

长瓣短柱茶种子油等在 2BS 细胞培养 中的延缓衰老效应*

吴开云 翁月霞 费学谦 杨婉琴 孙雪忠

摘要 将长瓣短柱茶种子油及其它木本食用油经酶解处理后,以适当比例加入 MEM 培养液培养人胚成纤维细胞(2BS)。测定各油组细胞膜过氧化脂质(LPO)水平、细胞培养传代数、细胞生长速度变化、细胞贴壁能力和细胞外观形态变化。结果表明长瓣短柱茶种子油具有与橄榄油相当的延缓细胞衰老效果,其第46代细胞的细胞膜过氧化脂质的积累显著低于普通油茶油、长瓣短柱茶油非皂化成分、三油酸甘油酯组。在加入橄榄油或长瓣短柱茶种子油酶解产物组中培养的2BS细胞比加入普通油茶油酶解产物组的细胞多传2代寿命。初步认为在以油酸为主要构成的食用油中亚油酸等多种不饱和脂肪酸成分以适当比例存在对延长细胞活力有重要意义;长瓣短柱茶油非皂化成分组在各项测试中仅次于长瓣短柱茶油与橄榄油组而依次优于普通油茶油、三油酸甘油酯加长瓣短柱茶油非皂化成分和三油酸甘油酯组,提示该部分中含有一定的延缓衰老活性成分。

关键词 长瓣短柱茶 种子油 木本食用油 人胚细胞培养(2BS) 延缓衰老效应

我国特有的山茶属植物长瓣短柱茶(*Camellia grjysii* Hance)俗称薄壳香油茶,为国家二级保护的渐危物种^[1]。本世纪60年代初,在该物种野生分布比较集中的湖南攸县,当地群众发现其种子油是一种风味很好的可食用油。据有关研究报道,其种子油的油酸含量约66.51%~74.38%,亚油酸含量约12.5%~16.7%,与橄榄油(含油酸65.8%~84.9%,亚油酸含量约3.3%~17.7%)相近^[2],并且含十分丰富的 α -维生素E。为了进一步了解长瓣短柱茶种子油及其重要组分在营养学方面的效应,作者利用人胚肺成纤维二倍体细胞(2BS)培养技术,对长瓣短柱茶种子油及其非皂化成分提取物、橄榄油、普通油茶油和和三油酸甘油酯在2BS细胞培养中的延缓衰老效应进行了对比检测研究,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 油样 长瓣短柱茶油、普通油茶油、橄榄油均为当年新榨毛油;三油酸甘油酯为上海生化试剂总厂产品。

1.1.2 细胞株系 采用上海卫生防疫站保存的2BS细胞株。其正常寿限约为50代。

1.2 试验方法

1998—01—06 收稿。

吴开云助理研究员,翁月霞,费学谦,杨婉琴(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400);孙雪忠(浙江省富阳市林业局)。

* 国家自然科学基金和浙江省自然科学基金资助项目的部分内容。本试验得到中国科学院上海细胞生物研究所孙燮钧高级实验师和浙江医科大学周君富教授的指导;油样主成分检测由上海粮油科学技术研究所承担。特此致谢!

1.2.1 试验设计 单因子完全随机区组设计, 3 次重复, 7 个处理: ①长瓣短柱茶油; ②橄榄油; ③普通油茶油; ④长瓣短柱茶油非皂化成分; ⑤三油酸甘油酯; ⑥长瓣短柱茶油非皂化成分加三油酸甘油酯; ⑦不加任何油脂酶解成分的对照。

1.2.2 非皂化成分的制备 取长瓣短柱茶油 10 g, 加 1.92 g KOH 皂化, 经过乙醚反复抽提, 收集下层乙醚相溶液, 再经蒸馏水多次淋洗, 去除脂肪酸钾盐及 OH^- 离子, 最后将乙醚相溶液蒸发、烘干至恒重, 获得 68 mg 非皂化物^[3]。

1.2.3 油样处理 取每种油样 1 g 或长瓣短柱茶油非皂化成分 6.8 mg, 用 0.8 mL 吐温 80 及 150 mmol/L 浓度的 Tris-HCl(pH 7.6) 缓冲液乳化, 加入 100 IU 脂肪酶在 37 ℃ 水浴条件下酶解 10 h, 然后定容至 65 mL(脂肪酸浓度约 54 $\mu\text{mol}/\text{mL}$), 并用 $\varnothing 2.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。70 ℃ 水浴 10 min, 去除脂肪酶残留活性。4 ℃ 保存备用。

