

花色苷的分离鉴定及生物活性综述



王璐, 王振宇*, 李小雨

(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: 主要对近年来花色苷的分离鉴定及其抗氧化、抗癌、抗动脉硬化等生物活性的研究进展进行总结和概述。

关键词: 花色苷, 分离鉴定, 生物活性

Review on the isolation and identification of anthocyanin and its bioactivities

WANG Lu, WANG Zhen-yu*, LI Xiao-yu

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: The isolation and identification of anthocyanin and its bioactivities, including anti-oxidant anti-cancer, anti-angiosclerosis were summarized and outlined.

Key words: anthocyanin; isolation and identification; bioactivities

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)03-0395-05

目前, 由于合成色素的使用对人体具有毒性效应, 因此, 天然色素的研究作为一个广泛的领域而引起越来越多的关注^[1]。其中, 花色苷是食品工业中应用最多的食用色素, 它是水溶性的物质, 可以从葡萄、浆果、紫甘蓝、红萝卜、郁金香等果蔬及植物中提取获得。因为花色苷是具有维管束植物中的最重要的色素, 而这些色素使一些果蔬和植物展现出鲜亮的橘色、红色及蓝色等, 其无害、易与水溶性介质混合, 因此可以作为天然的水溶性色素^[2]。另外, 重要的是花色苷具有多种生理功能, 许多研究都证明了其药用功能, 它被认为是具有强抗氧化性的天然产物。

1 花色苷的分离鉴定

在自然界中分布着多种多样的花色苷, 而它们之间主要的不同在于羟基化物的数量、结合糖的性质和数量、分子中结合在糖上的脂肪族或芳香族的羧化物及它们结合的位置^[3]。至今, 已报道有500多种不同种类的花色苷及23种花色素^[4], 其中只有六种花色素在具有维管束植物中最常见, 包括天竺葵色素Pg、芍药色素Pn、矢车菊色素Cy、锦葵色素Mv、牵牛花色素Pt和飞燕草色素Dp。三种非甲基化花色素(Cy, Dp和Pg)的糖苷衍生物在自然界中是最常见的。水果和蔬菜中6种较常见的花色素的分布为: Cy

50%, Dp 12%, Pg 12%, Pn 12%, Pt 7%, Mv 7%。自然界中分布较广泛的糖苷类衍生物为3-单苷、3-乙糖苷、3,5-和3,7-二葡萄糖苷。3-葡萄糖苷衍生物的分布大约是3,5-二葡萄糖苷的2.5倍, 其中最常见的花色苷为矢车菊色素-3-葡萄糖苷。

20世纪80年代后期, 分离与鉴定技术的联用为活性成分的研究和鉴定提供了有利条件。这些技术主要包括纸层析法、水解分析法、光谱分析法、液相色谱-电喷射离子化串联质谱、高速逆流色谱-质谱联用及生物分子相互作用分析-质谱联用等。结构的鉴定对于色素的研究和应用方面有着很重要的作用, 而有些色素的化学结构研究在国内尚未见报道。

目前通常采用柱层析、高效液相色谱法、高速逆流色谱法对花色苷进行分离提纯, 并采用光谱分析法对花色苷结构进行鉴定分析。Ana B. Cerezo等对Camarosa草莓中花色苷类化合物进行分离鉴定, 采用LC-DAD-MS检测可知, 天竺葵色素-3-葡萄糖苷是其中主要的化合物, 其次还检测有天竺葵色素-3-芦丁糖苷和天竺葵色素、矢车菊色素衍生物, 另外, 此次研究首次在草莓中鉴定出飞燕草色素-3-葡萄糖苷、芍药色素-3-葡萄糖苷、矢车菊色素-3-半乳糖苷^[5]; Garzón等利用带有光敏二极管阵列的高效液相色谱(HPLC-DAD)和HPLC-电喷射离子化串联质谱法(ESI-MS/MS)测定了哥伦比亚野生越橘中花色苷和酚类组成, 结果显示, 花色苷含量为(329.0±28.0)mg 矢车菊色素-3-葡萄糖苷当量/100g FW, 总酚含量为(758.6±62.3)mg没食子酸当量/100g FW, 其中矢车菊

