

## 平阴玫瑰花色苷的鉴定及对 LPS/AGEs/4-HNE 诱导炎症的抑制

吕雯雯<sup>1</sup>, 吴 华<sup>2</sup>, 肖俊松<sup>1\*</sup>, 曹雁平<sup>1</sup>, 雷胜明<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>北京工商大学食品与健康学院 北京市食品添加剂工程技术研究中心

食品添加剂与配料北京高校工程研究中心 北京 100048

<sup>2</sup>北京工商大学化学与材料工程学院 北京 100048

<sup>3</sup>济南紫金玫瑰股份有限公司 济南 250000)

**摘要** 平阴玫瑰是我国山东特有的玫瑰花资源,于 2010 年被批准为新资源食品。本文提取并鉴定平阴玫瑰花中的花色苷,以脂多糖(LPS)、晚期糖基化终末产物(AGEs)、4-羟基壬烯醛(4-HNE)分别诱导 RAW264.7 巨噬细胞构建炎症模型,研究其对活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)生成及部分炎症因子表达的影响。结果表明:平阴玫瑰花色苷主要含有 2 种苷元,分别为矢车菊素和芍药色素;共鉴定出 6 种主要花色苷,分别为 3 种矢车菊素-二己糖苷、2 种芍药素-二己糖苷及芍药素-芸香糖-己糖苷。花色苷能显著抑制 LPS、AGEs 和 4-HNE 诱导的 RAW264.7 细胞中 ROS 和 NO 的产生,显著抑制促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达,表现出较好的抑制炎症反应的效果。

**关键词** 平阴玫瑰;花色苷;鉴定;炎症;抑制;RAW264.7 细胞

**文章编号** 1009-7848(2023)12-0037-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.005

平阴玫瑰(Pingyin rose)为蔷薇属落叶灌木,是我国山东特有的玫瑰花资源。平阴玫瑰花作为食品食用已有千年历史,并于 2010 年被批准为新资源食品<sup>[1]</sup>。平阴玫瑰花中含有丰富的类黄酮、萜类、类固醇、生育酚和胡萝卜素等物质,其中花色苷是平阴玫瑰花瓣中的主要活性成分之一<sup>[2-4]</sup>。常见的天然花色色素有天竺葵色素(Pelargonidin)、飞燕草色素(Delphinidin)、矢车菊色素(Cyanidin)、牵牛花色苷(Petunidin)、芍药色素(Peonidin)和锦葵色素(Malvidin)等<sup>[5-6]</sup>。花色色素可与不同的糖基结合,形成花色苷。各种花色苷结构上的差异是由于配糖体上羟基和甲氧基数目和位置的不同,配糖体上结合的糖基数目、种类和位置的不同,或是羟基乙酰化及与糖基相连脂肪酸种类与数目的不同形成的<sup>[7]</sup>,这些差异决定花色苷生物学性状和功能的多样性。

平阴玫瑰花可加工为玫瑰鲜花饼、玫瑰花酱、玫瑰粉、玫瑰花苞茶、玫瑰饮料等多种普通和功能食品,这些食品中都有丰富的玫瑰花色苷<sup>[8]</sup>。花色

苷具有较好的抗氧化性,可以有效清除多种活性氧自由基<sup>[9-10]</sup>。花色苷还可显著抑制 LPS 诱导的 THP-1 样巨噬细胞中 iNOS、COX-2 及 NO、PGE2 的表达,能显著下调 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的 mRNA 表达水平<sup>[11-12]</sup>。

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁组分,是主要的病原相关识别模式分子(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),通过细胞膜上的模式识别受体(Pattern Recognition Receptors, PRR),如 TLR4,诱导活性氧和炎症因子<sup>[13-14]</sup>。4-HNE 和 AGEs 是主要的损伤相关模式识别分子(Damage-associated molecular patterns, DAMPs),可能通过植物凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1),晚期糖基化终端产物受体(RAGE)等 PRR 类型的受体结合介导炎症反应<sup>[15-17]</sup>。这 3 种食品和人体内常见的促炎因子通过不同受体和通路介导氧化应激和炎症反应。平阴玫瑰花色苷对这些通路的氧化应激和炎症是否有缓解功能,目前尚不清楚。

本文以平阴玫瑰为原料,采用有机试剂法提取其花色苷成分,通过大孔树脂层析,乙酸乙酯萃取和中压柱层析纯化,UPLC 结合 ESI/MS 鉴定平阴玫瑰中的花色苷组分。分别以 LPS、AGEs、4-HNE 诱导 RAW264.7 细胞炎症,比较平阴玫瑰花

