

热带水果多酚提取物的抗氧化和抗增殖活性研究

李武¹, 李艳君², 杨瑞丽²

(1. 海南大学食品学院, 海南海口 570228) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为明确12种热带水果多酚提取物的总酚含量、总抗氧化能力和抗肿瘤细胞增殖活性, 分别采用Folin-Ciocalteu法确定了水果提取物的总酚含量, 采用ORAC和FRAP的方法确定了其抗氧化能力, 采用MTT的方法确定了其抗人肝癌细胞HepG₂增殖的活性。结果显示, 12种水果提取物的总酚含量为26.17~229.67 mg GAE/100 g 鲜重, 最高杨桃的总酚含量为最低鳄梨的8.78倍; ORAC和FRAP抗氧化值分别为607.05~2631.17 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重和462.12~1067.92 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重, 杨桃具有最高的ORAC和FRAP抗氧化值, 分别是最低木瓜的4.33倍和鳄梨的2.31倍; 11种水果提取物抑制肿瘤细胞HepG₂增殖的IC₅₀值为31.79~66.93 mg/mL, 抑制活性最弱木瓜的IC₅₀值为最强杨桃的2.11倍。水果提取物的总酚含量与其ORAC抗氧化值 ($R^2=0.7839$)、FRAP抗氧化值 ($R^2=0.7636$) 和抑制HepG₂细胞增殖的IC₅₀值 ($R^2=0.8847$) 之间具有显著的相关性。

关键词: 热带水果; 多酚; 抗氧化; 抗增殖

文章编号: 1673-9078(2013)10-2383-2387

Antioxidant and Antiproliferative Activities of Polyphenol Extract from 12 Tropical Fruits

LI Wu¹, LI Yan-jun², YANG Rui-li²

(1. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To evaluate the phenolic contents, antioxidant and antiproliferative activities of phenolic extracts from 12 tropical fruits, the total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity was measured with oxygen radical absorbance capacity activities (ORAC). The ferric reducing ability of plasma (FRAP), and the antiproliferative activity against human hepatoma cells (HepG₂) were analyzed by MTT assay. It was found that the total phenolic contents ranged from 26.17 to 229.67 mg gallic acid equivalents (GAE) per 100g fresh weight (FW). *Averrhoa carambola* had the highest phenolic content, being of 8.87-fold higher than *Persea americana* which had the lowest phenolic content. The ORAC and FRAP values were in the ranges of 607.05~2631.17 $\mu\text{mol TE}/100\text{g FW}$ and 462.12~1067.92 $\mu\text{mol TE}/100\text{g FW}$, respectively. *Averrhoa carambola* showed the highest ORAC value which was 4.33 times higher than *Carica papaya*, and the highest FRAP value which was 2.31 times higher than *Persea Americana*. The limits of IC₅₀ values against HepG₂ cells were from 31.79 to 66.93 mg/mL. *Carica papaya* had the lowest antiproliferative activity, with a 2.11-fold higher IC₅₀ value compared to *Averrhoa carambola* with the highest antiproliferative activity. In addition, the total phenolic contents showed significant correlations with ORAC ($R^2=0.7839$), FRAP ($R^2=0.7636$) and IC₅₀ values against HepG₂ cells ($R^2=0.8847$).

Key words: tropical fruits; polyphenol; antioxidant; antiproliferation

癌症是一类严重威胁人类健康的疾病, 全世界每年约有 760 万人死于癌症。而临床研究发现, 约有 1/3 的癌症可以通过改变饮食习惯而避免^[1]。研究证实, 增加水果、蔬菜的摄入可以降低癌症的患病风险^[2~3]。

收稿日期: 2013-05-21

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (313034), 海南大学科研启动基金项目 (KYQD1319)

作者简介: 李武 (1976-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物活性研究

通讯作者: 杨瑞丽 (1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与安全

果蔬中的多酚、多糖等植物活性成分被认为在防止癌症发生的过程中起着重要的作用, 这些植物活性成分通过改善机体氧化应激状态、调节相关基因表达、调节细胞凋亡以及免疫系统发挥保护机体的作用^[3]。

