

人参多糖的分离纯化及其对UVB致皮肤损伤的保护作用

聂梅, 黎鹏, 汤静洁, 张平军, 黄冬婷

Separation and Purification of Ginseng Polysaccharide and Its Protective Effect on Skin Damage by UVB

NIE Mei, LI Peng, TANG Jingjie, ZHANG Pingjun, and HUANG Dongting

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022110165>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

人参多糖对氧化应激损伤肝细胞的保护作用机制研究

Mechanism of Protective Effect of Ginseng Polysaccharide on Hepatocytes Induced by Oxidative Stress

食品工业科技. 2020, 41(5): 280-285,292 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.046>

1-脱氧野尻霉素对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用

Anti-aging Effects of 1-Deoxynojirimycin on *Caenorhabditis elegans*

食品工业科技. 2018, 39(21): 280-286 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.21.050>

碱蓬多糖SSP1-1的分离纯化及其抗肿瘤活性

Separation and Purification of Polysaccharide SSP1-1 from *Suaeda salsa* and Its Antitumor Activity

食品工业科技. 2020, 41(20): 314-319 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.052>

芋头水溶性多糖的分离纯化及其对巨噬细胞免疫活性功能的影响

Isolation and Purification of Water-Soluble Polysaccharide from Taro and Its Effect on Immune Activity of Macrophages

食品工业科技. 2020, 41(19): 13-19 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.003>

沙棘多糖对D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用

Antioxidant Effects of *Hippophae rhamnoides* Polysaccharide on Aging Mouse Induced by D-galactose

食品工业科技. 2020, 41(4): 293-297,306 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.050>

海洋生物活性物质抗衰老作用研究进展

Research Progress on the Anti-aging Effect of Marine Bioactive Substances

食品工业科技. 2021, 42(22): 433-441 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090202>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

聂梅, 黎鹏, 汤静洁, 等. 人参多糖的分离纯化及其对 UVB 致皮肤损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 412-419. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110165

NIE Mei, LI Peng, TANG Jingjie, et al. Separation and Purification of Ginseng Polysaccharide and Its Protective Effect on Skin Damage by UVB[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(16): 412-419. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110165

· 营养与保健 ·

人参多糖的分离纯化及其对 UVB 致皮肤损伤的保护作用

聂梅^{1,2}, 黎鹏^{1,2}, 汤静洁^{1,2}, 张平军^{1,2}, 黄冬婷^{1,2,*}

(1. 广东省科学院生物与医学工程研究所, 广东广州 510316;

2. 广东省绿色制糖工程技术研究中心, 广东广州 510316)

摘要: 以药食同源中药材人参为原材料, 通过超声辅助热水法提取人参多糖 (Ginseng polysaccharides, GPS), 经酶解法去除淀粉和蛋白质, 再经 DEAE-52 纤维素柱层析分离纯化得到精制人参多糖 (GPS-1)。通过高效凝胶渗透色谱、红外光谱和核磁共振波谱测定了 GPS-1 的相对分子质量、单糖构成和结构特征, 另外研究了 GPS-1 对人皮肤成纤维细胞 (Human skin fibroblasts, HFF-1) 存活率和 HFF-1 中活性氧 (Reactive oxygen, ROS)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathion peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、金属蛋白酶 1 (Metalloproteinase 1, MMP-1) 和金属蛋白酶 9 (Metalloproteinase 9, MMP-9) 的影响。结果表明, GPS-1 为均一性多糖, 多糖纯度为 95.13%, 重均分子量为 2.104 kDa, 由 α -D-葡萄糖、 α -D-半乳糖醛酸、 α -D-阿拉伯糖、 α -D-岩藻糖、 α -D-核糖、 β -D-甘露糖和 β -D-阿拉伯糖构成。GPS-1 可保护 UVB 照射下的 HFF-1 细胞活性, 质量浓度为 200 μ g/mL 的 GPS-1 溶液即可显著抑制 MMP-1 和 MMP-9 的表达 ($P < 0.01$), 显著提升 SOD 和 GSH-Px 的含量 ($P < 0.01$), 显著降低 ROS 和 MDA 的含量 ($P < 0.01$), 为人参多糖的分离纯化以及在开发抗衰老产品的应用提供了科学依据。

关键词: 人参多糖, 分离纯化, 中波紫外线 (UVB), 抗衰老, 人皮肤成纤维细胞 (HFF-1)

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)16-0412-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022110165



本文网刊:

Separation and Purification of Ginseng Polysaccharide and Its Protective Effect on Skin Damage by UVB

NIE Mei^{1,2}, LI Peng^{1,2}, TANG Jingjie^{1,2}, ZHANG Pingjun^{1,2}, HUANG Dongting^{1,2,*}

(1. Institute of Biological and Medical Engineering, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510316, China;

2. Guangdong Province Engineering Research Center for Green Technology of Sugar Industry, Guangzhou 510316, China)

Abstract: Ginseng polysaccharide (GPS) was obtained from ginseng, a traditional Chinese medicinal material, through an efficient extraction method in this work. Namely, the extracts of ginseng were first collected by ultrasonic assisted extraction of hot water, then purified through enzymolysis to remove the starch and protein, and finally refined by DEAE-52 cellulose column chromatography to get the desired ginseng polysaccharide (GPS-1). The molecular weight, mono-saccharide composition and structure of GPS-1 were determined by high performance gel permeation chromatography, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. In addition, the role of GPS-1 in human skin fibroblasts (HFF-1) survival rate and the effect on reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), metalloproteinase 1 (MMP-1) and metalloproteinase 9 (MMP-9) were studied. The results showed that GPS-1 was a homogeneous polysaccharide with a purity of 95.13% and an average

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 广东省科学院发展专项资金项目 (2020GDASYL-20200103069); 揭阳市科技计划项目 (2019089)。

作者简介: 聂梅 (1970-), 女, 本科, 工程师, 研究方向: 天然产物分离与活性分析, E-mail: 630016559@qq.com。

* 通信作者: 黄冬婷 (1992-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 天然产物分离与活性分析, E-mail: 719584029@qq.com。

molecular weight of 2.104 kDa, which was composed of α -D-glucose, α -D-galacturonic acid, α -D-arabinose, α -D-fucose, α -D-ribose, β -D-mannose and β -D-arabinose. Moreover, the cell experiments confirmed that GPS-1 could protect HFF-1 cells from UVB irradiation, and the expression of MMP-1 and MMP-9 could be significantly inhibited by GPS-1 solution at the concentration of 200 μ g/mL ($P<0.01$). Further study revealed that GPS-1 could also significantly increase SOD and GSH-Px content ($P<0.01$) and decrease the contents of ROS and MDA ($P<0.01$). These results would provide a scientific basis for the isolation and purification of ginseng polysaccharide and its application in the development of anti-aging products.

