

文章编号:1001-1498(2015)05-0753-05

余甘子精粉的体外抗氧化活性分析

李 娟, 甘 瑾, 张雯雯, 侯 彬, 张 弘, 冯 颖*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所; 国家林业局资源昆虫培育与利用实验室, 云南 昆明 650224)

关键词: 余甘子精粉; 体外抗氧化; FRAP法; SH-SY5Y细胞; H₂O₂损伤

中图分类号: S667.9

文献标识码: A

Analysis on Antioxidant Activities *in vitro* of Refined Powder of *Phyllanthus emblica* L.

LI Xian, GAN Jin, ZHANG Wen-wen, HOU Bin, ZHANG Hong, FENG Ying

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry; Laboratory of Cultivation and Utilization of Resources Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The antioxidant activities *in vitro* of refined powder of *Phyllanthus emblica* L. were detected by methods based on chemical measurement and cell modeling. The results of anti-peroxidation ability and iron reduction ability trials showed that the refined powder of *P. emblica* L. had strong ability of anti-peroxidation, and it increased with the increasing of concentration with a clear dose-response relationship. When the concentration reached 800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the ability of anti-peroxidation was almost equal to the positive control VC with the same concentration. Meanwhile, it also had iron reduction ability that accompanied by significant dose-response relationship. By *in vitro* cell culture method, H₂O₂ was used to induce SH-SY5Y cells damages to establish the cell model of oxidative damage. The author detected the effect of different concentrations of powder on cell survival rate for the model cells by MTT assay. The results indicated that refined powder could show better protective effect to oxidative damaged SH-SY5Y cells in the range of 600 ~ 1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. When the concentration reached 1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the cell survival rate was the highest and refined powder exhibited the best antioxidant activity. Both methods proved the strong antioxidant activities of refined powder of *P. emblica* L. *in vitro*.

Key words: refined powder; *Phyllanthus emblica*; antioxidant activities *in vitro*; FRAP assay; SH-SY5Y cells; H₂O₂-induced cell damage

余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)是大戟科(Euphorbiaceae)叶下珠属(*Phyllanthus*)植物,其果鲜食酸而微涩,回味甘甜,故名余甘,又名滇橄榄、油柑子、庵摩勒等。全世界约有17个国家的传统药物体系中使用余甘子,在我国的中药、藏药等均有应用,作为一味重要的传统民族药,已被载入多版《中国药典》^[1]。余甘子具有清热凉血、生津止咳等药用功

效,具有较高的食用和药用价值^[2],是卫生部审核颁布的“药食同源”植物,营养价值丰富。现代药理学研究证明,余甘子具有抗肿瘤、抗衰老、抗病原微生物、降血脂、降血压等作用^[3-4],并已证实,余甘子显著的抗氧化活性是其生理功能的基础^[5-6]。

目前,余甘子的加工利用主要产品有果汁、果脯等,其中果汁含有丰富的抗氧化活性成分^[7],笔者所

收稿日期: 2015-05-15

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目子课题(2012BAD36B03-03)

作者简介: 李 娟(1985—),女,硕士,助理研究员,从事天然产物活性分析及细胞工程相关研究。

* 通讯作者。

在课题组前期研究发现,存放后的余甘子果汁稳定性不佳,超氧化物歧化酶(SOD)、维生素 C(VC)等活性成分含量随存放时间延长而下降;为保护余甘子的敏感性功效成分,提高其保健功效,可采用超声波破壁、逆流多级渗滤提取,通过喷雾干燥法制成余甘子精粉。经检测,精粉中 VC 保持率达 52.6%,对邻苯三酚氧化抑制率为 29.6%,营养成分损失少,干燥物速溶性、冲调性好^[8-9]。为进一步验证其抗氧化活性,本文通过化学检测法和细胞模型法对余甘子精粉进行体外抗氧化活性研究,以期为更好地开发利用余甘子资源提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器

Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo scientific)、二氧化碳培养箱(美国 Thermo scientific)、倒置显微镜(日本 Olympus)、生物安全柜(美国 Baker)、细胞活力计数仪(美国 Beckman)。

