



铜藻多糖对H₂O₂诱导的HaCaT细胞氧化应激的保护作用

魏双艳, 蔡春尔, 何培民, 贾睿

引用本文:

魏双艳, 蔡春尔, 何培民, 贾睿. 铜藻多糖对H₂O₂诱导的HaCaT细胞氧化应激的保护作用[J]. 热带亚热带植物学报, 2023, 31(2): 232–240.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4567>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

蚕豆花水提取物的UPLC–ESI–QTOF质谱联用分析及抗氧化活性研究

UPLC–ESI–QTOF Mass Spectrometry Analysis and Antioxidant Activity of Water Extract from *Vicia faba* Flowers

热带亚热带植物学报. 2022, 30(5): 663–675 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4596>

黄兰叶乙醇提取物的活性研究和成分分析

Bioactivity and Chemical Composition of Ethanol Extract from *Michelia champaca* Leaves

热带亚热带植物学报. 2022, 30(1): 135–143 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4396>

盐度、温度和光照强度对针叶蕨藻的生长及光合活性的影响

Effects of Salinity, Temperature and Light Intensity on Growth and Photo-synthetic Activity of *Caulerpa sertularioides*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(6): 626–633 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4378>

冬季南亚热带森林演替中后期优势树种幼叶光保护策略

Photoprotection Strategies in Young Leaves of Dominant Species in Mid- and Late-Successional Stages of Low Subtropical Forest in Winter

热带亚热带植物学报. 2021, 29(2): 171–179 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4264>

不同种植模式下重金属污染对牧草叶片光合特性和重金属含量的影响

Effects of Heavy Metal Pollution on Photosynthetic Characteristics and Heavy Metal Contents in Forage Leaves under Different Planting Patterns

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 31–40 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4244>

向下翻页, 浏览PDF全文

铜藻多糖对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的保护作用

魏双艳, 蔡春尔, 何培民, 贾睿*

(上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306)

摘要: 为探究铜藻多糖(*Sargassum horneri* polysaccharides, SHP)对 H₂O₂ 诱导的人角质形成细胞(HaCaT)氧化应激损伤的保护作用, 测定了 SHP 对总抗氧化能力(T-AOC)、DPPH 自由基、羟自由基(\cdot OH)和超氧阴离子自由基(O₂⁻)的清除作用, 以评价 SHP 的体外抗氧化能力, 并建立 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤模型; 通过测定细胞存活率、细胞活性氧以及酶活, 评价 SHP 对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用。结果表明, 当 SHP 为 1 mg/mL 时, DPPH 的清除率为 68%、 \cdot OH 清除能力 65.48 U/mL; 在 SHP 为 3 mg/mL 时, O₂⁻ 清除能力为 84.86 U/mL, T-AOC 为 33.55。SHP 能显著提高 H₂O₂ 诱导氧化损伤的 HaCaT 细胞活力, 其中经 100 μ g/mL SHP 处理后, HaCaT 细胞存活率由 56.85% 提高到 80.57%, 并且显著降低细胞内 ROS 水平, 提高细胞内 SOD 活力, 减少细胞内 MDA 的含量($P < 0.05$)。因此, SHP 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤具有保护作用, SHP 可作为一种天然的抗氧化剂在化妆品以及药妆品领域具有广阔的应用前景。

关键词: 铜藻; 多糖; 人角质形成细胞; 氧化应激; 体外抗氧化

doi: 10.11926/jtsb.4567

Protective Effect of Polysaccharide from *Sargassum horneri* on H₂O₂-induced Oxidative Stress in HaCaT Cells

WEI Shuangyan, CAI Chuner, HE Peimin, JIA Rui*

(College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the protective effect of *Sargassum horneri* polysaccharides (SHP) on H₂O₂-induced oxidative stress injury of human keratinocytes (HaCaT), the total antioxidant capacity (T-AOC), DPPH free radical, hydroxyl free radical (\cdot OH) and superoxide anion free radical (O₂⁻) were determined, and the antioxidant capacity of SHP *in vitro* and established the oxidative damage model of HaCaT cells induced by H₂O₂ was evaluated. The protective effect of SHP on oxidative damage of HaCaT cells was evaluated by measuring cell survival rate, reactive oxygen species and enzyme activity. The results showed that the clearance rate of DPPH was 68% and the scavenging capacity of \cdot OH was 65.48 U/mL treated with 1 mg/mL SHP. The clearance capacity of O₂⁻ was 84.86 U/mL and T-AOC was 33.55 treated with 3 mg/mL SHP. SHP could significantly improve the viability of HaCaT cells by H₂O₂-induced oxidative damage. After, The survival rate of HaCaT cells increased from 56.85% to 80.57%, as well as the intracellular SOD activity treated with 100 μ g/mL SHP, while the contents of ROS and MDA significantly reduced ($P < 0.05$). Therefore, SHP had a protective effect on H₂O₂-induced

收稿日期: 2021-11-12 接受日期: 2022-02-05

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC0312604); 上海市农委科技兴农项目[沪农科推字(2017)1-13]; 国家“八六三”高技术研究发展计划(2014AA093506); 上海市大学生创新训练计划项目(S201910264057)资助

This work was supported by the National Key Research and Development Project (Grant No. 2019YFC0312604), the Project for Agriculture Science and Technology Innovation in Shanghai [Grant No. (2017)1-13], the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No. 2014AA093506), and the Project for Student Innovation Training in Shanghai (Grant No. S201910264057).

作者简介: 魏双艳(1997年生), 女, 硕士研究生, 研究方向为海藻多糖的生物活性研究。E-mail: wsy97221@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: rjia@shou.edu.cn

oxidative stress injury of HaCaT cells, suggesting that SHP, a natural antioxidant, could be widely applied to cosmetics and cosmeceuticals.

