铺满 96 孔板的 80% 时, 给药组加入 250、125、62.5 μ g/mL 浓度的山楂核醇提取物及其不同萃取组分, 每孔 100 μ L, 空白组加入 100 μ L 的培养基。培养 28 h 后, 采用 MTT 法检测细胞活力并计算细胞存活率, 存活率大于 90% 的浓度为安全浓度。

1.3.4 不同样品对氧化损伤细胞存活率的考察

将 1×10^5 个/mL 的 HaCaT 细胞溶液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L。当细胞铺满 96 孔板的 80% 时, 给药组加入 50、25、12.5 μ g/mL 的山楂核醇提取物及其不同萃取组分作用于 HaCaT 细胞, 每孔 100 μ L, 模型组和空白组加入等体积的培养基, 阳性药组加入 50 μ g/mL 维生素 C。继续培养 12 h 后, 除空白组外其余各组加入终浓度为 0.12 mg/mL 的 H_2O_2 , 4 h 后采用 MTT 法检测细胞活力并计算细胞存活率。将 8×10^4 个/mL 的 GES-1 细胞溶液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L。当细胞铺满 96 孔板的 80% 时, 给药组加入 50、25、12.5 μ g/mL 的山楂核醇提取物及其不同萃取组分作

用于 GES-1 细胞, 每孔 100 μ L, 模型组和空白组加入等体积的培养基, 阳性药组加入 50 μ g/mL 维生素 C。继续培养 24 h 后, 除空白组外其余各组加入终浓度为 0.2 mg/mL 的 H_2O_2 , 4 h 后采用 MTT 法检测细胞活力并计算细胞存活率。

1.3.5 细胞中 SOD 和 GSH-Px 水平的检测

将 1×10^5 个/mL 的 HaCaT 细胞溶液接种到 6 孔板中, 每孔 2.5 mL。当细胞铺满 6 孔板的 80% 时, 给药组加入不同浓度的山楂核醇提取物中的活性组分样品作用于 HaCaT 细胞, 每孔 2.5 mL, 模型组和空白组加入等体积的培养基, 阳性药组加入等体积的 50 μ g/mL 维生素 C。12 h 后, 除空白组外其余各组加入终浓度为 0.12 mg/mL 的 H_2O_2 , 4 h 后超声破裂后取细胞内液, 按照 GSH-Px 和 SOD 试剂盒说明进行操作。将 8×10^4 个/mL 的 GES-1 细胞溶液接种到 6 孔板中, 每孔 2.5 mL。当细胞铺满 6 孔板的 80% 时, 给药组加入不同浓度的山楂核醇提取物中的活性组分样品作用于 GES-1 细胞, 每孔 2.5 mL, 模型组和空白组加入等体积的培养基, 阳性药组加入等体积的 50 μ g/mL 维生素 C。24 h 后, 除空白组外其余各组加入终浓度为 0.2 mg/mL 的 H_2O_2 , 4 h 后超声破裂后取细胞内液, 按照 GSH-Px 和 SOD 检测试剂盒说明进行操作。

1.3.6 山楂核醇提取物中活性组分大类成分含量测定

将 EAF 溶于 DMSO 中, 配制成 5 mg/mL 作为供试品溶液。将 WF 溶于超纯水中, 配制成 10 mg/mL 作为供试品溶液。参考文献方法^[15]以没食子酸为对照品, 采用福林酚比色法测定供试品溶液中多酚含量。参考文献方法^[16]以芦丁为对照品, 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法测定供试品溶液中黄酮含量; 以葡萄糖为对照品, 采用苯酚-硫酸比色法测定供试品溶液中多糖含量; 以半乳糖醛酸为对照品, 采用间羟基联苯法测定供试品溶液中糖醛酸含量。参考文献方法^[17]以蛇菰宁为对照品, 采用紫外分光光度法测定供试品溶液中总木脂素含量。供试品溶液中蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法, 按照试剂盒说明书方法进行测定。

1.3.7 数据处理与分析

数据以 Mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 22 软件进行统计分析, 组间比较用 ANOVA 检验。p<0.05 认为具有显著性差异。实验数据绘图由 Graph Prism 7.00 软件完成。

