# 咖啡果壳多酚的提取及抗氧化和抗炎特性

陈 誉，罗 磊，王 硕，李 森*，管 骁
（上海理工大学 健康科学与工程学院，上海 200093）

**摘要**：咖啡果壳是咖啡生产中的主要副产品，富含多酚类物质，然而目前人们对其开发利用有限。作者以咖啡果壳为原料，对其富含的多酚进行提取纯化和表征，研究其抗氧化活性，并通过建立脂多糖（lipopolysacchride，LPS）诱导的 Caco-2 细胞炎症模型来探究多酚的抗炎作用。结果显示，LX-17 大孔树脂的纯化效果优良，纯化的咖啡果壳多酚主要成分为 3，4-二羟基苯甲酸（15.78 μg/mg），绿原酸（37.85 μg/mg）和生物碱咖啡因（55.82 μg/mg）；抗氧化测定显示提取的多酚具有良好的抗氧化活性，对 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基和羟基自由基都具有极强的清除能力；在细胞炎症模型中，5~200 μg/mL 的纯化多酚均能抑制 LPS 诱导的细胞炎症因子的表达（*IL-6*、*IL-10*、*IL-1β*、*TNF-α*），为咖啡果壳多酚的提取纯化和综合利用提供了理论基础。

**关键词**：咖啡果壳多酚；提取纯化；抗氧化活性；脂多糖；抗炎特性
**中图分类号**：TS 209　**文章编号**：1673-1689(2022)08-0104-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.011

# Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Polyphenols Extracted from Coffee Cherry Husks

*CHEN Yu*, *LUO Lei*, *WANG Shuo*, *LI Sen**, *GUAN Xiao*
(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract**: As the main by-products of coffee production, coffee cherry husks are rich in polyphenols. However, its comprehensive development and utilization are limited. In this study, polyphenols in coffee cherry husks were extracted, purified and characterized. The antioxidant activity was determined. The inflammatory model of Caco-2 cell induced by lipopolysacchride (LPS) was established to explore the anti-inflammatory properties of polyphenols. The results showed that the purification effect of LX-17 macroporous resin was excellent. The main components of purified coffee cherry husks polyphenols were 3, 4-dihydroxybenzoic acid (15.78 μg/mg), chlorogenic acid (37.85 μg/mg) and alkaloid caffeine (55.82 μg/mg). The antioxidant assay showed that the extracted polyphenols exhibited good antioxidant activity and showed strong scavenging activity on DPPH, $ABTS^+$ and hydroxyl free radicals. In the inflammatory cell model, 5~200 μg/mL of purified

**收稿日期**：2022-04-11
**基金项目**：上海市国内科技合作项目（19395800200）。
* **通信作者**：李 森（1982—），女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事谷物加工与营养方面的研究。E-mail：lisen_1027@126.com

polyphenols could inhibit the expression of proinflammatory factors (*IL-6*, *IL-10*, *IL-1β* and *TNF-α*) induced by LPS. In conclusion, this study provided a good theoretical basis for the extraction, purification and comprehensive utilization of polyphenols from coffee cherry husks.

**Keywords:** polyphenols in coffee cherry husks, extraction and purification, antioxidant activity, lipopolysaccharide, anti-inflammatory properties

细胞的代谢过程中会产生大量自由基,而自由基的积累可导致细胞和组织的损伤,造成氧化应激[1]。氧化应激的水平的升高可导致慢性炎症的发生,从而导致包括癌症在内的大多数慢性疾病的发生[2]。膳食中的抗氧化剂能提供电子,中和自由基,有助于减少自由基造成的损害,维持机体平衡。因此,具有抗氧化活性的膳食功能因子的开发对于维持人体健康具有重要意义。

多酚是膳食中常见的抗氧化功能因子,具有抗氧化、抗癌、抗炎和神经保护等多种功能[3]。多酚来源广泛,在不同食品中含量及种类差异较大,且多酚的功能与其结构密切相关。咖啡是世界消费量第一的饮料,多酚含量丰富,但目前对咖啡多酚的研究多集中于咖啡豆来源的多酚。而咖啡果壳中也含有大量的多酚类化合物,研究发现咖啡果壳中多酚的质量分数为 1.8%~8.6%[4],多酚提取物中以咖啡因、绿原酸、阿魏酸、原花青素、羟基苯甲酸及其衍生物居多[5],但目前对咖啡果壳多酚的提取纯化效果有待进一步提高。朱晨薇等[6]也指出咖啡壳中存在酚类物质,但不易提取,且多酚类成分由于其结构的特殊性,目前在提取分离上还存在一定的困难。除此之外,咖啡果壳也是咖啡生产过程中的主要副产物,每生产 1 t 咖啡豆产生等量的咖啡果壳。目前对咖啡果壳的综合利用主要包括生物燃料[7]和肥料生产[8],以及酶[9]、膳食纤维[10]和生物活性化合物的提取[11]等。对咖啡果壳多酚活性的深入研究将为咖啡副产物的高值化开发提供理论依据。

脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,可激活细胞膜上表达的 toll 样受体-4(TLR-4)介导的炎症信号通路触发炎症,是常用的炎症诱导剂[12]。作者对咖啡果壳中的多酚进行提取纯化,分析其抗氧化活性,并通过 LPS 建立肠细胞炎症模型,以探究咖啡果壳多酚的抗炎作用,为深入开发咖啡副产物提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

咖啡果壳:普洱市思茅区来旺咖啡种植场;无水乙醇、没食子酸、Folin-Ciocateu 试剂、无水碳酸钠、过氧化氢、抗坏血酸、过硫酸钾、硫酸亚铁、水杨酸、三氯甲烷、异丁醇等:上海国药集团化学试剂有限公司;LX-17 大孔树脂、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、铁氰化钾、三氯乙酸(TCA):上海维塔有限公司;脂多糖(LPS):Sigma 公司,货号 L2880。DMEM 培养基、胰酶:上海生工生物工程股份有限公司;青霉素-链霉素原液(100×)、CCK-8 试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

高速多功能磨粉机:上海菲力博宝业公司;MYP11-2 磁力搅拌器:上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;TGL-25M 高速冷冻离心机:美国 ALPHA 公司;KQ-700E 型超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;RE-2000A 旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂;SCIENTZ-18N 多歧管压盖型真空冷冻干燥机:新芝冻干设备股份有限公司;Synergy HTX 多功能酶标仪:美国 Berten 公司;$CO_2$ 培养箱:PHCbi 公司;KUBOTA 5500 型号冷冻离心机:日本久保田公司;ME204E 电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HWS12 型电热恒温水浴锅:上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 咖啡果壳多酚提取物制备及纯化** 将干制的咖啡果壳用高速多功能磨粉机研磨,过 80 目筛。称取 20.00 g 粉于 1 L 烧杯中,加 1 L 水,放入转子,保鲜膜封口。磁力搅拌 0.5 h,80 ℃下浸提 2 h,8 000 r/min 下离心 15 min,弃上清液。将沉淀中加入体积分数 60%的乙醇,磁力搅拌 0.5 h,80 ℃浸提 2 h,超声 40 min,8 000 r/min 离心15 min,取上清

液。将上清液于 50 ℃下浓缩,浓缩液置于-80 ℃冰箱预冻 2 h,再冻干,得到粗多酚。

取粗多酚溶于水中,再将液体倒入活化好的 LX-17 大孔树脂(活化的大孔树脂:体积分数 95%的乙醇溶液中浸润过夜,质量分数 5%的 HCl 冲洗树脂 2 h,质量分数 5%的 NaOH 冲洗树脂 2 h)中进行静态吸附 2 h,弃滤液,清水冲洗 2 遍树脂,再用体积分数 60%的乙醇溶液解吸 2 h。将解吸液旋蒸、冻干,得到纯多酚。

**1.3.2 总酚质量分数的测定** 采用 Folin-Ciocalteau 法测总酚质量分数。将没食子酸作为标准品,用纯水配制成 0、20、40、60、80、100 μg/mL,分别吸取 1 mL 不同质量浓度的没食子酸标准溶液或待测样品溶液于试管中,依次加入 1.5 mL 福林酚试剂,1 mL 0.2 g/mL 的 $Na_2CO_3$ 溶液,蒸馏水定容至 10 mL,涡旋混匀,室温下避光静置 1 h,用酶标仪在 765 nm 处测定吸光值。做 3 次独立重复试验,以没食子酸当量(GAE)表示总酚质量分数。

**1.3.3 粗多酚的体外抗氧化活性测定**

1)DPPH 自由基清除能力测定 参考颜征等[13]的方法。取 2 mL 样品溶液和 2 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L)放入试管中,充分反应后置于阴凉避光处放置 30 min,在 517 nm 处测定其吸光值。同样方法以空白溶剂作为对照,用 VC 标准品作为阳性对照测定 517 nm 的吸光值。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \quad (1)$$

式中:$A_1$ 为 2 mL 样品溶液与 2 mL DPPH 溶液的混合溶液的吸光值;$A_2$ 为 2 mL 样品溶液与 2 mL 空白溶剂的混合溶液的吸光值;$A_0$ 为 2 mL 空白溶剂与 2 mL DPPH 溶液的混合溶液的吸光值。

