

柑橘模拟胃肠消化后的多酚生物有效性和抗 HepG2 细胞增殖活性

从彦丽¹, 唐旭蔚¹, 刘冬¹, 孙海燕¹, 彭梦雪^{1,2}

(1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055)

(2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

摘要: 本文通过模拟胃肠消化法评价柑橘类水果(宽皮柑、脐橙和金桔)的多酚生物有效性和抗肿瘤细胞增殖的活性。柑橘水果经过模拟胃肠消化后,采用高效液相色谱法测定主要多酚单体的释放量,亚甲基蓝法测定柑橘水果提取物抗 HepG2 细胞增殖的活性。结果表明,释放量较大(>20 mg/kg FW)的柑橘多酚是新橙皮甙、根皮苷、柚皮素、香草酸和原儿茶酸等。模拟胃消化过程可以促进根皮苷、香草酸和原儿茶酸的释放,而所检测的大部分多酚在肠消化过程显著降解($p<0.05$)。宽皮柑、脐橙和金桔模拟胃肠消化后其产生细胞毒性的浓度显著降低($p<0.05$),模拟胃消化及模拟肠消化后的提取物(浓度分别为 84.56、93.74、32.26 mg/mL 和 121.23、107.14、40.03 mg/mL)作用于 HepG2 细胞 72 h 后,细胞的存活率分别为 65.46%、37.20%、24.19%和 21.32%、43.52%、12.31%,表明模拟胃肠消化过程可以促进抗 HepG2 细胞增殖的活性物质释放。

关键词: 柑橘; 多酚; 模拟胃肠消化; 生物有效性; 细胞毒性; 抗增殖活性

文章编号: 1673-9078(2019)03-38-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.007

The Bioaccessibility and the Activity of Anti-HepG2 Cell Proliferation of Citrus Fruits Polyphenol after Simulated Gastrointestinal Digestion

CONG Yan-li¹, TANG Xu-wei¹, LIU Dong¹, SUN Hai-yan¹, PENG Meng-xue^{1,2}

(1. College of Applied Chemistry and Biotechnology Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

(2. College of Life Science Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The bioaccessibility and anti-tumor cell proliferation activity of Citrus fruits (*Citrus reticulata*, Navel orange and Kumquat) polyphenol were evaluated by simulated gastrointestinal digestion. After the Citrus fruits were simulated for gastrointestinal digestion, the release of major polyphenols was determined by high performance liquid chromatography, and the activity of Citrus fruit extracts against HepG2 cells was determined by methylene blue method. The results showed that Citrus polyphenols with a large release amount (>20 mg/kg FW) were neohesperidin, phlorizin, naringenin, vanillic acid, protocatechuic acid, and the like. Simulated gastric digestion promoted the release of phlorizin, vanillic acid, and protocatechuic acid, and most of the polyphenols detected significantly degraded during intestinal digestion. After simulating gastrointestinal digestion, the Citrus fruits concentrations that produced cytotoxicity were significantly reduced. The cells survival rates were 65.46%, 37.20%, 24.19% and 21.32%, 43.52%, 12.31%, respectively, after HepG2 cells were treated with simulated gastric digestion and simulated intestine digestion of the *Citrus reticulata*, Navel orange and Kumquat extracts (Concentrations of 84.56, 93.74, 32.26 mg/mL and 121.23, 107.14, 40.03 mg/mL, respectively) for 72 hours. This suggests that the simulated gastric digestion promotes the release of active substances against HepG2 cell proliferation.

Key words: Citrus; polyphenols; simulated gastrointestinal digestion; bioaccessibility; cytotoxicity; antiproliferative activity

柑橘类植物自古以来便是食药两用的重要栽培作物。柑橘在我国有悠久的药用历史,柑橘叶、果皮、

收稿日期: 2018-11-11

基金项目: 广东省国际合作项目(2012B050600031); 深圳市科技计划项目(JCYJ20130331151512026)

作者简介: 从彦丽(1966-),女,副教授,研究方向:食品生物技术

通讯作者: 刘冬(1968-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术

果肉、橘络和果籽均可入药,枳实、陈皮和橘红等是常用的中药,具有破气消积、化痰散痞和理气宽中等作用^[1,2]。常见的柑橘类水果包括宽皮柑、脐橙、金桔、柠檬和柚等,富含多酚、维生素C及类胡萝卜素等多种生理活性成分,被广泛应用于功能性食品的开发。柑橘多酚尤其是类黄酮如柚皮苷、新橙皮甙、柚皮素、川陈皮素、芸香柚皮苷和橙皮苷等具有抗氧

