

亮叶杨桐叶中酚类物质的抗氧化和抗 HepG2 细胞增殖作用

陈永生¹, 扶雄¹, 周林^{1,2}, 游丽君¹, 刘瑞海³

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)(2. 广东药学院生命科学生物制药学院, 广东广州 510006)
(3. 康奈尔大学食品科学系, 纽约伊萨卡 14853-7201)

摘要: 研究春秋两个季节亮叶杨桐叶中酚类物质体外抗氧化活性及对 HepG2 细胞的抗增殖作用。采用福林酚法、硼氢化钠/四氯苯醌比色法、超氧自由基吸收能力 (ORAC)、超氧自由基清除能力 (PSC)、细胞抗氧化法 (CAA) 和亚甲基蓝染色法分析游离态/结合态多酚含量、游离态/结合态黄酮含量、游离态/结合态提取物胞外抗氧化能力、游离态提取物胞内抗氧化能力和游离态提取物对 HepG2 细胞的抗增殖作用。秋季亮叶杨桐叶中游离态酚、游离态黄酮含量高, 分别是 142.69 ± 0.58 mg GAE/g DW 和 112.98 ± 0.37 CE/g DW; 游离态提取物超氧自由基吸收能力强、超氧自由基清除能力强和细胞抗氧化能力强, 分别是 1723.08 ± 109.27 μ mol TE/g DW、 24.07 ± 1.98 μ M VCE/g DW 和 900.84 ± 2.68 μ mol QE/100 g; 游离态提取物对 HepG2 细胞的抗增殖作用强, EC_{50} 值为 4.30 mg/mL。亮叶杨桐叶富含酚类物质, 特别是秋季亮叶杨桐叶是一种新型的天然抗氧化剂的原料, 可进一步开发。

关键词: 亮叶杨桐; 抗氧化; 抗增殖; 植物化学物; 酚类物质

文章编号: 1673-9078(2016)8-14-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.003

Antioxidant Activity of the Phenolics from *Adinandra nitida* Leaves and Their Antiproliferative Effect on HepG2 Cells

CHEN Yong-sheng¹, FU Xiong¹, ZHOU Lin^{1,2}, YOU Li-jun¹, LIU Rui-hai³

(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.School of Bioscience and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)
(3.Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY 14850-7201, USA)

Abstract: The antioxidant activity of phenolic compounds from *Adinandra nitida* leaves collected in spring and fall and their antiproliferative effects on HepG2 cells were studied. The free/bound polyphenolic contents and free/bound flavonoid contents in *Adinandra nitida* leaves were investigated by the Folin reagent method and sodium borohydride/chloranil-based assay (SBC), respectively. The *in vitro* antioxidant activities of free/bound phytochemicals in the extracts and the *in vivo* antioxidant activities of free phytochemicals in the extracts were measured through oxygen radical absorbance capacity (ORAC), peroxy radical scavenging capacity (PSC), and cellular antioxidant activity (CAA) assays. The antiproliferative effect of free phytochemicals from *Adinandra nitida* leaf extracts was measured by the methylene blue colorimetric method. The free phenolic content and free flavonoid content from autumn *Adinandra nitida* leaves were high, and the values were 142.69 ± 0.58 mg GAE/g DW and 112.98 ± 0.37 CE/g DW, respectively. The ORAC, PSC, and CAA of free phytochemicals from leaf extracts were relatively strong, and the values were 1723.08 ± 109.27 μ mol TE/g DW, 24.07 ± 1.98 μ M VCE/g DW, and 900.84 ± 2.68 μ mol QE/100 g, respectively. The free phytochemicals from autumn *Adinandra nitida* leaves showed a strong antiproliferative effect on HepG2 cells, with a half maximal effective concentration (EC_{50}) value of 4.30 mg/mL. *Adinandra nitida* is rich in phytochemicals, and especially, autumn *Adinandra nitida* leaves are a new raw material for natural antioxidants.

Key words: *Adinandra nitida*; antioxidant; antiproliferative; phytochemicals; phenolics

收稿日期: 2015-09-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2014A030313242); 广东省科技计划项目 (2013B090700008); 广州市科技计划项目 (2013J4500036); 广东省科技计划项目 (2012B050500003); 广东省领军人才项目 (刘瑞海); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (D2155140)

作者简介: 陈永生 (1985-), 男, 博士, 研究方向: 食品营养

通讯作者: 游丽君 (1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养与健康

植物化学物是植物体内非营养类次级代谢产物,对营养健康、降低慢性病的发生有良好的预防保健作用^[1]。多酚、黄酮是常见的植物化学物,在茶、水果、谷物、豆类等植物中广泛存在。多酚、黄酮主要以游离态形式存在,部分与蛋白质、纤维素、多糖通过氢键、疏水键相结合。在植物组织中多酚、黄酮的存在形式和含量有差异,且随着生长阶段、季节、天气的变化,各组织中的形式和含量也发生着相应的改变。不同季节植物体内植物化学物大分子物质和小分子物质间的转化可影响人体的消化吸收,研究人员已经开始关注不同季节植物体内化学物的组成、含量及生物利用率变化,旨在有效的利用植物化学物。如 Sharpe 等^[2]研究发现从春、秋季节采摘的茶叶按照日常饮茶方法浸泡,采用 ORAC 方法和 NanoCerac 方法检测发现浸泡液的抗氧化能力受季节的影响。

