

白首乌甾苷复合酶法提取工艺优化及保肝活性分析

Optimization of complex enzymatic extraction process of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight and its hepatoprotective activity

宋婉钰^{1,2} 戴静³ 冯进² 李春阳² 马永强¹

SONG Wan-yu^{1,2} DAI Jing³ FENG Jin² LI Chun-yang² MA Yong-qiang¹

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 3. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023)

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076, China; 2. Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China; 3. College of Biology and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou, Zhejiang 310023, China)

摘要:目的:为开发白首乌保肝高值化产品提供依据。方法:以多年生白首乌为原料,采用单因素试验及响应面法,考察酶解时间、酶解温度、复合酶用量和酶解 pH 对白首乌甾苷得率的影响;通过乙醇诱导 HepG2 肝细胞损伤模型研究谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)及谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的含量和细胞形态变化。结果:在酶解时间 100 min、温度 46 °C、酶用量 1.30% 和 pH 5.0 的条件下,实际得率为(2.80±0.04)%。与模型组相比,白首乌可明显抑制肝损伤细胞中 ALT、LDH 含量,显著提高细胞内的 GSH 水平,恢复细胞损伤。结论:复合酶法可有效提取白首乌甾苷;白首乌甾苷具有保肝作用。

关键词:白首乌;甾苷;复合酶法;保肝活性

Abstract: Objective: Response surface methodology was used to optimize the extraction process of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight by complex enzymatic method, and its effects on alcohol dehydrogenase activity and human hepatoma cell HepG2 were analyzed. **Methods:** Four experimental factors; enzymolysis duration, temperature, compound enzyme dose and pH were used as responses to a

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目(编号: CX[20]2006)

作者简介:宋婉钰,女,哈尔滨商业大学在读硕士研究生。

通信作者:李春阳(1966—),男,江苏省农业科学院农产品加工研究所研究员,博士。E-mail: lichunyang968@126.com

收稿日期:2023-01-23 **改回日期:**2023-06-15

single-factor experiment of the Response Surface Methodology on the steroidal glycoside yields, using perennial *C. auriculatum* as the target material. The alcohol-induced hepatocyte damage model of HepG2 was used to investigate the contents of ALT, LDH, and GSH and changes in cell shape. **Results:** The results show that the optimum extraction conditions of steroidal glycoside enzyme were obtained at an enzymolysis duration of 100 min, a temperature of 46 °C, enzyme dose of 1.30% and pH of 5.0. Consequently, the actual extraction rate of (2.80 ± 0.04)% was achieved using the optimized process conditions, which was close to the expected value. Compared with the model group, it significantly suppresses the growth of ALT and LDH while increasing the amount of intracellular GSH, and the cell damage was restored. **Conclusion:** The compound enzyme method can effectively extract the steroidal glycosides of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; steroidal glycosides of *C. auriculatum* have hepatoprotective effect.

Keywords: *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; steroidal glycosides; complex enzymatic method; hepatoprotective activity

目前酒精性肝损伤的治疗以去除病因和辅助治疗为主,首要方法是戒酒,以减少酒精摄入;营养支持也是从控制饮水量,增加免疫力等方面来缓解酒精性肝损伤;而药物干预则一般不建议使用,避免对肝脏造成进一步的负担,所以多从保肝、抗纤维化、抗炎和抗氧化等活性功能方面寻找效果好的药食同源食材、中药材,进行辅助治

疗。白首乌是萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消 (*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight) 的干燥块根, 其中江苏滨海白首乌产量占了全国 95%^[1]。经研究^[2-4]发现, 与滨海白首乌活性功能密切相关的成分主要涉及甾苷类、多糖类和苯酚类。滨海白首乌味甘微苦, 2014 年被国家卫计委批准作为有传统食用习惯的普通食品, 其具有补肾益肝、养血益精、抗衰老等功效^[5-7]。

迄今已报道的白首乌甾苷种类约有 150 余种, 其中滨海白首乌的甾苷种类众多远胜其他品种的白首乌。目前, 研究人员采用的各种不同方法提取天然植物中甾苷成分, 常见提取方法得到白首乌甾苷提取量一般在 5~15 mg/g。有研究^[8]发现, 热回流法和常温浸渍法提取, 随着白首乌甾苷浓度的增加, 对 ABTS 自由基、DPPH 自由基清除率也在不断增强, 但缺点是该方法在提取过程中由于连续加热, 白首乌粉末在蒸馏烧瓶提取溶剂中受热时间较长, 对于白首乌甾苷结构会产生一定的破坏, 导致提取率不高。而超临界 CO₂ 萃取法具有操作温度低, 分离效率高且无溶剂残留等优点, 但从经济角度考虑, 此方法仪器设备价格昂贵, 成本高^[9]。又因酶解破壁技术可大幅增加活性物质的提取量。白首乌细胞壁在果胶酶和半纤维素酶的作用下会使组织结构软化、通透性增加, 甚至分离原有结构, 使细胞中活性物质溶出。

研究拟优化白首乌复合酶法提取工艺, 提高白首乌甾苷提取率, 通过乙醇诱导 HepG2 肝细胞损伤模型研究 ALT、LDH 酶活性及 GSH 含量和细胞形态变化, 以期对白首乌保肝高值化产品研发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

二年生白首乌: 滨乌一号, 盐城果老首乌科技有限公司;

乙醇: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

果胶酶: 3 万 U/g, 希杰尤特尔生物科技有限公司;

半纤维素酶: 2.5 万 U/g, 上海源叶生物科技有限公司;

乙醇脱氢酶: 313 U/mg, 上海源叶生物科技有限公司;

谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶测试盒: 南京建成海浩生物科技有限公司;

MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶和双抗(青霉素、链霉素): 美国 GIBCO 公司;

水飞蓟素和 MTT: 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

台式低速离心机: L3-5K 型, 湖南可成仪器设备有限

公司;

