

枸杞叶、果的抗氧化和抗 DNA 损伤活性研究

全娜¹,王琦¹,李宣仪¹,杨晓华²,朱春燕¹,张华峰^{1*}

¹中俄食品与健康科学国际联合研究中心 西北濒危药材资源开发国家工程实验室 陕西师范大学食品工程与营养科学学院,西安 710119;²卫生部法医学重点实验室 西安交通大学医学部,西安 710061

摘要:采用苯酚-硫酸比色法、Folin-Ciocalteu 比色法、AlCl₃ 显色法测定了枸杞叶、果不同溶剂提取物中活性成分的含量,采用 ABTS 和 DPPH 方法分析了枸杞叶、果提取物的抗氧化活性,采用质粒 DNA 方法研究了抗 DNA 损伤活性。结果表明:枸杞叶、果不同溶剂提取物中活性成分的含量不同。枸杞叶的抗氧化活性高于枸杞果。枸杞叶、果甲醇提取物的 EC₅₀ 值最低 (ABTS:0.69,2.04;DPPH:0.03,0.52),乙醇提取物次之 (ABTS:0.70,2.08;DPPH:0.04,0.57),水提取物最高 (ABTS:0.95,2.08;DPPH:0.05,0.62),说明甲醇提取物具有较强的抗氧化能力。枸杞叶甲醇提取物的 DNA 保护作用强于枸杞果。多酚和黄酮类化合物可能是枸杞叶、果抗氧化和抗 DNA 损伤活性的物质基础。本研究为枸杞资源的科学开发和综合利用提供了参考。

关键词:枸杞叶;枸杞果;提取物;抗氧化活性;DNA 损伤;活性成分

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.1.023

Antioxidant Capacity and Inhibitory Activity against DNA Damage of *Lycium barbarum* Leaves and Fruits

QUAN Na¹, WANG Qi¹, LI Xuan-yi¹, YANG Xiao-hua², ZHU Chun-yan¹, ZHANG Hua-feng^{1*}

¹International Joint Research Center of Shaanxi Province for Food and Health Sciences, National Engineering Laboratory for Resources Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China, College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China; ²Key Laboratory of Ministry of Health for Forensic Sciences, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Contents of polysaccharides, polyphenols and flavonoids in leaves and fruits of *Lycium barbarum* were determined by phenol-sulfuric acid method, Folin-Ciocalteu reagent method and AlCl₃ colorimetric method, respectively. Antioxidant capacities of different extracts from *L. barbarum* were evaluated by ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assays. In addition, the inhibitory activity against DNA damage of leaves and fruits were analyzed using plasmid DNA method. Concentrations of bioactive constituents varied across different extracts from leaves and fruits. Antioxidant activities of leaves were higher than those of fruits. Methanol extract from leaves and fruits possessed the lowest EC₅₀ value (ABTS:0.69,2.04;DPPH:0.03,0.52), followed by ethanol extract (ABTS:0.70,2.08;DPPH:0.04,0.57) and aqueous extract (ABTS:0.95,2.08;DPPH:0.05,0.62), which suggested the highest antioxidant activity of methanol extract. DNA damage protection activity of methanol extract from leaves was higher than that from fruits. Antioxidant capacity and inhibitory activity against DNA damage of leaves and fruits was possibly attributed to their polyphenols and flavonoids. The present research was helpful for the scientific exploitation and comprehensive utilization of *L. barbarum* resource.

Key words: *Lycium barbarum* leaf; *Lycium barbarum* fruit; extract; antioxidant activity; DNA damage; bioactive constituent

氧化应激 (Oxidative stress) 可能导致 DNA 损

伤^[1]。DNA 是机体最重要的遗传物质, DNA 损伤可能引起癌症、不育、免疫力低下、帕金森症、衰老等^[2,3]。植物是天然抗氧化剂的主要来源, 研究植物提取物的抗氧化活性和抗 DNA 损伤活性具有重要的应用价值^[4]。枸杞 (*Lycium barbarum*) 是茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 多年生落叶小灌

收稿日期:2017-08-28 接受日期:2017-10-09

基金项目:陕西省-青海省科技合作项目(2014SJ-01);陕西省科学技术研究发展计划(2016SF-350);中央高校基本科研业务费专项资金(GK2016CSZ008,GK20170 3076)