2)ABTS 阳离子自由基清除能力测定 参考王萍等[14]的方法。称取 96.00 mg ABTS 于 25 mL 容量瓶中,加纯水溶解并定容;称取 6.63 mg 过硫酸钾于 10 mL 容量瓶中,加纯水溶解并定容。将配置好的 ABTS 溶液和过硫酸钾溶液等体积混合,室温下避光保存 12~16 h。用无水乙醇将混合液 $ABTS^+$稀释,使工作液在 734 nm 处的吸光值为 0.70±0.02。取 0.2 mL 不同质量浓度提取物与 3.8 mL $ABTS^+$工作液,混合均匀后室温下避光反应 6 min,于 734 nm 波长下测定吸光值。同理,以空白溶剂为参照、VC 为阳性对照,测定 734 nm 处的吸光值。

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_i-A_j}{A_0}\right)\times 100 \quad (2)$$

式中:$A_i$ 为 0.2 mL 样品溶液与 3.8 mL ABTS 与工作液的混合溶液的吸光值;$A_j$ 为 0.2 mL 样品溶液与 3.8 mL 空白溶剂的混合溶液的吸光值;$A_0$ 为 0.2 mL 空白溶剂与 3.8 mL ABTS 与工作液的混合溶液的吸光值。

3)羟基自由基清除能力测定 参考杨冰鑫等[15]的方法。取不同浓度的粗多酚样品溶液 1 mL 分别加入试管中,分别依次加入 1 mL 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液,1 mL 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液,1 mL 8.8 mmol/L $H_2O_2$。充分混匀后静置 1 h,在 510 nm 处测定吸光值。同样方法,用蒸馏水作为空白、VC 标准品作为对照在 510 nm 下测定吸光值。

$$\text{羟基自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \quad (3)$$

式中:$A_1$ 为 1 mL 样品溶液、1 mL $FeSO_4$ 溶液、1 mL 水杨酸溶液和 1 mL $H_2O_2$ 溶液的混合溶液的吸光值;$A_2$ 为 1 mL 空白溶剂、1 mL $FeSO_4$ 溶液、1 mL 水杨酸溶液和 1 mL $H_2O_2$ 溶液的混合溶液的吸光值;$A_0$ 为 1 mL 样品溶液、1 mL $FeSO_4$ 溶液、1 mL 水杨酸溶液和 1 mL 蒸馏水的混合溶液的吸光值。

**1.3.4 纯多酚的组分分析** 使用 Waters e2695 高效液相色谱仪,$C_{18}$ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流量 0.8 mL/min,进样量 10 μL,柱温 25 ℃。流动相梯度洗脱程序见表 1。

**表 1 流动相梯度洗脱程序**

**Table 1 Mobile phase gradient elution procedure**

| 时间/min | *A* 0.2%三氟乙酸-水体积分数/% | *B* 乙腈体积分数/% |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 40 | 20 | 80 |
| 42 | 0 | 100 |
| 44 | 0 | 100 |
| 44.5 | 95 | 5 |

**1.3.5 纯多酚对 LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症模型的抗炎作用**

1)细胞培养 将 Caco-2 细胞接种于含有质量分数 88%的 DMEM、10%的胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%双抗(100 mg/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素)的完全培养基中,置于瓶底面积为 25 $cm^2$ 的培养瓶中,在 37 ℃、5% $CO_2$ 及相对湿度 95%的培养箱

中单层生长,实验时取对数生长期的细胞。

2)LPS 诱导的炎症模型的建立 称取 10 mg LPS,用生理盐水定容至 100 mL,终质量浓度为 100 μg/mL,再用培养基将其稀释成 0、2.5、5、10、20、40 μg/mL,现配现用。于 96 孔板中每孔加 100 μL,种下每孔 $10^5$ 个细胞,每组 6 个复孔。待其贴壁后,分别加入不同浓度的 LPS。培养 24 h 后,每孔再加入 10 μL 的 CCK-8 溶液孵育 1 h,用酶标仪在 450 nm 下测吸光值。通过检测细胞活性,确定多酚对于 LPS 引起的炎症模型作用的诱导时间。

3)多酚处理细胞 取 0.1 g 多酚冻干粉,蒸馏水定容至 100 mL,配成 1 000 μg/mL 的母液,再用培养基稀释成 0、5、10、50、100、200、400 μg/mL 的溶液。于 96 孔板中每孔加 100 μL,种下每孔 $10^5$ 个细胞,待其贴壁后,分别加入不同质量浓度的多酚溶液。培养 24 h 后,每孔再加入 10 μL 的 CCK-8 溶液孵育 1 h,用酶标仪在 450 nm 下测吸光值。