1.2 材料与试剂

余甘子精粉,由云南天启生物科技有限公司提供。

DMEM 高糖培养基(美国 Gibco)、胎牛血清(FBS)(美国 Hyclon)、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Hyclon)、胰蛋白酶(美国 Amresco)、甲基噻唑基四唑溴盐(MTT)(美国 Amresco)、二甲基亚砷(DMSO)(美国 Amresco)、维生素 C(美国 Sigma)、其他试剂均为国产分析纯。人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)购于中国科学院昆明动物研究所。

1.3 化学测定法

1.3.1 余甘子精粉抗脂质过氧化能力的测定 参照文献方法^[10],选择 VC 为阳性对照,将余甘子精粉用蒸馏水配制成与 VC 相同的浓度,过滤后冷藏备用。使空白管和样品管反应体系(表 1)在 37℃ 分别反应 0.5 h 后,分别加入 0.05 mL 20% 三氯乙酸(TCA)、2 mL 0.8% 硫代巴比妥酸(TBA),充分混合后在 100℃ 反应 30 min,冷却后加入 4 mL 正丁醇萃取,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液于比色皿中,用分光光度计测 532 nm 处的吸光度,同一浓度重复 3 次,取平均值,以不加热反应的反应体系作为空白调零管。按下列公式计算抗脂质过氧化率,式中 $A_{532(\text{样品})}$ 为样品管的吸光度; $A_{532(\text{空白})}$ 为空白管的吸光度。

$$\text{抗脂质过氧化率}(\%) = [1 - A_{532(\text{样品})} / A_{532(\text{空白})}] \times 100\%$$

表 1 反应体系组成

试剂	空白管/mL	样品管/mL				
		1	2	3	4	5
0.5% 亚油酸乳液	1	1	1	1	1	1
10 mmol·L ⁻¹ FeSO ₄	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
10 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
样品	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
提取溶剂	1	0.8	0.6	0.4	0.2	-
样品浓度/(mg·mL ⁻¹)	0	80	160	240	320	400
总体积	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4

1.3.2 余甘子精粉铁还原能力的测定 参考文献^[11]方法,并略作修改,以 FeSO₄ 为标准物质绘制标准曲线,分别吸取 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16 mL 的 1 mmol·mL⁻¹ FeSO₄ 溶液,并加蒸馏水补充至 0.2 mL,再分别加入 3.8 mL FRAP 试剂(现用现配:10 mmol·mL⁻¹ 三吡啶三吡啶(TPTZ)、20 mmol·mL⁻¹ FeCl₃·6 H₂O 和乙酸缓冲液(pH=3.6)以 1:1:10 的体积比混匀,37℃ 保温备用),混匀后 37℃ 反应 10 min,测定 593 nm 波长处吸光度。以吸光度为纵坐标,FeSO₄ 浓度为横坐标,绘制标准曲线。样品的测定则分别取 40、80、120、160、200 μL 样品,用蒸馏水补充至 200 μL,使样品浓度为 80、160、240、320、400 mg·mL⁻¹,再分别加入 3.8 mL FRAP 试剂,混匀后 37℃ 反应 10 min,于 593 nm 处测定吸光度,同一浓度重复 3 次,取平均值。样品的铁还原能力等于样品与 Fe(III)-TPTZ 反应后在 593 nm 处产生的吸光值所相当的标准 FeSO₄ 溶液的浓度(μmol·mL⁻¹),FeSO₄ 浓度越大,表示样品抗氧化活性越强。

1.4 细胞模型法

1.4.1 细胞的培养 SH-SY5Y 细胞培养于完全培养液(含 10% FBS 的 DMEM 培养液)中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养,2~3 天传代。细胞传代时,先吸去瓶中的培养液,再用 PBS 液清洗 1 次,加入适量的 0.25% 胰蛋白酶消化后轻轻吹打,当细胞脱离瓶壁后,加入完全培养液终止消化,细胞悬液离心,弃上清液后收集细胞,取对数生长期的细胞进行实验。

1.4.2 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤模型的建立 参照文献方法^[12-13],将 SH-SY5Y 细胞按 6.0 × 10⁵ cells·mL⁻¹ 的浓度接种于 96 孔板,每孔 200 μL,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,弃上清液,将细胞分为正常对照组,不同浓度的 H₂O₂ 损伤组(模型组),正常对照组加入完全培养液,模型组分别加入含 400、600、800、

