

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-04-002

· 专家论坛 ·

· EXPERT FORUM ·

广西“桂十味”药材体外抗氧化活性及保护作用

张兵^{1abc}, 陈聪^{1ab}, 彭彦芬^{1ab}, 韦坤华², 余启明^{1c}, 谭相端^{1ab}

(1. 桂林医学院 a. 药学院, b. 广西药物分子发现与成药性优化重点实验室, c. 公共卫生学院, 桂林 541199;

2. 广西药用植物园广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530023)

专家简介 谭相端, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 桂林医学院优秀学术带头人, 美国新泽西州立大学访问学者, 广西药物分子发现与成药性优化重点实验室固定成员; 主持国家自然科学基金项目 3 项, 广西自然科学基金项目 3 项, 广西中青年教师基础能力提升项目 1 项, 参与国家自然科学基金项目 5 项, 指导学生创新项目 5 项; 以第一作者或通信作者发表论文 20 余篇; 申请国家发明专利 6 项, 其中已获得授权 3 项, 且已全部转让企业。



摘要 **目的** 探讨广西“桂十味”药材不同溶剂提取物体外抗氧化活性及对 H₂O₂ 诱导 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的保护作用。**方法** 以广西“桂十味”各味药材为原料, 利用水和 75% 乙醇制备不同溶剂提取物, 通过 DPPH、ABTS 自由基清除法和 Fe³⁺ 还原能力法评价其抗氧化活性, 采用 MTT 法评价提取物对 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤的保护作用。**结果** 鸡血藤水提取物表现出最强的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力, 鸡血藤 75% 乙醇提取物表现出最强的 Fe³⁺ 还原能力; 山豆根水提取物及鸡血藤 75% 乙醇提取物对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用最强; 鸡骨草水提取物及龙眼肉、莪术 75% 乙醇提取物对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞氧化损伤的保护作用最强。**结论** 通过比较“桂十味”各味药材不同溶剂提取物的抗氧化活性及对 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤的保护作用, 可为后期“桂十味”道地药材的抗氧化研发提供实验基础。

关键词: 桂十味; 不同溶剂提取物; 抗氧化活性; 抗细胞氧化损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)04-0009-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060627); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA159149); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2024451)。

第一作者: 张兵, 硕士研究生, 研究方向为天然产物及药物化学。

通信作者: 余启明, qm_yu19@glmc.edu.cn; 谭相端, tandy@glmc.edu.cn。

Antioxidant activity and protective effect of ten varieties geo-authentic traditional Chinese medicine of Guangxi

ZHANG Bing^{1abc}, CHEN Cong^{1ab}, PENG Yanfen^{1ab}, WEI Kunhua², YU Qiming^{1c}, TAN Xiangduan^{1ab}

(1. a. College of Pharmacy, b. Guangxi Key Laboratory of Drug Discovery and Optimization, c. College of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541199, China;
2. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

Abstract This article aims to investigate the antioxidant activity in vitro and protective effect against H₂O₂-induced oxidative damage of different solvent extracts of “ten varieties geo-authentic traditional Chinese medicine of Guangxi” in HepG2 and L02 cells. **Methods** With “ten varieties geo-authentic traditional Chinese medicine of Guangxi” as the raw materials, their different solvent extracts were prepared with water and 75% ethanol. The antioxidant activities of different solvent extracts were evaluated by DPPH, ABTS radical scavenging method and Fe³⁺ reduction capacity method. MTT method was used to evaluate the protective effect of different solvent extracts on H₂O₂ induced cells oxidative damage. **Results** The aqueous extract of *Spatholobus suberectus* Dunn exhibited the strongest scavenging ability for DPPH and ABTS free radicals. The 75% ethanol extract of *Spatholobus suberectus* Dunn showed the strongest reducing ability for Fe³⁺. The aqueous extracts of *Euchresta japonica* Hook.f.ex Rege and 75% ethanol extract of *Cassia Twig* and *Spatholobus suberectus* Dunn had the strongest protective effect on the cell viability of HepG2 cells. The aqueous extracts of *Abrus pulchellus* subsp *cantonensis* (Hance) Verdcourt and the 75% ethanol extract of *Dimocarpus longan* Lour and *Curcuma kwangsiensis* S.G.Lee et C.F.Liang had the strongest protective effect on the cell viability of L02 cells. **Conclusion** The antioxidant activity and the protective effect on H₂O₂-induced cellular oxidative damage of different solvent extracts of “ten varieties geo-authentic traditional Chinese medicine of Guangxi” are compared in this study, which provides an experimental basis for the later antioxidant research and development of “ten varieties geo-authentic traditional Chinese medicine of Guangxi”.

Keywords: ten varieties geo-authentic traditional Chinese medicine of Guangxi; different solvent extracts; antioxidant activity; anti-cellular oxidative damage

近年来,随着人们健康意识的提高,天然动、植物提取物在食品及药品中的应用受到广泛关注。越来越多的动、植物资源被开发用于食品和药品的研制。因此,对动、植物资源开展系统性的评价和筛选,不仅有助于挖掘其营养和生理活性,也是开发和利用这些动、植物资源的关键环节。“桂十味”是2021年广西壮族自治区遴选确定的“品质佳、疗效好、知名度高、文化底蕴深厚”的10味广西道地药材^[1],包括肉桂、罗汉果、八角、莪术、龙眼肉、山豆根、鸡血藤、鸡骨草、两面针、广地龙。近年来,对“桂十味”药材的活性成分以及药理作用的研究逐年增

