

不同极性段滇黄精抗氧化及细胞保护作用评价

陈凯燕¹, 方语文¹, 张 猛¹, 程桂广¹, 刘亚平^{1*}, 周文兵^{2*}

(¹昆明理工大学食品科学与工程学院 昆明 650500

²烟草行业病虫害生物防治工程研究中心 云南玉溪 653100)

摘要 目的:以食药同源明星植物滇黄精为原料,探讨不同极性段滇黄精的体外抗氧化活性和细胞保护作用。方法:通过 D101 大孔树脂,以滇黄精根茎甲醇提取物上柱,使用不同体积分数的甲醇水(20%,40%,60%,80%,100%)依次洗脱获得不同极性段的滇黄精样品,测定其总酚、总黄酮含量,通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)方法评价各极性段滇黄精样品的体外抗氧化活性,利用 H₂O₂ 诱导的 HePG2 细胞氧化应激模型测定了细胞内活性氧(ROS)、脂质过氧化物(MDA)的含量和抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)]活性,评估不同极性段滇黄精样品的抗氧化活性和细胞保护作用。通过主成分分析(PCA),评估不同极性段滇黄精样品的总酚总黄酮含量、体外抗氧化活性、胞内 ROS 与 MDA 含量及胞内抗氧化酶(SOD、GSH-px)活性之间的相关性。结果表明:各极性段样品的抗氧化能力与总酚、总黄酮的含量呈正相关关系,含量越高,抗氧化能力越强。40%和 60%甲醇段样品总酚含量(TPC)分别为(40.27±0.59)mg GAE/g 提取物和(51.34±2.08)mg GAE/g 提取物;总黄酮含量(TFC)分别为(23.95±1.73)mg RE/g 提取物和(24.97±2.75)mg RE/g 提取物。40%和 60%甲醇段样品体外清除自由基的效果显著,能显著抑制细胞内 ROS 的生成,提高细胞内 SOD、GSH-px 的水平,降低 MDA 的含量,体现出较好的抗氧化活性和细胞保护作用。结论:不同极性段滇黄精样品均具有一定的抗氧化活性和细胞保护作用,其中 40%和 60%甲醇段样品效果最为显著。

关键词 滇黄精; 不同的极性段; 抗氧化; 细胞保护

文章编号 1009-7848(2024)08-0133-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.08.013

活性氧(ROS)是体内常见且重要的内源性自由基,在正常范围内的细胞信号传导和稳态中起着至关重要的作用,在机体内可分为内源性和外源性 2 种^[1]。机体内线粒体的有氧呼吸和代谢是内源性 ROS 的主要来源^[2]。外源性 ROS 主要由外源性物理因素,如光照、药物、污染等使细胞产生的^[3]。机体内 ROS 过量积累会导致氧化和抗氧化状态失衡,损伤细胞中脂质、蛋白质和 DNA,加速机体衰老^[4]。在氧化还原平衡状态被破坏时,会引起细胞发生转化,严重时会引起癌症^[5],高血压、心血管疾病^[6]、慢性炎症,糖尿病^[7]。抗氧化酶和抗氧化剂能有效的清除多余的自由基,维持体内的氧化平衡,进而减少疾病的发生。因此保持机体内 ROS 的产生与消除平衡对保持健康具有重要意义^[3]。

植物类多酚和黄酮是主要的天然抗氧化剂^[8],在植物中广泛存在,目前在植物中已发现 8 000 多种多酚化合物,其中 4 000 余种是类黄酮^[9]。许多植物提取物和植物化学成分通过直接清除体内自由基,维持体内自由基平衡^[10]。有研究表明表儿茶素、槲皮素、二氢槲皮素、芦丁等结构相似的黄酮类化合物具有 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)自由基清除活性,能降低氧化应激小鼠血清中 MDA 含量,提高抗氧化酶活性^[11]。海蒿子提取物多酚组分能有效清除 ABTS 和 DPPH 自由基,样品浓度越高,清除效果越好,呈浓度依赖性^[12]。

滇黄精(*Polygonatum kingianum*)是百合科黄精属植物,多产于云南、贵州、四川^[13]。滇黄精作为中国传统滋补药材,集药用、保健、食用于一体,可广泛应用于新型药物、功能性食品研发中,具有极高的应用价值和广阔的市场前景^[14]。滇黄精的主要活性成分为多糖、多酚、黄酮^[15]。滇黄精多糖分为中性糖和酸性糖,具有增强免疫力^[16],延缓衰

收稿日期: 2023-08-06

基金项目: 云南省重大科技计划项目(202202AG050009);
云南省应用基础研究面上项目(202101AT070436)

第一作者: 陈凯燕,女,硕士生

通信作者: 刘亚平 E-mail: liuyaping@kust.edu.cn
周文兵 E-mail: yaowufx2001@163.com

老^[17],抗糖尿病^[18-19]等活性。滇黄精富含黄酮多酚,有研究采用 UPLC-Q/TOF-MS 对滇黄精根茎提取物进行定性分析,鉴定出的黄酮类化合物约占 37%^[20],多酚黄酮主要通过自由基清除作用体现其抗氧化活性。目前对滇黄精多酚黄酮活性研究大多停留在提取工艺优化与对自由基清除能力的初步评价^[21]方面。也有研究证实干制、酒制、蒸制的滇黄精乙醇提取物具有一定的清除自由基能力^[22]。然而,目前对滇黄精多酚黄酮富集工艺以及抗氧化和细胞保护作用鲜有报道。本文研究不同极性滇黄精根提取物的体外抗氧化能力,对氧化应激细胞损伤的保护作用,为食药同源滇黄精产品的开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

滇黄精,由中国科学院昆明植物研究所鉴定为百合科滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl)。取干燥根茎用于试验。

D101 大孔树脂、维生素 C (VC)、噻唑兰 (MTT)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA),上海 Sigma-Aldrich 公司;人肝癌细胞 (HepG2 细胞),昆明细胞库(中国科学院昆明动物研究所);青霉素、链霉素、完全培养液 (DMEM),Gibco 公司 (Grand Island, NY);SOD 试剂盒、GSH-px 试剂盒、MDA 试剂盒,南京建成生物工程研究所;其它使用的试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

