

# 响应面法优化沙棘籽粕 5-羟色胺部位的提取工艺及其抗炎活性研究

王继飞<sup>1,2,3</sup>, 铁芳芳<sup>1,2</sup>, 胡娜<sup>1,2</sup>, 王洪伦<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室;

<sup>2</sup>青海省藏药研究重点实验室, 西宁 810008; <sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**采用响应面法对乙酸水提取沙棘籽粕中 5-羟色胺的工艺进行优化, 获得了最佳提取工艺为: 乙酸浓度 2.6%, 液料比 50 mL/g, 温度 100 °C, 时间 60 min, 提取 1 次。在此条件下, 5-羟色胺提取得率为  $2.42 \pm 0.04$  mg/g。利用大孔吸附树脂对 5-羟色胺进行富集, 获得了沙棘籽粕 5-羟色胺部位。通过建立脂多糖诱导的 RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞炎症模型考察沙棘籽粕 5-羟色胺部位的抗炎活性, 并对其作用机制进行探讨。结果显示, 5-羟色胺部位能够抑制细胞分泌 NO 和炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ , 同时减少 COX-2 蛋白的表达并抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的磷酸化, 对脂多糖所致细胞的炎症反应具有显著的抑制作用。

**关键词:**沙棘籽粕; 5-羟色胺; 响应面; 提取工艺; RAW 264.7 细胞; 抗炎活性

中图分类号: TQ461

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0066-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.011

## Study on optimization of extraction process of 5-hydroxytryptamine from *Hippophae rhamnoides* Linn. seed meal by response surface methodology and its anti-inflammatory activity

WANG Ji-fei<sup>1,2,3</sup>, TIE Fang-fang<sup>1,2</sup>, HU Na<sup>1,2</sup>, WANG Hong-lun<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Tibetan Medicine Research of Qinghai Province, Xining 810008, China;

<sup>3</sup>University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction process of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from *Hippophae rhamnoides* Linn. seed meal with acetic acid. The optimal extraction conditions were as follows: acetic acid concentration 2.6%, liquid-solid ratio 50 mL/g, extraction temperature 100 °C, extraction time 60 min and 1 time. Under the conditions, the extraction yield of 5-HT was  $2.42 \pm 0.04$  mg/g. The 5-HT was enriched by macroporous adsorption resin. Meanwhile, lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory model on RAW 264.7 mouse monocytes-macrophages was established to investigate the anti-inflammatory activity of the 5-HT fraction. The mechanism was also discussed. The results showed that 5-HT fraction inhibited the secretion of NO and inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , decreased the expression of COX-2 protein and inhibited the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  protein, which significantly inhibited the inflammatory response induced by LPS.

**Key words:** *Hippophae rhamnoides* Linn. seed meal; 5-hydroxytryptamine; response surface methodology; extraction process; RAW 264.7 cells; anti-inflammatory activity

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* Linn.), 属胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae* Linn.) 的多年

生落叶灌木或小乔木, 为药食两用植物, 同时也是藏医、蒙医的传统药材, 有着健脾消食, 止咳祛痰, 活血散瘀的作用, 可治疗脾虚食少, 食积腹痛, 咳嗽痰多, 胸痹心痛, 瘀血经闭, 跌扑瘀肿等症<sup>[1]</sup>。传统藏医典籍《四部医典》记载, 沙棘具有健脾养胃、破淤止

收稿日期: 2022-01-24 接受日期: 2022-03-10

基金项目: 青海省科技厅项目 (2021-ZJ-T05)

\* 通信作者 Tel: 86-013997384106; E-mail: hlwang@nwipb.cas.cn

血、祛痰、利肺、化湿、壮阴、升阳的功效<sup>[2]</sup>。《藏药志》中将沙棘分为柳叶沙棘、中国沙棘、江孜沙棘、助果沙棘和西藏沙棘,在青海、甘肃、西藏、内蒙古、山西、陕西、四川、河北等省份有广泛种植,总面积约 215 万公顷<sup>[3]</sup>。