加。肉桂具有优良的抗炎、抗高血糖、改善糖脂代谢和抗氧化性能,也常用于药物制剂、食品和饮料的制作^[2]。八角是食品中广泛运用的香料,有抗微生物及抗脂质氧化活性,可用作食品防腐剂^[3]。鸡血藤含有丰富的多酚和黄酮类化合物,具有优良的抗氧化、肝保护、抗炎等作用^[4]。罗汉果是天然甜味剂的重要来源,其中罗汉果黄酮和多糖具有抗氧化、降血糖以及抗炎症等功能^[5]。鸡骨草含有黄酮类、皂苷类等多种活性成分,具有优良的抗氧化、抗炎和调节血脂的特性^[6]。

目前,有不少对“桂十味”相关药材抗氧化活性

的单一比较研究^[7-10],但尚未有文献对“桂十味”各味药材的抗氧化能力进行整体比较研究。本研究拟对“桂十味”各味药材进行系统研究,旨在评估这些药材提取物的活性成分及体外抗氧化能力的差异,再通过比较对 H₂O₂ 诱导 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的保护作用,为“桂十味”各味药材进一步开发利用提供理论支持和实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用“桂十味”各味药材由广西药用植物园提供;人肝癌细胞系 HepG2 细胞、人正常肝细胞系 L02 细胞(购自武汉普诺赛生命科技有限公司);1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、过硫酸钾(分析纯)、葡萄糖(分析纯)(购自广东西陇化工股份有限公司);二甲基亚砜(DMSO,分析纯)(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司);2,4,6-三(2-吡啶)-1,3,5-三嗪(TPTZ,98%)(购自北京百灵威科技有限公司);芦丁(购自上海贤鼎生物技术有限公司);没食子酸(购自上海麦克林生化科技有限公司);DMEM 高糖培养基(购自美国 Gibco 公司);0.25%胰蛋白酶、双抗[青霉素(100 U/mL)/链霉素(100 μg/mL)]混合液、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(购自北京索莱宝公司);胎牛血清(购自杭州四季青公司)。

1.2 仪器与设备

V-100 型旋转蒸发仪(购自瑞士步琦公司);ME204E 分析电子天平(购自上海梅特勒-托利多仪器有限公司);多功能酶标仪(购自美国 Thermo Fisher 公司);二氧化碳培养箱(购自德国 Eppendorf 公司);UV-2700 紫外分光光度计(购自日本岛津仪器有限公司);Direct-Q 8 超纯水机制备机(购自德国密理博公司)。

1.3 实验方法

将“桂十味”药材粉碎后过 60 目筛,按 1:50 加入水或 75%乙醇作为提取溶剂。在 60℃ 条件下静置提取 72 h,静置提取过程中每 24 h 超声处理 30 min。抽滤获取提取液,在 40℃ 条件下用旋转蒸

发仪减压浓缩至原体积的 1/10,然后采用真空冷冻干燥法获得冻干粉末。将提取物冻干粉末密封存储于 -20℃ 冰箱备用。后期实验所用提取液均由对应提取溶剂复溶制备,现配现用。

1.3.1 总酚、总黄酮和总糖的含量测定 ①总酚含量测定采用福林-酚试剂法^[11]。以没食子酸为标准品,在 750 nm 波长处测定吸光度,得到标准曲线方程: $Y=0.617X+0.050$, $R^2=0.9912$ (其中 Y 为吸光度, X 为没食子酸浓度)。通过标准曲线方程计算“桂十味”药材不同溶剂提取物的总酚含量,用没食子酸当量(gallic acid equivalents, GAE)与提取物干重的比值表示。②总黄酮含量测定方法^[12]。以芦丁为标准品,在 415 nm 波长处测定吸光度,得到标准曲线方程: $Y=1.423X+0.045$, $R^2=0.9957$ (其中 Y 为吸光度, X 为芦丁浓度)。通过标准曲线方程计算“桂十味”各味药材不同溶剂提取物的总黄酮含量,用芦丁当量(querctin equivalents, QE)与提取物干重比值表示。③总糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[13]。以葡萄糖为标准品,在 490 nm 波长处测定吸光度,得到标准曲线方程: $Y=0.017X-0.017$, $R^2=0.9984$ (其中 Y 为吸光度, X 为葡萄糖浓度)。通过标准曲线方程计算“桂十味”各味药材不同溶剂提取物的多糖含量,用葡萄糖当量与提取物干重比值表示。

1.3.2 “桂十味”药材不同溶剂提取物的体外抗氧化活性测定 ①DPPH 自由基清除活性的测定^[14]。测定“桂十味”各味药材不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除能力(DPPH radical scavenging activity, DRSA)。将 10 μL 提取物溶液与 100 μL DPPH 溶液混合,室温避光反应 30 min 后,在 517 nm 波长下测定反应液的吸光度值 A_1 。其他实验条件不变,用相同体积的溶剂替代待测样品溶液,测得未加样品的吸光度值 A_0 ,用相同体积的溶剂替代 DPPH 溶液,测得样品溶液的本色吸光度值 A_2 ,DPPH 自由基清除率的计算公式为:清除率(%)= $[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100\%$ 。②ABTS 自由基清除活性的测定^[15]。测定“桂十味”各味药材不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除能力(ABTS radical scavenging activity, ARSA)。将 14.8 mmol/L ABTS 溶液与 4.9 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合,室温避光反应 14 h 制备 ABTS 自由