亮叶杨桐叶在华南地区以石崖茶的形式消费,有着数百年的代茶历史,主要产于广西境内,平南县、金秀县、桂平市、昭平县等地。目前,亮叶杨桐已被人工驯化,且人工种植量不断增加。传统认为石崖茶饮用后具有清爽止渴、排腻解闷、饮后回甜的特色,还具有抗菌、抗氧化、降血压及止痛等生物活性^[3-4],引起了研究人员的广泛关注。Liu 等^[5]采用超声辅助提取从亮叶杨桐叶中提取黄酮,经鉴定发现主要黄酮类成分是山茶苷 A。芹菜素具有多种生理活性,刘本国等^[6]加热酸解的方法从亮叶杨桐叶中提取芹菜素。Gao 等^[3]发现从亮叶杨桐叶中提取纯化的山茶苷 A 对 HepG2 细胞和 MCF-7 细胞有抗增殖作用。然而,围绕着不同季节亮叶杨桐叶内含植物化学物的特性研究鲜有报道,本研究对春秋两个季节亮叶杨桐叶中游离态、结合态植物化学物的含量、胞内/胞外抗氧化活性及对 HepG2 细胞的抗增殖作用进行了测定,以期有助于挖掘山区资源特色农产品,为亮叶杨桐的深度开发提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与设备

1.1.1 试剂

2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, ABAP), Trolox, 没食子酸、Folin-Ciocalteu、儿茶素水合物、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA), 三种复合抗生素,购自 Sigma-Aldrich 公司; WME 培养基、Hank's 平衡盐溶液(HBSS)、表皮生长因子、肝素、胰岛素和其他细胞培养试剂购

自 Gibco 生物科技公司;胎牛血清(FBS),购自浙江天杭生物科技有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Filter Max F5 型多功能荧光/化学分析仪,美国 Molecular Devices 公司;高效液相色谱仪(SunFireC 18 分析柱, Waters 1525 泵, Waters 2998 双波长检测器以及 2707 自动进样器),美国 Waters 公司;DU 730 紫外-可见分光光度计,美国 BECKMAN 公司;G 3 型真空旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司;Centrifuge 5424R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;CKX41 倒置显微镜,日本 OLYMPUS;二氧化碳培养箱,美国 Thermo Scientific 公司;T 25 高速均质机,德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 材料准备

春季(四月)和秋季(九月)亮叶杨桐叶采摘于顶芽、一芽三叶且均采摘于广西省十万大山,采摘后电风扇吹干密封袋密封置于-25℃冰箱中保存。

1.2.2 游离态酚类化合物提取

亮叶杨桐叶中游离态酚类化合物提取采用预冷丙酮提取法^[7]。称取 2 g 样品,选择样品为一芽两叶,加入预冷的 80%丙酮溶液 150 mL 进行搅拌 3 min;倒入高脚杯中用均质机中提取 3 min,混合液真空抽滤;收集滤渣用预冷的 80%丙酮再次提取 3 min,然后真空抽滤,重复三次。收集过滤液在 45℃条件下旋转蒸发至总体积的 10%。用超纯水溶解,定容至 10 mL,分装并储存于-40℃直至检测。

1.2.3 结合态酚类化合物提取

亮叶杨桐叶中结合态酚类化合物的提取采用氢氧化钠消化法^[7]。结合态酚类物质的提取用游离态酚类化合物提取后的残渣进行提取。室温下向残渣中加入 4 M 氢氧化钠溶液 20 mL,在静态混合仪上 60 r/min 处理 1 h;混合液用浓盐酸调整 pH 值为 2,加入乙酸乙酯萃取后 3500 r/min 离心 5 min,收集乙酸乙酯部分,重复操作至乙酸乙酯相澄清无色。收集到的乙酸乙酯相在 45℃条件下旋转蒸发至干,用超纯水定容至 10 mL。提取液分装并储存于-40℃备用。

1.2.4 总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu 比色法进行总酚含量的测定^[8]。样品稀释液和 Folin-Ciocalteu 反应后,加入碳酸钠终止反应,室温下放置 90 min 后,用分光光度计检测 760 nm 下的吸光度。总酚含量以每克干重没食子酸毫克当量(mg GAE/g DW)表示。

