

医药与日化原料

以升麻为主的复方精油制备及其对小鼠的抗辐射作用

黄钹, 陈靖颖, 杨晓旭*

(哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 以升麻、金银花、沙棘、黄芩和玉竹 5 种本草植物中药材为原料, 采用微波辅助提取法制备了复方精油, 采用单因素实验和响应面实验对提取工艺条件进行了优化。通过 GC-MS 法对复方精油进行了定性和定量分析; 采用抑菌圈实验对复方精油的金黄色葡萄球菌抑菌活性进行了检测; 通过 UVB 照射法建立小鼠辐射皮肤损伤模型和人类永生角质形成细胞 (HaCaT) 的损伤模型; 通过 H & E 染色法对超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性、丙二醛 (MDA) 水平、胶原蛋白含量进行了检测; 通过 Western blotting 法测定 HaCaT 细胞 p53 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 蛋白表达水平; 探究了复方精油对经 UVB 照射后的小鼠皮肤的辐射修复活性。结果表明, 以体积分数 75% 的乙醇水溶液为提取溶剂, 在液料比 (mL : g) 为 28 : 1、微波功率为 385 W、提取时间为 32 min 的最佳条件下, 复方精油提取率为 0.624%; 复方精油中共检测出 32 种化学成分, 主要包括醇类、酮类、酚类等, 其中, 甲基丁香酚、3,4-二甲氧基苯乙烯、3,4,5-三甲氧基甲苯的相对含量较高, 分别为 18.64%、13.27%、12.16%; 8 μ L 复方精油对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 (18.23 \pm 0.25) mm, 抑菌属于高度敏感, 其抑制效果主要源自黄芩精油; 复方精油通过升高小鼠皮肤组织 SOD 活性和胶原蛋白的含量, 降低了小鼠皮肤组织 MDA 水平, 从而发挥对抗 UVB 辐射的预防作用, 通过下调 HaCaT 细胞 p53 和 PCNA 的蛋白表达水平对 UVB 辐射损伤起到修复作用。

关键词: 升麻; 复方精油; 小鼠; 抗辐射; 预防修护; 医药原料

中图分类号: TQ461 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 10-2214-09

Preparation of compound essential oil based on *Cimicifugae Rhizoma* and its antiradiation activity on mice

HUANG Rusi, CHEN Jingying, YANG Xiaoxu*

(School of Pharmacy, Harbin Commercial University, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

Abstract: The compound essential oil was prepared by microwave extraction method from *Cimicifugae Rhizoma*, *Lonicera japonica*, *Sea buckthorn*, *Scutellaria baicalensis* and *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce, with the extraction conditions optimized by single factor experiment and response surface methodology. The compound essential oil was qualitatively as well as quantitatively analyzed by GC-MS, and analyzed by bacteriostatic zone test for the bacteriostatic activity of its component *Staphylococcus aureus*. The radiation repair activity of the compound essential oil was evaluated using the mouse radiation skin injury model and human immortalized keratinocyte (HaCaT) cell injury model established by UVB irradiation method. The activity of superoxide dismutase (SOD), the level of malondialdehyde (MDA) and the content of collagen were detected by H & E staining method, while the expression levels of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in HaCaT cells were determined by Western blotting method. The results showed that under the optimal conditions of liquid to solid ratio (mL : g)=28 : 1, microwave power 385 W and extraction time 32 min, the extraction yield of the compound essential oil was 0.624%. A total of 32 chemical components were detected in the compound essential oil, including alcohols, ketones, phenols, etc., with the relative contents of methyl eugenol, 3,4-dimethoxystyrene, and 3,4,5-trimethoxytoluene

收稿日期: 2024-10-23; 定用日期: 2024-12-06; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240811

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202410240046X)

作者简介: 黄钹 (2004—), 女, E-mail: 1984892722@qq.com. 联系人: 杨晓旭 (1978—), 女, 讲师, E-mail: africa5566@163.com.

18.64%, 13.27%, and 12.16%, respectively. The inhibition zone diameter of 8 μL compound essential oil against *Staphylococcus aureus* was (18.23 \pm 0.25) mm, which was highly sensitive, and its inhibitory effect mainly came from *Scutellaria baicalensis* essential oil. Compound essential oils decreased the MDA level of mouse skin tissue by increasing the SOD activity and the collagen and reducing the level of MDA in mouse skin tissue, and could repair UVB radiation damage by downregulating the protein expression of p53 and PCNA in HaCaT cells.

Key words: *Cimicifugae Rhizoma*; compound essential oil; mice; anti-radiation; preventive repair; drug materials

古代医学典籍和现代研究表明,许多本草植物中药材,如升麻、沙棘、黄芩以及金银花等都有抗辐射、抗炎和增强免疫力的作用^[1-3]。其中,原产地为黑龙江省的升麻具有耐寒、生长条件要求低、药材质量较高的特性。在 2022 年发布的《黑龙江省“十四五”中医药发展规划》中,升麻被列为天然植物开发品种。沙棘被誉为“寒地浆果”,在黑龙江省已成为国家地理标志农产品之一,其具有易成活、产量高、果粒大、易采摘的特点。黄芩和金银花也属于黑龙江省地道药材,并具有良好的抑菌和辐射后修复作用^[4-5]。

近年来,辐射污染引起人们的广泛关注。辐射污染进入人体的主要途径为皮肤,长期辐射会对人面部引发黑色素沉积(长斑)、肤色变暗、皮肤角质层增厚、毛孔粗大等一系列问题。当前,护肤品市场中具备抗辐射预防功能的产品主要以透明质酸和玻尿酸等成分为主体,缺乏天然本草“以修养护,温和有效”预防和修护兼顾的抗辐射护肤产品。

植物精油因具有毒副作用小,针对性强的优良特性,在抗菌^[6-7]、抗炎^[8]、抗氧化^[9]、抗辐射^[10]等皮肤损伤预防及修复领域已有报道。

本文拟以升麻、金银花、沙棘、黄芩和玉竹 5 种本草植物中药材为原材料,采用微波辅助提取法制备复方精油,采用 GC-MS 法对复方精油成分进行定性和定量分析,通过建立小鼠 UVB 辐射皮肤损伤模型来考察复方精油对 UVB 辐射后皮肤损伤的修复作用,并通过测定永生生化人角质形成细胞(HaCaT) p53 和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达水平对其作用机制进行初步探讨。以期将传统中药理论与现代创新萃取、乳化技术相结合,使中草药提取物在防辐修护领域中得到充分应用,推动黑龙江省中医药事业和中草药产业的可持续发展。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