Key words: *Sargassum horneri*; Polysaccharide; HaCaT cell; Oxidative stress; *In vitro* antioxidant

机体内活性氧成分与抗氧化系统之间平衡失调所引起的一系列适应性的反应称为氧化应激(oxidative stress, OS)^[1]。通常,正常代谢产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以被细胞内源性抗氧化系统清除^[2-3]。然而,过度的环境压力(如紫外线辐射和化学物质等)会导致异常的活性氧产生,从而导致多种疾病(如癌症、炎症、糖尿病、阿尔茨海默病和衰老等)^[4]。因此,具有较强的活性氧清除能力和低毒性或无毒性的抗氧化成分可能是开发针对氧化应激相关疾病的理想治疗剂。由于天然化合物具有生物活性高、无毒的优点,从陆地和海洋生物中分离生物活性化合物引起了广泛的关注^[5-7]。海藻含有多种独特新颖的活性成分如:多酚化合物、甾醇类化合物、不饱和脂肪酸和多糖等^[6,8],具有多种生物活性如:抗癌、降压、消炎、抗氧化以及抗糖尿病等^[5,9-11],已被广泛应用于医药、化妆品以及药妆品等领域。海藻多糖含量尤其丰富,通常由海藻酸盐、卡拉胶和岩藻多糖组成^[12]。海藻多糖由于其独特的理化性质,如高含量的岩藻糖、半乳糖、糖醛酸和硫酸盐等,具有很强的生物活性^[13-14]。已有报道,从海藻中分离的多糖具有较好的抗氧化活性^[15-16]。

马尾藻属(*Sargassum*)是墨角藻目、墨角藻科中物种最丰富的属之一,全球公认的物种共有 354 种^[17-18]。铜藻(*S. horneri*)为马尾藻属一种典型的大型可食用褐藻,其主要分布在中国暖温带海域浅海区域,其既可以为海藻工业提供优质的原料,又可以在食品、医药和饲料等行业中发挥较高的经济价值。据研究报道,从铜藻中分离的多糖具有抗炎、光保护以及抗衰老等多种生物活性^[19-21]。Fernando 等^[19]利用乙醇分级沉淀法从铜藻中分离的多糖对 UVB 诱导的人角质形成细胞(HaCaT)具有较好的紫外线防护作用。Sanjeeva 等^[21]从铜藻中分离的多糖对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞和斑马鱼胚胎所产生炎症反应具有保护作用。已有研究表明从铜藻中分离的多糖对 DPPH 自由基、·OH 自由基以及 O₂⁻ 自由基等具有清除作用,即具有体外抗氧化作用^[22-25]。并且近期研究发现铜藻多糖表现出较好的抵抗 HaCaT 细胞光氧化损伤的潜力^[19]。随着人们对美的不断追求,绿色天然、温和安全的化妆品已经成为

众多消费者的诉求,而天然抗氧化剂的开发也受到越来越多的重视,然而目前,关于铜藻多糖的抗氧化应激损伤的相关机理还尚未见报道。HaCaT 细胞是人表皮中的主体细胞成分,其经过增殖和分化,最终可形成包括基底层、棘层、颗粒层及角质层的表皮复层结构^[26]。目前 HaCaT 细胞株已经被广泛应用于化妆品的抗氧化、抗衰老及透皮性的研究中^[27]。因此,本文以 HaCaT 细胞为研究对象,通过水提醇沉法分离铜藻多糖(*Sargassum horneri* polysaccharides, SHP),进行红外光谱表征,探究 SHP 的体外抗氧化能力以及 SHP 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激的保护作用,以期 SHP 在医药、化妆品以及药妆品等行业中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

铜藻(*Sargassum horneri*)于 2020 年 10 月采自浙江省枸杞岛;人表皮角质形成细胞(HaCaT)购自上海信裕生物科技有限公司。

Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Scientific 公司)、CO₂ 培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)、TS2RFL 倒置显微镜(日本 Nikon 公司)、F97 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司)、UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津公司)、iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)等。

1.2 SHP 的制备

将新鲜的铜藻用自来水清洗 3 遍,将水脱干,在 60 °C 烘箱中烘干备用,然后用超微粉碎机粉碎,过 80 目筛得到藻粉。称取藻粉 20 g,采用 95%酒精浸泡 72 h 以脱脂脱色。滤渣烘干后按照 1:20 加蒸馏水,90 °C 煮 4 h,用 500 目的纱布过滤得到滤液,然后将滤渣重复煮 1 次,合并 2 次滤液,抽滤过滤掉滤渣,加热浓缩至 100 mL,加入 4 倍体积 95%乙醇,于 4 °C 冰箱静置 24 h,10 989×g 离心得沉淀。最后沉淀经无水乙醇、丙酮和乙醚洗涤 3 次以脱水干燥,平均得到 1.93 g 的 SHP 粉末。

1.3 SHP 的红外光谱表征

称取 10 mg 干燥的 SHP 样品,利用 Nicolet iS5

傅里叶变换红外光谱仪对 SHP 进行结构表征,采用 KBr 压片法进行测定^[28]。

1.4 SHP 的体外抗氧化作用

将 SHP 配制成体积浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1 mg/mL, 参照 DPPH 自由基和羟自由基测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测 SHP 溶液的 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力; 根据超氧阴离子自由基和总抗氧化能力试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书测定 SHP 溶液(0.5、1、1.5、2、2.5、3 mg/mL)对超氧阴离子自由基清除能力和总抗氧化能力。

