

# 一种量子化大蕉果提取物抑制人体细胞活性氧自由基的研究

范祥翠<sup>1\*</sup>, 刘人豪<sup>2</sup>, 秦银艺<sup>3</sup>, 郑华<sup>3</sup>, 姚艺晨<sup>4</sup>

(1. 重庆医科大学, 重庆 400000; 2. 美国斯坦福大学, 斯坦福 CA94305; 3. 广西修培刻灵生物科技有限公司, 南宁 530000; 4. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430048)

**摘要:目的** 基于角质形成细胞, 中波紫外线 (UVB) 照射诱导产生活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 建立体外氧化损伤细胞模型, 通过检测大蕉果 (*Musa sapientum*) 提取物对 ROS 的抑制能力来评估其抗皱紧致能力。**方法** 实验基于 UVB 刺激人永生角质形成细胞 (HaCaT) 模型, 参考 Q/WP-SHACDDTW-WIF-1055UVB 刺激角质形成细胞 ROS 测试规范, 细胞接种、配液、UVB 辐射、给药后检测细胞 ROS 含量。**结果** 基于 UVB 刺激 HaCaT 模型, 样品大蕉果提取物在 0.625%、1.250% 和 2.500% (V/V) 浓度下, 角质形成细胞的 ROS 含量明显降低, 且与 NC 组相比具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。**结论** 大蕉果提取物能显著的抑制人体细胞活性氧自由基 ROS 的产生, 具有抗皱、紧致功效。

**关键词:** 大蕉果提取物; HaCaT; 活性氧自由基; *Musa sapientum*

## 0 引言

活性氧自由基 (ROS), 也被称为反应性氧种, 是一类具有高反应性的氧分子或氧原子, 它们在生物体内的代谢过程中扮演着重要的角色。它们与细胞的信号传递、周期循环以及增殖活动紧密相关。ROS 可导致多种损害, 包括: 核酸受损、蛋白质受损、肽链断裂、蛋白质交联聚合物的形成、免疫原性的改变、生物膜的损伤, 以及能量代谢的紊乱。

线粒体呼吸过程中产生的生化反应贡献了大约 90% 的 ROS 含量。在涉及 ROS 的疾病状况中, 细胞因 ROS 的高度活性而遭受氧化应激, 进而引发功能失常, ROS 含量可以高达 100  $\mu\text{mol/L}$ , 这一病理变化与癌症<sup>[1-2]</sup>、炎症<sup>[3-5]</sup>、阿尔茨海默症<sup>[6]</sup> 和帕金森病等神经退行性变化有关。细胞的 ROS 含量是细胞正常代谢和应对环境变化的重要指标, 测定其水平对于理解细胞功能和疾病机制具有重大意义。

植物的天然成分如多酚、黄酮类化合物和维生素 C 等, 通过其抗氧化机制如直接清除 ROS、通过启动抗氧化酶体系或抑制产生 ROS 的酶, 以保护细胞不受氧化应激伤害, 能够有效地中和并减少 ROS 的生成<sup>[7]</sup>。

本研究中的大蕉果 (*Musa sapientum*) 提取物, pH >

12, 在稀释到千分之 3 浓度时 pH 值 > 9.5; -300 mV 左右的负电位; 稀释到极低浓度时仍能使 80 Hz 以上的大分子团簇水被长效、稳定地活化成低于 60 Hz 的小分子团簇水; 富含植物活性硒、羽扇豆酮、黄酮、氨基酸、灵芝酸、香豆素、多糖、酚类等, 且这些活性成分的纳米颗粒半径小于 100 nm, 呈现出植物外泌体的显著特征。台北医科大学万方医院癌症中心、花莲慈济医院中医肿瘤中心、台湾中国中央研究院生物医学科学研究所等联合试验研究证明此种提取物能显著抑制促炎细胞因子和趋化因子 (IL-6, RANTES, IFN- $\gamma$ , MCP-1, 角质形成细胞衍生趋化因子, IL-17), 其对于炎症细胞浸润和促炎及抗炎细胞因子的调节机制可能与 NF- $\kappa$ B 信号抑制密切相关<sup>[8]</sup>。台湾奇美医疗中心医学研究部和台湾大仁科技大学药学系及药学科技研究所研究证明此种提取物能显著促进糖尿病大鼠中伤口愈合<sup>[9]</sup>。本实验旨在探讨此种提取物在抑制 ROS 上的作用效果, 探索植物成分在抑制活性氧自由基 ROS 领域的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

