

菊糖抗氧化活性及其机理

刘德萍, 吴平*

(江南大学 直属附属医院(无锡市第四人民医院), 江苏 无锡 214062)

摘要: 通过测定菊糖的还原能力、 Fe^{2+} 整合能力,以及 DPPH 自由基清除能力等方法,评价菊糖的抗氧化能力,并采用 Caco-2 细胞模型探讨其抗氧化机理。3 种抗氧化活性实验结果表明,菊糖具有良好的抗氧化活性。与阳性对照组比较,菊糖对 H_2O_2 诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤具有显著的保护作用。当菊糖质量浓度为 0.8 mg/mL 时,Caco-2 细胞中过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶,以及谷胱甘肽过氧化物酶的活力,分别提高了 35.8%,47.6%和 61.2%。菊糖主要通过提高细胞内抗氧化酶的活力发挥其抗氧化作用。

关键词: 菊糖;抗氧化活性;Caco-2 细胞模型;机制

中图分类号: TS 201.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)09—1002—06

Studies on the Antioxidant Activity of Inulin and Its Mechanism

LIU Deping, WU Ping*

(Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

Abstract: The antioxidant activity of inulin was evaluated by the studies of the reduction ability, Fe^{2+} -chelating activity and DPPH free radical scavenging activity. The mechanism of its antioxidant activity was investigated using the Caco-2 cell monolayer model. Three different antioxidant activity assays showed that inulin exhibited good antioxidant activity. A significant protective effect of inulin on H_2O_2 induced oxidative stress in Caco-2 cells was observed in comparison with the positive controls. With the treatment of 0.8 mg/mL inulin, the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were increased by 35.8%, 47.6%, and 61.2%, respectively. The antioxidant activity of inulin takes effect mainly by activating the intracellular antioxidant enzymes.

Keywords: Inulin, antioxidant activity, the Caco-2 cell monolayer model, mechanism

菊糖,又名菊粉、菊苣多糖,是 D-果糖经 $\beta(2 \rightarrow 1)$ 键连接的链状果聚糖,末端常含有一个葡萄糖基,一般从菊苣或菊芋中提取获得^[1]。菊糖作为一种水溶性很好的膳食纤维,具有很多促进人体健康的生理功能。例如,具有低热量、非胰岛素依赖性、非

龋齿性等特点,适于糖尿病患者食用;菊糖还可降低血液中胆固醇和甘油三酯的含量,可用来减肥、预防心血管疾病和高胆固醇血症;也可作为双歧杆菌增殖因子,调节肠道功能,预防结肠癌等。此外,菊糖持水性高,可预防便秘,可广泛应用于开发临

收稿日期: 2015-03-23

作者简介: 刘德萍(1962—),女,吉林长春人,主管护师,主要从事营养护理及临床实践研究。E-mail: 23368058@qq.com

* 通信作者: 吴平(1981—),女,江苏南通人,工学硕士,主治医师,主要从事临床营养治疗及研究。E-mail: wuping_1981@163.com

床营养治疗产品、功能性食品和保健品等^[2]。

目前,大量研究结果显示,部分植物多糖如黄芪多糖^[3]、大蒜多糖^[4-5]等具有清除自由基、抑制脂质氧化及提高抗氧化酶活性的功能。目前,已有部分文献报道菊糖具有抗氧化活性^[6-7],但对其抗氧化机理探讨还鲜见报道。国内外营养学研究表明,活性多糖的抗氧化作用主要是清除体内自由基、提高抗氧化酶活性及抑制脂质过氧化等,多数活性多糖的抗氧化机理可能是调控 Nrf2-Keap1-ARE 信号通路^[8]。作者利用 3 种体外方法和 Caco-2 细胞模型对菊糖抗氧化功能进行分析,并探讨菊糖抗氧化活性作用机理,为今后菊糖在医药及保健品开发方面的应用提供依据。

1 实验器材

1.1 材料与试剂

菊糖 ORFTI™ HP 型,江南大学食品学院提供;磷酸缓冲液、无水乙醇、三氯乙酸、氯化高铁($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、七水合硫酸亚铁、 H_2O_2 (体积分数 30%)、NaOH, 购自国药集团化学试剂有限公司;铁氰化钾,上海试剂一厂产品;DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼)、Ferrizine 试剂, Sigma 公司产品;DMEM 培养基、胎牛血清、链霉素、青霉素、非必需氨基酸,美国 Gibco 公司产品;质量分数 0.25% 胰酶(含 EDTA)、Triton X-100 过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽氧化酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GSH-Rx),碧云天生物技术有限公司研制;其他各种分析纯试剂,国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

