

# 油橄榄叶甲醇提取物多酚成分、抗氧化及抑癌活性研究

黄智, 罗思源, 刘莉, 陈涛, 丁春邦, 冯士令\*

四川农业大学生命科学院, 雅安 625014

**摘要:**以油橄榄叶为材料, 利用 HPLC 测定其甲醇提取物 (EOL) 中多酚成分, 并通过秀丽线虫和 HeLa 细胞探究其抗氧化及抗肿瘤活性。结果表明, EOL 中含芦丁、木犀草素-4'-*O*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷、木犀草素和芹菜素 5 种主要多酚成分。EOL 显著提高秀丽线虫抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性, 降低 MDA 水平, 使其氧化应激存活率提升了 72.52%。此外, EOL 通过上调 Caspase 9 和 Caspase 3 活性抑制 HeLa 细胞增殖, 且肿瘤细胞抑制率呈现浓度和时间依赖型。因此, EOL 具有开发为抗氧化和抑癌药物的潜力。

**关键词:**油橄榄叶; 多酚; 秀丽线虫; 抗氧化活性; HeLa 细胞

中图分类号: Q949.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0001-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.001

## Study on polyphenols, antioxidant and anticancer activities of methanol extract from olive leaves

HUANG Zhi, LUO Si-yuan, LIU Li, CHEN Tao, DING Chun-bang, FENG Shi-ling\*

College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

**Abstract:** The methanol extract of olive leaves (EOL) was obtained by ultrasonic-assisted method. The polyphenols of EOL were determined by HPLC, and their antioxidant and anti-tumor activities were explored by *Caenorhabditis elegans* and HeLa cells. The results showed that EOL contains 5 main polyphenol components including rutin, luteolin-4'-*O*-glucoside, apigenin-7-*O*-glucoside, luteolin and apigenin. EOL significantly increased the antioxidant enzyme activities of SOD, CAT and GSH-Px, decreased the level of MDA, and increased the survival rate of *C. elegans* under oxidative stress by 72.52%. In addition, HeLa cells were treated with different EOL concentrations to determine the inhibition rate of HeLa cells and the underlying anti-tumor mechanism of EOL was also explored. The results showed that EOL inhibited the proliferation of HeLa cells by up-regulating the activities of Caspase 9 and Caspase 3, and the tumor cells inhibition rate was concentration and time-dependent. Therefore, EOL has the potential to be developed as an antioxidant and anticancer drug.

**Key words:** olive leaf; polyphenols; *C. elegans*; antioxidant activity; HeLa cells

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 为木犀科木犀榄属常绿乔木, 原产于地中海沿岸, 20 世纪 60 年代引进中国。据统计, 全世界有近 9 亿棵橄榄树, 平均一株油橄榄树每年约产 12 ~ 30 kg 废叶, 这些废叶的利用率不高, 主要处理方式为抛弃和焚烧, 造成资源浪费和环境污染<sup>[1]</sup>。研究表明, 油橄榄叶中主要活性成分为多酚类化合物, 而且多酚含量远比果实中高<sup>[2,3]</sup>。植物多酚类化合物已被证实具有较强的抗氧化活性, 可清除过多的自由基, 进而缓解细胞氧化损伤。油橄榄叶多酚有助于调节血糖及血压, 减少低

密度脂蛋白的氧化<sup>[4-7]</sup>。与油橄榄果相比, 其叶的利用率较低, 因此可以作为一种廉价的多酚类化合物来源。

本课题组前期试验已证明油橄榄叶甲醇提取物 (EOL) 可以很好地清除 DPPH 自由基和超氧自由基<sup>[8]</sup>。但对于 EOL 体内抗氧化活性的研究甚少。Wang 等<sup>[9]</sup>发现 EOL 对 HeLa 细胞的生长有很好的抑制作用, 但对其抑癌机理尚未研究。因此, 本试验以废弃的油橄榄叶为研究对象, 采用 HPLC 检测其酚类成分及含量, 以模式生物秀丽线虫为模型, 探究 EOL 对急性氧化胁迫下线虫存活率及相关抗氧化酶活性的影响, 分析了 EOL 对 HeLa 细胞增殖的抑制率及抗肿瘤机理, 以此来评估 EOL 的体内抗氧化