Hei-VAP 型旋转蒸发仪,瑞士步琦公司;Epoch 2 微孔板酶标仪,美国伯腾公司;ac2-6s1 型二级生物安全柜、cel170A-8 型 CO₂ 恒温培养箱,新加坡 ESCO 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 不同极性段滇黄精样品的制备方法 称取滇黄精干燥根茎 100 g,经 90% 甲醇按料液比 1:10 超声辅助提取 3 次 (30 min/次)。收集提取液,离心后将上层清液经旋转蒸发仪蒸干,得到甲醇粗提物 21.4 g。20 g 甲醇粗提物完全溶解于纯水中,采用 D101 大孔吸附树脂进行梯度洗脱 (洗脱梯度为:20%,40%,60%,80%和 100% 甲醇)。分别获得不同的极性段洗脱液,先经旋转蒸发仪蒸干甲醇,

后冷冻干燥得滇黄精的不同极性段样品 (20%,40%,60%,80%和 100% 甲醇段)。不同极性段样品均储存在冰箱 (-20 °C) 中,以供进一步试验使用。

1.3.2 不同极性段滇黄精样品总酚和总黄酮的含量测定 按福林酚法^[23]测定各极性段的总酚含量,简单地说,用 80% 甲醇溶解样品,得到 0.2 mg/mL 的样品溶液与 0.1 mL 福林酚试剂混合反应 1 min,加入 0.3 mL Na₂CO₃ (20%) 和 1.2 mL 超纯水。充分混合后,经 70 °C 水浴孵化 10 min,于波长 765 nm 处测定吸光度。参考王秀文等^[24]的方法对总黄酮的含量进行测定,依次加入 0.6 mL 样品溶液 (0.2 mg/mL)、1.9 mL 60% 乙醇和 0.15 mL 5% 的 NaNO₂ 溶液,充分混合。反应 8 min 后,加入 0.15 mL 10% AL(NO₃)₃ 溶液,再加入 2.0 mL NaOH 和 0.1 mL 60% 乙醇溶液。静置反应 12 min 后,在波长 510 nm 处测定吸光度。

1.3.3 不同极性段滇黄精样品体外抗氧化活性测定

1.3.3.1 ABTS 自由基清除活性测定 参照文培华等^[25]的方法对不同极性段滇黄精样品进行 ABTS 自由基清除能力测定,所有的测试都重复 5 次。使用公式 (1) 计算每个样品的 ABTS 自由基清除能力。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \left[\frac{(A_1 - A_2)}{A_1} \right] \times 100 \quad (1)$$

式中:A₁ 为不加样品孔的吸光度值;A₂ 为样品孔的吸光度值。

1.3.3.2 DPPH 自由基清除活性测定 对不同极性段滇黄精样品进行 DPPH 自由基清除试验测定^[26]。所有的测试都重复 5 次。每个样品对 DPPH 自由基清除率按公式 (2) 计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left[\frac{(B_1 - B_2)}{B_1} \right] \times 100 \quad (2)$$

式中:B₁ 为不加样品孔的吸光度值;B₂ 为样品孔的吸光度值。

1.3.4 不同极性段滇黄精样品对 HepG2 细胞毒性评价 HepG2 细胞按照 1×10⁵ 个/孔密度接种于 96 孔板,孵育 24 h。孵育结束后试验分组如下,空白组:200 μL DMEM 培养液与 HepG2 细胞共培养 24 h,样品处理组:200 μL 不同质量浓度的不同极性段滇黄精样品 (100 μg/mL 和 200 μg/mL),处

理 HepG2 细胞 24 h。处理结束后,用 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液(150 μ L/孔)孵育细胞 4 h,二甲基亚砷作用于细胞后,利用酶标仪在波长 570 nm 处测定各孔的吸光度。细胞存活率通过公式(3)计算。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} \times 100 \quad (3)$$

式中: C_1 为样品孔的吸光度值; C_2 为空白孔的吸光度值

1.3.5 不同极性段滇黄精样品对 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响 细胞内 ROS 含量测定,参照 Yang 等^[27]的方法,细胞在 6 孔板(1×10^5 个/孔)中预孵育 24 h,达到约 70%~80%融合时,空白组和模型组细胞继续用 DMEM 完全培养液培养,阳性组中 VC 溶解于 DMEM 完全培养液,VC 最终的质量浓度为 200 μ g/mL,样品组的样品溶解于 DMEM 完全培养液,样品最终的质量浓度为 200 μ g/mL。以上细胞处理培养 24 h 后,空白组更换 DMEM 完全培养液,其余组加入 0.8 mmol/mL H_2O_2 培养 6 h,预处理试验结束后,用冷 PBS 洗涤 HepG2 细胞,用 1 mL DCFH-DA(10 μ mol/L)在 37 $^{\circ}$ C 黑暗处孵育 30 min。预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,用流式细胞仪测定细胞内绿色荧光强度。

1.3.6 不同极性段滇黄精样品对 HepG2 细胞内抗氧化酶水平的影响 细胞内 SOD、GSH-PX、MDA 水平测定,试验分组和细胞培养与细胞内 ROS 含量测定试验方法一致。细胞与受试物处理完成后,用胰酶消化后,离心弃去上清,用预冷的 PBS 1 mL 吹洗一遍后用细胞真空破碎仪破碎并收集细胞,测定细胞内 SOD、GSH-px、MDA 水平。

1.4 数据处理及统计分析

试验结果重复 3 次,数据通过 SPSS 20.0、Origin 8.5 数据软件分析处理,其最小差异($P < 0.05$)具有统计学意义。结果表示成“均值 \pm 标准差”。

2 结果与分析

2.1 不同极性段滇黄精样品的得率

1.3.1 节中 20 g 甲醇提取物经 20%,40%,60%,80%和 100%甲醇依次洗脱后分别得到滇黄精 20%,40%,60%,80%和 100%甲醇的不同极性段样品。以上 5 个不同极性段的样品质量分别为 2.2,4.4,6.3,2.0,1.6 g,最大极性的 20%甲醇段