沙棘果实目前主要用于沙棘果汁、果粉和籽油的生产,在沙棘籽油生产过程中产生了大量的沙棘籽粕,目前被用作饲料或直接丢弃,造成了资源的严重浪费<sup>[4]</sup>。据文献报道,沙棘籽粕中富含多种生物活性成分,包括黄酮、原花青素、萜类、维生素、有机酸、生物碱等活性成分<sup>[5]</sup>。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种吲哚类生物碱,最早从血清中发现,又名血清素,在沙棘中也有 5-羟色胺的报道, Petrova 等<sup>[6]</sup>从沙棘茎中分离鉴定出 5-羟色胺; Xu 和 Hu 等<sup>[7,8]</sup>从沙棘籽粕中分离得到 5-羟色胺、5,11-二羟色胺和 Shepherdine,研究了 5,11-二羟色胺的抗心肌缺血和保护心肌细胞活性; Lu 等<sup>[9]</sup>优化了从沙棘皮渣中提取 5-羟色胺的工艺参数; Li<sup>[10]</sup>、Wang<sup>[11]</sup>分别研究了大孔树脂吸附 5-羟色胺的分析技术和纯化工艺; Ouyang<sup>[5]</sup>从沙棘籽粕中分离制备出 N-乙酰-5-羟色胺。

炎症反应是一种机体应对感染或组织损伤的保护性免疫反应,是许多疾病的基础病。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌外层膜的重要成分,亦被称为内毒素。巨噬细胞易受 LPS 诱导激活,发挥免疫功能,释放大量炎症介质,是常用的炎症模型之一。现代药理学研究表明,吲哚类生物碱具有较强的抗炎活性<sup>[12,13]</sup>。目前未见对沙棘籽粕 5-羟色胺部位抗炎作用研究的报道,基于以上研究,本文对沙棘籽粕 5-羟色胺部位的提取工艺进行响应面优化,再利用大孔吸附树脂富集 5-羟色胺部位,并在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型上对其抗炎活性进行评价并对抗炎作用机制进行初步探讨,以期对沙棘籽粕资源的利用提供方法和途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

沙棘籽粕(青海康普生物科技股份有限公司); 5-羟色胺盐酸盐标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度大于等于 98%,批号: F05D11E128683); RAW 264.7 小鼠单核巨噬细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库); 胎牛血清(以色列 BI 公司,批号: 2144319); DMEM 培养基(美国 Corning 公司,批号: 10013055); 脂多糖(LPS)、噻唑蓝(MTT)、

磷酸盐(PBS)缓冲液、胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素-链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号: 818E035、715F0525、20210630、20210601、20210531); Griess 法 NO 检测试剂盒、IL-6、TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号: 022421210604、112121211129、120621211210、120220210512); COX-2、 $p$ -I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 等抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); 兔二抗(武汉爱博泰克生物技术有限公司); 乙醇、甲酸、乙酸为分析纯,甲醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司)。

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司); UPH-II-100L 超纯水制造系统(成都优普科技有限公司); WZJ-6B 型药物低温超微粉碎机(济南天方机械有限公司); Memmert ICP 500 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Memmert 公司); BioTek Synergy Epoch 2 型酶标仪(美国 BioTek 公司); Leica DMi 1 型倒置显微镜(德国 Leica 公司); Eppendorf 5430 R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); PL303 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 沙棘籽粕 5-羟色胺含量的测定

HPLC 法被用来测定 5-羟色胺含量<sup>[11]</sup>,以 5-羟色胺盐酸盐为标准品,配制成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL,在 Agilent 1260 型高效液相色谱仪上进样测试。色谱条件: 色谱柱 Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 柱温 30  $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10  $\mu$ L, 检测波长 280 nm, 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.4% 甲酸水。梯度洗脱程序为: 0 ~ 15 min, 5%  $\rightarrow$  20% A; 15 ~ 40 min, 20%  $\rightarrow$  95% A; 40 ~ 45 min, 95% A。以 5-羟色胺浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算提取液或各组分的 5-羟色胺含量。

#### 1.2.2 5-羟色胺的提取工艺优化

沙棘籽粕原料使用 WZJ-6B 型药物低温超微粉碎机粉碎 15 min, 过 40 目筛。称取沙棘籽粕粉末 1.0 g 置于 50 mL 离心管中, 平行 3 组, 按照设定的条件, 加入提取溶剂充分混匀, 在恒温水浴锅中加热提取, 随后使用离心机在转速 5 000 r/min 条件下离心 20 min, 上清液定容至 50 mL, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜, HPLC 法测定 5-羟色胺含量, 按下式计算提取率<sup>[14]</sup>。

$$Y = \frac{c \times V}{m}$$

式中:  $Y$ : 提取得率 (mg/g);  $c$ : 上清液中 5-羟色胺浓度 (mg/mL);  $V$ : 上清液体积 (mL);  $m$ : 沙棘籽粕质量 (g)。

