

高春燕, 郭琦, 李媛丽, 等. 不同采收期虫草参多酚对羟基自由基介导的 DNA 氧化损伤保护作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 119–127. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040062

GAO Chunyan, GUO Qi, LI Yuanli, et al. Hydroxy Radical Mediated DNA Oxidative Damage Protective Effect of Polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. at Different Harvest Times[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 119–127. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040062

· 研究与探讨 ·

不同采收期虫草参多酚对羟基自由基介导的 DNA 氧化损伤保护作用的研究

高春燕¹, 郭琦², 李媛丽², 李望², 卢跃红^{1,*}

(1. 北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏银川 750021;

2. 大理大学公共卫生学院, 云南大理 671000)

摘要: 采用 Folin-酚法测定两个采收地 (S1 和 S2) 三个采收期 (T1、T2 和 T3) 虫草参游离酚和结合酚提取物的多酚含量。采用 HPLC 法检测多酚提取物中没食子酸、绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸的含量。同时, 评价了虫草参多酚提取物对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 介导的 DNA 氧化损伤的保护作用。结果显示, 虫草参游离酚和结合酚提取物的多酚含量范围分别为 86.53~181.40 和 89.70~193.58 $\mu\text{g GAE/mg}$; 咖啡酸在结合酚中含量较高, 且 S2 采收地高于 S1; 而迷迭香酸在游离酚中含量较高, 且在 T1 和 T3 采收期, S2 采收地的高于 S1, 相反在 T2 采收期, S2 采收地的低于 S1; 虫草参游离酚 (25~300 $\mu\text{g/mL}$) 和结合酚 (3.125~50 $\mu\text{g/mL}$) 提取物对 DNA 氧化损伤保护作用的双螺旋百分比范围分别为 1.81%~55.04% 和 1.67%~70.83%。相较于游离酚, 结合酚提取物表现出更好的保护效果。

关键词: 虫草参, 多酚, 自由基, DNA 氧化损伤, 保护作用

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)01-0119-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040062

本文网刊:



Hydroxy Radical Mediated DNA Oxidative Damage Protective Effect of Polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. at Different Harvest Times

GAO Chunyan¹, GUO Qi², LI Yuanli², LI Wang², LU Yuehong^{1,*}

(1. College of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China;

2. College of Public Health, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: The phenolic content of free and bound phenolic extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. harvested from two sites (S1 and S2) at three different times (T1, T2 and T3) was determined by Folin-Ciocalteu method. The content of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and rosmarinic acid in the phenolic extracts was detected by HPLC. Meanwhile, the protective effect of polyphenolic extracts on $\cdot\text{OH}$ mediated DNA oxidative damage was evaluated. The results revealed that the phenolic contents of free and bound phenolic extracts were in the range of 86.53~181.40 and 89.70~193.58 $\mu\text{g GAE/mg}$, respectively. Higher amount of caffeic acid was found in the bound phenolic extract and the content of S2 *L. lucidus* Turcz. was higher than that of S1. Where as higher amount of rosmarinic acid was observed in the free phenolic extract. Furthermore, the rosmarinic acid content in S2 *L. lucidus* Turcz. was higher than that of S1 at T1 and T3. On the contrary, lower rosmarinic acid content was detected in S2 *L. lucidus* Turcz. at T2. The contents of caffeic acid and rosmarinic acid varied greatly with the harvest sites. The percentage of DNA double helices of free (25~300 $\mu\text{g/mL}$) and bound phenolic extracts (3.125~50 $\mu\text{g/mL}$) were in the range of 1.81%~55.04% and 1.67%~70.83%, respectively. The DNA damage protective effect of bound phenolics was higher than that of free phenolics.

收稿日期: 2022-04-08

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2022AAC03263); 北方民族大学青年人才培育项目 (2021KYQD37); 国家自然科学基金项目 (31301455)。

作者简介: 高春燕 (1981-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植源性食品资源开发与利用, E-mail: gcyxixi@163.com。

* 通信作者: 卢跃红 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品营养, E-mail: 78645515@qq.com。

Key words: *Lycopus lucidus* Turcz.; polyphenols; free radicals; DNA oxidative damage; protective effect

自由基是人体内产生的正常代谢的中间产物^[1]。外部因素,如环境污染物、压力、农药、辐射、水源污染、各种医疗处理也会促进自由基的形成^[2]。自由基具有高反应活性,可以与糖类、蛋白质、脂类、DNA 等生物分子发生氧化反应,启动自由基链式反应,破坏生物机体的结构,从而损害机体^[3-5]。其中,自由基攻击 DNA,可引起细胞内 DNA 的氢链断裂、碱基降解和主链解旋,可造成细胞生物学活性改变,甚至导致基因突变、肿瘤与细胞死亡。此外,自由基被认为是引起衰老和各种慢性疾病,如神经系统疾病、心血管疾病、癌症和糖尿病的重要因素^[6-9]。多酚,广泛存在于植物的花、茎、叶及果实中^[10]。大量的研究表明,多酚是良好的抗氧化剂,具有显著的自由基清除活性^[11-14]。

虫草参(*Lycopus lucidus* Turcz.),系唇形科地笋属多年生草本植物的地下根茎^[15]。在我国,主要分布在山东、四川、重庆、广西等地区。其中,在云南主要分布在丽江、大理、昆明^[16]。大理剑川沙溪镇是云南省境内野生虫草参的原产地,现已建成大规模的人工引种栽培基地。虫草参富含酚酸^[17]、黄酮^[18]、三萜类^[19]、多糖等植物化学物^[20-21],具有抗氧化^[22]、抗衰老^[23]、降血糖^[24]、降血脂^[25-26]、增强免疫^[27]、抗肿瘤等功能活性^[28-29]。虫草参作为云南高原特色食品资源^[19],在民间传统中以炒制、炖煮、油炸和腌渍食用等为主。