和最小极性的 100%甲醇段样品得率均较低,60%甲醇段样品得率最高,其次为 40%甲醇段样品。

2.2 不同极性段滇黄精样品的总酚和总黄酮测定

测定滇黄精不同极性段样品中总酚和总黄酮的含量,总酚、总黄酮含量分别表示为每克提取物中没食子酸当量(Gallic acid equivalent, GAE, mg GAE/g 提取物),每克提取物中芦丁当量(Rutin equivalent, RE, mg RE/g 提取物)。结果如表 1 所示,40%和 60%甲醇段样品总酚、总黄酮含量较高,且两者数据无显著性差异,其中 60%甲醇段总酚和总黄酮含量最高,20%甲醇段总酚和总黄酮含量最低,前者的总酚含量约为后者的 2.6 倍,总黄酮含量约为后者的 3.1 倍。滇黄精各极性段样品中总酚和总黄酮含量受到洗脱剂甲醇体积分数的显著影响($P < 0.05$),随着洗脱剂甲醇体积分数的增加,总酚和总黄酮含量先增加后减小^[28],从而极性大的 20%甲醇段和极性小的 100%甲醇段样品中总酚总黄酮含量较低,中极性的 60%甲醇段总酚、总黄酮含量较高,达到了富集滇黄精中多酚和黄酮的效果。

表 1 滇黄精不同极性段的总酚和总黄酮含量

Table 1 Contents of total phenolic (TPC) and total flavonoids (TFC) in different polar samples of *Polygonatum kingianum*

样品	总酚含量/ (mg GAE/g 提取物)	总黄酮含量/ (mg RE/g 提取物)
20% 甲醇	20.08 \pm 1.04 ^c	8.10 \pm 0.61 ^c
40% 甲醇	40.27 \pm 0.59 ^b	23.95 \pm 1.73 ^b
60% 甲醇	51.34 \pm 2.08 ^a	24.97 \pm 2.75 ^a
80% 甲醇	24.04 \pm 0.58 ^c	23.54 \pm 0.76 ^a
100% 甲醇	21.51 \pm 0.48 ^c	19.08 \pm 0.48 ^b

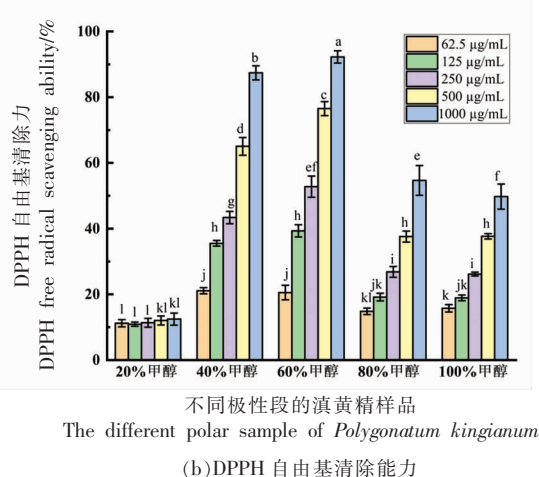
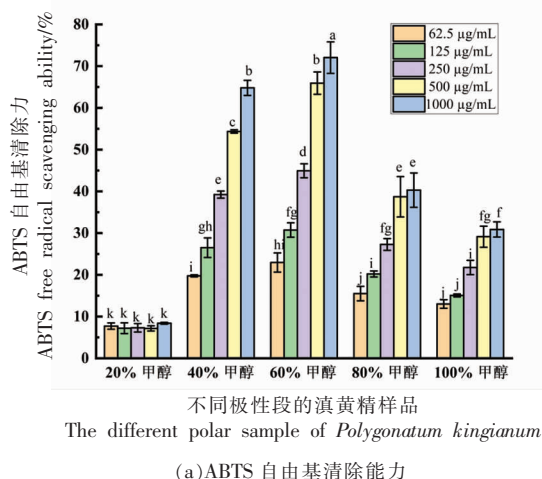
注:表中同一列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同极性段滇黄精样品体外抗氧化能力

如图 1 所示,在 ABTS 和 DPPH 自由基清除试验中,60%甲醇段样品对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除效果最好,其次为 40%甲醇段样品。其中,60%甲醇段 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为(289.55 \pm 2.46) μ g/mL 和(190.94 \pm 2.28) μ g/mL,40%甲醇水段 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 分别为(431.60 \pm 2.64) μ g/mL 和(242.58 \pm 2.39) μ g/mL。剩余 20%,80%和 100%甲

醇段的样品对 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力效果不明显,20%甲醇段样品对自由基的清除率最低,20%甲醇段在最高剂量时,ABTS 和 DPPH 自由基清除率均不足 50%。在不同极性段滇黄精样品中,60%、40%甲醇水段样品中总酚总黄酮含量

相对较高,对 ABTS 和 DPPH 自由基清除效果也较好,这与相关的报道研究结果一致^[29]。同时,滇黄精各极性段对自由基的清除能力随样品质量浓度增大而增强,呈剂量依赖关系。



注:不同字母表示组间差异具有显著性($P<0.05$)。

图 1 不同极性段滇黄精样品清除 ABTS 和 DPPH 自由基的能力

Fig.1 ABTS and DPPH free radical scavenging ability of different polar samples of *Polygonatum kingianum*

2.4 不同极性段滇黄精样品对 HepG2 细胞的毒性作用

HepG2 细胞经样品 (100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$) 处理后,采用 MTT 法测定细胞活率,一般认为细胞存活率在 90% 及以上,则测试样品对细胞无毒^[30]。如图 2,滇黄精 5 个不同极性段样品与 HepG2 细胞共培养后,在最高质量浓度 (200 $\mu\text{g/mL}$) 处理条件下,HepG2 细胞存活率均在 90% 以上。据此认为滇黄精 5 个不同极性段样品在 200 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,对 HepG2 细胞无毒性。

