

三七根总皂苷、总黄酮、总多糖抗氧化活性对比研究

黄加文^{1,2,3}, 何志明^{1,2,3}, 詹 易^{1,2,3}, 吴德松^{1,2,3}, 查雨锋^{1,2,3*}

¹云南白药集团股份有限公司, 昆明 650500;

²云南省药物研究所; ³ 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111

摘要:探究三七根总皂苷、总黄酮、总多糖体外抗氧化活性的差异。提取三七根中的上述3种成分,采用DPPH、ABTS自由基清除实验比较其自由基清除能力;采用H₂O₂诱导人皮肤成纤维细胞(human foreskin fibroblasts, HFF)氧化损伤模型,通过检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)等细胞氧化应激指标及I型胶原蛋白(type I collagen, COL-I)、COL-III、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase 1, MMP-1)、MMP-3蛋白表达,比较其改善氧化应激的能力;采用中波紫外线(ultraviolet B, UVB)诱导3D皮肤损伤模型,通过HE染色观察及检测紧密连接蛋白-1(claudin-1, CLDN-1)、闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)蛋白表达,比较其屏障修复能力,综合评估其抗氧化活性。结果表明:在自由基清除活性方面,总皂苷表现微弱,总黄酮的清除能力优于总多糖;在抗氧化应激方面,各提取成分均能不同程度降低细胞中MDA含量,提升SOD活性与GSH含量、抑制ROS生成、促进COL-I和COL-III的表达、抑制MMP-1和MMP-3的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),其中总皂苷与总黄酮的抗氧化应激能力相当,总多糖较弱;在屏障修复方面,各提取成分均能修复UVB所致皮肤屏障损伤,显著上调CLDN-1与ZO-1的表达($P < 0.01$, $P < 0.001$),总皂苷的屏障修复能力最优,其次为总黄酮,总多糖最弱。本研究系统比较了三七根总皂苷、总黄酮、总多糖的体外抗氧化活性差异,证实了三七根不同成分在抗氧化方面各有侧重且相互补充,为三七资源的高值化利用提供了理论依据。

关键词:三七根; 自由基清除; 氧化应激; 屏障修复; 3D皮肤模型

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)9-1915-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.9.005

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.9.005

Comparison on antioxidant activities of total saponins, total flavonoids, and total polysaccharides from *Panax notoginseng* roots

HUANG Jia-wen^{1,2,3}, HE Zhi-ming^{1,2,3}, ZHAN Yi^{1,2,3}, WU De-song^{1,2,3}, ZHA Yu-feng^{1,2,3*}

¹Yunnan Baiyao Group Co., Ltd., Kunming 650500, China; ²Yunnan Institute of Materia Medica;

³Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China

Abstract: To investigate the differences in antioxidant activities of total saponins, total flavonoids, and total polysaccharides from *Panax notoginseng* roots *in vitro*, these three components were extracted and their free radical scavenging abilities were compared using DPPH and ABTS assays. The capacity to alleviate oxidative stress was evaluated using an H₂O₂-induced human foreskin fibroblasts (HFF) cell model by measuring cellular oxidative stress markers including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), and reactive oxygen species (ROS), as well as protein expression levels of type I collagen (COL-I), COL-III, matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) and MMP-3. Additionally, a 3D skin damage model induced by UVB radiation was used to assess barrier repair ability through HE staining and detection of claudin-1 (CLDN-1) and zonula occludens-1 (ZO-1) protein expression. The antioxidant activity of each component was comprehensively evaluated. Results showed that in terms of free radical scavenging ability, total saponins exhibited weak activity, while total flavonoids demonstrated superior scavenging capacity compared to total polysaccharides. Regarding antioxidant

收稿日期: 2026-03-06 接受日期: 2026-06-23

基金项目: 云南特色植物筛选与研发服务 CXO 平台建设(2022YKZY001); 云南省基础研究专项面上项目(202401AT070155)

* 通信作者 E-mail: chayufeng@ynby.cn

stress, all extracts significantly reduced intracellular MDA levels, enhanced SOD activity and GSH content, suppressed ROS generation, promoted COL-I and COL-III expression, and inhibited MMP-1 and MMP-3 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Among them, total saponins and total flavonoids showed comparable antioxidant effects, whereas total polysaccharides were relatively weaker. In barrier repair, all extracts effectively repaired UVB-induced skin barrier damage and significantly upregulated CLDN-1 and ZO-1 expression ($P < 0.01$, $P < 0.001$), with total saponins showing the strongest barrier repair effect, followed by total flavonoids, and total polysaccharides being the weakest. This study systematically compared the *in vitro* antioxidant activities of total saponins, total flavonoids, and total polysaccharides from *P. notoginseng* roots, confirming that different components exhibit distinct yet complementary antioxidant functions, providing theoretical support for the high-value utilization of *P. notoginseng* resources.

Key words: *Panax notoginseng* roots; free radical scavenging; oxidative stress; skin barrier repair; 3D skin model

随着生活水平的提高,消费者在满足基本物质需求的同时,愈发重视精神生活与皮肤健康,其中,延缓皮肤衰老已成为普遍关注的热点^[1]。氧化损伤被广泛认为是机体衰老的重要诱因之一^[2]。作为人体最外层的屏障器官,皮肤直接暴露于外界环境中,更易受到氧化应激的侵害,从而加速衰老过程^[3]。因此,探索增强皮肤抗氧化能力、延缓氧化性衰老的途径,具有重要的科学价值和实际应用前景。

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属植物,主产于我国云南省文山市,主要以根入药,其活性成分主要包括三七素、皂苷、黄酮及多糖等^[4,5]。研究表明,三七根中的主要活性组分总皂苷、总黄酮和总多糖均具备一定抗氧化能力^[6,7]。本课题组前期研究发现,在三七根、茎、叶、花的不同部位中,根的提取物表现出最优的抗氧化效果^[8]。然而,前期研究多基于粗提物,提取方法相对简单,尚无法明确具体抗氧化作用的物质基础,同时现有研究多聚焦于单一成分,缺乏对三七根中不同有效成分抗氧化活性的系统比较。因此,本研究拟对三七根总皂苷(total saponins from *P. notoginseng* roots, NTS)、三七根总黄酮(total flavonoids from *P. notoginseng* roots, NTF)及三七根总多糖(total polysaccharides from *P. notoginseng* roots, NTP)的抗氧化功效进行系统深入评价,旨在明确其活性物质基础及其功效差异,为相关抗氧化化妆品开发及三七资源的高值化利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药材与细胞

