

三种蓝莓抗氧化及抗 Hep G2 细胞增殖活性的比较分析

梁泽明¹, 陈春², 伍惠仪¹, 胡心怡¹, 王睿飞¹, 余以刚¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 劲家庄(惠州)健康食品有限公司, 广东惠州 516000)

摘要: 以三种常见市售蓝莓[大兴安岭野生蓝莓 (*Vaccinium uliginosum* L.)、贵州兔眼蓝莓 (*Vaccinium ashei* Reade) 和智利蓝莓 (*Vaccinium corymbosum* L.)]为研究对象, 研究了其总多酚、总黄酮和总花色苷含量及抗氧化活性和抗 Hep G2 细胞增殖活性, 并分析了活性成分含量与活性功能的相关性。结果表明: 大兴安岭野生蓝莓的总多酚、总黄酮和总花色苷的含量及 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力显著高于贵州蓝莓和智利蓝莓 ($p < 0.05$); 细胞抗氧化实验结果表明大兴安岭野生蓝莓的 CAA (Cellular Antioxidant Activity) 值显著高于贵州蓝莓和智利蓝莓, 为 $202.40 \pm 6.33 \mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$ 鲜果 (非 PBS 清洗处理时) 和 $65.40 \pm 3.04 \mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$ 鲜果 (PBS 清洗处理时) ($p < 0.05$); 三种蓝莓均对 Hep G2 细胞增殖有较强的抑制作用, 其中大兴安岭野生蓝莓的抗 Hep G2 细胞增殖的半数有效浓度 EC_{50} 显著低于贵州蓝莓和智利蓝莓, 分别为 150.41 ± 7.82 、 212.87 ± 13.10 和 $221.53 \pm 12.53 \text{ mg/mL}$ ($p < 0.05$); 蓝莓的 CAA 值与总多酚和总黄酮含量之间显著相关, 抗 Hep G2 细胞增殖的 EC_{50} 值与总多酚、总黄酮和总花色苷含量之间显著相关 ($p < 0.05$)。以上结果表明大兴安岭野生蓝莓具有极大的开发利用优势。

关键词: 蓝莓; 花色苷; 细胞抗氧化活性; 抗增殖活性

文章编号: 1673-9078(2019)06-48-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.007

Comparative Analysis of Antioxidant Activity and Anti-proliferative Activity against Hep G2 Cells of Three Blueberry Varieties

LIANG Ze-ming¹, CHEN Chun², WU Hui-yi¹, HU Xin-yi¹, WANG Rui-fei¹, YU Yi-gang¹

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Jin Jia Zhuang (Hui Zhou) Health Food Co. Ltd., Huizhou, 516000, China)

Abstract: Three common commercially available blueberries (*Vaccinium uliginosum* L., *Vaccinium ashei* Reade and *Vaccinium corymbosum* L.) were studied for their total contents of polyphenols, flavonoids and anthocyanins, as well as the antioxidant activity and anti-proliferative activity against Hep G2 cells. The correlation between the content of active components and the activities was also examined. The results showed that the contents of total polyphenols, total flavonoids and total anthocyanins and abilities to scavenge the DPPH and ABTS free radicals of the *Vaccinium uliginosum* L. (a wild blueberry from the Northeast China) were significantly ($p < 0.05$) higher than those in *Vaccinium ashei* Reade (a blueberry from Guizhou China) and *Vaccinium corymbosum* L. (a blueberry from Chile). The results of cellular antioxidant experiments indicated that the wild blueberry from the Northeast China exhibited significantly ($p < 0.05$) higher Cellular Antioxidant Activity (CAA) values [$65.40 \pm 3.04 \mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$ fresh fruit for Phosphate Buffered Saline (PBS) cleaning; $202.40 \pm 6.33 \mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$ fresh fruit for non-PBS cleaning] than the blueberries from Guizhou and the Chilean blueberry. The three types of blueberries all exhibited strong inhibitory effects on Hep G2 cell proliferation, with the half maximal effective concentration (EC_{50} value) of the wild blueberry from the Northeast China ($150.41 \pm 7.82 \text{ mg/mL}$) was significantly ($p < 0.05$) lower than those of the Guizhou blueberry ($212.87 \pm 13.10 \text{ mg/mL}$) and Chilean blueberry ($223.53 \pm 12.53 \text{ mg/mL}$). The CAA values of the blueberries were significantly correlated with the total contents of polyphenols and flavonoids, while there was also a significant ($p < 0.05$) correlation between the EC_{50} values of anti-Hep G2 cell proliferation

收稿日期: 2018-11-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602201); 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020212003)

作者简介: 梁泽明 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与质量控制

通讯作者: 余以刚 (1968-), 男, 教授, 研究方向: 食品质量与安全控制

and the total polyphenols, and between the total flavonoid content and the total anthocyanin content. The above results indicate that the wild blueberry from the Northeast China has great advantages in development and utilization.

