

红豆越橘不同萃取物的抗炎及免疫活性研究

樊梓鸾¹, 赵翔¹, 陈凯莉¹, 付玉杰²

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 本研究红豆越橘 (*Vaccinium vitis-idaea* L.) 不同溶剂萃取物对炎症小鼠免疫功能及抗炎的影响。昆明小鼠按体重 10 mg/kg 剂量灌胃, 连续灌胃 15 d, 测定小鼠血清、肝脏中谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量和总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 活性。建立耳肿胀炎症模型, 分析不同溶剂萃取物对耳肿胀抑制情况。建立 LPS 脓毒症模型, 采用酶联免疫 ELISA 试剂盒法测量 PGE₂ 及 NO 含量变化。结果显示, 四组给药组均能不同程度地提高抗氧化酶活力、增加 GSH 的含量、降低 MDA 含量。其中血液中正丁醇组 GSH 含量最高, 提高了 33.47%, 肝脏中石油醚组 GSH 含量最高, 提高了 38.61%; 乙酸乙酯组能够显著提高血液中 35.75% 的 T-SOD 活力、降低 27.97% 的 MDA 含量; 正丁醇组可以显著增加 44.44% 和 35.68% 血液和内脏中的 GR 活性; 四组给药组能够显著抑制 LPS 诱导的 NO 和 PGE₂ 产生, 乙酸乙酯组略低于阳性对照地塞米松组。本实验证实, 红豆越橘萃取物不仅可以有效提高机体中抗氧化酶的水平, 起到保护细胞的作用, 而且可以减少由于氧化应激炎症产生的 PGE₂ 和 NO。为红豆越橘的综合开发提供理论依据。

关键词: 红豆越橘; 萃取物; 抗氧化; 抗炎; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2019)05-16-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.003

Anti-inflammatory and Immunoactive of Different Solvent Extracts of Lingonberry

FAN Zi-luan¹, ZHAO Xiang¹, CHEN Kai-li¹, FU Yu-jie²

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In this work, the effects of different solvent extracts of *Vaccinium vitis-idaea* L. on the anti-inflammatory and immune functions of inflammatory mice were studied. Continuous oral gavage for 15 days at doses of 100 mg/kg body weight was conducted. The content of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione reductase (GR) in serum and liver of mice were measured. An ear swelling inflammation model was established to evaluate the inhibition of ear swelling by different solvent extracts. The sepsis model LPS was established to investigate the change in the content of NO and PGE₂ by enzyme-linked immunoassay ELISA kit method. The results showed that, for all the four groups treatment, the activity of antioxidant enzymes and the content of GSH increased, while the content of MDA decreased. Among them, the GSH content in the n-butanol group was the highest, which increased by 33.47%. The GSH content in the petroleum ether group was the highest in the liver, which increased by 38.61%. For the ethyl acetate group, the T-SOD activity in the blood increase significantly and the MDA decreased by 27.97%. For the content of n-butanol group, the activity of GR in blood and viscera increase significantly by 44.44% and 35.68%, respectively. For all the four groups, the production of NO and PGE₂ induced by LPS could be inhibited significantly. The effect of inhibition of the ethyl acetate group was slightly worse than the positive control dexamethasone group. This experiment confirmed that Lingonberry extract can not only effectively increase the level of antioxidant enzymes in the body, but also protect cells. It can also reduce PGE₂ and NO caused by oxidative stress inflammation. This work provided a theoretical basis for the comprehensive development of lingonberry.

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (QC2016021); 中国博士后科学基金项目 (31170510); 中央高校科学前沿与交叉学科创新基金项目 (2572016CA06); 国家自然科学基金项目 (31170510)

作者简介: 樊梓鸾 (1981-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物分离纯化及功能活性评价

通讯作者: 付玉杰 (1967-), 女, 教授, 研究方向: 天然产物开发

Key words: lingonberry; extract; antioxidant; anti-inflammatory; immunological activity

随着人们生活节奏的加快,环境的日益变化和社会的可持续发展,近年来植物资源活性物质具有预防疾病和维持身体健康的作用已成受到重视的课题^[1,2]。红豆越橘,我国重要的天然绿色野生植物资源,也是风靡世界的新兴保健水果的重要野生品种之一,具有很高的营养和利用价值^[3,4]。我国大兴安岭地区红豆越橘资源极丰富,分布面积为10万hm²,蕴藏量为10000t。但是红豆越橘资源的多功能利用特性被忽略。