1.5 SHP 对 HaCaT 细胞的保护作用

HaCaT 细胞的培养 将 HaCaT 细胞分别培养于含 10%胎牛血清及含 1%抗生素的高糖 DMEM 培养基中, 置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱内培养, 根据细胞生长的状况, 每 2~3 d 将旧的细胞培养基全部更换成新鲜的细胞培养基, 当细胞达到 80%~90%融合度时用 0.25%的胰蛋白酶进行消化传代, 然后取处于对数生长期的细胞进行实验。

H₂O₂ 损伤模型的确定 选择对数生长期的 HaCaT 细胞制成 1×10⁵ cells/mL 的细胞悬液, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 每组设 6 个复孔, 置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱内培养, 24 h 后待细胞状态稳定后, 分别加入终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mmol/L 的 H₂O₂ 继续孵育 24 h。用 CCK-8 试剂盒(上海碧云天技术有限公司)检测细胞存活率, 选择细胞存活率接近 50%的 H₂O₂ 浓度作为最佳作用浓度。细胞存活率(%)=(A_{药物}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})×100%, 式中, A_{药物}为实验组吸光度值, A_{空白}为空白组吸光度值; A_{对照}为对照组吸光度值。

SHP 对 HaCaT 细胞的毒性 将 HaCaT 细胞制成 1×10⁵ cells/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 每组设置 6 个复孔, 在细胞培养箱孵育 24 h 后, 用含有不同浓度的 SHP 培养基(0、25、50、75、100、150、200、500 μg/mL)处理细胞, 继续孵育 24 h 后, 用 CCK-8 法测定 SHP 对细胞的安全剂量。

SHP 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞活力的保护作用 取处于对数生长期的 HaCaT 细胞, 用胰酶消化并制备单细胞悬液, 以细胞密度为 1×10⁵ cells/mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 放置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱内培养。待细胞贴壁后, 向多糖保护组加入等体积的 SHP (25、50 和 100 μg/mL),

孵育 1 h 后, 多糖保护组和 H₂O₂ 损伤组分别使用含 H₂O₂ (终浓度为 0.5 mmol/L)的培养基处理 HaCaT 细胞, 而空白对照组加入等体积的培养基。每组设 6 个复孔, 孵育 24 h 后, 用 CCK-8 法测定细胞活力。空白对照组: 不加 H₂O₂, 不加 SHP; H₂O₂ 损伤组: 加 H₂O₂ 损伤, 不加 SHP; 多糖保护组: 加 SHP 预保护 1 h 后加 H₂O₂。

SHP 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞 ROS 的清除作用 将 HaCaT 细胞以 1×10⁵ cells/mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔加入 2 mL, 并设立空白对照组、H₂O₂ 损伤组和多糖保护组。处理结束后, 各孔加入终浓度为 10 μg/mL 的 DCFH-DA, 在细胞培养箱中孵育 30 min, 每隔 5 min 摇晃 1 次, 以便于探针与细胞充分接触, 且全程避光操作。孵育结束后, 用预热的培养基清洗 2 次, 然后收集细胞于荧光显微镜下拍照并用荧光分光光度计测定细胞内的荧光强度。将空白对照组的荧光强度设置为 100%, 其他组与空白对照组荧光强度相比, 以计算其他组细胞内的荧光强度。

SHP 对细胞内的丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响 将细胞接种到 6 孔板, 每孔加入 2 mL, 设立空白对照组、H₂O₂ 损伤组和多糖保护组。处理结束后移除原培养基, 并用 PBS 轻轻漂洗 2 遍, 然后用细胞刮板轻轻刮取, 离心并倒去上清液, 加 200 μL 双蒸水, 利用反复冻融法破碎细胞, 离心后取上清液, 参照 SOD 和 MDA 的试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行测定。

1.6 数据处理

采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析, 采用单因素方差分析(ANOVA)进行显著性分析。P<0.05 表示有显著差异; P<0.01 表示有极显著差异。

2 结果和分析

2.1 SHP 的红外光谱表征

通过红外光谱仪对 SHP 进行简单表征(图 1), 在 3 432 cm⁻¹ 处的吸光度是 O-H 特征伸缩振动峰, 在 2 938 cm⁻¹ 处的吸光度是 C-H 特征伸缩振动峰; 在 1 625 cm⁻¹ 处的特征峰为 H-O-H, 这表明样品中存在水分。此外, 在 1 200 cm⁻¹ 处的吸收峰表示 S=O 的伸缩振动, 即硫酸盐的强烈伸缩振动, 而在 842 cm⁻¹ 处的吸收峰为 C-O-S 的不对称伸缩振动, 即硫酸盐

的弯曲振动。

2.2 SHP 的体外抗氧化活性

采用 DPPH、·OH、O₂⁻ 和 T-AOC 试剂盒对 SHP 的抗氧化能力进行评价, 由图 2 可见, SHP 的自由基清除能力随着 SHP 浓度增大而增大, 呈现出显著的正相关。当 SHP 为 1 mg/L 时, 对 DPPH 和 ·OH 清除能力分别为 68% 和 65.48 U/mL; 在 SHP 为 3 mg/L 时, 清除 O₂⁻ 和总抗氧化能力分别为 84.86 U/mL 和 33.55, 表明 SHP 具有较好的自由基清除能力, 即具有较好的体外抗氧化活性。目前, H₂O₂ 已经广泛被

作为诱导剂用来评估抗氧化的研究^[1,4]。因此, 本研究将采用 H₂O₂ 建立氧化应激模型, 进一步探究 SHP 的体外抗氧化作用。

2.3 SHP 对 HaCaT 细胞的保护作用

H₂O₂ 诱导的细胞损伤模型建立 用终浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mmol/L 的 H₂O₂ 处理 HaCaT 细胞相同时间后, 采用 CCK-8 法检测 HaCaT 细胞的活力变化。由图 3 可见, HaCaT 细胞活力与 H₂O₂ 浓度呈负相关, 即随 H₂O₂ 浓度增加, 细胞活力迅速下降, 当 H₂O₂ 为 0.5 mmol/L 时,

