

高良姜提取物不同组分的抗氧化活性比较

林振鹏¹, 李媛婷¹, 廖小丹², 张俊爱¹, 叶 华¹, 林文辉², 夏 敏^{2*}, 邓亦峰^{1*} (1. 广东医科大学广东省天然药物研究与开发重点实验室, 广东湛江 524023; 2. 广东同德药业有限公司、国家中医药管理局重点研究室, 广东湛江 524000)

摘 要: 目的 比较高良姜提取物不同组分的抗氧化活性。方法 采用减压液相层析法(VLC)分离高良姜提取物, 再用高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)进行归属鉴别。应用H₂O₂诱导人肝癌细胞株HepG2氧化损伤模型及小鼠负重游泳实验, MTT法和流式细胞术检测不同组分高良姜提取物的抗氧化活性。结果 高良姜提取物被分离出A~G等7个组分, 归类为二苯基庚烷类(A、B)、黄酮类(C、D)、挥发油类(E、F、G)。组分A、B、D和F提高氧化损伤HepG2细胞存活率($P<0.05$), 而组分B、D降低氧化损伤HepG2细胞凋亡率($P<0.05$)。低剂量组二苯基庚烷类显著延长小鼠负重游泳时间($P<0.05$)。结论 高良姜提取物中二苯基庚烷类具有显著的抗氧化活性。

关键词: 高良姜; 抗氧化活性; HepG2细胞

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)06-0606-05

Comparison of antioxidant activity in different components of *Alpinia Officinarum* extract

LIN Zhen-peng¹, LI Yuan-ting¹, LIAO Xiao-dan², ZHANG Jun-ai¹, YE Hua¹, LIN Wen-hui², XIA Min^{2*}, DENG Yi-feng^{1*} (1. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Tongde Pharmaceutical Co. Ltd., Zhanjiang 524000, China)

Abstract: Objective To compare the antioxidant activity in different components of *Alpinia Officinarum* extract. Methods The galangal extracts were separated by vacuum liquid chromatography (VLC), and then identified by HPLC and LC-MS. The antioxidant activity of different components of galangal extracts was determined by MTT assay and flow cytometry in H₂O₂-induced oxidative damage model of HepG2 cells and weight loading swimming mice. Results The galangal extracts were separated into A-G components, belonging to diphenylheptanes (A, B), flavonoids (C, D) and volatile oils (E, F, G). The components A, B, D and F increased the survival rates of oxidative damage HepG2 cells ($P<0.05$), while components B and D decreased the apoptosis rates ($P<0.05$). The low dose of diphenylheptanes enhanced the weight loading swimming time of the mice ($P<0.05$). Conclusion Diphenylheptanes of galangal extracts possess the antioxidant activity.

Key words: *Alpinia Officinarum*; antioxidant activity; HepG2 cells

高良姜是姜科属植物高良姜(*Alpinia officinarum* Hance)的干燥根茎, 其药用资源丰富, 作为药食两用的天然植物已有近上千年历史。近年文献报道高良姜富含二苯基庚烷类、黄酮类和挥发油成分, 具有抗炎、抗胃溃疡、抗菌和抗氧化等活性^[1-2], 但其药效物质基础鲜见报道。本文在前期研究基础上^[3-5]

采用H₂O₂诱导人肝癌细胞(HepG2)氧化损伤模型和小鼠负重游泳实验比较高良姜提取物不同部位的抗氧化相关活性, 为高良姜的资源开发与利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂与动物

岛津LC MS-8000α型液相色谱-质谱联用仪; 旋转蒸发器(上海申生科技R系列), 流式细胞仪(美国DB公司), 酶标仪(Biotek), 薄层层析硅胶(青岛海洋化工, HG/T2354-2010, 化学纯, 批号0121016), RPMI 1640培养基(Gibco), 胎牛血清(Gibco), MTT (Sigma-Aldrich), 细胞凋亡检测试剂盒(北京四正柏

基金项目: 广东省中医药强省科研项目(No.20141152), 湛江市工业与高新技术产业重点项目(No. 2014A02003)