于 96 孔板中每孔种下 5 000 个细胞,每孔 100 μL,待其贴壁,长满至 80%左右开始加样。对照组:培养基孵育 24 h;LPS 组:20 μg/mL 的 LPS 溶液孵育 24 h;LPS+多酚组:不同质量浓度的多酚溶液(0、5、10、50、100、200、400 μg/mL)孵育 12 h,再换 20 μg/mL 的 LPS 溶液孵育 24 h。

孵育结束后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液孵育 1 h,用酶标仪在 450 nm 下测吸光值。

4)QPCR 法测定细胞中 *IL-6*、*IL-10*、*IL-1β*、*TNF-α* 的 mRNA 表达 通过 MagzolTM Reagent 试剂提取总 RNA。使用 Hiscript II Q RT Supermix 将总 RNA 逆转录成 cDNA。采用 ChamQ Universal SYBY qPCR Master Mix 将 cDNA 扩增,在 Thermo Lifetech ABI QuantStudio3 仪器上进行实时荧光定量 PCR(Real-time Quantitative PCR,qPCR)分析。为了检测细胞中基因的表达情况,使用 *β-actin* 作为内参基因,$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 用于计算基因的相对表达量。引物序列见表 2。

表 2 qPCR 分析引物序列

Table 2 Primer sequences used for qPCR analysis

| 基因 | 上游引物 | 下游引物 |
|---|---|---|
| *IL-6* | AGTGAGGAACAAGCCAGAGC | CAAACTGCATAGCCACTTTCCA |
| *IL-10* | ACATCAGGGTGGCGACTCTA | ATCCCTCCGAGACACTGGAA |
| *IL-1β* | GGACAAGCTGAGGAAGATGC | TCGTTATCCCATGTGTCGAA |
| *TNF-α* | GTGCTTGTTCCTCAGCCTCT | CACCCTTCTCCAGCTGGAAG |
| *β-actin* | GATGAGATTGGCATGGCTTT | CACCTTCACCGTTCCAGTTT |

**1.3.6** *数据处理与分析* 用 Graph Pad Prism 8.0.2(美国)画图,并通过单因素方差分析(one-way ANOVA)对所有数据进行显著性分析。LPS 建模的数据使用 SPSS 19.0(美国)并用 Duncan's 多重比较检验进行分析。# 表示 Con 组与 LPS 组相比,* 表示多酚组与 LPS 组相比(其中,* 代表 $P<0.05$,** 代表 $P<0.01$,# 代表 $P<0.05$,## 代表 $P<0.01$)。

## 2 结果与分析

### 2.1 咖啡果壳多酚的制备、纯化和成分分析

用 Folin-Ciocalteau 法对总酚质量分数的检测结果显示,当没食子酸质量浓度在 0~100 μg/mL 范围内时,其质量浓度与吸光值呈线性关系。其线性回归方程为:$Y=0.006\ 240X+0.007\ 753$,相关系数 $R^2=0.999\ 3$,见图 1。经计算,咖啡果壳多酚提取液冻干后的粗多酚总酚质量分数为(92±3.4) mg/g,纯化后的咖啡果壳多酚冻干粉中的总酚质量分数为(387±5.9) mg/g。

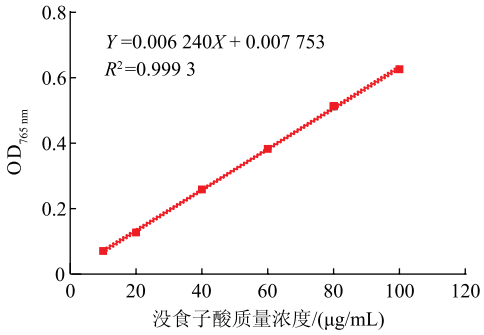



图 1 没食子酸质量浓度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of gallic acid mass concentration

相对于纯化前咖啡果壳多酚提取物,纯化后的多酚提取物中总酚质量分数明显增加,表明 LX-17 树脂的纯化方法能起到有效分离作用,与钟嘉伦

等的结果类似[16]。对纯化后的多酚进行成分分析，HPLC 图谱见图 2。纯化的咖啡果壳多酚主要成分为 3,4-二羟基苯甲酸（15.78 μg/mg），绿原酸(37.85 μg/mg)和生物碱咖啡因(55.82 μg/mg)，见表 3。与 NEMZER[17]等的研究结果一致，他们对市售咖啡果壳进行了多酚提取，发现多酚提取物中主要含有绿原酸或咖啡因；此外，还含有少量的有机酸(葡萄糖酸、苹果酸、柠檬酸、奎宁酸等)、胆碱类衍生物、泛酸、黄嘌呤和蔗糖等活性成分。

