

黑米矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及其月桂酸酰化物对小鼠肠道免疫功能的影响

金 缘, 张左勇, 刘淑芸, 王慕文, 孙汉巨*, 何述栋, 张 涛, 王 蕾, 马 钢

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 农产品生物化工教育部工程研究中心, 合肥 230009)

摘 要: **目的** 研究黑米矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(cyanidin-3-O-glucoside, C3G)及其月桂酸的酰化产物(cyanidin-3-O-glucoside lauryl ester, L-C3G)对小鼠肠道免疫功能的影响。**方法** 以小鼠为试验动物, 经过低、中及高剂量的 C3G 和 L-C3G 灌胃 28 d 后, 测定小鼠的体重、肠道消化酶活性(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶)、肠道 pH、肠道组织形态及免疫细胞数量等指标, 对 C3G 和 L-C3G 的肠道免疫作用进行评价。**结果** 与空白对照组相比, C3G 和 L-C3G 能够降低小鼠的体重和小鼠肠道 pH; 提高淀粉酶和蛋白酶活性, 降低脂肪酶活性; 提高小鼠肠腔绒毛高度, 降低隐窝深度, 提高消化能力; 提高肠道免疫细胞(T 细胞、肥大细胞、杯状细胞)的数量。此外, 与 C3G 相比, L-C3G 有更强的免疫促进作用。**结论** C3G 和 L-C3G 有较好的肠道免疫促进作用。**关键词:** 黑米; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; 月桂酸; 酰化; 肠道免疫

Effects of cyanidin-3-O-glucoside cyanidin from black rice and its lauric acid acylate on intestinal immune function in mice

JIN Yuan, ZHANG Zuo-Yong, LIU Shu-Yun, WANG Mu-Wen, SUN Han-Ju*, HE Shu-Dong, ZHANG Tao, WANG Lei, MA Gang

(School of Food and Biological Engineering, Engineering Research Center of Bio-process of Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of cyanidin-3-O-glucoside (C3G) and its acylated product with lauric acid (L-C3G) on intestinal immune function in mice. **Methods** After oral administration of low, medium and high doses of C3G and L-C3G for 28 days, the body weight, intestinal digestive enzyme activities (protease, amylase and lipase), intestinal pH, intestinal morphology and immune cell numbers of mice were measured to evaluate the intestinal immune activity of C3G and L-C3G. **Results** Compared with the blank control group, C3G and L-C3G could reduce the body weight of mice and the intestinal pH of mice, increase the activities of amylase and protease, reduce the activities of lipase, improve the digestive ability of mice (increase of villus height, and decrease of crypt depth) and the numbers of immune cells (T cells, mast cells and goblet cells). Moreover, compared with C3G, L-C3G had stronger enhancing effects on the intestinal immune activity. **Conclusion** C3G and L-C3G have better intestinal immune promotion effects.

KEY WORDS: black rice; cyanidin-3-O-glucoside; lauric acid; acylation; intestinal immunity

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771974)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31771974)

*通信作者: 孙汉巨, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为农产品的综合利用。E-mail: sunhanju@163.com

*Corresponding author: SUN Han-Ju, Ph.D, Professor, School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China. E-mail: sunhanju@163.com

0 引言

黑水稻(*Oryza sativa* L.)是我国重要的水稻品种,主要分布于贵州、云南、湖南等省市^[1]。黑米的营养价值较高,富含蛋白质、糖类、脂类、氨基酸、维生素等营养成分,还含有丰富的花青素,最高含量达2%。其中,矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(cyanidin-3-O-glucoside, C3G)占花青素总含量的80%以上^[2-3]。花青素属于多酚类黄酮物质,其基本结构为3,5,7-三羟基-2-苯基苯并吡喃阳离子^[4]。花青素通常与糖苷结合,以花色苷形式存在,因取代基连接的种类、位置以及数目的不同,已鉴定的花色苷有六百多种^[5]。花青素也是一种广泛存在于自然界中的天然色素,其颜色会随pH值的改变而发生变化,在pH=3~10范围内,依次变为深红色、红色、淡红色、紫色和蓝色^[6]。

大量研究表明,花青素有抗氧化^[7]、清除自由基^[8]、降低血脂^[9]、预防动脉粥样硬化^[10]、抗癌^[11]及抗肿瘤^[12]等作用,被认为是存在于自然界中的天然免疫调节剂^[13]。潘利华等^[14]研究发现蓝莓花青素具有免疫调节活性。然而,花青素很不稳定,易受氧气、光、热、pH及金属离子等影响,造成其氧化及破坏^[15]。研究显示,酰基化后,花青素的稳定性会大大提高,更利于保藏^[16]。

为探讨酰基化衍生对花青素免疫功能的影响,本研究选取C3G及其月桂酸酰化物(cyanidin-3-glucoside lauryl ester, L-C3G)作为研究对象,对两者的肠道免疫特性进行评价。以小鼠作为试验动物,通过灌胃不同剂量的C3G和L-C3G后,以其肠道形态变化、肠道免疫细胞等作为评价指标,考察两者对小鼠肠道免疫功能的影响,进而促进花青素在肠道免疫方面的利用,以期开发新的食品和生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑米(黑龙江金谷粮油食品有限公司); X-5 大孔树脂(一级品,天津市光复精细化工研究所); 聚酰胺树脂(30~60目,上海源叶生物科技有限公司); 4A分子筛(工业级)、月桂酸(分析纯)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); Novozym 435酶(50000 U/g, 丹麦诺维信 Novozymes 有限公司); 柠檬酸、氢氧化钠、叔戊醇(分析纯)、甲醇(色谱纯)(国药集团化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯,美国Tedia公司); 蛋白酶试剂盒、 α -淀粉酶试剂盒、脂肪酶试剂盒(南京建成有限公司)。

1.2 仪器与设备

HX-300 高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药剂厂); JM50 胶体磨(温州市瓯海梧田华慧乳化机械厂); KRT-NT-2-1 多功能膜设备(合肥科锐特环保工程有限公司);

RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); L8GJ-12 真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司); HP Plus 100D 半制备液相色谱仪(苏州利穗科技有限公司); PHS-2C 酸度计(淄博森源电气有限公司); EVOS 7000 倒置光学显微镜(美国赛默飞科技有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 C3G的制备与纯化

