

油茶籽油的抗炎活性研究

兰念念,刘睿杰,常明,金青哲,王兴国

(江南大学 食品学院,国家功能食品工程技术研究中心,江苏省食品安全与质量控制协同创新中心,江苏 无锡 214122)

摘要:以5种油茶籽油为实验对象,对其脂肪酸组成、微量营养成分(生育酚、多酚、角鲨烯、植物甾醇)进行检测,并采用LPS诱导的第四代小鼠单核巨噬细胞系(RAW264.7)建立细胞炎症模型,研究不同油茶籽油甲醇提取物对细胞炎症因子一氧化氮表达水平的影响。结果显示:相较于模型组,1 mg/mL的油茶籽油甲醇提取物能够显著抑制一氧化氮的生成($P < 0.01$),具有良好的抗炎作用;Pearson相关性分析结果表明,油茶籽油中的多酚和角鲨烯对抗炎活性有显著影响,多酚的影响尤为显著($P < 0.01$)。

关键词:油茶籽油;微量营养成分;抗炎活性

中图分类号:TS225.1;R285

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)08-0084-05

Anti-inflammatory activity of oil-tea camellia seed oil

LAN Niannian, LIU Ruijie, CHANG Ming, JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, National Engineering Technology Research Center of Functional Food, College of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: The fatty acid compositions, micronutrients (tocopherol, polyphenol, squalene and phytosterol) of five oil-tea camellia seed oils were determined. The LPS-induced RAW264.7 cell inflammation model was established to investigate the effects of methanol extract of different oil-tea camellia seed oils on expression of cell inflammatory factor NO. The results showed that 1 mg/mL methanol extract of oil-tea camellia seed oil significantly inhibited the formation of NO ($P < 0.01$) compared with the model group, and had good anti-inflammatory effect. Pearson correlation analysis illustrated that the polyphenol and squalene in oil-tea camellia seed oil had significant effects on the anti-inflammatory activity, and the effect of polyphenol was more prominent ($P < 0.01$).

Key words: oil-tea camellia seed oil; micronutrient; anti-inflammatory activity

油茶树是我国最古老的木本食用油料树种,有2300多年的栽培历史,与油棕、橄榄、椰子并称为世界四大木本食用油树种^[1]。油茶籽油脂肪酸组成与橄榄油相似,含有多种生物活性成分,如生育酚、多酚、甾醇和角鲨烯等,素有“油中珍品”之称。《本草纲目》中记载“茶油性寒,味甘平,润肠通便,清热化湿,润肺祛痰,利头目”的药用价值。《中国药典》《中国医药大辞典》也将油茶籽油作为药用油收

载^[2]。福建、江西等地,有通过口服或外用油茶籽油治疗口腔溃疡、鹅口疮、湿疹、皮炎以及烧烫伤等疾病的习俗^[3-5],此民间疗法是否有科学依据,有待进一步证实。林朝悦等^[6]研究发现油茶籽油对角叉菜胶致大鼠的原发性刺激性炎症有抑制作用;Bumrungpert等^[7]研究发现食用富含油茶籽油的食品可降低高胆固醇血症患者的氧化应激和炎症标志物;中国医学科学院药用植物研究所实验发现,油茶籽油对消炎痛、乙醇和水束缚导致的小鼠胃溃疡均具有显著的预防和治疗作用。目前,油茶籽油抗炎作用主要集中在外用,细胞水平的抗炎活性评价鲜有报道。本实验采用油茶籽油甲醇提取物,通过LPS诱导RAW264.7细胞炎症的经典模型,测定油

收稿日期:2017-11-16

作者简介:兰念念(1994),女,硕士研究生,主要从事油茶籽油营养性研究(E-mail) lnn19940312@163.com。

通信作者:刘睿杰,副教授(E-mail) liuruijie163@163.com。

茶籽油醇提物对炎症模型细胞一氧化氮分泌量的影响,从细胞水平研究油茶籽油醇提物的抗炎活性,并从油茶籽油组成方面对抗炎可能的功效成分进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

