

梁汾醋对小鼠免疫增强作用及体外抗氧化活性

耿晓琦, 范冰冰, 宋 佳, 郑 宇, 王 敏*

(天津科技大学 生物工程学院 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心工业发酵
微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

摘 要: 目的 测定梁汾醋中的主要成分及其含量, 并探究其对小鼠的免疫增强作用和体外抗氧化活性。
方法 通过比较低剂量与高剂量梁汾醋对小鼠免疫器官的脏器指数、NK 细胞活性、淋巴细胞转化功能、迟发型变态反应和细胞因子变化等的影响, 评价梁汾醋对小鼠免疫功能的作用。通过 1,1-二苯基-2-苦肟基 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]自由基和羟基自由基清除实验, 观察梁汾醋的体外抗氧化活性。**结果** 2 个剂量的梁汾醋对小鼠的体重、脾脏指数和胸腺指数均无显著影响, 但高剂量组能够显著提高小鼠的 NK 细胞活性、脾淋巴细胞的转化能力, 有效缓解迟发型变态反应, 促进细胞因子 IL-10、IL-12 的释放, 增加免疫球蛋白的水平; 梁汾醋表现出显著的清除 DPPH 自由基以及羟基自由基的能力, 在一定浓度下清除率可达到 100%, 对于 ABTS 自由基也有较好的清除率, 在浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除率达到 76.73% $\pm$ 3.28%, 并与浓度呈现量效关系。**结论** 摄入一定量的梁汾醋具有增强小鼠免疫功能的作用, 且具有良好的抗氧化效果。
关键词: 梁汾醋; 营养成分; 小鼠; 免疫; 抗氧化活性

Immunoenhancement and *in vitro* antioxidant activity of Liangfen vinegar in mice

GENG Xiao-Qi, FAN Bing-Qian, SONG Jia, ZHENG Yu, WANG Min*

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Engineering Research Center of Microbial Metabolism and Fermentation Process Control, College of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: Objective To determine the main components of Liangfen vinegar and its content, and to explore its immune-enhancing effect on mice and antioxidant activity *in vitro*. **Methods** By comparing the effects of low dose and high dose Liangfen vinegar on the organ index, NK cell activity, lymphocyte transformation function, delayed allergic reaction and cytokine changes in mouse immune organs, the effects of Liangfen vinegar on mouse immune function were evaluated. The antioxidant activity of Liangfen vinegar was observed *in vitro* by scavenging

基金项目: 天津市教委一般项目(2018KJ125)、天津市教委创新团队(TD13-5013)、天津市教委科研计划项目(2018KJ125)、天津科技大学新型冠状病毒防治科研攻关项目

Fund: Supported by Tianjin Education Commission General Project (2018KJ125), Tianjin Education Commission Innovation Team (TD13-5013), Tianjin Education Commission Scientific Research Program (2018KJ125), Tianjin University of Science and Technology Scientific Research Project of Novel Coronavirus Prevention and Treatment

***通讯作者:** 王敏, 教授, 主要研究方向为发酵食品健康因子分析及功能评价。E-mail: minw@tust.edu.cn

***Corresponding author:** WANG Min, Professor, Tianjin University of Science and Technology, College of Biological Engineering, Tianjin 300457, China. E-mail: minw@tust.edu.cn

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical, 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (ABTS) free radical and hydroxyl free radical and hydroxyl radical scavenging experiments. **Results** Two doses of Liangfen vinegar had no significant effect on the weight, spleen index, and thymus index of mice. The high-dose group could significantly improve the NK cell activity and the transformation ability of splenic lymphocytes in mice, and effectively alleviate the late abnormal response, promote the release of cytokines IL-10 and IL-12 and increase the level of immunoglobulin. Liang fen vinegar showed significant scavenging ability of DPPH free radical and hydroxyl radical, and the scavenging rate could reach 100% under certain concentration. ABTS free radical scavenging rate was also better, the clearance rate was $76.73\% \pm 3.28\%$ at the concentration of $120 \mu\text{g/mL}$, and showed a dose-effect relationship with the concentration. **Conclusion** Intake of a certain amount of Liangfen vinegar can enhance the immune function of mice, and has a good antioxidant effect.

KEY WORDS: Liangfen vinegar; nutritional composition; mice; immune; antioxidant activity

1 引 言

食醋是一种常用的调味品,含有丰富的营养物质,主要包括糖类、有机酸、蛋白质、多酚、黄酮、无机盐、维生素等,具有独特的药理学作用^[1]。山西老陈醋是我国的4大名醋之一,具有悠久的历史^[2]。近年来,研究者越来越关注谷物醋的营养价值和功能,许多学者发现,谷物醋具有很好的抗氧化、抗衰老作用,且能够有效的缓解酒精对肝脏的损伤作用^[3-5]。梁汾醋是山西老陈醋的一种,它是以高粱为主要原料,经过蒸煮、糖化、酒化等工艺过程,然后再以高温快速醋化,温火焙烤醋醅和陈酿而成^[6]。