* 通信作者 Tel:86-29-85310517; E-mail: isaacsau@sohu.com

木^[5]。据《名医别录》记载,枸杞“冬采根,春夏采叶,秋采茎实”。枸杞的嫩茎和叶片统称为枸杞叶,在我国西北地区常作为蔬菜、茶叶食用^[5]。枸杞的果实又称枸杞果、枸杞子,在医药、食品领域中具有重要用途^[6]。祖国医学认为,枸杞叶可用于治疗五劳七伤、目涩有翳、阳气衰、腰脚疼痛等疾病,枸杞果可用于治疗虚劳精亏、腰膝酸痛、眩晕耳鸣、内热消渴、血虚萎黄等疾病。Liu 等采用离子交换层析法从枸杞叶中分离得到的多糖组分具有促进脾细胞增殖、提高免疫力等功效^[7]。目前有关枸杞果的研究较多^[8],而有关枸杞叶的研究较少^[5,9]。本研究制备了枸杞叶和枸杞果的乙醇提取物、甲醇提取物与水提物,测定了不同提取物中黄酮类化合物、多酚和多糖的含量,采用 ABTS [2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐] 和 DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 方法分析了枸杞叶、果不同提取物的抗氧化活性,研究了枸杞叶、果的抗 DNA 损伤活性,以期对枸杞资源的科学开发和综合利用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 植物材料与试剂

枸杞叶、果购自银川育新枸杞种业有限公司;抗坏血酸(Vc,纯度 $\geq 99\%$)、芦丁(纯度 $\geq 95\%$)、没食子酸(纯度 $\geq 99\%$)、DPPH、ABTS 购自美国 Sigma 公司;葡萄糖、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为分析纯,购自天津市天力化学试剂有限公司;无水乙醇、甲醇、苯酚、浓硫酸为分析纯,购自西安斯迈尔试剂仪器经营部; H_2O_2 、正丁醇、氯仿为分析纯,购自天津市富宇精细化工有限公司;琼脂糖购自上海典君生物技术有限公司;溴化乙锭、TAE 缓冲液(由三羟甲基氨基甲烷、醋酸和 EDTA 组成)购自上海双博生物科技有限公司;上样缓冲液(由丙三醇、溴酚蓝、EDTA 组成)购自上海双博生物科技有限公司;PBS 缓冲液(磷酸盐缓冲液,pH=7.4)等购自西安科昊生物工程有限责任公司;pBR322 质粒购自日本 Takara Bio 株式会社。

1.2 仪器与设备

电泳凝胶染色、脱色与移动装置(专利号 ZL201420201636.8):本实验室自主研发^[10];全自动凝胶成像分析系统(QUANTUM ST4):法国 Vilber 公司;电泳仪(DYY-4):北京六一生物科技有限公司;全数字式超声波清洗机(JPCQ0328):武汉嘉鹏电子有限公司;紫外可见分光光度计(TU-1810):北京普

析通用公司;真空冷冻干燥机(LGJ-18C):北京四环科学仪器厂。

2 实验方法

2.1 枸杞叶、果提取物制备方法

2.1.1 枸杞叶、果前处理

用蒸馏水清洗枸杞叶和枸杞果,热风干燥(50℃)至恒重。粉碎过筛(80目),烘干(50℃)后置密闭容器中保存(备用)。

2.1.2 乙醇提取物制备

参考 Cao 等的方法制备枸杞叶、果的乙醇提取物^[11]。分别称取适量的枸杞叶、果样品粉末,按照 1:50(g/mL)固液比加入 50% (v/v) 乙醇溶液,先在 50℃ 条件下温浴 2 h,后超声波辅助提取 20 min。在 4000 rpm 条件下离心 10 min,取上清液,用 0.45 μm 有机系滤膜过滤后冷冻干燥,即得乙醇提取物。

2.1.3 甲醇提取物制备

参考 Kriengsak 等的方法制备枸杞叶、果的甲醇提取物^[12]。分别称取枸杞叶、果样品粉末,按照 3:25(g/mL)固液比加入 50% 甲醇溶液(v/v),在 4℃ 条件下浸提 12 h。然后在 4000 rpm 条件下离心 10 min,取上清液,过滤(0.45 μm 有机系滤膜)后冷冻干燥。

