

# 5-羟甲基糠醛抗氧化性及其抗细胞增殖活性的研究

赵玲, 陈建平, 李琳, 周蓉, 苏健裕

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文采用 ABTS 法、DPPH 法和红细胞溶血试验来评价 5-羟甲基糠醛的抗氧化性, 并在溶血试验中, 通过环境扫描电镜 (ESEM) 对血红细胞的形貌进行直观的观察; 同时, 采用 MTT 实验考察 5-羟甲基糠醛的抗细胞增殖活性。结果表明, 当 5-羟甲基糠醛浓度为 6.4 mM 时, 5-HMF 对 ABTS 自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为  $53.98 \pm 0.016\%$  和  $17.80 \pm 0.010\%$ , 说明 5-羟甲基糠醛具有清除 ABTS 和 DPPH 自由基的能力; 且当 5-羟甲基糠醛浓度为 12.0 mM 时, 其对红细胞的溶血抑制率高达  $89.95 \pm 0.001\%$ , 说明它可以抑制 AAPH 诱导的血红细胞氧化损伤, 并通过环境扫描电镜 (ESEM) 观察血红细胞的形貌进一步验证了这一结论。5-羟甲基糠醛能抑制人正常肝细胞 L02、皮肤黑色素瘤细胞 A375 和结肠癌细胞 SW480 的增殖, 其中对 A375 细胞具有最大的活性, 这一结论通过倒置显微镜观察细胞形态变化得到进一步验证。

**关键词:** 5-羟甲基糠醛; 抗氧化; 抗增殖

**文章编号:** 1673-9078(2013)11-2638-2642

## Antioxidant and Antiproliferative Activities of 5-Hydroxymethylfurfural

ZHAO Ling, CHEN Jian-ping, LI Lin, ZHOU Rong, SU Jian-yu

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The antioxidant of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) was evaluated by ABTS, DPPH and hemolysis assay. In the hemolysis assay, the morphological changes of erythrocytes were observed directly by an environmental scanning electron microscope (ESEM). Meanwhile, MTT assay was carried out to investigate antiproliferative activities of 5-HMF. The results showed that the scavenging rates of ABTS and DPPH were  $53.98 \pm 0.016\%$  and  $17.80 \pm 0.010\%$ , respectively when using 5-HMF at 6.4 mM. And the emolysis inhibition rate reached  $89.95 \pm 0.001\%$  at a concentration of 12.0 mM, suggesting that 5-HMF could inhibit the hemolysis oxidative damage induced by AAPH. The results was verified by observation of the morphological changes of erythrocytes using ESEM. 5-HMF showed a higher antiproliferative activity on human melanoma A375 cells than L02 cells and SW480 cells, which was certificated by inverted microscope.

**Key words:** 5-Hydroxymethylfurfural; antioxidant; antiproliferative

5-羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural, 5-HMF), 又称 5-羟甲基-2-糠醛、羟甲基糠醛, 5-羟甲基-2-呋喃糠醛, 分子式为  $C_6H_6O_3$ , 纯品呈暗黄色液体、粉末或针状结晶, 有甘菊花味, 易液化, 是一种呋喃类化合物, 主要来源于己糖的受热分解和美拉德反应, 广泛存在于含糖量高的食品和植物中, 且含量较高<sup>[1-2]</sup>。如 5-HMF 在白酒和果汁中的含量高达 0.2 g/L, 在大麦、干果和咖啡中超过了 1.0 g/kg, 在菊苣中甚至可以达到 20.0 g/kg。目前, 人的日平均摄入量为 30~150 mg/d, 比其它热引起的物质 (如丙烯酰胺、呋喃) 高几个数量级<sup>[3]</sup>。因此, 关于 5-HMF 的安全性研究成为热点, 也逐渐引起争议。一方面, 有报道称,

收稿日期: 2013-07-14

基金项目: 973项目 (2012CB720800); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD37B01); 国家自然科学基金资助项目 (31101278)