Key words: blueberry; anthocyanin; cellular antioxidant activity; anti-proliferative activity

蓝莓属杜鹃花科 (*Ericaceae*)、越橘属 (*Vaccinium* spp.) 小浆果^[1], 多产于美洲、欧洲、韩国、日本和中国等地区。其果肉细腻、甜酸可口, 不仅为鲜食佳品, 而且果酱、果酒等加工产品也深受消费者的喜爱。蓝莓堪称“世界第 3 代水果之王”, 被联合国粮农组织列为人类 5 大健康食品之一, 其富含多酚、黄酮、花青素、维生素 C 等多种天然抗氧化物^[2,3], 具有明目、抗炎、抗癌、延缓衰老和调节血糖等功效^[4-6]。

我国野生蓝莓主要集中在东北大小兴安岭、长白山地区, 其营养丰富, 花青素的含量高达 3.3~33.8 mg/kg, 约是人工栽培品种的 5~20 倍^[7,8]。相比于栽植蓝莓, 野生蓝莓口感稍差, 国内外关于大兴安岭野生蓝莓 (*Vaccinium uliginosum* L.) 的研究报道也相对较少, 从而导致人们对其营养价值认识不足。另外, 贵州麻江县蓝莓引种于 2000 年, 到 2008 年为止共引入 30 个品种并从中筛选出 10 个适宜种植的品种, 如今贵州的蓝莓资源非常丰富, 尤其是兔眼蓝莓 (*Vaccinium ashei* Reade)^[9]。大兴安岭野生蓝莓、贵州兔眼蓝莓和进口智利蓝莓 (*Vaccinium corymbosum* L.) 是常见的三种市售蓝莓, 然而关于它们的活性成分含量、抗氧化活性和抗 Hep G2 细胞增殖活性的研究则少见有报道。

其中, 食物抗氧化活性评价方法主要包括体外化学法、细胞学方法和动物体内实验法三种。其中, 动物模型体内评价食物的抗氧化能力更有效、准确, 但是由于其耗时更长、样品消耗量更大, 因此不适合用于食物抗氧化能力的初筛研究。人们更倾向使用一种基于人肝癌细胞 (Hep G2) 模型的抗氧化活性细胞学定量分析方法 (cellular antioxidant activity assay, CAA) 来对食物的抗氧化活性进行初筛研究, 该方法测定条件与体内生理条件相似, 能在一定程度上体现抗氧化物质的吸收代谢特征, 测定结果也具有较高的生物相关性^[10]。目前, 对蓝莓的抗氧化活性评价主要采用体外化学法, 利用细胞抗氧化法来评价不同品种蓝莓的抗氧化活性的研究鲜见报道, 而对大兴安岭野生蓝莓和贵州兔眼蓝莓细胞抗氧化活性、抗 Hep G2 细胞增殖活性的研究则未见报道。

因此, 本研究拟采用 Hep G2 人肝癌细胞模型对大兴安岭野生蓝莓和贵州兔眼蓝莓的细胞抗氧化和抗增殖活性进行评价, 并与国外进口智利蓝莓 (*Vaccinium corymbosum* L.) 进行比较, 旨在提供这些蓝莓的保健

功能的基础参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大兴安岭野生蓝莓、贵州兔眼蓝莓和智利蓝莓产地分别为黑龙江大兴安岭、贵州麻江县和智利 (同一季节)。对所有蓝莓进行人工挑选、鉴定品种, 并选择完整的、新鲜的、成熟度相似的蓝莓来开展实验。

十三种花色苷标准品, 色谱纯, 日本 Funakoshi 公司; 2,2-二苯基-1-苦基肼 (DPPH)、2,2'-偶氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)、2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷) 二盐酸盐 (ABAP)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA)、Folin-ciocalteu 试剂、没食子酸、芦丁、槲皮素, 分析纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙醇、丙酮、碳酸钠、盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾, 分析纯, 上海生工生物工程股份有限公司; 乙腈、磷酸, 色谱纯, 德国 CNW 科技有限公司; Hep G2 细胞, 北京翠竹生物科技有限公司; Hank 平衡盐溶液 (HBSS)、DMEM 培养基、二甲基亚砷 (DMSO)、胎牛血清 (FBS)、青霉素、链霉素、庆大霉素以及其他细胞培养试剂, 美国 Gibco 生物科技公司。

1.2 仪器与设备

JYL-C012 型高速粉碎机, 九阳股份有限公司; T25 型匀浆机, 德国 IKA 公司; 5180R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 液相色谱仪 LC-20AT, 日本岛津公司; 色谱柱 Kinetex C18 柱 (150 mm×4.6 mm, 2.6 μm), 美国菲罗门公司; HERA cell 240 型 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; DM IRB 型荧光倒置显微镜, 德国 Leica 仪器有限公司; EnSpire 酶标仪, 美国 Perkinelmer 公司。

1.3 方法

1.3.1 蓝莓提取液制备

蓝莓提取液的制备参考文献^[11]并略作修改, 具体操作如下: 称 20 g 新鲜蓝莓, 加 50 mL 80% 冰冻丙酮 (4 °C), 高速粉碎机粉碎 3 min, 于高速匀浆机 12000 r/min 均质 3 min, 匀浆液在高速离心机中 4000 r/min 离心 10 min, 滤渣重复以上操作, 提取至上清液无色, 后合并上清液, 45 °C 下真空旋转蒸发至体积小于

10 mL, 蒸馏水定容至 25 mL, 于-18 °C 下贮存备用。

1.3.2 总多酚含量测定^[12]

100 μ L 蓝莓提取液和没食子酸标准溶液中各加入 6 mL 蒸馏水、500 μ L Folin-Ciocalteu 试剂, 摇匀后放置 6 min, 再加入 1.5 mL 20% Na_2CO_3 溶液, 摇匀, 避光反应 90 min。取 200 μ L 至 96 孔板, 并利用酶标仪测定吸光值, 检测波长为 760 nm。没食子酸标准溶液的浓度分别为 50、100、150、200、250、300、400、500 $\mu\text{g/mL}$, 标准曲线的线性方程为 $y=0.0022x+0.1438$, $R^2=0.9983$ 。以蒸馏水作为空白对照, 总多酚含量用 mg 没食子酸当量/100 g 鲜果 (mg GAE/100 g 鲜果) 表示。

1.3.3 总黄酮含量测定^[13]

