

桑葚多糖对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用

张培丽¹, 张帅^{1,2}, 陈雪香¹, 刘果¹, 王群¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 肇庆学院化学化工学院, 广东肇庆 526061)

摘要: 采用水提法和乙醇沉淀法制备得桑葚多糖 T2, 利用质量分数为 4% 的 ZnSO₄ 盐析法去除桑葚多糖 T2 中的蛋白质, 从而得到桑葚多糖 T3, 蛋白去除率高达 88.52%。然后采用 DEAE-52 纤维素离子交换层析法对桑葚多糖 T3 进行分离纯化, 共收集到 4 个组分 T3-1、T3-2、T3-3 及 T3-4, 其中 T3-1 和 T3-3 为桑葚多糖 T3 的主要组分。进而, 从对细胞氧化损伤保护作用的角度对桑葚多糖 T3 的 4 个组分的抗氧化性进行了检测。选用 700 μmol/L 的 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞损伤 8 h 为细胞氧化损伤模型, 考察 T3 各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响, 发现 T3-3 可使细胞存活率增大至 41.81%。最后以 T3-3 为研究对象考察其对 H₂O₂ 诱导的 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用。结果显示, 600 μg/mL 的 T3-3 对 PC-12 细胞氧化损伤具有最强保护作用, 表明高浓度的 T3-3 具有非常强的细胞抗氧化作用。

关键词: 桑葚多糖; 分离纯化; 抗氧化性; 离子交换层析; 氧化损伤

文章编号: 1673-9078(2015)11-20-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.004

Protective Effect of Mulberry Polysaccharides on H₂O₂-induced Oxidative Damage in PC-12 Cells

ZHANG Pei-li¹, ZHANG Shuai^{1,2}, CHEN Xue-xiang¹, LIU Guo¹, WANG Qun¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: Mulberry polysaccharide T2 was obtained by water extraction and ethanol precipitation. Proteins were removed by salting out with 4% (mass fraction) ZnSO₄ at a rate of 88.52%, to yield mulberry polysaccharide T3, which was isolated and purified by DEAE-52 cellulose ion exchange chromatography. Thus, four fractions: T3-1, T3-2, T3-3, and T3-4 were collected. T3-1 and T3-4 were the main components of mulberry polysaccharide T3. Subsequently, the antioxidant activity of the four components was measured in terms of protective effect on cellular oxidative damage. The cellular oxidative damage model was established after damage of PC-12 cells was induced by treatment with 700 μmol/L H₂O₂ for eight hours. Effects of all T3 fractions on normal PC-12 cellular proliferation were investigated and the results showed that T3-3 improved cell survival rate to 41.81%. Finally, the protective effect of T3-3 on H₂O₂-induced oxidative damage in PC-12 cells was investigated. The results showed that 600 μg/mL T3-3 exhibited the strongest protective effect, indicating that T3-3 exerts very strong cellular antioxidant activity at high concentrations.

Key words: mulberry polysaccharides; isolation and purification; antioxidant activity; ion exchange chromatography; oxidative damage

桑葚 (*Morus alba* L.), 是桑科桑属多年生木本植物桑树的果实, 不仅富含多种维生素、矿物质及有机酸等营养成分, 而且因含有多糖、芦丁苷、白藜芦醇及原花青素等多种活性成分而具有调节免疫力、抗肿瘤、抗衰老、抗炎症及降血糖等生理功效^[1]。植物多糖因大多具有较强清除自由基的功能而一直倍受国内外学者的关注, 因而开展桑葚多糖的抗氧化性研究对

收稿日期: 2014-12-23

基金项目: 广东高校国际科技合作创新平台项目 (2013g.jhz0003)

