

玫瑰蜂花粉中不同存在形态酚类物质的组成及其抑制 B16 黑色素瘤细胞的活性

庄永亮, 张燕新, 唐远龙

(昆明理工大学食品安全研究院, 云南昆明 650500)

摘要: 本文研究了玫瑰蜂花粉中游离态和结合态酚酸类物质含量和组成; 采用铁离子还原能力、ABTS 和 DPPH 自由基清除能力三种模型评价其抗氧化能力; 同时测定了其抑制酪氨酸酶活性的抑制作用; 并进一步研究了对 B16 细胞的增殖形态、黑色素含量和酪氨酸酶活性的影响。结果表明, 蜂花粉中游离态和结合态的总酚含量分别为 23.36 和 1.47 mg GAE/g 干重 (DW), 总黄酮含量为 19.12 和 2.42 mg RE/g DW。酚酸类物质大多以游离态形式存在, 富含槲皮素和芦丁, 而结合态中鞣花酸和 3,4-二甲氧基苯甲酸含量较高; 游离态和结合态多酚在三种模型中均显示较好的抗氧化活性; 抑制酪氨酸酶活性 IC_{50} 分别为 22.26 和 26.34 $\mu\text{g/mL}$, 显著高于 Vc; 一定程度上影响了 B16 细胞的增殖和形态, 同时显著降低细胞内相对黑色素含量和酪氨酸酶活性。玫瑰蜂花粉中不同形态多酚的活性与其酚酸的含量和组成有直接的关系。

关键词: 玫瑰蜂花粉; 多酚组成; 抗氧化活性; 黑色素; 酪氨酸酶

文章编号: 1673-9078(2016)8-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.001

Composition of Different Phenolic Extracts from Rose Bee Pollen and Their Inhibitory Activity against B16 Melanoma Cells

ZHUANG Yong-liang, ZHANG Yan-xin, TANG Yuan-long

(Yunnan Institute of Food Safety, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: The content and composition of free and bound phenolic acids in rose bee pollen were studied in this paper. Their antioxidant activity was evaluated by three models: ferric reducing ability of plasma (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging capacities. Their inhibitory effects on mushroom tyrosinase activity were also determined, and their effects on cell proliferation, melanin content, and tyrosinase activity in B16 melanoma cells were studied. The content of free and bound total phenolics in rose bee pollen were 23.36 mg GAE/g dry weight (DW) and 1.47 mg GAE/g DW, respectively, and the content of free and bound total flavonoid were 19.12 and 2.42 mg RE/g DW, respectively. The phenolic compounds existed mainly in the free form, with high levels of quercetin and rutin. The content of ellagic acid and 3,4-dimethoxybenzoic acid were relatively high in the bound extract of rose pollen. Both free and bound polyphenolics showed good antioxidant activities in three models, and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values against mushroom tyrosinase inhibitory activity were 26.34 $\mu\text{g/mL}$ and 22.26 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were significantly better than that of Vc. Rose bee pollen phenolic extract also affected the cell proliferation and morphology of B16 cells to some extent, and pronouncedly reduced the relative melanin content and tyrosinase activity in B16 cells. The activities of different forms of phenolic extract from rose bee pollen were obviously related to the phenolic composition and content.

Key words: rose bee pollen; phenolic composition; antioxidant activity; melanin; tyrosinase

皮肤的颜色主要是由黑色素的含量决定的, 酪氨酸酶是黑色素生物合成的关键酶和限速酶^[1], 黑色素的生成需要一个氧化压力环境, 同时氧化环境也是酪氨酸酶发挥活性的主要条件之一。因此, 利用天然植物提取物作为抗氧化剂和酪氨酸酶抑制剂越来越受到

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31301456)

作者简介: 庄永亮 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品高值化利用

人们的关注^[2]。蜂花粉是花粉、花蜜和蜜蜂分泌物的混合物, 除含有碳水化合物、蛋白质、脂肪、矿物质、纤维素、维生素和氨基酸外, 还含有多种植物化合物^[3]。因此, 蜂花粉具有很好的食药价值, 被誉为“浓缩的天然药库”、“全能的营养食品”、甚至是“内服的化妆品”等。蜂花粉具有抗氧化、抗菌、抗辐射、消炎以及肝保护等功能, 在改善心脑血管系统、增强免疫力、预防前列腺炎、保护消化系统、抗老化具有重