升麻、沙棘、黄芩、金银花、玉竹〔*Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce〕,哈尔滨三颗树药材市场,

经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授鉴定为合格药材。金黄色葡萄球菌,青岛海博生物技术有限公司;高原护肤霜(80 g),临沂市宝韵化妆品有限公司;空白药敏试纸(6 mm),常德比克曼生物科技有限公司;考马斯亮蓝蛋白测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒,南京建成生物工程研究所;HaCaT 细胞,上海长海医院皮肤科教研室;RPMI-1640 培养基,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;小牛血清,杭州四季青生物公司;噬菌二聚体单抗,美国 Sigma 公司;Western blotting 试剂盒、显色试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司。

硫化钠(Na_2S), AR, 成都化学试剂厂;戊巴比妥钠, AR, 北京普博斯生物科技有限公司;生理盐水, 三联药业股份有限公司;牛肉膏蛋白胨琼脂, 生物试剂, 杭州百思生物技术有限公司;苏木素-伊红(H & E)染色液, 常德比克曼生物科技有限公司;浓盐酸(质量分数 38%), AR, 广州化学试剂厂;氢氧化钠, AR, 北京益利精细化学品有限公司;柠檬酸, AR, 国药集团化学试剂有限公司;对二甲氨基苯甲醛, AR, 中国上海试剂三厂;氯胺-T, AR, 德国 Merck 公司上海分公司;羟脯氨酸标准品, 中国药品生物制品检定所。

6890 型气相色谱-5975 型质谱联用仪(GC-MS), 美国 Agilent 公司; DRB200 型 COD 消解仪, 美国 HACH 公司; A300 型全自动氨基酸分析仪, 德国 MembraPure GmbH 公司; UV-1100 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis), 上海美谱达仪器有限公司; ZDZ-1 型紫外辐射照度仪, 上海市嘉定学联仪表厂; GeneAmp 2400 型基因扩增仪(PCR), 美国 Perkin Elmer 公司; 1658033 型 Mini-PROTEAN Tetra Cell 电泳槽、HOOD II 型凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; SUV-100 型日光紫外线模拟器, 上海希格玛高技术有限公司; UV-B 型 UVB 辐照度显示器, 青岛紫电科仪智能环保科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 复方精油制备

首先,将升麻、沙棘、黄芩、金银花、玉竹粉碎过 40 目筛后,备用;其次,分别称取升麻 30 g,

金银花 10 g, 沙棘、黄芩和玉竹各 20 g, 按液料比 (mL : g, 下同) 均为 20 : 1, 加入体积分数 75% 的乙醇水溶液, 经微波提取 (385 W) 30 min 后, 用旋转蒸发仪在 40 °C、200 r/min 转速下去除提取液中的乙醇溶剂, 然后将其倒入分液漏斗中, 密封静置, 待明显分层后, 缓慢地放出下层水层, 收集得到各精油, 将其混匀后, 得到复方精油。根据式 (1) 计算复方精油的提取率 (%)。

$$\text{提取率}/\% = m(\text{复方精油})/m(\text{原料}) \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 复方精油对 UVB 辐射小鼠皮肤损伤的抗炎活性实验

参照文献[11-13]进行实验。

1.2.2.1 UVB 辐射小鼠建模

动物实验依照《实验动物护理和使用指南》第 8 版中的规定执行, 并经哈尔滨商业大学实验动物伦理委员会批准 (HSDYXY-2024091)。

挑选健康的无特定病原体动物 (SPF) 级雄性昆明小鼠 40 只, 体重为 18~22 g, 由长春亿斯实验动物技术有限责任公司提供, 动物合格证号 SCXK(吉)2023-0003。小鼠饲养在聚碳酸酯笼子里, 于 20~22 °C、相对湿度 45%~55% 的清洁环境中, 正规饲料喂养, 光/暗循环 12 h, 自由摄入食物和水, 适应 1 周后进行实验。

将 40 只雄性小鼠随机分为 4 组, 分别为正常组、模型组、阳性对照组和复方精油组, 每组 10 只, 各组小鼠以 0.2 mL/10 g 的剂量腹腔注射质量分数为 0.5% 的戊巴比妥钠进行诱导麻醉后, 将鼠背部的毛修剪至约 1 mm 长度, 采用质量分数 6% 的 Na₂S 溶液实施脱毛处理, 确保脱毛区域为 5 cm×5 cm, 裸露出完整皮肤, 未见红肿、充血等炎症现象。阳性对照组每次给予高原护肤霜约 0.3 g, 涂抹给药 (0.0125 g/cm², 涂抹面积 5 cm×5 cm, 涂抹 2 次, 每次间隔 5 min); 复方精油组每次给予 3 mL 复方精油, 涂抹给药 (0.125 mL/cm², 涂抹面积 5 cm×5 cm, 涂抹 2 次, 每次间隔 5 min); 模型组每次给予 3 mL 生理盐水, 涂抹给药 (0.125 mL/cm², 涂抹面积 5 cm×5 cm, 涂抹 2 次, 每次间隔 5 min)。给药 50 min 后, 将模型组、阳性对照组和复方精油组置于波长 313 nm 的紫外光灯下, 接受 20 min 的辐照, 紫外光源与小鼠皮肤之间的垂直间距设定为 35 cm, 辐照强度为 0.17 mW/cm²。完成照射后的 24 h, 各组小鼠需再次给药 1 次, 连续 7 d。末次实验 4 h 后, 将各组小鼠颈椎脱臼处死, 取背部脱毛区的皮肤组织, 用生理盐水漂洗除去血液和皮下脂肪, 于 -80 °C 冷冻保存备用。

1.2.2.2 UVB 照射后皮损情况及皮肤组织切片

将采集到的部分皮肤组织样本, 放入含有质量

分数 10% 的福尔马林溶液中固定, 切取 2 mm 厚度的组织并使用 PBS 缓冲液进行洗涤与修正, 再按照乙醇体积分数从低到高 (30%、50%、70%、90%、100%) 进行梯度脱水, 脱水后的皮肤组织样本用二甲苯进行浸泡透明, 浸蜡包埋后进行切片制备, 采用 H & E 染色法对切片进行着色处理。完成脱水及封片操作后, 利用显微镜对样本的病理变化进行观察。