基储备液。用水对储备液进行稀释,调节在 734 nm 波长下吸光值为 (0.70 ± 0.05) , 得到 ABTS 自由基工作液。取 10 μL 各提取物溶液加入 200 μL ABTS 工作液混合后,避光反应 30 min, 在 734 nm 波长下测定吸光度 A_1 , ABTS 溶液本色吸光度 A_0 , 各提取物溶液的本色吸光度 A_2 , ABTS⁺ 自由基清除率计算公式为:清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。③铁离子还原能力测定^[16]。测定“桂十味”药材不同溶剂提取物的铁离子还原能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)。工作液由 0.3 mol/L pH 3.6 醋酸缓冲液、10 mmol/L TPTZ 溶液和 20 mmol/L FeCl₃ 溶液以 10 : 1 : 1 比例混合制备。取 10 μL 提取物溶液加入 240 μL 工作液后混匀,避光反应 20 min, 在 593 nm 波长下测定反应液的吸光度值。用 FeSO₄ 标准液绘制标准曲线, 得到标准曲线方: $Y = 1.125X + 0.159$, $R^2 = 0.9938$ (其中 Y 为吸光度; X 为 FeSO₄ 浓度)。通过标准曲线方程计算各提取物的铁离子还原能力。

1.3.3 “桂十味”药材不同溶剂提取物对细胞活性的影响及对细胞氧化损伤的保护作用

①细胞培养。以含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基为完全培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 HepG2 和 L02 细胞。当细胞密度达 80% 左右时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。②“桂十味”药材不同溶剂提取物对细胞活性的影响。取对数生长期的 HepG2 和 L02 细胞, 稀释至 5×10^3 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL 。细胞贴壁后弃去培养液, 加入等体积含质量浓度为 100 及 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的各提取物溶液, 在培养箱中培养 6 h。弃去培养液后, 每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL) 溶液及 100 μL 完全培养基, 空白组仅加入完全培养基, 避光孵育 4 h。吸去孔内培养液后每孔加入 150 μL DMSO, 低速震荡 10 min 溶解结晶^[17]。在 490 nm 波长下测定吸光度值, 细胞存活率计算公式为: 细胞存活率(%) = $[(A_1 - A_0) / (A_2 - A_0)] \times 100\%$ 。式中: A_0 为空白组的吸光度值, A_1 为样品组吸光度值, A_2 为对照组吸光度值。

③H₂O₂ 诱导 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的浓度筛选。用不同浓度的 H₂O₂ 处理 HepG2 和 L02 细胞, 筛选出适合的 H₂O₂ 浓度建立细胞氧化损伤模型。H₂O₂ 浓度过低, 对细胞损伤不明显, 而浓度过高, 会导致细胞发生不可逆的损伤, 不利于后续用药物进行修复^[18]。本研究确定 H₂O₂ 诱导 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤模型的最佳浓度分别为 800 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。③“桂十味”药材不同溶剂提取物对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的保护作用。取对数生长期的 HepG2 和 L02 细胞, 调整密度至 5×10^3 个/mL, 接种于 96 孔板, 细胞贴壁后弃去原培养基。样品组加入含 H₂O₂ 和质量浓度为 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各提取物溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h 后弃液。每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL) 溶液和 100 μL 完全培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。加入 150 μL DMSO 溶解结晶, 测定 490 nm 波长处的吸光度值, 每组做 5 个复孔。另设: 空白组 (仅加培养液)、对照组 (不加 H₂O₂ 和不加提取物)、模型组 (加 H₂O₂ 处理但不加提取物), 其余操作步骤相同。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件处理数据, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用单因素方差分析、Duncan 多重比较及 t 检验进行数据分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 “桂十味”药材不同溶剂提取物的总酚、总黄酮及总糖含量

使用相同溶剂提取不同药材时, 各提取物的得率、总酚含量、总黄酮含量和总糖含量存在一定差异。当使用不同溶剂提取同一种药材时, 提取物的提取得率、总酚、总黄酮和总糖含量也存在一定差异。75% 乙醇提取物的提取得率、总酚和总糖含量高于水提取物, 但总黄酮含量未见明显差异, 结果如表 1 所示。

表 1 “桂十味”药材不同溶剂提取物中的得率、总酚、总黄酮及总糖含量

药材	得率/%		总酚含量/(mg/g)	
	水提取物	75%乙醇提取物	水提取物	75%乙醇提取物
肉桂	11.42±1.04 ^{fg}	22.81±1.91 ^{cd**}	233.41±19.71 ^{bcd}	627.63±13.64 ^{a***}
八角	13.05±1.22 ^{ef}	19.55±1.72 ^{de**}	11.34±1.14 ^j	333.32±10.81 ^{bc***}
罗汉果	22.91±1.91 ^c	30.25±2.61 ^{b*}	67.89±3.44 ^g	173.32±16.84 ^{e***}
菘术	16.98±1.46 ^d	10.60±0.85 ^{f*}	40.38±1.64 ^{hi}	244.77±12.60 ^{d***}
鸡血藤	10.61±0.88 ^{fg}	24.52±2.12 ^{c**}	415.94±6.09 ^a	613.63±9.06 ^{a***}
鸡骨草	9.82±0.84 ^g	13.24±1.08 ^f	101.08±8.45 ^f	325.14±14.68 ^{bc***}
两面针	9.06±0.75 ^g	10.23±0.78 ^f	155.17±5.66 ^{de}	319.33±9.29 ^{c***}
山豆根	17.16±1.52 ^d	17.65±1.46 ^e	98.71±9.73 ^f	263.23±8.83 ^{d***}
地龙	27.32±2.41 ^b	10.08±0.78 ^{f***}	46.04±5.80 ^h	191.85±7.47 ^{e***}
龙眼肉	40.34±3.51 ^a	57.35±4.81 ^{a***}	29.84±3.40 ⁱ	200.22±12.08 ^{e***}