722 型可见分光光度计,上海精密仪器有限公司制造;UV-2100 型紫外可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司制造;AKTATM 蛋白质分析纯化系统,瑞士 Amersham Biosciences 公司制造;J-26XPI 型高效冷冻离心机,美国 BECKMAN 公司制造;细胞培养瓶及培养板,美国 Corning 公司制品; CO_2 细胞培养箱、Nano drop 2000 型分光光度仪,美国 ThermoForma 公司制造;细胞刮刀,上海耐思生物公司制品;BIOsafe12 型生物安全柜,中国 HealForce 公司制造;恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司制造;MS3digital 漩涡振荡器、摇床,德国 IKA 公司制造;U410 型超低温冷冻冰箱,美国 New Brunswick Scientific 公司制造;4000 mini 型 Image

Quant LAS,美国 GE 公司制造;倒置显微镜,日本 OLY MPUS 公司制造;台式高速冷冻离心机、PCR 仪,德国 Eppendorf 公司制造。

2 实验方法

2.1 还原能力的测定

将菊糖样品配制质量浓度分别为 1、5、10、25、50 mg/mL 的溶液,各取出 2 mL 作为样品待测溶液,分别加入 0.2 mol/L pH 6.6 的磷酸盐缓冲液 2 mL,质量分数 10% 的铁氰化钾($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)溶液 2 mL 混匀,50 °C 水浴中保温 20 min,接着加入体积分数 10% 的三氯乙酸(TCA)溶液 2 mL,振荡混匀后离心(1 000 r/min)。再各取去沉淀后的上清液 2 mL 加入 2 mL 去离子水和 0.4 mL 质量分数 0.1% 的 FeCl_3 溶液,振荡混匀后在 50 °C 水浴下保温 10 min,溶液慢慢由黄色变为深蓝色,在波长 700 nm 下进行比色。样品空白对照为去离子水。测定值取 3 次平行测定的平均值。

2.2 整合金属离子能力的测定

Fe^{2+} 整合能力测定^[10]方法:配制质量浓度分别为 1、5、10、25、50 mg/mL 的菊糖溶液,从中分别取出 0.5 mL 样品液,以等体积去离子水代替样品液作空白对照,吸光值为 A ,所有测定值为 3 次平均值。配制 FeCl_2 溶液浓度为 0.25、0.20、0.15 mmol/L,加入至各质量浓度样品测量吸光值。整合率按公式(1)计算:

$$c = ((A_c - A_y) / A_c) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, A_c 为去离子水吸光值, A_y 为加入 FeCl_2 溶液的菊糖样品液吸光值。

2.3 DPPH 自由基捕获能力的测定

DPPH 自由基捕获能力的测定^[11]方法:配置 0.1 mmol/L DPPH 溶液(溶于体积分数 95% 的乙醇),样品组菊糖质量浓度分别为 1、5、10、25、50 mg/mL,称取不同质量浓度的样品溶于 2 mL 去离子水中,加入 2 mL DPPH 溶液,避光反应 25 min;阳性对照组为 2 mL DPPH 溶液加入 2 mL 去离子水(代替样品),空白组为等体积去离子水和体积分数 95% 乙醇混合液。在波长 517 nm 处分别测定吸光值 A_i 、 A_j 、 A_0 。清除率按公式(2)计算:

$$R = ((A_i - A_j) / A_0) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, A_i 为样品组吸光值, A_j 为空白组吸光值, A_0 为对照组吸光值。

2.4 Caco-2 细胞培养

将 Caco-2 细胞培养于含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养温度 37 ℃, CO₂ 体积分数 5%, 隔天换一次培养液。本实验中所采用的细胞传代数均为 15~55 代。Caco-2 细胞长满培养瓶底约 85% 面积时, 吸去培养基, 加入 PBS 清洗两次, 加入消化液 1 mL, 消化 2~3 min 后, 吹打至细胞呈单个悬浮状, 以 1×10^6 个/孔的密度接种到培养板中, 隔天换液。当 Caco-2 细胞铺满培养板底约 85% 面积时进行各项指标测定。