1.2.2.3 SOD 活性和 MDA 水平检测

用滤纸将皮肤组织拭干, 称重, 按组织质量的 10% 加入生理盐水, 于 4 °C 冰浴中使用生理盐水将其稀释成质量分数 10% 的组织匀浆液, 在低温台式离心机中以 10000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。采用考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 检测总蛋白含量, 以牛血清清蛋白为标准品绘制标准曲线, 按试剂盒说明书进行 SOD 活性和 MDA 水平测定。

1.2.2.4 胶原蛋白水平检测

将皮肤组织剪碎、研磨、过 40 目筛后, 精确称取 25.0 mg 置于消解管中, 采用氯胺-T 比色法, 用紫外-可见分光光度计在 560 nm 波长下测定溶液的吸光度。以羟脯氨酸质量浓度 (x , μg/mL) 为横坐标, 吸光度 (y) 为纵坐标, 绘制出羟脯氨酸质量浓度-吸光度标准曲线, 标准曲线拟合方程: $y = 6.4873x - 0.0097$ ($R^2 = 0.99084$)。计算得到溶液中羟脯氨酸的质量 (μg), 再按照式 (2) 计算胶原蛋白含量 (μg/mg)。

$$\text{胶原蛋白含量} = m(\text{羟脯氨酸})/[m(\text{皮肤组织}) \times 0.134] \quad (2)$$

1.2.3 复方精油对 UVB 辐射后 HaCaT 细胞光产物的影响实验

参照文献[14]进行实验。

1.2.3.1 细胞培养与细胞处理

将 HaCaT 细胞置于 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的细胞培养箱中培养。采用质量分数 0.25% 胰蛋白酶和质量分数 0.02% 的乙二胺四乙酸 (EDTA) 混合溶液进行细胞消化处理, 采用 RPMI-1640 培养基 (内含质量分数 10% 胎牛血清) 对细胞悬液进行调整, 直至细胞密度达到 1×10^6 个/mL。在 6 孔板内预先放入已灭菌的盖玻片, 并向每片盖玻片上准确滴加 0.6 mL 细胞悬液。细胞经过 6~8 h 的贴壁生长后, 需向各培养孔中额外补充 1 mL 的 RPMI-1640 培养基 (含质量分数 10% 小牛血清), 以确保细胞的持续培养环境。此外, 将一部分细胞悬液以适宜的量接种至直径为 35 mm 的培养皿中, 并维持其处于稳定的培养条件下, 待细胞融合度达到 90% 时, 对其进行紫外线照射处理, 随后进行 Western blotting 实验。

1.2.3.2 细胞照光与造模

将处于指数生长期的 HaCaT 细胞置于 6 孔板中 (6×10^5 个细胞/孔, 1 mL 培养基/孔), 正常培养

24 h, 使细胞贴壁, 分为正常组、模型组和复方精油组, 将模型组与实验组置于波长 313 nm 的紫外光灯下, 接受 30 min 的辐照, 照射强度为 30 mJ/cm², 复方精油组细胞经 UVB 照射后加入质量浓度 200 μg/mL 的复方精油培养基处理, 正常组与模型组给予等量空白培养基替代, 给药 24 h, 每组设 3 个平行培养孔。

1.2.3.3 细胞 p53 和 PCNA 蛋白表达水平测定

根据 Trizol 试剂的说明书, 从各组细胞中提取总蛋白, 用 Bradford 法测定总蛋白含量。制备质量分数 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 并向每个胶槽中加入 20 μg 样本蛋白。恒流(20 mA/块胶)进行电泳约 2 h, 转换至恒压模式(100 V)继续电泳约 1 h 以完成转膜。使用封闭液在 20~37 °C 内对膜进行封闭处理 1~2 h, 将膜与稀释 500 倍的一抗(p53、PCNA、β-actin)在 20~37 °C 下孵育杂交约 2 h。经过振荡洗膜后, 在 37 °C 下, 采用稀释 200 倍的二抗(山羊抗小鼠 IgG)进行 20 min 的孵育, 并再次进行振荡洗膜。利用 DAB 试剂显色, 并观察所得条带的具体情况。通过 BIO-RAD 凝胶成像系统对条带进行图像采集与数据解析。Western blotting 条带的光强度反映了蛋白样品的相对含量, 计算目标条带峰面积与内参条带峰面积的比值, 即可得到目的蛋白表达水平的半定量分析值。

1.3 复方精油成分分析

采用 GC-MS 法分析复方精油成分。GC 条件: 质量分数 5% 酚聚硅毛细管柱(0.25 mm×30 m×0.25 μm)。柱温 50~230 °C, 程序升温: 以 10 °C/min 的速率从室温升温至 280 °C, 保持 15 min。进样口温度 250 °C, 检测器温度 280 °C; 柱前压 100 kPa; 柱流量 1.0 mL/min。将复方精油经 0.2 μm 有机滤膜过滤, 进样量 0.40 μL, 分流比 1:50, 载气为高纯 He(体积分数 99.995%)。

MS 条件: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV。传输线温度 250 °C, 倍增电压 1600 V, 离子源温度 230 °C。四极杆温度 130 °C, 扫描范围 50~500 amu。获取的复方精油质谱数据用 NIST-98 版质谱库(<https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a>)进行检索并鉴定成分, 采用色谱峰面积归一化法进行定量。

1.4 复方精油抑菌活性测定

参照文献[15]。

1.4.1 菌株活化与菌悬液制备

采用经过灭菌处理的接种环, 在营养琼脂平板表面上划线接种金黄色葡萄球菌菌株, 将接种完毕的培养皿放入设定温度为 37 °C 恒温培养箱中, 进行为期 24 h 的培养, 从平板上挑取单一菌落接种至

营养琼脂斜面培养基上, 进行进一步的扩大培养, 直至获得活化的菌体。从经过活化的斜面培养基中, 挑取一环菌体样本, 将其接种到相应的液体培养基内, 将此接种后的培养基放置于恒温振荡培养箱中, 进行培养直至菌体达到对数生长期。从处于对数生长期的菌液中吸取适量样本, 加入到无菌水中进行逐步稀释, 直至最终菌落数达到 1×10⁵~1×10⁶ CFU/mL, 备用。