1.2.4 细胞培养 采用 25 mL(有效贴壁面积 2.8 cm × 5 cm) 的细胞培养瓶。每个培养瓶中加入 3.5 mL 培养液(MEM Hank's 小牛血清=6:3:1) 及油样酶解液 50 μL (对照不加油样酶解液), 于 5% CO_2 空气条件下 37 ℃ 培养。当细胞刚刚长满底壁时按 1 分 2 的方式传代。每瓶每次传代接种量约 250 万个活细胞。第 37 代开始在培养液中加入油样处理液。

1.2.5 油样主要成分检测 主要脂肪酸、 α -维生素 E 含量分别采用气相色谱和液相色谱法测定。

1.2.6 细胞状态指标检测 细胞膜过氧化脂质(LPO)检测: 每个油样试验组各取其第 46 代细胞 3 个培养株, 经消化离心去除培养液后, 用 Tris-HCl(pH 7.4) 缓冲液调整至每毫升含 500 万个细胞的悬浮液 1 mL, 加入 1 mL 硫代巴比妥酸(0.67% TBA 冰乙酸=1:1, V/V), 100 ℃ 水浴 30 min, 急冷至 4 ℃, 加入 4 mL 正丁醇 4 mL, 充分混匀, 1 200 g 离心 10 min, 取上层液体用 721 型分光光度计于 532 nm 波长检测丙二醛(MDA) 光密度(OD_{532})。标准 MDA 溶液由 5 nmol 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷(Sigma 公司产品) 经过上述同样处理而获得^[4-6]。LPO 计算公式如下^[7, 8]:

$$LPO = S \times d / D$$

式中: S 为制标准液时所用 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷的量, 在这里 $S = 5$ (nmol), d 为样品 OD_{532} 值, D 为标准液 OD_{532} 值, LPO 单位为: nmol/500 万个细胞。

用倒置显微镜定时观测 2BS 细胞外观形态, 记录加入油样酶解液后的细胞传代数、传代间隔天数及每次传代后细胞贴壁能力。

1.2.7 细胞生长速度的测定 根据该细胞增加一倍所需天数(即两次传代之间的间隔天数)推算细胞生长速度: 日增长率(%) = $(\sqrt[n]{2} - 1) \times 100\%$, n 为两次传代间隔天数。

1.2.8 细胞贴壁能力分级 根据各次传代 4 h 后细胞贴壁率, 将细胞贴壁能力归为 a、b、c、d、e、f 6 级。a 级: 90% ~ 100% 的细胞贴壁; b 级: 75% ~ 90% 的细胞贴壁; c 级: 50% ~ 75% 的细胞贴壁; d 级: 25% ~ 50% 的细胞贴壁; e 级: 5% ~ 25% 的细胞贴壁; f 级: 细胞基本没有贴壁。

1.2.9 统计分析 不同处理组之间 LPO 水平差异显著性, 采用方差分析和 q 检验进行。

2 结果与分析

2.1 各油组 2BS 细胞膜过氧化脂质水平的比较

在 7 个处理组中, 橄榄油组细胞膜过氧化脂质水平最低, 三油酸甘油酯组的最高。经过方

差分析, 表明不同处理组之间 *LPO* 水平存在极显著差异 ($F = 25.45 > F_{0.01} = 4.46$)。从表 1 可以看出长瓣短柱茶油组、橄榄油组与对照组的 *LPO* 水平无显著性差异, 但三者都极显著地低于三油酸甘油酯、普通油茶和三油酸甘油酯加长瓣短柱茶油非皂化成分组。非皂化成分组的细胞膜 *LPO* 值较长瓣短柱茶油全油组高。长瓣短柱茶油非皂化成分组与三油酸甘油酯组之间 *LPO* 值差异极显著, 两者相加处理组的 *LPO* 值介于两者之间, 且远低于长瓣短柱茶全油组。

表 1 各油组细胞膜过氧化脂质 (*LPO*) 水平 *q* 检验 (单位: nmol/500 万个细胞)

