

负载白藜芦醇的玉米醇溶蛋白-果胶纳米粒抗氧化活性及其对急性炎症小鼠的抗炎作用

刘烨¹, 彭雅琦¹, 邹艳¹, 梁晓¹, 胡坤²

(1. 广东药科大学公共卫生学院, 广东广州 510006) (2. 广东药科大学食品科学学院, 广东中山 528458)

摘要: 本文研究了负载白藜芦醇的玉米醇溶蛋白(zein)-果胶纳米颗粒(En-RES)对体外模拟消化后的抗氧化能力和 LPS 诱导小鼠的抗炎效果。采用反溶剂/静电沉积相结合的方法制备负载白藜芦醇的玉米醇溶蛋白(zein)/果胶纳米颗粒。用模拟胃肠道消化的 En-RES 消化液处理 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化应激模型, 检测丙二醛(MDA)和抗氧化酶的含量。72 只小鼠随机分成正常组、脂多糖(LPS)模型组、游离白藜芦醇低、中、高浓度组、En-RES 低、中、高浓度组, 分别干预后取血浆测定白细胞介素-1 α (IL-1 α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-10 (IL-10)和一氧化氮(NO)水平。研究结果表明, 与游离白藜芦醇(RES)消化液相比, En-RES 消化液处理氧化应激的 HepG2 细胞后, 细胞内的 MDA 含量降低 49.07%, 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性分别提高 35.27%、67.22%和 13.15%($p<0.05$)。小鼠急性炎症实验中, 与 RES 高浓度处理组相比, En-RES 高浓度组中小鼠血浆 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 和 NO 水平分别下降 62.73%、44.91%、52.86%和 55.47%, IL-10 水平提高了 66.49% ($p<0.05$)。负载白藜芦醇的 zein-果胶纳米颗粒提高了白藜芦醇在体外的抗氧化能力和体内的抗炎能力。

关键词: 玉米醇溶蛋白; 果胶; 白藜芦醇; 纳米颗粒; 氧化应激; 炎症反应

文章编号: 1673-9078(2020)05-7-13

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.002

Antioxidant Activity and Anti-inflammatory Effect on Acute Inflammatory Mice of Resveratrol-loaded Zein-pectin Nanoparticles

LIU Ye¹, PENG Ya-qi¹, ZOU Yan¹, LIANG Xiao¹, HU Kun²

(1. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

(2. School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

Abstract: The anti-oxidative ability after simulated digestion *in vitro* and the anti-inflammatory effects of LPS-induced mice of resveratrol-loaded zein-pectin nanoparticles (En-RES) were studied. An antisolvent/electrostatic deposition method was used to prepare En-RES. The H₂O₂-induced oxidative stress model was treated with En-RES digestive fluid after simulated gastrointestinal digestion, and the contents of malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes were measured. The 72 mice were randomly divided into the normal group, lipopolysaccharide (LPS) model group, free resveratrol groups (low, medium and high concentrations) and En-RES groups (low, medium and high concentrations). The plasmas were collected for determination of interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and nitric oxide (NO) level. The results showed that, when compared with free resveratrol (RES) digestion fluid treated oxidative stress reacted HepG2 cells, the intracellular MDA content of the cells treated with En-RES digestion fluid decreased by 49.07%, and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activities were increased by 35.27%, 67.22% and 13.15%, respectively ($p<0.05$). In the mouse acute inflammation experiment, compared with the RES high concentration treatment group, the plasma

引文格式:

刘烨, 彭雅琦, 邹艳, 等. 负载白藜芦醇的玉米醇溶蛋白-果胶纳米粒抗氧化活性及其对急性炎症小鼠的抗炎作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 7-13

LIU Ye, PENG Ya-qi, ZOU Yan, et al. Antioxidant activity and anti-inflammatory effect on acute inflammatory mice of resveratrol-loaded zein-pectin nanoparticles [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 7-13

收稿日期: 2020-02-26

基金项目: 国家自然科学基金(31771920); 广东省科技厅国际合作项目(2015A050502051)

作者简介: 刘烨(1994-), 男, 硕士研究生在读, 研究方向: 功能性食品

通讯作者: 胡坤(1975-), 男, 教授, 研究方向: 食品生物活性物质输送体系、食品生物大分子与胶体科学

levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and NO in the high concentration group of En-RES decreased by 62.73%, 44.91%, 52.86% and 55.47%, respectively, and IL-10 levels were increased by 66.49% ($p<0.05$). This study showed that resveratrol-loaded zein-pectin nanoparticles could improve the antioxidant capacity *in vitro* and anti-inflammatory capacity *in vivo* of resveratrol.