紫外可见分光光度计: 752 型, 上海棱光技术有限公司;

旋转蒸发器: RE52-A 型, 上海亚荣生化仪器厂;

真空冷冻干燥机: FD-1A-80 型, 北京莱万生物技术有限公司;

细胞培养箱: 353040-16029 型, 美国赛默飞公司。

1.2 方 法

1.2.1 白首乌甾苷提取 将白首乌用组织捣碎机粉碎, 过 60 目筛后得到白首乌粉, 保存于 -20 °C 条件。称取 10.0 g 白首乌粉, 按一定比例加入 80% 乙醇溶液, 调节至适当 pH, 用 $m_{\text{果胶酶}} : m_{\text{半纤维素酶}} = 1 : 1$ 提取, 酶解时每 15 min 搅拌 1 次, 升温至 90 °C 保持 15 min, 冷却至室温并静置 20 min^[10]。5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 残渣二次提取离心, 合并上清液, 冷藏静置 2 h 后过滤, 浓缩(45 °C、45 r/min)至无醇味, 得白首乌提取液。

1.2.2 白首乌甾苷纯化 将上述提取液转入分液漏斗中, 用等体积的乙酸乙酯萃取 2 次, 再用水饱和正丁醇(1:1)溶液萃取 3 次, 得黄色水相溶液, 浓缩(45 °C、45 r/min)后经大孔树脂柱(AB-8 树脂用 95% 的乙醇浸泡 24 h 后装柱, 并用 95% 的乙醇淋洗至无白色, 5% 盐酸溶液与 2% 氢氧化钠溶液分别浸泡并洗至中性)纯化后冷冻干燥(-60 °C、1 d)。

1.2.3 不同工艺提取的白首乌甾苷对乙醇脱氢酶活性的影响 称取 10.0 g 白首乌粉, 加入 80% 乙醇溶液, 分别按表 1 的参数用热回流法、常温浸渍法、超声辅助法(超声功率为 600 W, 频率为 40 kHz), 以及复合酶法(pH 5.0、酶用量 1.5%)提取后, 在 5 000 r/min 下离心 20 min 并收集上清液, 残渣 2 次提取离心, 合并上清液, 4 °C 下冷藏静置 2 h 后过滤, 减压浓缩至无醇味, 得质量浓度为 1 g/mL 白首乌样品, 进行白首乌甾苷得率及乙醇脱氢酶活性对比。每种方法 3 组平行取平均值。

1.2.4 ADH 酶激活率的检测 取 10 mL 试管, 加 1.5 mL pH 8.8 焦磷酸钠缓冲液, 1 mL 氧化型辅酶 I(NAD⁺), 0.5 mL 60% 乙醇溶液, 白首乌甾苷质量浓度为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 的试样各取 0.1 mL, 每组 3 个平

表 1 不同方法提取工艺条件

Table 1 Extraction process conditions from different methods

提取方法	提取温度/°C	提取时间/h	料液比(g/mL)
热回流法	75	3	1:15
常温浸渍法	24	72	1:15
超声辅助法	40	0.3	1:15
复合酶法	50	1	1:15

行。混匀后置于 37 ℃ 水浴 5 min, 之后向管中加入 0.1 mL ADH 酶溶液, 对照管则由蒸馏水代替试样。混匀后立即测定其吸光度值(340 nm), 每隔 30 s 读数一次, 连续 5 min。用蒸馏水调定零点, 按式(1)和式(2)计算每分钟平均吸光度的活性及激活率。

$$E = \frac{\Delta A \times V}{W \times 6.2}, \quad (1)$$

$$Q = \frac{E_1 - E_0}{E_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

E ——每分钟还原 1 μmol NAD+ 所需酶量, U/mL;

E_1 ——样品组酶活力, U/mL;

E_0 ——空白组酶活力, U/mL;

ΔA ——340 nm 处每分钟吸光度增加值;

V ——溶液体积, mL;

W ——每毫升酶溶液中含酶量, mg/mL;

6.2——NADH 的克分子吸光值系数;

Q ——ADH 酶激活率, %。

1.2.5 单因素试验 按 1.2.1 的提取方法, 试验基本条件定为料液比 1 : 15 (g/mL)、pH 5.0、 $m_{\text{果胶酶}} : m_{\text{半纤维素酶}} = 1 : 1$ 、酶用量 1.5%、酶解温度 50 ℃ 和酶解时间 90 min, 分别考察料液比 [1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 25 (g/mL)]、pH(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0)、复合酶 ($m_{\text{果胶酶}} : m_{\text{半纤维素酶}}$ 分别为 0 : 1, 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1, 1 : 0)、酶用量 (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%)、酶解温度 (40, 45, 50, 55, 60 ℃) 和酶解时间 (30, 60, 90, 120, 150 min) 对白首乌甙昔得率的影响。

1.2.6 白首乌甙昔得率 按式(3)计算白首乌甙昔得率。

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R ——甙昔含量, %;

m_1 ——甙昔样品含量, g;

m_2 ——白首乌粉质量, g。

1.2.7 HepG2 细胞试验适宜浓度的确认 将处于对数生长期的 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (FBS), 1% 抗生素的 MEM 培养基中, 置于 37 ℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞铺满 80% 培养瓶时, 采用 1 mL 0.25% 胰酶消化 2 min, 加入培养基终止消化, 吹打, 离心后, 配制成 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 100 μL /孔。细胞预培养 24 h 后, 加入质量浓度为 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 mg/mL 白首乌甙昔待测样品, 处理 24 h 后用 MTT 法检测细胞活率。其中, 白首乌甙昔样品溶于培养基, 用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌后使用^[1-14]。每组 6 个平行。