1.2.5 总黄酮含量测定

每个样品的总黄酮含量采用硼氢化钠/四氯苯醌(SBC)比色法^[9]。提取物用氮气吹干,加入1 mL 四氢呋喃/无水乙醇混合液溶解样品,分别加入硼氢化钠和三氯化铝溶液室温下振荡反应30 min,再次加入硼氢化钠溶液室温下振荡反应30 min;加入预冷的冰醋酸,避光振荡反应15 min;加入四氯苯醌溶液,在99 °C下加热反应60 min,冷却后甲醇定容到4 mL;加入香草醛混匀后,加入浓盐酸,避光振荡反应15 min。反应液3500 r/min离心5 min,取上清液检测490 nm处吸光值。总黄酮含量以每克干重儿茶素毫克当量(mg CE/g DW)表示。

1.2.6 吸收过氧自由基能力测定(ORAC)

采用李武等^[10]报道的ORAC方法分析吸收过氧自由基能力。样品用磷酸盐缓冲液稀释,加入到96孔板中在37 °C下孵育10 min;加入荧光素钠盐,37 °C孵育20 min后加入ABAP激发液,利用荧光酶标仪(激发光485 nm,吸收光525 nm)测定反应值动力变化。ORAC值以每克干重Trolox定量表示。

1.2.7 清除过氧自由基能力分析(PSC)

参考Chen报道的方法并稍作修改^[11]。样品用磷酸盐缓冲液稀释成梯度溶液,加入96孔板;DCFH-DA用氢氧化钾溶液水解避光放置5 min,然后用磷酸盐缓冲液定容到5 mL,加入到96孔板中,再加入新鲜配置的ABAP磷酸盐溶液。将96孔板放入到荧光酶标仪(激发光485 nm,吸收光525 nm)中进行测定,样品清除过氧自由基能力用每百克干重样品中维生素C的定量表示。

1.2.8 细胞培养

HepG2细胞在WME培养基(5% FBS、10 mM Heps、2 mM 谷氨酸盐、5 μg/mL 胰岛素、1%复合抗生素)中生长,于37 °C、5% CO₂条件下进行培养。

1.2.9 细胞抗氧化(CAA)

采用HepG2细胞模型进行细胞内抗氧化活性实验^[8],实验步骤简要描述如下: HepG2细胞接种在96孔板上,培养24 h后吸取出培养基,用PBS冲洗每个接种孔,然后加入100 μL样品处理液。继续在培养箱中培养1 h,取出96孔板,吸出样品处理液,用100 μL PBS清洗每个孔,吸出PBS加入100 μL的含有ABAP的HBSS新鲜溶液,将96孔板放入到荧光酶标仪(激发光485 nm,吸收光525 nm)中进行扫描每5 min扫描一次共1 h。细胞抗氧化值以每百克干重样品中槲皮素摩尔当量表示。

1.2.10 细胞抗增殖和细胞毒性测定

细胞抗增殖和细胞毒性实验采用亚甲基蓝染色法^[11]。将HepG2细胞接种到白色96孔板上,抗增殖实

验细胞数为 2.5×10^4 个/孔、细胞毒性实验细胞数为 4×10^4 个/孔,待细胞贴壁生长后(抗增殖实验4 h、细胞毒性24 h)吸取出培养基加入100 μL含有不同样品浓度的培养基溶液,37 °C、5% CO₂条件下培养(抗增殖实验72 h、细胞毒性实验24 h)后,吸取出溶液,用PBS清洗后加入50 μL亚甲基蓝染色液,置于37 °C培养箱中培养1 h后,去除染色液,96孔板浸入清水中清洗6次。甩干细胞培养板中的水,每孔加入100 μL的洗脱缓冲液,在平板振荡器上振荡20 min后,用酶标仪检测570 nm下每孔的吸光值,比较不同浓度下提取物与对照组的差异。

1.3 数据处理

采用Sigmaplot绘图,用CalcuSyn1计算EC₅₀值,方差分析用SPSS 13.0统计分析软件包。每个样品至少做三次重复,实验结果以平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 植物化学物含量

2.1.1 多酚含量

酚类物质是一大类物质,包含酚酸、黄酮类物质等,迄今为止,被分离、鉴定出来的酚类物质超过5000种,并且这个数字随着研究技术的发展也在不可预知的增长^[12]。我们日常饮食中的茶、蔬菜和水果富含酚类物质,酚类物质有助于降低慢性病的发生。亮叶杨桐叶在我国华南地区有着保健茶和中草药的用途,有研究报道,亮叶杨桐叶是富含酚类物质的植物资源^[3,7,13]。本文首次报道春秋季节亮叶杨桐叶中游离态和结合态酚类物质含量,由图1可知,秋季亮叶杨桐叶游离态多酚和总酚含量分别是(142.69±0.58、143.06±0.58 mg GAE/g DW),显著高于春季亮叶杨桐叶中游离态多酚(4.70±0.04 mg GAE/g DW)和总多酚含量(6.87±0.03 mg GAE/g DW)($p < 0.05$);另外,春季和秋季亮叶杨桐叶中游离态酚类物质都比结合态酚类物质含量高数据差异显著($p < 0.05$)。秋季亮叶杨桐叶中结合态多酚的含量(0.37±0.02 mg GAE/g DW)在所有检测样品中含量最低。两个季节间的总多酚含量差异显著($p < 0.05$),相似的是,Brasileiro等^[14]也发现不同的采摘季节对棱轴土人参中总多酚含量有显著性影响。