收稿日期: 2011-02-25 * 通讯联系人

作者简介: 王璐(1986-), 女, 博士在读, 研究方向: 天然产物分离提取与功能研究。

色素-3-葡萄糖苷是主要的花色苷,而含量最多的非花色苷酚类化合物为绿原酸^[9];Zhendong Yang等通过HPLC-MS鉴定,紫玉米中主要检测到6种花色苷,被鉴定为矢车菊色素-3-葡萄糖苷、天竺葵色素-3-葡萄糖苷、芍药色素-3-葡萄糖苷及它们相应的丙二酸盐类似物^[7];Vaccinium uliginosum浆果中的色素用含0.5% TFA的乙醇溶液提取,用X-5树脂柱纯化并用HPLC-DAD进行鉴定,所有的峰的分配都用低分辨率电喷射质谱进行确认,结果表明,该浆果中存在11种花色苷和两种黄酮醇^[8]。赵善仓等应用超高效液相色谱配以串联质谱技术和二极管阵列检测技术对蓝、紫粒小麦籽粒中的花色苷进行分离与鉴定,揭示了蓝、紫粒小麦籽粒花色苷的组成成分,结果表明蓝、紫粒小麦籽粒中含有14种不同种类的花色苷类化合物,且不同的蓝、紫粒小麦籽粒中花色苷的种类与含量不同^[9]。褚衍亮等采用纸层析、高效液相色谱和高效气相色谱的方法,鉴定了樟树果的花色苷组分,结果表明其中花色苷的主要组分为芍药色素-3-阿拉伯糖苷、芍药色素-3-木糖苷和芍药色素-3-葡萄糖苷或它们的衍生物^[10]。

另外,还有利用质谱、气质联用等与核磁共振结合对花色苷进行鉴定,大多数情况下,研究者结合核磁共振来测定花色苷中糖苷的位置^[11-12]。Susana从富含花色苷的紫玉米粉中分离黄烷醇-花色苷浓缩色素,利用质谱、¹H和¹³C NMR 1D和2D技术(COSY、HSQC、HMBC),结果化合物明确地鉴定为二聚物儿茶素(4 α -8)-矢车菊色素-3,5-O-二葡萄糖苷^[13]。DANIEL在实验中用酸化的乙醇提取红猕猴桃花色苷,并利用固相萃取和制备型HPLC进行分离,获得了5种花色苷并利用LC-MS/MS,GC-MS和2D NMR鉴定其为飞燕草色素-3-[2-(木糖苷)半乳糖甘]、飞燕草色素-3-半乳糖苷、矢车菊色素-3-[2-(木糖苷)半乳糖甘]、矢车菊色素-3-半乳糖苷和矢车菊色素-3-葡萄糖苷^[14]。

2 花色苷的生物活性

许多报道都关注了花色苷在癌症治疗、人类营养及生物活性方面的重要应用。花色苷的一个重要的特性是它的抗氧化活性,它的这种活性使其在预防一些神经性、心血管方面的疾病以及癌症、糖尿病等方面具有非常关键的作用^[15]。

2.1 抗氧化活性

活性氧簇(ROS)是引起细胞损伤的主要原因,日益增多的疾病都与其相关,包括癌症。大多数ROS是通过正常细胞的代谢而在细胞中产生的。阻断ROS或限制其在细胞中的效应是抗氧化剂的主要作用^[16]。一些富含花色苷、多酚类的植物表现出很高的抗氧化活性,它们通过清除ROS、减少氧化DNA损伤、刺激抗氧化酶等途径阻止了致癌物诱导的DNA加合物形成并增强了DNA修复。由于花色苷可以提供氢原子并捕获自由基^[17-18],因此反应活性强,但是这也造成了其性质的不稳定性。花色苷的抗氧化活性与它们的化学结构有关系,如果改变芳香环上的化学基团的位置或种类,它们接受未配对电子的能