人永生角质形成细胞 (HaCaT)、高糖 DMEM 培养液

\* 通信作者: 范祥翠, 研究方向为生物医药。E-mail: 420542117@qq.com

(GlutaMAX™)、HyClone 胎牛血清(Cytiva)、Sigma-Aldrich PBS、pH 7.4 Sigma-Aldrich 胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.25%)、Abcam MTT 细胞增殖检测试剂盒、Thermo Fisher Scientific DMSO、Abcam ROS 检测试剂盒。

CO<sub>2</sub> 培养箱(瑞沃德, D165H)、生物安全柜(博科 BIOBASE 鑫贝西-A2B2)、倒置荧光显微镜(基恩士 BZ-X810)、酶标仪(Tecan, Spark)。

## 1.2 样品信息

样品信息如表 1 所示。

表 1 样品信息

样品名称	样品编号	保存条件
大蕉果提取物	2404003002-1	常温

## 1.3 测试方法

### 1.3.1 细胞毒性

细胞接种过程: 将细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个的密度接种到 96 孔板中, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内过夜孵育。

测试分组: 分为样品组、调零组、对照组、阳性对照组。在样本组内, 每个样本均设有 8 个不同浓度级别, 均

进行 3 次重复实验。

制备溶液: 根据测试浓度设定表 2, 制备出各种不同浓度的样品溶液。

给药: 铺板率达到半数时给药, 所有孔中加入培养液体积均为 200  $\mu$ L, 其中, 对照组为 10% PBS(磷酸盐缓冲液), 阳性对照组为 10% DMSO(二甲基亚砜), 样品组为含相应浓度的样品, 调零组为无细胞培养液。在施药完毕后, 将 96 孔板放入温度为 37 °C、二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中进行培育。

检测: 细胞培养 1 d 之后, 移除上层液体, 然后添加含有 0.5 mg/mL MTT(四甲基偶氮唑盐)的工作液, 于 37 °C 条件下在无光环境下继续培养 4 h。培养完毕后, 去除上层液体, 向每个孔中加入 100  $\mu$ L 的 DMSO, 最后在 490 nm 波长下测定吸光度值。

细胞活性的计算: 依据特定公式进行计算。

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{样品孔OD} - \text{调零孔OD}}{\text{溶剂对照孔OD} - \text{调零孔OD}} \times 100\%$$

### 1.3.2 ROS 含量

测试分组具体设置如表 3 所示。

表 2 测试浓度设定表

样品名称	浓度设置(V/V)%							
	1	2	3	4	5	6	7	8
大蕉果提取物	10.000	5.000	2.5000	1.250	0.625	0.313	0.156	0.078

表 3 实验设计

组别	样品浓度(V/V)	造模条件	检测模型	检测指标	检测方法
空白对照(BC)	—	/			
阴性对照(NC)	—				
阳性对照(PC)	100 $\mu$ g/mL VC+ 7 $\mu$ g/mL VE	UVB	HaCaT	ROS	荧光成像
	0.625%	300 mJ/cm <sup>2</sup>			
大蕉果提取物	1.250%				
	2.500%				

(1)细胞接种: 将细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个的密度接种到 24 孔板中, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中过夜孵育。