作者简介: 张培丽 (1980-), 女, 讲师, 研究方向为食品化学

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然活性产物及功能性食品

于提高桑葚这一宝贵资源的利用率, 增加桑葚的深加工途径, 以及丰富市场植物多糖类保健产品, 具有重要意义。

目前桑葚多糖相关文献多集中于粗多糖提取方面的研究。韩伟等^[2]采用絮凝法纯化桑葚多糖, 蛋白质去除率仅 30.14%。惠贤民^[3]利用合成大孔树脂对桑葚多糖进行吸附纯化, 所得多糖并未脱蛋白, 实际仍为粗多糖。Lee 等^[4]采用 DEAE-纤维素离子交换色谱法纯化桑葚中的水溶性多糖, 并对其单糖组成进行了测定。关于桑葚多糖的分离纯化, 目前存在着蛋白质去除率低, 纯度不高的问题, 另外, 桑葚多糖实际为几种单组分构成的多糖复合物, 但迄今尚无相关报道。

关于桑葚多糖的抗氧化性研究, 仅少量文献作了桑葚多糖清除自由基方面的报道。张文娜等^[5]以维生素 E 为对照, 考察桑葚多糖对超氧阴离子、羟基、DPPH 自由基的清除能力及对亚油酸氧化活性的抑制能力。结果显示桑葚多糖对以上自由基均有一定清除能力并能抑制亚油酸氧化活性。李颖等^[6]用热水浸提的桑葚多糖对羟基自由基和超氧负离子都有一定清除能力, 当桑葚多糖浓度为 0.7 mg/mL 时, 对羟基自由基和超氧负离子的清除率分别为 52.7% 和 31.2%。

本文采用 ZnSO₄ 盐析法高效去除桑葚多糖中的蛋白质, 并利用 DEAE-52 纤维素离子交换层析法对脱蛋白后的桑葚多糖进行分离纯化, 并收集到 4 种单组分。同时, 建立 H₂O₂ 诱导的 PC-12 细胞氧化损伤模型, 通过考察各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响及对 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用来研究桑葚多糖各组分的抗氧化性。本研究分离出了桑葚多糖多种单组分, 为下一步各组分的结构鉴定奠定了基础, 同时筛选到抗氧化性最强的桑葚多糖单组分, 有利于后续桑葚多糖对细胞损伤保护机理的深入研究。

1 料与方法

1.1 材料、试剂与仪器设备料

1.1.1 原料与试剂

桑葚, 购于广州天河农贸市场, 60 °C 烘干、粉碎, 过 60 目筛得桑葚样品备用。

DEAE-52 纤维素, 英国 Whatman 公司, 参照说明书进行预处理; 结晶体牛血清白蛋白, 美国 Sigma 公司; 大鼠嗜铬瘤细胞株 PC-12、胎牛血清、马血清、DMEM 高糖培养基, 上海拜力生物科技有限公司; MTT 试剂盒, 日本 TAKARA 公司; 考马斯亮蓝 G-250、苯酚、3,5-二硝基水杨酸、ZnSO₄、AgNO₃、二甲基亚砷 (DMSO) 及维生素 C (Vc) 等药品均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

204B3 旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; DL-5-B 低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; UV3010 紫外可见分光光谱仪, 日本日立高科技公司; FD-1 冷冻干燥机, 北京博医康技术公司; FW100 高速万能粉碎机, 天津市华鑫仪器厂; Φ 2.6×40 cm 层析柱, 上海精科实业有限公司; 3500 Da 透析袋, 广州威佳科技有限公司; GI6-2 二氧化碳恒温培养箱, 美国 Shellab 公司; LRH 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; TTL-16B 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂;

DG5032 型酶联免疫检测仪, 上海亿欣生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桑葚多糖的分离纯化

1.2.1.1 工艺流程

桑葚样品→100 °C, 料液比 1:30, 水提 2 h→离心除渣(4000 r/min, 20 min)→桑葚多糖 T1→浓缩至糖度 17%→85% 乙醇沉淀(料液比 1:3, 6 h, 4 °C)→离心, 取沉淀(4000 r/min, 20 min)→水复溶沉淀→桑葚多糖 T2→脱蛋白→离心, 留清液(4000 r/min, 20 min)→桑葚多糖 T3→85% 乙醇沉淀→离心, 取沉淀(4000 r/min, 20 min)→冻干→DEAE-52 纤维素离子交换层析纯化→按出峰收集 T3 各组分→3500 Da 透析 24 h, AgNO₃ 检测 Cl 残留→冻干得成品