三七根购自云南白药集团股份有限公司,产地为云南省文山市,经云南省药物研究所天然药物资源研究部鉴定为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根。

人皮肤成纤维细胞(human foreskin fibroblasts, HFF)(细胞目录号:SCSP-109,中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库);人表皮角质形成细胞(human epidermal keratinocytes, KC)(货号:CP-H113,武汉普诺赛生物科技有限公司)。

1.2 试剂与仪器

DPPH、MTT(纯度:98%,批号:STBF5255V、253641F,德国默克公司);L-抗坏血酸(V_c)(纯度 $\geq 98\%$,批号:102688692,)、牛胶原蛋白溶液(collagen solution from bovine skin, CSBS)(6 mg/mL,批号:0000319064)、ABTS(纯度 $\geq 98\%$,批号:SLBV5859V)(德国 Sigma 公司);磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)、DMEM高糖培养基(批号:8115183、N2343318P、2520735、3023171,美国 Gibco 公司);Western 一抗稀释液、Western 及 IP 完全裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5\times$)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号:52424240708、A097240913、A179250126、0707212 10930、A147250403,上海碧云天生物技术股份有限公司);预染蛋白分子 Marker(批号:318540,美国赛默飞公司);CnT-Prime 上皮细胞增殖培养基、CnT-Prime-3D 气升培养基(批号:2503125、2502055,瑞士 Cellntec 公司);基质金属蛋白酶 1(matrix metalloproteinase 1, MMP-1)一抗、MMP-3 一抗、I 型胶原蛋白(type I collagen, COL-I)一抗、COL-III 一抗、闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)一抗、紧密连接蛋白-1(claudin-1, CLDN-1)一抗(批号:GR3180071-39、GR3334334-8、GR247379-64、GR247379-68、GR447589-50、GR3321056-8,美国 Abcam 公司);12 孔 Transwell 小室(批号:012025ER01,美国密理博公司);超氧化物歧化酶(superoxide dis-

mutase, SOD) 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号:20250724、20250708, 南京建成生物工程研究所); 还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 试剂盒 (批号:96800160642, 武汉爱博泰克生物科技有限公司); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号:02891200, 上海雅酶生物医药科技有限公司); 无水乙醇、甲醇 (批号:20250218、20241127, 国药集团上海试剂有限公司); 过硫酸钾 ($K_2S_2O_8$) (批号:F1508005, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 人参皂苷 R_{g1} (纯度:98%, 批号:N21HS205182)、HE 染色液 (批号:KR35691A) (上海源叶生物科技有限公司); ECL 化学发光底物 (批号:1705060, 美国 Bio-Rad Laboratories 公司); 芦丁、D-无水葡萄糖 (纯度:98%, 批号:C15523923、C14828297, 上海麦克林生化试剂股份有限公司)。

Practum224 SQP 电子天平 (赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司); BSC-1806 II A2 二级生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司); 371GP 型 CO_2 恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TDL-5M 冷冻离心机 (四川蜀科仪器有限公司); DMIL-LED 倒置相差显微镜 (德国莱卡公司); Multiskan GO 连续波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Mini-PROTEAN 垂直电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5424R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf Innovation 公司); WD-9423B 化学发光分析仪 (北京六一生物科技有限公司); UV1-3L 紫外线治疗仪 (石家庄三奥医疗器械有限公司); Axio Observer 3 荧光显微镜 (德国蔡司公司); Histocore Multicut 轮转式切片机、ECLIPSE Ci-L 自动脱水机 (徕卡显微系统 (上海) 有限公司); YB-6LF 石蜡包埋机、YT-7FB 生物组织摊烤片机 (湖北省孝感市亚光医用电子技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 药物制备

NTS 的制备: 取三七干燥根打粉, 按 1:12 (g/mL) 料液比加入 80% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 采用旋转蒸发仪减压浓缩至一定体积, 大孔吸附树脂进行纯化, 回收乙醇后, 进行真空干燥即得。参照 Huang 等^[9]的方法, 采用紫外分光光度法在 545 nm 处测定不同浓度人参皂苷 R_{g1} 的吸光度, 以人参皂苷 R_{g1} 浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线: $y = 10.993 + 1.543x$, $R^2 = 0.9998$ 。精密称取 NTS, 用甲醇配制为 0.2 mg/mL, 用相

同方法测定吸光度, 根据人参皂苷 R_{g1} 标准曲线计算测定浓度后, 按公式(1)计算 NTS 纯度(P)后, 再按公式(2)计算三七根中 NTS 含量(ω)。

$$P = (C_1/C_2) \times 100\% \quad (1)$$

式中, C_1 代表三七根提取成分测定质量浓度 (mg/mL); C_2 代表三七根提取成分配制质量浓度 (mg/mL)。

$$\omega = m_1 \times P / m_2 \quad (2)$$

式中, m_1 代表三七根各提取成分质量 (mg); P 代表三七根各提取成分纯度 (%); m_2 代表三七根粉末质量 (g)。

NTF 的制备: 参照 Nie 等^[10]的方法, 取三七干燥根打粉, 采用 90% 乙醇回流提取, 分离纯化后即得。采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法在 500 nm 处测定不同浓度芦丁的吸光度, 以芦丁浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线: $y = 8.1834x - 0.0165$, $R^2 = 0.9998$ 。精密称取 NTF, 用乙醇配制为 0.2 mg/mL, 用相同方法测定吸光度, 根据芦丁标准曲线计算测定浓度后, 按公式(1)计算 NTF 纯度, 再按公式(2)计算三七根中 NTF 含量。

NTP 的制备: 取三七干燥根打粉, 采用 95% 乙醇回流提取, 取药渣, 用热水回流提取 3 次, 滤过, 合并提取液离心, 取离心液放入有机膜设备中, 用超滤膜过滤 ($M > 10\ 000$ Da) 后, 滤液再过纳滤有机膜 ($10\ 000$ Da $> M > 300$ Da), 取未过纳滤膜成分, 用 4 倍量的 95% 乙醇醇沉, 4 °C 过夜后离心, 取沉淀冻干即得。参照 Huang 等^[11]的方法, 采用苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定不同浓度葡萄糖的吸光度, 以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线: $y = 14.997x - 0.0038$, $R^2 = 0.9999$ 。精密称取 NTP, 用纯水配制为 0.2 mg/mL, 用相同方法测定吸光度, 根据葡萄糖标准曲线计算测定浓度后, 按公式(1)计算 NTP 纯度, 再按公式(2)计算三七根中 NTP 含量。

