

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.004

辣椒叶多糖抗氧化作用研究*

常方照¹ 程 宣² 李 倩³ 唐劲天^{3Δ} 陆宇燕^{1Δ}

(1 沈阳师范大学生命科学学院两栖爬行动物学实验室 辽宁 沈阳 110034; 2 北京大学化学与生物学院 吉林 吉林 132013;

3 清华大学工程物理学粒子技术与辐射成像教育部重点实验室 北京 100084)

摘要 目的:从辣椒叶中分离纯化活性多糖并考察其抗氧化活性。**方法:**采用水提醇沉法提取多糖, Sevag 法脱蛋白, 得辣椒叶粗多糖; 分别使用超纯水、0.06 mol/L NaCl 溶液、0.18 mol/L NaCl 溶液作为洗脱液, 通过 DEAE-52 离子交换柱色谱纯化得到三种辣椒叶多糖 LD-0、LD-0.06、LD-0.18, 测定多糖含量。DPPH、ABTS 法检测多糖体外抗氧化作用。以小鼠血清、肝组织中总超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性及丙二醛含量为指标, 考察小鼠灌胃 LD-0.06 多糖对脂质过氧化模型的影响。**结果:**辣椒叶粗多糖、LD-0、LD-0.06、LD-0.18 多糖含量分别为 9.92%、43.14%、82.97%、37.63%, 其中 LD-0.06 多糖含量最高。体外抗氧化实验结果显示, 三种结果均具备较好的清除能力, 其中 LD-0.06 对 ABTS⁺、DPPH[·] 的清除效果最好, IC₅₀ 值分别为 0.58 mg/mL 和 0.60 mg/mL, 结果与对照组在 0.05 水平具有显著性差异, 说明辣椒叶多糖提取物是一种有效的天然抗氧化剂。在脂质过氧化模型小鼠体内, 与模型组比较, LD-0.06 多糖能显著增强小鼠血清和肝组织中的 T-SOD 与 CAT 活性, 降低 MDA 的含量, 且剂量越高, 体内抗氧化能力越强。**结论:**辣椒叶多糖提取物具有一定的抗氧化作用, 为进一步开发利用辣椒资源提供了理论依据。

关键词:辣椒叶; 多糖; 氧自由基; 抗氧化活性**中图分类号:**R-33; S641.3; Q505 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)11-2019-06

Study on Antioxidation of Capsicum annuum Leaves Polysaccharide*

CHANG Fang-zhao¹, CHENG Xuan², LI Qian³, TANG Jin-tian^{3Δ}, LU Yu-yan^{1Δ}

(1 Institute of Herpetology, Shenyang Normal University, Shenyang, Liaoning, 110034, China;

2 College of chemistry and biology, Beihua University, Jilin, Jilin, 132013, China; 3 Institute of Nuclear Energy Technology, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: To extract, purify polysaccharides from Capsicum leaves and to determinate the antioxidant activity. **Methods:** Crude Capsicum leaves polysaccharide was gained by boiling in hot-water, precipitating using ethanol, removing proteins with Sevage method. Three kinds of Capsicum leaves polysaccharides LD-0, LD-0.06, LD-0.18 were purified through DEAE-52 cellulose colume, using ultrapure water, 0.06 mol/L NaCl solution and 0.18 mol/L NaCl solution as eluent respectively. The content of polysaccharides was determined by the experiments of ABTS radical and DPPH radical scavenging. The effects of low, medium and high dose LD-0.06 polysaccharides on lipid peroxidation model in mice were studied, the indicators included total superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde. **Results:** The contents of polysaccharides, LD-0, LD-0.06 and LD-0.18 were 9.92%, 43.14%, 82.97% and 37.63% respectively. Among them, LD-0.06 has the highest polysaccharide content. Antioxidant activity tests revealed that all three methods have good scavenging ability, and LD-0.06 has the best effect on ABTS and DPPH. The IC₅₀ values were 0.58 mg/mL and 0.60 mg/mL, respectively. Compared with the model group, LD-0.06 polysaccharide can significantly enhance the activity of T-SOD and CAT in serum and liver tissue of mice, reduce the content of MDA, and has a significant dose-effect relationship. **Conclusions:** Capsicum leaf polysaccharide extract has certain antioxidant effect. This study indicated that polysaccharide extract of Capsicum annuum leaves had high anti-oxidant activity, which provided a theoretical basis for the further research of the comprehensive development of Capsicum annuum resources.