通讯作者: 苏健裕 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为功能活性因子及其生物利用

5-HMF 可通过吸入或皮肤接触被人体吸收, 刺激眼睛、上呼吸道、皮肤和黏膜等, 损害横纹肌、内脏及神经, 并能与人体蛋白质结合产生蓄积中毒, 在含糖葡萄糖或其他单糖的制剂中作为一种重要的相关物质加以控制, 目前, 其在葡萄糖输液中的限量一般为 0.02%, 并被作为啤酒、蜂蜜等食品的感官评价指标<sup>[4]</sup>。另一方面, 有研究报道 5-HMF 具有一定的药理活性, 如抗氧化、抗心肌缺血、抗酪氨酸酶、改善血液流变学、影响甘草酸代谢、降低血中胆固醇药物含量、抑制肿瘤等作用<sup>[5-6]</sup>, 在中药研究中被认为是中药的活性成分, 如山茱萸<sup>[7]</sup>、枸杞<sup>[8]</sup>等。

针对这一现状, 本文对 5-HMF 的安全性进行评价, 分别采用 ABTS 法、DPPH 法和溶血试验评估 5-HMF 的抗氧化的活性, 并通过 MTT 实验考察其抑制人体常见细胞 (正常肝细胞 L02、皮肤黑色素瘤细胞 A375 和结肠癌细胞 SW480) 的增殖作用, 为其在食品、医药、化妆品等方面的合理使用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

5-羟甲基糠醛(分析纯, >99.90%, 分子式 126.11), ABTS、DPPH、MTT、PI 染液, 美国 Sigma 公司; AAPH、PBS, 广州齐云生物技术有限公司; 高糖 DMEM 培养基, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; DMSO, 天津市百世化工有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 人血细胞, 健康志愿者; 人正常肝细胞 L02, 南京凯基生物技术有限公司; 皮肤黑色素瘤细胞 A375, 结肠癌细胞 SW480, 美国模式培养物保藏所。

BS224S 电子天平, 德国 Sartorius 公司; 震荡型恒温近似浴, 微型离心机, 美国 Thermo 公司; 微量加样器, 德国 Ependoff 公司; 环境扫描电子显微镜, 荷兰 FEI 公司; 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 倒置光学显微镜, 奥林巴斯; 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 ABTS 自由基清除能力的测定<sup>[9]</sup>

根据 Miller 等<sup>[10]</sup>人的方法, 由 ABTS 溶液和 MnO<sub>2</sub> 混合反应产生 ABTS<sup>+</sup> 自由基。配置 6 mM 的 ABTS 水溶液, 并加入过量的 MnO<sub>2</sub> 反应后过滤, 制成 ABTS<sup>+</sup> 储备液, 使用时稀释其在 734 nm 的吸光度值为 0.50±0.02。将 20 μL 不同浓度的 5-HMF 和 180 μL ABTS<sup>+</sup> 工作液加入 96 孔板中, 充分混合, 6 分钟后在 734 nm 处测吸光度, 并根据公式 (1) 计算不同浓度的 5-HMF 对 ABTS<sup>+</sup> 的清除率。

$$\text{ABTS}^{\cdot+}\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100 \quad (1)$$

注: A<sub>样品</sub> 为加入样品的吸光度, A<sub>空白</sub> 为空白组的吸光度。

#### 1.2.2 DPPH 自由基清除能力的测定<sup>[9]</sup>

根据 Okada 等<sup>[11]</sup>人的方法制备 DPPH<sup>+</sup> 自由基, 并制成在 515 nm 处吸光度为 0.50±0.02 的 DPPH<sup>+</sup> 工作液将 20 μL 不同浓度的 5-HMF 和 180 μL DPPH<sup>+</sup> 工作液加入 96 孔板中, 充分混合, 6 min 后在 734 nm 处测吸光度, 并根据公式 (2) 计算不同浓度的 5-HMF 对 DPPH<sup>+</sup> 的清除率。

$$\text{DPPH}^{\cdot+}\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{空白}}) \times 100 \quad (2)$$

