

柳蒿芽多糖的制备及抗氧化活性研究

季子琦, 刘荣*, 樊梓鸾
(东北林业大学 哈尔滨 150040)

摘要 目的:从柳蒿芽中分离、纯化多糖,对其抗氧化活性进行研究。方法:采用响应面法优化超声波辅助酶法提取柳蒿芽多糖的工艺条件。结果:最佳提取工艺为:超声功率 300 W,料液比 1:30 g/mL,超声时间 46 min,纤维素酶添加量 2.0%,果胶酶添加量 3.0%,此条件下多糖得率为 7.67%。采用 DEAE-52 层析柱分离、纯化共得到 6 个多糖组分。对 AIP-2 和 AIP-3 两个组分进行抗氧化活性的研究表明,不同质量浓度 AIP-2 和 AIP-3 处理对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤均有较强的浓度依赖性保护作用。与模型组相比,高质量浓度 AIP-2 和 AIP-3(50 μg/mL)处理使细胞存活率提高了 54.35%和 60.26%,SOD 活力提高了 35.86%和 38.98%,CAT 活力提高了 173.02%和 205.42%,GSH-PX 活力提高了 50.24%和 50.78%,MDA 含量降低了 46.13%和 53.87%。结论:柳蒿芽多糖具有良好的抗氧化活性。

关键词 柳蒿芽多糖;超声波辅助酶法提取;分离、纯化;HepG2 细胞;抗氧化

文章编号 1009-7848(2024)04-0235-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.022

柳蒿芽(*Artemisia integrifolia*)是柳蒿的嫩芽。主要生长在我国的呼伦贝尔草原、嫩江平原、大兴安岭南北地区。柳蒿芽滋味鲜美独特,含有多糖、萜烯类、酯类、黄酮等多种化学成分,具有消炎、清热解毒、降脂^[1]、降糖以及降血压等药理保健作用^[2-4]。近年来,已有一些关于柳蒿芽食用价值的文献报道,而对其它药理作用的研究非常有限。目前,从柳蒿芽中分离得到的化合物主要有黄酮类、香豆素等^[5]。

植物多糖是一类天然高分子聚合物,具有免疫调节^[6]、抗衰老、抗肿瘤^[7]、降血糖^[8]、抗氧化^[9],调节肠道菌群等生物活性功能,且对细胞没有毒性作用。由于多糖自身结构的多样性和复杂性,因此其得率和生物活性因提取方式的不同而发生变化。目前植物多糖常见的提取方法有水提法、酸提法、酶提法、超声辅助提取及微波辅助提取等^[10]。然而,单一提取方法有一定的弊端,如耗时久,提取率低等。将多种技术联合使用可以避免这些缺陷,如超声辅助酶提取^[11]、微波辅助酶提取及超声辅助双水相提取^[12]等为现阶段常见的复合提取方法。

有研究表明,氧化应激产生的氧化损伤与糖尿病、动脉硬化、阿尔兹海默症等众多慢性疾病的发生有关^[13]。关于天然抗氧化剂的研究已成为当今的热点之一。通常情况下,多糖的抗衰老作用与提高免疫功能、清除体内氧自由基及抗脂质过氧化密切相关^[14]。Liu 等^[15]研究表明不同分子质量的枸杞多糖具有不同的理化和抗氧化功能。目前,鲜见有关柳蒿芽多糖体外抗氧化活性方面的研究。通过对柳蒿芽多糖提取工艺、分离纯化及体外抗氧化活性的研究,以期对柳蒿芽多糖提取及其抗氧化机制研究以及开发柳蒿芽多糖功能性产品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柳蒿芽,产于吉林省安图县松江镇。

纤维素酶、果胶酶、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、葡萄糖、H₂O₂、苯酚、硫酸、氯化钠、氯化铁均为分析纯级;总蛋白(TP)测定试剂盒、丙二醛试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒、过氧化氢酶试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒,南京建成生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

RE-2000A 旋转蒸发器,上海康代仪器有限公司;KQ-300DE 数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;BB150 二氧化碳培养箱,美国赛默

收稿日期:2023-04-30

基金项目:中央高校科学前沿与交叉学科创新基金项目(2572019BA09);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2020C035)

第一作者:季子琦,女,硕士生

通信作者:刘荣 E-mail:lrwxh123@163.com

飞世尔科技公司; ULTS1368-80℃低温冰箱, 赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 柳蒿芽多糖的提取 材料预处理: 柳蒿芽烘干, 粉碎, 过 60 目筛, 石油醚浸泡 24 h 后, 烘干, 备用。

多糖溶液制备: 称取柳蒿芽粉末 2.00 g 于烧杯中, 加入 pH 5.5 的盐酸溶液^[16], 超声提取并加入纤维素酶和果胶酶, 将烧杯置于 55℃水浴锅中不断搅拌酶解 30 min 后, 立即在沸水中加热 5 min, 使酶失活, 抽滤, 获得多糖提取液。

1.3.1.1 柳蒿芽多糖得率的测定 柳蒿芽多糖溶液中总糖含量采用苯酚-硫酸法^[17]测定。以葡萄糖溶液为标准对照, 计算柳蒿芽多糖得率, 公式如下:

多糖得率 = (测量浓度 × 稀释倍数 × 提取液体积) / 原料干重 × 100% (1)

1.3.1.2 总抗氧化能力(FRAP法)测定 参照刘国艳等^[8]的方法测定柳蒿芽多糖总抗氧化能力, 结果以铁离子还原能力表示。

1.3.1.3 酶添加量的确定 以得率和总抗氧化能力为指标, 采用正交试验确定纤维素酶(A)和果胶酶(B)最佳添加量及配比。试验因素与水平见表 1。

1.3.1.4 柳蒿芽多糖提取工艺的确定 分别考察酶-超声波顺序(酶-超声波、酶耦合超声波、超声波-酶)、料液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, g/mL)、超声功率(180, 210, 240, 270, 300 W)和超声时间(20, 30, 40, 50, 60 min)对柳蒿芽多糖提取得率、总抗氧化能力及综合值的影响。

