

五味子对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用

金银萍,侯 微,高 薇,王玉帅,焉 石,王英平*

中国农业科学院特产研究所,长春 130112

摘要:检测五味子不同组分对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用,筛选得到其活性组分。利用大孔吸附树脂法,对五味子果实提取物进行分离纯化,得到不同的组分段。以 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力 (ABTS 法) 为考察指标,对五味子各组分的抗氧化活性进行评价;采用 MTT 法筛选五味子各组分对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用,获得活性组分。结果显示,50% 乙醇洗脱物抗氧化活性最强,能提高 H_2O_2 处理后的 HaCaT 细胞存活率,减少 MDA 的生成,上调 SOD 酶和 GSH 酶活性。研究结果证实,50% 乙醇洗脱物是五味子保护皮肤细胞免受 H_2O_2 诱导氧化应激的活性组分。

关键词:五味子;过氧化氢;氧化应激损伤;HaCaT 细胞

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.11.023

Protective Effect of *Schisandra chinensis* Fructus on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress Injury in HaCaT Cells

JIN Yin-ping, HOU Wei, GAO Wei, WANG Yu-shuai, YAN Shi, WANG Ying-ping*

Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

Abstract: In this study, the protective effects of different fractions of *Schisandra chinensis* Fructus on H_2O_2 -induced oxidative stress injury in HaCaT cells were investigated and the active components were screened. The extracts of *S. chinensis* fruits were separated with macroporous resin. With DPPH free radical scavenging activity and total antioxidant capacity as indexes, the antioxidant activities of *S. chinensis* were assessed. MTT method was used to screen the protective effects of different fractions of *S. chinensis* on H_2O_2 -induced oxidative stress injury in HaCaT cells. The active components with better protective effect were obtained. The results showed that 50% EtOH fraction demonstrated the strongest antioxidant activity and can inhibit the H_2O_2 -induced injury in HaCaT cells. Furthermore, 50% EtOH fraction reduced MDA activity and elevated SOD, GSH activities. The results suggested that 50% EtOH fraction was the active components of *S. chinensis* protecting skin cells against H_2O_2 -induced oxidative stress injury.

Key words: *Schisandra chinensis*; hydrogen peroxide; oxidative stress injury; HaCaT cell

皮肤是维持人体生命和健康的重要部分,直接与外界接触,是机体的第一道屏障,极易受到环境因素的影响而导致损伤。人类皮肤的衰老是机体衰老最易观察到的外部显示,是整体衰老的局部表现。促使皮肤衰老的因素很多,除了先天与遗传因素外,还受外界环境中诸多因素的直接影响如污染、阳光、紫外线的照射、应激反应等。随着社会人口老龄化和生活环境的不断恶化,以及人们生活水平的提升,预防和延缓皮肤衰老越来越受到人们的重视。在“回归自然、崇尚天然”的潮流趋势下,以植物来源

的天然功能性化妆品,备受消费者的青睐。

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 是木兰科 (Magnoliaceae) 五味子属 *Schisandra* 多年生落叶藤本植物^[1]。近年来有关五味子药理活性的研究表明,五味子提取物及其所含的木脂素、多糖类等成分,均具有抗氧化活性^[2-10]。但是,五味子对皮肤衰老方面的研究报道相对较少^[11-13]。本试验通过 H_2O_2 造成 HaCaT 细胞(人皮肤角质形成细胞)自由基氧化损伤衰老模型,观察五味子各组分抗皮肤细胞衰老效果,以期筛选得到五味子抗衰老护肤活性功能因子,为北五味子抗皮肤衰老产品的开发奠定基础。

1 仪器与材料

收稿日期:2015-08-04

接受日期:2015-09-21

基金项目:吉林省重点科技攻关项目(20140204062YY,20140101125JC)

* 通讯作者 Tel:86-431-81919806; E-mail:yingpingw1967@126.com

1.1 材料与试剂

HaCaT 细胞购自上海川翔生物科技发展有限公司;五味子醇甲(批号 110857)、五味子酯甲(批号 111529)、五味子甲素(批号 110764)、五味子乙素(批号 110765)购自中国药品生物制品检定研究所,五味子醇乙(批号 YY90208)购自上海源叶生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基购自 Gibco;胎牛血清购自 Clack;胰蛋白酶购自 HyClone;噻唑蓝(MTT)、DPPH 购自 Sigma;微量丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、微量还原型谷胱甘肽(GSH)测试盒购自南京建成生物工程研究所;总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)购自碧云天生物技术研究所;30% H₂O₂ 购自天津市百世化工有限公司。