1 000、1 200、1 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 的完全培养液,每组设4个平行孔,置于 CO_2 培养箱中培养1h后,每孔加入20 μL 浓度为5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MTT溶液,于 CO_2 培养箱继续培养4h后,吸去上清液,每孔加入150 μL DMSO,振荡15 min,使结晶物充分溶解,在酶标仪上测定各孔在570 nm处的吸光度,计算细胞相对存活率,计算方法如下,选择细胞相对存活率在50%左右的 H_2O_2 浓度作为1h的造模浓度。

细胞相对存活率(%) = (模型孔或样品孔吸光度/正常对照孔吸光度) \times 100%

1.4.3 余甘子精粉对 H_2O_2 损伤的SH-SY5Y细胞相对存活率的影响 将对数生长期细胞按 6×10^5 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度加入96孔培养板,每孔200 μL ,置于37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、95%空气、饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养24 h后,吸去上清液,加入含样品的完全培养液,样品组设8个浓度,分别为200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔200 μL ,每个浓度设4个平行孔,同时设空白对照孔(无细胞,只有培养液和样品),以扣除溶媒颜色的干扰,以及正常对照孔(细胞+培养液),阳性对照为VC,浓度为0.1~400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 等8个浓度。加入样品后置于 CO_2 培养箱中培养24 h,吸去上清液,用PBS液清洗一遍后,加入1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 再培养1 h后用MTT法(方法同1.3.4)在酶标仪上测定各孔在570 nm处的吸光度,计算细胞相对存活率。

1.5 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS软件处理,方差齐性采用 F 检验,方差齐的数据进行方差分析;方差不齐的数据则用非参数检验。

2 结果与分析

2.1 化学测定法

2.1.1 余甘子精粉抗脂质过氧化能力的测定 结果表明,余甘子有较强的抗脂质过氧化能力,并随浓度的增加而增强,呈明显的量效关系(图1)。当浓度为800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,抗脂质过氧化能力与同浓度阳性对照VC相当,有明显的活性。

2.1.2 余甘子精粉铁还原能力的测定 由图2结果可见,各浓度的余甘子精粉和VC对铁离子的还原能力随浓度的增加而增强,虽然两者均呈浓度依赖性增长,但铁还原能力仍存在差别,当精粉浓度达37.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,铁还原能力为382.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 ,仅与浓度为18.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的VC铁还

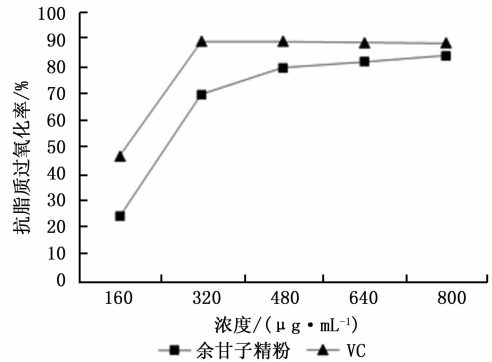


图1 余甘子精粉的抗脂质过氧化能力

原能力(371 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4)相当,而同浓度(37.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)VC的铁还原能力则达到760.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 ,由此可见,余甘子精粉体外还原力强度不及VC。

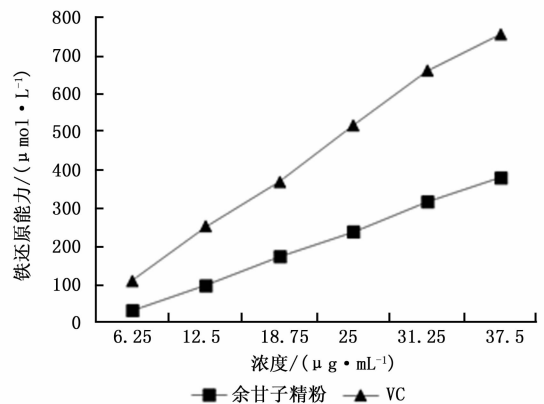


图2 余甘子精粉的铁还原能力

2.2 细胞模型法

2.2.1 H_2O_2 诱导SH-SY5Y细胞氧化损伤模型的建立 MTT实验结果显示:细胞相对存活率随 H_2O_2 浓度的升高而降低,当1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理1 h后,能使SH-SY5Y细胞相对存活率降低至50%左右,与正常组比较,差异有显著意义($P < 0.01$),为理想造模条件。选用1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理1 h作为最佳造模条件,结果如图3所示,成功复制了氧化损伤细胞模型,可用于余甘子精粉体外抗氧化活性的检测。