红豆越橘富含的多酚类、黄酮、花青素、三萜酸等物质对自发性高血压大鼠有降压作用^[5],具有抗炎功效^[6],预防心血管疾病的功效^[7,8],可治疗尿道感染^[9],有较高的抗氧化活性^[3],对神经具有明显的保护作用,可抑制水果中真菌的生长^[10],因此,对红豆越橘各种活性成分的研究是近年来国内外的热点之一^[11]。

关于红豆越橘的报道已经有很多,但是对红豆越橘粗提取物及不同溶剂萃取物的抗炎及调节免疫功能的报道较少,通过本实验的研究为更好的了解红豆越橘抗氧化成分的存在部位,更有效的开发与利用红豆越橘提供一定的理论基础。本文在前期试验基础上,获得了红豆越橘不同溶剂萃取物,分析了各组成分与抗氧化的相关性^[12],本论文进一步探讨其活性成分与抗炎、免疫调节的关系,分别建立小鼠耳肿胀炎症模型和LPS脓毒血症模型^[13],旨在得到具有较高的免疫、抗炎、抗氧化功能的提取部位。为食品、医疗行业提供新的保健制剂,同时提高红豆越橘原料的经济价值,延长产业链,拓展红豆越橘的应用范围和领域提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

矮丛红豆越橘(*Vaccinium Vitis-idaea* L.), 2017年7月采摘于大兴安岭加格达奇,冷冻保藏。

1.2 主要仪器设备

756PC紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;SHB循环水多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;FA25高剪切分散乳化机,上海弗鲁克流体机械制造公司;RT-6000酶标仪,深圳雷社生命科技股份有限公司;TOP-SZ7单筒立体电子照相显微镜,昆山托普泰克电子有限公司;PHS-26数显PH计,上海精密仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱;ALC-1104电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的制备

矮丛红豆越橘经95%乙醇提取后,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取^[12]得到的固体萃取物按0.05 mg/mL蒸馏水配制溶液。

1.3.2 动物实验模型建立

SPF级健康昆明小鼠,18~22g,购于黑龙江省中医药大学,许可动物饲养房温度控制在18℃~25℃,相对湿度控制,50%~60%,通风良好,室内无对流风,人工照明12h,所有笼具保持清洁。小鼠自由饮水进食,实验前在实验环境中适应,实验前禁食不禁水。

取健康昆明小鼠,随机分6组,每组12只,并对每只小鼠进行编号,即:空白对照组(蒸馏水,等容积灌胃);模型组(蒸馏水,等容积灌胃,模型建立时正常致炎);乙酸乙酯组(乙酸乙酯萃取物100 mg/kg灌胃);石油醚组(石油醚萃取物100 mg/kg灌胃);正丁醇组(正丁醇萃取物100 mg/kg灌胃);粗提物组(粗提物100 mg/kg灌胃),每日称量小鼠体重,观察并记录体态变化。

1.3.3 体内抗氧化活性指标测定

连续灌胃给药15d,停药后隔日处死小鼠,眼眶取血,3500 r/min离心15 min,取上层血清。解剖小鼠,取肝脏用生理盐水清洗干净后用吸水纸吸取多余水分,称取适量肝组织制备10%的肝组织匀浆,3000 r/min离心10 min,取上清液。血清以及制备好的组织匀浆上清液均参照试剂盒说明书来测定丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)活性、谷胱甘肽还原酶(GR)活性,用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白含量^[14]。

1.3.4 耳廓肿胀试验

1.3.4.1 炎症模型确立

灌胃给药15d,每天一次,从每组中分出3只,建立模型。第16d进行致炎。在末次给药2h后,将0.3%麻油-丙酮溶液,取1 mL均匀的涂抹在小鼠右耳缘中央部分,使小鼠产生耳部炎症^[14]。左耳不作处理为正常耳对照。

1.3.4.2 观察指标

致炎30 min后,颈椎脱臼处死小鼠,沿耳郭基线剪下两耳,用直径8 mm打孔器分别在两耳的同一部位取下耳片,于电子分析天平上分别精密称重(mg)^[15],根据左右耳片重量差计算肿胀度,并计算肿胀抑制率^[16]。

$$\text{肿胀度}(\%) = \frac{(\text{致炎侧耳片重量} - \text{非致炎侧耳片重量})}{\text{非致炎侧耳片重量}} \times 100\%$$

$$\text{肿胀抑制率}(\%) = \frac{(\text{模型组平均肿胀度} - \text{给药组平均肿胀度})}{\text{模型组平均肿胀度}} \times 100\%$$