化、抗癌、抗炎和抗病毒等活性^[3,4]。柑橘黄酮类化合物对人体多种肿瘤细胞,如结肠癌细胞、前列腺癌细胞及淋巴瘤细胞等有抑制增殖的作用^[5]。

与传统基于有机溶剂提取的化学评价法相比,通过体外模拟胃肠消化模型评价水果多酚的生物有效性(Bioaccessibility)是更科学合理的评价方法。多酚在食物中以酯、苷和聚合物的形式存在,可通过非共价键(如氢键、疏水作用力、离子键)或共价键(如酯键)与蛋白质、多糖形成复合物^[6]。胃蛋白酶、胰酶和胆汁等消化液可以破坏多酚与蛋白质、多糖等之间的共价键,使结合态多酚释放。胃液较低的 pH (≈ 2) 可以破坏疏水作用力以及氢键的形成,不利于多酚-蛋白质-多糖复合物的形成,从而使得多酚从复合物中释放出来。在胃液中,黄酮类低聚物降解成更小的单元;在小肠中,多酚可能会发生去糖基化、葡萄糖醛酸化、甲基化、磺化以及类黄酮的羟基化等化学变化^[7]。通过有机溶剂萃取水果中的多酚物质,提取物中多酚种类、释放量以及生物活性与模拟胃肠消化法往往有很大不同。黑莓多酚经胃肠消化后提取物可以以较低的、接近生理血药的浓度保护神经母细胞,避免其被 H_2O_2 诱导死亡,而其有机溶剂提取物在高于生理提取 5 倍的浓度下也没有保护作用^[8]。通过模拟胃肠消化法评价柑橘多酚的生物有效性和生物活性,有助于柑橘类水果作为功能性食品的开发。

本研究首先通过高效液相色谱技术(High performance liquid chromatography, HPLC)定量分析 3 种柑橘类水果(宽皮柑、脐橙和金桔)模拟消化前后多酚组分的释放量变化,接着将体外模拟胃肠消化前后的柑橘类水果提取物作用于人肝癌细胞 HepG2,以期探讨柑橘类水果的多酚生物有效性以及抗肿瘤细胞增殖活性。研究结果将丰富水果营养健康评价理论知识,有利于开发利用柑橘类水果作为功能性食品或饲料的研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

宽皮柑和脐橙产地为江西,金桔产地为广东。宽皮柑和脐橙洗净去皮去籽,金桔只去籽后备用。实验材料均避光保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。HepG2 人肝癌细胞株,购于美国 ATCC (American Type Culture Collection)。

1.1.2 主要试剂

胃蛋白酶、胰酶、胆汁提取物、没食子酸、原儿茶酸、新绿原酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、香草酸、

咖啡酸、对香豆酸、芹菜素-2-葡萄糖苷、阿魏酸、芥子酸、白藜芦酸、槲皮素-3-葡萄糖苷、芦丁、异牡荆黄素、新北美圣草苷、扁蓄苷、槲皮苷、柚皮素、根皮苷、新橙皮甙、柚皮甙、根皮素、异鼠李素、Hepes 缓冲液、非必需氨基酸(100 $\times$)、青链霉素混合液(100 $\times$)、甲醇、乙腈,均购自美国 Sigma 公司; William's Medium E 培养基、胎牛血清(FBS)、Hank's 平衡盐溶液(HBSS, 1 $\times$)、0.05%胰酶-EDTA, 购自美国 Life-Technologies 公司; NaCl、 $NaHCO_3$ 、 Na_2CO_3 、浓 HCl、NaOH、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 均购自天津市大茂化学试剂厂; 实验用水为 $18.2\text{ M}\Omega$ 超纯水。

1.2 仪器与设备

JYL-C012 型组织捣碎机,山东九阳公司; IKA T25 digital Ultra-Turrax 型高速匀浆机,德国 IKA 公司; Avanti J-30I 型冷冻离心机,美国 BECKMAN 公司; 5180 R 型冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; Laborota 4001 型旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司; Spectra Max M2 型连续光谱密度荧光检测仪,美国 Molecular Devices 公司; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器公司; SRY-1230 型恒温水浴摇床,美国 crystal 公司; 高效液相色谱(LC-20A),日本岛津公司; 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); Milli-Q 超纯水器,购自美国 Millipore 公司; HERA cell 240 型 CO_2 细胞培养箱,美国 Thermo 公司; DMIRB 型荧光倒置显微镜,德国 Leica 仪器公司。

1.3 体外模拟胃肠消化

1.3.1 体外模拟胃消化

参考熊云霞^[9]的方法并稍作改进。宽皮柑和脐橙去皮去籽后切成碎片,1000 g 果肉与 1000 g 0.9 g/100 mL 的 NaCl 混合,经组织捣碎机捣碎 1 min,再经高速匀浆机以转速 12000 r/min 均质 5 min (冰浴),制成匀浆液; 金桔只去籽后切成碎片,500 g 去籽金桔与 1500 g 0.9 g/100 mL NaCl 混合制成匀浆液。

模拟胃液组: 200 g 匀浆液水浴至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后,1 mol/L HCl 调节 pH 2.0,再加入 5 mL 模拟胃液(0.5 g 胃蛋白酶溶于 5 mL 0.01 mol/L HCl)。胃酸对照组: 200 g 匀浆液加入 5 mL 0.01 mol/L HCl,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度条件下调节 pH 2.0。空白对照组: 200 g 匀浆液加入 5 mL 0.90% NaCl (pH 7.0),pH 值为柑橘水果匀浆液原始 pH 值。

实验设立 3 个平行组。用锡箔纸将锥形瓶包好避光,在氮气流下,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 的恒温水浴摇

床消化,于消化的0、0.5、1、2、3 h取样,每次取样20 g,并将所取样品马上置于碎冰冷却,经20000 r/min离心20 min后,取上清液。柑橘水果提取物经过真空冷冻干燥,超纯水(用于细胞实验)或甲醇溶解(用于HPLC定量分析)后,样品浓缩5~6倍,4℃12000 g/min离心15 min,0.22 μm PES滤膜过滤备用。