2.1.4 水提物制备

参考 Maran 等的方法制备枸杞叶、果的水提物^[13]。分别称取枸杞叶、果样品粉末,按照固液比 1:20(g/mL)的比例加入蒸馏水,在提取温度为 65℃ 条件下超声波辅助提取 20 min。然后在 4000 rpm 条件下离心 10 min,取上清液,过滤(0.45 μm 水系滤膜)后冷冻干燥。

2.2 定量分析方法

2.2.1 黄酮类化合物含量测定

采用 AlCl_3 显色法测定枸杞叶、果提取物中黄酮类化合物的含量^[14]。用芦丁作为比色对照物,配制芦丁梯度标准溶液(0、80、120、160、200、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$),各加入甲醇和 CH_3COONa 溶液(1M),6 min 后再加入 AlCl_3 溶液(10%),显色 30 min 后在 430 nm 波长处测定吸光度。以芦丁浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 0.0020x - 0.0230$, R^2 为 0.998。按照同样方法测定提取物样品溶液的吸光度,代入回归方程即可计算出黄酮类化合物含量。每个样品设 3 个重复。

2.2.2 多酚含量测定

采用 Folin-Ciocalteu 比色法测定多酚含量^[15]。用没食子酸作为比色对照物,配制没食子酸梯度标准溶液(0、50、60、80、100、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$),各加入 Folin-Ciocalteu 试剂,5 min 后再加入 Na_2CO_3 溶液(100 g/L),反应 15 min 后在 765 nm 波长处测定吸光度。以没食子酸浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 0.0055x + 0.0131$, R^2 为 0.994。按照同样方法测定样品溶液的吸光度,代入回归方程即可计算出多酚含量。每个样品设 3 个重复。

2.2.3 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸比色法测定多糖含量^[16]。用葡萄糖作为比色对照物,以葡萄糖浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 0.0118x - 0.0231$, R^2 为 0.994。测定样品溶液的吸光度,代入回归方程即可计算出多糖含量。每个样品设 3 个重复。

2.3 抗氧化实验方法

按照 Yang 等的方法测定枸杞叶、果不同提取物对 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 、 DPPH^{\cdot} 自由基的清除率并计算半数有效浓度(EC_{50})^[11]。用 Vc 作为阳性对照,每个实验设 3 个重复。

2.4 抗 DNA 损伤实验

参考 Jeong 等和 Yang 等的方法测定枸杞叶、果甲醇提取物的抗 DNA 损伤活性^[17,1]。在反应管中加入 5 μL 的 PBS 缓冲液(10 mM)、2 μL 的硫酸亚铁溶液(1 mM)、2 μL 的 H_2O_2 溶液(1 mM)、10 μL

的提取物样品溶液和 1 μL 的 pBR322 质粒(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),充分混合后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min。然后加入 5 μL 上样缓冲液终止反应,用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳分离。电泳结束后用溴化乙锭溶液对凝胶进行染色,置全自动凝胶成像分析系统中观察、拍照。

2.5 统计分析

实验数据的录入、计算和绘图等采用 Excel 2010 软件。显著性分析采用 SPSS 13.0 软件,显著性分析采用最小显著差数(LSD)的 t 检验方法, $P < 0.05$ 和 $P > 0.05$ 分别表示统计学显著和不显著。

3 结果与分析

3.1 枸杞叶、果提取物的化学组成

3.1.1 枸杞果提取物中活性成分的含量

由表 1 可知,枸杞果水提物、乙醇提取物、甲醇提取物中含量最高的活性成分皆为多糖,其质量占到提取物总量的 1/2 左右。3 种提取物中含量最低的活性成分为黄酮类化合物。水提物、甲醇提取物中多糖的含量显著高于乙醇提取物($P < 0.05$),水提物和甲醇提取物之间的差异不显著($P > 0.05$)。甲醇提取物中黄酮类化合物的含量显著高于水提物和乙醇提取物($P < 0.05$),水提物与乙醇提取物的差异较小($P > 0.05$)。甲醇提取物中多酚的含量显著高于乙醇提取物($P < 0.05$),甲醇提取物与水提物之间以及水提物与乙醇提取物之间的差异不大($P > 0.05$)。