35 μ L 蓝莓提取液和芦丁标准溶液中各加入 10.5 μ L 5% NaNO_2 , 摇匀后放置 5 min, 加入 10.5 μ L 的 10% AlCl_3 , 摇匀, 避光反应 6 min, 加入 70 μ L NaOH (1 mol/L) 和 88 μ L 蒸馏水, 利用酶标仪测定吸光值, 检测波长为 510 nm。芦丁标准溶液的浓度分别为 40、60、80、100、120、140、160、180 $\mu\text{g/mL}$, 标准曲线的线性方程为 $y=0.0016x-0.1094$, $R^2=0.9996$ 。以蒸馏水作为空白对照, 总黄酮含量以 mg 芦丁当量/100 g 鲜果 (mg GE/100 g 鲜果) 表示。

1.3.4 高效液相色谱测定花色苷含量

蓝莓花色苷的提取和测定参考文献^[14]进行并作修改, 其中提取溶剂为 50%乙醇 (含 0.5%盐酸), 反复提取 3 次至提取液无色并合并提取液。流动相 A 和 B 分别为 4%磷酸溶液和乙腈, 检测波长为 520 nm, 梯度洗脱程序: 0~8% B 10 min, 8~18% B 45 min, 18~70% B 4 min。流速为 1 mL/min, 进样体积为 5 μ L, 平衡时间为 15 min。单个花色苷的含量以外标法定量, 并表示为矢车菊素-3-葡萄糖苷 (Cy-3-g) 当量。

1.3.5 化学抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 抗氧化试验^[15]

100 μ L 蓝莓提取液和抗坏血酸溶液中分别加入 100 μ L 的 DPPH 无水乙醇溶液 (6×10^{-5} mol/L), 摇匀, 避光反应 30 min, 利用酶标仪测定吸光值, 检测波长为 517 nm, 以蒸馏水作为空白对照, DPPH 抗氧化值以 mg Vit. C equiv./g 鲜果表示。

1.3.5.2 ABTS 抗氧化试验^[16]

5 mL ABTS 溶液 (7 mmol/L) 中加入 88 μ L 硫酸钾溶液 (2.45 mmol/L), 摇匀, 避光放置 12 h, 生成 ABTS 自由基溶液, 使用前用无水乙醇将 ABTS 自由基溶液稀释至吸光值为 0.70 ± 0.02 (734 nm 下), 得到 ABTS 自由基工作液。100 μ L 蓝莓提取液和抗坏血酸溶液中分别加入 100 μ L ABTS 自由基工作液, 摇匀,

避光反应 7 min, 利用酶标仪测定吸光值, 检测波长为 734 nm, 以蒸馏水作空白对照, ABTS 抗氧化值以 mg Vit. C equiv./g 鲜果表示。

1.3.6 细胞培养

Hep G2 细胞用含有 5% FBS、5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、10 mmol/L Hepes、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 氢化可的松、50 units/mL 青霉素、50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养, 实验用细胞代数为 15~28 代。

1.3.7 细胞毒性实验^[17]

96 孔板每孔加入 100 μ L 混合均匀的 Hep G2 细胞悬液 (4×10^4 个细胞/孔), 于 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 移去培养基, PBS 清洗贴壁细胞 1 次。加入 100 μ L 不同浓度的蓝莓提取物 (生长培养基稀释), 空白对照组只加入生长培养基, 于 37 °C、5% CO_2 条件培养 24 h 后, 移去板内培养基, 再用 PBS 清洗贴壁细胞 1 次。每孔加入 50 μ L 亚甲基蓝溶液 (0.67% 戊二醛、98% HBSS 和 0.6% 亚甲基蓝) 于 37 °C 培养 1 h, 移去亚甲基蓝溶液, 用蒸馏水清洗贴壁细胞直至表面无色, 并在纸巾上控干水分。然后每孔加入 100 μ L 洗脱液 (49% PBS、50%乙醇和 1%醋酸), 并将 96 孔板置于振荡器上振荡 20 min 使已染色的细胞重新分散形成均匀的悬液, 利用酶标仪在 570 nm 下测定吸光值。若样品组与对照组相比细胞活率降低 10% 以上, 则认为该浓度下样品有细胞毒性。所有细胞实验浓度“mg/mL”均指的是新鲜蓝莓全果的粗提液浓度。

1.3.8 细胞抗氧化活性测定^[18]

96 孔板每孔加入 100 μ L 混合均匀的 Hep G2 细胞悬液 (6×10^4 个细胞/孔), 于 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 移去培养基, PBS 清洗贴壁细胞 1 次。加入 100 μ L 用培养基稀释的不同浓度的蓝莓提取物和槲皮素标准溶液以及 DCFH-DA 荧光探针溶液 (终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$), 在 37 °C、5% CO_2 条件下培养 1 h 后, 移去培养基, 加入 PBS (100 μL /孔) 清洗一次或不经 PBS 清洗处理。然后每孔加入 100 μ L ABAP 溶液 (600 $\mu\text{mol/L}$), 利用多功能酶标仪测定荧光值, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 538 nm, 每 5 min 测定一次, 共测定 1 h。对照组用 DCFH-DA 和 ABAP 处理, 不加蓝莓提取物; 空白组只用 DCFH-DA 处理。细胞抗氧化活性 (CAA 值) 表示为 μmol 槲皮素当量/100 g 鲜果 ($\mu\text{mol QE}/100\text{ g 鲜果}$)。

1.3.9 细胞抗增殖实验^[19]

96 孔板每孔加入 100 μ L 混合均匀的 Hep G2 细胞悬液 (2.5×10^4 个细胞/孔), 于 37 °C、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 移去培养基, PBS 清洗贴壁细胞 1 次。

加入 100 μL 用培养基稀释的不同浓度的蓝莓提取物 (无细胞毒性浓度范围), 对照组加入 100 μL 生长培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 72 h 后测定吸光值, 具体操作步骤与细胞毒性测定相同。蓝莓提取物抗 Hep G2 细胞增殖活性以细胞增殖抑制率 (%) 和半数有效抑制浓度 (IC_{50} , mg/mL) 表示。