参考娄秋艳^[15]的方法提取黑米花青素。黑米(3 kg)经中药粉碎机粉碎至平均目数为100目后,将黑米粉与柠檬酸溶液(1.0 g/L, 20 L)混合。混合匀浆经过胶体磨磨浆后,在40℃下暗瓶中浸泡24 h;再用滤袋(120目)过滤,滤液经过多功能膜设备(截留分子量:30 kDa)去除蛋白质和多糖等杂质,得到流出液。流出液依次经过平衡后的X-5树脂柱和聚酰胺树脂柱,最后用80%乙醇溶液(V/V)洗脱,收集洗脱液。洗脱液经过冷冻干燥,得到花青素粉末。将花青素粉末按1:10(m/V)料液比溶于甲醇溶液,经0.45 μ m滤膜过滤,备用。最后,采用半制备液相色谱仪分离收集C3G。色谱流动相A为10%甲酸(V/V),流动相B为乙腈。梯度洗脱条件:0~5 min, 5%~10% B; 5~10 min, 10% B; 10~17 min, 10%~24% B; 17~27 min, 24%~90% B; 27~30 min, 90% B; 30~35 min, 90%~5% B; 35~45 min, 5% B,流速10.0 mL/min,进样量5 mL,柱温30℃。采集波长为360 nm,检测波长为520 nm。收集物冷冻干燥后,在-80℃下保存,以备后续试验。

1.3.2 L-C3G的制备

参照YANG等^[16]制备C3G与月桂酸酰化产物的方法,修改如下。按照C3G与月桂酸摩尔比55:1、Novozym 435酶的添加量为16 g/L,在56℃条件下反应28 h。反应结束后,采用滤液萃取和半制备液相色谱法分离纯化得到L-C3G。色谱流动相A为10%甲酸溶液(V/V),流动相B为甲醇:乙腈:甲酸:去离子水=25:25:10:40(V/V/V/V)。梯度洗脱条件:0~8 min, 16%~20% B; 8~11 min, 20%~38% B; 11~25 min, 38%~46% B; 25~27 min, 46%~85% B; 27~34 min, 85% B; 34~35 min, 85%~16% B; 35~40 min, 16% B,流速12.0 mL/min,进样量5 mL,柱温30℃。采集波长为360 nm,检测波长为520 nm。收集液冷冻干燥后,在-80℃下保存,以备进一步使用。

1.3.3 动物试验

(1) 试验小鼠分组与饲养

清洁级昆明小鼠购于安徽医科大学动物饲养中心,体重(20 $\pm$ 2) g。周龄6~8周,雌雄各半,70只。小鼠充分适应环境后,用染料标记,将70只小鼠随机分成7组(每组10只,雌雄对半,分笼喂养)。对照I组:灌胃0.3 mL生理盐水;试验II组:按小鼠体重50 mg/kg的剂量,分别灌胃C3G和L-C3G 0.3 mL;试验III组:按小鼠体重100 mg/kg的剂量,分别灌胃C3G和L-C3G 0.3 mL;试验IV组:按小鼠体重200 mg/kg的剂量,分别灌胃C3G和L-C3G 0.3 mL。受试物剂量根据杨曦^[17]的方法进行设置。

饲养室温度控制在 22 ℃, 相对湿度 60%。每天保持 12 h 光照和 12 h 黑暗, 自由采食、饮水。小鼠喂养 28 d 后, 精确称重后, 颈椎脱臼处死。

(2) 小鼠体重的测定

试验开始时, 称取每只小鼠的初始重。之后分别在 7、14、21 和 28 d 时, 称量每只小鼠的在进食前的体重, 并作详细记录。

(3) 肠道消化酶活性的测定(蛋白酶、 α -淀粉酶、脂肪酶)

将 5 g 肠道内容物溶于 5 mL 的去离子水, 振荡匀浆, 离心(2000 r/min, 5 min), 收集上清液。按照试剂盒说明书中的方法, 测定上清液中胰蛋白酶、 α -淀粉酶及脂肪酶活性。

(4) 肠道内容物 pH 的测定

根据赵明明^[18]的方法, 测定肠道内容物 pH。取 10 g 的肠道内容物于试管中, 加入 5 mL 的去离子水稀释, 振荡匀浆后, 用酸度计测定其 pH 值。

(5) 小鼠肠道组织形态的观察

用剪刀剪取 2~3 cm 小鼠肠道组织, 再用生理盐水洗净, 放入 10% 的福尔马林溶液中固定。最后, 用石蜡包埋, 连续切片。采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色的方式将切片染色, 用倒置显微镜观察小肠组织切片的黏膜结构。100 倍视野下观察切片的肠道病理损伤, 选取视野范围内 5 根肠腔绒毛, 运用 CaseViewer 图像数据分析系统测量肠腔绒毛长度及其隐窝深度, 再取平均值, 并计算绒毛长度/隐窝深度的比值(V/C 值)。

注: 绒毛长度是指绒毛顶端一直到肠腺绒毛连接处的长度。隐窝深度则是指肠腺绒毛连接处至肠腺基底的距离。V/C 值通常作为衡量肠道结构形态和消化吸收能力的重要指标。

(6) 小鼠小肠 T 细胞数目的切片观察

根据赵明明^[18]的方法, 进行免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)切片的制作。经过抗原修复、灭酶封闭、CD4 抗体孵育、二氨基联苯胺(diaminobenzidine,

DAB)染色、复染以及脱水封片后, 使用倒置光学显微镜, 在 400 倍视野下, 观察免疫组化切片中阳性细胞, 统计 5 个视野范围内的阳性细胞总数。

(7) 小鼠肥大细胞数目的切片观察

用甲苯胺蓝染色后使用倒置光学显微镜观察肠黏膜固有层中肥大细胞的数量, 400 倍视野下随机选取 5 个视野, 并统计每个视野内肥大细胞的数目。

(8) 小鼠杯状细胞数目以及粘液面积的切片观察

依次经过剪取肠道、组织脱水、透明与浸蜡、包埋、切片和烤片、脱蜡及复水等步骤, 制作小鼠肠道组织切片。将组织切片进行 AB-PAS 染色, 用倒置光学显微镜, 在 200 倍视野下观察。选取视野范围内 5 根完整肠腔绒毛, 进行拍照。再采用 Imagej 图像数据分析系统, 准确计量绒毛上杯状细胞总数, 测量肠绒毛粘液层面积并取平均值, 计算每根绒毛粘液面积。

