构树穗多糖的抗氧化活性及对AAPH诱导的人红细胞氧化损伤保护作用

陈文博[1,2*]，甄迪辉[1]，杨智皓[1]，姜朋庆[1]，杨乾坤[1]

（1.郑州工程技术学院食品与健康工程学院，河南郑州 450044）（2.河南工业大学小麦和玉米深加工国家工程研究中心，河南郑州 450001）

摘要：该研究探讨了构树穗多糖的抗氧化活性及对 AAPH 诱导的人红细胞氧化损伤保护作用。该研究以构树穗为原料，采用热水浸提法设计单因素试验，用响应面法优化得到构树穗粗多糖提取工艺。以 $ABTS^{+\cdot}$、DPPH·、·OH 清除率，Fe^{3+} 还原能力和对 AAPH 诱导的人红细胞氧化损伤保护作用为考察指标，研究构树穗多糖的体外抗氧化活性和抑制人红细胞溶血性能。实验表明，最佳的提取工艺条件为：料液比 1:32.33（g/mL），提取温度 89.89 ℃，提取时间 116.53 min，此时构树穗粗多糖得率 23.67%；在抗氧化实验中，构树穗多糖对 $ABTS^{+\cdot}$、DPPH·、·OH 清除率分别达到了 76.92%、57.81%、80.76%。构树穗多糖对 Fe^{3+} 的还原能力在质量浓度 8 mg/mL，波长 700 nm 条件下的吸光度为 1.66；红细胞溶血实验表明，构树穗多糖可以有效地抑制 AAPH 处理的红细胞内 ROS 和 MDA 的产生，并降低 GSH 转化为 GSSG 的转化率，同时调节 CAT、GSH-Px 和 SOD 的酶活性恢复到正常红细胞的水平。研究证明了构树穗多糖具有良好的抗氧化能力，可以保护红细胞免受 AAPH 造成的氧化损伤。本研究旨在为研究构树穗多糖具生物活性的物质基础提供科学依据，对构树穗保健食品研发具有重要意义。

关键词：构树穗多糖；条件优化；抗氧化活性；红细胞溶血

文章编号：1673-9078(2025)12-27-37 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.12.1337

Antioxidant Activity of Polysaccharide from *Broussonetia papyrifera* Panicle and Its Protective Effect Against AAPH-induced Oxidative Damage in Human Red Blood Cells

CHEN Wenbo[1,2*], ZHEN Dihui[1], YANG Zhihao[1], JIANG Pengqing[1], YANG Qiankun[1]

(1.School of Food and Health Engineering, Zhengzhou University of Technology, Zhengzhou 450044, China)
(2.National Engineering Research Center of Wheat and Corn Further Processing, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

引文格式：

陈文博,甄迪辉,杨智皓,等.构树穗多糖的抗氧化活性及对AAPH诱导的人红细胞氧化损伤保护作用[J].现代食品科技,2025,41(12):27-37.

CHEN Wenbo, ZHEN Dihui, YANG Zhihao, et al. Antioxidant activity of polysaccharide from *Broussonetia papyrifera* panicle and its protective effect against AAPH-induced oxidative damage in human red blood cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(12): 27-37.

收稿日期：2024-09-06；修回日期：2024-11-04；接受日期：2024-11-10

基金项目：河南省高等学校重点科研项目（24B550018）；河南工业大学小麦和玉米深加工国家工程研究中心开放课题资助课题（NL2023008）；郑州工程技术学院高层次人才科研启动项目（zggk202102）；郑州市科技局基础研究及应用基础研究项目（zkz202203）；郑州工程技术学院“青年英才计划”

作者简介：陈文博（1990-），男，博士，讲师，研究方向：天然产物的开发与利用，E-mail：cwb19900612@163.com

Abstract: In this study, the antioxidant activity and protective effect against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes of the polysaccharides from *Broussonetia papyrifera* panicle were studied. *Broussonetia papyrifera* panicle was taken as the raw material, single factor experiments were designed for a hot water extraction method and the extraction process of *Broussonetia papyrifera* panicle crude polysaccharide was optimized by the response surface method. The evaluation indicators included the scavenging rate of $ABTS^{+}\cdot$, DPPH· and ·OH, the reducing ability of Fe^{3+}, and the protective effect against the AAPH-induced human red blood cell oxidative damage, to study the *in vitro* antioxidant activity and hemolysis inhibition of the polysaccharides. The results showed that the optimal conditions were: solid-to-liquid ratio 1:32.33 (g/mL), extraction temperature 89.89 ℃, extraction time 116.53 min, under which the yield of crude polysaccharide was 23.67%. In the antioxidant experiments, the scavenging rates of $ABTS^{+}\cdot$, DPPH· and ·OH of the polysaccharide were 76.92%, 57.81% and 80.76%, respectively. The absorbance of the polysaccharide corresponding to the reducing ability against Fe^{3+} was 1.66 at a polysaccharide mass concentration of 8 mg/mL and the wavelength of 700 nm. Erythrocyte hemolysis experiments showed that the polysaccharide could effectively inhibit the production of ROS and MDA in the erythrocytes treated by AAPH, reduce the conversion rate of GSH to GSSG, and regulate the enzyme activities of CAT, GSH-PX and SOD to restore normal red blood cell levels. The study confirmed that the polysaccharide from *Broussonetia papyrifera* panicle possessed good antioxidant capacity and can protect erythrocytes from oxidative damage caused by AAPH. This research aimed to provide a scientific foundation for the study on the bioactive material basis of *Broussonetia papyrifera* panicle polysaccharides, which is of great significance for the research and development of health food products derived from *Broussonetia papyrifera* panicle.

Key words: *Broussonetia papyrifera* polysaccharide; condition optimization; antioxidant activity; erythrocyte hemolysis

构树（*Broussonetia papyrifera*），又称楮树，后者是民间常用的称呼。构树喜光，适应性强，在我国各地广泛分布。构树花雌雄异株。构树雌株聚花果名为楮实子，是一味中药，其雄花花序为柔荑状花序，即构树穗，又名楮不揪。嫩时可做野菜食用，美味可口。作为一种具有较高营养价值的天然食品原料，构树穗具有低脂肪、高蛋白等特点，并富含多糖和多种氨基酸。其中，构树穗多糖具有良好的生物活性[1]。多糖广泛存在于生物体中，是一类天然高分子多聚物，同时也是维持生命活动正常运转的基本物质之一。研究表明，植物多糖具有抗氧化，免疫调节等多种生物活性。抗氧化活性作为多糖的一项重要的生物活性指标，在细胞内有着清除自由基的重要作用[2]。当给予红细胞外界条件干扰时，如 AAPH 处理红细胞，活性氧水平会迅速上升，打破红细胞内的氧化还原平衡，过量的活性氧会导致红细胞的凋亡，同时对人体造成伤害。而红细胞对自由基造成的氧化损伤非常敏感，是研究抗氧化水平的理想模型[3]。詹麒平[4]研究金樱子果肉多糖发现，经过 AAPH 处理的红细胞，其细胞内 ROS 水平迅速升高，而加入金樱子果肉多糖预保护能够显著降低红细胞内 ROS 水平，抑制红细胞溶血，且金樱子果肉多糖的浓度越高，对红细胞溶血的抑制能力越强，二者呈现正相关。