力就会发生变化。近年来,有许多研究报道了不同种类植物中花色苷的抗氧化活性。

G.A. Garzón等研究了早金莲花(旱金莲属)的主要花色苷及抗氧化活性,测定了其对ABTS和DPPH自由基的清除活性分别为458、91.87 $\mu\text{mol trolox eq/g FW}$,并说明了由于其中较高含量的花色苷及总酚含量使其具有此活性,证明了它可以作为天然色素和抗氧化剂应用于功能性食品中^[19]。Markus Schantz等研究了商业中的富含花色苷的越橘提取物(BE),在体外对人类结肠肿瘤细胞系Caco-2和HT-29的抗氧化功效,结果表明,BE在检测条件下具有抗氧化活性,并预防了DNA的氧化损伤,减少了胞内ROS和细胞tGSH水平^[20]。

有研究测定了蓝小麦中花色苷类化合物清除DPPH和ABTS自由基的能力,及抑制人低密度脂蛋白胆固醇氧化的作用,并证明了其花色苷粉末的抗氧化能力显著超过了二叔丁对甲酚(BHT),结果表明,利用蓝小麦作为天然的抗氧化剂及色素具有很大的开发潜力^[21]。此外,很早就有研究证明许多花色苷或花色苷的抗氧化活性都高于V_c和V_e^[22]。

浆果中花色苷含量丰富,不同品种的浆果的抗氧化活性也不同。Petko Denev对野樱桃、接骨木果、黑葡萄干、黑莓及蓝莓几种浆果的花色苷提取物的抗氧化特性进行了研究,通过测定它们的氧自由基吸收能力(ORAC)、羟基自由基转移能力(HORAC)、总超氧自由基吸收抗氧化参数(TRAP)、清除氧化亚氮和抑制脂质过氧化来评价。其中接骨木果提取物具有最高的ORAC值为5783 $\mu\text{mol TE/g}$;野樱桃提取物是最有效的脂质过氧化抑制剂并具有最高的TRAP值为4051 $\mu\text{mol TE/g}$;蓝莓提取物具有最高的HORAC值为1293 $\mu\text{mol GAE/g}$,并且对NO清除能力最高^[23]。

刘红锦等采用不同浓度的乙醇溶液分别提取蓝莓鲜果液,测定各提取物中的总黄酮、花色苷含量,并通过二苯基苦基苯肼(DPPH)和 β -胡萝卜素/亚油酸模型评估其抗氧化活性,结果显示蓝莓60%乙醇溶液提取物中总黄酮和花色苷含量最高,分别为(3.94 \pm 0.19)mg/g、(1.26 \pm 0.11)mg/g,且有很强的抗氧化活性^[24]。

2.2 抗癌活性

对花色苷类物质抗癌活性的研究一直都是热点,花色苷具有抑制诱变和癌症发生的作用,它同时影响了与癌症演变有关的细胞进程,包括与细胞增殖、分化、凋亡和血管发生有关的信号途径。近年来对花色苷结构与抗癌功能关系方面也有一些研究,PU JING等研究了紫玉米、野樱桃、覆盆子、紫胡萝卜、葡萄、小红萝卜及接骨木果的花色苷提取物的不同花色苷结构对人结肠腺癌(HT29)细胞系的生长抑制作用,结果表明,所有的提取物均在不同程度抑制了HT29细胞的生长,其中紫玉米的效果最明显,统计数据表明,花色苷的化学结构影响其化学防护能力,非酰基单糖基化的花色苷对HT-29细胞的增殖具有最强的抑制效应,而带有天竺葵甙元、三糖苷和肉桂酸酰化的花色苷表现出的效果最弱^[25]。另外

还有报道了黑莓的花色苷提取物对HT-29, MCF-7和HL-60癌细胞系具有毒性效应,同时也证明了黑莓的花色苷提取物中花色苷和非花色苷酚类化合物相互协同或加成而产生了抗癌效应^[26]。

不同种类的花色苷针对不同肿瘤细胞而起作用。有研究者研究了acai的花色苷提取物(AEA)的抗氧化特性和对C-6鼠脑神经胶质瘤细胞和MDA-468人乳腺癌细胞的抗增殖活性,结果显示,它显著地抑制了C-6鼠脑神经胶质瘤细胞,DNA ladder碎片结果表明,AEA诱导了C-6鼠脑神经胶质瘤细胞凋亡,而AEA对于MDA-468人乳腺癌细胞的生长没有影响^[27]。

