

油橄榄叶提取物体内抗氧化活性研究

郑洁¹, 何海荣¹, 王宁丽¹, 裴栋², 田亚涛¹, 谢雪健¹, 刘晔玮^{1*}

兰州大学公共卫生学院营养与食品卫生研究;² 中国科学院兰州化学物理研究所 中科院西北特色植物资源化学重点实验室, 兰州 730000

摘要: 为评价油橄榄叶提取物的体内和体外抗氧化能力, 体外抗氧化活性评价采用 DPPH· 和 ·OH 清除能力实验, 体内抗氧化活性评价采用 D-半乳糖连续背部注射制作亚急性衰老小鼠模型, 以 VE 为阳性对照组, 油橄榄叶提取物 58、116、232 mg/kg BW 灌胃 30 d, 处死后测定 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性, 观察肝脏和大脑组织病理形态学的改变。结果表明, 衰老小鼠 MDA 的含量明显升高, 血清、肝组织中的 SOD、GSH-Px 和脑组织中的 SOD 活性均明显降低, 与正常小鼠比较有差异 ($P < 0.05$); 各剂量的油橄榄叶提取物均能提高衰老小鼠血清、肝组织中的 SOD、GSH-Px 和脑组织中的 SOD 活性, 并降低 MDA 的含量; 油橄榄叶提取物可明显改善 D-gal 致衰老小鼠肝脏、大脑皮质和海马神经元的细胞形态和水肿情况。油橄榄叶提取物清除 DPPH· 和 ·OH 的 IC_{50} 分别为 0.064 mg/mL 和 0.066 mg/mL。实验结果表明油橄榄叶提取物具有较好的抗氧化活性。

关键词: 油橄榄叶提取物; D-半乳糖; 抗氧化; 小鼠

中图分类号: R151.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.10.011

In Vitro and in Vivo Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Leaf Extracts

ZHENG Jie¹, HE Hai-rong¹, WANG Ning-li¹, PEI Dong², TIAN Ya-tao¹, XIE Xue-jian¹, LIU Ye-wei^{1*}

¹School of Public Health, Lanzhou University; ²Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Abstract: The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Olea europaea* L. leaf extracts. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by DPPH· and ·OH scavenging assays, and the *in vivo* antioxidant activity was evaluated using subacute aging mice model. The subacute aging model mice were made by back subcutaneous injection of D-galactose every day. With VE as positive control, the mice were given by garage three different doses (58, 116, 232 mg/kg BW, respectively) of *O. europaea* leaf extracts, for 30 days, the malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined, and the liver and brain tissue's morphological changes were observed. The SOD and GSH-Px activities in aging model group were decreased, and MDA level was increased significantly as compared to normal mice ($P < 0.05$). While in the *O. europaea* leaf extract treatment group, the activity of SOD and GSH-Px were increased and MDA level decreased significantly as compared to the model group ($P < 0.05$). *O. europaea* leaf extracts improved the cell shape and the edema situation of D-gal induced aging mice's liver, brain cortex and hippocampal neurons obviously. The IC_{50} of *O. europaea* leaf extracts scavenging DPPH· and ·OH were 0.064 mg/mL and 0.066 mg/mL respectively. The experimental results indicated that *O. europaea* leaf extracts had good antioxidant activity.

Key words: *Olea europaea* L. leaf extract; D-gal; antioxidation; mice

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 属木樨科 (*Europaea*) 木樨榄属 (*Olea*) 植物, 是世界著名的常绿木本油料和果树树种^[1]。流行病学^[2,3]和动物实验^[4]都证明了橄榄油具有降低心血管疾病、胃癌、乳腺癌等疾病

发病率的潜在作用, 这种作用不仅归因于橄榄油中不饱和脂肪酸和维生素等生物活性物质, 还与其中具有抗氧化活性的酚类化合物有关^[5], 而油橄榄叶中的抗氧化活性物质含量高于油橄榄果、茎和树皮^[6]。