1.3.1.5 柳蒿芽多糖提取工艺的优化 选取 3 个因素通过 Box-Behnken 中心组合试验设计对柳蒿芽多糖提取进行优化, 分析果胶酶添加量(X_1)、超声时间(X_2)、料液比(X_3)3 个因素之间的相互作用及对柳蒿芽多糖综合值(Y)所产生的影响。试验因素与水平设计见表 2。

1.3.1.6 综合值计算方法 将多糖得率和总抗氧化能力数据均标准化为 0~1 之间的归一值。归一值 d_{\max} 的计算公式如下^[19]:

$$D_{\max} = (D_i - D_{\min}) / (D_{\max} - D_{\min}) \quad (2)$$

式中, D_i ——当前试验值; D_{\min} ——同组试验

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素	
	纤维素酶(A)/%	果胶酶(B)/%
1	0.5	1.0
2	1.0	2.0
3	1.5	3.0
4	2.0	4.0

表 2 响应面试验因素与水平表

水平	因素		
	X_1 (果胶酶添加量)/%	X_2 (超声时间)/min	X_3 (料液比)/g·mL ⁻¹
-1	2.5	45	1:27
0	3.0	50	1:30
1	3.5	55	1:33

中的最小值; D_{\max} ——同组试验中的最大值。

得率和总抗氧化能力的权重分别为 0.5 和 0.5, 将这 2 个指标的归一值分别与权重相乘, 结果相加得出 Y 综合值。

Y (综合值) = 多糖得率归一值 × 50% + 总抗氧化能力归一值 × 50% (3)

1.3.2 柳蒿芽多糖的分离纯化

1.3.2.1 蛋白质的去除 采用 Sevag 法去除柳蒿芽多糖中的蛋白质。氯仿: 正丁醇 = 5:1 (V/V) 配制 Sevag 试剂, 加入 5 倍体积的多糖溶液, 剧烈振荡, 静置分层, 除去中间层的变性蛋白, 取上清液, 多次重复, 尽可能多的去除多糖溶液中的蛋白质。

将除去蛋白的多糖溶液进行浓缩, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 醇析沉淀多糖, 冷冻干燥后为柳蒿芽粗多糖。

1.3.2.2 DEAE-52 离子交换层析 选用 DEAE-52 离子交换层析柱对多糖进行分离纯化^[20]。将多糖溶液加入到柱体中, 依次用蒸馏水、0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱, 每管收集 10 mL, 流速 25 mL/h。管中液体的多糖含量采用苯酚-硫酸法^[17]测定。以横坐标为洗脱液体积, 纵坐标为多糖质量浓度, 绘制柳蒿芽多糖洗脱曲线, 合并相同组分, 50℃下真空旋转浓缩, 透析 48 h 后, 真空冷冻干燥得到不同组分精制多糖。

1.3.3 体外抗氧化活性的研究

1.3.3.1 柳蒿芽多糖对 HepG2 细胞的毒性作用

细胞培养与传代参照唐琳琳^[21]的方法。在 96 孔板中加入 100 μL 细胞密度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,吸去旧培养基。对照组加无血清的 DMEM 培养基,试验组加质量浓度为 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的不同组分多糖溶液。加样后继续培养 24 h, 每组设置 6 个复孔。培养结束后,吸去旧培养基,每孔加入 200 μL 终质量浓度为 0.50 mg/mL 的 MTT 后,继续在 CO_2 培养箱中培养 4 h 后,吸去上清液,每孔加入 150 μL DMSO, 避光振荡 10 min, 在波长 490 nm 处测定 OD 值,按公式(4)计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \text{OD}_{\text{试验}} / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100\% \quad (4)$$

式中, $\text{OD}_{\text{试验}}$ ——试验组吸光值; $\text{OD}_{\text{对照}}$ ——对照组吸光值。

1.3.3.2 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤模型的建立

参照 Chang^[22]的方法并稍加修改。按上述步骤将细胞接种于 96 孔板中,加入不同浓度 H_2O_2 溶液(终浓度分别为 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$),于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 4 h。计算细胞存活率,选择细胞存活率接近 50%时的 H_2O_2 浓度进行后续试验^[23]。

1.3.3.3 柳蒿芽多糖对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞存活率的影响

在 6 孔板中加入 2 mL 上述细胞悬液培养 24 h 后,吸去旧培养液,设置空白组(BC)、模型组(MC)、试验组,空白组加入无血清的 DMEM 培养基;模型组先用无血清的 DMEM 培养基培养 24 h,再加一定浓度 H_2O_2 培养 4 h;试验组先加不同浓度柳蒿芽多糖样液培养 24 h,再加一定浓度的 H_2O_2 培养 4 h。每组设 4 个复孔。培养结束后,吸去旧培养基,计算细胞存活率。

1.3.3.4 与抗氧化酶活性有关指标的测定

按照试剂盒方法,测定细胞内与抗氧化酶活性有关指标,包括总蛋白(TP)、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性^[24]。

1.4 数据处理与分析

所有数据统计分析均采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行,各试验重复 3 次,图片由 Origin

2021 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 柳蒿芽多糖的提取

2.1.1 多糖标准曲线分析结果

经过测定,得到回归方程: $Y = 5.7288X + 0.157$, $R^2 = 0.9993$,线性关系良好。

2.1.2 酶添加量的确定

由表 3 和表 4 可知,果胶酶对柳蒿芽多糖提取的综合值影响显著 ($P < 0.05$),纤维素酶则不显著 ($P > 0.05$)。由直观分析可得,酶提取柳蒿芽多糖的最佳添加量为 A_4B_3 ,即果胶酶添加量和纤维素酶添加量分别为 3.0%和 2.0%。在此条件下,柳蒿芽多糖得率为 3.69%,总抗氧化能力为 75.42%。

表 3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test

序号	因素		Y/%
	A	B	
1	1	1	33.25
2	1	2	49.66
3	1	3	59.14
4	1	4	48.77
5	2	1	49.08
6	2	2	50.00
7	2	3	50.02
8	2	4	52.71
9	3	1	46.97
10	3	2	46.67
11	3	3	46.59
12	3	4	52.11
13	4	1	45.23
14	4	2	50.13
15	4	3	59.51
16	4	4	53.46
k_1	47.705	43.633	
k_2	50.453	49.115	
k_3	48.085	53.815	
k_4	52.083	51.763	
r	4.378	10.182	