处 理	橄榄油	对 照	长瓣短柱茶油	长瓣短柱茶油非皂化成分	普通油茶	长瓣短柱茶油非皂化成分+三油酸甘油酯	三油酸甘油酯
<i>LPO</i> 平均值 ± <i>SD</i>	6.22 ± 1.06	6.27 ± 0.98	6.52 ± 0.92	9.55 ± 0.90	11.14 ± 1.27	12.54 ± 1.47	14.93 ± 1.50
<i>LSD</i> _{0.01} = 4.16							
<i>LSD</i> _{0.05} = 3.30							

2.2 各油组细胞培养传代数的比较

传代数的大小反映了细胞寿命的长短。由表 2 可知, 在 7 组处理中, 以橄榄油、长瓣短柱茶油及对照三组的传代数最长, 三者均比最短的三油酸甘油酯组多传 5 代。总传代数增加了 10.6%, 加油传代数增加了 45.5%。

表 2 不同油样处理 2BS 细胞的总传代数及加油传代数 (单位: 代)

处 理	橄榄油	对 照	长瓣短柱茶油	长瓣短柱茶油非皂化成分	普通油茶	长瓣短柱茶油非皂化成分+三油酸甘油酯	三油酸甘油酯
总传代数	52	52	52	50	50	48	47
加油传代数 ^①	16	16	16	14	14	12	11

①从第 37 代开始计算。

2.3 各油组细胞生长速度变化的比较

细胞日增长率从一个侧面反映了细胞生存的活力。增长率高表明细胞活力高, 反之则细胞活力低。从图 1 可见, 三油酸甘油酯组的 2BS 生长速度最早开始下降。普通油茶和非皂化成分组居中。橄榄油和长瓣短柱茶油组与对照相近, 其 2BS 细胞生长速度下降最迟。

2.4 各油组 2BS 传代培养中贴壁能力比较

细胞的贴壁能力直接反映了细胞的活力。从表 3 可见, 三油酸甘油酯处理的细胞贴壁能力最早开始衰退, 至第 47 代时即完全不能贴壁; 橄榄油、长瓣短柱茶油、对照三处理最迟衰退, 均在第 52 代时才完全不能贴壁, 普通油茶、非皂化物两处理均在第 50 代时完全没有贴壁能力。

2.5 各油组 2BS 细胞外观形态变化

当细胞衰老时, 由于细胞膜过氧化脂质的积累, 其细胞形态、透光性也随着发生相应的变化。表 4 列出了第 43~46 代各处理组 2BS 细胞的外观形态。可以看出, 三油酸甘油酯、长瓣短柱茶油非皂化成分加三油酸甘油酯处理的 2BS 细胞外观形态劣化较严重, 而长瓣短柱茶油、

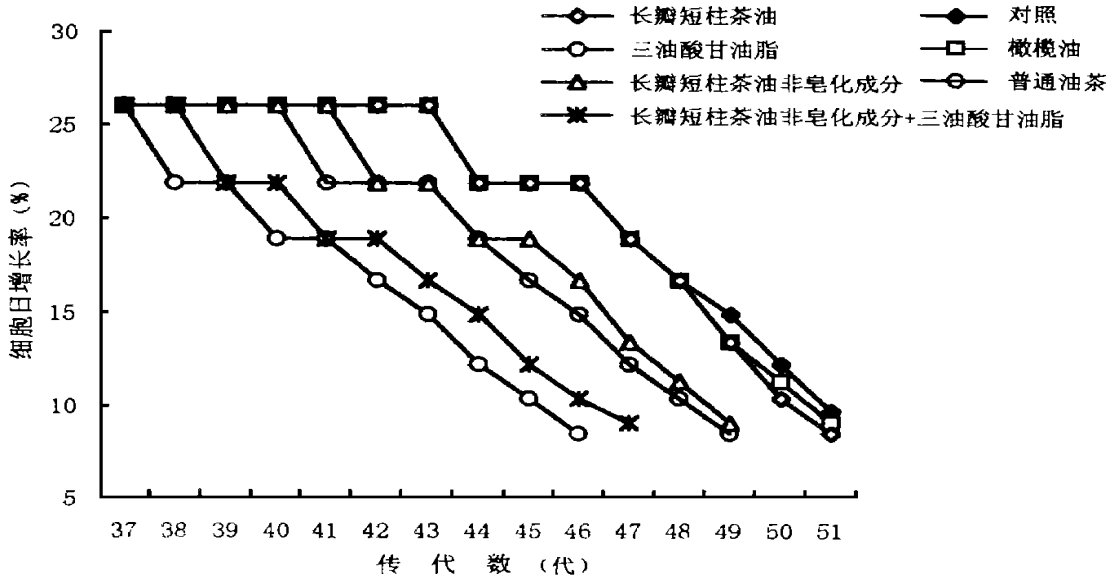


图 1 不同油样处理的 2BS 细胞生长速度变化

橄榄油、对照等处理在第 46 代还未出现劣化现象。

表 3 不同处理各代 2BS 细胞贴壁能力 (6 级)