1.3.2 体外模拟肠消化

基于模拟胃消化样品的分析结果,模拟胃消化2 h后,样品的多酚黄酮释放量趋于平稳,因此柑橘水果匀浆液经胃消化2 h后结束胃消化阶段,作为肠消化0 h。

模拟肠液消化组:200 g柑橘匀浆液经过模拟胃消化2 h后,1 mol/L NaHCO₃调节pH值至7.0,加入20 mL模拟肠液(0.3 g胰酶和1.9 g胆汁溶于60 mL 0.1 mol/L pH 7.0的NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲溶液);肠空白对照组:200 g柑橘匀浆液经过模拟胃消化2 h后,1 mol/L NaHCO₃调节pH 7.0,加入20 mL的0.1 mol/L pH 7.0的NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲溶液。

用锡箔纸将锥形瓶包好避光,继续在氮气流下置于37℃、100 r/min的恒温水浴摇床中,持续消化4 h,于模拟肠消化0、0.5、1、2、3、4 h取样,每次取样20 g,并将所取样品置于碎冰冷却,经20000 r/min离心20 min后,取上清液。柑橘水果提取物经过真空冷冻干燥,超纯水(用于细胞实验)或甲醇溶解(用于HPLC定量分析)后,样品浓缩5~6倍,4℃12000 g/min离心15 min,0.22 μm PES滤膜过滤备用。

1.4 高效液相色谱条件

高效液相色谱条件在李艳等^[10]的方法上稍作改进。柱温35℃;流速1.0 mL/min;进样量10 μL;检测波长为280、320、350、370 nm;流动相为乙腈(A)和含0.1%甲酸的超纯水(B)。梯度洗脱:0~5 min,3% A;5~10 min,3%~7% A;10~25 min,7%~10% A;25~35 min,10%~12% A;35~45 min,12%~14% A;45~55 min,14%~15% A;55~65 min,15%~22% A;65~80 min,22%~25% A;80~90 min,25%~30% A;90~110 min,30%~35% A;110~115 min,35%~3% A;115~120 min,3% A。多酚单体含量测定的结果表示为mg/kg鲜重(Fresh weight, FW),即mg/kg FW。

1.5 HepG2 细胞培养

HepG2细胞接种在完全培养基中生长,培养基中含有5%胎牛血清(FBS)、10 mmol/L Hepes缓冲液、5 μg/mL胰岛素、0.05 μg/mL氢化可的松、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素。细胞在5% CO₂, 37℃

条件下培养。待细胞进入对数生长期后用0.05%胰酶-EDTA消化传代。

1.6 细胞毒性实验

细胞毒性实验参考Felice等^[11]的方法并稍作改进,实验操作过程如下:100 μL HepG2单细胞悬液接种到96微孔透明板中(4×10⁴个/孔),于含5% CO₂、37℃的细胞培养箱培养24 h;吸出生长培养基,用1×PBS清洗贴壁细胞;加入100 μL不同浓度的柑橘提取物(提取物用0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌后,用生长培养基稀释系列浓度),设空白对照组(只加入生长培养基);于含5% CO₂、37℃细胞培养箱培养24 h;吸出含柑橘提取物的培养基,1×PBS清洗贴壁细胞;每孔加入50 μL亚甲基蓝溶液(含1×HBSS、1.25%戊二醛和0.60%亚甲基蓝),于含5% CO₂、37℃细胞培养箱培养60 min;吸出亚甲基蓝溶液,将微孔板轻轻浸入去离子水中清洗三次至洗净细胞表面吸附的染料。将96孔板倒置在纸巾上晾干水分后,每孔加入100 μL洗脱液(含体积分数49% 1×PBS、50%无水乙醇、1%冰醋酸)。将96孔板室温旋转震荡20 min,置于Spectra Max M5e多功能酶标仪中测定570 nm处的OD值。若样品组比对照组的OD值显著性减少($p<0.05$),即判断为柑橘提取物有细胞毒性。

1.7 抗 HepG2 细胞增殖实验

抗HepG2细胞增殖活性实验所用的柑橘提取物浓度设在没有细胞毒性的浓度范围内。抗增殖实验参考Felice等^[11]的方法并稍作改进,实验操作过程如下:100 μL HepG2单细胞悬液接种到96微孔透明板中(2.5×10⁴个/孔),于含5% CO₂、37℃细胞培养箱培养4 h;吸出细胞生长培养基,加入100 μL不同浓度的柑橘提取物(不同浓度提取物用生长培养基稀释制备),设空白对照组(只加入生长培养基)。于含5% CO₂、37℃细胞培养箱培养72 h;吸出含柑橘提取物的培养基,1×PBS清洗贴壁细胞;亚甲基蓝染色法测定OD值,并计算细胞存活率,细胞存活率(%)=样品组OD值/空白对照组OD值×100。

1.8 统计分析

采用IBM SPSS 20.0软件分析实验数据,平均值的差异性用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)中的最小显著差异法(least significant difference, LSD)检验, $p<0.05$ 为有统计学差异。数值用平均值±标准偏差($\bar{x}\pm s$)表示,实验重复3次。