近年来,国内外学者对食醋在提高免疫及抗氧化方面进行了大量研究,并取得了较大的进展。Hashimoto等^[7]利用黑醋刺激小鼠脾细胞发现可以促进TNF- α 产生,具有免疫调节作用。这些结果表明,长期发酵的黑醋含有免疫刺激成分。Huo等^[8]通过实时定量PCR检测肝、脾、十二指肠、肠系膜淋巴结中白介素10(IL-10)、白介素22(IL-22)和白介素25(IL-25)的mRNA表达水平,发现竹醋粉能很好提高断奶仔猪生长性能,调节断奶仔猪免疫器官中IL-10、IL-22和IL-25的mRNA表达水平而且投加量在0.5%时效果最佳。刘杰超等^[9]以红枣酒为原料,经过醋酸菌发酵后,将其中的总酚和总黄酮含量以及1,1-二苯基-2-苦肟基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)[2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]自由基清除能力分别提高16.59%、42.98%、24.66%、38.07%^[9]。果醋、食醋均具有很好的抗氧化活性,与其中多酚、黄酮、类黑素等含量呈正相关^[10,11]。

本研究以梁汾醋为实验材料分析其中的营养成分,研究食醋在提高免疫以及体外抗氧化方面的优良特性,探讨其对小鼠的免疫增强作用以及体外抗氧化活性,为开发食醋保健品奠定理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

昆明小鼠:雌雄对半,6~8周龄,18~22 g,购自中国食品药品检定研究院,许可证号:SCXK(京)2014-0013。

梁汾醋(太原梁汾醋业有限公司);乳酸钠、二硝基氟苯、过硫酸钾(分析纯,北京索莱宝科技有限公司);BCA、CCK8、IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IgG, IgA, IFN- α 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)。

SYNEK GY4多功能酶标仪(美国Bio Tek);FA2204B电子分析天平(德国赛多利斯);LD5-10高速离心机(北京医用离心机厂);L-8900氨基酸自动分析仪(日本日立公司);TE2000倒置显微镜(日本Nikon公司)。

2.2 方 法

2.2.1 溶液配制

RPMI-1640完全培养液:RPMI-1640培养液过滤除菌,用前加入15%胎牛血清,1%青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 $\mu\text{g/L}$)。

LDH基质液的配制:用蒸馏水20 mL溶解40 mg NBT、100 mg NAD⁺、10 mg PMS,取上清16 mL,加1 mol/L乳酸钠4 mL,加PBS缓冲液(pH 7.4)至100 mL,现用现配并避光保存。

二硝基氟苯(dinitrofluorobenzene, DNFB)溶液:称取-DNFB-50 mg,置于清洁干燥小瓶中,添加5 mL预先配置好的丙酮麻油溶液(丙酮:麻油=1:1),盖好瓶塞并用胶布密封。混匀后,用250 μL 注射器通过瓶盖取用。

刀豆蛋白A(concanavalin A, ConA)液:精密称取刀豆蛋白A粉末,超纯水配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,过滤除菌,保存于-20℃冰箱中,临用前稀释。

ABTS储备液的制备:取等体积的2.6 mmol/L过硫酸钾溶液与7.4 mmol/L ABTS溶液混合均匀,室温下避光静置12 h,用pH=7.4的PBS稀释40~50倍,调节A734 nm

的值为 0.7±0.02, 溶液现配。

DDPH 测试液的配制: 取 DDPH 1 mg 溶于约 20 mL 乙醇中, 混匀, 测 A519 nm 的值, 在 1.2~1.3 之间最佳, 避光保存, 溶液现配现用。

2.2.2 实验动物分组及灌胃

昆明小鼠适应环境 4 d 后按体重随机分为 4 组, 连续灌胃 30 d, 分组和灌胃情况如下(1)空白对照组: 灌胃生理盐水 200 μL(2)乙酸组: 灌胃与食醋中含量相同的乙酸溶液 200 μL(3)低剂量组: 灌胃 4 mL/kg(按照小鼠体重灌胃食醋的含量)的食醋 200 μL(4)高剂量组: 灌胃 20 mL/kg 的食醋 200 μL。

2.2.3 食醋中主要成分分析

对梁汾醋中主要成分进行分析, 总糖、还原糖、总酸、总多酚、总黄酮参考国标中对应方法进行测定^[12-16]。

不挥发性酸的测定方法: 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法(色谱柱: Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column(7.8 mm×300 mm); 柱温: 30 °C; 流速: 0.6 mL/min; 紫外检测器波长: 215 nm; 流动相: 5 mmol/mL 硫酸水溶液; 进样量: 10 μL; 运行时间: 30 min)。

氨基酸的测定方法: 采用氨基酸测定仪进行测定。

2.2.4 梁汾醋对小鼠 NK 细胞活性的影响

实验前 24 h 传代培养靶细胞小鼠淋巴瘤细胞(YAC-1), 用含有 15%的胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞浓度调整至 4×10⁶ 个/mL, 备用。取各组小鼠, 每组 8 只, 雌雄各半, 末次灌胃 2 h 后处死, 无菌取脾脏, 研磨过滤制备单细胞悬液, 调节脾细胞浓度为 1×10⁸ 个/mL(效靶比为 50:1), 加入 96 孔板中培养。