收稿日期: 2022-12-08

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6212002);北京市教委一般项目(KM202010011010)

第一作者: 吕雯雯,女,博士生

通信作者: 肖俊松 E-mail: xiaojun@th.btbu.edu.cn

色苷对 RAW264.7 细胞氧化应激和炎症水平影响的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

平阴玫瑰鲜花于 2018 年 5 月采自山东平阴, 经园艺林学专业吴华博士鉴定为平阴玫瑰。RAW264.7 小鼠巨噬细胞系购于中科院上海细胞库。

甲醇(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、乙酸乙酯,北京化工厂;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),北京迈瑞达科技有限公司;盐酸,赛默飞世尔科技公司;AB-8 型大孔树脂,上海源叶生物科技有限公司;Sepacore 12 g C18 快速色谱柱,瑞士 BUCHI 仪器公司;DMEM 培养基,胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、谷氨酰胺,德国 GIBCO 公司;磷酸缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS),德国 Hy-Clone 公司;一氧化氮检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;噻唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT),碧云天生物技术研究所;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)、大肠杆菌脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorodiacetate, DCFH-DA),美国 Sigma 试剂公司;十二烷基硫酸钠(Sodium lauryl sulfate, SDS),上海麦克林生化科技有限公司;TransZol Up 裂解液、RT-PCR 试剂盒,全式金生物技术有限公司。晚期糖基化终末产物(Advanced glycation end products, AGEs),北京拜尔迪生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

JJ600Y 精密电子天平,美国双杰公司;ACQUITY 超高效液相色谱-质谱联用仪,美国 WATERS 公司;Q5000 紫外可见分光光度计,美国 QUAWELL 公司;Infinite M2000PRO 多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司;CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪,美国伯乐公司;9700 型 PCR 扩增仪,美国 ABI 公司;CKX31 倒置生物显微镜,奥林巴斯公司;BSA124S-CW 分析天平,德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;NU-4750E CO<sub>2</sub> 细胞培养箱,美国 NUSIRE 公司;V-700 真空泵、R210 旋

转蒸发仪、C-620 中压制备色谱层析仪,瑞士 BUCHI 仪器公司;HH-2 恒温水浴锅,至翔科教仪器;Alpha 2-4 LD plus 冷冻干燥机,德国 CHRIST 冻干机有限公司;Sigma 1-14K 小型台式冷冻离心机,德国 SIGMA 公司;DL-S105 迷你涡旋混合器,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;MINI Q 迷你掌上离心机,北京五洲东方科技发展有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 玫瑰花色苷的提取 本试验选用新鲜的平阴玫瑰花,仅摘取花瓣,准确称量 100.0 g,以体积分数为 0.1%的盐酸甲醇溶液为浸提液,料液比 1:10(g/L),50℃下避光水浴 2 h。用 BUCHI V-700 真空泵抽滤,得到花色苷提取液,然后用 BUCHI R210 旋转蒸发仪对提取液进行旋蒸浓缩,得到花色苷粗提液。

1.3.2 玫瑰花色苷的纯化 花色苷粗提液经 AB-8 大孔吸附树脂吸附后用纯甲醇洗脱,收集花色苷组分,40℃下减压旋蒸浓缩后,与乙酸乙酯按 1:2 比例萃取 12 h,萃取 2 次。收集萃取后的溶液,用 Alpha 2-4 LD plus 冷冻干燥机冻干,得到初步纯化后的花色苷粉末。

将花色苷粉末溶于甲醇,使用 BUCHI C-620 中压制备色谱层析仪进一步纯化。色谱柱为 Sepacore C18 闪柱,流动相 A 为纯水、B 为甲醇。梯度洗脱:1 min-5% B;5 min-5% B;6 min-15% B;9 min-15% B;10 min-50% B;15 min-50% B。流速 10 mL/min,检测波长 520 nm。

根据色谱峰收集花色苷洗脱液并合并,40℃下减压旋蒸浓缩,冷冻干燥,所得花色苷样品用于结构分析和细胞实验。

1.3.3 玫瑰花色苷的成分鉴定 使用 Waters ACQUITY UPLC-ESI-MS, 鉴定平阴玫瑰花色苷成分。色谱分离采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)。流动相 A 为含 0.1%甲酸水溶液,B 为甲醇。梯度洗脱程序如下:5% B,0~2 min;5%~30% B,2~8 min;30%~90% B,8~10 min;90%~5% B,10~12 min。流动相流速为 0.4 mL/min,进样量 5 μL。PDA 检测器在 280 及 520 nm 处监测。

