

油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用及抑菌活性

丁亚男,王瑞阳,高观祯,汪惠勤,周建武*,饶平凡

中国科学院上海生命科学研究院 浙江工商大学食品营养科学联合研究中心,杭州 310013

摘要:为研究油橄榄叶提取物对人永生角质形成细胞(HaCaT)氧化损伤的保护作用及抑菌作用,采用肌红蛋白保护率评价油橄榄叶提取物对不同种类自由基的胞外抗氧化能力,建立 HaCaT 细胞的氧化损伤和炎症模型,评价油橄榄叶提取物对细胞氧化损伤的保护作用,并进一步考察油橄榄叶提取物对常见病原菌的抑制作用。结果表明油橄榄叶提取物对羟基自由基、次氯酸根和过氧自由基均具有抗氧化作用,其中对羟基自由基和过氧自由基的抗氧化效果较好。在细胞水平上,油橄榄叶提取物能够显著降低 HaCaT 的胞内自由基,可以有效改善 HaCaT 细胞的氧化应激状态。同时,0.156~0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的油橄榄叶提取物能够有效降低炎症细胞中的白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)因子水平,0.156~0.312 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的提取物能够降低肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平。此外,油橄榄叶提取物能够有效抑制金黄色葡萄球菌,而对大肠杆菌和铜绿假单胞菌敏感度低。综上,油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞的氧化损伤具有一定的保护作用,且具有抗炎效果和抑菌活性。

关键词:油橄榄叶提取物;人永生角质形成细胞;氧化损伤;肌红蛋白保护率;抑菌活性

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)9-1584-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.9.014

Protective effect of *Olea europaea* leaves extract against oxidative damage in HaCaT cells and its antibacterial activity

DING Ya-nan, WANG Rui-yang,

GAO Guan-zhen, WANG Hui-qin, ZHOU Jian-wu*, RAO Ping-fan

Zhejiang Gongshang University Joint Centre for Food and Nutrition Research, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310013, China

Abstract: To investigate the protective effect of *Olea europaea* leaves extract against oxidative damage in HaCaT cells and its antibacterial activity, the myoglobin protective ratio was used to evaluate the extracellular antioxidant capacity of *O. europaea* leaves extract against different types of free radicals, the oxidative damage and inflammation model of HaCaT cells was established to evaluate the protective effect of the extract against oxidative damage to the cells, and the inhibitory effect of *O. europaea* leaves extract on the common pathogenic bacteria was further investigated. The results showed that the *O. europaea* leaves extract possessed antioxidant effects on hydroxyl radicals, hypochlorite and peroxy radicals, among which the antioxidant effects on hydroxyl and peroxy radicals were better. At the cellular level, the extract was able to significantly reduce the intracellular free radicals of HaCaT, which could effectively improve the oxidative stress status of HaCaT cells. Meanwhile, 0.156-0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *O. europaea* leaves extract was effective in reducing IL-6, IL-1 β levels in inflammatory cells, and 0.156-0.312 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract was able to reduce TNF- α levels. In addition, *O. europaea* leaves extract was able to effectively inhibit *Staphylococcus aureus* with low sensitivity to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In conclusion, *O. europaea* leaves extract has a certain protective effect against oxidative damage in HaCaT cells, and has anti-inflammatory and antibacterial activities.

Key words: *Olea europaea* leaves extract; human immortalized keratinocytes; oxidative damage; myoglobin protection rate; antibacterial activity

的低地森林中,产地主要集中在地中海沿岸国家,国内主要产区在甘肃、广西、云南等。油橄榄在食品行业一直作为优质的植物源油料植物,在地中海地区也被当作传统药物,作为治疗炎症性肠道疾病的常用手段^[1,2]。由于目前国内外学者对油橄榄叶中生物活性成分(多酚类、黄酮类和萜类等)的相关研究日益增多,其抗氧化活性和相应的健康益处获得了广泛验证和肯定^[3]。研究显示油橄榄叶提取物不仅具有体外抗氧化作用,还能够增加体内抗氧化酶活性表现出体内抗氧化活性^[4],并且具有治疗高胆固醇血症和动脉粥样硬化等疾病的能力^[5]。主要体现在降低体内胆固醇含量,通过降低糖尿病大鼠的氧化应激改善血糖等^[6]。因此,近年来油橄榄叶提取物在食品、药品以及化妆品等领域均受到了广泛的关注,并表现出较好的潜力。

