

度的增大抑制率不断升高,并存在剂量依赖关系,其半抑制浓度 $IC_{50}$ 为0.039g/L,且当LSPC浓度达到2g/L时抑制率达到95.48%。以上结果表明,LSPC对酪氨酸酶有较强抑制作用,且该抑制作用属于竞争性抑制。其原因可能是LSPC与L-多巴竞争酶的结合部位,也可能是原花青素能与酪氨酸酶中的金属离子螯合,从而抑制酶的活力,这部分机理还尚待进一步研究。

3.3 LSPC对多巴自动氧化生成黑色素的研究中,得到LSPC对多巴色素转化黑色素有抑制作用,当LSPC浓度达到0.5g/L和1g/L时与对照组相比有显著性差异(分别为 $p<0.05$ ;  $p<0.01$ )。其半抑制浓度 $IC_{50}$ 1.750g/L。

#### 参考文献:

- [1] Iwata M, et al. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins[J]. J Invest Dermatol, 1990, 95: 9-15.
- [2] Mason H S J Biol Chem[J], 1948, 172: 83-99.
- [3] 何冰芳, 陈琼华. 生物化学杂志[J], 1989, 5 (2): 154-158.
- [4] 刘宇红, 董银卯, 李才广. 皮肤化学美白剂抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 日用化学工业, 2001, 2 (1): 21-23.
- [5] 赵炎, 郑玉娟, 高波, 衣丹. 对羟基苯甲酸对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 吉林大学自然科学学报, 1998, 10 (4): 89-90.
- [6] 刘德育, 雷焕强, 杨梅黄素及蛇葡萄素对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 生物化学杂志, 1996, 12 (5): 618-620.

## 柚皮提取物抗氧化作用和对正常小鼠免疫功能的影响

李春美, 付志贤, 谢笔钧

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**研究了柚皮提取物的抗氧化作用和对正常小鼠免疫功能的影响,结果表明柚皮提取物在一定浓度下可以有有效的抑制菜油的氧化,但是不具有剂量-效应关系。 $500 \times 10^{-6}$ 的柚皮提取物抗氧化效果最好,并强于 $1000 \times 10^{-6}$ 的VC和BHT,但柚皮提取物在高浓度时( $1000 \times 10^{-6}$ 、 $2000 \times 10^{-6}$ )反而有轻微的助氧化作用。抗坏血酸对柚皮提取物抗氧化效果具有明显的协同增效作用;柚皮提取物可明显增强正常小鼠细胞免疫和非特异性免疫功能,能显著地提高正常小鼠血清SOD的活性、降低血清MDA的含量,且呈明显的剂量-效应关系。

**关键词:**柚皮提取物; 抗氧化活性; 免疫

### Studies on the Antioxidant Activity of Shaddock Peels Extract and Its Effect on the Immunomodulatory System of Normal Mice

LI Chun-mei, FU Zhi-xian, XIE Bi-jun

(Department of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The antioxidant activity of shaddock peels extract (SPE) in rape oil system and its immunomodulatory effects on normal mice was studied. Grapefruit Skin extract showed significant antioxidant activity in rape oil system at concentration of  $500 \times 10^{-6}$ , and VC had synergistic antioxidant effect to SPE in rape oil system, but when the concentration increased to  $1000 \times 10^{-6}$  and  $2000 \times 10^{-6}$ , it showed pro-oxidant effect, and SPE can also activate serum SOD and reduce the content of MDA of mice significantly, and the concentration-effect relationship was obvious; It was found that Grapefruit Skin extract ( $100, 200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d} \times 7 \text{ d}$ ) can significantly intensify DTH caused by DNFB, and SPE ( $100 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}, 200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}, \times 15 \text{ d}$ ) can improve phagocytosing function of peritoneal macrophage (PM $\Phi$ ) by 22.94%, 53.96% respectively;

**Key words:** shaddock peels extract; immunity; antioxidant activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0174-03