另外,提取物中不同组分均可能起到抗癌作用。Li-Shu Wang研究表明,黑色覆盆子对鼠食管肿瘤细胞发展的抑制作用,采用生物检测-直接的分级分离,黑色覆盆子中的花色苷被证明是在体外下调小鼠表皮细胞的致癌物诱导的核因子- κ B和激活剂蛋白-1的表达,并证明花色苷是几种组分中最有活性的部分,通过对黑覆盆子提取物的不同组分进行动物实验,表明浆果中除了花色苷以外的组分也可能具有化学防护功效,并且不同的浆果组分有相似的作用机制^[28]。

2.3 抗动脉硬化活性

花色苷对预防动脉粥样硬化有重要的作用。然而,对于其结构功能关系的研究还不深入。Long Yi等比较了21种花色苷对氧化修饰低密度脂蛋白诱导的内皮损伤的抑制效应,来明确花色苷的化学结构和内皮保护特性的关系。另外,测定所选择花色苷的细胞内抗自由基活性,来鉴定与内皮保护作用的相互关系。结果表明,使花色苷具有抑制氧化应激诱导的内皮损伤作用的主要结构为-OH的总数或B-环中的-OH,3,4-正-二羟基及3-羟基,并且这种抑制效应与细胞内自由基清除活性有明显的相关性^[29]。

CD40介导的炎症信号是内皮细胞(ECs)有效的激活剂,并能有效地触发动脉粥样硬化的发病,它是一种慢性炎症性疾病。花色苷被认为能够产生有效的心血管保护效应,一部分是通过它的抗炎活性。然而,明确的机制还不清楚。Min Xia等在实验中用花色苷矢车菊色素-3-O- β -葡萄糖苷(Cy-3-g)和芍药色素-3-O- β -葡萄糖苷(Pn-3-g)处理ECs,防止了CD40诱导的内皮的激活,这是因为其阻止了致炎细胞因子和基质金属蛋白酶(MMPs)的原因。另外,花色苷可以抑制CD40诱导的内皮细胞凋亡。花色苷同样减少了CD40诱导的JNK和p38的激活。这就解释了花色苷的抗炎应答及它的动脉保护功能^[30]。焦岩等人研究了蓝靛果花色苷的降血脂作用,结果表明蓝靛果花色苷可降低高血脂大鼠血脂水平,提高抗动脉硬化指数(AAD),使肝脏LPS、HL、LPL酶活性明显增强,因此蓝靛果果渣花色苷具有降低血脂及预防动脉粥样硬化作用^[31]。

2.4 其它生理功能

A. Ologundudu等研究了芙蓉属*sabdariffa*花色苷对2,4-二硝基苯胍诱导的组织损伤的作用,*H. sabdariffa*花色苷提取物前处理组明显地减少了MDA

的形成($p < 0.05$),增加了GSH水平并维持了组织中葡萄糖-6-磷酸盐脱氢酶的正常活性,从而有效改善了DNPH的毒性效应。这些结果表明,*Hibiscus sabdariffa* Linn的干燥花萼的花色苷提取物可以保护动物免受2,4-DNPH诱导的脂过氧化和细胞毒性效应^[32]。

Susan等研究结果证明,浆果提取物在体外可以抑制高危急性成淋巴细胞性白血病细胞的生长并诱导其凋亡,提取物诱导了非白血性白血病细胞不同水平的凋亡。对于用最大剂量处理组,细胞死亡伴随着细胞周期中G2/M阶段的阻止^[33]。

ZHAOHUA HOU等研究了黑米的花色苷提取物对长期酒精诱导肝脏损伤小鼠的保护效应,结果表明,它的摄入可以明显减少肝脏损伤小鼠血清中肝脏酶(AST、ALT、GGT)、MDA、血清浓缩物、肝脏的甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)的水平,使其显示出良好的抗氧化系统^[34]。