众所周知,皮肤活性氧自由基(reactive oxygen radicals, ROS)过量产生可直接或间接地导致细胞膜上的脂质过氧化,破坏表皮细胞的抗氧化防御系统,造成细胞损伤,诱发皮肤出现局部红斑、色素沉着异常、皱纹甚至皮肤癌等病理状态^[7]。一些天然植物提取物和相关的植物化合物由于安全性高、功能活性突出等优点成为防治皮肤氧化损伤最受关注的研究热点。例如,之前的文献中报道了荔枝壳中的原花青素对中波紫外线诱导的人永生化角质形成细胞(human immortalized keratinocytes, HaCaT)氧化应激损伤具有保护作用^[8];软枣猕猴桃中的黄酮类化合物对过氧化氢造成的 HaCaT 细胞氧化应激损伤具有一定的保护作用^[9];山刺玫叶醇提取物能够显著减少 HaCaT 细胞炎症介质一氧化氮和其他细胞因子的释放,减少细胞磷酸化^[10]。有研究报道油橄榄叶提取物能够提高经紫外线照射的 HaCaT 细胞的细胞活力^[1],并且能够通过 ERK1/2 和 p53 介导的途径诱导小鼠皮肤黑色素瘤细胞(B16-F10)凋亡,显示了其对黑色素瘤皮肤癌的潜在治疗作用^[12]。然而,仍没有以肌红蛋白保护率的方法来评估油橄榄叶提取物对不同种类自由基(次氯酸根、羟基自由基和过氧自由基)的抗氧化作用,以及其在 HaCaT 细胞中的胞内抗氧化能力(cellular antioxidant activity, CAA)和抗炎作用尚鲜有报道。

油橄榄叶提取物还具有抗微生物的作用,能够有效促进伤口快速愈合防止感染^[13]。研究显示,在 1-氯-2,4-二硝基苯诱导的实验小鼠模型中,油橄榄叶提取物和绣线菊提取物的组合通过调节免疫平衡

和皮肤屏障功能来缓解特异性皮炎^[14],在糖尿病实验大鼠的伤口感染上同样表现出愈合活性^[15]。在具体菌种方面,油橄榄叶提取物对单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)以及肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)等病原细菌也有抗菌活性^[16]。然而,由于不同病原菌对提取物的敏感程度可能存在较大的差异,我们的研究为了拓展油橄榄作为食物和药品外特别是在护肤品领域的应用,也对其抑菌可能性进行了初步探索。

本研究通过肌红蛋白保护率调查油橄榄抽叶提取物对不同自由基类型的抗氧化作用,并通过 HaCaT 氧化损伤模型评价油橄榄提取物对细胞活力以及胞浆 ROS 的影响,同时调查其对 HaCaT 细胞炎症介质的影响。此外,研究还测定了油橄榄叶提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油橄榄(*Olea europaea*)叶提取物(妍译生物科技有限公司)。

HaCaT(中科院典型培养物保藏委员会细胞库);金黄色葡萄球菌 ATCC 6538(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、铜绿假单胞菌 ATCC 9027(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027)以及大肠杆菌 ATCC 8739(*Escherichia coli* ATCC 8739)(中国普通微生物种保藏管理中心)。

细胞培养基 DMEM、磷酸盐缓冲液 PBS、Hank's 缓冲液、青霉素-链霉素混合溶液(美国 Thermo Fisher 公司,批号分别为 2906239、2592066、2808889、2587131);二甲基亚砜、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH)、肌红蛋白(马骨骨髓 95%~100%)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 RNBL1502、118M401V、WXBD4809V、00131643);胰酪大豆胨液体培养基(青岛海博生物有限公司,批号:HB411419)。

1.2 仪器与设备

DMI3000 B 型荧光倒置显微镜(美国 Leica 公司);FlexStation 3 型多功能钙流检测工作站(美国 Molecular Devices 公司);XS105DU 型电子分析天平(上海 Mettler Toledo 仪器有限公司);NU-8500 型二氧化碳培养箱(美国 NUAIRA 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 肌红蛋白保护率的测量

使用肌红蛋白保护率评估测试样品对不同类型 ROS(包括过氧自由基、羟基自由基、次氯酸根离子)的抗氧化活性。称取肌红蛋白溶于 PBS 缓冲液(8.10 mmol/L Na_2HPO_4 、1.47 mmol/L KH_2PO_4 、273 mmol/L NaCl 、26.8 mmol/L KCl)中制备 0.5 mg/mL 的肌红蛋白溶液。

为了测试样品对次氯酸盐离子的抗氧化活性,将 165 μL 肌红蛋白溶液、5 μL 试样和 30 μL 次氯酸盐溶液(0.02%)加入酶标仪孔板中,混合后用测量吸光度(405 nm)。

为测试样品对过氧自由基的抗氧化能力,将 140 μL 肌红蛋白溶液、5 μL 试样和 55 μL AAPH 溶液(50 mmol/L)加入酶标仪孔板中。在吸光度测量之前,使用水浴将含有溶液的微孔板在 60°C 下孵育 15 min 以产生过氧自由基,混合后测量吸光度(405 nm)。