处 理	第 37 代	第 38 代	第 39 代	第 40 代	第 41 代	第 42 代	第 43 代	第 44 代	第 45 代	第 46 代	第 47 代	第 48 代	第 49 代	第 50 代	第 51 代	第 52 代
橄 榄 油	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	c	c	d	e	f
长瓣短柱茶油	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	c	c	d	e	f
普 通 油 茶	a	a	a	a	a	b	b	b	b	c	c	d	e	f	-	-
长瓣短柱茶油非皂化成分	a	a	a	a	a	b	b	b	b	c	c	d	e	f	-	-
长瓣短柱茶油非皂化成分 + 三油酸甘油酯	a	a	a	a	b	b	b	c	c	d	e	f	-	-	-	-
三油酸甘油酯	a	a	a	a	b	b	c	c	d	e	f	-	-	-	-	-
对 照	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	c	c	d	e	f

表 4 各油组中 2BS 细胞外观形态变化

处 理	第 43 代	第 44 代	第 45 代	第 46 代
橄 榄 油	光滑透明	光滑透明	光滑透明	光滑透明
对 照	光滑透明	光滑透明	光滑透明	光滑透明
长瓣短柱茶油	光滑透明	光滑透明	光滑透明	光滑透明
长瓣短柱茶油非皂化成分	光滑透明	光滑透明	略混浊	粒状粗燥
普 通 油 茶	光滑透明	光滑透明	略混浊	粒状粗燥
长瓣短柱茶油非皂化成分 + 三油酸甘油酯	光滑透明	略混浊	粒状粗燥	鳞屑状粗燥
三油酸甘油酯	略混浊	粒状粗燥	鳞屑状粗燥	残骸较多

注: 光滑透明: 细胞轮廓光滑流畅, 细胞体清晰透明; 略混浊: 细胞轮廓较流畅, 细胞体透光, 光质略显混浊; 粒状粗燥: 细胞膜遍布摩擦样沙粒, 细胞体较混浊; 鳞屑状粗燥: 细胞体混浊, 同时细胞轮廓线条粗燥僵硬, 有鳞屑状裂痕; 残骸较多: 细胞残骸多呈小粒、小球及屑状物, 漂浮而不贴壁, 常相互结团并与相对正常的细胞粘连而不易去除。

2.6 4 种油脂全油成分比较

经检测, 长瓣短柱茶油、橄榄油和普通茶油均以油酸为主, 但亚油酸等多种不饱和脂肪酸以及 α -维生素 E 均以长瓣短柱茶油中含量为最高。结合三油酸甘油酯比较, 4 种油脂成分见表 5。从表 5 可见, 长瓣短柱茶油的油酸含量为 71.2%, 比橄榄油低 10.4 个百分点, 普通茶油油酸比橄榄油还要高 3.7 个百分点。而亚油酸的含量, 长瓣短柱茶油为 14.6%, 比橄榄油高 6.9 个百分点, 普通茶油仅比橄榄油低 1.0 个百分点。亚麻酸含量, 长瓣短柱茶油为 2.2%, 是橄榄油的 2.75 倍, 而普通茶油是橄榄油的 1/2。同时, α -维生素 E 的含量, 长瓣短柱茶油是橄榄油的 6 倍, 普通茶油是橄榄油的 2 倍。

表 5 4 种油脂全油成分比较

(单位: %)				
成 分	橄榄油	长瓣短柱茶油	普通茶油	三油酸甘油酯
硬脂酸	11.4	1.64	1.83	-
棕榈酸	1.1	11.7	6.67	-
油 酸	81.6	71.2	85.3	> 98.0
亚油酸	7.7	14.6	6.7	-
亚麻酸	0.8	2.2	0.4	-
α -维生素 E (mg/100g 油)	17.4	107.8	30.2	-

3 结论与讨论

通过各油组细胞膜过氧化脂质(LPO)水平、细胞培养传代数、细胞生长速度变化、2BS 传代培养中贴壁能力、细胞外观形态变化指标分析表明, 长瓣短柱茶油与橄榄油在 2BS 培养中的营养效应相近。