1.2.1.2 桑葚多糖含量测定

(1) 总糖含量: 苯酚-硫酸法^[7]测定。标曲回归方程为 $y=10.655x+0.0052$, $R^2=0.996$, 曲线拟合良好。

(2) 还原糖含量: 3,5-二硝基水杨酸法^[8]测定。标曲回归方程为 $y=19.299x-0.0411$, $R^2=0.995$, 曲线拟合良好。

(3) 多糖含量 = 总糖含量 - 还原糖含量。

1.2.1.3 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法^[9]测定。标曲回归方程为 $y=0.0132x+0.0002$, $R^2=0.998$, 曲线拟合良好。

1.2.1.4 脱蛋白质

采用 ZnSO₄ 盐析法脱除桑葚多糖 T2 中的蛋白质。当蛋白溶液 pH 值大于等电点时, 蛋白质分子的酸性基团带有较多负电荷, 易与带正电荷的重金属离子如 Zn²⁺、Cu²⁺、Ag⁺、Pb²⁺ 及 Hg²⁺ 等结合成稳定的沉淀而析出^[10]。前期试验已测定桑葚中蛋白质等电点为 2.0。

$$\text{蛋白质脱除率}(\%) = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{C_2V_2} \times 100$$

式中, C₁ 与 C₂ 分别为脱蛋白前后蛋白质含量, mg/mL; V₁ 与 V₂ 分别为脱蛋白前后溶液体积, mL。

1.2.1.5 桑葚多糖 T3 分离纯化

DEAE-52 纤维素湿法装柱, 参照文献^[11]的方法。层析柱中填料高度 30 cm, 0、0.1、0.3、0.5 及 1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 流速 2.5 mL/min, 每一管收集 10 mL。绘制桑葚多糖 T3 分级流出的出峰图谱, 每个峰收集为一个组分, 经透析后冻干备用。

1.2.2 桑葚多糖 T3 各组分的抗氧化活性

1.2.2.1 PC-12 细胞培养及处理

PC-12 细胞培养基组成: 5% 胎牛血清, 8% 马血清, 86% DMEM 基础培养基, 1% 双抗 (DMEM 完全培养基), PC-12 细胞预处理如下: 取对数生长期的 PC-12

细胞,经吹打均匀,用 DMEM 完全培养基制成密度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板,100 μL /孔,待 12 h 贴壁后更换相应培养液,正常组每孔加入含 8% 马血清的 DEMA 完全培养液 100 μL 进行传代和后续试验。

1.2.2.2 MTT 法检测 PC-12 细胞活性

细胞培养结束前 4 h 吸出旧培养基,加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 100 μL ,继续培养 4 h 后终止培养。3000 r/min 离心 10 min,吸去孔内液体,每孔加 150 μL DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解。490 nm 波长下于酶联免疫检测仪测定各孔吸光值^[12]。

1.2.2.3 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞氧化损伤模型的建立

参考 Park^[13]的方法并加以改进。 H_2O_2 作用于 PC-12 细胞后其氧化作用会损伤细胞,损伤程度与 H_2O_2 浓度及作用时间呈一定正比关系。按照 1.2.2.1 准备后, H_2O_2 损伤组分别加入不同浓度 H_2O_2 (终浓度 100、250、400、550 及 700 $\mu\text{mol/L}$),每组 5 个复孔,继续培养 4、8 及 12 h。MTT 法检测细胞存活率,确定出 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞氧化损伤模型。

1.2.2.4 桑葚多糖 T3 各组分抗氧化活性测定

(1) 桑葚多糖 T3 各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响

按照 1.2.2.1 准备后,样品组分别加入等量不同浓度的 T3-1、T3-2、T3-3 和 T3-4 溶液(终浓度分别为 5、50、200、500 $\mu\text{g/mL}$),培养 24 h,MTT 法检测细胞存活率,选择细胞存活率最大的组分。