Key words: zein; pectin; resveratrol; nanoparticles; oxidative stress; inflammatory response

白藜芦醇(RES)是存在于多种食用植物中的多酚类物质,如葡萄、蓝莓、桑葚、蔓越莓、花生等,这些植物在受到伤害、紫外线照射、臭氧暴露和真菌侵袭时,白藜芦醇就会增加^[1]。有研究表明白藜芦醇具有抗炎、抗氧化^[2]、保护肝脏^[3]等一系列生物活性。但由于本身难溶于水,生物利用率低和化学不稳定等因素限制了其在药物和膳食补充剂方面上的应用^[4,5]。

将白藜芦醇包埋于食品蛋白质自组装的纳米颗粒是提高其化学稳定性、水溶性和生物利用度的安全有效方法^[6]。已有明胶^[7]、牛血清白蛋白^[8]、麦醇溶蛋白^[9]和玉米醇溶蛋白^[10]等蛋白质用于制备负载白藜芦醇的纳米载体。其中,玉米醇溶蛋白(zein)因其来源丰富、成本低而更有应用前景。Zein 能溶于高浓度乙醇(60%~90%, *V/V*)溶液而不溶于水^[11],这意味着 zein 纳米颗粒可以通过简单的反溶剂沉淀法制备^[10]。由于白藜芦醇和 zein 能共同溶解在高浓度的乙醇中,可经反溶剂沉淀法负载到蛋白质的纳米颗粒中,从而获得较高的载药量^[10]。Zein 纳米颗粒的缺陷是其疏水性较强,在中性 pH 水环境中易聚集^[12]。为了提高 zein 纳米粒子的稳定性,有研究者利用阴离子多糖如海藻酸盐^[13]、果胶^[10]与 zein 纳米颗粒形成静电复合颗粒以稳定颗粒,表面活性高分子如聚多巴胺-酪蛋白结合物^[14]、酪蛋白-葡聚糖结合物^[15]等也被用于稳定 zein 纳米颗粒。其主要的稳定机制是通过增加纳米颗粒之间的空间斥力和静电斥力,以提高 zein 纳米粒子的聚集稳定性。

本课题组已研究开发出负载白藜芦醇的 zein-果胶纳米颗粒(En-RES),平均粒径 235 nm,负载量可高达 10.2% (*W/W*)。体外模拟胃肠道消化试验表明,En-RES 消化液中白藜芦醇的含量显著高于游离的白藜芦醇样品消化液,并且对 2,2'-Azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS^{·+})清除能力和 Fe³⁺还原能力也明显增强^[16]。因此,本文在此基础上进一步研究 En-RES 经模拟胃肠道消化后对 H₂O₂ 诱导细胞氧化模型的抗氧化能力,以及口服 En-RES 后对 LPS 诱导小鼠急性炎症的抗炎作用,从而揭示白藜芦醇纳米颗粒经消化道消化吸收后其生物活性的变化,为其在保健食品、药品中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 动物与饲料

研究动物:72 只 KM 雌性小鼠购买于广东省医学实验动物中心,体质量为(16~18) g(生产许可证号:SCX(粤)2018-0002,使用许可证号:SYXK(粤)2017-0125。动物房温度为 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,相对湿度 55%~65%,明暗交替 12 h。动物自由摄食(由广东省医学实验动物中心提供的全价营养饲料)和取水,并在动物房饲养观察一周,实验时动物的平均体重为 24.41 $\pm$ 0.11 g。本研究经广东药科大学实验动物伦理委员会审查批准。

1.2 主要试剂和仪器

玉米醇溶蛋白、果胶、脂多糖(LPS),Sigma 公司;白藜芦醇(>98%),阿达玛斯试剂公司;HepG2 细胞,中国科学院上海细胞库;DMEM 完全培养基、胎牛血清(FBS)、双抗,Gibco 公司;IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10,武汉华美生物工程有限公司;其他试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

LGI-18 冷冻干燥机,北京四环科学;RE-2000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器;LC-2010A HT 高效液相色谱仪,日本 Shimadzu;BPN-50CH 恒温培养箱,上海以恒;xMark 多功能酶标仪,Bio-Rad;MIKRO 22R 高速冷冻离心机,德国 Hettich。