Key words: Capsicum annuum leaves; Polysaccharide; ROS; Antioxidation activity**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; S641.3; Q505 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)11-2019-06

前言

辣椒属于茄科辣椒属植物, 是世界上消费量最高的无季节

蔬菜^[1]。目前, 对于辣椒的研究主要集中于果实, 而占植株绝大部分的茎叶被作为农产品废物, 尚未进行有效的开发和利用^[2,3]。根据《中华本草》记载, 辣椒叶具有健胃、活血、消肿、止痒等功

* 基金项目: 国家 863 计划项目(20141860082); 辣椒叶主要成分分离鉴定以及生物活性研究(20132001124)

作者简介: 常方照(1990-), 硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学, E-mail: cfzbaggio@163.com

Δ 通讯作者: 唐劲天, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物活性成分研发与保健产品开发, E-mail: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn;

陆宇燕, 教授, 研究方向: 细胞生物学, E-mail: luyuyan1962@163.com

(收稿日期: 2018-11-30 接受日期: 2018-12-26)

效^[4]。现代药理学研究表明,辣椒具有有效的生物活性,例如清除自由基、抗微生物和抑制酪氨酸酶活性等^[5,7],同时,辣椒叶还具有抑制肿瘤细胞增殖的活性^[8]。作为多种天然活性化合物的天然来源,辣椒叶通过对自由基的清除作用体现其抗氧化活性^[9]。

当体内的自由基水平过高时,会氧化生物分子引起组织损伤、细胞凋亡和各种疾病,如心血管疾病、动脉氧化、神经紊乱及炎症^[10]。自由基通过攻击细胞膜上的脂质引起脂质的过氧化,人体则通过各种酶形成抗氧化防御机制。而当体内抗氧化防御机制与自由基之间出现不平衡时,就会对机体造成一定的损伤^[11]。邱爱东等^[12]探究了辣椒叶的抗氧化作用,利用乙醇提取辣椒叶并测定其总黄酮含量,考察辣椒叶体外的总抗氧化活性以及对超氧阴离子自由基、羟自由基和 DPPH 自由基的清除能力,并由此推测辣椒叶因含有黄酮类物质以及其他的抗氧化活性成分,而具有明显的抗氧化作用。张友仁^[13]等对大孔吸附树脂纯化前后辣椒叶多酚提取物的体外抗氧化及抗急性炎症活性进行了比较分析,结果表明,辣椒叶多酚的 ABTS 与 DPPH 自由基清除率与 Vc 处于同一数量级,抗氧化能力与之相当,是一种有效的天然抗氧化剂,进一步探求了辣椒叶多酚的生物活性。本研究采用水提醇沉法提取辣椒叶多糖,经纤维素凝胶 DEAE-52 纯化得到含量为 82.97% 的多糖,通过体内和体外抗氧化实验比较分析不同浓度多糖的抗氧化活性,为辣椒叶的开发及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

辣椒叶为市售,产地为河南,播种期在 4 月上旬,采收期为 7 月,经鉴定为 *Capsicum.annuum* L. 的叶。

洁净级健康昆明小鼠 36 只,6-8 周龄,体重(20±2)g,雌雄各半,来自清华大学动物实验中心。

1.2 试剂和仪器

凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒购于南京建成生物工程研究所;ABTS(Amresco 公司);DPPH(阿法埃莎(天津)化学有限公司);苯酚、环磷酰胺、Vc 购于 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯,北京化工厂生产。

DZF-6050 型真空干燥箱:北京神泰伟业仪器有限公司;AL204-IC 型电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV 756 CRT 型紫外分光光度计:上海佑科仪器仪表有限公司;FW100 型电动粉碎机:天津市泰斯特仪器有限公司;VAR-IOSKAN FLASH 型全波长扫描式多功能读数仪:美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 辣椒叶多糖的粗提取与纯化 取辣椒叶 200 g,加入 4 L 无水乙醇,采用冷凝回流法提取 2 次,将滤渣中乙醇挥干,加入 4 L 蒸馏水冷凝回流提取 2 次,合并滤液,浓缩,得到辣椒叶多糖水提物。用适量蒸馏水溶解辣椒叶多糖水提物,加入乙醇至浓度达 80%,搅拌 2 h 后,静置 12 h,过滤后离心。将沉淀用去离子水溶解后,Sevage 法脱蛋白,离心、冻干得辣椒叶粗多糖 LD。

辣椒叶粗多糖用蒸馏水溶解,配制成浓度为 8 mg/mL 的溶

液,8000 r/min 离心 10 min,取上清液上样。使用超纯水,0.06 mol/L、0.18 mol/L NaCl 溶液作洗脱液,对 DEAE-52 阴离子交换柱(1.6 cm×20 cm)进行洗脱,每个洗脱梯度收集 30 管,合并洗脱液,后两份分别透析除盐,冷冻干燥得超纯水洗脱液多糖(LD-0)、0.06 mol/L NaCl 洗脱液多糖(LD-0.06)、0.18 mol/L NaCl 洗脱液多糖(LD-0.18)。