(2)制备溶液: 依据表 3, 配制出各种浓度的样品溶液。

(3)24 孔板细胞覆盖度达到半数时, 进行照射。此时, 阴性对照组、阳性对照组以及样品组均会受到 300 mJ/cm<sup>2</sup> 的 UVB 辐射剂量, 而空白对照组则置于同等条件下, 但不接受任何 UVB 辐射(辐射剂量为 0)。

(4)给药: 在辐射处理完毕后, 对各组进行药物施用。空白对照组和阴性对照组孔加 1 mL 培养基; 阳性组孔加 1 mL 含 100  $\mu$ g/mL 维生素 C 和 7  $\mu$ g/mL 维生素 E 的培养基; 样品组的每个孔中加入 1 mL 含有相应浓度测试物质的培养基, 之后继续培养 24 h。

(5)ROS 含量检测: 检测 ROS 含量时, 用无血清培养基将 DCFH-DA(2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯)探针母液稀释至 1:1000 的比例, 以达到最终浓度为 10  $\mu$ mol/L。将稀释后的 DCFH-DA 探针 500  $\mu$ L 加入每个孔中, 并在 37 °C 的细胞培养箱中孵育。30 min 后, 用无血清的 DMEM 培养基清洗细胞四次, 确保未进入细胞的探针被彻底清除。然后在荧光显微镜下, 以 488 nm 的激发波长进行观察并进行拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞毒性测试结果

设定 8 个样品的给药浓度, 并进行细胞毒性测试, MTT 测试的结果展示在表 4 中。进行 *t*-test 双尾检验的统

计分析, 以 Mean(均值)和 SD(标准差)记录。

以选取的样品中 8 个不同浓度作为横轴, 细胞活性数值作为纵轴, 绘制出细胞活性图(图 1)。因此, 依据 MTT 结果, 样品大蕉果提取物在 2.500%(V/V)的浓度区间内, 未观察到对 HaCaT 的毒性效应。

