

新疆疏花蔷薇花的体外抗氧化活性

冯倩倩¹, 赵文惠², 李安林¹, 郭瑛¹, 田莉^{1,3*}

(1. 新疆医科大学中医学院, 新疆乌鲁木齐 830017) (2. 新疆医科大学中心实验室, 新疆乌鲁木齐 830011) (3. 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830017)

摘要: 研究新疆特色植物资源疏花蔷薇花不同极性部位的体外抗氧化活性, 为该药材的后续研究提供参考。制备疏花蔷薇花的石油醚 (E1)、二氯甲烷 (E2)、乙酸乙酯 (E3)、正丁醇 (E4) 等不同极性部位提取物, 考察其对 DPPH、ABTS⁺ 和羟基自由基的清除能力评价体外抗氧化活性; 以抗氧化活性最高的 E4 为研究对象, 以 D-半乳糖诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立体外氧化损伤模型, 设立对照组、模型组、Vc 组、E4 (低、中、高剂量) 组, CCK-8 法测定细胞存活率, 测定细胞中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、乳酸脱氢酶、过氧化氢酶的活力及丙二醛含量。疏花蔷薇花不同极性部位抗氧化活性大小为 E4>E3>E2>E1, 其中 E3、E4 清除自由基能力较强, 并且呈明显剂量依赖效应。当 E4 质量浓度为 3.13~12.50 μg/mL 时, RAW264.7 细胞的存活率均 ≥80%, 无明显毒性; 各剂量组可显著促进 RAW264.7 细胞存活率 ($P<0.05$), 并呈剂量依赖性提高细胞中 SOD、GSH-PX、LDH、CAT 活力, 降低 MDA 含量。结果表明疏花蔷薇花具有良好的体外抗氧化能力。

关键词: 疏花蔷薇花; 不同极性提取部位; 体外抗氧化; 小鼠巨噬细胞 RAW264.7

文章编号: 1673-9078(2024)09-153-159

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0981

In Vitro Antioxidant Activity of the Flowers of *Rosa laxa* Retz. from Xinjiang

FENG Qianqian¹, ZHAO Wenhui², LI Anlin¹, GUO Ying¹, TIAN Li^{1,3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

(2. Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

(3. Xinjiang Key Laboratory of Famous Prescription and Science of Formulas, Urumqi 830017, China)

Abstract: The *in vitro* antioxidant activities of different polar parts of the flowers of *Rosa laxa* Retz., a characteristic plant resource of Xinjiang, were studied to provide a reference for the subsequent research of this medicinal material. Extracts of different polar parts of the flower using petroleum ether (E1), dichloromethane (E2), ethyl acetate (E3) and n-butanol (E4) were prepared and their *in vitro* antioxidant activities were evaluated by investigating their scavenging abilities on DPPH, ABTS⁺, and hydroxyl radicals. E4 with the highest antioxidant activity among them was used as the research object for subsequent studies. An *in vitro* oxidative damage model of mouse macrophage RAW264.7 induced by D-galactose was established. The control group, model group, Vc group and E4 groups (low-, medium- and high-dose groups) were set up. The cell survival rate was determined by the CCK-8 method, and the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase,

引文格式:

冯倩倩, 赵文惠, 李安林, 等. 新疆疏花蔷薇花的体外抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 153-159.

FENG Qianqian, ZHAO Wenhui, LI Anlin, et al. *In vitro* antioxidant activity of the flowers of *Rosa laxa* retz. from Xinjiang [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 153-159.

收稿日期: 2023-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81860744); 新疆维吾尔自治区“十四五”重点学科: 中医学

作者简介: 冯倩倩 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新制剂研究与开发, E-mail: 2406153250@qq.com

通讯作者: 田莉 (1974-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药新制剂研究与开发, E-mail: tianli109@126.com

lactate dehydrogenase and catalase in cells, and the content of malondialdehyde in cells, were determined. The antioxidant activities of different polar parts of the *Rosa laxa* Retz. flower were in the order of E4>E3>E2>E1, among which E3 and E4 exhibited strong free radical scavenging abilities and showed obvious dose-dependent effects. At an E4 mass concentration of 0.5~10 $\mu\text{g/mL}$, the survival rate of E4 on RAW264.7 cells was $\geq 80\%$, with no obvious toxicity detected. The treatments at each dose could significantly promote the survival rate of RAW264.7 cells ($P<0.05$), and in a dose-dependent manner, increase the activities of SOD, GSH-PX, LDH and CAT in cells while reducing the content of MDA. The above results demonstrated that the flowers of *Rosa laxa* Retz. possessed an *in vitro* good antioxidant activity.