构树穗作为河南地区的一种特色食物，除了具有食用和药用价值，其独特的口感和丰富的营养使其受到人们的喜爱，其食用方法多样。而当前雌花授粉形成中药果实楮实子，雄花脱落被大量丢弃，造成了丰富的构树穗资源浪费，且目前国内外构树穗方向的研究寥寥无几，多数偏向于构树花、叶、皮、楮实子等方向。因此，本研究选取构树穗作为提取多糖的原料，并设计条件优化实验优化其提取条件，以及选取 $ABTS^{+}\cdot$、DPPH·、·OH 清除率和 Fe^{3+} 还原能力以及红细胞溶血实验为检验指标，综合反应构树穗多糖的抗氧化能力及对外界诱导的氧化损伤的保护作用。以上研究，填补了构树穗及其多糖研究方向上的空缺，为未来河南地区的构树穗保健产品及其相应领域开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

构树穗，郑州市惠济区；新鲜抗凝血人红细胞，广州鸿泉生物科技有限公司；ABTS、DPPH，阿拉丁公司；DCFH-DA 探针、AAPH，美国 Sigma-Aldrich 公司；微量丙二醛（MDA）试剂盒、活性氧（ROS）试剂盒、还原型谷胱甘肽（GSH）试剂盒、超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒、氧化型谷胱甘肽（GSSG）试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒，碧云天生物技术研究所；PBS 缓冲液（pH 值 7.4），美国 Hyclone 公司；无水乙醇、石油醚，天津市富宇精细化工；氯仿、浓硫酸、正丁醇，天津市科密欧化学试剂；苯酚，烟台市双双化工。

1.2 主要仪器与设备

SHJ-2 磁力搅拌水浴锅，金坛区白塔安瑞实验仪器厂；1000Y 高速粉碎机，浙江铂欧电器有限公司；202-0A 电热恒温干燥箱，绍兴市尚诚仪器制造有限责任公司；722 可见分光光度计，上海舜宇恒平科学仪器有限公司；SHZ-D(III) 循环水式多用真空泵，河南佰泽仪器有限公司；RE-2000A 旋转蒸发器，巩义市瑞力仪器设备有限公司；L530 低速台式离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；Infinite M1000 Pro 酶标仪，瑞士 Tecan 公司；BSA-224S-CW 分析天平，德国 Sartorius 公司；Spectra Max M2 荧光酶标仪，美国 Molecular 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 构树穗粗多糖提取工艺

参考段雪伟等[5]的提取工艺并简要调整，将构树花烘干、粉碎后过 60 目筛，称取构树穗粉末 50.00 g，先加入 10 倍体积的石油醚，在 75 ℃水浴锅中回流 2 h，然后加入 10 倍体积乙醇（80%，*V*/*V*）在 92 ℃水浴锅中回流 2 h，得到脱脂样品。准确称取脱脂样品粉末 2.00 g，按照提取时间 60 min、提取温度 80 ℃、料液比 1:30（g/mL）进行热水浸提，合并提取液，放入离心机 3 000 r/min 离心 20 min，取出离心液抽滤、置于旋转蒸发仪浓缩至小体积，取出浓缩液加入 3 倍体积的无水乙醇，4 ℃下静置 24 h，收集沉淀物，干燥得到构树穗粗多糖。

1.3.2 单因素试验

考察提取时间、提取温度、料液比对构树穗粗多糖得率的影响。考察某一因素时控制其他因素条件固定。其中提取时间（30、60、90、120、150 min），提取温度（50、60、70、80、90 ℃），料液比（1:10、1:20、1:30、1:40、1:50），固定条件为提取时间 60 min、提取温度 80 ℃、料液比 1:30（g/mL）。

1.3.3 响应面优化试验

在单因素试验结果基础上，根据 Box-Behnken 设计原理，设计三因素（料液比、提取温度、提取时间）三水平试验，见表 1。

表 1 响应面水平因素

Table 1 Response surface level and factor

水平	因素		
	A 时间/min	B 温度/℃	C 料液比 (g/mL)
−1	90	70	1:20
0	120	80	1:30
1	150	90	1:40

1.3.4 构树穗粗多糖的纯化

参考周颖等[6]的纯化方法，使用 Sevag 法脱蛋白进行构树穗粗多糖的纯化，Sevag 试剂由氯仿和正丁醇体积比 4:1 配置。将构树穗样品热水浸提后，合并提取液，离心，抽滤，得到抽滤液，将抽滤液与 Sevag 试剂体积比 5:1 进行混合，通风柜内反应 40 min，放入离心机 3 000 r/min 离心 10 min，以上步骤重复进行 5 次，得到样品液，置于旋转蒸发仪浓缩，取出浓缩液以 1:3 的比例加入 3 倍体积的无水乙醇，将混合物在 4 ℃下静置 24 h，收集沉淀，干燥，加入蒸馏水复溶，置于低温冷冻，然后取出干燥，得到构树穗多糖（BBP）。

1.3.5 BBP含量的测定

在测定多糖含量时，参考 Chen 等[7]的方法，使用苯酚－浓硫酸法。通过以葡萄糖溶液作为基准，以其浓度为横轴，相应吸光度为纵轴，绘制了葡萄糖的标准曲线。得到回归方程为 y=0.007 2x−0.013 1，R^2=0.987 8。设置三组平行实验取平均值，测得样品吸光度。

1.3.6 BBP抗氧化活性测定

1.3.6.1 $ABTS^+$·清除率

参考 Wang 等[8]和 Ye 等[9]的实验方法并做一调整，以 Vc 溶液作为阳性对照组。精准称量 ABTS 和过硫酸钾样品，制备 7 mmol/L 的 ABTS 溶液，并将其与相同体积的 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液均匀混合。将混合物在避光环境下静置 18 h，以确保充分反应，使用无水乙醇对混合物进行稀释。选取不同浓度的 BBP 溶液，将其与稀释后的 ABTS 溶液按照 1:2 的体积比例混合，混合后的溶液在黑暗环境中反应 6 min，测量混合溶液在 734 nm 波长下的吸光度值，并标记为 A_1。以不含 BBP 为对照组，吸光值记为 A_0。每组设置 3 个平行实验，其中 BBP 溶液质量浓度为 0.5、1、2、4、8 mg/mL。将 Vc 溶液与 BBP 溶液吸光度结果做一对比，当吸光度数值呈现较低水平时，反映其具备更强的自由基清除能力。采用以下公式计算 $ABTS^+$· 的清除效果：

$$C_A=(1-\frac{A_1}{A_0})\times 100\% \quad (1)$$

式中：

C_A——$ABTS^+$· 清除率，%；

A_0——蒸馏水代替样品的无样品组吸光值；

A_1——多糖样品组吸光值。

1.3.6.2 DPPH·清除率

DPPH· 清除率：参考 Sun 等[10]的实验方法，以 Vc 溶液作为对照组，配制不同浓度的 BBP 溶液，准确量

取 1.0 mL 配置的 BBP 溶液，加入等量的 DPPH 溶液，充分摇匀确保反应均匀，将混合溶液在室温下黑暗环境存放 30 min。然后使用分光光度计在 517 nm 波长下测定该溶液的吸光度，记录该值为 A_1。设置对照组，即不含 BBP 的溶液，同样在相同条件下测定其吸光度，记录为 A_0。每组设置 3 个平行实验。其中 BBP 溶液质量浓度为 0.5、1、2、4、8 mg/mL，DPPH 溶液：0.12 mmol/L。将 Vc 溶液与 BBP 溶液吸光度结果做一对比，当吸光度数值呈现较低水平时，反映其具备更强的自由基清除能力。采用以下公式计算 DPPH· 的清除效果：

