

中药米曲中活性成分的提取及其免疫调节作用

熊川¹, 陈祖琴¹, 吴正云², 唐雪³, 朱宇¹

(1. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川成都 610061)

(2. 四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065) (3. 四川师范大学生命科学院, 四川成都 610101)

摘要: 测定一种传统中药米曲中总多酚、总黄酮及多糖含量, 评估其抗氧化及免疫调节活性。采用超声波辅助提取法获得总多酚及总黄酮, 通过水提醇沉法获得中药曲多糖。通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用, 评价中药曲多酚及黄酮的自由基清除能力。同时, 测定中药曲多糖对小鼠脾细胞增殖的影响, 进一步测定小鼠腹腔单核巨噬细胞细胞系(RAW 264.7)的吞噬能力和细胞因子分泌能力的促进作用。结果表明: 中药曲中总多酚含量为 33.54 mg/g, 总黄酮含量为 10.88 mg/g, 多糖含量为 74.98 mg/g。中药曲中多酚及黄酮具有优良的自由基清除活性。此外, 中药曲多糖能直接促进脾细胞及免疫细胞的增殖。对于 RAW 264.7 细胞的吞噬能力及细胞因子分泌具有促进作用。传统中药米曲可作为一种保健品开发利用。

关键词: 中药曲; 抗氧化; 免疫调节

文章编号: 1673-9078(2018)11-132-137

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.021

Extraction and Immunomodulatory Activities of Active Components from Chinese Herbs-koji

XIONG Chuan¹, CHEN Zu-qin¹, WU Zheng-yun², TANG Xue³, ZHU Yu¹

(1. Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China) (2. College of Light Industry, Textile & Food Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

(3. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China)

Abstract: In order to evaluate the antioxidant and immunomodulatory activity of a traditional Chinese herbs-koji, the contents of total polyphenols, total flavonoids and polysaccharides were measured. Ultrasound-assisted extraction was used to obtain total polyphenols and total flavonoids. Polysaccharides in Chinese herbs-koji (HKP) were extracted by water extraction and alcohol precipitation. The antioxidant activity of polyphenols and flavonoids were evaluated by the use of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radicals, hydroxyl radicals, and superoxide anion radicals methods. The potency of HKP on the phagocytosis and cytokine secretion of RAW 264.7 cells was determined by commercial kit. Results showed that the content of total polyphenols in the Chinese herbs-koji was 33.54 mg/g, the total flavonoid content was 10.88 mg/g, and the polysaccharide content was 74.98 mg/g. The extracted polyphenols and flavonoids showed good free-radical scavenging capacity to DPPH radical, superoxide anion radical and hydroxyl radical. Furthermore, the corresponding half inhibitory concentration (IC₅₀) of polyphenols is 18.87 μg/mL, 26.24 μg/mL and 33.31 μg/mL, and for flavonoids is 33.24 μg/mL, 38.97 μg/mL and 33.08 μg/mL. The HKP resulted in a significant increase of lymphocyte proliferation and could also enhance the effect of Con A-induced T lymphocyte proliferation and the stimulation index of LPS-induced B lymphocytes. In addition, the phagocytosis and cytokine secretion of RAW 264.7 cells can be promoted by HKP. The traditional Chinese herbs-koji can be developed and utilized as a health product.

Key words: Chinese herbs-koji; antioxidant; immunoregulation

曲, 是一种利用微生物的发酵作用, 将稻米、大小麦、豆类等分解成食品或食品原料的制品。制曲在中国有悠久的历史, 如红曲等作为一种食药两用的传统食品应用广泛^[1], 其抑菌、抗氧化的生物活性已被实验证实^[2]。在制曲过程中添加中药而制成的曲称为中药曲, 半夏曲和神曲是典型代表。某些中药曲已被用于医药行业, 具有健胃和食等临床疗效^[3]。

收稿日期: 2018-07-30

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2016GZ0359)

作者简介: 熊川(1990-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 大型珍稀食用菌菌栽培及功效评价

通讯作者: 朱宇(1969-), 男, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术

统食品应用广泛^[1], 其抑菌、抗氧化的生物活性已被实验证实^[2]。在制曲过程中添加中药而制成的曲称为中药曲, 半夏曲和神曲是典型代表。某些中药曲已被用于医药行业, 具有健胃和食等临床疗效^[3]。