五味子果实采自吉林市左家镇中国农业科学院特产研究所药用植物资源圃,经中国农业科学院特产研究所艾军研究员鉴定为木兰科(Magnoliaceae)五味子属 *Schisandra* 五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 四年生果实。

1.2 仪器与设备

ST-360 酶标仪(上海科华实验系统有限公司);IBE1000 倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);KDC-40 低速离心机(安徽中科中佳);HF151UV 二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器有限公司);FDU-2100 冷冻干燥机(日本 EYELA);10AvP 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU)。

2 实验方法

2.1 HPLC 分析五味子各组分木脂素含量

2.1.1 样品制备

五味子果实提取物(SC),上大孔吸附树脂 AB-8,静置过夜,依次用 H₂O、10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇洗脱,每个梯度冲洗 5 个保留体积,分别收集各梯度洗脱液,过滤,减压浓缩,浓缩液经冷冻至干,备用。样品组分依次命名为 SC-0、SC-10、SC-30、SC-50、SC-70、SC-95。

2.1.2 色谱条件

Hypersil ODS2(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相:乙腈(A),水(B)。梯度洗脱模式:0 ~ 30 min,45% ~ 75% A;30 ~ 35 min,75% ~ 99% A;35 ~ 40 min,99% ~ 45%;40 ~ 45 min,45% A;流速 1 mL/min;检测波长 254 nm,进样量 10 μL,柱温为室温。

2.1.3 样品测定

准确称取五味子各组分样品适量,按“2.1.2”条件进行测定,以下列公式计算五味子醇甲等 5 种木脂素的含量(mg/g):木脂素的含量 = (C × D)/W 式中:C 为测试液中各木脂素浓度(g/L),D 为供试液的稀释因子,W 为样品的质量(g)。

2.2 DPPH 法测定五味子各组分抗氧化能力

精密称取 DPPH 5.0 mg,用乙醇溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶内,避光保存备用。将样品溶液配制成不同质量浓度梯度的待测液,混匀,备用。吸取待测样品溶液 0.1 mL 及 3.9 mL 的 DPPH 溶液,加入到 5.0 mL 具塞试管中,摇匀,室温避光放置 90 min,取 200 μL 加入 96 孔酶标板中,于 517 nm 处测定吸光值 Ab_{SI},每次重复 3 次。根据下列公式计算样品自由基清除率,清除率(%) = [(Ab_{S0} - Ab_{SI}) / Ab_{S0}] × 100, Ab_{S0} 为空白对照 0.1 mL 溶剂与 3.9 mL DPPH 混合溶液的吸光值。清除 DPPH 的能力用 IC₅₀ 值表示^[14]。

2.3 ABTS 法测定五味子各组分总抗氧化能力

精密吸取待测样品 10 μL 置 96 孔酶标板上,加入工作液。空白溶液吸取 50% 乙醇 10 μL,加入工作液,采用酶标仪在 734 nm 进行测定。记录吸光值,代入回归方程计算^[15]。

2.4 HaCaT 细胞培养

取 HaCaT 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期的 HaCaT 细胞,以 1 × 10⁵ 个/mL 细胞接种到 96 孔细胞培养板内,每孔 100 μL,培养 24 h 备用。

2.5 细胞增殖检测

实验分为空白组、模型组、药物处理组和药物预处理后加 H₂O₂ 组,每组至少 3 个复孔。空白组给予完全培养基;模型组加入终浓度为 1000 μmol/L H₂O₂ 的完全培养基,作用时间 1 h;药物处理组根据各组分的实际情况分为 4 个不同剂量组,预处理作用时间 24 h;药物预处理后加 H₂O₂ 组是加入受试药物作用 24 h 后,加入终浓度为 1000 μmol/L H₂O₂ 的完全培养基作用 1 h。利用 MTT 法判断各组细胞增殖情况。加入 5 mg/mL MTT 20 μL,孵育 4 h 后,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO 溶解沉淀物,振荡器混匀后,用酶标仪在 490 nm 波长下检测 OD 值。细胞存活率通过以下公式计算:细胞存活率(%) = (OD_{处理} / OD_{空白}) × 100%^[13]。