$$C_D=(1-\frac{A_1}{A_0})\times 100\% \quad (2)$$

式中：

C_A——DPPH· 清除率，%；

A_0——蒸馏水代替样品的无样品组吸光值；

A_1——多糖样品组吸光值。

1.3.6.3 ·OH清除率

参考闫浩等[11]的方法并略做调整。以 Vc 溶液作为对照组。配制不同浓度的 BBP 溶液，准确量取 1.0 mL 配置的多糖溶液，取 1.0 mL 的 $FeSO_4$ 溶液，与等量的水杨酸－乙醇溶液混合。向该混合溶液中添加 1.0 mL 的 H_2O_2，并将整体置于 37 ℃水浴中加热 30 min。加热完成后，取出混合物并测定其在 510 nm 波长下的吸光度值。其中，蒸馏水代替样品的无样品组吸光值记为 A_0，多糖样品组吸光值记为 A_1，蒸馏水代替样品及 H_2O_2 的对照组吸光值记为 A_2。每组设置 3 个平行实验。其中 BBP 溶液质量浓度为 0.5、1、2、4、8 mg/mL，$FeSO_4$ 溶液：2 mmol/L，H_2O_2 溶液：6 mmol/L，水杨酸－乙醇溶液：6 mmol/L。将 Vc 溶液与 BBP 溶液吸光度结果做一对比，当吸光度数值呈现较低水平时，反映其具备更强的自由基清除能力。采用以下公式计算 ·OH 的清除效果：

$$C_H=\frac{A_0-A_1}{A_0-A_2}\times 100\% \quad (3)$$

式中：

C_H——·OH 清除率，%；

A_0——蒸馏水代替样品的无样品组吸光值；

A_1——多糖样品组吸光值；

A_2——蒸馏水代替样品及 H_2O_2 的对照组吸光值。

1.3.6.4 Fe^{3+}还原能力

Fe^{3+} 还原能力：参考 Xia 等[12]的方法并略做调整，以 Vc 溶液作为对照组。配制不同浓度 BBP 溶液，精确量取 1.0 mL BBP 溶液，随后添加 1.0 mL 的磷酸盐缓冲液和等体积的铁氰化钾溶液，确保充分混合。再将混合液置于 50 ℃下水浴保持 20 min，在水浴完成后加入 2.5 mL 三氯乙酸，通过离心机在 2 000×g 的离心力下离心 10 min，将离心后的混合物中取出 2.5 mL 上清液，与 5.0 mL 的 $FeCl_3$ 溶液和 2.5 mL 蒸馏水混合，然后在室温下静置 10 min。静置结束后使用分光光度仪测定该混合物在 700 nm 波长下的吸光度，将此吸光度值作为衡量多糖溶液样品还原能力大小的指标。每组设置 3 个平行实验，吸光度越高，代表多糖溶液样品还原能力越强。

1.3.7 BBP对AAPH诱导的人红细胞氧化损伤保护作用

1.3.7.1 红细胞悬浮液的制备

新鲜血液样本来自健康不吸烟的 30 岁成年男性，取 10 mL 新鲜的血液移入 80 mL 离心管中，加入 70 mL pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS），离心机设置 2 500 r/min 离心 15 min，取出后将上清液移除，重复该操作两到三次，直至上清液澄清透明。向离心结束的红细胞样品加入 4 倍体积的磷酸盐缓冲液稀释后得到红细胞悬浮液。

1.3.7.2 红细胞溶血抑制活性

参考陈文博[13]的方法，将上述制备好的红细胞悬浮液取 200 μL 移入离心管中，将其设置为三组，每组设置 5 个平行实验。其中，A 组只加入正常红细胞悬浮液，作为对照，B 组向红细胞悬浮液中加入多糖保护，C 组向红细胞悬浮液中加入 AAPH 诱导氧化损伤。向 B 组加入 200 μL 不同质量浓度的（0.5、1、2、4、8 mg/mL）构树穗多糖溶液进行保护；向 A，C 两组分别加入相同体积 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液溶液，在 37 ℃条件下反应 30 min，向 A 组添加了 400 μL 的磷酸盐缓冲溶液，向 B、C 两组各加入 400 μL 的 AAPH 溶液。将所有组别在 37 ℃条件下进行振荡，并避光保存 2 h。随后使用 8 mL 的磷酸盐缓冲溶液对各组样品进行稀释，并将稀释后的样品放入离心机中以 2 500 r/min 的转速离心 15 min。离心完成后，取出 200 μL 的上清液，并将其置于 540 nm 波长的酶标板中，测定其吸光度（A）。在红细胞悬液中加入 8 mL 的超纯水，相同条件下测定其吸光度（B）。溶血率的计算基于以下公式：

$$C=(1-\frac{A}{B})\times 100\% \quad (4)$$

式中：

C——溶血率，%；

A——未完全溶血样品；

B——加超纯水完全溶血样品。

1.3.7.3 红细胞活性氧（ROS）含量测定

将预先制备的红细胞悬浮液，在 4 ℃条件下使用 1 200×*g* 的离心力进行离心，持续 10 min。随后用 PBS 缓冲液重复洗涤红细胞三次，丢弃上清液。用相当于红细胞体积五倍的 PBS 溶液重新悬浮红细胞，再向红细胞悬浮液中加入 200 μL 浓度为 10 μmol/L 的 2’7’- 二乙酰二氯荧光素（DCFH-DA），确保在 37 ℃条件下避光存放 30 min。完成孵育后，使用 PBS 溶液进行多次洗涤，直至 DCFH-DA 被完全洗去。然后用 600 μL 的 PBS 溶液再次重悬红细胞，并充分混合。从中取出 200 μL 的红细胞悬液转移至 96 孔板中，使用酶标仪在 540 nm 波长下测定红细胞样品的荧光强度。

1.3.7.4 红细胞GSH、GSSG、MDA、GSH-Px、SOD及CAT含量测定

将上述处理后的红细胞样品按试剂盒说明书测定 GSH、GSSG、MDA 含量及 GSH-Px、SOD、CAT 活性。

1.3.8 数据处理

响应面试验的设计与结果分析采用 Design-Expert 软件完成；抗氧化活性及红细胞相关实验结果以 Origin 8.5 软件进行图形化处理；所有实验数据均以均值 ± 标准差表示，并采用 IBM SPSS Statistics 27 软件进行统计学分析，通过方差分析（ANOVA）检验各处理组之间的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

由单因素实验结果绘得图 1。由图 1a 可知，随着提取时间增大，构树穗得到充分的浸提，粗多糖得率逐渐上升，当提取时间为 120 min 时，粗多糖得率达到最大为 20.62%，而后得率逐渐下降，推测是热水提取的时间过长导致提取多糖中的杂质被提取出来，从而导致多糖得率的降低。考虑到提取效率，选取最适热水浸提时间为 120 min。由图 1b 可知，随着提取温度增大，分子热运动加快，粗多糖得率逐渐上升，当提取时间达到 80 ℃时，粗多糖得率达到最大为 17.1%，而后逐渐下降，推测是温度过高从而破坏了多糖的结构。考虑到提取效率，最适水浸提温度选择为 80 ℃。由图 1c 可知，随着料液比增大，提取液量增大，溶液黏度降低，从而使构树穗粗多糖容易扩散出来，使得粗多糖得率先是逐渐上升，当料液比达到 1:30（g/mL）时，粗多糖得率达 18.26%，而后逐渐下降。推测是料液比过高导致溶液中的其它杂质也提取出来，且使后续旋转蒸发时造成时间过长，破坏多糖结构，影响多糖提取率[14]。考虑到提取效率和成本，选取最适料液比为 1:30（g/mL）。

