

真空提取核桃粕多酚的抗氧化活性研究

苏 晨^{1,2}, 忠 梦^{1,2}, 吉洋洋³, 何爱民³, 荣瑞芬^{1,2*}

[1. 北京联合大学生物化学与工程学院, 北京 100023; 2. 北京市生物活性物质与功能食品
重点实验室, 北京 100191; 3. 河北省(邢台)核桃产业技术研究院, 河北 054300]

摘 要: **目的** 探究真空提取的核桃粕(walnut meal)多酚的抗氧化活性。**方法** 以非真空条件下提取的多酚为对照, 采用超声波辅助真空法提取核桃粕多酚, 用 HPD-100 型大孔树脂对多酚进行纯化, 福林酚(Folin-Ciocalte)法测定多酚含量, 通过试剂盒检测多酚对 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、超氧阴离子自由基的清除率及 Fe^{3+} 还原能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)来评价其体外抗氧化活性, 用 cck8 (cell counting kit-8)法测定不同浓度的核桃粕多酚对 HepG2 细胞的毒性作用, 确定 3 个无毒性作用浓度, 以 770 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞建立氧化应激损伤模型, 通过测定 HepG2 细胞中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力、谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量探究 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 核桃粕多酚对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用。**结果** 真空条件下提取的多酚含量为 26.96 mg/g, 比非真空条件下提取的多酚含量高 14.50%; 经 HPD-100 型大孔树脂纯化后, 对照组和真空组核桃粕多酚纯度分别由 22.69%、26.60%提高至 73.87%、77.53%; 纯化后, 对照组与真空组多酚质量浓度为 0.5 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除率高达 93.83%、93.67%, 高于维生素 C 的清除率 91.03%; 同一浓度范围内, 真空条件下提取的核桃粕多酚对超氧阴离子自由基的清除率和 FRAP 均显著高于对照组多酚($P<0.05$), 其中多酚质量浓度为 2.0 mg/mL 时, 对照组与真空组多酚的 FRAP 分别为 8.91 $\mu\text{mol/L}$ 、9.92 $\mu\text{mol/L}$, 均高于维生素 C 的 FRAP (7.91 $\mu\text{mol/L}$); 核桃粕多酚可以使受氧化损伤的 HepG2 细胞内 MDA 含量明显减少, 并能提高受氧化损伤细胞内 SOD 活力及 GSH 含量。**结论** 真空条件有利于核桃粕多酚的提取, 提取纯度较高, 纯化后核桃粕多酚具有较好的体外氧化活性, 对 HepG2 细胞氧化损伤有一定的保护作用。

关键词: 真空; 核桃粕多酚; 抗氧化活性; HepG2 细胞; 氧化损伤

Study on the antioxidant activity of polyphenols from walnut meal extracted by vacuum

SU Chen^{1,2}, ZHONG Meng^{1,2}, JI Yang-Yang³, HE Ai-Min³, RONG Rui-Fen^{1,2*}

[1. College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China; 2. Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing 100191, China; 3. Walnut Engineering Technology Research Center of Hebei (Xingtai), Hebei 054300, China]

ABSTRACT: Objective To investigate the antioxidant activity of polyphenols extracted from walnut meal under vacuum conditions. **Methods** Polyphenols extracted under non-vacuum conditions were used as control, and the

基金项目: 河北省科技计划项目(18963002D-6)

Fund: Supported by the Hebei Province Science and Technology Plan Project (18963002D-6)

*通信作者: 荣瑞芬, 博士, 教授, 主要研究方向为农产品贮藏加工中营养品质保持。E-mail: ruifen@buu.edu.cn

*Corresponding author: RONG Rui-Fen, Ph.D, Professor, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China. E-mail: ruifen@buu.edu.cn

polyphenols were extracted by ultrasonic-assisted method under vacuum conditions, and the polyphenols were purified by HPD-100 type macroporous resin. The content of polyphenols was determined by Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity *in vitro* of the polyphenols was evaluated by measuring the scavenging rates of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, superoxide anion radicals and ferric reducing antioxidant power (FRAP) by kit, the toxic effects of different concentrations of walnut meal polyphenols on HepG2 cells were determined by the cell counting kit-8 (cck8) method, the 3 non-toxic effect concentrations were determined, oxidative stress injury model was established by inducing HepG2 cells with 770 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . The content malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione (GSH) content in HepG2 cells were measured to explore the protective effect of walnut meal polyphenols on oxidative damage of HepG2 cells at 12.5, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g/mL}$. **Results** The content of polyphenols extracted under vacuum conditions was 26.96 mg/g, which was 14.50% higher than that of polyphenols extracted under non-vacuum conditions. After purification by HPD-100 macroporous resin, the purity of walnut meal polyphenols in the control and vacuum groups increased from 22.69% and 26.60% to 73.87% and 77.53%, respectively. The scavenging rates of DPPH radicals were 93.83% and 93.67% in the control and vacuum groups after purification at a mass concentration of 0.5 mg/mL, which was higher than that of vitamin C at 91.03%. In the same concentration range, the scavenging rate of superoxide anion radicals and Fe^{3+} reducing antioxidant power of walnut meal polyphenols extracted under vacuum conditions were significantly higher than that of control polyphenols ($P < 0.05$), when the mass concentration of polyphenols was 2.0 mg/mL, the Fe^{3+} reducing antioxidant power of polyphenols in the control and vacuum groups were 8.91 and 9.92 $\mu\text{mol/L}$, respectively, which were higher than that of vitamin C (7.91 $\mu\text{mol/L}$). Walnut meal polyphenols significantly reduced the MDA content of oxidatively damaged HepG2 cells, and increased the SOD activity and GSH content in oxidatively damaged cells. **Conclusion** The vacuum condition is conducive to the extraction of polyphenols from walnut meal with high extraction purity. Purified walnut meal polyphenols have good oxidative activity *in vitro*, and have certain protective effect on oxidative damage in HepG2 cells.

