

文章编号:2095-6002(2013)06-0021-07

引用格式:袁莉,吴雨晨,任晓萌,等. 荭草素和异荭草素抗氧化活性及对肝癌细胞增殖的影响. 食品科学技术学报,2013,31(6):21-27.

YUAN Li, WU Yu-chen, REN Xiao-meng, et al. Comparison of Antioxidant Activities and Cytotoxicity in HepG2 Cells of Orientin and Isoorientin. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(6):21-27.

荭草素和异荭草素抗氧化活性及对肝癌细胞增殖的影响

袁莉, 吴雨晨, 任晓萌, 刘学波*

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用荭草素和异荭草素标准品,通过测定两者对 DPPH·、ABTS⁺·、H₂O₂·OH 自由基的清除率,脂质过氧化,Cu²⁺/H₂O₂诱导的牛血清蛋白(BSA)和 DNA 氧化损伤及 BSA 蛋白羰基化的抑制作用来评价二者的抗氧化活性,另外用 MTT 法评价了二者对人肝癌(HepG2)细胞生长的影响。结果表明,荭草素和异荭草素均可清除自由基,抑制脂质过氧化、BSA 和 DNA 氧化损伤和 BSA 羰基化,且一定浓度范围内异荭草素的抗氧化活性强于荭草素;另外荭草素和异荭草素可显著抑制 HepG2 细胞增殖,并呈浓度和时间依赖性,且异荭草素的抑制率高于荭草素,说明异荭草素是优于荭草素的有抗癌功效的天然抗氧化剂。

关键词:荭草素; 异荭草素; 体外抗氧化; 氧化损伤; HepG2 细胞

中图分类号: TS201

文献标志码: A

活性氧(ROS)是一类性质非常活泼的含氧物质的总称。在需氧有机体正常代谢过程中伴随有 ROS 的产生,它可作为信号分子维持机体的正常生理功能。机体内 ROS 水平处于动态平衡状态,当机体内 ROS 过量或抗氧化物质不足时,会引起氧化应激,损害生物大分子(如蛋白质、核酸和脂类等)的结构和功能,最终导致机体生理和病理的改变^[1]。据报道,许多重大疾病的发生与机体内 ROS 水平失衡密切相关,如帕金森、阿尔茨海默、肿瘤和肥胖等^[2]。抗氧化物质可通过阻碍自由基产生和干预自由基作用的方式而抑制自由基对机体的伤害,而天然抗氧化剂以其具有安全、高效和无毒副作用等优点而备受关注^[3],所以运用天然抗氧化剂来干预氧化应激相关疾病的发生已成为目前功能食品研究的热点。

荭草素(3', 4', 5, 7-四羟基-8-吡喃葡萄糖基

黄酮)(orientin)和异荭草素(3', 4', 5, 7-四羟基-6-吡喃葡萄糖基黄酮)(isoorientin)是黄酮类物质,互为同分异构体,广泛存在于苦菜、荞麦、山楂和竹笋等^[4-7]食品中。据报道,荭草素和异荭草素具有清除 DPPH 自由基和抗炎的作用,但二者抗氧化性能和对癌细胞活力的影响的研究还不全面^[8-9]。本研究拟探讨荭草素和异荭草素清除自由基、减少蛋白羰基化、预防蛋白和 DNA 氧化的能力及对人肝癌(HepG2)细胞活力的影响,旨在为荭草素和异荭草素在天然抗氧化剂和功能食品领域的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荭草素和异荭草素结构见图 1。

收稿日期:2013-10-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31000757)。

作者简介:袁莉,女,博士研究生,研究方向为营养与功能食品因子;