Key words: ginseng polysaccharide; separation and purification; ultraviolet radiation b (UVB); anti-aging; human skin fibroblasts (HFF-1)

皮肤是人体的最外层器官,很容易暴露在紫外线下造成刺激。根据波长的不同,紫外线可以分为 UVA(320~400 nm)、UVB(280~320 nm)、UVC(100~280 nm)。大气中的臭氧层对 UVC 有较强的吸收能力,到达地球表面的紫外线主要是 UVA 和 UVB^[1]。UVB 的波长处于 DNA 和蛋白质的吸收峰附近,其辐射是皮肤光化学反应中最活跃部分,诱发的炎症在皮肤光老化中起核心作用^[2-3]。过量的 UVB 辐射导致皮肤组织中的 ROS 被大量激活,超过了机体的清除能力,导致细胞膜受损,脂质过氧化产生过量 MDA,致使细胞凋亡从而引起光老化^[4-5]。因此,开发含有天然成分或配方的药物、食物抑制 UVB 对皮肤的损伤实现抗衰老受到越来越多人的关注。

人參作为一种被广泛使用了几千年的著名中药材,其有效成分包括皂苷、多糖、挥发油和氨基酸等^[6]。主要有效成分人參皂苷的研究比较完整,其生理功能已经有了大量的实验依据和证明^[7-9]。然而,人參成分中最丰富的多糖(约占总含量的 40%)还没有得到充分的研究,此前对人參多糖的研究主要集中在其具有抗氧化作用^[10],通过降低组织过氧化程度,保护组织器官免受氧化损伤^[11-13]。目前还缺乏人參多糖在皮肤抗衰老方面的研究。抗衰老活性研究中,细胞模型和动物模型都已有报道。董坤等^[14]建立了 UVB 致 HFF-1 损伤模型,考察草莓叶水提物对 UVB 致皮肤损伤的保护作用,结果表明草莓叶水提物有助于缓解氧化应激造成的细胞损伤,达到延缓衰老的功效。王慧云^[15]通过建立过氧化氢刺激人脐静脉血管内皮细胞诱导的衰老细胞模型发现,党参多糖干预后细胞血清中内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)、诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)、ROS 含量降低,内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)含量升高, DNMT1、EZH2、Bmi-1 蛋白与基因表达量、细胞 DNA 甲基化水平也得到了调节,表明党参多糖可以延缓内皮细胞衰老。赵苑伶等^[16]分离纯化得到铁皮石斛多糖,以秀丽隐杆线虫为模式生物,研究了铁皮石斛多糖的抗衰老作用,结果表明铁皮石斛多糖可以显著延长秀丽隐杆线虫的寿命,对高温损伤和氧化应激损伤有一定的抵御作用。朱秋秩等^[17]利用秀丽隐杆线虫模型研究羊乳酪蛋白酶解物的抗衰老作用,实验表明羊乳酪蛋白酶解物能延长线虫寿命,降低线虫体内脂褐素积

累,提高线虫在应激条件下的抵抗能力和体内抗氧化酶活力,具有较好的抗衰老活性。

由于对分离纯化后的人參多糖在皮肤抗衰老方面的研究较为少见,因此,本文制备了人參精多糖,对其进行均一性测定、波谱表征及延缓皮肤衰老功效评价,为人參多糖的分离纯化及在延缓皮肤衰老方面的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人參的干燥根及根茎 河北省安国市药材市场; α -淀粉酶(酶活力 4000 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力 3000 U/g) 分析纯, 麦克林试剂生化科技有限公司; 无水乙醇 市售, 分析纯; 窄分部普鲁兰多糖标准品 日本 Shodex 公司; Cell Counting Kit-8(CCK-8) 试剂盒、人基质活性氧(ROS)ELISA 试剂盒、人基质丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒、人基质谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、人基质超氧化物歧化酶(SOD)ELISA 试剂盒 深圳子科生物科技有限公司; 人基质金属蛋白酶 1(MMP-1)ELISA 试剂盒、人基质金属蛋白酶 9(MMP-9)ELISA 试剂盒 杭州联科生物技术股份有限公司。

TDZ4-WS 离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; DNM-9602 酶标分析仪 北京普朗新技术有限公司; BHC-1300IIB2 生物安全柜 苏州金净净化设备公司; Thermo Forma 3111 CO₂ 恒温培养箱 美国 Thermo 公司; XDS-500C 显微镜 上海蔡康光学仪器有限公司; UV-1750 紫外-可见分光光度计、GPC-20A 凝胶渗透色谱仪、RID-20A 示差折光检测器 日本岛津公司; iS10 红外(FT-IR)光谱仪 美国尼高力公司; AVANCE III 400M 核磁共振波谱仪 德国 BRUKER; TSKgel GMPWXL 水相凝胶色谱柱 东曹(上海)生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人參粗多糖(GPS)的制备 参考文献 [18] 制备人參粗多糖。称取干燥过筛后的人參样品,置于玻璃烧杯内,按料液比 1:30(g/mL)加入去离子水,在 70 $^{\circ}$ C 温度、60 Hz 超声功率下提取 30 min。待溶液冷却后离心(6000 r/min),取上清液。在上清液中加入约 4 倍体积的无水乙醇溶液,放置在 -20 $^{\circ}$ C 环境中醇沉 24 h。过滤收集沉淀,将其放入真空干燥箱(70 $^{\circ}$ C)中干燥至恒重,即得人參粗多糖(GPS),备用。

