

桑葚提取物体外抗炎作用及机制的研究

朱翠玲^{1,2,3}, 陈铭^{1,2}, 汪孟涵¹, 沈婷¹, 强倩¹, 王新风¹, 纪丽莲^{1,2}, 冯作山⁴, 陶永霞⁴, 白羽嘉⁴, 胡卫成¹
(1. 淮阴师范学院, 江苏省高校区域现代农业与环境保护协同创新中心, 江苏淮安 223300) (2. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300) (3. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127) (4. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 本文采用脂多糖 (LPS) 刺激小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7, 建立细胞体外的炎症模型, 研究桑葚提取物对 LPS 诱导巨噬细胞 RAW264.7 分泌功能的影响及其作用机制。实验用 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 RAW264.7 细胞, 在不同浓度样品的干预下, 用 MTT 法检测不同浓度的样品对 RAW264.7 细胞的作用; 用 Griess 法检测细胞液中 NO 的含量; 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测细胞液中 PGE₂ 含量; 用免疫印迹法 (Western Blot) 和 RT-PCR 法检测桑葚提取物对细胞 iNOS 和 COX-2 表达的影响; 用 HPLC 法检测桑葚提取物中白藜芦醇的含量。结果表明桑葚提取物浓度在 0.5~2 mg/mL 范围内对细胞生长无明显影响; 在 1~2 mg/mL 范围内能有效抑制 NO 和 PGE₂ 的分泌并能有效抑制 iNOS 和 COX-2 的表达; 桑葚提取物中白藜芦醇的含量为 107.44 \pm 0.48 $\mu\text{g/g}$ 。这表明桑葚提取物抑制炎症相关因子表达量, 从而减弱促炎症反应, 发挥抗炎功效, 其抗炎活性可能与桑葚中含有较高的白藜芦醇相关。

关键词: 桑葚; 内毒素; 抗炎; 白藜芦醇

文章编号: 1673-9078(2017)4-61-66

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.010

In vitro Characterization of the Anti-inflammatory Effects of Mulberry

Extract and the Molecular Mechanisms

ZHU Cui-ling^{1,2,3}, CHEN Ming^{1,2}, WANG Meng-han¹, SHEN Ting¹, QIANG Qian¹, WANG Xin-feng¹, JI Li-lian^{1,2}, FENG Zuo-shan⁴, TAO Yong-xia⁴, BAI Yu-jia⁴, HU Wei-cheng¹

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China) (2. Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake, School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China) (3. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China) (4. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: An *in vitro* model of inflammation was established by stimulating the mouse peritoneal macrophage cell line RAW264.7 with lipopolysaccharide (LPS). This model was employed to investigate the anti-inflammatory effects of mulberry extract and the underlying molecular mechanisms. RAW264.7 cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS, followed by treatment with different concentrations of the extract. The effect of the extract on RAW264.7 cell viability was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) content were determined by the Griess reagent assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The expression of nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting. At the tested concentrations (0.5~2 mg/mL), the mulberry extract did not affect RAW264.7 cell growth. At concentrations ranging from 1 to 2 mg/mL, the extract significantly inhibited NO and PGE₂ secretion, as well as iNOS and COX-2 expression. The resveratrol content in the mulberry extract was 107.44 \pm 0.48 $\mu\text{g/g}$. In conclusion, the results suggest that mulberry extract attenuates LPS-stimulated inflammatory responses and exerts anti-inflammatory effects by suppressing the expression of inflammation-related cytokines; the anti-inflammatory effect of mulberry extract is probably attributable to its high resveratrol content.

Key words: mulberry; endotoxin; anti-inflammatory; resveratrol

收稿日期: 2016-04-27

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目 (14KJB550002); 江苏省自然科学基金项目 (BK20150414); 国家科技支撑计划项目 (2015BAD29B00)

作者简介: 朱翠玲 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 食品分子营养学

通讯作者: 胡卫成 (1984-), 男, 博士后, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品化学; 白羽嘉 (1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 农产品加工与综合利用