收稿日期: 2017-05-24; **修订日期:** 2017-07-16

作者简介: 林振鹏(1992-), 男, 硕士研究生。

***通信作者:** 邓亦峰(1960-), 男, 高级工程师, 硕士生导师。

夏 敏(1960-), 男, 研究员, 硕士生导师。

生物科技有限公司), HepG2肝癌细胞株(本实验室提供), 乙酸乙酯、石油醚Ⅱ、冰醋酸、PEG400、无水乙醇等试剂除文中另外注明的均为分析纯, KM雄性小鼠156只, 体质量(20 ± 2) g, SPF级, 购置于广东省医学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK(粤)2008-0002。

1.2 方法

1.2.1 高良姜的提取分离 高良姜药材36 kg, 粉碎至60目, 采用98%食用级乙醇制备浓缩浸膏, 参照文献方法^[6]进行VLC硅胶层析制备, 采用乙酸乙酯-石油醚Ⅱ-2%冰醋酸为色谱流动相, 分离制备出A、B、C、D、E、F、G等7个组分。

1.2.2 高良姜提取物色谱峰归属鉴别 采用HPLC对7个组分的分离效果进行评价, 以LC-MS对色谱峰进行归属鉴别。色谱条件: Sham pack VP-ODS色谱柱(2.0 mm×250 mm, 5.0 μ m); 流动相A为0.1%醋酸-水; 流动相B为乙腈-甲醇-四氢呋喃=15%: 40%: 45%; 梯度洗脱: 0~20 min, 39%→61% B; 20~30 min, 61%→100% B; 30~40 min, 100%→100% B; 流速0.2 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样5 μ L, 检测波长280 nm, 参比波长360 nm; 分析时间: 40 min; 质谱条件: ESI电离源, 电极电压-4.0 kV、温度250 $^{\circ}$ C, 检测器电压1.7 kV, 喷雾氮气流速4.5 L·min⁻¹; 采用负离子扫描方式, 质量范围m/z50~800、扫描间隔1 s。

1.2.3 MTT法检测细胞存活率 调整HepG2细胞密度为 1×10^4 个细胞/孔接种于96孔板, 培养24 h至细胞贴壁, 实验设置空白对照组、模型组与给药组(给予A~H的药物, 其中H为高良姜乙醇总提取物), 模型组与给药组均以1 200 μ mol/L H₂O₂造模4 h, PBS洗涤两遍弃去, 给药组均给予0.01 g/L上述药物, 培养24 h后, 每孔加入20 μ L的5 g/L MTT溶液, 继续培养4 h, 弃孔内液体, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡10 min, 于酶标仪490 nm波长处测量吸光度。计算各组细胞存活率, 评价各组分对细胞抗氧化损伤活性的影响。

1.2.4 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率 取对数生长期的HepG2细胞, 配制成 5×10^4 /mL的单细胞悬液, 每孔3 mL接种于6孔培养板, 实验分组与药物处理同“1.2.3”, 收集细胞, 用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS洗两次, 结合缓冲液重悬, 使得细胞密度为 10^6 个·mL⁻¹, 从中吸取100 μ L于5 mL流式管中, 加入5 μ L的Annexin V-Alexa Fluor 488混匀后, 避光、室温孵育15

min, 上机前5 min加入10 μ L的PI染色, 上机前补加400 μ L的结合缓冲液, 进行流式分析, 重复3次。

1.2.5 小鼠负重游泳实验 小鼠适应性饲养1周, 经预游泳姿势正确的小鼠随机分为13组, 每组12只, 分别为空白对照组和药物组(二苯基庚烷类部位、黄酮类部位和挥发油类部位), 每组药物组均设有高(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、低(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)剂量组, 空白对照组给予等剂量10%的无水乙醇和23%的PEG400溶液, 连续给药30 d。末次给药30 min后, 将尾根部负荷5%体质量铅丝的不同组小鼠同时置于80 cm×50 cm×40 cm的游泳箱中进行游泳。水深不少于30 cm, 水温(25 ± 1) $^{\circ}$ C。搅动小鼠周围水面, 防止小鼠四肢漂浮不运动影响实验结果。记录小鼠自游泳开始至头部全部入水持续10 s不能浮出水面为止的时间。