质谱使用 ESI 正离子模式,主要参数如下:毛

细管电压 3.50 kV, 锥孔电压 20 V, 锥孔气流量 60 L/h, 干燥气流速 1 000 L/h, 温度 500 °C, 全扫描模式, 扫描范围 50~1 700 *m/z*。

**1.3.4 细胞培养** RAW264.7 小鼠巨噬细胞系培养于含 10%(体积分数)FBS, 1%(体积分数) 丙酮酸钠和 1%(体积分数)谷氨酰胺的 DMEM 高糖完全培养基中, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 湿化气氛下置于细胞培养箱培养, 当细胞铺满培养瓶底部 80%(体积分数)时进行传代, 将培养至对数生长期的细胞用于后续试验。

**1.3.5 细胞活力检测** 采用 MTT 法检测平阴玫瑰花色苷、AGEs 及 4-HNE 对 RAW264.7 细胞活力的影响。采用 DMEM 高糖完全培养基将 RAW264.7 细胞调整为 1×10<sup>6</sup> cells/mL 的细胞悬液, 加入到 96 孔板中, 每孔 100 μL, 置于细胞培养箱中孵育, 至细胞汇合度达到 80%以上, 即可用于细胞活力检测。

移除 96 孔板孔中培养基, 加入用 PBS(pH 7.0) 配制的不同浓度的花色苷、AGEs 及 4-HNE 溶液孵育, 空白对照组加入 100 μL DMEM 高糖完全培养基, 在培养箱中孵育 24 h。孵育结束后, 移除培养基, 每孔加 100 μL DMEM 高糖完全培养基和 10 μL MTT, 继续孵育 4 h, 然后加入 100 μL SDS 溶液, 继续孵育 12 h。取出 96 孔板, 用 Infinite M2000 PRO 多功能酶标仪在 570 nm 处测量每孔吸光度, 计算细胞活力。

**1.3.6 活性氧 ROS 检测** 采用 1.3.5 节方法将 RAW264.7 细胞在 96 孔板中孵育至汇合度 80%以上, 加入不同浓度的花色苷溶液, 分别与 LPS、AGEs、4-HNE 共同孵育。24 h 后, 每孔加 10 μmol/L 的 DCFH-DA 100 μL, 继续孵育 30 min, PBS 洗 3 次去除游离 DCFH-DA, 再加 100 μL DMEM 高糖完全培养基, 最后采用 Infinite

M2000PRO 多功能酶标仪测量荧光强度 (激发波长 485 nm, 发射波长 530 nm)。

**1.3.7 NO 含量测定** 采用 1.3.5 节方法将 RAW264.7 细胞在 96 孔板中孵育至汇合度 80%以上, 加入不同浓度的花色苷溶液, 分别与 LPS、AGEs、4-HNE 共同孵育 24 h。吸取 96 孔板培养基上清, 按照 NO 检测试剂盒(南京建成)说明要求, 处理细胞上清液, 用 Infinite M2000PRO 多功能酶标仪在 550 nm 处测定吸光度, 计算细胞上清液中 NO 浓度。

**1.3.8 炎症因子表达水平的定量**

**1.3.8.1 总 RNA 的提取** 将 RAW264.7 巨噬细胞铺于 10 cm<sup>2</sup> 培养皿中, 细胞浓度 1×10<sup>6</sup> cells/mL, 每皿 4 mL, 培养 18 h 达到对数期后, 加入不同浓度的花色苷溶液, 再分别加入 LPS、AGEs、4-HNE 共同孵育 24 h, 然后每皿加入 1 mL Trizol 裂解液, 静置至细胞脱落, 加入 200 μL 氯仿, 颠倒混匀, 室温静置 5 min; 4 °C, 10 000×g 离心 15 min; 吸取上层无色溶液 400 μL, 加等量无水乙醇, 颠倒混匀; 按全式金 RNA 提取试剂盒说明纯化 RNA, 加入 50 μL 无 RNA 酶水, 静置 1 min 后 12 000×g 离心 1 min 得到 RNA 溶液, 在 Q5000 紫外可见分光光度计上测定 RNA 浓度。

**1.3.8.2 逆转录** 取 1.0 μg RNA, 65 °C 预变性 5 min; 加入 4×DN Master Mix 2 μL, 补加无 RNA 酶水至总体积 8 μL, 37 °C 反应 5 min; 加入 5×Mix II 2 μL, 按设定程序(37 °C, 15 min; 50 °C, 5 min; 98 °C, 5 min), 在 9700 型 PCR 扩增仪上进行反应, 获得的 cDNA 在 -20 °C 下保存备用。