桑葚(*Morus alba*)又名桑枣、桑果和乌葚等,系桑属(*Morus Linn*)植物^[1]。桑葚资源丰富,在我国除青藏高原外其他各地均有种植。桑葚味道酸甜可口且营养丰富,现代营养学证明:桑葚除含糖类、蛋白质、脂类等丰富的营养素之外,还含有许多重要的活性物质如原花青素、花色苷、活性多糖、有机酸和白藜芦醇等^[2,3]。大量研究表明,桑葚具有抗氧化应激、抗肿瘤、抗辐射消除炎症、改善心血管功能及预防冠心病等多种对人体有益的功效^[4,5]。传统中医认为桑葚味甘,性寒,具生津止渴、补肝益肾、滋阴补血和明目乌发等功效。

炎症是动物机体对各种致炎因子及促炎因子或外界对机体的损伤及刺激所发生的以防御反应为主的应答反应,以局部组织的病变为主要表现^[6]。炎症是一种极其常见的基本病理过程,往往伴随着疾病的发生,且会促进疾病的发展,严重时会产生恶性肿瘤等。很多慢性疾病的发病机制都涉及炎症,如:炎症性肠病、类风湿关节炎、败血症和癌症等。革兰氏阴性菌外膜的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是诱发慢性炎症及感染性疾病的重要因素,产生炎症反应的细胞因子主要包括:抗肿瘤坏死因子和白介素等。因此,抑制前炎症分子的产生成为预防或治疗各种疾病的重要靶点^[7]。早在1993年,国家卫生部就将桑葚列为药食兼用的农产品之一。近年来,随着人们对桑葚化学成分及药理作用方面的研究越来越广泛,其在医药保健、食品工业上也得到广泛应用。但迄今为止,关于桑葚提取物对体外巨噬细胞炎症影响的研究报道较少^[4,5]。本文用桑葚提取物对LPS刺激RAW264.7细胞构建体外细胞炎症模型来探讨桑葚提取物的抗炎功效,为食品工业开发功能性食品提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑葚:新疆药桑。采集自新疆阿克苏地区库车县牙哈镇塔克马克农场,采集时间:2015年7月14日。白藜芦醇标准品(RES)由扬州大学谢虹老师提供;脂多糖(LPS)、甲氮甲唑蓝(MTT)、亚硝酸钠及台盼蓝均购于Sigma公司;ELISA试剂盒购于美国安迪生物科技有限公司;30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液(29:1)、RIPA裂解液、辣根过氧化物酶试剂盒、微量BCA蛋白定量试剂盒均购于北京康为世纪生物科技有限公司;胎牛血清(FBS)购于HyClone公司;RPMI1640培养基、抗生素购于Gibco公司;蛋白质Marker购于美国NEB(New England Biolabs)公司。

Trizol购于Invitrogen公司;过硫酸铵购于国药集团化学试剂有限公司;GAPDH、iNOS、COX-2引物由上海捷瑞生物工程有限公司;抗体iNOS、COX-2、 β -actin购于Cell Signaling公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:美国安捷伦1260;9700 PCR扩增仪:ABI公司;水平电泳槽:美国Bio-Rad公司;ALPHA 1-2LDPLUS冷冻干燥机:德国ALPHA公司;ME254S(0.1 mg/250 g)分析天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司;GEL XP System伯乐凝胶成像系统:美国Bio-Rad公司;Tanon 5200 Multi数码凝胶图像处理系统:上海天能科技有限公司;Tecan infinite M200PRO酶标仪:瑞士Tecan公司;KQ-500B超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;二氧化碳培养箱,日本SANYO公司;C2500-R 1.5 mL、2.0 mL台式高速冷冻离心机:德国Eppendorf公司。

1.3 试验方法

1.3.1 桑葚样品预处理及供试品配制

准确称取干燥后的桑葚3.00 g,按1:25的体积比加入75 mL、75%(V/V)的乙醇,35℃超声提取8 min,提取2次,合并溶液后过滤除去残渣,滤液浓缩后用乙腈洗脱并定容至10 mL吸取1 mL用0.45 μ m微孔膜过滤,滤液作为供试品。

1.3.2 白藜芦醇标准曲线的绘制

精密称取白藜芦醇标准品5 mg,用少量乙腈溶解完全并定容至25 mL容量瓶,得到标准品母液浓度为0.2 mg/mL,精密配制不同浓度的白藜芦醇标准液12.5、50、100、200 μ g/mL。在306 nm处测定其峰面积,绘制白藜芦醇标准曲线。