2.6 五味子组分对氧化损伤 HaCaT 细胞 MDA、SOD 和 GSH 水平的影响

取空白对照组、H₂O₂ 损伤组、不同剂量活性组分处理组的 HaCaT 细胞(处理方式同前),按照 MDA、SOD 和 GSH 检测试剂盒说明书进行操作。

2.7 统计学分析

实验数据均用 $\bar{X} \pm S$ 表示,各组之间均数的比较采用单因素方差分析。数据使用 SPSS 17.0 软件进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示差异具有极显著性。

表 1 五味子各组分中木脂素含量($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Lignan contents of *S. chinensis* fractions ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	五味子醇甲 Schisandrol A (mg/g)	五味子醇乙 Schisandrol B (mg/g)	五味子酯甲 Schisantherin A (mg/g)	五味子甲素 Schizandrin A (mg/g)	五味子乙素 Schizandrin B (mg/g)
SC-0	-	-	-	-	-
SC-10	-	-	-	-	-
SC-30	2.21	-	-	-	-
SC-50	176.38	18.54	-	-	-
SC-70	292.03	94.03	9.55	29.19	5.54
SC-95	35.31	46.42	6.26	20.18	5.76

3.2 五味子各组分清除 DPPH 自由基能力的测定

五味子各组分清除 DPPH 自由基能力的大小顺序依次为: V_c (0.17) > SC-50 (1.08) > SC-30 (1.06) > SC-95 (20.64) > SC-70 (27.18) > SC-10 (33.43) > SC-0。SC-0 在 38.00 mg/mL 时其清除率仅为 7%,受样品溶解度的限制,无法进一步加大样品浓度,且没有实际意义,所以没有求得具体 IC₅₀ 值。

五味子总提取物 SC 经大孔树脂分离纯化所得的各组分,与 SC 相比均具有极显著性差异($P < 0.01$);除 SC-30 和 SC-50 外,SC 和其余组分与阳性对照(V_c)比较,均具有极显著性差异($P < 0.01$),DPPH 自由基清除能力均低于 V_c。

SC-30 和 SC-50 的抗氧化能力明显强于其它组分,且清除 DPPH 自由基能力相当,与 SC 及其它组分相比较具有极显著性差异($P < 0.01$)。

3.3 ABTS 法测定五味子各组分总抗氧化能力

结果显示,五味子各组分总抗氧化能力的大小顺序为: SC-50 (5.127) > V_c (1.000) > SC-30 (0.765) > SC-70 (0.476) > SC-95 (0.058) > SC-10 (0.012) > SC-0。SC-0 其 TEAC 值无限接近

3 实验结果

3.1 HPLC 分析五味子组分木脂素含量

五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素是五味子中 5 种主要的木脂素。按上述色谱条件进行测定,计算其在各组分中的含量。从表 1 结果可以得出,木脂素含量的大小顺序为: SC-70 > SC-50 > SC-95 > SC-30。SC-0 和 SC-10 不含木脂素类成分。

于 0,没有抗氧化活性;SC-50 的抗氧化能力与其它组分相比,具有极显著性差异($P < 0.01$),且效果强于 V_c。

3.4 细胞增殖检测

3.4.1 不同浓度五味子组分对细胞生长的影响

采用 MTT 法检测不同浓度五味子各组分对 HaCaT 细胞生长得到影响。结果显示,SC-0 和 SC-10 在 <1000 μg/mL 时,除 SC-10 在 1000 μg/mL 时有细胞毒性之外,均不影响细胞的增殖;而其他组分在 >500 μg/mL 时,均对细胞产生明显的细胞毒性,

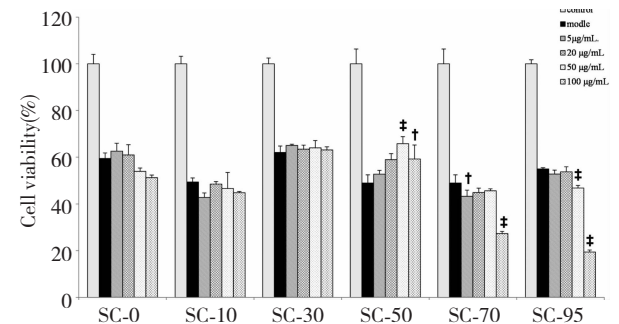


图 1 五味子各组分对细胞生长的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of different fractions of *S. chinensis* on cell viability ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

减少细胞增殖在 23% ~ 97% 左右; SC-50 在 100 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间时,对细胞有明显的增殖作用,细胞活力提高 12% ~ 18% 左右,与正常对照组比较具有极显著差异。具体如图 1 所示。