设置 5 组单因素实验: 乙酸浓度 (1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%), 液料比 (10、20、30、40、50 mL/g), 温度 (20、40、60、80、100 °C), 提取时间 (30、60、90、120、150 min), 提取次数 (1、2、3、4、5 次)。按照上述提取方法进行单因素实验, 以确定各因素的

表 1 响应面实验设计的因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface design

水平 Level	因素 Factor		
	A: 乙酸浓度 Acetic acid concentration (%)	B: 液料比 Liquid-solid ratio (mL/g)	C: 温度 Temperature (°C)
-1	2.0	30	80
0	2.5	40	90
1	3.0	50	100

### 1.2.3 沙棘籽粕 5-羟色胺部位的富集

D101 型大孔吸附树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h, 用蒸馏水冲洗至无醇味。提取物加水溶解, 过滤后上大孔树脂, 上样比例 1:20 (g:mL), 依次用水、10%、30%、50% 乙醇各洗脱 4 BV, 各洗脱组分用旋转蒸发仪 60 °C 减压干燥, 测定各组分中 5-羟色胺含量<sup>[10,11,16]</sup>。

### 1.2.4 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型的建立

RAW 264.7 细胞使用含 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。细胞贴壁生长 48 h 需进行传代培养, 用含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化传代, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

细胞以密度  $5 \times 10^4$  个/mL, 每孔 150  $\mu$ L 接种于 96 孔板, 继续培养 48 h。用培养基将 LPS 配成 0.1 ~ 200  $\mu$ g/mL 等 7 个不同浓度, 分别加入 96 孔板中, 处理 24 h 后, 加入 10  $\mu$ L 噻唑蓝 (MTT), 4 h 后弃去培养基, 每孔加 150  $\mu$ L 的 DMSO 溶解细胞, 在酶标仪中检测 490 nm 波长处的吸光值, 以测试孔与对照孔吸光值比值的百分数衡量细胞活力。以相同方法培养细胞, 用 LPS 处理细胞 24 h, 取培养液用 NO 检测试剂盒测定 NO 含量。比较细胞活力和 NO 水平, 确定 LPS 的最佳造模剂量。

### 1.2.5 沙棘籽粕 5-羟色胺部位抗炎活性评价

沙棘籽粕 5-羟色胺部位用 DMSO 溶剂配制成 200 mg/mL 的母液, 使用时用培养基稀释。细胞培

适宜范围及筛选出响应面法继续优化的 3 个因素<sup>[15]</sup>。

5-羟色胺提取得率受乙酸浓度、液料比、温度 3 个因素的影响较显著。借助实验设计软件 Design Expert 8.0, 基于 Box-Behnken Design 原理, 设计响应值为提取得率 ( $Y$ ), 变量为乙酸浓度 ( $A$ )、液料比 ( $B$ ) 和温度 ( $C$ ) 的 3 因素 3 水平响应面实验, 实验设计见表 1, 其他提取条件与单因素实验结果相同<sup>[9,14]</sup>。

养同“1.2.4”项方法。实验分为空白组, 模型组和低、中、高 3 个剂量的治疗组。模型组用 LPS 处理, 治疗组用 LPS 和 12.5、25、50  $\mu$ g/mL 的沙棘籽粕 5-羟色胺部位同时处理, 共孵育 24 h 后, 使用 NO 检测试剂盒测定培养液 NO 含量, ELISA 试剂盒检测 IL-6、TNF- $\alpha$  水平。

细胞以密度  $5 \times 10^4$  个/mL, 每孔 3 mL 接种于 6 孔板, 继续培养 48 h。模型组用 LPS 处理, 3 个治疗组用 LPS 和 12.5、25、50  $\mu$ g/mL 的沙棘籽粕 5-羟色胺部位共同处理, 继续培养 24 h。Western blot 检测细胞内 COX-2 蛋白表达量和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平, 按照试剂盒说明书方法裂解细胞抽提总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 Loading Buffer, 加热变性, 用 10% SDS-PAGE 分离胶、5% 浓缩胶分离蛋白, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 用 1:1 000 稀释的兔一抗 COX-2、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 在 4 °C 条件下孵育过夜, TBST 洗 3 次, 再用 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 显影后拍照, 以  $\beta$ -actin 作为内参对蛋白条带进行灰度分析<sup>[17]</sup>。

### 1.2.6 数据处理

实验数据采用 Graphpad Prism 6.01 统计软件进行统计学分析, 数据用平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表述。各组均数之间采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  认为差异显著, 具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 沙棘籽粕 5-羟色胺的提取工艺优化