活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 是生物有氧代谢过程中产生的一类化学性质活泼的含氧代谢物。正常生理状态下, ROS通过机体酶系统和非酶系统以及膳食中的抗氧化物质共同作用得以清除并处于动态平衡状态。当这种平衡状态被打破, ROS的生成超过机体的清除能力, 将会产生氧化应激并对机体造

成损害以致引发疾病。研究证实, ROS过量生成在癌症等疾病的发生和发展过程中扮演着重要的作用^[4], 而膳食抗氧化物质在预防和阻止机体氧化应激以及其引发的相关疾病过程中起着重要的作用^[3,4]。

多酚是一类广泛存在于植物中的多元酚类化合物, 按其结构可分为酚酸、黄酮等几大类物质。作为一种重要的膳食抗氧化剂来源, 植物多酚具有防止机体氧化应激, 降低癌症、糖尿病、心脑血管等疾病患病风险的作用^[5]。水果是人体日常膳食摄入酚类物质的重要来源之一, 许多水果尤其是一些热带水果被证实含有丰富的酚类物质。但是不同种类水果的多酚含量及其生物活性可能存在较大差异。为明确几种热带水果的多酚含量及其可能的活性差异, 本文对12种热带水果的多酚含量进行了测定, 并比较了其抗氧化和抑制肿瘤细胞增殖的活性。研究结果可以为热带水果的进一步开发利用提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

Trolox (水溶性维生素 E), 2,4,6-三吡啶三吡嗪 (TPTZ), 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH), 荧光素钠 (3',6'-dihydroxyspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthene]-3-one, disodium salt, FL), 没食子酸标准品购自 Sigma-Aldrich 公司 (上海); 人肝癌细胞 HepG₂ 购自广州中医药大学免疫学教研室; DMEM 培养基干粉, 美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清, 购自杭州四季青生物工程材料公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT), 购自广州东征化玻仪器公司。

1.2 主要仪器设备

EYELA N-1100 旋转蒸发仪, 日本东京理化器械株式会社; CO₂ 细胞培养箱, MK3 型多功能酶标仪, 多功能荧光分析仪 Fluoroskan Ascent FL, 美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酚类物质的提取

挑选成熟、品种一致的 12 种水果各 2 kg, 使用蒸馏水洗净, 取可食用的果肉部分, 采用 Liu 等^[6]的方法提取: 50 g 新鲜果肉加入 200 mL 80% 预冷的丙酮, 采用飞利浦搅拌机搅拌 5 min 后, 用高速内切匀浆机均质提取 5 min, 提取液经真空抽滤得滤液。过滤后

的残渣重复提取 1 次, 合并滤液, 45 °C 减压浓缩后用蒸馏水定容至 50 mL, -20 °C 保存待测。

1.3.2 总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[6]测定各提取物的总酚含量。125 μL 稀释的提取物加入 0.5 mL 蒸馏水和 125 μL 的 Folin-Ciocalteu 试剂, 反应 6 min 后依次加入 1.25 mL 7% 的碳酸钠溶液和 1 mL 蒸馏水, 混匀, 避光反应 90 min 后于 760 nm 测定其吸光值。各提取物总酚含量以没食子酸 (GA) 为标准进行定量, 结果以每 100 g 新鲜果肉所含的没食子酸当量表示 (mg GAE/100 g)。

1.3.3 抗氧化能力的测定

1.3.3.1 氧自由基吸收能力 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) 的测定

水果提取物的 ORAC 值参考文献^[7]的方法测定。分别将待测样品和 Trolox 标准品用 75 mmol/L 的磷酸缓冲液稀释, 加入到荧光酶标板中, 每孔 20 μL, 同时加入 200 μL 0.96 μmol/L 的 FL, 37 °C 反应 20 min 后, 每孔加入 119 μmol/L 的 AAPH 20 μL, 使用荧光分析仪在激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm 连续测定各孔的荧光强度, 每 5 min 测定一次, 总测定时间为 2.5 h。通过样品和 Trolox 标准品的荧光曲线下面积计算出各样品的 ORAC 值, 结果以每 100 g 新鲜果肉中所含的 Trolox 当量 (TE) 表示 (μmol TE/100 g)。