2.5 不同极性段滇黄精样品对 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞内活性氧 (ROS) 的影响

HepG2 细胞常用于各种代谢和药物毒性研究,形态和生化特征与人类正常肝细胞相似^[31]。为了研究不同极性段滇黄精样品的抗氧化活性及细胞保护作用,通过 H_2O_2 建立 HepG2 细胞氧化应激损伤模型,采用 DCFH-DA 荧光探针作为检测工具,通过流式细胞仪检测细胞内 ROS。遵循无毒最佳质量浓度的原则,选择样品质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 开展不同极性段滇黄精样品抗氧化活性和

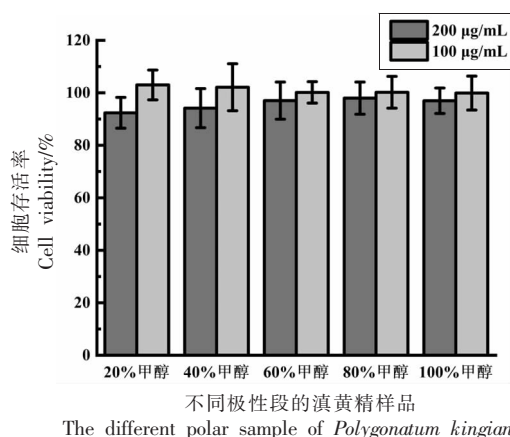
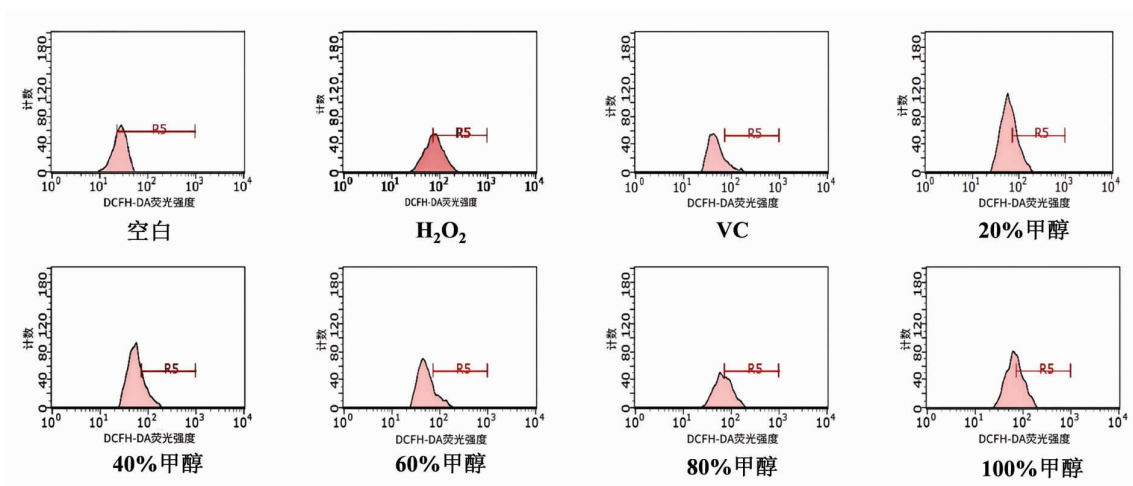


图 2 不同极性段滇黄精样品对 HepG2 细胞的毒性作用
Fig.2 The toxic effects of the different polar samples of *Polygonatum kingianum* on HepG2 cells

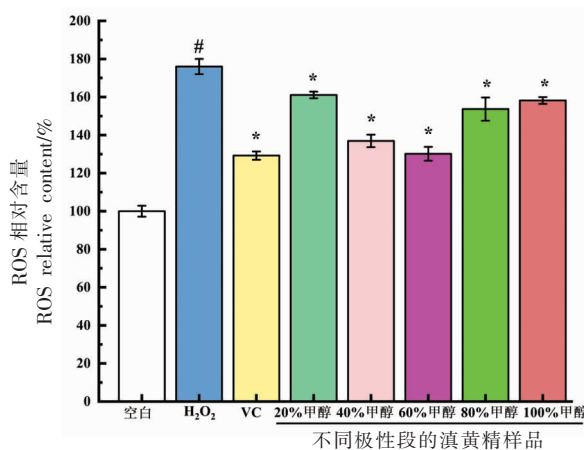
细胞保护作用的评价。结果如图 3a 所示,与空白对照组相比,细胞经 H_2O_2 (0.8 mmol/mL) 诱导后,细胞荧光信号明显右移 ($P<0.05$),说明细胞在 H_2O_2 处理后产生了大量 ROS。图 3b 定量结果中,以空白组细胞内 ROS 水平为 100%,细胞经 H_2O_2 处理后,细胞内 ROS 水平较空白组显著提高 ($P<$

0.05), ROS 相对含量高达 (176.00±4.00)%, 阳性对照经 VC (200 μg/mL) 处理的细胞内 ROS 水平较 H₂O₂ 组明显降低 (P<0.05), 细胞内 ROS 相对含量为 (129.22±2.17)%。滇黄精各极性段样品也显著降低了胞内 ROS 水平 (P<0.05), 其中 60% 和 40% 甲醇段样品处理组细胞内 ROS 相对含量分别为 (130.17±3.66)% 和 (136.93±3.27)%, 对细胞内 ROS 的抑制效果接近阳性对照组 VC (P>0.05)。20% 甲醇段, 80% 甲醇段和 100% 甲醇段样品处理

的细胞内 ROS 相对含量分别为 (161.07±1.75)%, (153.66±6.07)%, (158.18±1.79)%, 细胞内 ROS 相对含量低于 H₂O₂ 模型组, 而与 VC 阳性组有显著差异 (P<0.05), 对 ROS 的抑制效果不够明显。滇黄精各极性段样品对细胞内 ROS 的抑制作用与样品总酚总黄酮含量相关, 即总酚、总黄酮含量越高的样品, 细胞内 ROS 的相对含量越少, 40% 甲醇段和 60% 甲醇段样品总酚、总黄酮含量较高, 抑制 ROS 增加效果也最为明显。