制曲入药能够促进微生物生长繁殖、代谢过程与驯化。此外, 能够改善酒产品的风味。微生物代谢过程能够产生大量的酶分解利用中药材, 并且中药材经过微生物的发酵作用, 其活性成分能获得更充分的分

离和提取,更易被机体吸收,从而更好地发挥天然中草药的药效。根据制曲工艺的不同,添加中药材的种类、添加方式及添加量各有区别。研究发现,一些中药材对有害菌具有较强的抑制作用,而对功能菌无害,并且还可促进其生成与酶代谢。如薄荷、杏仁、桑叶等对酵母有益,而木香对根霉有害^[4]。因此,在传统制曲工艺中加入中药材,能够提高制曲效率,并且丰富中药曲活性,具有更大的应用价值。

本实验所用中药米曲系采用日本纯种米曲的制曲工艺,添加多种传统中药材制作的纯中药米曲。前期实验证实,西洋参、黄芪和红景天最适宜用以制作药曲,西洋参制曲的最佳添加量为0.20%~0.4%,黄芪和红景天制曲的最佳添加量为0.1%~0.4%,较传统中药曲,本实验所用中药米曲具有更好的糖化力和液化力^[5]。目前,在对中药曲的研究中,大部分都是对其工艺、菌株等的研究,而对其活性成分、功能等研究较少。本研究主要探索中药米曲中总多酚、总黄酮及多糖(The polysaccharides of Chinese herbs-koji, HKP)含量并评价多酚、黄酮的抗氧化及多糖的免疫调节活性,为中药曲的深入开发利用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中药米曲,由四川大学轻纺与食品学院提供;RAW 264.7(小鼠腹腔单核巨噬细胞系,ATCC Number: TIP71)细胞,美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)菌种保藏中心;胎牛血清、细胞培养液(dulbecco's modified eagle medium, DMEM), Thermo Scientific 公司;青霉素、链霉素,美国 Sigma 公司;一氧化氮检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)细胞因子检测试剂盒,美国 BD 公司。焦性没食子酸、芦丁,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其余试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

MCO-15AC CO₂ 细胞培养箱(日本 SANYO 公司); Spectra max plus 384 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); LSC plus 真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司); IX73 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 多酚提取测定

根据蔡建秀等^[6]的方法完成中药曲多酚的提取与含量测定。称取中药曲 20 g,加入 1000 mL 40%的乙醇浸泡,超声提取条件为 80 kHz,在 35 °C 条件下处理 15 min。过滤收集滤液,旋转蒸发回收乙醇,获得中药曲多酚浸膏。以焦性没食子酸绘制标准曲线并得到线性回归方程,测定中药曲多酚的含量。

1.3.2 黄酮提取测定

根据郑亚美等的方法完成中药曲黄酮的提取与含量测定^[7]。称取中药曲 20 g,加入 600 mL 80%的乙醇,在 80 °C 条件下浸提 6 h。过滤收集滤液,旋转蒸发回收乙醇,获得中药曲黄酮浸膏。以芦丁标准品绘制标准曲线并得到线性回归方程,测定中药曲黄酮的含量。

1.3.3 多糖(HKP)提取测定

采用水提醇沉法获得中药曲多糖^[8]。准确称取 20 g 中药曲置于 1000 mL 锥形瓶中,加入 800 mL 纯水进行超声波提取,提取完毕后冷却至室温,补液至提取前的量,5000 r/min 离心 10 min,取上清,减压蒸馏浓缩,浓缩产物加入 9 倍体积无水乙醇,醇沉过夜,醇沉产物通过 6000 r/min 离心收集沉淀,苯酚-硫酸法测定多糖含量。

1.3.4 自由基清除活性测定

依据 Oktay 等的方法完成 DPPH 自由基、羟自由基及超氧阴离子自由基的清除能力测定^[9]。样品(1 mg)溶解于 10 mL 的纯水中,稀释成浓度为 0~50 μ g/mL 待用。阳性对照设定为 V_C,同一测定重复 3 次。