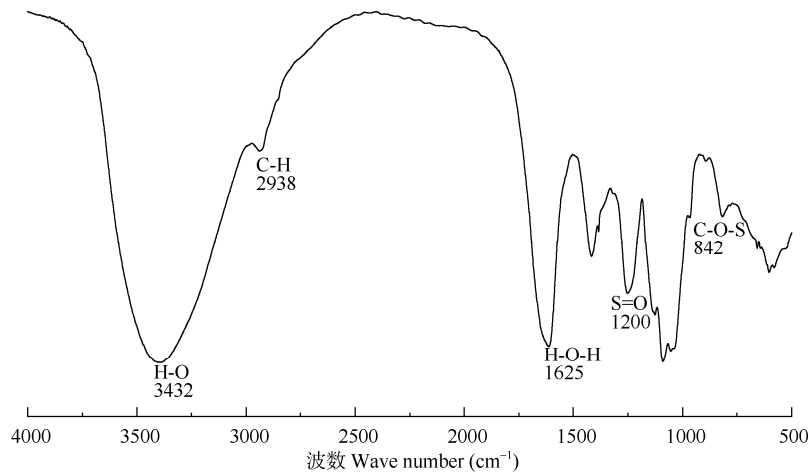


图 1 SHP 的红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of SHP

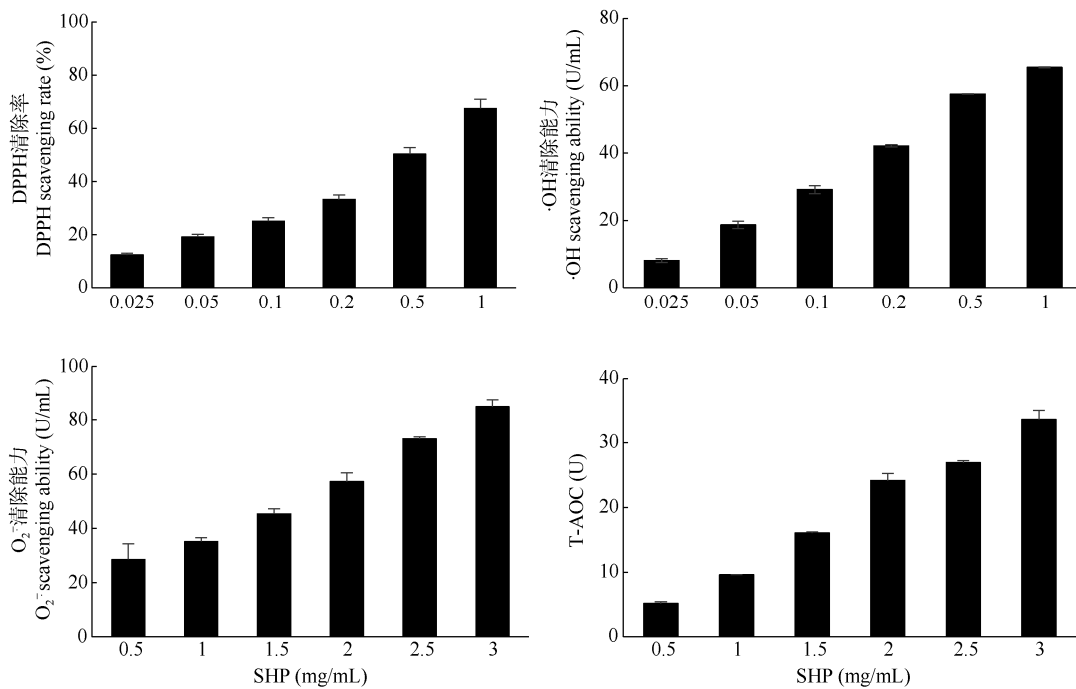


图 2 SHP 的自由基清除能力

Fig. 2 Free radical scavenging ability of SHP

HaCaT 细胞的活力为 62.56%，与空白对照达极显著差异($P<0.01$)。因此选用 0.5 mmol/L H_2O_2 作为 HaCaT 细胞的损伤浓度。

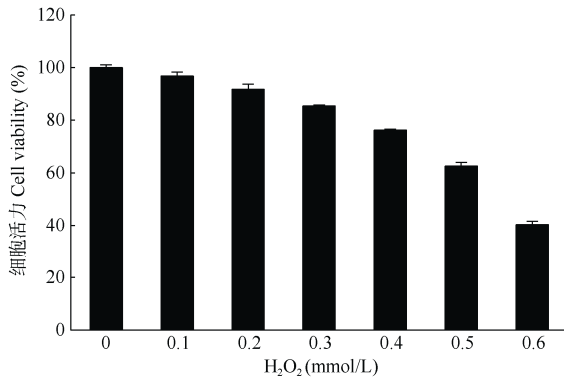


图 3 H_2O_2 对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 3 Effect of H_2O_2 on HaCaT cell viability

SHP 对 HaCaT 细胞的毒性 采用 CCK-8 法分析 SHP 对 HaCaT 细胞的毒性(图 4)，当 SHP 为 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 时，HaCaT 细胞活性与空白对照没有显著差异($P>0.05$)。但当 SHP 浓度大于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞活力明显下降，可能是高浓度 SHP 对 HaCaT 细胞产生了细胞毒性。因此在后续实验中选用 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 3 个剂量来探究 SHP 对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞氧化应激的保护作用。