1.4 数据处理

所有实验重复 3 次, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 分别采用 Origin 8.0 和 SPSS 13.0 进行数据分析和显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 三种蓝莓总多酚和总黄酮含量分析

大兴安岭野生蓝莓、贵州兔眼蓝莓和智利蓝莓的总多酚 ($\text{mg GAE}/100\text{ g}$ 鲜果) 和总黄酮 ($\text{mg RE}/100\text{ g}$ 鲜果) 含量测定结果如图 1 所示。总多酚含量依次为: 大兴安岭野生蓝莓 ($299.60\pm 6.69\text{ mg GAE}/100\text{ g}$ 鲜果) > 贵州蓝莓 ($197.79\pm 9.05\text{ mg GAE}/100\text{ g}$ 鲜果) > 智利蓝莓 ($143.73\pm 7.96\text{ mg GAE}/100\text{ g}$ 鲜果), 总黄酮含量依次为大兴安岭野生蓝莓 ($309.68\pm 5.77\text{ mg RE}/100\text{ g}$ 鲜果) > 贵州蓝莓 ($195.48\pm 5.63\text{ mg RE}/100\text{ g}$ 鲜果) > 智利蓝莓 ($155.57\pm 8.71\text{ mg RE}/100\text{ g}$ 鲜果) ($p<0.05$)。三种蓝莓中, 大兴安岭野生蓝莓的总多酚和总黄酮含量最高。三种蓝莓的总多酚和总黄酮含量的差异可能是由于不同品种和产地等因素导致, 这与 Sellappan 等人^[3]和 Howard 等人^[20]的研究结果一致。蓝莓富含黄酮、酚酸和花青素, 这些都是重要的天然抗氧化剂。长期大量摄食蓝莓可有效减缓人体内由自由基引起的过氧化应激, 有利于预防衰老和癌症等疾病, 改善身体健康。

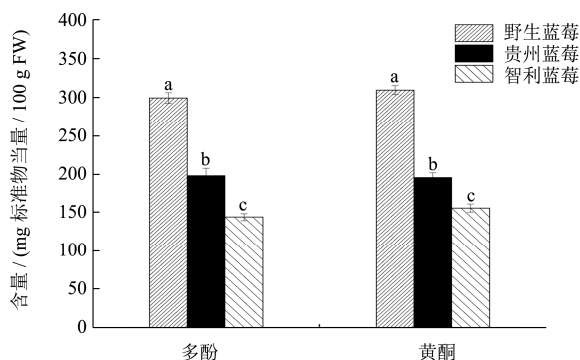


图 1 三种蓝莓的总多酚和总黄酮含量

Fig.1 Total polyphenols and total flavonoids in three blueberries ($p<0.05$)