*刘学波,男,教授,主要从事营养与功能食品因子方面的研究。通讯作者。

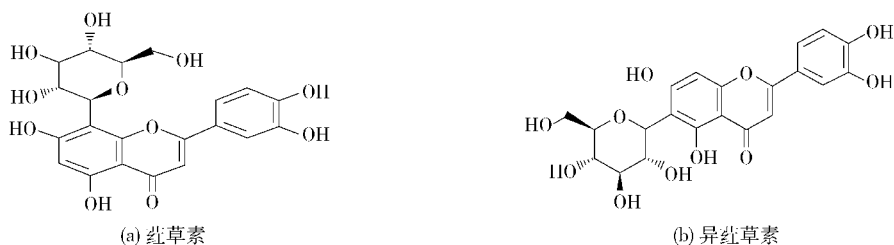


图1 荭草素和异荭草素的结构

Fig. 1 Chemical structure of orientin and isoorientin

荭草素和异荭草素标准品,上海永恒生物技术有限公司,纯度>98%;牛血清白蛋白(BSA)、2,2-二苯基-1-苦味肼基自由基(DPPH·)和2,2-联氮-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-6-磺酸)(ABTS⁺·),美国Sigma公司;Anti-DNP和anti-rabbit,美国Santa Cruz公司;噻唑兰(MTT)、2,4-二硝基苯肼(DNPH),美国Amresco公司;DNA(pBR322),中国碧云天生物技术有限公司;人肝癌HepG2细胞株,第四军医大学细胞库;RPMI-1640培养基和胎牛血清,中国Thermo Fisher公司。

1.2 仪器与设备

UV-1700型紫外分光光度计,日本岛津公司;Model 680型酶标仪,美国伯乐公司;3110型细胞培养箱,美国Thermo Scientific公司;165-8001型垂直电泳槽和Chemi Doc XRS型凝胶成像系统,美国伯乐公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DPPH·自由基的清除实验

参照Faller等^[10]方法并修改。50 μL不同浓度的样品溶液(样品溶液终质量浓度分别为20, 40, 80, 100, 200, 400 μmol/L)与225 μL 100 μmol/L的DPPH·甲醇溶液避光静置反应30 min,后用紫外-可见分光光度计在517 nm波长下测定其吸光度。空白组用超纯水代替样品,对照组用甲醇代替DPPH·甲醇溶液,同时用终浓度为400 μmol/L的Vc溶液的清除能力作对比。按式(1)计算样品对DPPH·的清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中:C为DPPH·的清除率,A₁为实验组的吸光度,A₂为对照组的吸光度,A₀为空白组的吸光度。

1.3.2 ABTS⁺·自由基的清除实验

40 μL不同浓度的样品溶液(样品溶液终浓度分别为1, 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L)与200 μL ABTS工作液避光静置反应6 min,后用紫外-可见分光光度计在734 nm波长下测定吸光度。空白组用超纯

水代替样品,对照组用超纯水代替ABTS工作液。同时用终浓度为80 μmol/L的Vc溶液的清除能力作对比。按式(2)计算样品对ABTS⁺·的清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中:C为ABTS⁺·的清除率,A₁为实验组的吸光度,A₂为对照组的吸光度,A₀为空白组的吸光度。

1.3.3 过氧化氢(H₂O₂)的清除实验

参照乔德亮等^[11]方法并修改。取离心管,分别加入240 μL 0.1 mol/L pH值为7.4的磷酸缓冲液、60 μL 0.04 mol/L H₂O₂和100 μL不同浓度样品溶液(使得样品溶液终浓度分别为0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 μmol/L),涡旋振荡后,室温放置10 min,用紫外-可见分光光度计在230 nm波长下测定其吸光度。同时设定空白组和对照组,空白组是用超纯水代替样品溶液,对照组是用超纯水代替H₂O₂。另外,按照同样方法测定终浓度为5 μmol/L的Vc溶液的清除能力用来对比。

按式(3)计算样品对H₂O₂的清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中:C为H₂O₂的清除率,A₁为实验组的吸光度,A₂为对照组的吸光度,A₀为空白组的吸光度。

1.3.4 对羟基(·OH)自由基的清除

采用Fenton法测定·OH自由基^[12]。50 μL不同浓度样品溶液(样品溶液终浓度分别为0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μmol/L)、100 μL 1.8 mmol/L FeSO₄、75 μL 1.8 mmol/L水杨酸-乙醇溶液和5 μL 0.03% H₂O₂ 37℃水浴孵育30 min后,用紫外-可见分光光度计在510 nm波长下测定其吸光度。空白组用超纯水代替样品溶液,对照组用超纯水代替FeSO₄、水杨酸-乙醇溶液和H₂O₂,同时用终浓度为20 μmol/L的Vc溶液的清除能力作对比。按式(4)计算样品对羟基自由基(·OH)的清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式(4)中: C 为 $\cdot\text{OH}$ 的清除率, A_1 为实验组的吸光度, A_2 为对照组的吸光度, A_0 为空白组的吸光度。