按表 1 所示向 96 孔板中加样品, 上述待测细胞均设 8 组平行实验, 37 °C、5% CO₂ 下无菌培养 2 h。1000 r/min 离心 5 min, 每孔吸取 100 μL 上清加入 100 μL LDH 基质液, 磕板混匀, 室温下避光保存 15 min。每孔加入 30 μL 1 mol/L 柠檬酸来终止反应, 测定 OD₅₇₀, 计算 NK 活性。NK 细胞活性计算如下:

$$\text{NK 细胞活性}\% = (\text{反应孔 } OD_{570} - \text{自然释放孔 } OD_{570}) / (\text{最大释放孔 } OD_{570} - \text{自然释放孔 } OD_{570}) \times 100\% \quad (1)$$

表 1 96 孔板中各孔的样品组成

Table 1 Sample composition of each hole in 96 hole plate

孔	成分
自然释放孔	100 μL YAC-1 + 100 μL RPMI-1640
反应孔	100 μL YAC-1 + 100 μL 脾细胞
最大释放孔	100 μL YAC-1 + 100 μL 1%NP-40

2.2.5 迟发型变态反应

取各组灌胃 4 周后的小鼠, 每组 8 只, 雌雄各半。用硫化钡脱毛, 用 DNFB 溶液进行致敏, 5 d 后用 DNFB 溶液

涂抹于小鼠右耳两面。24 h 后处死, 取直径 8 mm 的耳片, 称重。左右耳重量之差表示迟发型变态反应的程度。

2.2.6 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验

取各组灌胃 4 周后的小鼠, 每组 8 只, 雌雄各半。末次给药 1 h 后, 制备脾细胞悬液, 调整脾细胞浓度为 1×10⁷ 个/mL, 置于 96 孔板中培养。实验组每孔加 100 μL 脾细胞和 100 μL 20 μg/mL ConA 液, 对照组每孔加 100 μL 脾细胞和 100 μL RPMI1640 培养液, 37 °C, 5% CO₂ 条件下, 培养 48 h。终止培养前 2 h 在显微镜下观察孔内细胞转化情况并用 CCK8 试剂盒检测淋巴细胞转化情况, 淋巴细胞转化效率的计算公式如下:

$$\text{刺激指数(SI)} = \text{ConA 刺激孔 OD} / \text{对照孔 OD} \quad (2)$$

2.2.7 小鼠脏器指数的测定

每组 8 只取灌胃 4 周后的小鼠连续灌胃 4 周于末次给药 2 h 后, 称重, 眼球采血后处死。取脾脏、胸腺, 剔除结缔组织, 吸干表面液体, 称重计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器重量} / \text{小鼠体重} \quad (3)$$

2.2.8 对小鼠免疫细胞因子水平的影响

每组小鼠眼球取血后, 室温放置 30 min, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清备用。按照 ELISA 试剂盒说明检测 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、TNF-α、IgA、IgG 含量。

2.2.9 体外抗氧化活性评价

梁汾醋体外抗氧化活性通过对 ABTS、DPPH 和羟基自由基这 3 种自由基的清除实验进行评价。在样品管中分别加入不同浓度 0.2 mL 梁汾醋或 Vc 以及 3 mL ABTS 溶液, 空白组用蒸馏水代替待测样品, 对照组用超纯水代替 ABTS 溶液。每组均设置 3 平行, 室温避光条件下放置 1 h, 在 734 nm 处测定吸光值。按照如下公式计算 ABTS 清除率:

$$\text{ABTS 自由基清除率}\% = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\% \quad (4)$$

在 DPPH 溶液中加入不同浓度的 0.6 mL 梁汾醋或 Vc, 混匀, 黑暗中静置 30 min 后取上清, 在 517 nm 处测定吸光值。按照如下公式计算 DPPH 自由基的清除率(A₁: 蒸馏水加 DPPH 溶液的吸光度; A₂: 样品加 DPPH 溶液的吸光度; A₃: 样品加乙醇溶剂的吸光度):

$$\text{DPPH 自由基清除率}\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\% \quad (5)$$

在样品管中依次加入 0.5 mL 0.15 mol/L FeSO₄、2 mL 2 mmol/L 水杨酸钠溶液、2.5 mL 蒸馏水和 1 mL 不同浓度的梁汾醋或 Vc, 最后加入 1 mL 6 mmol/L 的 H₂O₂, 37 °C 下反应 1 h, 取上清在 510 nm 处测定吸光值。按照如下公式计算羟基自由基的清除率(A₁: 空白对照液的吸光度, A₂: 对照+加样后的吸光度, A₃: 溶液的本底吸光度):

$$\text{羟基自由基清除率}\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100\% \quad (6)$$

2.2.10 数据处理

实验数据用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA), 统计结果均以平均值±标准差(X±SD)表示。组间

做 Tukey's 检验, $P<0.05$ 则表示有显著性差异, $P<0.01$ 为极显著性差异, 有统计学意义, 实验作图均用 Origin 8.5 软件进行。