5种油茶籽油取自苏州制油厂,编号为A、B、C、D、E;第四代小鼠单核巨噬细胞系(RAW264.7), American Type Collection;无水甲醇、正己烷、氢氧化钾、硫代硫酸钠、福林酚试剂、焦性没食子酸、二甲亚砜等,均为分析纯;正己烷、异丙醇为色谱纯,美国J&K化学公司;生育酚混合标准品,瑞士Roche公司;高纯氮气、高纯氢气、高纯氦气,无锡太湖气体厂;胎牛血清,美国Hyclone公司;高糖DMEM培养基,美国Gibco公司;5 α -胆甾醇标准品, BSTFA + TMCS (99:1) 硅烷化试剂,脂多糖(LPS, L2630)、噻唑蓝、胰蛋白酶、青霉素-链霉素双抗溶液、磷酸盐缓冲液(PBS),美国Sigma公司;一氧化氮检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 仪器与设备

HH-4 数显恒温水浴锅;AR2140 电子分析天平;KH7200DB 数控超声波清洗器;Diol-SPE 二乙醇基固相萃取小柱(500 mg, 6 mL),美国赛芬公司;7820 气相色谱仪,美国Agilent公司;Trace GC Ultra 气相色谱仪、ISQ 质谱检测仪,美国Thermo公司;ZHJH-C1112B 超净工作台;TS100-F 倒置相差显微镜,日本Nikon公司;二氧化碳培养箱,美国Thermo公司;LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器;TDL-50C 低速台式离心机;M5 酶标仪,美国Molecular Devices公司;AG 5418 离心机,德国Eppendorf公司。

1.2 实验方法

1.2.1 油茶籽油指标测定

1.2.1.1 脂肪酸组成及含量测定

参照GB 5009.168—2016对油茶籽油甲酯化,气相色谱测定其脂肪酸组成。

气相色谱条件:TR-TRACE FAME 色谱柱(60 m \times 2.5 mm \times 2.5 μ m);初始温度60 $^{\circ}$ C保持3 min后,以5 $^{\circ}$ C/min升温至175 $^{\circ}$ C,保持15 min,然后以2 $^{\circ}$ C/min升温至220 $^{\circ}$ C,保持10 min;分流比50:1;进样量1 μ L;进样口温度和检测器温度均为220 $^{\circ}$ C。

1.2.1.2 生育酚含量测定

采用正向高效液相色谱法^[8]测定生育酚含量,色谱条件:Sehperisorb Silica 柱(25 cm \times 4.6 mm \times 5 μ m);流动相为正己烷-异丙醇(体积比98.5:1.5),流速0.8

mL/min;柱温25 $^{\circ}$ C;检测波长295 nm;进样量20 μ L。

1.2.1.3 植物甾醇和角鲨烯含量测定

参照李志晓^[9]的方法,以5 α -胆甾醇为内标,采用气质联用法测定。色谱条件:DB-5 色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m);检测器温度和进样口温度均为290 $^{\circ}$ C;分流比100:1;进样量1.0 μ L;升温程序为200 $^{\circ}$ C保持1 min,10 $^{\circ}$ C/min升温至300 $^{\circ}$ C,保持18 min。质谱条件:传输线温度和离子源温度均为250 $^{\circ}$ C,电子电离源离子化模式,分子离子碎片扫描范围为(m/z)50~550。

1.2.1.4 多酚含量测定

参照GB/T 8313—2008,采用固相微萃取法提取多酚类物质^[10-11],分光光度法测定765 nm处吸光度。以焦性没食子酸为标准品,绘制标准曲线,计算油茶籽油中多酚含量。