1.3 方法

1.3.1 负载白藜芦醇的玉米醇溶蛋白-果胶纳米颗粒的制备

按照 Xulin Huang 的方法^[10],将 2.0 g zein 溶于 100 mL 85%(*V/V*)的乙醇水溶液中,加入 0.24 g 白藜芦醇,避光磁力搅拌 30 min,形成白藜芦醇-zein 溶液。将果胶溶于 70 $^{\circ}$ C 的热水中,冷却至室温后,用 1 mol/L 的 HCL 将 pH 调节至 4.0,果胶的终浓度为 0.1%(*W/V*)。接着使用注射器在 900 r/min 下持续搅拌下将 5 mL 白藜芦醇-zein 溶液快速注入到 20 mL pH 4.0 的水中,继续搅拌 5 min。用旋转蒸发器,蒸发乙醇后,添加适量 pH 4.0 的水以补偿乙醇的损失。最后,在不断搅拌

下将纳米颗粒分散液倒入 31.25 mL 果胶溶液中以形成负载白藜芦醇的 zein-果胶纳米颗粒, 冷冻干燥后的样品避光保存在冰箱中, 以用于后续实验。

1.3.2 白藜芦醇测定(HPLC)

色谱柱: C18 reverse-phase column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m, Hibar, Germany); 流动相: 甲醇: 水=40:60 (V/V); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 360 nm。在上述液相条件下, 以白藜芦醇浓度为 10~250 μ g/mL 所对应的峰面积建立标准曲线($R^2=0.9996$)。

1.3.3 模拟胃肠道消化

取含 0.01 g 白藜芦醇的 En-RES、与纳米颗粒组成相同的物理混合物和 RES 结晶性粉末进行体外模拟胃肠道消化(具体消化过程请参考 Xulin Huang^[16]方法), 经过胃液消化 2 h, 肠液消化 4 h 后终止消化, 3000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为样品消化液。同时以 0.45 μ m 过滤后, 用 HPLC 检测消化液中白藜芦醇含量。

1.3.4 HepG2 细胞培养

细胞培养于含有 10% FBS 和 1% 双抗溶液的 DMEM 培养基中。细胞培养箱保持 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 。

1.3.5 细胞中 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 水平测定

HepG2 细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, 培育 24 h。分为 5 个组, 分别为空白对照组、 H_2O_2 模型组和三个实验组。实验组分别各用 1 mL 的 En-RES 消化液、RES 消化液和白藜芦醇/zein/果胶物理混合物消化液(消化液用 DMEM 稀释 256 倍)处理细胞 12 h, 接着除空白对照组外, 其他组用 H_2O_2 处理 6 h。PBS 洗三次后, 用细胞裂解液于冰上裂解细胞, 裂解后于 4 $^{\circ}$ C, 14000 r/min 离心 10 min 取得上清。参考试剂盒要求, 测定 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 的水平。

1.3.6 小鼠分组及处理

将 72 只小鼠随机分成 8 个组, 分别为正常组、LPS 模型组、RES 低浓度组、中浓度组、高浓度组、En-RES 低浓度、中浓度和高浓度组。低、中、高浓度分别使用 10、20、40 mg/kg 等剂量的白藜芦醇溶液进行灌胃。正常组和 LPS 组给予等量的生理盐水进行灌胃。连续灌胃一周后, 第 8 d, 除正常组腹腔注射等量的生理盐水外, 其他各组腹腔注射 40 μ g LPS(溶于无菌的生理盐水中), 6 h 后处死小鼠取血液和脏器。

1.3.7 血液中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 NO 水平检测

采用眼眶内眦采血法采血, 血液在室温放置 1-2

h, 待血液凝固后, 3000 r/min 离心 10 min, 分离上层血清于液氮中待测。使用酶联免疫吸附实验法并严格按照 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 NO 试剂盒说明书进行操作。

1.3.8 HE 染色

将新鲜小鼠的肝和肺用固定液固定, 经脱水、包埋处理后进行组织切片, 切片依次用苏木素、伊红染色。使用光学显微镜镜检并分析图像。

1.4 统计学处理

所有试验重复三次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。采用单因素方差进行统计, 两组间采用实施独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 说明差异具有统计学上意义。

2 结果与讨论

2.1 En-RES 的 HPLC 色谱图

图 1 和图 2 分别表示纳米颗粒中白藜芦醇含量和纳米颗粒经模拟胃肠道消化后消化液中白藜芦醇含量的 HPLC 色谱图, 保留时间为 11.12 min。

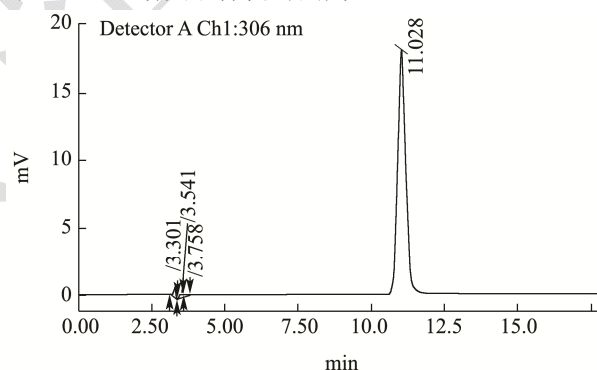


图 1 En-RES 中白藜芦醇含量的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of resveratrol in En-RES