(a) 细胞内 ROS 的细胞流式图



The different polar sample of *Polygonatum kingianum*

(b) 细胞内 ROS 含量

注：“#”表示 H₂O₂ 组与空白组具有显著性差异 (P<0.05); “*”表示样品组与 H₂O₂ 组具有显著性差异 (P<0.05)。

图 3 不同极性段滇黄精对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞 ROS 积累的影响

Fig.3 The effects of different polar samples of *Polygonatum kingianum* on ROS accumulation in H₂O₂ - induced HepG2 cells

2.6 不同极性段滇黄精样品对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞中抗氧化酶的测定

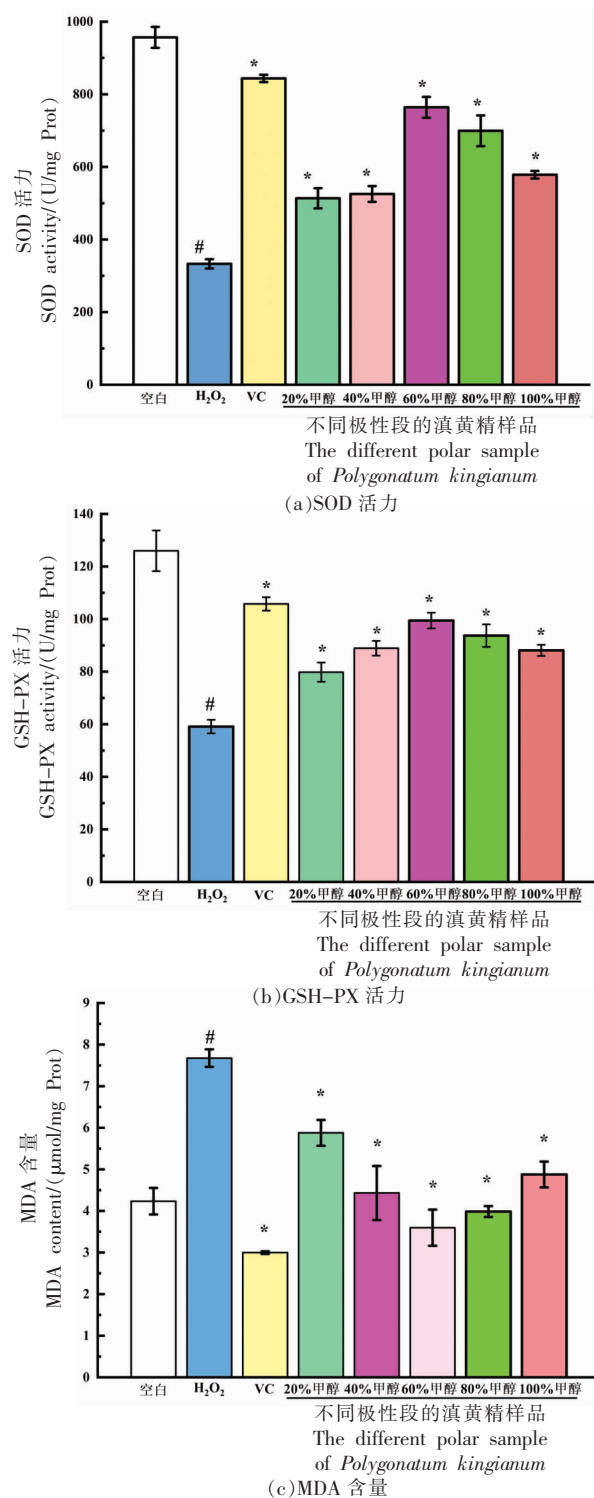
SOD 和 GSH-px 为机体内主要抗氧化酶。

SOD 可以催化分解超氧化物, 清除有害自由基; GSH-px 催化谷胱甘肽 (GSH) 的氧化, 从而消耗过氧化物^[32]。MDA 是氧化应激的常见标志, 间接反映

了自由基代谢的变化和细胞损伤程度^[33]。本文测定了 HepG2 细胞经 H₂O₂ 诱导后,细胞内的氧化酶(SOD、GSH-px)的活力和 MDA 的含量。结果如图 4 所示,模型组经 H₂O₂ 处理后,细胞内 SOD 和 GSH-px 活力水平较空白组显著降低,MDA 含量则显著增加($P<0.05$),这说明 H₂O₂ 引起了细胞的氧化应激,并破坏了细胞内相关抗氧化酶活性。阳性对照组细胞经 VC (200 μg/mL) 处理后细胞内 SOD 和 GSH-px 活力分别为 (263.69±9.99)U/mg 蛋白和(105.77±2.56)U/mg 蛋白,与模型组相比活力显著升高($P<0.05$)。在不同极性段滇黄精样品的处理下,细胞中 SOD、GSH-px 活力值与模型组相比均显著升高($P<0.05$),其中 60% 甲醇段样品对提高细胞内酶活效果最明显,SOD 活力值较模型组提高了 91.1%,GSH-px 活力值较模型组提高 68.3%,酶活力值接近阳性对照组 VC。剩余极性段样品也可提高细胞内的酶活力,结果稍逊于 60% 甲醇段。阳性对照组 VC 处理的细胞内脂质过氧化物 MDA 水平与模型组相比显著降低($P<0.05$),为(2.99±0.03)μmol/mg Prot,在滇黄精各极性段样品中,60% 甲醇段样品处理的细胞内 MDA 含量最低,为(3.59±0.44)μmol/mg Prot,接近阳性对照组 VC 处理的细胞内 MDA 含量,其余各极性段样品处理的细胞内 MDA 水平也低于模型组,在一定程度上降低了细胞内 MDA 的水平。滇黄精各极性段样品对细胞内 SOD、GSH-px 活力和 MDA 水平的作用规律与细胞内 ROS 水平一致,揭示总酚黄酮含量越丰富,自由基清除能力越强的样品,越能提高细胞内抗氧化酶的活力,降低细胞内 MDA 的水平。