本文测定了春季和秋季亮叶杨桐叶中游离态和结合态黄酮含量,由图2可知,秋季亮叶杨桐叶游离态黄酮和总黄酮含量分别是(112.98±0.37、113.40±0.37

mg CE/g DW), 显著高于春季亮叶杨桐叶中游离态黄酮(3.06±0.031 mg CE/g DW)和总黄酮含量(6.53±0.05 mg CE/g DW) ($p < 0.05$), 两个季节间的游离态黄酮和总黄酮含量差异显著 ($p < 0.05$)。秋季亮叶杨桐叶中游离黄酮含量显著高于结合态黄酮含量, 差异显著 ($p < 0.01$); 然而, 春季亮叶杨桐叶中结合态黄酮含量略高于游离态黄酮含量, 差异不显著; 秋季亮叶杨桐叶中结合态黄酮的含量在所有检测样品中最低(0.43±0.04 mg CE/g DW)。

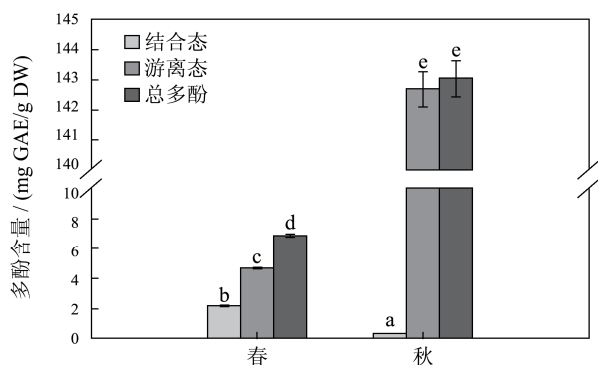


图1 不同季节多酚的含量 (mean±SD, n=3)

Fig.1 Phenolic content of *Adinandra nitida* leaves collected in different seasons (mean ± SD, n = 3)

注: 图上标注不同的字母表示两组数据间差异显著 ($p < 0.05$)。

2.1.2 黄酮含量

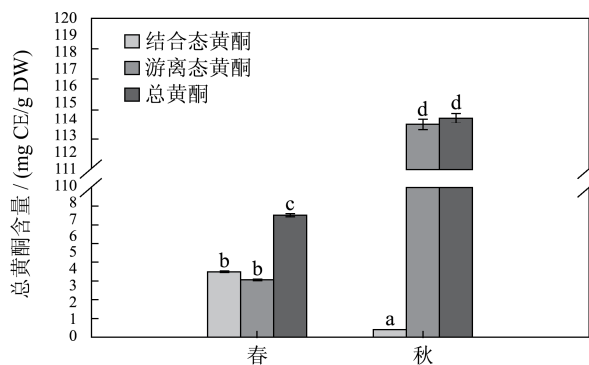


图2 不同季节总黄酮的含量 (mean±SD, n=3)

Fig.2 Total flavonoid content of *Adinandra nitida* leaves collected in different seasons (mean ± SD, n = 3)

注: 图上标注不同的字母表示两组数据间差异显著 ($p < 0.05$)。

2.1.3 黄酮占多酚的比例

黄酮占多酚的比例是以黄酮、多酚含量的摩尔量为基础进行计算得到的。春季亮叶杨桐叶中结合态黄酮占结合态多酚的比例(93.54±2.4%)在所有样品中最高(图3), 说明春季亮叶杨桐叶结合态提取物中主要成分是黄酮类物质; 秋季亮叶杨桐叶中结合态黄酮占结合态多酚的比例(68.27±0.72%)在所有样品中排

第二位。春季亮叶杨桐和秋季亮叶杨桐叶游离态提取物中黄酮占多酚的比例都小于50%, 说明亮叶杨桐叶游离态提取物中大部分成分为非黄酮类化合物; 秋季亮叶杨桐叶游离态黄酮占多酚的比例和总黄酮占总多酚的比例无显著差异 ($p > 0.05$)。