1.3.3 色谱条件

色谱柱Eclipse XDB-C18(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),流动相:乙腈:水=25:75(V/V),检测波长:306 nm,柱温:30℃,流速:1.0 mL/min,进样量为20 μ L。

1.3.4 细胞培养

RAW264.7细胞用含10%胎牛血清和青霉素(100 U/mL)及链霉素(100 mg/mL)的RPMI1640培养基置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,2~3 d更换新的培养基。当细胞融合率达到80%时对细胞进行继代培养。

1.3.5 不同浓度样品对RAW264.7细胞毒性的检测

MTT工作液配制:准确称取0.10 g甲氮甲唑蓝试剂后,加入到20 mL PBS中,混匀避光过滤,配制成5 mg/mL MTT溶液。

MTT 终止液配制: 准确称取 20.00 g SDS 试剂, 加入 0.176 mL HCl 溶液后, 定容至 20 mL。

采用 MTT 法检测样品对 RAW264.7 细胞毒性的影响, 待细胞长至对数期后, 取细胞悬浮液稀释细胞数为 1×10^6 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 培养 16~18 h。向 96 孔板中加入不同浓度样品, 每个浓度梯度设 3 个复孔。同时设正常对照组和样品处理组。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后吸去上清, 每孔加入 100 μ L、0.5 mg/mL 的 MTT 测试工作液, 于上述培养箱中培养 4 h 后加入 100 μ L MTT 终止液。待完全溶解后, 用酶标仪在 550 nm 下测其 OD 值。

1.3.6 不同浓度样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 和 PGE₂ 的影响

取对数生长期细胞, 调整细胞数为 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板每孔 100 μ L 培养 16 h。用不同浓度样

品处理细胞, 30 min 后加入 50 μ L LPS(终浓度 1 μ g/mL) 刺激并设立正常对照组, LPS 组和样品处理组, 每组设 3 个复孔。用 Griess 法检测细胞上清液中 NO 的含量; 用 ELISA 试剂盒测定 PGE₂ 的含量。

1.3.7 不同浓度样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 mRNA 的表达检测

取对数生长期 RAW264.7 细胞, 接种 5×10^6 个细胞于 4 mL 培养皿中, 培养 16 h。吸去旧的培养基, 加入 1 mg/mL、2 mg/mL 桑葚样品溶液, 同时设立正常对照组、LPS 组、样品处理组, 放入培养箱 30 min 后加入 LPS (终浓度 1 μ g/mL) 处理 6 h。用 Trizol 试剂盒法提取细胞总 RNA。荧光定 PCR 检测 mRNA 的表达量: 移取 2 μ L 上述 RNA 转为 cDNA 进行 PCR 扩增实验。

正反向引物碱基序列如下:

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

引物名称	上游引物序列 5'-3'	下游引物序列 5'-3'
GAPDH	CACTCACGGCAAATTC AACGGCACA	GACTCCACGACATACTCAGCAC
iNOS	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAG	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTG
COX-2	CACTACATCCTGACCCACTT	AIGCTCCTGCTTGAGTATGT

半定量 PCR 反应体系: 10 μ L 2 \times Ex Taq、上下引物各 0.5 μ L、cDNA 2 μ L 以及 7 μ L 蒸馏水混匀后置于 PE 管中。GAPDH、COX-2 及 TNF- α 的扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、2 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s (30 个循环) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、5 min。

实时定量 PCR 检测反应体系: 25 μ L 2 \times Ex Taq、上下游引物各 1 μ L 及 9 μ L 的蒸馏水。COX-2 的扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、10 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s (30 个循环) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、5 min。iNOS 的扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、2 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s (27 个循环) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、5 min。GAPDH 的扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、2 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s (30 个循环) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、5 min。产物经电压为 100 V, 时间为 30 min 的琼脂糖凝胶电泳对 iNOS 和 COX-2mRNA 的表达量进行分析。