1.3.2 DPPH 自由基清除能力测定

参照 Yuan 等^[12]的方法稍加改动进行测定。将 V_C 、NTS、NTF、NTP 分别用甲醇配制成不同质量浓度 (6.25、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$) 的溶液。用甲醇配制 0.15 mol/L 的 DPPH 溶液。实验设空白组、对照组、阳性 V_C 组和 NTS、NTF、NTP 各浓度样品组, 实验在 96 孔板中进行, 空白组加入 200 μL 甲醇, 对照组加入 100 μL 甲醇, 阳性 V_C 组加入 100 μL V_C 溶液, 样品组分别加入 NTS、NTF、NTP 各浓度样品 100 μL , 每组设 3 个复孔, 除空白

组外,其余组各孔加入 100 μL DPPH 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,于 517 nm 下测定吸光度(A)。按公式(3)计算自由基清除率(S)。

$$S = [1 - (A_3 - A_1) / (A_2 - A_1)] \times 100\% \quad (3)$$

式中,其中 A_1 、 A_2 、 A_3 分别代表空白组、对照组和实验组的吸光度值。

1.3.3 ABTS 自由基清除能力测定

参照 Tang^[13]的方法稍加改动进行测定。配制 2.45 mmol/L 的 ABTS 与 14 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液,后将 ABTS 与 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液按 5:1 (V/V) 的比例混合均匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,用 50% 乙醇稀释 4 倍,配制成 ABTS 工作液备用。将 V_c 、NTS、NTF、NTP 分别用 50% 乙醇配制成不同质量浓度(6.25、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的溶液。实验设空白组、对照组、阳性 V_c 组和 NTS、NTF、NTP 各浓度样品组,实验在 96 孔板中进行,空白组加入 200 μL 50% 乙醇,对照组加入 100 μL 50% 乙醇,阳性 V_c 组加入 100 μL V_c 溶液,样品组分别加入 NTS、NTF、NTP 各浓度样品 100 μL ,每组设 3 个复孔,除空白组外,其余组各孔加入 100 μL ABTS 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,于 734 nm 下测定吸光值(A),按公式(3)计算自由基清除率。

1.3.4 细胞培养

HFF 细胞使用含有 15% FBS 的 DMEM 高糖培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养,细胞浓度达到 80% ~ 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化传代,传 2 代后进行实验。

KC 细胞使用 CNT-Prime 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养,细胞浓度达到 80% ~ 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化传代,取第 3 代进行实验。

1.3.5 MTT 法检测细胞存活率

选择对数生长期的 HFF 细胞,以 1×10^5 个/mL 密度接种至 96 孔板中,每孔 100 μL ,置于细胞培养箱中培养 24 h。将 NTS、NTF、NTP 分别用 DMEM 培养基配制成不同质量浓度(5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的溶液。实验设置空白组和 NTS、NTF、NTP 质量浓度梯度组,每个浓度设置 6 个复孔,弃除培养基,空白组加入 DMEM 培养基 100 μL ,其余各组加入含各质量浓度受试样品的 DMEM 培养基 100 μL ,置于培养箱中培养 24 h,各孔加入 10 μL MTT 溶液(2.5 g/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后弃除上清液,每孔加入 200 μL DMSO,避光放置 30 min。在

490 nm 波长处测定各孔吸光度(A),按公式(4)计算细胞存活率(R),确定后续实验给药浓度。

$$R = (A_2 / A_1) \times 100\% \quad (4)$$

式中,其中 A_1 、 A_2 分别代表空白组、实验组的吸光度值。

1.3.6 氧化损伤 HFF 细胞内 MDA、SOD 及 GSH 的测定

参照 Zha 等^[8]的方法稍加改动进行测定。将 HFF 细胞以 1×10^5 个/mL 密度分别接种至 6 孔板中,每孔 2 mL,置于细胞培养箱中培养 24 h。实验设置空白组、模型组、NTS、NTF、NTP 组,每组设 3 个复孔,弃除培养基,空白组加入 2 mL DMEM 培养基,其余各组每孔加入含 900 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 的培养液 2 mL,培养 6 h 建立氧化损伤模型。弃除上清液,空白组和模型组每孔加入 2 mL DMEM 培养基,其余各组每孔分别加入含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NTS、NTF、NTP 的 DMEM 培养基 2 mL,放入培养箱培养 24 h。弃除上清液,用 PBS 清洗细胞 3 次,各组细胞每孔加入 400 μL 浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 裂解液,充分裂解后,10 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,用 MDA、SOD 和 GSH 试剂盒分别测定细胞中 SOD 活力、MDA、GSH 含量。

1.3.7 氧化损伤 HFF 细胞内 ROS 生成的测定

参照 Liang^[14]的方法稍加改动进行测定。分组、给药及造模方法同“1.3.6”项,HFF 细胞给药 24 h 后,弃除上清液,用 PBS 清洗细胞 3 次,使用 ROS 检测试剂盒对各组细胞进行荧光染色,采用荧光显微镜进行拍照(200 倍),Image J 软件分析各组细胞中 ROS 荧光强度。

1.3.8 Western blot 法检测氧化损伤 HFF 细胞内衰老蛋白表达水平

参照 Ge 等^[15]的方法稍加改动进行测定。分组、给药及造模方法同“1.3.6”项,HFF 细胞给药 24 h 后,弃除上清液,用 PBS 清洗细胞 3 次,裂解细胞、测定蛋白浓度后,加入 loading buffer (5 $\times$) 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中煮沸 5 min 进行变性,样本采用 10% SDS-PAGE 胶进行电泳,电泳结束,进行转膜;使用 5% 脱脂奶粉封闭 120 min;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;滴加 MMP-1、MMP-3、COL-I、COL-III 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;次日,使用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min;滴加二抗,室温孵育 60 min;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,用 ECL 化学发光法进行显影,ImageJ 软件分析灰度值。

