

# 马尾松树皮提取物的抗氧化性初步研究

崔映宇<sup>1</sup>, 谢 衡<sup>2</sup>, 赖 斐<sup>1</sup>, 王金发<sup>1,\*</sup>

(1.教育部基因工程重点实验室 中山大学生科院, 广东 广州 510275

2.广东嵩珍营养源研究所, 广东 广州 510645)

**摘 要** 目的 研究马尾松树皮提取物(Pinus massoniana bark extract, PMBE)在体外不同介质中的抗氧化能力和清除活性氧自由基能力, 测定不同浓度 PMBE 对体外培养的人体 8 种癌细胞株的作用。方法: 用化学比色法测定 PMBE 体外的抗氧化和清除活性氧能力, 并与天然抗氧化剂 VC 和 VE 进行比较; 用四甲基偶氮唑蓝比色法(measurement of trititaed thymidine incorporation, MTT)测定 PMBE 对不同癌细胞株的体外作用。结果: PMBE 在体外生理盐水条件下具有较强抗氧化和清除活性氧能力, 其抗氧化能力稍弱于 VC, 约为 VE 的 3.5 倍, 对不同癌细胞株的抑制浓度和抑制程度不同。结论: PMBE 是一种天然抗氧化剂和活性氧清除剂, 具有抑癌潜能。

**关键词:** 马尾松树皮提取物; 抗氧化剂; 活性氧; 人癌细胞株

## Preliminary Study on Antioxidative Activities of Pinus massoniana Bark Extract (PMBE)

CUI Ying-yu<sup>1</sup>, XIE Heng<sup>2</sup>, LAI Fei<sup>1</sup>, WANG Jin-fa<sup>1,\*</sup>

(1.Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China 2.Institute of Songzhen Nutritional Resource, Guangzhou 510645, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the competence of total antioxidation and scavenging reactive oxygen radicals of Pinus massoniana bark extract (PMBE) in different media and its effect on 8 human cancer cell lines cultured in vitro. Methods: Chemical colorimetry and measurement of tritiated thymidine incorporation (MTT) assay were applied to study the total antioxidation competence and reactive oxygen radical-scavenging competence of PMBE in different media and its effect on human cancer cell lines, respectively. Its antioxidative and reactive oxygen radical-scavenging competence was compared with that of natural antioxidants vitamin C or vitamin E through chemical colorimetry. Results: PMBE owned higher competence of total antioxidation and scavenging reactive oxygen radicals in normal saline in vitro, just a little less than VC and nearly 3.5 times as much as VE. Different inhibition degrees to different cancer cell lines with different concentration PMBE solutions were shown, respectively. Conclusion: PMBE would be a natural antioxidant and reactive oxygen radical scavenger, probably a functional potential for inhibiting cancer and could be applied in R&D of anticancer drug.

**Key words:** Pinus massoniana bark extract; antioxidant; reactive oxygen species; human cancer cell lines

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)09-0179-05

VC、VE 和  $\beta$ -胡萝卜素等天然营养素保健防病功能的发现使天然抗氧化剂日益受到人们的青睐。一则它可以清除机体内过多的活性氧自由基, 抵抗其对机体的氧化损伤, 参与各种炎症、衰老甚至癌症的预防<sup>[1]</sup>, 二则其来源广泛、毒副作用小、价廉、显效<sup>[2]</sup>。目前, 天然抗氧化剂的寻找与开发已引起国内外营养学、医学和生物学界人士的广泛关注。

大量研究证实, 多数天然抗氧化剂中的有效抗氧化成分为类黄酮化合物和酚酸类物质<sup>[3]</sup>, 这两大类物质在植

物中广泛存在, 如: 茶、水果、蔬菜和大豆中含量就很丰富, 其所具有的保健功能也已被许多科学工作者的研究证实。例如, 类黄酮化合物可有效阻滞恶性肿瘤孕育中的血管增生, 断绝其养料来源, 从而延缓或阻止肿瘤恶变成癌; 还能够对抗自由基, 清除人体内的活性氧, 防止细胞膜脂质过氧化, 从而延缓人体组织老化等<sup>[3]</sup>。