1.2.2 GPS 纯化 参考文献 [19] 对 GPS 进行纯化。利用 α -淀粉酶去除上述提取的 GPS 的淀粉。精密称取 10.0 g GPS, 用少量去离子水溶解后转移至 1000 mL 容量瓶中, 用去离子水定容, 得到 10 mg/mL 的 GPS 溶液。向配制好的 GPS 溶液中加入 800 U α -淀粉酶, 50~60 °C 酶解 30 min, 然后转移至沸水浴中加热 5 min 终止酶解反应。溶液降至室温后离心 (4000 r/min, 10 min), 收集上清液。

利用木瓜蛋白酶去除上述提取的 GPS 中的蛋白质。将 200 U 木瓜蛋白酶加入上述溶液中, 30~40 °C 酶解 2 h, 然后转移至沸水浴中加热 5 min 终止酶解反应。溶液降至室温后离心 (4000 r/min, 10 min), 收集上清液。

将上清液加热至 70 °C 以蒸发除去过多的水分, 浓缩至 50 mL, 向浓缩液加入 200 mL 无水乙醇, 摇匀, -20 °C 冰箱冻存静置 24 h, 过滤得到白色固体, 放置真空干燥箱中烘干 (60 °C) 至恒重, 得到 4.8 g 酶解后的 GPS。

取酶解后的 GPS 4.0 g, 配制成 10 mg/mL 的溶液。溶液用 DEAE-52 纤维素填料进行柱层析洗脱, 以去离子水为洗脱液, 使用试管收集, 每管收集 10 mL。采用苯酚-硫酸法对每管溶液在 490 nm 处吸光度进行检测, 对出现吸收峰的溶液进行收集, 将收集的溶液冷冻干燥 (-40 °C), 得到 2.5 g 人参精多糖 (GPS-1)。

1.2.3 GPS-1 的均一性鉴定及相对分子质量测定 采用高效凝胶渗透色谱法测定 GPS-1 的相对分子质量和纯度。采用 TSKgel GMPWXL 水相凝胶色谱柱, 以 0.1 mol/L NaNO_3 +0.06% NaN_3 (质量分数) 水溶液为流动相, 流速 0.6 mL/min, 检测温度 35 °C, 进样体积 20 μL 。采用示差折光检测器, 窄分部普鲁兰多糖标准品进行对照, 对 GPS-1 的分子量分布进行测试。

1.2.4 GPS-1 的初级结构表征 采用溴化钾压片法对 GPS-1 样品进行 FT-IR 测试, 波数范围: 400~4000 cm^{-1} , 光谱仪分辨率 4 cm^{-1} , 信噪比 50000:1, 扫描 64 次。采用核磁共振氢谱 (^1H NMR) 和核磁共振碳谱 (^{13}C NMR) 对 GPS-1 的初级结构进行表征: 称取 GPS-1 样品 5 mg, 放入核磁管, 加入 1 mL 氘代试剂 (重水) 充分溶解样品, 检测其 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图。

1.2.5 细胞培养、细胞活力测试 采用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青霉素 (10000 U/mL) 与链霉素 (10 mg/L) 混合液) 的 DMEM 培养基培养 HFF-1 细胞, 将其置于 37 °C, 5% CO_2 的培养箱中。显微镜下观察 HFF-1 细胞为贴壁细胞。

将处于对数生长期的细胞经胰蛋白酶消化, 显微镜下计数后制成 3×10^4 个细胞/L 的细胞悬液。分别取 100 μL 至 96 孔培养板, 每种细胞每块板设置 3 个复孔, 3×10^3 个细胞/孔, 然后添加 100 μL 不同质量浓度的 GPS-1 溶液, 同时以 100 μL 培养液做空白

对照, 将培养板放置 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养过夜。分别处理细胞在 0、48 h 后, 按 1:10 体积比混合 CCK-8 和无血清必需基本培养基, 每孔 100 μL 加入待测孔中, 在 37 °C、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h。用酶标仪测定 450 nm 波长下培养板每孔吸光度, 记录数值。

1.2.6 急性光损伤模型的建立及分组 参照文献 [14] 建立急性光损伤细胞模型。选择生长状态良好、对数生长期的 HFF-1, 接种密度 3×10^4 个/孔, 建立实验分组, 每组设置 3 个复孔。空白对照组: 不照射 UVB, 不加 GPS-1 溶液, 细胞正常培养 72 h; UVB 照射组: 细胞正常培养 48 h 后, 在功率密度 68 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、照射距离 10 cm 条件下, UVB 辐照 100 s 后细胞培养 24 h; GPS-1 高中低剂量组 (200、500 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 细胞正常培养 24 h 后, 添加 GPS-1 溶液和培养条件下培养 24 h, 然后在功率密度 68 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、照射距离 10 cm 条件下, UVB 辐照 100 s 后, 再进行细胞培养 24 h。

1.2.7 GPS-1 对 SOD、MDA、MMP-1、MMP-9、ROS、GSH-Px 的影响 培养后, 收集细胞上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书对 SOD、MDA、MMP-1、MMP-9、ROS、GSH-Px 含量进行测定。

1.3 数据处理

采用 SPSS statistics 软件对数据进行 One-way ANOVA 检验, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $*P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $**P < 0.01$ 为差异极其显著。

2 结果与分析

2.1 GPS-1 的纯度及相对分子质量分析

纯化后的人参多糖 GPS-1 的 HPGPC 结果显示, 分子量分布图 (图 1) 有两个峰, 其中峰 1 峰面积占 95.13%, 此峰数均分子量 (M_n) 为 1.079 kDa, 重均分子量 (M_w) 为 2.104 kDa, 分布宽度指数 PD (M_w/M_n) 为 1.95。峰 2 峰面积占比 4.87%, 数均分子量 (M_n) 为 0.055 kDa, 重均分子量 (M_w) 为 0.072 kDa, 分布宽度指数 PD (M_w/M_n) 为 1.29。结果表明 GPS-1 分子量分布相对均一, 多糖纯度为 95.13%, 相对分子质量较低。