为测试样品对羟基自由基的抗氧化能力,将 165 μL 肌红蛋白溶液和 29.5 μL 试样加入酶标仪孔板中,轻轻混合。同时,在试管中加入 200 μL FeSO_4 溶液(10 mmol/L)和 2 mL H_2O_2 (13 mmol/L),通过芬顿反应产生羟基自由基。立即向每个孔中加入 5.5 μL 的 Fenton 反应混合物,并通过移液管混合,最后用酶标仪测量吸光度(405 nm)。作为不含抗氧化剂的对照,添加超纯水代替测试样品。对于没有 ROS 的对照,添加超纯水代替 ROS。根据公式(1)计算测试样品的肌红蛋白保护率(R_1)。

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_1 - A_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_1 为肌红蛋白溶液的吸光度, A_2 为仅含 ROS 的溶液的吸光度,而 A_3 则为同时含试样和 ROS 的溶液的吸收率。

1.3.2 HaCaT 细胞培养

人永生角质细胞用 DMEM 培养液(含体积分数为 10% 的胎牛血清)培养。

1.3.3 MTT 法检测细胞存活率

当 HaCaT 细胞达到所需实验要求时,将其密度调整到 5×10^4 个/mL,并接种到 96 孔板。待 24 h 后按照分组设置加入实验样品,然后放回 CO_2 培养箱中。待 24 h 后,拿出 96 孔板每孔加入调配好浓度的 MTT 溶液(20 μL , 5 mg/mL)继续放回 CO_2 培养箱中培养 4 h。倒去原有溶液后,加入 150 μL 细胞

级 DMSO 溶液($\geq 99.7\%$)。振荡 10 min 后测定吸光值(570 nm)。按照公式(2)计算细胞存活率(R_2)。

$$R_2 = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 、 A_1 、 A_2 分别为空白、对照和样品组的吸光值。

1.3.4 细胞内抗氧化活性(CAA)检测

按照胞内抗氧化法测定油橄榄叶提取物在 HaCaT 细胞内的抗氧化能力。使用酶标仪测定荧光值($\text{EX} = 538 \text{ nm}$, $\text{EM} = 485 \text{ nm}$),连续检测 1 h,每隔 5 min 测一次以使其生成动力曲线。各组 CAA 值(C)按(3)计算。

$$C = 100 - \frac{\int A_1}{\int A_2} \times 100 \quad (3)$$

式中: $\int A_1$ 表示样品组荧光曲线积分下面积; $\int A_2$ 表示对照组荧光曲线积分下面积。

1.3.5 胞浆 ROS 检测

当角质形成细胞达到所需实验要求时,将其接种到 96 孔板上(1×10^5 个/mL)。24 h 后,小心地移去培养基,并使用 HBSS 清洗 1 次去除原有培养基中血清的干扰。向每孔中加入 100 μL 含有样品(1 mg/mL)的细胞维持液,继续放入 CO_2 培养箱中 6 h。然后使用 HBSS 缓冲液清洗去除残余的液体,并向每孔中加入 100 μL DCFH-DA(20 $\mu\text{mol/L}$)荧光探针溶液,探针孵育 30 min 后用 HBSS 洗去残余荧光探针后测定荧光值($\text{EX} = 538 \text{ nm}$, $\text{EM} = 485 \text{ nm}$)。

1.3.6 炎症因子含量的测定

将培养好的 HaCaT 细胞密度调至 1×10^6 个/mL,然后接种在 24 孔板上。实验时相应孔中分别加入含有样品的维持液 500 μL 预先培养 2 h,再取出加入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 500 μL (终浓度 20 $\mu\text{g/mL}$)刺激。24 h 后按照测定试剂盒的操作说明书测定细胞上清液中炎症因子含量。

1.3.7 菌种活化

将实验菌种(铜绿假单胞菌,金黄色葡萄球菌,大肠杆菌)接种胰酪大豆胨液体培养基(TSB)中,使用 25 °C 摇床 12 h,活化 2 次,备用。

1.3.8 油橄榄叶提取物对三种细菌的 MIC 和 MBC

按照试管二倍稀释法测定油橄榄叶提取物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)

和最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC), 观察各试管浑浊情况, 记录结果。MIC 为试管内液体呈现清亮透明的最大稀释倍数的油橄榄叶浓度。然后将 MIC 浓度及与其前后相邻两个稀释度的油橄榄抽提物样品涂布于普通琼脂培养基内, MBC 为普通琼脂培养基内不超过 5 个菌落的试管浓度。

1.3.9 油橄榄叶提取物的抑菌圈

在普通琼脂培养基上均匀涂布细菌悬液 (100 μL , 1×10^7 CFU/mL), 再将牛津杯置于培养基上, 每个牛津杯内加入油橄榄叶提取物 250 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后测定抑菌圈直径 (inhibitory zone diameter, IZD)。其中庆大霉素 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为阳性对照, 无菌生理盐水组作为阴性对照。IZD ≥ 20 mm, 极度敏感; $15 \leq \text{IZD} \leq 20$ mm, 高度敏感; $10 \leq \text{IZD} \leq 15$ mm, 中度敏感; $5 \leq \text{IZD} \leq 10$ mm, 轻度敏感; IZD ≤ 5 mm, 不敏感。