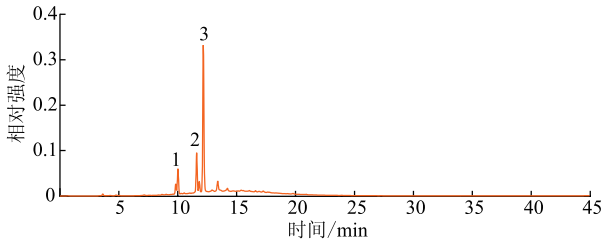



**图 2　纯化后咖啡果壳多酚的 HPLC 图(280 nm)**

**Fig. 2　HPLC diagram of purified polyph-enols from coffee cherry husks (280 nm)**

**表 3　纯化多酚的主要成分**

**Table 3　Main components of purified polyphenols**

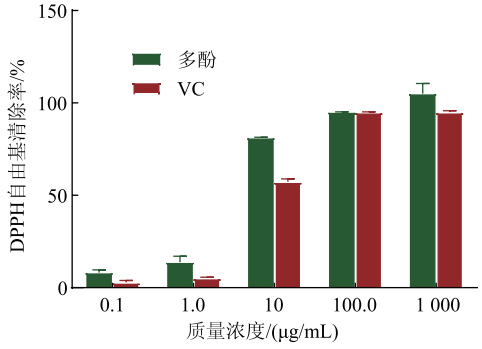
| 序号 | 时间/min | 名称 | 分子式 | 质量分数/(μg/mg) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 10.01 | 3,4-二羟基苯甲酸 | $(HO)_2C_6H_3CO_2H$ | 15.78 |
| 2 | 11.60 | 绿原酸 | $C_{16}H_{18}O_9$ | 37.85 |
| 3 | 12.17 | 咖啡因 | $C_8H_{10}N_4O_2$ | 55.82 |

## 2.2　咖啡果壳多酚的体外抗氧化活性

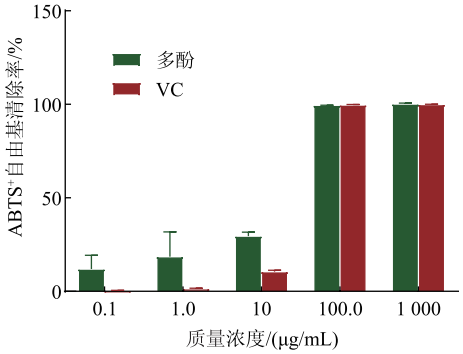
DPPH 自由基清除能力和 $ABTS^+$自由基清除能力是评价多酚抗氧化性的重要指标。当黄酮类等抗氧化性物质与 DPPH 自由基结合时会使 DPPH 溶液的吸光值不断减小[18]。从图 3(a)中可以看出，DPPH 自由基清除的能力随着多酚质量浓度的升高而逐渐增强，达到 100 μg/mL 时，清除率将近 100%；而且多酚对 DPPH 自由基的清除率与 VC 不相上下，在较低质量浓度时甚至优于 VC。经线性拟合，其 $IC_{50}$ 为 3.97 μg/mL。

对 $ABTS^+$自由基清除能力检测结果见图 3(b)。多酚和 VC 对 $ABTS^+$自由基的清除作用均呈剂量性增加，且低质量浓度时多酚的 $ABTS^+$自由基清除能力优于 VC，经线性拟合得多酚对 $ABTS^+$自由基清除率的 $IC_{50}$ 为 26.09 μg/mL。

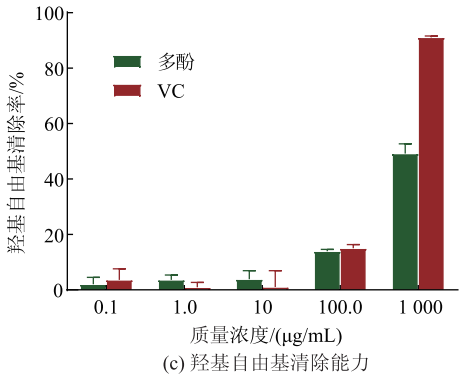
对羟基自由基清除能力的检测结果见图 3(c)。咖啡果壳多酚对羟自由基的清除能力低于 VC，$IC_{50}$ 为 543.3 μg/mL。以上结果表明，咖啡果壳多酚对 DPPH、$ABTS^+$和羟基自由基均具有良好的清除能力。朱晨薇等[6]也做过咖啡壳酚类物质的提取，其 DPPH、$ABTS^+$自由基清除能力的 $IC_{50}$ 约为 60、80 μg/mL，这也体现出 LX-17 树脂纯化效果的优良。根据对咖啡果壳多酚成分的分析，咖啡因是主要成分之一，根据 DALAL 等[19]的报道，其抗氧化机制是通过清除和修复羟基自由基来发挥作用的。活性氧失调会引发氧化损伤，而绿原酸可通过阻断 $Ca^{2+}$通道降低活性氧含量，从而减轻 LPS 诱导的 HUVEC 损伤[20]。3,4-二羟基苯甲酸(原儿茶酸)，与没食子酸、咖啡酸等其他抗氧化化合物结构相似，可以通过提供氢原子清除自由基来显示抗氧化活性[21]。