3 结果与分析

3.1 梁汾醋中的主要成分组成

由表 2 可知, 梁汾醋中含有多种成分。由表 3、表 4 可知, 梁汾醋中含有一定量的有机酸与氨基酸。食醋中的有机酸和氨基酸能够促进消化、增强食欲、促进新陈代谢、刺激中枢神经, 帮助开发智力^[1,17], 多酚类化合物是重要的抗氧化成分, 具有抗氧化、抗衰老、降脂、抗炎等作用^[18-20]。黄酮具有解酒护肝、抗肿瘤、抗疲劳等作用^[21,22]。

表 2 梁汾醋中的主要成分(n=3) Table 2 Main components in Liangfen vinegar(n=3)	
成分	含量/(g/100 mL)
总糖	4.344±1.57
还原糖	1.095±0.30
蛋白质	1.301±0.46
黄酮	0.035±0.061
多酚	0.386±0.050
总酸	7.17±1.24
不挥发性酸	2.33±0.28

表 3 梁汾醋中的有机酸种类及含量(n=3) Table 3 Types and contents of organic acids in Liangfen vinegar(n=3)	
有机酸	含量/(g/100 mL)
草酸	1.1±0.12
柠檬酸	1.2±0.09
酒石酸	0.085±0.003
苹果酸	0.61±0.08
琥珀酸	0.006±0.001
乳酸	5.9±0.23
乙酸	5.1±0.31

3.2 细胞免疫功能的测定

3.2.1 NK 细胞活性测定

NK 细胞是机体重要的免疫细胞, 是一类非特异性杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞的淋巴细胞^[23]。连续灌胃 30 d, 与空白组相比, 高剂量梁汾醋组(4 mL/kg)的 NK 细胞的活性提高了 59.42%; 剂量组(4 mL/kg, 20 mL/kg)的 NK 细胞活性与乙酸组比较差异具有统计学意义(表 5)。表明梁汾醋具有提高 NK 细胞活性的作用。

表 4 梁汾醋中氨基酸种类及含量(n=3) Table 4 Types and contents of amino acids in Liangfen vinegar (n=3)	
氨基酸	含量/(g/L)
Lys	0.37±0.010
Trp	ND
Phe	ND
Met	0.11±0.004
Thr	0.33±0.001
Ile	0.78±0.003
Leu	1.11 ±0.001
Val	0.69±0.004
Gly	0.62±0.004
Ala	1.38±0.002
Pro	ND
Tyr	0.20±0.002
Ser	0.59±0.020
Cys	0.38±0.002
Asn	ND
Gln	ND
Asp	1.19±0.012
Glu	0.55±0.004

表 5 梁汾醋对小鼠的 NK 细胞活性的影响 Table 5 Effect of Liangfen vinegar on NK cell activity in mice	
组别	NK 细胞活性/%
空白对照组	15.77±1.84 ^a
乙酸组	16.23±0.34 ^{ab}
醋低剂量组(4 mL/kg)	18.24±0.47 ^{ac}
醋高剂量组(20 mL/kg)	25.14±1.69 ^{bc}

注: 表中数值为平均数±标准差(n=8), 同一列中不同字母表示有显著性差异($P<0.05$), 下同。

3.2.2 迟发型变态反应

机体免疫功能主要反映在细胞免疫和体液免疫两方面。T 淋巴细胞是细胞免疫的主要参与者, 在免疫过程中发挥着重要作用^[24]。迟发型变态反应(delayed type hypersensitivity, DTH)是一种由 T 细胞介导的炎症免疫反应, DTH 可直观反映机体细胞的免疫功能^[25]。由表 6 可知, 梁汾醋的高剂量组(20 mL/kg)脾淋巴细胞转化功能明显高于空白组与乙酸组, 经统计学分析, 差异具有显著性意义, 表明梁汾醋具有促进脾细胞增值的作用。高剂量组(20 mL/kg)小鼠左右肿胀率明显低于空白对照组且低剂量

组(4 mL/kg)也能在一定程度上缓解小鼠的迟发型变态反应,表明梁汾醋具有加强迟发型变态反应程度的作用,对机体细胞有一定的免疫功能。

表 6 梁汾醋对小鼠淋巴细胞转化功能和耳部肿胀的影响
Table 6 Effects of Liangfen vinegar on lymphocyte transformation and ear swelling in mice

组别	脾淋巴细胞转化功能 /%	耳部肿胀率/%
空白对照组	18.00 ± 3.00 ^a	43.12±2.13 ^a
乙酸组	19.20 ± 2.31 ^{ab}	42.14±3.12 ^a
醋低剂量组(4 mL/kg)	19.73 ± 3.74 ^{ab}	41.54±1.56 ^a
醋高剂量组(20 mL/kg)	27.61 ± 2.71 ^{bc}	37.21±1.03 ^b

3.3 小鼠体重和脏器指数

免疫器官的重量是非特异性免疫的重要指标,胸腺和脾脏与体重的百分比能够直接反应免疫器官的发育情况和机体的免疫力^[26]。由表 7 可知,连续灌胃 30 d,梁汾醋剂量组(4 mL/kg, 20 mL/kg)的脾脏和胸腺指数与空白组以及乙酸组相比均无显著变化,表明梁汾醋对小鼠的脾脏和胸腺没有显著的损伤作用。

表 8 梁汾醋对小鼠细胞因子水平的影响
Table 8 Effects of Liangfen vinegar on cytokine levels in mice