1.3.2 辣椒叶多糖含量的测定 按照文献方法操作^[14]。称取干燥至恒重的葡萄糖标准品 10 mg,用蒸馏水定容至 100 mL,配置成 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μg·mL⁻¹ 的标准溶液,各取 1 mL,加入 1 mL 5%苯酚溶液,和 5 mL 浓 H₂SO₄ 溶液,混合均匀,室温放置 30 min,于 490 nm 波长处测定吸光度 A;绘制葡萄糖溶液浓度 C 与吸光度 A 的标准曲线。取纯化后的三种辣椒叶多糖,分别配置为 0.1 mg/mL 多糖溶液,分别取 1 mL 溶液,用苯酚-硫酸法测定吸光度,并根据标准曲线计算多糖含量。

1.3.3 辣椒叶多糖提取物对 ABTS⁺ 自由基的清除作用 根据试剂盒说明书进行操作:以 60%乙醇为溶剂分别配制 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的辣椒叶多糖提取物溶液、VC 溶液及 ABTS⁺ 自由基工作液。吸取 150 μL ABTS⁺ 工作液与 50 μL 各浓度辣椒叶多糖溶液混合震荡,室温反应 6 min,734 nm 波长条件下测定 OD 值。50%乙醇溶液作阴性对照,按上述步骤检测,平行试验 3 次,计算其平均值及 IC₅₀。

清除率计算公式:

$$K(\%) = (1 - A_s/A_0) \times 100$$

式中, A_s 为加入样品后测定的吸光度; A₀ 为阴性对照的吸光度。

1.3.4 辣椒叶多糖提取物对 DPPH 自由基的清除作用 以 60%乙醇为溶剂分别配制 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的辣椒叶多糖提取物溶液。50 μL 不同浓度辣椒叶多糖溶液和 150 μL 的 DPPH 工作液充分混匀,室温反应 6 min。于 510 nm 处测定吸光度 OD 值。50%乙醇溶液阴性对照,按上述步骤检测,平行试验 3 次,计算其平均值及 IC₅₀。

1.3.5 辣椒叶多糖体内抗氧化活性的测定 小鼠随机分为 6 组:空白对照组,模型对照组,阳性对照组,低、中、高剂量组,每组 6 只。除空白对照组外各组均皮下注射 150 mg/kg 环磷酰胺构造小鼠过氧化模型,适应性饲养 3 天后,模型对照组与空白对照组均灌胃 10 mL/(kg·day) 生理盐水,阳性对照组灌胃 200 mg/(kg·day) Vc,低、中、高剂量组分别灌胃 100 mg/(kg·day) LD-0.06、150 mg/(kg·day) LD-0.06、200 mg/(kg·day) LD-0.06,连续灌胃 7 天。第 8 天起禁食 24 小时后摘眼球取血,脱颈处死^[15]。检测血清、肝脏中超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)水平,评价辣椒叶多糖对小鼠体内抗氧化性的影响。

1.4 数据统计分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析各实验组与对照组是否具有显著性差异, P<0.05 为差异有统计学意义, P<0.01 时,为差异有极显著性意义。

2 实验结果

2.1 辣椒叶多糖含量测定

以葡萄糖标准系列浓度 C 为横坐标, 对应吸光值 A 为纵坐标, 绘制标准曲线如图 1, 结果表明, 在 $0\sim 0.1\text{ mg/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

测得四种辣椒叶多糖 LD、LD-0、LD-0.06、LD-0.18 吸光度值, 分别代入回归方程, 计算各多糖含量(表 1)。从结果中可见 LD-0.06 多糖含量最高, 为 82.97%, 粗多糖 LD 为 9.92%, LD-0 为 43.14%, LD-0.18 为 37.63%。

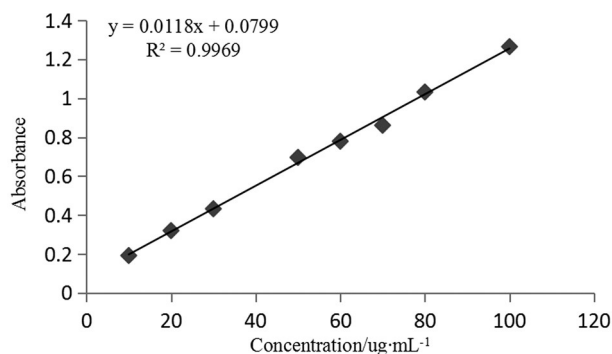


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve for glucose determination

表 1 辣椒叶多糖含量

Table 1 Content of Capsicum annuum leaves polysaccharide

Sample	Content(%)
LD	9.92
LD-0	43.14
LD-0.06	82.97
LD-0.18	37.63

2.2 辣椒叶多糖的体外抗氧化能力

2.2.1 辣椒叶多糖对 ABTS^+ 清除率的影响 LD-0、LD-0.06、LD-0.18 和粗多糖 LD 对 ABTS^+ 的清除能力结果见图 2。

由图 2 可见, LD-0、LD-0.06、LD-0.18 和 LD 均表现出较好的清除能力, 在 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 这 4 者对 ABTS^+ 的清除率分别是 LD 为 45.12%、LD-0 为 65.66%、LD-0.06 为 79.28%、LD-0.18 为 55.23%; 计算其 IC_{50} 值, LD 为 1.51 mg/mL , LD-0 为 0.72 mg/mL , LD-0.06 为 0.58 mg/mL , LD-0.18 为 0.84 mg/mL , 统计分析结果显示: $P<0.05$, 具有统计学差异。结果表明, 随着辣椒叶多糖提取物多糖含量的升高, 抗氧化活性明显提高, 抗氧化活性良好, 表明体外抗氧化活性与多糖含量之间可能存在一定的相关性。