2 结果与讨论

2.1 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞和 GES-1 细胞氧化

损伤模型的建立

如图 1a 所示,随着造模剂 H₂O₂ 浓度的增大(0.08 mg/mL 增至 0.20 mg/mL), HaCaT 细胞存活率逐渐降低(90.63%减至 36.60%),当 H₂O₂ 浓度为 0.12 mg/mL 时,HaCaT 细胞相对存活率为 50%左右,因此选用 0.12 mg/mL 的 H₂O₂ 做为氧化损伤 HaCaT 细胞的造模剂浓度。

GES-1 细胞的存活率和 H₂O₂ 浓度的关系如图 1b 所示,随着 H₂O₂ 浓度的增大(0.10 mg/mL 增至 0.20 mg/mL),GES-1 细胞存活率逐渐降低(108.19%减至 51.99%),当 H₂O₂ 浓度为 0.2 mg/mL 时,GES-1 细胞相对存活率为 50%左右,因此选用 0.2 mg/mL 的 H₂O₂ 浓度为氧化损伤 GES-1 细胞的造模剂浓度。

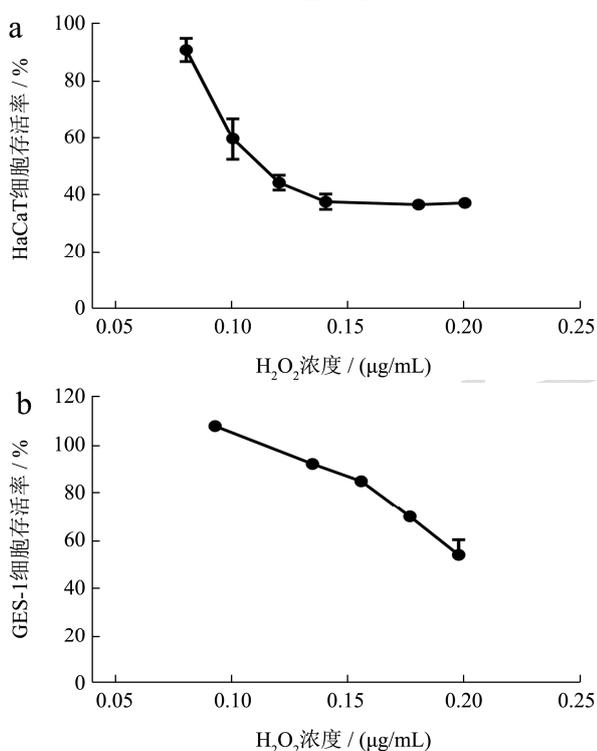


图 1 不同浓度的造模剂 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞 (a) 和 GES-1 细胞 (b) 存活率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of H₂O₂ on the cell viability of HaCaT cells (a) and GES-1 cells (b)

2.2 山楂核醇提取物及其不同萃取组分对 HaCaT 细胞和 GES-1 细胞的细胞毒性

HaCaT 细胞的存活率和样品浓度(250 μg/mL、125 μg/mL 和 62.5 μg/mL)的关系如图 2a 所示,山楂核醇提取物及其不同萃取组分浓度为 62.5 μg/mL 时,HaCaT 细胞存活率约为 91.34%到 112.08%间,均大于 90%。但随着样品浓度的增大,HaCaT 细胞存活率逐

渐降低,其中当 EE、EFA 和 WF 浓度为 250 μg/mL 时,HaCaT 细胞存活率为 72.08%到 87.60%间,小于 90%,表现出一定毒性。因此取低于 62.5 μg/mL 的浓度作为山楂核醇提取物及其各萃取组分对 HaCaT 细胞的给药浓度,实验设置 50、25 和 12.5 μg/mL 三个浓度。

GES-1 细胞的存活率和样品浓度(250 μg/mL、125 μg/mL 和 62.5 μg/mL)的关系如图 2b 所示。除 WF 外,山楂核醇提取物及其各萃取组分在高浓度 250 μg/mL 时,GES-1 细胞存活率约为 16.28%到 83.83%间,均小于 90%,表现出一定毒性,其中 EAF 对 GES-1 细胞毒性较明显,其细胞存活率仅为 16.27%±0.93%。山楂核醇提取物及其各萃取组分在 62.5 μg/mL 浓度下 GES-1 细胞存活率约为 99.17%到 100.81%,均大于 90%,因此取低于 62.5 μg/mL 的浓度作为山楂核醇提取物及各部位对 GES-1 细胞的给药浓度,设置 50、25 和 12.5 μg/mL 三个浓度。