近年来, “岁寒三友”之一的松树颇受营养学界人士的关注。曾有报道称, 法国海松(Pinus maritima)树皮提取物具有抗氧化、降血压、抗癌等多种药理活

收稿日期: 2003-09-12

\*通讯联系人

作者简介: 崔映宇(1968-), 男, 在读博士, 研究方向为分子遗传学。

性<sup>[4]</sup>,其抗氧化能力是VE的50倍,VC的20倍<sup>[5]</sup>。本文用化学比色法对嵩珍营养源研究所膜分离法制备的马尾松树皮提取物进行抗氧化活性的体外测定,并用不同浓度的马尾松树皮提取物处理体外培养的人体8种癌细胞株,检测其对癌细胞生长的影响,结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

马尾松树皮提取物(广东嵩珍营养源研究所膜分离法制备,马尾松树皮经筛选、烘干和粉碎后,用纯水加热浸提,浸提液经粗滤、离心分离和微滤后,除去悬浮物和大分子杂质,再用中空纤维膜超滤,得到含有前花青素等生物活性成分的透过液,透过液用卷式纳滤膜浓缩,去除糖类、无机盐等小分子杂质和大部分水后,经干燥制得松树皮生物活性物质提取物),抗氧化检测试剂盒、活性氧检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),VC(L-Ascorbic acid, SIGMA Corp.),VE( $\alpha$ -Tocopherol, SIGMA Corp.),0.9%生理盐水,二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO, Amresco),RPMI 1640(HyClone),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 杭州四季青),青链霉素(Penicillin-Streptomycin, Penicillin 10000units/ml, Streptomycin 10000 $\mu$ g/ml, GIBCO, Invitrogen Corp.),无水乙醇,三蒸水。

人癌细胞株:肝癌BEL-7402、宫颈癌HeLa(本室保存),肺癌GLC-82、骨髓细胞白血病HL-60、胃腺癌MGC-803、胰腺癌SW1990、结肠癌LoVo(购自中山大学医学院细胞中心),喉癌Hep2(中山大学微生物遗传室)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 溶液配制

母液(10mg/ml):用电子天平称取PMBE 100mg,放入干燥洁净的50ml小烧杯中,然后加入0.9%生理盐水10ml,磁力搅拌器上搅拌,使PMBE完全溶解,5ml Eppendorf管分装,4℃冰箱放置待用。

工作液:以0.9%生理盐水稀释母液成5、2.5、1、0.5、0.1、0.01mg/ml的样品液。

#### 1.2.2 总抗氧化能力测定

1.2.2.1 原理:测定 $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ 的还原能力,通过光吸收值的变化来确定抗氧化物质的总抗氧化能力。光吸收值变化越大,总抗氧化能力越强。

1.2.2.2 实验方法:按照总抗氧化能力检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)要求准备各工作液。取0.1ml 0.9%生理盐水和0.1ml待测样品液分别置于对照管和测试管中,再分别加入检测试剂2.0ml,混合均匀,在37℃恒温水浴锅中反应30min,1cm光径、520nm处测定光吸收度(OD),每一样品测3次,详细记录每一测量

数据。

1.2.2.3 计算方法:在37℃时,每分钟每毫升样品液使反应体系的吸光度值每增加0.01时,为一个抗氧化能力单位。

计算公式:总抗氧化能力=(测定管OD-对照管OD)×反应液(ml)×样品测试前稀释倍数÷0.01÷30÷取样量(ml)

#### 1.2.3 清除活性氧能力测定

1.2.3.1 原理:Fenton反应是最常见的产生羟自由基的化学反应, $\text{H}_2\text{O}_2$ 的量和Fenton反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 量成正比,当给予电子受体后,用Gress试剂显色,形成红色物质,其颜色深浅与 $\cdot\text{OH}$ 的多少成正相关。通过测定光吸收值的变化即可测定样品清除活性氧自由基的能力。

1.2.3.2 实验方法:按照活性氧检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)要求准备各工作液,置工作液于37℃水浴中预温3min,以下操作均在37℃水浴中进行。在标准空白管内加入蒸馏水0.4ml;标准管内加入蒸馏水0.2ml,0.03% $\text{H}_2\text{O}_2$ 标准应用液0.2ml;对照管内加入蒸馏水0.2ml,底物应用液0.2ml;测定管内加入底物应用液和样品各0.2ml;上述每管内均加入试剂盒中的试剂三0.4ml。混匀,37℃反应1min(准确以秒表计时),从加完试剂三开始到1min结束,立即加入2ml显色剂终止反应。混匀,室温放置20min后,1cm光径、550nm处,以三蒸水调零,测定各管吸光度值(OD),每一样本测3次,详细记录每一测量数据。