表 1 枸杞果不同提取物中活性成分的含量

Table 1 Contents of bioactive constituents in different extracts from *L. barbarum* fruits

| 样品 Sample | 活性成分含量 Contents of bioactive constituents (mg/g) | | |
|------------------------|--|------------------------------|--------------------------------|
| | 多糖 Polysaccharides | 黄酮类化合物 Flavonoids | 多酚 Polyphenols |
| 水提物 Aqueous extract | 538.89 \pm 2.37 ^a | 1.79 \pm 1.81 ^b | 14.19 \pm 1.64 ^{ab} |
| 乙醇提取物 Ethanol extract | 427.68 \pm 3.25 ^b | 1.92 \pm 1.91 ^b | 13.77 \pm 0.26 ^b |
| 甲醇提取物 Methanol extract | 555.76 \pm 0.99 ^a | 2.30 \pm 2.35 ^a | 14.40 \pm 2.44 ^a |

注:每列数值右侧的不同上标表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different superscript letters in each column mean significant differences ($P < 0.05$).

3.1.2 枸杞叶提取物中活性成分的含量

由表 2 可知,枸杞叶乙醇提取物中多糖、多酚的含量与甲醇提取物差异不大($P > 0.05$),但是乙醇提取物、甲醇提取物的多糖、多酚含量均显著高于水

提物($P < 0.05$)。甲醇提取物中黄酮类化合物的含量最高(62.45 \pm 4.49 mg/g),乙醇提取物次之(55.33 \pm 0.65 mg/g),水提物最低(44.17 \pm 2.46 mg/g),3 种提取物之间存在显著差异($P < 0.05$)。

由表 1、表 2 还可看出,枸杞果提取物中多糖的含量显著高于枸杞叶 ($P < 0.05$),但其黄酮类化合物和多酚的含量均显著低于枸杞叶 ($P < 0.05$),这说明枸杞不同器官中活性成分的含量差异很大。总体上看,枸杞叶、果的甲醇提取物中 3 种活性成分的

含量普遍高于水提物。Alimpic 等在比较研究鼠尾草 (*Salvia amplexicaulis*) 不同提取物中多酚的含量和活性时也发现,甲醇提取物中多酚的含量明显高于水提物和乙醇提取物^[18]。

表 2 枸杞叶不同提取物中活性成分的含量

Table 2 Contents of bioactive constituents in different extracts from *L. barbarum* leaves

| 样品 Sample | 活性成分含量 Contents of bioactive constituents (mg/g) | | |
|------------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| | 多糖 Polysaccharides | 黄酮类化合物 Flavonoids | 多酚 Polyphenols |
| 水提物 Aqueous extract | 112.38 ± 2.66 ^b | 44.17 ± 2.46 ^c | 77.84 ± 1.11 ^b |
| 乙醇提取物 Ethanol extract | 145.20 ± 4.68 ^a | 55.33 ± 0.65 ^b | 86.50 ± 2.02 ^a |
| 甲醇提取物 Methanol extract | 144.39 ± 1.28 ^a | 62.45 ± 4.49 ^a | 89.53 ± 2.38 ^a |

注:每列数值右侧的不同上标表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different superscript letters in each column mean significant differences ($P < 0.05$)

3.2 枸杞叶、果的抗氧化活性

3.2.1 枸杞果不同提取物的自由基清除活性

在试验浓度范围内,枸杞果水提物、乙醇提取物和甲醇提取物的 ABTS^{·+} 和 DPPH[·] 自由基清除率均随着提取物浓度的增加而升高(图 1),枸杞果不同溶剂提取物的浓度与自由基清除率之间呈现出良好的量效关系, R^2 在 0.985-0.999 之间(表 3),说明枸杞果提取物具有一定的抗氧化活性。这与 Zhang

等的研究结果基本一致^[19]。在 3 种枸杞果提取物中,甲醇提取物的 EC_{50} 值最低 (ABTS: 2.04; DPPH: 0.52),乙醇提取物次之 (ABTS: 2.08; DPPH: 0.57),水提物最高 (ABTS: 2.08; DPPH: 0.62),表明枸杞果甲醇提取物的自由基清除能力最强。Šamec 等在比较研究绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum*) 水提物与甲醇提取物的化学成分和生物活性时发现,甲醇提取物中多酚的含量高于水提物,其抗氧化活性也较