1.3.5 对脂质过氧化的抑制实验

参照 Tsuda 等^[13]方法。20 μL 脂质体(20 mg 卵磷脂,溶于 5 mL 0.05 mol/L pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液中,充氮封口)和 50 μL 不同浓度的样品溶液(样品溶液终浓度分别为:10,100,500,1 000 $\mu\text{mol/L}$)混匀后加入 50 mmol/L FeSO_4 5 μL 并 0.1 mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液补足至体系总体积为 300 μL 。后 37 $^\circ\text{C}$ 水浴温育,40 min 后,分别加入 10% TCA 100 μL 和 0.8% TBA 100 μL ,于 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中敞盖煮沸 15 min,冷却后与 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液用紫外-可见分光光度计在 532 nm 波长下测定其吸光度。空白组用磷酸缓冲液代替样品溶液,对照组用磷酸缓冲液代替 FeSO_4 溶液,同时用终浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Vc 溶液的抑制能力用来对比。按式(5)计算样品对脂质过氧化的抑制率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式(5)中: C 为脂质过氧化抑制率, A_1 为实验组的吸光度, A_2 为对照组的吸光度, A_0 为空白组的吸光度。

1.3.6 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 BSA 蛋白氧化损伤实验

参照 Xiao 等^[14]方法。97 μL BSA (0.6 mg/mL)蛋白溶液和 1 μL 荭草素或异荭草素溶液(样品溶液终浓度分别为 0.001,0.010,0.100,1.000 mmol/L)与室温孵育 30 min,再分别加入 1 μL Cu^{2+} 和 H_2O_2 ,37 $^\circ\text{C}$ 水浴 90 min;同时以 97 μL BSA 溶液与 1 μL 甲醇溶液,2 μL PB 混合液作阳性对照;以 97 μL BSA 溶液、1 μL 甲醇溶液、1 μL Cu^{2+} 和 1 μL H_2O_2 的混合液作为阴性对照。反应结束后,加入 25 μL SDS,95 $^\circ\text{C}$ 水浴 5 min,使蛋白充分变性。同体积的蛋白样品经 10% 聚丙烯凝胶电泳后,0.15% 的考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,脱色过夜,蛋白含量由 Quantity One 4.6.2 软件分析。

1.3.7 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 BSA 蛋白羰基化实验

根据 1.3.6 方法制备蛋白样品,经 10% 聚丙烯凝胶电泳后,10 V,25 min 转印,使凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。膜再与 DNPH 衍生 30 min,2 mol/L HCL 洗涤 3 次,每次 5 min,甲醇洗涤 5 次,每次 5 min。5% 脱脂乳室温封闭 2 h,TBST 洗涤。用 DNP 抗体 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤,anti-rabbit 抗体室温孵育 2 h,TBST 洗涤,化学成像系统观察蛋白质羰基化的产生,并用 Quantity One 4.6.2 软件定量分析。

1.3.8 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导 DNA 氧化损伤

氧化损伤使 DNA 超螺旋断裂成环形结构,参照 Jung 等^[15]的方法测定 DNA 氧化损伤程度。DNA (pBR322) 与荭草素或异荭草素(样品溶液终浓度分别为 10,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min,后与 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (0.1/1 mmol/L)于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 2 h。反应体系与上样缓冲液混合后,1% 琼脂糖以 0.5 $\times$ TBE 缓冲液(Tris 5.4 g,硼酸 2.75 g,EDTA 0.037 2 g,双蒸水 1 000 mL)水平电泳 100 V 30 min 后,用化学成像系统观察 DNA 损伤程度,并用 Quantity One 4.6.2 软件定量分析。

1.3.9 HepG2 细胞活力测定

采用 MTT 法^[16]测定细胞活力。消化收集细胞,细胞计数并调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL,接种到 96 孔板中,每孔 100 μL ,同时设置对照孔,置 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。将荭草素和异荭草素分别用无血清培养基稀释至 20,40,80 $\mu\text{mol/L}$,加入到 96 孔板中,每孔 100 μL ,每组均设 6 复孔,继续培养 24 h 和 48 h 后,每孔加入 100 μL 0.5 mg/mL MTT 溶液(用培养基稀释),37 $^\circ\text{C}$ 作用 4 h 后,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO),用酶标仪于 490 nm 波长下测定每孔 OD 值。按式(6)计算细胞相对存活率:

