

槟榔多糖的抗氧化活性及其对细胞内氧化损伤抑制作用的研究

唐敏敏¹, 宋菲¹, 王辉², 赵松林¹, 陈卫军¹

1 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339

2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

摘要 研究了槟榔多糖粗提物(ASP)的抗氧化活性及其对人皮肤成纤维细胞(HSF)内氧化损伤的抑制作用。结果表明:利用超声波辅助法提取的槟榔子多糖经初步去杂质后,具有良好的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH·)清除能力、二价铁螯合能力和三价铁还原力。在对HSF细胞内氧化损伤的抑制作用研究中,当过氧化氢(H₂O₂)处理浓度为150 μmol/L、ASP添加浓度为20 μg/mL时,HSF细胞存活率上升至93.15%,与对照组差异不显著($p < 0.05$);当短波紫外线照射强度为100 μW/cm²、照射时间为3.5 h、ASP添加量为20 μg/mL时,HSF细胞存活率上升至82.92%,与对照组差异不显著($p < 0.05$)。因此,ASP具有抑制H₂O₂和短波紫外线处理对HSF细胞造成的氧化损伤的作用。

关键词 槟榔多糖; 抗氧化; 抗细胞内氧化损伤

中图分类号 S792.91

文献标识码 A

In Vitro Antioxidant Activities and Protective Effects of Polysaccharides from *Areca catechu* L. Seed

TANG Minmin¹, SONG Fei¹, WANG Hui², ZHAO Songlin¹, CHEN Weijun¹

1 *Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China*

2 *Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China*

Abstract The *in vitro* antioxidant activities and protective effects on human skin fibroblasts (HSF) of crude polysaccharides from *Areca catechu* L. seed were evaluated. The initially purified ASP had good DPPH radical scavenging activity, ferrous ions chelating capacity and strong reducing power. Cell culture results indicated that HSF (damaged by H₂O₂ or UV C) treated with ASP exhibited better cellular morphology and higher cell variability compared with the negative control group, and the protective effects were stronger with a supplemented ASP dose in the experimental range.

Key words Polysaccharides from *Areca catechu* L. seed; Antioxidant activities; Protective effects

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2015.06.020

槟榔(*Areca catechu* L.)是棕榈科槟榔属植物,为多年生常绿乔木,广泛分布于中非、南亚和东南亚等国家。中国也是重要的槟榔产地之一,主要集中在海南、台湾、广东等省份。槟榔果中含槟榔油、生物碱、多酚、色素等多种化学物质,具有泻气消水、杀虫去积^[1]、抑菌消炎^[2]、杀精抑排卵^[3]、保护肝脏^[4]等药理作用,入药历史悠久。

槟榔是海南省热带作物中仅次于橡胶的第二大经济作物。然而中国的槟榔加工技术水平目前处于初级加工阶段,缺乏高附加值产品,严重影响了槟榔产业的收益。另一方面,有关于槟榔致癌的研究

报道^[5],即对槟榔的褒贬看法不一。因此,探索槟榔的功能成分及其生理活性,科学地评价槟榔的生理功能作用,对促进槟榔产业的可持续发展具有重要意义。

多糖是广泛存在于动物、植物和微生物中的一类碳水化合物,因其具有独特的物理化学特性和生物活性而越来越受到人们的关注和重视。迄今为止,大量研究结果表明多糖具有广泛的药理活性,如免疫调节^[6]、抗肿瘤^[7]、防紫外线^[8]、降低血糖血脂、抗氧化、抑制溃疡、造血^[9]等。目前,关于槟榔活性成分的研究主要集中在生物碱、多酚、色素

收稿日期 2014-12-02

修回日期 2015-02-03

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No. 1630052015040); 海南省自然科学基金项目(No. 314146)。

作者简介 唐敏敏(1984—),女,助理研究员;研究方向:功能食品;E-mail: tangdou18@hotmail.com。

等方面, 而关于槟榔多糖的研究鲜有报道。

笔者主要研究 ASP 的体外抗氧化活性及其对人体皮肤成纤维细胞内氧化损伤的抑制作用, 以期对槟榔的精深加工提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及预处理 5月龄的槟榔 (*Areca catechu L cv. Reyan No.1*) 果实摘自中国热带农业科学院椰子研究所槟榔种质基地, 去壳后的种子经冷冻干燥后, 保存于干燥器中备用(1个月内使用)。