### 2.1.1 HPLC 定量分析方法的建立

采用 HPLC 法定量分析沙棘籽粕中的 5-羟色胺,5-羟色胺的保留时间为 8.27 min,提取物在相同位置出峰,且具有类似的吸收光谱(见图 1)。通过

对 5-羟色胺浓度系列的分析,得到标准曲线为: $y = 14\ 192x + 2.809\ 5$ ,  $r^2 = 0.999\ 9$ ,相关性良好,线性范围 0.2 ~ 1.0 mg/mL,式中, $y$ :280 nm 波长下的峰面积, $x$ :标准品浓度,单位 mg/mL。

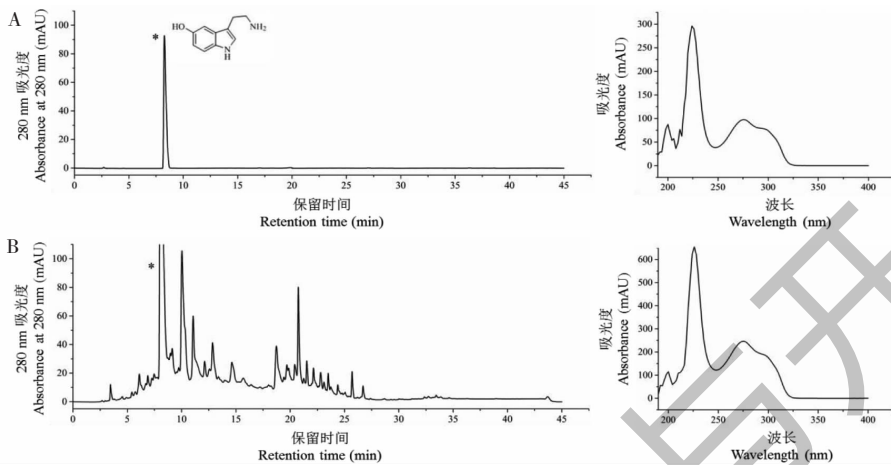


图 1 标准品(A)和沙棘籽粕提取物(B)的HPLC图和光谱图

Fig. 1 The high performance liquid chromatogram and spectrum of standard substance (A) and *H. rhamnoides* seed meal extract (B)

### 2.1.2 单因素实验结果

由图 2A 可知,当乙酸浓度在 1.0% ~ 2.5% 时,5-羟色胺提取得率随乙酸浓度的增加快速增长,乙酸浓度在 2.5% ~ 3.0% 时,提取得率增长缓慢。2.5% 的乙酸水更有利于 5-羟色胺溶出,因此选择乙酸浓度为 2.5%。由图 2B 可知,在液料比为 10 ~ 40 mL/g 时,提取得率逐渐增加,液料比大于 40 mL/g 时,提取得率略有下降,可见液料比为 40 mL/g 可保证 5-羟色胺的基本溶出,故选择液料比 40 mL/g 为宜。由图 2C 可知,随着温度的增加,分子热运动速率增大,溶解速度加快,提取得率呈上升趋势,100

℃时提取得率最高,因此选择提取温度 100 ℃为宜。由图 2D 可知,提取时间在 30 ~ 60 min 时,提取得率有所上升,60 min 以后,提取得率略有下降。时间过短不利于 5-羟色胺在提取溶剂中充分溶解,时间过长杂质相应增多,因此选用提取时间为 60 min。由图 2E 可知,随着提取次数累加,提取得率增长不明显,且提取溶剂的总体积相应增加,综合成本、时间、能耗等因素,选择提取 1 次为宜。综合以上单因素实验结果,初步优化后的提取条件为:乙酸浓度 2.5%,液料比 40 mL/g,温度 100 ℃,提取时间 60 min,提取 1 次。