2.5 Caco-2 细胞体外氧化损伤模型的建立

按照 2.4 中 Caco-2 细胞培养方法, 待细胞长至培养板底面积 85% 左右时, 吸去培养基, PBS 清洗两次, 再加入不含血清的培养基。每孔加入浓度不同的 H₂O₂, 使终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L, 作用 4 h 后检测细胞存活率。每组实验设置 3 个平行, 以无任何处理的 Caco-2 细胞的存活率作为 100%。

2.6 细胞存活率检测

采用 WST-1 法检测细胞存活率, 当 48 孔中 Caco-2 细胞培养结束后, 每孔加入 100 μ L 培养液, 再加入 10 μ L WST-1 试剂, 培养 30 min 后于 450 nm 处测定每孔吸光值。以无任何处理的 Caco-2 细胞组为对照组, 按公式(3)计算细胞存活率

$$S = (A_{450} / A'_{450}) \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, A_{450} 为实验组的吸光值, A'_{450} 为对照组的吸光值。

2.7 菊糖对 Caco-2 细胞的抗氧化保护作用

待 Caco-2 细胞长满培养板底 85% 左右面积时, 吸去培养基, 用 PBS 清洗两次, 加入不含血清的培养基, 接着分为 4 组进行处理比较。

1) 阴性 Caco-2 细胞对照组 (NEG): 只加入不含胎牛血清的培养基;

2) 阳性 Caco-2 细胞对照组 (POS): 在培养基中加入 H₂O₂, 终浓度为 1 mmol/L;

3) 正常 Caco-2 细胞实验组: 加入含有不同质量浓度的菊糖培养基孵育细胞 2 h 后, 吸去旧培养基, 接着用 PBS 清洗, 最后加入含 H₂O₂ 的培养基;

4) 加入菊糖的 Caco-2 细胞对照组: 加入含有不同质量浓度菊糖的培养基, 细胞孵育 6 h, 按照 WST-1 法检测细胞存活率, 阴性对照组的细胞存活率为 100%。

2.8 细胞内氧化还原酶系指标的测定

分别按紫外比色法检测过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活力。

2.9 数据处理与统计方法

采用 GraphPad Prism[®] 5 package 软件制图, 实验数据采用 t-test 法比较两组间差异。

3 结果与讨论

3.1 还原能力

如图 1 所示, 不同质量浓度菊糖样品溶液 (1、5、10、25、50 mg/mL) 的吸光值在可检测范围内, 而且其还原能力随着菊糖质量浓度的增加而增强。

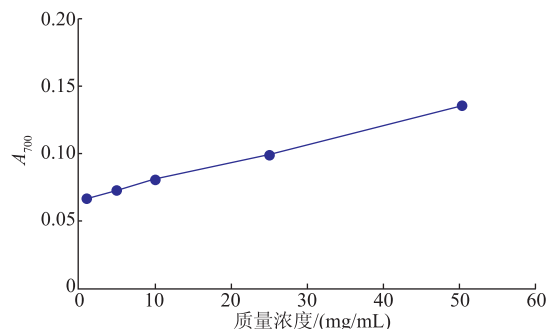


图 1 不同质量浓度菊糖还原能力

Fig. 1 Reduction ability of inulin with various concentrations

3.2 螯合金属离子能力

过渡金属离子铁离子是非常强的自由基发生剂, 能够催化各种自由基的生成, 如羟基自由基和超氧阴离子自由基。金属离子的存在使得捕捉自由基的抗氧化剂消耗掉。如图 2 所示, 选取浓度分别为 0.15、0.20、0.25 mmol/L 的底物 FeCl₂ 溶液, 在底物 FeCl₂ 溶液浓度为 0.15 mmol/L 时, Fe²⁺ 螯合率大约在 4.5%~10%; 底物 FeCl₂ 溶液浓度为 0.20 mmol/L 时, Fe²⁺ 螯合率大约在 15.8%~17.8%; 底物 FeCl₂ 溶液浓度为 0.25 mmol/L 时, Fe²⁺ 螯合率约在 16.8%~21.7%。随着菊糖浓度增加, 二价铁离子的螯合能力逐渐增强, 且随着底物浓度的增加, 同一质量浓度菊糖的二价铁离子的螯合能力也逐步增强。