KEY WORDS: vacuum; walnut meal polyphenols; antioxidant activity; HepG2 cell; oxidative damage

0 引言

核桃栽培历史悠久,是世界公认的生态友好型和经济型树种。核桃营养价值丰富,具有保护神经细胞、抗氧化、降血脂、抗肿瘤等多种保健作用^[1-3]。核桃粕是核桃仁榨油后的副产物,但目前仅有少量核桃粕被用于核桃蛋白粉的加工^[4],更多则被用做动物饲料或肥料,开发利用程度不高,造成资源的浪费^[5]。

多酚是指一类具有多个酚羟基结构的化合物^[6],可通过提供氢原子或电子来清除自由基,具有良好的抗氧化活性^[7]。核桃粕中含有丰富的多酚物质,例如,梁杏^[8]利用高效液相色谱-串联质谱法从核桃粕中鉴定出 12 种多酚化合物。此外,研究表明核桃粕多酚在抗氧化^[9]、降血脂^[10]、神经保护^[11]等方面功效明显,还具有一定的抗肿瘤活性^[12]、抑菌活性^[13]。目前,对多酚抗氧化活性的研究主要包括体外和体内两种方法,体外检测主要包括对 1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基、超氧阴离子自由基清除能力、铁离子还原/氧化能力的测定,体内方法主要包括细胞实验和动物

实验,细胞实验与动物实验相比具有方便、快捷、经济等优点^[14]。目前,常采用 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化应激模型进行氧化应激的研究, H_2O_2 是一种重要的活性氧分子,性质相对稳定且易穿过细胞膜,常作为细胞氧化应激损伤的试剂^[15],此外, HepG2 细胞拥有肝脏的大部分特异性代谢酶,它既具有正常肝细胞的生理功能,又具有癌细胞增殖速度快的特点,因此是一个适宜的人类肝细胞模型,被广泛地应用于细胞氧化应激保护作用的研究^[16]。

目前,多酚提取方法主要包括传统溶剂提取法、超声辅助溶剂浸提法、微波辅助溶剂浸提法、酶解-超声联合、亚临界提取法等方法^[17],其中超声辅助溶剂提取法操作方便且提取得率较高,是最常用的提取方法。真空条件可降低热敏性活性物随温度升高造成的氧化,且使体系更活跃,从而加快提取速率^[18]。近年来,植物多酚的提取技术及其生物活性逐渐成为研究热点,但多酚性质不稳定,提取过程中很容易发生氧化反应而损耗,真空条件下提取可减少或隔绝空气中的氧气,降低或避免多酚的氧化反应,从而保持多酚的生物活性,因此,本研究以核桃粕为原料,用

超声波辅助法在真空条件下提取核桃粕粗多酚,并通过 HPD-100 型大孔树脂对核桃粕多酚进行纯化,测定纯化后的核桃粕多酚的抗氧化活性和对 HepG2 氧化损伤细胞的保护作用,以期对核桃粕高值化利用以及核桃粕多酚的进一步研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃粕购于河北绿岭果业有限公司,为液压压榨制油后得到的干核桃粕,装于塑料袋内冰柜冻藏存放备用; HepG2 细胞: 本实验室自存。

石油醚(分析纯,天津市津东天正精细化学试剂厂); 无水乙醇(分析纯,天津市光复科技发展有限公司); 没食子酸标准品(纯度 $\geq 99\%$,天津市津科精细化工厂研究所); 福林酚试剂(Folin-Ciocaltea)(上海麦克林生化科技有限公司); 无水碳酸钠(分析纯,西陇科学股份有限公司); HPD-100 大孔树脂、维生素 C (vitamin C, VC)标准品(纯度 $\geq 99\%$)、DPPH 自由基清除能力检测试剂盒(BC4755)、超氧阴离子清除能力检测试剂盒(BC1415)、 Fe^{3+} 还原能力检测试剂盒(BC1315)(北京索莱宝科技有限公司); DMEM 高糖培养液、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 总蛋白定量测定试剂盒(A045-4-2)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(A001-3-2)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(A006-2-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(A003-1-3)(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器与设备

BL1206A 破壁料理机(美的集团); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); JB-B01 真空包装机、真空封口袋(200 mm $\times$ 300 mm)(拜杰京东自营旗舰店); DZKW-4 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂); FD-305 冷冻干燥机(济南俊德仪器有限公司); UV-1800 紫外可见分光光度计[岛津企业管理(中国)有限公司]; Infinite M Nano 酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 核桃粕粗多酚的提取

参照郑晓宁等^[19]的方法略作修改,取核桃粕样品,将其深黑色表皮去除后,用破壁机粉碎过 20 目筛,用石油醚以料液比 1:5 (g:mL)避光浸泡 12 h 脱脂,真空抽滤,回收石油醚,收集得到脱脂核桃粕粉,置于通风橱中挥干残留的石油醚,备用。分别称取一定量的脱脂核桃粕粉,分为真空组 and 对照组,真空组以 50% 的乙醇作为提取液,按照料液比 1:40 (g:mL)、超声功率 585 W、室温的条件下将原料和提

取液放入 200 mm $\times$ 300 mm 真空袋中,利用真空包装机(真空压力为 60 kPa)抽真空封口后超声提取多酚 70 min,对照组以同一提取方法在非真空条件下提取多酚,全程避光,4000 r/min 离心 20 min,收集上清液,得核桃粕粗多酚提取液,测定提取液中多酚含量后,于 55 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸浓缩,浓缩液置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 预冷冻处理后,冷冻干燥得核桃粕粗多酚样品。