1.1.2 药品和试剂 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH·)、Ferrozine 试剂购自 Sigma 公司; 高糖改良杜氏伊格格培养基 (DMEM)、胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司; 其他分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 超声波细胞破碎仪 (型号: XO-650D) 均购自南京先欧仪器制造有限公司; 紫外可见分光光度计、二氧化碳培养箱 (型号: WJ-1851) 均购自上海三腾仪器有限公司; 全自动荧光免疫分析仪 (型号: VarioskanFlash) 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ASP 的制备 将干燥的槟榔种子磨碎, 过 200 目筛后置于烧杯中, 加入 15 倍体积的蒸馏水, 于超声波细胞破碎仪内进行多糖提取, 提取超声波功率为 400 W, 提取时间为 8 min, 于 9 000 r/min 条件下离心 10 min, 重复提取 2 次(在冰浴条件下提取以保持提取系统的温度在 55 °C 以下); 合并上清液, 通过真空旋转蒸发将其浓缩至原来体积的 1/4, 加入 4 倍体积的无水乙醇沉淀过夜; 所得到的沉淀用无水乙醇、丙酮和乙醚进行清洗, 加入少量的去离子水进行冻干后得到 ASP, 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 槟榔多糖抗氧化能力测定 (1) ASP 对 DPPH· 的清除率测定: 参照文献[10]的方法, 分别吸取 2 mL 不同浓度的 ASP 溶液与等体积的 0.14 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液于试管中, 混匀, 室温下暗处放置 30 min 后, 在 517 nm 波长下测定吸光值。以水溶性维生素 C (Vc) 作阳性对照。DPPH 自由基清除率按照下列公式计算:

$$\text{清除率}/\%=(1-A_{\text{sample } 517}/A_{\text{control } 517})\times 100$$

(2) ASP 对三价铁离子的还原力测定: 参照文献[11]的方法, 稍有改动。于 0.5 mL 不同浓度的 ASP 溶液中分别加入 1 mL pH 为 6.8 的 0.2 mol/L 磷

酸缓冲液和 2 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 混匀, 于 50 °C 水浴中反应 20 min; 加入 1 mL 10% 的三氯化铁溶液终止反应后, 加入 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁显色, 稳定 10 min; 于 700 nm 波长下测定吸光值。吸光值越大, 还原力越强。以 Vc 作阳性对照。

(3) ASP 对二价铁离子螯合力测定: 参照文献[11]的方法, 略有改动。分别于 1 mL 不同浓度的 ASP 溶液中加入 0.1 mL 300 μmol/L 的二氯亚铁溶液, 反应 30 s 后, 加入 0.1 mL 5 mmol/L Ferrozine 溶液, 混匀后室温反应 10 min, 于 562 nm 处测定吸光值。以乙二烯四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 作阳性对照。

$$\text{螯合率}/\%=(1-A_{\text{sample } 562}/A_{\text{control } 562})\times 100$$

1.2.3 ASP 对 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用 (1) HSF 的培养: 将 HSF 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 培养条件为 5% CO₂, 温度 37 °C, 饱和湿度。

(2) 对过氧化氢诱导的 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用: 采用文献[12]的方法, 稍有改动。当细胞处于对数生长期时, 用 0.25% 的胰酶消化后再用吸管吹打成单细胞悬液, 以 1×10⁴ 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 过夜培养。实验分为对照组、阴性对照组、ASP 保护组。对照组: 不做任何处理, 培养 24 h; 阴性对照组: 用含终浓度为 150 μmol/L 的 H₂O₂ 培养基培养 24 h; ASP 保护组: 用含 150 μmol/L H₂O₂ 及不同浓度 ASP (5、10、20 μg/mL) 的培养基培养 24 h。培养结束后, 采用 MTT 法测定细胞存活率。