要意义^[4]。然而,由于受到植物来源、土壤类型、气候条件、养蜂人的行为、花粉收集位置等因素影响,蜂花粉的成分有很大的区别^[5]。

云南省作为我国第一花卉大省,拥有着巨大的高原特色玫瑰产业。因此,玫瑰蜂花粉产量丰富,对玫瑰蜂花粉进行研究并开发其更多的应用功能具有重要意义。本研究对云南玫瑰蜂花粉中不同存在形态的酚类物质(游离态和结合态)进行了总酚含量测定、酚酸组成分析、体外抗氧化和抑制蘑菇酪氨酸酶活性研究,在此基础上,将玫瑰蜂花粉中不同存在形态酚类物质的提取物作用于小鼠黑色素瘤 B16 细胞,测定了其细胞增殖率、细胞内黑色素相对含量及酪氨酸酶相对活性的影响。本文研究内容对玫瑰蜂花粉资源的深度利用以及附加值提升都有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 原料与样品

玫瑰花粉采自云南蒙自市,经 40 °C 烘干粉碎后,过 80 目筛,置于干燥箱中备用。

所有用于 HPLC 分析的标准品, DPPH, ABTS, TPTZ 和蘑菇酪氨酸酶购自美国 sigma 公司; L-酪氨酸, L-多巴胺, 牛血清白蛋白购自上海阿拉丁公司; 胎牛血清购自美国 Sciencell 公司, DMSO, MTT, 胰酶, 青霉素和链霉素购自北京索莱宝公司; DMEM, PBS 购自 Gibco (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 仪器与设备

SpectraMax M5 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Airstream A2 型 II 级生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); CelCulture CO₂ 培养箱(新加坡 ESCO 公司); Mshot 显微镜(广州市明美科技有限公司); L500 台式低速自动平衡离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TGL-20B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); TU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 游离态多酚的提取

玫瑰蜂花粉游离态多酚的提取参照扶雄等^[6]的方法并稍有改进。准确称取 2 g 样品,用正己烷去除脂肪,加入 100 mL 70% 的乙醇,超声提取 1 h, 4000 r/min 离心 15 min, 收集上清液,用 2 M 的 HCl 调 pH 至 2, 然后用乙酸乙酯萃取 4 次, 收集乙酸乙酯相加入 10 g Na₂SO₄ 去除

水分, 过滤, 45 °C 旋蒸至干, 再用 3 mL 纯甲醇溶解, -20 °C 冻存备用。

1.3.2 结合态多酚的提取

向上述游离态多酚提取后的剩余物中加入 100 mL 2 M 的 NaOH, 充入氮气密封后, 室温震荡 1 h, 4000 r/min 离心 15 min, 收集上清液稀释, 其他操作如游离态多酚提取^[6]。

1.3.3 总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu 法^[7]进行测定。上述提取液稀释至一定浓度, 取 0.5 mL 至具塞试管中, 加入 2.5 mL Folin-Ciocalteu 试剂, 混匀反应 5 min 后, 加入 7.5% 的 Na₂CO₃ 溶液 2 mL, 混匀后在室温下避光静置 60 min, 于 760 nm 下测定吸光值。总酚含量以玫瑰花粉中所含没食子酸 (mg GAE/g DW) 和儿茶素当量 (mg CE/g DW) 来表示。

1.3.4 总黄酮含量的测定

参照王猛等^[8]人文献中的方法略做改动。上述提取液经稀释后, 加入 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液混合后反应 6 min, 加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 混匀反应 6 min 后加入 4 mL 1 M NaOH, 最后用乙醇补至 10 mL, 于 510 nm 下测定吸光值。总黄酮含量以玫瑰花粉中所含儿茶素 (mg CE/g DW) 和芦丁当量 (mg RE/g DW) 来表示。