2.2.2 余甘子精粉对 H_2O_2 损伤的SH-SY5Y细胞相对存活率的影响 阳性对照VC对本实验中的模型细胞显示出较好的抗氧化活性,表明本评价体系可信。经不同浓度VC预保护24 h后,模型细胞相对存活率随VC浓度的增加而提高,呈浓度依赖性(图4),与模型组相比,200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ VC组细胞相

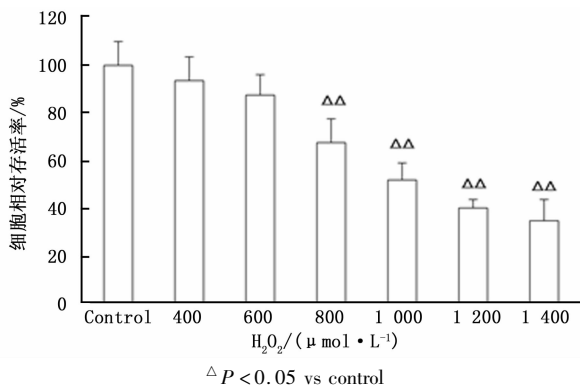
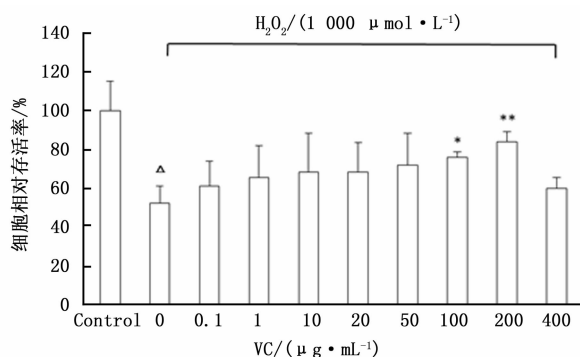


图3 不同浓度 H₂O₂ 对 SH-SY5Y 细胞吸光度的影响

对存活率明显提高 ($P < 0.01$); 经不同浓度余甘子精粉预保护 24 h 后, 模型细胞相对存活率随精粉浓度增加而提高, 呈量效关系 (图 5), 其中 800 ~ 1 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 各浓度精粉组细胞相对存活率明显高于模型组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 当浓度达 1 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时显示出最佳活性。当 VC 浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞相对存活率已达 80% 以上 (图 4); 与阳性对照组 VC 相比, 余甘子精粉浓度要到达 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后, 细胞存活率才达到 80% 以上 (图 5); VC 在较低浓度时就具有与其约 3 倍浓度精粉相当的保护模型细胞的作用。试验发现, 当 VC 和精粉浓度高于一定程度后, 细胞相对存活率反而降低, 结合显微观察, 分析这种现象的原因可能与样品加入培养液后使其 pH 值、渗透压等发生改变, 从而影响细胞的生存状态有关。