1.3.2 核桃粕多酚的纯化

参照孙敬敬等^[20]的方法,HPD-100 树脂分离纯化核桃粕多酚工艺为: 上样液的质量浓度为 4.0 mg/mL,洗脱液乙醇的浓度为 70%,洗脱的流速为 2 BV/h,洗脱的体积为 3.6 BV。纯化后得到核桃粕多酚液,于 55 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸浓缩,浓缩液置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 预冷冻处理后,冷冻干燥得核桃粕多酚样品。多酚纯度计算按公式(1):

$$\text{多酚纯度}/\% = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (1)$$

式中: m 表示多酚类物质质量, g; M 表示混合物总质量, g。

1.3.3 多酚含量的测定

以没食子酸标准品绘制标准曲线,采用 Folin-Ciocalteu 法进行测定^[21]。以吸光值 A 为纵坐标,质量浓度 C 为横坐标,得没食子酸的标准曲线方程 $y=12.112x$ (回归系数 $r^2=0.9978$)。取待测提取液 1 mL,以蒸馏水为空白,于 765 nm 波长处测定吸光度,重复 3 次。用没食子酸标准曲线回归方程计算得到样品提取液中多酚浓度(C)。多酚含量计算按公式(2):

$$\text{多酚含量}/(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times D}{M} \quad (2)$$

式中: C 表示根据吸光度值计算出的溶液质量浓度, mg/mL; V 表示样品溶液体积, mL; D 表示稀释倍数; M 表示样品质量, g。

1.3.4 核桃粕多酚的抗氧化活性测定

(1) 核桃粕多酚体外抗氧化活性的测定

根据前期预实验结果,用蒸馏水配制成质量浓度为 5 mg/mL 的样品溶液,按照比例稀释样品浓度,其中, DPPH 自由基清除率实验中样品质量浓度为 0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mg/mL; 超氧阴离子自由基清除率实验中样品质量浓度为 0.6、1.2、1.8、2.4、3.0 mg/mL; Fe^{3+} 还原能力实验中样品质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.3 mg/mL, 3 组均以同浓度 VC 为阳性对照,按照试剂盒的操作方法,测定纯化后的真空组和对照组的核桃粕多酚对 DPPH、超氧阴离子自由基的清除率和 Fe^{3+} 还原能力。

(2) 核桃粕多酚对 HepG2 氧化损伤细胞的保护作用

参考 HE 等^[22]的方法,将 HepG2 细胞经复苏、培养和传代等操作,经几次传代后细胞进入稳定生长对数期可进行下一步实验。取处于细胞生长对数期的 HepG2 细胞,用 DMEM 完全培养基稀释为含有细胞数 3×10^5 个的细胞悬液,将细胞悬液加入 96 孔板中,每孔 100 μL ,分为空白组与实验组,于细胞培养箱中培养 24 h 后,弃去

上清液,加 100 μL PBS 洗涤细胞后,空白组加入 100 μL DMEM 完全培养基,实验组分别加入由 DMEM 完全培养基溶解的不同浓度的核桃粕多酚溶液 100 μL ,样品质量浓度为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0 $\mu\text{g/mL}$,每组设置 6 个重复孔,于细胞培养箱中培养 24 h 后,按照 cck8 法测定 HepG2 细胞存活率,细胞存活率计算按照公式(3)。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{实验组OD值}}{\text{空白组OD值}} \times 100\% \quad (3)$$

参照刘先皓等^[23]的方法以 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型的建立,按照上述细胞培养方法与分组,空白对照组中加 100 μL DMEM 培养基,实验组中分别加入 100 μL 由 DMEM 完全培养基溶解的不同浓度的 H_2O_2 溶液, H_2O_2 浓度分别为 100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{mol/L}$,每组设置 6 个重复孔,于细胞培养箱中培养 24 h 后,按照 cck8 法测定 HepG2 细胞存活率,以较为接近半数抑制的 H_2O_2 浓度作为氧化损伤浓度,完成建模。

根据细胞毒性实验结果,选取 3 个无毒性作用的核桃粕多酚浓度,将 HepG2 细胞接种于 60 mm 培养皿中,每皿接种细胞数量为 1×10^6 个,分为空白组、损伤组、样品保护组,用不同浓度的核桃粕多酚对氧化损伤细胞进行保护后,按照 cck8 法测定细胞存活率,按照试剂盒说明书要测定细胞的 MDA、GSH 含量及 SOD 活力、蛋白质浓度。

1.4 数据处理

所有实验均重复 3 次,结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。用 Origin 2018、GraphPad Prism 8 软件作图,用 SPSS 19.0 软件作单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 真空提取核桃粕多酚的含量与纯度

由表 1 可知,与对照组相比,在真空条件下提取的核桃粕多酚含量显著性升高($P < 0.05$),且经 HPD-100 大孔树脂纯化后,多酚纯度与对照组相比也有所提高,说明真空条件有利于多酚的提取,真空条件可降低热敏性活性物质随温度升高造成的氧化损耗,同时使体系更加活跃,可促进多酚的溶出,提高多酚的提取率^[18]。田莉等^[24]在真空条件下提取苹果渣中的多酚,与非真空条件下提取的多酚相比,其多酚含量由 5.57 mg/g 提高到 6.64 mg/g,付婧等^[25]对比了常规回流法与真空超声法对茶多酚的提取效果,发现茶多酚提取率由 17.58% 提高到 22.76%。与本研究真空中真空条件有利于多酚的提取的结论一致。

2.2 核桃粕多酚的体外抗氧化活性研究结果

由图 1 可知,核桃粕多酚对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基有较好的清除能力,且具有较强的 Fe^{3+} 还原能力,由图 1A 可知,核桃粕对照组多酚、真空组多酚对

表 1 真空提取核桃粕多酚的含量与纯度($n=3$)
Table 1 Content and purity of polyphenols of walnut meal extracted under vacuum ($n=3$)

组别	多酚含量 /(mg/g)	纯化前多酚纯度 /%	纯化后多酚纯度 /%
对照组	23.05 $\pm$ 0.36 ^a	22.69 $\pm$ 0.17	73.87 $\pm$ 0.10
真空组	26.96 $\pm$ 0.70 ^b	26.60 $\pm$ 0.11	77.53 $\pm$ 0.09