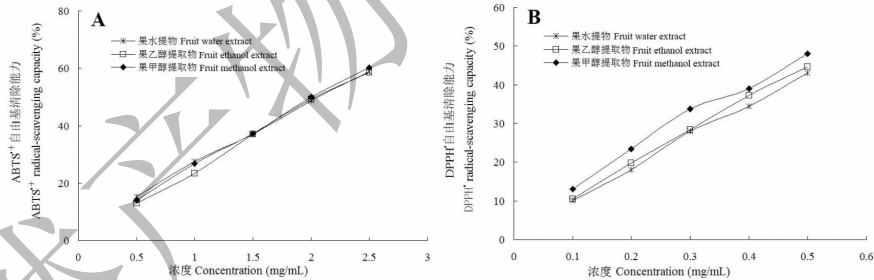


图 1 枸杞果对 ABTS^{·+} (A) 和 DPPH[·] (B) 自由基的清除能力

Fig. 1 ABTS^{·+} and DPPH[·] radical-scavenging activities of *L. barbarum* fruits

表 3 枸杞果不同提取物的抗氧化活性及其量效关系数学模型

Table 3 Antioxidant activity and mathematical model of dose-effect relationship of different extracts of *L. barbarum* fruits

| 物质种类 Substance | ABTS 实验 ABTS assay | | EC_{50} (mg/mL) | DPPH 实验 DPPH assay | | EC_{50} (mg/mL) |
|------------------------|-----------------------|-------|----------------------|-----------------------|-------|-----------------------|
| | 拟合方程 Fit equation | R^2 | | 拟合方程 Fit equation | R^2 | |
| Vc | $y = 0.010x - 0.021$ | 0.995 | 0.05 | $y = 11.800x + 0.813$ | 0.998 | 4.17×10^{-3} |
| 水提物 Aqueous extract | $y = 21.713x + 4.899$ | 0.999 | 2.08 | $y = 0.075x + 3.769$ | 0.985 | 0.62 |
| 乙醇提取物 Ethanol extract | $y = 23.410x + 1.140$ | 0.997 | 2.08 | $y = 0.082x + 3.190$ | 0.997 | 0.57 |
| 甲醇提取物 Methanol extract | $y = 23.087x + 3.004$ | 0.999 | 2.04 | $y = 0.086x + 5.701$ | 0.988 | 0.52 |

注:拟合方程中, x 、 y 分别代表物质浓度 (mg/mL)、自由基清除率 (%)。

Note: In fit equation, x and y represented substance concentration (mg/mL) and radical-scavenging activity (%), respectively.

高^[20]。植物多酚和黄酮类化合物通常具有较强的抗氧化能力^[19,21]。枸杞果甲醇提取物中多酚和黄酮类化合物的含量均高于水提物和乙醇提取物(表1),这可能是甲醇提取物抗氧化能力最强的原因。

3.2.2 枸杞叶不同提取物的自由基清除活性

由图2可见,在试验浓度范围内,枸杞叶不同溶剂提取物的 ABTS^{·+} 和 DPPH[·] 自由基清除能力也呈现出明显的剂量依赖性,即自由基清除率随着提取物浓度的增加而升高。由表4可知,3种提取物浓度与自由基清除率之间拟合方程的 R^2 在 0.996-0.999 之间,说明拟合方程能较好地反映量效关系。从表4还可看出,枸杞叶甲醇提取物的 EC_{50} 值最低

(ABTS: 0.69; DPPH: 0.03),乙醇提取物次之 (ABTS: 0.70; DPPH: 0.04),水提物最高 (ABTS: 0.95; DPPH: 0.05),表明枸杞叶甲醇提取物的自由基清除能力优于乙醇提取物和水提物。由表2可知,枸杞叶甲醇提取物中多酚、黄酮类化合物含量均高于乙醇提取物和水提物,这可能是甲醇提取物抗氧化活性较高的主要原因。

由表3、表4还可看出,枸杞叶、果的甲醇提取物具有较强的抗氧化能力,枸杞叶不同溶剂提取物的抗氧化活性明显高于相对应的枸杞果提取物。从抗氧化活性角度来看,枸杞叶具有较好的开发利用潜力。