2 结果与讨论

2.1 柑橘在模拟胃肠消化过程中的多酚释放量

宽皮柑、脐橙和金桔分别经过模拟胃肠消化后,取消化后的水果匀浆离心取上清液,真空冷冻干燥浓缩,甲醇溶解。通过 HPLC 测定其提取物中的多酚单体组分的释放量,结果如图 1、2 和 3 所示。宽皮柑最大释放量高于 20 mg/kg FW 的多酚分别为新橙皮甙 (117.45 ± 15.23 mg/kg FW)、根皮苷 (158.18 ± 7.12 mg/kg FW)、柚皮素 (30.08 ± 3.47 mg/kg FW); 脐橙最大释放量高于 20 mg/kg FW 的多酚分别为根皮苷 (334.45 ± 36.33 mg/kg FW)、香草酸 (173.51 ± 7.45 mg/kg FW)、芹菜素-2-葡萄糖苷 (60.90 ± 6.78 mg/kg FW)、柚皮素 (74.29 ± 5.11 mg/kg FW)、原儿茶酸 (30.40 ± 4.75 mg/kg FW); 金桔最大释放量高于 20 mg/kg FW 的多酚分别为新橙皮甙 (31.23 ± 4.39 mg/kg FW)、根皮苷 (141.48 ± 15.34 mg/kg FW)、原儿茶酸 (39.30 ± 2.88 mg/kg FW)。

新橙皮甙在宽皮柑和金桔中的释放量较高,其中宽皮柑模拟胃消化 0 h、胃消化 2 h、胃酸对照 2 h、胃空白对照 2 h、肠消化 3 h、肠空白对照 3 h 的新橙皮甙释放量分别为 117.45 ± 15.23 、 2.34 ± 0.11 、 3.36 ± 0.41 、 150.66 ± 16.78 、 57.75 ± 9.45 、 85.52 ± 5.67 mg/kg FW。模拟消化 2 h 和胃酸对照 2 h 的新橙皮甙释放量仅仅是胃空白对照 2 h 的 1.60% 和 2.20%, 表明新橙皮甙在较低 pH (≈ 2) 条件下不稳定,胃消化酶可以降解新橙皮甙;胃空白对照 2 h 是模拟胃消化 0 h 的 1.3 倍,表明随着模拟消化时间的延长,新橙皮甙可以缓慢释放到水相中;与肠空白对照 3 h 相比,模拟肠消化 3 h 的新橙皮甙释放量下降了 32.50%,表明肠消化酶可以降解新橙皮甙。

根皮苷在宽皮柑、脐橙和金桔中的释放量均较高。宽皮柑、脐橙和金桔模拟胃消化 2 h 后,根皮苷的释放量分别达到 158.18 ± 7.12 、 221.51 ± 25.18 、 141.48 ± 15.34 mg/kg FW,而模拟肠消化 3 h 后,与模拟胃消化 2 h 相比,根皮苷分别下降了 100%、84.70%、100%。表明根皮苷在酸性 (pH ≈ 2) 条件下的稳定性高于中性或弱碱性条件 (模拟肠消化 pH ≈ 7),胃蛋白酶和酸性条件有利于根皮苷的释放。

香草酸在脐橙中的释放量最大,胃消化 2 h、胃酸对照 2 h、胃空白对照 2 h、肠消化 3 h 的香草酸释放量分别为 173.51 ± 7.45 、 0.70 ± 0.05 、 23.08 ± 3.21 、

3.17 ± 0.26 mg/kg FW,而模拟胃消化 0 h 和肠空白对照 3 h 未检测到香草酸。胃消化 2 h 的香草酸释放量是胃空白对照 2 h 的 7.5 倍,是肠消化 3 h 的 54.7 倍,表明模拟胃液可以促进香草酸的释放,且香草酸在模拟肠消化条件下不稳定。

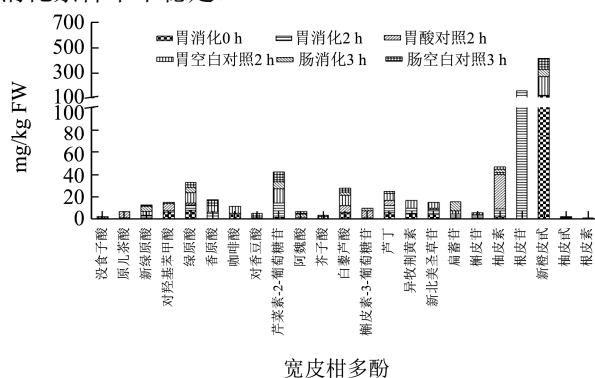


图 1 宽皮柑模拟胃肠消化前后的多酚释放量

Fig.1 The polyphenols releasing from *Citrus reticulata* before and after gastrointestinal digestion

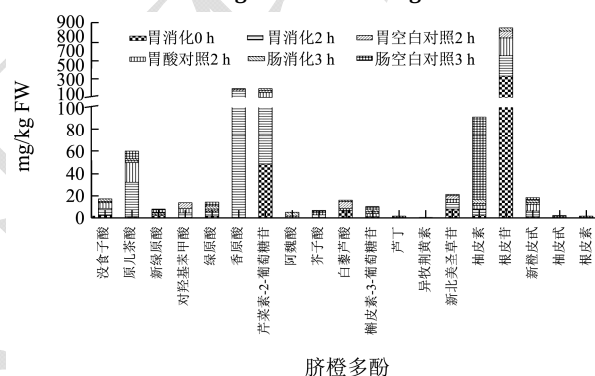


图 2 脐橙模拟胃肠消化前后的多酚释放量分析

Fig.2 The polyphenols releasing from Navel orange before and after gastrointestinal digestion