表4 正交试验的方差分析

Table 4 Analysis of variance of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	51.098	3	0.934	3.860	
B	233.150	3	4.264	3.860	*
误差	164.05	9			

注:*. $P < 0.05$ 。

2.1.3 柳蒿芽多糖提取工艺的单因素实验

2.1.3.1 酶、超声波提取顺序对柳蒿芽多糖提取效果的影响 由图1和表5可知,酶、超声提取顺序不同,柳蒿芽多糖得率和活性也不相同,且提取顺序对综合值有显著影响($P < 0.05$)。当提取工艺为先超声再酶解时,多糖得率最高为7.56%,总抗氧化能力也最高为66.78%,综合值也达最高为100。因此选取提取工艺为先超声再酶解。

与2.1.2节仅用酶提取相比,超声辅助酶提取后柳蒿芽多糖得率增加了3.87%,而抗氧化活性减少了8.64%。这是因为超声波较强的作用力使细胞破碎更完全,利于多糖溶出,而同时也导致了部分多糖结构被破坏,抗氧化能力降低。

2.1.3.2 料液比、超声功率、超声时间对柳蒿芽多糖提取效果的影响 柳蒿芽多糖得率在料液比为1:25 g/mL时,得率最高为7.62%(图2a)。这是因为适当增加提取溶剂可使柳蒿芽粉末与其充分接触,有利于多糖浸出,而溶剂过量会导致超声和酶对细胞的破坏作用降低,多糖溶出量减少^[25]。在超声功率为270 W时,多糖得率最高为7.66%(图2b),超声功率超过270 W时,得率开始减小。这可能是由于超声功率过高,产生的空化泡未能及时破裂,导致部分植物细胞的细胞壁没有被破坏,多糖溶出不完全,得率减少^[26]。超声时间为50 min时,多糖得率最高为7.55%(图2c),超声时间超过50 min时,多糖得率开始减少,可能是由于超声时间过长,超声波较强的作用力破坏了多糖的自身结构,使一些较大分子质量的多糖发生降解^[27]。

有研究发现超声处理会破坏多糖分子链并改变其表面形态^[28],影响其组成、结构及理化性质,进而影响其抗氧化活性^[29]。由图2a可知,料液比不同,柳蒿芽多糖总抗氧化能力也不相同。当料液比为1:30 g/mL时,柳蒿芽多糖总抗氧化能力最高为65.68%,此时综合值也最高为79.80。图2b

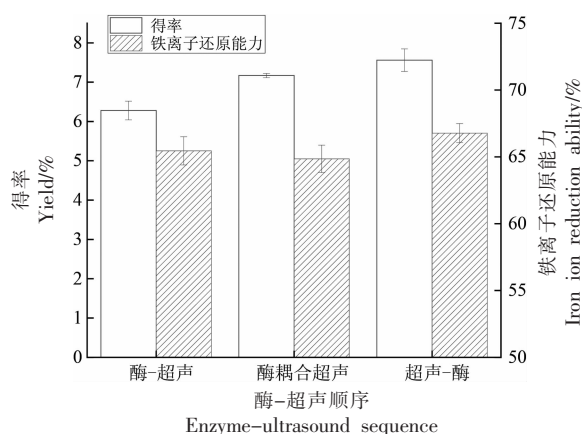


图1 提取顺序对柳蒿芽多糖提取得率和铁离子还原能力的影响

Fig.1 Effects of extraction sequence on the yield and iron ion reduction ability of polysaccharides from *Artemisia integrifolia*

表5 提取顺序对柳蒿芽多糖提取综合值的影响

Table 5 Effects of extraction sequence on comprehensive extraction value of polysaccharides from *Artemisia integrifolia*

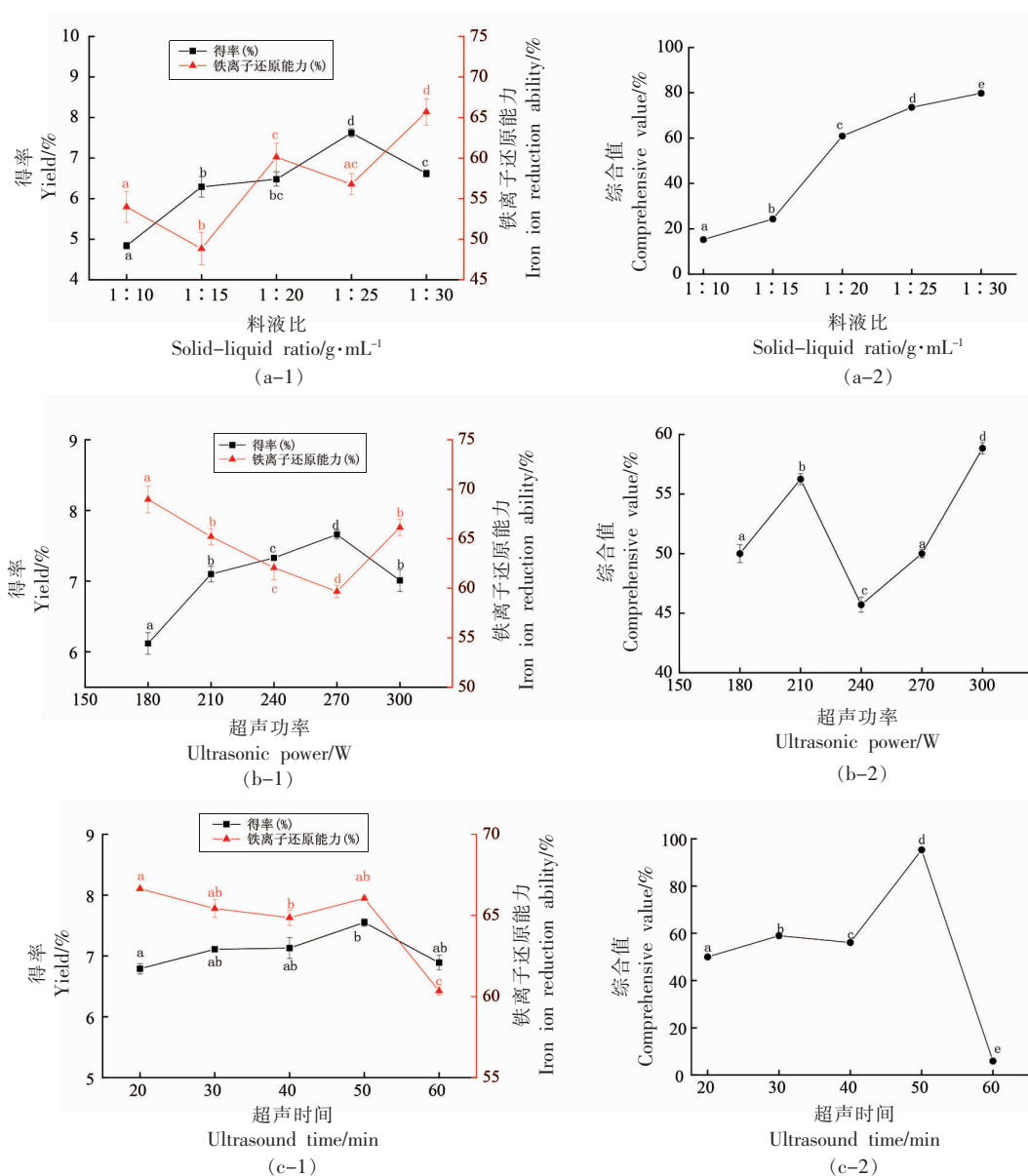
提取顺序	Y(综合值)/%
酶-超声	12.43 ± 0.64 ^a
酶耦合超声	34.79 ± 0.53 ^b
超声-酶	100 ± 0.50 ^c