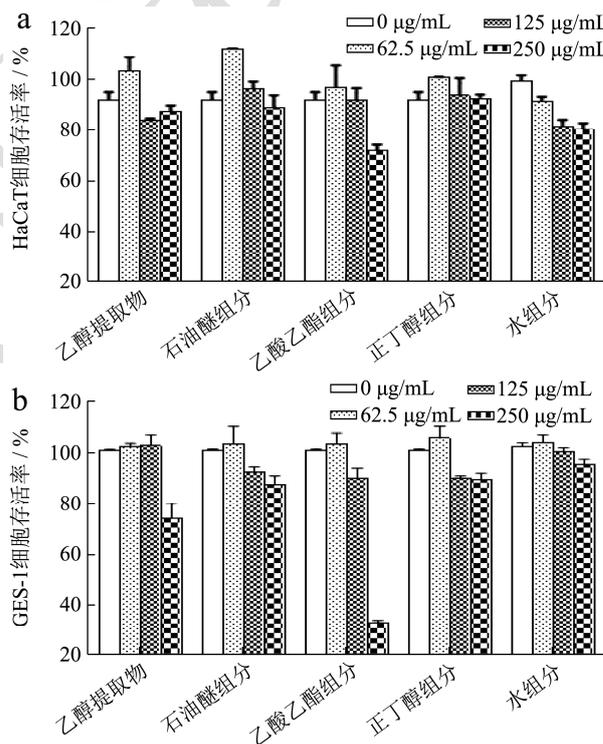


图 2 山楂核醇提取物及其不同萃取组分对 HaCaT 细胞 (a) 和 GES-1 细胞 (b) 存活率的影响

Fig.2 Effects of alcohol extraction from hawthorn kernel and its different polar fractions on the cell viability of HaCaT cells (a) and GES-1 cells (b)

2.3 山楂核醇提取物及其不同萃取组分对氧化损伤 HaCaT 细胞和 GES-1 细胞的保护作用

人皮肤角质形成细胞 HaCaT 细胞是人体最外层

皮肤的主要构成细胞，是人体隔离外界环境的天然屏障，也最易受到氧自由基的侵害^[18]。山楂核醇提取物及其不同萃取组分（50 μg/mL、25 μg/mL 和 12.5 μg/mL）对氧化损伤的 HaCaT 细胞存活率的影响如图 3a 所示。与空白组相比，H₂O₂ 显著降低 HaCaT 细胞存活率（细胞存活率 43.03%，*p*<0.01），表明氧化损伤 HaCaT 细胞模型诱导成功。与模型组比较，维生素 C 组 HaCaT 细胞存活率显著升高（细胞存活率 57.46%，*p*<0.01）；50 μg/mL 和 25 μg/mL 的 EAF 显著提高氧化损伤 HaCaT 细胞的存活率 18.18%和 21.23%，细胞存活率分别为 50.85%和 52.17%（*p*<0.01）；此外 25 μg/mL 和 12.5 μg/mL 的 WF 组氧化损伤 HaCaT 细胞的存活率亦显著升高 16.20%和 14.95%，细胞存活率分别为 50.00%和 49.46%（*p*<0.01）。其余各组分对氧化损伤 HaCaT 细胞的存活率没有明显影响。这些结果表明，EAF 和 WF 对 H₂O₂ 诱导氧化损伤 HaCaT 细胞具有一定的保护作用。