1.3.8 Western Blot 检测 RAW264.7 细胞 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达水平

取对数生长期 RAW264.7 细胞接种 5×10^6 个细胞于 4 mL 体系的培养皿中, 培养 16 h 后向其中加入不同浓度的样品, 并同时设立正常对照组、LPS 组、样品处理组。放入培养箱 6 h 后除去培养基, 用 PBS 冲洗细胞。收集细胞并于 4 $^{\circ}$ C、14000 r/min 条件下离心 15 min, 加入一小勺玻璃珠及 200 μ L 蛋白酶裂解液充分振荡, 4 $^{\circ}$ C、14000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液

即细胞总蛋白。按 BCA 试剂盒法制作标准曲线测定细胞总蛋白的浓度, 用 Western Blot 检测 GAPDH、iNOS 和 COX-2 的表达。取不同浓度样品蛋白 30 μ g/mL, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转膜。蛋白转膜移至含有封闭液的塑料盒内置于摇床室温下进行脱色, 加入一抗室温孵育洗涤, 加入二抗室温孵育洗涤。将洗好的膜加入显色剂采集图像。

1.3.9 数据分析

本研究细胞实验设立 3 个复孔, 结果以 Mean \pm SD 表示, 采用 SPASS 20.0 统计分析软件对数据进行方差分析, 图表用 SigmaPlot 绘制。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度桑葚提取物对 RAW264.7 细胞毒性及释放细胞炎症因子的影响

MTT 法检测桑葚提取物对 RAW264.7 细胞是否有毒性。如图 1a 所示与正常对照组相比桑葚提取物在 0.5~2 mg/mL 时对细胞无明显的毒性, 与正常对照组相比无显著性差异 ($p > 0.05$)。当浓度为 4 mg/mL 时对细胞有毒性作用, 与正常对照相比差异性显著 ($p < 0.05$)。因此, 本课题其他研究选取桑葚样品浓度在小于 4 mg/mL。不同浓度桑葚提取物处理细胞 24 h

后吸取细胞上清液,用 Griess 法检测由 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞培养液中的 NO 分泌情况及用 ELISA 法检测桑葚提取物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞培养液中 PGE₂ 的影响。

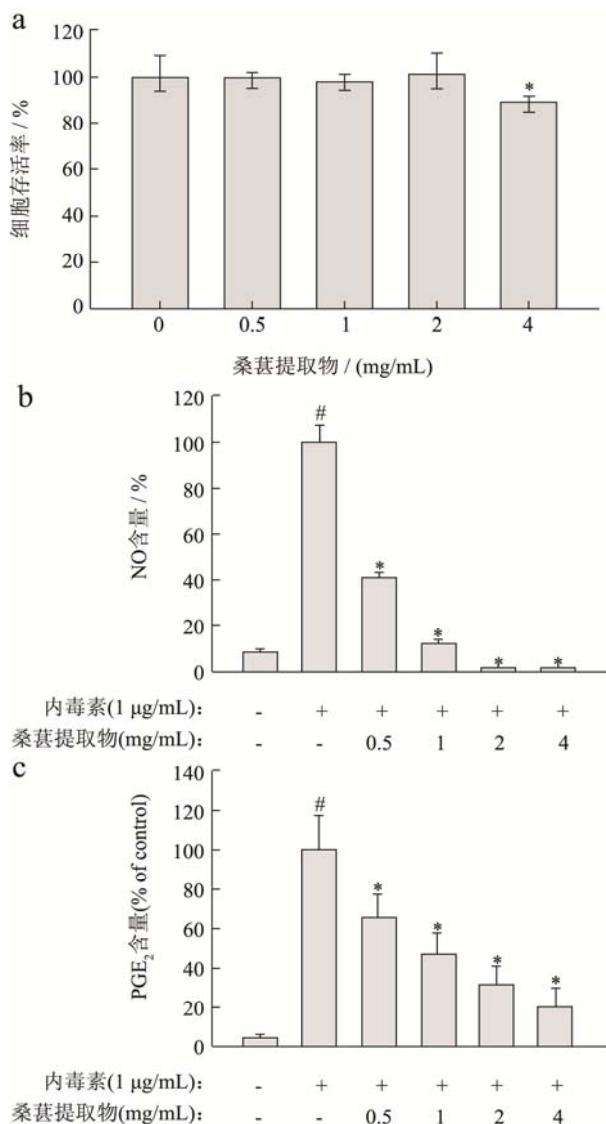


图1 桑葚提取物对 RAW264.7 细胞毒性 (a) 及释放 NO (b) 和 PGE₂ (c) 的影响

Fig.1 Effects of mulberry extract on RAW264.7 cell viability (a) and the production of NO (b) and PGE₂ (c) by these cells