目前, 关于油橄榄叶提取物的分离纯化^[7,8]及抗癌^[9,10]、降血压^[11]、降血糖^[12]等各种生理活性及体外抗氧化活性的研究较多, Coban^[13]等研究了油

收稿日期: 2015-05-13 接受日期: 2015-08-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2014AA022203)

* 通讯作者 E-mail: liuyw@lzu.edu.cn

橄榄叶提取物的体内抗氧化活性,但对其抗氧化活性的系统研究鲜见报道。本文通过观察小鼠体内抗氧化指标和组织形态学的变化,结合体外清除 DPPH· 和 ·OH 的能力,系统研究了油橄榄叶提取物的抗氧化作用,为充分利用目前被废弃的油橄榄叶,开发具有保健功能的油橄榄多酚产品,延长产业链,实现种植和精深加工多形式的优化组合提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试样品

油橄榄叶提取物(陇南田园油橄榄科技发展有限公司提供,课题组经 HPLC 法测定橄榄苦苷含量为 22.3%);橄榄苦苷(购自青岛耐特生物技术有限公司,课题组经 HPLC 法测定其含量为 98.2%)。

1.1.2 主要试剂与仪器

试剂: D-半乳糖(D-gal)、Coomassie Brilliant Blue G-250、Albumin Bovine V(Sigma,美国);维生素 E(VE)(江西天之海药业股份有限公司);1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH·)标准品(批号 S43654-098, Sigma,美国);抗坏血酸对照品(批号: A-4544, 购自 Fluka 公司,美国);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号: 20140312, 南京建成生物工程研究所);其它试剂均为分析纯,水为实验室自制双蒸水。

仪器:旋涡混合器(海门市麒麟医用仪器厂);L600 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Microfuge® 22R Centrifuge(美国贝克曼库尔特/Beckman Coulter);UV759 紫外-可见分光光度计(上海精密仪器科技有限责任公司)。

1.1.3 实验动物

25 g 左右雄性健康成年昆明种小鼠 90 只,购于兰州大学医学院动物实验中心(动物合格证号:甘医动字第 14-006);饲养条件:温度 18~22 °C,光暗周期 12 h:12 h,群养,3 只/笼,常规喂养饲料,自由饮水。

1.2 方法

1.2.1 体外清除自由基作用

参考文献^[14,15]方法及预实验结果,以抗坏血酸、橄榄苦苷为对照,测定各质量浓度的油橄榄叶提取物对 DPPH· 和 ·OH 的清除率,分别计算其半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.2 D-gal 致衰老小鼠抗氧化作用

1.2.2.1 动物分组及给药剂量设置^[16]

小鼠按体重随机分为 6 组,即:空白组、D-gal 模型组、油橄榄叶提取物低、中、高剂量组、VE 组。油橄榄叶提取物组给药量分别为 58、116、232 mg/kg BW;VE 组 VE 灌胃 100 mg/kg BW;空白组与 D-gal 模型组灌胃等量生理盐水。除空白组外,其余各组均每日颈背部皮下注射 D-gal 200 mg/kg BW,注射量为 0.1 mL/10 g,空白组每日皮下注射等量生理盐水。每 3 d 称体重和食物,换算灌胃量并计算食物利用率。D-gal 与油橄榄多酚均连续给药 30 d。

1.2.2.2 体内抗氧化指标测定

各组于实验末日禁食 16 h 后摘眼球采血,离心取血清-80 °C 保存备用,同时迅速取出小鼠脑、肝组织做成 10% 匀浆,离心取上清液-80 °C 保存备用。按试剂盒说明操作,测定血清、肝组织、脑组织中 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性;蛋白质测定采用考马斯亮蓝法。

1.2.2.3 小鼠肝脏和大脑组织形态学观察

取部分肝脏和大脑组织,制成 HE 染色切,在光学显微镜下观察。

1.2.3 数据处理

实验结果采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析、多重比较和直线回归分析。以 $P < 0.05$ 为结果差异存在统计学意义,以 $P < 0.01$ 为更有理由相信结果差异存在统计学意义。