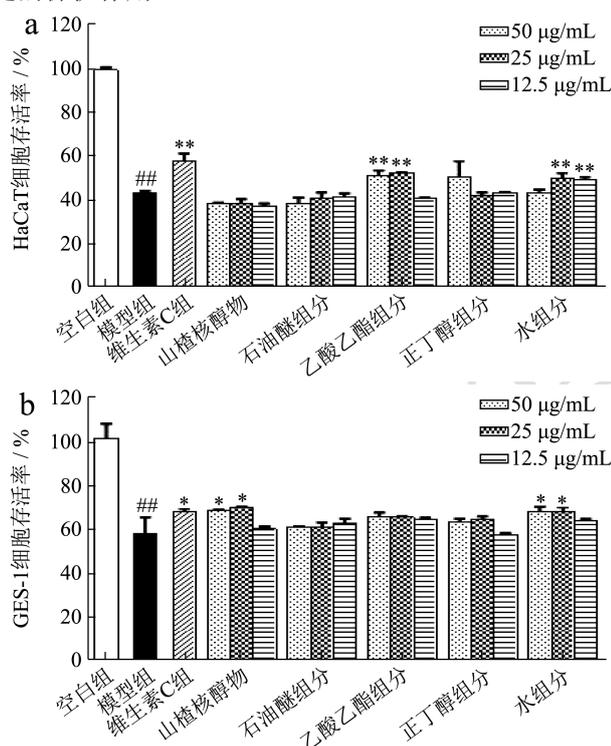


图 3 不同浓度山楂核醇提取物及其不同萃取组分对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞 (a) 和 GES-1 细胞 (b) 存活率的影响

Fig.3 Effects of alcohol extraction from hawthorn kernel and its different polar fractions on the cell viability of oxidation-damaged HaCaT cells (a) and GES-1 cells (b)

注：##*p*<0.01，与空白组比较；**p*<0.05，***p*<0.01 与模型组比较。

氧自由基作为第二信使激活不同的氧化还原反应敏感的信号传导通路，导致组织炎症和损伤，这是急性胃粘膜损伤形成和发展的重要因素^[13]。山楂核醇提取物及其不萃取组分（50 μg/mL、25 μg/mL 和 12.5 μg/mL）对氧化损伤的 GES-1 细胞的存活率影响如图 3b 所示。与空白组相比，H₂O₂ 处理显著降低 GES-1 细胞存活率（细胞存活率 55.34%，*p*<0.01），表明氧化损伤 GES-1 细胞模型诱导成功。与模型组比较，维生素 C 组 GES-1T 细胞存活率显著升高（细胞存活率 68.27%，*p*<0.05）；EE 及 WF 在 50 μg/mL 和 25 μg/mL 浓度下均能显著提高氧化损伤 GES-1 细胞的存活率（*p*<0.05），其余部位无明显作用。其中 50 μg/mL WF 组氧化损伤 GES-1 细胞的存活率为 63.28%（*p*<0.05），与模型组相比提高了 23.15%，25 μg/mL 山楂核水部位组氧化损伤 GES-1 细胞的存活率为 64.78%（*p*<0.05），与模型组相比提高了 23.61%。这些结果表明，WF 对 H₂O₂ 诱导氧化损伤 GES-1 细胞具有一定的保护作用。

本研究中，WF 对 H₂O₂ 诱导氧化损伤两种细胞均具有一定保护作用，而 EAF 仅对 H₂O₂ 氧化损伤 HaCaT 细胞具有一定保护作用，表明 WF 在抗 H₂O₂ 诱导氧化损伤方面可能优于 EAF，这与我们前期研究结果相一致。前期研究^[8]发现，EAF 在清除 DPPH 和 ABTS 自由基、Fe³⁺ 还原能力方面优于其他组分；WF 在清除羟自由基能力方面表现最好，EAF 次之。因此 WF 在对 H₂O₂ 诱导细胞应激氧化损伤方面具有较好的保护作用。

2.4 山楂核醇提取物中的活性组分对氧化损伤

的 HaCaT 细胞和 GES-1 细胞中 SOD 和 GSH-Px 的影响

SOD 和 GSH-Px 是生物体内重要的抗氧化酶，作为清除生物体内自由基的首要物质，其可以及时修复因氧自由基对细胞造成的损伤，其表达高低可以看做是细胞衰老与死亡的指标之一。因此，我们进一步考察了山楂核醇提取物中抗氧化活性组分对 H₂O₂ 诱导氧化损伤 HaCaT 和 GES-1 细胞中 SOD 和 GSH-Px 水平的影响，初步探索山楂核醇提取物中活性组分对氧化损伤细胞保护作用机制。