1.3.5 酚类组成分析

采用高效液相色谱法^[9]对花粉中 19 种酚类物质的含量进行测定, 采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 色谱条件为: 色谱柱型 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5-Micron); 流动相 A: 0.1% 冰醋酸水溶液, B: 0.1% 冰醋酸乙腈溶液; 紫外检测波长 280 nm; 流速 1 mL/min; 进样量 20 μL; 洗脱程序为: 0~2 min, B 为 8%~10%; 2~27 min, B 为 10~30%; 27~50 min, B 为 30~90%; 50~51 min B 为 90~100%; 51~55 min, B 为 100%; 55~58 min, B 为 100~8%。分别用不同浓度的标准品按上述色谱条件进行分析, 得标准曲线。

1.3.6 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除能力的测定参照 Goh^[10]的方法略作改动。上述提取液稀释成一定浓度梯度, 取 0.4 mL 加入 2 mL 0.1 mM 的 DPPH 甲醇溶液, 混匀, 室温暗处反应 30 min, 于 517 nm 下测定反应液吸光值。0.4 mL 蒸馏水+2 mL 甲醇为空白调零, 0.4 mL 蒸馏水+2 mL 0.1 mM 的 DPPH 甲醇溶液为对照, 清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

IC₅₀ 值表示清除率为 50% 时多酚的浓度 (μg/mL)。以 Vc 作为阳性对照。

1.3.7 ABTS自由基清除能力测定

5 mL 7 mM的ABTS和88 μ L 2.45 mM的过硫酸钾混合制成ABTS溶液, 室温暗处放置16 h后备用。使用前用乙醇稀释至734 nm处吸光值为 0.70 ± 0.02 的工作液。4 mL ABTS工作液与0.5 mL稀释成浓度梯度的多酚溶液混合, 于30 $^{\circ}$ C反应6 min后, 在734 nm处测定吸光值。0.5 mL水+4 mL无水乙醇为空白调零, 0.5 mL无水乙醇+4 mL ABTS工作液, 在0 min时的吸光值为对照, 清除率计算式为:

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

IC₅₀值表示清除率为50%时多酚的浓度(μ g/mL), 以Trolox作为阳性对照。

1.3.8 FRAP抗氧化能力测定

FRAP工作液为: 100 mL磷酸缓冲液(300 mM, pH为3.6), 10 mL TPTZ溶液(10 mM)和10 mL FeCl₃溶液, 混匀后置于37 $^{\circ}$ C水浴中备用。4.5 mL FRAP工作液与150 μ L稀释成浓度梯度的多酚溶液混合, 6 min后于593 nm处测定吸光值, 来表征样品的还原能力^[11]。EC₅₀值表示还原能力达到0.5 mmol/L FeSO₄的A_{593 nm}时多酚的浓度(μ g/mL)。以Vc作为阳性对照。

1.3.9 蘑菇酪氨酸酶抑制能力测定

分别取上述提取液0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL及1 mL, 用蒸馏水补足到1 mL, 加入3 mL L-酪氨酸溶液37 $^{\circ}$ C保温15 min, 加入蘑菇酪氨酸酶溶液0.1 mL, 于37 $^{\circ}$ C反应25 min, 470 nm下测定其吸光度值。按下面公式计算酪氨酸酶抑制率:

$$\text{酪氨酸酶抑制率}(\%) = (A_0 - A_1 + A_2) / A_0 \times 100\%$$

其中A₀为对照组吸光度值; A₁为实验组吸光度值; A₂为空白组吸光度值。

1.3.10 细胞增殖率测定

B16细胞购自中国科学院昆明动物研究所, 细胞在含有10% FBS、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉

$$\text{酪氨酸酶相对活性}(\%) = [(OD'_{30} - OD'_0) / Pro_1] / [(OD_{30} - OD_0) / Pro_0] \times 100\%$$

其中OD'₀, OD'₃₀表示样品在0 min和30 min时的光密度; OD₀, OD₃₀表示空白组在0 min和30 min时的光密度, Pro₁, Pro₀分别为样品和空白的蛋白质含量。

1.4 数据分析

实验数据用SPSS 20.0软件进行统计处理, 组间比较采用t检验, 若 $p < 0.05$, 表示两者有显著性差异。每个样品3次重复, 结果以均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 玫瑰蜂花粉中游离态和结合态总酚含量

素的高塘DMEM培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱中生长。每2 d进行传代维持细胞对数生长。