1.2.2 油茶籽油体外抗炎活性

1.2.2.1 油茶籽油甲醇提取液的制备

称取2.0 g 油茶籽油,加入4 mL 甲醇溶液,旋涡混合仪剧烈振荡10 min后3 500 r/min离心,吸取上清液;重复甲醇萃取4次,合并5次萃取液,氮气吹至质量不变,再用2 mL 甲醇重溶,制得1 g/mL的油茶籽油甲醇提取物母液,置于棕色样品瓶中4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

1.2.2.2 细胞培养

将RAW264.7细胞培养在含10%胎牛血清和100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养液中,置于二氧化碳培养箱中培养。

1.2.2.3 细胞活力测定

RAW264.7细胞培养至对数生长期,胰酶消化调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,每孔100 μ L,接种于96孔板中,24 h培养后,设置调零组(培养基),对照组(细胞+培养基),模型组(LPS终质量浓度1 μ g/mL),实验组(LPS终质量浓度1 μ g/mL+油茶籽油醇提物终质量浓度1 mg/mL),每组6个复孔,置于二氧化碳培养箱中培养24 h,弃去上清,5 mg/mL MTT溶液孵育4 h,小心弃上清后150 μ L DMSO溶解晶体,490 nm下测各孔吸光度,按下式计算细胞活力。

细胞活力 = (实验孔 - 调零孔) / (对照孔 - 调零孔) \times 100%

1.2.2.4 细胞形态学观察

取对数期的RAW264.7细胞按每孔 1×10^6 个接种于6 cm培养板中,培养24 h。设置对照组(培养基),模型组(LPS终质量浓度1 μ g/mL),再孵育24 h后,弃去培养液,倒置相差显微镜观察。

1.2.2.5 细胞培养液中一氧化氮浓度测定

取对数期的 RAW264.7 细胞,调整细胞密度为 3×10^5 个/mL,每孔 2 mL 传代于 6 孔板中,24 h 培养后,设置对照组(细胞 + 培养基),模型组(LPS 终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),实验组(终质量浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS + 终质量浓度 1 mg/mL 的油茶籽油醇提取物),每组 3 个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。一氧化氮检测选用一氧化氮检测试剂盒,取细胞上清液 100 μL 加入 Griess 试剂,测 540 nm 波长处吸光度,根据绘制的一氧化氮标准曲线计算细胞上清液一氧化氮释放浓度。

1.2.3 统计分析

数据采用 SPSS22 软件进行统计学分析,组间差异采用 one-way ANOVA 显著性分析,相关性采用 Pearson 相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酸组成

5 种油茶籽油的脂肪酸组成及含量如表 1 所示。由表 1 可以看出,油茶籽油脂肪酸组成以棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸为主,其中油酸含量约为 80%。one-way ANOVA 分析结果表明 5 种油茶籽油的脂肪酸组成没有显著性差异。

表 1 5 种油茶籽油的脂肪酸组成及含量 %

脂肪酸	A	B	C	D	E
棕榈酸	8.53	8.57	8.58	8.45	8.66
硬脂酸	2.13	2.14	2.14	2.18	2.12
油酸	79.44	79.04	79.01	79.32	79.13
亚油酸	8.95	9.20	9.20	8.98	9.13
α -亚麻酸	0.40	0.43	0.45	0.46	0.41
γ -亚麻酸	0.55	0.62	0.62	0.61	0.54
饱和脂肪酸	10.66	10.71	10.72	10.63	10.78
不饱和脂肪酸	89.34	89.29	89.28	89.37	89.21
单不饱和脂肪酸	79.44	79.04	79.01	79.32	79.13
多不饱和脂肪酸	9.90	10.25	10.27	10.05	10.08