收稿日期: 2021-03-22 接受日期: 2021-04-16

基金项目: 四川省科技计划 (2020YFH0207)

\* 通信作者 Tel: 86-015196564796; E-mail: fsl@sicau.edu.cn

活性和抗肿瘤活性,为油橄榄叶后续产品的开发提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器设备

Agilent 1260 型高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司);RE-2000B 旋转蒸发器(上海荣亚生化仪器),KQ-300KDE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);Spec-tramax M2 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

### 1.2 材料与试剂

油橄榄叶材料采摘自四川西昌北河油橄榄种植基地。橄榄叶样品用蒸馏水冲洗干净后于 45 °C 下烘干并研磨成细粉过 60 目筛,放置-20 °C 保存备用。

野生型秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*) N2 及大肠杆菌(*Escherichia coli*) OP50 由美国秀丽线虫遗传中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)惠赠。HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)来源于四川农业大学生命科学学院生物工程系。

各单体多酚标准品(美国 Sigma 公司);甲醇、磷酸、乙腈、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等(成都科龙化工试剂厂)。

### 1.3 油橄榄叶甲醇提取物(EOL)的制备

将 100 g 油橄榄叶粉末溶于 5 L 甲醇,采用超声波辅助提取,超声温度 45 °C,提取时间 60 min,功率 400 W。提取液经抽滤后使用旋转蒸发器浓缩并真空干燥得 EOL,4 °C 冰箱保存。

### 1.4 EOL 的酚类组成分析及含量测定

通过高效液相色谱法检测 EOL 中的酚类成分。色谱条件:ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm);DAD 检测器;进样量 20 μL;检测波长 350 nm;柱温 30 °C;流量 0.5 mL/min;流动相为(A)含水磷酸(0.15%, V/V)和(B)乙腈(含 0.1% 乙酸, V/V);梯度洗脱程序为:10%→16% B(0~3 min), 16%→30% B(3~20 min), 30%→40% B(20~25 min), 40%→16% B(25~30 min), 和 16%→10% B(30~40 min)。使用标准曲线测定芦丁,木犀草素-4'-O-葡萄糖苷,芹菜素-7-O-葡萄糖苷,木犀草素,槲皮素和芹菜素的含量,所有结果均以 mg/g 表示。

### 1.5 体内抗氧化能力

#### 1.5.1 秀丽线虫的培养

在 20 °C 条件下,用大肠杆菌 OP50 在线虫生长培养基(NGM)琼脂平板上培养线虫。为了尽可能消除样本间的差异,使用次氯酸钠裂解液进行线虫

的同期化处理,获得试验样本。

#### 1.5.2 秀丽线虫存活率测定

前期通过食物清除试验得出 EOL 样品的最适用药浓度为 0.4 mg/mL。线虫氧化应激分析参照 Liao 等<sup>[10]</sup>的方法稍加改动。在次氯酸钠处理后,将虫卵转移到涂有大肠杆菌 OP50 的新鲜 NGM 板上,培养线虫至 L4 期。随后,将 L4 期线虫转移到涂有 0.4 mg/mL EOL 样品的 NGM 板上培养 48 h。然后将处理后的线虫转移到含有 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液的 NGM 板中,在 20 °C 下培养 4 h,然后对线虫的存活情况进行统计。

#### 1.5.3 抗氧化酶的活性和丙二醛含量的测定

将用药处理 48 h 后的 L4 期线虫暴露于 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 环境中,于 20 °C 下培养 1 h。用 M9 缓冲液将虫子从 NGM 上冲洗下来并收集线虫,多次使用 M9 冲洗除去细菌。利用超声波细胞粉碎机(300 W,工作 2 s 间歇 4 s,6 min)在冰上将线虫破碎,离心(12 000 rpm,4 °C,10 min),收集上清液 4 °C 储藏备用。按照试剂盒说明书进行超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)含量测定。