细胞增殖率参照Souza^[12]的方法进行测定并稍作改动。处于对数生长期, 生长状况良好的B16细胞按每孔 1.0×10^4 个接种于96孔板, 培养24 h后, 加入不同浓度的玫瑰蜂花粉多酚提取液, 继续培养24 h或48 h, 加入MTT孵育4 h后用DMSO溶解, 于570 nm处用酶标仪测定吸光值并计算细胞存活率:

$$\text{细胞增殖率}(\%) = OD_1 / OD_0 \times 100\%$$

其中OD₀为对照组吸光度值; OD₁为实验组吸光度值。

1.3.11 细胞内黑色素相对含量和细胞内酪氨酸酶相对活性测定

黑色素含量和酪氨酸酶活性的测定参照Hu等^[13]的方法进行测定。B16按每孔 2×10^5 个细胞接种于6孔板中, 在不同浓度玫瑰蜂花粉多酚提取液作用48 h后, 收集细胞溶于1 mL NaOH(1 M, 含10% DMSO)溶液中, 超声破碎30 min, 80 $^{\circ}$ C水浴30 min, 3000 r/min离心15 min后, 取上清液于450 nm测定OD值。蛋白质含量用南京建成生物工程研究所的总蛋白定量试剂盒进行测定, 黑色素相对含量按下面公式计算:

$$\text{黑色素相对含量}(\%) = (OD_1 / Pro_1) / (OD_0 / Pro_0) \times 100\%$$

其中OD₁和OD₀分别为样品和空白的光密度, Pro₁, Pro₀分别为样品和空白的蛋白质含量。

不同浓度玫瑰蜂花粉多酚提取物作用后细胞, 收集后, 用裂解液(含5% Triton X-100, 1 mM的磷酸缓冲液)在冰水浴中超声裂解, 取200 μ L上清液于37 $^{\circ}$ C孵育10 min后与50 μ L 0.1% L-DOPA溶液混合, 于0 min和30 min时在475 nm处测定OD值, 蛋白质含量用南京建成生物工程研究所的总蛋白定量试剂盒进行测定, 每mg蛋白质所含酪氨酸酶相对活性按下式计算:

和总黄酮含量

由表1可以看出, 玫瑰蜂花粉中多酚主要以游离态形式存在, 不论是以没食子酸还是儿茶素当量表示, 游离态多酚含量是结合态含量的15倍左右; 但以不同物质作为当量表示时, 多酚含量差异很大, 儿茶素当量表示的多酚含量总和比没食子酸当量表示多酚含量总和多24.3%, 其中游离态多酚以儿茶素当量表示时含量为29.03 mg CE/g DW, 远远大于以没食子酸当量表示的含量23.36 mg GAE/g DW。玫瑰蜂花粉中, 黄酮主

要以游离态形式存在, 游离态总黄酮是结合态总黄酮含量的7.9倍, 总黄酮含量以芦丁和儿茶素当量表示时差异不大, 以芦丁当量表示时为21.55 mg RE/g DW, 以儿茶素当量表示时为20.71 mg CE/g DW。玫瑰蜂花

粉总多酚含量与Kaškonienė等^[14]文献中报道的蜂花粉中多酚含量相当, 但总黄酮含量却高于报道的蜂花粉总黄酮含量。

表1 玫瑰蜂花粉的总酚和总黄酮含量

Table 1 Rose bee pollen total phenolic and total flavonoid content

	总多酚含量		总黄酮含量	
	以没食子当量表示	以儿茶素当量表示	以芦丁当量表示	以儿茶素当量表示
	/(mg GAE/g DW)	/(mg CE/g DW)	/(mg RE/g DW)	/(mg CE/g DW)
游离态	23.36±0.15b	29.03±0.18 ^b	19.12±0.11 ^b	18.29±0.10 ^b
结合态	1.47±0.02c	1.84±0.02 ^c	2.42±0.01 ^c	2.42±0.01 ^c
总和	24.84±0.14a	30.87±0.16 ^a	21.55±0.10 ^a	20.71±0.09 ^a