1.2.8 酒精肝损伤细胞模型建立及白首乌甙昔保肝活性分析 根据 1.2.7 的方法培养细胞 24 h, 白首乌甙昔组加

入质量浓度分别为 0.01, 0.05, 0.50 mg/mL 的待测样品、0.1 mg/mL 水飞蓟素组、模型组, 正常对照组则加入等量培养液分别处理细胞 24 h 后, 结束试验。用试剂盒测定培养基中 ALT 和 LDH 含量, 来观察细胞损伤程度; 测定细胞内的 GSH 含量, 来观察细胞内氧化还原平衡状态; 用倒置显微镜观察细胞状态及生长状况^[15-18]。每组 3 个平行。

1.3 数据处理

单因素数据分析采用 Origin 9 软件, 响应面优化采用 Design-Expert 10.0.7 软件进行设计及结果与方差分析。

2 结果与分析

2.1 白首乌甙昔对乙醇脱氢酶活性的影响

由图 1 可知, 白首乌甙昔质量浓度为 0.8 mg/mL 时, 乙醇脱氢酶活性最高; 在白首乌甙昔质量浓度 < 0.8 mg/mL 时, 随着白首乌甙昔质量浓度不断提高, 乙醇脱氢酶活性也在不断增大; 白首乌甙昔质量浓度为 1 mg/mL 时, 乙醇脱氢酶激活率降低至 112.5%。说明白首乌甙昔对乙醇脱氢酶的活性具有一定的促进作用。

由图 2 可知, 复合酶法的白首乌甙昔得率及乙醇脱氢酶激活率最大, 提取效果最佳。

2.2 单因素试验

由图 3 可知, 单一酶法不如复合酶法提取的白首乌甙昔得率高, 乙醇脱氢酶活性大; 当 $m_{\text{果胶酶}} : m_{\text{半纤维素酶}} = 1 : 2$ 时, 乙醇脱氢酶激活率和白首乌甙昔得率最大。

由图 4 (a) 可知, 当溶剂用量过大, 超过 1 : 15 (g/mL) 时, 会导致试剂损耗、仪器能耗增加且回收困难, 使得增大料液比提取量反而减小, 且料液比为 1 : 10~1 : 15 (g/mL) 时, 白首乌甙昔得率增长最快, 因此, 最适料液比选为 1 : 15 (g/mL)。

由图 4 (b) 可知, 随着酶解时间的增加, 白首乌甙昔得

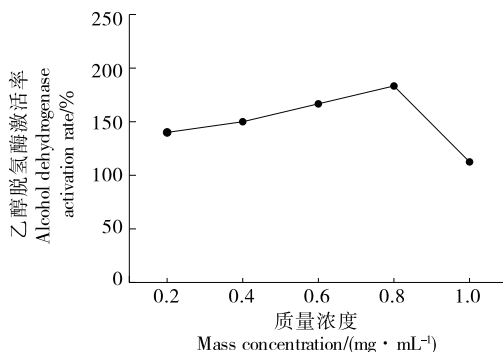


图 1 白首乌甙昔质量浓度对乙醇脱氢酶激活率的影响
Figure 1 Effect of steroidal glycosides' concentration from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight on activity rate of alcohol dehydrogenase

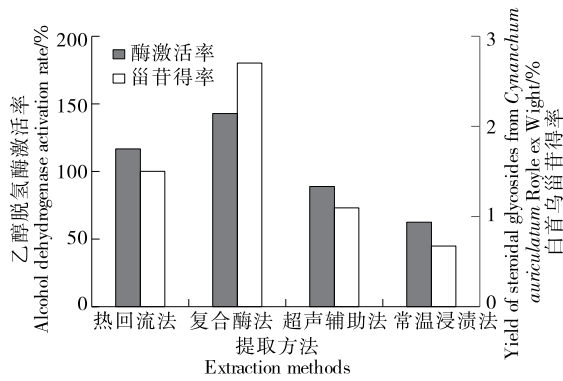


图2 提取方法对白首乌甾苷得率及乙醇脱氢酶激活率的影响

Figure 2 Effect of different extraction methods on the yields of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight and activity of alcohol dehydrogenase

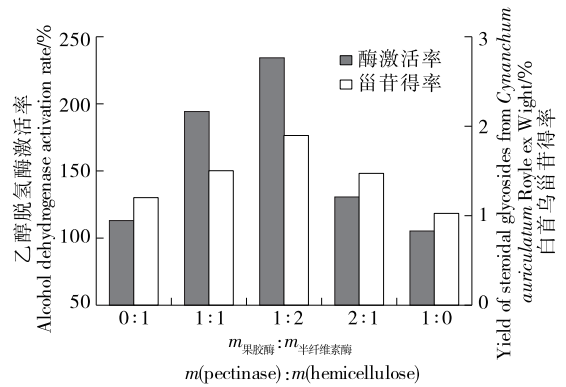
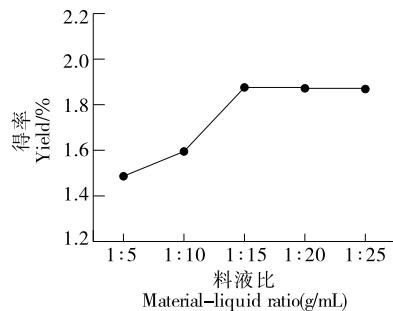
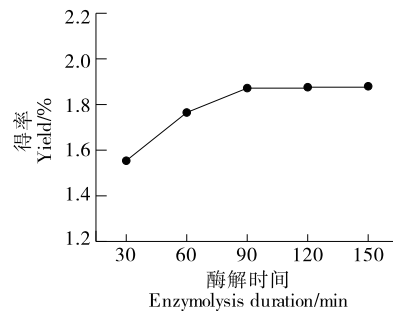