1.3.4 数据分析

本试验重复 3 次, 结果为平均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。所得数据采用 Tukey 检验分析结果差异的显著性($P<0.05$)。所有统计分析均使用 20.0 版本 BM SPSS packageprogram。

2 结果与分析

2.1 C3G 和 L-C3G 的制备

以 C3G 标准品为对照(色谱图见图 1), 采用高效液相色谱-质谱联用法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)测定黑米花青素提取物(black rice anthocyanin extract, BRAE)的主要成分。如图 2 所示, BRAE 的主峰出现在 7.17 min 左右, 与 C3G 标准品的保留时间(7.11 min)相对应。C3G 的分子量为 449.09 Da, 其结构如图 2 所示。根据其全质谱图, L-C3G 的 $[M]^+$ 出现在 m/z 631.26 处, 26 min 左右的新峰对应于连接到月桂酸部分(L-C3G)的 C3G 分子, 其结构如图 3 所示。用半制备液相色谱仪(semi preparative-high performance liquid chromatography, SM-HPLC)进一步分离 C3G 和 L-C3G。然后, 将收集到的组分冷冻干燥, 然后在 -80 ℃ 条件下保存。

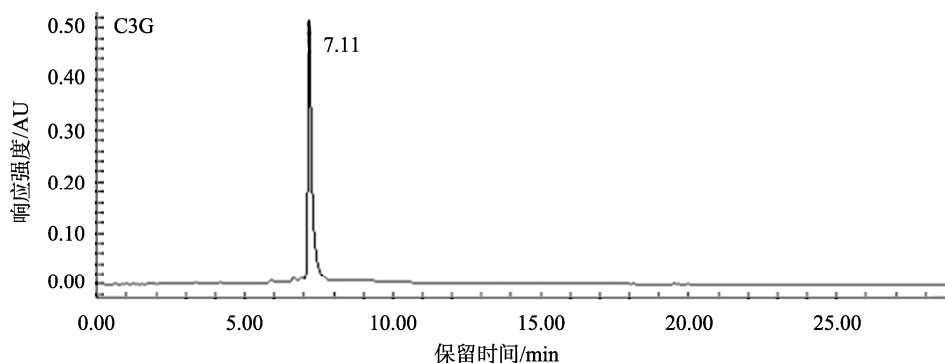


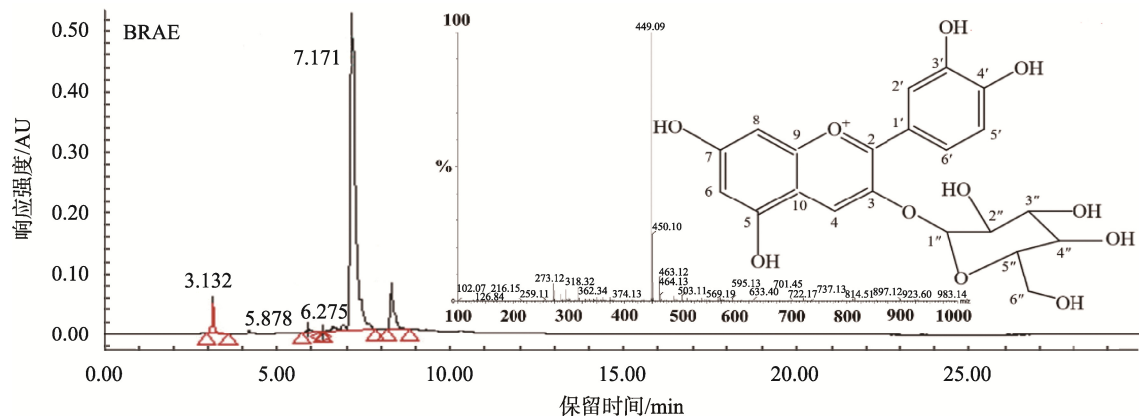
图 1 C3G 标准的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatogram of C3G standard

2.2 花青素对小鼠体重的影响

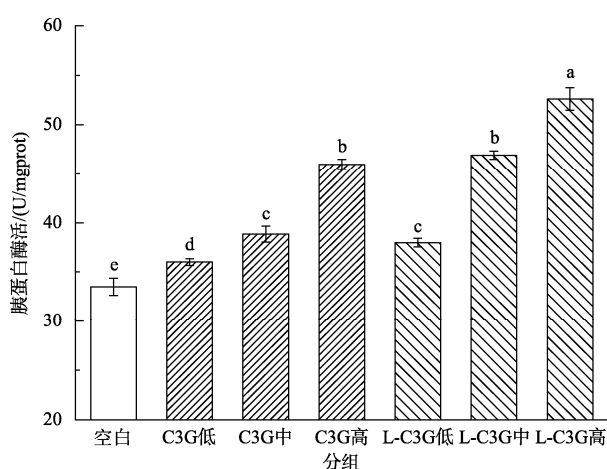
经过 28 d 灌胃喂养后, C3G 和 L-C3G 对小鼠的体重影响如表 1 所示。随着时间的增加, 小鼠的体重逐渐增加, 随着时间先是快速增长后又转为缓慢增长。并且, 随着浓度的升高, C3G 组小鼠的体重上升的越来越缓慢; 而 L-C3G 组小鼠的体重先快速上升后又缓慢上升。在同一剂量下, C3G 相较于 L-C3G 对小鼠体重降低的作用更为明显($P<0.05$)。通过

28 d 的喂养试验, C3G 的 3 个剂量和 L-C3G 的高剂量组小鼠的体重都有显著降低。这一结果与红树莓花青素对高脂肪小鼠具有减肥效果相一致^[19]。而 L-C3G 对小鼠体重的差异或与其脂溶性的改变有关系。C3G 与月桂酸经过酶法酰化后, L-C3G 的脂溶性得到了提高。L-C3G 经过灌胃达到小鼠体内, 可能对小鼠进食起促进作用, 随着剂量的提高, 相对于空白对照组, 小鼠体重增长地越缓慢。