1.3.10 数据处理与分析

所有测试均进行三次, 以确保实验重复性。数据结果以平均值 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 然后利用软件 IBM SPSS Statistics 23 对数据进行方差分析

和显著性检验, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异, 并使用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制所有图表。

2 结果与分析

2.1 油橄榄叶提取物的肌红蛋白保护率

本研究采用肌红蛋白保护率法评估油橄榄叶提取物对不同种类自由基的抗氧化能力。如图 1 所示, 油橄榄叶提取物在羟自由基 (见图 1A)、过氧自由基 (见图 1B) 和次氯酸根 (见图 1C) 存在时, 均能较好地保护肌红蛋白的结构, 表现出较为广泛的抗氧化能力。在低浓度下 (0.312 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 油橄榄叶提取物几乎未体现出对羟基自由基、过氧自由基和次氯酸根的抗氧化作用。高浓度 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的油橄榄叶提取物对羟自由基、过氧自由基和次氯酸根造成的肌红蛋白结构改变的保护率分别为 (20.89 \pm 3.43)%、(21.38 \pm 1.81)%、(8.56 \pm 0.77)%, 这表明油橄榄抽提物对羟基自由基和过氧自由基的抗氧化效果好于对次氯酸盐离子的抗氧化效果。此外, 由图可见, 油橄榄叶提取物对三种自由基的抗氧化能力均具有浓度依赖性, 即浓度越高肌红蛋白保护率越高。

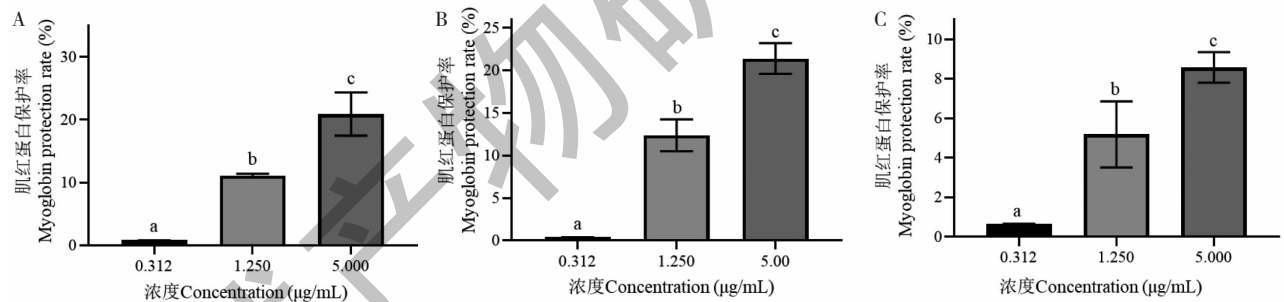


图 1 油橄榄叶提取物的肌红蛋白保护率

Fig. 1 Myoglobin protection ratio of *O. europaea* leaves extract leaves extract

注: A: 羟自由基存在; B: 过氧自由基存在; C: 次氯酸根存在; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Note: A: Presence of hydroxyl radicals; B: Presence of peroxy radicals; C: Presence of hypochlorite; Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.2 油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞存活率的影响

通过初筛选择油橄榄叶浓度 0.078、0.156、0.312、0.625 和 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行细胞实验。图 2 分别为油橄榄叶提取物与细胞共同孵育 24 h 后, 不同浓度样品对 HaCaT 细胞的影响。结果显示, 油橄榄提取物浓度为 0.078、0.156 和 0.312 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均对 HaCaT 细胞的存活率无显著影响, 既未造成细胞毒性, 也未表现出对 HaCaT 角质细胞的促生长作用。而当提取物浓度为 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

mL 时, 与细胞作用 24 h 后能够显著降低 HaCaT 细胞的存活率, 计算得到半抑制浓度为 $\text{IC}_{50} = 0.660$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 油橄榄叶提取物的胞内抗氧化能力及对胞浆 ROS 的影响

分别选取 0.156、0.312 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的油橄榄叶提取物, 考察其胞内抗氧化能力以及短时间内对胞浆 ROS 的影响。如图 3A 所示, AAPH 作用于细胞可引起胞内 ROS 含量上升, 进而诱导 HaCaT 细

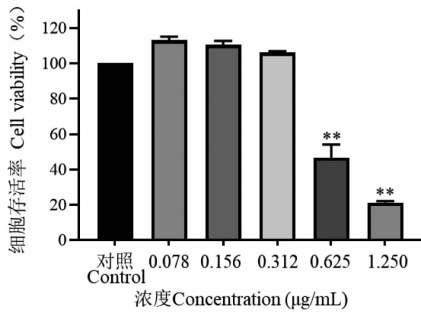


图2 油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effects of *O. europaea* leaves extract on the survival rate of HaCaT cells