3.3 DPPH 自由基的捕获能力

DPPH· (1,1-二苯基苦基苯肼自由基) 是一种合成的稳定的有机自由基, 主要用来测定酚类物质和食品的抗氧化活性, 多糖的抗氧化活性测定也可以采用此方法。此变化与抗氧化剂抗氧化能力及其数量呈定量关系。

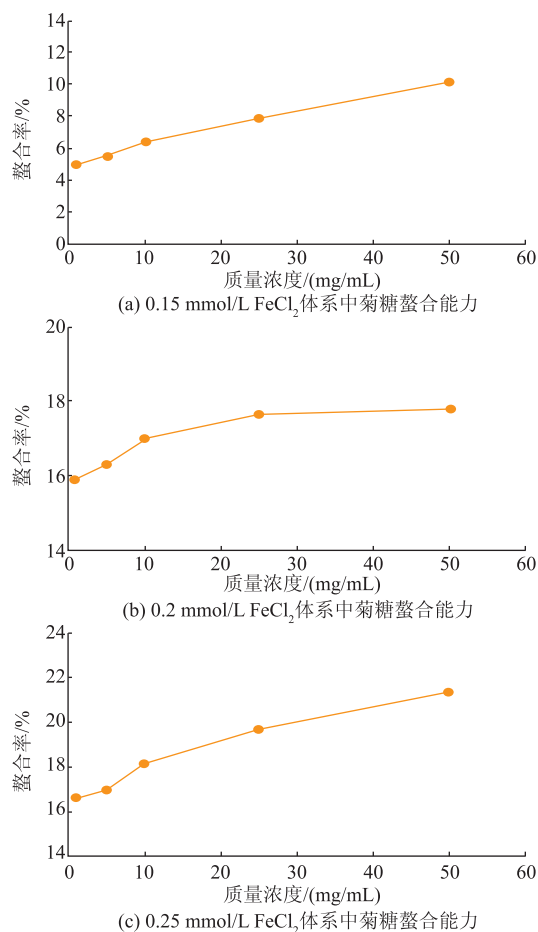


图2 不同质量浓度菊糖对金属离子的螯合能力

Fig. 2 Metal ions chelating activity of inulin with various concentrations

如图3所示,伴随着菊糖质量浓度逐渐增加,DPPH 自由基清除率逐步增加,提示随着菊糖质量浓度增加,菊糖抗氧化能力逐渐增强。当菊糖质量浓度达到 60 mg/mL 时,DPPH 自由基清除率最高可达 31.2%;当质量浓度为 5 mg/mL 时,清除率为 4.9%。

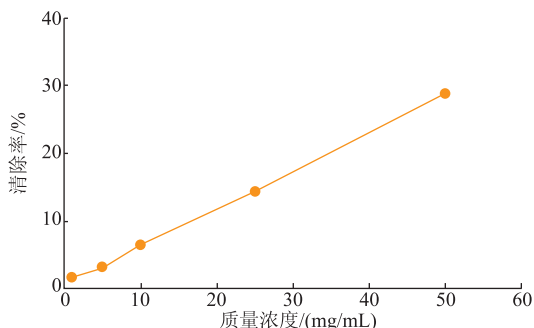
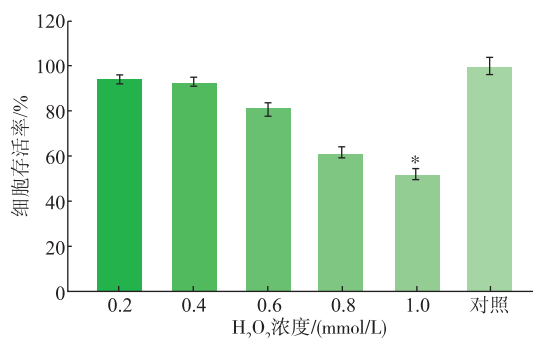


图3 不同质量浓度菊糖对 DPPH 自由基的捕获能力

Fig. 3 DPPH free radical scavenging activity of inulin with various concentrations