1.2.3.3 计算方法:规定每毫升样品液在37℃反应1min,使反应体系中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度降低1mmol/L为一个清除活性氧单位。

计算公式:清除活性氧能力=(对照管OD-测定管OD)÷(标准管OD-标准空白管OD)×标准管浓度(8.824mmol/L)×样品测试前稀释倍数

#### 1.2.4 PMBE在不同介质中抗氧化能力与清除活性氧能力比较

实验方法:将PMBE分别完全溶解于25%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、25% DMSO和0.9% NaCl成10mg/ml的母液,然后分别依次按5、2.5、1、0.5、0.1、0.01mg/ml浓度稀释,再按2.2、2.3中的方法制备各自的对照管和测试管,然后同法逐一测定、记录、计算各浓度样品的抗氧化能力和清除活性氧能力。

#### 1.2.5 PMBE与VC、VE的抗氧化能力比较

实验方法:将VC和VE分别溶解在0.9% NaCl和25%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 中成10mg/ml的母液,再按5、2.5、1、0.5、0.1、0.01mg/ml浓度稀释,按2.2中的方法测定并计算

表1 PMBE 总抗氧化能力(T-AOC)测定结果(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

	对照	PMBE (mg/ml)		
		0.01	0.1	1
T-AOC 单位	8.444±0.308	2 955.556±159.386 <sup>b</sup>	1 520±22.835 <sup>b</sup>	474.578±1.318 <sup>b</sup>

注: b:  $p < 0.01$  vs 对照。

表2 PMBE 清除活性氧(SROS)能力测定结果(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

	对照	PMBE (mg/ml)		
		0.01	0.1	1
SROS 单位	3 814.288±58.020 <sup>△</sup>	3 769.506±24.054 <sup>a</sup>	455.941±3.5646 <sup>b</sup>	67.435±0.230 <sup>b</sup>

注:  $\Delta$ 系统中总ROS单位; a:  $p < 0.05$  vs 对照, b:  $p < 0.01$  vs 对照。

各浓度样品的抗氧化能力。

### 1.2.6 四甲基偶氮唑蓝(MTT)还原实验法测定 PMBE 对癌细胞生长的影响

将人癌细胞株 BEL-7402, HeLa, GLC-82, HL-60, MGC-803, SW1990, Lovo, Hep2 的单细胞悬液以  $10^4$  个/ml 的密度分别接种在 96 孔板上,  $200 \mu\text{l}$ /孔, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24h, 大部分细胞贴壁后, 换上 0.5% FBS-RPMI 1640 培养液, 再培养 48h, 使细胞基本同步于  $G_0$  期, 再换用 10% FBS-RPMI 1640 培养液, 分实验组和空白对照组。实验组分别加入以 DMSO 为介质的 PMBE 处理液, 使 PMBE 的终浓度分别为 10、20、40、80、100、120、140、160、180、200  $\mu\text{g/ml}$ , DMSO 的终浓度均小于 0.25%。每孔总反应体系  $200 \mu\text{l}$ , 每一浓度设 4 个复孔, 空白组仅加培养液而不加细胞, 对照组加培养液和细胞而不加 PMBE, 培养 48h, 实验结束前 4h, 每孔加入 5mg/ml MTT 溶液  $20 \mu\text{l}$ , 继续培养 4h 后, 吸弃上清, 每孔加入  $150 \mu\text{l}$  DMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪上, 分别以 550nm 和 630nm 波长测每孔的吸光度  $A_1$  值和  $A_2$  值,  $A_1$  减去  $A_2$ , 即为每孔的吸光度 A 值, 取 4 孔均值。细胞的生长抑制率 =  $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ , 上述实验重复 3 次, 取均值。

1.2.7 统计学处理 测定结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 非齐性方差 t 检验, 由 Excel 2000 和 SPSS10.0 软件包完成,  $p < 0.05$ , 差异显著, 具统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 总抗氧化能力