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note:Compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

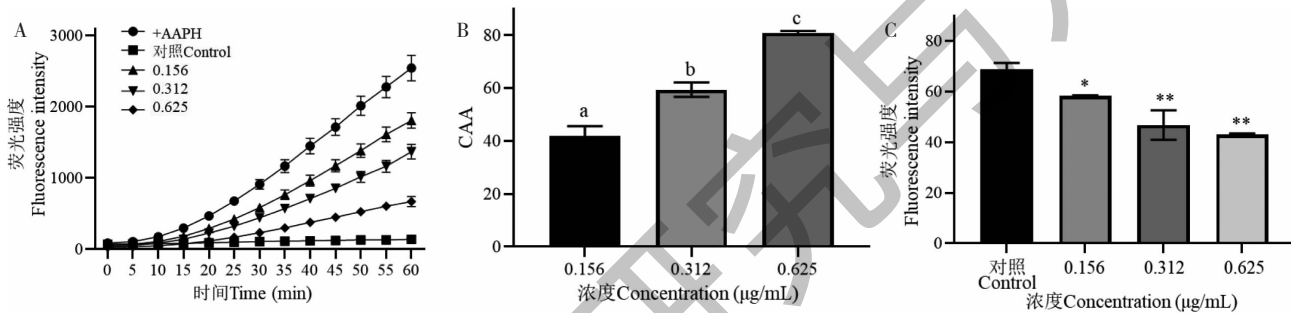


图3 油橄榄叶提取物的胞内抗氧化能力及对胞浆 ROS 的影响

Fig. 3 Intracellular antioxidant capacity of *O. europaea* leaves extract and its effect on cytoplasmic ROS

注:A:胞内抗氧化能力的动力学曲线;B:胞内抗氧化值;C:对胞浆 ROS 荧光强度的影响;图 B 中不同字母表示差异显著($P < 0.05$);图 C 中,与对照组相比差异显著,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note:A:Kinetic curve of intracellular antioxidant capacity;B:Cellular antioxidant activity units o;C:Effect on cytoplasmic ROS fluorescence intensity;Different letters in Fig. B indicate significant differences ($P < 0.05$);In Fig. C,compared with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.4 油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞炎症因子的影响

为了研究油橄榄叶提取物对细胞炎症的调节作用,将 HaCaT 细胞暴露于 LPS,诱导其产生炎症反应作为模型,并分别测定有无油橄榄叶提取物作用细胞内的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。如图 4 所示,油橄榄叶提取物浓度为 0.156 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.312 $\mu\text{g/mL}$ 时能显著降低细胞 TNF- α 因子水平,而当浓度为 0.625 $\mu\text{g/mL}$ 时 TNF- α 因子含量显著高于 LPS 对照组,可能与长时间孵育(24 h)油橄榄叶提取物导致细胞存活率降低有关。提取物在三种不同浓度下均能显著降低 IL-6 因子水平且具有浓度依赖性,IL-6 因子含量从 $266.42 \pm 16.80 \text{ pg/mL}$ 分别降至 265.76 ± 2.82 、 187.84 ± 7.56 、 $153.51 \pm 7.96 \text{ pg/mL}$ 。当浓度为 0.156 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.312 $\mu\text{g/mL}$ 时,油橄榄叶提取物对 IL-1 β 因子无明显影响,0.625 $\mu\text{g/}$

胞中无荧光的 DCFH(2',7'-二氯荧光素)氧化为具有荧光的 DCF(2',7'-二氯荧光素),表现为荧光强度随时间升高。加入不同浓度的油橄榄叶提取物后,其荧光强度随时间变化形成的动力学曲线均较 AAPH 组均有所下降,可知油橄榄叶提取物对氧化应激状态的 HaCaT 细胞均有不同程度的自由基清除能力。图 3B 为不同浓度油橄榄叶提取物测得的胞内抗氧化值,在 HaCaT 的 CAA 模型中,可见不同浓度的油橄榄叶提取物均表现出胞内抗氧化活性,且随着浓度升高 CAA 值升高,表现出一定的浓度依赖性。此外,图 3C 为油橄榄叶提取物与细胞共同作用 6 h 的胞浆自由基荧光强度,结果表明油橄榄叶提取物能够显著降低胞浆 ROS 水平。

mL 油橄榄叶提取物则能显著降低 IL-1 β 因子水平。结果表明油橄榄叶提取物能够通过调控 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子水平,来达到对 HaCaT 细胞的抗炎症作用。