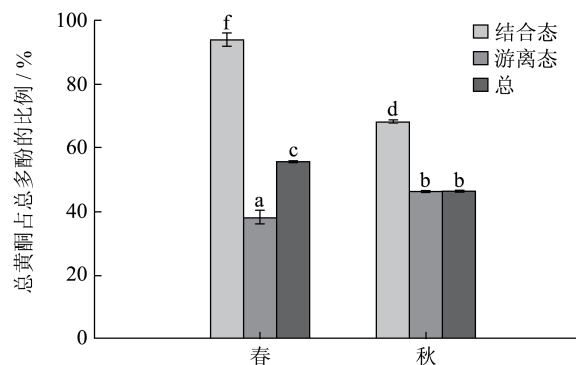


图3 黄酮占多酚的比例

Fig.3 Ratio of flavonoids to phenolics. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

注: 图上标注不同的字母表示两组数据间差异显著 ($p < 0.05$)。

春季和秋季亮叶杨桐叶中多酚、黄酮含量的差异可能是因为温度和天气潮湿等因素影响亮叶杨桐代谢作用, 春季亮叶杨桐叶中多酚、黄酮等次级代谢产物代谢积累量低, 即亮叶杨桐属性和外部环境因素的交互作用影响了酚类化学物在亮叶杨桐体内的生物合成。

2.2 胞外抗氧化活性

不同季节亮叶杨桐叶的抗氧化能力存在差异(图4a), 秋季亮叶杨桐叶游离态多酚、总多酚的氧自由基吸收能力最强, 分别是 $1723.08 \pm 109.27 \mu\text{mol TE/g DW}$ 、 $1728.78 \pm 108.91 \mu\text{mol TE/g DW}$; 春季亮叶杨桐叶游离态多酚、总多酚的氧自由基吸收能力次之, 秋季亮叶杨桐叶结合态多酚的氧自由基吸收能力最弱; 秋季亮叶杨桐叶游离态多酚、总多酚的氧自由基吸收能力和春季亮叶杨桐叶中游离态多酚、总多酚的氧自由基吸收能力相比差异显著 ($p < 0.05$)。

由图4b)知, 游离态多酚、总多酚的氧自由基清除能力秋季杨桐叶最强, 分别是 $24.07 \pm 1.98 \mu\text{M VCE/g DW}$ 、 $24.33 \pm 1.99 \mu\text{M VCE/g DW}$; 春季亮叶杨桐叶总氧自由基清除能力次之, 秋季亮叶杨桐叶结合态氧自由基清除能力最弱; 秋季亮叶杨桐叶游离态多酚、总多酚的氧自由基清除能力和春季亮叶杨桐叶游离态多酚、总多酚的氧自由基清除能力差异显著 ($p < 0.05$)。

秋季亮叶杨桐叶具有较强的吸收氧自由基清除能力(ORAC)和较强的清除氧自由基的能力(PSC),

另外 Liu 等^[15]采用甲醇溶液从亮叶杨桐叶中获得提取物, 通过 DPPH 法也证明其对自由基有清除能力, 充分说明亮叶杨桐中含有具有清除自由基的活性成分。

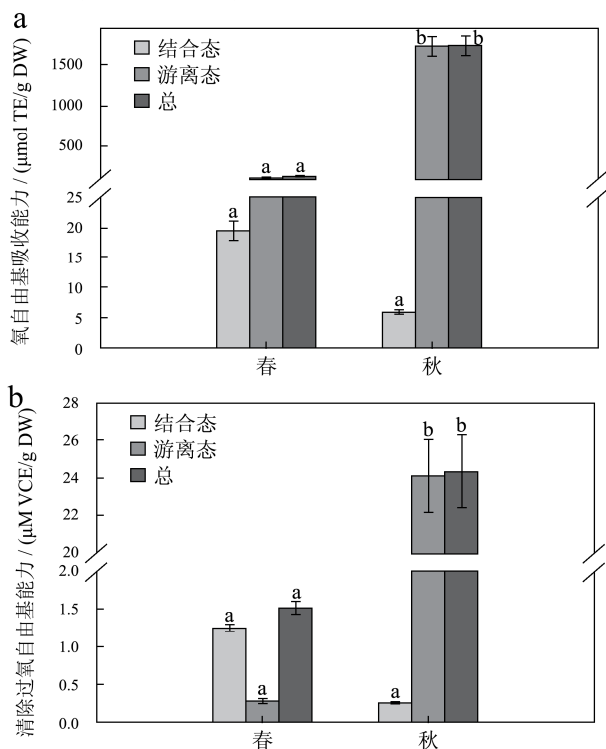


图4 不同季节亮叶杨桐叶的抗氧化能力

Fig.4 *In vitro* antioxidant activity of *Adinandra nitida* leaves collected in different seasons

注: a.氧自由基吸收能力; b.氧自由基清除能力, 图上标注不同的字母表示两组数据间差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3 胞内抗氧化活性