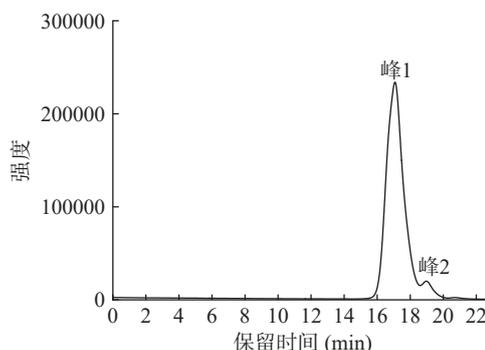


图 1 GPS-1 的分子量分布凝胶色谱图

Fig.1 GPC chromatogram of GPS-1 for molecular weight determination

2.2 GPS-1 的初级结构表征

2.2.1 GPS-1 的红外光谱表征 图 2 为 GPS-1 的 FT-IR 谱图, 该谱图表现出多糖的特征吸收峰, 分别在 3385、2928、1632、1594、1413、1364、1153、1079、1024、931 和 850 cm^{-1} 处出现特征吸收峰。在 3385 cm^{-1} 附近出现相对较宽的强吸收峰, 是由分子间或分子内的 O-H 伸缩振动引起的, 表明样品含有多糖羟基。2928 cm^{-1} 附近的肩峰, 是由 C-H 或 O-H 的伸缩振动引起的特征吸收峰^[20]。1632 cm^{-1} 是 C=O 非对称伸缩振动峰, 是未酯化的糖醛羧基特征峰^[21]; 1413 cm^{-1} 处为 C-H 的变形吸收峰。在 1200~1000 cm^{-1} 区间的多糖特征吸收峰是由 C-O-C 和 C-O-H 的伸缩振动引起的^[20]。在 1024、1079 和 1153 cm^{-1} 处分别有三个吡喃糖特征吸收峰, 表明该样品多糖结构为吡喃糖环状结构。 α -型或 β -型吡喃葡萄糖通常在 960~730 cm^{-1} 内有特征吸收峰, 其中, 在 844 \pm 8 cm^{-1} 处有吸收峰为 α -型异构体, 在 891 \pm 7 cm^{-1} 处有吸收峰为 β -型异构体^[22]。该样品的红外谱图在 891 cm^{-1} 处无吸收峰, 在 850 cm^{-1} 处出现明显的吸收峰, 表明存在 α -D-吡喃葡萄糖^[23]。红外光谱分析结果表明 GPS-1 存在 α -D-吡喃葡萄糖构型。

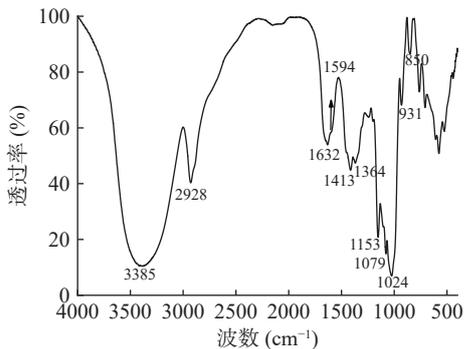


图 2 GPS-1 的红外光谱图
Fig.2 FTIR spectra of GPS-1

2.2.2 GPS-1 的核磁表征 糖苷异头氢的 ^1H NMR 信号一般处于 δ 4.2~5.8 ppm 范围, 其中, α -型糖苷的异头质子处于 δ 4.8~5.8 ppm 范围内, β -型糖苷的异头质子处于 δ 4.2~4.8 ppm 范围^[24]。图 3 显示, δ 4.7 ppm 为重水溶剂峰, δ 3.2~4.0 ppm 为人参多糖环上的

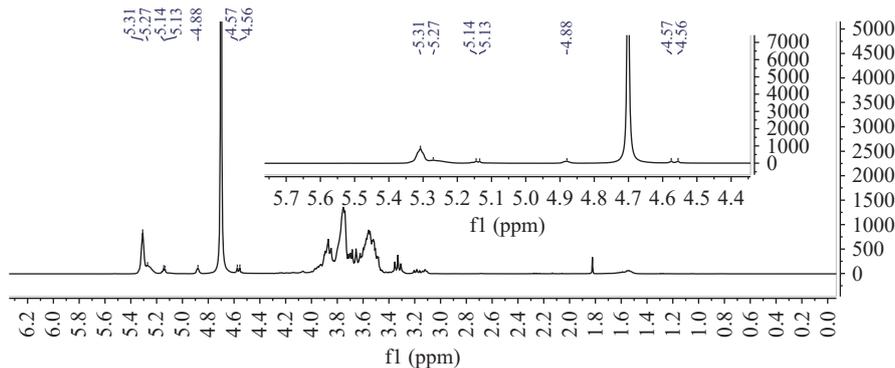


图 3 GPS-1 在 400 MHz 条件下的 ^1H NMR 谱图
Fig.3 ^1H NMR spectrum of GSP-1 recorded at 400 MHz

质子信号。人參多糖糖苷键的质子化学位移在 δ 4.5~5.4 ppm 范围内, 表明含有 α -型和 β -型两类糖苷键。在糖苷键质子共振区 δ 4.2~5.8 ppm 范围内出现 7 个信号峰, 表明样品由 7 种单糖组成。根据文献 [25] 报道推断氢谱上 7 个信号 δ 5.31 ppm、 δ 5.27 ppm、 δ 5.14 ppm、 δ 5.13 ppm、 δ 4.88 ppm、 δ 4.57 ppm、 δ 4.56 ppm 分别归属为 α -D-葡萄糖、 α -D-半乳糖醛酸、 α -D-阿拉伯糖、 α -D-岩藻糖、 α -D-核糖、 β -D-甘露糖、 β -D-阿拉伯糖糖苷键质子信号。