### 1.6 抗肿瘤能力测定

#### 1.6.1 细胞培养

将 HeLa 细胞培养在含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 中。培养箱温度为 37 °C,含有 5% CO<sub>2</sub>。

#### 1.6.2 CCK-8 检测 HeLa 细胞活性

HeLa 细胞长满 80% 细胞瓶时用胰蛋白酶消化下来离心取沉淀备用。用 DMEM 培养基将细胞重悬为 10<sup>5</sup> 个/mL,将 100 μL 细胞悬浮液接种在 96 孔板中培养 6 h。将样品溶解在 DMEM 培养基中,用不同的样品浓度和处理时间对细胞进行处理,再用 100 μL 新鲜生长培养基完全取代 DMEM 培养基。培养 48 h 后,将 10 μL CCK-8 加入细胞孔中,孵育 1 h。最后在 450 nm 处统计细胞存活数。细胞存活率测定公式如下:

$$\text{细胞存活率} = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0) \times 100\%$$

注:其中 A<sub>0</sub> 为仅有加药、CCK-8 溶液和样品溶液的孔的吸光度;A<sub>1</sub> 为加药、CCK-8 溶液和样品溶液的细胞孔的吸光度;A<sub>2</sub> 为只有细胞和 CCK-8 溶液的孔的吸光度。

#### 1.6.3 线粒体膜电位(MMP)和细胞凋亡蛋白的检测

采用 MMP 试剂盒对 HeLa 细胞凋亡进行检测,

将 HeLa 细胞以  $10^6$  个/mL 的浓度接种在 6 孔培养板中,培养 24 h 后,加入 EOL 处理 48 h 后,弃去培养基,加入 400  $\mu$ L JC-10 染色液,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,除去染色液后加入 PBS 洗涤 2 次,根据试剂盒说明书对 MMP 进行检测。采用 Caspase 3 和 Caspase 9 比色测定试剂盒检测细胞中凋亡蛋白的活性,用胰蛋白酶消化 EOL 处理的 HeLa 细胞,得到单细胞悬液。测定前用 PBS 洗涤悬液。

### 1.7 数据处理

采用 GraphPad prism 7.0 对数据进行统计分析并制图,所有数值均以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD)

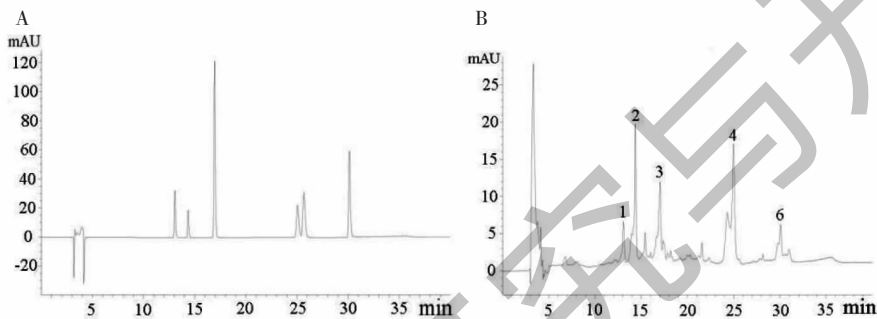


图 1 多酚化合物的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of polyphenols

注:(A)混合物标准品;(B)油橄榄叶提取物;1:芦丁;2:木犀草素-4'-O-葡萄糖苷;3:芹菜素-7-O-葡萄糖苷;4:木犀草素;5:槲皮素;6:芹菜素。Note:(A) Mixtures standard;(B) Olive leaf extract;1:Rutin;2:Luteolin-4'-O-glucoside;3:Apigenin-7-O-glucoside;4:Luteolin;5:Quercetin;6:Apigenin.