尽管目前对单体、食物混合物及膳食补充剂等的总抗氧化能力评价有许多种化学评价方法, 但是这些化学方法未能充分的考虑体内生理代谢环境的影响、待测物质在体内的消化及吸收等问题。最好的检测单体、食物混合物及膳食补充剂抗氧化的方法是采用动物实验或者人体内实验, 然而动物实验和人体内实验耗时长且花费高, 在初步探讨食物或者膳食补充剂的抗氧化能力时不适用。细胞抗氧化方法不仅能充分考虑到温度、生物 pH 值环境、消化代谢及吸收问题, 而且花费低、反应快^[8]。因此, 细胞抗氧化方法是一个有效的、定量的分析食物、植物化学物及膳食补充剂抗氧化能力的手段。本文采用人体肝癌 HepG2 细胞模型, 检测春季和秋季亮叶杨桐叶提取物的细胞抗氧化能力。

由于春季和秋季亮叶杨桐叶样品中结合态多酚、黄酮含量较低, 故只选择游离态提取物进行细胞抗氧化实验。

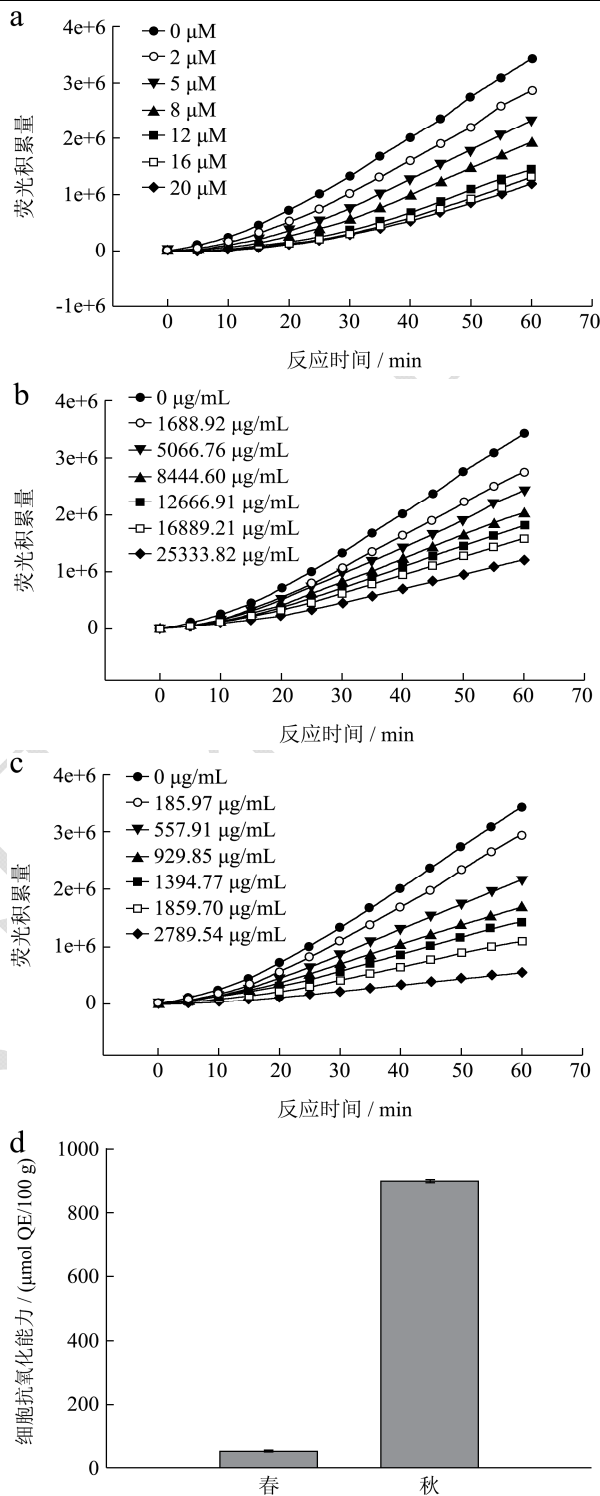


图5 槲皮素 (a)、春季 (b) 和秋季 (c) 时间动力学与剂量-反应曲线及胞内抗氧化值 (d)

Fig.5 Kinetics and dose-response curves of quercetin (a), spring (b), fall (c), and CAA values (d)

非极性的 DCFH-DA 在 HepG2 细胞内, 经细胞酯酶的脱乙酰基作用生成 DCFH, DCFH 被 ABAP 生成的过氧自由基氧化形成具有荧光信号的 DCF, 细胞中的荧光信号反应氧化水平; 植物化学物、抗氧化剂或食物提取物具有抗氧化作用可以清除胞内代谢作用或