自当年种植的 11 月份至次年的 1 月份,可陆续进行虫草参的采挖。先前,郭琦等^[30]已经报道了四联村三个采收期虫草参对 ROO[·]介导的 DNA 损伤的保护作用,但对·OH 介导的 DNA 损伤的保护作用尚未见报道。为了进一步明确虫草参对不同自由基介导的 DNA 损伤保护作用,本文以两个采收地三个采收期的虫草参为原料,采用分步提取法,提取了虫草参中的游离酚和结合酚,测定了提取物的多酚含量,并采用 HPLC 法检测了没食子酸、绿原酸、咖啡酸和迷迭香酸在提取物中的含量。同时采用体外·OH 介导的 DNA 氧化损伤体系,评价了虫草参多酚提取物对 DNA 氧化损伤的保护作用,以期对虫草参功能活性的开发提供理论依据,同时为 DNA 损伤的预防与治疗提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

虫草参 采自云南省剑川县沙溪镇江尾村(S1)和鳌凤村(S2)三个采收期(T1: 2016/11/28; T2: 2016/12/27; T3: 2017/01/27)的新鲜样品,清洗,冻干,粉碎,过 60 目筛,−20 ℃ 冷藏备用; pBR322 质粒 DNA(0.5 μg/μL)、咖啡酸、绿原酸、迷迭香酸、没食子酸、Folin-酚试剂、Trolox 标品纯度≥99%,Sigma-Aldrich 公司; 色谱甲醇 美国 Fisher 公司; 其它试

剂均为国产分析纯。

Scientz-18ND 型真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; V-T3 可见分光光度计 屹谱仪器制造(上海)有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪和 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 美国 Agilent 公司; DYY-6C 型双稳定时电泳仪和 WD-9413C 型凝胶成像分析系统 北京六一科技生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 多酚的提取 参考文献 [31] 的方法进行游离酚和结合酚的提取。游离酚的提取步骤: 5.0 g 虫草参粉, 80% 甲醇超声波辅助(37 ℃、500 W)提取 3 次(10 min/次), 合并滤液, 旋蒸, 剩余水相调 pH 至 1~2, 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯相, 旋蒸, 剩余残留物冻干, 得游离酚提取物。

结合酚的提取步骤: 提取完游离酚后所得虫草参残渣, NaOH(2 mol/L, 含乙二胺四乙酸和维生素 C), 室温避光震荡水解 4 h, 调 pH 至 1~2, 抽滤, 滤液乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯相, 旋蒸, 剩余残留物冻干, 得结合酚提取物。

1.2.2 多酚含量的测定 采用 Folin-酚法测定^[32], 分别吸取 0.00、0.08、0.12、0.16、0.20、0.24、0.28 mL 100 μg/mL 没食子酸标准溶液于 10 mL 具塞试管中, 加入 100 μL Folin-酚试剂, 混匀, 3 min 后, 加入 2 mL 7.5%(w/v) Na₂CO₃, 蒸馏水定容至 5 mL 刻度处, 混匀, 置暗室反应 40 min。待反应结束后于 760 nm 处测定吸光值。以没食子酸浓度为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。得没食子酸标准曲线方程为 $y=0.0965x+0.0974$ (0~6.4 μg/mL), 相关系数 $R^2=0.9917$ 。配制一定浓度的地参游离酚和结合酚提取物待测液, 分别吸取 0.1 mL, 按上述步骤, 测定其多酚含量。多酚含量测定结果以没食子酸等量每毫克提取物干重表示(μg GAE/mg)。

1.2.3 HPLC 分析条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm); 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL; 检测波长: 320 nm。流动相 A: 100% 色谱甲醇; 流动相 B: 色谱甲醇: 冰乙酸: H₂O, 10: 1: 89。

虫草参游离酚和结合酚梯度洗脱条件见表 1。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of HPLC

多酚	流动相(%)	时间(min)							
		0	1	16	18	30	35	40	43
游离酚	A	85	85	75	75	70	60	80	85
	B	15	15	25	25	30	40	20	15
结合酚	A	80	80	62	62	40	40	80	80
	B	20	20	38	38	60	60	20	20

以峰面积(Y)为纵坐标,以浓度(C)为横坐标,在游离酚洗脱条件下,没食子酸、绿原酸、迷迭香酸和咖啡酸的回归方程分别为 $Y=1.915C-2.19(R^2=0.9929, 10\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL})$ 、 $Y=31.786C-154.62(R^2=0.9936, 10\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL})$ 、 $Y=20.75C-335.16(R^2=0.9985, 40\sim 200\text{ }\mu\text{g/mL})$ 和 $Y=65.704C-989.22(R^2=0.9925, 40\sim 200\text{ }\mu\text{g/mL})$;在结合酚洗脱条件下,没食子酸、绿原酸、迷迭香酸和咖啡酸的回归方程分别为 $Y=1.975C+1.01(R^2=0.9964, 10\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL})$ 、 $Y=30.683C-136.23(R^2=0.9982, 10\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL})$ 、 $Y=14.186C-54.828(R^2=0.9914, 5\sim 40\text{ }\mu\text{g/mL})$ 和 $Y=53.679C-166.8(R^2=0.9934, 5\sim 40\text{ }\mu\text{g/mL})$ 。样品中含量的测定结果以微克每毫克提取物表示($\mu\text{g/mg}$)。