1.3.5 中药曲多糖(HKP)对脾细胞的增殖作用

取 3~5 mL 无菌 Hank's 液于无菌平皿中,无菌取脾置于平皿,用注射器内芯轻轻磨碎脾脏,制成单个细胞悬液。经 200 目筛网过滤,用 Hank's 液洗 2 次,每次 1000 r/min 离心 10 min。然后将细胞悬浮于 2 mL 的完全培养液中,显微镜计数脾细胞,调整至细胞浓度为 3 \times 10⁶ 个/mL。

HKP 对静息期脾细胞的增殖的影响。将细胞悬液加入 24 孔培养板中,每孔 1 mL,加入培养液配置的不同浓度 HKP (0.05、0.10、0.50、1.00 mg/mL) 100 μ L,阴性对照设定为无 HKP 的培养液,未加细胞的孔作为空白对照。置于 CO₂ 为 5%,37 °C 细胞培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h,每孔吸去上清液 0.7 mL,加入 0.7 mL 无血清 DMEM 培养液,同时每孔加入 50 μ L MTT (5 mg/mL),继续培养 4 h。之后,每孔加入 1 mL 酸性异丙醇,超声振荡(2 s)混匀,至紫色结晶完全溶解。吸液至 96 孔培养板,每个孔分装 3 孔作为平行样,570 nm 波长测定 OD 值。

HKP 对刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA)诱导的

小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响。将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 每孔加 75 μ L ConA 液(相当于 7.5 μ g/mL), 其余操作同上。

HKP 对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠 B 淋巴细胞增殖的影响。将细胞悬液分两孔加入 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 每孔加 40 μ L LPS (相当于 4 μ g/mL), 其余操作同上。

1.3.6 HKP 的免疫调节作用

采用 RAW 264.7 细胞株吞噬中性红评价中药曲多糖的促巨噬细胞吞噬能力。RAW 264.7 细胞以浓度 2×10^4 个/mL 铺 96 孔板, 每孔 100 μ L。对照组(CK)设定为: 100 μ L 细胞悬液+100 μ L DMEM 细胞培养液; 实验组: 100 μ L 细胞悬液+80 μ L DMEM 细胞培养液+20 mL HKP, 最终保证中药曲多糖终浓度分别为 25、50、100 和 200 μ g/mL, 阳性对照设定终浓度为 10 μ g/mL 的 LPS, 每组均设立 8 个重复。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内培养 24 h, 用 PBS 洗涤 3 次, 之后加入中性红溶液 100 μ L 使其终浓度为 1 mg/L, 继续培养 30 min。吸弃中性红溶液, 洗涤 3 次, 加入裂解液(冰醋酸:无水乙醇=1:1, 体积比) 200 μ L, 静置过夜, 待完全裂解细胞后, 540 nm 波长下测定吸光度值。

采用 Griess 试剂法测定中药曲多糖对 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的影响。RAW 264.7 细胞用 DMEM 培养基稀释成 1×10^5 个/mL, 加入到 24 孔板中。然后终浓度为 25、50、100、200 μ g/mL 的中药曲多糖, 阳性对照 LPS 终浓度为 10 μ g/mL。培养 72 h, 每隔 24 h 测定一次 NO 含量。采用 Griess 试剂法的 NO 试剂盒测定, 操作步骤按说明书进行, 以标准品浓度为横坐标, 对应 OD 值为纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 拟合得出回归方程, 按曲线方程计算各样品中的浓度值。

RAW 264.7 细胞(1×10^5 个/mL)接种到 24 孔板(1 mL/孔)中进行培养, 实验设置同上。培养结束后, 取上清液, 使用小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒测定其中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子浓度, 操作步骤参照试剂盒操作说明书。用酶标仪或紫外分光光度计在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值)。以标准品浓度为横坐标, 对应 OD 值为纵坐标, 绘制出标准品拟合线性回归曲线, 得出回归方程, 按曲线方程计算各样品中的浓度值。

1.3.7 数据处理及统计

实验获得的数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示并采用 SPSS 17.0 分析, 采用 ANOVA 检验进行多组间数比较, $p < 0.05$ 视为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 中药曲活性成分含量

以焦性没食子酸绘制标准曲线并得到线性回归方程为 $Y=0.1191X+0.0169$, $R^2=0.9912$, 得出中药曲中总多酚的含量为 33.54 mg/g。以芦丁标准品绘制标准曲线并得到线性回归方程为 $Y=0.9929X+0.0367$, $R^2=0.9998$, 得出中药曲中总黄酮含量为 10.88 mg/g。水提醇沉法获得中药曲多糖, 含量为 74.98 mg/g。