**1.3.8.3 PCR 引物的设计** 根据基因库(Genbank) 上发表的 RAW264.7 细胞的炎症因子基因序列进行引物设计, 设计后的引物送至华大基因公司合成, 见表 1。

表 1 RAW264.7 巨噬细胞炎症因子的基因

Table 1 The gene of RAW264.7 macrophage inflammatory cytokine

基因		引物序列
IL-1β	R	5'-TGCAGAGTTCCCAACTGGTACATC-3'
	F	5'-GTGCTGCCTAATGTCCCTTGAATC-3'
IL-6	R	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'
	F	5'-AAGTGCATCATCGTTGTCATACA-3'
iNOS	R	5'-AATGGCAACATCAGGTCCGCCATCACT-3'
	F	5'-GCTGTGTGTCACAGAAAGTCTCGAACTC-3'
TNF-α	R	5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3'
	F	5'-TACAGGCTTGTCACACTCGAATT-3'

1.3.8.4 PCR反应体系 在离心管中加入1  $\mu\text{L}$  cDNA模板,3  $\mu\text{L}$  无RNA酶水,5  $\mu\text{L}$  SYBR染料,0.5  $\mu\text{L}$  上游引物,0.5  $\mu\text{L}$  下游引物,混匀后用MINI Q迷你掌上离心机离心,离心后在CFX96 Touch实时荧光定量PCR仪上进行反应。PCR反应程序如下:

第1阶段:95  $^{\circ}\text{C}$ ,30 s;

第2阶段:95  $^{\circ}\text{C}$ ,5 s;57  $^{\circ}\text{C}$ ,30 s;40个循环;

第3阶段:95  $^{\circ}\text{C}$ ,15 s;60  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min;95  $^{\circ}\text{C}$ ,15 s。

#### 1.4 数据统计分析

数据采用EXCEL 2017及SPSS 17.0软件进行统计分析,结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示,采用 $t$ 检验进行显著性分析,用OriginPro 8.5.1进行绘图, $P<0.05$ 表示差异显著。试验重复3次。

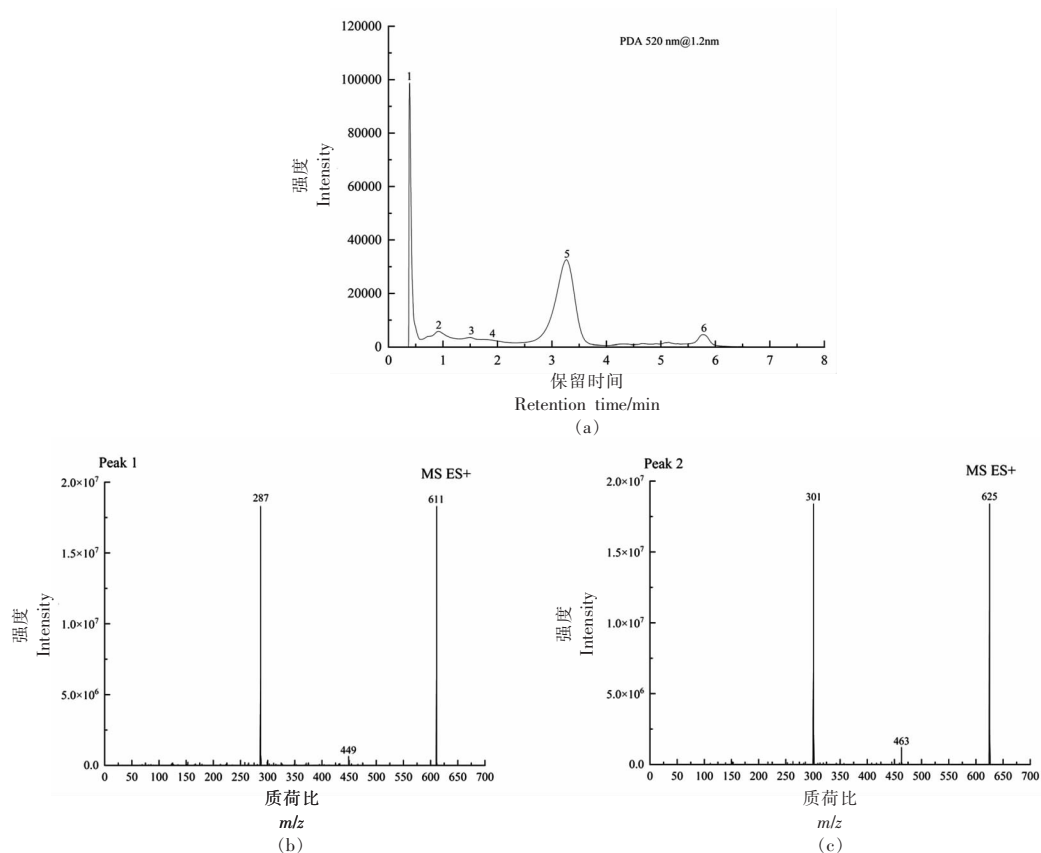
## 2 结果与分析

### 2.1 平阴玫瑰花色苷成分的鉴定结果

100.0 g平阴玫瑰鲜花花瓣,经0.1%盐酸甲醇溶液浸提、AB-8大孔吸附树脂吸附、乙酸乙酯萃取纯化、旋蒸浓缩、冷冻干燥后得到花色苷粉末0.64 g,平阴玫瑰花色苷提取率为0.64%。