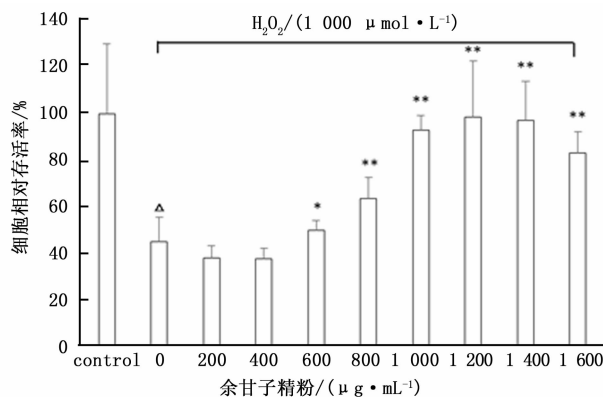


△ $P < 0.05$ vs control; * $P < 0.05$ vs H₂O₂ group, ** $P < 0.01$ vs H₂O₂ group

图4 VC 对 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞相对存活率的影响

3 结论与讨论

研究表明, 本文试验条件下, 各浓度余甘子精粉均表现出较好的抗脂质过氧化能力和还原铁的



△ $P < 0.05$ vs control; * $P < 0.05$ vs H₂O₂ group, ** $P < 0.01$ vs H₂O₂ group

图5 余甘子精粉对 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞相对存活率的影响

能力, 与阳性对照 VC 相比, 在一定浓度时精粉抗脂质过氧化能力与之相当, 而铁还原能力则远不及 VC, 表明余甘子精粉的体外抗脂质过氧化能力高于铁还原能力; 余甘子精粉能够显著提高氧化损伤模型细胞的相对存活率, 可保护 SH-SY5Y 细胞免受氧化损伤, 但与 VC 相比, 同浓度时其保护作用不及 VC。2 种方法均证实余甘子精粉具有较好的体外抗氧化作用, 作为天然抗氧化剂具有很好的开发潜力。

人体的许多疾病和组织损伤都与体内的氧化应激反应有关, 氧化 - 抗氧化状态之间的不平衡造成的氧化损伤与众多疾病的发生相关, 包括癌症、神经系统疾病等。因此, 应用抗氧化物质来保持人体健康和预防疾病的研究得到了越来越多科学家的关注^[14-15]。目前, 体外抗氧化活性评价方法种类繁多, 其中包含化学测定法、细胞模型法、动物模型试验等, 它们各有其优势及局限性, 单一的评价方法并不能全面的评价一种物质的抗氧化活性^[16], 应当选择多种反应机制的评价模型, 以便客观准确的对具有抗氧化活性的物质进行评价。研究中选择了目前较为常用的化学测定法, 可间接评价其抗氧化活性。与动物模型试验相比, 细胞模型法具有耗时短、成本相对较低的优点, 研究采用能产生羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 引发脂质过氧化反应的 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤复制细胞模型^[17], H₂O₂ 造成的损伤模型已成为研究细胞氧化损伤的重要工具之一^[18]。

余甘子果汁营养成分分析研究发现^[19-20], 其中含有丰富的 SOD、VC、多酚、黄酮和多糖等, 起抗氧化作用的主要是酚类物质, 它能够提供活泼的氢质

子,有效的清除氧自由基;还能够与过氧化自由基结合成稳定的化合物,阻止氧化过程中的链锁反应的传播;另外,酚类通过对金属离子络合作用清除自由基。还有研究者发现^[21],余甘子对酶性及非酶性体系产生的 $O^{-2} \cdot$ 和 $\cdot OH$ 具有明显的清除作用,并发现余甘子能抑制 Fe^{2+} 诱发卵黄脂蛋白不饱和脂肪酸(PUFA)过氧化作用,认为这些抗氧化活性与余甘子中存在着以丰富的 VC、SOD 为代表的抗氧化物质有关。由此可知,余甘子的抗氧化活性可能是由酚类物质、VC、SOD 等多种有效成分共同作用的结果。

本研究发现,余甘子精粉在抗脂质过氧化能力、铁还原能力、提高 H_2O_2 损伤的 SH-SY5Y 细胞相对存活率方面都表现出一定的抗氧化活性,尤其当浓度达到一定范围时活性更加显著,但与 VC 相比,各检测指标达到同一水平时,所用精粉浓度往往高于 VC 2 至 5 倍。这可能是由于余甘子精粉并非单一成分,它是含有上述多种成分的复合体,其中 VC 抗氧化作用表现在可以与 O_2^{-} 、 HOO^{-} 及 OH^{-} 迅速反应,生成半脱氢抗坏血酸,清除单线态氧,还原硫自由基,依靠可逆的脱氢反应来完成其抗氧化作用^[22]。SOD 能够催化 O_2^{-} 发生歧化反应形成 H_2O_2 , H_2O_2 通过酶促体系分解成 H_2O 和 O_2 ,最后清除 O_2^{-} ^[23]。酚类物质则是由于其羟基取代的高反应性和吞噬自由基的能力而具有很好的抗氧化活性^[24]。因此分析,余甘子精粉的抗氧化活性是通过多种成分、多途径协同作用的结果。由于经过浓缩处理,精粉不仅在有效成分含量上优于果汁,其稳定性和易于保存的特点也是果汁所不能及,下一步将通过提取分离、活性追踪,去除其中与抗氧化活性不相关的成分,得到更纯的有效成分,从而进一步提高余甘子精粉的抗氧化活性。

参考文献:

[1] 药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:167.