长瓣短柱茶油非皂化物成分与皂化成分分开后的营养效应有一定降低。但前者各项指标仅次于长瓣短柱茶油和橄榄油组而依次优于普通茶油、三油酸甘油酯加长瓣短柱茶油非皂化成分和三油酸甘油酯组, 提示该部分中含有一定的延缓衰老活性成分。

长瓣短柱茶油非皂化成分营养效应明显高于三油酸甘油酯, 而与长瓣短柱茶全油比较接近, 但前两者相加处理的效果远低于长瓣短柱茶全油, 这可能表明三油酸甘油酯的单一油酸成分并不有利于细胞的生存活力。长瓣短柱茶油只含有 71% 左右油酸, 另含有亚油酸 14.6%, 亚麻酸 2.2%。因而可以推测亚油酸、亚麻酸的适量存在在长瓣短柱茶抗衰老效应的构成中具有重要意义。

普通茶油 α -维生素 E 含量远低于长瓣短柱茶, 同时油酸含量较高, 而亚油酸、亚麻酸偏低。这些因素的综合, 可能是普通茶油的抗衰老效应显著低于长瓣短柱茶油和橄榄油的原因。

未加任何油的对照组细胞膜 LPO 水平与长瓣短柱茶油、橄榄油等处理相当, 其它指标也相应一致。这可能与前者没有油脂酶解系统的背景干扰有关。

由于长瓣短柱茶油的营养价值与橄榄油相当, 可以考虑作为与橄榄油平等的另一种选择而应用于化妆品业和烹饪业。在普通油茶低产林改造中, 长瓣短柱茶可作为一种优良品种资源用于普通油茶林的改接换冠, 在不适合油橄榄生长的大部分亚热带地区推广种植长瓣短柱茶。

参 考 文 献

- 1 傅立国主编. 中国植物红皮书——稀有濒危植物第一册. 北京: 科学出版社, 1991.
- 2 翁月霞, 邵玉芬, 刘仁义, 等. 薄壳香茶油的油质及其保健效用. 经济林研究, 1996, 14(1): 12~14.
- 3 中国农业科学院茶叶研究所. 茶树生理及茶叶生化实验手册. 北京: 农业出版社, 1983.

- 4 陈裕明,周韞珍.不同食用油对大鼠机体脂质过氧化脂类含量的影响.营养学报,1993,15(3):293~298.
- 5 Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem., 1978, 86: 271~278.
- 6 Gavino V C, Miller J S, Ikharebha S O, et al. Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. J. Lipid Res., 1981, 22: 763~769.
- 7 Packer L, Smith J R. Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71(12): 4763~4767.
- 8 Steinbrecher U P, Parthasarathy S, Leake D S, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 3883~3887.

Comparison of Antisenile Effects of Seed Oil of *Camellia grisea* and Olive Oil from Woody Crops on 2BS Cell Culture

Wu Kaiyun Weng Yuexia Fei Xueqian
Yang Wanqing Sun Xuezhong

Abstract The seed oil of *Camellia grisea* (GRI) and *C. oleifera* (OLF), olive oil (OLV) and olein (OLN) after enzymolysis etc. were added to MEM medium to culture the human diploid foetal lung fibroblasts (2BS). The results showed the similar antisenile effects of the seed oil of *C. grisea* and olive oil. Significant lower accumulation of *LPO* in cell membrane tested at 46th generation of the above two groups than that of OLF, unsaponifiable fraction of GRI(NSG), OLN+ NSG and OLN groups were found. The lifespan of cells in GRI and OLV groups was 2 generations longer than that in OLF group. The comparison of morphology of 2BS under microscope revealed the same sequence as the result of *LPO* testing and lifespan observation. Preliminary conclusion is that an appropriate existence of linoleic acid is essential to prolong the lifespan of 2BS with the main component of oleic acid in certain edible oils, and there are some active components in unsaponifiable fraction of GRI which could delay the aging process of 2BS.

Key words *Camellia grisea* seed oil edible oil 2BS culture antisenile effects

Wu Kaiyun, Assistant Professor, Weng Yuexia, Fei Xueqian, Yang Wanqing (The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang, Zhejiang 311400); Sun Xuezhong (The Forest Bureau of Fuyang County, Zhejiang Province).