2.2 蓝莓花色苷高效液相色谱 (HPLC) 定量

大兴安岭野生蓝莓、贵州兔眼蓝莓、智利蓝莓和 13 种花色苷标准品混标的液相色谱图如图 2 所示。

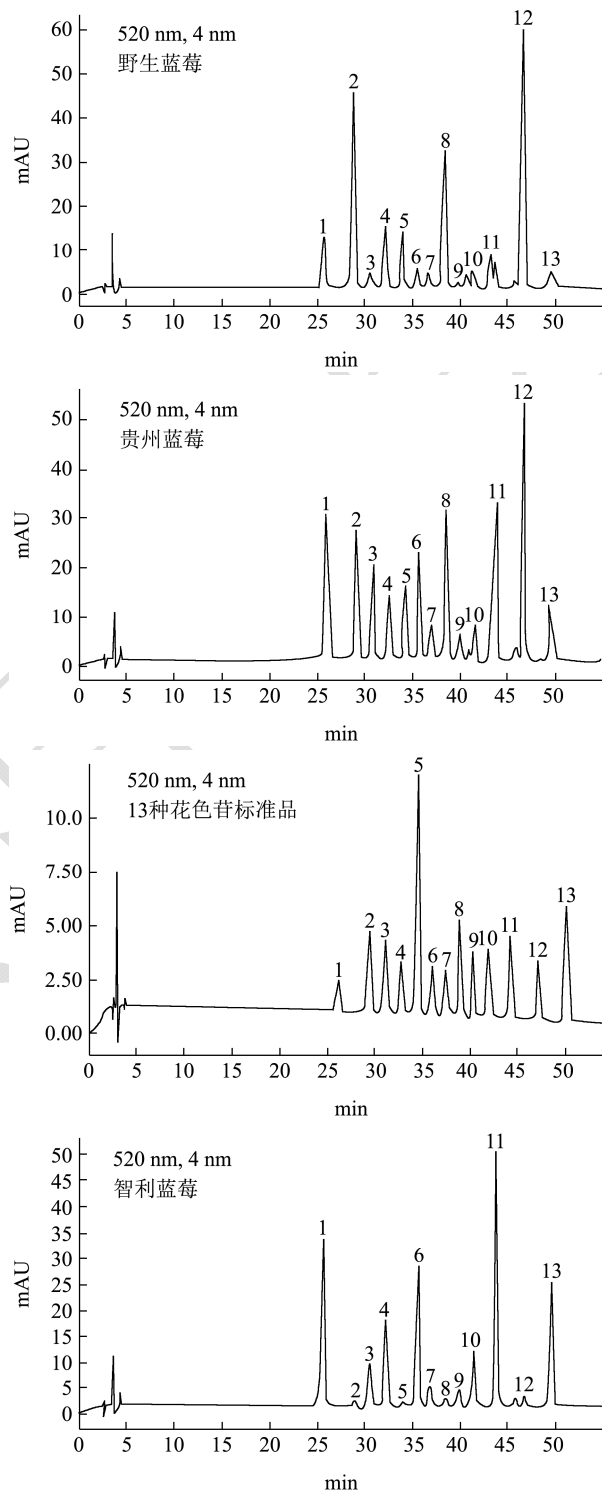


图 2 蓝莓花色苷高效液相色谱

Fig.2 The high performance liquid chromatography of blueberry anthocyanin

三种蓝莓的 13 种花色苷含量如表 1 所示, 大兴安岭野生蓝莓中含量最高的花色苷是锦葵素葡萄糖苷 ($676.35\pm 2.71\text{ }\mu\text{g/g}$ 鲜果), 其次是飞燕草素葡萄糖苷 ($524.81\pm 3.15\text{ }\mu\text{g/g}$ 鲜果), 它们约占总花色苷的

53.69%。贵州蓝莓中含量最高的花色苷是锦葵素葡糖苷(423.09±1.63 μg/g 鲜果), 其次是飞燕草素半乳糖苷(261.57±2.55 μg/g 鲜果)和锦葵素半乳糖苷(260.97±3.46 μg/g 鲜果), 这3种花色苷约占总量的43.06%。而智利蓝莓中锦葵素半乳糖苷的含量最高, 为330.33±4.64 μg/g 鲜果, 飞燕草素半乳糖苷(237.36±2.85 μg/g 鲜果)次之, 它们约占总花色苷的46.96%。三种蓝莓的13种的花色苷的含量不同, 例如飞燕草素葡糖苷在大兴安岭野生蓝莓和贵州蓝莓中含量分别为524.81±3.15和213.72±1.48 μg/g 鲜果, 而在智利蓝莓中含量只有4.76±0.90 μg/g 鲜果。大兴安岭野生蓝莓和贵州蓝莓中的锦葵素葡糖苷含量分别为676.35±

2.71和423.09±1.63 μg/g 鲜果, 但是在智利蓝莓中含量只有10.73±1.03 μg/g 鲜果。三种蓝莓总花色苷按大小顺序依次为大兴安岭野生蓝莓(2237.35±3.45 μg/g 鲜果)>贵州蓝莓(2196.13±4.22 μg/g 鲜果)>智利蓝莓(1208.93±2.83 μg/g 鲜果)($p<0.05$), 大兴安岭野生蓝莓的花色苷含量最高, 约为智利蓝莓的2倍。三种蓝莓的花色苷含量的差异可能是由于不同品种和产地等因素而引起的^[3,20]。蓝莓体积可能会对总花色苷含量有一定影响, 这是由于花色苷大部分集中在果皮, 大兴安岭野生蓝莓的平均体积比贵州蓝莓和智利蓝莓的体积更小, 意味着相同质量条件下, 大兴安岭野生蓝莓将含有更多的皮组织, 因此其活性物质含量更高。

表1 三种蓝莓花色苷含量分析

Table 1 The analysis of anthocyanin content in three blueberries

峰号	保留时间/min	成分	含量/(μg 矢车菊素葡糖苷当量/g 鲜果)		
			野生蓝莓	贵州蓝莓	智利蓝莓
1	26.37	飞燕草素半乳糖苷	133.82±1.70 ^{cC}	261.57±2.55 ^{bA}	237.36±2.85 ^{bB}
2	29.54	飞燕草素葡糖苷	524.81±3.15 ^{bA}	213.72±1.48 ^{dB}	4.76±0.90 ^{kC}
3	31.21	矢车菊素半乳糖苷	35.74±1.47 ^{iC}	151.72±2.08 ^{fA}	52.85±1.34 ^{eB}
4	32.88	飞燕草素阿拉伯糖苷	153.97±1.35 ^{dA}	101.09±1.47 ^{hC}	108.44±4.65 ^{eB}
5	34.62	矢车菊素葡糖苷	134.25±2.18 ^{eA}	115.60±1.83 ^{eB}	3.31±0.91 ^{kC}
6	36.09	矮牵牛花半乳糖苷	47.04±1.61 ^{gC}	168.67±1.48 ^{eB}	180.81±1.51 ^{cA}
7	37.42	矢车菊素阿拉伯糖苷	33.68±1.17 ^{iB}	54.50±1.30 ^{iA}	23.56±3.04 ^{hC}
8	39.02	矮牵牛花葡糖苷	355.89±3.00 ^{cA}	246.11±4.53 ^{eB}	5.66±1.35 ^{kC}
9	40.42	芍药素半乳糖苷	8.53±0.85 ^{jC}	39.95±3.05 ^{jA}	18.93±1.51 ^{iB}
10	42.03	芍药素阿拉伯糖苷	35.55±1.50 ^{iC}	54.50±2.97 ^{iB}	69.31±3.17 ^{fA}
11	44.31	锦葵素半乳糖苷	58.21±1.38 ^{fC}	260.97±3.46 ^{bB}	330.33±4.64 ^{aA}
12	47.23	锦葵素葡糖苷	676.35±2.71 ^{aA}	423.09±1.63 ^{bB}	10.73±1.03 ^{iC}
13	50.11	锦葵素阿拉伯糖苷	39.50±1.17 ^{hC}	104.64±4.50 ^{hB}	162.89±2.08 ^{dA}
总含量(μg 矢车菊素葡糖苷当量/g 鲜果)			2237.35±3.45 ^A	2196.13±4.22 ^B	1208.93±2.83 ^C