Key words: flowers of *Rosa laxa* Retz.; different polarity extraction sites; *in vitro* antioxidant; RAW264.7

人体内细胞与氧气结合可同时产生维系生命所需的能量和诱导氧化反应的活性物质自由基, 当体内清除自由基的能力下降时, 过多的自由基会对机体有一定损害的氧化应激反应^[1]。因此, 抗氧化通过机体清除自由基以减少其对细胞膜和生物膜的伤害, 提高抗氧化酶活性来保护 DNA 免受破坏, 其对机体健康及生活质量有重要影响^[2]。中药中含有的酚酸类、黄酮、生物碱、多糖、皂苷等成分可抑制自由基的产生, 或对抗其对细胞及组织的损伤, 具有较好的抗氧化活性, 因此, 从药食同源的中草药寻求安全性高的天然自由基清除剂已成为倍受关注的研究热点^[3]。新疆特色植物资源疏花蔷薇 (*Rosa laxa* Retz.) 属蔷薇科直立灌木植物, 广泛分布于新疆海拔 500~1 150 m 的山坡、荒漠、盐碱地、干沟边或河谷旁, 抗逆性强, 野生资源丰富, 具有耐干旱、耐瘠薄、耐寒和抗病虫特性, 现也作为新疆一种主要的园林景观灌木^[4,5]。疏花蔷薇花为疏花蔷薇的干燥花蕾或初开的花, 现收载于《哈萨克药志》, 含有挥发油, 花青素、胡萝卜素等成分, 用于治疗感冒发烧, 其亦可冲泡作为茶饮, 长期服用具有延缓衰老的作用^[6]。本课题组前期研究发现, 疏花蔷薇花中含有黄酮、酚酸及萜类化合物, 具有一定的抗氧化作用。目前, 疏花蔷薇花中的主要成分及其药效的相关研究尚未见报道, 本实验探究疏花蔷薇花的抗氧化活性部位及其作用, 为后续质量控制和药效研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

疏花蔷薇花 2022 年 6 月采摘于新疆乌鲁木齐市雅玛里克山 (87°34'E, 43°48'N; 海拔, 1 120 m), 经新疆医科大学徐海燕教授鉴定为蔷薇科疏花蔷薇 (*Rosa laxa* Retz.) 的花, 置于阴凉通风处阴干。

没食子酸, 四川维克奇生物科技有限公司; 芦

丁, 维生素 C (Vc), 成都曼思特公司; DPPH, D-半乳糖 (D-gal), 上海麦克林生化科技有限公司; ABTS, 阿拉丁公司; 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7、RAW264.7 细胞专用培养基, 武汉普诺赛公司; DMEM 高糖培养基, 赛默飞世尔公司; CCK-8 试剂盒, 北京博奥森生物技术有限公司; BCA 蛋白分析试剂盒, 上海雅酶生物医疗科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒, 南京建成公司。

1.2 主要仪器设备

ABI35-S 型电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; UV-2700 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 超净工作台, 苏州净化设备总厂; Galaxy 17CR 型 CO₂ 细胞培养箱, Eppendorf 公司; Multiskan GO 酶标仪, Thermo Fisher Scientific; TDL-40B 型高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; DK-80 型恒温水浴锅, 上海精密仪器厂。

1.3 不同极性部位制备

精密称取疏花蔷薇花粉末约 5.000 0 g, 平行 3 份, 分别加入 100 mL 石油醚, 回流 2 h, 过滤, 续滤液经水浴 (60 $^{\circ}\text{C}$) 蒸干, 制得疏花蔷薇花的石油醚提取物 (E1); 滤渣依次用 100 mL 二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇回流提取 2 h, 滤液蒸干制得疏花蔷薇花二氯甲烷提取物 (E2), 乙酸乙酯提取物 (E3), 正丁醇提取物 (E4)。4 种提取物浸膏分别称重, 计算出膏率^[7]。

$$D = \frac{m_0}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——出膏率, %;

m_0 ——提取物浸膏质量, g;

m ——药材质量, g。

1.4 抗氧化活性测定

1.4.1 DPPH自由基清除试验

根据文献^[8]方法,制备0.1 mmol/L DPPH溶液后,每种样品各取100 μ L与100 μ L DPPH混合,避光保存30 min,反应溶液检测波长为517 nm。根据公式计算自由基清除率。

$$D_1 = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D_1 —DPPH自由基清除率, %;