Mary H. 等研究了一种富含花色苷的矮灌林蓝莓*Vaccinium angustifolium* Aiton的降血糖作用,结果表明,蓝莓中的花色苷具有减轻患糖尿病C57b1/6J鼠的高血糖症状,富含花色苷部分相对于富酚提取物有着更强的降血糖活性。用纯的单体花色苷:锦葵色素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草色素-3-O-葡萄糖苷进行强饲法(300mg/kg),结果表明,锦葵色素-3-O-葡萄糖苷有明显的降血糖作用,而飞燕草色素-3-O-葡萄糖苷无此作用^[35]。

另外,赵晓燕等人研究了紫玉米花色苷对小鼠免疫功能的影响,结果表明饲喂小鼠不同剂量的花色苷32d后,中剂量组可显著提高小鼠淋巴细胞转化能力和抗体生成细胞数,高剂量组能显著提高小鼠淋巴细胞的增殖能力、抗体生成细胞数和半数溶血值^[36]。

3 展望

花色苷作为一种天然无毒的食用色素,可以广泛应用于食品工业,由于它的多种生理功能,也可以用于开发保健食品。但是由于花色苷自身的不稳定性,在一定程度上限制了它的应用。这就需要进一步明确它的结构组成,尝试对其结构进行改性来增强稳定性;另外,对于其生理功能方面的研究大多数是在体外进行或者受试动物为小鼠,如果要实际应用于人体还要作进一步的研究,包括要考虑花色苷在人体内的代谢、人群之间的差异、进行流行病学研究等。

参考文献

- [1] Chou PH, Matsui S, Misaki K, et al. Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater[J]. Environmental Science and Technology, 2007, 41(2): 652-657.
- [2] Pazmino-Durán AE, Giusti MM, Wrolstad RE. Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants[J]. Food Chemistry, 2001, 75(2): 211-216.
- [3] Kong JM, Chia LS, Goh NK, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 923-933.

- [4] Andersen M, Jordheim M. Flavonoids[M]. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006: 452-471.
- [5] Ana B Cerezo, Elyana Cuevas, P Winterhalter. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry[J]. Food Chemistry, 2010, 123: 574-582.
- [6] GA Garzón a, CE Narváez a, KM Riedl. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia [J]. Food Chemistry, 2010, 122: 980-986.
- [7] Zhendong Yang, Weiwei Zhai. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays L.*) cob and identification with HPLC-MS[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010(11): 470-476.
- [8] Li Rui, Wang Ping, Guo Qing-qi. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry[J]. Food Chemistry, 2011, 125: 116-120.
- [9] 赵善仓, 刘宾, 等. 蓝、紫粒小麦籽粒花色苷组成分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(19): 4072-4080.
- [10] 褚衍亮, 王娜. 樟树果花色苷组分鉴定及抑菌防腐研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10907-10909.
- [11] Kim MY, Iwai K, Onodera A. Identification and antiradical properties of anthocyanins in fruits of *Viburnum dilatatum* thunb [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(21): 6173-6177.
- [12] Remy-Tanneau, Le Guerneve, Meudec E. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and Mass Spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12): 3592-3597.
- [13] Susana. Flavanol-anthocyanin pigments in corn: NMR characterisation and presence in different purple corn varieties [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21: 521-526.
- [14] Daniel J Comeskey, Mirco Montefiori, Patrick J B Edwards. Isolation and structural identification of the anthocyanin components of red kiwifruit[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 2035-2039.
- [15] Konczak I, Zhang W. Anthocyanins-more than nature's colours[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004(5): 239-240.
- [16] Wang SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2): 140-146.
- [17] Chen ZY, Chan PT, Ho KY, et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 1996, 79(2): 157-163.
- [18] Rice-Evans C A, Miller N J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1996, 20(7): 933-956.
- [19] GA Garzón, RE Wrolstad. Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*) [J]. Food Chemistry, 2009, 114: 44-49.
- [20] Markus Schantz, Christiane Mohn. Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29[J]. Journal of Berry Research, 2010(1): 25-33.
- [21] EL-Sayed M, Abdel-AAL, Atef A Abou-Arab. Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 11171-11177.
- [22] Bagchi D, Garg A, Krohn R L, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice[J]. General Pharmacology, 1998, 30(5): 771-776.
- [23] Petko Denev, Milan Ciz, Gabriela Ambrozova. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties[J]. Food Chemistry, 2010, 123: 1055-1061.
- [24] 刘红锦, 刘小莉. 蓝莓中花色苷提取及其抗氧化活性研究[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(6): 1347-1350.
- [25] PU Jing, Joshua A Bomser, Steven J Schwartz. Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 9391-9398.
- [26] J Dai, A Gupte, L Gates. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47: 837-847.
- [27] Shelly Hogan, Hyun Chung, Lei Zhang. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from acai[J]. Food Chemistry, 2010, 118: 208-214.
- [28] Li-Shu Wang, Stephen S Hecht, Steven G Carmella. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats[J]. Cancer Prev Res, 2009, 2(1): 84-93.
- [29] Long Yi, Chun-ye Chen, Xin Jin. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity[J]. FEBS Letters, 2010, 584: 583-590.
- [30] Min Xia, Wenhua Ling, Huilian Zhu. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation[J]. Atherosclerosis, 2009, 202: 41-47.
- [31] 焦岩, 王振宇. 蓝靛果花色苷超声波辅助提取优化及其降血脂作用[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 52-59.
- [32] A Ologundudu, A O Ologundudu, O M Oluba. Effect of Hibiscus sabdariffa anthocyanins on 2,4-dinitrophenylhydrazine-induced tissue damage in rabbits[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, 2010, 2(1): 1-6.
- [33] Susan J Zuninoa, Yanjun Zhangb, Navindra P Seeramb. Berry fruit extracts inhibit growth and induce apoptosis of high-risk acute lymphoblastic leukemia cells in vitro[J]. Journal of Functional Foods, 2001: 187-195.
- [34] Zhaohua HOU, Peiyu QIN, Guixing REN. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa L. Japonica*)

