

桂花多酚对 TNF- α 诱导下 HUVEC 炎症反应保护作用的研究

李红领^{1,2}, 李春阳¹, 曾晓雄², 刘晓林³

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)(2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)
(3. 徐州林泉绿色食品饮料厂, 江苏徐州 221711)

摘要: 通过建立体外肿瘤坏死因子(TNF- α)诱导人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)炎症损伤反应模型, 研究桂花多酚纯化组分1、2、3对炎症细胞的活性(MTT)、活性氧(ROS)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性影响; 以10 Ug/L TNF- α 诱导HUVEC产生炎症反应, 加入6000 Ug/L、3000 Ug/L、300 Ug/L和30 Ug/L桂花多酚纯化组分1、2、3, 研究桂花多酚纯化组分1、2、3的浓度及其组成对炎症细胞保护作用的影响。结果表明, 当桂花多酚纯化组分2、3浓度为300~3000 Ug/L、组分1浓度为3000 Ug/L时, 可显著提高由TNF- α 诱导的HUVEC细胞活力和SOD酶活性($p < 0.05$), 显著抑制炎症细胞中活性氧(ROS)含量和XOD酶活性($p < 0.05$), 具有显著抗炎效果。

关键词: 桂花多酚; 人脐静脉血管内皮细胞; 抗炎; 肿瘤坏死因子; 超氧化物歧化酶; 黄嘌呤氧化酶

文章编号: 1673-9078(2016)07-39-46

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.007

Protective Effect of the Polyphenols from *Osmanthus fragrans* Flowers on TNF- α -induced Inflammation in HUVECs

LI Hong-ling^{1,2}, LI Chun-yang¹, ZENG Xiao-xiong², LIU Xiao-lin³

(1. Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing, 210014, China)

(2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing, 210095, China)

(3. Beverage Factory of Organic Foods in Linquan, Xuzhou, 221711, China)

Abstract: An *in vitro* human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) model of inflammation induced by tumor necrosis factor (TNF)- α was established to study the effects of the purified fractions 1, 2, and 3 obtained from the ethanol extracts of *Osmanthus fragrans* flowers on cell viability (MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay), reactive oxygen species (ROS) content, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XOD) in the inflammatory cells. The inflammatory reaction was triggered by TNF- α (10 μ g/L) in HUVECs, and then the inflammatory cells were treated with fractions 1, 2, and 3 at concentrations of 6000, 3000, 300, and 30 μ g/L. The protective effects of the concentrations and compositions of fractions 1, 2, and 3 on inflammatory cells were evaluated. The results showed that treatment with fractions 2 and 3 at concentrations ranging from 300–3000 μ g/L and fraction 1 at a concentration of 3000 μ g/L could significantly enhance HUVEC cell viability and SOD activity ($p < 0.05$), while significantly suppressing XOD activity and reducing ROS content ($p < 0.05$). The abovementioned treatment exhibited strong anti-inflammatory effects.

Key words: polyphenols; *Osmanthus fragrans* flowers; human umbilical vein endothelial cells; anti-inflammatory; tumor necrosis factor- α ; superoxide dismutase; xanthine oxidase

国内外研究表明, 桂花醇提物中含有大量多酚和

收稿日期: 2015-08-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金(CX(14)2120); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20141386); 江苏省苏北科技专项资金(富民强县)项目(BN2014088); 2014年中央财政农业技术推广资金项目(TG(14)113)

作者简介: 李红领(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品

通讯作者: 李春阳(1966-), 男, 研究员, 研究方向: 营养与活性物质, 农产品精深加工

黄酮类物质^[1~4], 且具有显著的体内外抗氧化清除自由基活性^[1,3,5,6]、抗癌、抗炎等活性功能^[7-10]。Huang等^[7]研究发现, 桂花醇提物可以显著抑制牙龈卟啉单胞菌的生长, 提高由牙龈卟啉单胞菌脂多糖诱导的炎症反应中超SOD活性和抗氧化信号通路中Nrf2的表达, 可作为治疗牙龈疾病的附属药物; Hung^[8]等研究表明, 通过使老鼠口服桂花醇提物, 发现老鼠肺和脾中谷胱甘肽含量增加, 硫代巴比土酸反应底物显著降低, 其

清除含氧自由基的能力显著升高,降低了老鼠肺中炎症细胞的 IgE 表达和渗透物含量,从而达到抗炎的目的;以上结果表明,桂花醇提物具有一定的抗炎效果。然而,关于桂花醇提物在 HUVEC 中的抗炎作用却鲜有报道。

研究发现,当 TNF- α 由 23.24 pg/L 增加至 39.32 pg/L 时,可通过直接的细胞毒害作用,破坏血管内皮细胞结构和功能的完整,导致内皮功能障碍^[11]。所以,一些学者通过建立 TNF- α 诱导 HUVEC 产生炎症的模型,来研究药物或者生物活性物质的抗炎作用^[12~14]。

本文通过建立 TNF- α 诱导 HUVEC 产生炎症损伤反应模型,来研究不同浓度和组分的桂花多酚纯化物对炎症损伤细胞的影响,为桂花中天然抗炎活性因子的研究和开发提供理论依据。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料与试剂