1.3.5 小鼠 LPS 脓毒症模型

1.3.5.1 脓毒症模型的确立

本试验选用大肠杆菌内毒素攻击小鼠建立鼠脓毒症模型。

在小鼠脓毒症模型构建过程中,内毒素的给药剂量和给药方式极为重要。内毒素剂量过大,病理损害过强,小鼠造模后数小时迅速死亡,死亡率极高,其本质是一种中毒性模型,并非真正意义上的脓毒症模型,且药物治疗作用易被病理损害掩盖,易致假阴性结果。内毒素剂量过小,短时间内诱发机体炎症反应轻,所制作的模型器官功能损害可能不明显,死亡率很低,不符合脓毒症的预后规律,且在药物治疗时,易致假阳性结果。脓毒症模型动物死亡率控制在40%~70%的范围内确定LPS剂量的模型较佳。因此,通过测定人肠杆菌内毒素对小鼠的LD₅₀来确定建立小鼠脓毒症模型的最佳攻毒剂量。通过重复多次试验可确定本试验所建LPS脓毒症模型最佳攻毒剂量^[17]。

1.3.5.2 实验分组

空白对照组(蒸馏水,等容积灌胃);模型组(腹腔注射脂多糖LPS 5 mg/kg);乙酸乙酯组(腹腔注射脂多糖LPS 5 mg/kg+乙酸乙酯萃取物 100 mg/kg 灌胃);石油醚组(腹腔注射脂多糖LPS 5 mg/kg+石油醚萃取物 100 mg/kg 灌胃);正丁醇组(腹腔注射脂多糖LPS 5 mg/kg+正丁醇萃取物 100 mg/kg 灌胃);粗提物组(腹腔注射脂多糖LPS 5 mg/kg+粗提物 100 mg/kg 灌胃),每日称量小鼠的体重,观察并且记录小鼠的体态变化。

1.3.5.3 血清中NO含量及小鼠前列腺素E2含量测定

按照南京建成试剂盒说明书测定血清中NO含量,通过ELISA酶联免疫法按照试剂盒说明书测定PGE₂的含量。

1.4 统计分析

采用Microsoft Office Excel 2007、Origin 9.0和CalculSyn Demo等软件处理数据,应用SPSS 21.0统计软件进行统计学分析,组间计量资料比较采用组间对照方差齐性t检验, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 红豆越橘不同溶剂萃取物急性毒性试验

结果分析

参照国标中急性经口毒性试验的方法,根据预实验结果,最终采用最高剂量100 mg/kg体重剂量进行试验,初始均存活,继续观察15 d,没有出现异常叫声、嗜睡、流涎、僵持、竖毛、鼻孔分泌物、呼吸急促或缓慢、喘息窒息等异常情况;小鼠大小便正常;小鼠毛色光洁,皮肤情况良好,眼和口腔也没有异常分泌物。小鼠整体表现正常,没有任何异常的情况。

根据小鼠体重变化,绘制出体重变化曲线如图1所示。

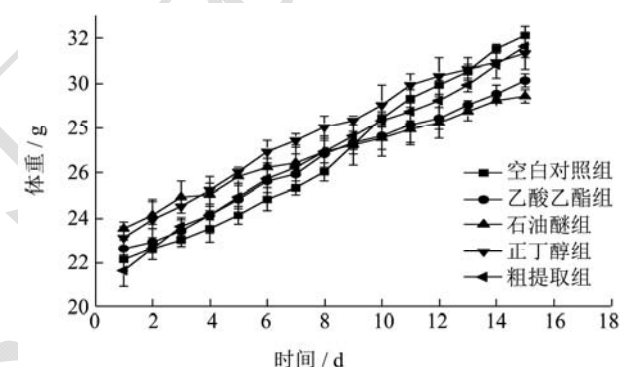


图1 小鼠体重变化曲线

Fig.1 Body weight changes of mice

首先小鼠均无死亡,LD₅₀>5000 mg/kg,其次从体征状态以及体重变化趋势来观察,第一天有嗜睡、少动现象,隔天后状态恢复,体重增加较大。分析其原因,是由于饥饿时间过长,空腹持续灌胃量大对胃形成刺激所造成的,之后的观察期内小鼠体征状态均无异常。从体重来看整体指标,剂量组和空白组相比较无明显差异。解剖观察其内脏器官,其状态良好无病变。以上结果分析红豆越橘萃取物为实际无毒级别。

2.2 体内抗氧化活性指标测定结果分析

2.2.1 血清中抗氧化酶和MDA含量测定结果

按照南京建成总超氧化物歧化酶T-SOD活力试剂盒、谷胱甘肽GSH试剂盒、谷胱甘肽还原酶GR试剂盒、MDA含量试剂盒说明书操作,测定小鼠血清中抗氧化酶和MDA含量。