1.2.4 多酚提取物 DNA 氧化损伤保护作用的测定

参考 Jeong 等^[33]的方法进行测定。具体操作流程为:1 μL 质粒 DNA、10 μL 10 mmol/L pH7.4 PBS、分别加入 5 μL 游离酚溶液(25、50、100、200、300 $\mu\text{g/mL}$)、结合酚溶液(3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$)(正常组和损伤组为 5 μL PBS),充分混匀,加入 2 μL 1 mmol/L FeSO_4 和 2 μL 1 mmol/L H_2O_2 (正常组为 4 μL PBS),37 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min,取出 4 μL ,加入 2 μL loading buffer,混匀,吸取 4 μL ,加入 1.0% 的琼脂糖凝胶 Tris/Acetate/EDTA 缓冲液中电泳 50 min,凝胶成像系统测定灰度值。按下式计算双螺旋百分比:双螺旋百分比(%)= $G1/(G1+G2+G3)\times 100$ 。式中:G1、G2 和 G3 分别为双螺旋、开环和线性 DNA 的灰度值;以 Trolox(25、50、100、200、300 $\mu\text{g/mL}$)作为阳性对照。

1.3 数据处理

所有实验均平行测定 3 次,数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)来表示,采用 SPSS22.0 统计软件 ANOVA 进行组间显著性差异检验、析因分析进行主体间效应检验和 Pearson 进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 虫草参多酚提取物的多酚含量

两个采收地三个采收期的虫草参多酚提取物的多酚含量见 表 2。虫草参游离酚和结合酚提取物的多酚含量范围分别为 86.53~181.40 和 89.70~193.58 $\mu\text{g GAE/mg}$,且 S2 采收地的高于 S1。不同采收地的虫

表 2 虫草参多酚提取物的多酚含量($\mu\text{g GAE/mg}$)

Table 2 Polyphenolic content of extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. ($\mu\text{g GAE/mg}$)

多酚提取物	采收地	采收期		
		T1	T2	T3
游离酚	S1	86.53 $\pm$ 1.52 ^a	108.86 $\pm$ 1.31 ^b	120.41 $\pm$ 4.03 ^c
	S2	181.40 $\pm$ 1.83 ^c	173.63 $\pm$ 2.56 ^b	127.51 $\pm$ 1.83 ^a
结合酚	S1	89.70 $\pm$ 2.53 ^a	116.60 $\pm$ 2.58 ^c	108.73 $\pm$ 0.74 ^b
	S2	193.58 $\pm$ 2.93 ^b	170.78 $\pm$ 2.20 ^a	177.51 $\pm$ 3.66 ^a

注:同一行不同字母表示同一采收地不同采收期差异具有统计学意义($P<0.05$)。

草参游离酚和结合酚在采收过程中多酚含量变化趋势存在差异。就游离酚而言,S1 采收地的虫草参呈现 $T1<T2<T3$ 的趋势,而 S2 采收地的呈现 $T3<T2<T1$ 的趋势;就结合酚而言,S1 采收地的虫草参呈现 $T1<T3<T2$ 的趋势,而 S2 采收地的呈现 $T2<T3<T1$ 的趋势。采用析因分析检验了采收地和采收期对多酚提取物多酚含量的影响以及两因素的交互作用,结果见表 3 和表 4。就游离酚而言,其多酚含量不仅受到采收地和采收期的影响,同时还受到两因素的共同交互作用;就结合酚而言,其多酚含量受到采收地的影响和两因素的共同交互作用。与植物多酚的合成与代谢有关的酶有苯丙氨酸解氨酶(PAL)、酪氨酸氨基转移酶(TAT)、肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)、多酚氧化酶(PPO)等。不同采收地虫草参在采收过程中酶的合成或者酶的活性发生的变化不同,从而影响了虫草参中游离酚和结合酚的合成与代谢,致使其在不同采收期多酚含量存在差异^[34]。

表 3 采收地和采收期对虫草参游离酚提取物多酚含量的主体间效应检验

Table 3 The test of between-subjects effects of collect sites and harvest times on the polyphenolic content of free phenolic extract from *Lycopus lucidus* Turcz.

源	III类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	20531.619 ^a	5	4106.324	4106.324	$P<0.01$
截距	317875.538	1	317875.538	317875.538	$P<0.01$
采收地	13734.874	1	13734.874	13734.874	$P<0.01$
采收期	855.609	2	427.805	427.805	$P<0.01$
采收地 $\times$ 采收期	5941.136	2	2970.568	2970.568	$P<0.01$
误差	12.000	12	1.000		
总计	338419.157	18			
修正后总计	20543.619	17			

注:因变量:游离酚提取物多酚含量, $R^2=0.999$ (调整后 $R^2=0.999$)。

表 4 采收地和采收期对虫草参结合酚提取物多酚含量的主体间效应检验

Table 4 The test of between-subjects effects of collect sites and harvest times on the phenolic content of bound phenolic extract from *Lycopus lucidus* Turcz.

源	III类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	27699.258 ^a	5	5539.852	5539.852	$P<0.01$
截距	367138.805	1	367138.805	367138.805	$P<0.01$
采收地	25728.193	1	25728.193	25728.193	$P<0.01$
采收期	13.436	2	6.718	6.718	0.011
采收地 $\times$ 采收期	1957.630	2	978.815	978.815	$P<0.01$
误差	12.000	12	1.000		
总计	394850.063	18			
修正后总计	27711.258	17			

注:因变量:结合酚提取物多酚含量, $R^2=0.999$ (调整后 $R^2=0.999$)。

2.2 虫草参多酚提取物中多酚组成的 HPLC 分析结果

根据前期研究结果^[17, 30],采用 HPLC 检测了虫草参多酚提取物中四种酚酸的含量,代表性的色谱图见图 1。可以看出,结合酚中分离出的色谱峰多于游离酚,且没食子酸和绿原酸在所有样品中均未检出。