(2) 最佳桑葚多糖组分对 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用

按照 1.2.2.1 准备后,实验分组:正常对照组(含 8% 马血清的 DMEM 完全培养液 100 μL)、 H_2O_2 损伤组(含 8% 马血清的 DMEM 完全培养液 100 μL)、Vc 阳性对照组(25 $\mu\text{g/mL}$)、样品组(最佳桑葚多糖组分浓度分别取 50、100、200、400 及 600 $\mu\text{g/mL}$,各 100 μL)。培养 24 h 后,分别加入 H_2O_2 100 μL 于最佳作用浓度和时间条件下培养,每组 5 个复孔,MTT 法检测细胞存活率,研究最佳桑葚多糖组分对 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤的保护作用。

1.2.3 数据分析

利用 R 软件 (Version 3.0.2) 进行数据拟合,建立数学回归方程,分析 H_2O_2 浓度和作用时间对细胞存活率的影响,并最终建立 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞损伤的模型。

2 结果与讨论

2.1 桑葚多糖分离纯化结果

2.1.1 桑葚多糖 T2 中蛋白质脱除结果

桑葚多糖 T2 经不同质量分数的 ZnSO_4 盐析后脱除蛋白质,结果如图 1 所示。

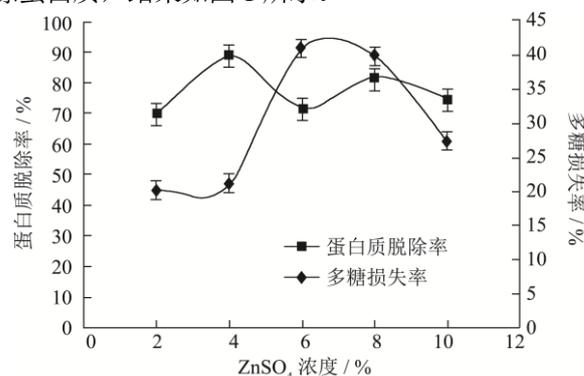


图 1 ZnSO_4 对桑葚多糖 T2 中蛋白质脱除率和多糖损失率的影响

Fig.1 Effect of ZnSO_4 concentrations on rate of protein removal and polysaccharide loss of mulberry polysaccharide T2

由图 1 可知,质量分数为 4% 的 ZnSO_4 对桑葚多糖 T2 的脱蛋白效果最好,蛋白质脱除率达 88.52%,此时多糖损失率亦较低,仅为 21.25%。桑葚多糖 T2 经盐析后纯度可达到 92.87%。综合考虑蛋白质脱除率和多糖损失率,添加 ZnSO_4 最佳质量分数为 4%。

2.1.2 桑葚多糖 T3 分离纯化结果

将脱蛋白后的桑葚多糖 T3 溶液浓缩后取 10 mL 上样进行 DEAE-52 纤维素离子交换层析,以不同浓度 NaCl 溶液梯度洗脱,苯酚-硫酸法追踪多糖流出,所得出峰图谱如图 2。

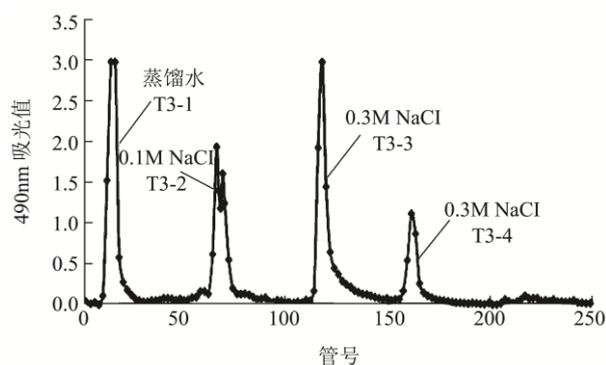


图 2 桑葚多糖 T3 离子交换层析出峰图谱

Fig.2 Ion exchange chromatography spectrum of mulberry polysaccharide T3

由图 2 可知,桑葚多糖 T3 经洗脱后可得到 4 个色谱峰:桑葚多糖 T3-1 (8-24 管,0 mol/L NaCl 洗脱),桑葚多糖 T3-2 (62-72 管,0.1 mol/L NaCl 洗脱),桑葚多糖 T3-3 (114-122 管,0.3 mol/L NaCl 洗脱)、桑葚多糖 T3-4 (158-164 管,0.3 mol/L NaCl 洗脱)。T3-1、