收稿日期: 2003-04-06

作者简介: 李春美 (1973-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品化学与天然产物化学。

柚皮为芸香科柑橘属柚子的果皮,柚子皮中除含有芳香油,果胶,色素外,还含有丰富的黄酮类物质<sup>[1]</sup>。研究表明黄酮类化合物是一类具有广泛生物活性的物质,具有抗氧化,抗肿瘤,抗病毒,防治心血管疾病及增强人体免疫能力等多种生物活性。我国的柚子资源极为丰富,以往国内对柚皮的研究主要集中于果胶和挥发性芳香油的提取。近年来有少许研究表明柚皮黄酮具有较强的抗氧化作用,但均是在简单的油脂体系中进行<sup>[2~4]</sup>,未见有体内抗氧化及免疫功能方面的研究。本课题通过动物实验对柚皮提取物的抗氧化性能以及对小鼠的免疫功能的影响进行了初步研究,旨在为柚皮提取物的进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

柚皮提取物 自行制备,总黄酮含量为28.84%;菜油购自狮子山菜市场;新鲜鸡血 华中农业大学动科院采集;SOD,MDA试剂盒 南京建成生物工程研究所;Giemsa染色素 上海试剂三厂;试验动物 昆明种雌性小鼠,清洁级,体重18~22g,由同济医科大学实验动物中心提供(动物合格证:鄂医动字19-052号)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 柚皮提取物的制备

称取柚皮干粉200g,用60%的酒精以10:1的比例连续浸提两次,抽滤,合并滤液,真空回收溶剂,将浓缩液上NKA9大孔树脂柱,先用蒸馏水洗脱,至洗脱液中不含糖,然后用60%的酒精进行洗脱,将所得60%乙醇洗脱部分重新上柱一次,回收溶剂,冷冻干燥后制得样品。经芦丁标准比色法测定,提取物中总黄酮含量为28.84%。

#### 1.2.2 柚皮提取物在菜油体系中的抗氧化活性

添加不同浓度的柚皮提取物( $500 \times 10^{-6}$ 、 $1000 \times 10^{-6}$ 、 $2000 \times 10^{-6}$ )于菜油中混匀,置于60℃温箱中强制氧化,采用 $\text{NaS}_2\text{O}_5\text{-I}_2$ 滴定法<sup>[5]</sup>检测油脂的过氧化值(POV)的变化。

#### 1.2.3 柚皮提取物对正常小鼠血清SOD活力和MDA含量的影响

小鼠试验方法与剂量分组:将40只小鼠随机分为四组,每组10只,设100、200、400 mg/kg·d三个柚皮提取物剂量组,同时设一对照组,以生理盐水灌胃。连续灌胃一个月。试验结束后小鼠断头取血,测血清SOD活力和MDA含量。

SOD,MDA测定方法:按试剂盒说明书操作测红细胞SOD活力和血清MDA含量。SOD活力以亚硝酸单位表示,即NU/ml。

#### 1.2.4 柚皮提取物对正常小鼠免疫功能的影响

##### 1.2.4.1 试验分组、给药方法及剂量

30只小鼠随机分为3组,每组10只,即对照组和柚皮提取物二个不同剂量组。实验前将柚皮提取物按所需浓度。

DTH试验以100、200mg/kg·d二个剂量连续灌胃7d;腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验二个剂量为100、200mg/kg·d,连续灌胃15d。

##### 1.2.4.2 DTH反应的产生和测定

按徐叔云<sup>[6]</sup>的方法。小鼠腹部去毛,范围为 $3 \times 3\text{cm}^2$ 大小,实验第二天将1%的二硝基氟苯(DNFB)的丙酮溶液 $100 \mu\text{l}$ 均匀涂于小鼠腹部以致敏。致敏后第五天将1% DNFB $10 \mu\text{l}$ 均匀涂于小鼠右耳(两面)进行攻击。攻击后24h,颈椎脱臼处死小鼠,以游标卡尺测量左右耳厚度之差为肿胀度,同时取小鼠胸腺和脾脏称重,以每10g小鼠的胸腺和脾重(mg)作为胸腺指数和脾指数。