结果显示 PMBE 在体外 0.9% 生理盐水中具有较强的抗氧化能力。当其终浓度为 0.01mg/ml 时, 其抗氧化能力单位为  $2 955.556 \pm 159.386$ ; 终浓度为 1mg/ml 时, 其抗氧化能力单位为  $474.578 \pm 1.318$ , 与对照组相比均有显著性意义。结果见表 1。

### 2.2 清除活性氧能力

结果显示 PMBE 在体外 0.9% 生理盐水中的清除活性氧能力显著强于对照组。当其终浓度为 0.01mg/ml 时, 其清除活性氧单位为  $3 769.506 \pm 24.054$ ; 终浓度为 1mg/ml 时, 其清除活性氧单位为  $67.435 \pm 0.230$ , 结果见表 2。

### 2.3 PMBE 在不同介质中总抗氧化能力与清除活性氧能力的差异

尽管 DMSO 有一定的毒性, 但出于后续细胞学研究需要, 我们还是选择了 25% DMSO 作为介质之一。结果显示, 体外不同的介质中, PMBE 的总抗氧化能力不同, 大致为:  $25\% \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} > 0.9\% \text{NaCl} > 25\%$

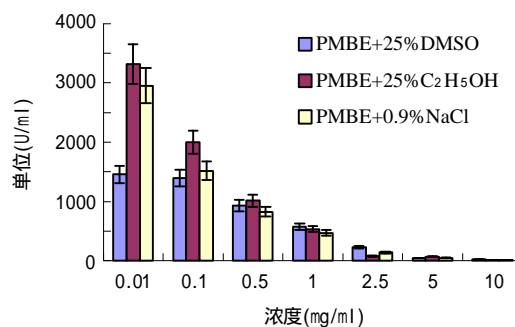


图1 不同介质中PMBE总抗氧化能力比较

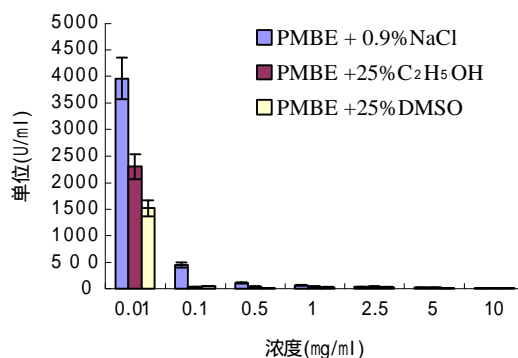


图2 不同介质中PMBE清除活性氧能力比较

DMSO (见图1); 而且其清除活性氧的能力也有差异, 尤以 PMBE 终浓度为 0.01mg/ml 时为最明显, 同时可见低浓度的 PMBE 在 0.9% NaCl 中的清除活性氧能力最强 (见图2)。

#### 2.4 PMBE 与 VC、VE 的抗氧化能力比较

PMBE 易溶于 DMSO、乙醇和生理盐水, 但由于 VC 为水溶性, 而 VE 易溶于乙醇, 兼之 DMSO 有一定的毒性, 故从实用角度考虑, 仅选择 25% 乙醇和 0.9% 生理盐水作介质, 分两组进行。结果显示, 在给定浓度范围内, PMBE 的体外最强抗氧化能力约为 VC 的 0.9 倍 (图3), VE 的 3.5 倍 (图4)。