2.7 多变量分析

选择滇黄精不同极性段的总多酚、总黄酮含量、ABTS 和 DPPH 自由基清除率、H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞中 ROS 含量、抗氧化酶的活力含量等数据,进行主成分分析(Principal component analysis, PCA),结果如图 5 所示,其中 PC1 贡献率为 87.6%,PC2 贡献率为 8.8%,二者累计贡献率为 96.4%。PC1 正侧的右上象限包括 40% 甲醇段和 60% 甲醇段样品,其样品中总酚总黄酮含量高,ABTS 和 DPPH 自由基清除活性强,同时细胞内氧化酶 SOD 和 GSH-px 活力较高。80% 甲醇段样品



注:“#”表示 H₂O₂ 组与空白组存在显著性差异($P<0.05$);
“*”表示样品组与 H₂O₂ 组存在显著性差异($P<0.05$)。

图 4 滇黄精不同极性段对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞抗氧化酶活力的测定

Fig.4 The intracellular antioxidant enzymes activities of different polar samples of *Polygonatum kingianum* on H₂O₂-induced HepG2 cells

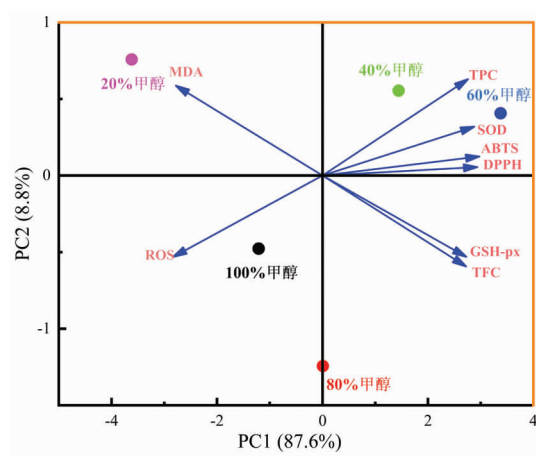


图 5 不同极性段的滇黄精样品总酚、总黄酮和抗氧化活性的 PCA 分析

Fig.5 PCA analysis of TPC, TFC, and antioxidant activities in different polar samples of *Polygonatum kingianum*

位于右下象限靠近 PC1 负轴, 其总酚总黄酮含量次于 60% 和 40% 甲醇段, 其总黄酮含量与 GSH-px 活性与 60% 甲醇段相当。20% 甲醇和 100% 甲醇段样品位于 PC2 负轴, 与其获得的抗氧化值相关, 它们的总酚和总黄酮含量低, 评分为负, 与作为氧化应激标志物的 MDA 和 ROS 体现了显著的相关性 ($P < 0.05$), SOD、GSH-px 的活性较低, ABTS 和 DPPH 自由清除活性较弱。总酚总黄酮含量与抗氧化能力密切相关, 且总酚总黄酮含量越高, 抗氧化能力越好^[34]。不同极性段滇黄精样品中总酚总黄酮含量越高, 细胞内抗氧化酶 SOD、GSH-px 的活力越高, 抑制细胞内 ROS 生成, 降低细胞内 MDA 水平越强, 其抗氧化能力越好, 细胞保护作用的效果越好, 提示样品内总酚总黄酮含量与内源抗氧化酶 SOD 和 GSH-px 活力存在着紧密联系, 对细胞氧化损伤有一定的保护作用。

3 结论

本试验以食药同源植物滇黄精根茎为原料, 通过 D101 大孔树脂柱获得 5 个不同极性段样品, 研究不同极性段样品中总酚总黄酮含量、抗氧化能力和对细胞氧化损伤的保护作用。本试验结果表明滇黄精 5 个不同极性段样品中总酚总黄酮是发挥抗氧化和细胞保护作用的主要贡献者, 抗氧化能力和细胞保护作用均与样品总酚总黄酮含量

呈正相关关系。在滇黄精各极性段中, 40% 和 60% 甲醇段总酚总黄酮含量较高, 具有显著地 ABTS 和 DPPH 自由基清除活性, 能有效清除细胞内过量的 ROS, 提高 SOD 和 GSH-px 活力, 减少 MDA 的生成, 修复细胞氧化损伤, 维持细胞内稳态。综上, 滇黄精作为食药同源原材料, 通过 D101 大孔树脂富集滇黄精极性段中总酚总黄酮含量, 显著提高了其抗氧化和细胞保护作用。这项研究为滇黄精根茎开发具有抗氧化和细胞保护作用的功能性食品提供了试验依据, 为滇黄精的综合开发利用提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 郁军超, 薛连璧. 机体 ROS 的产生及对生物大分子的毒性作用[J]. 山东医药, 2012, 52(8): 94-96.
YU J C, XUE L B. ROS production and toxic effects on biomacromolecules[J]. Shandong Pharmaceutical, 2012, 52(8): 94-96.
- [2] CHEN G I, FAN M X, WU J L, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 706-712.
- [3] 李兴太, 张春英, 仲伟利, 等. 活性氧的生成与健康 and 疾病关系研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 257-270.
LI X T, ZHANG C Y, ZHONG L W, et al. Research progress on the relationship between production of reactive oxygen species and health and disease[J]. Food Science, 2016, 37(13): 257-270.
- [4] 李晓娟, 孟君, 徐莹, 等. 荔枝玫瑰酒的营养成分分析与皮肤抗氧化功效研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(10): 96-102.
LI X J, MENG J, XU Y, et al. Analysis of nutritional components and skin antioxidant effect of Lychee and Rose wine[J]. Chinese Brewing, 2020, 39(10): 96-102.
- [5] CHECA J, ARAN J M. Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes[J]. Journal of Inflammation Research, 2020, 13: 1057-1073.
- [6] GONCHAROV N V, AVDONIN P V, NADEEV A D, et al. Reactive oxygen species in pathogenesis of atherosclerosis [J]. Current Pharmaceutical Design,