(3) 对短波紫外线诱导的 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用: 采用文献[13]的方法, 稍有改动。当细胞处于对数生长期时, 用 0.25% 的胰酶消化后再用吸管吹打成单细胞悬液, 以 2×10⁵ 个/mL 的密度接种于 35 mm 的细胞培养皿中, 过夜培养。实验分为正常对照组、阴性对照组、ASP 保护组 (ASP 添加浓度分别为 5、10、20 μg/mL)。实验分组后, 吸除各细胞培养皿中的培养液, 用 PBS 冲洗一次后加入 700 μL PBS 覆盖底面以避免干燥。阴性对照组和 ASP 保护组于 18 W 紫外灯下照射 3.5 h, 照射强度为 100 μW/cm²; 正常对照组不经过紫外照射。紫外照射结束后, 采用 MTT 法测定各组细胞存活率。

(4) 细胞存活率的测定: 采用 MTT 法^[12], 略有改动。待分组处理的细胞结束培养后, 加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 于 37 °C 孵育 4 h, 吸除上清液, 加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分融解, 于 550 nm 波长下测定各孔吸光度 (A)。假设正常

对照组的细胞存活率为 100%。

$$\text{细胞存活率}/\% = A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100$$

1.3 数据分析

体外抗氧化活性试验设 3 个重复，细胞存活率实验设 8 个重复，实验结果表述用平均值±标准偏差，采用 SPSS 16.0 中的 Duncan 法进行显著性分析，用 Excel 2007 作图。

2 结果与分析

2.1 ASP 的体外抗氧化作用

2.1.1 对 DPPH·的清除活性 如图 1 所示，ASP 对 DPPH 自由基的清除率随着浓度的增加而逐渐升高，而 Vc 的浓度为 20 μg/mL 时，DPPH 自由基清除率基本达到 100%。通过线性回归分析可知，在

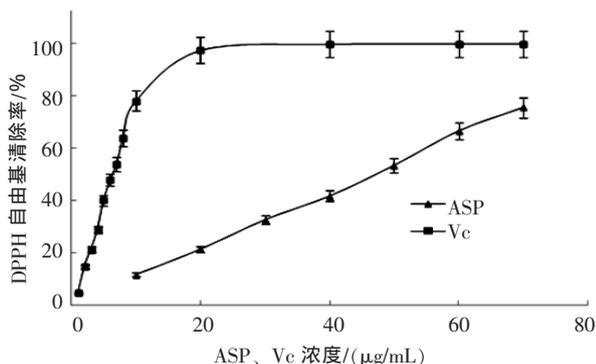


图 1 槟榔多糖对 DPPH 自由基的清除活性

Fig. 1 DPPH radical scavenging activities of ASP

2.1.3 二价铁离子螯合力 图 3 列出了 ASP 和 EDTA-2Na 对二价铁离子的螯合能力。在实验测定范围内，二价铁离子的螯合能力随 ASP 浓度的增加呈线性升高趋势，线性公式为 $y=0.3909x+11.772$ ($R^2=0.9949$)。而在 0~9 μg/mL 范围内，EDTA-2Na 对二价铁离子的螯合能力也与其浓度呈正相关 ($y=10.4510x+8.4954$, $R^2=0.9974$)。通过计算得

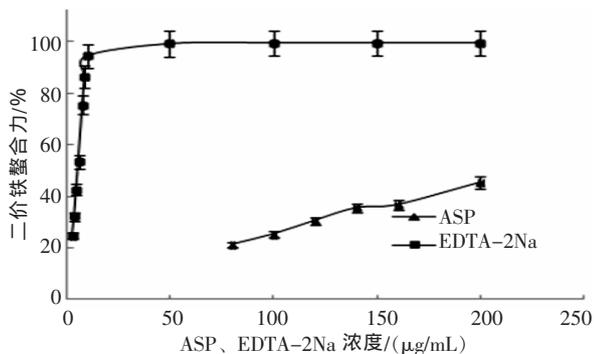


图 3 槟榔多糖对二价铁的螯合力

Fig. 3 Iron chelating capacity of ASP

0~70 μg/mL 浓度范围内，ASP 对 DPPH·的清除率与浓度呈线性正相关 ($y=1.08x+0.24$, $R^2=0.9980$)；在 0~7 μg/mL 范围内，Vc 对 DPPH·的清除率与浓度也呈线性正相关 ($y=8.27x+2.94$, $R^2=0.9949$)。ASP 的 EC_{50} 值为 46.26 μg/mL，换算成 Vc 当量为 0.12 μg/mL，说明 ASP 对 DPPH·的清除能力良好。