金桂采摘于江苏省溧阳市芳芝林生态园区;HPD100 大孔树脂由河北宝恩吸附材料有限公司提供;MTT 粉末购于 sigma 公司;TNF- α 、PMSF、IP 细胞裂解液、ROS、XOD、BCA、SOD 试剂盒均购于碧云天生物技术研究所;液相用甲醇为色谱级。

1.2 仪器与设备

FDU-1200 真空冷冻干燥机,东京理化/EYELA;TriStar LB 941 微孔板式多功能分析仪, Berthold Technologies;高效液相色谱与质谱联用仪 Agilent 1100 HPLC/MS (SL), 美国 Agilent 公司;转盘式激光共聚焦显微镜 PE(Ultra View VOX), 美国珀金埃尔默公司。

1.3 实验方法

1.3.1 桂花多酚的提取、纯化与检测

桂花多酚的提取与纯化参考 Lee 等^[15]方法。

1.3.1.1 提取

桂花醇提物的制备:在常温下,按照料液比为 1:10,用 70%乙醇对金桂花瓣超声提取 2 h,抽滤、浓缩、冻干,得到桂花醇提物(粉末)。

1.3.1.2 纯化

活化 HPD100 大孔树脂,称取一定量粉状桂花醇提物,超纯水溶解后,过 HPD100 大孔树脂。经充分吸附后,先用超水洗脱,去除糖、蛋白等杂物后,再用 3BV50%乙醇进行洗脱,收集洗脱液,浓缩、冻干,得到桂花多酚纯化物,含量在 40%以上;将桂花

多酚与硅胶混合拌样,装柱。为研究桂花多酚的成分和极性对活性影响,分别用含 30%、50%和 70%乙酸乙酯的石油醚体系洗脱柱子,收集洗脱液,浓缩、冻干,分别记为桂花多酚纯化组分 1、2 和 3。取一定质量(mL)的干粉状纯化组分 1、2 和 3,用蒸馏水复溶后,用福林酚法测总酚含量(m2)(以没食子酸计),使用公式:含量(%)=(m1/m2)*100 计算,得到的多酚含量均为 70%以上。

1.3.1.3 HPLC-MS/MS 检测

桂花多酚纯化组分 1、2、3 过 0.22 μ m 滤膜后,由自动进样器进样 10 μ L,流速 0.6 mL/min,柱温 35 $^{\circ}$ C,采用 Zorbax SB-C18 反相色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),DAD 检测器,检测波长为 280 nm。流动相 A:含 1.0%醋酸的水;流动相 B:含 1.0%醋酸的甲醇。

洗脱条件:采用梯度洗脱;以流动相 B 的含量来表示为:0~5 min, 5%~20%; 5~15 min, 20%~25%; 15~20 min, 25%~30%; 20~25 min, 30%~35%; 25~30 min, 35%~38%; 30~35 min, 38%~40%; 35~40 min, 40%~42%; 40~45 min, 42%~45%; 45~50 min, 45%~48%; 50~55 min, 48%~50%; 55~60 min, 50%~55%; 60~65 min, 55%~60%; 65~75 min, 60%~75%; 75~80 min, 75%~80%; 80~85 min, 80%~83%; 85~90 min, 83%~85%; 90~95 min, 85%~20%; 95~100 min, 20%~5%; 100~110 min, 5%。

质谱条件:雾化器 N₂30 (psi);干燥氮气 N₂10 (psi);毛细管温度为 350 $^{\circ}$ C,ESI: 3.0 kV,测定范围: m/z 100~1000。

1.3.2 TNF- α 诱导人脐静脉血管内皮细胞炎症反应模型

选择 5~6 代的人脐静脉血管内皮细胞,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下培养,待细胞长满培养瓶底部约 90% 时,传至 6 孔板,长满 6 孔板底部时,换无血清的 1640 细胞培养液,饥饿培养 4 h,使细胞达到同步生长状态。然后加入一定质量浓度的桂花多酚纯化组分 1、2、3,培养 18 h 后再加入 10 U μ g/L TNF- α 培养 4 h。

1.3.3 桂花多酚纯化物处理人脐静脉血管内皮细胞

将 1.3.2 所述中达到同步生长状态的细胞,进行分组:1 号孔为对照组 1 (control 1),不加任何药物;2 号孔为对照组 2 (control 2),只加 10 U μ g/L TNF- α ;4-6 号孔为实验组 1-4 (Test1-4),分别加 6000 U μ g/L、3000 U μ g/L、300 U μ g/L 和 30 U μ g/L 桂花多酚纯化组分 1、2、3。

1.3.4 细胞活力 MTT 的测定

参考 Xu 等^[16]方法测定 1.3.3 中所述各组细胞的活力

1.3.5 激光共聚焦显微镜检及 ROS 含量的测定

ROS 含量按照碧云天生产的试剂盒说明书进行测定, 荧光检测条件为: 激发波长 485 nm, 发射波长为 535 nm; 细胞装载 DCFH-DA 荧光探针后用转盘式激光共聚焦显微镜进行检测。