注: A<sub>样品</sub> 为加入样品的吸光度, A<sub>空白</sub> 为空白组的吸光度。

#### 1.2.3 溶血实验<sup>[12]</sup>

取健康成人新鲜血液于 1500 g 离心机中离心 10

min, 用 PBS (pH 7.4) 洗 3 次得到红细胞, 并制成 20% 的红细胞悬液。

AAPH 诱导红细胞溶血的浓度优化: 在 0.1 mL 20% 红细胞悬液中分别加入终浓度为 0、50、100、200、300、400 mM 的 AAPH, 37 °C 下震动孵育 2 h, 在 540 nm 处测其吸光度。

AAPH 诱导红细胞溶血的时间优化: 在 0.1 mL 20% 红细胞悬液中加入终浓度为 100 mM 的 AAPH, 37 °C 下震动避光孵育, 在 540 nm 处测其吸光度, 每隔 30 min 测一次。

5-HMF 对 AAPH 诱导的红细胞氧化损伤的抑制作用: 0.1 mL 20% 红细胞悬液经 0.1 mL 不同浓度的 5-HMF (0.0、1.5、3.0、6.0、12.0 mM) 预处理 20 min 后, 加入 0.2 mL 终浓度为 100 mM 的 AAPH 溶液, 微震, 避光孵育 2 h。单独用 5-HMF 处理红细胞来检测其本身是否具有溶血性, 以超纯水处理的红细胞作为全溶血组, 以 0.1 mL 20% 红细胞悬液和 0.3 mL PBS 共同孵育 2 h 作为空白对照组, 以 1.5 mM 的 Vc 作阳性对照。取各处理组的溶液 50 μL 用 PBS 缓冲液稀释至 1 mL, 1500 g 离心 10 min 后取上清, 在 540 nm 处测其吸光度, 并根据公式 (3) 计算各处理组的溶血率。

$$\text{溶血率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{全溶血}} - A_{\text{空白}}) \times 100 \quad (3)$$

注: A<sub>样品</sub> 为加入样品的吸光度, A<sub>空白</sub> 为空白组的吸光度, A<sub>全溶血</sub> 为全溶血组的吸光度。

#### 1.2.4 红细胞形态学观察

各处理组红细胞经适当稀释后, 取 10 μL 细胞稀释液均匀涂在硅片上, 加入 2.5% 戊二醛固定 5~10 min, 用双蒸水洗硅片 3 次, 然后放在通风处自然风干。制片时, 要求细胞为单层, 无重叠。样品制片完成后用环境扫描电镜观察细胞形貌。

#### 1.2.5 细胞存活率检测及形态学观察<sup>[13~14]</sup>

将人正常肝细胞 L02 (密度为 2.0×10<sup>4</sup> cells/mL)、皮肤黑色素瘤细胞 A375 (密度为 1.5×10<sup>4</sup> cells/mL) 和结肠癌细胞 SW480 (密度为 1.5×10<sup>4</sup> cells/mL) 各 100 μL 接种于 96 孔板中, 放入 37 °C 培养箱过夜培养, 加入 5-HMF, 使其终浓度为 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mM, 继续于 37 °C 培养箱中培养 72 h, 用倒置显微镜观察细胞生长状态及形貌。然后用 MTT 法检测细胞存活率, 即每孔加入 25 μL MTT (5 mg/mL), 37 °C 培养 4 h 后, 抽去上清液, 加入 150 μL DMSO/孔, 震荡 10 min, 用酶标仪在 570 nm 处测其吸光度值, 并根据公式 (4) 计算存活率。

$$\text{存活率}(\%) = A_{\text{样品}} / A_{\text{空白}} \times 100 \quad (4)$$

注: A<sub>样品</sub> 为加入样品的吸光度, A<sub>空白</sub> 为空白组的吸光度。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 专业统计软件进行数据分析, 结果用平均值±SD 表示。与对照组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01。