组别	IL-2/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)	IL-12/(pg/mL)	IFN- α /(pg/mL)
空白对照组	34.73±5.75 ^a	14.87±2.53 ^a	48.42±6.27 ^a	13.40±1.66 ^a	5.16±0.61 ^a
乙酸组	43.04±4.62 ^a	13.91±2.51 ^a	54.72±8.89 ^a	14.71±1.03 ^a	6.24±0.77 ^a
醋低剂量组(4 mL/kg)	35.92±1.49 ^a	13.92±1.36 ^a	54.39±10.53 ^a	14.68±2.42 ^a	5.14±0.50 ^a
醋高剂量组(20 mL/kg)	35.14±6.69 ^a	14.46±1.58 ^a	67.59±5.13 ^b	17.72±2.11 ^b	6.16±0.24 ^a

3.5 免疫球蛋白的含量

免疫球蛋白 G(immune globulin G, IgG)是血清中含量最高的免疫球蛋白^[31],在结合补体、增强免疫细胞吞噬病原微生物等方面具有重要作用。免疫球蛋白 A(IgA)是人体每天合成量最大的抗体,在血清中含量仅次于 IgG^[32]。由表 9 可知,连续灌胃 30 d,高低剂量组(20 mL/kg)对 IgG 的含量影响不大,与空白组相比高剂量组(20 mL/kg)能够显著增加 IgA 的含量。

不同分组小鼠灌胃 30 d,通过 ConA 诱导小鼠脾淋巴细胞转化实验,耳肿胀法,检测 NK 细胞活性以及细胞因子和免疫球蛋白含量变化表明梁汾醋对小鼠免疫器官以及免疫细胞具有一定的调节作用。Kim 等^[33]通过测定 TNF- β 、IL-12、IL-6 和 NO 的变化研究从柿子醋中分离出的多糖对巨噬细胞免疫调节活性影响发现柿子醋多糖可以增强对巨噬细胞的刺激作用,具有一定的免疫活性。于娟等^[34]研究

3.4 细胞因子含量

细胞因子是免疫细胞和某些非免疫细胞分泌的小分子蛋白,通过结合相应受体调节细胞生长、分化和效应,调控免疫应答^[27,28]。IL-2 能够促进 T 淋巴细胞的增值与分化,调节免疫反应^[23]。IL-6 能使 B 细胞前体成为产生抗体的细胞,IL-10、IL-12 能够增强抗炎性因子释放,都是重要的免疫细胞因子^[29]。IFN- α 是肿瘤坏死因子,是一种由激活的巨噬细胞产生的能抑制成骨细胞和刺激破骨细胞的细胞因子^[30]。由表 8 可知,连续灌胃 30 d,与空白组相比高剂量梁汾醋组(20 mL/kg)能够显著促进 IL-10 和 IL-12 的分泌,但其余指标影响不大。低剂量组(4 mL/kg)与空白组相比差异不明显。从总体结果来看,高剂量组(20 mL/kg)对小鼠血清几种细胞因子的促进作用要优于低剂量组(4 mL/kg)。

表 7 梁汾醋小鼠脏器指数的影响
Table 7 Effect of Liangfen vinegar on organ index of mice

组别	体重/g	脾脏/%	胸腺/%
空白对照组	40.60±5.52	0.32±0.10	0.39±0.12
乙酸组	38.52±6.89	0.27±0.07	0.39±0.10
醋低剂量组(4 mL/kg)	39.66±6.34	0.33±0.11	0.40±0.11
醋高剂量组(20 mL/kg)	40.37±7.32	0.31±0.10	0.40±0.11

发现红茶多酚可以抑制体内肿瘤的生长,提高淋巴细胞的增殖能力并使巨噬细胞的吞噬能力大大增强,相应炎症因子水平提高并降低 MDA 含量,表明红茶多酚具有很好的抗肿瘤作用,并增强机体的免疫调节活性。梁汾醋中含有一定量的多糖以及多酚,可能是醋增强免疫作用的主要活性成分。

表 9 梁汾醋对小鼠免疫球蛋白含量的影响
Table 9 Effect of Liangfen vinegar on immunoglobulin content in mice

组别	IgG/(mg/mL)	IgA/(μ g/mL)
空白对照组	29.14±4.15 ^a	20.83±3.72 ^a
乙酸组	35.38±4.68 ^a	23.77±4.58 ^a
醋低剂量组(4 mL/kg)	35.46±3.46 ^a	24.50±5.78 ^a
醋高剂量组(20 mL/kg)	38.19±4.48 ^a	30.66±4.65 ^b

3.6 梁汾醋体外抗氧化评价

天然活性物质清除自由基的途径主要包括氢原子转移(H-atom transfer, HAT)和单电子转移(single electron transfer, SET)2种途径, 其中 HAT 是通过供氢的方式清除自由基, 而 SET 则是通过电子转移的方式达到清除自由基的目的^[35]。以对 ABTS、DPPH 以及羟基自由基的清除率建立的体外抗氧化评价很好的体现了这两种途径。梁汾醋的体外抗氧化评价如下图1~图3所示, 在实验浓度范围内, 梁汾醋对不同自由基的清除能力与浓度呈量效关系, 醋浓度越大, 自由基清除能力越强。与阳性对照(Vc)相比, 梁汾醋表现出较好的清除 DPPH 自由基以及羟基自由基的能力, 在浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率均达到了 100%, 对于 ABTS 自由基, 在浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率也达到了 76.73% $\pm$ 3.28%, 具有良好的抗氧化效果。