表1 小鼠血清中 T-SOD、GSH、GR 和 MDA 的含量指标

Table 1 The content of T-SOD, GSH, GR and MDA in serum in mice (M±SD, n=10)

| 组别 | T-SOD/(U/mL) | GSH/(μmol/L) | GR(U/L) | MDA/(nmol/mL) |
|------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|
| 空白组 Normal | 122.66±12.51 | 1180.31±69.54 | 9.63±2.02 | 7.15±0.42 |
| 乙酸乙酯组 | 158.41±9.53** | 1315.12±74.15** | 9.10±1.35 | 5.82±0.35* |
| 石油醚组 | 141.32±13.78* | 1484.86±120.81* | 8.32±1.66 | 6.53±0.51 |
| 正丁醇组 | 154.99±7.01** | 1575.32±79.21** | 13.91±1.17** | 5.15±0.48* |
| 粗提取物组 | 138.83±6.46* | 1397.63±81.40* | 12.10±1.35** | 6.02±0.27 |

Note: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Normal. Same as table 2.

表2 小鼠肝脏中 MDA、T-SOD、GSH、GR 的含量

Table 2 The content of MDA, T-SOD, GSH, GR in liver in mice (M±SD, n=10)

| 组别 | T-SOD/(U/mL) | GSH/(μmol/L) | GR/(U/g pro) | MDA/(nmol/mg) |
|------------|---------------|------------------|--------------|---------------|
| 空白组 Normal | 168.63±14.02 | 1221.31±121.54 | 17.18±4.02 | 6.95±0.72 |
| 乙酸乙酯组 | 193.32±12.66* | 1440.12±84.15* | 18.10±1.35 | 4.71±0.65* |
| 石油醚组 | 172.31±16.17 | 1692.86±120.81** | 17.92±2.66 | 5.33±0.50* |
| 正丁醇组 | 185.66±6.51* | 1310.32±117.21 | 23.31±1.17* | 4.24±0.48** |
| 粗提取物组 | 181.66±11.03 | 1532.66±98.40** | 21.66±1.03* | 4.93±0.37* |

小鼠经灌胃 15 d, 各给药组与空白组相比, 血清中 T-SOD 活力都有所增加, 说明萃取物可提高 T-SOD 的活性, 其中, 乙酸乙酯组增加最明显, 增加了 35.75 U/mL, 其次是正丁醇组, 增加 32.33 U/mL, 二者之间差异性不显著 ($p > 0.05$), 但与其他各组存在显著性差异 ($p < 0.05$)。结果如表 1, 活力大小分别为: 乙酸乙酯组 > 正丁醇组 > 石油醚组 > 粗提取物组 > 空白对照组, 根据前期文献报道^[12]分析发现可能由于正丁醇中的花青素及乙酸乙酯中的总酚黄酮含量较多, 激活机体中 T-SOD 活性, 说明红豆越橘不同溶剂萃取物对抗氧化指标有积极的促进作用。

各给药组与空白组相比, 血清中 GSH 含量同样有所增加, 其中正丁醇组增加最显著, 提高了 33.47%, 乙酸乙酯组增加最少, 提高了 11.42%, 由大到小分别为: 正丁醇组 > 石油醚组 > 粗提取物组 > 乙酸乙酯组 > 空白对照组, 其中正丁醇组增加极为显著 ($p < 0.01$), 石油醚组和粗提取物组的 GSH 含量增加二者相差异性不显著 ($p > 0.05$)。根据前期文献报道^[12]分析发现可能由于正丁醇中的花青素及石油醚中的五环三萜类化合物含量较多, 促进血清中 GSH 含量的富集起到抗氧化的作用。

各给药组与空白组相比, 血清中 GR 活力大小依次为: 正丁醇组 > 粗提取物组 > 空白对照组 > 乙酸乙酯组 > 石油醚组, 其中正丁醇组增加显著 ($p < 0.01$), 提高了 44.44%, 其次粗提取物组的 GR 活力增加与正丁醇组二者差异不显著, 乙酸乙酯组和石油醚组 GR 活力有所减少, 与空白组无显著性差异, 说明正丁醇和粗提取物中的花青素对 GR 活力有显著的促进作用。

结果如表 1 所示, 各给药组与空白组相比, 血清中 MDA 含量均有不同程度的下降, 正丁醇组和乙酸乙酯组有显著差异 ($p < 0.05$), 石油醚组和粗提取物组无显著性差异。其中效果最佳的正丁醇组, 下降了 27.97%, 乙酸乙酯组次之, 下降了 18.60%。根据前期文献报道^[12]分析发现可能由于正丁醇中的花青素及乙酸乙酯中的总酚含量较多, 抑制机体中 MDA 的生成, 从而保护机体免受氧化损伤。