注: 表中数据均为平均值±标准方差(n=3), 同一列或同一行中不同字母表示有显著性差异($p<0.05$)。

2.3 三种蓝莓化学抗氧化活性分析

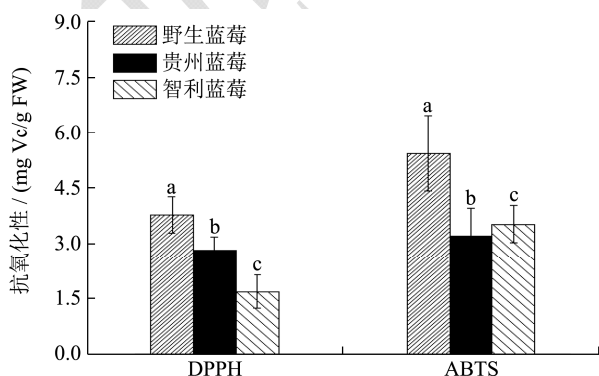


图3 三种蓝莓的抗氧化性分析

Fig.3 The analysis of antioxidant activity of three blueberries ($p<0.05$)

采用DPPH和ABTS法对三种蓝莓的化学抗氧化性进行分析, 结果如图3所示。一般而言, 样品的DPPH和ABTS抗氧化值越大, 表明其抗氧化性越强。大兴安岭野生蓝莓具有最高的DPPH(3.77±0.50 mg Vit. C equiv/g 鲜果)和ABTS(5.43±1.02 mg Vit. C equiv/g 鲜果)抗氧化值, 其中DPPH抗氧化值的大小依次为大兴安岭野生蓝莓>贵州蓝莓>智利蓝莓($p<0.05$), ABTS抗氧化值的顺序为大兴安岭野生蓝莓>贵州蓝莓~智利蓝莓($p<0.05$)。研究表明, 食物的抗氧化活性与它们总多酚黄酮含量有很大关系^[21-24]。蓝莓的ORAC值与总花色苷和总多酚之间也有显著的正相关性, 其r相关系数分别为0.6277和0.8786^[26]。本试验中, DPPH抗氧化活性与总多酚、总黄酮和总花色苷之间均显著相关(r值分别为0.976, 0.950和0.904,

$p < 0.05$), 而 ABTS 抗氧化活性与总多酚和总黄酮显著相关 (r 值分别为 0.885 和 0.926, $p < 0.05$), 但与总花色苷无显著相关 (r 值为 0.411, $p > 0.05$)。Howard 等人^[20]的研究表明, 蓝莓的抗氧化活性与基因型和生长季节相关, 这可能是由于基因型与生长季节影响了蓝莓的多酚和花青素等活性物质的含量, 从而影响了它们的抗氧化活性。本试验中大兴安岭野生蓝莓的总多酚、黄酮和花色苷含量均为最高, 其 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性也显著高于贵州蓝莓和智利蓝莓 ($p < 0.05$)。

2.4 三种蓝莓细胞抗氧化活性分析

三种蓝莓的细胞抗氧化实验测定的 CAA 值如图 4 所示。非 PBS 清洗处理时, 大兴安岭野生蓝莓、贵州蓝莓和智利蓝莓的 CAA 值分别为 202.40 ± 6.33 、 86.86 ± 3.15 和 90.29 ± 4.63 $\mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$ 鲜果; PBS 清洗处理时, 大兴安岭野生蓝莓、贵州蓝莓和智利蓝莓的 CAA 值分别为 65.40 ± 3.04 、 31.83 ± 5.72 和 27.31 ± 2.88 $\mu\text{mol QE}/100 \text{ g}$ 鲜果。样品的 CAA 值越大, 表明其细胞抗氧化活性越强, 这表明在无 PBS 清洗处理和 PBS 清洗处理的条件下, 大兴安岭野生蓝莓均表现出最强的细胞抗氧化活性。

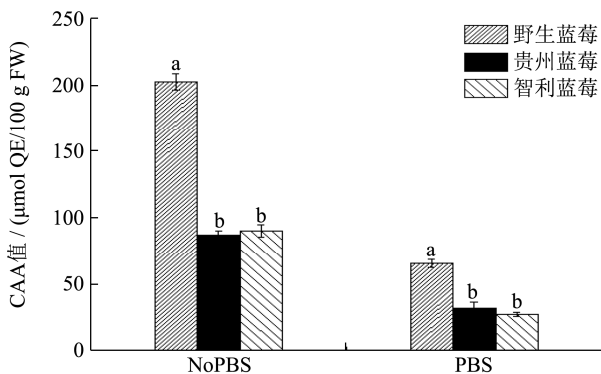


图 4 三种蓝莓的细胞抗氧化性分析

Fig.4 The analysis of cellular antioxidant activity of three blueberries ($p < 0.05$)

由于非 PBS 清洗处理主要反应抗氧化剂在细胞膜表面的抗氧化活性, PBS 清洗则反映抗氧化剂在细胞内部的抗氧化活性。本试验中, 非 PBS 清洗处理时, 三种蓝莓的 CAA 值均比经 PBS 清洗处理的 CAA 值大, 这表明蓝莓提取物在细胞膜表面的抗氧化活性优于在细胞内部的抗氧化活性。这可能是由于花青素上连接着糖苷而导致其不能够轻易地穿过细胞膜进入细胞^[25]。

三种蓝莓的细胞抗氧化活性 EC_{50} 值如图 5 所示, EC_{50} 值和 CAA 值呈负相关, EC_{50} 值越小, 则表明样品的细胞抗氧化活性越强。在非 PBS 清洗和 PBS 清