1.4.2 复方精油抑菌圈测定

采用纸片琼脂扩散法测定抑菌活性。用打孔器将定性滤纸裁剪为直径 6 mm 的小圆片, 在 160 °C 下进行 2 h 的干热灭菌处理。在培养皿中, 以正三角形布局等距放置 3 片滤纸, 使用移液枪向每片滤纸上精确滴加 8 μL 的精油样品。设置无菌蒸馏水作为空白对照组, 自制的升麻、沙棘、黄芩、金银花和玉竹单组分精油作为实验对照组。所有样品均在 37 °C 的恒温培养箱中培养 24 h, 测量抑菌圈的直径。重复 3 次平行实验, 最终结果取 3 次测量的算术平均值。

1.5 复方精油提取单因素实验

固定液料比(20:1)、微波功率(385 W)、提取时间(30 min)这 3 个因素中的 2 个, 考察不同单因素, 即液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1)、微波功率(355、365、375、385、395 W)、提取时间(10、20、30、40、50 min)对复方精油提取率的影响。实验重复 3 次, 确定最佳条件。

1.6 复方精油提取响应面实验

根据单因素实验结果, 以液料比(A)、微波功率(B)、提取时间(C)为自变量, 以复方精油提取率(Y)为评价指标, 采用 Box-Behnken 中心组合设计, 对 3 个因素分别设置 3 个水平, 用“-1、0、+1”表示, 液料比、微波功率、提取时间根据单因素研究结果中心点取值。

1.7 数据处理

所有实验均进行 3 次重复实验, 实验结果采用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行处理分析, 最终结果用“算术平均数±标准误差($\bar{X} \pm S$)”来表示。采用 *t* 检验法对组间数据进行比较, *P*<0.05 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与分析

图 1 为液料比、微波功率、提取时间对复方精油提取率的影响。

从图 1a 可以看出, 随着液料比(10:1~50:1)的增加, 复方精油的提取率呈现先增加后降低的趋势。当液料比为 30:1 时, 复方精油的提取率最高,

为 57.6%。这是因为，乙醇用量过少，导致混合药材无法充分浸润，所以提取率会降低；乙醇用量过高会导致极性不匹配、溶解度饱和、挥发性物质损失以及溶剂和药材的相互作用改变，从而降低复方精油的提取率。

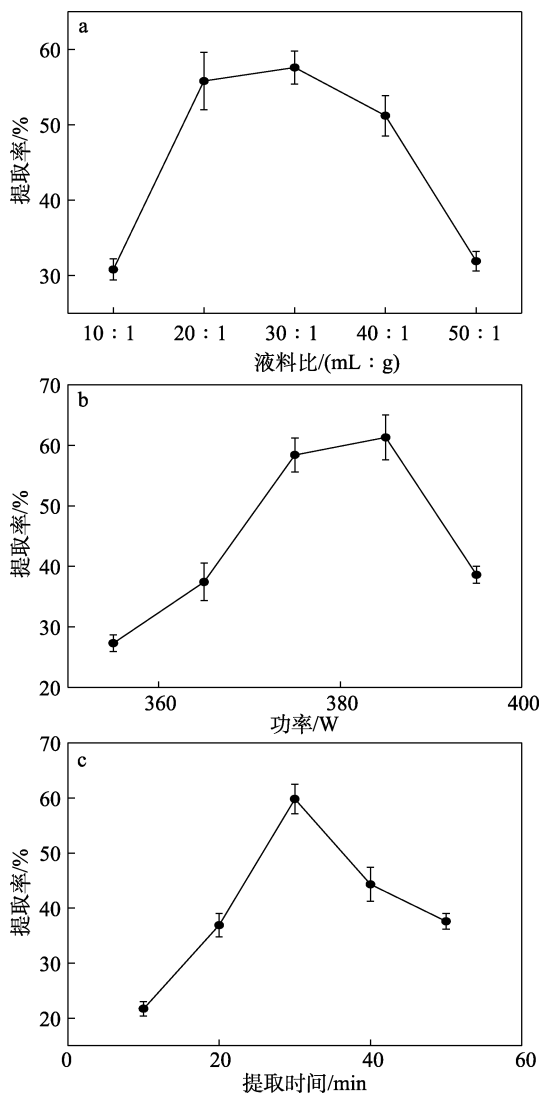


图 1 液料比 (a)、微波功率 (b)、提取时间 (c) 对复方精油提取率的影响

Fig. 1 Effects of liquid to material ratio (a), microwave power (b), and extraction time (c) on extraction rate of compound essential oil

从图 1b 可以看出，随着微波功率 (355~395 W) 的增加，复方精油的提取率呈现先增加后降低的趋势。当微波功率为 385 W 时，复方精油提取率最高，为 61.3%。这是因为，微波功率的提高会使药材吸收更多的能量，有助于分子的扩散和精油的溶出，但是微波功率过高，会分解挥发性较强的精油成分，且导致溶剂挥发过快，影响精油的溶出与提取。

从图 1c 可以看出，随着提取时间 (10~50 min) 的增加，复方精油的提取率呈现先增加后降低的趋

势。当提取时间为 30 min 时，复方精油提取率最高，为 59.8%。这是因为，提取时间太短不利于精油的溶出，而时间太长又会使精油挥发造成提取率降低。

2.2 响应面实验结果与分析

2.2.1 响应面实验设计与结果

采用 Design expert 8.05 软件对表 1 中的数据点进行二项式拟合，并对模型进行方差分析，得到二项式拟合方程为：

$$Y=0.6094+0.0225A+0.0870B+0.0338C+0.0187AB-0.0068AC+0.0053BC-0.1568A^2-0.1183B^2-0.1348C^2$$

($P<0.0001$, $R^2=0.9906$)

表 1 响应面法实验设计和结果

Table 1 Experimental design and results of response surface methodology

序号	编码值			实际值			Y/%
	A	B	C	液料比/(mL : g)	微波功率/W	提取时间/min	
1	0	0	0	25 : 1	375	30	0.614
2	0	0	0	25 : 1	375	30	0.591
3	+1	0	+1	40 : 1	375	50	0.348
4	0	0	0	25 : 1	375	30	0.621
5	-1	+1	0	10 : 1	395	30	0.384
6	0	+1	+1	25 : 1	395	50	0.482
7	0	-1	+1	25 : 1	355	50	0.321
8	+1	-1	0	40 : 1	355	30	0.247
9	-1	0	-1	10 : 1	375	10	0.274
10	0	+1	-1	25 : 1	395	10	0.381
11	0	0	0	25 : 1	375	30	0.618
12	-1	-1	0	10 : 1	355	30	0.224
13	0	0	0	25 : 1	375	30	0.603
14	-1	0	+1	10 : 1	375	50	0.332
15	+1	0	-1	40 : 1	375	10	0.317
16	+1	+1	0	40 : 1	395	30	0.482
17	0	-1	-1	25 : 1	355	10	0.241