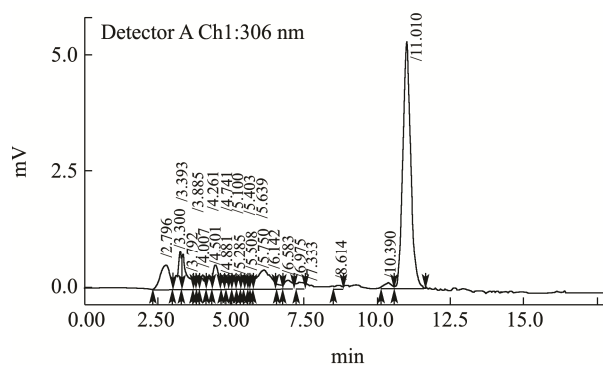


图 2 En-RES 消化液中白藜芦醇含量的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of resveratrol in En-RES digestion solution

2.2 模拟体外胃肠道消化后的抗氧化能力

有文献报道, 过氧化氢(H_2O_2)是氧化损伤的重要原因, 半衰期比其他活性氧种类的半衰期长, 并且很容易转化为最具破坏性的自由基之一的羟基^[17], 而且过氧化氢能引发肝细胞的凋亡^[18]。因此本文选用 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞来建立氧化应激模型。引用张业尼^[19]等人的研究成果, 选取 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理细胞 6 h, 建立的模型细胞存活率为 60.93%, 而且胞内 ROS 水平明显升高, 说明造模成功。前期研究表明样品消化液稀释 256 倍或更高倍数后不会对细胞产生毒性^[16], 故采用此稀释倍数的消化液处理细胞。

样品消化液对氧化应激的 HepG2 细胞抗氧化效果如表 1 所示, 模型组过氧化产物丙二醛(MDA)水平为(2.73 $\pm$ 0.06) nmol/mg 蛋白质, 高于空白对照组; 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化功能酶的水平分别为(36.57 $\pm$ 2.68) U/mg 蛋白质、(6.68 $\pm$ 1.16) U/mg 蛋白质、(1.59 $\pm$ 0.92) U/mg 蛋白质, 低于空白对照组, 说明建模成功, 细胞产生了过氧化损伤。与模型组相比, RES 消化液预处理后细胞的 MDA 含量降低了 60.44%, SOD、GSH-Px 和 CAT 活性分别增加了 56.06%、52.99%、129.56% ($p<0.05$); 而 En-RES 消化液预处理后细胞的 MDA 含量降低了 79.9%, SOD、GSH-Px 和 CAT 活性分别提高了 111.11%、155.84%和 159.75% ($p<0.05$)。说明 RES 和 En-RES 消化液都具有较强的抗氧化能力。相比较 RES 消化液预处理的细胞, En-RES 消化液预处理的细胞中 MDA 含量降低了

49.07%, 而 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性则分别提高了 35.27%、67.22%和 13.15% ($p<0.05$)。说明 En-RES 经过模拟胃肠道消化后表现出更强的抗氧化能力, 减轻细胞氧化应激的损伤。

以液相色谱法测定 En-RES 消化液、RES 消化液和白藜芦醇/zein/果胶物理混合物消化液中白藜芦醇的含量分别为 92.09、50.51 和 59.71 $\mu\text{g/mL}$, En-RES 消化液中含有更高浓度的白藜芦醇, 从而增加了其抗氧化能力。Rudra Pangen 等人亦报道, 负载白藜芦醇的纳米乳液比游离的白藜芦醇更能有效降低大鼠脑中 MDA 水平(23.18%), 提高 SOD(17.49%)和 GSH(52.53%)的活性^[20]。Yuting Fan 等人用牛血清蛋白-咖啡酸偶联物稳定负载 RES 的 zein 纳米粒, 经体外模拟胃肠道消化后纳米颗粒的 RES 生物利用度为 73.4%, 而游离的 RES 只有 43.6%, 且纳米颗粒包埋的白藜芦醇对细胞氧化具有更好的保护作用^[21]。之前研究报道 zein-果胶核/壳型纳米颗粒包埋白藜芦醇, 其模拟消化后的生物可利用度为 77.3%, 而物理混合物和单纯白藜芦醇则分别为 58.8%和 55.7%^[21]。Kangfei Yao^[22]等人在研究负载姜黄素的纳米颗粒模拟消化模式时也发现相似的现象, 并提出其增溶的机制可能是 zein 纳米颗粒消化产生的多肽具有一定的乳化增溶作用; 另外, 包埋颗粒中无定形姜黄素比游离晶体形态姜黄素更能溶于消化液, 从而增加其生物可利用度。zein 纳米颗粒包埋明显提高了白藜芦醇的生物可利用度, 从而能发挥更好的生物活性, 为口饲动物实验提供了可行性。