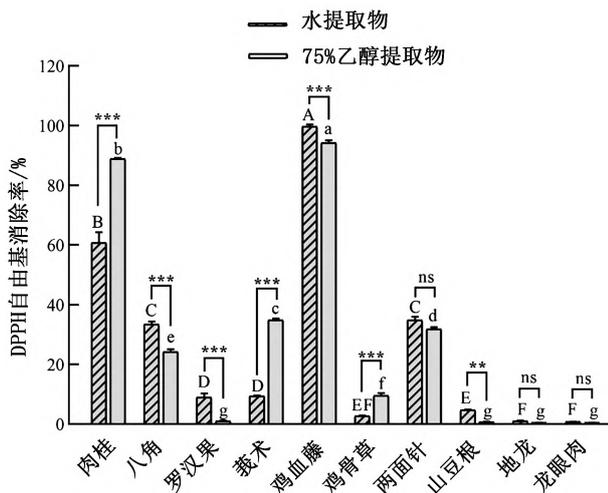
药材	总黄酮含量/(mg/g)		总糖含量/(mg/g)	
	水提取物	75%乙醇提取物后	水提取物	75%乙醇提取物后
肉桂	9.46±1.72 ^c	29.61±2.42 ^{b**}	222.81±17.72 ^c	327.75±7.18 ^{de***}
八角	15.43±1.05 ^b	10.14±2.82 ^{e*}	146.92±8.48 ^f	318.31±29.91 ^{de***}
罗汉果	21.14±1.09 ^a	4.45±1.32 ^{f**}	163.06±11.57 ^{ef}	245.22±8.92 ^{f**}
菘术	11.43±1.34 ^c	12.62±1.20 ^{de}	262.12±12.74 ^b	349.10±13.75 ^{de***}
鸡血藤	22.57±3.83 ^a	13.82±1.94 ^{d*}	221.32±12.16 ^c	423.85±9.90 ^{e***}
鸡骨草	20.44±3.32 ^a	24.13±1.08 ^c	196.15±12.33 ^d	201.25±2.34 ^f
两面针	22.12±2.44 ^a	43.44±2.61 ^{a***}	200.78±3.14 ^d	302.91±12.46 ^{e***}
山豆根	3.12±0.44 ^d	3.08±0.26 ^g	163.42±12.90 ^f	502.85±6.37 ^{bc***}
地龙	5.08±0.74 ^d	3.15±0.22 ^{fg}	46.91±3.72 ^g	63.56±5.47 ^g
龙眼肉	1.51±0.05 ^e	1.10±0.06 ^g	512.44±14.88 ^a	857.62±10.45 ^{a***}

注:同列不同字母表示不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$)。与该药材的水提取物比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

2.2 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除作用

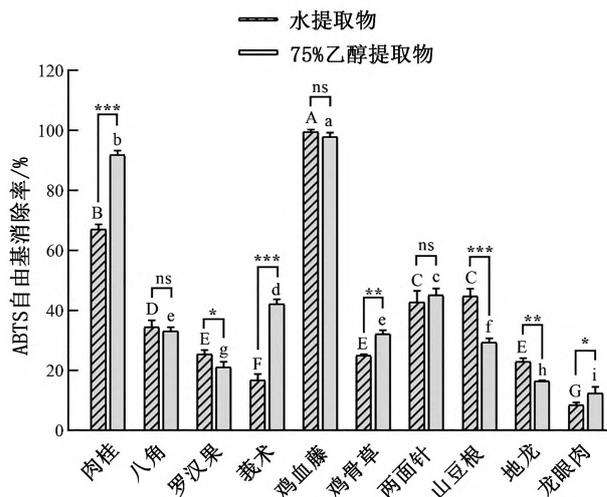
各味药材提取物对 DPPH 自由基具有不同程度的清除作用。鸡血藤提取物的 DPPH 自由基清除率最高($\geq 90.00\%$),鸡血藤水提取物效果最佳,可达 99.77%;其次是鸡血藤 75%乙醇提取物(94.24%)。

同时发现,同一药材的水提取物和 75%乙醇提取物在相同浓度下对 DPPH 自由基的清除能力存在显著差异。例如,肉桂、菘术及鸡骨草的 75%乙醇提取物显著优于其水提取物($P<0.001$);八角、罗汉果及鸡血藤水提取物显著优于其 75%乙醇提取物($P<0.001$),结果如图 1 所示。



注:不同大写字母表示水提取物不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$);不同小写字母表示 75%乙醇提取物不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$)。与该药材的水提取物比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;ns 表示 $P>0.05$ 。

图 1 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 DPPH 自由基的清除率



注:不同大写字母表示水提取物不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$);不同小写字母表示 75%乙醇提取物不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$)。与该药材的水提取物比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;ns 表示 $P>0.05$ 。