2.2 中药曲的自由基清除活性

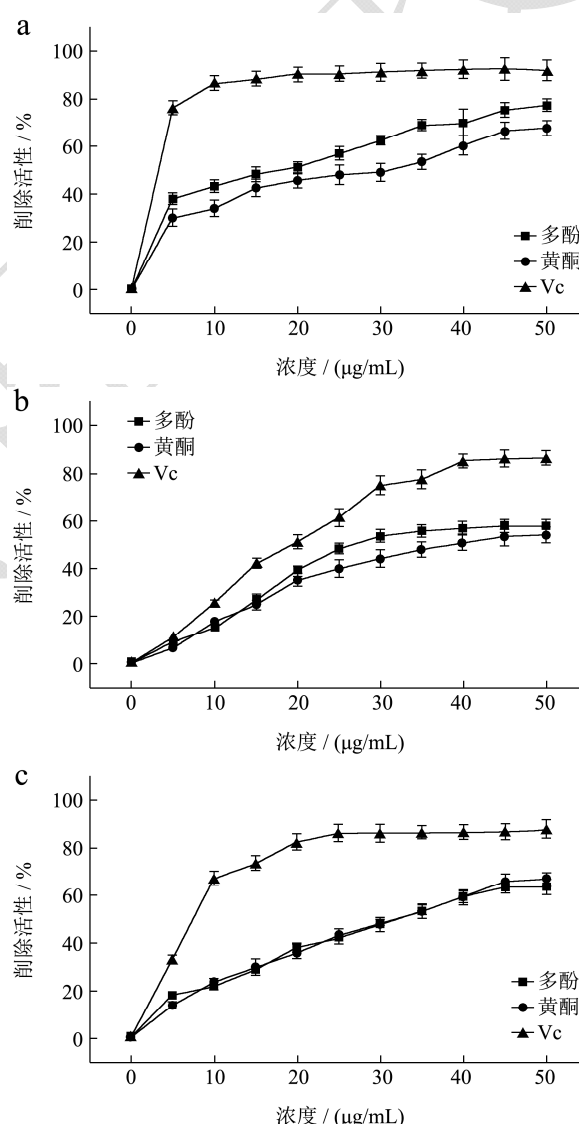


图1 中药曲多酚和黄酮清除 DPPH 自由基 (a)、羟自由基 (b) 及超氧阴离子自由基 (c) 的活性

Fig.1 Scavenging activity of polyphenols and flavonoids on DPPH radical (a), hydroxyl radical (b) and superoxide radical (c)

中药曲多酚和黄酮的 DPPH 自由基清除能力测定

结果如图 1a 所示, 中药曲多酚和黄酮具有较显著的 DPPH 自由基清除能力, 且具有剂量依赖关系, 高浓度的多酚及黄酮的清除活性接近同浓度的 Vc, 多酚的 IC₅₀ 值为 18.87 μg/mL, 黄酮的 IC₅₀ 值约为 33.24 μg/mL。图 1b 中, 多酚及黄酮具有较好的羟自由基清除能力。多酚的 IC₅₀ 值为 26.24 μg/mL, 黄酮的 IC₅₀ 值为 38.97 μg/mL。图 1c 中, 高浓度的多酚及黄酮(50 μg/mL)对超氧阴离子自由基清除活性接近 60%, 多酚的 IC₅₀ 值为 33.31 μg/mL, 黄酮的 IC₅₀ 值约为 33.08 μg/mL。

人类上百种疾病的发生都可以追溯到活性氧自由基上, 大量的活性氧自由基会攻击包括蛋白质、DNA、脂质在内的几乎所有生物大分子, 对生物体产生严重的氧化损伤^[1]。已有研究表明, DNA 突变, 衰老, 动脉粥样硬化, 炎症, 神经退行性疾病及肿瘤病变等都涉及氧化压力^[12]。本实验首先测定了中药米曲的自由基清除活性。中药米曲对 DPPH 自由基清除活性很高, 对于羟自由基及超氧阴离子自由基也具有一定的清除作用。由此可知, 中药米曲中含有的总多酚和总黄酮是一种具有还原性的天然活性物质。已有学者报道了天然物质中多酚和黄酮的自由基清除活性。山豆根黄