注:同一指标不同肩标字母表示差异显著($P < 0.05$)。

可知,随超声功率的增加,总抗氧化能力呈先降低后升高的趋势。当超声功率为300 W时,综合值最高为58.84。由图2c可知,随着超声时间的延长,总抗氧化能力整体呈下降趋势。当超声时间为50 min时,综合值最高为95.32。因此,选取柳蒿芽多糖提取料液比1:30 g/mL,超声功率300 W,超声时间50 min。

2.1.4 柳蒿芽多糖提取工艺的正交试验优化

2.1.4.1 模型的建立与分析 利用 Design-Expert 软件拟合表6的数据,可以得到多糖提取率回归



注:小写字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图 2 料液比(a)、超声功率(b)和超声时间(c)对柳蒿芽多糖提取的影响

Fig.2 Effects of solid-liquid ratio (a), ultrasonic power (b) and ultrasonic time (c) on the extraction of polysaccharides from *Artemisia integrifolia*

方程为: $Y = 52.03 - 1.66A + 0.83B + 0.11C - 0.70AB + 6.20AC - 1.54BC - 12.11A^2 - 3.79B^2 - 9.57C^2$ 。

由表 7 可知,回归模型 $P < 0.01$,模型相关系数 R^2 为 0.8229,证明该回归模型达到极显著的水平,模型拟合度较好,可以用来预测柳蒿芽多糖的提取条件。失拟度 $P > 0.05$,表明失拟度差异不显著,残差是由随机误差引起的。另外,3 个因素对柳蒿

芽多糖提取影响的强弱为:果胶酶添加量 > 超声时间 > 料液比。交互项 AC,二次项 A^2 、 C^2 对柳蒿芽多糖提取影响显著 ($P < 0.05$);一次项 A、B、C,交互项 AB、BC,二次项 B^2 对柳蒿芽多糖提取影响不显著 ($P > 0.05$);这说明试验因素与多糖提取之间呈现出非线性关系^[30]。

表6 响应面设计及结果

Table 6 Response surface design and results

序号	A	B	C	Y(综合评分)	序号	A	B	C	Y(综合评分)
1	2.5	45	1:30	37.90	10	3	55	1:27	45.19
2	3.5	45	1:30	37.89	11	3	45	1:33	35.22
3	2.5	55	1:30	35.75	12	3	55	1:33	38.99
4	3.5	55	1:30	32.96	13	3	50	1:30	50.25
5	2.5	50	1:27	37.39	14	3	50	1:30	48.79
6	3.5	50	1:27	19.74	15	3	50	1:30	52.17
7	2.5	50	1:33	28.55	16	3	50	1:30	52.93
8	3.5	50	1:33	35.71	17	3	50	1:30	55.99
9	3	45	1:27	35.24					

表7 方差分析

Table 7 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均值	F值	P值	显著性
模型	1 356.08	9	150.68	9.26	0.0039	**
A	22.08	1	22.08	1.36	0.2823	
B	5.51	1	5.51	0.34	0.5789	
C	0.10	1	0.10	6.36×10 ⁻³	0.9387	
AB	1.93	1	1.93	0.12	0.7406	
AC	153.88	1	153.88	9.46	0.0179	*
BC	9.55	1	9.55	0.59	0.4687	
A ²	617.15	1	617.15	37.92	0.0005	**
B ²	60.62	1	60.62	3.72	0.0949	
C ²	385.76	1	385.76	23.70	0.0018	**
残度	113.93	7	16.28			
失拟度	83.75	3	27.92	3.70	0.1193	
纯误差	30.18	4	7.54			
总和	1 470.01	16				

注:*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$ 。

2.1.4.2 交互作用分析与优化 图3为料液比、超声时间、果胶酶添加量交互作用对柳蒿芽多糖提取的影响结果。曲线走势越陡,对应等高线越圆,表明该因素影响越显著;走势越平滑,则表明该因素影响较小^[31]。由图3所示,综合值随着3个因素的增加呈先增加后减小的趋势。其中果胶酶添加量与料液比两个因素之间交互作用显著,当果胶酶添加量为3.0%时,提取的综合值达到最大;而超声时间与果胶酶添加量和料液比与超声时间二者交互作用不显著,在料液比约为1:30 g/mL,超声时间为50 min时,达到最大值。

模型预测柳蒿芽多糖的最佳提取工艺为:超

声时间46.45 min,果胶酶添加量2.89%,料液比1:29.87 g/mL。在最佳提取工艺条件下,柳蒿芽多糖的得率为7.67%,总抗氧化能力为66.05%,综合值为49.23。因实际操作具有局限性,各因素分别修正为:超声时间46 min,果胶酶添加量3.0%,料液比1:30 g/mL。对得到的模型进行验证试验(平行3次),得到柳蒿芽多糖得率的平均值为7.60%,总抗氧化能力为65.96%。试验结果稳定,重现性较好,与模型预测值的误差较小,说明该模型有效。