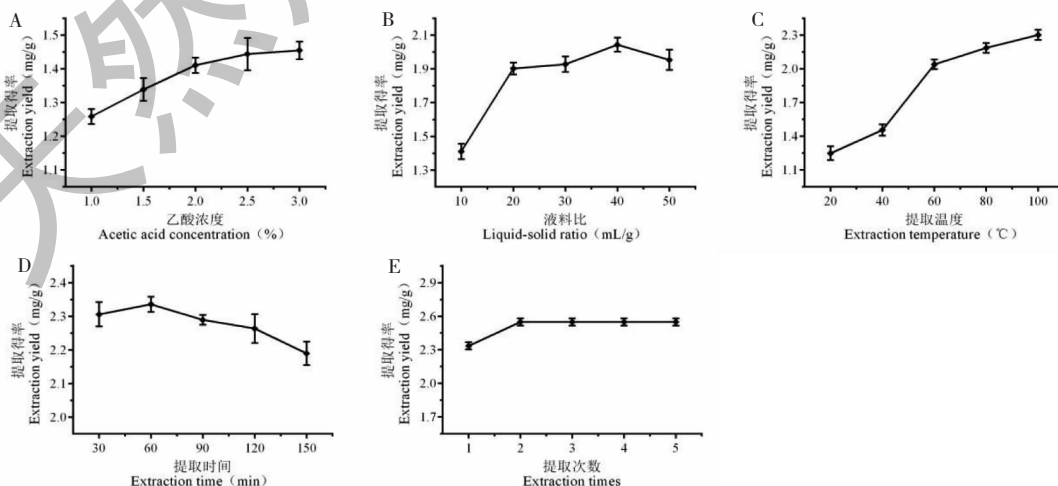


图 2 各单因素对沙棘籽粕 5-羟色胺提取得率的影响

Fig. 2 The effects of each single factor on the yield of 5-HT from *H. rhamnoides* seed meal

## 2.1.3 响应面实验结果

根据单因素实验结果设计3因素3水平响应面实验,表2所列为17组实验的条件与结果。使用Design Expert 8.0对响应面实验结果进行拟合,建立数学模型为: $Y = -1.67 + 0.52 A + 0.04 B +$

$0.05 C + 4.22 \times 10^{-3} AB - 3.71 \times 10^{-4} AC - 3.58 \times 10^{-5} BC - 0.13 A^2 - 4.85 \times 10^{-4} B^2 - 2.02 \times 10^{-4} C^2$ 。模型的相关系数 $R^2 = 0.9774$ ,说明模型与实验数据的拟合度良好。

表2 响应面实验设计方案与结果

Table 2 Design and results of response surface

编号 No.	因素 Factor			Y 提取得率 Extraction yield (mg/g)
	A (%)	B (mL/g)	C (°C)	
1	2	30	90	2.19
2	3	30	90	2.13
3	2	50	90	2.36
4	3	50	90	2.39
5	2	40	80	2.21
6	3	40	80	2.23
7	2	40	100	2.37
8	3	40	100	2.38
9	2.5	30	80	2.13
10	2.5	50	80	2.31
11	2.5	30	100	2.26
12	2.5	50	100	2.42
13	2.5	40	90	2.33
14	2.5	40	90	2.36
15	2.5	40	90	2.34
16	2.5	40	90	2.36
17	2.5	40	90	2.35

表3 模型的方差分析

Table 3 ANOVA of mathematic model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	0.13	9	0.01	33.56	< 0.0001**
A	0.00	1	0.00	0.01	0.9308
B	0.07	1	0.07	169.26	< 0.0001**
C	0.04	1	0.04	87.89	< 0.0001**
AB	0.00	1	0.00	4.09	0.0830
AC	0.00	1	0.00	0.03	0.8641
BC	0.00	1	0.00	0.12	0.7415
A <sup>2</sup>	0.00	1	0.00	10.30	0.0149*
B <sup>2</sup>	0.01	1	0.01	22.75	0.0020**
C <sup>2</sup>	0.00	1	0.00	3.94	0.0875
残差 Residual	0.00	7	0.00	-	-

续表3(Continued Tab. 3)

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
失拟 Lack of fit	0.00	3	0.00	5.24	0.071 8
误差 Pure error	0.00	4	0.00	-	-
总变异 Cor total	0.13	16	-	-	-

注: \* 差异极显著( $P < 0.01$ ); \* 差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: \*\* Highly significant difference ( $P < 0.01$ ); \* Significant difference ( $P < 0.05$ ).