- 2015, 21(13): 1134–1146.
- [7] VOLPE C M O, VILLAR-DELFINO P H, DOS ANJOS P M F, et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 1–9.
- [8] 张鹤, 张莹, 杨逢建, 等. 向日葵茎髓醇提物中不同溶剂萃取部位总酚、总黄酮含量与抗氧化活性的相关性[J]. *食品科学*, 2018, 39(15): 54–59.
- ZHANG H, ZHANG Y, YANG F J, et al. Correlation between the contents of total phenols and total flavonoids in different solvent extraction parts and antioxidant activities of sunflower stem pulp alcohol extract[J]. *Food Science*. 2018, 39(15): 54–59.
- [9] 李静, 赵海峰. 多酚类化合物的主要食物来源[J]. *卫生研究*, 2017, 46(1): 169–173.
- LI J, ZHAO H F. A major food source of polyphenols[J]. *Health Research*, 2017, 46(1): 169–173.
- [10] 李丽, 刘春明. 中药抗氧化成分的现代分离和分析技术[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 1–2.
- LI L, LIU C M. Modern techniques for separation and analysis of antioxidant components in traditional Chinese medicine[M]. Beijing: Science Press, 2011: 1–2.
- [11] ZENG Y X, SONG J J, ZHANG M M, et al. Comparison of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of six flavonoids with similar structures[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8): 732–746.
- [12] 谢星, 王思宇, 王佩欣, 等. 海蒿子多酚组分的化学成分、抗氧化和降血糖活性分析[J/OL]. *食品科学*, (2022-09-16) [2022-11-26]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Xlf5kQqXA0m4YEUFpFPfd3_tyv40-kzyaWxJqPNfsSODTUKHhpzyoWGWxeQxcSIjV6TSM0Ig4ggstKpkMnOzwp5H8dgFpxA29nJtNiPhCVgRCuEsuYBy7Q2FRZnkTnqEC94MZsqP1iU6YvnsbUk7adhBTQ_PQ6P&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- XIE X, WANG S Y, WANG P X, et al. Analysis of chemical constituents, antioxidant and hypoglycemic activities of polyphenols from sea wormwood[J/OL]. *Food Science*, (2022-09-16) [2022-11-26]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Xlf5kQqXA0m4YEUFpFPfd3_tyv40-kzyaWxJqPNfsSODTUKHhpzyoWGWxeQxcSIjV6TSM0Ig4ggstKpkMnOzwp5H8dgFpxA29nJtNiPhCVgRCuEsuYBy7Q2FRZnkTnqEC94MZsqP1iU6YvnsbUk7adhBTQ_PQ6P&uniplatform=](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=Xlf5kQqXA0m4YEUFpFPfd3_tyv40-kzyaWxJqPNfsSODTUKHhpzyoWGWxeQxcSIjV6TSM0Ig4ggstKpkMnOzwp5H8dgFpxA29nJtNiPhCVgRCuEsuYBy7Q2FRZnkTnqEC94MZsqP1iU6YvnsbUk7adhBTQ_PQ6P&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG)
- [13] 王月, 韩彩霞, 殷诗凯, 等. 滇黄精种子萌发及成苗特性初探[J]. *中药材*, 2018, 41(6): 1257–1261.
- WANG Y, HAN C X, YIN S K, et al. Preliminary study on seed germination and seedling formation characteristics of *Fructus dipteridum* [J]. *Chinese Medicinal Materials*, 2018, 41(6): 1257–1261.
- [14] 杨建宇, 刘冠军, 刘白云, 等. 中华中医药道地药材系列汇讲(7)道地药材滇黄精的研究近况[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2020, 4(7): 100–103.
- YANG J Y, LIU G J, LIU B Y, et al. Chinese traditional medicine series of traditional Chinese medicine (7) recent research status of pure medicinal material *Dipterocarpus yunnanensis* [J]. *Modern Medicine and Health Research electronic journal*, 2020, 4(7): 100–103.
- [15] 陈兴荣, 王成军, 李龙星, 等. 滇黄精的化学成分及药理研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2002, 1(9): 560–561.
- CHEN X R, WANG C J, LI L X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacology of *Dipterocarpus diptericum* [J]. *Shi Zhen Chinese Medicine*, 2002, 1(9): 560–561.
- [16] 余亚英. 黄精多糖的分离、鉴定及免疫调节功效研究[J]. *光明中医*, 2019, 34(19): 2944–2945.
- YU Y Y. Isolation, identification and immunomodulatory effect of *Polygonatum polygonatum* polysaccharide[J]. *Guangming Traditional Chinese Medicine*, 2019, 34(19): 2944–2945.
- [17] PENG X M, HE J C, ZHAO J M, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharide promotes osteoblastic differentiation through the ERK1/2–catenin signaling pathway *in vitro* [J]. *Rejuvenation Research*, 2018, 21(1): 44–52.
- [18] LI R S, TAO A E, YANG R M, et al. Structural characterization, hypoglycemic effects and antidiabetic mechanism of a novel polysaccharides from *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110687–110695.
- [19] YAN H L, LIU J M, WANG Y F, et al. Intake of total saponins and polysaccharides from *Polygonatum kingianum* affects the gut microbiota in diabetic rats [J]. *Phytomedicine*, 2017, 26: 45–54.
- [20] 杨波, 黄金月, 郑时嘉, 等. 基于UPLC-Q/TOF-MS技术的东北黄精、多花黄精及滇黄精成分分析[J]. *中医药学报*, 2022, 50(10): 43–51.
- YANG B, HUANG J Y, ZHENG S J, et al. Anal-