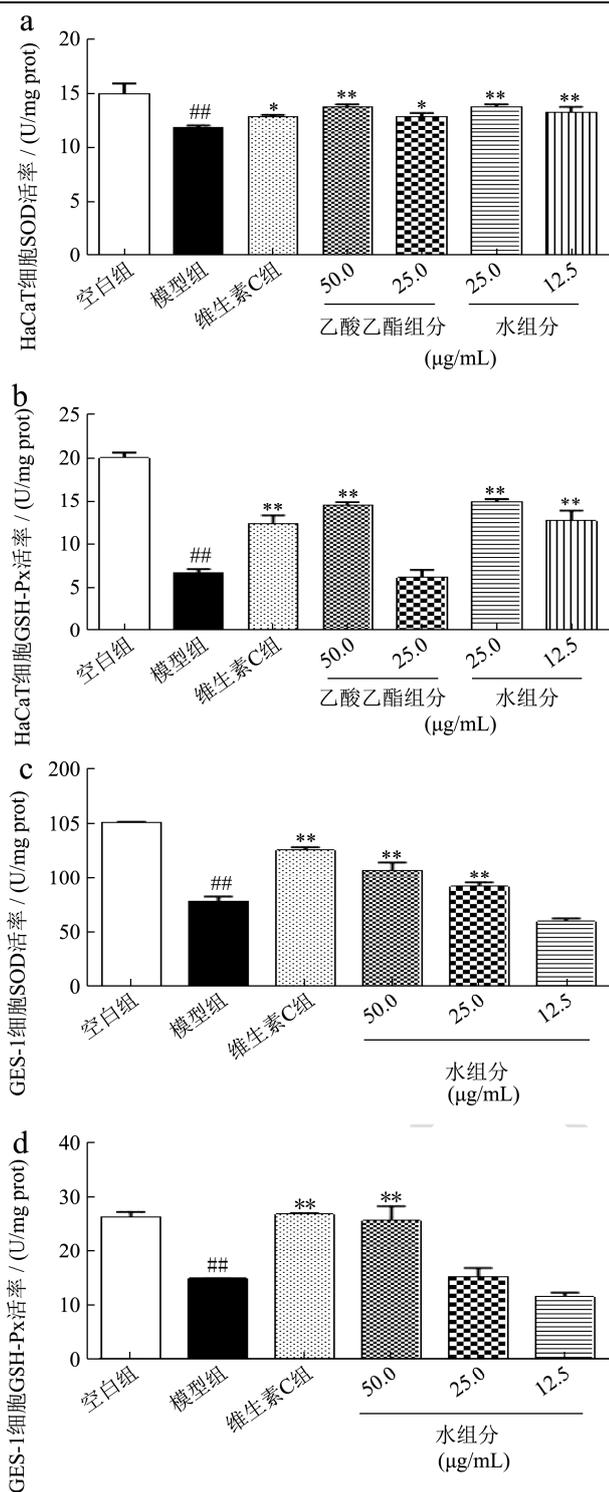


图4 山楂核活性组分对H₂O₂诱导氧化损伤HaCaT细胞内SOD(a)和GSH-Px(b)、氧化损伤GES-1细胞内SOD(c)和GSH-Px(d)水平的影响

Fig.4 Effects of alcohol extraction from hawthorn kernel and its different polar fractions on SOD (a) and GSH-Px (b) activity in oxidation-damaged HaCaT cells, SOD (c) and GSH-Px (d) activity in oxidation-damaged GES-1 cells

注: ^{##}*p*<0.01, 与空白组比较; ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.01 与模型组比较。

EAF对氧化损伤的HaCaT细胞中SOD和GSH-Px水平的影响见图4a和图4b。其中, EAF在50 μg/mL和25 μg/mL浓度下分别提高H₂O₂诱导氧化损伤HaCaT细胞中SOD水平16.45%和9.09%,细胞内SOD水平分别为13.81 U/mg prot (*p*<0.01)和12.94 U/mg prot (*p*<0.05)。50 μg/mL的EAF能显著提高氧化损伤HaCaT细胞中GSH-Px水平1.16倍,细胞中GSH-Px水平为14.54 U/mg prot (*p*<0.01);但25 μg/mL的EAF对氧化损伤HaCaT细胞中GSH-Px的水平无明显影响。由图4a和4b可知,WF在25 μg/mL和12.5 μg/mL浓度下分别提高H₂O₂诱导氧化损伤HaCaT细胞中SOD水平16.62%和12.32%,细胞内SOD水平分别为13.83 U/mg prot (*p*<0.01)和13.32 U/mg prot (*p*<0.01);提高GSH-Px的水平1.22倍和88.78%,细胞内GSH-Px水平分别为15.00 U/mg prot (*p*<0.01)和12.72 U/mg prot (*p*<0.01)。