^{13}C NMR 谱图中, 糖苷碳的信号共振区通常在 δ 95~110 ppm 范围内。根据图 4 可知, δ 100.33 ppm、 δ 99.94 ppm、 δ 99.69 ppm、 δ 99.58 ppm、 δ 98.57 ppm、 δ 98.25 ppm、 δ 95.75 ppm 分别对应七种单糖的糖苷碳, 表明 GPS-1 含有七种单糖成分, 与其 ^1H NMR 结果一致。糖环上化学位移一般在 δ 50~85 ppm 范围内, 其中, 未发生取代的 C6 在 δ 60~63 ppm 附近, 连接到另一个糖残基的 C6 特征峰出现在 δ 65~70 ppm 附近; 糖环上 C2、C3、C4 位置未发生取代时特征信号峰在 δ 70~77 ppm 范围内, 糖环上 C2、C3、C4 位置发生取代时特征信号峰在 δ 77 ppm 以上^[26]。图 4 中 GPS-1 信号在 δ 68~69.5 ppm 范围内有特征峰, 说明 C6 位发生取代; 在 δ 70~77 ppm 范围内出现明显的特征峰, 可以判断 GPS-1 在 C2、C3、C4 位置未发生取代。

2.3 GPS-1 对正常生长 HFF-1 细胞增殖的影响

本实验使用可快速高灵敏度检测细胞增殖和细胞毒性的 CCK-8 试剂盒, 考察 GPS-1 对正常生长 HFF-1 细胞增殖情况的影响。细胞存活率是直接表达各组细胞状态的指标, 反映细胞增殖情况, 细胞存活率越高说明细胞状态越好^[27]。由图 5 可知, 与对照组相比, 当 GPS-1 的质量浓度小于等于 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 HFF-1 细胞存活率无显著影响 ($P>0.05$)。当 GPS-1 的质量浓度大于 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HFF-1 细胞存活率降低, GPS-1 质量浓度增至 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞存活率降至 87.1% ($P<0.01$)。最终选取 200、500 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三个质量浓度用于后续实验。

2.4 GPS-1 对 UVB 致 HFF-1 细胞损伤的保护作用

由图 6 可知, 经 UVB 辐射后, 与对照组相比,

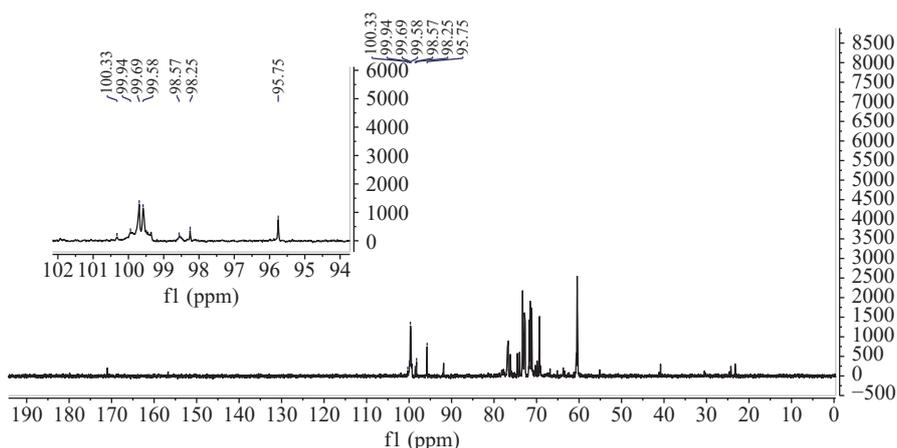


图4 GPS-1 在 400 MHz 条件下的¹³C NMR 谱图

Fig.4 ¹³C NMR spectrum of GSP-1 recorded at 400 MHz

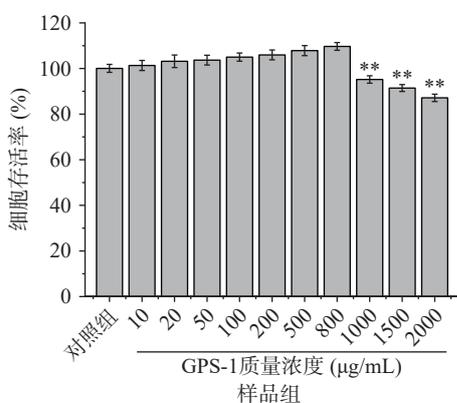


图5 GPS-1 对正常生长 HFF-1 细胞活力影响

Fig.5 Effect of GPS-1 on the viability of normal growing HFF-1 cells

注: 与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

UVB 照射组细胞存活率下降了 20.1%, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$), 说明 UVB 致 HFF-1 细胞损伤模型建立成功。而经 GPS-1 保护干预后, 与 UVB 照射组相比, GPS-1 质量浓度分别为 200、500 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率分别增加了 1.9% ($P < 0.05$)、9.5% ($P < 0.01$) 和 18.8% ($P < 0.01$), 均具有显著性差

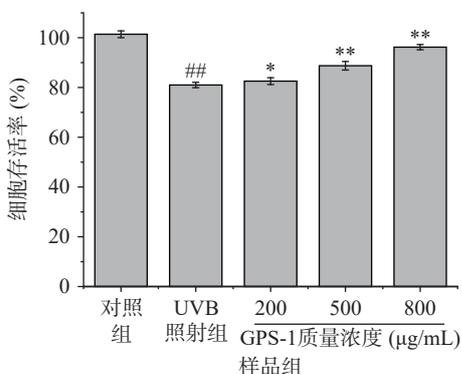


图6 GPS-1 对 UVB 照射组 HFF-1 细胞活力影响

Fig.6 Effect of GPS-1 on the viability of HFF-1 cells in UVB irradiation group

注: 与对照组相比, ## $P < 0.01$; 与 UVB 照射组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