1.3.9 UVB 照射后 3D 皮肤模型的病理染色及免疫荧光染色观察

参照 Song 等^[16]的方法稍加改动进行测定。将 6 × DMEM 高糖培养基与 CSBS (6 mg/mL) 按 1:5 (V/V) 的比例混合均匀,配制成浓度为 5 mg/mL 的胶原工作液,采用 1 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液调节 pH 值至中性(胶原溶液颜色为粉红至红色),对 HFF 细胞进行计数,调整 HFF 细胞浓度为 5 × 10⁵ 个/mL,将 HFF 细胞悬液与 5 mg/mL 的胶原工作液按 1:4 (V/V) 的比例混合均匀,使胶原浓度为 4 mg/mL, HFF 细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/mL,以上操作均在冰上进行。在每个预冷后的 12 孔 Transwell 小室中加入 600 μL 含 HFF 细胞的胶原,获得含 HFF 细胞的胶原支架,将制备好的胶原支架转移至 37 °C 培养箱中凝固 2 h,随后加入含 15% FBS 的 DMEM 高糖培养基,使胶原支架被完全浸没,置于 37 °C 培养箱中进行培养 1 d。吸干 Transwell 小室内、外残留培养基,使用无钙 DMEM 培养基浸泡小室 2 h,降低胶原支架内钙离子的浓度。使用 CNT-Prime 培养基调整 KC 细胞浓度为 7 × 10⁵ 个/mL,弃除 Transwell 小室内、外的培养基,在每个胶原支架上各加入 500 μL 调整浓度后的 KC 细胞,于 Transwell 小室外加入 2 mL CNT-Prime 生长培养基,置于 CO₂ 培养箱中培养 2 d,吸干 Transwell 小室内、外残留培养基,在 Transwell 小室内、外共加入 3 mL CNT-Prime-3D 培养基,使培养基液没过小室内胶原支架,继续培养 1 d,使 KC 细胞分化成致密细胞层;吸除 Transwell 小室内、外残留培养基,使用无菌镊将 Transwell 小室转移至 12 孔深孔板中,加入适量 CNT-Prime-3D 培养基,使培养基液面低于胶原支架表面,将 3D 皮肤模型表面暴露于空气中,连续气-液培养 6 d。实验设置空白组、模型组、NTS、NTF、NTP 组,每组设 3 个复孔,除空白组外,各样品组及模型组分别在 10 mW/cm² 照射强度的 UVB 光线下暴露 50 s 造模后,空白组及模型组在 3D 皮肤模型表面滴加 20 μL PBS 并涂抹均匀,NTS、NTF、NTP 组分别滴加 20 μL 1.0 mg/mL 的各样品 PBS 溶液并涂抹均匀,放入培养箱中培养,连续造模、给药 3 d,每天 1 次。将 3D 皮肤从 Transwell 中取出,4% 多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,进行 4 μm 切片,烤片,脱蜡,复水后每个样本取 3 张切片进行 HE 染色观察拍照。每个样本再取 6 张切片进行抗原修复,洗涤,阻断过氧化氢酶,洗涤,封闭,每个样本各取 3 张切片分别滴加 20 μL ZO-1 一

抗、CLDN-1 一抗 4 °C 孵育过夜,洗涤,滴加 20 μL 荧光二抗室温孵育 2 h,洗涤,滴加 20 μL DAPI 覆盖 5 min,洗涤,采用含荧光猝灭剂的封片剂进行封片,采用荧光显微镜进行拍照(200 倍),ImageJ 软件分析各组组织切片中 ZO-1、CLDN-1 荧光强度。

1.4 统计学处理

采用 Graphpad Prism 10.2 版统计学软件进行统计分析,结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经正态性检验和方差齐性检验满足正态分布和方差齐性后,进行单因素方差分析,组间差异比较用 LSD 检验,检验水平为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三七根中 NTS、NTF、NTP 含量分析

三七根中提取得到的 NTS、NTF、NTP 含量分别为 96.4、4.5、44.7 mg/g,纯度分别为:80.4%、85.7%、74.1% (见表 1)。

表 1 三七根中 NTS、NTP、NTF 的含量及纯度

Table 1 NTS,NTP,and NTF content and purity in <i>P. notoginseng</i> roots		
成分 Ingredient	含量 Content(mg/g)	纯度 Purity(%)
NTS	96.4	80.4
NTF	4.5	85.7
NTP	44.7	74.1

2.2 NTS、NTF、NTP 自由清除活性比较

阳性对照 V_C 及 NTF、NTP 均表现出良好的 DP-PH 与 ABTS 自由基清除能力,且其清除率随质量浓度增加而升高,呈现明确的浓度依赖性。NTF 的清除能力在所有测试浓度下均优于 NTP。相比之下,NTS 在各浓度下对 2 种自由基的清除率均低于 10%,活性微弱。综上,各样品自由基清除能力:NTF > NTP > NTS(见图 1)。

2.3 NTS、NTF、NTP 对 HFF 细胞存活率的影响

与空白组比较,当质量浓度为 20 μg/mL 时,NTS、NTF 和 NTP 处理组的 HFF 细胞存活率分别为 101.1%、99.3% 和 98.7%;当质量浓度提高至 40 μg/mL 时,细胞存活率分别为 99.3%、92.0% 和 101.5%(见图 2)。为保证细胞在正常生理状态下进行后续实验,本研究将细胞存活率处于 95% ~ 100% 范围内的浓度视为安全给药窗口。基于此原则,尽管浓度 ≤ 40 μg/mL 时多数提取成分未表现出明显细胞毒性,但为在相同条件下比较各提取成分

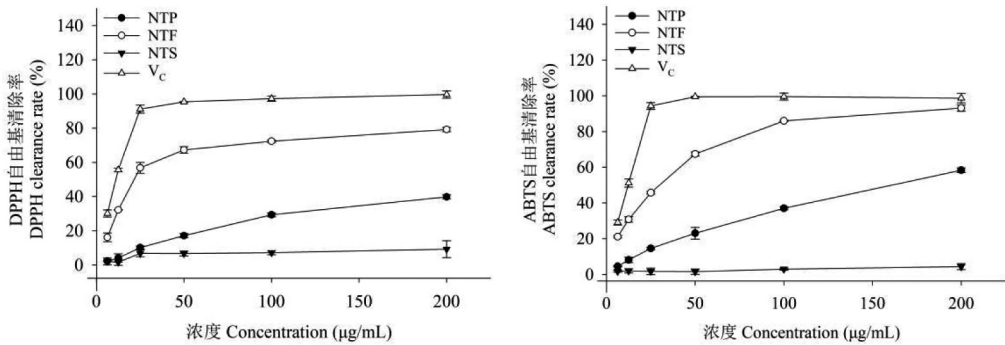


图 1 NTS、NTF、NTP 对 DPPH、ABTS 自由基的清除率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Scavenging effects of NTS, NTF, and NTP on DPPH and ABTS free radicals($\bar{x} \pm s, n = 3$)