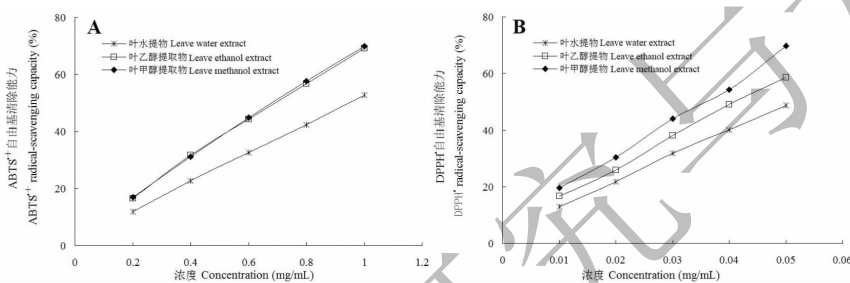


图2 枸杞叶对 ABTS^{·+} (A) 和 DPPH[·] (B) 自由基的清除能力

Fig. 2 ABTS^{·+} and DPPH[·] radical-scavenging activities of *L. barbarum* leaves

表4 枸杞叶不同提取物的抗氧化活性及其量效关系数学模型

Table 4 Antioxidant activity and mathematical model of dose-effect relationship of different extracts of *L. barbarum* leaves

| 物质种类 Substance | ABTS 实验 ABTS assay | | EC_{50} (mg/mL) | DPPH 实验 DPPH assay | | EC_{50} (mg/mL) |
|------------------------|-----------------------|-------|----------------------|-----------------------|-------|-----------------------|
| | 拟合方程 Fit equation | R^2 | | 拟合方程 Fit equation | R^2 | |
| Vc | $y = 0.010x - 0.021$ | 0.995 | 0.05 | $y = 11.800x + 0.813$ | 0.998 | 4.17×10^{-3} |
| 水提物 Aqueous extract | $y = 50.900x + 1.906$ | 0.999 | 0.95 | $y = 0.886x + 4.397$ | 0.999 | 0.05 |
| 乙醇提取物 Ethanol extract | $y = 65.266x + 4.550$ | 0.998 | 0.70 | $y = 1.070x + 5.632$ | 0.998 | 0.04 |
| 甲醇提取物 Methanol extract | $y = 66.250x + 4.385$ | 0.999 | 0.69 | $y = 1.243x + 6.317$ | 0.996 | 0.03 |

注:拟合方程中, x 、 y 分别代表物质浓度 (mg/mL)、自由基清除率 (%)。

Note: In fit equation, x and y represent substance concentration (mg/mL) and radical-scavenging activity (%), respectively.

3.3 枸杞叶、果的抗 DNA 损伤活性

在上述自由基清除实验基础上,采用质粒 DNA 方法研究了枸杞叶、果甲醇提取物的抗 DNA 损伤活性。正常的质粒 DNA 为双螺旋结构,当 DNA 受到 H_2O_2 等氧化应激破坏时,双螺旋结构会打开变成开环结构,如果破坏程度比较剧烈的话,还会进一步变成线性结构^[17,22]。由图3可见,通道11中双螺旋条带的亮度最高,表明质粒 DNA 结构基本完整。加入 H_2O_2 后,开环条带的亮度最高,线性条带次之,

双螺旋条带最低,说明氧化应激对 DNA 双螺旋结构产生了严重破坏(通道1)。添加抗氧化剂 Vc 后,双螺旋条带的亮度明显增加,开环条带和线性条带的亮度明显降低(通道8-10),说明 Vc 对 DNA 具有一定的保护效应,这与文献报道的结果相一致^[23,24]。在枸杞果甲醇提取物处理组,通道3中双螺旋条带的亮度高于通道2和通道4,通道2和通道4中开环条带的亮度高于通道3,通道2中线性条带的亮度高于通道3和通道4,提示枸杞果甲醇提取物对