2.2 柳蒿芽多糖的分离、纯化

由图4可知,柳蒿芽多糖经DEAE-52离子交换层析分离纯化共得到6个峰,即对应6个不同

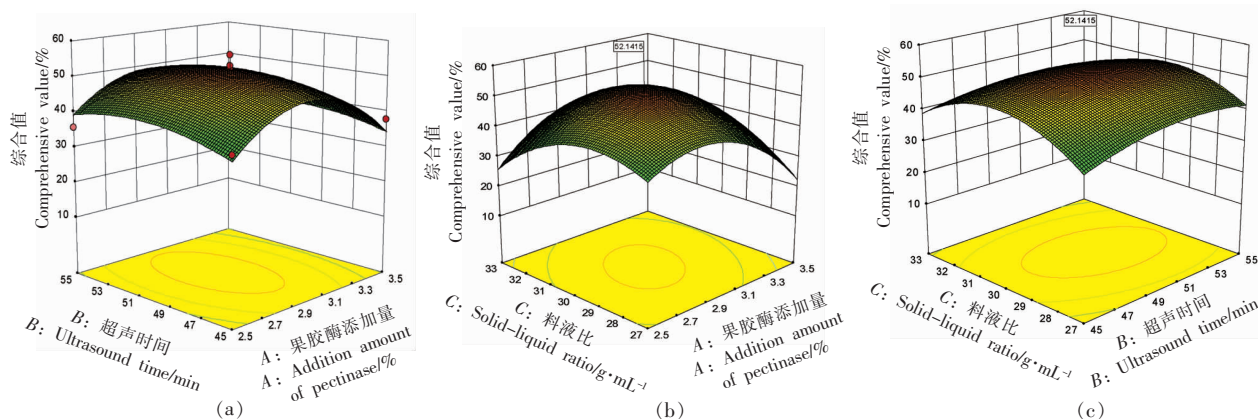


图 3 超声时间、果胶酶添加量与料液比交互作用对提取效果的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic time, pectinase addition and the ratio of solid to liquid on extraction

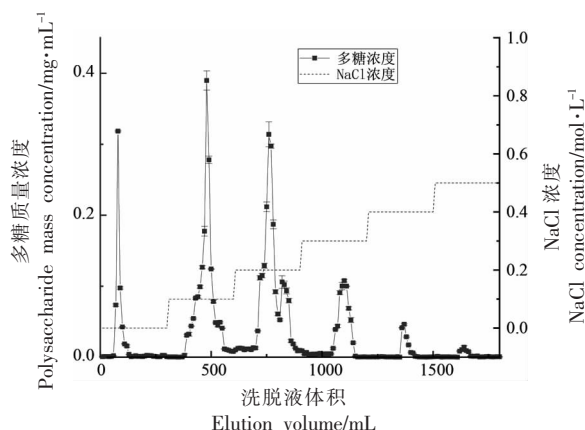


图 4 柳蒿芽多糖的 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

Fig.4 DEAE-52 column chromatography elution curve of *Artemisia integrifolia* polysaccharide

组分, 分别命名为:AIP-1、AIP-2、AIP-3、AIP-4、AIP-5、AIP-6, 所占比例分别为 10.4%, 33.34%, 39.46%, 13.02%, 2.67%, 1.08%。其中 AIP-1 为中性多糖,AIP2-6 为酸性多糖。收集含量最多的 2 个组分 AIP-2 和 AIP-3,经浓缩、透析、真空冷冻干燥后得到纯化多糖组分。

2.3 柳蒿芽多糖的体外抗氧化活性

2.3.1 柳蒿芽多糖对 HepG2 细胞的毒性作用 不同质量浓度、不同组分多糖对 HepG2 细胞的毒性作用通过细胞存活率来体现。如图 5 所示,当 AIP-2 与 AIP-3 的质量浓度在 75~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率在 118%~137%之间,两组分对细胞有明显的增殖作用。当质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,存活率分别降低至 66.09%和 84.25%,表明此质量浓

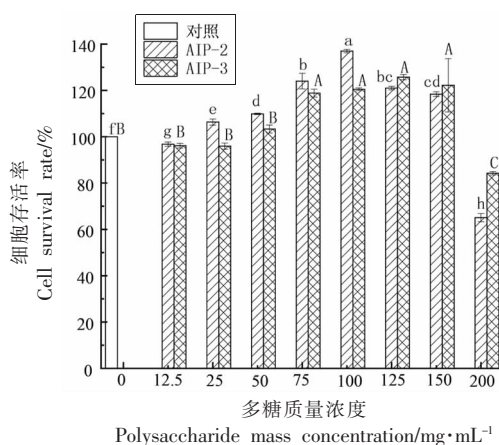


图 5 不同质量浓度的柳蒿芽多糖对 HepG2 细胞存活率的影响

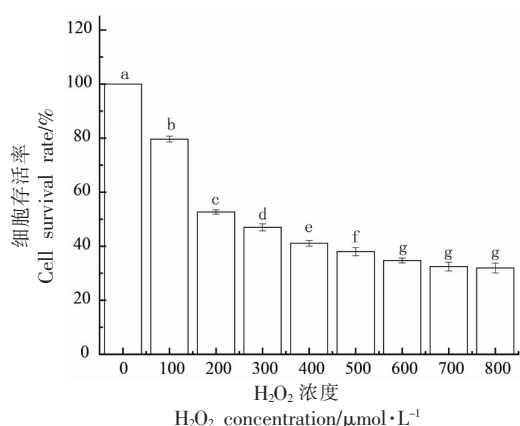
Fig.5 Effects of different mass concentrations of *Artemisia integrifolia* polysaccharide on the survival rate of HepG2 cells

度会对细胞产生毒性作用。当质量浓度在 12.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率在 95%~100%之间,表明在此质量浓度范围内,多糖对细胞既不会产生明显的毒性作用,也不会产生明显的增殖作用。因此,选择多糖质量浓度 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行后续研究。

2.3.2 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤模型的建立 H_2O_2 有很强的氧化性,能在细胞内转化为活性较高的羟自由基,引发一系列反应,使细胞生发氧化应激^[32]。