3.4.2 五味子各组分对 H_2O_2 诱导细胞损伤的保护作用

根据筛选得到的五味子各组分的安全剂量范围,设定 4 个不同剂量组,预处理时间为 24 h,利用 MTT 法判断各组细胞增值情况。结果显示,SC-0 在 100 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、SC-30 在 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间时,对 H_2O_2 诱导的细胞损伤具有一定的保护作用,但是与模型组比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$); SC-10、SC-70 及 SC-95 在安全剂量范围内,对细胞活力无明显变化; SC-50 处理组的细胞存活率较 H_2O_2 处理组明显提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈剂量依赖性,但伴随浓度增加到一定程度,逐渐出现细胞凋亡甚至死亡,存活率开始下降。具体如图 2 所示。

3.5 五味子组分对氧化损伤 HaCaT 细胞 MDA、SOD 和 GSH 水平的影响

用 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_2O_2 处理 HaCaT 细胞与空白

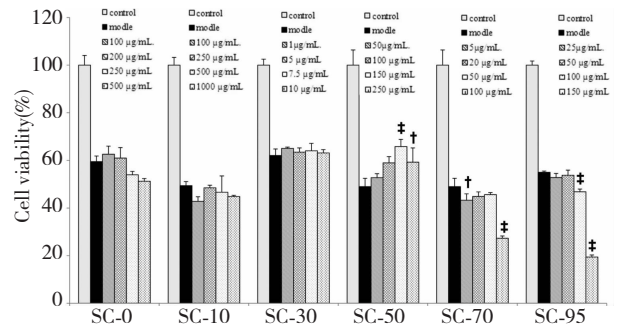


图 2 五味子各组分对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞损伤的保护作用 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Protective effects of different fractions of *S. chinensis* against H_2O_2 -induced oxidative stress injury in HaCaT cells ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

相比,脂质氧化产物 MDA 增加 21% 左右,抗氧化酶 SOD 降低 64% 左右, GSH 降低 49% 左右; 而用测试组分处理之后,明显降低了 MDA 的生成,提高细胞内 SOD 以及 GSH 的活力 ($P < 0.01$)。150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SC-50 能有效减少 MDA 生成量在 37% 左右,有效增加 SOD 量在 2.7 倍左右,增加 GSH 量在 1.8 倍左右。具体见表 2。

表 2 SC-50 组分对 HaCaT 细胞中 MDA、SOD 和 GSH 水平的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of SC-50 on cellular MDA, SOD and GSH in HaCaT cells ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)	GSH ($\mu\text{mol}/\text{gprot}$)
空白对照 Control	19.3 \pm 1.6	563.5 \pm 2.7	89.3 \pm 2.8
H_2O_2 处理组 H_2O_2 treated control	23.4 \pm 2.1	203.4 \pm 2.2	45.2 \pm 2.5
H_2O_2 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SC-50	20.7 \pm 1.0 ⁺	414.7 \pm 1.0 ⁺	75.0 \pm 2.6 ⁺
H_2O_2 + 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SC-50	14.7 \pm 1.6 ⁺	541.0 \pm 2.1 ⁺	80.1 \pm 2.8 ⁺
H_2O_2 + 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SC-50	17.2 \pm 2.0 ⁺	459.4 \pm 1.9 ⁺	76.4 \pm 2.9 ⁺

注:与 H_2O_2 处理组比较, ⁺ $P < 0.05$; [†] $P < 0.01$ 。

Note: Compared with H_2O_2 treated control, ⁺ $P < 0.05$; [†] $P < 0.01$.

4 讨论

中药“组分结构”理论认为,中药复方中各活性成分之间存在着一定的比例关系,组成物质基础的最基本单元为单体成分,具有稳定的结构;由同一化学类别的单体成分按照一定的比例构成组分,组分中各单体成分之间存在配伍配比关系;不同类别的组分按照一定的配伍比例组合构成中药复方的整体性物质基础^[16]。因而本文以功能单位“组分”为基础进行五味子抗皮肤衰老方面的研究。

越来越多的研究表明,自由基可以从细胞水平、

分子水平乃至组织器官水平上对机体造成各种不可逆性的氧化性损伤,加速生物体细胞乃至整个机体的衰老进程,诱发各种与衰老相关的各种疾病^[17-19]。人体细胞各种来源的大量自由基当中,最引人关注、研究较多的是 ROS。ROS 包括 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 及 HO_2^{\cdot} 、 $\cdot\text{OH}$ 等。 H_2O_2 是细胞内一种重要的氧自由基,对人体皮肤细胞能造成直接的氧化应激反应和氧化应激所致的氧化性损伤。在体外利用 H_2O_2 能够诱导细胞并加速细胞因氧化应激所致的衰老进程,模拟体内氧化损伤的病理过程。