2.3 花青素对小鼠肠道消化酶的影响

消化酶活力的提高,意味着分解饲料的能力提高。淀粉酶和蛋白酶活力的提高,表明小鼠将饲料中淀粉和蛋白水解成糖类、氨基酸的能力提高,分解中产生的能量还可以被肠道有益菌利用促进其自身的生长繁殖,从而起到提高肠道健康的作用^[20]。C3G 和 L-C3G 对胰蛋白酶活性的影响如图 4 所示。很显然,随着 C3G 和 L-C3G 剂量的增加,胰蛋白酶活性逐渐提高($P<0.05$)。相对于空白对照组, C3G 的低、中及高剂量组的胰蛋白酶活性分别提高了 1.075、1.16 及 1.372 倍; L-C3G 的低、中及高剂量组小鼠的胰蛋白酶活性分别提高了 1.134、1.4 及 1.57 倍。低、中、高剂量下, L-C3G 比 C3G 对胰蛋白酶活性的提高作用更为显著。



注: 不同小写字母表示差异显著, 仅对不同剂量组间的比较, 下同。

图 4 花青素对胰蛋白酶活性的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of anthocyanins on trypsin activities ($n=3$)

C3G 和 L-C3G 对 α -淀粉酶活性的影响如图 5 所示。随着花青素剂量的增加, α -淀粉酶活性逐渐提高($P<0.05$)。相对于空白对照组, C3G 的低、中及高剂量组的 α -淀粉酶活性分别提高了 1.068、1.121 及 1.172 倍; L-C3G 的低、中及高剂量组的 α -淀粉酶活性分别提高了 1.125、1.227 及 1.294 倍。花青素具有酶活力调节特性。花青素与蛋白酶和 α -淀粉酶结合后, 可能会通过氢键以及疏水相互作用, 从而使消化酶的空间结构发生变化, 最终导致消化酶的活性发生改变^[21]。李雅梅等^[22]研究了葡萄籽原花青素对大鼠肠道消化酶活性的影响。试验结果表明, 该原花青素可显著抑制大鼠肥胖, 且提高了蛋白酶和 α -淀粉酶等肠道消化酶的活性, 消化酶酶活的提高可以促进肠道对营养物质的吸收和利用。并且, 在同剂量下, L-C3G 比 C3G 对淀粉酶活性的提高作用更为显著。其原因可能是 C3G 中的羟基被月桂酸所取代, 碳链变长导致 L-C3G 脂溶性提高。另外, 脂溶性的 L-C3G 可能更容易与蛋白酶和 α -淀粉酶相互作用, 从而导致其活性的提高。

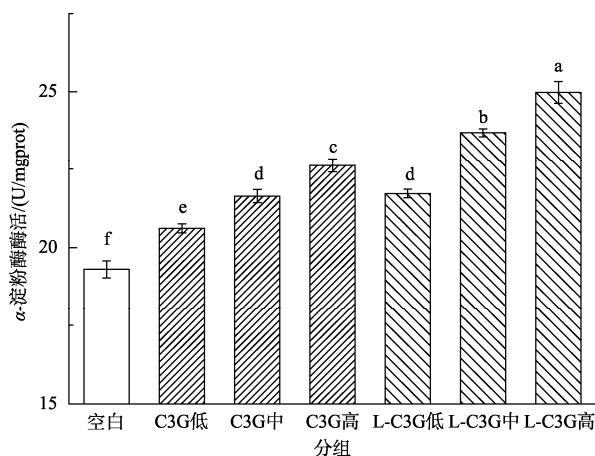


图 5 花青素对 α -淀粉酶活性的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of anthocyanins on α -amylase activities ($n=3$)

C3G 和 L-C3G 对脂肪酶活性的影响如图 6 所示。随着剂量的增加, 脂肪酶活性逐渐提高($P<0.05$)。相对于空白对照组, C3G 的低、中及高剂量组的脂肪酶活性分别降低了 1.639、1.998 及 2.334 倍; L-C3G 的低、中及高剂量的脂肪酶活性分别降低了 1.203、1.138 及 1.538 倍。并且相同剂量下, C3G 比 L-C3G 对脂肪酶活性的降低作用更为显著。该结果与表 1 小鼠体重降低可能存在相互关系, 因为脂肪酶活性降低, 从而使小鼠对食物中脂肪的摄取有所降低, 因而小鼠的体重得到降低。花青素可能是肠道脂肪酶的抑制剂, 降低脂肪酶的活性, 从而减少脂肪的消化^[23]。

由上述可知, C3G 和 L-C3G 对胰蛋白酶和 α -淀粉酶活性起到显著提高的影响, 且剂量越高, 提高作用越明显。低、中及高剂量下, L-C3G 相较于 C3G 的提高作用更为显著。C3G 和 L-C3G 对脂肪酶活性起到显著降低的影响, 且剂量越高降低作用越显著。

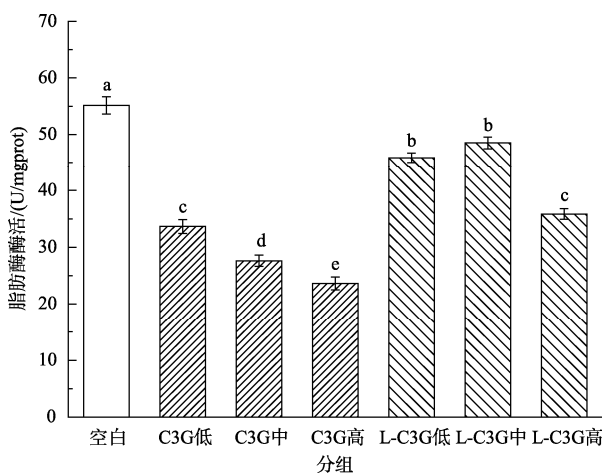


图 6 花青素对脂肪酶活性的影响($n=3$)

Fig.6 Effects of anthocyanins on lipase activities ($n=3$)