1.3.6 XOD、SOD 酶活的测定

将 1.3.3 中的各组细胞, 先经 2000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液冲洗后, 再经 2000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。加入 80 UL 含 1%, 100 mmol/L PMSF 的 IP 细胞裂解液, 匀浆后 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 上清液的 XOD、SOD 酶活按照碧云天生产的试剂盒说明书进行测定。

1.3.7 典型相关性分析及数据处理

采用典型相关性分析的方法来研究组分 1、2 和 3 的多酚浓度 (x1)、细胞活性 (x2) 和 ROS (x3) 与 SOD (y1)、XOD (y2) 酶活性的关系; 每组试验重复三次, 实验结果以平均值±标准差来表示, 典型相关分析和数据统计使用 R 软件来完成, $p < 0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果与讨论

2.1 桂花多酚纯化组分及其浓度对细胞活性

(MTT) 的影响

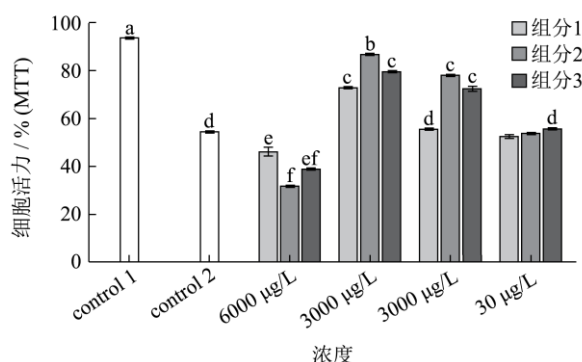


图 1 不同浓度和组分的桂花多酚纯化物对细胞活性的影响
Fig.1 Effects of different concentrations and fractions of POF on the activity of cells

Note: a-f Values in each column with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

由图 1 可知, 对照组 2 的细胞活力显著低于对照组 1 ($p < 0.05$), 说明由 TNF- α 诱导的 HUVEC 炎症模型显著; 当桂花多酚纯化组分 1、2 和 3 浓度为 6000

Ug/L 时, 细胞活力显著低于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明此条件对细胞产生了毒害作用; 组分 1、2、3 浓度为 30 Ug/L 和组分 1 浓度为 300 Ug/L 时, 细胞活力与对照组 2 相当, 说明低浓度的组分 1、2、3 和中等浓度的组分 1 对细胞的保护作用不明显; 当组分 2、3 浓度为 300 Ug/L 和 3000 Ug/L 及组分 1 浓度为 3000 Ug/L 时, 细胞活力显著高于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明对炎症细胞产生了显著的保护作用, 且组分 2 在浓度为 3000 Ug/L 时的细胞活力最大, 说明对细胞的保护作用最为显著 ($p < 0.05$).

2.2 桂花多酚纯化组分及其浓度对活性氧 (ROS) 的清除作用

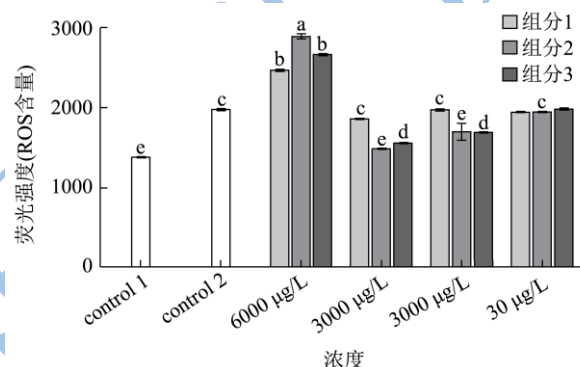


图 2 不同浓度和组分的桂花多酚纯化物对细胞 ROS 的清除作用
Fig.2 Effects of different concentrations and fractions of POF on ROS removal in cells

Note: a-e Values in each column with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

由图 2 可知, 对照组 2 的荧光强度显著高于对照组 1 ($p < 0.05$), 再次验证由 TNF- α 诱导的 HUVEC 炎症模型显著, 说明在 TNF- α 诱导下, 炎症细胞较正常细胞产生了更多的 ROS; 由于高浓度的毒害作用, 当组分 1、2、3 浓度为 6000 Ug/L 时, 荧光强度达到最大, 说明 ROS 含量达到最大; 当组分 1、2、3 浓度为 30 Ug/L 时和组分 1 浓度在 300 Ug/L 时, 荧光强度与对照组 2 相当, 说明低浓度组分 1、2、3 和中等浓度组分 1 对 ROS 的清除作用不明显; 当组分 2、3 浓度为 300 Ug/L 和 3000 Ug/L 及组分 1 浓度为 3000 Ug/L 时, 荧光强度显著低于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明在此条件下桂花多酚具有抑制或清除 ROS 的作用。