3.4 H_2O_2 诱导 Caco-2 细胞氧化损伤模型

Caco-2 细胞模型是近 20 年来国内外广泛采用的研究药物小肠吸收的体外模型。它具有培养相对简单、结果重复性好及应用范围较广的优点。Caco-2 细胞来源于人体的直肠癌,结构与功能与人小肠上皮细胞相似,含有与小肠刷状缘上皮相关的酶类,且与人体正常小肠上皮转运系统及酶类相似。由图4可知,0.2~1.0 mmol/L 浓度范围的 H_2O_2 作用 4 h 后对 Caco-2 细胞具有显著的毒性作用,导致 Caco-2 细胞存活率降低;也可以发现 Caco-2 细胞存活率与 H_2O_2 浓度呈现负相关,在 H_2O_2 浓度为 1.0 mmol/L 时,Caco-2 细胞存活率为 51.5%,损伤程度较大。为突显菊糖的抗氧化活性保护作用,选择浓度为 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 作用于 Caco-2 细胞的氧化损伤模型。如果用大于浓度 1.0 mmol/L 的 H_2O_2 作用于 Caco-2 细胞,导致 Caco-2 细胞存活率更低,作为一种抗氧化保护剂,抗氧化保护能力是有限的。



注:*表示与正常对照组相比具有高度显著性差异。

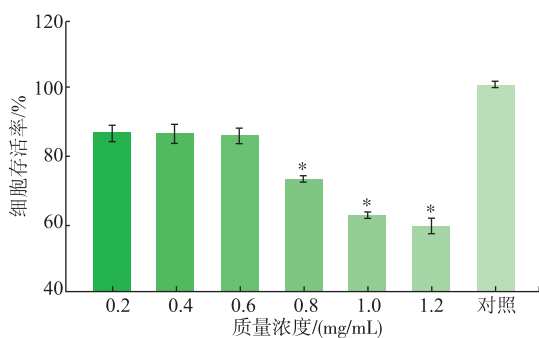
图4 不同浓度 H_2O_2 对 Caco-2 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of H_2O_2 with different concentrations on the viability of Caco-2 cells

3.5 菊糖对 Caco-2 细胞氧化损伤的保护

为探讨菊糖对 H_2O_2 诱导损伤的 Caco-2 细胞的保护作用,实验中菊糖与 Caco-2 细胞共同孵育 6 h。由图5可知,与对照组相比,经过 0.2~0.6 mg/mL 菊糖处理的 Caco-2 细胞,细胞存活率均在 86%左右,存活率虽有所下降但无显著差异($p>0.05$);但经过 0.8~1.2 mg/mL 菊糖处理的 Caco-2 细胞存活率出现下降趋势,随着质量浓度增加,存活率下降,表现出细胞毒性作用($p<0.05$)。菊糖对 Caco-2 细胞抗氧化保护作用的双重性:低质量浓度时,菊糖有一定的抗氧化活性,对细胞具有抗氧化保护作用,但质量浓度超过一定的程度,可能也会使细胞机能和形态发生改变,从而导致 Caco-2 细胞死亡。在一定质量

浓度范围内会随着质量浓度增加抗氧化保护能力逐渐增强,但达到顶峰时,继续增加菊糖的质量浓度,那将会导致对 Caco-2 细胞的致死作用强于抗氧化保护作用。故在研究菊糖的抗氧化机理时,选用 0.2~0.8 mg/mL 质量浓度的菊糖对 Caco-2 细胞进行抗氧化保护。



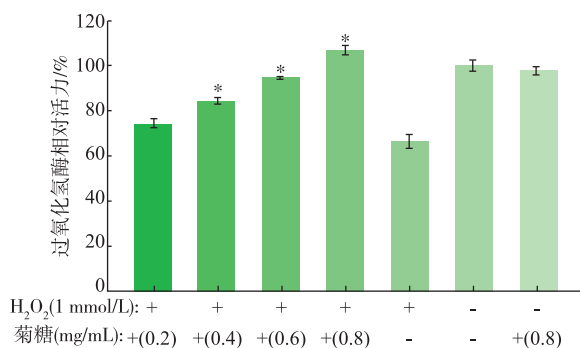
注:*表示与正常对照组相比具有显著性差异。

图 5 不同质量浓度菊糖对 Caco-2 细胞存活率的影响

Fig. 5 Effects of inulin with different concentrations on the viability of Caco-2 cells