## 2.2 EOL 可显著提高秀丽线虫存活率

$H_2O_2$  是活性氧簇 (ROS) 产生的触发因子之一,机体内过量的 ROS 会引起 DNA 突变和蛋白质降解,从而导致衰老和其他慢性疾病<sup>[11]</sup>。大量研究表明,天然植物提取物可以增强秀丽线虫对刺激环境的抵抗力<sup>[12-15]</sup>。因此,为了探究 EOL 对秀丽线虫抗

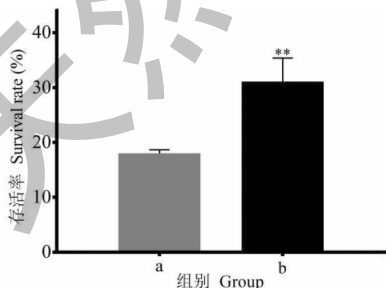


图 2 EOL 对秀丽线虫氧化应激存活率的影响

Fig. 2 The effect of EOL on survival rate of *C. elegans* under oxidative stress

注.:a:空白对照组;b:EOL 处理,下同。Note.:a:Blank control group;b:EOL treatment,the same below.

表示。所有试验均独立重复三次。

## 2 结果与分析

### 2.1 酚类成分分析

根据混合标准品的 HPLC 色谱图,对 EOL 中主要酚类成分进行定性和定量检测。通过与标准品对比,确定的主要酚类成分有:芦丁、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素和芹菜素(见图 1)。各多酚含量依次为:2.95  $\pm$  0.04、10.92  $\pm$  1.42、3.49  $\pm$  0.04、10.58  $\pm$  0.08、0.90  $\pm$  0.01 mg/g。其中木犀草素-4'-O-葡萄糖苷和木犀草素的含量最多。

氧化能力的影响,本试验使用 EOL 对氧化应激下的秀丽线虫进行 48 h 的处理,并检测其存活率。结果表明,EOL 可以使秀丽线虫的存活率显著提高 72.52% (见图 2),显著增强秀丽线虫对氧化应激的抵抗力,缓解氧化损伤。

### 2.3 EOL 增强秀丽线虫体内抗氧化酶活性

当机体处于氧化应激状态时,ROS 会在细胞内迅速积累,致使组织氧化损伤并加速机体死亡。机体的 SOD、CAT 和 GSH-Px 在保护机体免受过量 ROS 损伤过程中起重要作用,能清除机体过量自由基,平衡人体代谢<sup>[16]</sup>。如图 3 所示,经 EOL 处理 48 h 后,与对照组相比,秀丽线虫体内的 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性分别提高 30.97%、10.81%、52.23%。这表明,EOL 可以通过提升机体内抗氧化酶活性从而促进机体内 ROS 的清除,提高机体抗氧化能力。

多酚类物质作为油橄榄果实中主要的天然活性成分,具有抗氧化、抗炎等多种生物活性<sup>[17,18]</sup>。研究表明,油橄榄叶中含有的抗氧化活性成分远多于

果实,橄榄苦苷和类黄酮等多酚类物质是油橄榄叶中的主要活性成分<sup>[19]</sup>。因此,EOL中显著提高秀丽线虫体内抗氧化酶活性的物质与其多酚密切相关。此外,由于EOL中检测出木犀草素4'-O-葡萄糖苷和木犀草素这两种多酚的含量最多,且有报道指出,

这两种多酚具有较强的抗氧化能力<sup>[20,21]</sup>。所以推测EOL在促进内源抗氧化酶活性过程中起主要作用的可能是木犀草素4'-O-葡萄糖苷和木犀草素这两种多酚。