2.4 花青素对肠道内容物 pH 的影响

C3G 和 L-C3G 对肠道内容物 pH 影响如图 7 所示。随着剂量的提高, 肠道 pH 值逐渐降低($P<0.05$)。与低、中及高剂量组中的 C3G 相比, L-C3G 的低、中及高剂量组中肠道 pH 的降低更为显著。相对于空白对照组, C3G 的低、中及高剂量组中肠道 pH 值分别降低了 1.026、1.043 及 1.061 倍; 低、中及高剂量 L-C3G 中肠道 pH 值分别降低了 1.038、1.076 及 1.127 倍。结果表明, C3G 和 L-C3G 对肠道 pH 的降低都起到显著影响, 随着剂量的提高, 该作用更为显著。在低、中及高剂量下, L-C3G 相较于 C3G 对肠道 pH 的降低作用更为显著。花青素可作为碳源被肠道微生物利用, 促进微生物的生长繁殖, 同时也增加了短链脂肪酸的生成, 降低了肠道的 pH 值^[24]。肠道 pH 值的降低, 有利于有益菌的生长, 同时对有害菌的生长繁殖也起到抑制作用。而 L-C3G 被微生物吸收利用, 首先分解为 C3G 和月桂酸。月桂酸作为碳源, 可进一步被微生物所利用, 生成小分子酸从而降低肠道 pH 值。因此, L-C3G 相较于 C3G 对肠道 pH 的降低作用更为显著。

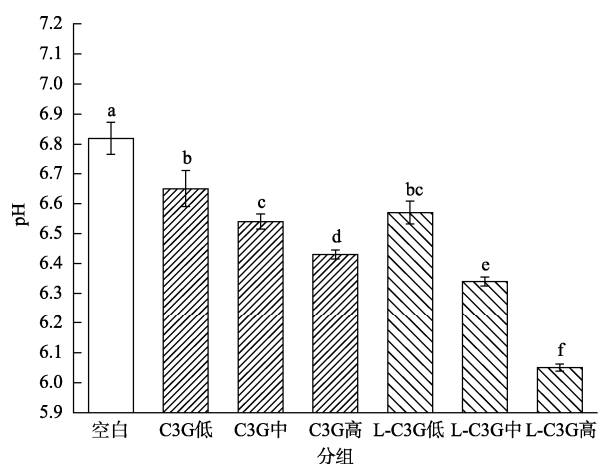


图 7 花青素对小鼠肠道 pH 的影响($n=3$)

Fig.7 Effects of anthocyanins on pH in mice intestine ($n=3$)

2.5 花青素对小鼠肠道组织形态的影响

与对照组相比, C3G 和 L-C3G 对肠腔绒毛高度的影响如图 8 所示。随着剂量的提高, 肠腔绒毛高度也逐渐提高。在低、中、高剂量下, L-C3G 相较于 C3G 对肠腔绒毛高度的提高作用更为显著($P<0.05$)。相对于对照组, 低、中及高剂量 C3G 组的肠腔绒毛高度分别提高了 1.069、1.114 及 1.18 倍; 低、中及高剂量 L-C3G 组的肠腔绒毛高度分别提高了 1.272、1.332 及 1.383 倍。

C3G 和 L-C3G 对隐窝深度变化的影响如图 9 所示。随着剂量的提高, 隐窝深度逐渐下降。低、中、高剂量

下, L-C3G 比 C3G 对隐窝深度的降低作用更为显著($P<0.05$)。如中剂量下, 相较于对照组, L-C3G 隐窝深度降低了 1.49 倍; C3G 隐窝深度降低了 1.20 倍。绒毛高度和隐窝深度作为肠道吸收营养物质能力的重要指标。绒毛高度越高, 营养物质的吸收面积就越大; 隐窝深度决定肠绒毛生成上皮细胞的速度, 隐窝越浅, 表明上皮细胞成熟率越高, 分泌功能也越强。而 V/C 值常作为衡量肠道结构形态及消化吸收能力的重要指标。通常情况下, V/C 值越高代表其消化吸收能力越好^[25]。如图 10 所示, 随着花青素剂量的提高, V/C 值也有显著提高。并且, 低、中、高剂量下, L-C3G 比 C3G 提升作用更为显著($P<0.05$)。结果表明, C3G 和 L-C3G 对小鼠肠道消化能力的提高有显著作用, 并且随着剂量的提高影响越显著。

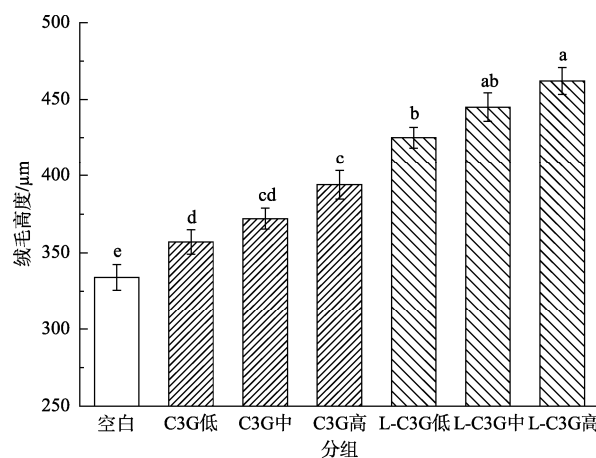


图 8 花青素对小鼠肠腔绒毛高度的影响($n=3$)

Fig.8 Effects of anthocyanins on villus height of intestinal cavity in mice ($n=3$)