2.5 油橄榄叶提取物的体外抑菌作用

油橄榄叶提取物对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 分别为 0.022 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.028 $\mu\text{g/mL}$,对大肠杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 0.120 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.126 $\mu\text{g/mL}$,对铜绿假单胞菌的 MIC 和 MBC 分别为 0.100 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.127 $\mu\text{g/mL}$ (见表 1)。研究结果显示,油橄榄提取物对金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用,而对大肠杆菌、绿脓杆菌等有较差的抑制作用。

表 2 和图 5 显示了三种不同菌株对油橄榄叶提取物表现出不同的敏感性。经测量得到金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 $13.05 \pm 0.88 \text{ mm}$,大肠杆菌

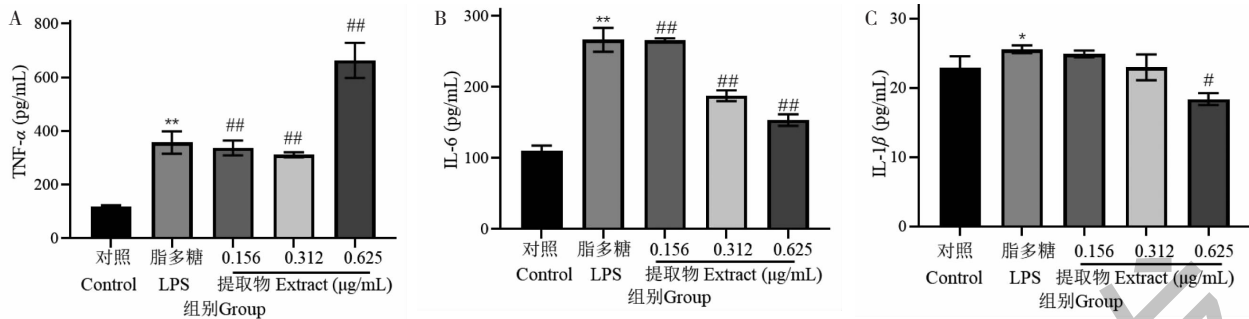


图 4 油橄榄叶提取物对 HaCaT 细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量的影响

Fig. 4 Effects of *O. europaea* leaves extract on TNF-α, IL-1β, IL-6 level in HaCaT cells

注:与对照组相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 LPS 组相比,#*P* < 0.05,###*P* < 0.01。Note:Compared with control group,**P* < 0.05,***P* < 0.01;Compared with LPS group,#*P* < 0.05,###*P* < 0.01。

琼脂培养基上测得的抑菌直径为 9.78 ± 0.42 mm,铜绿假单胞菌培养基上测得的抑菌直径为 9.9 ± 0.38 mm。按照抑菌圈直径的敏感度分级,结果表明金黄色葡萄球菌对油橄榄叶提取物为中度敏感 ($10 \leq IZD \leq 15$ mm),大肠杆菌、铜绿假单胞菌对

油橄榄叶提取物均轻度敏感 ($5 \leq IZD \leq 10$ mm)。综合上述结果,可见油橄榄叶提取物对三种病原菌均具有一定的抑菌和杀菌作用,并且对金黄色葡萄球菌的抑菌和杀菌效果最好。

表 1 油橄榄叶提取物的 MIC 和 MBC

Table 1 MIC and MBC of *O. europaea* leaves extract

菌种 Strain	MIC (μg/mL)	MBC (μg/mL)
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0.022	0.028
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0.120	0.126
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.100	0.127

表 2 油橄榄叶提取物的抑菌直径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The antimicrobial diameters of *O. europaea* leaves extract ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌种 Strain	抑菌直径 Antimicrobial diameter(mm)		
	对照组 Control	油橄榄叶提取物 <i>O. europaea</i> leaves extract	庆大霉素 Gentamicin
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	13.05 ± 0.88	20.84 ± 0.16
肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	9.78 ± 0.42	14.41 ± 0.42
绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	9.9 ± 0.38	14.94 ± 0.39

注:“-”表示没有抑菌圈。
Note:“-” means there is no inhibition zone.

3 讨论与结论

已有许多研究者报道了油橄榄叶提取物的抗氧化能力,并且发现不同提取工艺制备的样品,其抗氧化能力存在差异^[17]。然而,关于油橄榄叶提取物对不同种类自由基的抗氧化作用尚未有揭示。因此,本研究使用了肌红蛋白保护率来评估油橄榄叶提取物对不同种类自由基的抗氧化活性(次氯酸根离子、羟基自由基和过氧自由基)。在该方法中,通过

其抑制 ROS 反应引起的肌红蛋白结构变化的能力来评估不同类型自由基的抗氧化性能。该方法已被用于评估黄酮类化合物、蔬菜和豆类以及味噌等复合成分的抗氧化活性^[18]。研究结果显示油橄榄叶提取物对过氧自由基和羟基自由基引起的肌红蛋白保护率大于次氯酸根离子引起的肌红蛋白保护率。