数学模型的方差分析(ANOVA)如表3所示,模型总体达极显著水平( $P < 0.01$ ),失拟不显著( $P > 0.05$ ),表明模型可行。其中, $B$ 、 $C$ 、 $B^2$ 项极显著( $P < 0.01$ ), $A^2$ 项显著( $P < 0.05$ ),提取得率受液料比、温度的影响比乙酸浓度显著。

图3是根据回归方程绘制成的响应面图和等高线图,分析并比较各因素对5-羟色胺提取得率的影响和交互作用。响应面图可以直接反映因素的影响

程度,曲面的变化率越大,表明该因素对 $Y$ 值的影响越大。等高线图是响应面在底面的投影,能够反映两因素间交互作用的强弱,等高线呈现椭圆形时两因素间的交互作用显著。3组响应面均呈凸面且存在最高点, $Y$ 值在变量 $B$ 、 $C$ 方向上变化较大,说明液料比和温度因素比乙酸浓度对提取得率的影响显著,等高线不呈现椭圆形,交互作用不明显,这与方差分析结果一致。

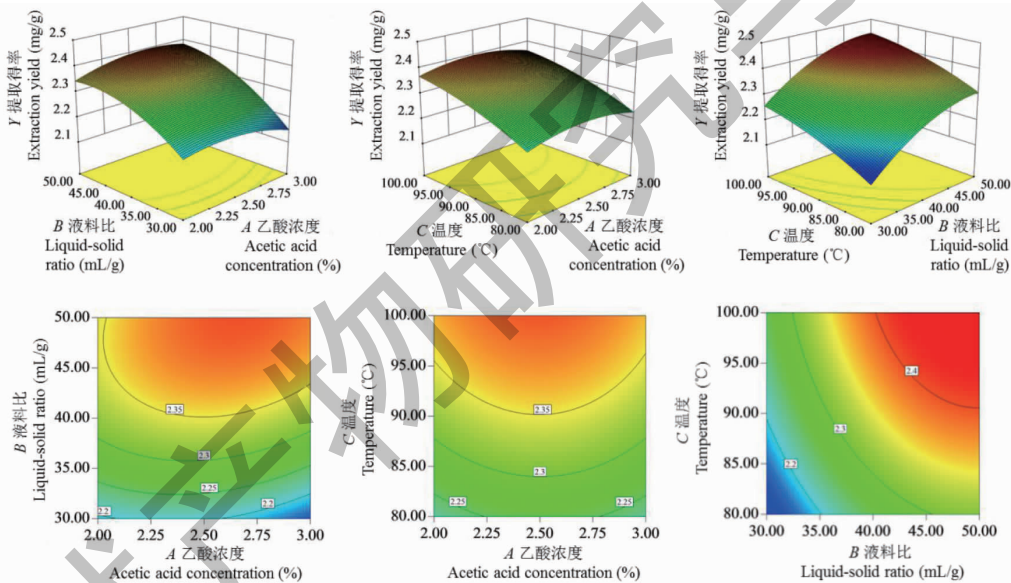


图3 因素间交互作用的响应面图和等高线图

Fig. 3 Response surface graphs and contour plots for the interaction among factors

对二次多项式模型中各自变量求偏导数,计算并比较所有极值点和边界点对应的响应值,得到的最优工艺参数为:乙酸浓度2.6%,液料比50 mL/g,温度100 ℃,预测最高提取得率为2.44 mg/g。称取沙棘籽粕1.0 g,按照优化条件进行提取验证。测得该条件下,5-羟色胺实际提取得率 $2.42 \pm 0.04$  mg/g( $n = 3$ ),与预测值的误差为0.8%,说明数学模型的结果稳定可靠。

## 2.2 沙棘籽粕5-羟色胺部位的富集

使用大孔树脂吸附提取物,依次用水和10%、30%、50%乙醇洗脱。经测定,不同洗脱部位5-羟色

胺含量分别为0.86%、7.92%、0.49%、0.00%。5-羟色胺集中在10%乙醇洗脱部位,实现了5-羟色胺的富集,获得了沙棘籽粕5-羟色胺部位。

## 2.3 LPS诱导RAW 264.7细胞炎症模型的建立

以0.1 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$ 浓度的LPS处理RAW 264.7细胞24 h,图4是LPS对细胞活力和NO释放量的影响,随着LPS浓度的增加,RAW 264.7细胞的活力显著下降( $P < 0.01$ )。LPS的浓度在0 ~ 5  $\mu\text{g/mL}$ 时,随着LPS处理浓度的增加,NO含量也逐渐增加,而LPS的浓度在10 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$ 时,随着LPS处理浓度的增加NO含量逐渐下降,故选择LPS