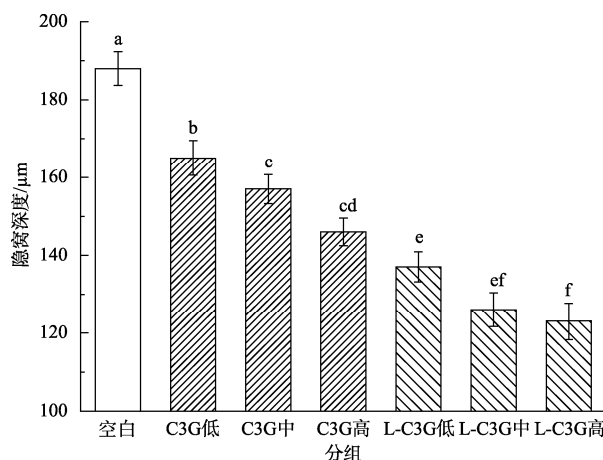
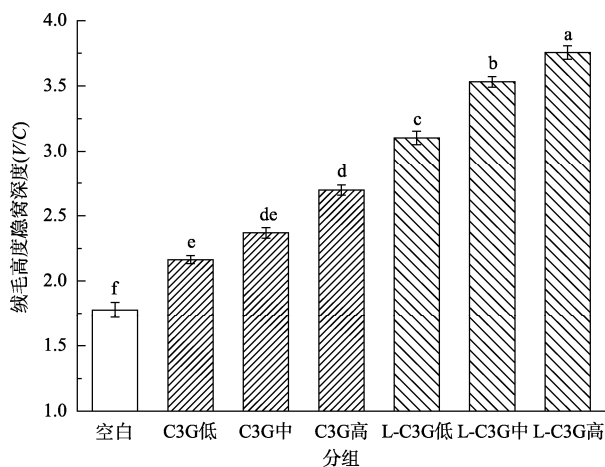


图 9 花青素对小鼠肠腔隐窝深度的影响($n=3$)

Fig.9 Effects of anthocyanins on crypt depth of intestinal cavity in mice ($n=3$)

图 10 花青素对小鼠肠腔绒毛高度/隐窝深度比值的影响($n=3$)Fig.10 Effects of anthocyanins on villus height/crypt depth of intestinal cavity in mice ($n=3$)

2.6 花青素对小鼠免疫细胞活性的影响

2.6.1 花青素对小鼠小肠 T 细胞增殖的影响

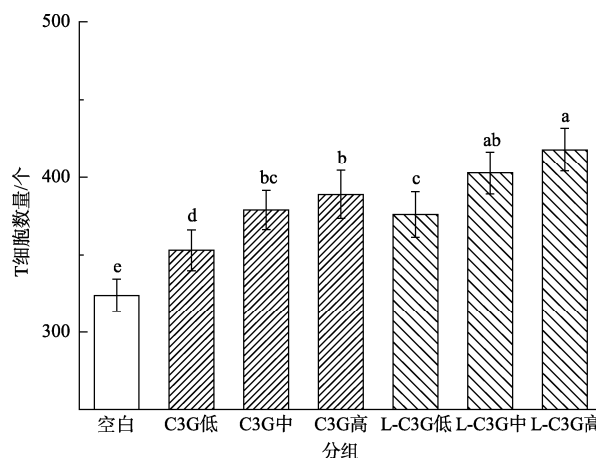
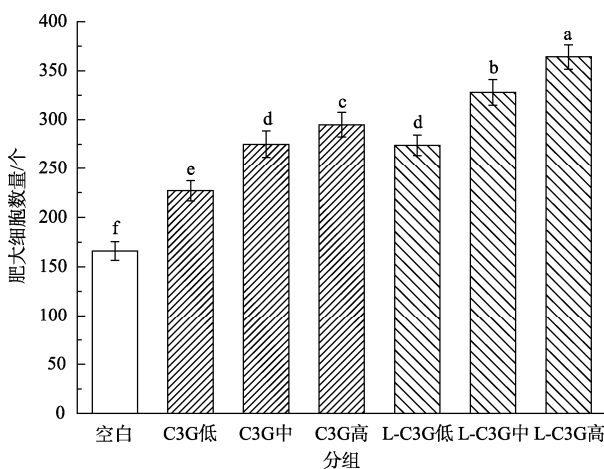
C3G 和 L-C3G 对小鼠肠道 T 细胞增殖的影响如图 11 所示。显而易见,随着剂量的提高,小鼠肠道 T 细胞数量逐渐提高。低、中及高剂量下,L-C3G 比 C3G 对小鼠肠道 T 细胞数量的提高作用更为显著($P<0.05$)。相对于空白对照组,低、中及高剂量 C3G 小鼠小肠 T 细胞数量分别提高了 1.090、1.170 及 1.201 倍;低、中及高剂量 L-C3G 小鼠的小肠 T 细胞数量分别提高了 1.160、1.244 及 1.290 倍。结果表明,C3G 和 L-C3G 都对 T 细胞增殖起到促进作用,并且随着剂量的提高影响越来越显著。并且,低、中、高剂量下,L-C3G 对 T 细胞增殖的促进作用比 C3G 更显著($P<0.05$)。

T 细胞作为重要的免疫细胞,可以直接介导细胞免疫,其功能主要为激活巨噬细胞,介导迟发超敏反应和促进合成抗体^[26]。小鼠肠道 T 细胞数量的增加,表明其抗体合成增多,从而肠道免疫能力得到提高。而 L-C3G 比 C3G 作用更明显的原因可能是 L-C3G 脂溶性的提高。而细胞膜为磷脂双分子层,脂溶性高的物质更容易通过细胞膜,从而使 L-C3G 更容易通过小鼠肠道细胞膜,从而促进小鼠肠道 T 细胞的表达。刘英姿^[27]研究表明,原花青素可以通过促进 T 淋巴细胞的成熟,增加 T 淋巴细胞的数量从而发挥增强细胞免疫的作用,与本研究结果类似。

2.6.2 花青素对小鼠肥大细胞增殖的影响

C3G 和 L-C3G 对小鼠肥大细胞数量的影响如图 12 所示。随着剂量的提高,小鼠肥大细胞数量逐渐提高。低、中、高剂量下,L-C3G 比 C3G 对小鼠肥大细胞数量的提高作用更为显著($P<0.05$)。在低、中及高剂量下,L-C3G 相较于 C3G 小鼠肥大细胞的数量分别提高了 1.207、1.193 及 1.234 倍。结果表明,C3G 和 L-C3G 对小鼠肥大细胞增殖起

到促进作用,并且随着剂量的提高影响越来越显著。低、中、高剂量下,L-C3G 对肥大细胞增殖的促进作用比 C3G 更为显著($P<0.05$)。当病毒侵入人体后,肥大细胞作为重要的免疫细胞会参与免疫应答将病毒清除。肥大细胞数量的增加,表明其肠道免疫能力得到提高^[28]。而 L-C3G 比 C3G 作用更明显的原因可能是因为 L-C3G 脂溶性的提高,从而使 L-C3G 更容易通过小鼠肠道细胞膜,从而促进小鼠肠道 T 细胞和肥大细胞的表达。