2.3 桂花多酚纯化组分及其浓度对超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响

由图 3 可知, 对照组 2 的 SOD 酶活性显著低于

对照组 1 ($p < 0.05$), 说明在炎症反应发生时, SOD 酶活性被抑制。当组分 1、2、3 浓度为 6000 U μ g/L 时, SOD 酶活性显著低于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明高浓度的毒害作用严重抑制了细胞中 SOD 酶活性, 尤其是组分 2 对 SOD 酶活的抑制作用最大, 显著低于其它组 ($p < 0.05$); 当组分 1、2、3 浓度为 30 U μ g/L 和组分 1 浓度为 300 U μ g/L 时, SOD 酶活性与对照组 2 相当, 说明低浓度的组分 1、2、3 和中等浓度的组分 1 对炎症细胞中 SOD 酶活性没有产生影响; 当组分 2、3 浓度为 300 U μ g/L 和 3000 U μ g/L 及组分 1 浓度为 3000 U μ g/L 时, SOD 酶活性显著高于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明在此条件下桂花多酚能显著提高 SOD 酶活性。

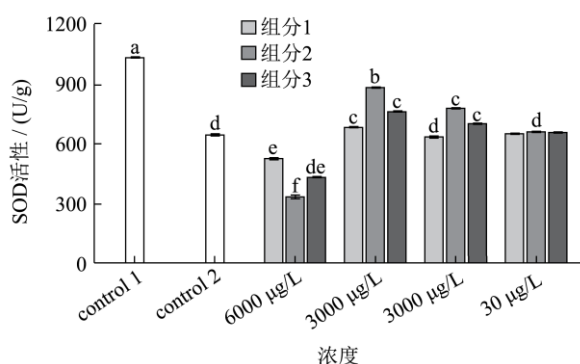


图 3 不同浓度和组分的桂花多酚纯化物对 SOD 酶活的影响

Fig.3 Effects of different concentrations and fractions of POF on SOD activity

Note: a-f Values in each column with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.4 桂花多酚纯化组分及其浓度对黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活性的抑制作用

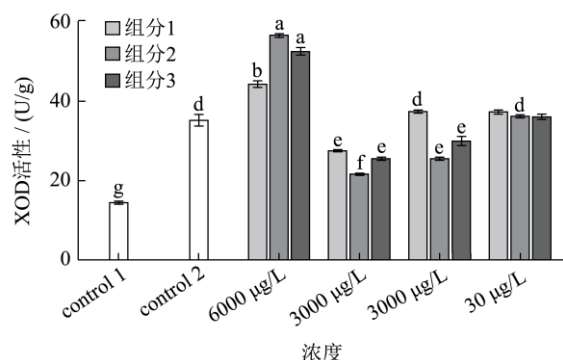


图 4 不同浓度和组分的桂花多酚纯化物对 XOD 酶活的影响

Fig.4 Effects of different concentrations and fractions of POF on XOD activity

Note: a-g Values in each column with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

如图 4 可知, 对照组 2 的 XOD 酶活性显著高于对照组 1 ($p < 0.05$), 说明炎症反应发生时 XOD 酶活较大; 当组分 1、2、3 浓度为 6000 U μ g/L 时, XOD 酶活显著高于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明高浓度的毒害作用显著提高了细胞中 XOD 酶活性; 当组分 1、2、3 浓度为 30 U μ g/L 时和组分 1 浓度在 300 U μ g/L 时, XOD 酶活与对照组 2 相当, 说明低浓度组分 1、2、3 和中等浓度组分 1 对 XOD 酶活性没有影响; 当组分 2、3 浓度为 300 U μ g/L 和 3000 U μ g/L 及组分 1 浓度为 3000 U μ g/L 时, XOD 酶活显著低于对照组 2 ($p < 0.05$), 说明在此条件下桂花多酚能显著抑制 XOD 酶活性。