图3 酶配比对白首乌甾苷得率及乙醇脱氢酶激活率的影响

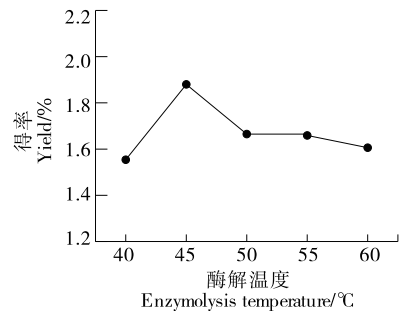
Figure 3 Effect of enzyme ratio on the yields of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight and activity of alcohol dehydrogenase



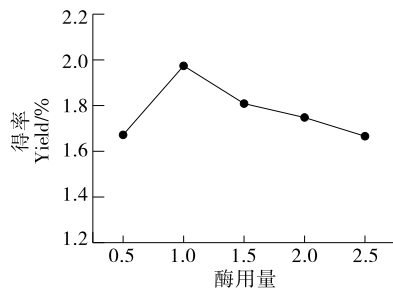
(a) 料液比



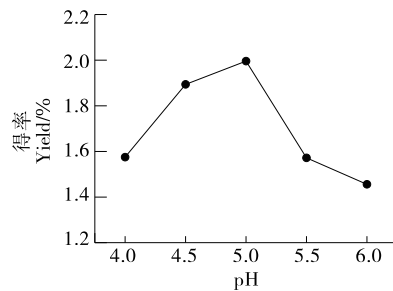
(b) 酶解时间



(c) 酶解温度



(d) 酶用量



(e) pH

图4 料液比、酶解时间、酶解温度、酶用量和 pH 对白首乌甾苷得率影响

Figure 4 Effect of ratio of material to liquid, enzymolysis duration, temperature, dosage of enzyme and pH on the yields of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

率逐渐升高,当酶解时间为 90 min 时,甾苷已基本溶出,此时甾苷得率为 1.872%。随着酶解时间的继续增加,不会再大幅提高白首乌甾苷得率。这是因为酶促反应趋于饱和,若继续延长酶解时间,浪费资源,且操作效率低,所得甾苷量也不高。因此,酶解时间选为 90 min。

由图 4(c)可知,酶解温度 45 °C 时,白首乌甾苷得率最大为 1.880%。酶解温度不宜过高,否则扩散速度过快,部分成分易挥发,反而影响白首乌甾苷的提取。

由图 4(d)可知,酶用量 > 1.0% 时,白首乌甾苷得率

最大为 1.974%。这是由于随着酶用量的增加,对白首乌细胞壁结构的破坏逐渐增强,增加了白首乌细胞壁的通透性,使白首乌甾苷更易溶出。当酶用量达到 1.0% 时,酶促反应达到饱和状态,白首乌甾苷的溶出处于平衡。因此,最适酶用量为 1.0%。

由图 4(e)可知,pH 5.0 时,白首乌甾苷得率最大,为 1.996%;pH > 5.0 或 < 5.0 都会破坏白首乌细胞壁,影响白首乌甾苷提取量。酶解法提取天然植物有效活性成分时,pH 为酶活力变化是否稳定的重要因素之一。在酶活

性最适 pH 下进行提取,果胶酶和半纤维素酶才能发挥最大作用,从而促进白首乌有效成分的溶出,提高白首乌甙昔提取率。因此,最适 pH 为 5.0。

2.3 响应面分析

2.3.1 响应面优化试验设计 综合单因素试验结果,选择酶解温度、pH 值、酶解时间以及酶用量为自变量(见表 2),以白首乌甙昔得率为响应值,采用 Box-Behnken 优化工艺条件。响应面试验设计及结果见表 3。

表 2 响应面优化试验因素及水平设计

Table 2 Factors and levels of the response surface experiment

水平	A 酶解温度/℃	B pH	C 酶解时间/min	D 酶用量/%
-1	40	4.5	60	0.5
0	45	5.0	90	1.0
1	50	5.5	120	1.5

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Response surface method design and test results

试验号	A	B	C	D	白首乌甙昔得率/%
1	-1	0	-1	0	2.28
2	1	0	-1	0	2.48
3	0	1	0	1	2.73
4	1	1	0	0	2.69
5	1	0	0	1	2.74
6	0	-1	1	0	2.34
7	0	1	1	0	2.65
8	0	0	0	0	2.75
9	0	-1	0	1	2.42
10	1	0	0	-1	2.38
11	-1	0	0	-1	2.26
12	0	0	0	0	2.76
13	0	0	1	1	2.70
14	0	-1	0	-1	2.27
15	1	-1	0	0	2.41
16	0	0	0	0	2.79
17	-1	0	0	1	2.58
18	0	0	0	0	2.82
19	0	1	-1	0	2.29
20	0	0	-1	1	2.38
21	0	0	1	-1	2.34
22	0	1	0	-1	2.32
23	0	-1	-1	0	2.27
24	1	0	1	0	2.65
25	-1	-1	0	0	2.29
26	0	0	-1	-1	2.25
27	-1	1	0	0	2.44
28	-1	0	1	0	2.52
29	0	0	0	0	2.80

2.3.2 二次回归模型的建立 利用 Design-Expert 10.0.7 软件对响应面结果(表 3)进行分析,并建立二次回归模型,拟合得到白首乌甙昔得率与提取条件之间的二次多元回归方程:

$$Y = 2.78 + 0.082A + 0.093B + 0.10C + 0.14D + 0.033AB - 0.018AC + 0.010AD + 0.073BC + 0.065BD + 0.058CD - 0.12A^2 - 0.20B^2 - 0.19C^2 - 0.17D^2 \quad (4)$$

2.3.3 回归模型的显著性分析 由表 4 可知,该模型 $P < 0.0001$ 极显著,失拟项 $P = 0.4972 > 0.05$ 不显著,回归模型 $R^2 = 0.9889$,调整相关系数 $R^2_{Adj} = 0.9778$,且该方程除 AC、AD 两项对白首乌甙昔得率的影响不显著外,其余项均显著。四因素对白首乌甙昔得率的影响顺序为:酶用量 > 酶解时间 > pH > 酶解温度。