细胞相对存活率 =

$$\text{处理组 OD 值} / \text{对照组 OD 值} \times 100\% \quad (6)$$

1.4 数据统计

全部实验数据用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 16.0 数据处理系统进行统计处理,计算标准偏差($\pm$ SE)并进行 Duncan's 多重差异显著分析。

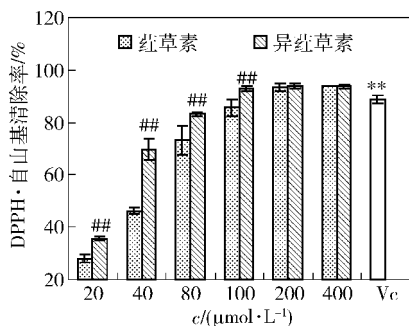
2 结果与分析

2.1 清除自由基的活性测定结果

2.1.1 DPPH $\cdot$ 自由基的清除作用

荭草素和异荭草素对 DPPH $\cdot$ 自由基的清除作用见图2。由图 2 可见,荭草素和异荭草素均具有清除 DPPH $\cdot$ 自由基的能力,并呈浓度依赖性,随着浓度的增加,清除率增加,当浓度增加到一定值时,二者的清除率趋于相当。浓度为 20,40,80,100 $\mu\text{mol/L}$ 时,异荭草素对 DPPH $\cdot$ 自由基的清除率显著($P \leq 0.01$)高于相同浓度荭草素的清除率,分别高于 28.03%,46.32%,73.23% 和 85.59%,说明异荭草素的清除能力明显强于荭草素。当浓度为 200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,荭草素和异荭草素的清除能力无显著差异。与 400 $\mu\text{mol/L}$ Vc 对 DPPH $\cdot$ 自由基的清除能力显著($P \leq 0.01$)低于相同浓度的荭草素和异荭

草素,说明异荳草素清除 DPPH·自由基的能力强于荳草素,且在高浓度下,其清除能力甚至强于同等浓度 Vc 对 DPPH·自由基清除能力。



竖线表示标准误 ($\pm$ SE), ** 表示 Vc 与其他处理具有显著性差异 ($P \leq 0.01$), ## 表示异荳草素与相同浓度荳草素具有显著性差异 ($P \leq 0.01$)

图2 荳草素和异荳草素对 DPPH·自由基的清除率

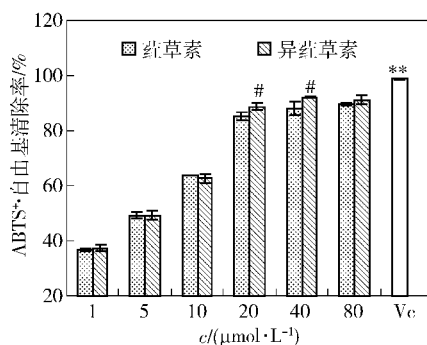
Fig. 2 Scavenging rate of orientin and isoorientin on DPPH· radical

2.1.2 ABTS·⁺自由基的清除作用

荳草素和异荳草素对 ABTS·⁺自由基的清除作用见图3。由图3可见,荳草素和异荳草素均具有清除 ABTS·⁺自由基的能力,且呈浓度依赖性。在低浓度范围内,二者对 ABTS·⁺自由基的清除能力没有显著差异,当浓度为 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,异荳草素对 ABTS·⁺自由基的清除率显著 ($P \leq 0.05$) 高于相同浓度荳草素的清除率,分别高于 85.40% 和 88.08%,说明异荳草素的清除能力明显强于荳草素。80 $\mu\text{mol/L}$ Vc 对 ABTS·⁺自由基的清除能力显著 ($P \leq 0.01$) 高于相同浓度的荳草素和异荳草素,说明高浓度范围内,异荳草素清除 ABTS·⁺自由基的能力高于荳草素,但其清除能力仍低于同等浓度 Vc 的清除能力。