## 2 结果与讨论

### 2.1 5-HMF 对 ABTS 自由基的清除能力

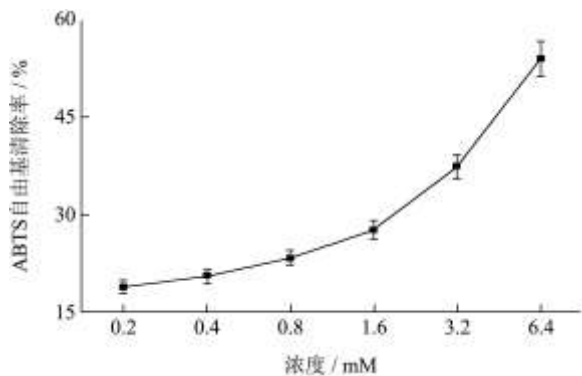


图 1 不同浓度的 5-HMF 对 ABTS 自由基的清除率

Fig.1 ABTS radical scavenging rate of 5-HMF with different concentrations

5-HMF 清除 ABTS 自由基的实验结果如图 1 所示, 5-HMF 浓度为 0.2~6.4 mM 时, 随着浓度的增加, 其对 ABTS 自由基的清除率越高; 当浓度为 6.4 mM 时, 5-HMF 对 ABTS 自由基的清除率达到 53.98±0.016%。证明了 5-HMF 具有清除 ABTS 自由基的能力, 且呈现量效关系。

### 2.2 5-HMF 对 DPPH 自由基的清除能力

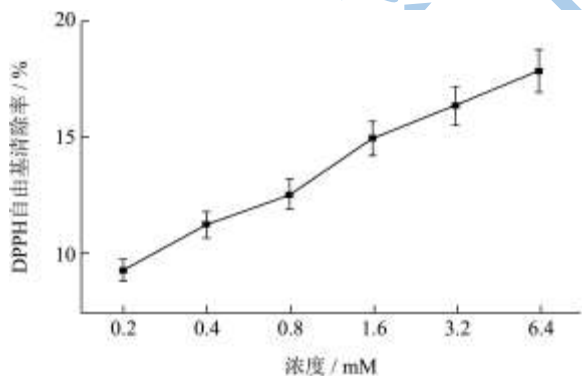


图 2 不同浓度的 5-HMF 对 ABTS 自由基的清除率

Fig.2 DPPH radical scavenging rate of 5-HMF with different concentrations

5-HMF 对 DPPH 自由基的清除率如图 2 所示, 5-HMF 浓度为 0.2~6.4 mM 时, 随着浓度的增加, 其对 ABTS 自由基的清除率越高; 当浓度为 6.4 mM 时, 5-HMF 对 DPPH 自由基的清除率仅达到 17.80±0.010%。可以看出 5-HMF 对 DPPH 自由基的清除能力同样呈量效关系, 但清除能力比其对 ABTS 自