此外,WF在50 μg/mL和25 μg/mL浓度下分别提高H₂O₂诱导氧化损伤GES-1细胞中SOD水平37.38%和17.38%,细胞内SOD水平分别为108.44 U/mg prot (*p*<0.01)和92.66 U/mg prot (*p*<0.01,图4c);在50 μg/mL浓度下提高H₂O₂诱导氧化损伤GES-1细胞中GSH-Px的水平72.58%,细胞中GSH-Px水平为25.74 U/mg prot (*p*<0.01,图4d)。

这些结果表明,EAF可通过调节细胞内抗氧化酶水平保护H₂O₂诱导氧化损伤的HaCaT细胞,WF可通过调节细胞内抗氧化酶水平保护H₂O₂诱导氧化损伤的HaCaT细胞和GES-1细胞。

2.5 山楂核醇提物中活性组分大类成分分析

表1 对照品没食子酸、芦丁、葡萄糖、半乳糖醛酸和蛇菰宁线性关系

Table 1 Linear regression equations of five reference materials

对照品	线性方程	R ²	线性范围/(μg/mL)
没食子酸	y=0.0154x-0.0626	0.9967	5~80
芦丁	y=1.5688x+0.0384	0.9952	22.1~221
葡萄糖	y=2.7908x+0.0112	0.9969	75~300
半乳糖醛酸	y=5.3822x+0.05	0.992	10~100
蛇菰宁	y=8.069x+0.0248	0.997	12.5~100

根据多酚(没食子酸)、黄酮(芦丁)、糖(葡萄糖)、糖醛酸(半乳糖醛酸)和木脂素(蛇菰宁)对照品的标准曲线(表1),计算EAF和WF中的各大类成份含量。由结果可知(表2),EAF中糖含量占该组分的32.73%,其次为黄酮、木脂素和多酚。糖类成分为EAF主要成分,由于EAF水溶性较差,其糖类成

分可能为一些醇溶性糖和糖苷类成分。研究表明, EAF 中所含木脂素类化合物 Hawthornin G 和 7S, 8R-Ficusal 具有清除 ABTS 和 DPPH 自由基活性^[4]。除木脂素外, 黄酮类^[19]、多糖^[20]类成分亦具有体外抗氧化活性。此外, 多酚^[21]、木脂素^[22]、多糖^[18]类成分均被证明对氧化损伤的 HaCaT 细胞具有一定保护作用, 提高氧化损伤细胞的存活率。因此我们推测, EAF 中含有的多糖、黄酮、木脂素、多酚类成分, 可能为其抗氧化的活性成分, 其在抗过氧化皮肤衰老方面具有一定开发和应用前景。

如表 3 所示, WF 中糖含量占该组分的 59.59%, 主要为水溶性多糖, 为其主要成份。除了被证明对氧化损伤的 HaCaT 细胞具有保护作用外, WF 对氧化损伤的 GES-1 细胞也具有一定的保护活性, 能够提高细胞内 SOD 和 GSH-Px 的活力。研究表明, 天然产物的糖类成分可以通过提高机体免疫功能、提高胃黏膜组织的抗氧化能力、控制炎症反应等途径来保护胃黏膜^[23,24]。猴头菇多糖能够降低氧化损伤的 GES-1 细胞内 ROS 的含量, 同时能够减少细胞的凋亡^[13]。WF 中糖含量较高, 多糖类成分可能对过氧化引起的皮肤衰老和胃黏膜具有一定保护活性, 其在抗过氧化皮肤衰老和胃黏膜保护方面具有较好的开发应用前景, 后续可对其中的多糖类成分进行进一步纯化研究。

表 2 山楂核醇提物中乙酸乙酯萃取组分 (EAF) 化学成分含量分析

Table 2 Composition analysis of ethyl acetate fraction of hawthorn kernel alcohol extraction