2.1.3 H₂O₂的清除作用

荳草素和异荳草素对 H₂O₂的清除能力见图4。由图4可见,荳草素和异荳草素均有清除 H₂O₂的能力,且异荳草素对 H₂O₂的清除能力始终强于荳草素。当浓度小于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,荳草素对 H₂O₂的清除率呈浓度依赖性。异荳草素对 H₂O₂的清除能力整体呈浓度依赖性,浓度为 0.05, 0.10, 0.50, 5.00 $\mu\text{mol/L}$ 时,异荳草素对 H₂O₂的清除率显著 ($P \leq 0.01$) 高于相同浓度荳草素的清除率,分别高于 24.94%, 28.14%, 31.78% 和 28.59%。当样品浓度为 0.01, 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 时,二者对 H₂O₂的清除能力无显著差异。5.00 $\mu\text{mol/L}$ Vc 清除 H₂O₂的能力显著 ($P \leq 0.01$) 高于相同浓度的荳草素和异荳草素,

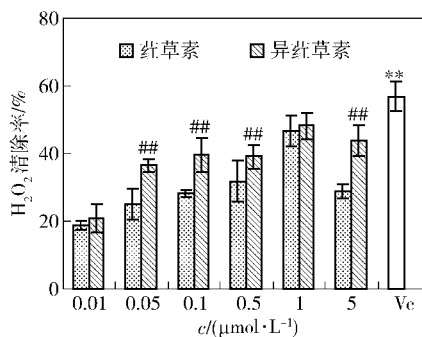


竖线表示标准误 ($\pm$ SE), ** 表示 Vc 与其他处理具有显著性差异 ($P \leq 0.01$), ## 表示异荳草素与相同浓度荳草素具有显著性差异 ($P \leq 0.01$)

图3 荳草素和异荳草素对 ABTS·⁺自由基的清除率

Fig. 3 Scavenging rate of orientin and isoorientin on ABTS·⁺ radical

说明异荳草素清除 H₂O₂的能力强于荳草素,但仍低于同浓度 Vc 对 H₂O₂的清除能力。



竖线表示标准误 ($\pm$ SE), ** 表示 Vc 与其他处理具有显著性差异 ($P \leq 0.01$), ## 表示异荳草素与相同浓度荳草素具有显著性差异 ($P \leq 0.01$)

图4 荳草素和异荳草素对 H₂O₂自由基的清除率

Fig. 4 Scavenging rate of orientin and isoorientin on H₂O₂ radical

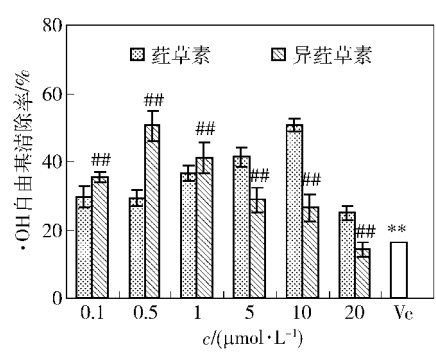
2.1.4 ·OH 自由基的清除作用

荳草素和异荳草素对 ·OH 自由基的清除能力见图5。由图5可以看出,荳草素和异荳草素均具清除 ·OH 自由基的能力,且分别在 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大清除能力。低浓度范围内,异荳草素对 ·OH 自由基的清除能力高于荳草素,当浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,异荳草素对 ·OH 自由基的清除率较荳草素高 21.29% ($P \leq 0.01$)。20 $\mu\text{mol/L}$ Vc 清除 ·OH 自由基的能力显著 ($P \leq 0.01$) 低于同浓度下荳草素对 ·OH 自由基的作用,而高于同浓度下异荳草素的作用。

2.2 保护大分子氧化损伤的活性测定结果

2.2.1 脂质过氧化的抑制作用

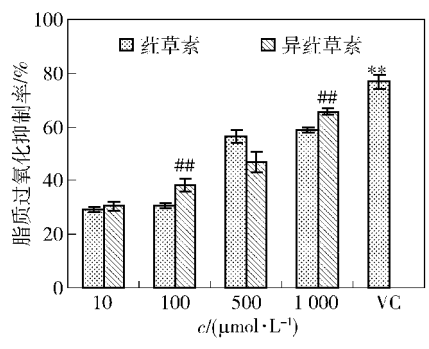
荳草素和异荳草素对脂质过氧化的抑制作用见



竖线表示标准误(±SE),**表示Vc与其他处理具有显著性差异($P\leq 0.01$),##表示异荭草素与相同浓度荭草素具有显著性差异($P\leq 0.01$)

图5 荭草素和异荭草素对·OH自由基的清除率
Fig. 5 Scavenging rate of orientin and isoorientin on ·OH radical