1.3 统计学处理

应用统计软件SPSS18.0进行分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高良姜提取物色谱峰归属鉴别

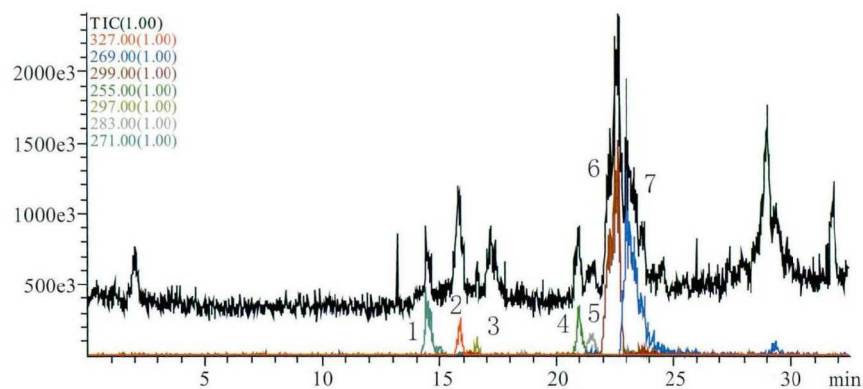
图1为高良姜乙醇提取物的LC-MS色谱图, 依据MIC的准分子离子[M-H]⁻¹的m/z值, 参照文献^[7]对色谱峰进行了归属鉴别; 对VLC分得的A~G 7个组分进行了HPLC分析, 组分A~G的HPLC色谱图如图2。依据LC-MS和HPLC分析结果, 将A~G 7个组分归为二苯基庚烷类(A、B), 黄酮类(C、D), 挥发油类(E、F、G)三个有效部位, 这3个部位的HPLC色谱图叠加对比如图3。

2.2 高良姜各组分对细胞存活率的影响

2.2.1 H₂O₂浓度的确定 100~1 400 μ mol/L H₂O₂对细胞有一定的损伤作用且具有浓度依赖性, 以浓度为1 200 μ mol/L H₂O₂孵育4 h, 细胞存活率为55.6%, 抑制率达50%左右(图4), 因此选择此浓度建立氧化损伤模型。

2.2.2 高良姜各组分的细胞毒作用 结果显示: 当质量浓度为0.1 g/L时, 与空白对照组相比, A~G以及总提取物H均能降低细胞存活率($P < 0.05$), 当质量浓度 ≤ 0.01 g/L时, 各组分对细胞生长影响不显著($P > 0.05$), 各组分均以此质量浓度进行抗氧化活性检测。

2.2.3 高良姜各组分抗氧化作用 相同剂量下, 组



1: m/z 271, 二氢高良姜醇; 2: m/z 327, 1-苯基-7-(3'-甲氧基-4'-羟基)-苯基-5-醇-3-庚酮; 3: m/z 297, 5-羟基-1-(4-羟苯基)-7-苯基-3-庚酮; 4: m/z 255, 乔松素; 5: m/z 283, 高良姜素-3-甲醚; 6: m/z 299, (3R, 5R)-1-(4-羟苯基)-7-苯庚烷-3, 5-二醇; 7: m/z 269, 高良姜素。