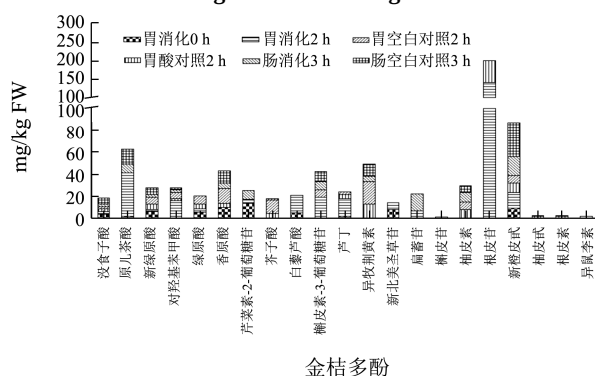


图 3 金桔模拟胃肠消化前后的多酚释放量分析

Fig.3 The polyphenols releasing from Kumquat before and after gastrointestinal digestion

原儿茶酸在脐橙和金桔中的释放量较高。脐橙模拟胃消化 0 h、胃消化 2 h、胃酸对照 2 h、胃空白对照 2 h、肠消化 3 h、肠空白对照 3 h 的原儿茶酸释放量分别为 1.99 ± 0.07 、 30.40 ± 4.75 、 17.48 ± 2.33 、 1.99 ± 0.21 、

1.95±0.20、6.31±0.91 mg/kg FW; 金桔模拟胃消化 0 h、胃消化 2 h、肠消化 3 h、肠空白对照 3 h 的原儿茶酸释放量分别为 1.96±0.16、39.30±2.88、8.04±0.65、13.22±2.78 mg/kg FW (胃酸对照 2 h 和胃空白对照 2 h 未检测到原儿茶酸)。脐橙胃消化 2 h 的原儿茶酸释放量是胃空白对照 2 h 的 15.3 倍, 表明模拟胃液可以促进原儿茶酸的释放。脐橙和金桔肠空白对照 3 h 的原儿茶酸释放量是肠液消化 3 h 的 3.2 和 1.6 倍, 表明模拟肠液可以降解原儿茶酸。

柑橘属植物富含多酚尤其是类黄酮, 已发现的柑橘属多酚超过 60 种^[5,12]。不同品种的柑橘类水果中, 多酚的种类和分布有所不同。柑橘类黄酮中含量最高的是黄烷酮, 黄烷酮糖苷赋予柑橘果实特有的风味。它们很少以苷元的形式 (主要是柚皮素和橙皮素) 存在, 多以糖苷或糖甙的形式, 包括新橙皮糖苷 (或糖甙) 和芸香糖苷两类, 大量存在于各种柑橘果实中^[5]。本研究发现柑橘类水果宽皮柑、脐橙和金桔主要含新橙皮甙、根皮苷、柚皮素、芹菜素-2-葡萄糖苷、香草酸、原儿茶酸、绿原酸、槲皮素-3-葡萄糖苷、异牡荆黄素等多酚。模拟胃肠消化过程可以影响大部分柑橘多酚的稳定性, 新橙皮甙在胃肠消化过程均显著降解。模拟胃消化过程有助于根皮苷、香草酸、原儿茶酸的释放, 而在肠消化阶段, 大部分多酚均发生降解。这与在苹果^[13]中的研究相似, 大部分多酚在模拟胃消化过程稳定存在, 在模拟肠消化过程稳定性较低。我们的前期研究^[14]发现, 柑橘模拟胃消化后总多酚和总黄酮均显著提高, 而在模拟肠消化阶段, 总多酚和总黄酮均显著下降, 所检测的主要多酚 (根皮苷、香草酸、原儿茶酸和新橙皮甙) 的变化规律与之相对应。此外, 在别的水果中也发现了相似的规律。橙、菠萝和猕猴桃模拟胃消化后绿原酸、对香豆酸、柚皮素和芦丁的浓度升高了, 阿魏酸、芥子酸、橙皮苷、槲皮素和儿茶素浓度降低, 而在模拟肠条件下, 大部分分析的多酚浓度降低^[15]。多酚作为抗氧化活性成分, 尽管其在

模拟肠消化阶段降解或异构化为其它形式, 总的抗氧化活性并没有在模拟肠消化过程降低, 相反的, 在苹果^[16]、梨^[17]和柑橘^[14]中均发现模拟肠消化过程可以提高水果的抗氧化活性。多酚单体可能以其它活性形式 (而不是我们已知的形式), 存在于水果提取物中, 并发挥抗氧化的功能。这充分体现了深入探究多酚的构效与生物活性之间的关系的必要性。

2.2 柑橘模拟胃肠消化提取物对 HepG2 细胞的毒性

细胞毒性 (cytotoxicity) 是化学物质 (或药物) 作用于细胞后引起的细胞杀伤事件, 其引发的细胞死亡区别于程序性细胞死亡 (如细胞凋亡)。化学物质对细胞产生毒性时, 细胞结构、新陈代谢、细胞增殖等发生紊乱, 通常通过测定细胞活力来评价化学物质的细胞毒性浓度^[18]。宽皮柑、脐橙和金桔分别经过模拟胃肠消化后, 其提取物用细胞培养基配制成系列浓度, 作用于人肝癌 HepG2 细胞, 亚甲基蓝法测定提取物对细胞的毒性。柑橘提取物处理组 OD 值与培养基对照组相比, 若 OD 值显著性减少即判断为提取物有细胞毒性。