3.6 菊糖对过氧化氢酶活力的调节

从图 6 可知,与阴性对照组比较,只加入 H_2O_2 的 Caco-2 细胞中,过氧化氢酶活力降低。与阳性对照组比较,加入 0.2~0.8 mg/mL 的菊糖处理后再加入 H_2O_2 的 Caco-2 细胞中,过氧化氢酶的活力分别提高了 7.8%、15.9%、24.7% 和 35.8%。0.4~0.8 mg/mL 3 组与阳性对照组比较,过氧化氢酶活力显著提高 ($p < 0.05$);与阴性对照组相比,无显著性差异;只接受 0.8 mg/mL 菊糖处理组,过氧化氢酶活力稍降低,无显著性差异。



注:*表示与阳性对照组相比具有显著性差异。

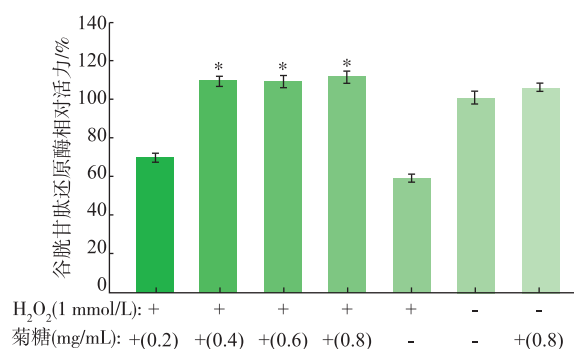
图 6 不同质量浓度菊糖对过氧化氢酶活力的影响

Fig. 6 Effects of inulin with different concentrations on catalase activity

3.7 菊糖对谷胱甘肽还原酶活力的调节

从图 7 可以得知,与阴性对照组比较,只加入

H_2O_2 的 Caco-2 细胞中 GSH-Rx 酶活力降低。与阳性对照组比较,加入 0.2~0.8 mg/mL 的菊糖处理后再加入 H_2O_2 的 Caco-2 细胞中,GSH-Rx 酶活力分别提高了 10.5%、31.6%、33.5% 及 37.6%。0.4~0.8 mg/mL 3 组与阳性对照组比较,过氧化氢酶活力显著提高 ($p < 0.05$);与阴性对照组相比,无显著性差异;只接受 0.8 mg/mL 菊糖处理组,GSH-Rx 酶活力稍提高,无显著性差异。



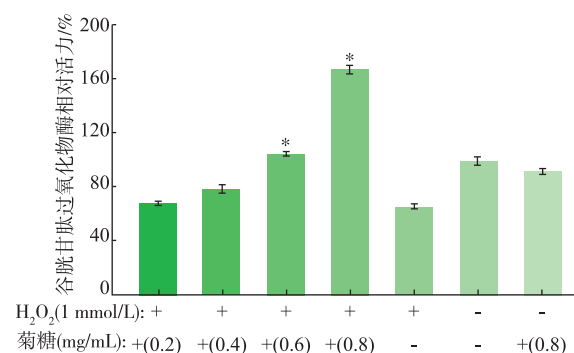
注:*表示与阳性对照组相比具有显著性差异。

图 7 不同质量浓度菊糖对谷胱甘肽还原酶活力的影响

Fig. 7 Effects of inulin with different concentrations on glutathione reductase (GSH-Rx) activity

3.8 菊糖对谷胱甘肽过氧化物酶活力的调节

从图 8 可以得知,与阴性对照组比较,只加入 H_2O_2 的 Caco-2 细胞中 GSH-Px 活力降低。与阳性对照组比较,加入 0.2~0.8 mg/mL 的菊糖处理后再加入 H_2O_2 的 Caco-2 细胞中,GSH-Px 酶活力分别提高了 1.9%、8.4%、29.7% 及 100.1%。0.6~0.8 mg/mL 两组与阳性对照组比较,过氧化氢酶活力显著提高 ($p < 0.05$);与阴性对照组相比,无显著性差异;只接受 0.8 mg/mL 菊糖处理组,无显著性差异。