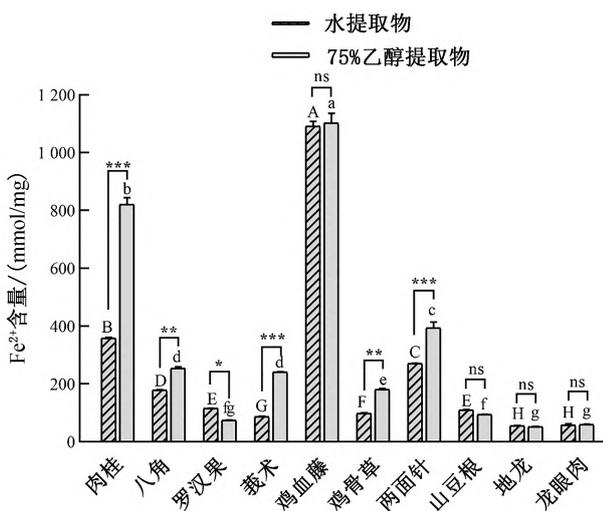
图 2 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除率

2.3 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 ABTS 自由基的清除作用

不同药材提取物对 ABTS 自由基也具有不同程度的清除作用。首先是鸡血藤和肉桂提取物的 ABTS 自由基清除率最高($\geq 90.00\%$),鸡血藤水提取物效果最佳,可达 100%;其次是鸡血藤 75%乙醇提取物(97.91%)和肉桂 75%乙醇提取物(91.90%)。同时也发现,同种药材的水提取物和 75%乙醇提取物在相同浓度下对 ABTS 自由基的清除能力存在显著差异,如肉桂和莪术的 75%乙醇提取物显著优于其水提取物($P<0.001$);而山豆根水提取物显著优于其 75%乙醇提取物($P<0.001$),结果如图 2 所示。

2.4 “桂十味”各味药材不同溶剂提取物对 Fe^{3+} 的还原能力

不同药材提取物对 Fe^{3+} 具有不同程度的还原能力。鸡血藤和肉桂的还原能力较强(Fe^{2+} 含量 ≥ 600 mmol/mg),鸡血藤 75%乙醇提取物效果最佳, Fe^{2+} 含量达到 1 136.24 mmol/mg,其次是鸡血藤水提取物(1 091.23 mmol/mg)和肉桂 75%乙醇提取物(821.58 mmol/mg)。此外,同一药材的水提取物和 75%乙醇提取物在相同浓度下对 Fe^{3+} 还原能力也存在显著差异,例如,肉桂、莪术及两面针的 75%乙醇提取物显著强于其水提取物($P<0.001$),结果如图 3 所示。



注:不同大写字母表示水提取物不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$);不同小写字母表示 75%乙醇提取物不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$)。与该药材的水提取物比较,* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;ns 表示 $P>0.05$ 。

图 3 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 Fe³⁺的还原能力

2.5 “桂十味”药材不同溶剂提取物对细胞活性的影响

经质量浓度为 100 μg/mL 及 200 μg/mL 各药材提取物处理后,部分提取物对 HepG2 细胞存在一定的细胞毒性,如鸡骨草水提取物处理后的细胞存活率低于 80%;莪术、鸡骨草、两面针以及地龙的 75%乙醇提取物处理后的细胞存活率也低于 80%,即存在一定细胞毒性^[19]。而 L02 细胞的存活率均 > 80%,表明这些提取物对正常肝细胞毒性较小或无毒性,结果如表 2 所示。

表 2 “桂十味”药材不同溶剂提取物对细胞活性的影响

药材	HepG2 细胞存活率/%			
	水提取物		75%乙醇提取物	
	100 μg/mL	200 μg/mL	100 μg/mL	200 μg/mL
肉桂	108.40±5.24 ^b	103.41±4.26 ^{cd}	80.77±3.55 ^{d***}	87.63±3.06 ^{d**}
八角	93.51±0.52 ^e	97.33±1.68 ^d	90.63±3.69 ^e	92.91±2.70 ^{bc}
罗汉果	100.10±1.71 ^c	81.21±0.17 ^d	102.18±6.74 ^{ab}	92.86±0.75 ^{bc***}
莪术	93.83±1.43 ^e	99.14±4.54 ^d	62.93±1.50 ^{g***}	58.33±1.07 ^{g***}
鸡血藤	109.61±3.50 ^b	110.30±0.31 ^{ab}	106.00±1.01 ^a	109.50±0.55 ^a
鸡骨草	62.61±0.62 ^g	76.89±0.10 ^e	73.37±5.49 ^{e*}	70.77±2.30 ^{e*}
两面针	86.32±2.53 ^f	83.23±2.83 ^e	58.83±0.85 ^{g***}	54.23±0.23 ^{g***}
山豆根	97.24±1.92 ^{de}	103.15±7.95 ^{cd}	96.73±2.06 ^b	90.91±0.40 ^{cd**}
地龙	105.64±6.38 ^b	105.62±3.04 ^{bc}	65.87±3.15 ^{f***}	63.61±3.81 ^{f***}
龙眼肉	115.64±5.64 ^a	113.26±3.45 ^a	96.31±2.29 ^{b**}	97.60±1.59 ^{b**}