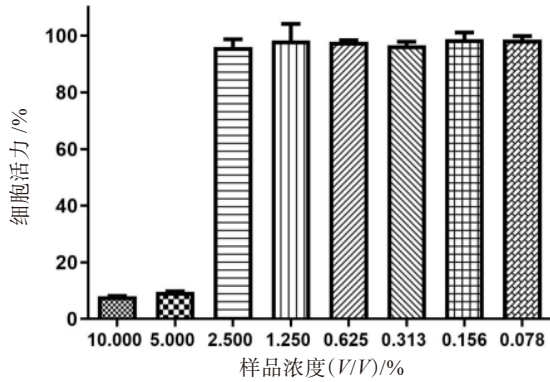


图 1 细胞活力图

2.2 ROS 含量测试结果

根据具体测试方法, 进行 ROS 含量检测, 检测结果如图 2、图 3 和表 5 所示。

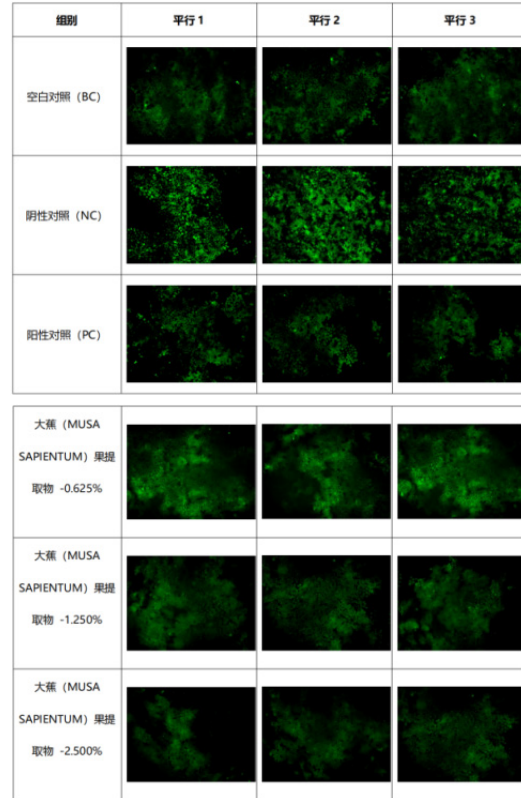


图 2 ROS 含量汇总图

表 4 MTT 测试结果

细胞活力 / %	对照	PC	浓度设置 (V/V) / %							
			10% DMSO	10.000	5.000	2.5000	1.250	0.625	0.313	0.156
Mean	100.00	7.86	7.97	9.47	95.96	98.23	97.19	96.56	98.78	98.67
SD	6.96	0.24	0.15	0.17	2.71	5.92	0.62	1.31	2.36	1.23

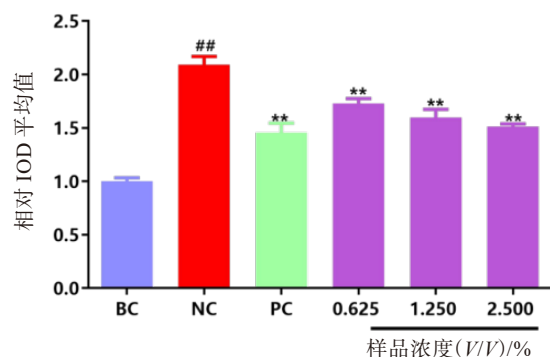
表 5 ROS 数据分析汇总表

组别	Mean/(ng/mL)	SD	P 值
空白对照(BC)	1.00	0.03	/
阴性对照(NC)	2.09	0.08	0.000 <sup>##</sup>
阳性对照(PC)	1.46	0.09	0.001 <sup>**</sup>
大蕉果提取物(0.625%)	1.73	0.04	0.002 <sup>**</sup>
大蕉果提取物(1.250%)	1.60	0.08	0.001 <sup>**</sup>
大蕉果提取物(2.500%)	1.51	0.02	0.000 <sup>**</sup>

注: 在进行 t-检验双尾检验的统计分析时, 若 NC 组与 BC 组进行比较, 显著性水平用 # 符号表示, P 值小于 0.05 时用 # 表示, 而 P 值小于 0.01 时则用 ## 表示; 对于样品组、PC 组与 NC 组的比较, 显著性用 \* 来标示, P 值小于 0.05 时用 \* 表示, P 值小于 0.01 时则用 \*\* 表示。

相较于 BC 组, NC 组的 ROS 荧光信号明显增强 (P < 0.01), 这说明 UVB 刺激在本次实验中成功地构建了模型。相较于 NC 组, PC 组的 ROS 荧光信号明显减少

(P < 0.01), 这说明阳性对照检测是有效的。与 NC 组相比, 样品大蕉果提取物在 0.625%、1.250% 和 2.500%(V/V) 浓度下 ROS 荧光信号显著降低 (P < 0.01)。



注: ##NC组与BC组比较,  $P < 0.01$ ; \*\*PC组和样品组与NC组比较,  $P < 0.01$ .

图 3 ROS 相对含量柱状图

### 3 讨论与结论

有研究表明大蕉果提取物在抗氧化作用方面主要涉及自由基清除、抑制氧化应激及协同作用机制等方面<sup>[10]</sup>。香蕉单宁分子中的酚羟基结构赋予其强还原性,能够有效清除 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟自由基、紫外诱导的 ROS。抑制氧化应激与脂质过氧化,抑制 ROS 生成可减少细胞膜脂质过氧化、蛋白质变性和 DNA 损伤,延缓皮肤衰老。大蕉果提取物中的多酚成分通过多种途径增强抗氧化效果,如香蕉单宁可与铜、锌、亚铁等金属离子结合,通过络合作用减少金属催化氧化反应,其中对亚铁离子的亲和性最高;通过干扰线粒体电子传递链(ETC)和三羧酸(TCA)循环关键酶活性,减少 ROS 生成。