DNA 也具有一定的保护作用。在枸杞叶甲醇提取物处理组,通道 7 和通道 6 中双螺旋条带的亮度高于通道 5,通道 5 中开环条带的亮度高于通道 6 和通道 7,线性条带的亮度由高到低依次为:通道 5 > 通道 6 > 通道 7,提示枸杞叶甲醇提取物对 DNA 亦具有一定的保护作用。总体上看,枸杞叶甲醇提取物处理组中双螺旋条带的亮度高于枸杞果甲醇提取物处理组,枸杞叶甲醇提取物处理组中线性条带的亮度低于枸杞果甲醇提取物处理组,阳性对照中开环条带、线性条带的亮度低于枸杞叶甲醇提取物处理组和枸杞果甲醇提取物处理组,提示枸杞叶甲醇提取物的 DNA 保护作用强于枸杞果甲醇提取物,但

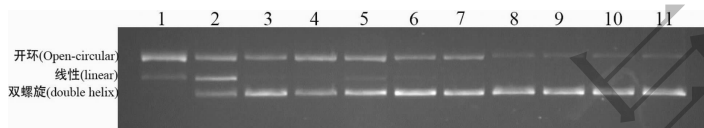


图 3 枸杞叶、果抗 DNA 损伤的凝胶电泳实验图谱

Fig. 3 Gel electrophoresis experiment map of *L. barbarum* leaves and fruits against DNA damage

注:通道 1 为阴性对照,通道 2、3、4 为枸杞果甲醇提取物的低、中、高浓度处理组,通道 5、6、7 为枸杞叶甲醇提取物的低、中、高浓度处理组,通道 8、9、10 为 Vc 的低、中、高浓度处理组(阳性对照),通道 11 为质粒 DNA

Note: Lane 1, negative control; Lanes 2, 3 and 4, methanol extracts at low, medium and high concentrations from *L. barbarum* fruits; Lanes 5, 6 and 7, methanol extracts at low, medium and high concentrations from *L. barbarum* leaves; Lanes 8, 9 and 10, Vc at low, medium and high concentrations (positive control); Lane 11, native plasmid DNA.

4 结论

枸杞叶乙醇提取物、甲醇提取物的多糖、多酚含量均显著高于水提物,甲醇提取物中黄酮类化合物的含量显著高于乙醇提取物和水提物。枸杞果水提物、甲醇提取物中多糖的含量显著高于乙醇提取物,甲醇提取物中黄酮类化合物的含量显著高于水提物和乙醇提取物,甲醇提取物中多酚的含量显著高于乙醇提取物。枸杞果提取物中多糖的含量显著高于枸杞叶,但其黄酮类化合物和多酚的含量明显低于枸杞叶。枸杞叶、果不同溶剂提取物均具有一定的 ABTS^{·+} 和 DPPH[·] 自由基清除能力。其中,甲醇提取物的 EC₅₀ 值最低,乙醇提取物次之,水提物最高,说明甲醇提取物具有较强的抗氧化能力。枸杞叶的抗氧化活性高于枸杞果。枸杞叶、果的抗氧化活性呈现出明显的剂量依赖性,基于量效关系建立的数学模型具有较高的拟合度。枸杞叶、果的甲醇提取物均具有一定的抗 DNA 损伤活性,枸杞叶的 DNA 保护作用强于枸杞果。枸杞叶、果的抗氧化活性与抗 DNA 损伤活性之间可能存在着相关性,多酚和黄

两者的抗 DNA 损伤活性均低于 Vc。枸杞叶、果甲醇提取物抗 DNA 损伤活性的趋势与两者清除 ABTS^{·+} 和 DPPH[·] 自由基能力的趋势相一致(表 3 和表 4)。Salar 等在研究大麦(*Hordeum vulgare*)提取物时发现,自由基清除能力较强的大麦品种(BH-393 和 BH902)也具有较高的抗 DNA 损伤活性^[24],这与本研究结果基本一致。枸杞叶、果甲醇提取物的抗氧化活性与抗 DNA 损伤活性之间可能存在着相关性,甲醇提取物对 DNA 的保护作用可能是通过其对氧化应激的抑制效应来实现的,多酚和黄酮类化合物可能是该抑制效应的物质基础。