2.2.2 辣椒叶多糖对 DPPH·清除率的影响 辣椒叶多糖对 DPPH·的清除能力随浓度的增加而增强, 如图 3, 当辣椒叶多糖质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 四种多糖对 DPPH·的清除率分别为 LD 为 49.31%、LD-0 为 57.42%、LD-0.06 为 75.64%、LD-0.18 为 54.79%; 计算其 IC_{50} 值, LD 为 1.16 mg/mL , LD-0 为 0.81 mg/mL , LD-0.06 为 0.60 mg/mL , LD-0.18 为 0.84 mg/mL 。统计分析结果显示: $p<0.05$, 具有统计学差异。结果表明辣椒叶多糖具有一定的 DPPH 自由基清除能力, 且随辣椒叶多糖提取物含量的升高, 清除率明显提高, 抗氧化活性良好。植物多糖是一种

能够中断氧化过程的天然抗氧化剂。本试验研究结果表明, 辣椒叶多糖具有一定的清除自由基的能力, 具有较好的保健功效, 有望于缓解人体衰老或预防疾病发生。

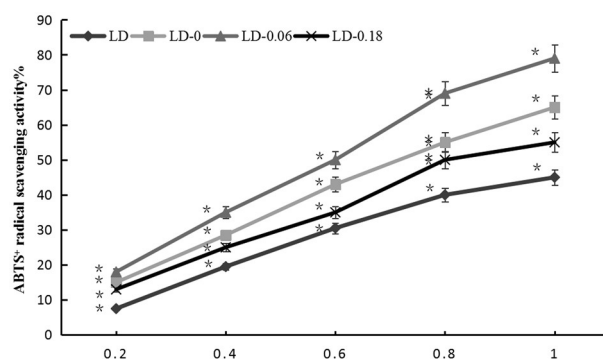


图 2 辣椒叶多糖对 ABTS^+ 的清除率

Fig.2 Radical scavenging rates of Capsicum annuum leaves polysaccharides on the ABTS^+

Note: *:indicate a significant difference at the 0.01 levels, compared with the model group.

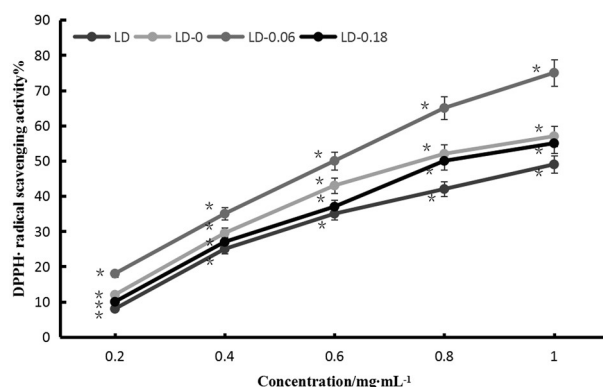


图 3 辣椒叶多糖对 DPPH·的清除率

Fig.3 Radical scavenging rates of Capsicum annuum leaves polysaccharides on the DPPH·

Note: *:indicate a significant difference at the 0.01 levels, compared with the model group.

2.3 辣椒叶多糖的体内抗氧化能力

2.3.1 辣椒叶多糖对小鼠血清中 T-SOD, MDA 和 CAT 水平的影响 小鼠血清中 T-SOD, MDA 和 CAT 水平见表 2, 由表可知, 各指标空白组与模型组均存在显著差异, 说明建模成功。从 T-SOD 水平来看, 随剂量的升高, 小鼠血清内 T-SOD 水平升高。从 MDA 水平来看, 随给药量增加, MDA 含量降低。从 CAT 水平来看, 阳性药物组和各浓度样品组的 CAT 活力高于模型对照组, 随给药量的增加, CAT 活性升高。

2.3.2 辣椒叶多糖对小鼠肝脏中 T-SOD, MDA 和 CAT 水平的影响 根据凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒所测结果, 以标准蛋白浓度为横坐标, 以所测 OD 值为纵坐标绘制蛋白浓度标准曲线, 如图 4, 拟合得回归方程为: $y=0.2253x+0.1822$ ($R^2=0.9961$), 在 0.1 mg/mL 浓度范围内线性关系良好。小鼠肝脏中 T-SOD, MDA 和 CAT 水平见表 3, 通过比较小鼠肝脏 T-SOD, MDA, CAT 水平, 空白组与对照组均存在显著差异, 说明过氧化模型建立成功。各剂量组肝脏中的 MDA 均低于模型组, T-SOD 与 CAT 均高于模型组。