酮对 DPPH 自由基, 羟自由基和超氧阴离子自由基具有良好的清除作用, 半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 9.52、14.44、17.21 μg/mL^[13], 蜜柚叶黄酮的 IC₅₀ 值分别为: 1.47、1.04、1.49 mg/mL^[7]。本实验获得的中药米曲总黄酮则为 33.24、38.97、33.08 μg/mL。由此可知, 原材料、提取方法等对获得的黄酮类化合物自由基清除活性影响很大, 在获得的总黄酮基础上, 更精细的分离鉴定是今后研究的重点。

2.3 HKP 的促脾细胞增殖作用

HKP 对静息期脾细胞的增殖具有明显的促进作用。当 HKP 的作用浓度达到 0.5 mg/mL 时, 脾细胞数目为 0.282, 与对照组(0.218)呈现显著性差异。

在实验设定的范围内, HKP 对脾细胞的增殖作用呈现剂量依赖关系。HKP 对 ConA 活化的 T 淋巴细胞的促增殖作用较弱, 呈现出低浓度无效, 中浓度微弱刺激, 高浓度抑制增殖的关系。而 HKP 对于 LPS 活化的 B 淋巴细胞的促增殖作用较强, 仅 0.05 mg/mL 的 HKP 就能够带来极显著的促进作用, 但是高浓度的 HKP(1 mg/mL)对于活化的 B 淋巴细胞的增殖具有抑制作用。

表 1 中药曲多糖对免疫细胞增殖的影响

Table 1 Effect of HKP on the proliferation of immune cells

细胞	对照	中药曲多糖浓度/(mg/mL)			
		0.05	0.10	0.50	1.00
静息期脾细胞	0.22±0.003 ^a	0.22±0.009 ^a	0.24±0.006 ^b	0.28±0.014 ^c	0.28±0.011 ^c
ConA 活化的 T 细胞	0.21±0.004 ^b	0.20±0.003 ^b	0.23±0.006 ^c	0.21±0.011 ^b	0.18±0.005 ^a
LPS 活化的 B 细胞	0.21±0.003 ^a	0.28±0.014 ^d	0.28±0.008 ^d	0.25±0.03 ^c	0.19±0.006 ^b

注: 数值为 3 个重复的平均值±标准差, 上标不同字母表示组内 5% 差异显著性水平。

脾脏是人体最大的外周免疫器官, 为免疫活性细胞定居的部位, 是进行免疫应答及产生免疫效应物质的重要基地。HKP 能有效促进脾淋巴细胞的增殖, 并与 ConA, LPS 对 T、B 淋巴细胞的增殖有协同刺激作用。Con A 是 T 淋巴细胞的有丝分裂原, 可促进 T 淋巴细胞活化, 进而使细胞因子合成、细胞因子受体表达、细胞分化及细胞增殖等变化。适宜浓度的 HKP 能有效促进 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖, 对生物体自身免疫可能具有一定的强化作用。

2.4 HKP 的免疫调节活性

采用中性红实验对 HKP 促进 RAW 264.7 细胞的吞噬能力进行评价, 结果如图 2 所示, HKP 对 RAW 264.7 细胞的吞噬中性红的能力有明显的促进作用。给以最低剂量的 HKP (25 μg/mL) 处理后, RAW 264.7 细胞的吞噬作用较空白对照提升了近 1 倍。50 μg/mL 的

HKP 的促进作用与阳性对照(LPS, 10 μg/mL)接近。100 μg/mL 的 HKP 促吞噬作用相比较阴性对照, 呈现出了极显著差异 $p < 0.01$, 强于阳性对照组 LPS。

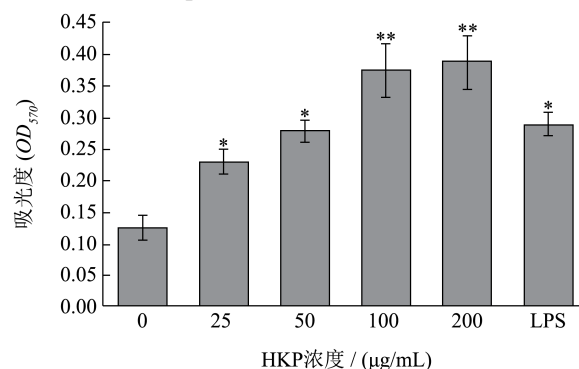


图 2 HKP 促进 RAW 264.7 细胞吞噬中性红

Fig.2 Enhanced phagocytosis of RAW 264.7 cells by HKP

注: 数值为 3 个重复的平均值±标准差, 与空白对照组比较, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 下同。