本研究以 UVB 刺激的 HaCaT 为实验模型,系统研究了大蕉果提取物对活性氧自由基的调控作用及其在皮肤抗衰老领域的潜在应用。实验结果显示,当大蕉果提取物的浓度分别为 0.625%、1.250% 和 2.500%(V/V)时,HaCaT 细胞内的 ROS 水平显著下降,与阴性对照组相比,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。这一发现表明,大蕉果提取物能够有效抑制细胞内活性氧自由基的生成,从而发挥其抗氧化、抗皱和紧致肌肤的多重功效。活性氧自由基是皮肤氧化应激和衰老的主要诱因之一,其过量积累会导致细胞膜脂质过氧化、蛋白质变性和 DNA 损伤,进而加速胶原蛋白和弹性纤维的降解,最终引发皮肤松弛、皱纹增多等老化现象。因此,大蕉果提取物通过抑制 ROS 的产生,不仅能够减轻氧化应激对皮肤的损害,还能促进胶原蛋白的合成与稳定,从而显著改善皮肤的紧致度和弹性。此外,本研究为大蕉果提取物在抗氧化领域的应用提供了

重要的科学依据,揭示了其在化妆品和护肤品开发中的广阔前景,尤其是在抗衰老、皮肤修复和光防护等领域。未来研究可进一步深入探讨大蕉果提取物的具体作用机制,例如是否通过调控 Nrf2/ARE 信号通路或抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 炎症通路来发挥抗氧化作用,同时还可探索其与其他天然抗氧化成分(如维生素 C、绿茶多酚等)的协同效应,以开发出更高效、更安全的抗衰老产品,为皮肤健康管理提供更多创新解决方案。

### 参考文献

- [1] 冉遥, 冷泓旭, 郑凯帆, 等. 血根碱在癌症治疗中的抗肿瘤机制研究进展[J]. 中中药学, 2024, 22(7): 1845-1850.
- [2] 张昕彤, 吴昊, 胡艳芬, 等. CYP27A1 对肝细胞癌预后的影响及生物学作用[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(4): 387-395.
- [3] 罗静, 朱华, 张森, 等. 蝙蝠草醇提取物对脂多糖所致 RAW264.7 细胞炎症反应的抑制作用[J]. 中成药, 2024, 46(8): 2763-2768.
- [4] 张之弘, 李秀娟, 王宇馨, 等. 中药干预氧化应激防治糖尿病肾病的研究进展[J/OL]. 实用中医内科杂志, [2024-09-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20240813.1451.007.html>.
- [5] 林丽, 陆滢, 李空飞, 等. 人参皂苷 Rg1 治疗多发性骨髓瘤的网络药理学预测与验证[J]. 温州医科大学学报, 2024, 54(8): 650-656+663.
- [6] 沈畅, 尹秋媛, 孟明耀, 等. 溶酶体半乳糖脑苷酯酶的作用机制及疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(4): 493-503.
- [7] 周宏丹, 罗晓萍, 涂米雪, 等. 植物褪黑素: 植物应答非生物胁迫的新兴信号分子[J]. 生物技术通报, 2024, 40(3): 41-51.
- [8] LIAO C H, LAO T Y, LIU F, *et al.* Inhibition of polyinosinic-polycytidylic acid-induced acute pulmonary inflammation and NF- $\kappa$ B activation in mice by a banana plant extract [J]. International Journal of Medical Sciences, 2024, 21(1): 107-122.
- [9] CHENG Y Z, LIU I M, LIU F, *et al.* Wound healing is promoted by *Musa paradisiaca* (banana) extract in diabetic rats [J]. Archives of Medical Science, 2020: 1-9.
- [10] 覃翠钠, 李志春, 何雪梅, 等. 基于成熟度研究不同品种香蕉多酚含量及抗氧化活性的差异[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 52-60.