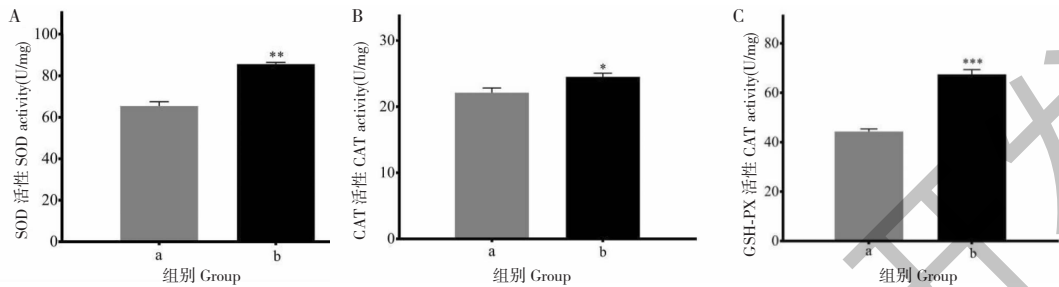


图3 EOL对秀丽线虫的SOD(A)、CAT(B)、GSH-Px(C)影响

Fig. 3 The effects of EOL on SOD (A), CAT (B), GSH-Px (C) in *C. elegans*

## 2.4 EOL降低MDA水平

氧化应激的结果之一是脂质过氧化,它可能引起肿瘤,血管硬化等疾病,从而严重损害人体健康。当过量ROS攻击细胞膜的多不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化产物MDA,MDA与生物大分子发生交联聚合,具有细胞毒性,造成细胞损伤。机体中MDA的含量可以反映脂质过氧化的程度<sup>[22,23]</sup>。基于此,测定了氧化应激下经EOL处理后的秀丽线虫体内的MDA含量。结果如图4所示,经EOL处理48h后,MDA含量较于对照组显著下降74.53%。这表明,EOL可以降低MDA水平,缓解秀丽线虫的氧化损伤程度。

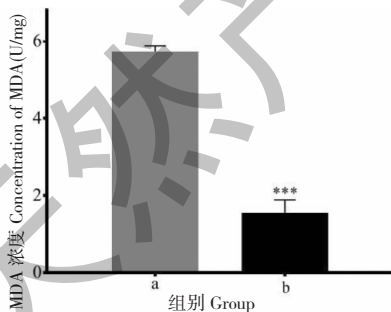


图4 EOL对秀丽线虫MDA含量影响

Fig. 4 Effect of EOL on MDA content of *C. elegans*

## 2.5 EOL可抑制Hela细胞增殖

宫颈癌是一种严重威胁妇女健康的疾病。目前主要通过化学药物进行治疗,具有很大的毒副作用。因此,寻找低毒高效的治疗药物是解决问题的途径之一。因此,本试验采用Hela细胞来评估EOL的

抑癌活性,结果如图5所示,使用浓度0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL的EOL处理24h的抑制率分别为7.36%、27.62%、39.49%、66.38%、92.71%;处理48h的抑制率分别为27.23%、35.39%、57.81%、79.14%、96.73%。这表明EOL对Hela细胞抑制率的影响呈浓度和时间依赖型。据报道,蔗糖及水水果中多酚类化合物可抑制Hela细胞增殖,具有显著的抗肿瘤活性<sup>[24,25]</sup>。此外,富含多酚的EOL可以促进Hela细胞凋亡<sup>[8,26]</sup>。Majumdar等<sup>[27]</sup>研究发现,木犀草素具有较强的抗肿瘤能力,而本研究发现而EOL中含有大量的木犀草素4'-O-葡萄糖苷和木犀草素,故推测EOL在促进Hela细胞凋亡的过程中起主要作用的物质可能是这两种多酚物质。

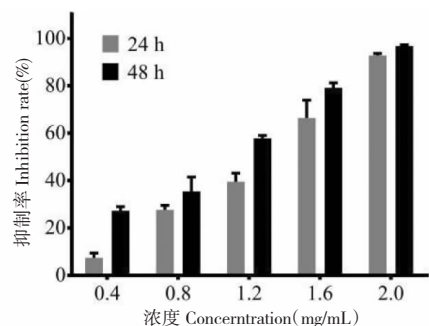


图5 EOL对Hela细胞抑制率的影响

Fig. 5 The effect of EOL on HeLa cell inhibition rate

线粒体膜电位检测试剂盒(JC-10法)是一种以JC-10为荧光探针,快速灵敏地检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位(MMP)变化的试剂盒,可以用于检测细胞凋亡。当MMP较高时,JC-10聚集在线粒