图1 高良姜LC-MS色谱峰归属鉴别

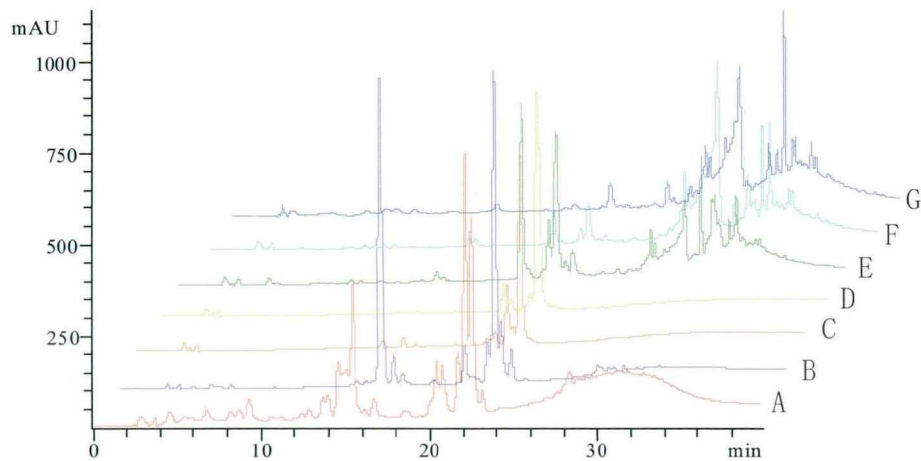


图2 组分A~G HPLC色谱图

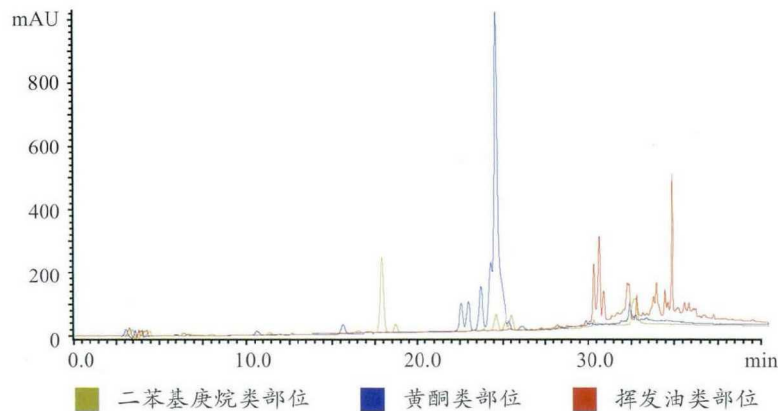


图3 二苯基庚烷类、黄酮类和挥发油类3个部位的HPLC色谱图叠加对比

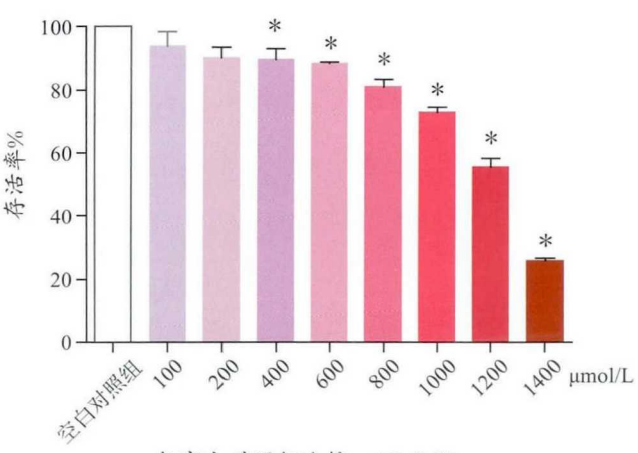
分A、B、D和F细胞存活率分别为77.3%、72.3%、70.5%、70.2%，与模型组(61.0%)相比均能显著提高细胞存活率($P<0.05$)，表明这些组分细胞线粒体琥珀酸脱氢酶活性升高，活细胞数目增多，具有抗氧化作用。

2.3 高良姜各组分对细胞凋亡率的影响

FCM结果显示(见图6)，相比于模型组，组分B、D可降低模型组细胞的凋亡率($P<0.05$)，组分B细胞凋亡率($46.3\pm 11.3\%$)略低于组分D($55.4\pm 11.7\%$)。