纯化后的花色苷用UPLC-ESI-MS进行分析鉴定,根据各色谱峰的紫外吸收光谱、质谱、保留时间等信息,结合文献报道,确定平阴玫瑰提取物中的花色苷成分。下图为平阴玫瑰花色苷的UPLC图谱(图1a)以及各色谱峰对应的质谱图(图1b~1g)。

如图1及表2所示,平阴玫瑰中共鉴定出6种花色苷。峰1、峰3与峰4的一级质谱离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 $m/z$  611,碎片离子为 $m/z$  449和 $m/z$  287,其中碎片离子 $m/z$  449是由于失去1分子葡萄糖或半乳糖 $[\text{M}-162]^+$ 得到的, $m/z$  287是矢车菊素的相对分子质量(失去2分子葡萄糖或半乳糖所得),结合文献[18-20]推测峰1、峰3和峰4均为矢车菊素-二己糖苷,由于糖苷部分通过质谱无法确定,因此峰1、峰3和峰4分别记为矢车菊素-二己糖苷A、矢车菊素-二己糖苷B和矢车菊素-二己糖苷C。峰2和峰5的一级质谱离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 $m/z$  625,碎片离子为 $m/z$  463和 $m/z$  301,其中碎片离子 $m/z$  463是由于失去1分子葡萄糖或半乳糖 $[\text{M}-162]^+$ 得到的, $m/z$  301是芍药素的相对分子质量(失去2分子葡萄糖或半乳糖所得),结合



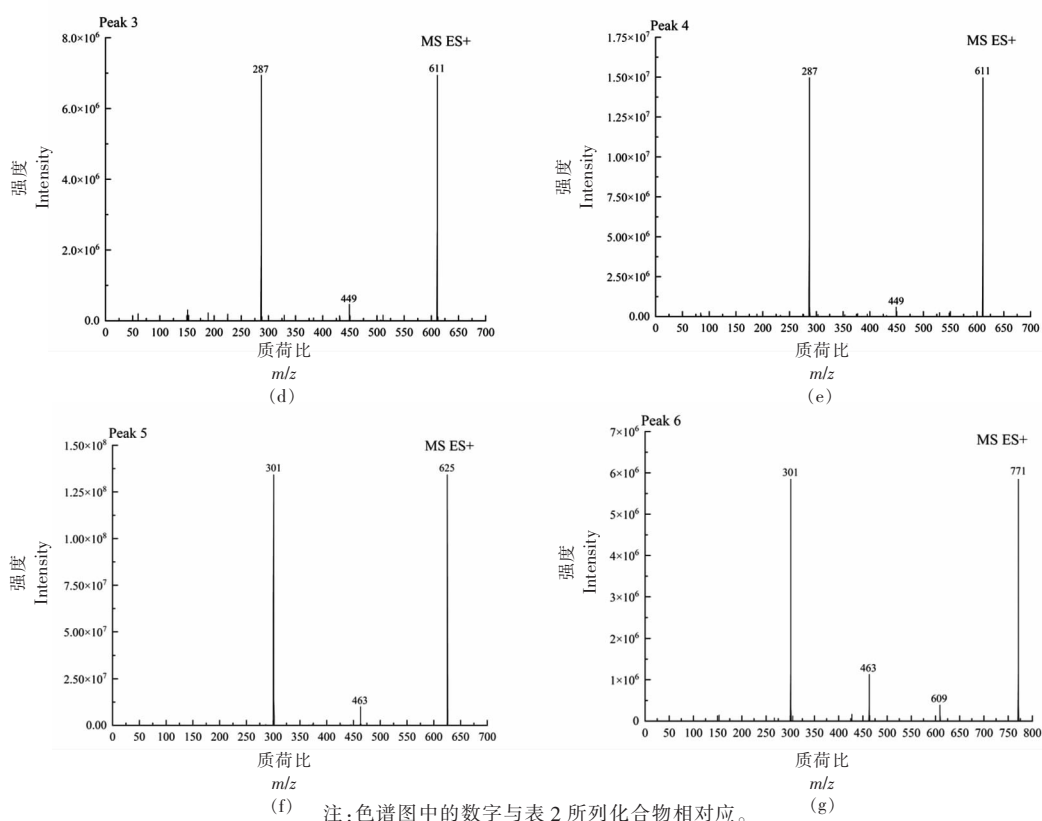


图 1 玫瑰花色苷的 UPLC 图谱(a)及质谱分析(b-g)