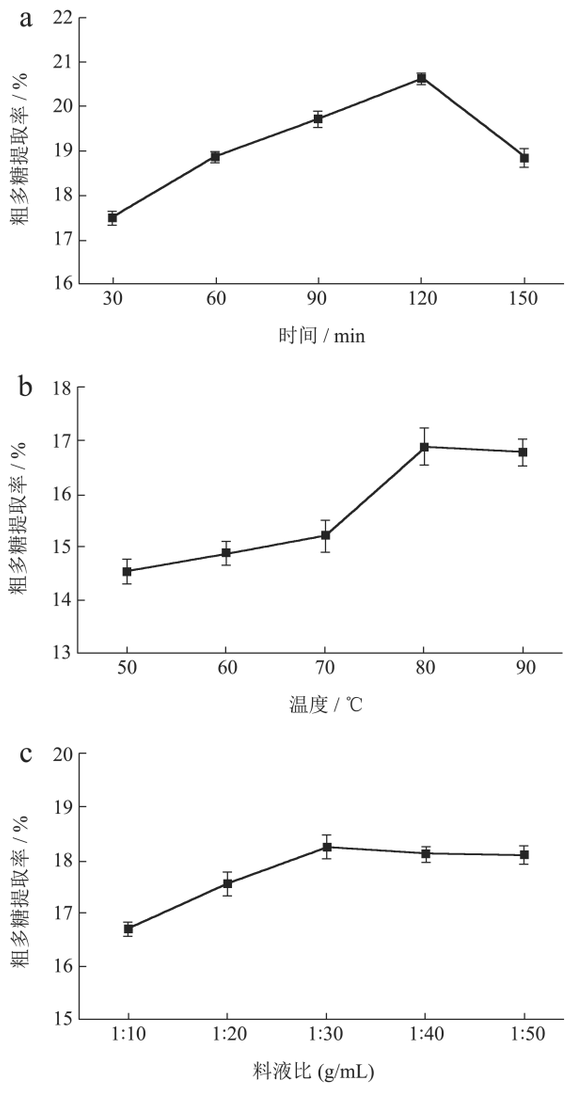


图 1 单因素条件对构树穗粗多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of single factor conditions on extraction rate of crude polysaccharide from *Broussonetia papyrifera*

2.2 响应面优化试验结果与分析

响应面试验结果如表 2 所示。通过观察图 2 等高线的形状，可以直观判断两因素之间的交互作用是否显著。图中等高线呈椭圆形，表明时间和温度、时间和料液比、温度与料液比之间的交互作用对多糖得率具有显著影响。图 3 展示了多个因素对粗多糖得率的 3D 响应面效果。经过对响应面模型的综合分析得出了最佳提取时间为 116.53 min，最佳温度为 89.89 ℃，最佳料液比为 1:32.33 mg/mL，以及最佳多糖提取率达到了 23.67%。

表 2 响应面的试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of response surface

试验号	因素			多糖提取率/%
	时间/min	温度/℃	料液比 (g/mL)	
1	−1	−1	0	18.2
2	−1	1	0	22.45
3	−1	0	−1	17.35
4	−1	0	1	19.88
5	0	−1	1	19.97
6	0	1	1	21.78
7	0	−1	−1	17.87
8	0	1	−1	18.75
9	1	−1	0	19.71
10	1	1	0	22.68
11	1	0	−1	17.99
12	1	0	1	18.82
13	0	0	0	23.67
14	0	0	0	22.56
15	0	0	0	21.88

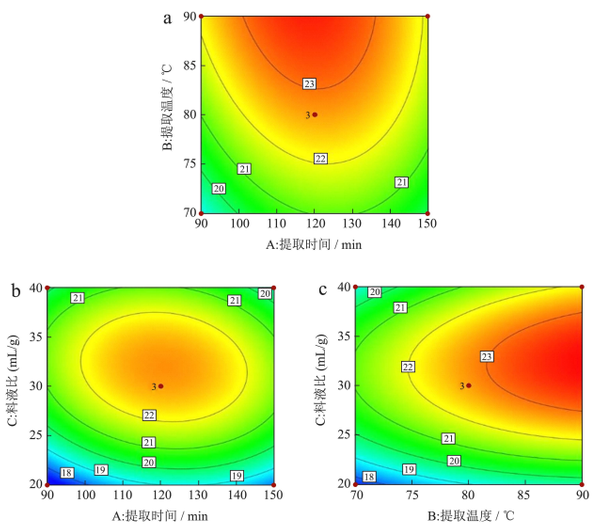
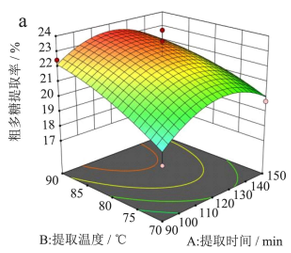


图 2 响应面优化结果 2D 图

Fig.2 2D Graph of response surface optimization results



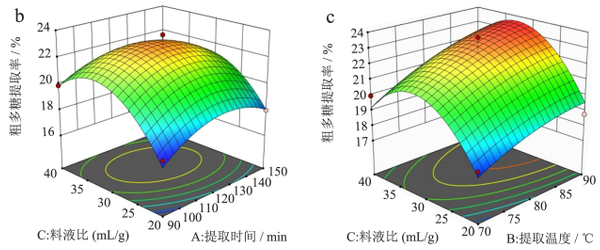


图 3 响应面优化结果 3D 图

Fig.3 3D Graph of response surface optimization results

2.3 体外抗氧化活性结果与分析

2.3.1 BBP对ABTS^{+}·的清除能力

ABTS^{+}· 清除原理是，ABTS 与过硫酸钾发生反应被氧化，生成的 ABTS^{+}· 在溶液中呈蓝绿色，该自由基在 734 nm 处有最大吸收峰，当抗氧化剂与 ABTS^{+}· 反应后，会使其褪色，导致 734 nm 处的吸光值降低[15]。因此，通过测定 734 nm 处的吸光值变化，可以评价 BBP 的抗氧化能力。图 4 展示了 BBP 对 ABTS^{+}· 清除能力的测定结果。由图可知，BBP 对 ABTS^{+}· 展现出了明显的清除效果，并且这种清除效果与其浓度呈现正相关关系，即随着浓度的提升，清除能力也随之增强。当质量浓度为 8 mg/mL 时 BBP 对 ABTS^{+}· 的清除率达到了 76.92%。但与 Vc 在相同浓度下的表现相比，BBP 对 ABTS^{+}· 的清除率稍显逊色。

研究表明，多糖浓度提高可以使 ABTS 溶液蓝绿色减弱，且溶液褪色的程度与样品抗氧化程度呈正相关，ABTS^{+}· 的清除率也随之上升[16]。因此，BBP 可能作为还原剂与 ABTS^{+}· 反应进而清除了 ABTS^{+}·。