注: 表中数据为平均值±标准偏差, 不同字母表示差异显著($p < 0.05$), 同一列中的字母相同表示无显著性差异。

2.2 玫瑰蜂花粉中游离态和结合态多酚的酚酸组成

表2 玫瑰蜂花粉中多酚组成与含量

Table 2 Rose bee pollen profile and phenolic compound content

酚酸种类	游离态/($\mu\text{g/g}$)	结合态/($\mu\text{g/g}$)	总和/($\mu\text{g/g}$)
原儿茶酸	nd	nd	nd
绿原酸	nd	nd	nd
咖啡酸	nd	nd	nd
丁香酸	nd	nd	nd
对香豆酸	nd	10.90±0.17	10.90±0.17
芦丁	150.75±0.96	nd	150.75±0.96
鞣花酸	50.94±0.12	75.24±0.03	126.18±0.13
3,4-二甲氧基苯甲酸	nd	33.15±0.05 ^b	33.15±0.05
苯甲酸	nd	nd	nd
白藜芦醇	nd	nd	nd
槲皮素	150.16±0.88	2.68±0.09	152.84±0.80
肉桂酸	70.51±0.07	3.68±0.01	74.19±0.06
香草醛	nd	nd	nd
没食子酸	tr	tr	tr
儿茶素	tr	tr	tr
香草酸	nd	nd	nd
4-羟基苯甲酸	nd	nd	nd

注: 表中nd代表没有检出, tr代表痕量; 表中数据为平均值±标准偏差。

玫瑰蜂花粉中游离态和结合态多酚的酚酸组成及含量如表2所示, 共检出16种标准品中的8种酚酸, 其中鞣花酸、槲皮素、肉桂酸、儿茶素和没食子酸在游离态和结合态多酚提取物中都存在。游离态中槲皮素含量为150.16 $\mu\text{g/g}$, 高于文献中报道的中国花粉样品中

的含量, 却低于波罗的海区域花粉中含量^[14]。芦丁仅存在于游离态中, 含量为150.75 $\mu\text{g/g}$, 略低于文献中所报道的蜂花粉中芦丁含量^[14]。蜂花粉经过碱液水解后, 对香豆酸, 3,4-二甲氧基苯甲酸才释放出来, 即以结合态形式存在。肉桂酸在游离态提取物中含量(70.51 $\mu\text{g/g}$) 约是结合态中含量的19倍。鞣花酸更多以结合态形式存在于玫瑰蜂花粉中, 含量为75.24 $\mu\text{g/g}$, 约为游离态中含量的1.5倍。没食子酸和儿茶素在游离态和结合态多酚中痕量检出。总的来说, 玫瑰蜂花粉中游离态和结合态中多酚的组成和含量有较大的差别。

2.3 玫瑰蜂花粉游离态和结合态多酚提取物的抗氧化活性

表3 玫瑰蜂花粉中游离态和结合态多酚抗氧化活性

Table 3 Antioxidant activities of the free and bound phenolic compounds in rose bee pollen

抗氧化指标	多酚提取物	抗氧化活性/($\mu\text{g/mL}$)
DPPH/IC ₅₀	游离态	26.71±0.48a
	结合态	8.18±0.28b
ABTS/IC ₅₀	Vc	3.05±0.61c
	游离态	53.37±0.31a
FRAP/EC ₅₀	结合态	2.93±0.04c
	Trolox	45.88±0.25b
	游离态	9.18±0.24a
	结合态	8.80±0.23a
	Vc	1.05±0.5b

注: 表中数据为平均值±标准偏差, 不同字母表示差异显著($p < 0.05$), 同一组中的字母相同表示无显著性差异。

多酚类物质是很好的自由基清除剂, 苯环上的羟基能加强酚类物质的抗氧化能力, 且不同的酚酸类物质之间可能存在协同抗氧化作用。在DPPH自由基清

除试验中, 抗氧化剂给DPPH自由基提供原子和电子而使其褪色, ABTS自由基主要和具有供氢能力的抗氧化剂反应, 而FRAP是电子转移型测定方法, 抗氧化剂能将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 三种模型体现被测物质不同的抗氧化机制。从表3中数据来看, 蜂花粉游离态和结合态提取物在不同的模型中都具有一定的抗氧化能力。结合态的DPPH的清除能力显著的高于游离态 ($p<0.05$), 不过均低于Vc; 针对于ABTS清除活性, 结合态的显著的高于游离态和Trolox ($p<0.05$); 在FRAP实验中, 游离态抗氧化能力与结合态相当。总的来说, 玫瑰蜂花粉中游离态与结合态多酚抗氧化活性不同, 结合态的活性高于游离态的, 这可能是由于玫瑰蜂花粉游离态和结合态多酚的组成和含量不同引起的。