异, 说明 GPS-1 对 UVB 损伤 HFF-1 细胞具有明显的保护作用, 在 GPS-1 质量浓度为 200~800 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 随着质量浓度增高, 对损伤细胞的保护作用随之增强。

2.5 GPS-1 对 UVB 照射组细胞内 SOD、MDA、ROS、GSH-Px、MMP-1、MMP-9 的影响

皮肤成纤维细胞是合成胶原及弹性纤维的主要场所, 虽然此种细胞位于真皮层, 但更易发生氧化损伤^[28]。当 UVB 照射成纤维细胞时, 细胞内 SOD 和 GSH-Px 抗氧化酶的活性受到抑制, 当大量的 ROS 未能得到及时清除出现氧化应激反应, 将破坏细胞内脂质、蛋白质、核酸等大分子物质, 激活基质金属蛋白酶表达, 导致脂质分解, 引发脂质过氧化反应, 形成过氧化脂质产物(MDA)^[14]。因此, 测定 MDA 含量, 可间接反映细胞损伤程度, 而 SOD 作为衡量机体抗氧化能力大小的重要因素, 可反映细胞消除 ROS 的能力^[29]。

如图 7 所示, 与空白对照组相比, UVB 照射组 HFF-1 细胞中 ROS 和 MDA 含量显著增高 ($P < 0.01$), SOD 和 GSH-Px 酶活力显著降低 ($P < 0.01$), 说明 UVB 照射对 HFF-1 有明显损伤作用, 大量的 ROS 未能被细胞清除, 同时导致生成过量的 MDA, 造成细胞氧化损伤, 引起机体衰老。与 UVB 照射组相比, 经 GPS-1 保护干预后, HFF-1 中 ROS 含量降低, GPS-1 低、中、高剂量组分别下降了 21.5%、42.8%、56.5%, 且具有显著性差异 ($P < 0.01$), 说明 GPS-1 可有效降低因 UVB 刺激产生的 ROS。同样地, 当 GPS-1 质量浓度分别为 200、500 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, HFF-1 中 MDA 含量降低, 分别为 4.9、3.4、2.9 nmol/mL ($P < 0.01$), 呈剂量依赖性。与 UVB 照射组相比, 当 GPS-1 质量浓度分别为 200、500 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, SOD 含量分别提高了 32.5%、75.0%、128.9% ($P < 0.01$), 说明 GPS-1 显著提升 HFF-1 细胞 SOD 活力。与 UVB 照射组相比, 当 GPS-1 质量浓度分别为 200、500 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, GSH-Px 含量分别提高了 29.7%、59.9%、108.3% ($P < 0.01$), 说明 GPS-1 可

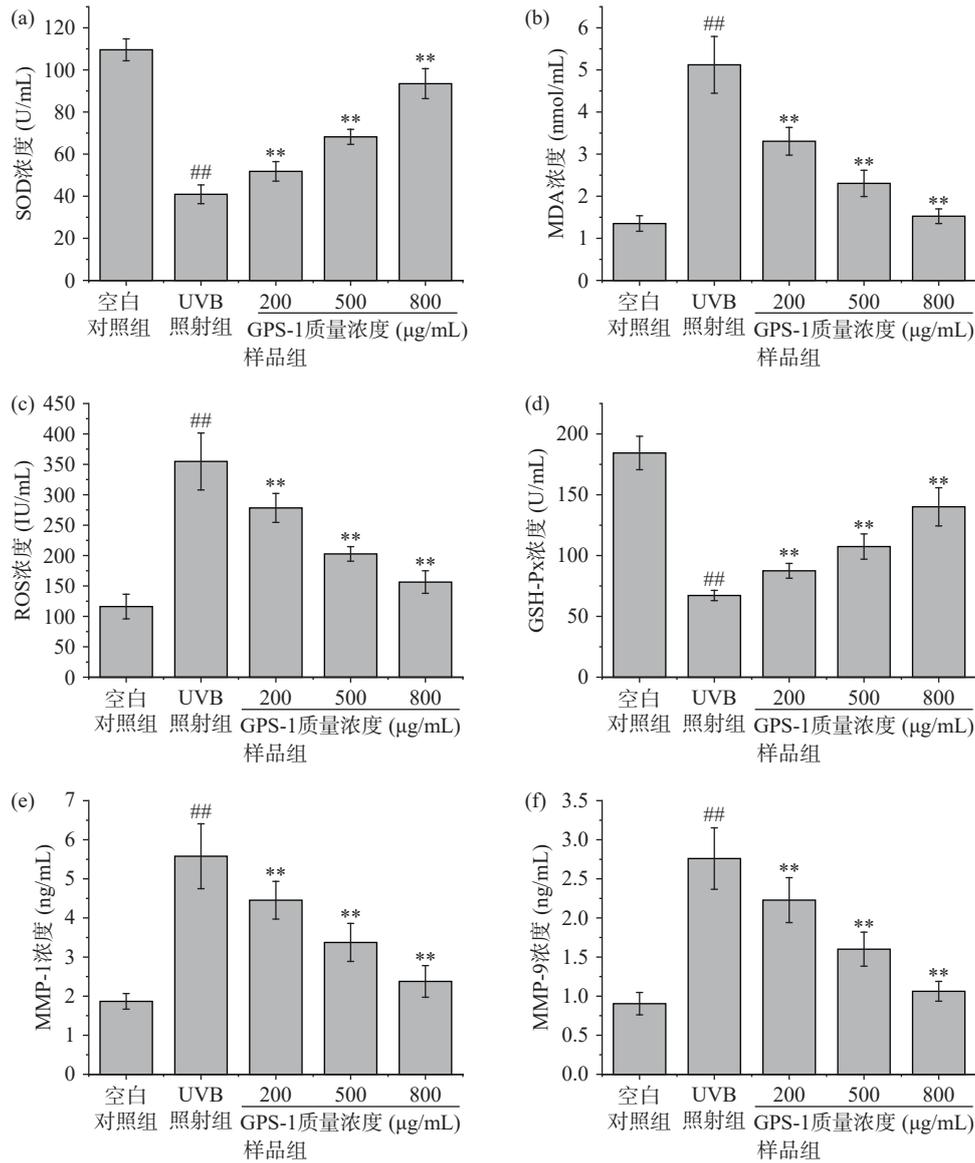


图 7 GPS-1 对 HFF-1 细胞内 SOD(a)、MDA(b)、ROS(c)、GSH-Px(d)、MMP-1(e)和 MMP-9(f)的影响
Fig.7 Effects of GPS-1 on SOD (a), MDA (b), ROS (c), GSH-Px (d), MMP-1 (e) and MMP-9 (f) in HFF-1 cells
注: 与对照组相比, ## $P < 0.01$; 与 UVB 照射组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