洗处理条件下, 三种蓝莓的 EC_{50} 值大小均为贵州蓝莓 \approx 智利蓝莓 $>$ 大兴安岭野生蓝莓 ($p < 0.05$)。利用总多酚、黄酮和花色苷含量和细胞抗氧化数据进行相关性分析, 结果表明, PBS 清洗处理时, CAA 与总多酚、总黄酮和总花色苷之间均显著相关 (r 值分别为 0.971, 0.990 和 0.619, $p < 0.05$); 非 PBS 清洗时, CAA 与总多酚和总黄酮显著相关 (r 值分别为 0.931 和 0.962, $p < 0.05$), 但与总花色苷无显著相关 (r 值为 0.508, $p > 0.05$)。

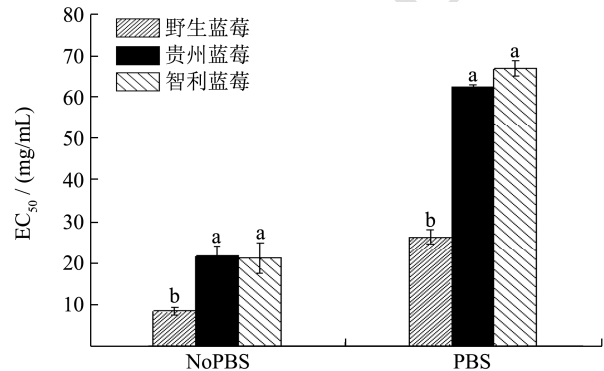


图 5 三种蓝莓细胞抗氧化性的 EC_{50} 值

Fig.5 The EC_{50} values of cellular antioxidant activity of three blueberries ($p < 0.05$)

食物中的细胞抗氧化活性与其所含的多酚、黄酮和花色苷等活性物质呈正相关, Wolfe 等^[21]发现了 25 种水果 CAA 值与总多酚含量之间具有良好的正相关性 ($r = 0.890$, $p < 0.05$); Song 等^[22]分析了 27 种蔬菜的 CAA 值与总多酚含量之间的相关性, 结果表明 CAA 值与总多酚具有良好的正相关性 ($r = 0.702$, $p < 0.05$)。

2.5 三种蓝莓抗 Hep G2 细胞增殖活性分析

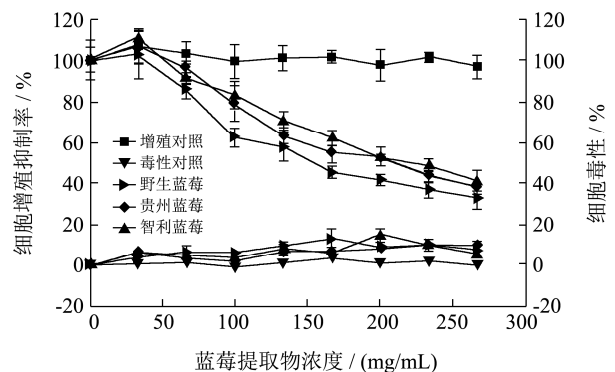


图 6 三种蓝莓的抗 Hep G2 癌细胞增殖活性和细胞毒性分析

Fig.6 The analysis of anti-proliferative activities on Hep G2 cancer cells and cytotoxicity of three blueberries

大兴安岭野生蓝莓、贵州蓝莓和智利蓝莓的抗 Hep G2 肿瘤细胞增殖活性实验结果如图 6 和表 2 所示。大兴安岭野生蓝莓、贵州蓝莓和智利蓝莓的 EC_{50} 值分别为 150.41 ± 7.82 、 212.87 ± 13.10 和 221.53 ± 12.53

mg/mL。三种蓝莓对 Hep G2 细胞增殖都有较强的抑制作用, 其中, 大兴安岭野生蓝莓的抗 Hep G2 细胞增殖活性最佳, 但贵州蓝莓和智利蓝莓之间无显著差异 ($p<0.05$)。细胞毒性试验中, 三种蓝莓的 CC_{50} 值均大于 300 mg/mL, 显著高于相应的 EC_{50} 值, 表明在实验浓度下, 3 种蓝莓对 Hep G2 肿瘤细胞抑制作用不是细胞毒性引起的。

蓝莓富含抗氧化物, 具有较好的抗癌活性。Li 等^[26]研究表明, 中国蓝莓花色苷对 Hep G2 细胞具有明显的抗增殖作用; Zu 等^[27]证明蓝莓花色苷抑制癌细胞 DLD-1 和 COLO205, 且呈剂量相关性; 蓝莓花色苷也显示出较好的抑制癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF7 效果^[28]。本试验中, 抗 Hep G2 细胞增殖活性 EC_{50} 值与总多酚、总黄酮和总花色苷含量之间均显著相关 (r 值分别为 0.972, 0.990 和 0.622, $p<0.05$), 表明多酚、黄酮和花色苷是蓝莓中抑制癌细胞增殖的主要活性物质, 但其详细的抑制机制仍待进一步研究。

表 3 三种蓝莓抗增殖活性和细胞毒性分析

Table 3 The analysis of anti-proliferative activity and cytotoxicity of three blueberries

品种	抗增殖活性 EC_{50} /(mg/mL)	毒性 CC_{50} /(mg/mL)
野生蓝莓	150.41±7.82 ^b	>300
贵州蓝莓	212.87±13.10 ^a	>300
智利蓝莓	221.53±12.53 ^a	>300