的处理浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

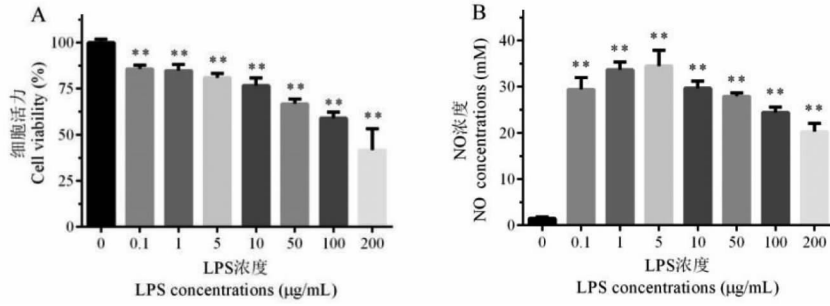


图4 LPS对细胞活力(A)和NO释放量(B)的影响

Fig. 4 The effects of LPS on cell viability (A) and NO release (B)

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

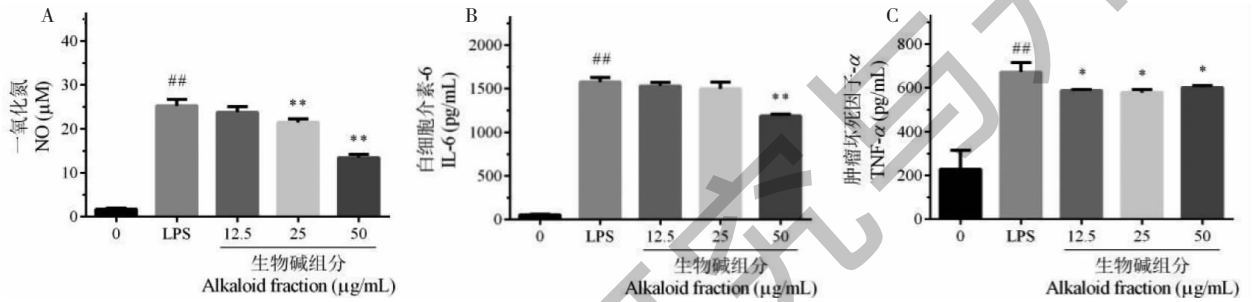


图5 沙棘籽粕5-羟色胺部位对NO(A)、IL-6(B)、TNF- $\alpha$ (C)的影响

Fig. 5 The effects of *H. rhamnoideis* seed meal 5-HT fraction on NO (A), IL-6 (B) and TNF- $\alpha$  (C)

注:与空白对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; Compared with model, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

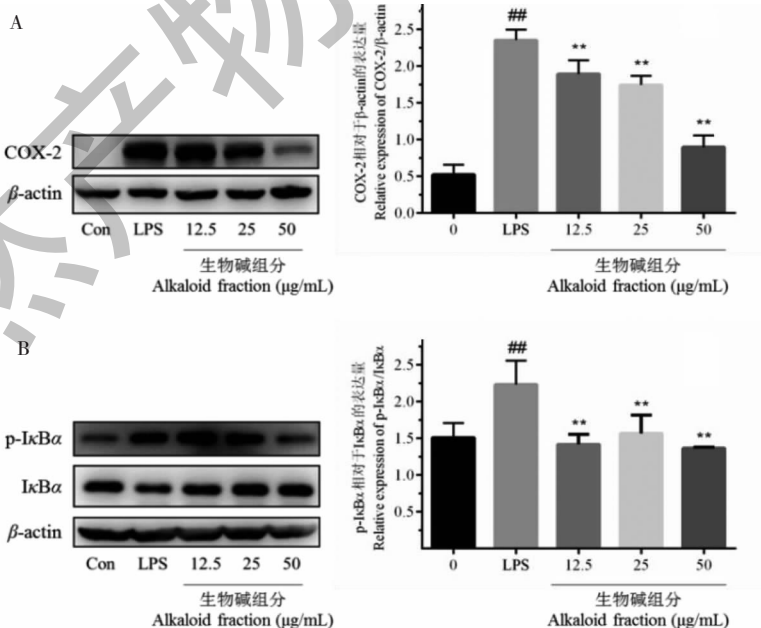


图6 COX-2的相对表达量(A)和I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化比例(B)

Fig. 6 Relative expression of COX-2(A) and phosphorylation ratio of I $\kappa$ B $\alpha$  (B)

注:与空白对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; Compared with model, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

## 2.4 沙棘籽粕5-羟色胺部位的抗炎活性评价

如图5所示,模型组细胞培养液的NO含量,IL-6、TNF- $\alpha$ 水平均显著高于对照组( $P < 0.01$ ),表现出炎症相关的表型。与模型组相比,经沙棘籽粕5-羟色胺部位处理后,培养液NO含量( $P < 0.01$ )和细胞炎症因子IL-6( $P < 0.01$ )、TNF- $\alpha$ ( $P < 0.05$ )水平均显著降低,其中NO、IL-6的降低呈现剂量依赖性。