A_0 —DPPH工作液、无水乙醇混合液的吸光度;

A_1 —DPPH工作液、样品混合液的吸光度;

A_2 —无水乙醇、样品混合液的吸光度。

1.4.2 ABTS⁺自由基清除试验

根据文献^[2]方法并稍做改动,配制ABTS工作液,并将样品与工作液充分混合,于734 nm处检测吸光度。

$$D_2 = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

D_2 —ABTS⁺自由基清除率, %;

A_0 —ABTS工作液、无水乙醇混合液的吸光度;

A_1 —ABTS工作液、样品混合液的吸光度;

A_2 —无水乙醇、样品混合液的吸光度。

1.4.3 羟基自由基清除试验

根据文献^[6]方法,制备硫酸亚铁水、水杨酸醇工作液。分别取各工作液0.5 mL和待测溶液1.0 mL,混匀,再加入9 mmol/L H₂O₂ 0.5 mL,混匀,置于37 $^{\circ}$ C反应30 min。以纯水为对照,于510 nm处测定吸光度,根据公式计算羟基自由基清除率。

$$D_3 = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

D_3 —羟基自由基清除率, %;

A_0 —水杨酸醇溶液、Fe²⁺、H₂O₂和纯水混合液的吸光度;

A_1 —水杨酸醇溶液、Fe²⁺、H₂O₂和样品混合液的吸光度;

A_2 —水杨酸醇溶液、Fe²⁺、纯水和样品溶液的吸光度。

1.5 E4中总多酚、总黄酮含量测定

精密称取E4浸膏,制备适宜质量浓度的溶液。分别采用福林酚-比色法^[9],亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定总多酚、总黄酮含量。

1.6 小鼠巨噬细胞RAW264.7的体外氧化模型建立

1.6.1 细胞培养

将1 mL冻存细胞液加至含有9 mL培养基的离心管中,低温低速离心5 min,弃去上清,加入培养基2 mL,吹打均匀,取细胞悬液1 mL移至含有3 mL培养基的培养瓶,十字摇匀,置细胞培养箱中培养,当细胞铺满瓶壁时90%时,取出用于后续试验^[10]。

1.6.2 CCK-8法测定安全质量浓度范围

将对数生长期的RAW264.7细胞接种于96孔细胞培养板(密度 6×10^4 cells/mL)中,每孔100 μ L。置于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)培养24 h,待细胞充分贴壁后,设置对照组、模型组、Vc组和给药组。对照组给予RAW264.7细胞专用培养基100 μ L,模型组给予100 μ L含D-gal(终质量浓度为3.13、6.25、12.50、25、50、100、200、400、800 μ g/mL)的培养基,Vc组给予含Vc(终质量浓度为3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、800 μ g/mL)的培养基,给药组给予100 μ L含E4(终质量浓度为3.13、6.25、12.50、25、50、100、200、400、800 μ g/mL)的培养基,均于常规条件培养24 h,弃去上清液,每孔加入10% CCK-8溶液100 μ L,常规孵育1 h,在波长450 nm处检测各孔的吸光度(OD)值,并计算细胞存活率^[11,12]。每个质量浓度组设6个复孔。

$$D_4 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

D_4 —细胞存活率, %;

A_0 —对照组的吸光度;

A_1 —测定组的吸光度。

1.6.3 对氧化应激损伤细胞存活率的影响

将贴壁生长达90%的RAW264.7细胞制成单细胞悬液(每毫升 6×10^4 cells),接种于96孔板(每孔100 μ L,即每孔 6×10^3 cells)中,常规培养24 h贴壁后,弃取上清,设置对照组,模型组,Vc阳性药组(5 μ g/mL),E4低、中、高剂量组(0.50、5、10 μ g/mL),每组6个复孔。各组干预24 h,弃上清,每孔加入275 μ g/mL D-gal溶液100 μ L,37 $^{\circ}$ C、 $\varphi=5\%$ CO₂培养24 h,弃上清,加入10% CCK-8溶液100 μ L,培养箱中孵育1 h,在450 nm下测定OD值,并计算细胞存活率。