ABAP 产生的过氧自由基并抑制具有荧光信号的 DCF 生成, 经标准品或样品处理的细胞内荧光信号相对于对照组中荧光信号的降低反应了植物化学物、抗氧化剂或食物提取物的抗氧化能力^[16]。经槲皮素、春季及秋季亮叶杨桐提取物处理的细胞中, DCFH 与 ABAP 产生的过氧自由基氧化反应动力学曲线如图 5 a、b 和 c 所示, 由图可知 DCFH 与细胞中的 ABAP 氧化反应动力学反应曲线与受试样品呈现浓度效应关系。图 5 d 显示了春季和秋季亮叶杨桐提取物经 PBS 清洗过程的细胞抗氧化能力, 秋季亮叶杨桐游离态提取物和春季亮叶杨桐叶游离态提取物细胞抗氧化能力分别为 $900.84 \pm 2.68 \mu\text{mol} \cdot \text{QE}/100 \text{g}$ 、 $55.52 \pm 2.25 \mu\text{mol} \cdot \text{QE}/100 \text{g}$, 秋季亮叶杨桐叶细胞抗氧化活性最强且显著高于春季亮叶杨桐游离态提取物细胞抗氧化能力 ($p < 0.05$)。近年来, 慢性病学研究表明具有特殊生物活性的植物化学物和人类健康有密切关系。特别是能清除自由基的植物, 是有效预防氧化损伤疾病、提高人类健康的有利武器^[17], 亮叶杨桐叶可作为开发具有细胞抗氧化活性的天然植物产品的原料。

2.4 抗氧化与植物化学物间的相关性

表 1 不同抗氧化能力的相关性分析

Table 1 Correlation coefficients between the different assays employed for analyzing antioxidant capacity

	ORAC	PSC	CAA
ORAC	1.000	0.998	0.997**
PSC		1.000	0.996
CAA			1.000

注: **表示相关性极显著 ($p < 0.01$)。

表 2 多酚、黄酮与不同抗氧化方法的相关性分析

Table 2 Correlation coefficients of the phenolics/flavonoids as determined by different antioxidant assays

	ORAC	PSC	CAA
Phenolics	0.997**	0.001	1.000**
Flavonoids	0.997**	-0.002	1.000**

注: **表示相关性极显著 ($p < 0.01$)。

对 ORAC、PSC 和 CAA 抗氧化方法进行相关性分析, 是对不同的植物化学物抗氧化方法进行比较, 对提取物的抗氧化能力进行全面的了解, 提取物用不同抗氧化能力检测方法分析, 其抗氧化能力不同。所选择的抗氧化方法具有显著的相关性 (表 1), 也凸显出亮叶杨桐叶游离态植物化学物具有良好的抗氧化能力。由表 2 可知, 多酚、黄酮与 ORAC 和 CAA 具有显著的相关性。相似的是, Ferreyra 等发现草莓中抗氧化能力与其总酚含量密切相关^[18]。秋季亮叶杨桐叶

富含多酚、黄酮但多酚、黄酮的含量与 PSC 相关性弱 ($p < 0.01$), 黄酮含量与 PSC 呈现负相关性, 产生原因有待于进一步分析。

2.5 对 HepG2 细胞的毒性和增殖抑制作用

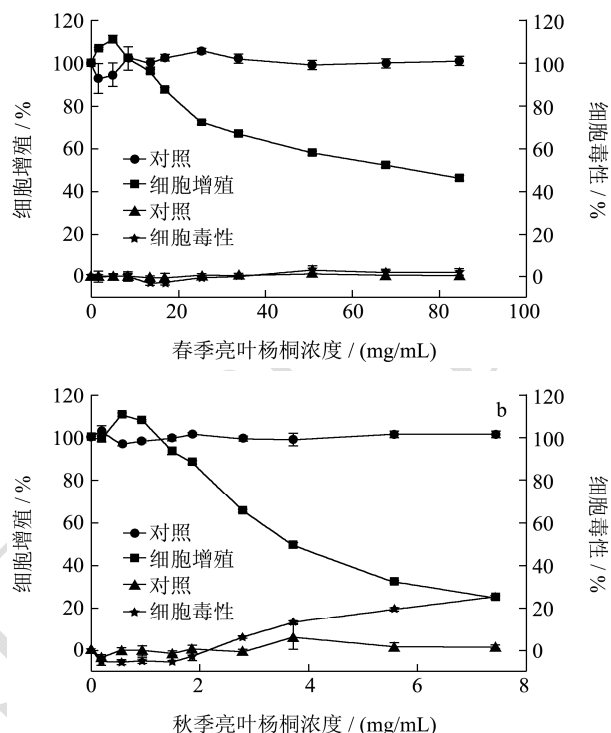


图 6 不同季节亮叶杨桐叶游离态提取物对 HepG2 细胞的抗增殖作用能力和细胞毒性作用能力

Fig.6 Percent growth inhibition in HepG2 liver cancer cells and cytotoxicity by free phytochemicals in the extract from *Adinandra nitida* leaves collected in different seasons