Western blot结果如图6所示,LPS可以引发细胞中COX-2大量表达,促进I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化的发生,沙棘籽粕5-羟色胺部位可以剂量依赖性显著下调细胞内COX-2的表达( $P < 0.01$ ),同时降低I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化水平( $P < 0.01$ )。以上实验结果说明,沙棘籽粕5-羟色胺部位可通过降低细胞NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 分泌水平,下调COX-2蛋白表达,抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白磷酸化,从而改善RAW 264.7细胞的炎症反应。

## 3 结论

本文优化了乙酸水提取沙棘籽粕5-羟色胺的工艺,对影响沙棘籽粕中5-羟色胺提取得率的乙酸浓度、液料比、温度、提取时间、提取次数5个单因素进行筛选,根据Box-Behnken原理设计响应面实验,对乙酸浓度(A)、液料比(B)和温度(C)3个因素进一步优化,得到沙棘籽粕5-羟色胺的最优提取工艺:乙酸浓度2.6%,液料比50 mL/g,温度100 $^{\circ}$ C,时间60 min,提取1次。验证实验结果表明,5-羟色胺提取得率可达 $2.42 \pm 0.04$  mg/g,接近数学模型预测结果2.44 mg/g。再利用大孔吸附树脂富集得到沙棘籽粕5-羟色胺部位。建立LPS诱导RAW 264.7细胞炎症模型,评价沙棘籽粕5-羟色胺部位的抗炎活性。生化指标和Western blot结果表明,沙棘籽粕5-羟色胺部位可通过抑制细胞释放NO和炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ ,下调COX-2蛋白表达,抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白磷酸化等过程发挥抗炎作用。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 184-185.
- 2 Zhou HN, Hu N, Dong Q, et al. Research progress on the chemical composition and pharmacological action of *Hippo-*

- phae rhamnoides* [J]. West China J Pharm Sci (华西药学报), 2020, 35: 211-217.
- 3 Ding J. Preparation of active components from *Hippophae rhamnoides* Linn. and study on doxorubicin-induced H9c2 myocardial injury [D]. Yantai: Yantai University (烟台大学), 2020.
- 4 Cui M. Study on extraction and functional properties of *Hippophae rhamnoides* seed meal protein [D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2011.
- 5 Ouyang J. Preparation of active components from the seed residue of *Hippophae rhamnoides* Linn. and studies of the mechanism on type II diabetes [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences (中国科学院大学), 2015.
- 6 Petrova MF, Menshikov GB. Studies on bases in bark of *Hippophae rhamnoides*. 1. Isolation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) [J]. J Gen Chem USSR, 1961, 31(7): 2249.
- 7 Xu DP, Hu CY, Mei JL, et al. Alkaloid against ischemia/reperfusion injury from seeds of *Hippophae rhamnoides* Linn. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2010, 22: 937-939.
- 8 Hu CY, Xu DP. Extraction, isolation and protective effect of alkaloid from seabuckthorn seeds on injured cardiomyocytes in rats [J]. Food Sci (食品科学), 2010, 31: 234-237.
- 9 Lu CZ, Shan YK, Li SZ, et al. Study on optimization of extraction technique of 5-hydroxytryptamine from seabuckthorn by response surface methodology [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2010, 35(6): 199-203.
- 10 Li JT, Limao CR. Analysis adsorption property of four macroporous resins for 5-HT in seabuckthorn by HPLC-DAD [J]. J Qinghai Nor Univ; Nat Sci (青海师范大学学报:自科版), 2013, 29(2): 53-55.
- 11 Wang JH, Limao CR, Rezeng CD, et al. Technology of purification serotonin in seabuckthorn stems by macroporous resins [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2014, 39(10): 254-257.
- 12 Meng QM, Liang J, Wu GF, et al. Research progress in pharmacological action of alkaloids [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2003, 11: 700-702.
- 13 Li J, Li YQ, Lu RM, et al. Research progress on anti-inflammatory alkaloids [J]. Gua Chem Ind (广州化工), 2020, 48(1): 14-19.
- 14 Li WC, Yang RM, Qiang W, et al. Optimization of extraction process of 5-hydroxytryptamine derivatives from safflower seeds by response surface methodology [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24(S1): 122-126.