2.1.2 对三价铁的还原力 如图 2 所示，在实验测定范围内，ASP 和 Vc 对三价铁的还原力均具有浓度依赖性，随着浓度的升高而逐渐增强。通过线性回归分析，得到两者对三价铁还原力的线性浓度范围分别为 0~200、0~100 μg/mL，线性公式分别为 $y=0.0031x+0.0565$ 、 $y=0.0073x+0.0182$ ， R^2 分别为 0.9949、0.9986。实验结果表明 ASP 具有一定的三价铁还原能力。

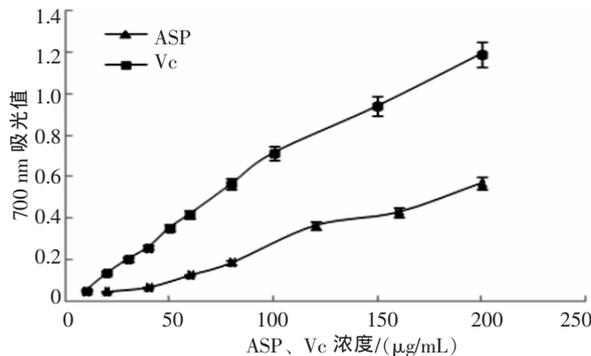


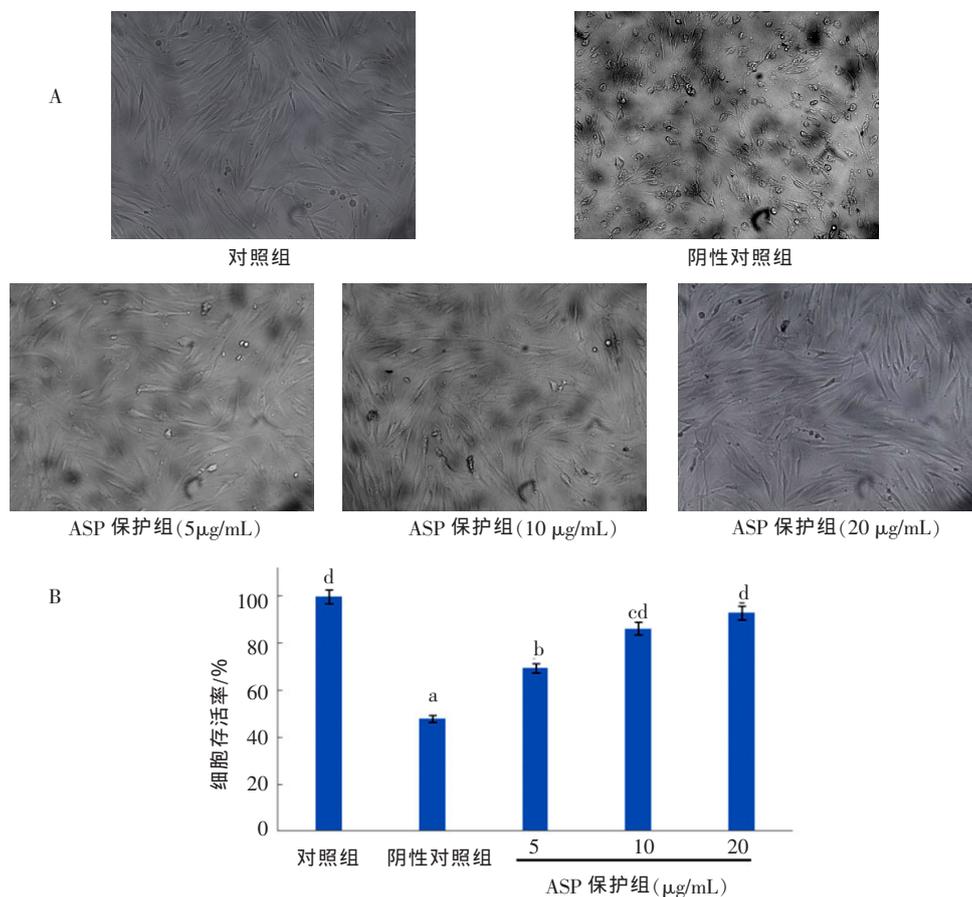
图 2 槟榔多糖对三价铁的还原力

Fig. 2 Reducing power of ASP

出，ASP 的 EC_{50} 值为 97.79 μg/mL，换算成 EDTA-2Na 当量为 0.04 μg/mL。

2.2 ASP 对 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用

2.2.1 对过氧化氢诱导的 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用 为建立 H₂O₂ 对 HSF 细胞的氧化损伤模型，采用 150 μmol/L 的 H₂O₂ 处理 HSF 细胞 24 h，结果如图 4 所示。在倒置显微镜下，正常的人皮肤成纤维细胞为梭状，细胞形态规则、饱满。