表 1 体外模拟白藜芦醇消化液对 HepG2 细胞抗氧化酶及 MDA 水平的影响

Table 1 Effects of antioxidative enzymes and MDA levels in HepG2 cells treated with simulated in vitro gastrointestinal digestion liquid containing resveratrol

分组	SOD(U/mgpro)	GSH-Px(U/mgpro)	CAT(U/mgpro)	MDA(nmol/mgpro)
空白对照组	75.10 $\pm$ 4.61	20.05 $\pm$ 3.47	5.10 $\pm$ 0.47	0.36 $\pm$ 0.06
模型组	36.57 $\pm$ 2.68 ^a	6.68 $\pm$ 1.16 ^a	1.59 $\pm$ 0.92 ^a	2.73 $\pm$ 0.10 ^a
En-RES 组	77.20 $\pm$ 3.37 ^b	17.09 $\pm$ 3.40 ^b	4.13 $\pm$ 0.11 ^{ab}	0.55 $\pm$ 0.11 ^b
RES 组	57.07 $\pm$ 4.36 ^{abc}	10.22 $\pm$ 1.26 ^{abc}	3.65 $\pm$ 0.07 ^{abc}	1.08 $\pm$ 0.22 ^{abc}
物理混合组	58.20 $\pm$ 6.46 ^{abc}	9.39 $\pm$ 1.16 ^{abc}	3.34 $\pm$ 0.37 ^{abc}	1.17 $\pm$ 0.21 ^{abc}

注: 与空白对照组(a)、模型组(b)、En-RES 组(c)相比, $p<0.05$ 。

2.3 各组小鼠血液中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、

NO 水平比较

脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 有研究发现 LPS 能造成急性炎症反应, 造成机体损伤^[23]。有很多研究表明, 白介素(IL-1 α 、IL-1 β)能作为

LPS 诱导急性炎症的识别物, 从而影响炎症反应^[24,25]。IL-6 是由巨噬细胞和 T 细胞分泌, 如果过度表达也会导致炎症^[26]。IL-10 被普遍认为是抗炎和免疫抑制因子^[27], 体内水平的高低与抗炎效果正相关。NO 在体内是一种重要的分子, 但如果 NO 过度表达就会导致炎症和自身免疫紊乱^[28]。因此能抑制 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、NO 的水平而提高 IL-10 的水平就会有效控制炎

症,降低对机体的损害。

从表2可以看出,小鼠注射LPS后,血浆中炎症因子(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6)和炎症介质(NO)的水平分别是正常组的8.63、14.67、10.57和4.88倍,而抗炎因子(IL-10)水平下降54.08% ($p<0.05$)。经过RES口饲处理后,高浓度组(40 mg/kg 体重)的IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6和NO水平比模型组分别下降了40.57%、53.52%、37.21%和55.12%; IL-10水平提高了127.33% ($p<0.05$),而低、中浓度组与模型组差别不明显。有研究表明,较高浓度的RES口服后通过作用TLR4/NF-kappaBp65/MAPKs信号通路来抑制炎症因子和炎症介质的释放^[29],从而达到抗炎效果。较低浓度的RES并没有此作用,可能与RES口服利用度比较低有关。

与模型组相比,经过高浓度En-RES处理后,小鼠血浆中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6和NO水平分别下降了77.82%、74.39%、70.40%和80.01%, IL-10水平提高了278.49% ($p<0.05$)。而且抗炎效果呈现剂量效应关系,En-RES的浓度越高,炎症因子和介质水平就越低,尤其是NO水平在En-RES高浓度组为 8.35 ± 0.89 $\mu\text{mol/L}$,几乎接近正常的 7.11 ± 3.01 $\mu\text{mol/L}$ 。对比RES和En-RES组,En-RES低浓度组的IL-1 α 水平为