2.2 微量营养成分

2.2.1 生育酚含量

5 种油茶籽油的生育酚含量如图 1 所示。

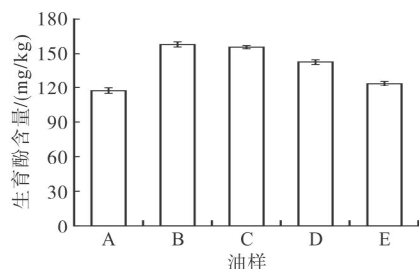


图 1 油茶籽油的生育酚含量

由图 1 可以看出,B 号油样中生育酚含量最高,为 157.38 mg/kg,A 号油样中最少,为 116.68 mg/kg。在油茶籽油中生育酚主要以 α -生育酚为主,约占总生育酚含量的 90%, β -、 γ -、 δ -生育酚含量较少。

2.2.2 植物甾醇和角鲨烯含量

5 种油茶籽油的植物甾醇和角鲨烯含量如图 2 所示。由图 2 可以看出,5 种油茶籽油中的甾醇种类一致,均含有羊毛甾醇、豆甾醇和 β -谷甾醇。其中 B 号油样中总甾醇和角鲨烯含量最高,分别为 1112.34 mg/kg 和 128.08 mg/kg,其中含有的羊毛甾醇含量最高,达 677.28 mg/kg。

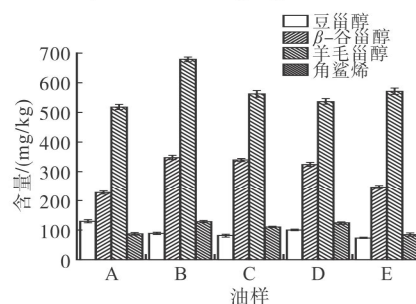


图 2 油茶籽油的植物甾醇和角鲨烯含量

2.2.3 多酚含量

没食子酸标准曲线和 5 种油茶籽油的多酚含量如图 3 所示。

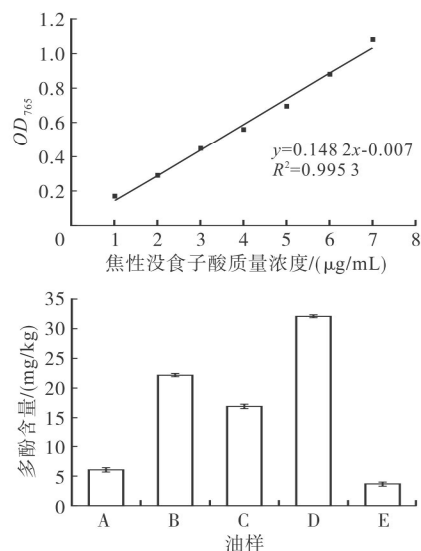


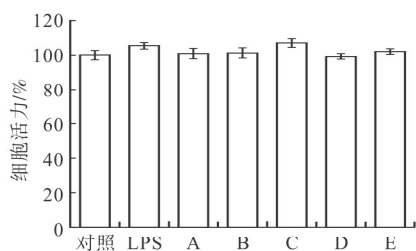
图 3 焦性没食子酸标准曲线和油茶籽油的多酚含量

由图 3 可以看出,没食子酸标准曲线具有良好的线性关系。5 种油茶籽油的多酚含量有较大区别,大小顺序为:D > B > C > A > E。其中 D 号油样中多酚含量最高,达 31.99 mg/kg,E 号油样的最少,为 3.68 mg/kg。

2.3 油茶籽油醇提取物体外抗炎活性

2.3.1 细胞活力

采用 MTT 法测定 5 种油茶籽油醇提取物对 RAW264.7 细胞活力的影响,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 和 1 mg/mL 油茶籽油醇提取物的处理均未对细胞活力产生明显抑制作用,可以作为后续抗炎活性实验的添加质量浓度。