以调节 HFF-1 细胞 GSH-Px 含量。在衰老细胞中, ROS 和 MDA 含量显著增加, SOD 和 GSH-Px 酶活力显著降低, 在该模型下, GPS-1 能有效减少细胞中 ROS 和 MDA 含量, 有效提高 SOD 和 GSH-Px 酶活力, 说明 GPS-1 能够通过减少 ROS 含量, 防止细胞产生氧化应激, 对 MDA 的产生具有抑制作用, 降低细胞氧化损伤, 同时促进细胞内 SOD 和 GSH-Px 活力提升, 提高细胞抗氧化能力, 从而帮助细胞对抗由 UVB 诱导引起的细胞衰老。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一种具有广泛特异性的而且几乎可以分解所有细胞外基质成分的水解酶。MMP-1 特异性降解 I 型胶原蛋白, 使得 I、III 型胶原比例下降, MMP-9 作为一种明胶酶, 可以继续降解 MMP-1 降解产物, 导致皮肤胶原蛋白流失, 继而发生衰老发生^[30]。如图 7e、图 7f 所示, 与 UVB 线照射组相比, 低剂量的人参多糖即可极显著降低

HFF-1 细胞内 MMP-1 和 MMP-9 的含量($P < 0.01$), 而当添加高剂量的人参多糖时, MMP-1 和 MMP-9 含量接近正常未经 UVB 照射组细胞内水平, 说明人参多糖可以抑制 MMP-1 和 MMP-9 的表达, 达到减少胶原分解的功效, 改善细胞结构, 从而具有延缓皮肤衰老的效果。

3 结论

本实验以人参为原料, 通过提取分离纯化得到人参精多糖。采用高效凝胶渗透色谱法对人参精多糖进行分析, 结果表明该人参多糖为均一性多糖, 相对分子质量为 2.104 kDa, 多糖纯度为 95.13%, 另外通过红外光谱、核磁谱图对人参结构进行了初步分析。进一步利用 UVB 照射 HFF-1 细胞模型, 通过 ROS、MDA、SOD、GSH-Px、MMP-1 和 MMP-9 等指标的测定, 对人参精多糖进行抗皮肤衰老的探究。实验结果表明人参精多糖可有效去除细胞中的 ROS,

抑制 MDA 的含量,缓解由外源条件(UVB)造成的细胞受损,同时,促进 SOD 和 GSH-Px 抗氧化酶活提升,提高细胞抗氧化能力,通过维持氧化还原平衡来达到抗衰老的作用,为皮肤提供有利的组织环境;此外,人参精多糖还可抑制 MMP-1 和 MMP-9 的表达,达到减少胶原分解的功效,维持皮肤弹性,延缓皮肤衰老。因此,人参多糖具有一定的抗皮肤衰老作用,可作为一种延缓衰老功效原料,应用于化妆品、保健品等领域,可以有力提升人参的市场竞争能力,进一步提高经济效益。

参考文献

- [1] BAI F, FAN C, LIN X, et al. Hemin protects UVB-induced skin damage through inhibiting keratinocytes apoptosis and reducing neutrophil infiltration[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2023, 238: 112604.
- [2] 邓映, 钟建桥. 皮肤光损伤与氧化应激研究进展[J]. *临床皮肤科杂志*, 2017, 46(9): 671-673. [DENG Y, ZHONG J Q. Advances in skin photodamage and oxidative stress[J]. *Journal of Clinical Dermatology*, 2017, 46(9): 671-673.]
- [3] 殷花, 林忠宁, 朱伟. 皮肤光老化发生机制及预防[J]. *环境与职业医学*, 2014, 31(7): 565-569. [YIN H, LIN Z N, ZHU W. Mechanisms and prevention of skin photoaging[J]. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 2014, 31(7): 565-569.]
- [4] DENG L, LI Y, WU Q, et al. Investigating potential ferroptosis-related differentially expressed genes of UVB-induced skin photodamage[J]. *International Journal of Dermatology*, 2023, 62: 79-87.
- [5] LEE H, KIM S Y, LEE S W, et al. Amentoflavone-enriched *Selaginella rossii* protects against ultraviolet- and oxidative stress-induced aging in skin cells[J]. *Life*, 2022, 12(12): 2106-2106.
- [6] TAO R Z, LU K Q, ZONG G F, et al. Ginseng polysaccharides: Potential antitumor agents[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2022, in press.
- [7] 董微, 郜玉钢, 何忠梅, 等. 人参中人参皂苷提取分离研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014(17): 366-369. [DONG W, GAO Y G, HE Z M, et al. Research progress in extraction and separation technology of ginsenosides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014(17): 366-369.]
- [8] 赵信平, 徐龙权, 宋建国, 等. 人参皂苷 Rb3 木糖苷酶的纯化及其酶学性质[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(17): 112-117. [ZHAO X P, XU L Q, SONG J G, et al. Purification and characterization of ginsenoside Rb3 xylosidase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(17): 112-117.]
- [9] 赵钰, 刘春莹, 赵妍, 等. 人参果浆中人参皂苷 Re 的提取和生物转化[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 25-30. [ZHAO Y, LIU C Y, ZHAO Y, et al. Extraction and biotransformation of ginsenoside Re from ginseng fruit pulp[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(4): 25-30.]
- [10] 李珊珊, 祝贺, 祁玉丽, 等. 人参果多糖的分离纯化及体外抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 73-76, 99. [LI S S, ZHU H, QI Y L, et al. Research on extraction, purification and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharide from ginseng berry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(4): 73-76, 99.]
- [11] 杨松, 王隶书, 刘美辰, 等. 人参多糖对氧化应激损伤肝细胞的保护作用机制研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(5): 280-285, 292. [YANG S, WANG L S, LIU M C, et al. Mechanism

of protective effect of ginseng polysaccharide on hepatocytes induced by oxidative stress[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(5): 280-285, 292.]