表 4 回归模型及方差分析†

Table 4 Analysis of variance of the regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.130	14	0.080	89.24	<0.0001**
A	0.080	1	0.080	88.84	<0.0001**
B	0.100	1	0.100	116.04	<0.0001**
C	0.130	1	0.130	144.54	<0.0001**
D	0.250	1	0.250	276.86	<0.0001**
AB	4.225×10^{-3}	1	4.225×10^{-3}	4.69	0.0481*
AC	1.225×10^{-3}	1	1.225×10^{-3}	1.36	0.2630
AD	4.000×10^{-4}	1	4.000×10^{-4}	0.44	0.5160
BC	0.021	1	0.021	23.34	0.0003**
BD	0.017	1	0.017	18.76	0.0007**
CD	0.013	1	0.013	14.68	0.0018*
A ²	0.097	1	0.097	107.17	<0.0001**
B ²	0.250	1	0.250	279.45	<0.0001**
C ²	0.240	1	0.240	268.91	<0.0001**
D ²	0.180	1	0.180	197.82	<0.0001**
残差	0.013	14	9.008×10^{-4}		
失拟项	9.292×10^{-3}	10	9.292×10^{-4}	1.12	0.4972
纯误差	3.320×10^{-3}	4	8.300×10^{-4}		
总误差	1.140	28			

† * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.001$)。

由图 5 可知,两因素交互响应面坡度呈较陡峭趋势,酶用量、酶解时间、pH 和酶解温度两两间的交互作用均对白首乌甙昔得率有显著影响。AB、BC、BD 以及 CD 等高线为椭圆形;AC 和 AD 等高线近似圆形,交互作用较小。酶解温度与酶用量、酶解时间的交互作用对白首乌甙昔得率均不显著。响应面分析结果与回归模型的显著性分析结果一致,说明结果可靠有效。

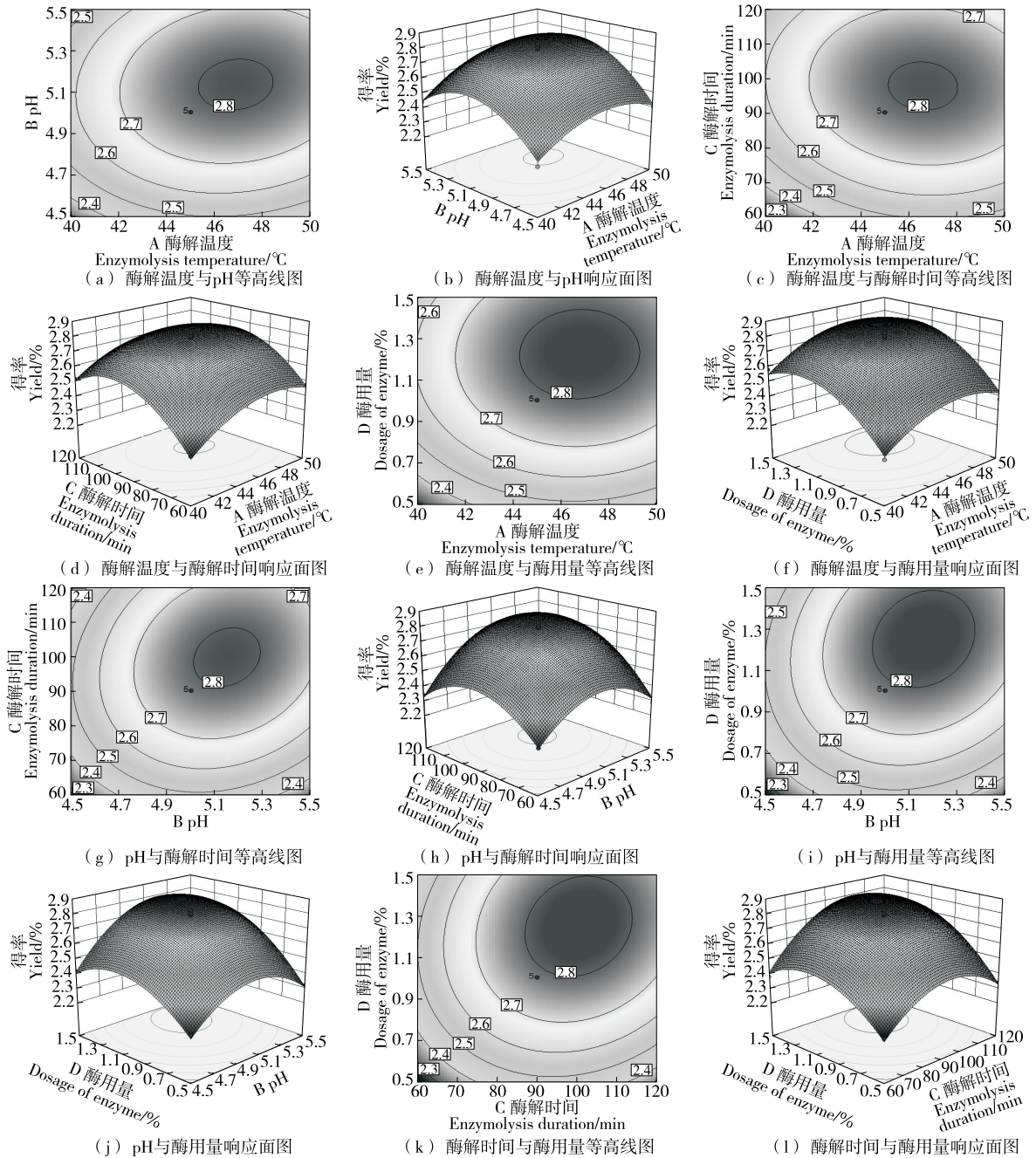


图 5 两因素的交互作用对白首乌甾苷得率的等高线图和响应面图

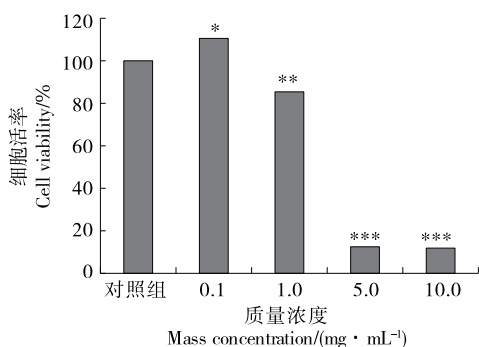
Figure 5 Contour maps and response surface plots of variable parameters on the yields of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