续表

组别	L02 细胞存活率/%			
	水提取物		75%乙醇提取物	
	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
肉桂	110.60 \pm 2.34 ^c	120.00 \pm 2.37 ^b	118.10 \pm 1.10 ^{c*}	133.21 \pm 8.94 ^{a*}
八角	103.10 \pm 2.65 ^{de}	110.70 \pm 1.72 ^c	113.50 \pm 1.10 ^{d*}	123.10 \pm 1.44 ^{b*}
罗汉果	104.40 \pm 0.90 ^d	110.80 \pm 0.57 ^c	103.60 \pm 0.36 ^e	110.80 \pm 0.17 ^d
菝葜	111.60 \pm 0.25 ^{bc}	111.00 \pm 0.51 ^c	99.17 \pm 0.40 ^{f*}	101.10 \pm 0.40 ^{e*}
鸡血藤	126.1 \pm 0.3 ^a	143.90 \pm 1.55 ^a	133.73 \pm 1.79 ^a	137.51 \pm 0.65 ^{a*}
鸡骨草	115.00 \pm 1.63 ^b	111.80 \pm 1.72 ^c	115.02 \pm 2.64 ^d	119.24 \pm 0.88 ^{****}
两面针	90.67 \pm 1.97 ^e	92.77 \pm 0.46 ^f	113.81 \pm 0.68 ^{d***}	121.01 \pm 0.36 ^{b***}
山豆根	100.60 \pm 0.62 ^{ef}	104.90 \pm 1.20 ^d	115.51 \pm 0.69 ^{d**}	116.10 \pm 0.17 ^{e*}
地龙	109.80 \pm 0.69 ^c	105.80 \pm 0.76 ^d	128.90 \pm 0.10 ^{b***}	135.80 \pm 0.87 ^{a***}
龙眼肉	101.80 \pm 4.25 ^{def}	98.90 \pm 5.17 ^e	102.70 \pm 0.64 ^{e*}	109.00 \pm 3.40 ^{d*}

注:同列不同字母表示不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$)。与该药材的相同浓度水提取物比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

2.6 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的保护作用

与对照组 HepG2 细胞存活率(99.86 \pm 1.32)%、L02 细胞存活率(99.91 \pm 2.24)%比较,模型组细胞的存活率显著下降,分别为 60.42%(HepG2 细胞)和 58.09%(L02 细胞),说明氧化损伤模型构建成功。加入不同浓度“桂十味”各味药材提取物处理后,受 H_2O_2 氧化损伤的 HepG2 和 L02 细胞存活率有不同

程度的提高,大多数提取物对氧化损伤细胞有显著保护作用。鸡骨草水提取物,鸡血藤 75%乙醇提取物对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用最强。鸡骨草水提取物及菝葜 75%乙醇提取物对 L02 细胞氧化损伤的保护作用最强。这些数据表明“桂十味”各味药材提取物能在一定程度上保护 HepG2 和 L02 细胞,缓解 H_2O_2 导致的氧化应激损伤,结果如表 3 所示。

表 3 “桂十味”药材不同溶剂提取物对 H_2O_2 诱导 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的保护作用

药材	HepG2 细胞存活率/%			
	水提取物		75%乙醇提取物	
	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
肉桂	82.77 \pm 0.97 ^b	85.50 \pm 0.71 ^b	86.53 \pm 2.63 ^{b***}	82.11 \pm 1.80 ^{b*}
八角	73.53 \pm 1.84 ^{cd}	75.93 \pm 2.01 ^{cd}	80.73 \pm 1.22 ^{c*}	79.45 \pm 1.90 ^b
罗汉果	72.90 \pm 0.14 ^{cd}	72.60 \pm 0.73 ^{cd}	68.60 \pm 1.02 ^d	65.90 \pm 1.70 ^{ef*}
菝葜	61.90 \pm 1.40 ^f	62.25 \pm 0.81 ^e	67.62 \pm 1.52 ^{d*}	69.84 \pm 1.00 ^{cde*}
鸡血藤	83.90 \pm 0.20 ^b	82.71 \pm 0.32 ^b	90.70 \pm 1.61 ^{a*}	88.31 \pm 1.42 ^{a*}
鸡骨草	89.44 \pm 0.52 ^a	95.01 \pm 0.42 ^a	69.27 \pm 2.12 ^{c***}	71.56 \pm 1.62 ^{cd***}
两面针	56.11 \pm 1.14 ^e	53.84 \pm 0.24 ^f	78.33 \pm 1.88 ^{b***}	73.83 \pm 1.53 ^{c***}
山豆根	82.69 \pm 0.21 ^b	83.94 \pm 0.59 ^b	60.92 \pm 1.90 ^{e***}	56.26 \pm 5.60 ^{b***}
地龙	65.97 \pm 1.71 ^e	65.47 \pm 2.50 ^e	60.70 \pm 3.70 ^{e*}	58.20 \pm 1.30 ^{gh*}
龙眼肉	70.63 \pm 1.01 ^d	72.07 \pm 0.40 ^d	60.55 \pm 1.90 ^{e*}	62.13 \pm 1.32 ^{fg*}

续表

药材	LO2 细胞存活率/%			
	水提取物		75%乙醇提取物	
	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
肉桂	87.80 \pm 9.31 ^c	81.33 \pm 1.43 ^c	80.81 \pm 4.12 ^{c*}	83.53 \pm 0.40 ^c
八角	84.62 \pm 0.74 ^{ef}	73.63 \pm 0.74 ^d	66.60 \pm 4.49 ^{d**}	59.21 \pm 6.73 ^{c*}
罗汉果	96.84 \pm 5.68 ^b	74.62 \pm 2.02 ^d	65.10 \pm 11.54 ^{d***}	48.90 \pm 2.65 ^{f***}
莪术	91.87 \pm 0.40 ^{de}	89.33 \pm 0.55 ^b	99.32 \pm 1.66 ^{a*}	108.11 \pm 0.24 ^{a***}
鸡血藤	69.03 \pm 5.21 ^e	68.11 \pm 0.26 ^c	67.12 \pm 0.51 ^d	75.63 \pm 0.16 ^{d*}
鸡骨草	107.62 \pm 1.88 ^a	101.11 \pm 1.63 ^a	97.07 \pm 1.74 ^{ab*}	74.94 \pm 2.54 ^{d***}
两面针	60.70 \pm 0.51 ^b	58.71 \pm 1.45 ^f	79.20 \pm 1.31 ^{c**}	53.40 \pm 0.62 ^{f*}
山豆根	89.57 \pm 1.40 ^e	80.51 \pm 1.36 ^c	98.51 \pm 1.34 ^{ab*}	93.17 \pm 1.01 ^{b*}
地龙	98.52 \pm 3.90 ^b	92.07 \pm 3.17 ^b	95.83 \pm 1.85 ^b	92.93 \pm 9.17 ^b
龙眼肉	97.51 \pm 2.07 ^{bc}	91.03 \pm 4.18 ^b	91.91 \pm 3.06 ^{b*}	93.87 \pm 5.28 ^b