图6. 由图6可见,荭草素和异荭草素都具有抑制脂质过氧化的能力,并呈浓度依赖性.浓度为100,1000 μmol/L时,异荭草素对脂质过氧化的抑制率显著($P\leq 0.01$)高于相同浓度荭草素的抑制率,分别高于30.45%,58.84%.当浓度为10,500 μmol/L时,荭草素和异荭草素的抑制能力无显著差异.1000 μmol/L Vc抑制脂质过氧化的能力显著($P\leq 0.01$)高于各浓度的荭草素和异荭草素,说明Vc抑制脂质过氧化的能力均强于荭草素和异荭草素,而异荭草素抑制脂质过氧化的能力强于荭草素.



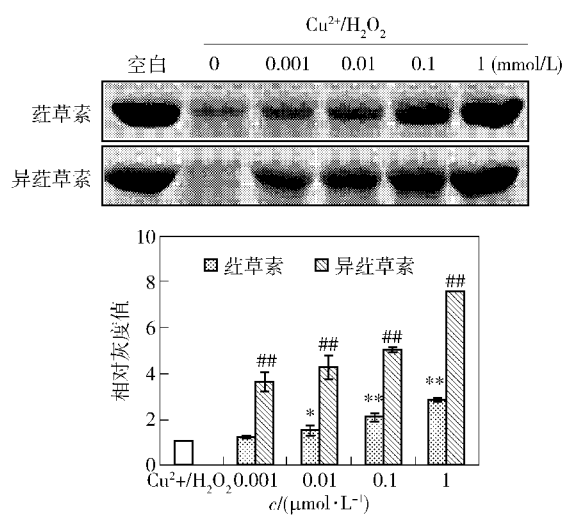
竖线表示标准误(±SE),**表示Vc与其他处理具有显著性差异($P\leq 0.01$),##表示异荭草素与相同浓度荭草素具有显著性差异($P\leq 0.01$).

图6 荭草素和异荭草素对脂质过氧化的清除率
Fig. 6 Scavenging rate of orientin and isoorientin on lipid oxidation

2.2.2 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的牛血清蛋白氧化损伤的保护作用

荭草素和异荭草素对BSA氧化损伤的保护作用见图7.由图7可见,荭草素和异荭草素均具有抑制BSA氧化损伤的能力,并呈浓度依赖性,且异荭草素的保护作用强于荭草素.当样品浓度为0.001,

0.01,0.1,1 mmol/L时,异荭草素对BSA的保护作用显著($P\leq 0.01$)高于相同浓度的荭草素,分别高于66.68%,64.76%,58.45%,62.60%.



竖线表示标准误(±SE),** $P<0.01$ 和* $P<0.05$ 表示荭草素与对照有显著性差异,## $P<0.01$ 表示异荭草素与对照和相同浓度荭草素有显著性差异

图7 荭草素和异荭草素对 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的BSA氧化损伤的保护作用

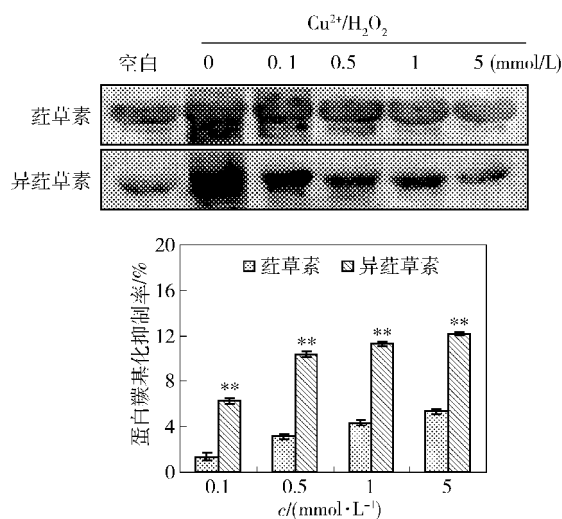
Fig. 7 Protective effect of orientin and isoorientin on $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ -induced BSA oxidative damage

2.2.3 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的BSA蛋白羰基化的抑制作用

荭草素和异荭草素对 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的蛋白羰基化的抑制情况见图8.由图8中可以看出,荭草素和异荭草素都具有抑制蛋白羰基化的能力,并呈浓度依赖性,即随着浓度的增加,对于蛋白羰基化的抑制作用越强,且异荭草素的抑制作用强于荭草素.当样品浓度为0.1,0.5,1,5 mmol/L时,异荭草素对蛋白羰基化的抑制作用显著($P\leq 0.01$)高于相同浓度的荭草素的抑制作用,分别高于1.38%,3.13%,4.32%和5.35%.