根据 Griess 试剂法绘制 NO 测定标准曲线, 建立回归方程如下: $Y=0.0322X+0.0968$, $R^2=0.9962$ (X 为所测标准品浓度, Y 为所测吸光值), 该回归方程适用的吸光度范围: 0~3.3。

根据标准曲线的回归方程, 计算得出各剂量组作用下 RAW 264.7 细胞培养上清液中的 NO 浓度, 其结果如图 3 所示, 研究发现 HKP 对 RAW 264.7 细胞在培养过程中, 能非常显著的刺激 RAW 264.7 细胞分泌 NO, 并在最低剂量组 25 $\mu\text{g/mL}$ 就与阴性对照组呈现出极显著差异 $p<0.01$, 且高剂量组(100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$)与阳性对照组 LPS 效果相当。此外, HKP 与 RAW 264.7 细胞共同培养 40 h, NO 的含量显著升高并在高位持续 8 h, 超过 48 h 下降。

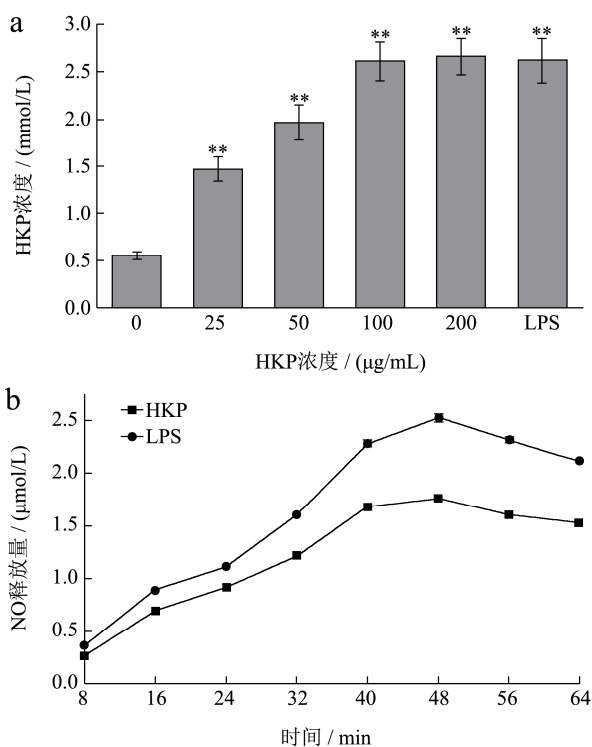


图 3 HKP 促进 RAW 264.7 细胞产生 NO 作用(a)和 RAW 264.7 细胞产生 NO 时间点(b)

Fig.3 HKP stimulated RAW 264.7 cells NO production (a) and its point in time (b)

HKP 能显著提高 RAW 264.7 细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量水平, 在实验范围内呈现剂量依赖关系。HKP 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量达到 58.4 pg/mL , 与空白对照组相比, 呈现极显著差异, 高浓度的 HKP (100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$)促进作用强于阳性对照(10 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS)。HKP 也能不同程度地提高 RAW 264.7 细胞 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 含量水平, 且对 IL-6 的促进作用更明显。

巨噬细胞存在于机体的几乎所有组织中, 在先天性免疫和获得性免疫中发挥中心作用, 是机体免疫防

御阵线的关键成员^[14]。吞噬能力是巨噬细胞的主要生理功能, 巨噬细胞能够有效吞噬外来的病原体、细胞残片和其他小分子。此外, 巨噬细胞能够递呈抗原、分泌生物活性物质, 如细胞因子等, 从而调控局部微环境, 抵御外界不良因素的侵害。实验表明, HKP 能够有效促进 RAW 264.7 细胞的吞噬能力, 表明中药曲多糖具有提高先天免疫反应的能力。