注: LPS 为模型组, A、B、C、D、E 为各油样的实验组。下同。

图 4 油茶籽油醇提取物对细胞活力的影响

2.3.2 细胞形态观察

RAW264.7 细胞形态通过倒置相差显微镜观察,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出,对照组的细胞呈现有细长伪足的形态,而经过内毒素 LPS 诱导之后,细胞形态变异明显,黏附能力增强,形成多伪足的大细胞,与文献 [12] 结果一致,说明 LPS 成功诱导了 RAW264.7 细胞炎症模型。

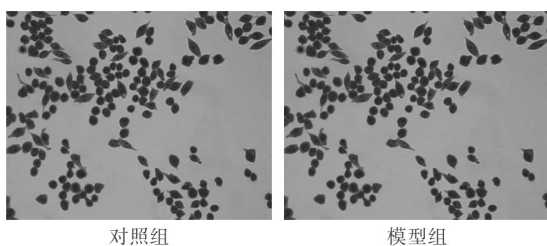
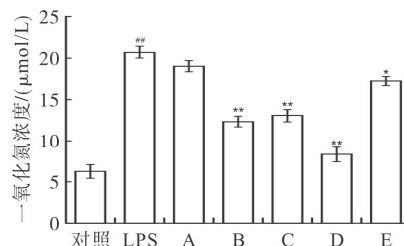
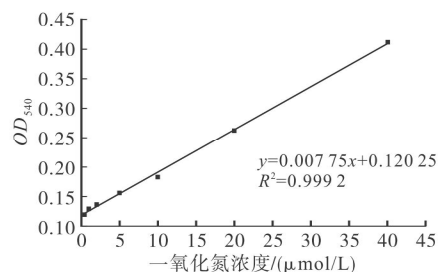


图 5 LPS 诱导对 RAW264.7 细胞形态的影响

2.3.3 细胞一氧化氮释放量

RAW264.7 巨噬细胞受到 LPS 刺激后,通过脂多糖结合蛋白 CD14 受体和 Toll 样受体 4 (TLR4) 等信号转导途径进入细胞,激活转录因子细胞核因子 K β (NF- κ B) 和活化蛋白-1 (MCP-1),引起各种细胞因子和炎症介质的过度表达^[13-14],从而形成“瀑布效应”,继而引发全身炎症反应综合征^[15]。其中一氧化氮是介导炎症反应的关键因子,在内毒素致机体损伤中起重要作用。过多的一氧化氮会促

进巨噬细胞释放各种细胞因子,加重炎症反应。本文分析了油茶籽油甲醇提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液中一氧化氮释放的影响,结果如图 6 所示。由图 6 可以看出,绘制的一氧化氮浓度标准曲线具有良好的线性关系。对照组的一氧化氮释放量为 6.24 $\mu\text{mol}/\text{L}$,表明未被 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞一氧化氮释放量处于较低水平。与对照组相比,LPS 模型组的一氧化氮生成量显著增加至 20.66 $\mu\text{mol}/\text{L}$,表明炎症细胞模型的成功构建。相较于模型组,B、C、D 号油样的油茶籽油醇提取物可以显著降低一氧化氮的表达 ($P < 0.01$)。由此可推测,油茶籽油可通过抑制一氧化氮的释放起到抗炎作用。



注:与对照组比较,##表示 $P < 0.01$;与 LPS 组比较,**表示 $P < 0.01$,*表示 $P < 0.05$ 。

图 6 一氧化氮浓度标准曲线及油茶籽油醇提取物对一氧化氮释放量的影响

2.4 油茶籽油微量营养成分与抗炎的关系

对 5 种油茶籽油的微量营养成分(生育酚、多酚、角鲨烯、植物甾醇(包括豆甾醇、 β -谷甾醇、羊毛甾醇))与油茶籽油醇提取物的抗炎能力(一氧化氮释放量)进行 Pearson 相关性分析,结果如表 2 所示。由表 2 可以看出,角鲨烯与抗炎能力在 0.05 水平(双侧)上显著相关,多酚物质与抗炎能力在 0.01 水平(双侧)上显著相关,说明油茶籽油中多酚和角鲨烯对抗炎活性有显著影响,多酚的作用尤为显著。