柑橘提取物对 HepG2 细胞的毒性浓度见表 1。由表 1 可知, 柑橘不同处理条件下的提取物对 HepG2 细胞生长产生毒性的浓度各不相同, 模拟胃消化和肠消化后的水果提取物产生细胞毒性的浓度较低, 表明柑橘类水果模拟胃肠消化后, 其提取液对 HepG2 细胞的毒性增强。团队前期在苹果^[19]的研究中也发现了相同的规律, 模拟胃肠消化后的苹果提取物, 其对 HepG2 细胞的毒性浓度降低了。此外, 黑脉羊肚菌^[20]的研究也得到了相似的结果。金桔提取物对 HepG2 细胞的毒性浓度较低, 表明金桔提取物对 HepG2 细胞有较好的杀伤能力, 这可能源于金桔皮层含有丰富的类黄酮以及活性多糖。

表 1 柑橘提取物对 HepG2 细胞的毒性浓度 (mg/mL)

Table 1 The toxic concentration of Citrus fruits extracts on HepG2 cell (mg/mL)

	胃消化 0 h	胃消化 2 h	胃酸对照 2 h	胃空白对照 2 h	肠消化 3 h	肠空白对照 3 h
宽皮柑	>294.84	>84.56	>101.54	>230.71	>121.23	>123.32
脐橙	>159.78	>93.74	>78.70	>242.33	>107.14	>88.63
金桔	>37.04	>32.26	>30.45	>33.00	>24.02	>26.76

2.3 柑橘模拟胃肠消化提取物对 HepG2 细胞的抗增殖活性

将系列质量浓度的柑橘多酚提取物作用于人肝癌

细胞 HepG2, 72 h 后检测其抗增殖活性。试验所用的柑橘提取物浓度均设置在没有细胞毒性的浓度范围内, 这样可以确保柑橘提取物的抗 HepG2 细胞增殖作用不是由其本身的细胞毒性作用引起。宽皮柑、脐橙和金桔不同处理条件下的提取物作用于 HepG2 细胞,

细胞的存活率分别如图4、图5及图6所示。

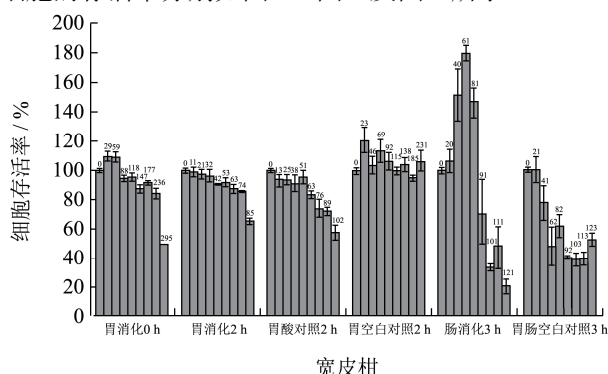


图4 HepG2 细胞在不同浓度的宽皮柑模拟胃肠消化提取物作用下的存活率

Fig.4 The survival rate of HepG2 cell intervened in different concentrations of *Citrus reticulata* extracts

注：柱形图上标示的数值为作用于 HepG2 细胞的宽皮柑提取物浓度，浓度单位 mg/mL。

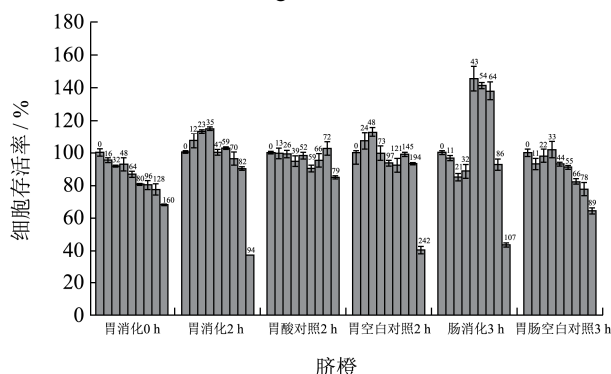


图5 HepG2 细胞在不同浓度的脐橙模拟胃肠消化提取物作用下的存活率

Fig.5 The survival rate of HepG2 cell intervened in different concentrations of Navel orange extracts

注：柱形图上标示的数值为作用于 HepG2 细胞的脐橙提取物浓度，浓度单位 mg/mL。

柑橘模拟胃消化2 h和模拟肠消化3 h后的提取物均可降低 HepG2 细胞的存活率，宽皮柑、脐橙和金桔模拟胃消化2 h及模拟肠消化3 h后的提取物的最高试验浓度（分别为 84.56、93.74、32.26 mg/mL 和 121.23、107.14、40.03 mg/mL）作用于 HepG2 细胞后，HepG2 细胞的存活率分别为 65.46%、37.20%、24.19%和 21.32%、43.52%、12.31%。这表明，宽皮柑、脐橙和金桔模拟胃肠消化后，在最大试验浓度下，其提取物对 HepG2 细胞的增殖有较强的抑制作用，且模拟肠消化3 h后的提取物对 HepG2 细胞增殖的抑制率高于模拟胃消化2 h后的提取物。金桔的抗增殖活性最强，HepG2 细胞的存活率在每个消化处理条件提取物在试验最大浓度作用下均较低（细胞存活率<30%）。宽皮柑、脐橙和金桔模拟肠消化3 h后

的提取物作用于 HepG2 细胞后，均出现了随着浓度的升高，细胞存活率出现“先升高，后降低”的现象，且在低浓度下对细胞生长有促进作用，高浓度下抑制细胞生长。与之相似的是，野樱桃(Chokeberry)^[21]、碧萝芷(Pycnogenol®)^[22]、苹果^[19]和黑脉羊肚菌^[20]模拟胃肠消化提取物的抗癌细胞增殖活性增强。