注:*表示与阳性对照组相比具有显著性差异。

图 8 不同质量浓度菊糖对谷胱甘肽过氧化物酶活力的影响

Fig. 8 Effects of inulin with different concentrations on glutathione peroxidase (GSH-Px) activity

4 结 语

通过测定菊糖对铁离子的还原能力、DPPH 自由基清除能力及金属离子螯合能力,证实了菊糖具有一定的抗氧化活性,而且随着菊糖质量浓度增大抗氧化活性逐渐增强。以 Caco-2 细胞为体外氧化损伤模型,探讨菊糖对 H_2O_2 诱导损伤细胞内抗氧化酶活力的调节。实验结果显示,菊糖可通过提高细胞内的过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽过氧化物酶活力,从而实现抗氧化保护作用。

菊糖是一种天然碳水化合物,对人体有特殊的

生理功能,目前已被世界上多个国家批准为食品营养增补剂。日本厚生省批准菊糖为特定保健食品,美国食品和药物管理局批准菊糖为公认的安全级配料,欧洲则把它作为控制人血液胆固醇水平的功能性甜味剂广泛应用。我国对菊糖的研究始于 20 世纪 90 年代,在很长一段时间内停留在实验室阶段。因此,下一阶段有必要开展其生理活性与临床应用研究,如保护脏器氧化损伤、降低粪臭素、影响下丘脑神经元以及菊糖过敏症等,为其在消化、内分泌、心血管疾病,以及肿瘤等的临床防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] 乌日娜,朱铁霞,于永奇,等. 菊芋的研究性状及开发潜力[J]. 草业科学,2013,30(8):1295-1300.
WU Rina,ZHU Yixia,YU Yongqi,et al. Study on status and exploiting potential of *helianthus tuberosus* [J]. **Pratacultural Science**,2013,30(8):1295-1300. (in Chinese)
- [2] Reza K,Mohammad H,Mehran G,et al. Application of inulin in cheese as prebiotic,fat replacer and texturizer:A review[J]. **Carbohydrate Polymers**,2015,119:85-100.
- [3] 苏兰利,吕元,程波,等. 黄芪多糖浸泡种蛋对雏鸡免疫器官抗氧化性能的影响[J]. 河南农业科学,2013,42(12):133-135.
SU Lanli,LV Yuan,CHENG Bo,et al. Effects of a stragalus polysaccharides on antioxidant activity of chicken by soaking fertilized eggs[J]. **Journal of Henan Agriical Science**,2013,42(12):133-135. (in Chinese)
- [4] 叶雪芳,崔志英. 大蒜多糖的作用功效[J]. 广东饲料,2012,21(1):27-30.
YE Xuefang,CUI Zhiying. The effects of polysaccharides from *Allium sativum* L[J]. **Guangdong Feed**,2012,21(1):27-30. (in Chinese)
- [5] 邵金华,李涛,杨佳. 微波辅助大蒜多糖的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 浙江农业学报,2013,25(4):868-872.
SHAO Jinghua,LI Tao,YANG Jia. Studyon microwave-assisted extraction ofgarlic polysaccharideand its antioxidantactivity[J]. **Acta Agriculhurae Zhejiangensis**,2013,25(4):868-872. (in Chinese)
- [6] 杨振,杨富民. 菊粉对油脂抗氧化研究[J]. 食品工业科技,2009,30(6):119-121.
YANG Zhen,YANG Fumin. Study on the antioxidant ability of inulin [J]. **Science and Technology of Food industry**,2009,30(6):119-121. (in Chinese)
- [7] 全瑛. 菊芋菊糖的提取纯化、抗氧化活性及菊糖复合饮料工艺研究[D]. 西安:西北大学,2010:53-57.
- [8] 陈荣,王学亮,徐环环,等. 抗氧剂抗氧化活性研究进展[J]. 菏泽学院学报,2013,35(5):44-49.
CHEN Rong,WANG Xueliang,XU Huanhuan,et al. A review on antioxidant activity of antioxidants [J]. **Journal of Heze University**,2013,35(5):44-49. (in Chinese)
- [10] Saiga A,Tanabe S,Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**,2003,51(12):3661-3667.
- [11] Rivero-Perez M D,Perez-Magarino S,Gonzalez-San M L. Role of melanoidins in sweet wines [J]. **Analytica Chimica Acta**,2002,458(1):169-175.