1.3.3.2 FRAP 抗氧化能力的测定

水果提取物的 FRAP 抗氧化值参考文献^[8]的方法测定。2800 μL FRAP 工作液 (300 mmol/L 醋酸缓冲液, 10 mmol/L 的 TPTZ, 20 mmol/L 的 FeCl₃ 溶液按体积比 10:1:1 混合均匀) 中加入 200 μL 相应水果提取液或其稀释液, 37 °C 避光反应 30 min, 593 nm 测定其吸光值。各提取物的总抗氧化能力以 Trolox 为标准进行定量, 结果以每 100 g 新鲜果肉中所含的 Trolox 当量 (TE) 表示 (μmol TE/100g)。

1.3.4 抑制 HepG₂ 细胞增殖活性的测定

采用 MTT 法^[9]检测水果提取物对人肝癌细胞 HepG₂ 增殖的抑制活性。HepG₂ 细胞按 2.5×10⁴/孔接种于 96 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 8 h, 吸去培养液, 加入包含不同浓度待测提取物的培养液 100 μL。空白对照组加入 100 μL 培养液。细胞孵育 72 h 后, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL, 孵育 4 h 后, 每孔加入二甲基亚砜 100 μL, 振荡器震荡 15 min, 充分溶解结晶后, 570 nm 测定其 OD 值。肿瘤细胞增殖抑制率通过公式: 抑制率 (%) = (1 - 加药组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100% 计算。采用 SPSS 软件计算各提取物抑制 HepG₂ 细胞增殖的 IC₅₀ 值 (抑制率达到 50% 时的各提取

物的浓度)。

1.3.5 统计分析

采用SPSS 13.0统计分析软件的ANOVA方法对实验数据进行差异显著性检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著,数据表示为平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)。

2 结果与分析

2.1 总酚含量

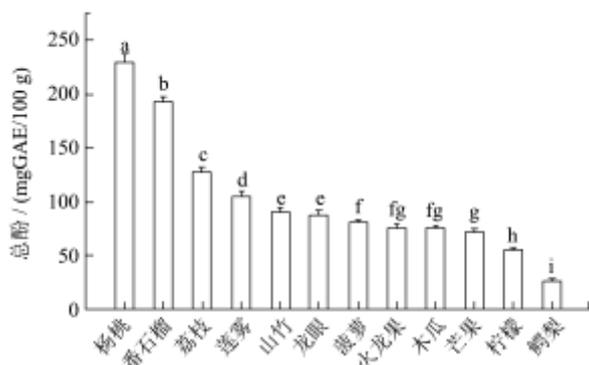


图1 12种水果提取物的总酚含量

Fig.1 The total phenolic content of extracts from 12 tropical fruits

注: 各组数据小写字母不同表示 $p < 0.05$ 。

12种水果提取物的总酚含量如图1所示,其总酚含量(单位为: mg GAE/100 g 鲜重)由高到低依次为杨桃(229.67±7.60),番石榴(192.46±6.17),荔枝(127.41±5.10),莲雾(105.76±3.76),山竹(90.32±4.17),龙眼(87.61±4.63),菠萝(80.91±1.71),火龙果(75.76±4.13),木瓜(75.61±1.76),芒果(71.65±3.17),柠檬(55.26±2.12),鳄梨(26.17±1.91)。结果显示,12种水果的总酚含量差异较大,其中,最高杨桃的总酚含量是最低鳄梨的8.78倍。在12种水果中,杨桃、番石榴和荔枝的总酚含量较高,与报道的葡萄(157~365 mg GAE/100 g 鲜重)^[10]相当;莲雾、山竹、龙眼、菠萝、火龙果、木瓜和芒果的总酚含量与报道的苹果(76~103 mg GAE/100 g 鲜重)^[6]相当。研究显示,水果的总酚含量除与其种类有关外,水果的品种、产地等因素也对其酚含量具有显著的影响,这可能是本文一些水果总酚含量的结果与其他文献报道^[11]具有一定差异的原因之一。