以 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力

(ABTS 法)为考察指标,对五味子各组分的自由基清除能力进行评价,利用 MTT 法筛选五味子各组分对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤的保护作用,结果显示,50% 乙醇洗脱组分有较强的自由基清除能力,并显著减少 MDA 的生成,提高 SOD 和 GSH 酶活性,这可能也是其对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞损伤具有保护作用的重要机制之一。

在前人文献报道指出,联苯环辛烯类木脂素的抗氧化活性较好,本文检测分析的五味子甲素、乙素等 5 种主要木脂素均报道具有抗氧化的活性。从木脂素含量分布来看,50% 乙醇组分不是木脂素含量最高的组分,但是抗氧化活性最强的组分。这也使我们对中药“组分结构”理论有了进一步的理解和深思,进而开展进一步的试验研究。

参考文献

- 1 Editorial Board of Flora of China (中国植物志编辑委员会). Flora of China (中国植物志). Beijing: Science Press, 1996. 252-252.
- 2 Lu H, Liu GT. Anti-oxidant activity of dibenzocyclootene lignans isolated from Schisandraceae. *Planta Med*, 1992, 58: 311-313.
- 3 Jang HI, Do GM, Lee HM, et al. *Schisandra Chinensis* Baillon regulates the gene expression of phase II antioxidant/detoxifying enzymes in hepatic damage induced rats. *Nutr Res Pract*, 2014, 8: 272-277.
- 4 Sung M, Park SS, Kim SS, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of *Schisandra chinensis* Baill. extracts containing active components in alcohol-induced HepG2 cells. *Food Sci Biotechnol*, 2014, 23: 1615-1621.
- 5 Wang ZF (王征帆). Antioxidant activity of water extract of Chinese herbs used for protecting spleen and nourishing stomach. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1271-1273.
- 6 Jung CH, Hong MH, Kim JH, et al. Protective effect of a phenolic-rich fraction from *Schisandra chinensis* against H₂O₂-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59: 455-462.
- 7 Cheng N, Ren NY, Gao H, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55: 234-240.
- 8 Mocan A, Crisan G, Vlase L, et al. Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Schisandra chinensis* leaves and fruits. *Molecules*, 2014, 19: 15162-15179.
- 9 Lu H, Liu GT. Effect of dibenzo [a,c] cyclootene lignans isolated from Fructus *Schizandrae* on lipid peroxidation and anti-oxidative enzyme activity. *Chem Biol Interact*, 1991, 78: 77-84.
- 10 Cai J (蔡晶), Zhang Q (张庆), Xiao F (肖峰), et al. Schisandrin B protects human liver cells oxidized by peroxide. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 766-769.
- 11 Hou W (侯微), Wei ZB (魏忠宝), Gao W (高薇), et al. Protective effects of schisandrin A, B and C on the oxidative damage of HaCaT cells. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2013, 41: 1047-1049.
- 12 Lam PY, Yan CW, Chiu PY, et al. Schisandrin B protects against solar irradiation-induced oxidative stress in rat skin tissue. *Fitoterapia*, 2011, 82: 393-400.
- 13 Chiu PY, Lam PY, Yan CW, et al. Schisandrin B protects against solar irradiation-induced oxidative injury in BJ human fibroblasts. *Fitoterapia*, 2011, 82: 682-691.
- 14 Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*, 2009, 112: 654-658.
- 15 Hou W (侯微), Wei ZB (魏忠宝), Jiang YL (姜艳玲), et al. Estimation on external anti-oxygen activity in root, cane and stem of *schisandra* fruit. *Jilin Tradit Chin Med* (吉林中医药), 2010, 30: 1086-1088.
- 16 Yan HM (严红梅), Chen XY (陈小云), Zhang ZH (张振海), et al. Discussion about research ideas of Chinese materia medica based on Chinese materia medica components and “composition structure” theory. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46: 1103-1110.
- 17 Schauen M, Hornig-Do HT, Schomberg S, et al. Mitochondrial electron transport chain activity is not involved in ultraviolet A (UVA)-induced cell death. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 499-509.
- 18 Ma W, Nunes I, Young CS, et al. Catalase enrichment using recombinant adenovirus protects alpha TN4-l cells from H₂O₂. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40: 335-340.
- 19 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 1997, 390: 45-51.