表 2 辣椒叶多糖对小鼠血清中 T-SOD,MDA 和 CAT 水平的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 Effect of polysaccharides from Capsicum annuum on serum T-SOD, MDA, CAT levels in peroxidation mice($\bar{x} \pm s$, n=6)

Group	T-SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)	CAT(U/mL)
Control	121.9 $\pm$ 5.4*	5.1 $\pm$ 1.2*	3.8 $\pm$ 0.2*
Model	68.1 $\pm$ 5.6	12.5 $\pm$ 1.7	1.9 $\pm$ 0.2
VC	118.3 $\pm$ 5.7*	6.3 $\pm$ 0.9*	3.4 $\pm$ 0.1*
Low	87.5 $\pm$ 7.3*	11.1 $\pm$ 1.5*	2.3 $\pm$ 0.4*
Medium	94.1 $\pm$ 6.3*	10.2 $\pm$ 1.2*	2.5 $\pm$ 0.3*
High	108.7 $\pm$ 6.1*	8.1 $\pm$ 1.1*	3.1 $\pm$ 0.2*

Note:*.indicate a significant difference at the 0.01 levels, comperared with the model group.

表 3 辣椒叶多糖对小鼠肝脏中 T-SOD,MDA 和 CAT 水平的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 3 Effect of polysaccharides from Capsicum annuum on liver T-SOD, MDA, CAT levels in peroxidation mice($\bar{x} \pm s$, n=6)

Group	T-SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)	CAT(U/mL)
Control	272.2 $\pm$ 14.9*	16.2 $\pm$ 3.2*	45.3 $\pm$ 3.2*
Model	150.8 $\pm$ 7.0	29.1 $\pm$ 2.7	25.3 $\pm$ 2.5
VC 组	246.1 $\pm$ 204*	18.6 $\pm$ 2.2*	42.1 $\pm$ 4.2*
Low	180.5 $\pm$ 7.8*	27.1 $\pm$ 3.8*	27.1 $\pm$ 2.3*
Medium	194.2 $\pm$ 18.2*	24.9 $\pm$ 2.5*	31.1 $\pm$ 2.5*
High	227.7 $\pm$ 22.1*	21.2 $\pm$ 2.2*	35.2 $\pm$ 2.3*

Note: *.indicate a significant difference at the 0.01 levels, comperared with the model group.

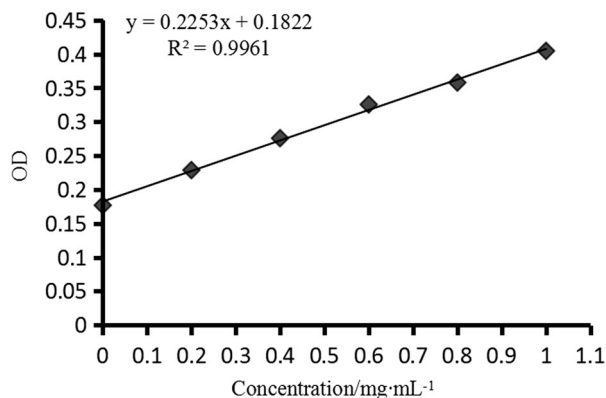


图 4 蛋白浓度标准曲线

Fig.4 Standard curve for protein concentration

3 讨论

辣椒作为多种生物活性物质的天然来源,在传统医学中发挥着重要的作用^[16]。辣椒的果实和茎叶中富含类胡萝卜素,抗坏血酸,黄酮和多糖等化合物^[17-19]。多糖是通过糖苷键将单糖连接而形成的聚合物,作为一种广泛存在于植物中重要的活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、清除自由基、抑制脂质过氧化等多种生物活性,因其对细胞的毒性较小,故此成为近年来研究的热点, JiSK 等对韩国辣椒多糖提取物进行研究,发现其具有较强的抗氧化活性^[8];Ganiyu 的研究表明,辣椒多糖能够对环磷酰胺诱导的脑内氧化应激起到良好的保护作用^[9];Yufeng 的研究表明蘑菇多糖提取物能对氧自由基有较好的清除效果^[10];Liu 的研究表明天然多糖 Xihibit 具有较好的抗肿瘤活性^[20]。