##### 1.2.4.3 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验

细胞涂片:参照徐叔云<sup>[6]</sup>和王桂枝<sup>[7]</sup>的方法进行。试验第30d每鼠腹腔注射5%的鸡红细胞生理盐水悬液 $0.5 \mu\text{l}$ ,30min后颈椎脱臼处死小鼠,正中剪开腹部皮肤,经腹部注入生理盐水2ml,轻轻按摩腹部1min,然后吸出腹腔洗液1ml,分滴于两片载玻片上,37℃温育30min,生理盐水漂洗,以除去未粘片的细胞。晾干,10%甲醛溶液固定5min,Giemsa染色。

结果判定:油镜下计数巨噬细胞,每片200个,按下式计算吞噬指数及吞噬百分率:

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{200 \text{ 个巨噬细胞 (吞噬及未吞噬的)}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞}}{200 \text{ 个巨噬细胞}} \div 2$$

##### 1.2.5 统计学方法

本实验数据均用PEMS2.0统计分析软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用t检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 柚皮提取物在菜油体系中的抗氧化活性

柚皮提取物在菜油体系中的抗氧化活性,结果如表1所示。

表1 不同浓度的柚皮提取物对菜油抗氧化性能的影响

样品	浓度 (×10 <sup>-6</sup> )	POV (mmol/kg)	
		0d	12d
对照	0	8.75	88.6
	500	8.75	42.25
	1000	8.75	90.5
柚皮提取物	2000	8.75	94.85
	BHT	1000	8.75
VC	1000	8.75	78.5
柚皮提取物+VC*	1000	8.75	47.05

注: \* $500 \times 10^{-6}$ 柚皮提取物+ $500 \times 10^{-6}$ 抗坏血酸,表中数据为三次平行的平均值。

从表1可以看出,柚皮提取物在一定浓度下可以有效地抑制菜油的氧化,但不具有剂量-效应关系。浓度为 $500 \times 10^{-6}$ 时效果最好,且效果强于 $1000 \times 10^{-6}$ 的抗坏血酸和BHT,但当浓度增大到 $2000 \times 10^{-6}$ 时则表现出轻微的助氧化作用,抗坏血酸对柚皮提取物具有明显的协同增效作用。

## 2.2 柚皮提取物对正常小鼠血清SOD活力和MDA含量的影响

小鼠灌胃后,对照组和各剂量组体重增长无明显差异,说明柚皮提取物对小鼠的生长无不良影响。

表2 柚皮提取物对小鼠血清SOD活力和MDA含量的影响

组别	剂量 (mg/kg·d)	小鼠 只数	SOD活力 (NU/ml)	MDA含量 (nmol/ml)
柚皮提取物	100	8	118.90±55.2*	12.35±1.68*
	200	8	133.13±55.17*	10.74±1.72*
	400	10	154.69±18.49**	9.12±1.49**
对照	0	8	98.14±51.36	18.79±2.46

与对照组比较,\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ 。

从表2可以看出,给予柚皮提取物后各剂量组小鼠血清SOD活性均显著地高于对照组( $p<0.05$ ),且 $400 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量组达到显著水平( $p<0.01$ ),各剂量组血清MDA含量也显著的低于对照组( $p<0.05$ ), $400 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量组也达到极显著水平( $p<0.01$ )。且柚皮提取物提高正常小鼠血清SOD活力和降低MDA含量表现出剂量-效应关系。

## 2.3 柚皮提取物对正常小鼠免疫功能的影响

### 2.3.1 柚皮提取物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响

表3 柚皮提取物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的影响

组别	剂量 (mg/kg·d)	小鼠 只数	吞噬百分率 (%)	胸腺指数 (mg/g)	脾脏指数 (mg/g)
柚皮	100	10	13.25±2.78**	3.66±0.73*	3.1±1.08*
提取物	200	10	15.95±5.53**	4.20±0.89*	3.9±0.51*
对照	0	10	10.36±3.21	3.02±0.54	2.5±0.43