[2] 徐义侠. 余甘子化学成分及总酚提取工艺研究[D]. 北京:北京中医药大学,2009.

[3] 张晓梅,刘晓芳,高云涛. 余甘子提取物抗氧化作用研究[J]. 微量元素与健康研究,2011,28(3):29-30.

[4] 李秀丽,叶 峰,俞腾飞. 余甘子的药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):266-267.

[5] Jose JK, Kuttan G, Kuttan R. Antitumour activity of *Embilica officinalis*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 75(2-3): 65

-69.

[6] Jose JK, Kuttan R. Hepatoprotective activity of *Embilica officinalis* and *Chyavanaprash*[J]. Journal Of Ethnopharmacology, 2000, 72(1-2): 135-140.

[7] 刘晓丽,赵谋明. 余甘子果汁活性成分与抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):151-154.

[8] 张雯雯,郑 华,冯 颖,等. 正交试验优化余甘子果汁微胶囊化工艺[J]. 食品科学,2015,36(2):25-29.

[9] ZHENG Hua, ZHANG Hong, GAN Jin, *et al.* Technique of spray-drying on *Phyllanthus emblica* L. and anti-oxidation of the product [J]. Advanced Materials Research, 2012, 524/525/526/527: 2321-2324.

[10] Nakashima A ,Ohtawa M ,Masuda N, *et al.* Antioxidative effects of fluvastatin, and its major metabolites[J]. Yakugaku Zasshi, 2001,121(1):113-116.

[11] Benzie I F, Strain J J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay [J]. Analytical biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.

[12] 王世博,邱景富,白群华,等. 黄芩苷对 H_2O_2 致 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2011,27(11):1603-1609.

[13] 高蒙蒙,孙桂波,斯建勇,等. 红车轴草总黄酮对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2013,29(2):201-207.

[14] Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, *et al.* Oxidative stress in ulcerative colitis - associated carcinogenesis [J]. Pathology-Research and practice, 2008,204(7):511-524.

[15] Peter C, Wootton - Beard, Lisa Ryan. Improving public health?: The role of antioxidant - rich fruit and vegetable beverages [J]. Food Research International,2011,44(10):3135-3148.

[16] 张献忠,黄海智,钟烈洲,等. 植物提取物体外抗氧化活性评价方法研究进展[J]. 中国粮油学报,2012,27(11):122-128.

[17] Blair IA. DNA adducts with lipid peroxidation products[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008,283(23):15545-15549.

[18] 阿 萨. 白藜芦醇通过调节抗氧化酶活性而呈现抗肿瘤效应 [D]. 湖南:中南大学,2013.

[19] 崔炳权,林元藻. 余甘子果汁的营养成分分析[J]. 食品工业科技,2007,28(8):222-223.

[20] 刘晓丽,吴克刚,柴向华,等. 余甘子多酚作为食用油脂抗氧化剂的研究[J]. 中国食品添加剂,2010(3):194-198.

[21] 肖 湘,俞丽君,邱玉莹,等. 油柑多糖的提取与清除氧自由基作用的研究[J]. 中国药理学杂志,1998,33(5):279-281.

[22] Bendich A. The Antioxidant Role of Vitamine C[J]. Adv. in Free Racical Biology & Medicine, 1986, 2: 419-444.

[23] 孙 静. LMWH-SOD 对神经细胞保护作用及其机理研究 [D]. 山东:山东大学,2005.

[24] 阎林茂,郭宇龙,张延龙,等. 百合花瓣酚类物质及其抗氧化活性的分析[J]. 食品科学,2013,34(7):51-55.