1.6.4 细胞抗氧化酶活力及MDA含量测定

通过 D-gal 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立氧化损伤模型^[13], 探究 E4 的抗氧化活性。收集破碎细胞悬液, 稀释至适宜的蛋白浓度, 按试剂盒说明书操作, 测定细胞中抗氧化酶活力及 MDA 含量^[14]。分别采用 WST-1 法检测细胞中 SOD 酶活性, TNB 法检测 GSH-PX 酶活力^[15], 分光光度计法检测 LDH 活力^[16], 钼酸铵法^[17]测定 CAT 酶活力, TBA 法^[18,19]检测细胞中 MDA 含量。

1.7 统计学处理与作图

SPSS 21.0 软件用于分析数据, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Origin 2021、Excel 用于作图分析。使用概率回归分析计算药物对巨噬细胞 RAW24.7 氧化模型的 IC_1 、 IC_5 和 IC_{10} 。两组间的比较用 t 检验, 当 $P < 0.05$, 表明差异具有统计学意义, 当 $P < 0.01$, 表明差异具有极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 出膏率含量测定

疏花蔷薇花不同极性提取部位 E1、E2、E3、E4 的出膏率依次为 1.15%、0.68%、1.10%、8.67%, 其中石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯极性较小, 出膏率较低, 初步判断疏花蔷薇花中所含亲脂性化学物质较少, 正丁醇极性较大, 出膏率明显增加, 表明正丁醇部位的化学成分较多, 为后续疏花蔷薇花化学成分的研究提供依据。

2.2 自由基清除率结果

E1、E2 部位自由基清除能力较小, 随质量浓度的增加清除率无明显变化, 随着 E3、E4 质量浓度增加, 对 $ABTS^{\cdot+}$ 的清除率呈先上升后趋于稳定, 清除率大小为: E4 ($IC_{50}=34.67 \mu\text{g/mL}$) > E3 ($IC_{50}=244.13 \mu\text{g/mL}$) > E2 > E1。在 20~140 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围, E4 对 $ABTS^{\cdot+}$ 清除率明显高于其余提取物 ($P < 0.01$), 当质量浓度 > 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, E4 对 $ABTS^{\cdot+}$ 清除率高于 Vc, 呈现较强的自由基清除能力。见图 1a。

随着 4 种不同极性提取样品质量浓度的增加, 对 DPPH 自由基的清除率均呈增加趋势, 清除率大小为: E3 ($IC_{50}=0.081 \mu\text{g/mL}$) > E4 ($IC_{50}=0.175 \mu\text{g/mL}$) > E2 ($IC_{50}=49.52 \mu\text{g/mL}$) > E1 ($IC_{50}=103.33 \mu\text{g/mL}$), 其中 E3、E4 的清除率明显高于 E1、E2 ($P < 0.01$)。

在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围, E3 清除率 > 80%, 也高于 Vc 清除率, 表明其清除率能力良好; E4 清除率略低于 E3。当质量浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时, Vc 对 DPPH 自由基的清除率高于 4 种不同极性提取物, 但与 E3、E4 的自由基清除率无显著差距。见图 1b。

4 种不同极性提取样品对羟基自由基的清除率能力存在明显差异, 其中 E4 清除能力最强, $IC_{50}=40.49 \mu\text{g/mL}$, E1 对羟基自由基清除能力很小且增长趋势不明显, E2、E3、E4 样品对羟基自由基清除能力随着质量浓度的增加呈缓慢增加趋势。见图 1c。