与对照组比较,\*\* $p<0.01$ ; \* $p<0.05$ 。

如表3所示,与对照组比较,柚皮提取物各剂量组小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞百分率均有提高,且呈剂量-效应关系。且柚皮提取物 $100$ 、 $200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 与对照组相比有极显著性差异( $p<0.01$ ),吞噬百分率分别提高了22.94%和53.96%(表3),表明柚皮提取物 $100$ 、 $200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量连续给药15d能明显增强小鼠巨噬细胞的吞噬功能,提示柚皮提取物可以增强小鼠的非特异性免疫功能。胸腺和脾脏为小鼠的免疫器官,各剂量组胸腺指数和脾脏指数均显著地高于对照组( $p<0.05$ ),说明柚皮提取物可以刺激小鼠免疫器官的发育,增强机体的免疫力。

表4 柚皮提取物对DNFB所致正常小鼠DTH反应的影响

组别	剂量 (mg/kg·d)	小鼠 只数	耳肿胀程度 mg ( $\bar{x} \pm s$ )	胸腺指数 (mg/g)	脾脏指数 (mg/g)
柚皮提取物	100	10	10.7±5.15*	3.70±0.72	5.07±0.65*
	200	10	11.13±2.63*	2.66±0.38	5.07±0.93*
对照	0	10	7.93±1.28	2.50±0.66	4.04±1.04

与对照组比较,\* $p<0.05$ 。

### 2.3.2 柚皮提取物对DNFB所致正常小鼠DTH反应的影响

柚皮提取物以 $100$ 、 $200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量对小鼠口服给药,与溶剂对照组相比较,各剂量组对小鼠的胸腺指数均无明显的影响,但可使小鼠脾脏指数增大( $p<0.05$ )。柚皮提取物 $100$ 、 $200 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$ 剂量组小鼠耳片肿胀度均增高,与对照组比较有显著差异( $p<0.05$ )。表明连续给药7d可显著增强DNFB所致的小鼠DTH反应。

## 3 结论

3.1 柚皮提取物在一定浓度下可以有效的抑制菜油的氧化,但是不具有剂量-效应关系。低浓度时( $500 \times 10^{-6}$ )的效果最好,且强于 $1000 \times 10^{-6}$ 的抗坏血酸和BHT,而在高浓度的情况下( $1000 \times 10^{-6}$ 、 $2000 \times 10^{-6}$ )反而有轻微的助氧化作用。抗坏血酸对柚皮提取物具有明显的协同增效作用。

3.2 柚皮提取物对小鼠的生长没有显著的副作用。柚皮提取物可以提高小鼠血清SOD活性,同时也降低了血清MDA的含量,且呈剂量-效应关系。说明柚皮提取物具有优异的体内抗氧化活性。

3.3 柚皮提取物对小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞百分率提高有一定作用,且呈剂量-效应关系。说明柚皮提取物可以增强小鼠的非特异性免疫功能;柚皮提取物可使DNFB所致小鼠皮肤DTH反应增强,并可刺激小鼠免疫器官(胸腺、脾脏)的发育,说明柚皮提取物对小鼠T细胞免疫功能具有增强作用。

## 参考文献:

- [1] 冯宝民,裴月湖.柚皮中的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2000,9(5):17.
- [2] 杨洋,韦小英.柚皮黄酮化合物提取方法及抗氧化性研究[J].食品与发酵工业,2002,28(6):9-12.
- [3] 丁小雯,等.柚皮及提取液抑制猪油氧化作用的研究[J].西南农业大学学报,2000,22(5):413-415.
- [4] 张海德,等.柚皮提取物的抗氧化作用研究[J].中国油脂,2001,26(4):54-58.
- [5] 韩雅珊.食品化学实验指导[M].北京农业大学出版社,1991.47-49.
- [6] 徐叔云.药理学实验方法学[M].人民卫生出版社,1991.
- [7] 王桂枝.免疫学实验指导[M].华中农业大学教务处印,1994.