人体衰老的学说主要为人体衰老基因的启动和人体自由

基的增多。人体内存在的氧自由基可对组织细胞造成严重损害,引发慢性疾病或衰老效应^[21]。当氧分子失去一个电子时会形成超氧离子自由基,其进一步产物包括过氧化氢、羟自由基和单线态氧等,统称为活性氧簇(ROS),占机体内自由基总量的95%以上^[22]。ROS 的产生有内源性和外源性两种。在耗氧生物体内,许多非酶反应、酶促反应和代谢过程都会产生内源性自由基,比如在线粒体中,NADH 的催化氧化、三羧酸循环和辅酶 Q 与细胞色素 C 的电子传递都会产生大量的氧自由基,然后转化为对细胞危害更大的 H₂O₂ 和 OH·。而受太阳紫外线、电离辐射、大气污染、吸烟等都会产生外源性自由基^[23]。一定量的 ROS 在分子间和细胞内信号传递、细胞生长和分化及宿主免疫防御机制等方面有重要作用。但是,过量的 ROS 会对人体造成伤害,在临床上主要表现为:(1)破坏细胞膜,使细胞丧失吸收营养与排泄代谢废物的能力,诱发细胞凋亡,使人体遭受细菌和病毒的入侵;(2)影响机体免疫系统,使人体表现出过敏反应,或攻击淋巴细胞,致使人体免疫功能下降;(3)侵蚀脑细胞,使人患上早老性痴呆等疾病;(4)氧化血液中的脂蛋白,造成胆固醇在血管壁上沉积,引起动脉硬化。(5)侵犯关节膜,诱发关节炎,侵蚀眼镜晶状体,招致白内障;(6)侵蚀胰脏细胞,使人与糖尿病结缘,破坏体内的免疫系统,释放出胶原蛋白酶和硬弹性蛋白酶,使皮肤衰老;(7)攻击基因,损伤 DNA(如碱基的氧化,导致 G-C、A-T 配对发生错误),导致遗传信息改变,造成基因突变进而诱发癌症等^[24-26]。在 ROS 中,超氧离子自由基是生物体内氧代谢首先形成的自由基,同时还能与活性氮生成活性氮氧成分。因此,清除超氧离子自由基对保护生物体免受自由基损伤尤为重要。Zhai 通过对石榴皮多糖化学特性的研究,表明有效的清除自由基能一定程度上抗氧化,从而延缓衰老过程^[27]。

Xu 通过使用 β - 葡聚糖调节小鼠的能量代谢和氧化应激,表明生物抗氧化剂可切断过氧化链式反应,抑制机体的自由基损伤^[28]。

抗氧化活性的研究主要分为体外和体内两种形式。体外抗氧化法是基于抗氧化剂的结构特性,主要是根据氢原子转移和电子转移的方法进行评估。目前大多数采用的是 ABTS 法和 DPPH 法,体外方法因具有成本低、省时高效、操作简单、灵敏度高而广泛使用^[29]。DPPH 自由基是一种稳定的含氮自由基,结构中存在单电子,在 517 nm 处有吸收峰,呈紫色。当自由基清除剂存在时,可以提供氧原子,与自由基结构中的孤对电子配对,减少单电子数目,此时颜色变浅,在最大吸收波长处吸光度变小,颜色变化与配对电子数成化学计量关系,可用来评价自由基的清除情况^[30,31]。ABTS 自由基和 DPPH 自由基类似,均为稳定的有机自由基,可以体现样品电子转移与氢质子转移的双重能力,样品抗氧化能力越强,其提供电子的能力也就越强,与该有机自由基反应量越大,反应速率也越快,二者均可以通过测定反应液吸光度的变化,直接反映出样品还原能力的大小^[32]。本研究结果发现,辣椒叶多糖对 ABTS⁺ 和 DPPH[·] 自由基有良好的清除效果,其中 LD-0.06 的清除效果最好,对 ABTS⁺ 的清除率为 79.28%,IC₅₀ 值为 0.58 mg/mL,对 DPPH[·] 的清除率为 75.64%,IC₅₀ 值为 0.60 mg/mL。

体内抗氧化能力检测常用与人体基因相似的小鼠,基于小鼠的生理系统作为载体,以动物试验的形式评估抗氧化活性,检测生物体内抗氧化能力。其中超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)为体内抗氧化活性检测的常用指标。研究认为,超氧化物歧化酶(SOD)的作用是催化超氧阴离子自由基形成过氧化氢,进而分解成水和氧气,从而保护机体免受氧化应激的伤害。因此,SOD 活性的高低能直接反映机体清除氧自由基的能力^[33]。人体内的过氧化氢可以促发细胞膜的脂质过氧化反应,导致细胞结构的破坏诱发细胞凋亡,并参与多种病理机制。CAT 是过氧化氢酶,以过氧化氢为底物,高效分解过氧化氢,从而保护机体免受氧化应激损伤,是一种重要的抗氧化酶^[34]。而丙二醛(MDA)是脂质过氧化物的产物之一,在机体内经过一系列的蛋白交联等反应进一步生成脂褐质等氧化产物堆积在机体细胞内,破坏机体细胞膜的正常结构和功能,增加机体组织的负担,最终导致机体组织细胞无法维持细胞正常代谢而衰老、死亡,其含量可以间接反映体内脂质氧化的程度和机体细胞受自由基攻击的严重程度^[35]。本试验结果显示经灌胃给予不同剂量的 LD-0.06 多糖后,各剂量组肝脏及血清中 MDA 均低于模型组,从 SOD 指标水平来看,LD-0.06 可以显著提高小鼠肝脏和血清中的 T-SOD 活性,且给药量与 T-SOD 活性呈明显的量效关系。CAT 指标也表现出同样的趋势,即辣椒叶多糖可提高小鼠肝脏和血清中的 CAT 活性。从 MDA 水平来看,各剂量组肝脏及血清中 MDA 均低于模型组,且呈一定的量效关系。从小鼠血清和肝脏中各指标的结果来看,辣椒叶多糖 LD-0.06 能显著改善小鼠体内的过氧化体系。