16.00 ± 1.50 pg/mL, RES高浓度组为 20.55 ± 1.04 pg/mL,两者差异具有统计学意义($p<0.05$),说明低浓度的En-RES对IL-1 α 的抑制能力高于高浓度的RES。而相比较RES高浓度组,En-RES高浓度组中小鼠血浆IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6和NO水平分别下降62.73%、44.91%、52.86%和55.47%, IL-10水平提高了66.49% ($p<0.05$)。说明En-RES高浓度组对炎症因子及炎症介质的抑制能力和对抗炎因子的促进能力都要明显优于RES高浓度组。体外模拟消化结果表明,包埋的白藜芦醇经胃肠液消化后消化液中的含量明显增加,说明zein-果胶纳米颗粒包埋后,白藜芦醇在消化液中的生物可利用度增加,使其更容易被小鼠消化吸收,从而表现出更强的抗炎能力。Frederic YK Siu等人证明了负载RES的半乳糖化纳米颗粒可提高RES在体外对TNF- α 、IL-6和NO水平的抑制^[26]。Rudimar Frozza等人发现RES脂核纳米颗粒比游离的RES更有效地通过阻断TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的释放,增加IL-10的释放来达到对神经元细胞的抗炎效果^[30]。本文则在动物体内证明了负载白藜芦醇的zein-果胶纳米颗粒对急性炎症小鼠炎症因子和介质的抑制作用,及对抗炎因子的促进作用,从而更好的达到抗炎效果。

表2 各组小鼠血浆中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、NO水平比较

Table 2 Comparison of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and NO levels in the plasma of mice in each group

分组	IL-1 α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)	NO/($\mu\text{mol/L}$)
正常组	3.59 ± 1.55	196.44 ± 10.62	4.04 ± 1.70	19.84 ± 1.61	7.11 ± 3.01
LPS模型组	34.53 ± 8.65^a	3077.47 ± 254.32^a	46.76 ± 10.67^a	9.11 ± 1.96^a	41.78 ± 11.74^a
RES低浓度组	27.16 ± 9.78^a	2369.45 ± 179.89^{ab}	51.24 ± 13.47^a	9.63 ± 1.72^a	40.67 ± 6.36^a
RES中浓度组	26.21 ± 4.34^a	2155.54 ± 46.73^{ab}	43.11 ± 6.65^a	16.63 ± 2.67^{bc}	30.45 ± 3.25^a
RES高浓度组	20.55 ± 1.04^{ab}	1430.56 ± 83.39^{abcd}	29.36 ± 1.15^{ab}	20.71 ± 7.61^{bc}	18.75 ± 5.82^{abcd}
En-RES低浓度组	16.00 ± 1.50^{abde}	1440.49 ± 121.70^{abcd}	27.75 ± 7.52^{ab}	19.25 ± 5.24^{bc}	17.42 ± 3.20^{abcd}
En-RES中浓度组	15.07 ± 2.53^{abde}	$1098.89\pm 111.97^{abcde}$	26.40 ± 5.56^{abcd}	26.78 ± 3.26^{abcd}	16.00 ± 2.00^{abcd}
En-RES高浓度组	7.66 ± 1.09^{abcde}	788.14 ± 83.50^{abcde}	13.84 ± 3.12^{abcde}	34.48 ± 3.09^{abcde}	8.35 ± 0.89^{bcde}

注:与正常组(a)、LPS组(b)、RES低浓度组(c)、RES中浓度组(d)、RES高浓度组(e)、En-RES低浓度组(f)、En-RES中浓度组(g)相比, $p<0.05$ 。

2.4 肺、肝组织病理切片形态学观察

显微镜观察肺脏组织切片,如图3所示,正常组(图3a)肺较为完整,并无炎症细胞浸润。LPS模型组(图3b)肺间隔明显增厚,肺部炎症聚集。RES高浓度组(图3c)肺间隔增厚,有轻度肺炎。En-RES高浓度组(图3d)只有局部肺间隔增厚。结果说明给予En-RES高浓度组预处理可以有效改善LPS诱导的肺部炎症病变程度。

显微镜观察肝脏组织切片,如图4所示,正常肝脏细胞形态正常,肝窦、肝索结构完整(图4a)。LPS模型组(图4b)中肝细胞呈灶状坏死,部分肝索消失,连接成片。RES高浓度组(图4c)有部分肝细胞坏死,部分肝细胞水肿。给予高浓度En-RES预处理后(图4d),肝细胞只有轻度的水肿,部分肝索消失。结果表明,高浓度En-RES干预后,肝脏的病变程度较模型组和RES高浓度组都有明显减轻。