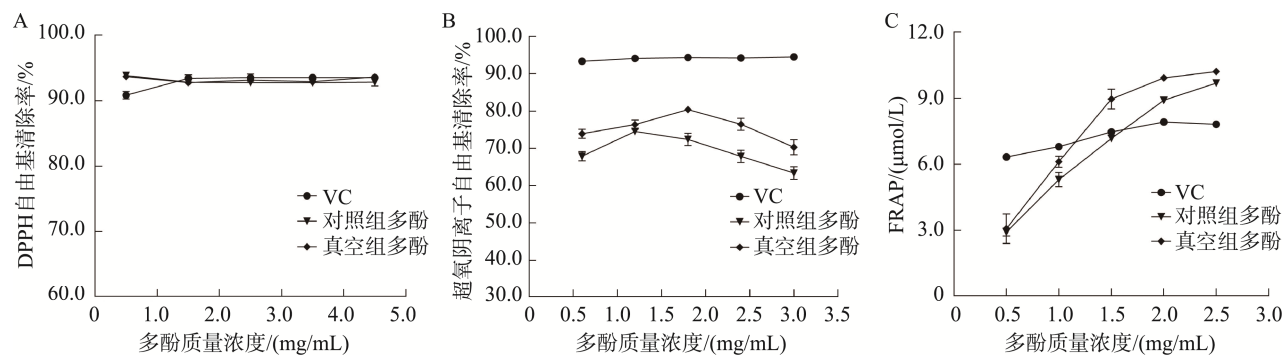
注:不同小写字母表示组间存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

DPPH 自由基的清除效果与阳性对照 VC 相当,当样品质量浓度大于 0.5 mg/mL 时,三者清除率基本不随浓度发生变化,且样品质量浓度为 0.5 mg/mL 时,三者对 DPPH 自由基清除率高达 93.83%、93.67%、91.03%;由图 1B 可知,核桃粕对照组、真空组多酚对超氧阴离子自由基的清除效果均不及 VC,但真空条件下提取的多酚对超氧阴离子自由基清除率始终显著高于对照组多酚($P < 0.05$),样品质量浓度为 0.6 mg/mL 时,对照组多酚、真空组多酚、VC 对超氧阴离子自由基清除率分别为 67.91%、73.94%、93.34%;由图 1C 可知,核桃粕对照组、真空组多酚与 VC 均具有较好的 Fe^{3+} 还原能力,且与浓度正相关,当样品质量浓度为 2.0 mg/mL 时,对照组与真空组多酚的 FRAP 分别为 8.91、9.92 $\mu\text{mol/L}$,均高于 VC 的 FRAP 7.91 $\mu\text{mol/L}$,当质量浓度为 2.5 mg/mL 时,VC、对照组多酚、真空组多酚的 Fe^{3+} 还原能力达到最大值,分别相当于 Fe^{2+} 当量 7.83、9.68、10.20 $\mu\text{mol/mL}$ 。当样品质量浓度大于 2.0 mg/mL 时,对照组和真空组核桃粕多酚的 Fe^{3+} 还原能力均优于 VC ($P < 0.01$),真空组多酚 Fe^{3+} 还原能力始终显著高于对照组多酚($P < 0.05$)。VC 是良好的天然抗氧化剂,以上研究结果表明核桃粕多酚具有较强的体外抗氧化能力,且真空条件下提取多酚有利于提高多酚对超氧阴离子自由基的清除率及 Fe^{3+} 还原能力。有研究表明核桃叶多酚浓度为 0.5 mg/mL 时对超氧阴离子的清除率约为 40%^[26]、核桃青皮多酚对超氧阴离子清除率最高达 54.06%^[27],与本研究结果相比,真空提取的核桃粕多酚具有更好的清除超氧阴离子自由基的能力。

2.3 核桃粕多酚对氧化损伤细胞的保护作用研究结果

2.3.1 核桃粕多酚对 HepG2 的细胞毒性

当细胞存活率低于 90% 时,可判定核桃粕多酚对细胞存在毒性作用^[22]。不同浓度核桃粕对照组与真空组多酚对 HepG2 细胞的毒性作用结果见图 2。以不添加核桃粕多酚的细胞存活率 100% 为空白对照,对照组多酚质量浓度为 800.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率为 72.78%,真空组多酚质量浓度为 200.0、400.0、800.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率分别为 69.92%、59.10%、41.20%,细胞存活率均低于 90%,说明在此浓度条件下已对细胞产生毒性作用;样品质量浓度为 12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组与真空组的细胞存活率均在 90% 以上,说明这 4 个多酚浓度均对细胞无毒性作用,后续实验需在核桃粕多酚对 HepG2 细胞无毒性作用的浓度范围内进行,故选择 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 多酚浓度进行后续实验。



注: A. 不同浓度多酚对 DPPH 自由基清除的影响; B. 不同浓度多酚对超氧阴离子自由基清除率的影响;

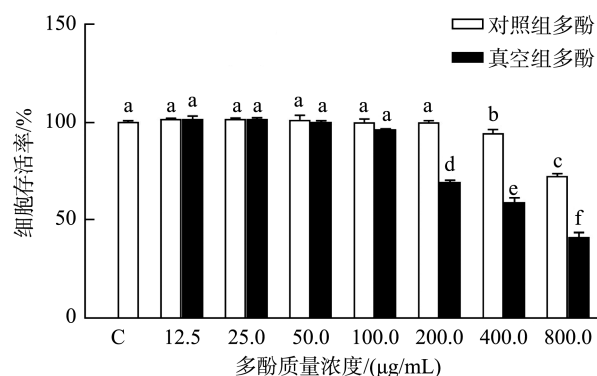
C. 不同浓度多酚对 Fe^{3+} 还原能力的影响。

图 1 核桃粕多酚的体外抗氧化活性比较($n=3$)

Fig.1 Comparison of antioxidant activities *in vitro* of walnut meal ($n=3$)

2.3.2 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型的建立

细胞氧化损伤模型的构建条件为, 在适宜损伤浓度条件下, 细胞产生明显氧化应激损伤且在抗氧化活性物质的作用下有机会被修复^[28], 所以该模型应控制造模后细胞存活率在 50% 左右。由图 3 可知当 H_2O_2 浓度在 600、800、



注: C 为空白组; 不同小写字母表示存在显著性差异($P < 0.05$), 下同。

图 2 核桃粕多酚对 HepG2 细胞存活率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of walnut meal polyphenols on the survival rates of HepG2 cells ($n=3$)