2 实验结果

2.1 体外清除自由基作用

各质量浓度的油橄榄叶提取物对 DPPH· 和 ·OH 均有一定的清除作用,并呈剂量-效应关系(图 1、2)。抗坏血酸、橄榄苦苷和油橄榄叶提取物对 DPPH· 和 ·OH 的 IC₅₀ 分别为 0.016、0.058、0.064 mg/mL;0.052、0.046、0.066 mg/mL。

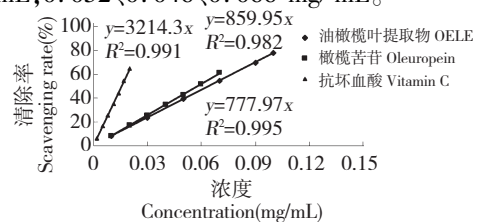


图 1 油橄榄叶提取物清除 DPPH· 的活性

Fig. 1 DPPH· scavenging activities of *O. europare* leaf extracts

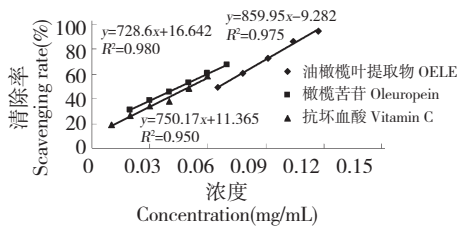


图2 油橄榄叶提取物清除·OH的活性

Fig. 2 ·OH scavenging activities of *O. europaea* leaf extracts

2.2 小鼠血清、肝脏组织、大脑组织的MDA含量、SOD和GSH-Px酶活性测定结果

各组血清、肝脏组织的SOD、GSH-Px活性和大

脑组织的SOD活性与D-gal模型组比较都有所增加(表1~3),差异均有统计学意义;各组血清、肝脏组织以及高剂量组大脑组织的MDA水平的与D-gal模型组比较都有所降低(表1~3),差异均有统计学意义。说明衰老模型建立成功。与空白组相比,各组高剂量组的GSH-Px活性明显升高(表1、2),SOD活性明显升高(表1~3),MDA含量明显降低(表1~3),差异具有统计学意义。表明油橄榄叶提取物能显著提高体内抗氧化酶活力。

2.3 小鼠肝脏和大脑组织形态学观察

2.3.1 肝脏组织形态学观察

D-gal模型组肝小叶失去正常结构,肝索排列紊

表1 油橄榄叶提取物对血清MDA、SOD、GSH-Px的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 1 Effect of *O. europaea* leaf extracts on serum MDA, SOD, GSH-Px levels ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别 Group	MDA含量 MDA content (nmol/mgprot)	SOD活性 SOD activity (U/mgprot)	GSH-Px活性 GSH-Px activity (U/mgprot)
空白组 Blank group	7.688 ± 0.829 **	186.966 ± 9.622 *	623.273 ± 27.331 *
D-gal模型组 D-gal model group	9.161 ± 0.871 $\Delta\Delta$	171.885 ± 7.339	557.091 ± 30.639 Δ
低剂量组 Low-dose group	7.528 ± 0.886 **	184.881 ± 6.900 *	624.318 ± 40.661 *
中剂量组 Middle-dose group	7.095 ± 0.586 **	187.211 ± 5.553 *	637.091 ± 29.282 **
高剂量组 High-dose group	6.701 ± 1.008 ** Δ	208.582 ± 9.535 ** $\Delta\Delta$	687.272 ± 31.659 ** Δ
VE组 VE group	7.026 ± 0.749 **	196.289 ± 9.096 **	686.234 ± 43.924 ** Δ