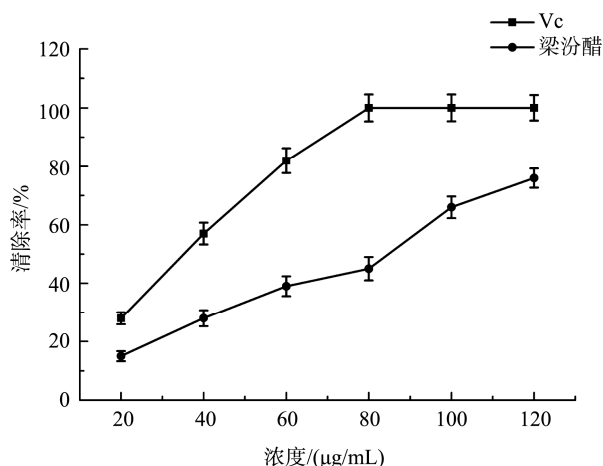


图1 梁汾醋对 ABTS 自由基的清除率(n=3)

Fig.1 Scavenging rate of ABTS free radical by Liangfen vinegar (n=3)

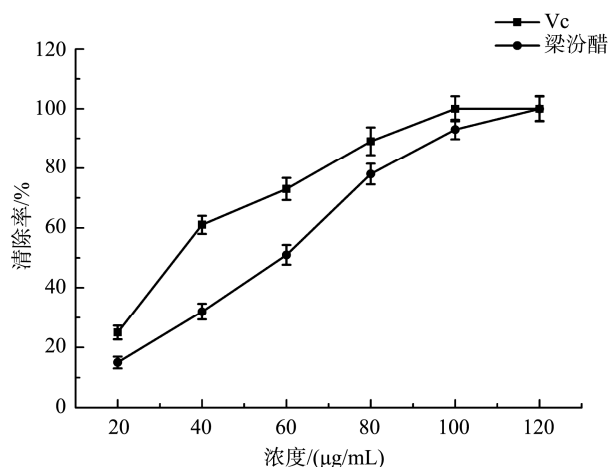


图2 梁汾醋对 DPPH 自由基的清除率(n=3)

Fig.2 Scavenging rate of DPPH free radical by Liangfen vinegar (n=3)

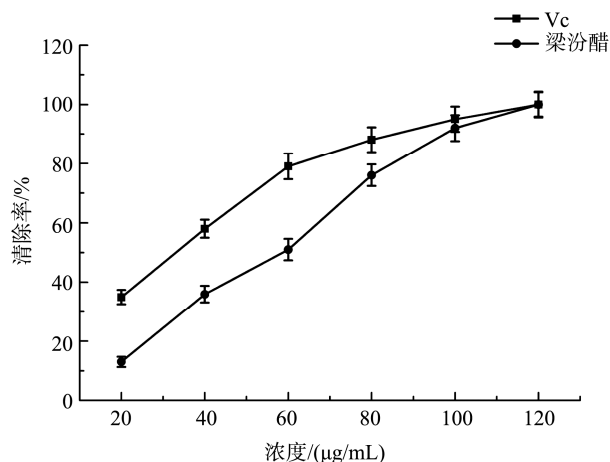


图3 梁汾醋对羟基自由基的清除率(n=3)

Fig.3 Scavenging rate of hydroxyl radical by Liangfen vinegar (n=3)

Verzelloni 等^[10]研究表明食醋的抗氧化能力与样品的总多酚含量密切相关, 但与样品抗氧化能力相关较好的化合物不一定是那些存在于高浓度中的化合物中。徐敏^[11]研究发现富含多酚的山葡萄皮渣醋的抗氧化活性高于苹果醋、葡萄醋, 但与粮食醋接近, 经多酚浸提预处理的山葡萄皮渣醋与未经处理的果醋相比表现出较强的 DPPH 自由基清除能力, 在一定程度上 DPPH 自由基清除能力与醋中多酚含量呈正相关。Verzelloni 等^[10]研究表明, 葡萄酒和醋的抗氧化能力与其酚类和黄酮含量也高度相关。

梁汾醋在酿造过程中发生美拉德反应, 使得醋中的类黑素、川穹嗪含量增高^[22], 而类黑素、川穹嗪具有很好的抗氧化活性。

4 结 论

梁汾醋中含有多种功能性成分(糖类、蛋白质、多酚、黄酮)和营养物质。其中多糖、多酚类物质可能是梁汾醋提高小鼠免疫的活性物质, 多酚、黄酮等物质可能是梁汾醋具有较好抗氧化效果的有效成分。