由图6可知,随着 H_2O_2 浓度的升高,细胞存活率显著降低($P<0.05$)。当 H_2O_2 浓度由 $100\ \mu\text{mol/L}$ 增加至 $800\ \mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率由 79.62% 降低至 31.95% 。当 H_2O_2 浓度为 $200\ \mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为 52.67% ,接近 50% ,因此选择浓度为 $200\ \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 构建细胞氧化损伤模型。

2.3.3 柳蒿芽多糖对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞存活率的影响 AIP-2 和 AIP-3 对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用如图7所示。从图中可



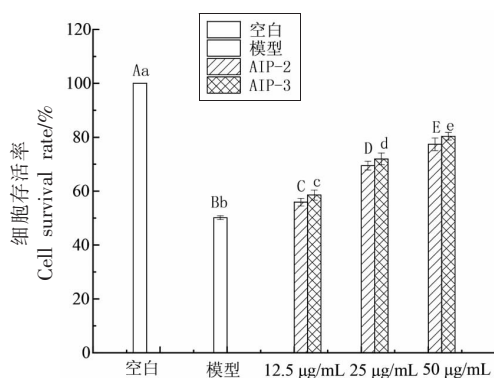
注:小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)。

图6 不同浓度的 H_2O_2 诱导对 HepG2 细胞存活率的影响
Fig.6 Effects of different concentrations of H_2O_2 on the survival rate of HepG2 cells

2.3.4 柳蒿芽多糖对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞内抗氧化酶活力相关指标的影响 研究表明 H_2O_2 诱导的 ROS 产生可引起细胞脂质过氧化并产生 MDA,因而测定 MDA 的含量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度^[33]。SOD 常用来反映细胞氧化损伤程度,其能催化超氧化物阴离子发生歧化作用,生成 H_2O_2 和 O_2 ,是生物体内清除自由基的首要物质^[34]。CAT 将细胞内产生的 H_2O_2 转化为 H_2O 和 O_2 ,并防止 H_2O_2 转化为更具活性的物质,是生物防御系统的关键酶^[35]。GSH 能参与体内氧化还原反应,清除亲电子基、氧自由基等物质,具有较好的抗氧化活性^[36]。

AIP-2 和 AIP-3 对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞内抗氧化酶活力相关指标的影响如图8所示。与空

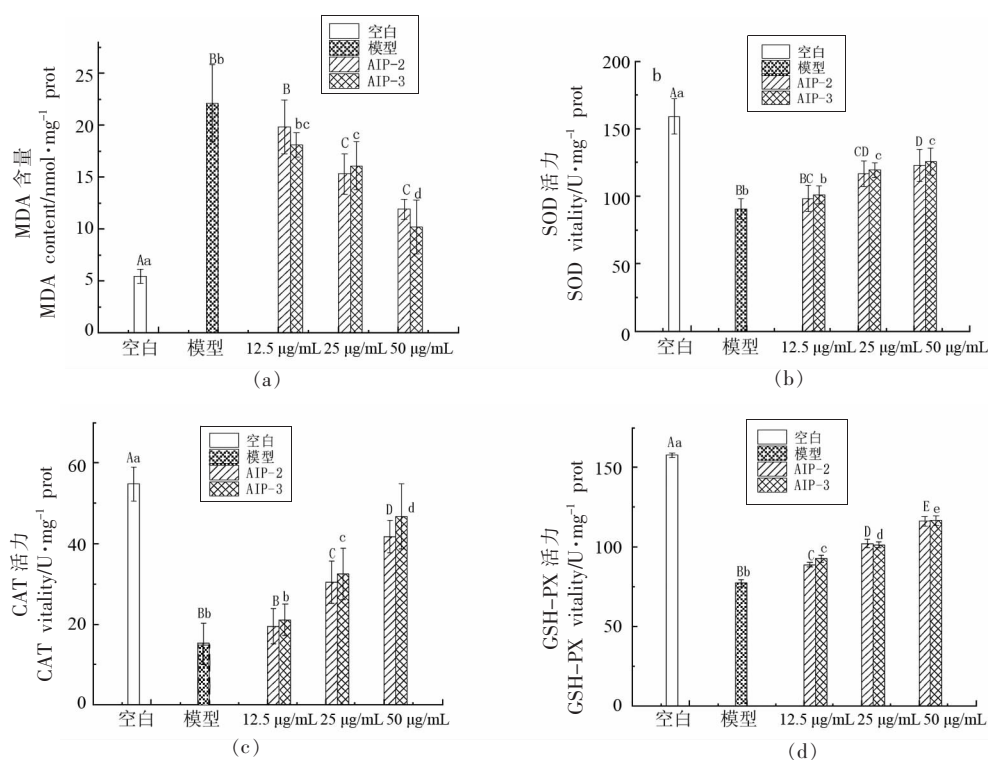
以看出,模型组细胞存活率为 50.15% ,与空白组相比降低了 49.85% ,表示细胞氧化损伤模型建立成功。与模型组相比,不同质量浓度多糖作用24 h后,细胞存活率呈浓度依赖方式显著增加。当用质量浓度为 $50\ \mu\text{g/mL}$ 的 AIP-2 和 AIP-3 作用于细胞后,细胞存活率分别增加了 54.35% 和 60.26% ,表明 AIP-2 和 AIP-3 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤均有较强的保护作用,且 AIP-3 保护作用强于 AIP-2。



注:小写字母不同表示不同质量浓度 AIP-2 组间差异显著($P<0.05$);大写字母不同表示不同质量浓度 AIP-3 组间差异显著($P<0.05$)。

图7 柳蒿芽多糖对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞存活率的影响
Fig.7 Effect of *Artemisia integrifolia* polysaccharide on H_2O_2 -induced survival rate of HepG2 cells