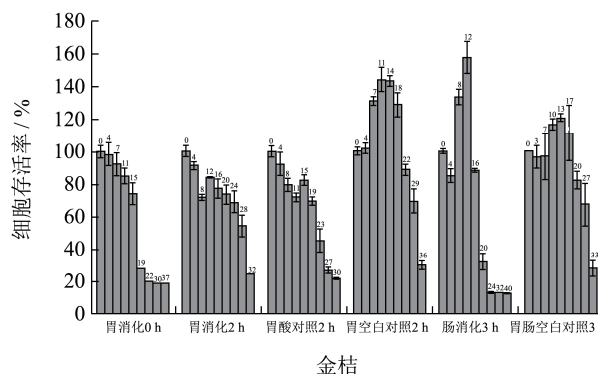


图6 HepG2 细胞在不同浓度的金桔模拟胃肠消化提取物作用下的存活率

Fig.6 The survival rate of HepG2 cell intervened in different concentrations of Kumquat extracts

注：柱形图上标示的数值为作用于 HepG2 细胞的金桔提取物浓度，浓度单位 mg/mL。

多酚可通过调控活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的水平，发挥抗肿瘤细胞增殖活性。槲皮素可通过增强 ROS 介导的凋亡信号通路，诱导卵巢癌细胞凋亡^[23]。山奈酚作用于肿瘤细胞后，DNA 发生剂量依赖性的单链断裂损伤^[24]，导致细胞凋亡。没食子酸能够通过 ROS 依赖的线粒体凋亡通路诱导肺癌细胞凋亡^[25]。模拟胃肠消化后引起的抗增殖活性增强可能在于模拟消化可促进多酚等抗氧化活性物质的释放。尽管所检测的大部分多酚单体在模拟肠消化阶段不稳定，但我们的前期研究表明，柑橘类水果模拟胃肠消化后，其抗氧化活性均显著升高^[14]。除了多酚以外，柑橘中可能还存在抗氧化活性较强的活性多糖、维生素 C、类胡萝卜素等活性成分。癌细胞中 ROS 的浓度显著高于正常体细胞，低微水平的 ROS 升高可促进细胞增殖，而较高水平下的 ROS 升高则会引发细胞的凋亡^[26,27]。与正常细胞相比，肿瘤细胞中铜的浓度要显著偏高，酚类物质在金属离子（如 Cu^{2+} ）存在下通过 Fenton 反应产生 ROS，可以引发癌细胞内更高的氧化应激水平，促使癌细胞 DNA 损伤，诱导细胞凋亡^[28]。酚类物质通过升高癌细胞内的氧化压力，损伤细胞内关键靶分子，启动凋亡程序，可能是其抗肿瘤的重要作用机制。

3 结论

本研究通过体外模拟胃肠消化评价了宽皮柑、脐橙和金桔的多酚生物有效性以及其抗人肝癌细胞 HepG2 增殖的活性。结果表明,柑橘多酚释放量较大的是新橙皮甙、根皮苷、柚皮素、芹菜素-2-葡萄糖苷、香草酸、原儿茶酸等。模拟胃消化过程可以促进根皮苷、香草酸、原儿茶酸的释放,而所检测的大部分多酚在肠消化过程显著降解。宽皮柑、脐橙和金桔模拟胃肠消化后,其细胞毒性浓度降低,表明其对 HepG2 细胞的毒性增强。宽皮柑、脐橙和金桔模拟胃消化 2 h 及模拟肠消化 3 h 后的提取物在最高试验浓度下(分别为 84.56、93.74、32.26 mg/mL 和 121.23、107.14、40.03 mg/mL)作用于 HepG2 细胞后, HepG2 细胞的存活率分别为 65.46%、37.20%、24.19%和 21.32%、43.52%、12.31%,表明模拟胃肠消化过程可以促进抗增殖活性物质的释放。柑橘类水果模拟消化提取物具有良好的抗肿瘤细胞增殖活性,可能与其释放的多酚等抗氧化活性物质有关,有待于进一步探讨柑橘多酚与抗肿瘤活性之间的构效关系。