由基的清除能力弱。

### 2.3 5-HMF 对红细胞溶血的保护作用

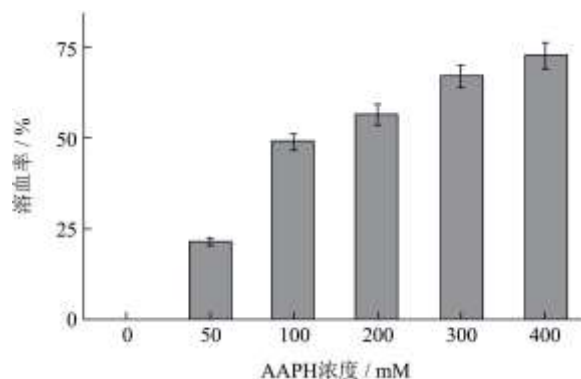


图 3 AAPH 诱导血红细胞溶血的剂量效应

Fig.3 The dose effect of AAPH on erythrocyte hemolysis

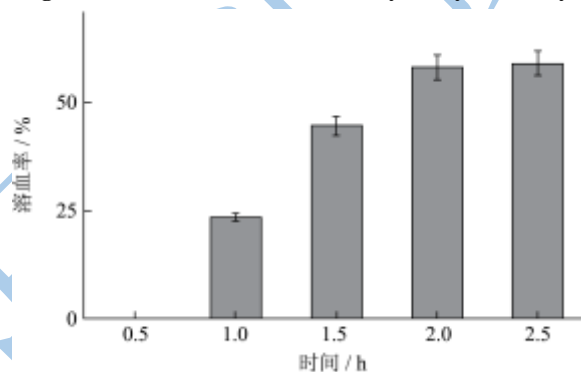


图 4 AAPH 诱导血红细胞溶血的时间效应

Fig.4 The time effect of AAPH on erythrocyte hemolysis

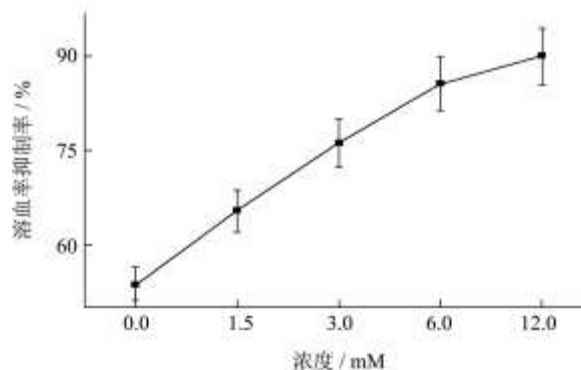


图 5 5-HMF 对 AAPH 诱导血红细胞溶血的保护作用

Fig.5 The protective effect of 5-HMF on erythrocyte hemolysis induced by AAPH

由图 3 可以看出, 随着 AAPH 浓度的增大, 细胞溶血率逐渐增大, 但在 AAPH 浓度小于 100 mM 时, 细胞溶血率增大较快, 大于 100 mM 时, 细胞溶血率上升缓慢, 且在 100 mM 时, 溶血率为 48.83 ± 0.001%, 综述所述, AAPH 浓度应选为 100 mM。

由图 4 可以看出, 固定 AAPH 浓度, 细胞溶血率随着时间的延长逐渐上升, 处理时间为 2 h 时, 溶血



率达到最大值, 2 h 以后溶血率趋于稳定, 因此, AAPH 诱导红细胞氧化损伤的最佳作用时间为 2 h。

实验发现, 5-HMF 本身对血红细胞的溶血率和空白对照组 ( $1.95 \pm 0.003\%$ ) 不存在显著差异, 可以认为其不引起红细胞溶血。5-HMF 对 AAPH 诱导的红细胞氧化损伤的抑制作用如图 5 所示。红细胞经 5-HMF 预处理后, 溶血抑制率明显上升, 且随着其浓度的增加逐渐增大, 当 5-HMF 浓度为 12.0 mM 时, 溶血抑制率为  $89.95 \pm 0.001\%$ , 未经 5-HMF 预处理的红细胞溶血抑制率为  $53.67 \pm 0.003\%$ 。说明 5-HMF 具有较好的溶血保护作用, 且呈现明显的剂量关系。这里用 1.5 mM 维生素 C 作阳性对照, 其溶血抑制率为  $88.75 \pm 0.006\%$ 。

## 2.4 红细胞的形貌观察

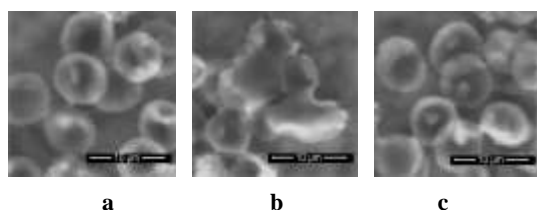


图 6 各不同处理组血红细胞的 ESEM 形貌图

### Fig.6 ESEM images of erythrocytes with different treatments

注: a 为正常红细胞形貌, b 为 100 mM AAPH 处理 2h 的红细胞形貌, c 为用 12.0 mM 的 5-HMF 预处理 20min 之后再加 100 mM AAPH 培养 2h 的红细胞形貌。

为了更直观地表征各处理组红细胞的形貌变化, 我们采用环境扫描电子显微镜对红细胞进行观察, 结果如图 6 所示。图中 a 为正常对照组, 可以看到正常红细胞典型的双凹面结构; 图中 b 为 100 mM AAPH 处理的损伤组, 细胞表面变得粗糙, 细胞塌陷, 高度有所降低, 形状不规则。图中 c 为经 5-HMF 预处理的保护组, 细胞损伤程度明显减弱, 几乎为正常组的形态, 呈现饼状结构。进一步验证了 5-HMF 对 AAPH 诱导的红细胞氧化损伤的保护作用。