T3-3 及 T3-4 为单一色谱峰, T3-2 则分离出两个十分接近的峰。当 NaCl 浓度大于 0.3 mol/L 时, 无多糖流出。T3-1 和 T3-3 峰最高值均超出仪器最大量程 (吸光值为 3), 即为最高洗脱峰, 表明二者为桑葚多糖 T3 主要组分。

2.2 桑葚多糖 T3 各组分抗氧化活性测定结果

2.2.1 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞氧化损伤模型的建立

改变 H₂O₂ 浓度及作用时间建立 H₂O₂ 诱导的细胞损伤模型, 结果见表 1。

表 1 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的细胞存活率 ($r=3$, $x \pm s$)

Table 1 Cell survival rate of PC-12 cells with H₂O₂-induced oxidative damage

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	PC-12 细胞存活率/%		
		4 h	8 h	12 h
空白对照组	0	100.00 \pm 1.3	100.00 \pm 1.1	100.00 \pm 1.5
	100	97.18 \pm 1.9	94.06 \pm 3.0	86.61 \pm 0.5
	150	92.82 \pm 2.3	89.76 \pm 2.7	84.76 \pm 2.5
H ₂ O ₂ 损伤组	400	91.44 \pm 3.1	80.7 \pm 2.6	77.74 \pm 3.2
	550	86.79 \pm 0.9	73.49 \pm 1.7	72.89 \pm 2.4
	700	82.04 \pm 2.1	59.83 \pm 3.4	58.99 \pm 1.1

R 软件 (Version 3.0.2) 处理表 1 数据后回归分析结果如下: $z = 109.5850 - 0.0413x - 1.4433y$ (z : 细胞存活率; x : H₂O₂ 浓度; y : 作用时间)。从 x 和 y 参数看, 细胞存活率与 H₂O₂ 浓度和作用时间呈负相关, 作用时间一定时, H₂O₂ 浓度每增加 100 $\mu\text{mol/L}$, 细胞存活率减少 4.13%; H₂O₂ 浓度一定时, 作用时间每增加 1 h, 细胞存活率减少 1.43%。决定系数 $R^2=0.8739$, 即自变量可解释因变量 87.39% 的变化模型, 表明模型整体拟合较好。统计量 $F=51.99$, 对应概率值 $p<0.05$, 说明回归方程显著成立。

当 H₂O₂ 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, PC-12 细胞存活率在 12 h 时达到 86.61%, 而当 H₂O₂ 浓度为 700 $\mu\text{mol/L}$ 时, PC-12 细胞存活率在 12 h 时达到 58.99%, 细胞存活率随 H₂O₂ 浓度增大而降低, 表明高浓度 H₂O₂ 对 PC-12 细胞氧化损伤严重; 当 H₂O₂ 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, PC-12 细胞在 8 h 时的存活率比 4 h 时的存活率降低了 3.12%, 而 12 h 时细胞存活率却比 8 h 时的存活率低 7.45%。在 H₂O₂ 浓度为 700 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞在 8 h 时的存活率比 4 h 时的存活率下降了 22.21%, 而 12 h 时的存活率却比 8 h 时的存活率只降低 0.84%, 不仅说明细胞存活率随 H₂O₂ 作用时间的延长而降低, 而且也表明低浓度 H₂O₂ 需要一定时间才能对细胞造成明显损伤, 而高浓度 H₂O₂ 可使 PC-12 细胞短时间内

严重损伤。综合分析, 模型选用 700 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞损伤 8 h。

2.2.2 桑葚多糖 T3 各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响

桑葚多糖 T3 各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响, 结果如图 3。

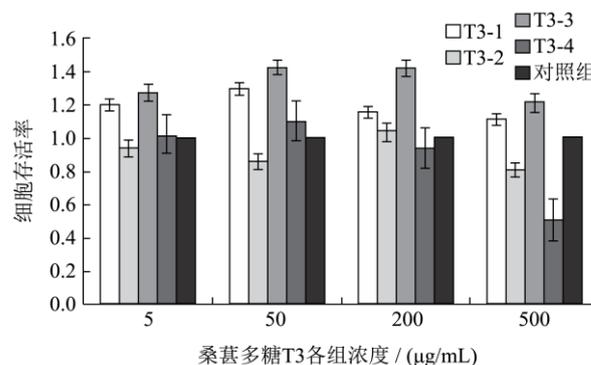


图 3 桑葚多糖 T3 各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of all T3 fractions on normal PC-12 cellular proliferation