2.2.2 肝脏中抗氧化酶和 MDA 含量测定结果

各组小鼠肝组织匀浆测定 T-SOD 活性, 结果如表 2 所示, T-SOD 活性由高到低分别为: 乙酸乙酯组 > 正丁醇组 > 粗提取物组 > 石油醚组 > 空白对照组, 其中乙酸乙酯组的 T-SOD 活力增加最为显著, 提高了 12.77%, 正丁醇组次之, 提高了 10.10%, 与空白对照组呈显著性差异。此结果与血清中的 T-SOD 活力趋势一致。石油醚组与空白组无显著性差异, 但高于空白组, 说明红豆越橘不同溶剂萃取得到的提取物对 T-SOD 酶活力有促进作用。

按照南京建成谷胱甘肽 GSH 试剂盒说明书操作, 肝组织测试结果分别为: 石油醚组 > 粗提取物组 > 乙酸乙酯组 > 正丁醇组 > 空白对照组, 其中石油醚组和粗提取物组对 GSH 含量增加极显著 ($p < 0.01$), 分别增加了 38.61% 和 25.49%, 乙酸乙酯组与空白组比较 GSH 含量增加差异显著 ($p < 0.05$), 正丁醇组 GSH 含量比空白组仅增加 7.29%, 无显著差异 ($p > 0.05$)。根据前期文献报道^[18]分析成分发现石油醚萃取物中的三萜类物质含量较高, 可能促进 GSH 的增加, 粗提取物中含有较多的花青素和总黄酮, 其作为抗氧化活性成分对

结果产生影响,与血清测定结果相符。

肝组织测试结果中 GR 活力增加量大小依次为:正丁醇组>粗提取物组>乙酸乙酯组>石油醚组>空白组,整体数据可说明红豆越橘不同溶剂萃取得到的提取物对抗氧化指标 GR 有一定的促进作用,其中,正丁醇组与粗提取物组与空白组比较有显著性差异 ($p < 0.05$),分别增加的 35.68%和 26.07%。

肝组织测试结果显示,各萃取物组中的 MDA 含量对比空白组有显著降低,降低趋势为:正丁醇>乙酸乙酯>粗提取物>石油醚>空白对照。可说明红豆越橘的萃取物能有效增强小鼠机体的抗氧化能力,其中正丁醇萃取物的效果最明显,MDA 含量降低了 38.99%,石油醚组降低最少为 23.31%,说明红豆越橘各萃取物中的活性成分可以有效的降低 MDA 的生成,保护机体免受氧化损伤,有较好的抗氧化效果。

2.3 不同萃取物对小鼠耳肿胀抑制率的影响

在耳肿胀试验中,与模型组比较,地塞米松组、正丁醇组均具有极显著性差异 ($p < 0.01$) 地塞米松组耳廓肿胀抑制率达到 60.03%,粗提取物组、乙酸乙酯组及石油醚组有显著性差异 ($p < 0.05$),石油醚组抑制率最低,也达 40.74%,说明红豆越橘各萃取组都具有较好的抗炎活性。结果如表 3 所示。

表 3 不同溶剂萃取物对小鼠耳肿胀的影响

Table 3 Effect of extract on ear swelling in mice (n=10)

| 组别 | 耳廓肿胀度/mg | 抑制率/% |
|-------|-------------|-------|
| 模型组 | 6.43±0.52 | - |
| 地塞米松 | 2.57±0.34** | 60.03 |
| 乙酸乙酯组 | 3.32±0.66* | 48.37 |
| 石油醚组 | 3.81±0.47* | 40.74 |
| 正丁醇组 | 2.96±0.51** | 53.97 |
| 粗提取物组 | 3.66±0.43* | 43.08 |

Note: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Model.