## 2.5 细胞存活率检测及形态学观察

通过 MTT 实验对人正常肝细胞 L02、皮肤黑色素瘤细胞 A375 和结肠癌细胞 SW480 的存活率进行检测, 结果如图 7 所示。随着 5-HMF 浓度的增加, 三种细胞的存活率均逐渐降低, 且人正常肝细胞 L02 的存活率降低较慢, A375 和 SW480 的存活率降低较快, 当 5-HMF 浓度为 3.2 mM 时, 三种细胞的存活率分别是  $60.11 \pm 0.027\%$ ,  $6.13 \pm 0.012\%$ ,  $27.66 \pm 0.060\%$ 。由此可以看出, 5-HMF 对癌细胞 A375 和 SW480 增殖的抑制作用大于正常肝细胞 L02, 且对 A375 具有最大

活性。并通过倒置显微镜观察细胞形态变化, 结果如图 8 所示, 对同一种细胞来说, 与对照组相比, 经不同浓度 5-HMF 处理之后, 细胞皱缩变圆, 并随着 5-HMF 浓度的增加, 细胞数目逐渐减少, 死亡数目逐渐增多, 表明 5-HMF 具有抑制细胞增殖的作用。通过对 3 种细胞抑制作用的比较看出, 随着 5-HMF 浓度的增加, 癌细胞 A375 和 SW480 数量明显减少, 细胞皱缩变圆的程度较大, 而对正常肝细胞 L02 的影响不明显。进一步验证了上述结论。

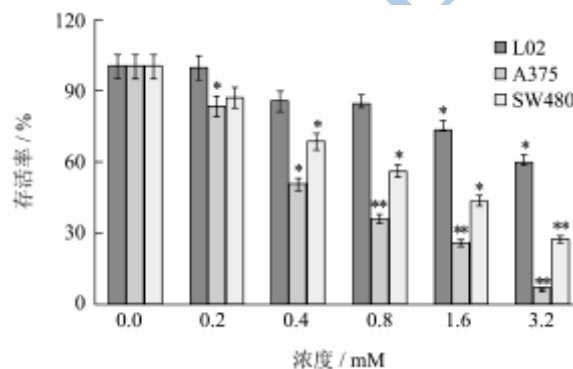


图 7 不同浓度 5-HMF 对 L02、A375 和 SW480 细胞存活率的影响  
Fig.7 Effects of 5-HMF with different concentrations on cell viabilities of L02, A375 and SW480

注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

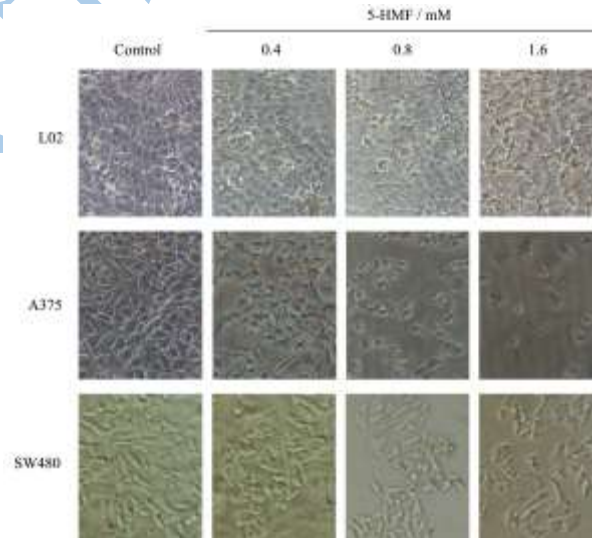


图 8 不同浓度 5-HMF 对 L02、A375 和 SW480 细胞形貌的影响  
Fig.8 Effects of 5-HMF with different concentrations on morphologies of L02, A375 and SW480