如图 1b~c 所示的结果在正常状态下, RAW264.7 细胞分泌的 NO 和 PGE₂ 处于基础水平, 经 LPS (1 µg/mL) 刺激后 NO 和 PGE₂ 的分泌量显著增加, 与正常对照组比较差异性显著 ($p < 0.05$)。不同浓度样品对 NO 和 PGE₂ 的释放具有明显的抑制作用且呈现剂量依赖性关系, 浓度越大抑制作用越强, 其 NO 的含量分别为 $40.56 \pm 2.43\%$ 、 $12.16 \pm 1.61\%$ 、 $1.48 \pm 0.17\%$ 和 $1.27 \pm 0.40\%$, 其 PGE₂ 的含量分别为 $65.43 \pm 12.21\%$ 、 $47.38 \pm 10.67\%$ 、 $31.54 \pm 9.76\%$ 和 $20.65 \pm 9.8\%$, 与 LPS 组比较差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。因此, LPS 能诱

导 RAW264.7 细胞释放 NO 和 PGE₂, 而桑葚提取物能够不同程度抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO 和 PGE₂ 且呈浓度依赖性。

2.2 不同浓度桑葚提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 COX-2 和 iNOS 的 mRNA 表达影响

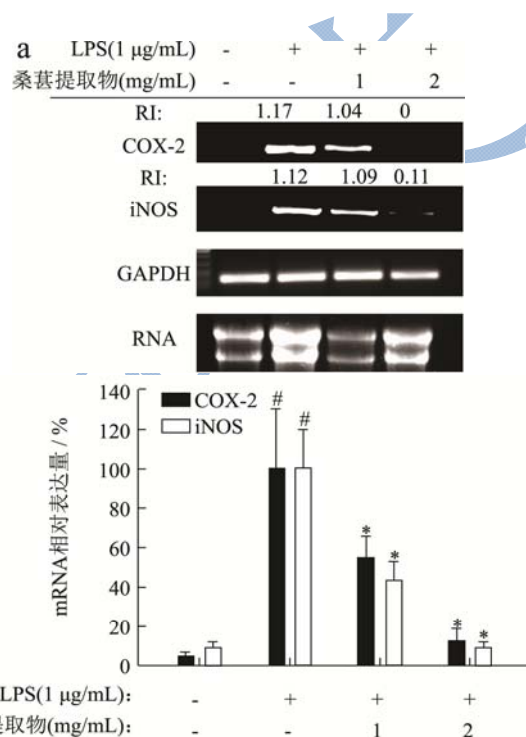


图2 桑葚提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of mulberry extract on iNOS and COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cells in response to LPS stimulation

LPS 诱导 RAW264.7 细胞促使细胞内相关炎症因子的 mRNA 表达水平显著升高, COX-2 和 iNOS 是细胞内参与炎症反应的重要酶。桑葚提取物对 COX-2 和 iNOS mRNA 的表达均有一定的抑制作用。如图 2a 半定量 PCR 结果所示, 正常对照组中 COX-2 和 iNOS mRNA 表达量较低, 经 LPS 诱导后 COX-2 和 iNOS 的 mRNA 表达显著提高。样品处理组能有效抑制 COX-2 和 iNOS 的 mRNA 表达并呈现出量效关系。实时定量 PCR 结果如图 2b 显示 COX-2 和 iNOS mRNA 表达量随着给药浓度的增大而降低, 其中 COX-2 表达量依次为 $54.67 \pm 11.23\%$ 、 $12.34 \pm 6.74\%$, iNOS 的表达量依次为 $43.21 \pm 10.23\%$ 、 $9.34 \pm 3.21\%$, 与相应的 LPS 组对比差异显著 ($p < 0.05$), 这与半定量 PCR 的研究结果相一致。由此可得, 桑葚提取物对 COX-2 和 iNOS mRNA 的表达均有一定的抑制作用且