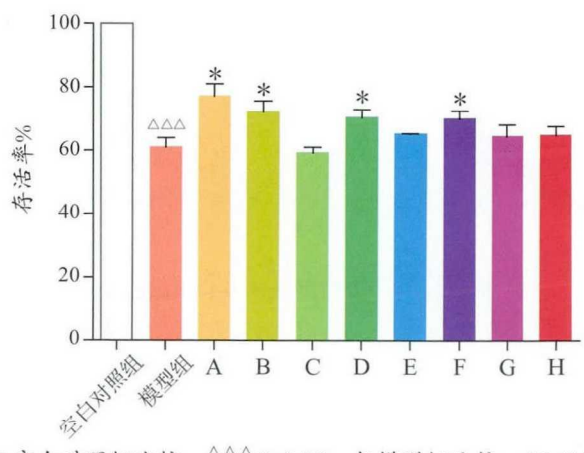
2.4 小鼠负重游泳实验

初次给药前、负重游泳前各组小鼠组间体质量



与空白对照组比较: * $P<0.05$

图4 H₂O₂诱导HepG2氧化损伤模型



与空白对照组比较: *** $P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$

图5 高良姜各部位对H₂O₂诱导细胞氧化损伤模型的影响

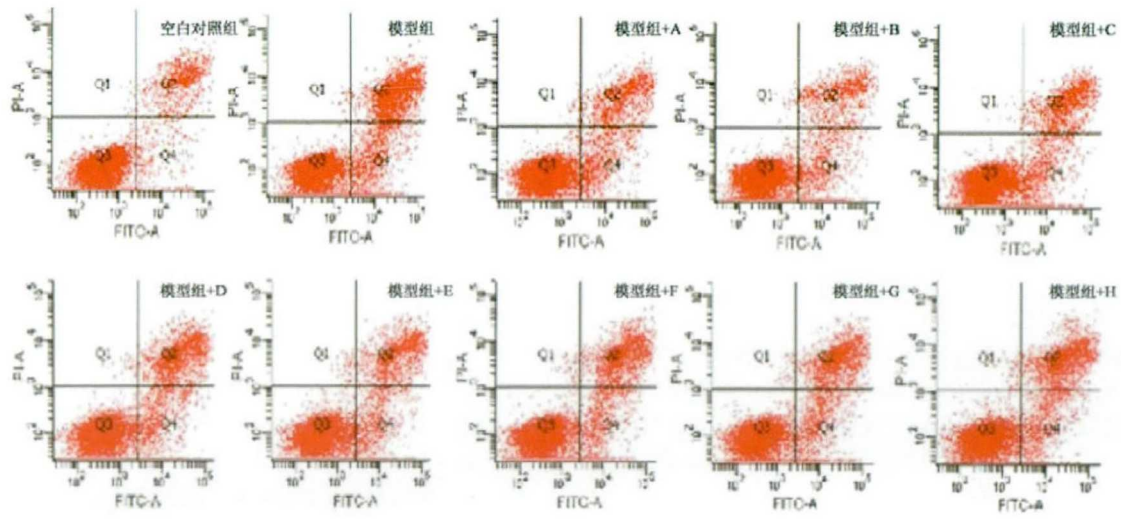


图6 流式细胞术检测细胞凋亡

均无统计学差异($P>0.05$), 给药期间各组小鼠生长状态良好, 给药组小鼠未发现生长发育不良情况, 实验前后各组体重如表1。各组小鼠负重游泳结果显示, 与空白对照组(15.90 ± 5.92) min相比, 二苯基庚烷类低剂量组 (25.34 ± 11.76) min显著延长小鼠负重游泳时间($P<0.05$)。见图7。

3 讨论

本文采用体外H₂O₂诱导HepG2细胞氧化损伤模型和体内小鼠负重游泳实验来比较高良姜提取物不同部位体内外抗氧化相关活性。实验表明, 高良姜提取物中的二苯基庚烷类部位在体外和体内试验中均显示出抗氧化相关活性, 黄酮类部位次之, 推测其活性主要源于高良姜提取物该两部位中的抗氧化、清除自由基活性化学成分。

高良姜提取物的二苯基庚烷类部位主要为二苯基庚烷A, 黄酮类部位主要为高良姜素。黄酮类化

表1 实验前后各组体质量表(g, $\bar{x}\pm s$, $n\geq 11$)		
分组	初次给药前体质量	游泳前体质量
空白对照组	21.62±1.28	38.14±4.11
二苯基庚烷类高剂量	21.49±1.22	37.14±3.00
二苯基庚烷类中剂量	21.58±1.14	38.18±2.50
二苯基庚烷类低剂量	21.69±1.29	37.57±2.44
黄酮类高剂量	21.48±1.20	37.33±4.85
黄酮类中剂量	21.58±1.21	38.35±1.95
黄酮类低剂量	21.62±1.15	38.97±2.78
挥发油类高剂量	21.65±1.31	37.73±3.72
挥发油类中剂量	21.59±1.19	37.69±4.04
挥发油类低剂量	21.50±1.31	37.88±3.57
总提取物高剂量	21.61±1.13	37.97±2.54
总提取物中剂量	21.61±1.12	37.69±4.14
总提取物低剂量	21.58±1.20	37.82±2.68