2.5 桂花多酚纯化组分的 HPLC-MS/MS 分析

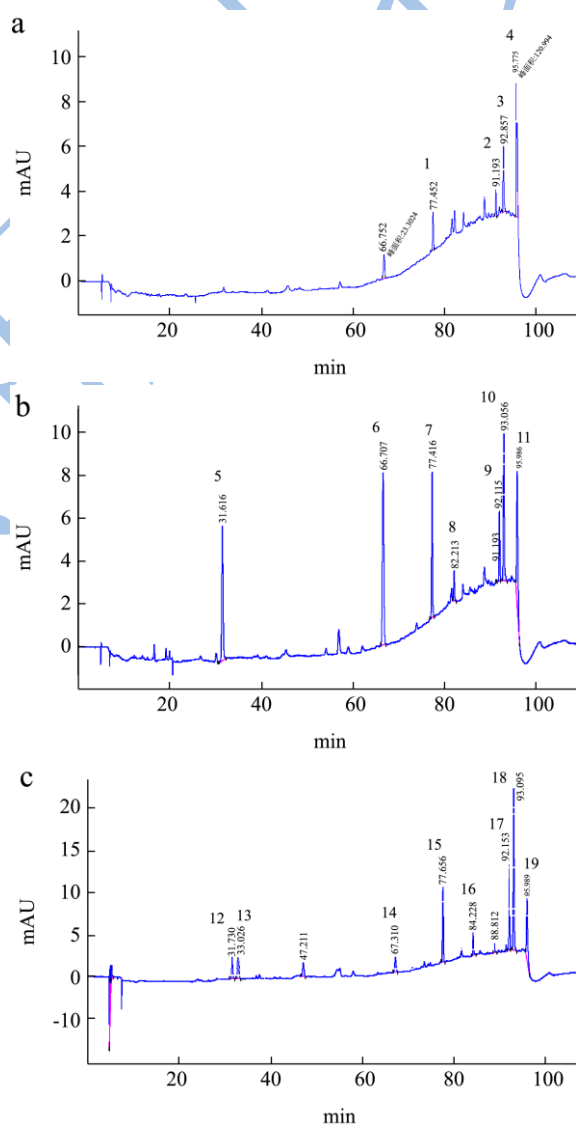


图 5 a、b、c 分别为桂花多酚纯化组分 1、2、3 的高效液相色谱

Fig.5 HPLC chromatograms of fractions 1 (a), 2 (b), and 3 (c) from POF

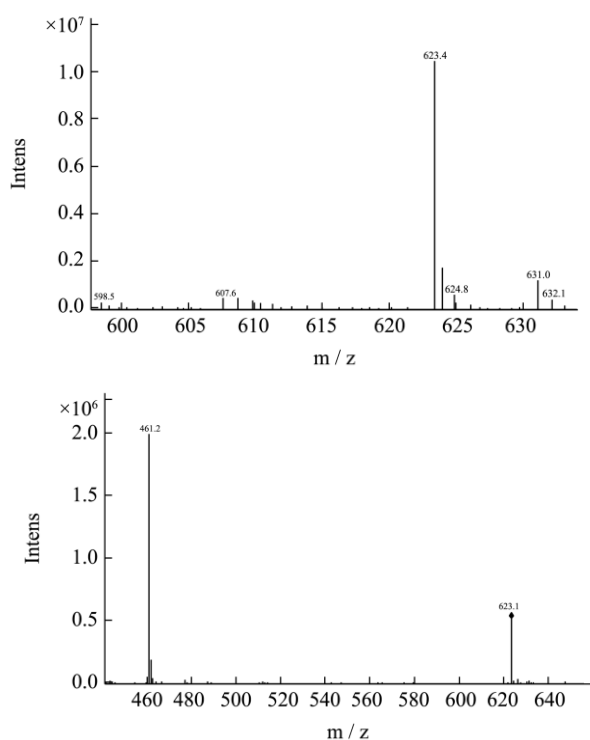


图6 峰13的一级和二级质谱图

Fig.6 MS and MS² spectra of peak 13

由图 5a 中的峰 1、2、3、4 与 5b 中的峰 7、9、

10、11 和图 5c 中的 15、17、18、19 由于溶剂的不同，保留时间略有差异，可以确定为桂花多酚纯化组分 1、2、3 中共有成分，峰 5 和峰 13 可以确定为组分 2 和 3 中共有成分；图 5a 与图 5b、c 最大的差别在于峰 5 和峰 13，说明组分 2 和 3 中含有的这种酚类物质是组分 1 中所没有的，通过质谱检测，峰 13 的分子离子峰 [M-H]⁻ 为 m/z 623.4，失去一个糖苷 (162u) 后，得到二级质谱碎片 Y₀^{*} 为 m/z 461.2，与已报道的麦角甾苷相符^[17]，Hung 等^[3] 从桂花醇提取物中亦分离鉴定出了麦角甾苷。故推测峰 13 为麦角甾苷。峰 8 和峰 15 的分子离子峰 [M-H]⁻ 为 m/z 523.1，失去糖苷 (162u) 后，得到二级碎片 Y₀^{*} 为 m/z 361.0，与已从桂花中鉴定出女贞苷相符^[3]。故推测峰 8 和峰 15 为女贞苷。峰 13 的一级和二级质谱图和数据分别见图 6 和表 1；图 5b 和 c 显示组分 2 和 3 的多酚组成大致是相同的，但是各组分的相对含量不同；桂花多酚纯化物组分 1、2、3 的质谱数据详见表 1。