咖啡酸在游离酚中含量较低甚至未检出,在结合酚中的含量范围为 6.53~44.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$,迷迭香酸在游离酚和结合酚中的含量范围分别为 40.43~77.64 和 1.93~5.32 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (表 5),表明咖啡酸在结合酚中含量较高,而迷迭香酸在游离酚中含量较高。此外,不同采收地同一采收期游离酚和结合酚提取物中咖啡酸和迷迭香酸的含量水平不同,S2 采收地虫草参中的咖啡酸含量高于 S1;而迷迭香酸在游离酚中,T1 和 T3 采收期,S2 采收地的高于 S1,相反在 T2 采收期,S2 采收地的低于 S1,在结合酚中,三个采收期均为 S2 采收地的高于 S1。这种含量的差异可归因于采收地对咖啡酸和迷迭香酸在虫草参生长过程中合成代谢的影响不同。

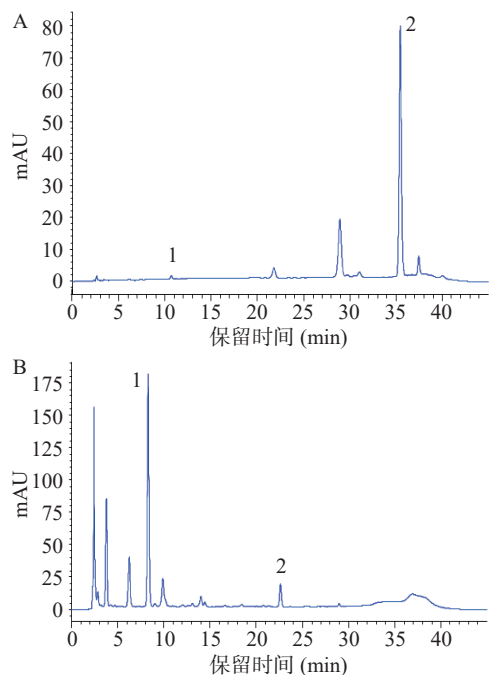


图 1 代表性的 HPLC 色谱图

Fig.1 Representative HPLC chromatograms

注: A: S1 采收地 T1 采收期的游离酚; B: S1 采收地 T2 采收期的结合酚; 峰 1: 咖啡酸; 峰 2: 迷迭香酸。

表 5 虫草参多酚提取物中迷迭香酸和咖啡酸的含量
($\mu\text{g}/\text{mg}$)

Table 5 The content of rosmarinic acid and caffeic acid in phenolic extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

多酚	单体	采收地	采收期		
			T1	T2	T3
游离酚	咖啡酸	S1	3.21 $\pm$ 0.12	nd	nd
		S2	3.31 $\pm$ 0.78 ^a	3.46 $\pm$ 0.09 ^a	3.22 $\pm$ 0.56 ^a
	迷迭香酸	S1	57.72 $\pm$ 1.19 ^b	77.64 $\pm$ 0.87 ^c	40.43 $\pm$ 2.21 ^a
		S2	68.41 $\pm$ 1.88 ^b	57.50 $\pm$ 1.54 ^a	77.08 $\pm$ 2.05 ^c
结合酚	咖啡酸	S1	6.53 $\pm$ 0.54 ^a	14.34 $\pm$ 1.19 ^c	10.45 $\pm$ 0.87 ^b
		S2	44.29 $\pm$ 2.08 ^b	31.50 $\pm$ 1.88 ^a	31.66 $\pm$ 0.63 ^a
	迷迭香酸	S1	3.06 $\pm$ 0.05 ^b	1.93 $\pm$ 0.11 ^a	1.93 $\pm$ 0.17 ^a
		S2	5.32 $\pm$ 0.78 ^b	2.43 $\pm$ 0.09 ^a	2.96 $\pm$ 0.48 ^a

注: “nd”表示未检出;同行不同字母表示同一采收地不同采收期差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 虫草参多酚提取物对 DNA 氧化损伤的保护作用

虫草参游离酚和结合酚提取物对 DNA 氧化损伤的保护作用分别见图 2 和图 3。正常的 pBR322 质粒 DNA 主要为双螺旋结构(泳道 1),被 $\cdot\text{OH}$ 氧化损伤的 DNA,主要为开环和线性结构(泳道 2)。与损伤的 DNA 相比,添加了虫草参多酚提取物后, DNA 双链被损伤的程度明显减弱(泳道 3~7)。保护作用的定量分析结果以双螺旋百分比(%)进行表征,值越大,表明保护效果越好。

在 25~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,虫草参游离酚提取物对 DNA 氧化损伤保护作用的双螺旋百分比范围为 1.81%~55.04%(图 2),且不同采收地保护作用不同。就 S1 而言,其双螺旋百分比范围为 3.99%~49.15%,且不同采收期保护作用存在差异;T1 采收期的双螺旋百分比范围为 8.29%~49.15%,且呈现先升高后降低而后又上升的趋势,当浓度从 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用也提高,当提高至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时反而又降低,进一步从 100 提高至 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用也逐渐提高;T2 采收期的双螺旋百分比在 3.99%~32.33% 范围内,且在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用最强;T3 采收期的双螺旋百分比范围为 8.66%~44.78%,当浓度从 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用逐渐减小,当浓度提高至 100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用显著增强,且达到最大,但当浓度进一步提高至 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用反而又减弱。就 S2 而言,其双螺旋百分比范围为 1.81%~55.04%,且不同采收期保护作用同样存在差异;T1 采收期的双螺旋百分比范围为 6.84%~50.19%,当浓度从 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用无显著变化,当浓度提高至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用显著升高,而后随着浓度的增加呈波浪性变化;T2 采收期双螺旋百分比范围为 30.14%~55.04%,保护作用随着浓度的增加呈现先降低后升高,而后再降低的变化趋势;T3 采收期双螺旋百分比范围为 1.81%~50.10%,保护作用随着浓度的提高呈现先升高后降低的变化趋势,在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用最强。