合物是以2-苯基色原酮为母核的多环结构, 二苯基

(下转第613页)

- [4] Liao H, Zhang J, Shestopal S, et al. Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(3): C797-C809.
- [5] Zaarour N, Defontaine N, Demaretz S, et al. Secretory carrier membrane protein 2 regulates exocytic insertion of NKCC2 into the cell membrane [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9489-9502.
- [6] Guo Z, Liu L, Cafiso D, et al. Perturbation of a very late step of regulated exocytosis by a secretory carrier membrane protein (SCAMP2)-derived peptide [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35357-35363.
- [7] Castle A, Castle D. Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (16): 3769-3780.
- [8] Muller H K, Wiborg O, Haase J. Subcellular redistribution of the serotonin transporter by secretory carrier membrane protein 2 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39): 28901-28909.
- [9] Singleton D R, Wu T T, Castle J D. Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(17): 2099-2107.
- [10] Wu T T, Castle J D. Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(13): 1533-1541.
- [11] Liu L, Liao H, Castle A, et al. SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4463-4472.
- [12] Ischebeck T, Seiler S, Heilmann I. At the poles across kingdoms: Phospho- inositides and polar tip growth [J]. *Protoplasma*, 2010, 240(1-4): 13-31.
- [13] Liao H, Zhang J, Shestopal S, et al. Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(3): C797-C809.
- [14] Diering G H, Church J, Numata M. Secretory carrier membrane protein 2 regulates cell-surface targeting of brain-enriched Na^+/H^+ exchanger NHE5 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(20): 13892-13903.
- [15] Shalem O, Sanjana N E, Zhang F. High-through put functional genomics using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299-311.

~~~~~

(上接第612页)

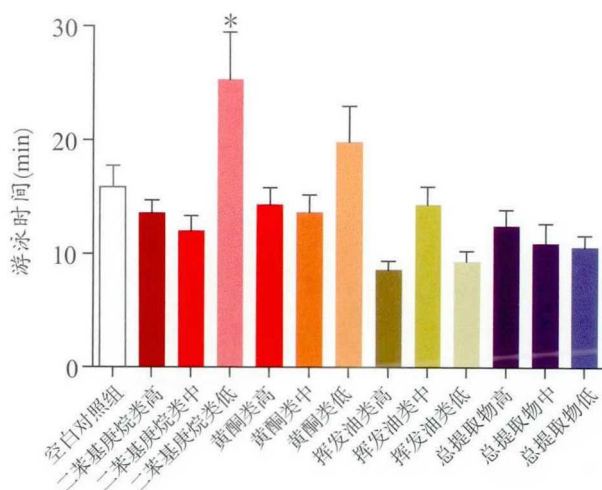


图7 小鼠负重游泳时间

庚烷类化合物是以1, 7-二苯基庚烷为母核的线性或环状结构, 它们分子中均含有酚羟基结构。由此推测, 高良姜中抗氧化相关活性物质主要为酚羟基化合物。该研究结果可为高良姜药用资源开发利用提

供实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 吕玮, 蒋伶活. 高良姜的化学成分及药理作用[J]. *中国药业*, 2006, 15(3): 19-21.
- [2] 严波, 白筱璐, 胡竟一, 等. 高良姜的解热和抗炎作用[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1): 85-87.
- [3] 程远, 李近, 廖小丹, 等. 高良姜不同活性部位对兔离体肠管平滑肌的影响[J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(6): 649-652.
- [4] 邓亦峰, 冯丽娜, 罗辉. 辛辣组分对高良姜提取物抗菌活性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(4): 4-7.
- [5] 冯丽娜, 邓亦峰, 梁念慈. 高良姜中芳香类化合物的分离及其活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(11): 2732-2733.
- [6] Harwood L M. Dry-column flash chromatography[J]. *Aldrichimica Acta*, 1985, 18(1): 25.
- [7] 李彩君, 陈佃, 何瑞. 高良姜中二苯基庚烷类化合物研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(4): 367-368.