2.4 蘑菇酪氨酸酶抑制率

酪氨酸酶是黑色素细胞合成黑色素的关键因素, 蘑菇酪氨酸酶被广泛应用于评价黑色素抑制剂。由表4可知, 蜂花粉游离态和结合态多酚提取物都具有蘑菇酪氨酸酶抑制活性, 游离态对蘑菇酪氨酸酶活性抑制的 IC_{50} 值为 $26.34 \mu\text{g/mL}$, 结合态为 $22.26 \mu\text{g/mL}$, 都远远高于Vc对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制能力。有文献表明, 酚酸能够抑制酪氨酸酶的酶活, 特别是槲皮素和苯甲酸衍生物。我们研究表明玫瑰蜂花粉游离态中富含槲皮素, 而结合态中3,4-二甲氧基苯甲酸含量较高。因此, 玫瑰蜂花粉具有作为黑色素抑制剂的较大潜力。

表4 玫瑰蜂花粉蘑菇酪氨酸酶抑制活性

Table 4 Mushroom tyrosinase inhibitory activity of rose bee pollen

pollen	
多酚提取物	细胞外酪氨酸酶抑制率 $IC_{50}/(\mu\text{g/mL})$
游离态	26.34 ± 0.16^b
结合态	22.26 ± 0.14^c
Vc	110.09 ± 0.21^a

注: 表中数据为平均值±标准偏差, 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$), 同一列中的字母相同表示无显著性差异。

2.5 细胞增殖率的测定

由图1和2可知, 玫瑰蜂花粉提取物浓度从 $10 \mu\text{g/mL}$ 到 $160 \mu\text{g/mL}$, 样品作用24 h, 游离态中细胞增殖率从99.67%降低到66.32%, 结合态中细胞增殖率从88.34%降低到71.03%; 样品作用48 h, 也具有类似的降低趋势, 这说明玫瑰蜂花粉在一定程度上有抑制B16黑色素瘤细胞生长的作用。同时, 由图3可以看出随着玫瑰蜂花粉多酚提取物浓度的变化, 细胞形态也发生了改变, 高于 $40 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞发生明显的聚集。

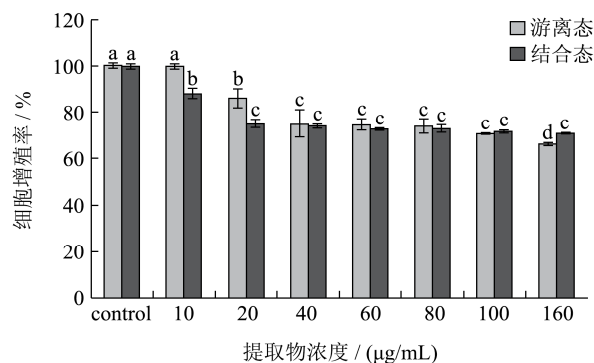


图1 玫瑰蜂花粉多酚提取物对B16细胞增殖率的影响 (24 h)

Fig.1 Effect of pollen phenolic extract on the cell proliferation rate of B16 cells (24 h)

注: 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

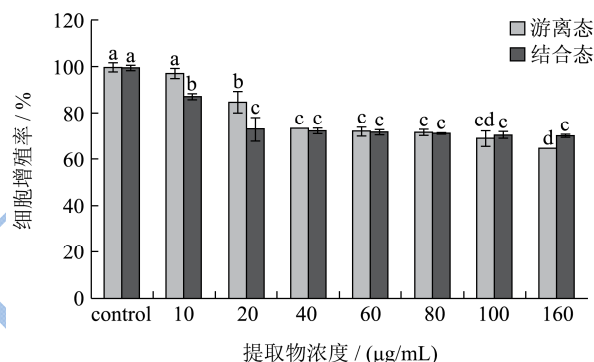


图2 玫瑰蜂花粉多酚提取物对B16细胞增殖率的影响 (48 h)

Fig.2 Effect of pollen phenolic extract on the cell proliferation rate of B16 cells (48 h)