ROS 浓度的增加导致的细胞氧化应激是皮肤细胞衰老的主要原因之一,皮肤真皮-表皮交界处的

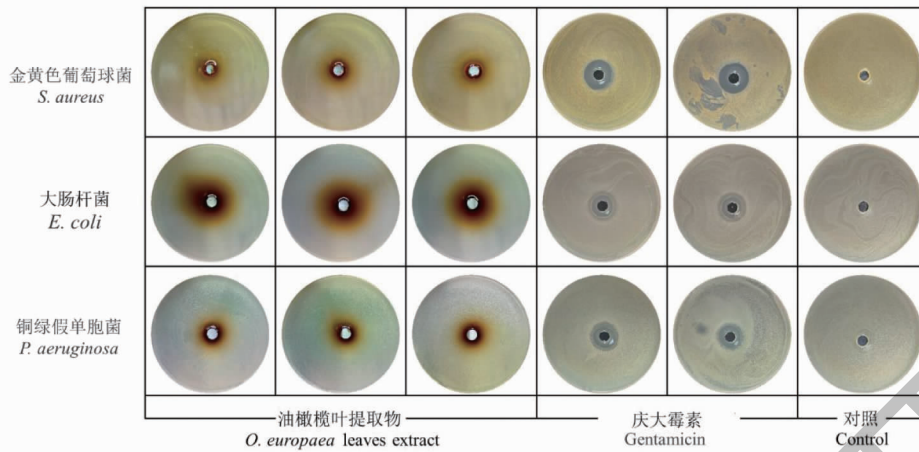


图5 油橄榄叶提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的抑菌圈

Fig. 5 Inhibition zone of *O. europaea* leaves extract against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*

扁平化、经表皮水分损失的减少、屏障功能的丧失、色素沉着的增加等症状都与之有关^[19]。人永生化角质形成细胞(HaCaT)常作为细胞模型用于皮肤氧化损伤的体外研究,维持 ROS 的平衡是减少 HaCaT 角质形成细胞氧化应激的关键策略。目前,关于诱导 HaCaT 细胞氧化损伤已有较多的研究报道,通常以中波紫外线 UVB 照射和 H₂O₂ 刺激进行造模, AAPH 诱导 HaCaT 细胞产生过氧自由基造成细胞氧化损伤的研究却鲜有报道。AAPH 作为一种水溶性自由基引发剂,它能够修饰脂质和 DNA 的烷基过氧基和烷基过氧化物。基于过氧自由基发生剂的定量细胞抗氧化活性测定法有助于检查食品抗氧化剂的生物利用度,因为它可以考虑包括细胞摄取和代谢等因素的影响。最初,胞内抗氧化能力的测定使用来自大鼠肾上腺的 PC12 细胞,后面拓展到了人肝细胞癌 HepG2 细胞、人结肠腺癌 Caco-2 细胞等^[20]。本研究利用人角质形成细胞 HaCaT,通过 CAA 法评价了油橄榄叶提取物的胞内抗氧化能力,结果显示其不仅具有 HaCaT 胞内抗氧化能力,而且呈现出剂量效应关系即提取物浓度越高胞内抗氧化能力越强。此外,0.156~0.625 μg/mL 的油橄榄叶提取物能够有效降低 HaCaT 细胞炎症模型中的 IL-6、IL-1β 因子水平,0.156~0.312 μg/mL 的油橄榄叶提取物能够降低 TNF-α 因子水平,表示油橄榄叶提取物在对皮肤细胞的氧化损伤具有良好保护作用的同时还表现出一定的抗炎作用。

植物源化合物及其提取物通常被认为具有广谱抑菌作用,并且金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌是食品和临床上比较常见的致病菌,容易

引起食物腐败变质产生不良的健康影响。许多植物源提取物的抑菌研究都应用了此类菌株,我们同样以此为对象,研究这三种菌株对油橄榄叶提取物的敏感性程度。结果显示,油橄榄叶提取物对这三种菌株均有抑制作用,并且金黄色葡萄球菌对油橄榄叶提取物最为敏感。先前的一项研究指出,油橄榄叶提取物对一些革兰氏阳性菌株(金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌)表现出抗菌活性;但是,对革兰氏阴性菌株(铜绿假单胞菌和大肠杆菌)不能抑制^[3],这与我们的结果相似。

综上所述,油橄榄叶提取物对过氧自由基、羟基自由基以及次氯酸根离子均具有抗氧化作用,其中对过氧自由基和羟基自由基的抗氧化作用效果更好。在细胞水平上,油橄榄叶提取物能够降低 HaCaT 细胞的胞浆 ROS 水平表现出较强的胞内抗氧化能力,且在一定浓度范围内(0.156~0.312 μg/mL)能够有效降低 HaCaT 炎症细胞模型的炎症因子释放(TNF-α、IL-1β 和 IL-6),明确了对氧化应激损伤的 HaCaT 细胞具有保护作用。同时,油橄榄叶提取物能够有效抑制金黄色葡萄球菌,但是大肠杆菌和铜绿假单胞菌抑制效果相对较差。该研究不仅为油橄榄叶提取物在食品工业中的抗氧化剂制备提供参考,还为防护皮肤损伤领域提供了一种可能性,但其具体的保护路径和内在调控机制仍需要进行深入研究。