Fig.1 UPLC spectrum (a) and mass spectrometry analysis (b-g) of rose anthocyanin

文献[21-22]推测峰 2 和峰 5 均为芍药素-二己糖苷,分别记为芍药素-二己糖苷 A 和芍药素-二己糖苷 B。峰 6 的一级质谱离子为  $m/z$  771 $[M+H]^+$ , 碎片离子为  $m/z$  609,  $m/z$  463 和  $m/z$  301, 其中碎片离子  $m/z$  609 是由于失去 1 分子葡萄糖  $[M-$

162] $^+$ 得到的,  $m/z$  463 是由于失去 1 分子芸香糖苷  $[M-308]^+$ 得到的,  $m/z$  301 是芍药素的相对分子质量(失去 1 分子己糖和芸香糖苷所得), 结合文献[23-24]推测峰 6 为芍药素-芸香糖-己糖苷。

表 2 玫瑰花色苷成分鉴定结果

Table 2 Identification results of rose anthocyanin

峰号	保留时间/min	$[M+H]^+ / m \cdot z^{-1}$	子离子/ $m \cdot z^{-1}$	花色苷名称
1	0.38	611	287 449	矢车菊素-二己糖苷 A
2	0.92	625	301 463	芍药素-二己糖苷 A
3	1.51	611	287 449	矢车菊素-二己糖苷 B
4	1.73	611	287 449	矢车菊素-二己糖苷 C
5	3.27	625	301 463	芍药素-二己糖苷 B
6	5.76	771	301 463 609	芍药素-芸香糖-己糖苷

## 2.2 玫瑰花色苷/AGEs/4-HNE 对 RAW264.7 巨噬细胞活力的影响

采用 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{g/mL}$  的平阴玫瑰花色苷处理 RAW264.7 细胞, 研究花色苷

对 RAW264.7 细胞活力的影响。如图 2 所示, 当花色苷质量浓度低于 7.5  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力大于 90%, 对 RAW264.7 细胞活力无显著影响。当花色苷质量浓度大于 10  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力均显著降

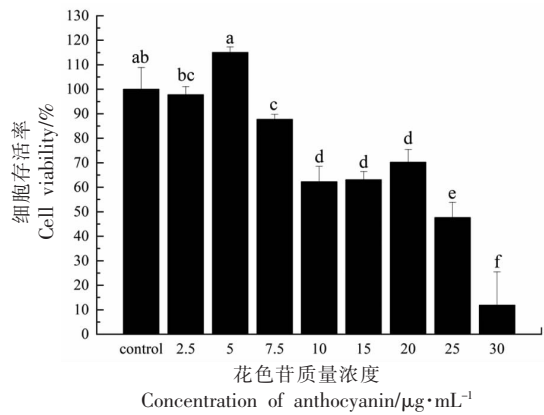


图2 不同浓度玫瑰花色苷对 RAW264.7 细胞活性的影响 ( $P<0.05$ )

Fig.2 Effects of different concentrations of rose anthocyanin on RAW264.7 cell activity ( $P<0.05$ )

低 ( $P<0.05$ ), 说明过高浓度花色苷对细胞会产生一定的毒性, 从而降低细胞活力。因此, 选择 1, 2.5, 5, 7.5  $\mu\text{g/mL}$  花色苷浓度进行后续试验, 评价平阴玫瑰花色苷对 RAW264.7 细胞的抗炎抗氧化作用。

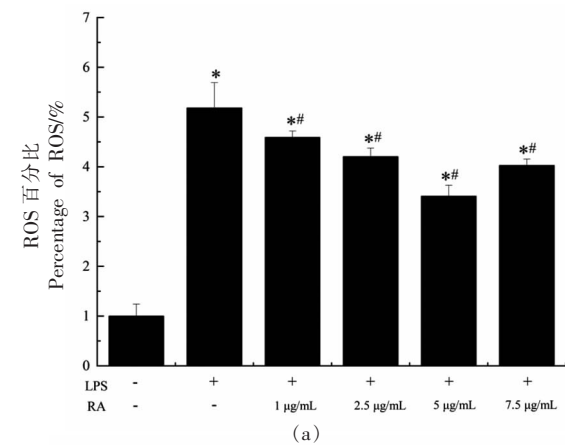
### 2.3 花色苷对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞氧化应