注: 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

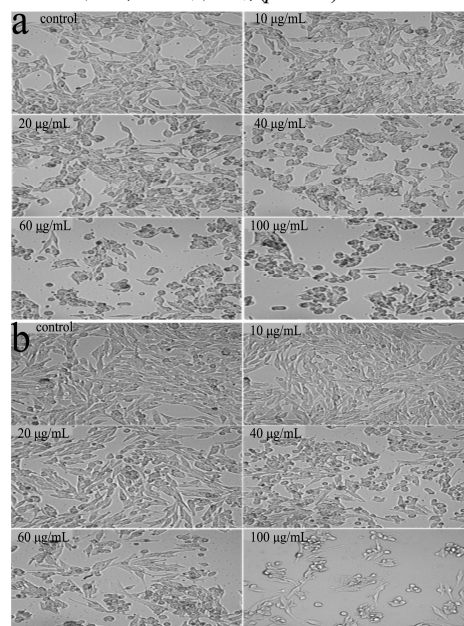


图3 不同浓度提取物作用24 h (a) 和48 h (b) 后显微镜中的细胞形态

Fig.3 Micrographs of B16 cells treated with rose bee pollen phenolic extracts after 24 h (left) and 48 h (right)

2.6 细胞内相对黑色素含量和酪氨酸酶活性的测定

的测定

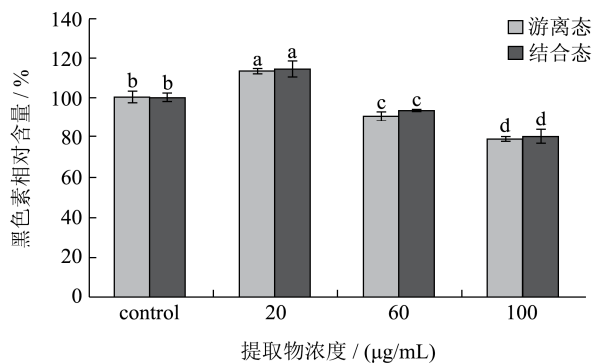


图4 细胞内黑色素相对含量

Fig.4 Relative melanin content in B16 cells

注: 不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

为进一步验证玫瑰蜂花粉对黑色素抑制的可能, 我们利用B16细胞进行研究。评价一物质是否具有美白效果的最直接方法就是观察黑色素含量是否减少。由图4可以看出, 低浓度多酚在一定程度上提升了黑色素的含量, 这与Chang^[15]等人报道相似; 但随着多酚提取物浓度的升高, 黑色素相对含量显著下降。在相同浓度下, 游离态与结合态的活性大小相当。图5直观的显示了蜂花粉游离态多酚对B16细胞内黑色素颜色的抑制能力。

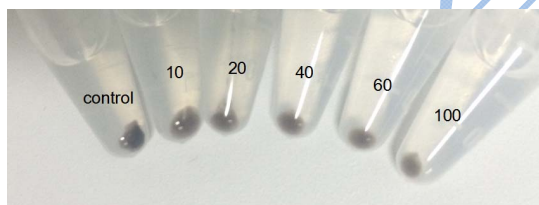


图5 不同浓度玫瑰蜂花粉游离态多酚提取物作用48 h后收集到的细胞

Fig.5 B16 cells collected after treatment with different concentrations (10, 20, 40, 60, and 100 µg/mL) of rose bee pollen free phenolic extracts for 48 h

蜂花粉多酚对细胞内相对酪氨酸酶活的影响见图4。在浓度高于60 µg/mL时, 结合态对于酪氨酸酶活的抑制能力高于游离态的, 这与体外抗氧化活性结果一致。在提取物浓度为100 µg/mL时, 游离态中酶活性降低了20.05%, 结合态中酶活性降低了29.97%。考虑到蜂花粉多酚对黑色素含量的影响(图4), 我们可以推断, 蜂花粉对细胞黑色素的影响除酪氨酸酶活方面, 可能还存在其它的原因, 需要下一步试验研究。