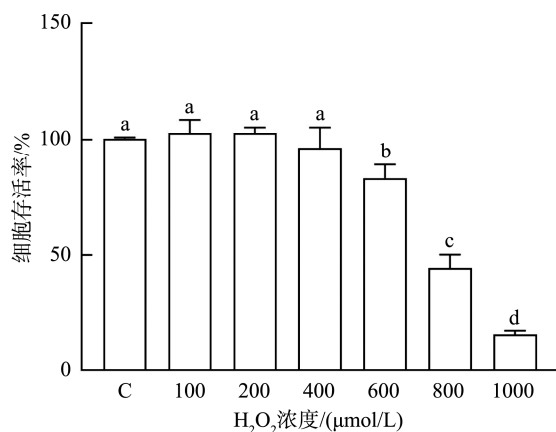


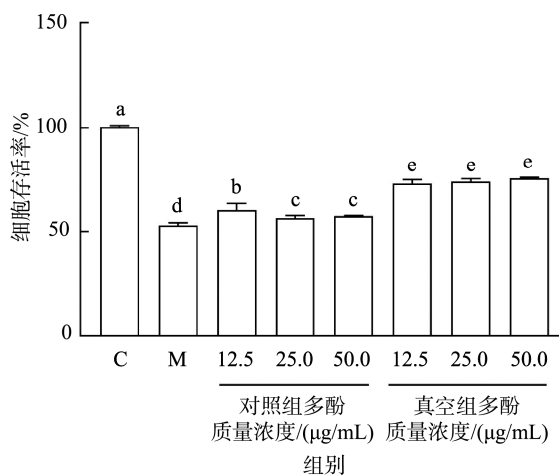
图 3 不同浓度 H_2O_2 对 HepG2 细胞存活率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different concentrations of H_2O_2 on the survival rate of HepG2 cells ($n=3$)

1000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率逐渐降低至 83.24%、44.43%、15.58%, 经统计分析得出的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 770.8 $\mu\text{mol/L}$, 即当 H_2O_2 质量浓度为 770.8 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率为 50%, 造模成功, 因此, 本研究选择 770 $\mu\text{mol/L}$ 为 H_2O_2 氧化损伤模型的建模浓度。

2.3.3 核桃粕多酚对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用

当机体受到外界有害刺激后, 产生大量活性氧, 使得体内正常的氧化与抗氧化作用的动态平衡紊乱, 机体内的蛋白质、脂质、DNA 等生物大分子遭受攻击, 从而造成组织的氧化损伤^[29]。细胞存活率是细胞损伤程度的最直观指标, 氧化应激会造成细胞内活性氧水平的升高, 导致细胞氧化损伤和凋亡^[30], 因此, 细胞存活率的恢复是有效降低细胞氧化损伤的标志。图 4 为核桃粕多酚对 H_2O_2 诱导 HepG2 细



注: C 为空白组; M 为损伤模型组, 下同。

图 4 不同浓度的核桃粕多酚对氧化损伤细胞存活率的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of different concentrations of walnut meal polyphenols on the survival rate of oxidatively damaged cells ($n=3$)

胞氧化损伤的保护作用研究结果, 由图 4 可知, 氧化损伤模型组细胞存活率为 52.98%, 经 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 核桃粕多酚处理, 细胞存活率均显著提高($P<0.05$), 经对照组多酚作用后细胞存活率分别升高至 60.18%、56.39%、57.46%, 真空组多酚作用后细胞存活率分别升高至 73.19%、74.10%、75.52%, 所以核桃粕多酚类物质可以减轻细胞氧化损伤从而使细胞存活率升高, 且真空提取有利于提高核桃粕多酚对氧化损伤细胞的保护作用。

2.3.4 HepG2 细胞内 MDA、GSH 含量和 SOD 活力的测定结果

机体通过酶系统与非酶系统产生的氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 从而引发脂质过氧化作用, 并形成脂质过氧化物 MDA, 因此 MDA 含量可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接反映细胞氧化损伤的程度, MDA 含量越高, 氧化应激损伤越严重^[31], 核桃粕对照组与真空组多酚对 HepG2 细胞内 MDA 含量的影响如图 5 所示, 由图 5 可知, 损伤模型组 MDA 含量为 3.99 nmol/mg prot, 显著高于空白组的 MDA 含量(3.49 nmol/mg prot) ($P<0.05$), 说明经过 770 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后, 细胞内产生大量自由基, 细胞受损严重, 造模成功。在不同浓度对照组和真空组核桃粕多酚作用下, 细胞内的 MDA 含量均呈下降趋势, 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照组和真空组核桃粕多酚均可显著降低细胞内 MDA 含量($P<0.05$), 其下降幅度分别 59.80%~69.60%、63.82%~81.91%, 在相同多酚浓度条件下, 真空组多酚作用下细胞内 MDA 含量下降程度大于对照组多酚, 表明核桃粕多酚可以降低氧化损伤细胞内 MDA 含量, 具有良好的氧化应激损伤保护作用, 且真空条件提取的多酚对细胞的氧化损伤保护作用更强。

SOD 是抗氧化系统中重要的指标, SOD 可调节细胞氧化应激反应, 清除超氧阴离子自由基, 保护细胞和机体免受氧化损伤^[32], 是机体抑制氧化损伤的第一道防线^[33], 因此 SOD 活力可以反映细胞的氧化损伤程度, SOD 活力越高, 代表细胞氧化损伤程度越小。由图 6 可知, 损伤模型组细胞内 SOD 活力为 16.60 U/mg prot, 显著低于空白组细胞内 SOD 活力(20.18 U/mg prot) ($P<0.05$), 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照组和真空组核桃粕多酚作用下, 细胞内 SOD 活力均显著升高($P<0.05$), 与损伤模型组相比, 上升幅度分别为对照组 83.25%~90.35%、真空组 86.33%~93.67%, 表明核桃粕多酚可以通过提高细胞内 SOD 活力来提高细胞抗氧化活性, 真空提取有利于提高核桃粕多酚的抗氧化应激活性。

