

# 油茶粕抗皮肤细胞紫外损伤活性成分研究

种姝伊, 石欣蕾, 蒋福全, 刘 婕, 张晓坤, 陈全成\*

(厦门大学药学院, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 目的 分离纯化油茶粕中抗皮肤细胞紫外损伤活性成分。方法 硅胶色谱和高效液相反相制备色谱纯化油茶粕正丁醇提取物, Western-blotting 法检测纯化物质对 UV 照射 HaCaT 皮肤细胞 JNK、P38 激活以及 MMP-9 的表达的影响。结果 分离得到一单体化合物, 经鉴定为 Kaempferol 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopyranoside, 且该化合物能够抑制 HaCaT 皮肤细胞 UV 照射后 JNK、P38 激活以及 MMP-9 表达。结论 油茶粕含有抗皮肤细胞紫外损伤活性成分, 值得进一步开发。

**关键词:** 油茶粕; 黄酮; 皮肤细胞; 抗紫外损伤

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.09.077

中图分类号: R962 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2015)09-2245-02

## Chemical component in camellia cake against ultraviolet rays radiation damage on skin cells

ZHONG Shu-yi, SHI Xin-lei, JIANG Fu-quan, LIU Jie, ZHANG Xiao-kun, CHEN Quan-cheng\*

(School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract: Objective** To isolate the chemical component of camellia cake against ultraviolet rays radiation damage on skin cells.

**Methods** Silica gel column chromatography and reverse phase preparative HPLC were used for the isolation of active compounds from the n-butanol extract of camellia cake. The effects of isolated compound on the activation of JNK and P38, and the protein expression of MMP-9 in UV irradiated HaCaT skin cells were determined by western blotting assay. **Results** A flavonoid glycoside was isolated from the camellia cake and identified as Kaempferol 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopyranoside using NMR data analysis. In addition, the isolated compound was showed to markedly inhibit the activation of JNK and P38, and MMP-9 protein expression in UV irradiated HaCaT skin cells.

**Conclusion** The components in camellia cake might have significant activity on protecting skin from UV rays radiation damage, suggesting their potential development values.

**Key words:** Camellia cake; Flavonoids; Skin cells; Against UV damage

油茶籽系山茶科植物油茶 *Camellia oleifera* Abel 或小叶油茶 *C. meiocarpa* Hu, Ms. 的成熟种子, 是中国特有的一种可食用的木本植物油料资源。据记载我国对油茶籽的使用已有 2000 多年的悠久历史, 为民间日用品。茶油除食用外, 还有多种多样的用途, 如清热解暑、润燥、杀虫、息风、治疗皮肤过敏以及暗疮、疥癣、小儿红屁股、皮肤烧烫伤等, 《中国药典》及其它典籍如《纲目拾遗》《农政全书》《中华本草》等中均有记载<sup>[1]</sup>。目前, 油茶籽的应用主要集中在榨油上, 榨油后产生大量的残渣, 又名油茶粕, 还未得到充分利用。近年来, 由于高空臭氧层耗损, 大量的紫外线直接辐射地面, 导致人类皮肤癌等疾病升高。因此, 寻找保护皮肤免受紫外损伤的物质成为急需要做的事情。本实验利用硅胶色谱和高效液相反相制备色谱纯化油茶粕正丁醇提取物, 利用 HaCaT 皮肤细胞做为模型, 检测分离纯化物质对紫外线损伤的保护作用, 以期油茶粕中抗皮肤细胞紫外损伤活性成分的进一步开发奠定实验基础。

收稿日期: 2014-12-29; 修订日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81102332);

福建省厦门市科技计划项目(No. 3502Z20123015)

作者简介: 种姝伊(1989-), 女(汉族), 山东枣庄人, 厦门大学药学院硕士研究生, 学士学位, 主要从事化学生物学研究工作。

\* 通讯作者简介: 陈全成(1977-), 男(汉族), 福建漳州人, 厦门大学药学院副教授, 博士学位, 主要从事天然药物化学研究工作。

## 1 仪器与试剂

AVANCE III 600 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪(美国布鲁克-道尔顿公司); UVP CL-1000S 紫外光联仪(美国 UVP 公司); MC2000-2 干式恒温煮样器(杭州奥盛仪器有限公司); 5424R 离心机(德国 eppendorf 公司); Waters400 高效液相制备色谱(德国 waters 公司); 抗体: MMP9(Abcam, ab38898), P-p38(CST 9215), P-JNK(CST 4668S),  $\beta$ -actin(SIGMA: A5441); 乙腈、醋酸、甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher 公司); 水为超纯水(美国 Millipore 公司); 其它试剂均为分析纯; 实验原料油茶籽采自福建省龙岩市上杭县。