对比发现平均肿胀抑制率由大到小依次为:正丁醇组>乙酸乙酯组>粗提取物组>石油醚组,四组萃取物均对耳肿胀急性炎症有影响,粗提取物组和石油醚组效果差异性不显著。根据前期文献报道^[12]分析成分发现,萃取物中总花色苷及齐墩果酸均具有抗炎作用,结合不同萃取物活性成分含量测定结果,石油醚萃取物中齐墩果酸含量最高,推测在小鼠耳肿胀炎症模型中产生抗炎作用,与耳廓肿胀抑制率相符。

2.4 小鼠 LPS 脓毒症模型结果分析

2.4.1 血清中 NO 含量测定结果分析

内皮细胞分泌多种血管活性因子包括内皮素

(ET-1)、一氧化氮(NO)、血栓素 B2(TXB2)等,它们参与血管收缩、舒张等生理和病理反应^[19]。血管损伤时 ET-1 会显著上升可以反映血管的损伤程度,NO 作为内皮细胞的功能因子其分泌量可以反映血管内皮细胞损伤后的恢复状态^[20]。异常活化的巨噬细胞产生过量的炎性介质如一氧化氮和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE₂),参与多种炎症相关疾病的发生,包括风湿性关节炎、动脉硬化、哮喘及肺纤维化^[21]。目前有学者建议某些炎症性疾病采用分子靶向治疗,如采用 TNF- α 单克隆抗体治疗风湿性关节炎。但由于炎症性疾病往往涉及多因素的综合影响,单一的靶向治疗无法达到预期的效果。但通过抑制巨噬细胞的活性,从而达到抑制多种炎症介质分泌,有望成为一种新型治疗的突破。按照南京建成一氧化氮 NO 试剂盒说明书操作,利用小鼠血清、肝组织匀浆进行测定,通过公式计算出一氧化氮含量,并按照公式计算结果如图 2。

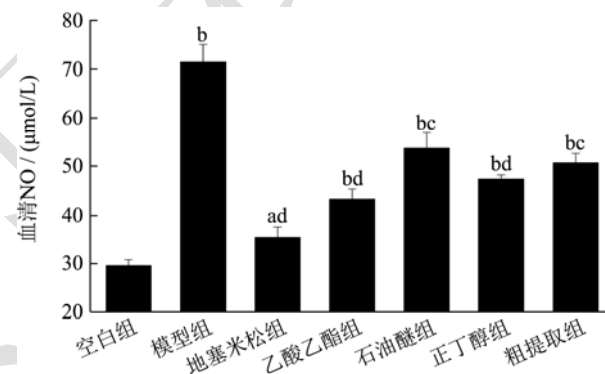


图 2 红豆越橘不同萃取物对小鼠血清中 NO 的影响

Fig.2 Effect of NO level in serum of mice by different Extracts of Lingonberry

Note: Results are means \pm SD of six measurements. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ compared with the control; ^c $p < 0.05$, ^d $p < 0.01$ compared with the Model.

由图 2 可以看出,模型组与空白组呈极显著 ($p < 0.01$),加药组 NO 含量依次为:阳性对照地塞米松组<乙酸乙酯组<正丁醇组<粗提取物组<石油醚组,其中正丁醇组和乙酸乙酯组与模型组比较 NO 含量下降极为显著 ($p < 0.01$),石油醚和粗提取物组呈显著降低 ($p < 0.05$)。四组给药组与空白组比较 NO 含量呈显著增加 ($p < 0.01$),根据前期文献报道^[12]分析发现正丁醇萃取物总花色苷含量最高,乙酸乙酯萃取物中多酚和黄酮含量最高,石油醚中五环三萜类齐墩果酸含量较高,总花色苷、多酚、黄酮与齐墩果酸作为抗炎活性成分,对结果产生影响。

2.4.2 血清中 PGE₂ 含量测定结果分析

按照公式计算结果如下图,由图 3 可以看出模型

组与空白组 PGE₂ 含量呈显著性差异 ($p < 0.05$), 加药组除正丁醇组外与空白组呈显著性差异 ($p < 0.05$)。加药组与模型组对比可看出, 血清中 PGE₂ 含量依次为: 地塞米松组 < 正丁醇组 < 乙酸乙酯组 < 粗提取物组 < 石油醚组, 其中正丁醇组和乙酸乙酯组的 PGE₂ 含量降低较为显著 ($p < 0.05$), 粗提取物组其次, 石油醚组和模型组二者差异不显著 ($p > 0.05$)。

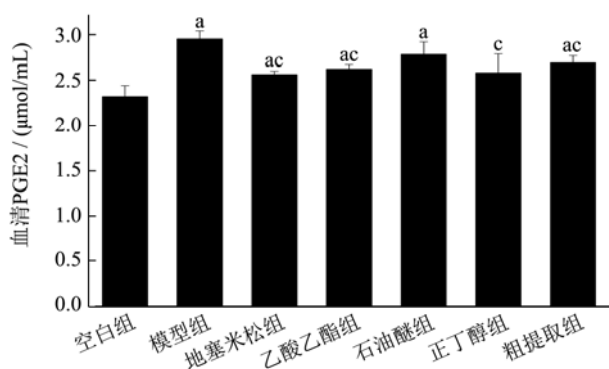


图3 红豆越橘不同萃取物对小鼠血清中 PGE₂ 的影响

Fig.3 Effect of PGE₂ level in serum of mice by different Extracts of Lingonberry

Note: Results are means±SD of six measurements. ^a $p < 0.05$ compared with the control; ^c $p < 0.05$ compared with the Model.