注:与D-gal模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note:Compared with the D-gal model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;compared with the control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表2 油橄榄叶提取物对肝组织MDA、SOD、GSH-Px的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of *O. europaea* leaf extracts on liver tissue MDA, SOD, GSH-Px levels($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别 Group	MDA含量 MDA content (nmol/mgprot)	SOD活性 SOD activity (U/mgprot)	GSH-Px活性 GSH-Px activity (U/mgprot)
空白组 Blank group	13.709 ± 2.940 **	225.112 ± 18.895 **	1056.005 ± 132.816 **
D-gal模型组 D-gal model group	17.857 ± 2.633 $\Delta\Delta$	197.935 ± 21.009 $\Delta\Delta$	730.548 ± 91.874 $\Delta\Delta$
低剂量组 Low-dose group	12.326 ± 1.779 **	220.774 ± 16.660 **	1001.592 ± 135.919 **
中剂量组 Middle-dose group	13.289 ± 0.999 **	227.978 ± 21.329 **	1116.662 ± 187.780 **
高剂量组 High-dose group	11.973 ± 2.135 **	241.021 ± 16.119 **	1201.431 ± 147.418 ** Δ
VE组 VE group	12.209 ± 1.563 **	222.302 ± 17.907 **	1191.421 ± 118.863 ** Δ

注:与D-gal模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note:Compared with the D-gal model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;compared with the control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表3 油橄榄叶提取物对脑组织的MDA、SOD的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 3 Effect of *O. europaea* leaf extracts on brain tissue MDA and SOD levels($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别 Group	MDA含量 MDA content (nmol/mgprot)	SOD活性 SOD activity (U/mgprot)
空白组 Blank group	12.184 ± 0.730 *	125.141 ± 12.420 *
D-gal模型组 D-gal model group	13.122 ± 0.626 Δ	107.973 ± 10.020 Δ
低剂量组 Low-dose group	12.733 ± 0.996	124.746 ± 14.535 *

中剂量组 Middle-dose group	12.391 ± 0.747	137.544 ± 15.964 **
高剂量组 High-dose group	12.196 ± 0.854 *	138.885 ± 13.496 **
VE 组 VE group	12.123 ± 1.031 *	124.291 ± 15.847 *

注:与 D-gal 模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: Compared with the D-gal model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

乱,肝细胞弥漫水肿,界限不清,胞浆疏松化或呈空泡样变,细胞形态不规则,排列不整齐,可见点状坏死,肝血窦变狭窄,血管外周间隙增大(图 3B)。油橄榄叶提取物低、中、高剂量组肝小叶结构、肝细胞索排列、肝细胞水肿、细胞增生程度与 D-gal 模型组相比,逐步恢复,并随油橄榄叶提取物剂量的增加,恢复程度也逐渐增加(图 3 C、D、E);VE 组肝小叶结构基本恢复正常,肝细胞索排列规则,细胞轻度增生(图 3F)。

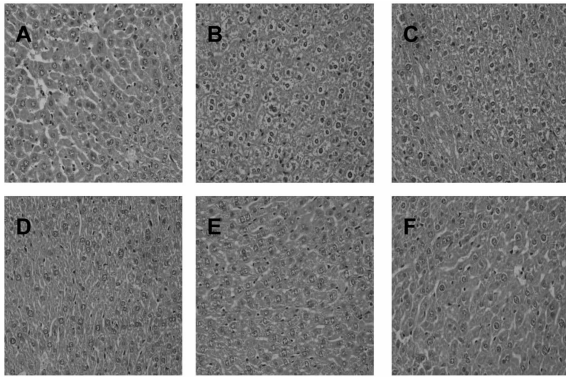


图 3 空白组(A)、D-gal 模型组(B)、低剂量组(C)、中剂量组(D)、高剂量组(E)及 VE 组(F)肝脏组织 HE 染色照片(10 × 40)

Fig. 3 HE staining images of liver tissues from blank (A), D-gal model (B), low-dose (C), middle-dose (D), high-dose (E) and VE groups (10 × 40)