2.3.4 验证实验 由数据分析得到预测模型为:酶解温度 45.80 °C、pH 5.05、酶解时间 101.62 min、酶用量 1.30%，白首乌甾苷得率为 2.86%。结合实验室实际情况,在酶解温度 46 °C、pH 5.0、酶解时间 100 min 和酶用量 1.30%的条件下进行 3 次平行验证实验,白首乌甾苷实测得率为(2.80±0.04)%,与预测值相吻合,验证了该预测模型的稳定性及准确性。

2.4 细胞毒性试验

2.4.1 细胞试验最适浓度 由图 6 可知,白首乌甾苷质量浓度 ≥ 1 mg/mL 时对细胞有显著毒性作用,白首乌甾苷质量浓度为 0.1 mg/mL 时对细胞生长有显著促进作用。因此,白首乌甾苷浓度 < 1 mg/mL 为乙醇诱导肝细胞损伤的最适浓度。

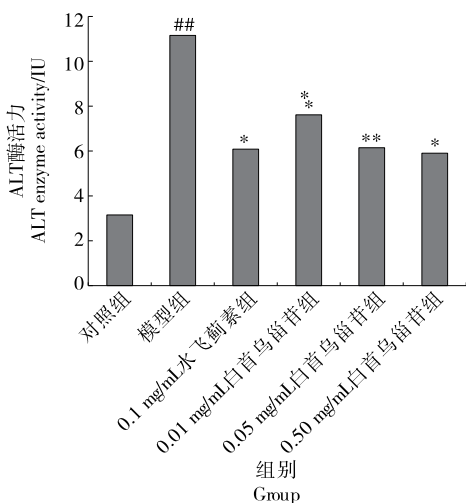
2.4.2 培养基中 ALT、LDH 含量 由图 7、图 8 可知,模



与对照组相比, * . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$; *** . $P < 0.001$

图 6 白首乌甙苷样品对肝细胞活力的影响

Figure 6 Effect of steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight on hepatocyte viability



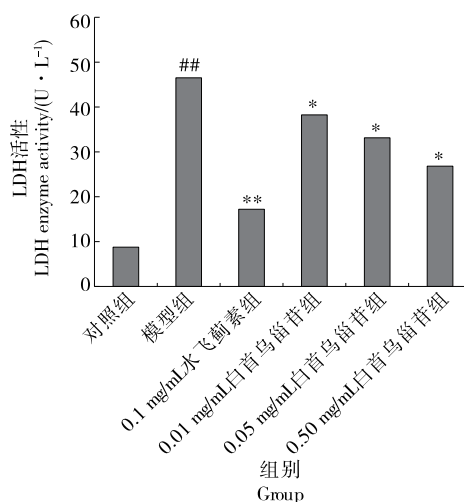
. 模型组与对照组相比 $P < 0.01$; * . 保护剂组与模型组相比 $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$

图 7 乙醇诱导肝细胞损伤的 ALT 含量

Figure 7 ALT content of ethanol-induced hepatocyte injury

模型组肝细胞 ALT 和 LDH 水平均高于对照组。将模型组与对照组比较,发现当乙醇诱导细胞损伤时会导致细胞内 ALT 以及上清液中 LDH 的升高,而白首乌甙苷在 0.01~0.50 mg/mL 的质量浓度范围内可减轻此种损伤 ($P < 0.01$),当白首乌甙苷质量浓度为 0.5 mg/mL 时,随白首乌甙苷质量浓度的升高,ALT 和 LDH 水平逐渐下降。将水飞蓟素组、白首乌甙苷组与模型组分别比较,发现细胞 ALT 和 LDH 含量均下降。

2.4.3 细胞内 GSH 含量 由图 9 可知,与模型组相比,细胞内 GSH 含量随着白首乌甙苷质量浓度的增加而增加,推测白首乌甙苷质量浓度为 0.01~0.50 mg/mL 时可通过提高 GSH 含量来减轻由于乙醇导致的肝细胞损伤。说明白首乌甙苷可以在一定范围内通过调节细胞内氧



. 模型组与对照组相比 $P < 0.01$; * . 保护剂组与模型组相比 $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$

图 8 乙醇诱导肝细胞损伤的 LDH 活性影响

Figure 8 Effect of LDH activity of ethanol-induced hepatocyte injury

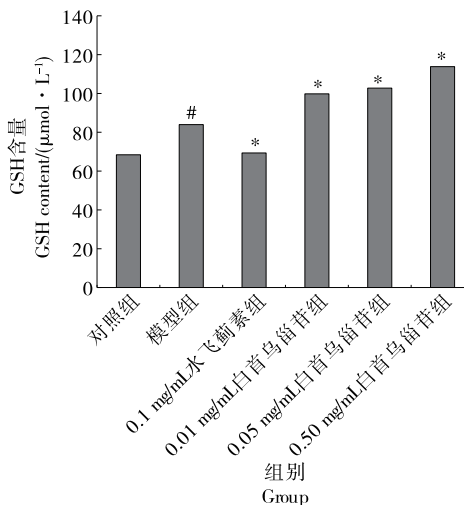


图 9 乙醇诱导肝细胞损伤的胞内 GSH 含量影响

Figure 9 Effect of intracellular GSH content on ethanol-induced hepatocyte injury