3 结论

在前期报道中已经证实, 红豆越橘提取物具有较好的抗氧化活性, 对辐射诱导的氧化损伤有一定的保护作用。红豆越橘各萃取物中活性成分与抗氧化有一定的相关性^[12]。本实验在前期工作基础上, 以红豆越橘不同溶剂萃取物为原料, 研究其各组间对小鼠动物模型产生的抗炎、抗氧化、相关免疫功能的影响。通过实验得出以下结论:

3.1 急性毒理实验表明红豆越橘萃取物为实际无毒级别。耳肿胀炎症模型分析得到正丁醇组对小鼠耳廓肿胀的抑制率最高, 其他各萃取物组也具有显著的抗炎活性。据前期文献报道^[12]分析发现正丁醇萃取物总花色苷含量最高, 乙酸乙酯中的总酚黄酮含量较多, 石油醚中五环三萜类齐墩果酸含量较高, 粗提物中含有花青素和黄酮类化合物, 都有一定的抗炎活性。

3.2 四组给药组均能不同程度地提高抗氧化酶活力、增加 GSH 的含量、降低 MDA 含量。其中血液中正丁醇组 GSH 含量最高, 提高了 33.47%, 肝脏中石油醚组 GSH 含量最高, 提高了 38.61%; 分析原因可能由于正丁醇中花青素物质更易被血液吸收, 而肝脏中更易吸收小分子的齐墩果酸类化合物达到抗氧化的作用。乙酸乙酯组能够显著提高血液中 35.75% 的 T-SOD 活力、降低 27.97% 的 MDA 含量, 主要由于含有大量

的多酚黄酮类化合物; 正丁醇组可以显著增加 44.44% 和 35.68% 血液和内脏中的 GR 活性; 达到抗氧化的作用。

3.3 炎症是组织损伤或感染的病原体引发的复杂生物的自卫反应。急性炎症是由时间和细胞类型依赖性的细胞因子和小信号分子包括活性氧和前列腺素所调控的。脓毒症是由侵袭性感染引起的全身性炎症反应综合征 (SIRS), 内毒素 (ETX) 的主要成分脂多糖 (LPS) 是脓毒症的主要启动物质。为了评价红豆越橘对其干预作用, 首先需要建立稳定可靠的脓毒症动物模型^[17]。目前国际上公认的小鼠脓毒症模型的制备方法有两种, 一种是盲肠结扎穿孔术, 另一种为细菌或内毒素攻击模型动物^[20]。四组给药组能够显著抑制 LPS 诱导的 NO 和 PGE₂ 产生, 乙酸乙酯组略低于阳性对照地塞米松组。本实验证实, 红豆越橘萃取物不仅可以有效提高机体中抗氧化酶的水平, 起到保护细胞的作用, 而且可以减少由于氧化应激炎症产生的 PGE₂ 和 NO。此结果与 Ishii^[22]报道一致, 下一步继续分析各部的的主要活性成分, 为红豆越橘的综合开发提供理论依据。

参考文献

- [1] Grzesik M, Bartosz G, Dzedzic A, et al. Antioxidant properties of ferrous flavanol mixtures [J]. Food Chemistry, 2018, 268(12): 567-576
- [2] Ferguson A, Carvalho E, Gourlay G, et al. Phytochemical analysis of salal berry (*Gaultheria shallon* Pursh.), a traditionally-consumed fruit from western North America with exceptionally high proanthocyanidin content [J]. Phytochemistry, 2018, 147(4): 203-210
- [3] Mane C, Loonis M, Juhel C, et al. Food grade lingonberry extract: polyphenolic composition and *in vivo* protective effect against oxidative stress [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(7): 3330-3339
- [4] Isaak C K, Petkau J C, Blewett H, et al. Lingonberry anthocyanins protect cardiac cells from oxidative-stress-induced apoptosis [J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2017, 95(8): 904-910
- [5] Al Hamimi S, Heyman-Linden L, Plaza M, et al. Alterations in the plasma metabolite profile associated with improved hepatic function and glycemia in mice fed lingonberry supplemented high-fat diets [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(3)
- [6] Isaak C K, Petkau J C, Blewett H, et al. Lingonberry anthocyanins protect cardiac cells from oxidative