实验结果表明梁汾醋高低剂量组的脾脏和胸腺指数与空白组以及乙酸组相比均无显著变化, 表明梁汾醋对小鼠的脾脏和胸腺没有显著的损伤作用; 与空白组相比, 高剂量组可以显著提高 NK 细胞活性, 与乙酸组相比, 低剂量组与高剂量组均可提高 NK 细胞活性; 高剂量组脾淋巴细胞转化功能明显高于空白组与乙酸组, 可见梁汾醋在受 ConA 刺激后能明显增强 T 淋巴细胞促进母细胞发生增值的反应; 高剂量组小鼠左右耳重量差值明显高于空白对照组, 且低剂量组也能在一定程度上缓解小鼠的迟发型变态反应, 表明梁汾醋通过增强 T 淋巴细胞增殖成致敏淋巴细胞进而增强抗原抗体反应; 与空白组相比高剂量梁汾醋组能够显著促进 IL-10 和 IL-12 的分泌, 提高小鼠 IgA 的含量,

高剂量组对小鼠血清几种细胞因子的促进作用要优于低剂量组。

在浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ 时 DPPH 自由基以及羟基自由基清除率均达到了 100%，对于 ABTS 自由基，在浓度为 120 $\mu\text{g/mL}$ 时清除率也达到了 76.73% $\pm$ 3.28%，具有良好的抗氧化效果。

梁汾醋对动物免疫器官、免疫细胞具有一定的调节作用并有较好的抗氧化效果，为食醋开发免疫调节剂提供一定的理论依据，为开发食醋保健品奠定理论基础。

参考文献

- [1] 阳飞, 张华山. 食醋及其营养保健功能研究进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(5): 171–175.
Yang F, Zhang HS. Research progress on nutrition and health care function of vinegar [J]. China Cond, 2017, 42(5): 171–175.
- [2] Yang L, Wang X, Yang X. Possible antioxidant mechanism of melanoidins extract from Shanxi aged vinegar in mitophagy-dependent and mitophagy-independent pathways [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(34): 8616–8622.
- [3] Xia T, Jin Z, Yao J, *et al.* Shanxi aged vinegar prevents alcoholic liver injury by inhibiting CYP2E1 and NADPH oxidase activities [J]. J Funct Foods, 2018, 47: 575–584.
- [4] Xu Q, Tao W, Ao Z. Antioxidant activity of vinegar melanoidins [J]. Food Chem, 2007, 102(3): 841–849.
- [5] Borut P, Dusan S, Irina M. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 1–11.
- [6] Wang A, Song H, Ren C, *et al.* Key aroma compounds in Shanxi aged tartary buckwheat vinegar and changes during its thermal processing [J]. Flavour Frag J, 2011, 27(1): 47–53.
- [7] Hashimoto M, Obara K, Ozono M, *et al.* Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (kurozu) [J]. J Biosci Bioeng, 2013, 116(6): 688–696.
- [8] Huo YG, Liu ZX, Xuan H, *et al.* Effects of bamboo vinegar powder on growth performance and mRNA expression levels of interleukin-10, interleukin-22, and interleukin-25 in immune organs of weaned piglets [J]. Anim Nutr, 2016, 2(2): 53–60.
- [9] 刘杰超, 葛晓丹, 吕真真, 等. 半连续液态深层发酵红枣醋及其抗氧化活性[J]. 中国酿造, 2020, 39(5): 49–53.
Liu JC, Ge XD, Lv ZZ, *et al.* Semi continuous submerged fermentation of jujube vinegar and its antioxidant activity [J]. China Brew, 2020, 39(5): 49–53.
- [10] Verzelloni E, Tagliazucchi D, Conte A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar [J]. Food Chem, 2007, 105(2): 564–571.
- [11] 徐敏. 山葡萄皮渣醋的酿造、催陈及抗氧化活性研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2017.
Xu M. Brewing technology, aging and antioxidant effect of *Vitis amurensis* pomace vinegar [D]. Jilin: Jilin University, 2017.
- [12] GB/T-15038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
GB/T-15038-2006 General analysis method for wine and fruit wine [S].
- [13] GB/T 12456-2008 食品中总酸的测定[S].
GB/T 12456-2008 Determination of total acids in foods [S].
- [14] GB/T 8313-2008 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S].
GB/T 8313-2008 Determination of tea polyphenols and catechins in tea [S].
- [15] GB/T 20574-2006 蜂胶中总黄酮含量的测定方法[S].
GB/T 20574-2006 Determination of total flavonoids in propolis [S].
- [16] GB 5009. 268-2016 食品中多元素的测定[S].
GB 5009. 268-2016 Determination of multi elements in food [S].
- [17] 刘国信. 醋-不经意间的营养与美味[J]. 心血管病防治知识, 2017, (8): 16–22.
Liu GX. Vinegar – inadvertently nutrition and delicious [J]. Prev Treat Cardiovasc Dis, 2017, (8): 16–22.
- [18] 刘珂. 浅谈我国食醋的功能及发展趋势[J]. 中国调味品, 2010, 35(6): 32–34.
Liu K. Discuss Chinese vinegar function and trend of development [J]. China Condiment, 2010, 35(6): 32–34.
- [19] Huetteroth W, Waddell S. Hungry flies tune to vinegar [J]. Cell, 2011, 145(1): 0–18.
- [20] Bjornsdottir KF, Breidt J, Mcfeeters RF. Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157: H7 in acidic environments [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 660–664.
- [21] Xia T, Zhang J, Yao J, *et al.* Shanxi aged vinegar protects against alcohol-induced liver injury via activating Nrf2-mediated antioxidant and inhibiting TLR4-induced inflammatory response [J]. Nutrients, 2018, 10(7): 805.
- [22] 夏婷, 姚佳慧, 郑宇, 等. 传统食醋的抗氧化成分及功能研究进展[J]. 食品科学, 2017, (13): 291–296.
Xia T, Yao JH, Zheng Y, *et al.* Research progress in antioxidant components and antioxidant function of traditional vinegar [J]. Food Sci, 2017, (13): 291–296.
- [23] 张箬茹, 符妍, 王丽丽, 等. 腹腔镜结直肠癌根治术对老年患者血清炎症细胞因子的影响[J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 609–611.
Zhang JR, Fu Y, Wang LL, *et al.* Effect of laparoscopic radical colorectal cancer on serum inflammatory cytokines in elderly patients [J]. Anhui Med Pharm J, 2013, 17(4): 609–611.
- [24] 张晖, 马丽, 韩焕兴. T 淋巴细胞在病毒免疫中作用的研究进展[J]. 医学综述, 2006, 12(2): 70–72.
Zhang H, Ma L, Han HX. Role of T lymphocytes in antiviral immunity [J]. Med Recapitulate, 2006, 12(2): 70–72.
- [25] 方笄, 王萌, 赵晓娟, 等. 芍药苷对迟发型变态反应小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 444–448.
Fang S, Wang M, Zhao XJ, *et al.* Effect of paeony and astragalus polyglycoside on cellular immune function in mice with delayed allergic reaction [J]. Chin Pharm Bull, 2008, 24(2): 444–448.
- [26] 李俊, 黄艳, 廖日权, 等. 罗汉果多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(9): 1237–1240.
Li J, Huang Y, Liao RQ, *et al.* Effects of polysaccharides from momordica Grosvenor on immune function in mice [J]. Chin Pharm Bull, 2008, 24(9): 1237–1240.
- [27] 奚庆, 兰冰雪, 李柳冰, 等. 白介素抗肿瘤机制研究进展[J]. 医学信息, 2013, 26(12): 393.
Xi Q, Lan BX, Li LB, *et al.* Research progress of interleukin-anti-tumor mechanism [J]. Med Inform, 2013, 26(12): 393.