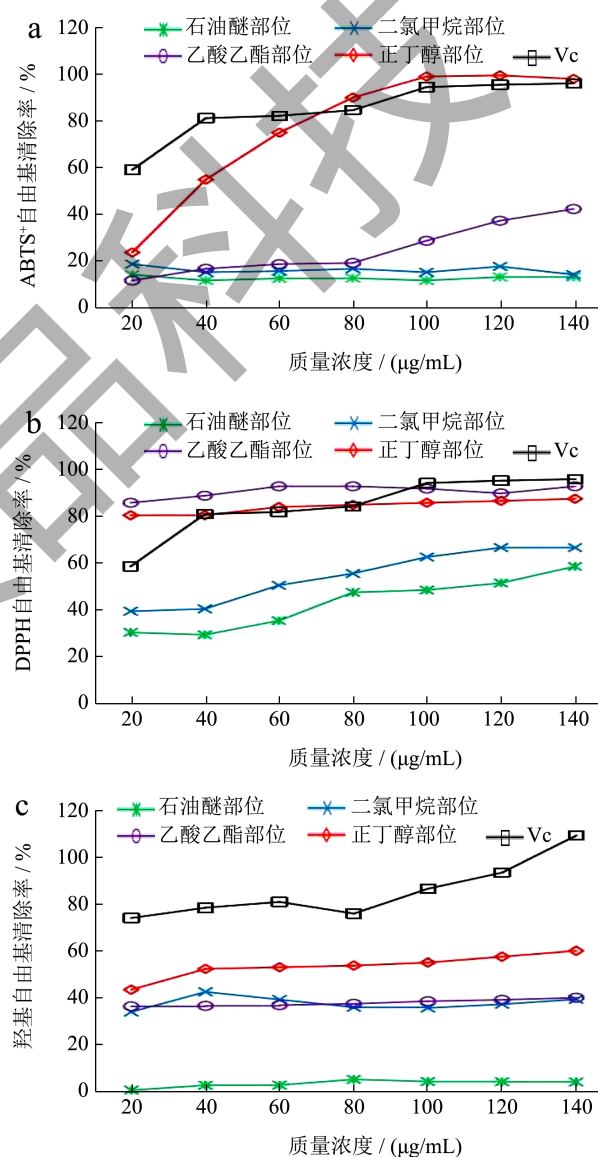


图 1 疏花蔷薇花不同极性提取物对自由基清除能力的结果
Fig.1 Results of free radical scavenging ability of different polar extracts of *Rosa florea*

综合考虑疏花蔷薇花不同极性提取物对 3 种自由基清除能力的结果, 确定 E4 抗氧化活性最高, 因此, 以 E4 为研究对象进行后续研究。

表 1 精密度、重复性和稳定性试验考察结果

Table 1 The precision, repeatability and stability test results ($\bar{x}\pm s, n=6$)

对照品	精密度		重复性		稳定性	
	Mean \pm sd	RSD/%	Mean \pm sd	RSD/%	Mean \pm sd	RSD/%
没食子酸	0.50 \pm 0.002	0.35	17.59 \pm 0.410	1.15	0.49 \pm 0.007	1.05
芦丁	0.53 \pm 0.002	0.16	7.11 \pm 0.183	1.81	0.67 \pm 0.001	0.68

表 2 加样回收率结果

Table 2 Results of sample adding recovery ($\bar{x}\pm s, n=9$)

成分	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	检测量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
总黄酮	0.500 4	40.55		74.28	101.83	100.88 \pm 3.96	2.76
	0.501 1	40.60	32.40	76.53	104.84		
	0.500 8	40.58		71.70	98.25		
	0.501 8	40.66		84.46	98.30		
	0.500 6	40.56	40.50	84.36	104.07		
	0.501 3	40.62		83.72	103.21		
	0.501 6	40.64		88.78	99.49		
	0.500 3	40.53	48.60	89.91	100.87		
总多酚	0.501 1	40.60		86.62	97.11	99.48 \pm 4.33	2.88
	0.500 5	9.84		18.31	103.33		
	0.500 7	9.84	7.88	18.40	103.81		
	0.501 1	9.85		18.15	102.36		
	0.501 6	9.86		19.31	97.97		
	0.500 8	9.85	9.85	19.38	98.39		
	0.500 3	9.84		19.33	98.19		
	0.500 8	9.85		21.25	98.06		
	0.500 7	9.84	11.82	21.05	97.20		
	0.501 3	9.86		20.83	96.06		

2.3 总黄酮、总多酚含量测定

2.3.1 线性、精密度、重复性及稳定性试验

以芦丁、没食子酸为对照品,测定 E4 中总黄酮、总多酚的含量。芦丁标准曲线为 $y=13.669x-0.0093$ ($r=0.9994$), 线性范围为 10.00~70.00 $\mu\text{g/mL}$ 。没食子酸的标准曲线是 $y=123.2x-0.0006$ ($r=0.9997$), 线性范围为 0.50~84.00 $\mu\text{g/mL}$ 。精密度、重复性、稳定性试验结果见表 1。