2.2 抗氧化能力

水果提取物的ORAC值如图2所示,12种水果的ORAC值变幅在607.05至2631.17 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重之间,由高到低(单位为: $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重)依次为杨桃(2631.17±489.79),番石榴

(1836.15±289.77),荔枝(1297.25±197.80),山竹(1112.31±189.16),柠檬(1098.02±166.79),鳄梨(917.16±161.13),莲雾(843.69±146.97),火龙果(803.33±122.33),芒果(802.33±136.15),龙眼(795.67±137.80),菠萝(761.21±121.67),木瓜(607.05±105.53)。其中,最高杨桃的抗氧化能力是最低木瓜的4.33倍。

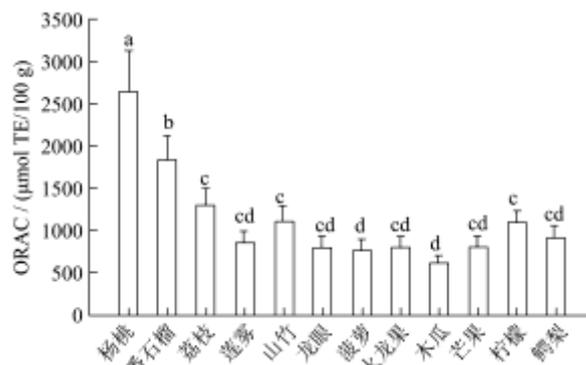


图2 12种水果提取物的ORAC抗氧化值

Fig.2 ORAC values of extracts from 12 tropical fruits

注: 各组数据小写字母不同表示 $p < 0.05$ 。

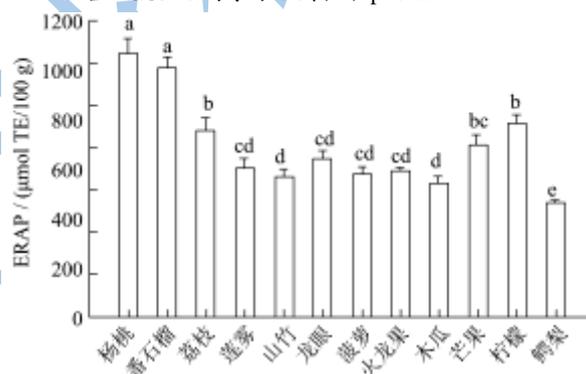


图3 12种水果提取物的FRAP抗氧化值

Fig.3 FRAP values of extracts from 12 tropical fruits

注: 各组数据小写字母不同表示 $p < 0.05$ 。

12种水果提取物FRAP值的测定结果如图3所示,其变幅在462.12至1067.92 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重之间,由高到低(单位为: $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重)依次为杨桃(1067.92±62.31),番石榴(1009.28±44.35),柠檬(783.70±37.11),荔枝(761.57±48.15),芒果(699.80±39.50),龙眼(647.66±29.16),莲雾(604.31±41.40),火龙果(591.67±18.17),菠萝(589.89±19.50),山竹(568.01±32.03),木瓜(544.39±29.09),鳄梨(462.12±12.16)。其中,最高杨桃的FRAP抗氧化能力是最低鳄梨的2.31倍。

抗氧化能力的结果显示,12种热带水果提取物的抗氧化活性差异较大,其中一些水果具有较高的抗氧化活性,如杨桃和番石榴的ORAC值高于葡萄(1759 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重)^[11];荔枝、山竹和柠檬的ORAC

值与柚子 (1076 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重)^[11]的ORAC值相当。这些结果表明,一些热带水果是较好的天然抗氧化物质来源和潜在的功能性食品开发来源。同时,从图2和图3的结果可以发现,采用ORAC和FRAP法测定的水果抗氧化能力之间存在一定的差异,这一结果与其他研究者的报道相类似^[12],不同方法测定抗氧化活性的差异与方法本身的测定原理以及不同抗氧化物质的结构与性质等因素有关^[13]。在本实验中,虽然使用两种方法测定水果的抗氧化活性强弱的顺序存在一定差异,但是相关性分析的结果(表1)显示,12种水果的ORAC值和FRAP值之间存在显著的相关性($R^2=0.7806$, $p<0.05$);且两者与水果的总酚含量之间均呈现显著的正相关,相关系数分别为0.7839 ($p<0.05$)和0.7636 ($p<0.05$)。这一结果表明,多酚可能是被检测水果中的一种主要的抗氧化物质。在12种水果之中,除山竹、柠檬和鳄梨外,其他水果的ORAC抗氧化值与其多酚含量之间的比值在3~15之间(图1;图2),这一结果与其他研究者的报道相一致^[11]。