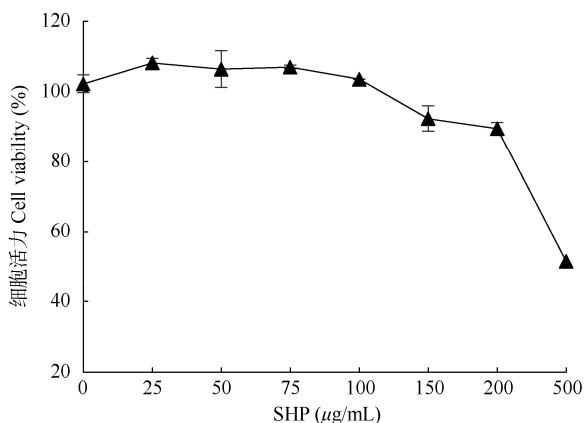


图 4 SHP 对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 4 Effect of SHP on HaCaT cell viability

SHP 对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞活力的保护作用 与空白对照相比，0.5 mmol/L H_2O_2 处理的 HaCaT 细胞活力极显著下降($P<0.01$)，为(56.85±2.63)%；而 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ SHP 处理的 HaCaT 细胞活力呈剂量依赖性增加，分别为(62.75±

1.96)%、(70.62±3.30)%、(80.57±2.91)% (图 5)。这表明 SHP 预处理后对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞活力具有一定的保护作用，SHP 可以有效的减弱 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激损伤。

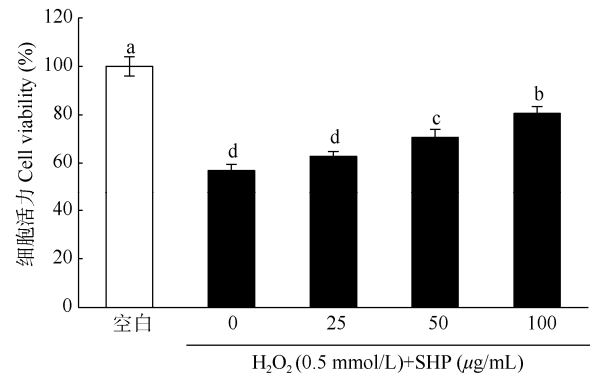


图 5 SHP 对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤的影响。柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Effect of SHP on H_2O_2 -induced oxidative damage in HaCaT cell. Different letters upon column indicate significant differences at 0.05 level.

SHP 对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞内 ROS 的清除作用 由图 6 可见，与空白对照相比， H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞荧光强度明显增强，说明 HaCaT 细胞内 ROS 含量极显著增强($P<0.01$)。但 0 和 25 $\mu\text{g/mL}$ SHP 对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞内 ROS 水平没有显著差异。然而当 SHP 浓度达 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时，HaCaT 细胞内 ROS 水平呈极显著降低($P<0.01$)。同时在荧光显微镜下观察的荧光图像也得到了相似的结果，说明一定浓度范围的 SHP 可以有效清除细胞内 ROS。

SHP 对 MDA 含量和 SOD 活性的影响 与空白对照相比， H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞 SOD 活力显著降低($P<0.01$)，MDA 含量显著升高($P<0.01$)，但 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ SHP 处理的 HaCaT 细胞 SOD 活力呈剂量依赖性增加，MDA 含量呈剂量依赖性显著降低($P<0.05$)(表 1)。这说明 SHP 可以显著降低 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞内 MDA 含量，从而使细胞避免受到氧化应激损伤。

3 结论和讨论

与陆生植物栖息环境相比，海藻具有独特新颖的分子结构以及生理生化性质，其中多糖类物质依然是近年来众多学者的研究热点，广泛应用于各个

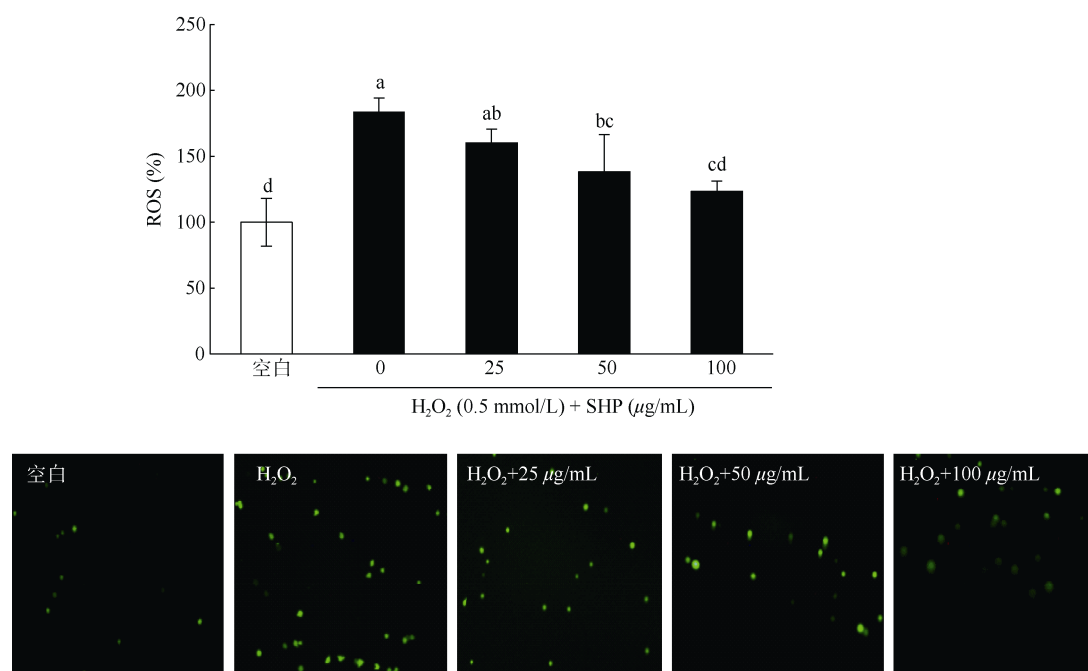


图 6 SHP 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞内 ROS 生成的影响。A: 荧光分光光度计结果; B: 荧光图像。柱上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Effect of SHP on H₂O₂-induced intracellular ROS generation in HaCaT cells. A: Fluorescence spectrophotometer result; B: Fluorescence images. Different letters upon column indicate significant differences at 0.05 level.