2.3.2 加样回收率试验和含量测定

精密称取已知总黄酮含量及总多酚含量的疏花蔷薇花粉, 平行 9 份, 分别按 80%、100% 和 120% 的比例精密加入芦丁和没食子酸对照品, 制得样品溶液, 按“1.5”项下方法测定, 计算回收率及 RSD 值, 见表 2。

按照“2.3.1”项下方法, 测得 E4 中总黄酮、总多酚含量分别为 7.01、17.19 mg/g 。

2.4 RAW264.7 细胞体外抗氧化结果分析

2.4.1 CCK-8 确定安全质量浓度范围

E4 在质量浓度 3.13~12.50 $\mu\text{g/mL}$ 范围, RAW264.7 细胞存活率均 $\geq 80\%$, 表明在此质量浓度范围 E4 对细胞毒性作用较小; Vc 在质量浓度 3.13~12.5 $\mu\text{g/mL}$ 范围, RAW264.7 细胞存活率 $\geq 80\%$, 表明在此质量浓度范围 Vc 对细胞毒性作用较小; D-gal 在质量浓度 3.13~275 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 细胞存活率 $\geq 60\%$, 表明在安全质量浓度范围内对巨噬细胞 RAW264.7 存在一定的损伤作用。见图 2。

根据 CCK-8 细胞毒性检测结果, 选择 E4 的 IC_1 (0.50 $\mu\text{g/mL}$)、 IC_5 (5 $\mu\text{g/mL}$)、 IC_{10} (10 $\mu\text{g/mL}$) 为低、中、高剂量组, 模型组 D-gal 的质量浓度为 275 $\mu\text{g/mL}$ 、阳性药 Vc 的质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 进行干预, 开展后续抗氧化实验。

表 3 细胞中SOD、GSH-PX、LDH、CAT活力及MDA的含量

Table 3 Contents of SOD, GSH-PX, LDH, CAT viability and MDA in cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	SOD 活力 (U/mg)	GSH-PX 酶活力 (U/mg)	LDH 酶活力 (U/mg)	CAT 酶活力 (U/mg)	MDA 含量 (mmol/mg)
空白对照组	18.05 ± 2.95	133.24 ± 15.05	214.67 ± 24.26	6.17 ± 0.70	7.17 ± 0.81
模型组	2.05 ± 0.25###	57.83 ± 6.65###	76.71 ± 8.82###	1.18 ± 0.14###	24.10 ± 2.76##
Vc 组	12.01 ± 0.41**	119.17 ± 23.11**	201.91 ± 39.17**	2.74 ± 0.53**	8.21 ± 1.59**
E4 低剂量组	9.25 ± 0.58**	88.05 ± 25.62**	166.29 ± 48.39**	1.43 ± 0.42**	22.56 ± 6.57**
E4 中剂量组	10.72 ± 1.19**	97.62 ± 22.06**	229.24 ± 51.81**	1.58 ± 0.36**	14.88 ± 3.37**
E4 高剂量组	13.12 ± 1.01**	108.03 ± 10.80**	262.83 ± 26.28**	1.86 ± 0.19**	8.21 ± 0.79**

注: #: 与空白组对比; ###: $P < 0.01$; #: $P < 0.05$; *: 与模型组对比; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