- ysis of components of *Polygonatum*, *Polygonatum polygonatum* and *Polygonatum dipteris* based on U-PLC-Q/TOF-MS technique[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 50(10): 43-51.
- [21] 陈毅坚, 石雪, 屈睿, 等. 滇黄精黄酮提取工艺及活性的初步研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(5): 222-225.
- CHEN Y J, SHI X, QU R, et al. Preliminary study on extraction technology and activity of flavone from *Dipterocarpus dipteris*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2013, 34(5): 222-225.
- [22] 施扬, 王力川, 马占林, 等. 滇黄精提取物成分与活性测定及细胞毒性评价[J]. *日用化学工业*, 2020, 50(11): 788-792.
- SHI Y, WANG L C, MA Z L, et al. Determination of components, activity and cytotoxicity of extracts from *Dipterocarpus dipteris* [J]. *Domestic Chemical Industry*, 2020, 50(11): 788-792.
- [23] JAVANMARDI J, STUSHNOFF C, LOCKE E, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum accessions*[J]. *Food Chemistry*, 2003, 83(4): 547-550.
- [24] 王秀文, 刘永梅. 降脂代用茶中总黄酮的含量测定及不确定度分析[J]. *广东化工*, 2022, 49(5): 156-158.
- WANG X W, LIU Y M, Determination and uncertainty analysis of total flavonoids in lipid-lowering substitute tea [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2022, 49(5): 156-158.
- [25] 文培华, 颜怡冰, 王文君, 等. 虎耳草总黄酮含量测定及其抗氧化性[J]. *食品工业*, 2022, 43(2): 315-319.
- WENG P H, YAN Y B, WANG W J, et al. Determination of total flavone content and antioxidant activity of Tigergrass[J]. *Food Industry*, 2022, 43(2): 315-319.
- [26] THAIPONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19(6/7): 669-675.
- [27] YANG M L, MA Y L, WANG Z Y, et al. Phenolic constituents, antioxidant and cytoprotective activities of crude extract and fractions from cultivated artichoke inflorescence[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 143: 111433-111444.
- [28] 刘馨雨, 张海生, 许铭芯, 等. 超声波微波协同提取沙棘叶黄酮及其组成和活性研究[J]. *核农学报*, 2022, 36(7): 1381-1390.
- LIU X Y, ZHANG H S, XU M X, et al. Study on the composition and activity of flavonoids extracted from sea buckthorn leaves by ultrasonic microwave [J]. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2022, 36(7): 1381-1390.
- [29] 陈蓬凤, 梅新, 黄师荣, 等. 不同品种薯尖的总酚、总黄酮含量及抗氧化活性比较[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(3): 132-138.
- CHEN P F, MEI X, HUANG S R, et al. Comparison of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities in different varieties of potato tips[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(3): 132-138.
- [30] 郑敏, 吴智君, 赵文锦, 等. 利用 HepG2 细胞毒性评估化学品急性经口毒性的实验研究[J]. *毒理学杂志*, 2022, 36(3): 237-242.
- ZHENG M, WU Z J, ZHAO W J, et al. Evaluation of acute oral toxicity of chemicals by HepG2 cytotoxicity[J]. *Journal of Toxicology*, 2022, 36(3): 237-242.
- [31] CHEN T Q, WU Y B, JIN Z K, et al. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72: 151-157.
- [32] REN Y Y, SUN P P, LI H R, et al. Effects of Na₂SeO₃ on growth, metabolism, antioxidase and enzymes involved in polysaccharide synthesis of *Cordyceps militaris*[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 97: 64-71.
- [33] 段桂姣, 王振常, 吴珊珊. 柔肝化纤颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织超氧化物歧化酶和丙二醛的影响[J]. *西部中医药*, 2022, 35(4): 30-34.
- DUAN G J, WANG Z C, WU S S. Effects of RuoganHuaxian Granules on superoxide dismutase and malondialdehyde in liver tissue of rats with hepatic fibrosis[J]. *Western Chinese Medicine*, 2022, 35(4): 30-34.
- [34] VONGSAK B, SITHISARN P, MANGMOOL S, et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 44: 566-571.

The Antioxidant Activities and Cell Protective Effects of Different Polar Samples of *Polygonatum kingianum*

Chen Kaiyan¹, Fang Yuwen¹, Zhang Meng¹, Cheng Guiguang¹, Liu Yaping^{1*}, Zhou Wenbing^{2*}

¹Faculty of Food Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500

²Engineering Research Center for Biological Control of Tobacco Diseases and Insect Pests, Yuxi 653100, Yunnan)

Abstract *Polygonatum kingianum*, belong to the genus *Polygonatum* (Liliaceae), mainly distributed in subtropical in the southwest of China, including Guizhou, Sichuan, and Yunnan. The dried rhizomes of *P. kingianum* have been used as a famous homologous plant of medicine and food for thousands of years. The paper was investigated the antioxidant activities and cell protective effects of *Polygonatum kingianum*. Using D101 macroporous resin, the methanol extract was eluted by different volume fraction of methanol water (20%, 40%, 60%, 80%, 100%) to obtain the different polar samples. The contents of total phenolic (TPC) and total flavonoids (TFC) in different polar samples were determined. The antioxidant activities were evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) methods. Furthermore, the cytoprotective effects of different polar samples were performed on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in HepG2 cells. The intracellular ROS production, the content of lipid peroxides (MDA) and the activity of enzymes (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px)) were measured. Principal component analysis (PCA) was used to analyze the correlations among the TPC and TFC, antioxidant activities (DPPH and ABTS), the contents of intracellular ROS and MDA, and the activities of intracellular oxidase (SOD, GSH-px). The results showed that the antioxidant capacities of different polar samples were positively correlated with TPC and TFC. The antioxidant capacity of the sample increased with the increasing of total phenolic and flavonoids content. The TPC of the 40% and 60% methanol samples were (40.27±0.59) mg GAE/g extract and (51.34±2.08) mg GAE/g extract, respectively. While TFC were (23.95±1.73) mg RE/g extract and (24.97±2.75) mg RE/g extract, respectively. The 40% and 60% methanol samples exhibited the highest phenolic and flavonoid contents, and displayed significantly free radical scavenging activities in vitro. Additionally, these samples markedly inhibited intracellular ROS production, enhanced SOD and GSH-px levels, and reduced MDA content. In conclusion, different polar samples of *P. kingianum* had certain antioxidant activities and cell protective effects, and 40% and 60% methanol samples displayed the best antioxidant activities and cell protective effects.

Keywords *Polygonatum kingianum*; different polar samples; antioxidant activities; cell protective effects