2.6 桂花多酚纯化组分 2 对 HUVEC 细胞的影响

表 1 桂花多酚在负离子模式下的一级和二级质谱数据

Table 1 MS/MS data of EOF fractions 1, 2, and 3

物质	峰号	保留时间/min	[M-H] ⁻ /(m/z)	Y ₀ [*] /(m/z)	其它特征离子/(m/z)
组分 1	1	77.452	523.1	361	291.0(a)/259.0(b)
	2	91.193	409	246.8	202.8(a)/228.9(b)/349.0(c)/158.9(d)
	3	92.857	549.3	489.1	631.1(a)/216.8(b)
	4	95.775	487.4	469.3	425.7(a)/443.7(b)/371.5(c)
组分 2	5	31.616	623.4	461.2[M-H-162.2]	315.0(a)/179.1(b)/161.0(c)/153.2(d)
	6	66.707	667.3	621.3	622.3(a)
	7	77.416	523.1	361.0[M-H-162.1]	291.0(a)/259.0(b)
	8	82.213	411.1	248.9	493.0(a)/216.8(b)/575.0(c)
	9	92.115	409	246.8	202.8(a)/228.9(b)/349.0(c)/158.9(d)
	10	93.056	549.3	489.1	631.1(a)/216.8(b)
	11	93.986	487.4	469.3	425.7(a)/443.7(b)/371.5(c)
组分 3	12	31.73	407.2	347.2	318.1(a)/383.2(b)/216.9(c)
	13	33.026	623.4	461.2[M-H-162.2]	315.0(a)/179.1(b)/161.0(c)/153.2(d)
	14	67.31	667.3	621.3	622.3(a)
	15	77.656	523.1	361.0[M-H-162.1]	291.0(a)/259.0(b)
	16	84.228	411.1	248.9	493.0(a)/216.8(b)/575.0(c)
	17	92.115	409	246.8	202.8(a)/228.9(b)/349.0(c)/158.9(d)
	18	94.086	549.3	489.1	631.1(a)/216.8(b)
	19	95.062	487.4	469.3	425.7(a)/443.7(b)/371.5(c)

注: a,b,c,d 表示离子丰度的大小, 其中 a>b>c>d。

由 2.1-2.4 试验结果可知桂花多酚纯化组分 2 较组分 1、3，对炎症细胞的影响较大，通过激光共聚焦显微镜检测不同浓度组分 2 对炎症细胞 ROS 含量和生长状态的影响，如图 7 所示，每组图左侧为 GFP 图，右侧为 DIC 图。

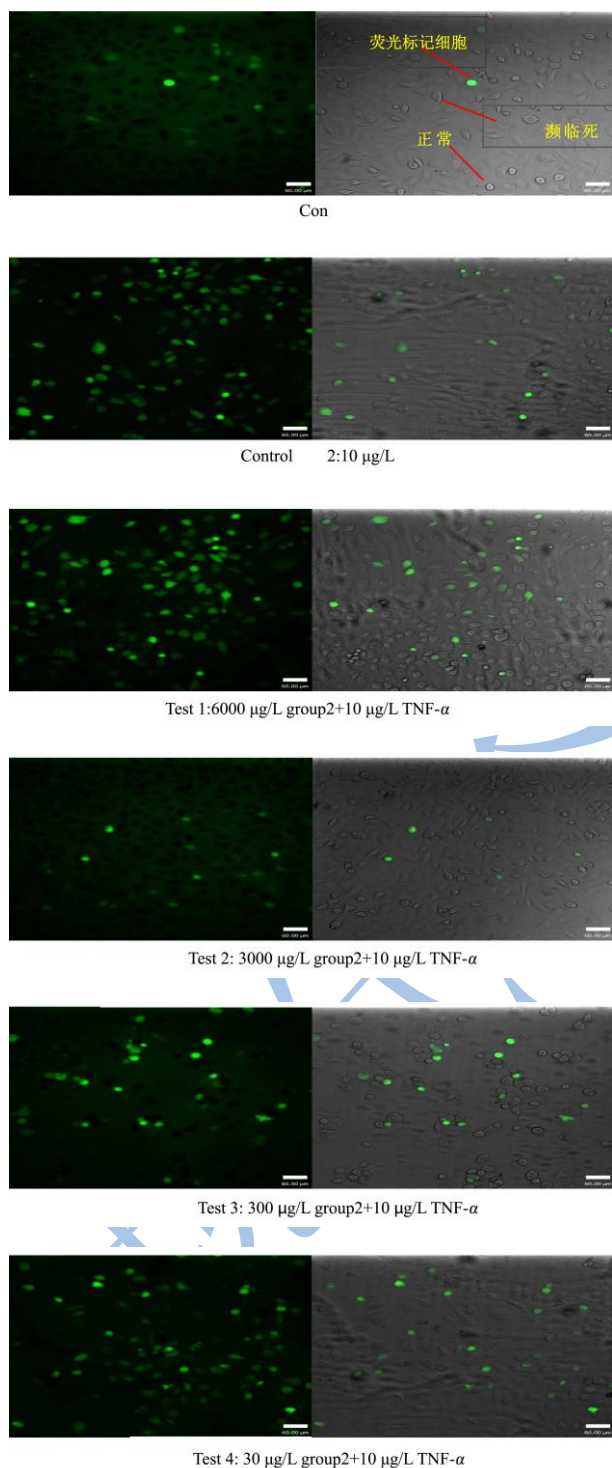


图 7 激光共聚焦显微镜检测不同浓度桂花多酚纯化组分 2 对 TNF-α 诱导 HUVEC 细胞的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of fraction 2 of POF on TNF-α-induced HUVEC cells under confocal

由 DIC 图可以明显的看出细胞的生长状态，正常细胞近似球形，呈现向上凸出状，具有一定的立体感，ROS 含量较高的细胞会发出绿色荧光，濒临死亡或死亡细胞呈不规则或梭形，如图 7 (Control 1) 中所标示；Control 2 较 Control 1 中的细胞呈现梭形的多，说明炎症反应对细胞的生长产生了影响；Test2 和 Test3 的细胞生长状态较 Control 2 中的好，濒临死亡和死亡的细胞较少，说明对炎症细胞产生了一定的保护作用；Test1 中的细胞死亡较多，细胞大多呈梭形，生长状态不佳，可能是由于高浓度的组分 2 对细胞产生毒害作用；Test 4 与 Control 2 中的细胞生长状态大致形同，说明低浓度的组分 2 对细胞的生长状态几乎没有影响；由 GFP 图可知，每组细胞中的荧光强度大小与 2.2 中的结果相符。