2.2.2 模型拟合与方差分析

表 2 为响应面实验数据的方差分析结果。

从表 2 可以看出，模型的 $P<0.0001$ ，说明模型有显著的统计学差异。相关系数 (R^2) 为 0.9906，表明该模型可解释 3 个因素 99.06% 的变异性，反映因变量与自变量关系密切，可以用来对提取工艺参数进行分析和预测。模型中方差分析结果显著性分别为 A^2 、 B^2 和 C^2 ，表明 3 个自变量因素对提取率的影响显著，而交互项 AB 、 AC 和 BC 均不显著。从 F 值可看出，单因素对复方精油提取率的影响大小顺序为 $B>C>A$ ，即微波功率>提取时间>液料比。

表 2 响应面实验方差分析

Table 2 Analysis of variance in response surface experiment

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	0.3421	9	0.0380	81.80	<0.0001	**
A 液料比	0.0041	1	0.0041	8.72	0.0213	*
B 微波功率	0.0606	1	0.0606	130.33	<0.0001	**
C 提取时间	0.0091	1	0.0091	19.61	0.0030	**
AB	0.0014	1	0.0014	3.03	0.1255	○
AC	0.0002	1	0.0002	0.39	0.5510	○
BC	0.0001	1	0.0001	0.24	0.6410	○
A ²	0.1036	1	0.1036	222.89	<0.0001	**
B ²	0.059	1	0.0590	126.88	<0.0001	**
C ²	0.0765	1	0.0765	164.74	<0.0001	**
残差	0.0033	7	0.0005	—	—	—
纯误差	0.0026	3	0.0009	5.78	0.0615	○
失拟性	0.0006	4	0.0002	—	—	—
总差	0.3453	16	—	—	—	—

注: “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$); “*”表示差异显著 ($P < 0.05$); “○”表示差异不显著 ($P > 0.05$); “—”代表无数据。

2.2.3 响应面分析

采用 Design expert 8.05 软件绘制复方精油提取液料比、微波功率、提取时间的三维曲面图, 结果如图 2 所示。

在响应面图中, 曲面的陡峭程度与交互作用的显著程度呈正相关, 即曲面越陡峭, 交互作用越显著; 反之, 曲面越平缓, 交互作用越弱。在等高线图中, 线条的形状和密集度能够体现各因素交互作用的强弱, 若线条呈现椭圆或马鞍形状, 则表明两因素之间交互作用显著; 若为圆形, 则表示交互作用较弱。由图 2 可见, 反应时间与微波功率的曲面陡峭程度较小, 这意味着二者交互作用对提取率的影响不大; 而反应时间与液料比、微波功率与液料比的曲面较为陡峭, 且等高线较为密集, 表明这两组因素之间的交互作用对提取率的影响较大。

由图 2 可得复方精油提取的最优条件为: 液料比为 27.534 : 1, 微波功率为 384.587 W, 提取时间为 31.602 min。在此条件下预测提取率为 0.627%。

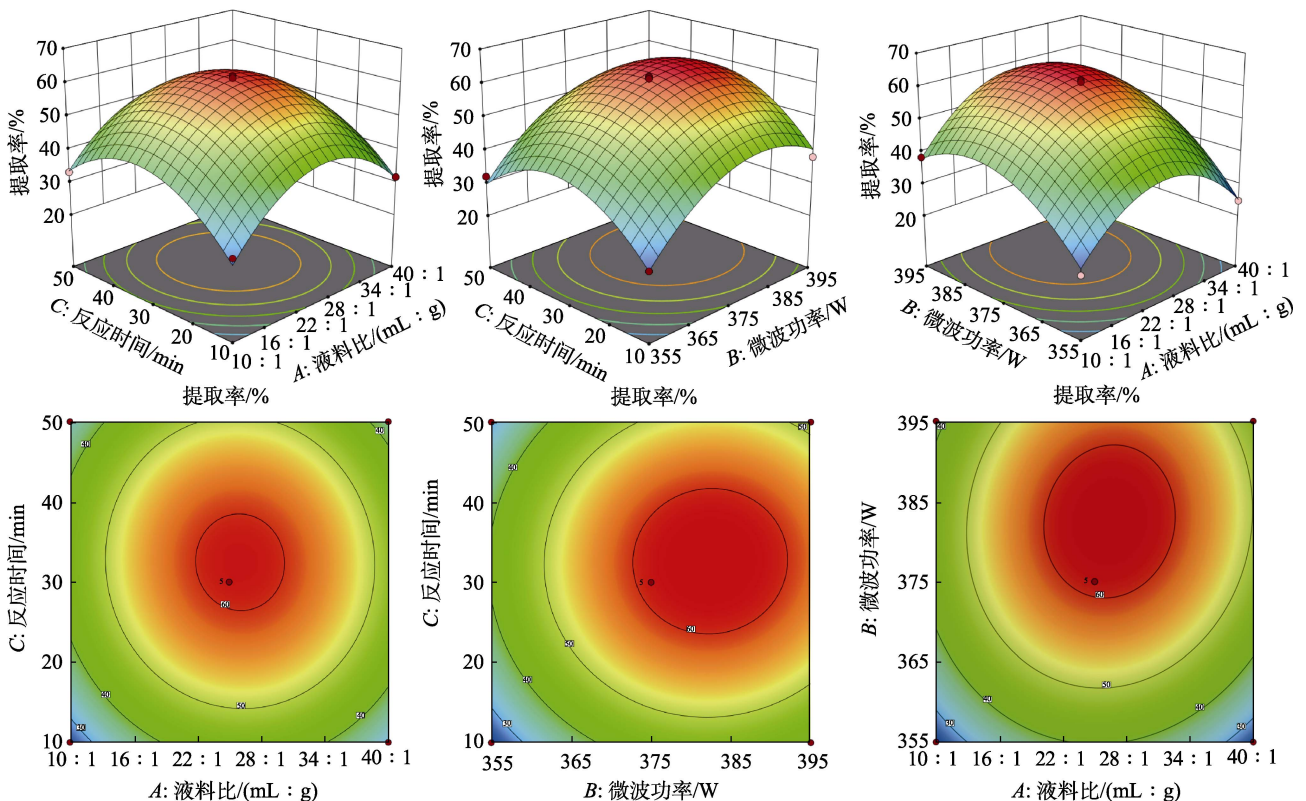


图 2 复方精油液料比、微波功率、提取时间两两交互影响的三维曲面图

Fig. 2 Three-dimensional surface diagram of the interaction effects of liquid-solid ratio, microwave power, and extraction time of compound essential oil