GSH 是最主要的内源性非酶类抗氧化剂之一, 氧化损伤中产生的活性氧会消耗细胞内大量的还原型 GSH, 因此经外源抗氧化物作用后细胞能否恢复细胞内 GSH 水

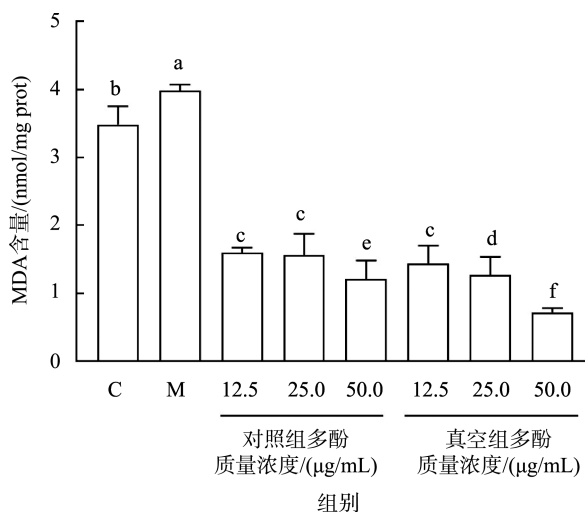


图 5 核桃粕多酚对 HepG2 氧化损伤细胞内 MDA 含量的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of walnut meal polyphenols on the intracellular MDA content of HepG2 oxidative damage cells ($n=3$)

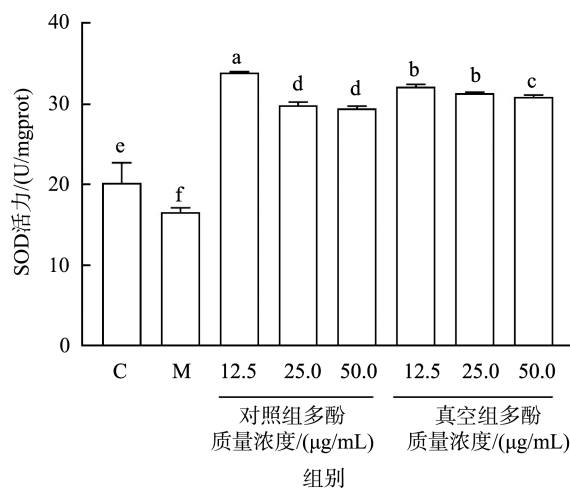


图 6 核桃粕多酚对 HepG2 氧化损伤细胞内 SOD 活力的影响($n=3$)

Fig.6 Effects of polyphenols of walnut meal on SOD activities in HepG2 oxidatively damaged cells ($n=3$)

平对细胞的抗氧化能力具有重要影响^[34], 细胞内 GSH 含量越高, 其抗氧化能力越强。由图 7 可知, 损伤模型组细胞内 GSH 含量为 59.41 $\mu\text{mol/g prot}$, 显著低于空白组(179.39 $\mu\text{mol/g prot}$) ($P<0.05$); 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照组和真空组核桃粕多酚作用下, 细胞内 GSH 含量均显著升高($P<0.05$), 与损伤模型组相比上升幅度分别为对照组 87.90%~102.66%、真空组 161.12%~171.17%, 表明核桃粕多酚可以提高氧化损伤细胞内 GSH 含量, 缓解细胞的氧化应激损伤, 真空提取有利于提高其对氧化损伤细胞保护作用。

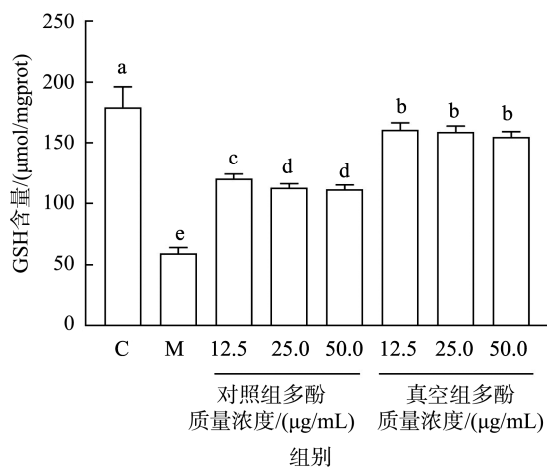


图 7 核桃粕多酚对 HepG2 氧化损伤细胞内 GSH 含量的影响(n=3)

Fig.7 Effects of polyphenols in walnut meal on intracellular GSH content in HepG2 oxidatively damaged cells (n=3)

3 讨论与结论

本研究发现真空条件有利于核桃粕多酚的提取, 与非真空条件下的对照组相比多酚含量提高了 14.50%, 经 HPD-100 大孔树脂纯化后, 真空组多酚纯度为 (77.53±0.09)%, 与对照组多酚纯度相比高出 4.96%; 体外抗氧化实验结果表明, 真空组与对照组核桃粕多酚对 DPPH 自由基的清除效果与 VC 的清除效果相当, 多酚质量浓度大于 1.5 mg/mL 时, Fe^{3+} 还原能力优于 VC, 表明核桃粕多酚具有良好的体外抗氧化活性, 其中真空条件下提取的多酚体外抗氧化活性更强, 真空组多酚对超氧阴离子自由基清除率始终显著高于对照组多酚 ($P<0.01$), 分析原因可能为多酚中含有的没食子酸等酚酸类物质结构中含有较多的酚羟基, 使多酚具有较强的抗氧化活性, 而真空条件下提取的核桃粕多酚含量较高, 因而与对照组相比具有更好的抗氧化活性, 杨恬等^[35]也证实了酚羟基氧原子电荷绝对值较大, 与酚羟基抗氧化性存在正相关性。此外, 本研究得出核桃粕多酚对 DPPH 自由基清除能力强于超氧阴离子自由基, 分析原因可能为两种自由基的清除机制不同, 多酚清除 DPPH 的机制是基于氢原子转移和单电子转移, 而超氧阴离子是活性氧的前体物质, 多酚通过清除活性氧来阻断自由基链式反应^[36]。在 H_2O_2 诱导的 HepG2 氧化损伤模型中, 核桃粕多酚可显著提高氧化损伤细胞的存活率, 并降低氧化损伤的 HepG2 细胞内 MDA 含量、提高细胞 SOD 活力和 GSH 含量, 说明核桃粕多酚可以通过降低脂质过氧化物的含量, 提高抗氧化酶的活力, 改善非酶类抗氧化系统的氧化活性来缓解细胞的氧化损伤, 前人研究发现榴莲壳^[37]、白茶^[38]、沉香叶^[39]、辣木叶^[40]中多酚类物质均可通过降低细胞内