注:同列不同字母表示不同组别之间存在显著性差异($P<0.05$)。与该药材的相同浓度水提取物比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

3 讨论

本研究结果表明,不同溶剂提取物的得率、总酚含量和总糖含量呈现相似规律,即75%乙醇提取物的得率、总酚含量和总糖含量均高于水提取物,而75%乙醇提取物总黄酮含量与水提取物的差异不明显。JIANG等^[20]在研究鸡血藤提取物抗氧化实验中发现,鸡血藤水提取物中的总酚和总黄酮含量显著高于乙醇提取物。RAKASIVI等^[7]在研究肉桂提取物作为食品储存添加剂的研究中发现,乙醇提取物中总酚含量高于水提取物。本实验中提取物的总酚、总黄酮、总糖含量与其他研究结果存在一定差异,可能与“桂十味”各味药材中总酚、总黄酮、总糖类化合物在不同溶剂中的溶解性以及提取条件的不同有关。本研究结果表明,提取溶剂对“桂十味”各味药材活性成分的提取有一定影响,许多先行研究也证实提取溶剂对活性物质的提取率有较大影响^[21]。

DPPH和ABTS自由基的清除作用及 Fe^{3+} 还原能力的实验结果显示,“桂十味”各味药材中抗氧化能力最强的两味药材分别是鸡血藤和肉桂。鸡血藤中含大量多酚和黄酮类物质,具有良好的抗氧化、肝保护及抗炎作用^[22]。肉桂是我国食品药品监督管理局许可使用的安全食品添加剂,其中肉桂多酚及

精油具有较好的抗菌和抗氧化活性^[23-24]。多酚类成分的分子结构中含酚羟基,能提供氢质子,具有很强的抗氧化能力^[25]。黄酮类化合物作为氢离子供体,能抑制自由基的产生及清除活性氧^[26],表明鸡血藤和肉桂具有较好的抗氧化能力。

通过对HepG2和LO2细胞存活率的分析发现,鸡骨草水提取物及莪术、鸡骨草、两面针、地龙的75%乙醇提取物对HepG2细胞表现出一定的细胞毒性,其中75%乙醇提取物的细胞毒性高于水提取物。而相同实验浓度下,“桂十味”药材的不同溶剂提取物处理后,对LO2细胞均未表现出细胞毒性。抗细胞氧化损伤结果显示,大多数“桂十味”药材经不同溶剂提取物对 H_2O_2 诱导的HepG2和LO2细胞氧化损伤有明显的保护作用。其中,鸡骨草水提取物、鸡血藤75%乙醇提取物对HepG2细胞氧化损伤的修复效果最佳;鸡骨草水提取物、莪术的75%乙醇提取物对LO2细胞氧化损伤的修复效果最佳。部分“桂十味”药材如山豆根、地龙和龙眼肉等不同提取物在DPPH和ABTS自由基清除作用及 Fe^{3+} 还原能力方面表现微弱作用,而这些提取物对 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤有较好的保护作用,可能是由于提取物直接与 H_2O_2 反应消除 H_2O_2 的氧化损伤作用。张明珠等^[27]研究结果表明,同一提取物对不同自由基的敏

感性不同,体外抗氧化活性及对细胞氧化损伤的保护作用也存在明显差异。本研究结果表明,鸡血藤和肉桂在体外抗氧化活性实验中表现出较好的抗氧化效果,鸡血藤提取物的抗氧化效果明显优于肉桂。而在抗细胞氧化损伤结果中,肉桂提取物的抗细胞氧化损伤效果与鸡血藤提取物相近,表明肉桂可能通过其他抗氧化体系对氧化损伤的细胞产生保护作用。

4 结论

本研究通过体外抗氧化及抗细胞氧化损伤实验,评估了“桂十味”药材不同溶剂提取物的抗氧化能力差异。结果表明,“桂十味”药材对自由基的清除能力存在较大的差异,对 H_2O_2 诱导的 HepG2 和 L02 细胞氧化损伤的保护作用也存在一定程度的差异。实验结果可为后续研究“桂十味”各味药材抗氧化机制的差异提供依据。下一步可继续开展“桂十味”药材中的有效活性成分分析及结构鉴定,以便更深入地研究抗氧化机制。