2.2.4 工艺验证结果

结合实际操作, 调整复方精油的提取工艺参数为: 液料比为 28 : 1, 微波功率为 385 W, 提取时间为 32 min。在此条件下进行 3 次平行验证实验, 得到复方精油提取率分别为 0.618%、0.625%、

0.629%, 算数平均值为 0.624%, 与预测值 (0.627%) 接近。表明该模型可靠, 优化条件可行。后续使用的复方精油均为最佳条件制备的。

2.3 复方精油成分及相对含量检测结果

图 3 为复方精油 GC-MS 的总离子流色谱图,

表 3 为主要成分检测结果。

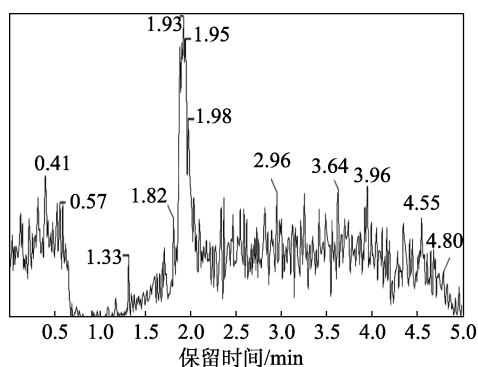


图 3 复方精油 GC-MS 总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatogram of compound essential oil by GC-MS

表 3 复方精油主要成分

Table 3 Main components in compound essential oils

序号	化合物名称	保留时间/ min	CAS 号	相对 含量/%
1	十五烷酸	0.41	1002-84-2	0.57
2	棕榈酸	0.57	57-10-3	6.31
3	芳樟醇	0.69	78-70-6	0.27
4	对-薄荷酮	0.72	89-80-5	0.83
5	胡薄荷酮	1.21	89-82-7	1.08
6	3,5-二甲氧基甲苯	1.33	4179-19-5	2.33
7	吡啶	1.52	120-72-9	0.62
8	14-甲基十五烷酸甲酯	1.63	5129-60-2	3.82
9	4-乙炔基愈创木酚	1.68	7786-61-0	1.03
10	对甲氧基苯乙酮	1.82	100-06-1	0.36
11	3,4-二甲氧基苯乙烯	1.85	6380-23-0	13.27
12	甲基丁香酚	1.93	93-15-2	18.64
13	3,4,5-三甲氧基甲苯	1.95	6443-69-2	12.16
14	丹皮酚	1.98	552-41-0	8.94
15	肉豆蔻醛	2.36	124-25-4	0.81
16	4-松油醇	2.96	562-74-3	2.75
17	雪松醇	3.10	77-53-2	0.29
18	β -石竹烯	3.24	87-44-5	0.63
19	(-)- α -萜澄茄油烯	3.57	17699-14-8	3.28
20	4-乙炔基-2-甲氧基苯酚	3.64	7786-61-0	4.62
21	苯乙酮	3.72	98-86-2	1.43
22	月桂酸	3.81	143-07-7	1.66
23	肉桂酸	3.96	621-82-9	3.68
24	β -桉叶醇	4.07	51317-08-9	0.24
25	肉豆蔻酸	4.35	544-63-8	4.37
26	糠醛	4.51	98-01-1	0.57
27	顺式-11-十六碳二烯酸	4.53	2416-20-8	2.82
28	亚油酸	4.55	60-33-3	5.82
29	苯甲酸苄酯	4.73	120-51-4	3.31
30	叶绿醇	4.80	150-86-7	3.34
31	白苏酮	4.83	6138-88-1	3.21
32	8-十七烷烯	4.892	16369-12-3	1.96

从表 3 可以看出,复方精油中共检测出 32 种成分,主要包括醇类、酮类、酚类、醛类、萜烯类等,其中,甲基丁香酚、3,4-二甲氧基苯乙烯、3,4,5-三甲氧基甲苯的相对含量较高,分别为 18.64%、13.27%、12.16%。甲基丁香酚具有镇痛、抗炎、抗氧化及调控 Nrf2 通路减轻肾脏氧化应激的特性;3,4-二甲氧基苯乙烯和 3,4,5-三甲氧基甲苯都具有清除自由基与抗氧化的特性; β -石竹烯有抗真菌、抗自由基和抗氧化特性^[16-17];肉桂酸、对甲氧基苯乙酮等不饱和羧酸类、酮类物质可通过对各种自由基的清除作用,进而阻断由自由基激活的信号传导,保护皮肤免于光损伤^[18];吡啶、4-乙炔基-2-甲氧基苯酚等芳香杂环类及酚类成分,可与金属离子螯合、抑制细胞膜脂质过氧化和调节抗氧化酶,发挥其抗氧化作用^[9];石竹烯、糠醛等倍半萜类和醛类物质,可通过影响 NF- κ B、JAK/STAT、MAPK 等信号通路传导,发挥抗皮肤炎症的作用^[8]。其他具体成分发挥的药效活性有待进一步研究。

2.4 复方精油的抑菌活性分析

表 4 为复方精油抑菌圈测定结果。

表 4 不同精油的抑菌圈直径

Table 4 Results of antibacterial zone diameter of different essential oils

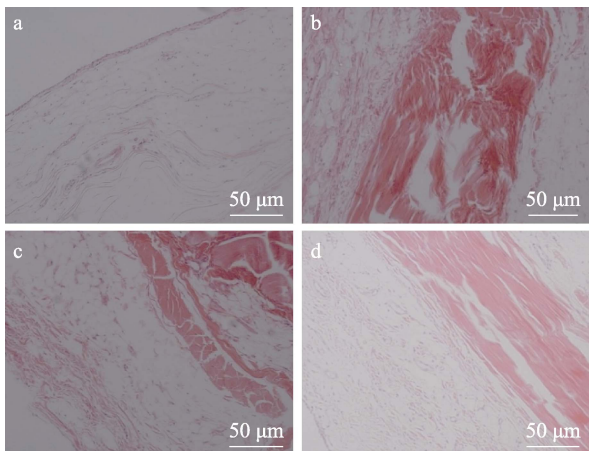
精油种类	抑菌圈直径/mm
复方精油	18.23±0.25
升麻精油	11.38±0.16
沙棘精油	12.67±0.61
黄芩精油	15.86±0.13
金银花精油	11.38±0.52
玉竹精油	13.24±0.24