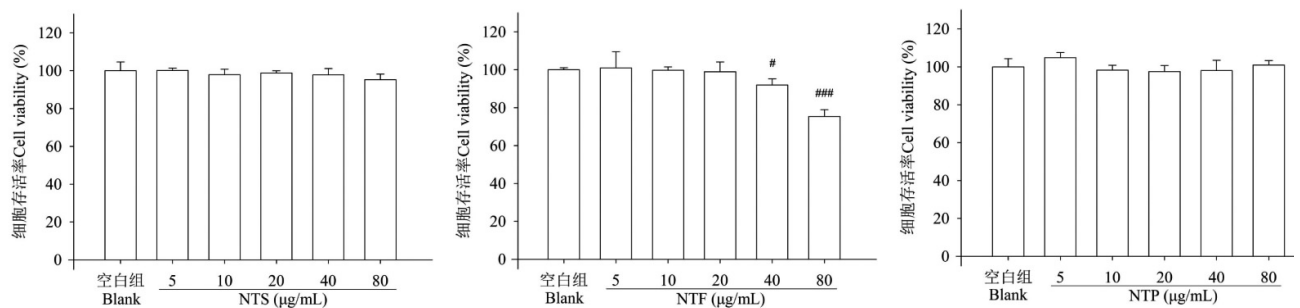


图 2 NTS、NTF、NTP 对 HFF 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of NTS, NTF, and NTP on the viability of HFF cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注:与空白组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

的抗氧化功效,最终选定 20 $\mu\text{g/mL}$ 作为统一给药浓度。

2.4 NTS、NTF、NTP 对氧化损伤 HFF 细胞内 MDA、SOD 及 GSH 的影响

H_2O_2 处理后 HFF 细胞内 MDA 水平显著上升, SOD 与 GSH 水平显著下降($P < 0.001$),表明氧化

损伤模型建立成功。NTS、NTF、NTP 均能有效降低 MDA 水平、提升 SOD 与 GSH 水平($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$)。然而,在逆转氧化应激指标方面,三者对 MDA、SOD、GSH 的改善程度存在差异。总体而言,改善氧化应激的能力:NTF > NTS > NTP (见图 3)。

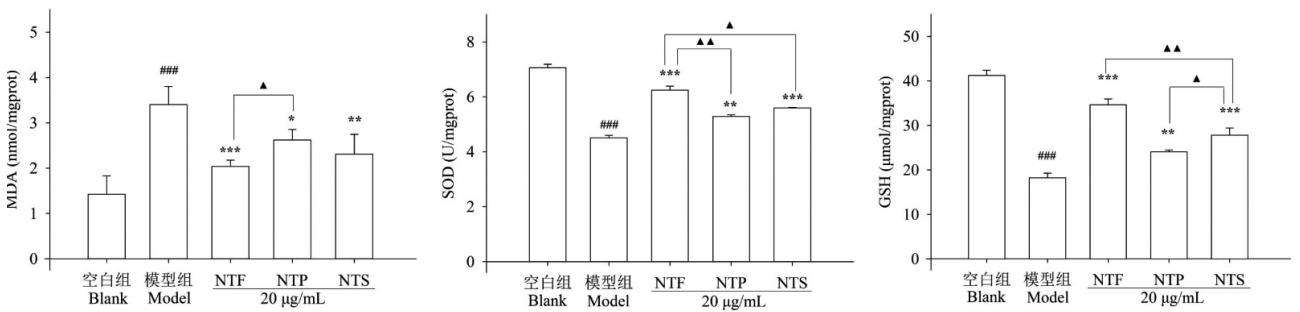


图 3 NTS、NTF、NTP 对氧化损伤 HFF 细胞内 MDA、SOD 及 GSH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of NTS, NTF, and NTP on MDA, SOD, and GSH levels in oxidatively damaged HFF cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与空白组比较, ### $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; NTF、NTP 和 NTS 组间比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, 下同。Note: Compared with blank group, ### $P < 0.001$; Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Comparisons among NTF, NTP and NTS groups, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, the same below.

2.5 NTS、NTF、NTP 对氧化损伤 HFF 细胞内 ROS 生成的影响

经 H_2O_2 处理后,HFF 细胞内 ROS 水平显著升高($P < 0.001$),表明氧化损伤模型成功建立。NTS、

NTF、NTP 均能有效抑制细胞内 ROS 的过度产生($P < 0.01, P < 0.001$),NTS 与 NTF 抑制 ROS 的能力相当,NTP 次之(见图 4)。

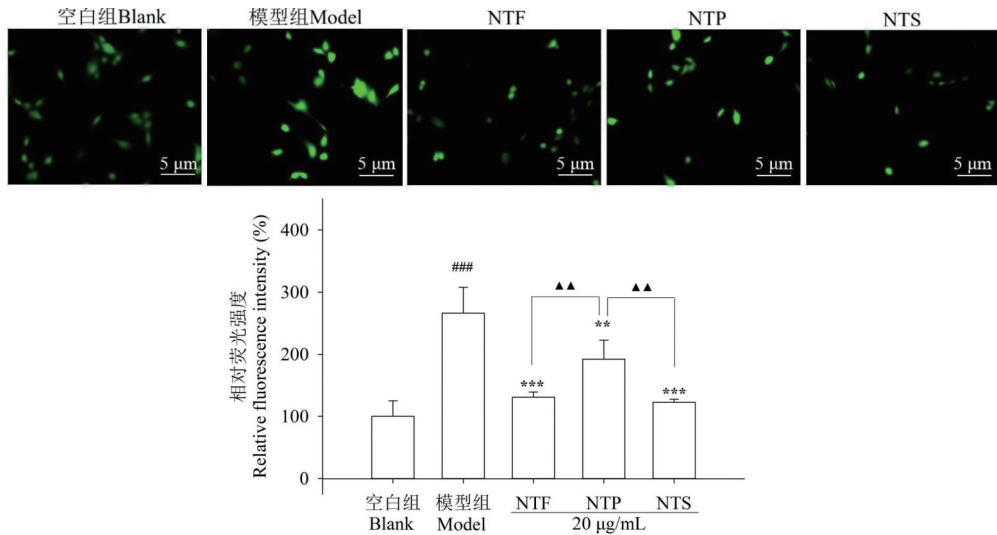


图 4 NTS、NTF、NTP 分对氧化损伤 HFF 细胞内 ROS 的影响($200 \times$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of NTS,NTF and NTP on intracellular ROS levels in oxidatively damaged HFF cells($200 \times$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 NTS、NTF、NTP 对氧化损伤 HFF 细胞内相关蛋白表达的影响