参考文献

- [1] 谢宗万.论枳实、枳壳古今药用品种的延续与变迁[J].中医药研究,1991,1:19-22
XIE Zong-wan. Researched on duration and changes of *Fructus aurantii immaturus* and *Fructus aurantii* as ancient and present drugs [J]. Research of Traditional Chinese Medicine, 1991, 1: 19-22
- [2] 黄伟.来源于酸橙的枳实、枳壳品质评价体系研究[D].成都:成都中医药大学,2011
HUANG Wei. Study on the quality evaluation system of *Fructus aurantii immaturus* and *Fructus aurantii* [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2011
- [3] Alam M A, Subhan N, Rahman M M, et al. Effect of *Citrus* flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action [J]. Advances in Nutrition, 2014, 5(4): 404-417
- [4] Nakajima A, Ohizumi Y, Yamada K. Anti-dementia activity of nobiletin, a *Citrus* flavonoid: a review of animal studies [J]. Clinical Psychopharmacology & Neuroscience the Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology, 2014, 12(2): 75
- [5] 彭燕,盛雪飞,吴丹,等.柑橘属中黄酮类化合物的研究与应用进展[J].食品与发酵工业,2009,7:113-118
PENG Yan, SHENG Xue-fei, WU Dan, et al. Progress in research and application of *Citrus* flavonoids [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 7: 113-118
- [6] Czubinski J, Dwiecki K. A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(3), 573-585
- [7] Tarko T, Duda-Chodak A, Zajac N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods: A Review [J]. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 2013, 64(2): 79-84
- [8] Tavares L, Figueira I, Macedo D, et al. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1443-1452
- [9] 熊云霞.体外模拟消化对苹果和梨的抗氧化活性及抗癌细胞增殖活性影响的研究[D].广州:华南理工大学,2013
XIONG Yun-xia. Study on influence of *in vitro* digestion on antioxidant and antiproliferative activity of apple and pear [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [10] 李艳,刘梅森,万红霞,等.高效液相色谱法测定玉米中的游离酚和结合酚[J].中国粮油学报,2015,30(9):108-111
LI Yan, LIU Mei-sen, WAN Hong-xia, et al. Determination of soluble phenolics and bound phenolics in corn by high performance liquid chromatography [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(9): 108-111
- [11] Felice D L, Sun J, Liu R H. A modified methylene blue assay for accurate cell countingm [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(1): 109-118
- [12] Tripoli E, La G M, Giammanco S, et al. *Citrus* flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review [J]. Food Chemistry, 2007, 104(2): 466-479
- [13] Bouayed J, Deuer H, Hoffmann L, Bohn T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4):1466-1472
- [14] 从彦丽,彭梦雪,刘冬,等.柑橘在体外模拟胃肠消化过程中总多酚、总黄酮及总抗氧化活性的变化规律[J].食品科学,2016,37(17):96-103
CONG Yan-li, PENG Meng-xue, LIU Dong, et al. Changes of total polyphenols, total flavonoids and total antioxidant activity in *Citrus* digestion during gastrointestinal digestion *in vitro* [J]. Food Science, 2016, 37(17): 96-103
- [15] Rodríguez-Roque M J, Rojas-Graü M A, Elez-Martínez P, et al. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles

- throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(8): 1859-1867
- [16] 彭梦雪,从彦丽,刘冬.模拟胃肠消化评价苹果多酚、黄酮及抗氧化活性的相关性[J].现代食品科技,2016,32(1):122-128
PENG Meng-xue, CONG Yan-li, LIU Dong. Determination of antioxidant activity and the contents of polyphenols and flavonoids of apples by simulated gastrointestinal digestion [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 122-128
- [17] 从彦丽,彭梦雪,王慧清,等.梨体外模拟胃肠消化过程中多酚、黄酮及抗氧化活性的变化规律[J].现代食品科技, 2016,32(6):29-34
CONG Yan-li, PENG Meng-xue, WANG Hui-qing, et al. Changes of polyphenols, flavonoids and antioxidant activities in gastrointestinal digestion of pears *in vitro* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 29-34
- [18] Pirvu L, Stefaniu A, Neagu G, et al. *In vitro* cytotoxic and antiproliferative activity of cydonia oblonga flower petals, leaf and fruit pellet ethanolic extracts, docking simulation of the active flavonoids on anti-apoptotic protein Bcl-2 [J]. Open Chemistry, 2018, 16(1): 591-604
- [19] 周志航,从彦丽,唐旭蔚,等.苹果模拟胃肠消化后的多酚释放和抗 HepG2 细胞增殖活性研究[J].现代食品科技, 2018,34(3):8-18
ZHOU Zhi-hang, CONG Yan-li, TANG Xu-wei, et al. Study on polyphenol release and anti-HepG2 cell proliferation activity after simulated gastrointestinal digestion in apples [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 8-18
- [20] 郑少杰,廖霞,卢可可,等.基于体外模拟消化的黑脉羊肚菌多酚细胞抗氧化及抗增殖活性[J].食品科学,2016,37(21): 234-240
ZHENG Shao-jie, LIAO Xia, LU Ke-ke, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols from morchella esculenta based on *in vitro* simulated digestion [J]. Food Science, 2016, 37(21): 234-240
- [21] Stanisavljević N, Samardžić J, Janković T, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix [J]. Food Chemistry, 2015, 175(175): 516-522
- [22] Frontela-Saseta C, López-Nicolás R, González-Bermúdez C A, et al. Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with pycnogenol® in colon carcinoma cells, the effect of *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(12): 1870-1875
- [23] Liu Y, Yang Z Y, Gong C, et al. Quercetin enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in ovarian cancer cells through reactive oxygen species (ROS) mediated CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)-death receptor 5 pathway [J]. Cancer Science, 2014, 105(5): 520-527
- [24] Bestwick C S, Milne L, Pirie L, et al. The effect of short-term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of Human (HL-60) leukaemic cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2005, 1740(3): 340-349
- [25] Wang R, Ma L, Weng D, et al. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in Human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway [J]. Oncology Reports, 2016, 35(5): 3075-3083
- [26] Tong L, Chuang C C, Wu S, et al. Reactive oxygen species in redox cancer therapy [J]. Cancer letters, 2015, 367(1): 18-25
- [27] Zhang L, Li J, Zong L, et al. Reactive oxygen species and targeted therapy for pancreatic cancer [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016(3): 1-9
- [28] Nazeem S, Azmi A S, Hanif S, et al. Plumbagin Induces Cell death through a copper-redox cycle mechanism in Human cancer cells [J]. Mutagenesis, 2009, 24(5): 413-418

(上接第 153 页)

- [24] Filannino P, Bai Y, Di C R, et al. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree [J]. Food Microbiology, 2015, 46: 272-279
- [25] Filannino P, Azzi L, Cavoski I, et al. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 163(2-3): 184-192