注: * $p<0.05$ 差异显著, ** $p<0.01$ 差异极显著。

由图 3 可知, T3-3 和 T3-1 对 PC-12 细胞均有显著增殖作用。浓度为 50-200 $\mu\text{g/mL}$ 时, T3-3 可使细胞存活率增大 41.81%, 50 $\mu\text{g/mL}$ 时 T3-1 可增大细胞存活率 29.25%。T3-2 除在浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时可增大 3.89% 的存活率外, 其它浓度均毒害细胞, 使其平均存活率降至 90.66%, T3-4 则在 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内促进 PC-12 细胞增殖约 19.86%~29.25%, 高于 200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围则毒害细胞。因此, 选择使 PC-12 细胞存活率最高的 T3-3 作为研究对象, 探究其对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用。

2.2.3 T3-3 对 H₂O₂ 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用

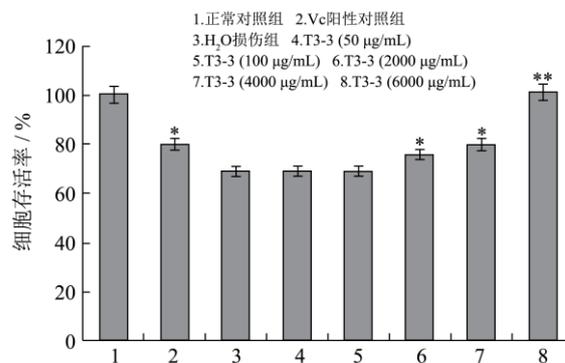


图 4 T3-3 对 H₂O₂ 诱导的 PC-12 细胞氧化损伤的影响

Fig.4 Effect of T3-3 on H₂O₂-induced oxidative damage in PC-12 cells

注: * $P<0.05$ 差异显著, ** $P<0.01$ 差异极显著 (与正常对照组相比)。

T3-3 对 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用, 结果如图 4。

由图 4 可知, Vc 阳性对照组和高浓度 ($> 200 \mu\text{g/mL}$) 的 T3-3 对 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞氧化损伤具有显著保护性, 低浓度 ($< 200 \mu\text{g/mL}$) T3-3 对 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞损伤几乎无保护性。在完全无保护状态下的 H_2O_2 损伤组和低浓度 T3-3 的细胞存活率接近, 为 68.45%, 说明低浓度 T3-3 对 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞损伤几乎无保护性; 当浓度达到 $400 \mu\text{g/mL}$ 时, T3-3 和 Vc 阳性组的细胞存活率相近, 为 79.10%, 与损伤组对比, 存活率提高 15.97%; 当浓度达到 $600 \mu\text{g/mL}$ 时, 和空白组的细胞存活率相近, 约为 100.52%, 与损伤组对比, 存活率提高 47.04%。可见, 提高 T3-3 浓度, 可大大增强其对 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用, 从而达到细胞抗氧化之目的。

3 结论

3.1 对桑葚多糖进行了分离纯化。因从桑葚中提取到的多糖 T2 结合蛋白质, 故先利用 $ZnSO_4$ 盐析法对 T2 脱蛋白。结果表明, $ZnSO_4$ 质量分数为 4% 时, T2 中的蛋白质脱除率最高, 达到 88.52%, 而多糖损失率则较小。然后, 对脱蛋白后的桑葚多糖 T3 利用 DEAE-52 纤维素离子交换层析法进行分离纯化, 并收集到 4 个组分 T3-1、T3-2、T3-3 及 T3-4, 除 T3-2 分离出两个十分接近的峰外, 其它组分均为单一色谱峰。根据我们的检索, 尚未发现有关桑葚多糖单组分分离的报道。Lee 研究了桑葚中水溶性多糖 (JS-MP-1) 的单糖组成, 认为半乳糖 (37.6%)、阿拉伯糖 (36.3%) 及鼠李糖 (18.4%) 是其主要成分, 但未对桑葚多糖进行单组分分离。桑葚多糖单组分的分离, 对于下一步研究各单组分中的单糖组成, 详细了解桑葚多糖的分子结构, 奠定了重要基础。