具有浓度依赖性。

2.3 不同浓度样品对 LPS 诱导的 RAW264.7

细胞 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

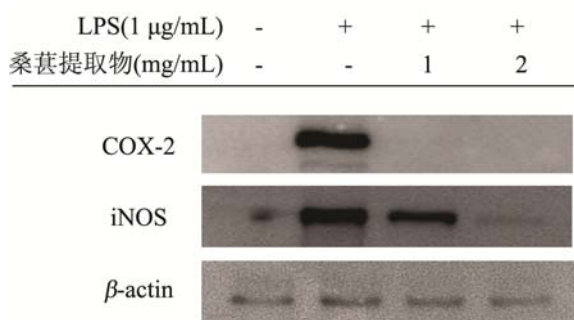


图3 桑葚提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of mulberry extract on iNOS and COX-2 protein expression in RAW 264.7 cells after being stimulated by LPS

Western Blot 检测结果如图 3 所示，正常情况下，RAW264.7 细胞中 iNOS 蛋白表达很少，而 COX-2 基本无表达。与正常对照组相比，在 LPS 刺激下二者的蛋白表达显著上调，差异性极显著 ($p < 0.01$)。桑葚提取物能够有效抑制 iNOS 和 COX-2 蛋白表达，且呈现浓度剂量关系，与 LPS 组相比差异显著 ($p < 0.05$)。

2.4 HPLC 法测定桑葚中白藜芦醇的含量

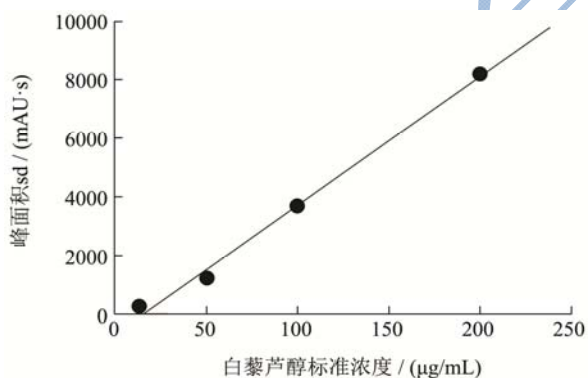


图4 白藜芦醇标准曲线

Fig.4 Resveratrol standard curve

表1 桑葚样品中白藜芦醇含量测定

Table 2 Determination of the resveratrol content in mulberry samples

参数	次数			平均值±SD
	1	2	3	
样品峰面积 Sd/(mAU·s)	801.78	813.83	810.65	808.75±6.2
样品浓度/(g/mL)	32.07	32.34	32.27	32.23±0.14
样品含量/(g/g)	106.90	107.8	107.58	107.44±0.48

HPLC 法所得白藜芦醇的浓度与峰面积的线性关系如图 4 所示，其数学关系式为：

$$y=43.54x-594.6 (R^2=0.993)$$

这显示了白藜芦醇在 12.5~200 μg/mL 范围内具有良好的线性关系。根据白藜芦醇标准曲线计算得出桑葚中白藜芦醇的含量为 107.44±0.48 μg/g 如表 2 所示。

2.5 白藜芦醇标品对 LPS 诱导的 RAW264.7

细胞毒性及释放 NO 的影响

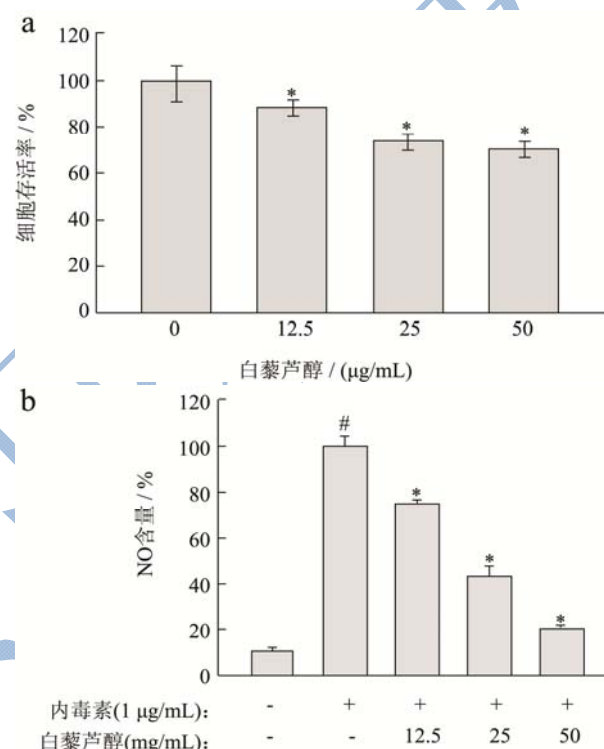


图5 白藜芦醇对 RAW264.7 分泌 NO 的影响

Fig.5 Effects of resveratrol on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells

白藜芦醇标品处理 RAW264.7 细胞，用 MTT 法检测细胞毒性其结果如图 5a 所示，与正常对照组相比白藜芦醇标品对 RAW264.7 细胞毒性作用不明显；Griess 法检测白藜芦醇标品对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 水平，其结果如图 5b 所示，不同浓度白藜芦醇标品对 NO 的释放具有明显的抑制作用并且呈现出剂量依赖性关系，其 NO 的含量百分比分别为 70.06±0.67%、42.98±2.93%和 20.56±0.80%。桑葚抗炎作用可能与其所含丰富的白藜芦醇相关。后续工作将以抗炎活性为导向，进一步分离桑葚中具有抗炎活性的化合物，以丰富桑葚化合物数据库。

3 结论

3.1 桑葚是一种食药兼用的果实，富含花青素、葡萄

糖、果糖、蛋白质、脂类、醇类、挥发油、芦丁和胡萝卜素等^[8]。白藜芦醇为桑葚中一种重要且含量丰富的生物活性物质,具有抗肿瘤、抗炎、抗菌和抗自由基的作用,能保护肝脏、保护神经、保护心脑血管,还具有增强免疫力、对骨代谢和棕色脂肪的分化具有促进作用^[9]。陈诚^[10]通过反高效液相色谱法对桑葚中的白藜芦醇和白藜芦醇苷进行了测定,赵康^[11]等人采用 HPLC 方法检测不同采摘时期桑葚中白藜芦醇及白藜芦醇苷含量各有差异,其中采摘期为红果刚转紫时白藜芦醇含量最高达到 94.5 $\mu\text{g/g}$ 。本课题研究桑葚提取物的体外抗炎活性,用 HPLC 法对桑葚中白藜芦醇的含量进行了测定,研究结果得出桑葚中白藜芦醇的含量为 $107.44 \pm 0.48 \mu\text{g/g}$,高于赵康等人的研究,可能与桑葚的不同品种、产地及栽培地区的气候等条件不同而产生差异。

3.2 炎症性疾病主要是由多细胞参与的复杂过程,其基本机制是机体应对外界炎症因子损伤刺激实现的自我保护修复的防御反应^[12]。RAW264.7 细胞是调节炎症反应及体内启动炎症因子的重要细胞,可由 LPS 诱导产生一系列的炎症反应,促使细胞分泌大量的炎症因子。LPS 经细菌释放通过 LR4 受体介导进入宿主体内,激活 RAW264.7 细胞炎症信号通路,诱导各种炎症因子的产生及释放如 NO、PGE₂、IL-6 和 IL-1 β 等^[13]。

3.3 桑葚具有抗氧化及抗炎的特性^[14],但迄今关于桑葚提取物对抗炎及调节机制还不是特别明确。桑葚提取物中白藜芦醇含量较高且白藜芦醇对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症因子具有调节作用^[15],因此桑葚具有抗炎作用可能与含有白藜芦醇具有密切的关系。

3.4 本研究以 LPS 刺激 RAW264.7 为细胞炎症模型,探讨桑葚提取物对 LPS 激活的巨噬细胞释放 NO、PGE₂ 等的释放以及 iNOS、COX-2 的表达。研究结果显示,桑葚提取物在 0.5~4.0 mg/mL 内对细胞无明显毒性,能够有效的抑制 LPS 诱导的巨噬细胞产生 NO、PGE₂ 等炎症因子,且呈现剂量依赖性关系。桑葚提取物对 iNOS、COX-2 蛋白的表达具有抑制作用,从而降低细胞中 NO、PGE₂ 的水平。桑葚提取物具有较好的抗炎作用,其机制或许与促进 RAW264.7 细胞活化及炎症因子的产生有重要关系。桑葚提取物抗炎作用的靶点并非在于直接抑制 NO 和 PGE₂ 等炎症因子的释放,而是发挥保护性的抗炎作用,这与 Chieh-Jung Liu^[14]等人研究桑葚具有抗炎作用相一致。通过这一机制可以促进炎症组织的修复作用,为桑葚保健品、功能性食品的开发提供了坚实的理论基础。