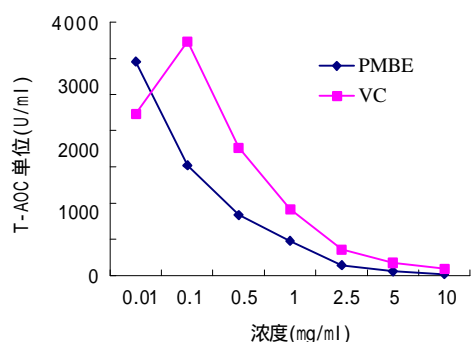


图3 PMBE和VC的总抗氧化能力比较

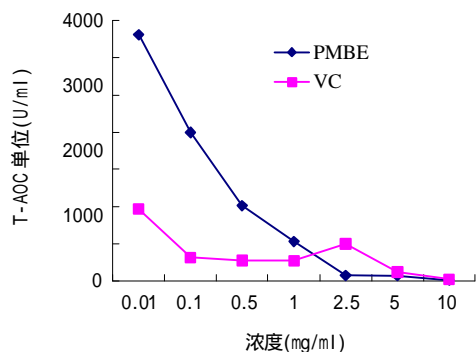


图4 PMBE和VE的总抗氧化能力比较

#### 2.5 PMBE 对体外培养人癌细胞生长的影响

不同浓度 PMBE 处理人体不同癌细胞株 48h 后对其生长的影响见图5。从图中可知, 在给定浓度范围内, PMBE 对子宫颈癌 Hela、喉癌 Hep2 和结肠癌 Lovo 细胞株均具抑制作用, 对肝癌 BEL-7402 细胞株基本都有抑制作用, 对肺癌 GLC-82 和胰腺癌 SW1990 细胞株, 在低浓度和高浓度时有抑制作用, 而对胃癌 MGC-803 和白血病 HL-60 细胞株, 仅在较高浓度时才有抑制作用。相比较而言, PMBE 对 HL-60 细胞株的抑制作用最强, 这很可能与 HL-60 系悬浮培养, 接触 PMBE 分子的数量相对较多有关。可见, PMBE 对体外培养的人不同癌细胞株呈现出程度不同的抑制作用, 且这种抑制作用具有明

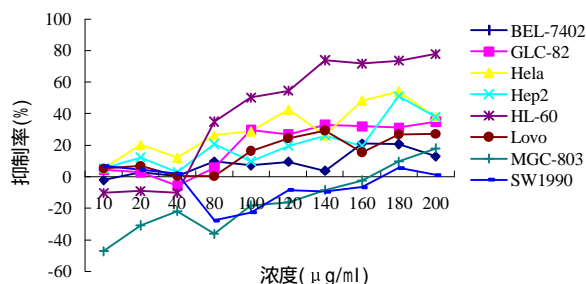


图5 不同浓度PMBE对不同癌细胞株的抑制率(t=48h)

显的浓度依赖性, 具体作用机理有待进一步深入研究。

### 3 讨论

化学比色法是一种评价天然抗氧化剂活性的方法, 主要通过分光光度计测定样品处理前后光吸收值的改变, 进而评估天然抗氧化剂的抗氧化能力和清除活性氧的能力<sup>[6]</sup>。该法具有耗时短、价格廉、操作简便等优点, 一般实验室均能进行。

本文研究了马尾松树皮提取物(PMBE)在体外的抗氧化能力和清除活性氧能力, 结果显示我国 PMBE 的抗氧化能力介于 VC 和 VE 之间, 在给定浓度范围内, 最高抗氧化能力是 VC 的 0.90 倍, 约为 VE 的 3.5 倍, 具有较强的抗氧化和清除活性氧能力, 且有良好的量效关系, 表明它是一种较强的抗氧化剂和活性氧自由基清除剂, 其在生理盐水中的较强活性提示其用于食品添加剂和药物研发的可行性。基于法国海松树皮提取物 Pycnogenol(r)的生理作用<sup>[7]</sup>, 提示马尾松树皮提取物可能也具有增强免疫力、抗疲劳和延缓衰老等功效, 具潜在的药用价值。

本实验用的是马尾松树皮的粗提取物, 这是由于粗提取物的抗氧化性更接近于实际应用。有报道称, 类黄酮化合物是松树皮提取物的主要成分, 且多种类黄酮混合可显示出加合效果, 是作为天然抗氧化剂的最佳选择<sup>[8]</sup>, 它们主要通过清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基发挥抗氧化作用<sup>[9]</sup>。活性氧是氧分子还原成水时产生的许多活性中间体的统称, 包括超氧阴离子自由基、羟自由基、过氧化氢等。近年有报道证实活性氧是维持肿瘤细胞恶性增殖的必要成分, 在细胞内可能作为第二信使, 起生长信号转导作用<sup>[10]</sup>, 不少化学结构各异的抗氧化剂有显著抑制癌细胞生长的作用, 甚至诱导癌细胞凋亡, 而它们大多兼具清除活性氧的功能, 因此有人认为抗氧化剂的抑癌作用可能与其清除活性氧的性质有关<sup>[11]</sup>。我们用不同浓度的 PMBE 处理体外培养的人体 8 种癌细胞株, 结果显示 PMBE 在不同浓度范围内对不同癌细胞也有程度不同的抑制作用。基于此, 我们认为 PMBE 也可能通过清除活性氧发挥其抗氧化功能, 从而