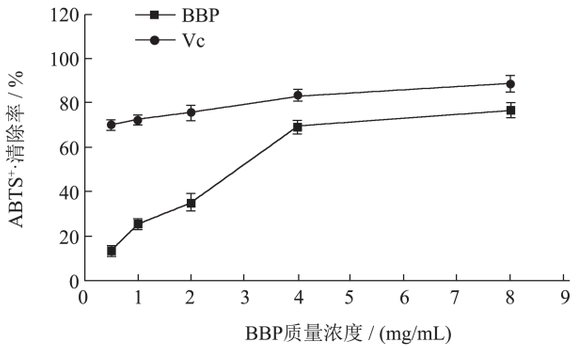


图 4 ABTS^{+}· 清除能力

Fig.4 Scavenging effects on ABTS^{+}·

2.3.2 BBP对DPPH·的清除能力

DPPH· 是一种在 517 nm 波长下展现出特征性吸收的稳定自由基，若能被消除，则说明样品具有还原过氧化物自由基、中断脂质过氧化链式反应的作用。它具备一个单电子，这使得它能够接收一个电子或氢

离子，进而参与特定的化学反应，其醇溶液呈紫色。抗氧化剂可以与其反应使其失去单电子致使紫色变淡褪色，在最大光吸收波长下的吸光度值也随之降低。从而使吸光度值的降低程度与自由基清除剂的抗氧化性增加程度呈线性关系。因此，被广泛用作测定各种天然化合物清除自由基能力的指标[17,18]。图 5 呈现了 BBP 对 DPPH· 清除能力的测定结果。由图可知，BBP 对 DPPH· 的清除作用显著，且随着质量浓度的上升，其清除能力总体增强。8 mg/mL 的 BBP 对 DPPH· 的清除率达到了 57.81%。然而，与相同质量浓度的 Vc 相比，BBP 对 DPPH· 的清除率明显较低。

研究表明，多糖中的单糖可以提供氢或单电子与自由基结合形成稳定的自由基，从而终止自由基反应，以此来表明自由基被清除[19]。因此，BBP 可能通过作为还原剂提供氢或电子进而清除了 DPPH·。

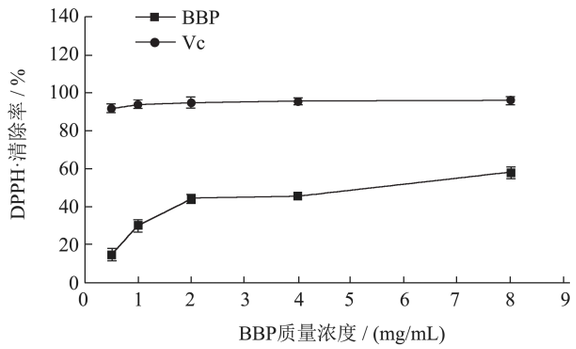


图 5 DPPH· 清除能力

Fig.5 Scavenging effects on DPPH·

2.3.3 BBP对·OH的清除能力

·OH 是一种在 510 nm 波长处有特征吸收峰的具有高反应活性的自由基，研究表明，·OH 具有巨大的破坏力，他可以与生物体 DNA 等反应，从而导致组织损伤或细胞死亡[20,21]，其与水杨酸反应可生成紫色化合物。当自由基清除剂存在时，可以作为电子或氢的供体以清除 ·OH，使反应体系颜色变浅，同时导致其在最大光吸收波长处的吸光度值下降，从而使吸光度与羟自由基含量呈正相关。因此，BBP 对 ·OH 的清除能力可以通过测量吸光度值的变化反映。BBP 对 ·OH 清除能力的测定如图 6 所示，由图可知，BBP 对 ·OH 具有显著的清除效果，并且这种效果随着质量浓度的提高而增强。8 mg/mL BBP 对 ·OH 的清除率最高达到了 80.76%。但是同等质量浓度下 BBP 对 ·OH 的清除率低于 Vc 对 ·OH 的清除率。

研究表明，不同质量浓度的多糖，与 ·OH 的清除率呈现正相关。随着多糖浓度的提高，多糖结构上带有的还原性半缩醛羟基清除了 ·OH，从而阻止自由基攻击细胞，·OH 的清除率也随之提高[22]。这与 BBP 对 ·OH 的清除率变化趋势相同，说明 BBP 具有清除 ·OH 的能力。

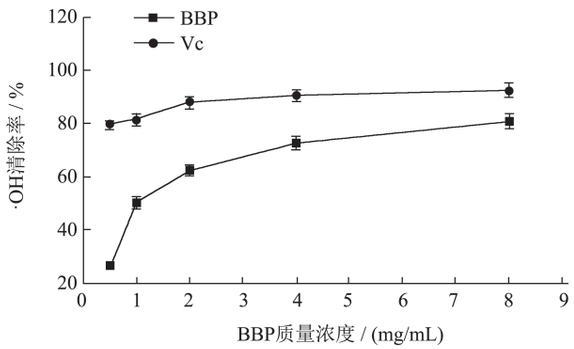


图 6 ·OH 清除能力

Fig.6 Scavenging effects on ·OH

2.3.4 BBP对Fe^{3+}的还原能力

FRAP 实验通过铁氰化钾还原法衡量抗氧化剂的电子供应能力，这种能力与生物物质的抗氧化活性联系紧密。抗氧化剂释放电子或氢的能力直接关联到其还原效能。在测试中，样品中的还原剂会导致铁离子络合物转化为亚铁形态，从而使溶液从黄色转变为不同程度的绿色或蓝色，颜色的深浅反映了还原剂的活性。这种变化可用作衡量化合物还原能力的指标，吸光值越高，还原力越强。BBP 对 Fe^{3+} 的还原能力的测定如图 7 所示，由图可知，BBP 对 Fe^{3+} 具有显著的还原能力，且其还原能力随着浓度的增加而增强。8 mg/mL 的 BBP 吸光度为 1.66。但是同等浓度下 BBP 吸光度低于 Vc 对照组的吸光度。

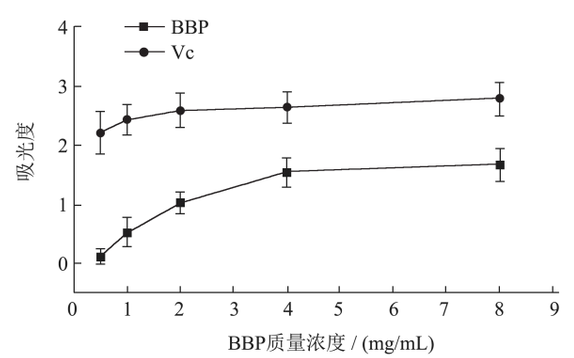


图 7 还原能力

Fig.7 Reducing power activity

有研究表明多糖具有 Fe^{3+} 还原能力[23]，且随着多糖浓度的增加，Fe^{3+} 还原能力也随之增强。多糖分子中含有大量能够作为电子供体的羟基基团，可以将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+}。因此因此，BBP 可能通过羟基基团提供电子进而将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+}，从而导致吸