成分	含量/%
多酚	6.40±0.06
黄酮	15.70±0.00
糖	32.73±0.01
糖醛酸	2.04±0.39
木脂素	8.09±0.32

表 3 山楂核醇提物中水萃取组分 (WF) 化学成分含量分析

Table 3 Composition analysis of water fraction of hawthorn kernel alcohol extraction

成分	含量/%
多酚	1.14±0.02
黄酮	0.92±0.06
糖	59.59±2.15
糖醛酸	13.93±0.39
木脂素	-
蛋白质	0.84±0.15

注: -表示未检测到。

EAF 和 WF 为山楂核醇提物中改善细胞氧化损伤的活性组分, 其可通过提高细胞内 SOD 和 GSH-Px 的活力对氧化损伤细胞发挥保护作用, 提高细胞存活率。其中, EAF 对氧化损伤的 HaCaT 细胞具有一定保护作用; 而 WF 对氧化损伤的 HaCaT 细胞和 GES-1 细胞均具有保护作用, 且主要成分为糖, 具备进一步开发的潜力。山楂核作为山楂加工过程中的副产品, 大多在山楂果实加工过程中被丢弃, 造成资源的浪费, 因此亟待深入开发和合理利用。后续我们将对 WF 中多糖类成分进一步深入研究, 以期对山楂核在抗过氧化皮肤衰老和胃黏膜保护等方面的开发提供科学依据, 为山楂核种子资源的开发和综合利用提供数据支持。

参考文献

- [1] 兰茂. 滇南本草[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 20-23
LAN Mao. *Materia Medica in Southern Yunnan* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978: 20-23
- [2] 温娜, 刘妍如, 陆世海, 等. 山楂核干馏油 GC-MS 主要成分分析及含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 990-996
WEN Na, LIU Yan-ru, LU Shi-hai, et al. Identification and simultaneous determination of aldehydes and phenols in the hawthorn seeds dry distilled oil [J]. *Natural Product Research and Development*, 2018, 30(6): 990-996
- [3] 许洪波, 唐志书, 刘澳昕, 等. 山楂核化学成分与药理活性研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(3): 674-680
XU Hong-bo, TANG Zhi-shu, LIU Ao-xin, et al. Progress on chemical composition and pharmacological activity of hawthorn seeds [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2018, 40(3): 674-680
- [4] Huang X X, Bai M, Zhou L, et al. Food byproducts as a new and cheap source of bioactive compounds: lignans with antioxidant and anti-inflammatory properties from *Crataegus pinnatifida* Seeds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(32): 7252-7260
- [5] 李玲芝, 彭纓, 牛超, 等. 山楂核中具有抗肿瘤活性化合物的分离(英文)[J]. 中国天然药物, 2013, 11(4): 411-414
LI Ling-zhi, PENG Ying, NIU Chao, et al. Isolation of cytotoxic compounds from the seeds of *Crataegus pinnatifida* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2013, 11(4): 411-414
- [6] 顾军, 庄桂东. 山楂核黄酮的提取及其调血脂保健功能的研究[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(5): 83-84
GU Jun, ZHUANG Gui-dong. Study on extraction of flavonoids from hawthorn seeds and its function of regulating