## 2 方法

2.1 活性物质分离纯化 取干燥的油茶籽粕 4.5 kg, 用粉碎机粉碎至 30 目大小, 用 5 L 95% 食用酒精加热恒沸回流提取 2 h, 共重复提取 3 次, 合并提取液减压浓缩得总浸膏约 750 g。将总浸膏溶解悬浮于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇有机溶剂进行萃取, 萃取液减压浓缩, 最后得到石油醚层浸膏 200 g, 乙酸乙酯层浸膏 110 g, 正丁醇层浸膏 400 g, 水层浸膏 40 g。

取正丁醇层提取物 100 g, 硅胶拌样后载至硅胶柱, 用二氯甲烷: 甲醇(5: 1)洗脱得到活性组分 YCB-1。YCB-1 用反相 C18 柱层析以甲醇溶液(0%、10%、20%及 95%)梯度洗脱得到 4 个亚组分, 其中 10%(YCB-1-2)及 20%(YCB-1-3)洗脱组分经过高效液相制备色谱纯化得到化合物 1。制备条件为制备

柱 20 mm × 25 cm 的反相 ODS 以 15% 乙腈加 0.1% 甲酸水溶液为流动相 25 ml/min 流速等度洗脱 检测波长 254 nm。

2.2 活性物质抗皮肤细胞紫外损伤活性检测 HacaT 细胞 10% FBS (GIBICO) MEM 培养基培养, 10 cm 盘长满铺 6 孔板, 密度 30% ~ 40% 吸掉培养基, 1 × 磷酸盐缓冲液 PBS 洗两遍, 每孔加 PBS 200 μl 紫外线照射 (40KJ/CM<sup>2</sup>) 吸掉 PBS 无血清加药 浓度分别为 1, 5, 10, 25 μM。加药 24 h 后收样。NP-40 裂解液 (含蛋白酶抑制剂混合物和磷酸化酶抑制剂) 冰上裂解 15 min, 裂解液转入 1.5 ml 离心管, 12000 r/min 低温离心 15 min, 吸取上清加入 5 × loading 煮 5 min, 10% 的 SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 100 v 转膜 1 h, 5% 牛奶封闭 1 h, 一抗孵育过夜, 二抗孵育 1h 检测 P-p38、P-JNK、MMP-9, β-actin 作为内参。

3 结果

3.1 活性化合物分离纯化 YCB-1-2 和 YCB-1-3 合并组分的色谱图见图 1。15% 乙腈加 0.1% 甲酸水溶液为流动相, 25 ml/min 等度洗脱, 反复收集纯化图中的化合物 1, 得黄色粉末单体化合物。

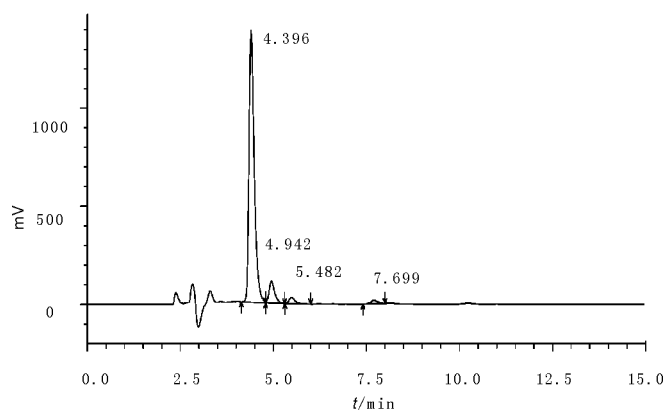


图 1 YCB-1-2 和 YCB-1-3 合并组分的液相色谱图

3.2 结构鉴定 化合物 1 为黄色粉末, ESIMS 质谱显示分子离子峰 [M + Na]<sup>+</sup> m/z 779.30 (C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>O<sub>20</sub>Na), <sup>1</sup>H 及 <sup>13</sup>C NMR 核磁数据见表 1。通过质谱及核磁数据解析及参考文献对照, 化合物 1 的结构鉴定为 Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1->6)]-β-D-glucopyranoside<sup>[2]</sup>。结构见图 2。