#### 激及炎症水平的影响

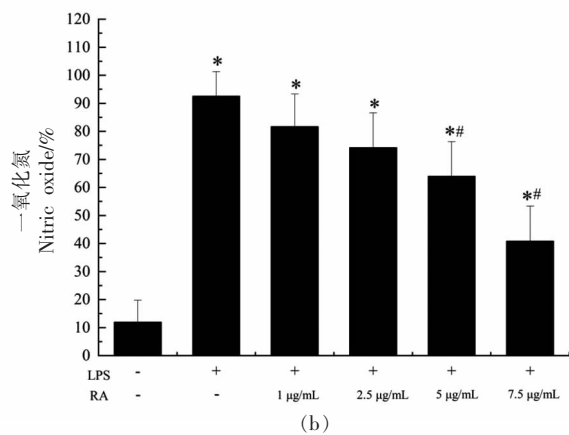
采用 1, 2.5, 5, 7.5  $\mu\text{g/mL}$  的花色苷浓度与 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS<sup>[25-26]</sup> 共同处理 RAW264.7 细胞, 测定花色苷对 RAW264.7 细胞氧化应激及炎症水平的影响。如图 3a, 3b 所示, LPS 刺激后, RAW264.7 细胞释放 ROS 和 NO 水平显著增加 ( $P<0.05$ )。ROS 与 NO 释放量的增加一定程度上说明了 RAW264.7 细胞氧化应激水平的增加。与 LPS 组相比, 花色苷处理可显著降低 ROS 水平 ( $P<0.05$ ), 花色苷质量浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时, 抑制 ROS 释放的作用最强。花色苷抑制细胞 NO 生成的效果随花色苷浓度的增加而增加, 表现出剂量效应 ( $P<0.05$ )。

细胞炎症因子表达结果如图 3c~3f 所示, LPS 刺激后, 细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 浓度显著增加 ( $P<0.05$ )。与 LPS 组相比, 花色苷处理可显著降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达 ( $P<0.05$ ), 并表现出剂量效应。

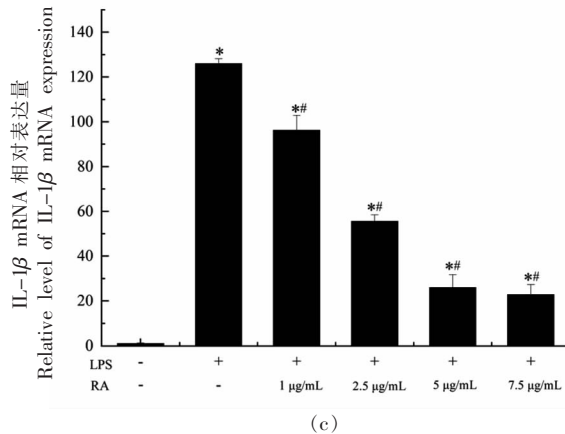
上述结果说明, 花色苷可抑制 LPS 诱导的 ROS 和 NO 的生成及细胞炎症因子的表达, 具有一定的抗氧化及抗炎作用。



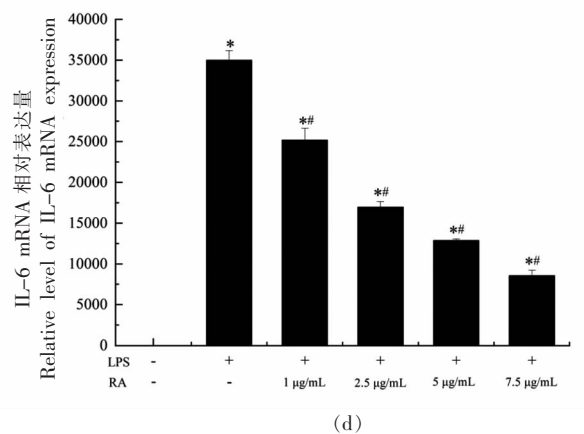
(a)