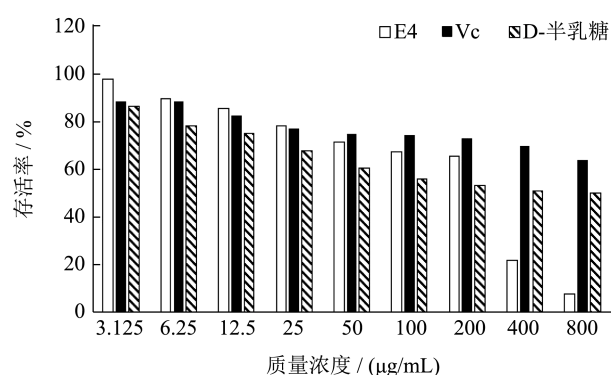


图 2 E4、Vc、以及 D-半乳糖对 RAW264.7 细胞的安全质量浓度范围

Fig.2 Safe mass concentrations of E4, Vc and D-galactose on RAW264.7 cells

2.4.2 疏花蔷薇花提取物E4对氧化应激损伤细胞存活率的影响

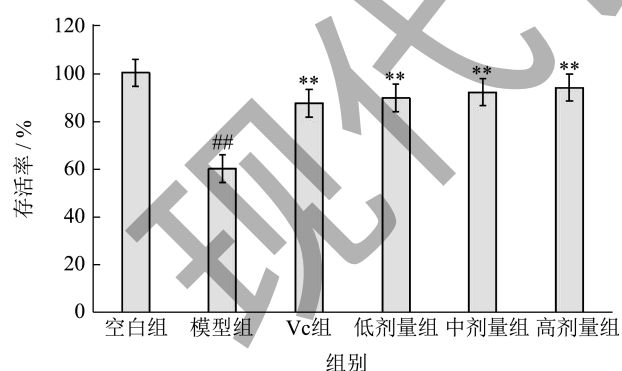


图 3 E4 对氧化应激损伤细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of E4 on cell survival rate damaged by oxidative stress ($\bar{x}\pm s, n=6$)

注: #: 与空白组对比, ###: $P < 0.01$, #: $P < 0.05$; 与模型组对比, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$.

与对照组相比, D-gal (质量浓度 275 $\mu\text{g/mL}$) 诱导后, RAW264.7 细胞存活率降低至 60.33% ($P < 0.01$), 表明对 RAW264.7 细胞造成了有效的

氧化损伤; 与模型组相比, E4 低、中、高剂量组均提高了细胞存活率并有显著差异 ($P < 0.01$), 其存活率明显提高至 89.57%、91.95%、93.85%, 且细胞存活率随 E4 质量浓度升高而升高。

Vc 作为天然抗氧化剂, 抗氧化活性强, 有助于机体清除过剩自由基, 达到抗衰老作用。以 Vc 作为阳性药, E4 组低、中、高剂量组的细胞存活率明显高于模型组, 并高于 Vc 组 ($P < 0.01$)。结果表明, E4 组低、中、高剂量组预保护处理均能显著提高细胞存活率 ($P < 0.01$)。见图 3。

2.4.3 E4对细胞中SOD、GSH-PX、LDH、CAT活力及MDA的含量

与模型组相比, E4 各剂量组均升高了 RAW264.7 细胞中 SOD、GSH-PX、LDH、CAT 等抗氧化酶活力 ($P < 0.01$), 降低细胞了中 MDA 含量 ($P < 0.01$), 并呈明显剂量依赖效应。见表 3。表明 E4 可以通过增强细胞内抗氧化酶 SOD、GSH-PX 及 CAT 活力, 提高机体清除过剩自由基效率, 减轻细胞的氧化应激损伤^[20]; 同时, 随着体内自由基的减少, 脂质不易与自由基反应从而降低 MDA 的生成, 达到保护细胞膜目的, 减少了 LDH 向细胞外流失, 提高 LDH 转化乳酸效率, 可更高效的为机体提供能量^[16]。

结果表明, E4 具有提高多种抗氧化酶的活力, 增强机体对自由基的清除能力, 同时可降低 MDA 含量, 减轻机体的氧化损伤程度, 在一定程度上增强了机体抗衰老作用。

3 结论

疏花蔷薇花不同极性部位提取物均具有一定的抗氧化能力, 综合 3 种自由基清除率试验结果, 其中以提取物 E4 对自由基清除率较高, 并呈明显剂

量依赖性。E4对DPPH自由基、ABTS⁺自由基和羟基自由基清除率IC₅₀依次为0.10、0.03、42.70 μg/mL,而Vc对3种自由基清除率IC₅₀依次为1、0.01、5.2 μg/mL,表明E4具有良好的抗氧化活性。E4可以有效减缓D-gal诱导的RAW264.7细胞氧化损伤模型的氧化损伤程度,使细胞存活率提高至90%左右,可以明显增强细胞内抗氧化酶SOD、GSH-PX、LDH、CAT的酶活力($P<0.01$),降低MDA含量($P<0.01$),并呈剂量依赖效应关系,表明E4具有保护调节细胞氧化还原系统,清除氧自由基及有害物质的作用。