酮类化合物可能是抗氧化、抗 DNA 损伤活性的物质基础。本研究对枸杞资源的开发利用具有一定的参考意义。

参考文献

- 1 Yang J, Zhang HF, Cao XY, *et al.* Enzymatic water extraction of polysaccharides from *Epimedium brevicornu* and their antioxidant activity and protective effect against DNA damage [J]. *J Food Biochem*, 2017, 41(1): e12298.
- 2 Moser B, Szekeres T, Bieglmayer C, *et al.* Impact of spinach consumption on DNA stability in peripheral lymphocytes and on biochemical blood parameters: results of a human intervention trial [J]. *Eur J Nutr*, 2011, 50: 587-594.
- 3 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease [J]. *Nature*, 2009, 461: 1071-1078.
- 4 Zhang HF (张华峰), Li L (李璐), Zhang X (张翔), *et al.* Content and antioxidant activities of polysaccharides in 5 species of the family of Berberidaceae [J]. *Fine Chem* (精细化工), 2014, 31: 174-178.
- 5 Zhang HF (张华峰), Yang XH (杨晓华). Bioactive substances in *Lycium* leaves and their application in food industry [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 31:

- 369-373.
- 6 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2015, Vol I: 249-249.
 - 7 Liu HH, Fan YL, Wang WH, *et al.* Polysaccharides from *Lycium barbarum* leaves: isolation, characterization and splenocyte proliferation activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51: 417-422.
 - 8 Yang RF, Zhao C, Chen X, *et al.* Chemical properties and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum*) polysaccharides extracted by different methods [J]. *J Func Foods*, 2015, 17: 903-909.
 - 9 Gong GP, Fan JB, Sun YJ, *et al.* Isolation, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharide LBLP5-A from *Lycium barbarum* leaves [J]. *Process Biochem*, 2016, 51: 314-324.
 - 10 Yang XH (杨晓华), Lai JH (赖江华), Zhang HF (张华峰). Staining, decoloring and transferring apparatus (电泳凝胶染色、脱色与移动装置) [P]. ZL201420201636. 8, 2014-11-5.
 - 11 Cao JG, Xia X, Dai XL, *et al.* Flavonoids profiles, antioxidant, acetylcholinesterase inhibition activities of extract from *Dryothyrium boryanum* (Willd.) Ching [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55: 121-128.
 - 12 Kriengsak T, Unaraj B, Kevin C, *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. *J Food Compos Anal*, 2006, 19: 669-675.
 - 13 Maran JP, Manikandan S, Nivetha CV, *et al.* Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design [J]. *Arab J Chem*, 2017, 10: 1145-1157.
 - 14 Abdennacer B, Karim M, Yassine M, *et al.* Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss [J]. *Food Chem*, 2015, 174: 577-584.
 - 15 Zarzecka K, Gugafa M, Sikorska A, *et al.* The effect of herbicides and biostimulants on polyphenol content of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and leaves [J]. *J Saudi Soc Agric Sci*, 2017, Accepted.
 - 16 Zhang HF, Niu LL, Yang XH, *et al.* Analysis of water-soluble polysaccharides in an edible medicinal plant *Epimedium*: method development, validation, and application [J]. *J AOAC Int*, 2014, 97: 784-790.
 - 17 Jeong JB, Park JH, Lee HK, *et al.* Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 525-529.
 - 18 Alimpic A, Knežević A, Milutinović M, *et al.* Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts [J]. *Ind Crop Prod*, 2017, 105 (4): 1-9.
 - 19 Zhang QY, Chen WW, Zhao JH, *et al.* Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes [J]. *Food Chem*, 2016, 200: 230-236.
 - 20 Šamec D, Valek-Žulj L, Martínez S, *et al.* Phenolic acids significantly contribute to antioxidant potency of *Gynostemma pentaphyllum* aqueous and methanol extracts [J]. *Ind Crop Prod*, 2016, 84: 104-107.
 - 21 Li XC, Wu XT, Huang L. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix *Angelicae Sinensis* (Danggui) [J]. *Molecules*, 2009, 14: 5349-5361.
 - 22 Prakash D, Singh BN, Upadhyay G. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*) [J]. *Food Chem*, 2007, 102: 1389-1393.
 - 23 Jimenez L, Alarcón E, Trevithick Sutton C, *et al.* Effect of γ -radiation on green onion DNA integrity: role of ascorbic acid and polyphenols against nucleic acid damage [J]. *Food Chem*, 2011, 128: 735-741.
 - 24 Salar RK, Purewal SS, Sandhu KS. Relationships between DNA damage protection activity, total phenolic content, condensed tannin content and antioxidant potential among Indian barley cultivars [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2017, Accepted.