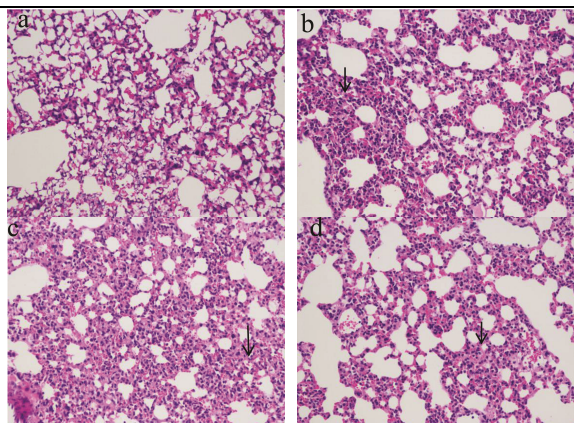


图3 不同组小鼠肺脏组织学观察图 HE 染色(×200)

Fig.3 Histological observation of lungs of mice in different groups HE staining (×200)

注: a、b、c、d 分别代表正常组、LPS 模型组、RES 高浓度组、En-RES 高浓度组。↓表示肺间隔增厚

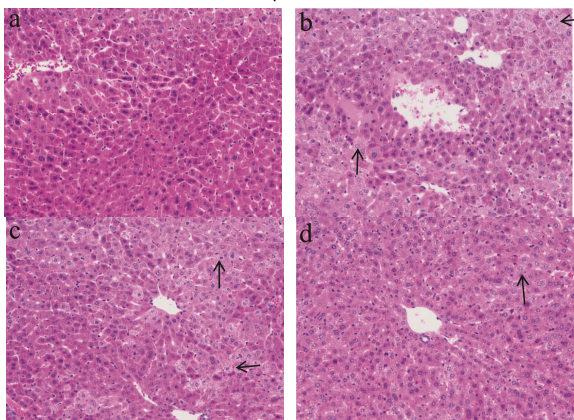


图4 不同组小鼠肝脏组织学观察图 HE 染色(×200)

Fig.4 Histological observation of liver in different groups of mice HE staining (×200)

注: a、b、c、d 分别代表正常组、LPS 模型组、RES 高浓度组、En-RES 高浓度组。←肝细胞灶状坏死, ↑肝细胞水肿

3 结论

负载白藜芦醇的 Zein 纳米颗粒体外抗氧化活性已有较多的报道,但其经胃肠道消化后白藜芦醇的生物可利用度与生物活性的关系还少见报道。前期研究表明,负载白藜芦醇的 zein-果胶核/壳型纳米颗粒经模拟消化后具有较高的生物可利用度,本文在此基础上继续研究模拟消化液的抗氧化活性及对急性炎症小鼠口饲处理后的抗炎活性。研究结果表明,经过模拟体外胃肠道消化后,En-RES 消化液比游离 RES 的消化液更能显著降低氧化应激的 HepG2 细胞中 MDA 的含量,提高 SOD、GSH-Px、CAT 活性,减少氧化应激的损害。以游离白藜芦醇和纳米颗粒负载的白藜芦醇对 LPS 诱导急性炎症小鼠模型进行干预后发现,口饲 En-RES 有效降低炎症小鼠血液中的 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6

和 NO 水平,提高了 IL-10 水平,表明颗粒负载的白藜芦醇能有效抑制炎症介质(NO)和炎症因子(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6)的水平,促进抗炎因子(IL-10)释放,提高机体的抗炎能力,从而达到保护肝脏、肺脏的效果,但对颗粒负载的白藜芦醇的抗氧化和抗炎方面的分子生物机制和信号通路还需更深层次的研究。

参考文献

- [1] R Neves A, Lucio M, L C Lima J, et al. Resveratrol in medicinal chemistry: A critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions [J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, 19(11): 1663-1681
- [2] Xu D, Yan L, Bo Z, et al. Resveratrol alleviate hypoxic pulmonary hypertension via anti-inflammation and anti-oxidant pathways in rats [J]. International Journal of Medical Sciences, 2016, 13(12): 942-954
- [3] Jia R, Li Y, Cao L, et al. Antioxidative, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of resveratrol on oxidative stress-induced liver damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2019, 215: 56-66
- [4] Walle T. Bioavailability of resveratrol [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, 1215(1): 9-15
- [5] Francioso A, Mastromarino P, Masci A, et al. Chemistry, stability and bioavailability of resveratrol [J]. Medicinal Chemistry [Sharjah (United Arab Emirates)], 2014, 10(3): 237-245
- [6] Davidov-Pardo G, McClements D J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues [J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 38(2): 88-103
- [7] Karthikeyan S, Hoti S L, Prasad N R. Resveratrol loaded gelatin nanoparticles synergistically inhibits cell cycle progression and constitutive NF-kappaB activation, and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 70: 274-282
- [8] Guo L, Peng Y, Li Y, et al. Cell death pathway induced by resveratrol-bovine serum albumin nanoparticles in a human ovarian cell line [J]. Oncology Letters, 2015, 9(3): 1359-1363
- [9] Joye I J, Davidov-Pardo G, Ludescher R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins [J]. Food Chemistry, 2015, 185: 261-267
- [10] Huang X, Dai Y, Cai J, et al. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: Impact on antioxidant and