## 3 结论

3.1 本实验采用 ABTS 法和 DPPH 法考察了 5-HMF 清除自由基的能力; 以人血红细胞为实验对象, 建立 AAPH 诱导红细胞氧化损伤模型, 证明了 5-HMF 对红细胞溶血的抑制作用。实验操作简单, 材料易得, 为 5-HMF 抗氧化活性检测提供一种行之有效的模拟

体内环境方法。

3.2 通过 MTT 实验对人正常肝细胞 L02、皮肤黑色素瘤细胞 A375 和结肠癌细胞 SW480 的存活率进行检测,结果表明,5-HMF 对癌细胞 A375 和 SW480 增殖的抑制作用大于正常肝细胞 L02,且对 A375 具有最大活性。本研究对 5-HMF 在食品工业、糖工业和医药工业等方面的应用非常重要。尽管如此,我们仍需要对 5-HMF 抑制癌细胞增殖的作用机制进行深入探讨。

### 参考文献

- [1] 张玉玉,宋弋,李全宏.食品中糠醛和 5-羟甲基糠醛的产生机理、含量检测及安全性评价研究进展[J].食品科学,2012,33(5):275-280  
Zhang Y Y, Song Y, Li Q H. A Review on Formation Mechanism, Determination and Safety Assessment of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Foods [J]. Food Sci., 2012, 33(5):275-280
- [2] Palma M, Taylor L T. Supercritical fluid extraction of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from raisins [J]. J Agric Food Chem, 2001, 2: 628-632
- [3] Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies [J]. LWT-Food Sci. Tech., 2011: 44, 793-810
- [4] 郭天鑫.5-羟甲基糠醛的检测方法及其在食品中产生研究[D].天津:天津科技大学,2010  
Guo TX. Study on the Detection Method of 5-Hydroxymethyl-furfural and Its Generation in Foods [D]. Tianjing: Tianjing University of Science & Technology, 2010
- [5] 耿放,王喜军.5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J].中药基础研究,2005,7(6):52-56  
Geng F, Wang XJ. Present situation of study on 5-hydroxymethyl-2-furfural [J]. Basic research of traditional Chinese Medicine, 2005, 7(6): 52-56
- [6] 傅紫琴,王明艳,蔡宝昌.5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨[J].中华中医药学刊,2008,26(3):508-520  
Fu ZQ, Wang MY, Cai BC. Discussion of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Chinese Native Medicine Research Present situation [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2008, 26(3):508-520
- [7] Ding X, Wang M Y, Yao Y X, et al. Protective effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed Fructus Corni on human hepatocyte LO2 injured by hydrogen peroxide and its mechanism [J]. Journal of ethnopharmacology, 2010, 128(2): 373-376
- [8] Yamada P, Nemoto M, Shigemori H, et al. Isolation of 5-(hydroxymethyl) furfural from Lycium chinense and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells [J]. Planta medica, 2011, 77(5): 434-440
- [9] 樊梓鸾,王振宇.红豆越橘体外抗氧化和抗细胞增殖活性研究[J].现代食品科技,2010,26(10):1081-1086  
Fan ZM, Wang ZY. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Lingonberries in vitro [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(10): 1081-1086
- [10] Miller N J, Sampson J, Candeias L P, et al. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls [J]. FEBS Lett. 1996, 384, 240-242
- [11] Okada Y, Okada M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species [J]. J. Agric. Food Chem., 1998, 46: 401-406
- [12] Fan C D, Jiang J, Yin X, et al. Purification of selenium-containing allophycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* and its hepatoprotective effect against t-BOOH-induced apoptosis [J]. Food Chem., 2012, 134: 253-261
- [13] 刘慧燕,赵广才,赵谋明.江蓠硫酸脂多糖的体外抗肿瘤和免疫活性研究[J].现代食品科技,2006,23(1):28-29  
Liu HY, Zhao GC, Zhao MM. Study on Anti-tumor Activity and Immunomodulating Effects of Sulfated Polysaccharides from *Gracilaria tenuistipitata* in Vitro [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 23(1):28-29
- [14] Chen T, Zheng W, Wong Y S, et al. Mitochondria-mediated apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells induced by a novel selenadiazole derivative [J]. Biomed. Pharmacother, 2008, 62: 77-84