3.3 化合物 1 抗皮肤细胞紫外损伤活性检测 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路广泛存在于哺乳动物细胞中, 与机体多种生理病理过程 (如皮肤癌, 糖尿病等) 密切相关, 是当代生物医学研究的热点<sup>[3]</sup>。大量的研究显示, 丝裂原活化的蛋白激酶家族中的 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 和 p38 在紫外线对皮肤细胞的损伤中起着重要的作用<sup>[4-6]</sup>, 如促进细胞 DNA 损伤、细胞色素 c 释放诱导细胞凋亡, 促进转录因子 AP-1 的激活, 进而转录在降解弹性蛋白和基膜中的 IV、VII 型胶原中有着重要作用的 MMP-9。因此, 本实验中重点检查了化合物 1 对 UV 诱导皮肤细胞 p38、JNK 激活以及 MMP-9 的表达的影响。

HaCaT 皮肤细胞经 40KJ/CM<sup>2</sup> 剂量的紫外线照射后, 无血清条件下分别加入 1, 5, 10, 25, 50 μM 化合物 1, 培养 24h 后检测 P-p38、P-JNK 水平以及 MMP-9 的表达情况。结果如图 3, 化合物 1 能够浓度依赖性的抑制 UV 照射导致的 p38 和 JNK 激活以及 MMP-9 的表达, 显示化合物 1 具有很好的抗皮肤细胞紫外

损伤活性。

表 1 化合物 1 及参比化合物的 <sup>1</sup>H 及 <sup>13</sup>C NMR 核磁数据

No.	1		Ref <sup>2</sup>
	δH (150 MHz)	δC (600 MHz)	
2		158.55	158.55
3		134.87	134.78
4		179.57	179.57
5		162.98	163.04
6	6.88 d (2.1)	100.08	99.5
7		165.93	165.82
8	6.88 d (2.1)	95.06	94.92
9		159.49	159.32
10		105.81	105.81
1'		123.04	122.97
2'6'	8.00 dd (8.5)	132.49	132.37
3'5'	6.88 dd (8.5)	116.31	116.25
4'		161.46	161.42
Glu 1	5.35 d (7.8)	101.28	101.08
2		81.86	82.15
3		77.89	77.88
4		71.32	71.35
5		78.33	78.26
6		68.34	68.23
Rha 1	4.47 d (1.5)	102.26	102.21
2		72.37	72.33
3		72.12	72.08
4		73.97	73.88
5		69.77	69.71
6	1.08 d (6.3)	17.97	17.84
Glu 1	4.75 d (7.2)	104.42	104.51
2		75.34	75.40
3		76.89	76.98
4		71.48	71.43
5		77.80	77.83
6		62.64	62.65

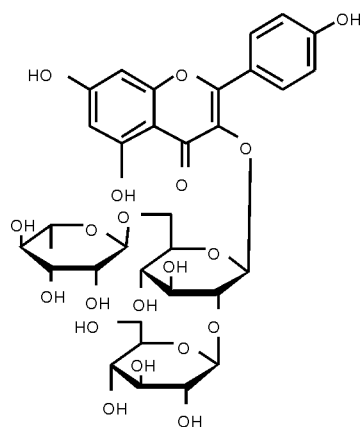


图 2 化合物 1 结构 (Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1->2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1->6)]-β-D-glucopyranoside)

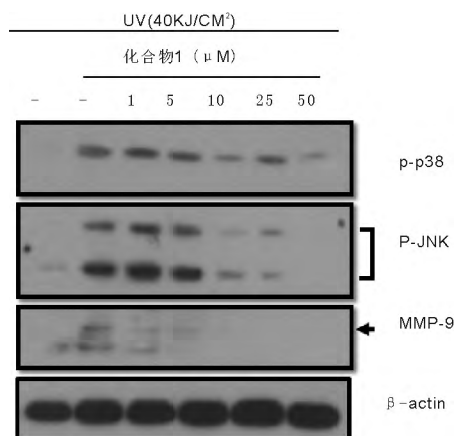


图3 化合物1浓度依赖性的抑制UV照射HaCaT细胞诱导的JNK、p38激活以及MMP-9的表达

#### 4 结论

本实验以油茶粕为原料,采取硅胶色谱和高效液相反相制备色谱法从正丁醇提取物中纯化出高效抗皮肤紫外损伤活性成分Kaempferol 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-glucopyranoside,为大力