体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;MMP 较低时,JC-10 不能在线粒体基质中聚集,此时 JC-10 为单体,产生绿色荧光。如图 6 所示,用 1.6 和 2.0 mg/mL EOL 处理 HeLa 细胞后的绿色荧光强度明显增强,表明 MMP 水平降低,标志着细胞凋亡。Caspase 3 和 Caspase 9 是细胞凋亡过程中的关键酶,采用试剂盒对 HeLa 细胞中这两种酶活性的检测结果表明,与对照组相比,EOL 处理的 HeLa 细胞的凋亡蛋白活性增强(见图 7)。因此,EOL 可通过线粒体凋亡途径诱导 HeLa 细胞凋亡,从而有效抑制 HeLa 细胞的增殖。

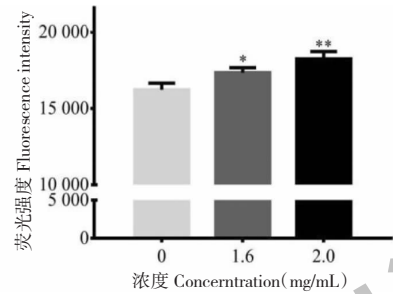


图 6 EOL 对处理 48 h 的 HeLa 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 6 The effect of EOL on mitochondrial membrane potential in HeLa cells treated for 48 h

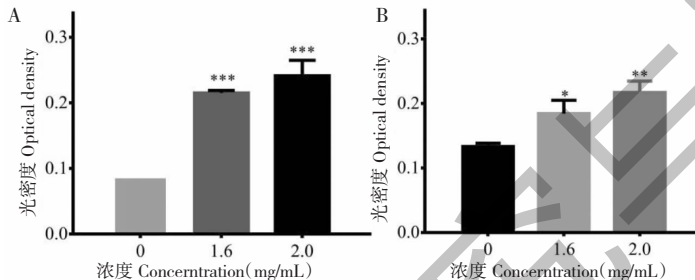


图 7 EOL 对处理 48 h 的 HeLa 细胞 Caspase 9 (A) 和 Caspase 3 (B) 蛋白活性的影响

Fig. 7 The effect of EOL on the activities of Caspase 9 (A) and Caspase 3 (B) proteins in HeLa cells treated for 48 h

### 3 结论

EOL 主要含有芦丁,木犀草素-4'-O-葡萄糖苷,芹菜素-7-O-葡萄糖苷,木犀草素,芹菜素 5 种多酚,其中木犀草素-4'-O-葡萄糖苷和木犀草素的含量较高。抗氧化试验结果表明,EOL 可以显著提高秀丽线虫抗氧化酶活性,降低脂质过氧化产物,使秀丽线虫的氧化应激存活率提升 72.52%,这表明 EOL 具有较强的体内抗氧化能力。抗肿瘤试验结果表明,EOL 可通过提高线粒体凋亡途径中关键酶 Caspase 3 和 Caspase 9 的活性从而促进 HeLa 细胞凋亡,且其对 HeLa 细胞抑制率呈浓度和时间依赖型,这表明 EOL 具有较强的抗肿瘤活性。此次试验可为油橄榄叶的后续探索与开发利用提供数据支撑及理论依据。

### 参考文献

- 1 María DP, Feliciano PC, María DLC. Selective ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of oleuropein to its aglycon in olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts [J]. Food Chem, 2017, 220(1):282-288.
- 2 Wang CZ, Gao CX, Jiang CY, et al. Chemical composition, processing and utilization of *Olea europaea*[J]. J Forest Eng

(林业工程学报),2006,2:1-4.

- 3 Ye JZ, Wang CZ, Chen HX et al. Variation rule of hydroxytyrosol content in olive leaves[J]. Chem Ind Forest Prod(林产化学与工业),2011,31(2):69-74.
- 4 Rao F, Yu TZ, Yi RG, et al. Determination of phenolic contents and antioxidant activities of extracts of *Jatropha curcas* L. seed shell, a by-product, a new source of natural antioxidant[J]. Ind Crop Prod,2014,58:265-270.
- 5 Chen XY, Song W, Tan XF, et al. Optimization of extraction process of polyphenols from fibrous roots of *Bletilla striata* and study on its antioxidant and tyrosinase inhibitory activities[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1134-1142.
- 6 Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease[J]. J Am Oil Chem Soc,1998,75(2):199-212.
- 7 El SN, Karakaya S. Olive tree(*Olea europaea* L.) leaves: potential beneficial effects on human health [J]. Nutr Rev, 2009,67:632-638.
- 8 Luo SY, Jiang XL, Jia LP, et al. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans*[J]. Molecules,2019,24(4):704.
- 9 Wang BX, Qu JP, Luo SY, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from olive (*Olea europaea*