MDA 含量、提高细胞 SOD 活力和 GSH 含量来缓解细胞的氧化损伤, 与本研究结果一致。

综上, 本研究通过体外和体内细胞水平对核桃粕多酚的抗氧化活性进行了评价, 证实了核桃粕多酚具有良好的抗氧化活性, 具有开发为天然抗氧化剂的潜在可能性, 接下来可继续开展核桃粕中多酚化合物的组成分析及结构鉴定, 明确其中发挥作用的主要化合物, 深入研究核桃粕多酚的构效关系。

参考文献

- [1] LEE J, KIM YS, LEE JH, *et al.* Walnut phenolic extract and its bioactive compounds suppress colon cancer cell growth by regulating colon cancer stemness [J]. *Nutrients*, 2016, 8(7): 439–452.
- [2] SHI D, CHEN C, ZHAO S, *et al.* Effects of walnut polyphenol on learning and memory functions in hypercholesterolemia mice [J]. *J Food Nutr Res*, 2014, 2(8): 450–456.
- [3] LIU H, WAN Y, WANG Y, *et al.* Walnut polyphenol extract protects against fenitrothion-induced immunotoxicity in murine splenic lymphocytes [J]. *Nutrients*, 2018, 10(12): 1838–1855.
- [4] 李明娟, 张雅媛, 游向荣, 等. 低温喷雾干燥技术制备核桃粕蛋白粉的工艺条件优化[J]. *食品工业*, 2021, 42(1): 156–161.
- [5] 冯贞, 方晓璞. 核桃加工副产物综合利用途径[J]. *中国油脂*, 2018, 43(9): 71–74, 87.
- [6] MAGALHÃES LM, SEGUNDO MA, REIS S, *et al.* Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 613(1): 1–19.
- [7] FIERASCU RC, ORTAN A, FIERASCU IC, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 24: 1–8.
- [8] 梁杏. 核桃饼粕多酚提取纯化及其抗氧化和降脂活性初步研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2016.
- [9] LIANG X. Extraction and purification of polyphenols from walnut meal and preliminary study on its antioxidation and lipid lowering activity [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [10] ROS E, IZQUIERDO-PULIDO M, SALA-VILA A. Beneficial effects of walnut consumption on human health: Role of micronutrients [J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2018, 21(6): 498–504.
- [11] ZHENG Y, WU S, WANG R, *et al.* Analysis and correlation of chemical components of various walnut (*Juglans regia* L.) cultivars [J]. *J Food Meas Charact*, 2020, 14(6): 3605–3614.