2.2.4 对 $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的DNA氧化损伤的保护作用

荭草素和异荭草素对DNA氧化损伤的保护作用见图9.由图9可见,荭草素和异荭草素均具有保护DNA氧化损伤的能力,并呈浓度依赖性,随着浓度的增加,剩余超螺旋DNA的百分比越多,即对DNA保护作用越强.浓度为10 μmol/L时,荭草素和异荭草素处理组的超螺旋DNA含量与对照组没有无显著性差异.浓度为50 μmol/L时,荭草素和异荭草素处理组的超螺旋DNA含量显著($P\leq 0.01$)多于对照组的含量,说明荭草素和异荭草素

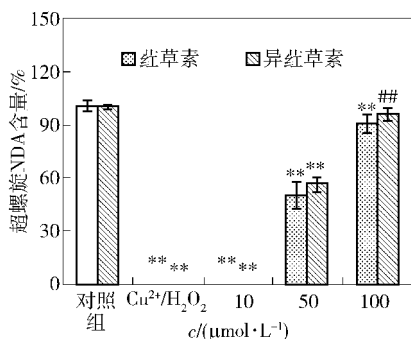


竖线表示标准误 ($\pm$ SE), * * $P < 0.01$ 表示异茺菪素与对照和相同浓度茺菪素有显著性差异。

图 8 茺菪素和异茺菪素对 Cu^{2+}/H_2O_2 诱导的蛋白羰基化的抑制率

Fig. 8 Inhibition of orientin and isoorientin on Cu^{2+}/H_2O_2 -induced BSA protein carbonyls

对 DNA 氧化损伤有保护作用。浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时,异茺菪素处理组的超螺旋形 DNA 含量高于相同浓度茺菪素处理组的含量 5.4%,具有显著性 ($P \leq 0.01$) 差异。



竖线表示标准误 ($\pm$ SE), * * $P < 0.01$ 表示与对照有显著性差异, ## $P < 0.01$ 表示与相同浓度茺菪素有显著性差异。

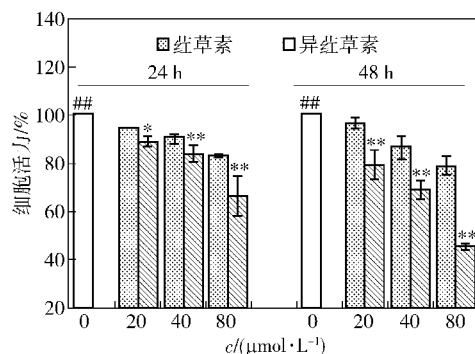
图 9 茺菪素和异茺菪素对 Cu^{2+}/H_2O_2 诱导的 DNA 氧化损伤的保护作用

Fig. 9 Inhibition of orientin and isoorientin on Cu^{2+}/H_2O_2 -induced BSA protein carbonyls

2.3 对 HepG2 细胞活力的影响

茺菪素和异茺菪素对 HepG2 细胞活力的影响见图 10。由图 10 可见,茺菪素和异茺菪素均可降低 HepG2 细胞活力,并呈浓度和时间依赖性,且异茺菪素效果显著强于茺菪素。80 $\mu\text{mol/L}$ 异茺菪素处理细胞 24 h 和 48 h 时,细胞活力较同浓度茺菪素处理相同时间后细胞活力分别低于 16.57%,

33.69%,存在显著性 ($P < 0.01$) 差异。



竖线表示标准误 ($\pm$ SE), * * $P < 0.01$ 和 * $P < 0.05$ 表示与相同浓度茺菪素有显著性差异, ## $P < 0.01$ 表示与其他处理有显著性差异。