- anticancer activities [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 64: 157-165
- [11] Dong F, Padua G W, Wang Y. Controlled formation of hydrophobic surfaces by self-assembly of an amphiphilic natural protein from aqueous solutions [J]. Soft Matter, 2013, 9(25): 5933
- [12] Zhang Y, Cui L, Li F, et al. Design, fabrication and biomedical applications of zein-based nano/micro-carrier systems [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 513(1-2): 191-210
- [13] Hu K, McClements D J. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44: 101-108
- [14] Li S, Li Z, Pang J, et al. Polydopamine-mediated carrier with stabilizing and self-antioxidative properties for polyphenols delivery systems [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2018, 57: 590-599
- [15] Davidov-pardo G, Pérez-ciordia S, Marín-arroyo M R, et al. Improving resveratrol bioaccessibility using biopolymer nanoparticles and complexes: impact of protein-carbohydrate Maillard conjugation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(15): 3915-3923
- [16] Huang X, Liu Y, Zou Y, et al. Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 261-269
- [17] Timmins A. Direct use of methyl tricosanoate as an internal standard and overcoming a potential error in the quantitation of the omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils as ethyl esters [J]. Food Chemistry, 2000, 70(3): 425-426
- [18] Lee Y J, Su J K, Kwon K W, et al. Inhibitory effect of FSLRY-NH₂ on inflammatory responses induced by hydrogen peroxide in HepG2 cells [J]. Archives of Pharmacal Research, 2017, 40(Pt 1): 1-10
- [19] 张业尼,钱磊,陈雪,等.过氧化氢诱导 HepG2 细胞氧化应激模型的建立[J].食品研究与开发,2018,39(5):160-164
ZHANG Ye-ni, QIAN Lei, CHEN Xue, et al. Establishment of oxidative stress model of HepG2 cells induced by hydrogen peroxide [J]. Food Research and Development, 2018, 39(5): 160-164
- [20] Pangen R, Sharma S, Mustafa G, et al. Vitamin E loaded resveratrol nanoemulsion for brain targeting for the treatment of Parkinson's disease by reducing oxidative stress [J]. Nanotechnology, 2014, 25(48): 485102
- [21] Fan Y, Liu Y, Gao L, et al. Improved chemical stability and cellular antioxidant activity of resveratrol in zein nanoparticle with bovine serum albumin-cafeic acid conjugate [J]. Food Chemistry, 2018, 261: 283-291
- [22] Yao K, Chen W, Song F, et al. Tailoring zein nanoparticle functionality using biopolymer coatings: Impact on curcumin bioaccessibility and antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79(Jun.): 262-272
- [23] Rietschel E T, Kirikae T, Schade F U, et al. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function [J]. The FASEB Journal, 1994, 8(2): 217-225
- [24] Malik A, Kanneganti T. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer [J]. Immunological Reviews, 2018, 281(1): 124-137
- [25] He X, Qian Y, Li Z, et al. TLR4-Upregulated IL-1 β and IL-1RI promote alveolar macrophage pyroptosis and lung inflammation through an autocrine mechanism [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 31663
- [26] Siu F, Ye S, Lin H, et al. Galactosylated PLGA nanoparticles for the oral delivery of resveratrol: enhanced bioavailability and *in vitro* anti-inflammatory activity [J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 4133-4144
- [27] Minciullo P L, Catalano A, Mandraffino G, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: The role of cytokines in extreme longevity [J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 2016, 64(2): 111-126
- [28] Dandona P, Chaudhuri A, Dhindsa S. Proinflammatory and prothrombotic effects of hypoglycemia [J]. Diabetes Care, 2010, 33(7): 1686-1687
- [29] Wang G, Hu Z, Fu Q, et al. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide-mediated acute inflammation in rats by inhibiting the TLR4/NF- κ Bp65/MAPKs signaling cascade [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 45006
- [30] Frozza R L, Bernardi A, Hoppe J B, et al. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against abeta-induced neuroinflammation [J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2013, 9(12): 2086-2104