2.7 多酚浓度与抗炎效果的典型相关性分析

根据 2.1-2.4 中，组分 1、2 和 3 的多酚浓度对细胞活性、ROS、SOD 和 XOD 影响的试验数据，多酚浓度 (x1)、细胞活性 (x2) 和 ROS (x3) 与 SOD (y1)、XOD (y2) 酶活性的典型相关方程如下：

其中 $x_i^*, y_j^*, i=1,2,3; j=1,2$ 是标准化后的数据：

$$\begin{cases} u_1 = -0.04x_1^* - 0.003x_2^* + 0.35x_3^* \\ u_2 = -0.20x_1^* + 1.35x_2^* + 1.45x_3^* \\ v_1 = -0.12y_1^* + 0.18y_2^* \\ v_2 = -1.33y_1^* - 1.32y_2^* \end{cases}$$

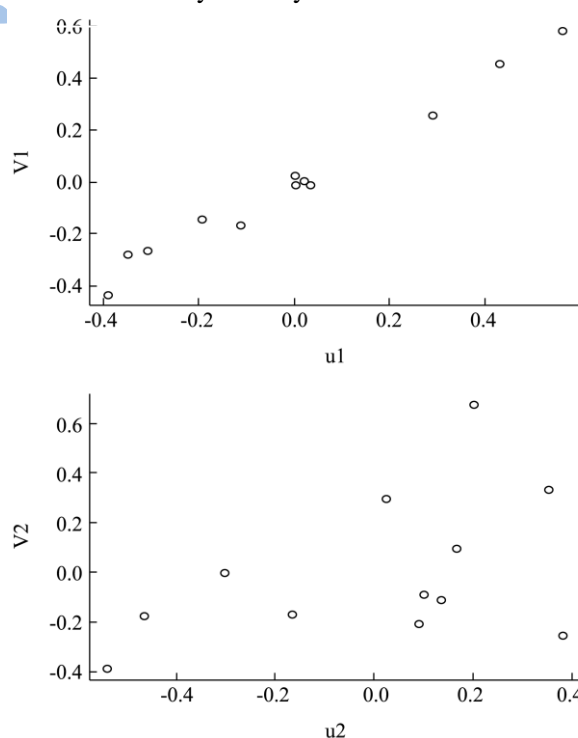


图 8 第 1、2 典型变量的散点图

Fig.8 Scatter plots of first and second typical variables

图 8a、b 分别是第 1, 2 对典型变量的散点图, 图 8a 中的点在一直线附近, 其典型相关系数 $\rho(u_1, v_1)=0.99$; 图 8b 中的点分布很散, 其典型相关系数 $\rho(u_2, v_2)=0.46$, 所以选择第 1 对主变量(u_1, v_1)来解释各个变量之间的关系。由第 1 对典型性相关方程可知细胞中的 SOD、XOD 的酶活性与多酚浓度 (x_1)、细胞活性 (x_2) 和 ROS (x_3) 的关系显著 ($p<0.05$), 说明不同浓度桂花多酚纯化组分可能是通过对细胞中 SOD 和 XOD 酶活性的影响, 起到对炎症细胞的保护作用。

3 讨论

由上述结果分析可知, 相同浓度桂花多酚纯化组分 1、2、3 对由 TNF- α 诱导的人脐静脉血管内皮细胞炎症反应的影响是不同的, 通过 HPLC-MS/MS 检测可知, 是由于组分 1、2、3 多酚含量和组成不同产生的。与组分 1 相比, 组分 2 中含有的麦角甾苷可能是导致二者对炎症细胞保护作用不同的主要原因; 组分 2 和组分 3 含有的多酚组分大致相同, 但各组分多酚含量不同, 是导致二者对炎症细胞保护作用不同的主要原因。

黄嘌呤氧化酶 (XOD) 是核苷酸的分解代谢酶, 可通过级联反应生成大量活性氧(ROS), 包括 $O^{\cdot-}$ 、OH 等^[18], 活性氧 (ROS) 能引起一系列的有害反应, 包括细胞凋亡、内皮功能障碍、心脏机械能量解耦联、炎症、硬化、癌症和衰老等病理过程^[19-20]。过氧化物歧化酶(SOD)能催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢和氧, 并具有减弱肺部炎症的作用^[21-22], 已有研究表明桂花醇提物可以显著提高炎症发应过程中 SOD 酶活性^[10]。本研究发现, 对炎症细胞保护作用最显著的桂花多酚纯化组分 2 在浓度为 300~3000 U μ L 时可以显著提高 SOD 酶活性和抑制 XOD 酶活性, 起到抑制炎症的作用。但其机理尚不清楚, 需进一步研究。