- [28] 张国祥, 许文龙. T 淋巴细胞及其分泌的细胞因子与哮喘[J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(1): 125–126.
- Zhang GX, Xu WL. T Lymphocytes and their secreted cytokines are associated with asthma [J]. J Bengbu Med Coll, 2008, 33(1): 125–126.
- [29] 陈一帆, 罗凤鸣. 白介素与非小细胞肺癌转移的关系[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 8: 622–625.
- Chen YF, Luo FM. Relationship between interleukins and on-small cell lung cancer [J]. Int J Respiration, 2014, 8: 622–625.
- [30] 汪平, 仲炜, 唐成武, 等. 槐耳颗粒对肝癌栓塞化疗后免疫功能的影响[J]. 中国现代医生, 2013, 51(36): 58–60.
- Wang P, Zhong W, Tang CW, *et al.* Protective of effect *Huaier* granules on immune function after TACE in patients with liver cancer [J]. Chin Mod Doc, 2013, 51(36): 58–60.
- [31] 蔡钰玫, 黄丹敏, 朱志宏, 等. 1 型糖尿病患者血清免疫球蛋白 G4 水平变化及其临床意义[J]. 实用医药杂志, 2019, 36(7): 586–588, 603.
- Cai YM, Huang DM, Zhu ZH, *et al.* The level changes of serum immunoglobulin G4 in type 1 diabetes patients, and their clinical significance [J]. J Pract Med, 2019, 36(7): 586–588, 603.
- [32] 吴强. 静注人免疫球蛋白中 IgA—临床价值与风险[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(7): 720–724.
- Wu Q. Residual IgA in intravenous immunoglobulin: clinical value and risk [J]. Chin Blood Transfus Mag, 2019, 32(7): 720–724.
- [33] Kim H, Hong HD, Suh HJ, *et al.* Structural and immunological feature of rhamnogalacturonan I-rich polysaccharide from Korean persimmon vinegar [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 89: 319–327.
- [34] 于娟, 纪海玉, 白云, 等. 红茶多酚对 H22 荷瘤小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J]. 中国食品学报, 2019, 10: 1–8.
- Yu J, Ji HY, Bai Y, *et al.* Immunoregulatory and antioxidant activities of black tea polyphenols on H22-bearing mice [J]. Chin J Food, 2019, 10: 1–8.
- [35] 万代林. 流苏石斛多糖的化学结构鉴定及体外抗氧化活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.
- Wang DL. Research on chemical structural identification and *in vitro* antioxidative activity evaluation of polysaccharides from dendrobium fimbriatum hook [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



耿晓琦, 硕士研究生, 主要研究方向为发酵工程。

E-mail: tustxiaoqi@163.com



王 敏, 教授, 主要研究方向为发酵食品健康因子分析及功能评价。

E-mail: minw@tust.edu.cn