抑制癌细胞生长, 具有防癌、抑癌作用, 可用于抗癌药物的研发。这也为我们从分子水平进一步研究 PMBE 的作用机理奠定了基础。

基于国外有松树皮提取物能诱导癌细胞凋亡的报道<sup>[12,13]</sup>, 鉴于 PMBE 在体外生理盐水中的抗氧化能力和清除活性氧能力较高, 且对体外培养的 8 种人体癌细胞有浓度依赖的不同程度抑制作用, 具有一定的实用价值, 其作用机理及相关的细胞学和分子生物学方面的研究正在本实验室进行。

#### 参考文献:

- [1] Ta-Chen Lin, Kazutaka Nishikawa, Tzu-Hua Wu, et al. Antioxidative and free radical scavenging activities of phenolics from *Scutellaria baicalensis* [J]. *The Chinese Pharmaceutical Journal*, 2002, 54: 193-198.
- [2] 霍光华, 高荫榆, 陈才水. 天然抗氧化剂的开发研究进展 [J]. *郑州工程学院学报*, 2002, 23(3): 104-109.
- [3] 秦翠群, 袁长贵. 一类天然的功能性添加剂 [J]. *中国食品添加剂*, 2002, (3): 59-63.
- [4] 余莹, 粟武, 魏东芝. 原花青素体外清除自由基活性的研究 [J]. *华东理工大学学报*, 2002, 28(3): 318-320.
- [5] 吕丽爽. 天然抗氧化剂低聚原花青素的研究进展 [J]. *食品科学*, 2002, 23(2): 147-150.
- [6] 刘厚淳, 陈万生. 何首乌水溶性成分 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯 2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的体外抗氧化作用研究 [J]. *药学实践杂志*, 2000, 18(4): 232-233.
- [7] Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2002, 40(4): 158-68.
- [8] 汪秋安. 天然抗氧化剂及其在食品中的应用 [J]. *粮油食品科技*, 2000, 8(1): 33-35.
- [9] 胡博路, 杭瑚. 核桃壳抗氧化作用的研究 [J]. *中国油脂*, 2002, 27(2): 22-23.
- [10] Gamaley I A, Klyubin I V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions [J]. *Int Rev Cytol*, 1999, 188: 203-255.
- [11] Rhee S G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger [J]. *Exp Mol Med*, 1999, 31(2): 53-59.
- [12] Huynh H T, Teel R W. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by Pycnogenol [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(4): 2417-2420.
- [13] Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. Studies of procyanidins on DU145 cells of human prostatic cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2000, 28(3): 129-138.



#### 信息

## 现代食品的安全问题—食品污染

食品污染是指食物受到有害物质的侵袭, 造成食品安全性、营养性或感官性状发生改变的过程。食品污染大致可分为: (1) 食物中存在的天然毒物; (2) 环境污染物; (3) 滥用食品添加剂; (4) 食品加工、贮存、运输及烹调过程中产生的有害物质或工具、用具中的污染物。

根据污染物的性质, 食品污染可分为三个方面: (1) 生物性污染: 有微生物及其毒素, 主要是细菌及细菌毒素, 霉菌及霉菌毒素等; 病毒对食品的污染也正引起重视; 寄生虫及其虫卵通过病人病畜的粪便或经过环境中转化, 最后通过污染食品造成危害; (2) 化学性污染: 危害最严重的是化学农药、有害金属、多环芳烃类, 滥用食品用的工具、容器、食品添加剂、植物生长促进剂等也是食品化学污染的因素; (3) 放射性污染: 食品可以吸附或吸收外来的放射线核素。

食品污染造成的危害, 可以归结为: (1) 影响食品的感官性状; (2) 造成急性食物中毒; (3) 引起机体的慢性危害; (4) 对人类的致畸、致突变和致癌作用。

## 欧洲调味食品采用软管包装

调味食品采用软管包装目前在欧洲已越来越普遍。蛋黄酱、芥末、番茄糊、辣根、色拉调味等都使用了软管包装。食品放在塑料、铝箔和层压材料的软管里, 对各种产品都能提供优良的隔离性能; 层压材料和铝箔制成的软管在产品挤出后不会回弹, 防止了打开包装后空气和食品的接触机会。