表 1 SHP 对 HaCaT 细胞内 SOD 活力和 MDA 含量的影响

Table 1 Effects of SHP on SOD activity and MDA content in HaCaT cell

处理 Treatment	SHP ($\mu\text{g/mL}$)	HaCaT	
		SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
空白对照 Blank control	-	25.44 \pm 2.43a	4.19 \pm 1.54c
H ₂ O ₂	-	7.95 \pm 0.94d	12.25 \pm 0.94a
	25	8.73 \pm 0.91cd	10.70 \pm 1.14ab
SHP	50	14.58 \pm 5.35bc	10.54 \pm 2.53ab
	100	17.01 \pm 4.56b	8.11 \pm 1.11b

数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Data followed by different letters indicate significant difference at 0.05 level.

领域^[29-31]。本研究采用水提法提取铜藻多糖不仅成本低廉而且易于操作,容易实现多糖的规模化生产。红外光谱结果显示 SHP 的结构特征, 2 938 cm^{-1} 处的吸收带是 C-H 的伸缩振动特征峰,说明多糖的存在^[32], 1 260 和 814 cm^{-1} 处的峰是 S=O 和 C-O-S 的不对称伸缩振动,表明 SHP 中含有硫酸盐基团^[33],因此可以推测 SHP 是硫酸多糖^[34]。本研究通过测定 SHP 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、羟自由基以及总抗氧化能力来探究 SHP 的抗氧化活性,结果表明 SHP 在体外具有一定的抗氧化能力,并且其抗氧化能力呈现出一定的浓度依赖性。

近年来,利用 H₂O₂ 建立细胞氧化损伤模型被

广泛应用于评价天然化合物对氧化应激的保护作用^[1,19,21,28],特别是利用多糖作为天然的抗氧化剂已经引起了众多学者的广泛关注。Wang 等^[1]从羊栖菜 (*Hizikia fusiforme*) 中分离的多糖可以显著降低 H₂O₂ 诱导的 Vero 细胞内 ROS 水平、细胞凋亡等,其对细胞氧化损伤具有明显的保护作用。郭子叶等^[35]研究表明浒苔多糖可以降低 H₂O₂ 对 HSF 细胞的氧化损伤,提高细胞的自由基清除能力,并且减少细胞的脂质过氧化作用。由于 H₂O₂ 可能会诱导细胞死亡,因此细胞存活率也是衡量 H₂O₂ 诱导氧化应激的理想指标,因此本研究通过不同浓度的诱导优化最终选用 0.5 mmol/L H₂O₂ 作为诱导 HaCaT 细胞

的最氧化应激模型,并利用该模型对 SHP 进行了体外抗氧化研究。本实验结果表明,SHF 可以呈剂量依赖性地提高 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞的存活率。除此之外,细胞内积累过量的 ROS 将会导致脂质过氧化、蛋白质氧化以及 DNA 损伤等,最终导致细胞死亡^[36]。本研究结果还表明, H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞内的 ROS 水平明显高于对照,而当添加 SHP 时, H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞内 ROS 水平呈剂量依赖性减弱,细胞存活率增加也支持这一观点。

在正常情况下,细胞具有内源性抗氧化系统,其通过产生超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶来保护细胞避免遭受 ROS 的损伤^[37]。SOD 是抗氧化酶防御系统中第一道也是最重要的一道防线,其可以清除细胞内 ROS,特别是超氧阴离子自由基,防止脂质过氧化,从而提升生物体的抗氧化能力^[38]。本实验结果表明, H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞的抗氧化酶 SOD 活力与空白对照组相比显著下降,表明 HaCaT 细胞在 H_2O_2 诱导下产生大量的自由基,从而抗氧化酶 SOD 活性得到抑制、氧化应激程度加深^[39]。然而,在经过 SHP 预处理后其细胞的 SOD 活力呈剂量依赖性增加,表明减弱了细胞氧化应激损伤程度。脂质过氧化在生物系统中被认为是一种毒理学现象,其会导致各种病理状况,而 H_2O_2 会增强细胞系统中的脂质过氧化^[40-41]。MDA 是公认的脂质过氧化作用的最终分解产物,其含量的多少反映了细胞损伤的程度,从而可以间接地反映细胞氧化应激的受损程度^[42]。本研究结果表明,SHF 呈剂量依赖性降低了 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞中 MDA 含量。因此 SHF 可以阻止过氧自由基的积累,保护 HaCaT 细胞免受 H_2O_2 诱导的细胞损伤。在本研究中,SHF 能够显著提高 H_2O_2 诱导氧化损伤的 HaCaT 细胞 SOD 活力,可以有效清除细胞内 ROS,阻止脂质过氧化,并且显著降低细胞内 MDA 的含量,从而对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞氧化应激起到保护作用。以上试验结果证实了 SHF 具有保护细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化应激的抗氧化潜力。

本研究采用自由基清除和细胞实验证实 SHF 具有较好的体外抗氧化作用,表明 SHF 具有作为天然抗氧化剂的潜力,可以用来增强对氧化应激的保护作用,以评估 SHF 作为化妆品和功能性食品成分的应用。从铜藻中提取的多糖作为褐藻多糖的一种,具有良好的对氧化应激损伤的保护作用,那么褐藻多糖可能也具有较好的体外抗氧化活性,并且