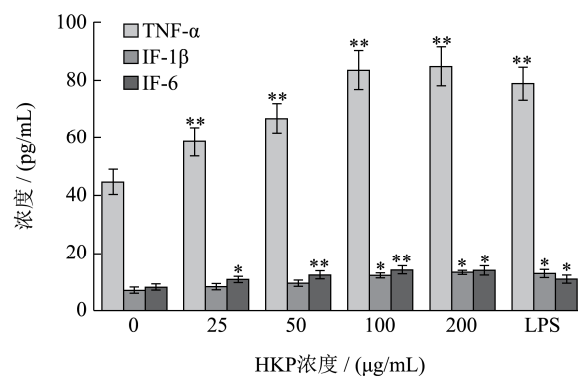


图 4 HKP 促进 RAW 264.7 细胞产生细胞因子作用

Fig.4 The effects of HKP stimulated cytokines secretion in RAW 264.7 cells

NO 被认为是一种重要的活性介质, 免疫系统产生的 NO 分子在宿主免疫防御、组织修复等生理活动中发挥重要的作用^[15]。巨噬细胞合成释放的 NO 具有细胞毒作用, 不仅可杀伤侵入机体的微生物, 而且还能够阻止癌细胞的繁殖, 阻止肿瘤细胞扩散。此外, NO 可以作为一种内皮细胞松弛因子, 可以松弛血管平滑肌, 抑制血小板凝聚, 在神经传导、学习记忆方面发挥作用。因此, 研究认为, 巨噬细胞的抗肿瘤、抗病毒、炎症反应及免疫反应由 NO 的释放来完成。用 Griess 法测定 NO 生成量, 结果表明 HKP 能显著提高巨噬细胞的 NO 释放, 且共培养 48 h 刺激作用达到峰值, NO 含量会在高位维持约 8 h。后续研究可以关注 HKP 促进 NO 释放的作用机制, 完善 HKP 开发利用所需的基础数据。

中药曲多糖能够促进 RAW 264.7 细胞分泌细胞因子。细胞因子是由多种细胞产生的多肽分子, 通过调节细胞分化、生长和凋亡控制整个机体的动态平衡, 对天然免疫和适应性免疫均有调控作用^[16,17]。

活化的巨噬细胞可以分泌 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 α 干扰素 ($\text{IFN-}\alpha$) 和 γ 干扰素 ($\text{IFN-}\gamma$) 等细胞因子, 以此来进行免疫调节^[18]。实验表明, HKP 能显著促进 RAW 264.7 细胞的细胞因子的分泌, 能有效激活巨噬细胞, 对其具有免疫调节活性。相关研究证实, 激活巨噬细胞是先天和适应性免疫防御病原体的一个关键事件, 因此, 可围绕介导巨噬细胞激活的一系列信号转导途径进行后续相关研究, 以探索更精细的作用通路。

3 结论

3.1 本文对一种中药米曲的活性成分进行了提取分离,获得了黄酮、多酚及多糖等3种功效成分,分别测定了黄酮、多酚的抗氧化作用及多糖的免疫调节作用。中药曲黄酮和多酚具有较强的自由基清除活性,中药曲多糖具有免疫调节作用,能直接促进脾细胞及免疫细胞的增殖,对于RAW 264.7细胞的吞噬能力及细胞因子分泌具有促进作用。

3.2 综上,本实验所得结果为中药米曲相关抗氧化、免疫强化产品的开发提供了一定的理论指导及借鉴作用,同时中药曲中的活性物质为进一步开发研究功能性中药产品奠定了基础。