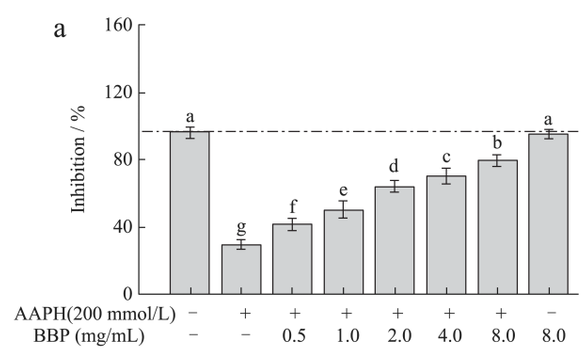
光度上升。

2.3.5 BBP对AAPH诱导的人红细胞氧化损伤保护作用

AAPH 在 37 ℃热分解产生的烷基自由基可以与氧气发生反应产生氢过氧自由基，而氢过氧自由基可以与细胞膜上的磷脂发生脂质过氧化反应，从而破坏细胞膜的完整性，造成红细胞溶血[24]。红细胞的细胞膜上富含多不饱和脂肪酸，所以非常容易受到自由基介导的氧化攻击，这导致了红细胞对氧化损伤的高敏感性[25]，而氧化损伤是红细胞氧化溶血的主要原因之一，因此红细胞常用作细胞模型进行抗氧化损伤研究[26]。如图 8a 所示，BBP 对 AAPH 诱导的红细胞溶血展现出显著的抑制能力，这种抑制力随着其浓度的上升而逐步加强。当 BBP 质量浓度达到 8 mg/mL 时，其溶血抑制效果几乎等同于正常红细胞对照组，这充分验证了 BBP 在保护红细胞免受 AAPH 引发的氧化性溶血方面具备显著的效果，且不会对红细胞造成损害。

BBP 在红细胞中发挥的抗氧化保护作用，其核心机制在于其能够调控细胞内 ROS 的水平。在正常细胞生理环境中，细胞内的 ROS 引发产生的自由基和细胞内的抗氧化系统清除自由基的能力处于一个动态平衡状态。经 AAPH 处理的红细胞产生氧化应激反应，导致 ROS 水平异常升高，进而触发细胞膜上不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应，损害红细胞结构而导致红细胞裂解。本研究通过 DCFH-DA 荧光标记染料监测细胞内 ROS 水平，并利用酶标仪测定荧光强度，以量化细胞内 ROS 的相对含量。

如图 8b 所展现，当红细胞在添加 BBP 后再接受 AAPH 处理时，随着多糖浓度的递增，细胞 DCF 荧光强度呈下降趋势，这显著表明 BBP 能有效抑制 ROS 的生成。而在仅有 BBP 处理的实验组中，红细胞 DCF 荧光强度与正常对照组相近，未出现显著差异，这说明 BBP 在常规条件下并不刺激红细胞产生过量的 ROS。基于以上结果，可以推断 BBP 具备维持红细胞内部氧化与抗氧化平衡的能力，其机制主要是通过抑制 ROS 的生成来实现。



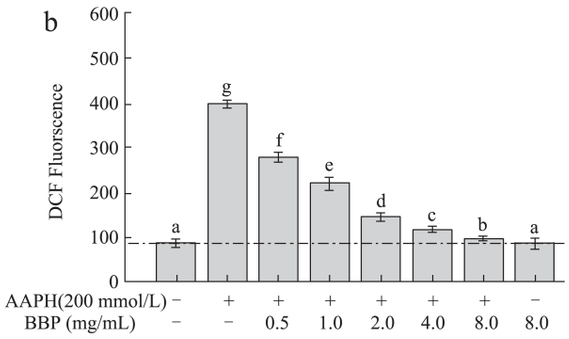


图 8 BBP 对 AAPH 诱导的红细胞溶血抑制率的影响（a）和 AAPH 处理红细胞后 ROS 水平的影响（b）

Fig.8 Effect of BBP on the inhibition rate of erythrocyte hemolysis induced by AAPH (a) and BBP on ROS levels in AAPH-treated erythrocytes (b)

注：图中字母表示各数值之间存在显著性差异。下图同。

2.3.6 BBP对MDA、GSH和GSSG含量的影响

MDA 是过氧化脂质分解的最终产物，被认为是常见的氧化应激标志物，受 AAPH 诱导的过氧化反应产生的 ROS 含量影响。当自由基攻击细胞时，细胞膜上会产生脂质过氧化反应，而 MDA 作为该胁迫反应的一种生物标志物，浓度会升高，进而导致细胞结构和功能遭到破坏[27]，因此防止细胞内 MDA 水平上升可以在一定程度上保护细胞膜免受自由基攻击，从而起到对细胞的保护作用。图 9a 展示了 BBP 对红细胞内 MDA 生成的影响。如图所示，在 AAPH 单独处理下，红细胞内 MDA 含量显著升高，MDA 水平由正常细胞组的 0.52 nmol/mg 提升到 2.07 nmol/mg，这表明 AAPH 处理的红细胞内发生了严重的脂质过氧化反应，但在加入不同浓度 BBP 保护的对照组里，MDA 水平随着 BBP 溶液浓度的增加而降低，使用 BBP 单独处理的红细胞，其 MDA 水平与正常细胞组几乎一致，无显著差异。以上结果证明了 BBP 能够有效防止 MDA 的累积，进而缓解 AAPH 对细胞的氧化损伤，达到其保护细胞的作用。

细胞的防御机制主要由酶促和非酶促抗氧化系统构成。非酶促抗氧化系统中，GSH 及其氧化形式 GSSG 尤为关键。且 GSH 在细胞内占据着非酶促抗氧化系统的核心地位，是一种非常重要的自由基清除剂和抗氧化剂。在氧化应激产生时，GSH 在氧化条件下被氧化为 GSSG，而 GSSG 在 NADPH 存在下可以还原为 GSH。Zheng 等[28]研究表明，GSH 的水平增加可以保护细胞免受自由基带来的氧化损伤。因此，降低氧化损伤的有效方法之一就是降低 GSH 的损耗。由图 9b 可知 BBP 对红细胞内 GSH 含量的影响。结果

显示，单独使用 AAPH 处理红细胞后，GSH 水平从正常细胞组的 14.18 μmol/L 显著下降至 5.21 μmol/L。变化表明红细胞在 AAPH 作用下经历了脂质过氧化反应，造成了 GSH 被氧化为 GSSG，含量水平降低。但在加入不同浓度 BBP 保护的对照组里，GSH 水平随着 BBP 溶液浓度的增加而增加，且单独使用 BBP 处理的红细胞，其 GSH 水平略高于正常细胞组的 GSH 水平，达到了 14.78 μmol/L。这些结果表明，BBP 能降低 GSH 的损耗，从而减轻 AAPH 对细胞的损伤，达到保护作用。

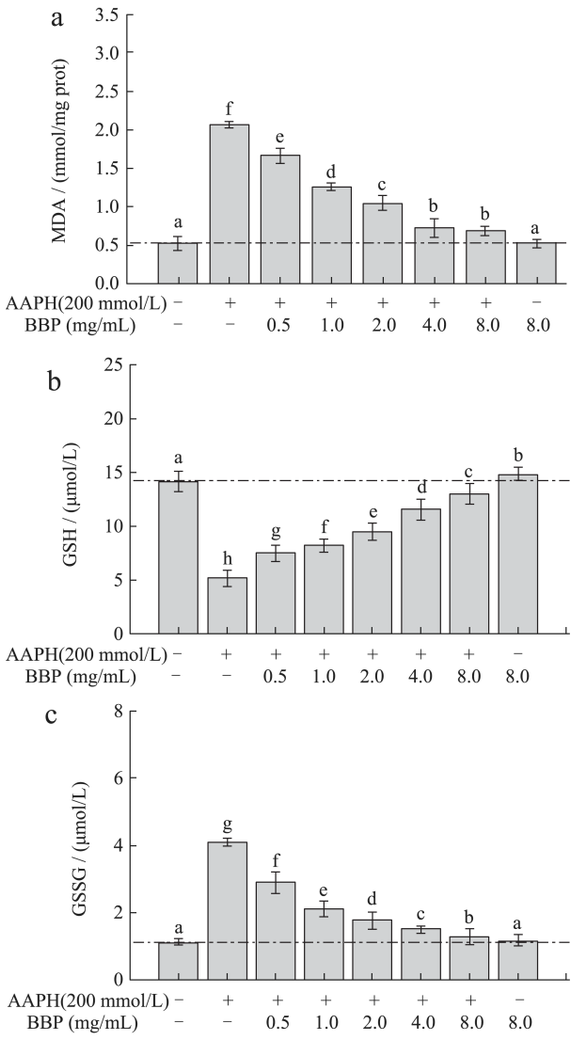


图 9 BBP 对 AAPH 处理红细胞后 MDA（a）、GSH（b）和 GSSG（c）含量的影响

Fig.9 Effect of BBP on MDA (a), GSH (b) and GSSG (c) contents in AAPH-treated erythrocytes