由于绿色天然无毒的优点,因此褐藻多糖作为原料开发新型的功能性化妆品具有广阔的前景,同时将其应用到氧化应激等相关疾病的防治也具有一定的可能性。褐藻多糖的抗氧化活性可能与硫酸根含量、分子量、结构组成和溶解度有关,这还需进一步的探究。

参考文献

- [1] WANG L, OH J Y, KIM H S, et al. Protective effect of polysaccharides from celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress *in vitro* in Vero cells and *in vivo* in zebrafish [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 112: 483–489. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.212.
- [2] WANG L, JO M J, KATAGIRI R, et al. Antioxidant effects of citrus pomace extracts processed by super-heated steam [J]. *LWT Food Sci*, 2018, 90: 331–338. doi: 10.1016/j.lwt.2017.12.024.
- [3] FERNANDO I P S, KIM M, SON K T, et al. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: A mechanistic approach [J]. *J Med Food*, 2016, 19(7): 615–628. doi: 10.1089/jmf.2016.3706.
- [4] KIM Y S, HWANG J W, SUNG S H, et al. Antioxidant activity and protective effect of extract of *Celosia cristata* L. flower on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity [J]. *Food Chem*, 2015, 168: 572–579. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.106.
- [5] WANG L, PARK Y J, JEON Y J, et al. Bioactivities of the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*: A review [J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 873–880. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.079.
- [6] THOMAS N V, KIM S K. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmetics [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(1): 146–164. doi: 10.3390/md11010146.
- [7] WEI S Y, CAI C E, HE P M, et al. Application of algae bioactive substances in cosmetics [J]. *Chin J Mar Drugs*, 2021, 40(3): 71–78. [魏双艳, 蔡春尔, 何培民, 等. 藻类生物活性物质在化妆品中的应用 [J]. *中国海洋药物*, 2021, 40(3): 71–78. doi: 10.13400/j.cnki.cjmd.2021.03.010.]
- [8] GUILLERME J B, COUTEAU C, COIFFARD L. Applications for marine resources in cosmetics [J]. *Cosmetics*, 2017, 4(3): 35. doi: 10.3390/cosmetics4030035.
- [9] FERNANDO I P S, JAYAWARDENA T U, SANJEEWA K K A, et al. Anti-inflammatory potential of alginic acid from *Sargassum horneri* against urban aerosol-induced inflammatory responses in keratinocytes and macrophages [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 160: 24–31. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.024.
- [10] FERNANDO I P S, SANJEEWA K K A, KIM H S, et al. Apoptotic and

- antiproliferative properties of 3 β -hydroxy- Δ 5-steroidal congeners from a partially purified column fraction of *Dendronephthya gigantea* against HL-60 and MCF-7 cancer cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2018, 38(4): 527–536. doi: 10.1002/jat.3559.
- [11] WANG L, LEE W W, OH J Y, et al. Protective effect of sulfated polysaccharides from cellulast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against ultraviolet B-induced skin damage by regulating NF- κ B, AP-1, and MAPKs signaling pathways *in vitro* in human dermal fibroblasts [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(7): 239. doi: 10.3390/md16070239.
- [12] LEE W W, KANG N, KIM E A, et al. Radioprotective effects of a polysaccharide purified from *Lactobacillus plantarum*-fermented *Ishige okamurae* against oxidative stress caused by gamma ray-irradiation in zebrafish *in vivo* model [J]. *J Funct Foods*, 2017, 28: 83–89. doi: 10.1016/j.jff.2016.11.004.
- [13] SARAVERA P S, CHO Y N, PATIL M P, et al. Hydrothermal degradation of seaweed polysaccharide: Characterization and biological activities [J]. *Food Chem*, 2018, 268: 179–187. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.077.
- [14] SEEDEVI P, MOOVENDHAN M, SUDHARSAN S, et al. Isolation and chemical characteristics of rhamnose enriched polysaccharide from *Grateloupia lithophila* [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 195: 486–494. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.002.
- [15] HE J Z, RU Q M, DONG D D, et al. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms [J]. *Molecules*, 2012, 17(4): 4373–4387. doi: 10.3390/molecules17044373.
- [16] KIM S Y, KIM E A, KIM Y S, et al. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 804–811. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.111.
- [17] LIU F, LIU X F, WANG Y, et al. Insights on the *Sargassum horneri* golden tides in the Yellow Sea inferred from morphological and molecular data [J]. *Limnol Oceanogr*, 2018, 63(4): 1762–1773. doi: 10.1002/lno.10806.
- [18] MATTIO L, PAYRI C E. 190 years of *Sargassum* taxonomy, facing the advent of DNA phylogenies [J]. *Bot Rev*, 2011, 77(1): 31–70. doi: 10.1007/s12229-010-9060-x.
- [19] FERNANDO I P S, DIAS M K H M, MADUSANKA D M D, et al. Human keratinocyte UVB-protective effects of a low molecular weight fucoidan from *Sargassum horneri* purified by step gradient ethanol precipitation [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(4): 340. doi: 10.3390/antiox9040340.
- [20] WEN Z S, XIANG X W, JIN H X, et al. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 88: 403–413. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.025.
- [21] SANJEEWA K K A, FERNANDO I P S, KIM S Y, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of high molecular weight sulfated polysaccharide; containing fucose separated from *Sargassum horneri*: Short communication [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 803–807. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.050.
- [22] SHAO P, CHEN X X, SUN P L. Improvement of antioxidant and moisture-preserving activities of *Sargassum horneri* polysaccharide enzymatic hydrolyzates [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 74: 420–427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.021.
- [23] YANG Y Y. Comprehensive application of four algae in cosmetics [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016. [杨亚云. 四种大型海藻在化妆品上综合应用研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.]
- [24] ZHANG Y, ZHANG M S, SHI Y P, et al. Comparison on antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Sargassum horneri in vitro* [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(6): 12–18. [张玉, 张绵松, 史亚萍, 等. 铜藻活性组分多糖的体外抗氧化性研究 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(6): 12–18. doi: 0.3969/j.issn.1005-6521.2018.06.003.]
- [25] GU L X, LIU L J, HE S T, et al. Study on water extraction technology and antioxidative activity of polysaccharides from *Sargassum heneri* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2014, 42(29): 10139–10141. [顾丽霞, 刘丽佳, 何淑婷, 等. 铜藻多糖水提法工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(29): 10139–10141. doi: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2014.29.038.]
- [26] PARK N H, PARK J S, KANG Y G, et al. Soybean extract showed modulation of retinoic acid-related gene expression of skin and photoprotective effects in keratinocytes [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2013, 35(2): 136–142. doi: 10.1111/ics.12014.
- [27] FENG B, WU Y, ZHAO Y, et al. Study of cosmetological efficacy of *Dendrobium nobile* prescriptions at cell theoretical level [J]. *China Surfact Deterg Cosmet*, 2014, 44(10): 568–571. [冯冰, 吴越, 赵亚, 等. 金钗石斛复方在细胞水平的美容功效研究 [J]. 日用化学工业, 2014, 44(10): 568–571. doi: 10.13218/j.cnki.csdc.2014.10.127.]
- [28] JAYAWARDENA T U, WANG L, SANJEEWA K K A, et al. Antioxidant potential of sulfated polysaccharides from *Padina boryana*; protective effect against oxidative stress in *in vitro* and *in vivo* zebrafish model [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(4): 212. doi: 10.3390/md18040212.
- [29] HEO S J, JEON Y J. Evaluation of diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae* for radical scavenging activity and its protective effect against H₂O₂-induced cell damage [J]. *Proc Biochem*,