综上所述,辣椒叶多糖具有一定的体内和体外抗氧化效果,但其具体的体内抗氧化机理,包括抗氧化物质的生物可及率、抗氧化剂之间的协同效应等不清楚,需进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Bown D Encyclopedia of Herbs and Their Uses [M]. Kindersley Dorling, London, Herb society of America, London, UK, 2001
- [2] Zimmer AR, Leonardi B, Miron D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Capsicum baccatum: From traditional use to scientific approach[J]. Ethnopharmacol, 2012, 139: 228-233
- [3] Menichini F, Tundis R, Bonesi M, et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of Capsicum chinense Jacq[C]. Habanero. Food Chem, 2009, 114: 553-560
- [4] Plant medicine database: 058 Capsicum [M]. World Notes Plant Med, 2005, 20(1): 41-42
- [5] Mai Hazekawa, Yuko Hideshima, Kazuhiko Ono, et al. Anti-inflammatory effects of water extract from bell pepper(Capsicum annuum L. var.grossum) leaves in vitro [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 14: 4349-4355
- [6] Toyoda T, Shi L, Takasu S, et al. Anti-inflammatory effects of capsaicin and piperine on helicobacter pylori induced chronic gastritis in Mongolian gerbils[J]. Helicobacter, 2016, 21: 131-142
- [7] Tang J, Luo K, Li Y, et al. Capsaicin attenuates LPS-induced inflammatory cytokine production by upregulation of LXR α [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28: 264-269
- [8] Jeon G, Han J, Choi Y, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of pepper (Capsicum annuum L.) leaves[J]. Korean Soc Food Sci Nutr, 2008, 37: 1079-1083
- [9] JiSK, Jiyun A, Sung J L, et al. Phytochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of paprika (Capsicum annuum L.var.special) cultivated in Korea[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(2): 193-198
- [10] Gulcin I. Antioxidant activity of L-adrenaline: an activity-structure insight[J]. Chem Biol Interact, 2009, 179: 71-80
- [11] Halliwell B, Aeshbach R, Loliger J, et al. The characterization of antioxidants[J]. Food Chem Toxicol, 1995, 33: 601-617
- [12] 邱爱东, 苟琳, 肖红梅, 等. 辣椒叶醇提物的体外抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2013, 13(2): 5-7
- [13] 张友仁, 唐涛, 黄韵, 等. 辣椒叶多酚抗氧化及抗炎活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 8(13): 346-349
- [14] 程莹, 赵骏. 桑叶多糖含量测定与成分分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(18): 1803-1805, 1809
- [15] Suijian Qi, Delong Zhou. Lotus seed epicarp extract as potential antioxidant and anti-obesity additive in Chinese Cantonese Sausage[J]. Meat Science, 2013, 93(2): 257-262
- [16] Meghvansi MK, Siddiqui S, Khan MH, et al. A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications[J]. Ethnopharmacol, 2010, 132: 1-14
- [17] Wang Qiang, Huang Xing-qi, Cao Tian-jun, et al. Heteromeric geranylgeranyl diphosphate synthase contributes to carotenoid biosynthesis in ripening fruits of red pepper (Capsicum annuum var.conoides) [J]. J Agric Food Chem, 2018, 19: 1-43
- [18] Yolanda MR, Guillermo CG, Victor AG, et al. Free Radical-Scavenging Capacities, Phenolics and capsaicinoids in Wild Piquin Chili(Capsicum annuum var.Glabriusculum) [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2655
- [19] Adami ER, Corso CR, Turin-Olivera NM, et al. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper(Capsicum annuum) on mammary tumor cells in vivo and in vitro [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 280-292
- [20] Liu L, Li M, Yu M, et al. Natural polysaccharides xhibit anti-tumor