参考文献

- [1] 徐浩, 霍丽妮, 陈睿. 广西十味中草药在抗肿瘤领域的研究和热点的可视化分析[J]. 壮瑶药研究, 2023(1): 31-43.
- [2] LI Y Q, TAN B Y, CEN Z Y, et al. The variation in essential oils composition, phenolic acids and flavonoids is correlated with changes in antioxidant activity during *Cinnamomum loureirii* bark growth[J]. Arab J Chem, 2021, 14(8): 103249.
- [3] ZOU Q Y, HUANG Y Y, ZHANG W Y, et al. A comprehensive review of the pharmacology, chemistry, traditional uses and quality control of star anise (*Illicium verum* hook. F.): an aromatic medicinal plant[J]. Molecules, 2023, 28(21): 7378.
- [4] LIU X Y, ZHANG Y B, YANG X W, et al. Anti-inflammatory activity of some characteristic constituents from the vine stems of *Spatholobus suberectus* [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3750.
- [5] DUAN J J, ZHU D, ZHENG X X, et al. *Siraitia grosvenorii* (swingle) C. Jeffrey: research progress of its active components, pharmacological effects, and extraction methods[J]. Foods, 2023, 12(7): 1373.
- [6] YAO X C, LI Z Q, GONG X M, et al. Total saponins extracted from *Abrus cantoniensis* Hance suppress hepatitis B virus replication in vitro and in rAAV8-1.3HBV transfected mice[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112366.
- [7] RAKASIVI K G J, CHIN K B. Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia* extract and quality of raw chicken patties added with *C. cassia* powder and *Pleurotus sajor-caju* powder as functional ingredients during storage[J]. Anim Biosci, 2022, 35(8): 1279-1288.
- [8] ARYA O P, ADHIKARI P, PANDEY A, et al. Health-promoting bioactive phenolic compounds in different solvent extracts of *Curcuma caesia* Roxb. rhizome from North-East India[J]. J Food Process Pres, 2022, 46(8): e16805.
- [9] YANG E C, HSIEH Y Y, CHUANG L Y. Comparison of the phytochemical composition and antibacterial activities of the various extracts from leaves and twigs of *Illicium verum*[J]. Molecules, 2021, 26(13): 3909.
- [10] SHIVANI, THAKUR B K, MALLIKARJUN C P, et al. Introduction, adaptation and characterization of monk fruit (*Siraitia grosvenorii*): a non-caloric new natural sweetener[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 6205.
- [11] AKULLO J O, KIAGE-MOKUA B N, NAKIMBUGWE D, et al. Phytochemical profile and antioxidant activity of various solvent extracts of two varieties of ginger and garlic[J]. Heliyon, 2023, 9(8): e18806.
- [12] STRYJECKA M, KROCHMAL-MARCZAK B, CEBULAK T, et al. Assessment of phenolic acid content and antioxidant properties of the pulp of five pumpkin species cultivated in southeastern Poland [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8621.
- [13] YUE F F, ZHANG J R, XU J X, et al. Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method[J]. Front Nutr, 2022, 9: 963318.
- [14] AL JUMAYI H A, ALLAM A Y, EL-BELTAGY A E, et al. Bioactive compound, antioxidant, and radical scavenging activity of some plant aqueous extracts for enhancing shelf life of cold-stored rabbit meat [J]. Antioxidants, 2022, 11(6): 1056.
- [15] COELHO M C, RIBEIRO T B, OLIVEIRA C, et al. In vitro gastrointestinal digestion impact on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from toma-

- to flours obtained after conventional and ohmic heating extraction[J]. *Foods*, 2021, 10(3):554.
- [16] KOLENC Z, HRIBERNIK T, LANGERHOLC T, et al. Antioxidant activity of different hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes[J]. *Plants*, 2023, 12(19):3436.
- [17] 周香辉, 莫晓宁, 凌楠, 等. 广西产‘桂桑优’桑叶不同溶剂提取物的抗氧化及降糖活性分析[J]. *食品科技*, 2022, 47(12):193-199.
- [18] KIM H R, KIM J E, BIN YUN W, et al. Protective effect of oil extracted from *Neophocaena asiaeorientalis* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells[J]. *Fish Sci*, 2019, 85(5):867-876.
- [19] 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]. *食品科学*, 2023, 44(10):281-290.
- [20] JIANG T, LEI W, LING N, et al. Antioxidant activity of aqueous extract of *spatholobi caulis* and its ameliorative effect on CCl₄ induced acute liver injury in mice[J]. *Int J Front Med*, 2023, 5(3):20-27.
- [21] 意如乐, 格根图, 贾玉山, 等. 不同溶剂对蒙早苦苣菜活性物质提取的影响[J]. *饲料研究*, 2023, 46(8):54-58.
- [22] 高志杰, 朱彤彤, 牛新茹, 等. 鸡血藤化学成分及药理活性研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(4):67-74.
- [23] KA ČÁNIOVÁ M, GALOVI ČOVÁ L, VALKOVÁ V, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Cinnamomum cassia* essential oil and its application in food preservation[J]. *Open Chem*, 2021, 19(1):214-227.
- [24] AL-AJALEIN A A S, SHAFIE M H, YAP P G, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Cinnamomum cassia* with anti-hyperpigmentation properties: optimization and characterization studies[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 226:321-335.
- [25] 王禹, 马维红. 牛蒡化学成分及其对心血管疾病保护作用的研究进展[J]. *华夏医学*, 2020, 33(3):178-181.
- [26] CHEN G L, FAN M X, WU J L, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule[J]. *Food Chem*, 2019, 277:706-712.
- [27] 张明珠, 秦华光, 穆丹, 等. 茶多糖的抗氧化活性及对细胞氧化损伤的保护机制[J]. *植物学报*, 2022, 57(4):444-456.

[收稿日期:2024-01-23]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:周寿红]