阴性对照组的细胞被 H₂O₂ 损伤，形态发生变化，逐渐变圆、皱缩；而经 ASP 保护后，损伤的形态逐渐恢复正常，当 ASP 浓度为 20 μg/mL 时，被损伤细胞已接近正常细胞的形态(图 4-A)。细胞存活率实验结果表明，用 H₂O₂ 处理 HSF 细胞 24 h 后细胞存活率明显降低，仅为正常对照组的 48.21%，而添加 ASP 能明显提高被 H₂O₂ 损伤的 HSF 细胞的存活率，而且与 ASP 浓度呈现量效关系。ASP 的添加浓度为 5 μg/mL 时，细胞存活率为 69.68%，显著高于阴性对照组 ($p < 0.05$)；当 ASP 的浓度分别增



A: 槟榔多糖对过氧化氢处理的 HSF 细胞形态的保护作用; B: 槟榔多糖对过氧化氢处理的 HSF 细胞存活率的影响; 图中不同的小写字母表示在 $p < 0.05$ 时差异显著。下同。

A: Protective effects of ASP on morphology of HSF treated by H_2O_2 ; B: Protective effects of ASP on viability of HSF treated by H_2O_2 ; Different small letters above the columns represent significant differences at $p < 0.05$; The same as below.

图 4 槟榔多糖对过氧化氢诱导的 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用 (20×)