图 11 花青素对小鼠肠道 T 细胞数量的影响($n=3$)Fig.11 Effects of anthocyanins on the number of intestinal T cells in mice ($n=3$)图 12 花青素对小鼠肥大细胞数量的影响($n=3$)Fig.12 Effects of anthocyanins on the number of mast cells in mice ($n=3$)

2.6.3 花青素对小鼠杯状细胞绒毛粘液面积的影响

小鼠杯状细胞绒毛粘液面积随着不同剂量的 C3G 和 L-C3G 的变化情况如图 13 所示。随着 C3G 和 L-C3G 剂量的提高,小鼠杯状细胞绒毛粘液面积逐渐提高。在同一剂量下,L-C3G 比 C3G 对小鼠杯状细胞绒毛粘液面积的提高作用更为显著($P<0.05$)。中剂量下,相较于空白对照

组, L-C3G 小鼠杯状细胞绒毛粘液面积提高了 1.17 倍; C3G 小鼠杯状细胞绒毛粘液面积提高了 1.08 倍。花青素提高小鼠杯状细胞绒毛粘液面积, 其原因可能是花青素经过小鼠肠道消化进而被吸收利用刺激了肠道杯状细胞的生长, 使其绒毛粘液面积得到提高。王莹等^[29]研究了葡萄籽原花青素对小鼠杯状细胞数目的影响。结果表明, 相较于空白对照组, 灌服了该原花青素的小鼠杯状细胞数目显著提高。小鼠肠绒毛粘液层面积的增加, 可使小鼠黏附外来有害物质的能力得到提高, 从而表明小鼠的肠道免疫能力得到提高。

综上所述, C3G 和 L-C3G 都对小鼠肠道免疫能力有显著性提高, 且随着剂量的提高影响更为显著($P<0.05$)。低、中、高剂量下, L-C3G 相较于 C3G 对小鼠肠道免疫能力的提高作用更为显著(图 13)。

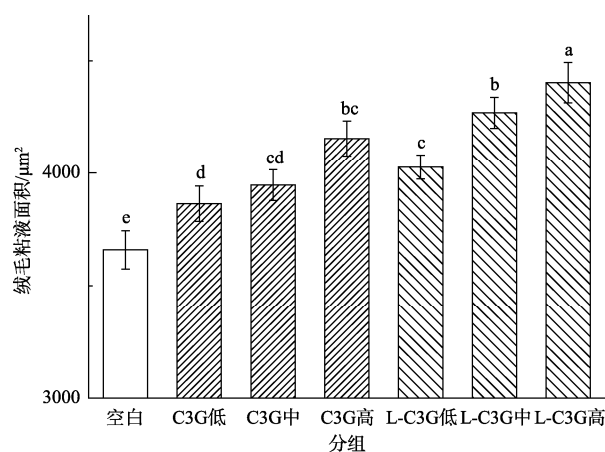


图 13 花青素对小鼠杯状细胞绒毛粘液面积的影响($n=3$)

Fig.13 Effects of anthocyanins on villus mucus area of mouse goblet cells ($n=3$)

3 结论与讨论

本研究以昆明小鼠为研究对象, 经过 28 d 低、中及高剂量的 C3G 和 L-C3G 灌胃后, C3G 和 L-C3G 的高剂量组能显著降低小鼠的体重, 提高其肠道蛋白酶和淀粉酶活性, 降低脂肪酶的活性, 降低小鼠对脂肪含量的摄取和吸收以及显著降低小鼠肠道 pH。并且, L-C3G 对肠道蛋白酶和淀粉酶活性提高作用是 C3G 的 1.05~1.44 倍, 对脂肪酶的活性提高作用是 C3G 的 1.30~1.52 倍, 高剂量下的 pH 相较于 C3G 降低作用超过 1.06 倍。除此之外, C3G 和 L-C3G 还能够显著提高小鼠的消化吸收能力以及肠道免疫细胞(T 细胞、肥大细胞、杯状细胞)活性。并且, L-C3G 对肠道免疫细胞的活性提升是 C3G 的 1.06 倍以上($P<0.05$)。因此, 黑米矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及其月桂酸酰化物具有较好的肠道免疫调节功能。

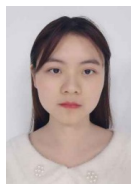
参考文献

- [1] CASTAÑEDA OVANDO A, PACHECOHERNÁNDEZ L, PÁEZHERNÁNDEZ E, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. Food Chem, 2009, 113(4): 859–871.
- [2] 钟岩, 李泽鸿, 邵明富. 黑米色素的提取方法及稳定性研究[J]. 北方园艺, 2008, 10(31): 71–73.
ZHONG Y, LI ZH, SHAO MF. Study on extraction method and stability of black rice pigment [J]. Northern Hortic, 2008, 10(31): 71–73.
- [3] 张铭顺. 七彩营养米的开发与利用[J]. 福建农业科技, 2005, 3(16): 23.
ZHANG MS. Development and utilization of colorful nutritious rice [J]. Fujian Agric Sci Technol, 2005, 3(16): 23.
- [4] SU X, XU J, RHODES D, *et al.* Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato [J]. Food Chem, 2016, 202(128): 184–188.
- [5] 谭佳琪, 王瑜, 孙旗, 等. 桑葚花色苷超高压提取工艺优化及其组分分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(21): 158–164.
TAN JQ, WANG Y, SUN Q, *et al.* Optimization of ultra high pressure extraction process and component analysis of mulberry anthocyanins [J]. Food Ind Technol, 2018, 39(21): 158–164.
- [6] CABRITA L, FOSSEN T, ANDERSEN OM. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions [J]. Food Chem, 2000, 68(1): 101–107.
- [7] HU Y, MA Y, WU S, *et al.* Protective effect of cyanidin-3-O-glucoside against ultraviolet B radiation-induced cell damage in human HaCaT keratinocytes [J]. Front Pharmacol, 2016, 7(1): 1–8.
- [8] 李春阳, 许时婴, 王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 102–106.
LI CY, XU SY, WANG Z. DPPH determination of free radical scavenging ability of grape seed proanthocyanidins [J]. J Food Biotechnol, 2006, 25(2): 102–106.
- [9] SANCHEZ S, PASTORE M. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes [J]. Food Res Int, 2012, 46(4): 378–386.
- [10] 韩雪, 周茜, 牛佳卉, 等. 蔷薇红景天低聚原花青素对动脉粥样硬化大鼠肝脏的保护作用[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 190–195.
HAN X, ZHOU Q, NIU JH, *et al.* Protective effect of rhodiola rosea oligo proanthocyanidins on the liver of atherosclerotic rats [J]. Food Sci, 2019, 40(1): 190–195.
- [11] 孙园园. 花青素与癌症预防[J]. 轻工科技, 2012, 28(1): 17–18.
SUN YY. Anthocyanins and cancer prevention [J]. Light Ind Technol, 2012, 28(1): 17–18.
- [12] 崔建, 李晓岩. 花青素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 310–315.
CUI J, LI XY. Research progress on anti-tumor mechanism of anthocyanins [J]. Food Sci, 2014, 35(13): 310–315.
- [13] MIGLIORINI A, PIROSKI S, DANIEL G, *et al.* Red chicory (*Cichorium intybus*) extract rich in anthocyanins: Chemical stability, antioxidant activity, and antiproliferative activity *in vitro* [J]. J Food Sci, 2019, 84(25): 990–1001.
- [14] 潘利华, 王建飞, 叶兴乾, 等. 蓝莓花青素的提取工艺及其免疫调节活性[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 81–86.
PAN LH, WANG JF, YE XQ, *et al.* Extraction technology and immunomodulatory activity of blueberry anthocyanins [J]. Food Sci, 2014, 35(2): 81–86.