在 3.125~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,虫草参结合酚提取物对 DNA 氧化损伤保护作用的双螺旋百分比范围为 1.67%~70.83%(图 3),与游离酚相似,不同采收地保护作用不同。就 S1 而言,其双螺旋百分比范围为 1.67%~45.36%,且不同采收期保护作用存在差异;T1 采收期的双螺旋百分比在 4.68%~45.36% 范围内,且随着浓度的增加呈现先升高后降低而后又升高的趋势,在 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,保护作用达到最大;T2 采收期的双螺旋百分比在 1.67%~5.94% 之间,几乎无保护作用;T3 采收期的双螺旋百分比在 2.56%~39.99% 范围内,且呈现先降低后升高而后又降低的趋势,在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时保护作用达到最大。就 S2 而言,其双螺旋百分比范围为 3.03%~70.83%,且不同采收期保护作用同样存在差异;T1 采收期的双螺旋

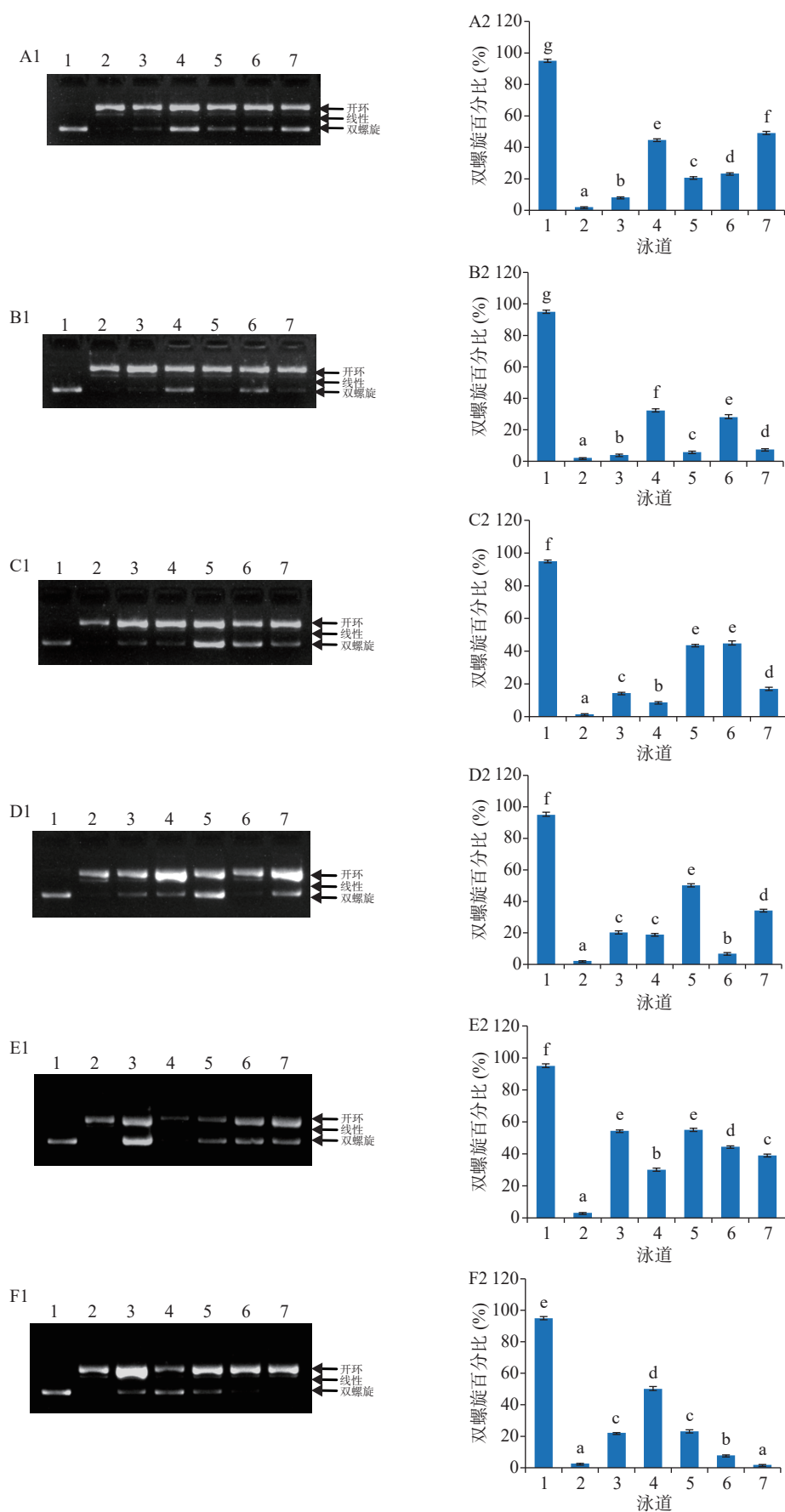


图 2 虫草参游离酚对 DNA 氧化损伤的保护作用

Fig.2 DNA oxidative damage protective effect of free phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz.

注: A~C 分别为 S1 采收地 T1、T2 和 T3 的游离酚; D~F 分别为 S2 采收地 T1、T2 和 T3 的游离酚; 泳道 1: 正常的 pBR322 质粒 DNA; 泳道 2: $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{pBR322}$ 质粒 DNA; 泳道 3~7: 25、50、100、200、300 $\mu\text{g/mL}$ 虫草参游离酚 + $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{pBR322}$ 质粒 DNA; 不同字母表示差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