(a) DPPH自由基清除能力




(b) $ABTS^+$自由基清除能力



(c) 羟基自由基清除能力

图 3　咖啡果壳多酚体外抗氧化能力

**Fig. 3　*In vitro* antioxidant capacity of polyphenols from coffee cherry husks**

## 2.3　咖啡果壳多酚对 LPS 诱导的细胞炎症模型中细胞增殖活力的影响

为了建立 LPS 诱导的炎症细胞模型，首先研究了不同质量浓度和不同时间下 LPS 对 Caco-2 细胞增殖活力的影响。结果显示，不同质量浓度的 LPS 对 Caco-2 细胞的增殖均有抑制作用，且呈剂量依赖性，见图 4(a)。当 LPS 质量浓度为 20 μg/mL 时，细胞存活率高于 60%，而 40 μg/mL 的 LPS 使细胞存活率低于 40%(不足 $IC_{50}$)。采用单样本 T 检验，20 μg/mL LPS 处理组的细胞存活率与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)，因此选用 20 μg/mL 作为 LPS 的质量浓度。这与杨柳[22]建立的 LPS 诱导 Caco-2 细胞炎症模型的质量浓度一致。对 LPS 的处理时间进行优化，LPS 诱导细胞 12、24、36、48 h 后检测细胞活性，发现 LPS 诱导 24 h 后的细胞活力已经接近 $IC_{50}$，见图 4(b)，因此以 24 h 作为 LPS 的诱导时间。

根据以上条件建立 LPS 诱导的细胞模型，检测不同质量浓度咖啡果壳多酚对细胞增殖能力的影响。首先用不同质量浓度的多酚预处理细胞 12 h，再经过 20 μg/mL LPS 诱导 Caco-2 细胞 24 h，观察不同剂量的咖啡果壳多酚对 LPS 诱导的 Caco-2 细胞增殖的影响，结果见图 4(c)。20 μg/mL 的 LPS 可以抑制Caco-2 细胞增殖，而低剂量酚组(5、10 μg/mL)细胞的存活率与对照组相比无明显差异，并显示出多酚处理对 LPS 作用的拮抗；随着多酚处理质量浓度的升高，细胞的存活率逐渐下降，多酚处理质量浓度为 100 μg/mL 及以上时，与 LPS 组相比不再有统计学差异。