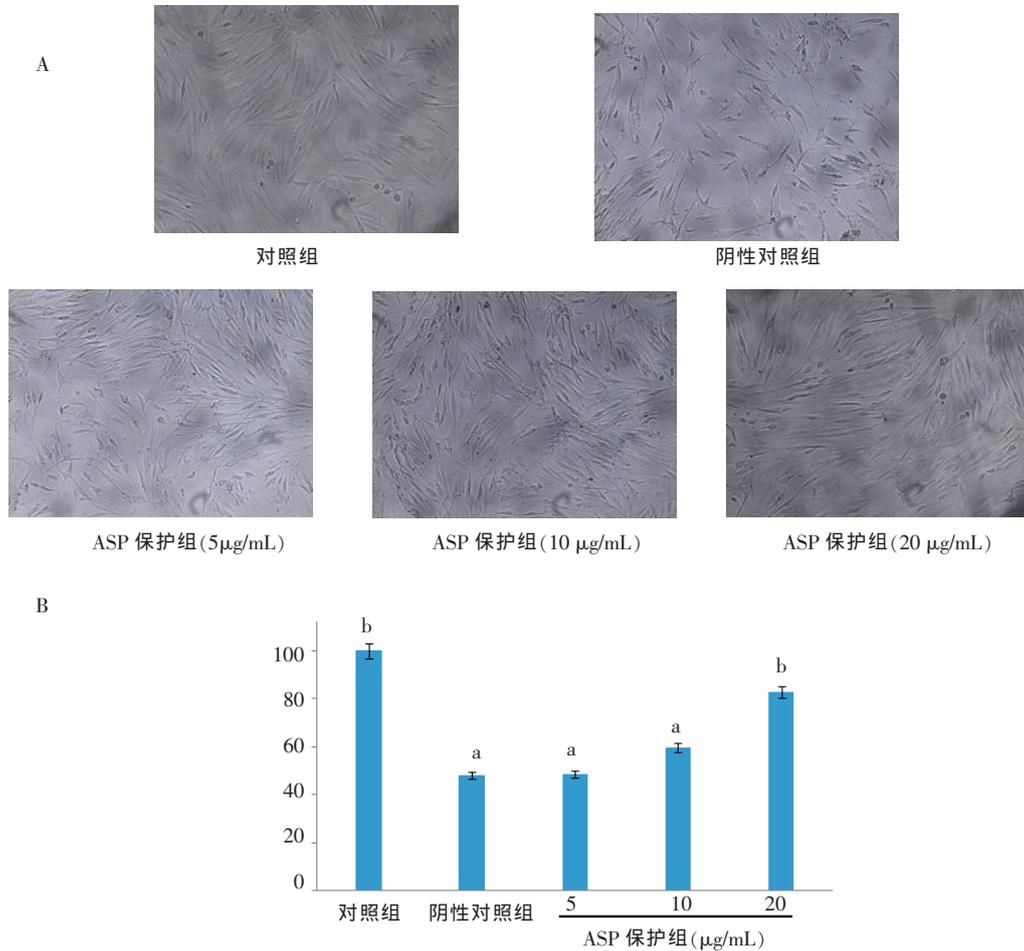
Fig. 4 Protective effects of ASPs on HSF treated by H_2O_2 (20×)

加至 10、20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率均增长至 80% 以上(图 4-B), 并且与对照组无显著差异($p < 0.05$)。这表明 ASP 可以抑制 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞内氧化损伤。

2.2.2 对短波紫外线诱导的 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用 采用短波紫外线诱导细胞内氧化损伤, 研究 ASP 对 HSF 细胞的保护作用, 结果如图 5 所示。由图 5-A 可知, ASP 可以在一定程度上保护短波紫外线处理的 HSF 细胞微观形态。在细胞存活率实验中, 经短波紫外线照射的 HSF 细胞存活率降低至正常组的 48.18%。当 ASP 添加量为 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, HSF 细胞存活率上升至 82.92%, 与正常对照组无显著性差异($p < 0.05$); 而低浓度(5、10 $\mu\text{g/mL}$)ASP 不能显著改善存活率(图 5-B)。结果表明一定浓度的 ASP 可以抑制短波紫外线诱导的 HSF 细胞内氧化损伤。

3 讨论与结论

活性氧代谢失调是自由基大量产生的主要途径。自由基生物学研究认为, 许多疾病的发生与自由基导致的大分子功能障碍如蛋白质修饰、脂质过氧化以及 DNA 损伤等有关^[14]。目前有多种方法均可评价某种化学成分是否具有抗氧化性。本研究通过 DPPH 自由基清除能力、二价铁螯合力、三价铁还原力的强弱对 ASP 的体外抗氧化能力进行了评价, 发现其具有良好的抗氧化活性, 这与其他多种植物中多糖的研究结果比较一致^[15-17]。有研究表明, 还原力的强弱与抗氧化剂中含有的还原酮有关, 因为还原酮可以贡献氢自由基, 打破原有的自由基链, 进而发挥抗氧化作用; 还原酮还可以与一些过氧化物的前体发生反应, 阻止过氧化反应的进行^[18]。二价铁离子螯合能力则与分子结构中含有的 -OH、-SH、-COOH、-PO₃H₂、CO、-NR₂、-S-



A: 槟榔多糖对短波紫外线处理的 HSF 细胞形态的保护作用; B: 槟榔多糖对短波紫外线处理的 HSF 细胞存活率的影响。
 A: Protective effects of ASP on morphology of HSF irradiated by UVC; B: Protective effects of ASP on viability of HSF irradiated by UVC.