2.3 抑制肝癌细胞 HepG₂ 增殖的作用

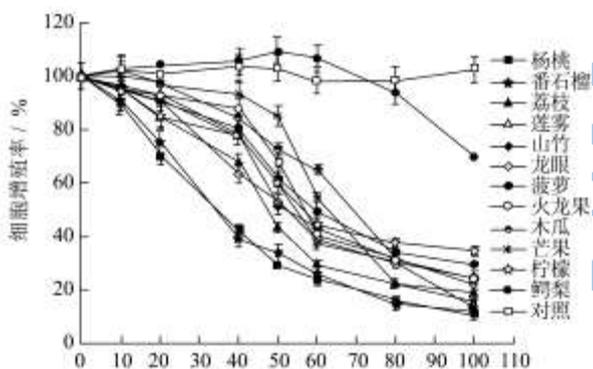


图4 12种水果提取物对HepG₂细胞增殖的抑制作用

Fig.4 Antiproliferation effect of extracts from 12 tropical fruits against HepG₂ cells

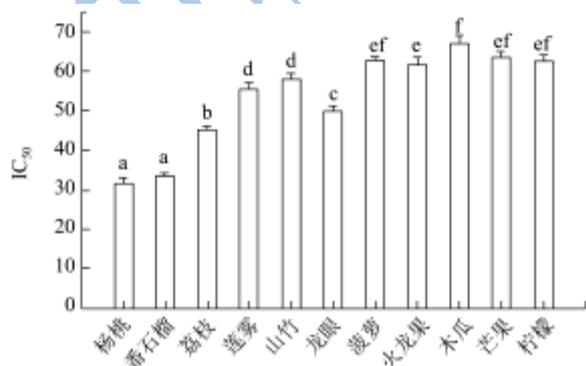


图5 水果提取物抑制HepG₂细胞增殖的IC₅₀值

Fig.5 IC₅₀ values of antiproliferative activity against HepG₂ cells of extracts from tropical fruits

注: 各组数据小写字母不同表示 $p<0.05$

图4和图5分别显示了水果提取物对人肝癌细胞HepG₂增殖的抑制活性和其IC₅₀值。图4的结果显示,在100 mg/mL的浓度范围内,12种水果提取物对HepG₂细胞均具有一定的抑制活性,并呈现一定的剂量关系。其中,杨桃(31.79 \pm 1.12 mg/mL),番石榴(33.60 \pm 0.76 mg/mL),荔枝(45.12 \pm 0.89 mg/mL)和龙眼(49.87 \pm 1.17 mg/mL)对HepG₂细胞具有较强的抑制活性,其IC₅₀值均小于50 mg/mL(图5);其他水果提取物抑制HepG₂细胞增殖的IC₅₀值由小到大依次为莲雾(56.08 \pm 1.11 mg/mL),山竹(57.94 \pm 1.39 mg/mL),火龙果(61.62 \pm 1.62 mg/mL),柠檬(62.59 \pm 1.57 mg/mL),菠萝(62.69 \pm 0.91 mg/mL),芒果(63.66 \pm 0.98 mg/mL),木瓜(66.93 \pm 1.81 mg/mL)。其中,抑制活性最弱木瓜的IC₅₀值为最强杨桃的2.11倍。在本实验的浓度范围内,未能确定出鳄梨提取物抑制HepG₂细胞增殖的IC₅₀值。

表1 12种水果的总酚含量与抗氧化能力和抑制HepG₂细胞增殖IC₅₀值的相关性分析

Table 1 Correlation analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and IC₅₀ values against HepG₂ cells