综上所述,疏花蔷薇花提取物E4可通过增加细胞内抗氧化酶活力,抑制氧化反应导致的膜系统损伤,增强细胞对氧化应激的耐受能力发挥良好的抗氧化能力,具有开发为天然来源抗氧化剂的潜力。本研究结果为后续新疆疏花蔷薇花的抗氧化药效成分、作用机制研究及其抗氧化产品开发提供了实验依据。

参考文献

- [1] 张泽生,卢亚莉,高云峰,等.常见生物模型抗氧化活性评价方法的研究进展[J].中国食品添加剂,2015,3:178-183.
- [2] WU W X, JIANG S, LIU M, et al. Simultaneous process optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and ellagic acid from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and its biological activities [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 12(80): 105833.
- [3] 王桂林,郭敏敏,吕雅娟,等.氧氟沙星-Fenton体系荧光法测定和评价中草药抗氧化活性[J].分析科学学报,2023,39(4):497-500.
- [4] 王春燕,张珊滋,王宁,等.疏花蔷薇果提取物的急性及亚慢性毒性研究[J].饲料研究,2023,46(3):88-92.
- [5] 刘士侠,从者福.新疆蔷薇[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,2000.
- [6] 徐新,巴哈尔古丽·黄尔汗.哈萨克药志[M].北京:民族出版社,2009:330-332.
- [7] WANG N, SUN J, ZHANG S Z, et al. Microscopic investigations and pharmacognostic techniques for the standardization of the fruits of *Rosa laxa* Retz [J]. Microscopy Research and Technique, 2022, 85(3): 1035-1045.
- [8] 刘贵阁,钟耀广,陈冰洁,等.不同醇沉米糠多糖的体外抗氧化和降血糖活性研究[J].保鲜与加工,2023,23(3):29-36.
- [9] 严和平,洪亮,徐进诺,等.红河州13种食用花卉的总黄酮、总多酚含量测定[J].食品研究与开发,2018,39(9):142-147.
- [10] DUNKHUNTHOD B, TALABNIN C, MURPHY M, et al. *Gymnema inodorum* (Lour.) Decne. extract alleviates oxidative stress and inflammatory mediators produced by RAW264.7 macrophages [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 8658314.
- [11] 李海涛,李沁,蔡飞,等.芹菜素对小鼠RAW264.7巨噬细胞极化和炎症反应的作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2023,49(3):549-556.
- [12] 张珊滋,王春燕,丁文欢,等.新疆疏花蔷薇果不同极性部位的体外抗肿瘤活性研究[J].化学与生物工程,2023,40(2):25-29,36.
- [13] 王贞丽,陈雪红,王丽华,等.茶多酚对D-半乳糖诱导衰老小鼠红细胞氧化损伤影响[J].齐鲁医学杂志,2006,21(3):210-212.
- [14] LI L, TAN H, ZOU Z, et al. Preventing necroptosis by scavenging ROS production alleviates heat stress-induced intestinal injury [J]. International Journal of Hyperthermia, 2020, 37(1): 517-530.
- [15] SHEEN L Y, SHEN S F, TSAI S J, et al. Effect of garlic active principle, diallyl disulfide, on cell viability, lipid peroxidation, glutathione concentration and its related enzyme activities in primary rat hepatocytes [J]. American Journal of Chinese Medicine, 1999, 27(1): 95-105.
- [16] 罗磊,张冰洁,马丽苹,等.金银花叶黄酮体外抗氧化能力及对H₂O₂诱导RAW264.7巨噬细胞损伤的保护作用[J].食品科学,2018,39(11):139-145.
- [17] FANG J, ZHAO X, LI S, et al. Protective mechanism of artemisinin on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide via activation of c-Raf-Erk1/2-p90rsk-CREB pathway [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10 (1): 312.
- [18] ZHANG Z, ZHAO X, GAO M, et al. Dioscin alleviates myocardial infarction injury via regulating BMP4/NOX1-mediated oxidative stress and inflammation [J]. Phytomedicine, 2022, 103: 154222.
- [19] 王以薇,曹永安,施文艳,等.神经生长因子对小鼠腹腔巨噬细胞SOD活性、MDA含量的影响[J].江苏医药,2005,31(12):919-920.
- [20] 罗磊,关宁宁,杨永庆,等.牡丹花蕊黄酮对H₂O₂诱导RAW264.7巨噬细胞损伤的保护作用[J].食品科学,2018,39(21):142-148.