- [15] 娄秋艳. 黑米花青素的组成、对益生菌和致病菌的活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017.
- LOU QY. Study on the composition and activity of black rice anthocyanins against probiotics and pathogenic bacteria [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.
- [16] YANG X, SUN H, TU L, *et al.* Kinetics of enzymatic synthesis of cyanidin-3-glucoside lauryl ester and its physicochemical property and proliferative effect on intestinal probiotics [J]. *Biology*, 2020, 9: 205.
- [17] 杨曦. 黑米花色苷的酶法酰基化修饰及产物稳定性、安全性和活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2020.
- YANG X. Study on the enzymatic acylation of anthocyanin isolated from black rice and the stability, safety and activity of the acylated derivative [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020.
- [18] 赵明明. 黑灵芝多糖对小鼠肠道黏膜免疫及黏膜损伤[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- ZHAO MM. Effects of ganoderma lucidum polysaccharides on intestinal mucosal immunity and mucosal injury in mice [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [19] TU L, SUN H, TANG M, *et al.* Red raspberry extract (*Rubus idaeus* L. shrub) intake ameliorates hyperlipidemia in HFD-induced mice through PPAR signaling pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 133(133): 110796–110805.
- [20] 伍莉, 陈鹏飞, 罗绍禄, 等. 不同添加剂对斑点叉尾鲷肠道蛋白酶、淀粉酶活力的影响[J]. *饲料研究*, 2002, 1(1): 4–7.
- WU L, CHEN PF, LUO SL, *et al.* Effects of different additives on activities of protease and amylase in intestine of channel catfish [J]. *Feed Res*, 2002, 1(1): 4–7.
- [21] 刘睿, 潘思轶, 谢笔钧, 等. 高粱原花青素对 α -淀粉酶和蛋白酶活力影响的DSC研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 7(19): 64–66.
- LIU R, PAN SY, XIE BJ, *et al.* DSC study on the effect of sorghum proanthocyanidins on the activities of α -amylase and protease [J]. *Food Ferment Ind*, 2006, 7(19): 64–66.
- [22] 李雅梅, 方烁, 肖俊松, 等. 原花青素对营养肥胖模型大鼠肠道消化酶活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 364–367.
- LI YM, FANG S, XIAO JS, *et al.* Effects of proanthocyanidins on digestive enzyme activities in intestinal tract of nutritional obesity model rats [J]. *Food Ind Technol*, 2016, 37(10): 364–367.
- [23] JAKOBEK, LIDIJA. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins [J]. *Food Chem*, 2015, 175(13): 556–567.
- [24] MAUKONEN J, SAARELA M. Human gut microbiota: does diet matter [J]. *Proc Nutr Soc*, 2015, 74(1): 23–36.
- [25] 杨海英, 杨在宾, 杨维仁, 等. 益生素和低聚木糖对断奶仔猪生产性能和肠道形态学影响研究[J]. *中国粮油学报*, 2008, 1(127): 123–127.
- YANG HY, YANG ZB, YANG WR, *et al.* Effects of probiotics and xylooligosaccharides on growth performance and intestinal morphology of weaned piglets [J]. *Chin J Cere Oil*, 2008, 1(127): 123–127.
- [26] 段玉清, 张海晖. 莲房原花青素对免疫功能的影响[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(2): 1–5.
- DUAN YQ, ZHANG HH. Effects of proanthocyanidins from lotus seedpod on immune function [J]. *Food Res Dev*, 2007, 28(2): 1–5.
- [27] 刘英姿. 碎米花杜鹃提取物原花青素 A-1 免疫活性研究[D]. 长春: 长春吉林大学, 2010.
- LIU YZ. Immune activity of proanthocyanidin A-1 from rhododendron fragrans [D]. Changchun: Changchun Jilin University, 2010.
- [28] 宫铭. 肥大细胞在病毒感染中的作用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2017, 45(1): 65–68.
- GONG M. The role of mast cells in viral infection [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2017, 45(1): 65–68.
- [29] 王莹, 张婷, 黄璐璐. 葡萄籽原花青素对肥胖大鼠肠粘膜的影响[J]. *核农学报*, 2019, 33(8): 125–130.
- WANG Y, ZHANG T, HUANG LL. Effect of grape seed proanthocyanidins on intestinal mucosa of obese rats [J]. *J Nucl Agric*, 2019, 33(8): 125–130.

(责任编辑: 于梦娇 王欣)

作者简介



金 缘, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学与工程。
E-mail: 18255333092@163.com



孙汉巨, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为农产品的综合利用。
E-mail: sunhanju@163.com