on chronically alcohol-induced liver damage in rats[J]. Agric Food Chem, 2010, 58: 3191-3196.

[35] Mary H Grace, David M Ribnicky, Peter Kuhn. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush

blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton[J]. Phytomedicine, 2009, 16: 406-415.

[36] 赵晓燕, 张超, 等. 紫玉米花色苷对小鼠免疫功能的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(8): 1933-1936.

(上接第357页)

具有提高作用。UCP、ACP相同剂量之间比较, 未见显著性差异, 见表5。

由流式细胞术分析各组靶细胞死亡率可以看出, UCP高剂量组、ACP中剂量组、ACP高剂量组和茯苓多糖口服液组的靶细胞死亡率均显著提高($p < 0.05$), 而靶细胞死亡率减去自然死亡率越高, 表明NK细胞杀伤活性越强。UCP、ACP相同剂量之间比较, 则未见显著性差异, 详见图1。

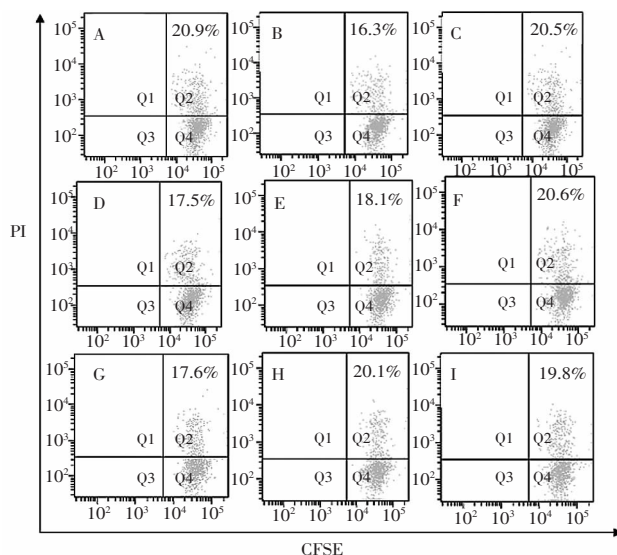


图1 流式细胞术分析各组中靶细胞死亡率

Table 1 Death rate map of target cells in each group by flow cytometry analysis

注: A: 正常对照; B: 模型对照; C: 茯苓多糖口服液;