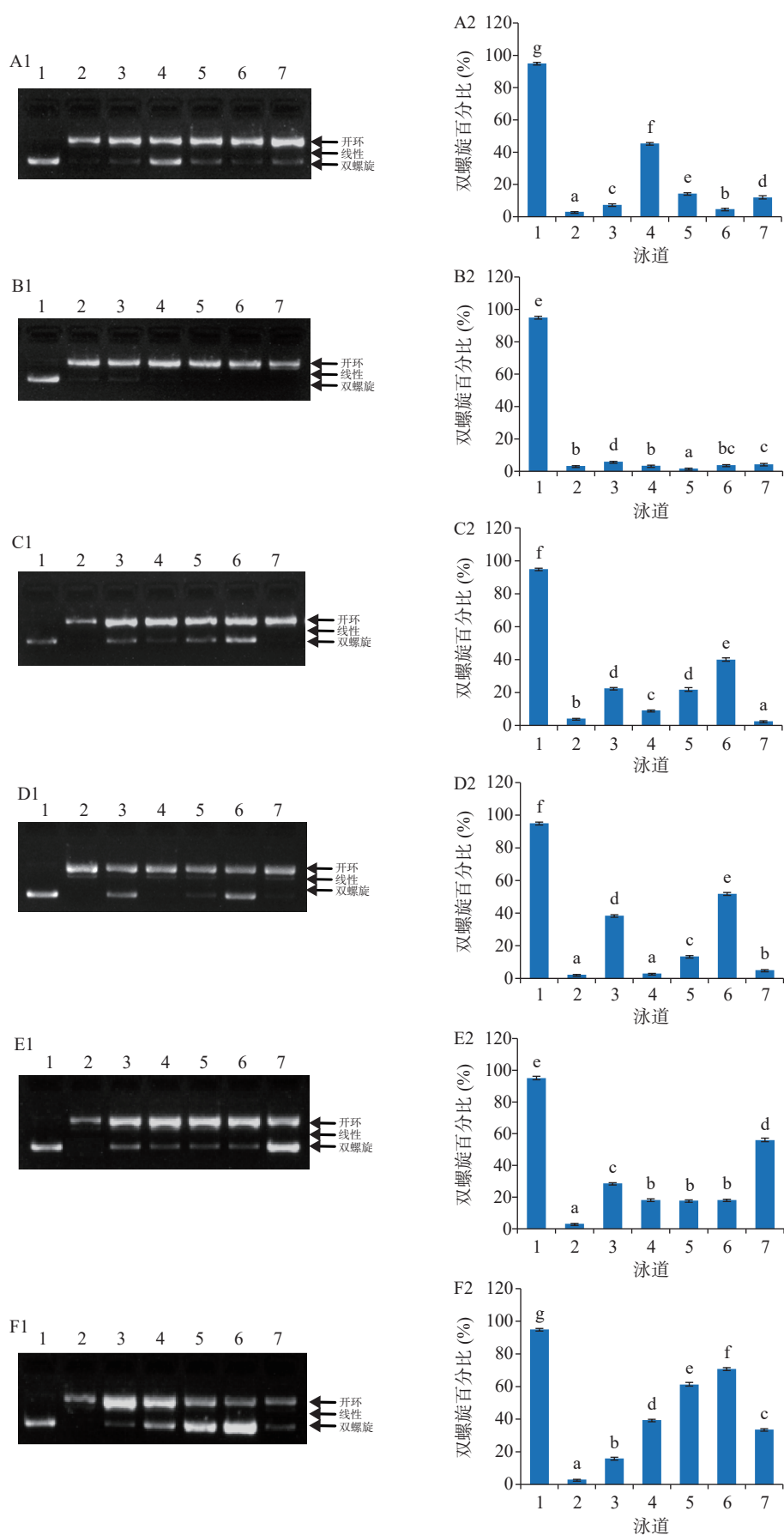


图3 虫草参结合酚对DNA氧化损伤的保护作用

Fig.3 DNA oxidative damage protective effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz.

注: A~C 分别为 S1 采收地 T1、T2 和 T3 的结合酚; D~F 分别 S2 采收地 T1、T2 和 T3 的结合酚; 泳道 1: 正常的 pBR322 质粒 DNA; 泳道 2: $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{pBR322}$ 质粒 DNA; 泳道 3~7: 3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 虫草参结合酚 + $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{pBR322}$ 质粒 DNA; 不同字母表示差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

百分比在 3.03%~51.87% 范围内,随着浓度的提高保护作用呈现先降低后升高而后又降低的趋势,在 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,保护作用最大;T2 采收期的双螺旋百分比在 17.71%~55.94% 范围内,当浓度由 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 提高至 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,保护作用显著下降,继续提高至 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,保护作用无显著性差异,进一步增加至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,保护作用显著提高且达到最大;T3 采收期的双螺旋百分比在 15.87%~70.83% 范围内,当浓度从 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 提高至 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,保护作用逐渐增加,但当浓度继续提高至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,保护作用反而显著下降。

具有清除 $\cdot\text{OH}$ 和螯合 Fe^{2+} 能力的化合物,对 $\cdot\text{OH}$ 介导的 DNA 氧化损伤,都会显示出一定的保护作用。通过浸提法获得的多酚粗提物中通常含有色素、糖类、蛋白质、氨基酸等非多酚类成分,而这些物质同样具有清除自由基和螯合 Fe^{2+} 的能力^[35-36]。此外,多酚提取物中的各成分之间对 DNA 损伤的保护作用可能存在拮抗或协同的关系。因此,虫草参多酚提取物对 DNA 氧化损伤的保护作用未呈现出剂量依赖效应。

阳性对照 Trolox 对 DNA 氧化损伤的保护作用见图 4,在浓度 25~300 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,其双螺旋百分比范围为 53.27%~77.28%,且浓度越大,保护效果越好。与 Trolox 相比,在 25~300 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,S1 和 S2 采收地的游离酚提取物对 DNA 氧化损伤保护作用的双螺旋百分比最高分别为 49.15% 和 55.04%,接近于 25 $\mu\text{g/mL}$ Trolox 的保护作用;在 3.125~50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,S1 和 S2 采收地结合酚提取物双螺旋百分比最高分别为 46.36% 和 70.83%,分别与 25 和 100 $\mu\text{g/mL}$ Trolox(图 4 中 3、5 泳道)的保护作用接近。大体上讲,相较于游离酚,结合酚对 DNA 氧化损伤表现出更好的保护作用,这不仅与两种不同结合态多酚提取物多酚含量水平的