从表 4 可以看出,复方精油对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为(18.23±0.25) mm,大于实验对照组的升麻、沙棘、黄芩、金银花和玉竹单组分精油的抑菌圈直径(11.38~15.86 mm),表现出最佳的抑菌效果。相比之下,黄芩精油的抑菌圈直径〔(15.86±0.13) mm〕略小于复方精油,表明复方精油对金黄色葡萄球菌的显著抑制效果主要源自黄芩精油,同时也是各种精油成分间协同增效的结果。复方精油对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径处于 15~20 mm,属于高度敏感,表明复方精油可能通过对微生物的细胞膜或细胞壁发起进攻,干扰细胞膜脂质层的流动性,进而改变细胞膜的通透性,促使细胞内部物质外泄,最终抑制细菌生长甚至引发细菌死亡^[6]。

2.5 复方精油对 UVB 辐射小鼠皮肤损伤的修复作用

2.5.1 形态学观察

图 4 为各组小鼠背部皮肤组织 H & E 染色照片。



a—正常组; b—模型组; c—阳性对照组; d—复方精油组

图 4 各组小鼠背部皮肤组织 H & E 染色照片

Fig. 4 Photos of H & E staining of back skin tissue of mice in each group

从图 4 可以看出, 正常组小鼠的皮肤样本中, 细胞层次结构清晰可见, 真皮层相对较薄, 弹性纤维呈现出有序的波浪状排列, 无任何盘绕、纠结或聚集的现象, 胶原纤维则以疏松的束状形式定向分布, 同时, 皮肤的附属器官保持完整状态 (图 4a); 相比之下, 模型组小鼠的皮肤则表现出表皮细胞层次增加、真皮层增厚的特征, 弹性纤维经历了嗜碱性变化, 形态变得不规则, 出现了破坏、增粗、盘绕纠结、成团乃至完全丧失的现象, 胶原纤维的排列不规则且质地变得粗大致密, 皮肤的附属器官出现缺失 (图 4b); 阳性对照组小鼠的皮肤胶原纤维则以结节状或旋涡状的形式不规则地排列, 质地同样表现出粗大致密的特点 (图 4c)。复方精油组与模型组相比, 其皮肤的表皮及其附属器官相对保持得更加完整, 真皮层中的弹性纤维破坏程度有所减轻, 胶原纤维的排列也呈现出更为规则有序的状态 (图 4d)。

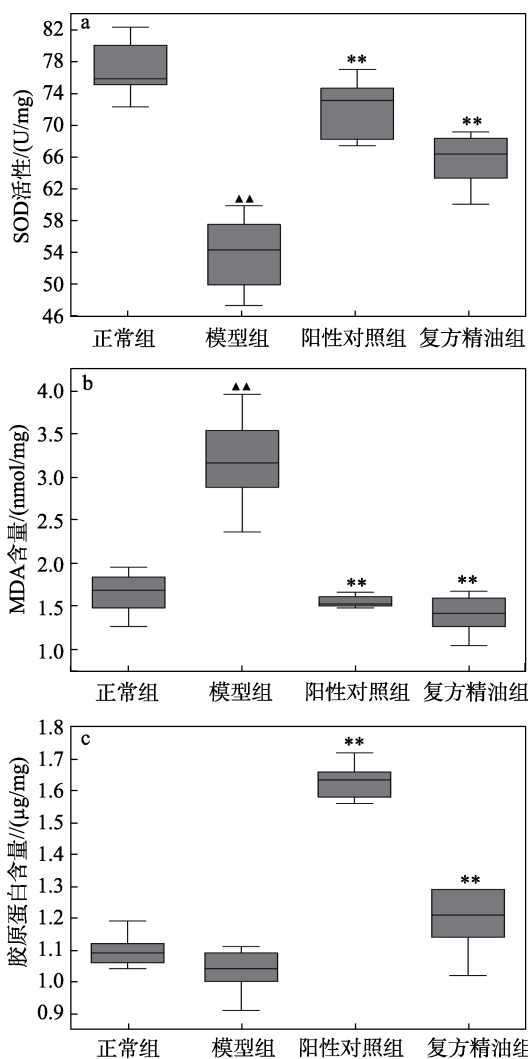
2.5.2 复方精油对小鼠皮肤组织 SOD 活性、MDA 水平、胶原蛋白含量的影响

图 5 为各组小鼠皮肤组织 SOD 活性、MDA 水平、胶原蛋白含量, 表 5 为其相关数据。

从图 5 可以看出, 在测定小鼠皮肤组织 SOD 活性的实验中, 与正常组相比, 经受 UVB 辐射的模型组小鼠的皮肤组织的 SOD 活性展现出极显著降低 ($P < 0.01$); 阳性对照组与复方精油组则均表现出相对于模型组的 SOD 活性有极显著的上升 ($P < 0.01$) (图 5a)。模型组小鼠的皮肤 MDA 水平相较于正

常组有极显著提升 ($P < 0.01$), 而阳性对照组与复方精油组则相较于模型组, MDA 水平极显著降低 ($P < 0.01$) (图 5b)。模型组小鼠皮肤组织的胶原蛋白含量与正常组相比降低, 与模型组相比, 复方精油组小鼠皮肤的胶原蛋白含量极显著升高 ($P < 0.01$) (图 5c)。

结果表明, 复方精油可通过降低 MDA 水平, 提高 SOD 活性, 减少皮肤损伤, 增强胶原蛋白的合成和分泌, 减少过量活性氧的产生, 恢复活性氧生成与清除之间的动态平衡状态, 减少自由基的积累, 提高胶原蛋白含量^[12]。