氧化损伤后 HFF 细胞中 COL- I 与 COL-Ⅲ的表达显著下调,而 MMP-1 与 MMP-3 的表达则显著上调($P < 0.001$)。在逆转这一损伤方面,NTS、NTF、NTP 表现出显著作用,对于 COL 表达的调节:NTF 与 NTS 均能显著促进 COL- I 的表达($P < 0.01, P < 0.001$),其效力:NTS > NTF;NTS、NTF、NTP 均能促进 COL-Ⅲ的表达($P < 0.05, P < 0.001$),且作用相当。对于 MMP 表达的调节:NTS、NTF、NTP 均能显著抑制 MMP-1 与 MMP-3 的表达($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),抑制 MMP-1 的效力 NTS 最优,NTF 与 NTP 相当,抑制 MMP-3 的效力 NTF 与 NTS 相当,NTP 次之。因此,综合比较延缓氧化应激引起皮肤衰老的相关蛋白表达能力:NTS > NTF > NTP (见图 5)。

2.7 NTS、NTF、NTP 对 UVB 照射后 3D 皮肤模型的影响

HE 染色结果显示,UVB 照射引起 3D 皮肤模型表皮层变薄、细胞排列紊乱且多数角质细胞出现空泡化。经 NTS、NTF、NTP 干预后,上述损伤均得到改善,表现为表皮层厚度增加、空泡化细胞减少,其中 NTF 与 NTS 的作用相当,NTP 次之。免疫荧光染

色结果显示,UVB 照射后模型组表皮层中紧密连接蛋白 CLDN-1 与 ZO-1 的表达显著降低($P < 0.001$),NTS、NTF、NTP 均能有效上调这 2 种蛋白的表达($P < 0.01, P < 0.001$),其上调效力:NTS > NTF > NTP。以上结果表明 NTS 的屏障修复能力最优,其次为 NTF,NTP 最弱(见图 6)。

3 讨论与结论

自由基是机体代谢过程中产生的高活性氧化物质,其在体内的过量积累所引起的氧化失衡,是加速机体衰老的关键因素之一^[17]。因此,清除过量自由基有助于减轻或避免氧化应激损伤,从而延缓皮肤衰老。在体外抗氧化活性评价中,DPPH 与 ABTS 自由基清除实验是常用的标准方法,其清除能力可直接反映样品的抗氧化效能^[13]。本研究通过上述 2 种实验体系,评估了三七根不同提取成分的抗自由基活性。结果表明,NTF 与 NTP 均表现出较好的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力,其中 NTF 的清除效果优于 NTP,而 NTS 对 2 种自由基的清除作用均非常微弱。

HFF 细胞是皮肤真皮层中的核心细胞类型,不仅在维持皮肤结构稳态中起关键作用,更是皮肤衰老与损伤后主要的修复细胞之一^[18],被广泛应用于皮肤抗衰老的相关研究中。 H_2O_2 可诱导细胞内产

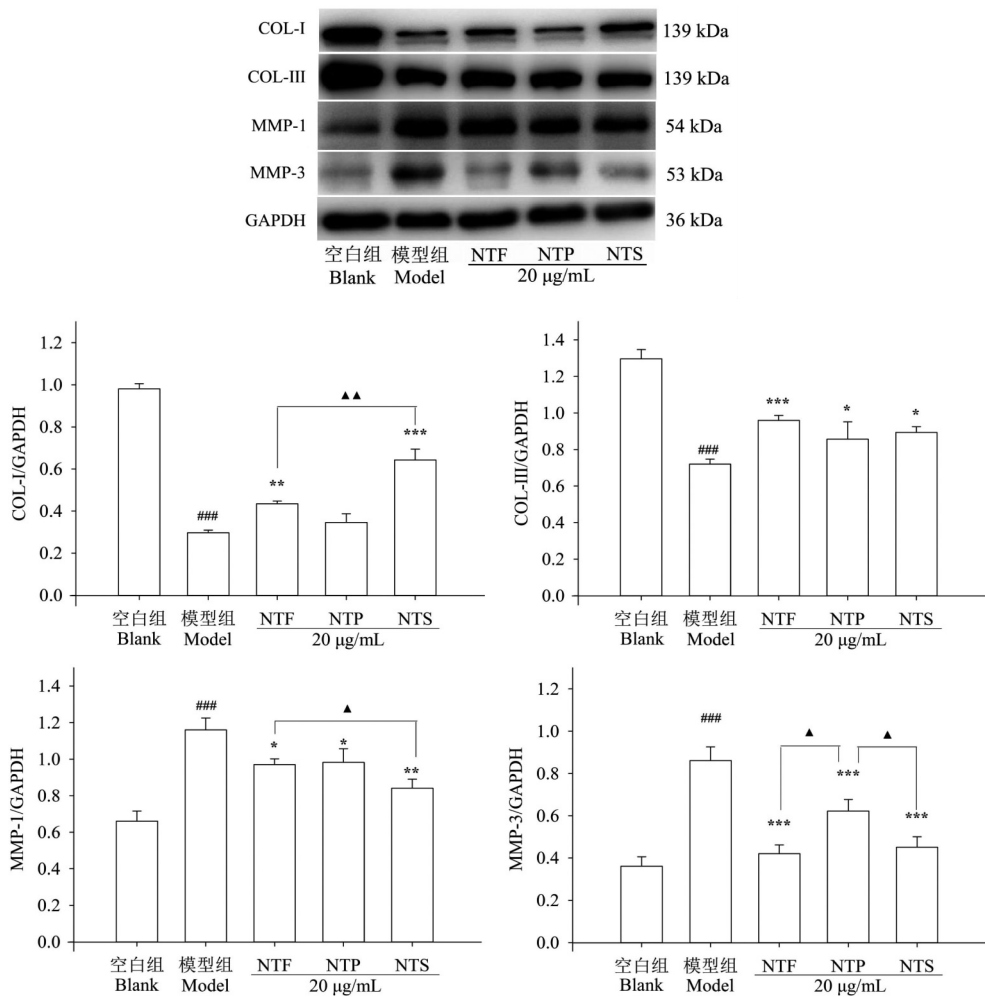


图5 NTS、NTF、NTP对氧化损伤HFF细胞内相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of NTS, NTF, and NTP on the expression of related proteins in oxidatively damaged HFF cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