3 结论

- blood lipid [J]. Food Research and Development, 2003, 24(5): 83-84
- [7] 程卓阳,周乐,刘思帆,等.山楂核中的芳香族化合物及其抗氧化活性[J].沈阳药科大学学报,2015,32(11):844-847
CHENG Zhuo-yang, ZHOU Le, LIU Si-fan, et al. Aromatic compounds from seeds of *Crataegus pinnatifida* and their antioxidant activities [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2015, 32(11): 844-847
- [8] 胡洁品,彭颖,刘峰,等.山楂核抗氧化、抑菌活性物质的筛选和 UPLC-Q-TOF/MS 分析活性物质的化学成分[J].食品科技,2020,45(2):334-340
HU Jie-pin, PENG Ying, LIU Feng, et al. Screening of antioxidant and bactericidal active material of hawthorn seeds and analysis of chemical components of active material by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(2): 334-340
- [9] Tabassum R, Jeong N Y, Jung J. Protective effect of hydrogen sulfide on oxidative stress-induced neurodegenerative diseases [J]. Neural Regeneration Research, 2020, 15(2): 232-241
- [10] Black H S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage [J]. Photochemistry & Photobiology, 2008, 46(2): 213-221
- [11] Lai-cheong J E, Mcgrath J A. Structure and function of skin, hair and nails [J]. Medicine, 2009, 37(5): 223-226
- [12] Wu F, Zhou C, Zhou D, et al. Structural characterization of a novel polysaccharide fraction from *Hericium erinaceus* and its signaling pathways involved in macrophage immunomodulatory activity [J]. Journal of Functional Foods, 2007, 37: 574-585
- [13] Wang M, Kanako N, Zhang Y, et al. A unique polysaccharide purified from *Hericium erinaceus* mycelium prevents oxidative stress induced by H₂O₂ in human gastric mucosa epithelium cell [J]. Plos One, 2017, 12(7): e0181546
- [14] 黄蕾,刘新国,杨全伟,等.洋参抗衰合剂对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J].药学研究,2018,37(12):690-693
HUANG Lei, LIU Xin-guo, YANG Quan-wei, et al. Protective effects of Yangshen Kangshuai mixture against hydrogen peroxide-induced HepG2 cell injury [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2018, 37(12): 690-693
- [15] 杨选平,曹继武,黄雪芳,等.福林酚比色法测定棕榈花中多酚含量的研究[J].科学技术创新(黑龙江科技信息),2017,11: 128
YANG Xuan-ping, CAO Ji-wu, HUANG Xue-fang, et al. Study on determination of polyphenol in Palm flower by Fulin phenol colorimetry [J]. Scientific and Technological Innovation, 2017, 11: 128
- [16] 刘巧利,王柳云,严建业,等.山楂中总黄酮和多糖的提取工艺研究[J].中南林业科技大学学报,2010,30(9):162-165
LIU Qiao-li, WANG Liu-yun, YAN Jian-ye, et al. Extracting conditions of total flavones and polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* [J]. Journal of Central South Forestry University, 2010, 30(9): 162-165
- [17] 龙飞,周元雳,李杰,等.厚朴总黄酮、总多糖、总木脂素、总鞣质和总皂苷含量测定[J].亚太传统医药,2018,14(7):25-28
LONG Fei, ZHOU Yuan-li, LI Jie, et al. Content determination of total flavonoids, polysaccharides, lignans, tannin, saponins from *Magnoliae officinalis* cortex [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2018, 14(7): 25-28
- [18] 王冰心,钟铭,卢颖裕,等.不同多糖配伍对 H₂O₂ 诱导的皮肤细胞老化的抑制作用[J].现代食品科技,2019,35(9):57-66, 146
WANG Bing-xin, ZHONG Ming, LU Ying-yu, et al. Inhibition of different polysaccharides on H₂O₂-induced skin cell aging [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(9): 57-66, 146
- [19] 张蓓蓓.植物黄酮类化合物的研究[J].科技视界,2018, 245(23):155-157
ZHANG Bei-bei. Study on plant flavonoids [J]. Science & Technology View, 2018, 245(23): 155-157
- [20] 孟庆龙,金莎,刘雅婧,等.植物多糖药理功效研究进展[J].食品工业科技,2020,41(11):335-341
MENG Qing-long, JIN Sha, LIU Ya-jing, et al. Research progress in pharmacological efficacy of plant polysaccharides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 335-341
- [21] 石浩,王仁才,庞立,等.软枣猕猴桃原花青素对 H₂O₂ 诱导细胞损伤的预保护作用[J].现代食品科技,2019,35(1):1-8
SHI Hao, WANG Ren-cai, PANG Li, et al. Preprotective effect of *Actinidia arguta* proanthocyanidins on the cell injured by drogen peroxide [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(1): 1-8
- [22] 侯微,魏忠宝,高薇,等.五味子甲素·乙素及丙素对 HaCat 细胞氧化损伤的保护作用研究[J].安徽农业科学,2013,41(3): 1047-1049
HOU Wei, WEI Zhong-bao, GAO Wei, et al. Protective effects of schisandrin A, B and C on the oxidative damage of HaCat cells [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(3): 1047-1049

(下转第 51 页)