- [11] SHENG JY, YANG XY, LIU QY, *et al.* Coadministration with tea polyphenols enhances the neuroprotective effect of defatted walnut meal hydrolysate against scopolamine-induced learning and memory deficits in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(3): 751–758.
- [12] 贺宇佳, 刘明, 伍树松. 植物多酚对氧化应激与炎症信号通路的调控机制[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(4): 1554–1563.
- HE YJ, LIU M, WU SS. Regulation mechanism of plant polyphenols in oxidative stress and inflammatory signaling pathways [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2019, 31(4): 1554–1563.
- [13] CHOI J, SHIN PK, KIM Y, *et al.* Metabolic influence of walnut phenolic extract on mitochondria in a colon cancer stem cell model [J]. *Eur J Nutr*, 2019, 58: 1635–1645.
- [14] TIAN L, WANG H, ABDALLAH AM, *et al.* Red and white wines inhibit cholesterol oxidation induced by free radicals [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(12): 6453–6458.
- [15] 武磊, 周学思, 杲修杰, 等. 离体大鼠主动脉内皮细胞氧化应激损伤模型的建立及评价[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(5): 390–394, 482.
- WU L, ZHOU XS, GAO XJ, *et al.* Establishment and evaluation of oxidative stress injury model of invitro rat aortic endothelial cells [J]. *Chin J Appl Phys*, 2016, 32(5): 390–394, 482.
- [16] ALIA M, RAMOS S, MATEOS R, *et al.* Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2) [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2005, 19(2): 119.
- [17] 郑晓宁, 李俊, 牟建楼, 等. 核桃果实多酚活性及其分离纯化研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(21): 351–358.
- ZHENG XN, LI J, MOU JL, *et al.* Research progress on polyphenol activity and separation and purification of walnut fruit [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(21): 351–358.
- [18] 李颜桃, 仲崇华, 张健荣, 等. 沙棘籽多酚超声耦合真空提取工艺的研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(11): 151–156.
- LI YT, ZHONG CH, ZHANG JR, *et al.* Ultrasonic coupled vacuum extraction process of polyphenols from *Hippophae rhamnoides* seed [J]. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2021, 36(11): 151–156.
- [19] 郑晓宁, 牟建楼, 陈永浩, 等. 超声辅助分离提取核桃仁种皮多酚研究[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(10): 64–68.
- ZHENG XN, MOU JL, CHEN YH, *et al.* Study on ultrasonic assisted separation extraction of polyphenols from walnut kernel pellicle [J]. *Cere Oils*, 2021, 34(10): 64–68.
- [20] 孙敬敬, 杨瑞金, 杨进洁, 等. 核桃种皮多酚的大孔树脂法分离与液质联用法鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(11): 136–142.
- SUN JJ, YANG RJ, YANG JJ, *et al.* Walnut pellicle polyphenols: Separation with microporous resin and identification with UPLC-TOF-MS/MS [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(11): 136–142.
- [21] 张春梅, 陈朝银, 赵声兰, 等. 核桃内种皮多酚提取工艺及其体外抗氧化活性的初步研究[J]. *中国酿造*, 2014, 33(7): 130–134.
- ZHANG CM, CHEN ZY, ZHAO SL, *et al.* Optimization of extraction technology and *in vitro* antioxidant activities of polyphenols from walnut kernel pellicle [J]. *Chin Brew*, 2014, 33(7): 130–134.
- [22] HE Y, BU LJ, XIE HD, *et al.* Antioxidant activities and protective effects of duck embryo peptides against H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells [J]. *Poultry Sci*, 2019, 98(12): 175–187.
- [23] 刘先皓, 杨明静, 陈壁, 等. 东紫苏多酚提取物对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(24): 9499–9506.
- LIU XH, YANG MJ, CHEN B, *et al.* Study on the protective effect of polyphenol extract from *Elsholtzia bodinieri* vaniot against oxidative damage of HepG2 cells [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(24): 9499–9506.
- [24] 田莉, 李海萍, 袁亚宏, 等. 真空耦合超声波提取苹果渣多酚的工艺优化[J]. *食品科学*, 2017, 38(14): 233–239.
- TIAN L, LI HP, YUAN YH, *et al.* Optimization of ultrasound-vacuum assisted extraction of polyphenols from apple pomace [J]. *Food Sci*, 2017, 38(14): 233–239.
- [25] 付婧, 岳田利, 袁亚宏, 等. 真空耦合超声提取茶多酚的工艺研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(3): 172–178.
- FU J, YUE TL, YUAN YH, *et al.* Extraction of tea polyphenols by ultrasonic-vacuum technology [J]. *J Northwest Agric Forest Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 41(3): 172–178.
- [26] 梁俊玉, 赵保堂, 殷振雄, 等. 核桃叶多酚的抗氧化活性测定 [J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(11): 171–174.
- LIANG JY, ZHAO BT, YIN ZX, *et al.* Study on the oxidative stability of walnut leaves [J]. *Food Ferment Ind*, 2012, 38(11): 171–174.
- [27] 刘猛, 吴伟源, 章检明, 等. 核桃青皮甲醇提取物的抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(13): 109–113.
- LIU M, WU WY, ZHANG JM, *et al.* Antioxidant activity of methanol extract from walnut green husk [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(13): 109–113.
- [28] ZHAO XC, ZHANG L, YU HX, *et al.* Curcumin protects mouse neuroblastoma neuro-2A cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress [J]. *Food Chem*, 2011, 129(2): 387–394.
- [29] 杨巍巍, 邓航, 李娇, 等. 植物多酚化合物抗氧化损伤研究进展[J]. *现代食品*, 2020, (16): 74–78.
- YANG WW, DENG H, LI J, *et al.* Research progress on antioxidant damage of plant polyphenols [J]. *Mod Food*, 2020, (16): 74–78.
- [30] ZHANG ZH, REN Z, CHEN S, *et al.* ROS generation and JNK activation contribute to 4-methoxy-TEMPO-induced cytotoxicity, autophagy, and DNA damage in HepG2 cells [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(2): 717–728.
- [31] GULCIN L. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview [J]. *Arch Toxicol*, 2020, 94(6): 651–715.
- [32] WANG F, FU CX, CHEN JS, *et al.* Biological function of catalase and its

- application in animals [J]. *Feed Res*, 2021, (5): 126–129.
- [33] JIAO R, LIU Y, GAO H, *et al.* The anti-oxidant and antitumor properties of plant polysaccharides [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(3): 463–488.
- [34] LIU D, XU J, CAO Y, *et al.* Effect of glutathione-enriched inactive dry yeast on color, phenolic compounds, and antioxidant activity of kiwi wine [J]. *J Food Process Preserv*, 2020, 44(3): e14347.
- [35] 杨恬, 张忠, 秦潇潇, 等. 基于新型互作模型的多酚不同羟基的抗氧化性评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(22): 7422–7430.
- YANG T, ZHANG Z, QIN XX, *et al.* Antioxidative evaluation of different hydroxyl groups of polyphenols based on a novel interaction model [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(22): 7422–7430.
- [36] GIRI L, BELWAL T, BAHUKHANDI A, *et al.* Oxidative DNA damage protective activity and antioxidant potential of Ashtvarga species growing in the Indian Himalayan Region [J]. *Ind Crop Prod*, 2017, 102: 173–179.
- [37] HE YZ, PENG L, XIONG H, *et al.* The profiles of durian (*Durio zibethinus* Murr.) shell phenolics and their antioxidant effects on H₂O₂ treated HepG2 cells as well as the metabolites and organ distribution in rats [J]. *Food Res Int*, 2023, 163: 112122.
- [38] YI R, WEI Y, TAN F, *et al.* Antioxidant capacity-related preventive effects of Shoumei (slightly fermented *Camellia sinensis*) polyphenols against hepatic injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020(19): 1–17.
- [39] 段宙位, 方宗壮, 何艾, 等. 沉香叶黄酮稳定性及对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(6): 1661–1667.
- DUAN ZW, FANG ZZ, HE AI, *et al.* Stability and protection against H₂O₂ induced oxidative stress injury in HepG2 of flavonoids from aloes leaves [J]. *Chin J Trop Crops*, 2021, 42(6): 1661–1667.
- [40] 蔡小华, 李小伟, 李国坤, 等. 辣木叶水提物对 H₂O₂ 致 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(10): 62–69, 111.
- CAI XH, LI XW, LI GK, *et al.* Protective effects of an aqueous extract of moringa oleifera leaves against H₂O₂-Induced oxidative damage in HepG2 cells [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(10): 62–69, 111.

(责任编辑: 郑 丽 于梦娇)

作者简介



苏 晨, 硕士研究生, 主要研究方向为农产品贮藏加工及其营养品质保持。
E-mail: suchen657408561@163.com



荣瑞芬, 博士, 教授, 主要研究方向为农产品贮藏加工中营养品质保持。
E-mail: ruifen@buu.edu.cn