生大量的自由基,造成细胞的氧化损伤加速细胞衰老^[19-20],常被用于建立体外细胞氧化损伤模型。MDA是脂质过氧化的终产物,其细胞内水平可直接反映细胞氧化损伤的程度,SOD和GSH则是细胞内重要的抗氧化酶及物质,能够有效清除自由基,对维持机体氧化与抗氧化的动态平衡至关重要^[21]。真皮层富含COL,其随年龄增长而逐渐流失是皮肤老化的主要特征之一。MMP的主要功能为降解COL,与皮肤老化过程密切相关^[15]。皮肤组织中ROS水平的升高,可通过双重途径加速皮肤衰老:一方面诱导细胞凋亡,另一方面通过抑制COL合成与促进MMP表达来加剧细胞外基质的降解^[22],因此,研究受试物对ROS的抑制对评价其抗皮肤衰老功效具有重要意义。本研究结果显示,三七根各提取成分均能不同程度提高细胞内SOD和GSH活性,促进COL-I与COL-III蛋白的表达;同时降低MDA含

量,抑制ROS过度生成及MMP-1与MMP-3的表达,表明各组均具有一定程度的抗氧化应激能力。综合比较,在抗氧化应激方面NTF、NTS作用相当,而NTP相对较弱。

值得关注的是,虽然NTS直接清除自由基的能力较弱,但在细胞层面上仍表现出明显的氧化应激改善作用。具体而言,NTS能够提升SOD与GSH活性,促进COL-I与COL-III蛋白的表达,并同时降低MDA水平、抑制ROS过度产生以及MMP-1、MMP-3的表达。以上结果提示,NTS的抗氧化机制并非依赖直接清除自由基,而是通过双途径发挥作用:一方面抑制氧化损伤相关有害产物的生成,另一方面增强细胞内源性还原物质的活性,从而综合减轻氧化应激状态,这与文献^[23]报道内容一致。

UVB照射会引发皮肤氧化应激,导致细胞损伤或死亡^[24],且显著下调表皮层中关键紧密连接蛋白

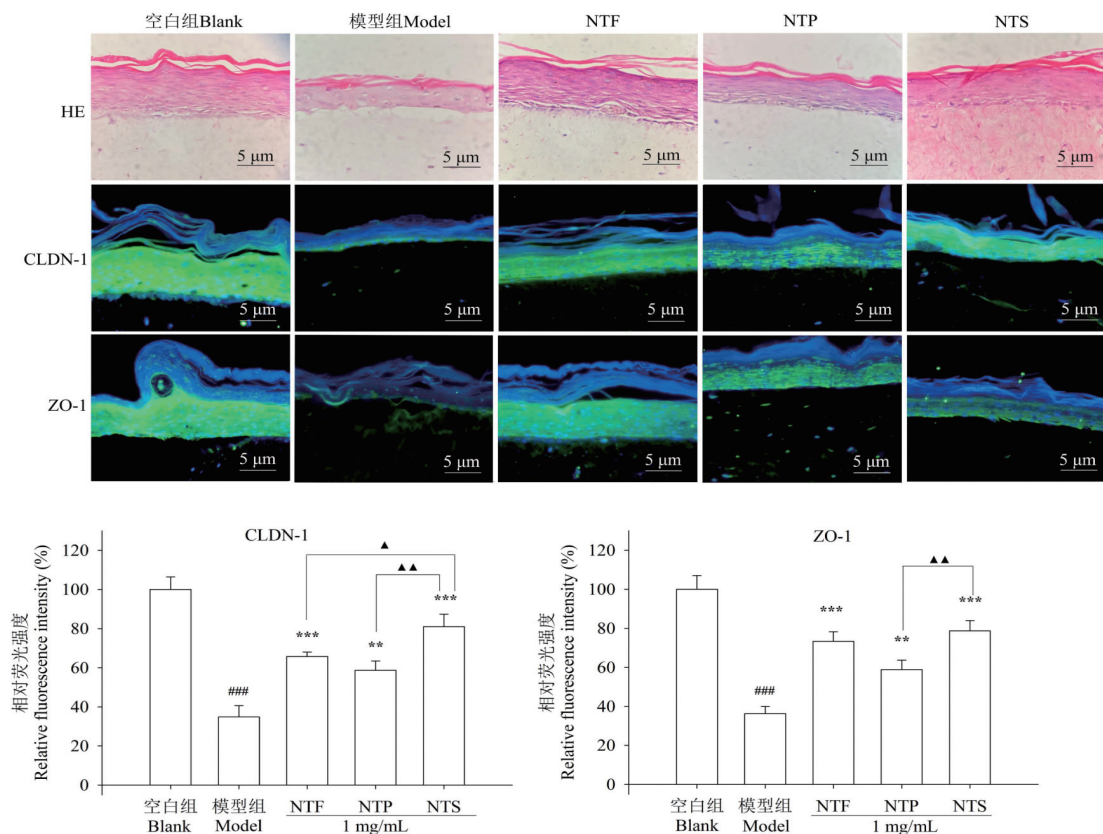


图6 NTS、NTF、NTP对UVB照射后3D皮肤模型的影响($200\times, \bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of NTS, NTF, and NTP on 3D skin models following UVB irradiation($200\times, \bar{x}\pm s, n=3$)

(如 CLDN-1 和 ZO-1)的表达,从而导致皮肤物理屏障受损^[25]。而3D皮肤模型是一种能高度模拟人体皮肤三维组织结构和生物学功能的体外模型,已成为化妆品体外安全性与功效评价的核心工具。基于此,本研究以UVB照射诱导的3D皮肤损伤模型为工具,深入探究三七根不同提取成分对损伤皮肤结构及相关屏障蛋白影响。结果显示,三七根各提取成分均能不同程度改善UVB照射后的3D皮肤模型的表皮厚度,减少空泡化细胞,修复表皮结构损伤,促进屏障修复相关蛋白 CLDN-1 与 ZO-1 的表达,表现出不同程度的屏障修复能力。综合比较,三七根各提取成分皮肤屏障修复能力:NTS > NTF > NTP。

因此,本研究通过实验从自由基清除、氧化应激反应及屏障修复3个方面综合比较了NTS、NTF、NTP在皮肤保护与修复方面的活性差异。结果显示:NTF的自由基清除活性最强;NTF与NTS的抗氧化应激能力相当;NTS在屏障修复方面表现最优;而NTP在各项功能中均较弱。上述结果表明,3种成分在功能上具有潜在互补性,为其复配应用提供了依据。本研究填补了三七根中不同有效成分抗氧