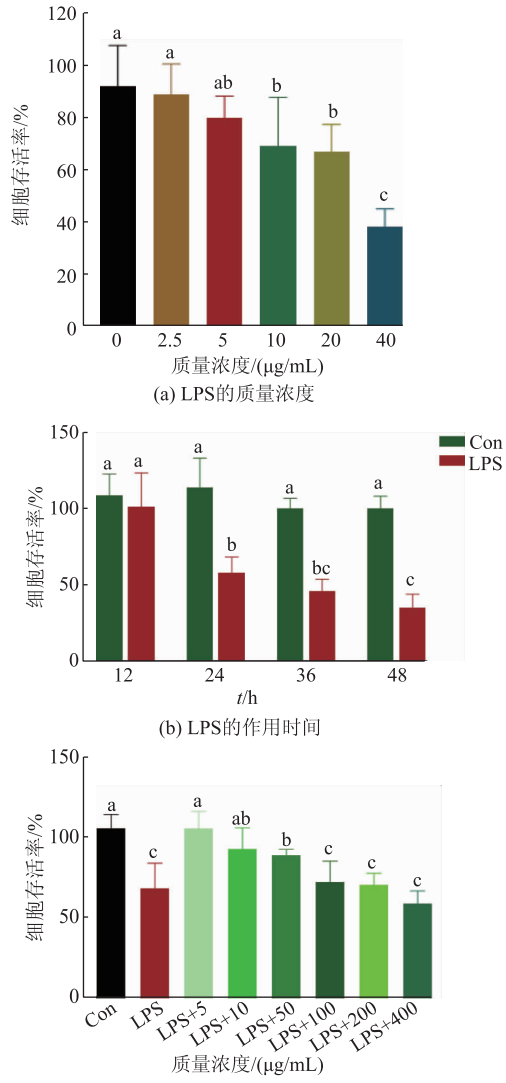



图 4　咖啡果壳多酚对 LPS 诱导的细胞炎症模型的影响

**Fig. 4　Effects of polyphenols from coffee cherry husks on the LPS-induced inflammation cell model**

## 2.4　咖啡果壳多酚对 LPS 诱导的炎症因子表达的影响

如图 5 所示，20 μg/mL 的 LPS 处理能够显著刺激 Caco-2 细胞中 *IL-6*、*IL-10*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 的 mRNA 转录。不同质量浓度的咖啡果壳多酚处理细胞后，细胞内 *IL-6*、*IL-10*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 的 mRNA 转录水平均得到显著抑制。与 LPS 模型组细胞相比，咖啡果壳多酚使 *IL-6* 和 *IL-10* 的转录水平降低至 10.6%和 4.2%；高质量浓度的咖啡果壳多酚(200 和400 μg/mL)能够分别使 *IL-1β* 的转录水平降低至32.1%和 48.0%，使 *TNF-α* 转录水平降低至 22.3%和 33.9%。以上结果表明，咖啡果壳多酚预处

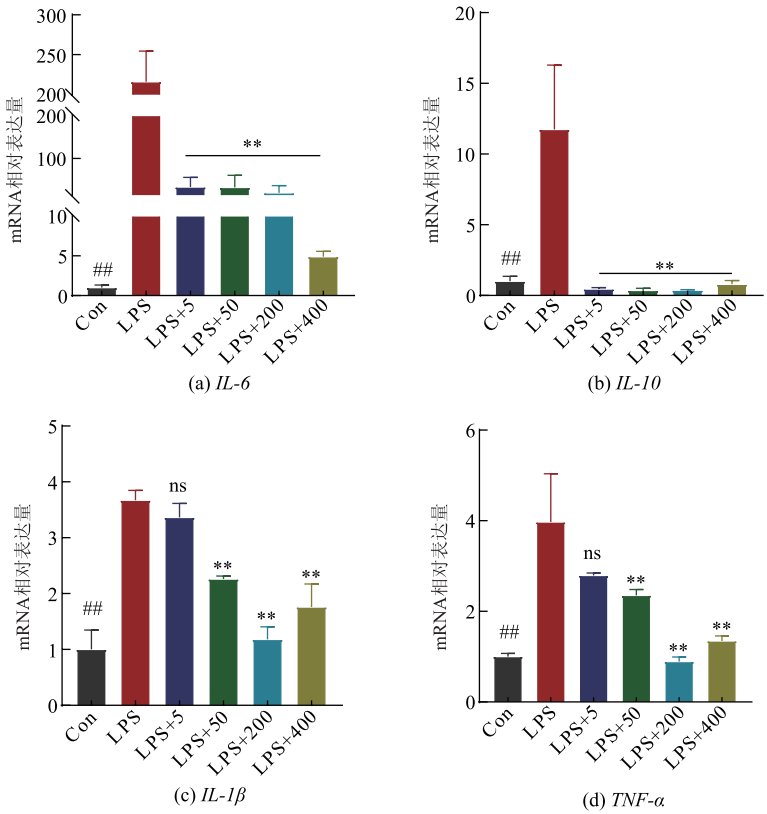



图 5 咖啡果壳多酚对 LPS 诱导的 Caco-2 细胞中炎症因子的相对表达量的影响

**Fig. 5 Effects of polyphenols from coffee cherry husks on the relative expression of inflammatory factors in LPS-induced Caco-2 cells**

理对于LPS 诱导的肠上皮细胞 Caco-2 的炎症具有明显抑制作用。根据表 3 的成分分析,咖啡果壳多酚主要含有咖啡因、绿原酸和 3,4-二羟基苯甲酸。Karuppagounder[23]发现咖啡因可通过恢复内源性抗氧化剂平衡来抑制神经炎症,Tan[24]也证实了绿原酸可通过清除自由基的作用减轻小鼠溃疡性结肠炎的炎症。因此推测咖啡果壳多酚可能通过清除自由基来降低炎症基因的表达,但发挥作用的是单一组分还是混合组分需要进一步探讨。

## 3 结 语

LX-17 大孔树脂对咖啡果壳多酚提取物具有良好的纯化效果,纯化后多酚的主要成分为 3,4-二羟基苯甲酸、绿原酸和咖啡因,能有效清除 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基及羟基自由基,具有良好的抗氧化作用。对 LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症模型的研究显示,低质量浓度的咖啡果壳多酚能够抑制 LPS 引起的细胞活力的下降,但高质量浓度多酚无显著作用;同时,咖啡果壳多酚显著抑制了 LPS 诱导的细胞中炎症因子的表达,对 Caco-2 细胞起到一定的保护作用。本研究也存在一些不足,例如起抗炎作用的对象主要来源于多酚化合物还是其中单一的组分,发挥作用的具体分子机制等需要进一步探究。

## 参考文献:

[1] KIM J H,CHOI W,LEE J H,et al. Astaxanthin inhibits $H_2O_2$-mediated apoptotic cell death in mouse neural progenitor cells via modulation of P38 and MEK signaling pathways[J]. **Journal of Microbiology & Biotechnology**,2009,19(11):1355-1363.