化应激反应来保护肝脏。

2.4.4 细胞形态 由图 10 可知,对照组细胞生长状况良好,已铺满培养皿底部且呈融合多边形结构。模型组细胞数量明显降低,无法铺满培养皿底部,且有部分细胞收缩成圆形,损伤了细胞原有形态。水飞蓟素组和白首乌甙苷组的细胞数量与对照组接近,但细胞形态上与对照组有所区别,部分细胞呈现出与模型组类似的细胞收缩呈圆形的情况。由此证明了白首乌对乙醇诱导造成的肝细胞损伤有保护作用,可使细胞数量增加,接近对照组,并对部分细胞形态有恢复作用。

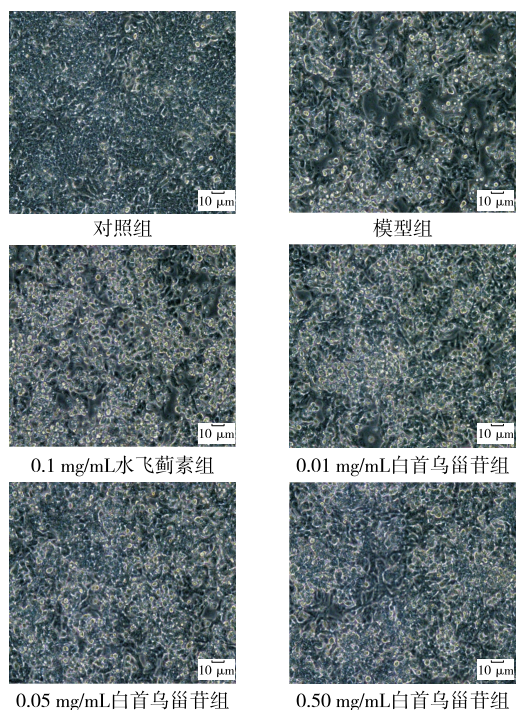


图 10 HepG2 细胞形态图

Figure 10 Morphology of HepG2 cells

3 结论

复合酶法在白首乌甾苷得率和乙醇脱氢酶活性方面提取效果最好,其最佳提取工艺为 46 °C、pH 5.0、100 min 和酶用量 1.30%,该条件下白首乌甾苷实测得率为 (2.80±0.04)%。白首乌甾苷提取物对肝脏具有保护作用,可减少酒精对人体的影响,并且显著提高了细胞内的 GSH 水平,可增强氧自由基的清除,抑制超氧阴离子毒性,减轻氧化应激及脂质过氧化,最终得出白首乌甾苷具有很好的解酒保肝作用的结论。

参考文献

[1] 印鑫,丁永芳,邵久针,等.白首乌的研究进展[J].中草药,2019,50(4):992-1000.
YIN X, DING Y F, SHAO J Z, et al. Research progress on *Cynanchi Bungei Radix*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(4): 992-1000.

[2] WANG L, CAI F J, ZHAO W, et al. *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, *Cynanchum bungei* Decne. and *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.: Current Research and Prospects[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7065-7105.

[3] CHAI Z, HUANG W Y, ZHAO X, et al. Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of polysaccharide from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 1068-1076.

[4] UCHIKURA T, TANAKA H, SUGIYAKI H, et al. Preliminary quality evaluation and characterization of phenolic constituents in *Cynanchi wilfordii Radix*[J]. Molecules, 2018, 23(3): 656-667.

[5] 庄子锐,王明亮,彭蕴茹,等.白首乌 C₂₁甾苷通过 TLR4 通路防治大鼠肝肾纤维化的作用研究[J].中国中药杂志,2021,46(11): 2857-2864.
ZHUANG Z R, WANG M L, PENG Y R, et al. Effect of C₂₁ steroidal glycoside of *Cynanchum auriculatum* on liver and kidney fibrosis through TLR4 pathway [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(11): 2857-2864.

[6] 张明,沈明晨,陈镭,等.白首乌的化学成分、药理作用及栽培技术综述[J].江苏农业科学,2022,50(2): 22-29.
ZHANG M, SHEN M C, CHEN L, et al. Chemical constituents, pharmacological effects and cultivation techniques of *Cynanchum auriculatum*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50(2): 22-29.

[7] 陈其燕,石云,洪键.滨海白首乌多糖的提取与药理活性研究进展[J].现代农业科技,2020(19): 215-216, 220.
CHEN Q Y, SHI Y, HONG J. Research progress on extraction and pharmacological activity of Polysaccharide from Binhai's *Cynanchum auriculatum* [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(19): 215-216, 220.

[8] 许慧卿.滨海白首乌甾苷提取工艺优化及其抗氧化活性研究[D].南京:南京农业大学,2019: 2-24.
XU H Q. Optimization on the extraction of steroidal glycosides from Binhai's *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight and its antioxidant activity[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019: 2-24.

[9] 田鹭.超临界 CO₂萃取白首乌中 C₂₁甾苷的工艺研究[D].镇江:江苏大学,2009: 33-56.
TIAN L. Extraction of C₂₁ steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex wight with supercritical carbon dioxide[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2009: 33-56.

[10] 李文君,王成章,张水晶,等.多元复合酶降解黄姜薯蕈皂苷元的工艺研究[J].生物质化学工程,2014,48(4): 23-27.
LI W J, WANG C Z, ZHANG S J, et al. Study on the degradation of Diosgenin by multiplex enzyme [J]. Biomass Chemical Engineering, 2014, 48(4): 23-27.

[11] WU Z H, WANG Y Y, MENG X, et al. Total C-21 steroidal glycosides, isolated from the root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight, attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative injury and inflammation in L02 cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(6): 3157-3170.