- [12] 王顺鹏, 韩翰. 人参多糖抗氧化延缓衰老作用研究进展[J]. *沈阳医学院学报*, 2020, 22(1): 87-89. [WANG S P, HAN H. Research progress on anti-aging effects of ginseng polysaccharide through anti-oxidation[J]. *Journal of Shenyang Medical College*, 2020, 22(1): 87-89.]
- [13] GUO M K, SHAO S, WANG D, et al. Recent progress in polysaccharides from *Panax ginseng* CA Meyer[J]. *Food & Function*, 2021, 12(2): 494-518.
- [14] 董坤, 翟文丽, 王兰青, 等. 草莓叶水提物对 UVB 致皮肤损伤的保护作用[J]. *精细化工*, 2021, 38(4): 806-814. [DONG K, ZHAI W L, WANG L Q, et al. Protective effect of strawberry (*Fragaria*×*Ananassa*) leaves water extract on skin damage by UVB[J]. *Fine Chemicals*, 2021, 38(4): 806-814.]
- [15] 王慧云. 党参多糖对活性氧诱导的血管内皮细胞衰老的影响及机制研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018. [WANG H Y. Study on the effect and mechanism of *Codonopsis pilosula* polysaccharide on the senescent vascular endothelial cells induced by active oxygen[D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2018.]
- [16] 赵苑伶, 张雪, 陈林珍, 等. 铁皮石斛多糖的分离纯化及抗衰老活性研究[J]. *世界中医药*, 2022, 17(17): 2410-2415. [ZHAO Y L, ZHANG X, CHEN L Z, et al. Separation, purification, and anti-aging activity of *Caulis Cendrobii* Officinalis polysaccharides[J]. *World Chinese Medicine*, 2022, 17(17): 2410-2415.]
- [17] 朱秋轶, 宋玉, 刘星雨, 等. 羊乳酪蛋白酶解物对秀丽线虫衰老的改善作用[J/OL]. *现代食品科技*, 2022: 1-9. doi:10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0466. [SONG Q Y, SONG Y, LIU X Y, et al. Effect of goat milk casein hydrolysates on senescence of *Caenorhabditis elegans* [J/OL]. *Modern Food Science and Technology*, 2022: 1-9. doi:10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0466.9078.2023.4.0466.]
- [18] 赵立春, 张亚玉, 李小沛, 等. 人参多糖 3 种提取工艺的优化比较[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(21): 254-260. [ZHAO L C, ZHANG Y Y, LI X P, et al. Optimization and comparison of three extraction processes of ginseng polysaccharide[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(21): 254-260.]
- [19] 黄冬婷, 黄俊生, 汤静洁, 等. 超声辅助离子液体提取人参多糖工艺及其抗氧化活性[J]. *精细化工*, 2022, 39(9): 1851-1857, 1871. [HUANG D T, HUANG J S, TANG J J, et al. Ultrasonic-assisted ionic liquid extraction of ginseng polysaccharide and its antioxidant activity[J]. *Fine Chemicals*, 2022, 39(9): 1851-1857, 1871.]
- [20] YU X H, LIU Y, WU X L, et al. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156: 9-18.
- [21] 郑艳. 西洋参多糖的分离纯化及结构研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2015. [ZHENG Y. Purification and structural analysis of the polysaccharides from *Panax quinquefolius* [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2015.]
- [22] 盈盈. 一种低分子量中性人参多糖的提纯与表征[D]. 北京: 北京林业大学, 2018. [CHEN Y Y. Purification and characterization of a low molecular weight polysaccharide from *Panax ginseng* by enzymatic hydrolysis[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018.]
- [23] NI W, ZHANG X, BI H T, et al. Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activi-

- ty[J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(18): 2512–2518.
- [24] WANG F X, WANG W, HUANG Y L, et al. Characterization of a novel polysaccharide purified from a herb of *Cynomorium songaricum* Rupr[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 47: 79–86.
- [25] HE P F, HE L, ZHANG A Q, et al. Structure and chain conformation of a neutral polysaccharide from sclerotia of *Polyporus umbellatus*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 155: 61–67.
- [26] 李先华. 人参多糖的分离、纯化及结构研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2007. [LI X H. Isolation, purification and structural analysis of the polysaccharides from *Panax ginseng*[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2007.]
- [27] 王振. 不同茶类抗 UVB 致表皮细胞衰老作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018. [WANG Z. Study on anti-aging effect of different tea against UVB induced epidermal cells[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2018.]
- [28] 李振洁, 彭丽倩, 高爱莉, 等. 枸杞多糖对紫外线致人皮肤成纤维细胞脂质损伤的防御作用[J]. 中国激光医学杂志, 2017, 26(3): 127–132. [LI Z J, PENG L Q, GAO A L, et al. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on UV-mediated lipid peroxide damage of HSF cells[J]. *Chinese Journal of Laser Medicine & Surgery*, 2017, 26(3): 127–132.]
- [29] 李强, 李宏彬, 布海霞, 等. 二氧化硫对小鼠肺组织超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 新乡医学院学报, 2009, 26(3): 251–253. [LI Q, LI H B, BU H X, et al. Effect of sulfur dioxide on the activity of superoxide dismutase and the concentration of malondialdehyde in the lung tissue of mice[J]. *Journal of Xinxiang Medical College*, 2009, 26(3): 251–253.]
- [30] MONDAL S, ADHIKARI N, BANERJEE S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A mini-review[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 194: 112260.