4 结论

桂花多酚纯化组分 2、3 浓度为 300 U μ L~3000 U μ L 及组分 1 浓度为 3000 U μ L 时, 可显著提高由 TNF- α 诱导的人脐静脉血管内皮细胞的活力 (MTT) 和 SOD 活性, 显著抑制炎症细胞中活性氧 (ROS) 含量和 XOD 酶活性, 桂花多酚纯化组分可能是通过影响炎症细胞中 SOD 和 XOD 的酶活性, 而起到显著的抗炎效果。

参考文献

[1] Ouyang X L, Wei L X, Wang H S, et al. Antioxidant activity

and phytochemical composition of *Osmanthus fragrans* ' pulps [J]. South African Journal of Botany, 2015:162-166

[2] Jiang L, Nakamura S, Xu B, et al. Chemical structures of constituents from the flowers of *Osmanthus fragrans var. aurantiacus* [J]. Journal of Natural Medicines, 2015, 69(1): 135-141

[3] Hung C Y, Tsai Y C, Li K Y. Phenolic antioxidants isolated from the flowers of *Osmanthus fragrans* [J]. Molecules, 2012, 17(9): 10724-10737

[4] Bing F H, Xia L G, Ping X, et al. Chemical composition comparison of the essential oil from four groups of *Osmanthus fragrans Lour.* flowers [J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2012, 15(5):832-838

[5] Zhang Y, Wang K, Zou B Q, et al. Studies on the free radical scavenging activity and transition metal ion chelation ability of the extracts from *Osmanthus fragrans* seeds[J]. Asian Journal of Chemistry, 2011, 23(7): 3169-3171

[6] Huang S, Pan Y, Gan D, et al. Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans* [J]. Medicinal Chemistry Research, 2011, 20(4): 475-481

[7] Huang B, Chen H, Shao L. The ethanol extract of *Osmanthus fragrans* attenuates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated inflammatory effect through the nuclear factor erythroid 2-related factor-mediated antioxidant signalling pathway [J]. Archives of Oral Biology, 2015, 60: 1030-1038

[8] Hung C Y, Huang F L, Shi L S, et, al. The ethanol extract of *Osmanthus fragrans* flowers reduces oxidative stress and allergic airway inflammation in an animal model [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM, 2013, 2013:211-230

[9] Lee D G, Lee S M, Bang M H, et, al. Lignans from the flowers of *Osmanthus fragrans var. aurantiacus* and their inhibition effect on NO production [J]. Archives of Pharmacal Research, 2011, 34(12): 2029-2035

[10] Yoo K H, Park, J H, Lee D K, et, al. Pomolic acid induces apoptosis in SK-OV-3 human ovarian adenocarcinoma cells through the mitochondrial-mediated intrinsic and death receptor-induced extrinsic pathways [J] Oncology Letters, 2013, 5(1): 386-390

[11] 杨威,肖柳英,潘竞锵,等.卡托普利对胰岛素抵抗-高血压综合征大鼠 TNF- α 、NO 和 SOD 水平的影响[J].中国药师, 2008, 11(5): 519-522

YANG Wei, XIAO Liu-ying, PAN Jing-qiang, et, al. The

- effects of captopril on level of TNF- α , NO and SOD of insulin resistant-hypertensive-syndrome rats [J]. *China Pharmacist*, 2008, 11(5): 386-390
- [12] Huang W Y, Wang J, Li C Y. Anti-inflammatory effect of malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside [J]. *Bio-medical Materials and Engineering*, 2013, 23: S415-S424
- [13] Noh K H, Kim J K, Song Y S. Suppressive effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coats on the production of cell adhesion molecules and inflammatory mediators in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Journal of the Korean Society of Food Science & Nutrition*, 2011
- [14] Lee J H, Zhou H Y, Cho S Y, et al. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2007, 30(10): 1318-1327
- [15] Lee D G, Park J H, Yoo K H, et al. 24-Ethylcholesta-4, 24(28)-dien-3,6-dione from *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* flowers inhibits the growth of human colon cancer cell line, HCT-116 [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2011, 54(2):206-210
- [16] Xu M, Mccanna D J, Sivak J G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells [J]. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods*, 2015, 71(71C):1-7
- [17] Lin L Z, Harnly J M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium Ramat*) [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(1): 319-326
- [18] Gonzalez A, Schmid A, Gm S, et al. XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells [J]. *Cellular Signalling*, 2002, 14(2):153-9
- [19] Calhoun D A, Jones D, Textor S, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research [J]. *Hypertension*, 2008, 51(6): 1403-1419
- [20] Lenz T L, Monaghan M S. Life style modifications for patients with hypertension [J]. *Journal of the American Pharmacists Association*, 2008, 48: 92-102
- [21] Brenda L G, Hagir S, Mamo L B, et al. Prenatal hypoxia decreases lung extracellular superoxide dismutase expression and activity [J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular & Molecular Physiology*, 2002, 283(3):549-L554
- [22] Mamo L B, Suliman H B, Giles B L, et al. Discordant extracellular superoxide dismutase expression and activity in neonatal hyperoxic lung [J]. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2004, 170(3): 313-318