亮叶杨桐游离态多酚对 HepG2 细胞的毒性和抗增殖作用如图 6 所示, 由图 6 可知秋季亮叶杨桐游离态多酚对 HepG2 细胞的抗增殖作用最强, 浓度为 4.30 mg/mL 时对 HepG2 细胞的抑制率为 50%; 然而, 春季亮叶杨桐游离态多酚对 HepG2 细胞的抗增殖作用较弱, 浓度为 64.31 mg/mL 时对 HepG2 细胞的抑制率为 50%。秋季亮叶杨桐游离态多酚对 HepG2 细胞的抗增殖作用抑制率超过 50%时呈现出细胞毒性作用, 然而, 春季亮叶杨桐游离态多酚在实验浓度范围内没有表现出细胞毒性。HepG2 细胞模型被广泛应用于天然产物抗增殖作用和营养学研究, 说明秋季亮叶杨桐叶较春季亮叶杨桐具有更强的生物活性。Yuan 等^[13]采用 MTT 法也发现从亮叶杨桐叶中提取的黄酮类物质对癌细胞有抗增殖作用。

3 结论

对不同季节亮叶杨桐叶中游离态和结合态提取物

中多酚、黄酮含量、抗氧化能力及抗增殖作用的分析表明：秋季亮叶杨桐叶游离态多酚、黄酮含量高，总多酚、总黄酮含量高；对氧自由基吸收能力(ORAC)、氧自由基清除能力(PSC)强胞内抗氧化能力(CAA)强，对HepG2细胞的增殖作用具有显著的抑制作用。具有抗氧化生物活性的亮叶杨桐叶是一种极具开发价值的原料，有待于在食品和饮料的保藏、化妆品功效成分等方面开发研究。

参考文献

- [1] Liu R H. Dietary bioactive compounds and their health implications [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(1): A18-A25
- [2] Sharpe E, Hua F, Schuckers S, et al. Effects of brewing conditions on the antioxidant capacity of twenty-four commercial green tea varieties [J]. Food Chemistry, 2016, 192
- [3] Gao H, Liu B G, Liu F, et al. Anti-proliferative effect of camellianin A in *Adinandra nitida* leaves and its apoptotic induction in human hep G2 and MCF-7 Cells [J]. Molecules, 2010, 15(6): 3878-3886
- [4] 袁尔东,肖仔君,刘本国,等.亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究[J].现代食品科技,2009,3:305-308
YUAN Er-dong, XIAO Zi-jun, LIU Ben-guo, et al. Extraction and antimicrobial activity of flavonoids from *Adinandra nitida* leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 3: 305-308
- [5] Liu B G, Ma Y X, Liu Y, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Adinandra nitida* leaves [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013, 12(6): 1045-1051
- [6] 刘本国,杨继国,邱晓斌,等.芹菜素的制备、鉴定与纯化的研究[J].现代食品科技,2013,12:2947-2952
LIU Ben-guo, YANG Ji-guo, QIU Xiao-bin, et al. Preparation, identification and purification of apigenin [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 12: 2947-2952
- [7] Chen Y S, Chen G, Fu X, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of different varieties of *Adinandra* tea (*Adinandra jack*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(1): 169-176
- [8] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8896-8907
- [9] He X J, Liu D, Liu R H. Sodium borohydride/chloranil-based assay for quantifying total flavonoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(20): 9337-9344
- [10] 李武,李艳君,杨瑞丽.热带水果多酚提取物的抗氧化和抗增殖活性研究[J].现代食品科技,2013(10):2383-2387
LI Wu, LI Yan-jun, YANG Rui-li. Antioxidant and antiproliferative activities of polyphenol extract from 12 tropical fruits [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(10): 2383-2387
- [11] Chen Y S, Wang G Y, Wang H, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activities in six species of ramie leaves [J]. Plos One, 2014, 9 (e1081409)
- [12] Tsao R, Deng Z Y. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences, 2004, 812(1-2): 85-99
- [13] Yuan E D, Liu B G, Ning Z X, et al. Preparative separation of flavonoids in *Adinandra nitida* leaves by high-speed counter-current chromatography and their effects on human epidermal carcinoma cancer cells [J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 1158-1163
- [14] Brasileiro B G, Leite J, Casali V, et al. The influence of planting and harvesting times on the total phenolic content and antioxidant activity of *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd [J]. Actascientiarum-Agronomy, 2015, 37(2): 249-255
- [15] Liu B G, Ning Z X, Zhan Y, et al. Characterization and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of methanol and supercritical carbon dioxide extracts from leaves of *Adinandra nitida* [J]. Journal of Food Biochemistry, 2008, 32(4): 431-442
- [16] Song W, Derito C M, Liu M K, et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(11): 6621-6629
- [17] Galasso S, Pacifico S, Kretschmer N, et al. Influence of seasonal variation on thymus longicaulis C. Presl chemical composition and its antioxidant and anti-inflammatory properties [J]. Phytochemistry, 2014, 107: 80-90
- [18] Ferreyra R M, Vina S Z, Mugridge A, et al. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 112(1): 27-32