相反，氧化应激发生时，GSH 在氧化条件下被 GSH-Px 氧化成 GSSG，而过剩的 GSSG 以 NADPH 作为还原剂，在谷胱甘肽还原酶的作用下，重新还原为 GSH，图 9c 展示了构树穗多糖对红细胞内 GSSG 含量的影响。如图所示，单独使用 AAPH 处理红细胞，细胞内 GSSG 水平显著上升，GSSG 水平由正常细胞组的 1.14 μmol/L 提升到 4.09 μmol/L，这一显著升高表明 AAPH 处理的红细胞，自由基攻击细胞膜发生了脂质过氧化反应，造成了 GSH 水平降低以及 GSSG 水平升高。但在加入不同浓度 BBP 保护的对照组里，GSSG 水平随着 BBP 溶液浓度的增加而降低，且单独使用 BBP 处理的红细胞，其 GSSG 水平与正常细胞组的 GSSG 水平几乎相同，无显著性差异。这一结果表明了 BBP 的显著作用，它能有效抑制 MDA 的累积，并具有通过平衡 GSH 和 GSSG 来改善红细胞非酶促抗氧化系统的功能。这一机制减少了 GSH 的消耗并降低了 GSSG 的水平，进而减少了细胞内自由基的生成，显著减轻了 AAPH 对细胞的损害，从而展现出其保护效应。

2.3.7 BBP对CAT、GSH-Px、SOD的影响

细胞内的抗氧化防线由非酶促与酶促两大系统构成。其中涵盖了 CAT、GSH-Px 和 SOD 等关键酶的酶促抗氧化系统通过对抗氧化应激清除攻击细胞的有害自由基，从而保护细胞免受自由基的损害。当红细胞经过 AAPH 的处理后，ROS 含量会迅速上升，进而打破胞内的氧化还原反应的动态平衡，从而引起红细胞内发生氧化应激反应，此时细胞会启动一系列相关的酶促抗氧化系统与非酶促抗氧化系统来清除自由基，恢复细胞正常生理状态[29]。其中，SOD 是最先发挥作用的抗氧化酶之一，SOD 能与超氧阴离子发生歧化反应生成 H_2O_2，CAT 可以将 H_2O_2 分解成分子氧和水，GSH-Px 能分解 H_2O_2 和有机过氧化物，从而保护细胞免受 H_2O_2 毒性的影响。此外，GSH-Px 还可以阻止 GSH 转化为 GSSG[30]，图 10 展示了 BBP 对红细胞内 3 种抗氧化酶活性的影响。如图所示，单独使用 AAPH 处理红细胞后，细胞内 CAT（图 10a）、GSH-Px（图 10b）、SOD（图 10c）的酶活性显著提升，这表明 AAPH 诱导的红细胞氧化应激发生时，细胞的酶促抗氧化系统积极的响应，表现为酶活性的提升。在实验组中红细胞先用 BBP 处理再加入 AAPH，CAT、GSH-Px 和 SOD 的酶活性均受到抑制，且这种抑制效果随 BBP 浓度的升高而加强。仅使用 BBP 处理的红细胞组，其 CAT 和 SOD 的活性与正常对照组相比没有明显差异。如图 10a、10c 所示，而 GSH-Px 活性与正常红细胞的对照组的活性相近，略高于对照组，如图 10b 所示。以上结果表明 BBP 显著抑制了 AAPH 引发的红细胞内氧化应激反应，有效减轻了 AAPH 对细胞的损害，进而使红细胞内的 CAT、GSH-Px 和 SOD 等抗氧化酶活性恢复至正常水平，起到了保护细胞的作用。

基于实验结果，推测构树穗多糖 BBP 可能通过特

定机制抑制 AAPH 诱导的红细胞 ROS 水平，调控红细胞内酶与非酶促抗氧化系统水平的相对平衡，避免红细胞发生氧化性溶血。如图 11 所示，使用 AAPH 处理红细胞时，会触发 ROS 的大量生成，进而引发氧化应激，导致细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化，生成大量 MDA，最终破坏细胞结构并导致凋亡。在这一连串反应中，红细胞内的抗氧化酶如 CAT、GSH-Px、SOD 通过协同作用来抵抗氧化应激的影响。同时清除超氧阴离子、过氧化物等活性氧，从而保护细胞免受自由基的攻击。除了酶促抗氧化系统，红细胞中还有包括 GSH 和 GSSG 的非酶促抗氧化系统，它们可以在 GSH-Px 参与催化下相互转化。由图 9b、9c 可知，降低 GSH 转化为 GSSG 的转化率，可以有效抑制氧化应激反应，减轻 AAPH 诱导的红细胞氧化损伤。

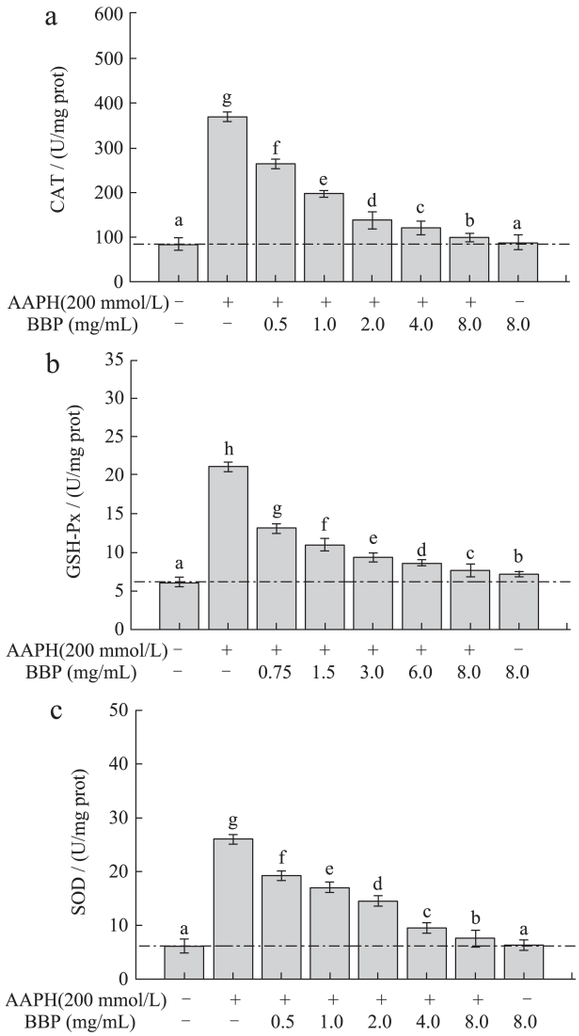


图 10 BBP 对 AAPH 处理红细胞后 CAT（a）、GSH-Px（b）和 SOD（c）活性的影响

Fig.10 Effect of BBP on CAT (a), GSH-Px (b) and SOD (c) activities in erythrocyte treated with AAPH