不同有关,还与两种多酚提取物中多酚类化合物单体的组成存在差异有关。

3 结论

虫草参游离酚和结合酚提取物的多酚含量范围分别为 86.53~181.40 $\mu\text{g GAE/mg}$ 和 89.70~193.58 $\mu\text{g GAE/mg}$,且 S2 采收地的高于 S1。游离酚提取物的多酚含量不仅受到采收地和采收期的影响,同时还受到两因素的共同交互作用;结合酚的多酚含量受到采收地的影响和两因素的共同交互作用。两个采收地三个采收期的虫草参多酚提取物中均未检出没食子酸和绿原酸。咖啡酸在结合酚中含量较高,而迷迭香酸在游离酚中含量较高,且不同采收地含量存在差异。虫草参多酚对 $\cdot\text{OH}$ 介导的 DNA 氧化损伤具有一定的保护作用,相较于游离酚,结合酚表现出更好的保护效果。

参考文献

- [1] 罗成,周达,鲁晓翔.天然产物抗氧化机理的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(4): 335-339. [LUO C, ZHOU D, LU X X. Research progress in antioxidant mechanism of natural products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(4): 335-339.]
- [2] LUSHCHAK V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [3] 罗泽江,张永生,李琢伟,等.银耳蓝莓酵素发酵过程中体外抗氧化性能变化及品质的研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(12): 39-45. [LUO Z J, ZHANG Y S, LI Z W, et al. Antioxidant capacity and quality changes of tremella blueberry enzymes *in vitro* during fermentation[J]. *Journal of Food Research and Development*, 2019, 40(12): 39-45.]
- [4] HOCHSTEIN P, ATALLAH A S. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer[J]. *Mutation Research/Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1988, 202(2): 363-375.
- [5] NOHYNEK L J, ALAKOMI H L, KHKENEN M P, et al. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens[J]. *Nutrition & Cancer*, 2006, 54(1): 18-32.
- [6] TANZADEHPANAH H, ASOODEH A, CHAMANI J. An antioxidant peptide derived from ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates[J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 105-111.
- [7] SHESHADRI D, SHETTY N, SHIVANANDAPPA T, et al. Oxidative stress resistance as a factor in aging: Evidence from an extended longevity phenotype of *Drosophila melanogaster*[J]. *Bio-gerontology*, 2019, 20(4): 497-513.
- [8] LUCA M, MAURO M D, MAURO M D, et al. Gutmicrobiota in alzheimers disease, depression, and type 2 diabetes mellitus: The role of oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 17(4): 4730539.
- [9] ROCHETTE L, ZELLER M, COTTIN Y, et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2014, 1840(9): 2709-2729.

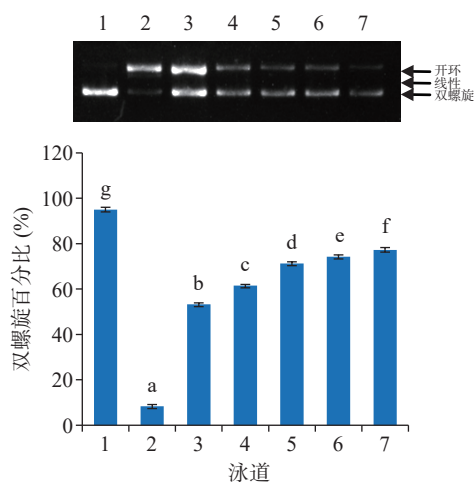


图 4 Trolox 对 DNA 氧化损伤的保护作用

Fig.4 DNA oxidative damage protective effects of Trolox
注:泳道 1:正常的 pBR322 质粒 DNA;泳道 2: $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{pBR322}$ 质粒 DNA;泳道 3~7: 25、50、100、200、300 $\mu\text{g/mL}$ Trolox+ $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{pBR322}$ 质粒 DNA;不同字母表示差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