化活性系统比较研究的空白。然而,本研究主要聚焦于NTS、NTF、NTP之间的抗氧化活性比较,未能与市售常见抗氧化物质进行对比,也未对NTS、NTF、NTP相互复配的功效进行研究。在后续工作中,我们将对NTS、NTF、NTP的复配功效进行比较研究。

总体而言,NTS、NTF、NTP均具有良好的抗氧化活性及屏障修复活性,有望作为原料开发成为皮肤保护和修复的化妆品、药品,或应用于生物医药领域。值得注意的是,各成分在三七根中的含量差异显著:NTS含量最高(96.4 mg/g),NTP次之(44.7 mg/g),NTF最低(4.5 mg/g)。鉴于3种成分在功能上具有潜在互补性,在针对性的化妆品开发中,为平衡功效与经济性,可结合不同功效需求与成分含量特点,合理选择或复配相应成分。例如,NTF的自由基清除活性最强,可作为预防皮肤氧化损伤化妆品及预防机体氧化损伤保健品的主要原料,并可与NTS复配使用,以实现更精准、高效、经济的皮肤护理策略。这也是我们后续研究的方向。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在

ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00188>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Li CT,Zhao H. Efficacy evaluation of cosmetics(IV) Scientific support for delaying skin aging cosmetic efficacy claims [J]. China Surfactant Deterg Cosmet (日用化学工业), 2018,48:188-195.
- 2 Gladyshev Vadim N. The free radical theory of aging is dead. long live the damage theory[J]. Antioxid Redox Sign,2014, 20:727-731.
- 3 Wang J,Wang JQ,Cheng H,et al. Progress of skin aging-related biomarkers and their mechanisms[J]. J Tissue Eng Reconstr Surg(组织工程与重建外科), 2023,19:586-590.
- 4 Li S, Yang XH, Li HY, et al. Extraction and purification of dencichine from the industrial *Panax notoginseng* dregs and its hemostatic pharmacological activity[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019,31:663-668.
- 5 Shi LP,Zhang GZ,Liu CS,et al. Research summary of chemical constituents and pharmacological effects of *Panax notoginseng* and predictive analysis on its Q-markers[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2023,48:2059-2067.
- 6 Gao SY,Huo T,Li XT,et al. Study on the anti-aging efficacy of Sanqi extract[J]. China Surfactant Deterg Cosmet (日用化学工业), 2020,50:783-787.
- 7 Tan L. Research on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from notoginseng and ginseng in different parts [D]. Changchun: Changchun Normal University(长春师范大学), 2018.
- 8 Zha YF,Zhan Y, Li T, et al. Study on antioxidant effect of extracts from different parts of Sanqi (Radix Notoginseng) *in vitro* [J]. Acta Chin Med(中医学报), 2022,37:142-148.
- 9 Huang JW, Li Q, Yang HJ, et al. Screening of active fractions of hemostatic effect and activating blood circulation effect of *Panax notoginseng*(Burk.) F. H. Chen. [J]. J Yunnan Univ Chin Med(云南中医学院学报), 2018,41:12-18.
- 10 Nie L,Luo WF,Wang XW. Studies on performance of absorption and separation of macro-reticular resin for *Panax pseudoginseng* flavanone[J]. J Yunnan Univ Chin Med(云南中医学院学报), 2007,30:10-12.
- 11 Huang QL, LEI T, He ZX, et al. Determination of polysaccharides in Xiaoke Pill by phenol-sulfuric acid method[J]. Res Integr Tradit Chin West Med(中西医结合研究), 2023,15:308-310.
- 12 Yuan MY,Kang SH,Cui LJ,et al. Optimization of ultrasonic extraction process for polysaccharides from Radix Hedysari and their antioxidant, whitening, moisture absorption and moisturizing activities[J]. Fine Chem (精细化工), 2025, 42:577-586.
- 13 Tang L,Lu AJ,Hu C,et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprint and *in vitro* antioxidant activity of Notoginseng Radix et Rhizoma and its processed products [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2026,38:1-12.
- 14 Liang Z. Experimental study of the Mg^{2+} /NMN-loaded, antibacterial, and antioxidant hydrogel in promoting diabetic wound healing[D]. Xian: Air Force Medical University(中国人民解放军空军军医大学), 2024.
- 15 Ge G. The effects of blue light on skin aging and Its molecular mechanism[D]. Shenyang: China Medical University(中国医科大学), 2021.
- 16 Song XJ,Zhou CX,Wu Y. Reconstruction of 3D skin model and its application in evaluation the efficacy of cosmetic raw materials to be used as active ingredients[J]. China Surf Deterg Cosmet(日用化学工业), 2017,47:633-636.
- 17 Sohal Rajindar S. RS. Oxidative stress hypothesis of aging [J]. Free Radical Biol Med,2002,33:573-574.
- 18 Wang XH,Wang Y,Jiang T,et al. Primary culture and biological characteristics of human skin fibroblasts[J]. J China Med Univ(中国医科大学学报), 2010,39:1041-1044.
- 19 Wang CY,Jiang M,Hou GY et al. Saikokeishito protecting humandermal fibroblast cell from oxidative damage induced by H_2O_2 [J]. Chin J Lab Diagn(中国实验诊断学), 2018, 22:1074-1077.
- 20 Burdon H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation [J]. Free Radical Biol Med, 1995,18:775-794.
- 21 Chen LL. Study on the pharmacodynamic material basis and mechanism of Qinglongyi-Buguzhi in treating vitiligo[D] Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine (山东中医药大学), 2025.
- 22 Ding WY,Tian Y, Li JX, et al. Mechanisms of blue light effects on skin and brief analyses of blue light and UV protections[J]. Flavour Frag Cosmet(香料香精化妆品), 2022 (2):104-111.
- 23 Wang HL,Sun Y, Liu XX, et al. Progress on mechanism of action and neuroprotective effects of notoginsenoside R_1 [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2024,40:2020-2025.
- 24 Li HD,Wu XY,Zhang Y,et al. Repairing effect of gastrudin on UVB-damaged skin[J]. China Surfactant Deterg Cosmet (日用化学工业), 2025,55:779-784.
- 25 Tu Y,Wu W, Guo Y, et al. Upregulation of hsa-miR-31-3p induced by ultraviolet affects keratinocytes permeability barrier by targeting CLDN1 [J]. Biochem Biophys Commun, 2020,532:626-632.