2.3.2 大脑组织形态学观察

2.3.2.1 小鼠大脑皮层形态学观察

D-gal 模型组神经元细胞排列稀疏紊乱,椎体细胞数量少,细胞脱失明显,甚至仅见少量残存的不规则细胞,并出现细胞核溶解,细胞轮廓不清晰,胞浆疏松,并有炎性细胞浸润(图 4B)。油橄榄叶提取物低、中、高剂量组神经元细胞数量较多,细胞核多是中间位,可见少量细胞固缩,并随着油橄榄叶提取物剂量的增大,恢复程度逐渐增加(图 4 C、D、E)。VE 组神经元细胞基本恢复,数量较多,形态基本正常,细胞核多是中间位,可见少量细胞固缩(图 4 F)。

2.3.2.2 小鼠大脑海马结构形态学观察

D-gal 模型组小鼠海马锥体细胞排列稀疏紊乱,

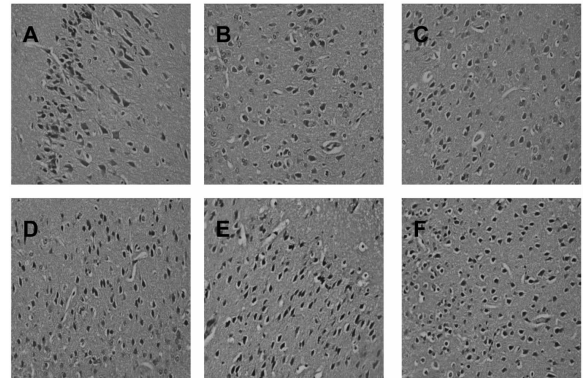


图 4 空白组(A)、D-gal 模型组(B)、低剂量组(C)、中剂量组(D)、高剂量组(E)及 VE 组(F)大脑皮层 HE 染色照片(10 × 40)

Fig. 4 HE staining images of cerebral cortex from blank (A), D-gal model (B), low-dose (C), middle-dose (D), high-dose (E) and VE groups (10 × 40)

细胞脱失明显,甚至仅见少量残存的不规则细胞,较多神经元出现核固缩、溶解,细胞间隙扩大,排列松散,细胞轮廓不清晰,胞质染色呈深红色(图 5B)。油橄榄叶提取物低、中、高剂量小鼠海马齿状回区细胞结构相对完整,细胞形态良好,无明显变性细胞,并随着油橄榄叶提取物剂量的增大,恢复程度逐渐

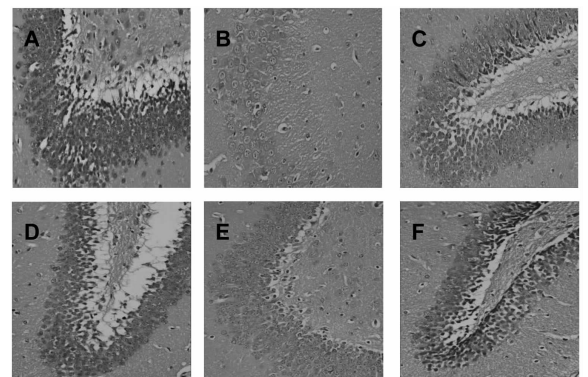


图 5 空白组(A)、D-gal 模型组(B)、低剂量组(C)、中剂量组(D)、高剂量组(E)及 VE 组(F)海马结构 HE 染色照片(10 × 40)

Fig. 5 HE staining images of hippocampal structure from blank (A), D-gal model (B), low-dose (C), middle-dose (D), high-dose (E) and VE groups (10 × 40)

增加(图5 C、D、E)。VE组小鼠大脑海马齿状回区基本恢复,锥体细胞排列整齐、紧密,层次丰富,形态正常,无变性,核大而圆,细胞质丰富(图5F)。

3 讨论

3.1 油橄榄叶提取物的抗氧化作用

体外实验结果表明,油橄榄叶提取物能有效地清除 DPPH· 和 ·OH。体内实验结果表明,油橄榄叶提取物能降低小鼠血清、肝脏和脑组织中的 MDA 含量,增加小鼠血清和肝脏组织中 SOD 和 GSH-Px 的活性,增加小鼠脑组织中 SOD 的活性,且呈剂量-效应关系,提示油橄榄叶提取物可能通过提高机体抗氧化酶的活性达到清除自由基的目的,从而增强了机体的抗氧化能力。体内、体外及病理形态学的结果都说明油橄榄叶提取物具有较好的抗氧化活性。