D: UCP低剂量; E: UCP中剂量; F: UCP高剂量; G: ACP低剂量; H: ACP中剂量; I: ACP高剂量。

本研究发现, UCP高剂量和ACP低、中、高剂量均可显著增强免疫功能低下小鼠的迟发型变态反应, 提示这些供试品对小鼠的细胞免疫功能具有提高作用, 且ACP中剂量作用明显优于UCP中剂量。UCP和ACP低、中、高剂量对免疫功能低下小鼠的血清溶血素生成量均具有显著提高作用, 提示它们对小鼠的体液免疫功能具有提高作用, 且ACP低、高剂量的作用优于UCP低、高剂量。ACP高剂量对免疫功能低下小鼠的碳廓清能力具有显著提高作用, 提示ACP高剂量对小鼠单核-巨噬细胞功能具有提高作用。UCP高剂量和ACP中、高剂量可显著提高免疫功能低下小鼠NK细胞活性, 提示这些供试品对NK细胞活性具有提高作用。UCP低剂量具有增加免疫功能低下小鼠胸腺重量的作用。

研究还观察到, 灵芝多糖提取物对小鼠免疫功能的增强作用并不是剂量越大越好, 而是存在最适剂量。本研究中, 中剂量组[100mg/(kg·d)]ACP对小

鼠耳肿胀度提高效果最好, 高剂量组[200mg/(kg·d)]反而作用减弱。UCP低剂量组[50mg/(kg·d)]的胸腺指数明显升高, 效果最好, 中剂量组和高剂量组反而下降。这一发现与文献[9]报道类似, 为灵芝多糖的开发应用在剂量上提供了实验依据, 也就是说在实际应用时剂量并非越大越好。

3 结论

免疫功能主要包括特异性免疫和非特异性免疫。DTH可反映细胞免疫功能的强弱, 溶血素生成反映了体液免疫功能状况, 两者均为特异性免疫; 碳廓清能力和NK细胞活性可反映非特异性免疫功能状况。胸腺和脾脏是重要的免疫器官, 其脏器指数也可以从一个侧面反映机体的免疫功能强弱。

参照中华人民共和国卫生部保健食品检验与评价技术规范(2003年版)^[10]关于增强免疫力功能评价实验结果判定的标准, 根据本研究结果可判定灵芝多糖ACP和UCP均具有增强免疫力的作用。从综合比较来看, 碱提法得到的灵芝多糖ACP的免疫增强作用优于超声提取的灵芝多糖。

至于两种工艺得到的灵芝多糖提取物增强免疫功能的机理是什么, 是否与提取工艺不同导致多糖的种类、结构变化有关, 还有待于进一步研究。

参考文献

[1] LI Yan-qun, LU Fang, ZHANG Ke-chang. 富含半乳糖的液体深层培养的灵芝胞外多糖的结构与生物活性研究[J]. 碳水化合物聚合物: 英文版, 2007, 68: 323-328.

[2] BAO Xin-feng, WANG Xue-song, DONG Qun, 等. 灵芝免疫活性多糖的结构特性研究[J]. 物理化学: 英文版, 2002, 59: 175-181.

[3] 张璐璐, 庞秀炳, 尹登科, 等. 灵芝多糖对肾小球系膜细胞增殖的影响和体外抗氧化活性的研究[J]. 药物生物技术, 2008, 15(6): 435-438.

[4] 杨琬芳, 王桂琴, 郝芳. 灵芝多糖和DCN合用对荷瘤小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(4): 245-247.

[5] 唐庆九, 张劲松, 潘迎捷, 等. 灵芝孢子粉碱提多糖对小鼠巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(2): 142-144.

[6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.

[7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.

[8] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南(药理学 毒理学)[M]. 1993.

[9] 李建军, 雷林生, 余传林, 等. 灵芝多糖抗肿瘤作用的免疫学相关性研究[J]. 中药材, 2007, 30(1): 71-73.

[10] 中华人民共和国卫生部, 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003.