注: EC_{50} 和 CC_{50} 均表示为 mg/mL (鲜果提取物); 同一列中不同字母表示有显著性差异 ($p<0.05$)。

3 结论

本试验主要比较分析了大兴安岭野生蓝莓、贵州蓝莓和智利蓝莓的多酚、黄酮、花色苷含量, 以及它们的抗氧化活性和抗 Hep G2 肿瘤细胞增殖活性。研究表明, 大兴安岭野生蓝莓总多酚 (299.60±6.69 mg GAE/100 g 鲜果)、总黄酮 (309.68±5.77 mg RE/100 g 鲜果) 和总花色苷 (2237.35±3.45 μ g/g 鲜果) 的含量均为 3 个品种中最高。同样地, DPPH 抗氧化值的大小依次为大兴安岭野生蓝莓>贵州蓝莓>智利蓝莓, ABTS 抗氧化值的顺序为大兴安岭野生蓝莓>贵州蓝莓~智利蓝莓 ($p<0.05$)。CAA 结果表明, 非 PBS 清洗处理时, 三种蓝莓的 CAA 值大小顺序为大兴安岭野生蓝莓>贵州蓝莓~智利蓝莓 ($p<0.05$), PBS 清洗处理时 CAA 值顺序与非 PBS 清洗处理时一致。非 PBS 清洗处理时三种蓝莓 CAA 值均显著大于 PBS 清洗处理的 CAA 值 ($p<0.05$), 表明不使用 PBS 清洗处理组蓝莓的细胞抗氧化活性大于使用 PBS 处理组。在无细胞毒性浓度范围内 ($CC_{50}<300$ mg/mL), 三种蓝莓均

对 Hep G2 细胞增殖都有较强的抑制作用, 其抗增殖活性大小为大兴安岭野生蓝莓>贵州蓝莓~智利蓝莓 ($p<0.05$)。综上所述, 大兴安岭野生蓝莓具有最强的 DPPH、ABTS 总抗氧化活性、细胞抗氧化活性和抗 Hep G2 细胞增殖活性, 这可能是由于其总多酚、总黄酮和总花色苷含量均为三种蓝莓中最高。大兴安岭野生蓝莓作为一种高营养价值的水果, 市场潜力巨大, 有待进一步开发。

参考文献

- [1] Abreu O A, Barreto G, Prieto S. *Vaccinium* (Ericaceae): ethnobotany and pharmacological potentials [J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2014, 26(7): 577-591
- [2] 姜爱丽. 蓝莓果实采后生理生化代谢及调控研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2011
JIANG Ai-li. Study on physio-biochemical metabolism and its regulation of postharvest blueberry fruits [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2011
- [3] Sellappan S, Akoh C C, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2432-2438
- [4] Su M S, Silva J L. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation [J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 182-187
- [5] 李斌, 雷月, 孟宪军, 等. 蓝莓营养保健功能及其活性成分提取技术研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 6: 251-254
LI Bin, LEI Yue, MENG Xian-jun, et al. Progress on functionality of blueberry and extracting technology for its active ingredient [J]. Food and Machinery, 2015, 6: 251-254
- [6] Neto C C. Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51(6): 652-664
- [7] 李安文. 蓝莓花色苷稳定性及分离纯化技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011
LI An-wen. Studies on the stability of anthocyanins extracted from blueberry and purification technology [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011
- [8] Vernon G, Baranova A, Younossi Z M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults [J]. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2011, 34(3): 274-285
- [9] 韦吉梅, 聂飞, 方品武. 蓝莓的引种与品种筛选[J]. 落叶果

- 树,2007,39(5):26-29
- WEI Ji-mei, NIE Fei, FANG Pin-wu. Blueberry introduction and variety screening [J]. *Deciduous Fruits*, 2007, 39(5): 26-29
- [10] Wolfe K L, Liu R H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. *J Agric. Food Chem.*, 2007, 55(22): 8896-8907
- [11] Guo X, Li T, Tang K, et al. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(44): 11050-11055
- [12] 张文莉.玫瑰茄挥发油和多糖的成分分析与结构鉴定及其抗炎、免疫活性评价[D].广州:华南理工大学,2016
- ZHANG Wen-li. Study on identification and structure of essential oils and polysaccharides from *Hibiscus Sabdariffa* Linn and their anti-inflammatory and immune activities [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [13] Li D, Li B, Ma Y, et al. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2017, 62: 84-93
- [14] 曾丹,邹波,徐玉娟,等.蓝莓成熟过程中花色苷组分的变化[J].食品工业科技,2016,37(23):86-90
- ZENG Dan, ZOU Bo, XU Yu-juan, et al. Changes in anthocyanin components of blueberry during ripening process [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(23): 86-90
- [15] Brandwilliams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25-30
- [16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [17] Felice d L, Jie S, Rui H L. A modified methylene blue assay for accurate cell counting [J]. *Journal of Functional Foods*, 2009, 1(1): 109-118
- [18] 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
- [19] Jiang X, Li T, Liu R H. 2 α -Hydroxyursolic acid inhibited cell proliferation and induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells through p38/MAPK signal transduction pathway [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(8): 1806-1816
- [20] Howard L R, Clark J R, Brownmiller C. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83(12): 1238-1247
- [21] Wolfe K L, Kang X, He X, et al. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(18): 8418-8426
- [22] 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
- [23] 刘冬,刘仁斌,孙海燕,等.不同品种荔枝果肉细胞抗氧化及抗增殖活性评价[J].现代食品科技,2018,2:53-58
- LIU Dong, LIU Ren-bin, SUN Hai-yan, et al. Evaluation of cellular antioxidant and antiproliferative activities of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp from different cultivars [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 2: 53-58
- [24] Virachnee L, Mary M, George S, et al. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(1): 249-254
- [25] Wang H, Guo X, Hu X, et al. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.) [J]. *Food Chemistry*, 2017, 217: 773-781
- [26] Li Y W, Wang D, Li X G, et al. Anthocyanins extracted from chinese blueberry and its anticancer effects on HepG2 cells [J]. *Advanced Materials Research*, 2014, 887-888: 592-595
- [27] Zu X Y, Zhang Z Y, Zhang X W, et al. Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells [J]. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123(19): 2714-2719
- [28] Faria A, Pestana D, Teixeira D, et al. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: Anticancer properties in breast cancer cell lines [J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 24(12): 1862-1869