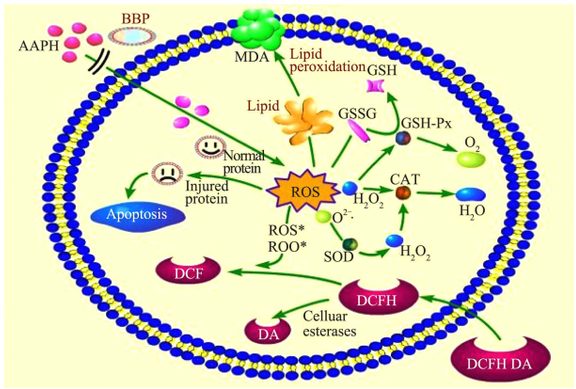


图 11 BPP 减轻 AAPH 诱导的红细胞氧化损伤可能机制图

Fig.11 Possible mechanism diagram of BPP alleviating AAPH induced oxidative damage in erythrocyte

由上述实验结果可知，正常的细胞生理状态中，酶促抗氧化系统与非酶促抗氧化系统共同组成细胞防御系统或直接或间接的参与到细胞中的反应中，使细胞的 ROS 含量和清除自由基的能力处于动态平衡状态，但 AAPH 处理的红细胞产生大量的 ROS，超出了细胞本身清除自由基的能力，打破了细胞内的平衡，从而导致细胞结构被破坏以致细胞凋亡。上述的实验结果表明，BBP 可以有效地阻止 ROS 的产生，并抑制 MDA 的产生，降低 GSH 转化为 GSSG 的转化率，同时调节 CAT、GSH-Px 和 SOD 的酶活性，使其随 BBP 浓度的增加而逐渐接近正常红细胞的水平。最终起到对 AAPH 诱导的红细胞氧化损伤保护作用。

3 结论

以构树穗为原料，通过热水浸提法提取多糖，并在单因素试验基础上，用响应面法优化得到最佳提取工艺为料液比 1:32.33（g/mL），提取温度 89.89 ℃，提取时间 116.53 min，体外抗氧化实验结果表明，构树穗多糖对 $ABTS^{+}\cdot$、DPPH· 和 ·OH 具有显著的的清除效果以及 Fe^{3+} 还原能力。红细胞溶血实验结果表明，构树穗多糖可以有效地降低 AAPH 处理的红细胞内 ROS 和 MDA 的水平，并降低 GSH 转化为 GSSG 的转化率，同时调节 CAT、GSH-Px 和 SOD 的酶活性，使其随构树穗多糖浓度的增加而逐渐接近正常红细胞的水平，保护红细胞免受 AAPH 造成的氧化损伤。以上说明构树穗多糖具有良好的抗氧化活性，为未来构树穗相关产品开发提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 叶兆伟,王锐丽,刘敏杰,等.构树雄花多糖提取工艺研究[J].江苏农业科学,2012,40(12):292-293.

[2] 席红如.卡琪花蒂玛中黄酮类物质的抗氧化活性及吸收特性研

究[D].广州:华南理工大学,2019.
[3] SUN C Z, LI H Y, HUI X D, et al. Protective effects of Mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein hydrolysates and their *in vitro* gastrointestinal digests on AAPH-Induced oxidative stress in human erythrocytes [J]. Foods, 2023, 12(18): 3468.
[4] 詹麒平.金樱子果肉多糖的结构鉴定、硒化改性及其生物活性研究[D].广州:华南理工大学,2021.
[5] 段雪伟,张敏君,王燕,等.构树花多糖提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2023,44(21):84-91.
[6] 周颖,夏新奎.槐米多糖的提取和纯化工艺研究[J].湖北农业科学,2011,50(15):3161-3163.
[7] CHEN F, HUANG G L L, YANG Z Y, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 673-680.
[8] WANG L, ZHAO Z W, ZHAO H Q, et al. Pectin polysaccharide from *Flos magnoliae* (Xin yi, *Magnolia biondii* pamp. flower buds): Hot-compressed water extraction, purification and partial structural characterization [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107061.
[9] YE Z P, WANG W, YUAN Q X, et al. Box–Behnken design for extraction optimization, characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147: 354-364.
[10] SUN L Q, WANG L, LI J, et al. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta [J]. Food Chemistry, 2014, 160: 1-7.
[11] 闫浩,成帆,晏芙蓉,等.响应面法优化黄芪-葛根药对多糖的超声提取工艺及其抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2023,40(5):38-44.
[12] XIA Y G, HUANG Y X, LIANG J, et al. Comparable studies of two polysaccharides from leaves of *Acanthopanax senticosus*: structure and antioxidation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 350-362.
[13] 陈文博.西藏绵头雪莲花多糖的结构鉴定及生物活性的研究[D].广州:华南理工大学,2020.
[14] 姚佳,黄希莲,姚玉仙,等.响应面法优化多穗石柯粗多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J].食品科技,2021,46(9):195-201.
[15] 曾俊.西洋参多糖的提取分离、结构表征及抗氧化活性研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2021.
[16] 沈佳琳.黑果枸杞多糖的提取纯化、抗氧化活性及体外模拟消化和发酵研究[D].南京:南京农业大学,2017.
[17] JIN Y M, YANG N, TONG Q Y, et al. Rotary magnetic field combined with pipe fluid technique for efficient extraction of pumpkin polysaccharides [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 35: 103-110.
[18] WANG M M, ZHANG C C, XU Y T, et al. Impact of six extraction methods on molecular composition and antioxidant activity of polysaccharides from young hulless barley leaves [J]. Foods, 2023, 12(18): 3381.
[19] CHEN R Z, LIU Z Q, ZHAO J M, et al. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from Acanthopanax senticosu [J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 434-440.
[20] CHEN F, HUANG G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of bitter gourd polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 14-20.
[21] CHEN Y X, LIU X Y, XIAO Z, et al. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 505-509.
[22] CHEN S H, HUANG H L, HUANG G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1047-1053.
[23] 赵焕焕.黄秋葵多糖提取纯化及体外抗氧化活性的探讨[D].郑州:郑州大学,2012.
[24] DU R F, LIU K L, ZHAO S, et al. Changes in antioxidant activity of peptides identified from brown rice hydrolysates under different conditions and their protective effects against AAPH-Induced oxidative stress in human erythrocytes [J]. ACS Omega, 2020, 5(22): 12751-12759.
[25] 张虹,张猛猛,赖富饶,等.甜菜碱保护细胞免受AAPH损伤的研究[J].现代食品科技,2016,32(6):18-23,12.
[26] MILENA B, BOŻENA B, RADOSŁAW P, et al. Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(9): 2202-2211.
[27] 庄姗姗,刘祎帆,张沁铭,等.柚子幼果精油的提取及其抗氧化活性研究[J].轻工学报,2022,37(2):51-58.
[28] ZHENG L, DONG H Z, SU G W, et al. Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes [J]. Food Chemistry, 2016, 197(PA): 807-813.
[29] 贺萍,王倩,张猛猛,等.东革阿里多糖对红细胞氧化溶血的保护作用[J].现代食品科技,2019,35(6):30-38.
[30] 纳雨农,陈乃驿,张涣悠,等.金柚幼果黄酮AAPH诱导红细胞氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2022,38(2):36-45,103.