- L.) leaves, and evaluation of their antioxidant and anticancer activities[J]. *Molecules*, 2018, 23(10):2513.
- 10 Liao HC, Yu CW, Chu YJ, et al. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132:480-487.
- 11 Kawagishi H, Finkel T. Unraveling the truth about antioxidants; ROS and disease; finding the right balance [J]. *Nat Med*, 2014, 20:711-713.
- 12 Yuan Z, Dan YM, Jin W, et al. Constituent and effects of polysaccharides isolated from *Sophora moorcroftiana*, seeds on lifespan, reproduction, stress resistance, and antimicrobial capacity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 4(16):252-260.
- 13 Wang H, Zhang XH, Cheng J, et al. Antioxidant effect of purple sweet potato extract in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2017, 38(23):165-170.
- 14 Ishikado A, Sono Y, Matsumoto M, et al. Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans* [J]. *Free Radical Bio Med*, 2013, 65:1506-1515.
- 15 Jena K, Kar PK, Kausar Z, et al. Effects of temperature on modulation of oxidative stress and antioxidant defenses in testes of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* [J]. *J Therm Biol*, 2013, 38(4):199-204.
- 16 Feng SL, Cheng HR, Xu Z, et al. *Panax notoginseng* polysaccharide increases stress resistance and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Funct Foods*, 2018, 45:15-23.
- 17 Wang AH, Long GQ, Wang DD, et al. Research progress on extraction and activity of polyphenols from olive pomace [J]. *Food Res Dev(食品研究与开发)*, 2021, 42(5):219-224.
- 18 Wang HD, Liu J, Liu L, et al. Study on the microwave assisted extraction and antioxidant capacity of polyphenols from olive fruits [J]. *Food Ind Sci Technol(食品工业科技)*, 2015, 36(21):204-209.
- 19 Zheng J, Wei JT, Liu JF, et al. Research progress on biological activities of *Olea europaea* leaf extract [J]. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2016, 41:613-618.
- 20 Kim NM, Kim J, Chung HY, et al. Isolation of Luteolin-7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *artemisia montana* [J]. *Arch Pharm Res*, 2000, 23:237-239.
- 21 Kamali M, Khosroyar S, Kamali H, et al. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant activities of *Dracocephalum kotschy* and determination of its luteolin content [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2016, 6:425-433.
- 22 Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging [J]. *Mech Ageing Dev*, 2004, 125:811-826.
- 23 Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products; malonaldehyde and 4-hydroxynonenal [J]. *Method Enzymol*, 1990, 186:407-421.
- 24 He XM, Sun J, Li L, et al. Antioxidant and antitumor activities of polyphenol compounds from sugarcane top [J]. *Food Ind Sci Technol(食品工业科技)*, 2015, 36(23):343-347.
- 25 Wang GL, Li JK, Wu XX, et al. Extraction and purification of *Debregeasia orientalis* fruit polyphenols and its antioxidant, antitumor activity [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2019, 31(1):1-9.
- 26 Vizza D, Lupinacci S, Toteda G, et al. An olive leaf extract rich in polyphenols promotes apoptosis in cervical cancer cells by upregulating p21<sup>Cip/WAF1</sup> gene expression [J]. *Nutr Cancer*, 2019, 71:320-333.
- 27 Majumdar D, Jung KH, Zhang H, et al. Luteolin nanoparticle in chemoprevention; *in vitro* and *in vivo* anticancer activity [J]. *Cancer Prev Res*, 2014, 7(1):65-73.