参考文献

- [1] 王亚威,武晓红,王鸿.红曲霉抑菌作用和抑菌成分的研究[J].中国调味品,2012,37(2):32-34,41
WANG Ya-wei, WU Xiao-hong, WANG Hong. Studies on the inhibitory effect and components of *Monascus* [J]. China Condiment, 2012, 37(2): 32-34, 41
- [2] 张红林,李桂玲,苏国成,等.古田红曲米抗氧化活性物质的分离纯化[J].现代食品科技,2018,34(5):136-142
ZHANG Hong-lin, LI Gui-ling, SU Guo-cheng, et al. Separation and purification of the antioxidant compounds from gutian red yeast rice [J]. Food Research and Development, 2018, 34(5): 136-142
- [3] 雷学俊,杨俊,李丽,等.添加中药材对米曲性能指标影响的规律性[J].食品研究与开发,2015,36(15):52-54
LEI Xue-jun, YANG Jun, LI Li, et al. Investigating the effect of adding Chinese herbs on the properties of rice-koji [J]. Food Research and Development, 2015, 36(15): 52-54
- [4] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2011:90-103
SHEN Yi-fang. Liquor production technology guidance [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011: 90-103
- [5] 罗芳,李丽,罗颂,等.多种中药材制作纯种药曲的性能比较及优化研究[J].酿酒科技,2014,2:7-12
LUO Fang, LI Li, LUO Song, et al. Optimization of the preparation of pure-species herbal starter with multiple traditional Chinese medicinal materials and study of its properties [J]. Liquor-making Science and Technology, 2014, 2: 7-12
- [6] 蔡建秀,曾炜,陈姗龙,等.紫菜多酚的超声波辅助提取工艺及其抗氧化作用[J].食品研究与开发,2015,36(21):54-60
CAI Jian-xiu, ZENG Wei, CHEN Shan-long, et al. Study on ultrasonic-assisted extraction technology of polyphenols in laver and the oxidation effect of flavonoids [J]. Food Research and Development, 2015, 36(21): 54-60
- [7] 郑亚美,任娇艳,史传超.蜜柚叶黄酮的提取及其抗氧化与降尿酸活性研究[J].食品工业科技,2017,38(8):262-271
ZHENG Ya-mei, REN Jiao-yan, SHI Chuan-chao. Extraction of flavonoids from *Honey pomelo* leaves and study on its antioxidant and uric acid reduction activities [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 262-271
- [8] 陈沛,刘会平,孙娜新,等.灰树花多糖的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J].现代食品科技,2018,34(6):107-114
CHEN pei, LIU Hui-ping, SUN Na-xin, et al. Isolation and purification of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its *in vitro* antitumor activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(6): 107-114
- [9] Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu OI. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts [J]. LWT-Food Science and Technology, 2003, 36(2): 263-271
- [10] 汪建国,沈玉根,陆伟杰,等.我国黄酒研究现状与发展趋势[J].中国酿造,2012,31(11):15-20
WANG Jian-guo, SHEN Yu-yin, LU Wei-jie, et al. Situation and development trend of Chinese rice wine research [J]. China Brewing, 2012, 31(11): 15-20
- [11] MATES J M, SRHURA J A, ALONSO F J, et al. Oxidative stress in apoptosis and cancer: An update [J]. Archives of Toxicology, 2012, 86(11): 1649-1665
- [12] DAVIES KJ. Oxidative stress: The paradox of aerobic life [J]. Biochemical Society Symposia, 1995, 61: 1-31
- [13] 蔡锦源,韦坤华,熊建文,等.山豆根黄酮的提取及抗氧化抑菌活性[J].精细化工,2017,34(3):285-293
CAI Jin-yuan, WEI Kun-hua, XIONG Jian-wen, et al. Extraction of flavonoids from *Sophora tonkinensis* gapnep and their antioxidant and antibacterial activities [J]. Fine Chemicals, 2017, 34(3): 285-293
- [14] CHAUHAN AK, JAKHAR R, PAUL S, et al. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis [J]. International Immunopharmacology, 2014, 18(2): 340-346
- [15] SUZUKI C, AOKI-YOSHIDA A, KIMOTO-NIRA H, et al. Effects of strains of *Lactococcus lactis* on the production of nitric oxide and cytokines in murine macrophages [J]. Inflammation, 2014, 37(5): 1728-1737
- [16] LU MM, YANG WJ, PENG ZZ, et al. Fluorofenidone inhibits macrophage IL-1 β production by suppressing

- inflammasome activity [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 27(1): 148-153
- [17] 秦延军,杨树宝,孙朋,等.中药多糖对巨噬细胞和树突状细胞免疫调节作用的研究进展[J].*中国兽药杂志*,2018,52(2): 72-77
- QIN Yan-jun, YANG Shu-bao, SUN Peng, et al. Effects of polysaccharides in Chinese medicine on the immunomodulator effect of macrophage and dendritic cell [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(2): 72-77
- [18] LIU X, XIE J, JIA S, et al. Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW 264.7 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 98: 576-581