- [10] ARYA A, NYAMATHULLA S, NOORDIN M I, et al. Antioxidant and hypoglycemic activities of leaf extracts of three popular *Terminalia* species[J]. *E-Journal of Chemistry*, 2012, 9(2): 883–892.
- [11] SUN Y C, MI J C, SEO W D, et al. Inhibitory effects of *Orostachys japonicus* extracts on the formation of N-nitrosodimethylamine[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(16): 6075–6078.
- [12] 邓俊琳, 李晚谊, 于丽娟, 等. 干燥温度对醇提余甘子多酚含量及其抗氧化活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(24): 57–61. [DENG J L, LI W Y, YU L J, et al. Effect of drying temperature on phenolic contents and its antioxidant activity of *Phyllanthus emblica* L[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 57–61.]
- [13] 魏园园, 刘琪, 梁宗瑶, 等. 栓皮栎橡子果仁多酚抗氧化与抑菌活性研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(20): 42–48. [WEI Y Y, LIU Q, LIANG Z Y, et al. Antioxidative and antibacterial activity of polyphenols in *Quercus variabilis* acorn nutlet[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(20): 42–48.]
- [14] 马景蕃, 林哲民, 柳盈, 等. 白背天葵多酚的提取及其抗氧化活性[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(7): 1450–1458. [MA J F, LIN Z M, LIU Y, et al. Extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Gynura formosana* Kitam[J]. *Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(7): 1450–1458.]
- [15] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 558–559. [State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese materia medica[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 558–559.]
- [16] 范仲先. 地参的特性及其栽培技术[J]. *科学种养*, 2006(9): 17. [FAN Z X. The characteristics and cultivation techniques of *Lycopus lucidus* Turcz.[J]. *Journal of Scientific Farming*, 2006(9): 17.]
- [17] LU Y H, TIAN C R, GAO C Y, et al. Nutritional profiles, phenolics, and DNA damage protective effect of *Lycopus lucidus*-Turcz. root at different harvest times[J]. *International Journal of Food Properties*, 2018: 1–16.
- [18] REN Q, DING L, SUN S S, et al. Chemical identification and quality evaluation of *Lycopus lucidus* Turcz by UHPLC-Q-TOF-MS and HPLC-MS/MS and hierarchical clustering analysis[J]. *Biomedical Chromatography*, 2016, 31(5): 3867–3869.
- [19] 黄小兰, 何旭峰, 周浓, 等. HPLC法同时测定地参中3种三萜酸的含量[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 273–278, 286. [HUANG X L, HE X F, ZHOU N, et al. Simultaneous determination of three triterpenic acids in *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel by high performance liquid chromatography[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(11): 273–278, 286.]
- [20] 黄小兰, 何旭峰, 杨勤, 等. PMP柱前衍生化HPLC法测定地参多糖的单糖组成[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 250–256. [HUANG X L, HE X F, YANG Q, et al. Determination of monosaccharide composition in *Lycopus lucidus* polysaccharides by pre-column PMP derivatization and HPLC[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(7): 250–256.]
- [21] 黄小兰, 何旭峰, 周祥德, 等. 不同产地地参中22种元素的测定与分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(20): 229–235. [HUANG X L, HE X F, ZHOU X D, et al. Determination and analysis of 22 elements in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* Regel from different habitats[J]. *Journal of Food and Fermentation Industry*, 2020, 46(20): 229–235.]
- [22] 桑鹏, 高春燕. 不同极性地参多酚抗氧化活性的比较[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(17): 6–9. [SANG P, GAO C Y. Comparison of antioxidant activity of *Lycopus lucidus* Turcz. polyphenols with different polarities[J]. *Journal of Food Research and Development*, 2016, 37(17): 6–9.]
- [23] 林春榕, 左绍远, 熊伟, 等. 地参多糖对D-半乳糖所致衰老小鼠的抗氧化作用研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(18): 9646–9647. [LIN C R, ZUO S Y, XIONG W, et al. Antioxidation effects of *Lycopus lucidus* polysaccharides on aged mice induced by D-galactose[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2012, 40(18): 9646–9647.]
- [24] 熊伟, 谭德勇, 陈贵元, 等. 地参多糖对正常及实验性糖尿病小鼠血糖的影响实验研究[J]. *生命科学仪器*, 2010, 8(5): 64–66. [XIONG W, TAN D Y, CHEN G Y, et al. Research of polysaccharide from *L. lucidus* Turcz on hypoglycemic effect in mouse[J]. *Journal of Life Science Instrument*, 2010, 8(5): 64–66.]
- [25] 杨文艺, 高春燕. 地参结合酚提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(23): 111–116. [YANG W Y, GAO C Y. Inhibitory effects of bound phenolic extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. on α -glucosidase and pancreatic lipase[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2018, 39(23): 111–116.]
- [26] 孔霄, 高春燕. 地参游离酚对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19(8): 564–568. [KONG X, GAO C Y. Inhibitory effects of free phenolic extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. on α -glucosidase and pancreatic lipase[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2018, 19(8): 564–568.]
- [27] YANG X B, ZHAO Y, HE N W, et al. Isolation, characterization, and immunological effects of α -galacto-oligosaccharides from a new source, the herb *Lycopus lucidus* Turcz.[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(14): 8253–8258.
- [28] 郭琦, 高春燕. 地参酚类化合物对亚硝酸盐的清除作用[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(19): 57–62. [GUO Q, GAO C Y. Nitrite scavenging effect of phenolic compounds from *Lycopus lucidus* Turcz.[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 38(19): 57–62.]
- [29] 熊伟, 焦扬, 罗永会, 等. 地参多糖对实验肿瘤细胞体内外增殖的影响[J]. *生物加工过程*, 2012, 10(4): 64–69. [XIONG W, JIAO Y, LUO Y H, et al. Effects of polysaccharide from *Lycopus lucidus* Turcz. on proliferation of tumor cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Biological Processes*, 2012, 10(4): 64–69.]
- [30] 郭琦, 高春燕. 硬毛地笋酚类化合物对DNA损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2018, 29(34): 54–59. [GUO Q, GAO C Y. Protective effect of phenolic compounds from *Lycopus lucidus* Turcz. on DNA damage[J]. *Food Science*, 2018, 29(34): 54–59.]
- [31] XU J G, TIAN C R, HU Q P, et al. Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in oats (*Avenanuda* L.)

during steeping and germination[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(21): 10392–10398.

[32] 陈磊, 杨建荣, 黄雪松. 高效液相色谱法快速测定红富士苹果渣中的 6 种多酚[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(8): 158–161.

[CHEN L, YANG J R, HUANG X S. Determination of 6 polyphenols in Fuji apple pomace by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food and Fermentation Industry*, 2008, 34(8): 158–161.]

[33] JEONG J B, PARK J H, LEE H K, et al. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect[J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2009, 47(3): 525–529.

[34] 任锦, 郭双生, 程泉勇, 等. 受控环境因素光和高 CO₂ 下植

物抗氧化系统的研究进展[J]. *航天医学与医学工程*, 2011, 24(6): 451–459. [REN J, GUO S S, CHENG Q Y, et al. Research progress of plants antioxidant system under lighting and hyper CO₂ concentration of controlled environment factors[J]. *Space Medicine & Medical Engineering*, 2011, 24(6): 451–459.]

[35] BROOK R D, RAJAGOPALAN S, POPE C A, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 121(21): 2331–2378.

[36] GHELDOLF N, WANG X H, ENGESETH N J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2002, 50(21): 5870–5877.