[12] 梁诗,李焯,陈良华,等.野菊水提物和醇提物抗氧化及保肝活性研究[J].亚热带植物科学,2019,48(4): 329-333.
LIANG S, LI X, CHEN L H, et al. Study on antioxidant and hepatoprotective activities of water extracts and alcohol extracts of wild chrysanthemum[J]. Subtropical Plant Science, 2019, 48(4): 329-333.

(下转第 201 页)

- GUO L L, ZHOU L Y, BI J F, et al. Studies on dry technics of shiitake mushroom using pulsed sudden decompression flashing drying and medium-shortwave infrared radiation [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(2): 155-165.
- [23] 朱凯阳,任广跃,段续,等. 红外辐射技术在农产品干燥中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(20): 303-311.
- ZHU K Y, REN G Y, DUAN X, et al. Application of infrared radiation technology in drying of agricultural products[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(20): 303-311.
- [24] 赵亚,朱智壮,石启龙,等. 成膜预处理提高扇贝柱超声波辅助热泵干燥效率及品质[J]. 农业工程学报, 2022, 38(18): 274-283.
- ZHAO Y, ZHU Z Z, SHI Q L, et al. Coating pretreatment improved drying efficiency and quality attributes of ultrasonic assisted heat pump dried scallop adductors[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(18): 274-283.
- [25] 高鹤,易建勇,毕金峰,等. 番木瓜真空冷冻联合变温压差膨化干燥工艺优化[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 156-163.
- GAO H, YI J Y, BI J F, et al. Optimization of the vacuum freeze combined explosion puffing drying for papaya[J]. Journal of the Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(7): 156-163.
- [26] 宋一凡,陈海峰,袁越锦. 猕猴桃 CO₂-低温高压渗透膨化干燥工艺优化[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 229-234.
- SONG Y F, CHEN H F, YUAN Y J. Optimization of CO₂-low temperature high pressure permeation drying process of kiwifruit [J]. Food Science, 2020, 41(4): 229-234.
- [27] YI J Y, HOU C H, BI J F, et al. Novel combined freeze-drying and instant controlled pressure drop drying for restructured carrot-potato chips: Optimized by response surface method[J]. Journal of Food Quality, 2018, 2 018: 6157697.
- [28] SONG J F, GONZALLES G, LIU J, et al. Optimization of explosion puffing drying for high-value yellow-fleshed peach crisps using response surface methodology[J]. Drying Technology, 2019, 37(8): 929-940.
- [29] YUAN Y J, ZHAO Z, WANG L, et al. Process optimization of CO₂ high-pressure and low-temperature explosion puffing drying for apple chips using response surface methodology [J]. Drying Technology, 2022, 40(1): 100-115.
- [30] SUI X L, ZHAO Y, ZHANG X, et al. Hydrocolloid coating pretreatment makes explosion puffing drying applicable in protein-rich foods: A case study of scallop adductors [J]. Drying Technology, 2022, 40(1): 50-64.
- [31] 屈展平,张小燕,宋淑亚,等. 变异系数法评价预处理方式对黄秋葵热风干燥品质特性的影响[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 150-155.
- QU Z P, ZHANG X Y, SONG S Y, et al. Evaluation of the influence of pretreatment methods on the quality characteristics of okra hot-air drying based on the coefficient of variation method[J]. Food & Machinery, 2022, 38(4): 150-155.
- [32] 孟迪,党斌,张杰,等. 干燥方法对黄蘑菇品质及微观结构的影响[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 139-145.
- MENG D, DANG B, ZHANG J, et al. Effects of drying methods on the quality and microstructure of *Armillaria luteo-virens* [J]. Food & Machinery, 2022, 38(10): 139-145.
- [33] 王纯,戴艳军,孙玥,等. 不同品种菌菇加工脆片适宜性评价[J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 171-175, 238.
- WANG C, DAI Y J, SUN Y, et al. Suitability evaluation for processing chips from different mushroom varieties[J]. Food & Machinery, 2021, 37(4): 171-175, 238.
- [34] 刘丽娜,王安建,田广瑞,等. 响应面法优化香菇柄变温压差膨化干燥工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(15): 198-202, 208.
- LIU L N, WANG A J, TIAN G R, et al. Optimization of explosion puffing drying process at variable temperature and pressure for mushroom stem by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(15): 198-202, 208.

(上接第 179 页)

- [13] LIU H, LI J Y, YUAN W W, et al. Bioactive components and mechanisms of poplar propolis in inhibiting proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 144: 112364.
- [14] PENG Y L, HU K. Effect of garlic on rats with chronic intermittent hypoxia combined with diabetes mellitus[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(4): 6 174-6 184.
- [15] 饶智,陈光宇,谢梦洲,等. 芦根提取物对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 95-98.
- RAO Z, CHEN G Y, XIE M Z, et al. Study on the protective effect of Reed root extract on acute alcoholic liver injury in rats[J]. Shi Zhen Chinese Medicine, 2022, 33(1): 95-98.
- [16] MUSTAFA K, YU S, ZHANG W, et al. Screening, characterization, and in vitro-ROS dependent cytotoxic potential of extract from *Ficus carica* against hepatocellular (HepG2) carcinoma cells[J]. South African Journal of Botany, 2021, 138: 217-226.
- [17] 刘甜甜,杨舒涵,颜梅,等. 柠檬提取物和水飞蓟素对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用研究[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(2): 105-109.
- LIU T T, YANG S H, YAN M, et al. Protective effect of lemon extract and silymarin on acute alcoholic liver injury in rats[J]. Journal of Southwest Medical University, 2021, 44(2): 105-109.
- [18] WANG Y S, ZHANG N H, ZHOU J X, et al. Protective effects of several common amino acids, vitamins, organic acids, flavonoids and phenolic acids against hepatocyte damage caused by alcohol [J]. Foods, 2022, 11(19): 3 014.