	ORAC	FRAP	抑制HepG ₂ 细胞增殖的IC ₅₀ 值
总酚含量	0.7839 ^{a*}	0.7636 [*]	0.8847 ^{a*}
ORAC	-	0.7806 [*]	0.7721 ^{a*}
FRAP	-	-	0.7301 ^{a*}

注: a, 相关系数R²; *表示 $p<0.05$ 。

相关性分析的结果显示(表1),水果提取物抑制HepG₂细胞增殖的IC₅₀值与其总酚含量之间存在显著的相关性($R^2=0.8847$, $p<0.05$)。同时,分析图1和图5的数据显示,水果的总酚含量与其抗肿瘤细胞增殖活性强弱的顺序存在一定的差异,如龙眼的总酚含量显著低于莲雾($p<0.05$),与山竹相当,但是龙眼抑制HepG₂细胞增殖的活性却显著强于莲雾和山竹($p<0.05$);柠檬的多酚含量显著低于菠萝、火龙果、木瓜和芒果($p<0.05$),但是柠檬抑制HepG₂细胞增殖的活性与这些水果之间却没有显著差异($p>0.05$)。这些结果表明,除总酚含量以外,存在其他因素影响水果的体外抗肿瘤活性,如多酚的组成或是水果中的其他植物化学成分影响其提取物对HepG₂细胞的抑制活性。同时,水果多酚在体内的抗肿瘤活性还取决于其生物利用率等因素^[14]。所以,不同水果多酚的抗肿瘤活性及其作用机制还需进一步研究。

3 结论

3.1 12种热带水果的总酚含量为26.17~229.67 mg GAE/100 g鲜重, 其中, 最高杨桃的总酚含量是最低鳄梨的8.78倍; ORAC和FRAP抗氧化值分别为607.05~2631.17 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重和462.12~1067.92 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ 鲜重; 在100 mg/mL的浓度范围内, 水果提取物对人肝癌细胞HepG₂表现出一定的抑制活性, 并呈现剂量关系, 提取物抑制HepG₂增殖的IC₅₀值为31.79~66.93 mg/mL。

3.2 12种热带水果的总酚含量与其ORAC和FRAP抗氧化值之间具有显著的相关性, 相关系数分别为0.7839和0.7636; 水果的总酚含量与其抑制HepG₂细胞增殖的IC₅₀值之间具有显著的相关性, 相关系数为0.8847。表明多酚是水果中一种重要的抗氧化和抗肿瘤活性物质。

参考文献

- [1] Liu R H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(S1): A18-A25
- [2] Reiss R, Johnston J, Tucker K, et al. Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(12): 4421-4427
- [3] Liu R H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action [J]. Journal of Nutrition, 2004, 134(12): 3479S-3485S
- [4] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84
- [5] Pandey K B, Rizvi S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009, 2(5): 270-278
- [6] Wolfe K, Wu X Z, Liu R H. Antioxidant activity of apple peels [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(3): 609-614
- [7] White B L, Howard L R, Prior R L. Polyphenolic composition and antioxidant capacity of extruded cranberry pomace [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 4037-4042
- [8] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6-7): 669-675
- [9] Selvakumaran M, Pisarcik D A, Bao R, et al. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines [J]. Cancer Research, 2003, 63(6): 1311-1316
- [10] Meng J F, Fang Y L, Qin M Y, et al. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China) [J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2049-2056
- [11] Isabelle M, Lee B L, Lim M T, et al. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore [J]. Food Chemistry, 2010, 123(1): 77-84
- [12] Judprasong K, Charoenkiatkul S, Thiyajai P, et al. Nutrients and bioactive compounds of Thai indigenous fruits [J]. Food Chemistry, 2013, 140(3): 507-512
- [13] Apak R, Gorinstein S, Bohm V, et al. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) [J]. Pure and Applied Chemistry, 2013, 85(5): 957-998
- [14] Asensi M, Ortega A, Mena S, et al. Natural polyphenols in cancer therapy [J]. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2011, 48(5-6): 197-216