- 2009, 44(4): 412–418. doi: 10.1016/j.procbio.2008.12.005.
- [30] HEO S J, JEON Y J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage [J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 95(2): 101–107. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011.
- [31] KIM H S, WANG L, JAYAWARDENA T U, et al. High-performance centrifugal partition chromatography (HPCPC) for efficient isolation of diphlorethohydroxycarmalol (DPHC) and screening of its antioxidant activity in a zebrafish model [J]. Proc Biochem, 2020, 88: 189–196. doi: 10.1016/j.procbio.2019.09.027.
- [32] OLASEHINDE T A, MABINYA L V, OLANIRAN A O, et al. Chemical characterization, antioxidant properties, cholinesterase inhibitory and anti-amyloidogenic activities of sulfated polysaccharides from some seaweeds [J]. Bioact Carbohydr Diet Fibre, 2019, 18: 100182. doi: 10.1016/j.bcdf.2019.100182.
- [33] YE Y H, JI D S, YOU L J, et al. Structural properties and protective effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharides against ultraviolet B radiation in hairless Kun Ming mice [J]. J Funct Foods, 2018, 43: 8–16. doi: 10.1016/j.jff.2018.01.025.
- [34] ZHANG R, ZHANG X X, TANG Y X, et al. Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: A review [J]. Carbohydr Polym, 2020, 228: 115381. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115381.
- [35] GUO Z Y, CAI C E, GENG Z L, et al. Study on potential use of crude polysaccharides from *Ulva prolifera* in cosmetic [J]. Chin J Mar Drugs, 2014, 33(2): 57–62. [郭子叶, 蔡春尔, 耿中雷, 等. 浒苔粗多糖化妆品开发潜力研究 [J]. 中国海洋药物, 2014, 33(2): 57–62. doi: 10.13400/j.cnki.cjmd.2014.02.010.]
- [36] SHARMA P, JHA A B, DUBEY R S, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [J]. J Bot, 2012, 2012: 217037. doi: 10.1155/2012/217037.
- [37] LÜ H L. Free radicals and human aging [J]. Sci Technol Inf, 2011(8): 253. [吕慧玲. 自由基与人类衰老 [J]. 科技资讯, 2011(8): 253. doi: 10.16661/j.cnki.1672-3791.2011.08.200.]
- [38] CHEN Y, SUN Z, ZHOU Z G. Anti-aging effects of algae-derived bioactive substances [J]. Nat Prod Res Dev, 2017, 29(5): 893–901. [陈勇, 孙净, 周志刚. 藻源活性物质的抗皮肤衰老作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 893–901. doi: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.030.]
- [39] ÇİMEN M Y B. Free radical metabolism in human erythrocytes [J]. Clin Chim Acta, 2008, 390(1/2): 1–11. doi: 10.1016/j.cca.2007.12.025.
- [40] YOKOZAWA T, LIU Z W, CHEN C P. Protective effects of *Glycyrrhizae radix* extract and its compounds in a renal hypoxia (ischemia)-re-oxygenation (reperfusion) model [J]. Phytomedicine, 2000, 6(6): 439–445. doi: 10.1016/S0944-7113(00)80072-0.
- [41] LEE J H, KO J Y, OH J Y, et al. Evaluation of phlorofucofuroeckol-A isolated from *Ecklonia cava* (Phaeophyta) on anti-lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo* [J]. Algae, 2015, 30(4): 313–323. doi: 10.4490/algae.2015.30.4.313.
- [42] ZHOU Y H, YU J P, LIU Y F, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats [J]. Mediat Inflamm, 2006, 2006: 092642. doi: 10.1155/MI/2006/92642.