[2] BARTSCH H,NAIR J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer:role of lipid peroxidation,DNA damage,and repair[J]. **Langenbecks Archive of Surgery**,2006,391(5):499-510.

[3] IRIONDO-DEHOND A,APARICIO GARCÍ A N,FERNANDEZ-GOMEZ B,et al. Validation of coffee by-products as novel food ingredients[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**,2019,51:194-204.

[4] GARCIA-BLANCO T,DAVALOS A,VISIOLI F. Tea,cocoa,coffee,and affective disorders:vicious or virtuous cycle[J]. **Journal of Affective Disorders**,2017,224:61-68.
[5] JANISSEN B,HUYNH T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products:a review[J]. **Resources,Conservation and Recycling**,2018,128:110-117.
[6] 朱晨薇,李杰祎,白宇航,等. 咖啡壳酚类物质的提取与抗氧化性能分析[J]. 广州化工,2017,45(10):64-66.
[7] WOLDESENBET A G,WOLDEYES B,CHANDRAVANSHI B S. Bio-ethanol production from wet coffee processing waste in Ethiopia[J]. **SpringerPlus**,2016,5(1):1903.
[8] HACHICHA R,REKIK O,HACHICHA S,et al. Co-composting of spent coffee ground with olive mill wastewater sludge and poultry manure and effect of *Trametes versicolor* inoculation on the compost maturity[J]. **Chemosphere**,2012,88(6):677-682.
[9] BATTESTIN V,MACEDO G A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*[J]. **Bioresource Technology**,2007,98(9):1832-1837.
[10] BALLESTEROS L F,TEIXEIRA J A,MUSSATTO S I. Chemical,functional,and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin[J]. **Food and Bioprocess Technology**,2014,7(12):3493-3503.
[11] MURTHY P S,MADHAVA NAIDU M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review[J]. **Resources,Conservation and Recycling**,2012,66:45-58.
[12] PÅLSSON-MCDERMOTT E M,O'NEILL L A J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor,Toll-like receptor-4[J]. **Insect Science**,2010,113(2):153-162.
[13] 颜征,张海晖,李亚群,等. 莲子壳多酚的抗氧化活性和稳定性[J]. 中国食品学报,2019;19(12):89-95.
[14] 王萍,王宇鹤,李辉,等. 枇杷核不同极性萃取物总黄酮、总多酚含量与其抗氧化活性的相关性[J]. 化学试剂,2020;42(9):1067-1072.
[15] 杨冰鑫,刘晓丽. 余甘子总多酚的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2019,40(16):6.
[16] 钟嘉伦. 可可豆和玛咖中功效成分的提取、合成、分离技术以及理化性质研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
[17] NEMZER B,ABSHIRU N,AL-TAHER F. Identification of phytochemical compounds in coffea arabica whole coffee cherries and their extracts by LC-MS/MS[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2021,69(11):3430-3438.
[18] SÁNCHEZ-MORENO C,LARRAURI J A,SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols[J]. **Journal of the Science of Food & Agriculture**,1998,76(2):270-276.
[19] SHI X,DALAL N S,JAIN A C. Antioxidant behaviour of caffeine:efficient scavenging of hydroxyl radicals[J]. **Food and Chemical Toxicology**,1991,29(1):1-6.
[20] JUNG H J,IM S S,SONG D K,et al. Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells[J]. **BMB Reports**,2017,50(6):323-328.
[21] KAKKAR S,BAIS S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential[J]. **ISRN Pharmacology**,2014,2014:952943.
[22] 杨柳,廖巧静,郑燕芳,等. 芪药鸡金粥含药血清通过 TLR4/NF-κB 通路对 Caco-2 炎症细胞模型的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2021,16(4):653-657.
[23] KARUPPAGOUNDER S S,UTHAYTHAS S,GOVINDARAJULU M,et al. Caffeine,a natural methylxanthine nutraceutical,exerts dopaminergic neuroprotection[J]. **Neurochemistry International**,2021,148:105066.
[24] TAN S,GAO J,LI Q,et al. Synergistic effect of chlorogenic acid and levofloxacin against *Klebsiella pneumonia* infection *in vitro* and *in vivo*[J]. **Scientific Reports**,2020,10(1):20013.