白组相比,模型组细胞内 MDA 含量显著增加了 307.56% ,SOD、CAT、GSH-PX 活力分别降低了 43.10% 、 72.04% 、 51.00% ,表明细胞内发生了脂质过氧化反应。经 AIP-2 和 AIP-3 作用细胞24 h后,细胞内 MDA 含量呈现出浓度依赖性降低,SOD、CAT、GSH-PX 活力随多糖质量浓度的升高而逐渐提高。当质量浓度为 $50\ \mu\text{g/mL}$ 时,AIP-2 和 AIP-3 分别使细胞内 MDA 含量较模型组降低了 46.13% 和 53.87% ,SOD 活力、CAT 活力、GSH-PX 活力较模型组分别增加了 35.86% 和 38.98% 、 173.02% 和 205.42% 、 50.24% 和 50.78% 。结果表明,AIP-2 和 AIP-3 均能在一定程度上抑制 HepG2 细胞的脂质过氧化,从而对 H_2O_2 导致的氧化损伤起一定的保护作用,且 AIP-3 组分的保护作用更强。



注:小写字母不同表示不同质量浓度 AIP-2 组间差异显著 ($P<0.05$);大写字母不同表示不同质量浓度 AIP-3 组间差异显著 ($P<0.05$)。

图 8 柳蒿芽多糖对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞内 MDA(a)、SOD(b)、CAT(c)、GSH-PX(d) 含量的影响

Fig.8 Effect of *Artemisia integrifolia* polysaccharide on MDA (a), SOD (b), CAT (c), GSH-PX (d) content in HepG2 cells induced by H₂O₂

3 结论

本试验采用超声波辅助酶法确定了柳蒿芽多糖的最佳提取工艺,经 DEAE-52 离子交换层析分离、纯化得到两种主要多糖组分 AIP-2 和 AIP-3,均为酸性多糖。体外抗氧化试验结果表明,AIP-2 和 AIP-3 处理均能显著增加 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞的存活率,细胞内 SOD 活力、CAT 活力、GSH-PX 活力显著增加,MDA 含量显著降低,说明 AIP-2 和 AIP-3 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤均有较强的保护作用,且相同质量浓度下,AIP-3 的保护作用优于 AIP-2,证实了柳蒿芽多糖的抗氧化活性。

参 考 文 献

[1] XU Y H, WANG Q H, BAO W Q, et al. Antihyperlipidemic effect, identification and isolation of the lipophilic components from *Artemisia integrifolia* [J].

Molecules, 2019, 24(4): 725.

[2] BAO H S E, WANG Q H, BA E E D L G, et al. Isolation, structure elucidation, antioxidant and hepatoprotective effects of petroleum ether extract of *Artemisia integrifolia* L. against CCl₄-induced liver injury in rats[J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2018, 12(6): 80-86.

[3] 穆师洋, 胡文忠, 姜爱丽. 柳蒿芽营养成分及生物活性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 385-387.

MU S Y, HU W Z, JIANG A L. Review on the nutritional ingredients and bioactive ingredients of *Artemisia integrifolia* L[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(13): 385-387.

[4] 张剑, 李素君, 籍保平, 等. 柳蒿芽对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学. 2008, 29(5): 405-408.

ZHANG J, LI S J, JI B P, et al. Modulation effects of *Artemisia integrifolia* on immune function of mice[J]. Food Science, 2008, 29(5): 405-408.

- [5] 王青虎, 额尔敦布拉嘎, 徐艳华, 等. 柳蒿芽化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(20): 1726-1728.
WANG Q H, E E D B L G, XU Y H, et al. Study on chemical constituents of *Artemisia integrifolia* L[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2018, 53(20): 1726-1728.
- [6] LI S, WANG X F, REN L N, et al. Protective effects of γ -irradiated *Astragalus* polysaccharides on intestinal development and mucosal immune function of immunosuppressed broilers[J]. Poultry Science, 2019, 98(12): 6400-6410.
- [7] 胡盼盼. 乳酸菌胞外多糖发酵条件优化及抗肿瘤活性的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 187-192.
HU P P. Fermentation conditions optimization and antitumor activity of exopolysaccharides by lactic acid bacteria[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 187-192.
- [8] LIU H J, HUAN G, YU W S, et al. Effects of different extraction methods on the structural properties and bioactivities of polysaccharides extracted from Qingke (Tibetan hulless barley)[J]. Journal of Cereal Science, 2019, 92(C): 102906.
- [9] ZHANG X X, NI Z J, ZHANG F, et al. Physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* seed dreg polysaccharides prepared by continuous extraction[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100282.
- [10] 王曼宇, 刘乃新, 张福顺. 植物源性多糖提取及生物活性研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(29): 34-41.
WANG M Y, LIU N X, ZHANG F S. Extraction and bioactivity of plant derived polysaccharides: A review [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(29): 34-41.
- [11] CHEN W W, JIA Z B, ZHU J J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from thick-shell mussel (*Mytilus coruscus*) and their antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1116-1125.
- [12] TAN J Q, CUI P S, GE S Q, et al. Ultrasound assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Cornus officinalis* fruit: Modeling, optimization, purification, and characterization[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 84: 105966.
- [13] CHEN X X, WANG X, SHEN M Y, et al. Combined RNA-Seq and molecular biology technology revealed the protective effect of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on H₂O₂-induced oxidative damage in L02 cells through regulating mitochondrial function, oxidative stress and Pi3K/Akt and MAPK signaling pathways[J]. Food Research International, 2022, 155: 111080.
- [14] NAA Y O P, BRIGHT K A, ZHOU C S, et al. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant, antibacterial and anticancer activities of water-soluble plant polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2262-2271.
- [15] LIU J F, PU Q S, QIU H D, et al. Polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. by integrated tandem hybrid membrane technology exert antioxidant activities in mitochondria[J]. Industrial Crops & Products, 2021, 168: 113547.
- [16] 朱翹楚, 王志强, 向晶, 等. 酶法提取柳蒿芽多糖的工艺条件[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(12): 54-55.
ZHU Q C, WANG Z Q, XIANG J, et al. Process conditions for enzymatic extraction of polysaccharide from *Artemisia integrifolia* L[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2009, 37(12): 54-55.
- [17] 李湘利, 刘静, 邓英立, 等. 超声-微波协同提取鸡枞菌多糖的工艺优化及抗氧化性[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 184-189.
LI X L, LIU J, DENG L Y, et al. Optimization of ultrasonic-microwave extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Termitomyces albuminosus* L[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 184-189.
- [18] 刘国艳, 李思童, 梁丽, 等. 油茶籽油不同形态酚类化合物的抗氧化互作关系[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 34-39.
LIU G Y, LI S T, LIANG L, et al. Antioxidant interaction of different forms of phenolic compounds extracted from camellia seed oil[J]. Food Science, 2021, 42(11): 34-39.
- [19] 赵改名, 焦阳阳, 祝超智, 等. 基于极差分析法与主成分分析法研究新型牛肉薄饼加工工艺[J]. 现代食品科技, 2019, 35(11): 144-151.
ZHAO G M, JIAO Y Y, ZHU C Z, et al. Research on new beef pancake processing technology based on range analysis and principal component