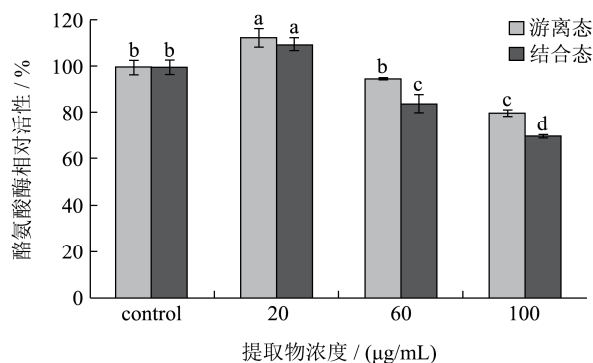


图6 细胞内酪氨酸酶相对活性

Fig.6 Relative tyrosinase activity in B16 cells

注: 不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

3 结论

本文研究玫瑰蜂花粉中游离态和结合态多酚类物质的含量和组成, 游离态的含量显著的高于结合态, 酚酸组成差异较大。三种体外抗氧化机制显示, 蜂花粉游离态和结合态多酚提取物具有较好的抗氧化活性。此外, 游离态和结合态多酚提取物能够有效的抑制蘑菇酪氨酸酶活性, 且活性显著的高于Vc。在B16细胞试验中, 不同形态的蜂花粉提取物在一定程度上抑制细胞的增殖, 细胞内黑色素相对含量和酪氨酸酶相对活性也下降明显。因此, 玫瑰蜂花粉具有成为新型天然的抗氧化剂和美白剂的潜力。

参考文献

- [1] Demirkiran O, Sabudak T, Ozturk M, et al. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of flavonoids from trifolium nigrescens subsp.petrisavi [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(51): 12598-12603
- [2] Shukla S, Park J, Kim D H, et al. Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture doenjang, a korean fermented soybean sauce variety [J]. Food Control, 2016, 59: 854-861
- [3] Morais M, Moreira L, Feás X, et al. Honeybee-collected pollen from five portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(5): 1096-1101
- [4] Dong J, Gao K, Wang K, et al. Cell wall disruption of rape bee pollen treated with combination of protamex hydrolysis and ultrasonication [J]. Food Research International, 2015, 75: 123-130
- [5] Feás X, Vázquez-Tato M P, Estevinho L, et al. Organic bee

- pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality [J]. *Molecules*, 2012, 17(12): 8359-8377
- [6] 扶雄,周惠芳,李超,等.甘蔗不同组织中游离态和结合态酚酸的分布及抗氧化活性[J].现代食品科技,2014(11):17-22
FU Xiong, ZHOU Hui-fang, LI Chao, et al. Distribution and antioxidant activity of free and bound phenolic acids in different parts of sugarcane [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014(11): 17-22
- [7] Moreira L, Dias L G, Pereira J A, et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from portugal [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(11): 3482-3485
- [8] 王猛,王敏,李环宇,等.海红果酚类物质种类及其抗氧化能力的研究[J].现代食品科技,2013,11:2633-2637
WANG Meng, WANG Min, LI Huan-yu, et al. Malus micromalus makino polyphenols and its antioxidant activity [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 11: 2633-2637
- [9] Kim M Y, Seguin P, Ahn J K, et al. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from korea [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7265-7270
- [10] Goh T B, Koh R Y, Yam M F, et al. 5-Methoxytryptamine reacts with natural food flavour to produce 6-methoxy tetrahydro- β -carbolines: in vitro investigation of their antioxidant and cytotoxicity properties [J]. *Food Chemistry*, 2015, 183: 208-216
- [11] Oegen M, Reese R N, Tulio J A Z, et al. Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) methods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(4): 1151-1157
- [12] Souza P M, Elias S T, Simeoni L A, et al. Plants from brazilian cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity [J]. *Plos. One*, 2012, 7(11): e48589
- [13] Hu S, Zheng Z, Zhang X, et al. Oxyresveratrol and trans-dihydromorin from the twigs of cudrania tricuspidata as hypopigmenting agents against melanogenesis [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 13: 375-383
- [14] Kaškonienė V, Ruočkusienė G, Kaškonas P, et al. Chemometric analysis of bee pollen based on volatile and phenolic compound compositions and antioxidant properties [J]. *Food Analytical Methods*, 2015, 8(5): 1150-1163
- [15] Chang C J, Dai R Y, Leu Y L, et al. Effects of the melanogenic inhibitor, uracil, derived from lactobacillus plantarum TWK10-fermented soy milk on anti-melanogenesis in B16F0 mouse melanoma Cells [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 17: 314-327