图 10 茺菪素和异茺菪素对 HepG2 细胞活力的影响

Fig. 10 Effect of orientin and isoorientin on HepG2 cell viability

3 结 论

茺菪素和异茺菪素可显著的清除 DPPH·、ABTS·+、 H_2O_2 、·OH 自由基;并有效抑制 Cu^{2+}/H_2O_2 诱导的脂质过氧化、BSA 氧化损伤、BSA 蛋白羰基化和 DNA 氧化损伤;另外,茺菪素和异茺菪素可显著抑制 HepG2 细胞生长,且异茺菪素抗氧化能力和抑制癌细胞增殖的效果明显优于茺菪素。关于茺菪素和异茺菪素抑制癌细胞增殖的作用机制,以及二者的其他生物功效还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 李勇,孔令青,高洪,等. 自由基与疾病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88.
- [2] Brieger K, Schiavone S, Miller F J Jr, et al. Reactive oxygen species: from health to disease [J]. Swiss Med Wkly, 2012, 142: 13659.
- [3] Van den Ende W, Peshev D, De Gara L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract [J]. Trends in Food Science Technology, 2011, 22(12): 689-697.
- [4] Tunalier Z, Koşar M, Küpeli E, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts [J]. J Ethnopharmacology, 2007, 110: 539-547.
- [5] Watanabe W. An anthocyanin compound in buckwheat sprouts and its contribution to antioxidant capacity [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71: 579-582.
- [6] Prinz S, Ring A, Huefner A, et al. 4''-acetyl vitexin-2''-

- O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxy-kaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *crataegus monogyna* and *crataegus pentagyna* from *crataegus laevigata* [J]. *Chem Biodivers*, 2007(4): 2920–2931.
- [7] Yong-Chun J, Lin Y, Yuan K. A novel high-performance liquid chromatography fingerprint approach to discriminate *Phyllostachys pubescens* from China [J]. *Pharmacogn Mag*, 2012(8): 42–48.
- [8] Park H S, Lim J H, Kim H J, et al. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *sasa borealis* [J]. *Arch. Pharm Res*, 2007, 30(2): 161–166.
- [9] Conforti F, Rigano D, Menichini F, et al. Protection against neurodegenerative diseases of *iris pseudopumila* extracts and their constituents fitoterapia [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80: 62–67.
- [10] Faller A L K, Fialho E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23(6): 561–568.
- [11] 乔德亮, 赵峰, 黄海忠, 等. 双孢蘑菇多糖超声波辅助提取及体外抗氧化活性 [J]. *中药材*, 2012, 35(8): 1340–1347.
- [12] 陆海峰, 罗建华, 蒙春越, 等. 蒲公英总黄酮提取及对羟自由基清除作用 [J]. *广州化工*, 2009, 37(3): 101–103.
- [13] Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, et al. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- beta. -D-glucoside and cyaniding [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(11): 2407–2410.
- [14] Xiao H F, Wang Y T, Xiang Q S, et al. Novel physiological properties of ethanol extracts from *Eremurus chinensis* Fedtsch. roots: in vitro antioxidant and anticancer activities [J]. *Food Function*, 2012, 3(12): 1310–1318.
- [15] Jung Y J, Surh Y J. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid [J]. *Free Radical BiolMed*, 2001, 30: 1407–1417.
- [16] Liu X B, Yamada N, Maruyama W, et al. Formation of dopamine adducts derived from brain polyunsaturated fatty acids [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(12): 34887–34895.

Comparison of Antioxidant Activities and Cytotoxicity in HepG2 Cells of Orientin and Isoorientin

YUAN Li, WU Yu-chen, REN Xiao-meng, LIU Xue-bo*

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this study, the effects of orientin and isoorientin on radical-scavenging activities (DPPH·, ABTS⁺·, H₂O₂, ·OH), lipid peroxidation, Cu²⁺/H₂O₂ induced BSA and DNA oxidative damage, and BSA protein carbonyls were investigated. The results showed that orientin and isoorientin exhibited high radical-scavenging activities and also effectively protected biological macromolecules including proteins, lipids, and DNA against oxidative damage induced by Cu²⁺/H₂O₂. Moreover, the MTT assay revealed that orientin and isoorientin inhibited proliferation of HepG2 cells in a dose and time dependent manner, and the antioxidant and anticancer activities of isoorientin was much better than that of orientin. These results demonstrate the remarkable potentiality of isoorientin as a valuable nature antioxidant possessing original anticancer abilities.

Key words: orientin; isoorientin; antioxidant; oxidative damage; HepG2 cells

(责任编辑:叶红波)