“▲▲”表示与正常组相比差异极显著 ($P < 0.01$); “▲”表示与正常组相比差异显著 ($P < 0.05$); “***”表示与模型组相比差异极显著 ($P < 0.01$); “*”表示与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$), 下同

图 5 各组小鼠皮肤组织 SOD 活性 (a)、MDA 水平 (b)、胶原蛋白含量 (c)

Fig. 5 SOD activity (a), MDA level (b), and collagen content (c) in the skin tissues of each group of mice

表 5 各组小鼠皮肤组织 SOD 活性、MDA 水平、胶原蛋白含量

Table 5 Levels of SOD, MDA, and collagen in skin tissues of mice in each group

组别	SOD 活性/ (U/mg)	MDA 水平/ (nmol/mg)	胶原蛋白含量/ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
正常组	77.20 \pm 3.66	1.63 \pm 0.25	1.10 \pm 0.05
模型组	54.19 \pm 4.68 ^{▲▲}	3.16 \pm 0.55 ^{▲▲}	1.03 \pm 0.07
阳性对照组	72.57 \pm 3.76 ^{**}	1.49 \pm 0.03 ^{**}	1.63 \pm 0.06 ^{**}
复方精油组	65.92 \pm 3.40 ^{**}	1.38 \pm 0.23 ^{**}	1.19 \pm 0.11 ^{**}

2.6 复方精油对 UVB 辐射 HaCaT 细胞 p53 和 PCNA 蛋白表达水平的影响

图 6 为 Western blotting 凝胶成像扫描图。图 7 为经内参 β -actin 进行校正后的具体结果。

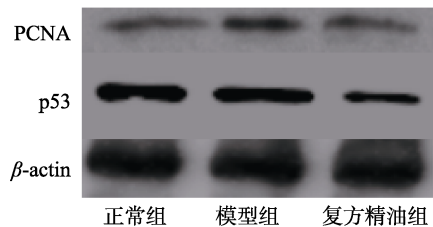


图 6 Western blotting 凝胶成像扫描图
Fig. 6 Western blotting and gel imaging

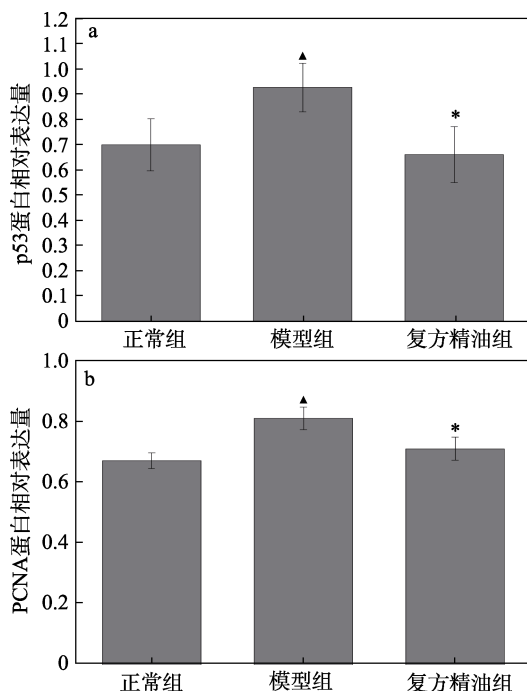


图 7 经内参 β -actin 校正后的 p53 (a) 和 PCNA (b) 的蛋白表达水平

Fig. 7 Protein expression levels of p53 (a) and PCNA (b) after internal reference β -actin correction

从图 6 可以看出,在 UVB 辐射后,相较于正常组,模型组的 p53 与 PCNA 条带灰度显著增加;然而,经复方精油干预后,复方精油组的 p53 与 PCNA

条带灰度相较于模型组有所减弱。

从图 7 可以看出,模型组中 HaCaT 细胞的 p53 与 PCNA 蛋白表达水平显著高于正常组 ($P < 0.05$)。相比之下,复方精油组中这两种蛋白的表达水平均显著低于模型组 ($P < 0.05$)。经过内参 β -actin 校正比较后,两组相应的蛋白表达量降低,具有统计学意义,表明复方精油可通过下调 HaCaT 细胞 p53 和 PCNA 的蛋白表达水平,减轻小鼠被 UVB 辐射后产生的细胞周期阻滞、影响 DNA 修复,以及编码核苷酸切除修复基因 (NER) 的表达等问题^[19-20]。推测其光保护作用可能与其下调修复相关调控分子 p53 和 PCNA 蛋白表达水平有关^[14]。

3 结论

采用微波辅助提取法,提取升麻、金银花、沙棘、黄芩和玉竹的活性成分,制备了复方精油,采用单因素实验和响应面实验对提取工艺进行了优化,通过 GC-MS 法对复方精油成分进行定性和定量分析,采用抑菌圈实验对复方精油的金黄色葡萄球菌抑菌活性进行检测,通过 UVB 照射法建立小鼠辐射皮肤损伤模型和 HaCaT 细胞的损伤模型,基于 H & E 染色法对 SOD 活性、MDA 水平、胶原蛋白含量进行检测,通过 Western blotting 法测定 HaCaT 细胞 p53 和 PCNA 蛋白表达水平,探究复方精油对经 UVB 照射后的小鼠皮肤的辐射修复活性,结论如下:

(1) 以体积分数 75% 的乙醇水溶液为提取溶剂,在液料比为 28 : 1、微波功率为 385 W、提取时间为 32 min 的最佳提取工艺条件下提取复方精油,提取率为 0.624%。

(2) 复方精油共检测出 32 种化学成分,包括醇类、酮类、酚类等,其中,甲基丁香酚、3,4-二甲氧基苯乙烯、3,4,5-三甲氧基甲苯的相对含量较高,分别为 18.64%、13.27%、12.16%。

(3) 8 μL 复方精油对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为(18.23 \pm 0.25) mm,属于高度敏感,其抑制效果主要源自黄芩精油。

(4) 复方精油通过升高小鼠皮肤组织 SOD 活性和胶原蛋白含量,降低小鼠皮肤组织 MDA 水平,发挥对 UVB 辐射损伤的预防作用,并可通过下调 HaCaT 细胞 p53 和 PCNA 蛋白表达水平,对 UVB 辐射损伤起到修复作用。

本文从 UVB 损伤预防及修复角度证明了复方精油具有良好的抑菌及抗辐射作用,可以为植物源性辐射防护剂的抗辐射功效,以及其他衍生活性药物治疗潜能的开发提供理论依据。