表 2 油茶籽油的微量营养成分与抗炎能力之间的相关性分析

项目	生育酚	多酚	角鲨烯	豆甾醇	β -谷甾醇	羊毛甾醇
一氧化氮	0.726	0.971**	0.896*	0.271	0.838	0.225

注:**表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关;*表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

3 结 论

本研究建立了 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞模型,考察不同油茶籽油醇提物对炎症细胞一氧化氮表达水平的影响。结果表明:油茶籽油醇提物(B、C、D)能够显著抑制一氧化氮的生成($P < 0.01$),具有抗炎作用。结合测定的油茶籽油脂肪酸和微量营养成分(生育酚、多酚、角鲨烯、植物甾醇)的数据,Pearson 相关性初步分析发现油茶籽油中多酚和角鲨烯对抗炎活性有显著影响,其中多酚的作用尤为显著。

本实验仅以一氧化氮表达量指标反映油茶籽油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎活性,较为单一,缺乏多指标的相互印证。但抗炎机制复杂,且油茶籽油伴随物多样,抗炎功能因子确定及机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2008.
- [2] 邹清容, 禰丽萍. 茶油抗炎、抗菌作用的临床应用进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(12): 12-13.
- [3] 刘添荣, 赖和英, 刘美英, 等. 复方山茶油外涂治疗放疗后口腔溃疡效果观察[J]. 护理学杂志, 2001, 16(1): 19.
- [4] LEE C P, YEN G C. Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed(*Camellia oleifera* Abel.) oil[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(3): 779-784.
- [5] 肖霞, 庞瑜. 生茶油在防治新生儿尿布皮炎中的应用[J]. 国际护理学杂志, 2006, 25(12): 1013-1014.
- [6] 林朝悦, 程波. 茶油及茶多酚抗炎作用及其机制研究[J]. 皮肤病与性病, 2011, 33(4): 190-193.
- [7] BUMRUNGPET A, PAVADHGUL P, KALPRAVIDH R W. Camellia oil-enriched diet attenuates oxidative stress and inflammatory markers in hypercholesterolemic subjects[J]. J Med Food, 2016, 19(9): 895-898.
- [8] 施堂红, 刘晓政, 严晓丽, 等. 不同加工工艺对山茶油中 α -V_E 含量的影响[J]. 中国油脂, 2014, 39(5): 19-22.
- [9] 李志晓. 制油工艺对油茶籽油品质的影响[J]. 中国油脂, 2015, 40(4): 47-51.
- [10] 罗凡, 费学谦, 方学智, 等. 固相萃取/高效液相色谱法测定茶油中的多种天然酚类物质[J]. 分析测试学报, 2011, 30(6): 696-700.
- [11] ZHANG L L, WANG Y M, WU D M, et al. Comparisons of antioxidant activity and total phenolics of *Camellia oleifera* Abel fruit hull from different regions of China[J]. J Med Plants Res, 2013, 4(14): 1420-1426.
- [12] 方瑶, 毛旭虎. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的培养技巧及经验总结[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(22): 4358-4359.
- [13] RHULE A, NAVARRO S, SMITH J R, et al. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 106(1): 121-128.
- [14] SURH Y J, CHUN K S, CHA H H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals; down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation[J]. Mutat Res - Fund Mol M, 2001, 480-481(3): 243-268.
- [15] CHENG A, HAN C, FANG X, et al. Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophages via the NF- κ B signalling pathway[J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(10): 3393-3400.

更 正

《中国油脂》杂志 2018 年第 43 卷第 6 期第 132 页发表的论文“溶血磷脂的制备、分离、检测及应用研究进展”,因作者失误,误将作者单位写为吉林工程技术学院,实际应为吉林工程职业学院,应作者要求特此更正。

中国油脂杂志社
2018 年 7 月 20 日