- activity by targeting gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 121: 743-751
- [21] Sun J, Yu X, Huangpu H, et al. Ginsenoside Rb3 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via activating the antioxidant signaling pathway of PERK/Nrf2/HMOX1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 109: 254-261
- [22] Onodera Y, Teramura T, Takehara T, et al. miR-155 induces ROS generation through downregulation of antioxidation-related genes in mesenchymal stem cells[J]. *Aging Cell*, 2017, 16(6): 1369-1380
- [23] Chen R, Lai UH, Zhu L, et al. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 132
- [24] Hu X, Teng S, He J, et al. Pharmacological basis for application of scutellarin in Alzheimer's disease: Antioxidation and antiapoptosis[J]. *Mol med Rep*, 2018, 18(5): 4289-4296
- [25] Ahmad KA, Ze H, Chen J, et al. The protective effects of a novel synthetic β -elemene derivative on human umbilical vein endothelial cells against oxidative stress-induced injury: Involvement of antioxidation and PI3k/Akt/eNOS/NO signaling pathways[J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2018, 106: 1734-1741
- [26] Seo JH, Pyo S, Shin YK, et al. The Effect of Environmental Enrichment on Glutathione-Mediated Xenobiotic Metabolism and Antioxidation in Normal Adult Mice[J]. *Frontiers in neurology*, 2018, 9: 425
- [27] Zhai X, Zhu C, Zhang Y, et al. Chemical characteristic, antioxidant capacities and hepatoprotection of polysaccharides from pomegranate peel[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 202: 461-469
- [28] Xu X, Ding Y, Yang Y, et al. β -glucan Salecan Improves Exercise Performance and Displays Anti-Fatigue Effects through Regulating Energy Metabolism and Oxidative Stress in Mice[J]. *Nutrients*, 2018, 10(7): 858
- [29] 林恋竹,赵谋明.反应时间对 DPPH·法、ABTS+ 法评价抗氧化性结果的影响[J].*食品科学*, 2010, 31(5): 63-67
- [30] Svarc-Gajic J, Cerda V, Clavijo S, et al. Chemical and bioactivity screening of subcritical water extracts of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) stems[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2018, 164: 353-359
- [31] Zheng L, Liu M, Zhai G, et al. Antioxidant and anti-ageing activities of mycelia zinc polysaccharide from *Pholiota nameko* SW-03 [J]. *Sci Food Agric*, 2015, 95(15): 3117-3126
- [32] YEN G C, DUH P D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species[J]. *Agric Food Chem*, 1994, 42: 629-632
- [33] Liu Q, Tian G, Yan H, et al. Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the wild edible mushroom *Russula vinosa* Lindblad[J]. 2014, 62(35): 8858-8866
- [34] Hou G, Surhio MM, Ye H, et al. Protective effects of a *Lachnum* polysaccharide against liver and kidney injury induced by lead exposure in mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 716-723
- [35] 石娜,苏洁,杨正标,等.白术多糖对 D- 半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化作用[J].*中国新药杂志*, 2014, 23(5): 577-584

(上接第 2071 页)

- [20] Mekhasingharak N, Chirapapaisan N, Laowanapiban P, et al. Visual function and inner retinal structure correlations in aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2018
- [21] Jeong J S, Lee W K, Moon Y S, et al. Early changes in retinal structure and BMP2 expression in the retina and crystalline lens of streptozotocin-induced diabetic pigs [J]. *Lab Anim Res*, 2017, 33 (3): 216-222
- [22] Lekskul A, Wuthisiri W, Padungkiatsagul T. Evaluation of retinal structure in unilateral amblyopia using spectral domain optical coherence tomography[J]. *J AAPOS*, 2018
- [23] Xiong W H, Pang J J, Pennesi M E, et al. The Effect of PKC α on the Light Response of Rod Bipolar Cells in the Mouse Retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(8): 4961-4974
- [24] Groman-Lupa S, Adewumi J, Park K U, et al. The Transcription Factor Prdm16 Marks a Single Retinal Ganglion Cell Subtype in the Mouse Retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (12): 5421-5433
- [25] Xia C H, Ferguson I, Li M, et al. Essential function of NHE8 in mouse retina demonstrated by AAV-mediated CRISPR/Cas9 knock-down[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 176: 29-39
- [26] Mir S, Andres D A. Small GTPase RIT1 in Mouse Retina; Cellular and Functional Analysis[J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(9): 1160-1168
- [27] de Melo J, Blackshaw S. In Vivo Electroporation of Developing Mouse Retina[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1715: 101-111
- [28] Wu H, Rodriguez A R, Spur B W, et al. An Acute Retinal Model for Evaluating Blood Retinal Barrier Breach and Potential Drugs for Treatment[J]. *J Vis Exp*, 2016(115)
- [29] Ruckebauer M, Barbatti M, Muller T, et al. Nonadiabatic photodynamics of a retinal model in polar and nonpolar environment [J]. *J Phys Chem A*, 2013, 117(13): 2790-2799
- [30] 牛希娟,童善保,朱贻盛,等.视网膜建模的研究进展[J].*生物医学工程学杂志*, 2008, 25(4): 962-966, 983