3.2 油橄榄叶提取物各成分间的抗氧化协同作用

油橄榄叶提取物除含有 22.3% 的橄榄苦苷,还有木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷和羟基酪醇醋酸酯^[17]等多种抗氧化活性成分。Benavente^[18]等研究报道,油橄榄叶提取物的 Trolox 当量抗氧化能力(TEAC)值比理论上提取物中其他酚类活性物质相加的平均 TEAC 值高出 72%,表明油橄榄多酚清除自由基能力具有协同作用;Mylonaki^[19]等对油橄榄叶提取物的总多酚和其抗自由基活性值之间做了简单线性回归分析,结果显示了低的相关性,无统计学差异($R^2 = 0.273, P > 0.05$),这表明它不是纯粹的多酚类物质提供高抗氧化能力,相反,这种效力可能是通过各种酚类成分之间的相互作用。因此,提示油橄榄叶提取物的抗氧化能力可能呈协同作用,即油橄榄叶提取物中的多种抗氧化活性成分共同协作,在机体内发挥较强的抗氧化功能。根据以上研究结果,本实验中油橄榄叶提取物对衰老小鼠的抗氧化作用通过多种抗氧化成分共同作用,因而抗氧化能力较强。建议在今后对油橄榄叶的进一步加工和应用时,保留油橄榄叶提取物多种活性成分。

综上所述,油橄榄叶提取物具有较好的抗氧化功能,其机制与清除体内自由基,增加体内抗氧化酶活性有关。本实验对油橄榄叶提取物抗氧化功能的研究,为深入研究其抗氧化机制提供理论基础,为天然药物和保健食品的研究和开发提供理论和临床依据。

参考文献

- Han HB(韩华柏), He F(何方). The olive introduction of research progress in our country. *South China Fruits*(中国南方果树), 2007, 36(3): 37-42.
- Verberne L, Bach-Faig A, Buckland G, et al. Association between the mediterranean diet and cancer risk; a review of observational studies. *Nutr Cancer*, 2010, 62: 860-870.
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, et al. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New Eng J Med*, 2003, 348: 2599-2608.
- Paiva-Martins F, Fernandes J, Rocha S, et al. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mole Nutr Food Res*, 2009, 53: 609-616.
- Blekas G, Vassilakis C, Harizanis C, et al. Biophenols in table olives. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 3688-3692.
- Wang CZ(王成章), Gao CX(高彩霞), Jiang CY(姜成英). Chemical composition and processing of olive. *China Forest Sci Technol*(林业科技开发), 2006, 20(2): 1-4.
- Bianco A, Uccella N. Biophenolic components of olives. *Food Res Int*, 2000, 33: 475-485.
- Tasioula-Margari M, Okogeri O. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS. *J Food Sci*, 2001, 66: 530-534.
- Bulotta S, Corradino R, Celano M, et al. Antioxidant and antitumor action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *J Mol Endocrinol*, 2013, 51: 181-189.
- Samet I, Han J, Jlaiei L, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 927619.
- Khayyal MT, El-ghazaly MA, Abdallah DM, et al. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-Name induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*, 2002, 52: 797-802.
- Al-Azzawie HF, Alhamdani M-S S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*, 2006, 78: 1371-1377.
- Coban J, Öztezcan S, Dođru-Abbasođlu S, et al. Olive leaf extract decreases age-induced oxidative stress in major organs of aged rats. *Geriatr Gerontol Int*, 2014, 14: 996-1002.
- Xu YM(徐月敏), Liu Y(刘毅), Liu YF(刘永峰), et al. Study on activities for scavenging free radicals of deer blood oligopeptides. *Food Ind*(食品工业), 2014, 35: 172-175.