3.2 首次采用 H_2O_2 诱导的 PC-12 细胞氧化损伤模型对桑葚多糖 T3 单组分的抗氧化性进行了研究。先通过改变 H_2O_2 浓度及作用时间建立 H_2O_2 诱导的 PC-12 细胞氧化损伤模型, 确定模型选用 $700 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 诱导 PC-12 细胞损伤 8 h。然后, 通过考察 T3 各组分对正常 PC-12 细胞增殖的影响, 发现 T3-3 可使细胞存活率最高增大 41.81%, 因而以 T3-3 为研究对象, 探究其对 H_2O_2 诱导的 PC-12 细胞氧化损伤的保护作用。结果显示, $600 \mu\text{g/mL}$ 的 T3-3 作用于 H_2O_2 诱导的氧化损伤的 PC-12 细胞, 细胞存活率接近空白组的细胞存活率, 约为 100.52%, 表明高浓度的 T3-3 具有非常强的细胞抗氧化作用。

参考文献

- [1] Wu X Y, Liang L H, Zou Y, et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 443-453
- [2] 韩伟,张玲玲,黄兮,等.桑葚多糖的絮凝纯化及其抗氧化性[J].南京工业大学学报(自然科学版),2014,36(1): 97-101
HAN Wei, ZHANG Ling-ling, HUANG Xi, et al. Flocculating purification and oxidation resistance of mulberry polysaccharides [J]. Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition), 2014, 36(1): 97-101
- [3] 惠贤民.大孔吸附树脂纯化桑葚多糖的工艺研究[J].安徽农业科学,2009,37(6):2572-2573,2642
HUI Xian-min. Study on the purification of polysaccharide in mulberries by macroporous resin [J]. Journal of Agricultural Science, 2009, 37(6): 2572-2573, 2642
- [4] Lee J S, Synytsya A, Kim H B, et al. Purification, characterization and immunomodulating activity of a pectic polysaccharide isolated from Korean mulberry fruit Oddi (*Morus alba* L.) [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(3): 858-866
- [5] 张文娜,陆敏,姚清国,等.桑葚多糖的抗氧化活性研究[J].安徽农业科学,2012,40(1):156-157,173
ZHANG Wen-na, LU Min, YAO Qing-guo, et al. Study on the antioxidative activity of polysaccharides from fructus mori [J]. Journal of Agricultural Science, 2012, 40(1): 156-157, 173
- [6] 李颖,李庆典.桑葚多糖抗氧化作用的研究[J].中国酿造,2010,(4):59-61
LI Ying, LI Qing-dian. Antioxidant activity of mulberry polysaccharide [J]. China Brewing, 2010, (4): 59-61
- [7] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format [J]. Analytical Biochemistry, 2005, 339(1): 69-72
- [8] Goncalves C, Rodriguez-Jasso R M, Gomes N, et al. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates [J]. Analytical Methods, 2010, 2(12): 2046-2048
- [9] Sedmak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250 [J]. Analytical biochemistry, 1977, 79(1-2): 544-552
- [10] Arakawa T, Timasheff S N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding [J]. Biochemistry, 1984, 23(25): 5912-5913
- [11] Peng F, Ren J L, Xu F, et al. Comparative studies on the physico-chemical properties of hemicelluloses obtained by

- DEAE-cellulose-52 chromatography from sugarcane bagasse [J]. Food Research International, 2010, 43(3): 683-693
- [12] Ferrari M, Fornasiero M C, Isetta A M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro* [J]. Journal of Immunological Methods, 1990, 131(2): 165-172
- [13] Park J B. Isolation and quantification of major chlorogenic acids in three major instant coffee brands and their potential effects on H₂O₂-induced mitochondrial membrane depolarization and apoptosis in PC-12 cells [J]. Food & Function, 2013, 4(11): 1632-163

现代食品科技