- stress-induced apoptosis [J]. *Faseb Journal*, 2017, 95(8): 904-910
- [7] Kelanne N, Laaksonen O, Yang B, et al. Modification of sensory-chemical quality of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) products using polymers [C] // Abstracts of Papers of the American Chemical Society. New Orleans 2018-05-18
- [8] Drozd P, Seziene V, Pyrzynska K. Phytochemical properties and antioxidant activities of extracts from wild blueberries and lingonberries [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2017, 72(4): 360-364
- [9] Isaak C K, Wang P, Prashar S, et al. Supplementing diet with Manitoba lingonberry juice reduces kidney ischemia-reperfusion injury [J]. *Journal Science Food Agricultural*, 2017, 97(9): 3065-3076
- [10] Tian Y, Puganen A, Alakomi H-L, et al. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants [J]. *Food Research International*, 2018, 106: 291-303
- [11] Ehlenfeldt M K, Ballington J R. Prolific triploid production in intersectional crosses of 4x *Vaccinium corymbodendron* Dunal (section *Pyxothamnus*) by 2x section *Cyanococcus* species [J]. *Euphytica*, 2017, 213(11): 238
- [12] 樊梓鸾,陈凯莉,柳雅馨,等. 红豆越橘不同溶剂萃取物组成及抗氧化相关性[J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 138-144
FAN Zi-luan, CHEN Kai-li, LIU Ya-xin, et al. Correlation between antioxidant activity *in vitro* and active components of different solvent extracts from lingonberry [J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 138-144
- [13] Gao Z, Liu XC, Wang WS, et al. Characteristic anti-inflammatory and antioxidative effects of enzymatic- and acidic- hydrolysed mycelium polysaccharides by *Oudemansiella radicata* on LPS-induced lung injury [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 204: 142-151
- [14] Hesse L, Brouwer U, Petersen AH, et al. Subcutaneous immunotherapy suppresses Th2 inflammation and induces neutralizing antibodies, but sublingual immunotherapy suppresses airway hyperresponsiveness in grass pollen mouse models for allergic asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2018, 48(8): 1035-1049
- [15] Nagano T, Nishida N, Ito H. The Inhibitory effect of a polyphenol concentrate from pomegranate juice on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice [J]. *Food Science Technology Research*, 2018, 24(1): 169-175
- [16] Fei R, Zhang H, Zhong S, et al. Anti-inflammatory activity of a thermophilic serine protease inhibitor from extremophile *Pyrobaculum neutrophilum* [J]. *Eur Journal Inflammation*, 2017, 15(3): 143-151
- [17] Shen C-Y, Jiang J-G, Shi M-M, et al. Comparison of the effects and inhibitory pathways of the constituents from *Gynostemma pentaphyllum* against LPS-induced inflammatory response [J]. *J Agr Food Chem.*, 2018, 66(43): 11337-11346
- [18] Shen J, Yang T, Xu Y, et al. Tocotrienol, isolated from rice bran, exerts an anti-inflammatory effect via MAPKs and p38 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3022
- [19] Wu Y, Liu Z, Wu W, et al. Effects of FM0807, a novel curcumin derivative, on lipopolysaccharide-induced inflammatory factor release via the ROS/JNK/p38 pathway in RAW264.7 cells [J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38
- [20] Wang X, Huang H, Ma XP, et al. Anti-inflammatory effects and mechanism of the total flavonoids from *Artemisia scoparia* Waldst. et kit. *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 390-403
- [21] Zhao SQ, Xu SQ, Cheng J, et al. Anti-inflammatory effect of external use of eschin on cutaneous inflammation: Possible involvement of glucocorticoids receptor [J]. *Chin J Nat Medicines*, 2018, 16(2): 105-112
- [22] Ishii T. Close teamwork between Nrf2 and peroxiredoxins 1 and 6 for the regulation of prostaglandin D-2 and E-2 production in macrophages in acute inflammation [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 88: 189-198

(上接第 116 页)

- [31] Sattar A, Deman J M, Alexander J C. Effect of wavelength on light induced quality deterioration of edible oils and fats [J]. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1976, 9(3): 108-113
- [32] 刘学彬,刘薇,王泽斌,等. 栅栏技术在核桃贮藏中的应用研究[J]. *安徽农业学*, 2013, 41(4): 1721-1723, 1735
LIU Xue-bin, LIU Wei, WANG Ze-bin, et al. Application of fence technology in walnut storage [J]. *Anhui Agriculture*, 2013, 41(4): 1721-1723, 1735