- analysis[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(11): 144–151.
- [20] 王婷婷. 无花果叶多糖提取纯化及降血糖活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- WANG T T. Extraction, purification and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Ficus carica* L. leaves[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.
- [21] 唐琳琳. 红树莓籽油提取及体外抗氧化、降血脂活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- TANG L L. Study on extraction of red raspberry seed oil and its antioxidant and hypolipidemic activity *in vitro*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.
- [22] CHANG X W, DONG S, BAI W L, et al. Methylated metabolites of chicoric acid ameliorate hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(7): 2179–2189.
- [23] 蔡小华, 李小伟, 李国坤, 等. 辣木叶水提物对 H_2O_2 致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(10): 62–69.
- CAI X H, LI X W, LI G K. Protective effects of an aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves against H_2O_2 -induced oxidative damage in HepG2 cells[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(10): 62–69.
- [24] XIONG W F, LI Y, YAO Y J, et al. Antioxidant mechanism of a newly found phenolic compound from adlay (Ndps) in HepG2 cells via Nrf2 signalling[J]. *Food Chemistry*, 2022, 378: 132034.
- [25] SUN H Y, LI C Y, NI Y J, et al. Ultrasonic/microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits and its antitumor activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 206: 557–564.
- [26] 王秀杰, 相艳, 金杰. 超声波-微波协同提取西瓜皮多糖及体外抗氧化活性研究[J]. *现代食品*, 2022, 28(4): 165–169.
- WANG X J, XIANG Y, JIN J. Study on ultrasonic and microwave synergistic extraction of watermelon peel polysaccharide and its antioxidation *in vitro*[J]. *Modern Food*, 2022, 28(4): 165–169.
- [27] 张静, 温暖, 刘阳洋, 等. 响应面法优化蒲公英根多糖超声辅助提取工艺[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2018, 34(2): 209–215, 230.
- ZHANG J, WEN N, LIU Y Y, et al. Optimization of ultrasonic extraction technology polysaccharides from dandelion roots by response surface method[J]. *Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition)*, 2018, 34(2): 209–215, 230.
- [28] 陈劲然. 超声波对黄大茶多糖的提取率、结构及生物活性的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
- CHEN J R. Effects of ultrasound on extraction rate, structure and biological activity of polysaccharides from large yellow tea[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2020.
- [29] 吴雅清, 冷小鹏. 多糖体外抗氧化作用及其影响因素[J]. *广州化工*, 2018, 46(4): 4–9, 16.
- WU Y Q, LENG X P. Antioxidant activity and influencing factors of polysaccharides *in vitro* [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2018, 46(4): 4–9, 16.
- [30] 原姣姣, 陈锦璇, 张帆, 等. 响应面优化超声-酶辅助强化油橄榄叶多糖的提取[J]. *中国油脂*, 2019, 44(4): 128–132.
- YUAN J J, CHEN J X, ZHANG F, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from olive leaf optimized by response surface methodology[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(4): 128–132.
- [31] HSIEH Y H, LI Y B, PAN Z C, et al. Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 63(C): 104915.
- [32] HU Y M, LU S Z, LI Y S, et al. Protective effect of antioxidant peptides from grass carp scale gelatin on the H_2O_2 -mediated oxidative injured HepG2 cells [J]. *Food Chemistry*, 2021, 373(Part B): 131539.
- [33] 王颖颖. 牡丹籽蛋白水解物的制备及其抗氧化特性的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2020.
- WANG Y Y. Study on preparation of tree peony seed protein hydrolysate and its antioxidant activity [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2020.
- [34] 叶贺丹. 绿豆抗氧化肽的制备及其分离纯化与结构鉴定[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- YE H D. Preparation, separation, purification and structural identification of mung bean antioxidant peptides[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [35] LI G S, ZHAN J Q, HU L P, et al. Identification of novel antioxidant peptide from porcine plasma hydrolysate and its effect in *in vitro* digestion/HepG2

- cells model[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 46(4): e13853.
- [36] LI G S, ZHAN J Q, HU L P, et al. Identification of a new antioxidant peptide from porcine plasma by *in vitro* digestion and its cytoprotective effect on H₂O₂ induced HepG2 model[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104679.

Studies on Preparation and Antioxidant Activity of *Artemisia integrifolia* Polysaccharides

Ji Ziqi, Liu Rong*, Fan Ziluan

(Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract Objective: Isolate and purify polysaccharides from *Artemisia integrifolia* and to investigate their antioxidant activity. Methods: The optimum extraction process was obtained by ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from *Artemisia integrifolia* using response surface methodology. Results: The optimum extraction process was obtained as follows: ultrasonic power 300 W, material-liquid ratio 1:30 g/mL, ultrasonic time 46 min, addition amount of cellulase 2.0%, addition amount of pectinase 3.0%, and under this condition, polysaccharide yield 7.67%. A total of six polysaccharide fractions were obtained by separation and purification using DEAE-52 chromatography column. Antioxidant activity studies on both AIP-2 and AIP-3 fractions showed that both AIP-2 and AIP-3 treatments at different mass concentrations had strong concentration-dependent protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells. Compared with the model group, treatment with high mass concentrations of AIP-2 and AIP-3 (50 μg/mL) increased cell survival by 54.35% and 60.26%, SOD viability increased by 35.86% and 38.98%, CAT viability increased by 173.02% and 205.42%, GSH-PX viability increased by 50.24% and 50.78%, and MDA content decreased by 46.13% and 53.87%. Conclusion: *Artemisia integrifolia* polysaccharide has good antioxidant activity.

Keywords *Artemisia integrifolia* polysaccharide; ultrasonic-assisted enzymatic extraction; isolation and purification; HepG2 cells; antioxidant