参考文献

- [1] 张志强,杨清香,孙来华.桑葚的开发及利用现状[J].中国食品添加剂,2009,4:65-68
ZHANG Zhi-qiang, YANG Qing-xiang, SUN Lai-hua. Present situation of exploitation and application of mulberry [J]. China Food Additive, 2009, 4: 65-68
- [2] Pawlowska A M, Oleszek W, Braca A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morusnigral.* and *Morus alba L.(Moraceae)* fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(9): 3377-3380
- [3] Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morusalba*), red (*Morusrubra*) and black (*Morusnigra*) mulberry fruits [J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1380-1384
- [4] Tong H K, Jin Y H, Hyun B K, et al. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia [J]. Neuroscience Letters, 2006, 39(1): 168-172
- [5] Wu X, Liang L, Zou Y, et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea Roxb.*) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 443-453
- [6] 李菁,朱元民,刘玉兰.炎症与肿瘤关系研究进展[J].中国医药导刊,2007,9(3):217-219
LI Jing, ZHU Yuan-min, LIU Yu-lan. Advances in the research on relationship between inflammation and cancer [J]. China Medical Tribune, 2007, 9(3): 217-219
- [7] 张治国,王君虹,陈新峰,等.枇杷籽提取物抗氧化及环氧合酶抑制活性研究[J].中国食品学报,2013,13(8):35-41
ZHANG Zhi-guo, WANG Jun-hong, CHEN Xin-feng, et al. Studies on antioxidant and cyclooxygenase inhibition activities of *Eriobotrya Japonica* seed extracts [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(8): 35-41
- [8] Jiang Y, Nie W J. Chemical properties in fruits of mulberry species from the Xinjiang province of China [J]. Food Chemistry, 2015, 174: 460-66
- [9] 游义琳,盛启明,张倩雯,等.桑椹及桑椹酒多酚提取物对 BAT-cMyc 细胞增殖及分化的影响[J].现代食品科技,2015, 6:6-12
YOU Yi-lin, SHENG Qi-ming, ZHANG Qian-wen, et al. The effect of mulberry polyphenol extract and mulberry wine polyphene extract on proliferation and differentiation of BAT-cMyc cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 6: 6-12
- [10] 陈诚.反相高效液相色谱法测定桑葚中白藜芦醇和白藜芦醇苷含量[J].中国药业,2006,15(8):25-26

- CHEN Cheng. Determination of resveratrol and glycosides by reversed phase high performance liquid chromatography in mulberry [J]. *China Pharmaceutical*, 2006, 15(8): 25-26
- [11] 赵康,苏政荣,杨碧文,等.桑椹中白藜芦醇及白藜芦醇苷测定方法的建立及含量比较[J].*食品科学*,2010,31(14):241-244
- ZHAO Kang, SU Zheng-rong, YANG Bi-wen, et al. Determination of resveratrol and polydactyl in mulberry [J]. *Food Science*, 2010, 31(14): 241-244
- [12] White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 103(3 Pt 2): S378-S381
- [13] 韩彩静,王文亮,陈相艳,等.蓝莓多酚对小鼠巨噬细胞中 NO、iNOS 及 COX-2 分泌量的影响[J].*中国食品学报*, 2015,15(2):15-20
- HAN Cai-jing, WANG Wen-liang, CHEN Xiang-yan, et al. Effects of the blueberry polyphenols on the secretion of NO, iNOS, COX-2 in mice macrophages [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(2): 15-20
- [14] Liu C J, Lin J Y. Anti-inflammatory effects of phenol extracts from strawberry and mulberry fruits on cytokine secretion profiles using mouse primary splenocytes and peritoneal macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 16(2): 165-70
- [15] Zhong C, Liu X H, Chang J, et al. Inhibitory effect of resveratrol demonized derivatives on nitric oxide production in lipopolysaccharide induced RAW264.7 cells [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 15(23): 4413-4418