参考文献

- 1 Qabaha K, Al-rimawi F, Qasem A, et al. Oleuropein is responsible for the major anti-inflammatory effects of olive leaf

- extract[J]. J Med Food,2018,21:302-305.
- 2 Vezza T, Algieri F, Rodríguez-nogales A, et al. Immunomodulatory properties of *Olea europaea* leaf extract in intestinal inflammation[J]. Mol Nutr Food Res,2017,61:1-22.
 - 3 Gaforio JJ, Sánchez-Quesada C, López-biedma A, et al. Chapter 26. Molecular aspects of squalene and implications for olive oil and the mediterranean diet[M]//Preedy VR, Watson RR. The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach. Academic Press,2015:281-290.
 - 4 Zheng J, He HR, Wang NL, et al. Study on the antioxidant activity of olive leaf extract *in vitro* and *in vivo*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:1743-1747.
 - 5 Cheurfa M, Abdallah HH, Allem R, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant properties of *Olea europaea* L. leaves from Chlef province, Algeria using *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches[J]. Food Chem Toxicol,2019,123:98-105.
 - 6 Al-attar AM, Alsalmi FA. Effect of *Olea europaea* leaves extract on streptozotocin induced diabetes in male albino rats[J]. Saudi J Biol Sci,2019,26:118-128.
 - 7 Mei M, Cai R, Yu Q, et al. Salidroside alleviates UVB-induced skin damage by inhibiting keratinocytes pyroptosis via the AQP3/ROS/GSDMD-N signaling pathway[J]. J Funct, 2023,107:105647.
 - 8 Dong LH, Luo MK, Zhang MW, et al. Protective effect of pro-cyanidins from litchi pericarp on ultraviolet B-induced oxidative damage in Hacat cells[J]. Food Sci(食品科学),2022,43:233-240.
 - 9 Shi H, Wang RC, Wu XY, et al. Protective effect of *Actinidia arguta* flavonoid on hydrogen peroxide-induced injury in HaCaT cells[J]. Food Sci(食品科学),2018,39:229-234.
 - 10 Hwang DH, Koh PO, Kang C, et al. *Rosa davurica* Pall. improves DNCB-induced atopic dermatitis in mice and regulated TNF- α /IFN- γ -induced skin inflammatory responses in HaCaT cells[J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153708.
 - 11 Xu FH, Yi XT, Zhang X, et al. Identification of anti-photoaging components of *Olea europaea* leaves based on spectrum-effect relationship[J]. J Chromatogr B,2023,1226:123807.
 - 12 Majumder D, Debnath M, Libin KVL, et al. Metabolic profiling and investigations on crude extract of *Olea europaea* L. leaves as a potential therapeutic agent against skin cancer[J]. J Funct,2019,58:266-274.
 - 13 Elnahas RA, Elwakil BH, Elshewemi SS, et al. Egyptian *Olea europaea* leaves bioactive extract: antibacterial and wound healing activity in normal and diabetic rats[J]. J Tradit Complement Med,2012,11:427-434.
 - 14 Lee YS, Ryu HW, Yang WK, et al. A combination of *Olea europaea* leaf extract and *Spirodela polyrhiza* extract alleviates atopic dermatitis by modulating immune balance and skin barrier function in a 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-induced murine model[J]. Phytomedicine,2021,82:153407.
 - 15 Elnahas RA, Elwakil BH, Elshewemi SS, et al. Egyptian *Olea europaea* leaves bioactive extract: antibacterial and wound healing activity in normal and diabetic rats[J]. J Tradit Complement Med,2021,11:427-434.
 - 16 Liu YH, McKeever L C, Malik NS. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens[J]. Front Microbiol,2017,8:113-121.
 - 17 Guo XQ, Cao M, Liang L, et al. Study on the active components and antioxidant strength of water extract from olive leaves[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2019,40:26-30.
 - 18 Morikawa M, Ando Y, Kita A, et al. Comprehensive evaluation of the antioxidant activity of miso by the myoglobin method[J]. Food Sci Technol Res,2014,20:1221-1228.
 - 19 Yue QX, Chen X, GAO JM, et al. Dendrobine protects HACAT cells from H₂O₂-induced oxidative stress and apoptosis damage via Nrf2/Keap1/ARE signaling pathway[J]. Toxicol Appl Pharm,2022,454:116217.
 - 20 Kellett ME, Greenspan P, Pegg RB. Modification of the cellular antioxidant activity(CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line[J]. Food Chem,2018,244:359-363.