发展油茶粕的综合利用,为抗皮肤紫外损伤油茶产品的开发提供了一定的基础,进而促进实现油茶产业化高值、有效、健康、可持续发展。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典,一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 386.
- [2] Du L. C, Wu B. L, Chen J. M. Flavonoid triglycosides from the seeds of *Camellia oleifera* Abel [J]. Chinese Chem Lett, 2008, 19 (11): 1315.
- [3] Erwin F. Wagner, Angel R. Nebreda. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 537.
- [4] Zhu X, Jiang M, Song E, et al. Selenium deficiency sensitizes the skin for UVB-induced oxidative damage and inflammation which involved the activation of p38 MAPK signaling [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 25 (75C): 139.
- [5] Ogawa K, Tsuruma K, Tanaka J, et al. The Protective Effects of Bilberry and Lingonberry Extracts against UV Light-Induced Retinal Photoreceptor Cell Damage in Vitro [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(43): 10345.
- [6] Liu K, Yu D, Cho YY, et al. Sunlight UV-induced skin cancer relies upon activation of the p38 $\alpha$  signaling pathway [J]. Cancer Res, 2013, 73(7): 2181.

## 不同采收时期对雪菊品质的影响分析

古宁宁<sup>1</sup>, 秦勇<sup>1\*</sup>, 梁恒博<sup>1</sup>, 陈安新<sup>2</sup>

(1. 新疆农业大学林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;  
2. 新疆生命核力高科股份有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830000)

**摘要:**目的 确定雪菊的最佳采收时期,以提高雪菊的药用价值和经济价值。方法 在雪菊的花蕾期、胎菊期、幼菊期、半菊期、全菊期分别进行采收,通过测定两个产地不同采收时期雪菊的活性物质总黄酮、总糖、绿原酸、总氨基酸、茶多酚以及微量元素的含量,进行比较和方差分析。结果 不同采收时期对雪菊的品质存在显著影响,活性物质总黄酮、总糖、茶多酚含量在胎菊期最高,全菊期最低;绿原酸和总氨基酸含量在花蕾期含量最高,全菊期最低;微量元素Ca、Mg、Mn、Zn、Cu的含量在花蕾期最高,全菊期最低,而Fe元素的含量在花蕾期最低,全菊期最高。结论 花蕾期和胎菊期为雪菊的最佳采收时期,有利于提高雪菊的药用价值。

**关键词:** 雪菊; 采收期; 活性物质; 微量元素

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.09.078

中图分类号: S567 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2015)09-2247-04

雪菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt. 属菊科金鸡菊属一年生草本植物<sup>[1]</sup>。雪菊长期适应早期湿润后期干旱低温的特殊生长环境,长期以来,雪菊被当地居民当花茶饮用,新疆维吾尔医院也把雪菊作为一种维药材应用。雪菊中富含的生物总黄酮、绿原酸、酚

类化合物等,具有降血压、降血脂、调节血糖、抗肿瘤与抗衰老等功效,是具有广阔前景和研究价值的药用植物,深受人们的喜爱<sup>[2-4]</sup>。

近几年,雪菊正在被广泛种植,而药用植物的采收时期对其品质至关重要,但目前仍没有明确的雪菊最佳采收时期。因此,系统地研究雪菊的活性物质总黄酮、绿原酸、茶多酚、总糖、总氨基酸以及微量元素的含量与采收时期的关系,有利于明确雪菊的最佳采收期,提升雪菊的品质,更好地指导雪菊生产。

#### 1 材料与方法

1.1 试验材料 供试雪菊采自乌鲁木齐县托里乡万亩草场和新疆农业大学三坪农场实践教学基地。实验材料产地的气象数据

收稿日期: 2015-01-06; 修订日期: 2015-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31360319)

作者简介: 古宁宁(1989-),女(汉族),四川绵阳人,新疆农业大学硕士研究生,硕士学位,主要从事蔬菜栽培与生理研究工作。

\* 通讯作者简介: 秦勇(1962-),男(汉族),甘肃高台人,新疆农业大学林学与园艺学院教授,硕士学位,主要从事蔬菜栽培与生理研究工作。