图 5 槟榔多糖对紫外线诱导的 HSF 细胞内氧化损伤的保护作用 (20×)
 Fig. 5 Protective effects of ASPs on HSF treated by UV C (20×)

和-O-等官能团有关, 因此可以推断 ASP 中含有以上一种或几种官能团。

H₂O₂ 和紫外辐射是重要的氧化应激源, 进入人体后, 可打破内部的氧化-还原平衡, 超氧阴离子自由基、羟基自由基、氮氧自由基和单线态氧等活性氧大量表达, 引起脂质过氧化、DNA 损伤等, 进而导致机体病变^[19]。在细胞存活率实验中, ASP 能够改善 HSF 细胞形态、显著提高细胞存活率, 有效地抑制 H₂O₂ 和短波紫外线对该类细胞造成的氧化损伤。经分析可知, ASP 能够抑制细胞内的氧化损伤可能与槟榔多糖具有良好的抗氧化性有关。另一方面, 多糖及其复合物的生物活性大多与其化学组成、分子量、官能团的位置、糖苷键的类型及提取分离的方法等因素有关^[19], 所以关于 ASP 的结构及其发挥抗氧化作用的机理还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 张渝渝, 杨大坚, 张毅. 槟榔的化学及药理研究概况[J]. 重庆中草药研究, 2014(1): 37-41, 44.
- [2] Khan S, Mehmood M H, Ali A N A, *et al.* Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of betel nut in rodents[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(3): 654-661.
- [3] Shrestha J, Shanbhag T, Shenoy S, *et al.* Antiovolatory and abortifacient effects of Areca catechu (betel nut) in female rats[J]. Indian Journal of Pharmacology, 2010, 42(5): 306-311.
- [4] Pithayanukul P, Nithitanakool S, Bavovada R. Hepatoprotective potential of extracts from seeds of Areca catechu and nutgalls of Quercus infectoria[J]. Molecules, 2009, 14(12): 4 987-5 000.
- [5] Li W C, Lee P L, Chou I, *et al.* Molecular and cellular cues of diet associated oral carcinogenesis-with an emphasis on areca-nut-induced oral cancer development[J]. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2014, DOI: 10. 1111/jop. 12171.
- [6] Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived

- from marine algae[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 14-21.
- [7] Zong A Z, Cao H Z, Wang F S. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1395-1410.
- [8] Widel M, Krzywon A, Gajda K, et al. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2014, 68: 278-287.
- [9] Jin M, Zhao K, Huang Q, et al. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.)Diels: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(3): 713-722.
- [10] Liu D M, Sheng J W, Li Z J, et al. Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.)Ching[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 56: 1-5.
- [11] Jiang C X, Xiong Q P, Gan D, et al. Antioxidant activity and potential hepatoprotective effect of polysaccharides from *Cyclina sinensis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(1): 262-268.
- [12] Giampieri F, Alvarez-Suarez J M, Mazzoni L, et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and Improves mitochondrial functionality [J]. Molecules, 2014, 19(6): 7798-7816.
- [13] Widel M, Krzywon A, Gajda K, et al. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2014, 68: 278-287.
- [14] 张桂芝, 耿莎, 杨海燕, 等. 植物抗氧化成分的研究进展[J]. 食品科学, 2008, 28(12): 551-553.
- [15] Zhang Z F, Lü G Y, Pan H J, et al. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 1140-1146.
- [16] Wu G H, Hu T, Li Z Y, et al. In vitro antioxidant activities of the polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing[J]. Food Chemistry, 2014, 148: 351-356.
- [17] Fan J L, Wu Z W, Zhao T H, et al. Characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb [J]. Carbohydrate Polymers, 2014: 101, 990-997.
- [18] Kong F L, Zhang M W, Liao S T, et al. Antioxidant activity of polysaccharide-enriched fractions extracted from pulp tissue of *Litchi Chinensis* sonn[J]. Molecules, 2010, 15(4): 2152-2165.
- [19] 宗万松. 环境氧化应激诱导蛋白质(多肽)氧化损伤评价新方法的研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.

责任编辑：林海妹