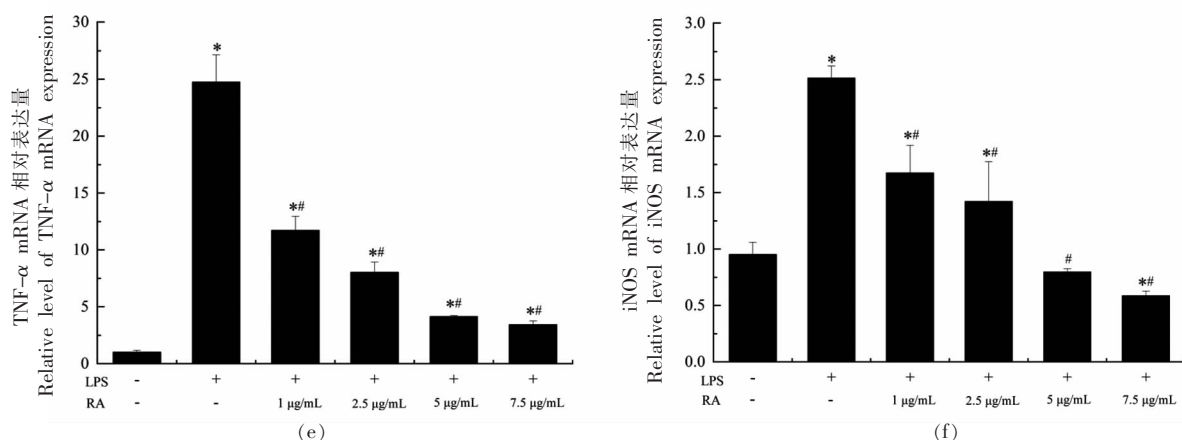
(b)



(c)



(d)



注: \* $P < 0.05$  vs 空白对照; # $P < 0.05$  vs LPS。

图 3 不同浓度玫瑰花色苷对 LPS 处理的 RAW264.7 细胞 ROS(a)、NO(b) 及炎症因子 IL-1 $\beta$ (c)、IL-6(d)、TNF- $\alpha$ (e)、iNOS(f) 的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of rose anthocyanin on ROS(a), NO(b) and inflammatory factors IL-1 $\beta$ (c), IL-6(d), TNF- $\alpha$ (e), iNOS(f) in RAW264.7 cells induced by LPS

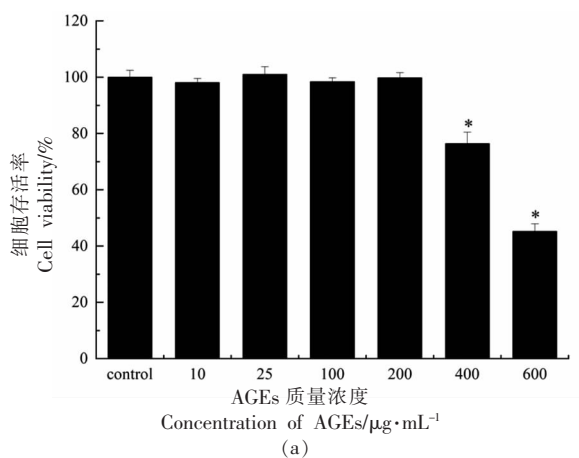
#### 2.4 AGEs 诱导 RAW264.7 细胞炎症的浓度选择

采用 10, 25, 100, 200, 400, 600  $\mu\text{g/mL}$  的 AGEs 处理 RAW264.7 细胞, 研究 AGEs 对 RAW264.7 细胞活力的影响。如图 4a 所示, 当 AGEs 质量浓度低于 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力大于 90%, 对 RAW264.7 细胞活力无显著影响。当 AGEs 质量浓度大于 400  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 说明过高浓度 AGEs 对细胞会产生一定的毒性, 从而降低细胞活力。因此, 选择对细胞活力无影响的 AGEs 浓度建立炎症模型。从图 4b、4c 中可以看出, AGEs 质量浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 可以显著增加 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达, 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症。因此, 选择 200  $\mu\text{g/mL}$  AGEs 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症, 并评价平阴玫瑰花色

苷对 AGEs 诱导 RAW264.7 细胞氧化应激和炎症水平的影响。

#### 2.5 花色苷对 AGEs 诱导 RAW264.7 细胞氧化应激及炎症水平的影响

采用 1, 2.5, 5, 7.5  $\mu\text{g/mL}$  的花色苷质量浓度与 200  $\mu\text{g/mL}$  AGEs 共同处理 RAW264.7 细胞, 测定花色苷对 RAW264.7 细胞氧化应激及炎症水平的影响。如图 5a、5b 所示, AGEs 刺激后, RAW264.7 细胞释放 ROS 和 NO 水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。与 AGEs 组相比, 花色苷处理可显著抑制 ROS 的生成 ( $P < 0.05$ ), 并表现出剂量效应。但花色苷抑制 NO 生成的效果不显著, 花色苷质量浓度为 7.5  $\mu\text{g/mL}$  时, 具有一定抑制 NO 生成的作用。有理由推测, 花色苷主要通过降低 ROS 的生成抑制



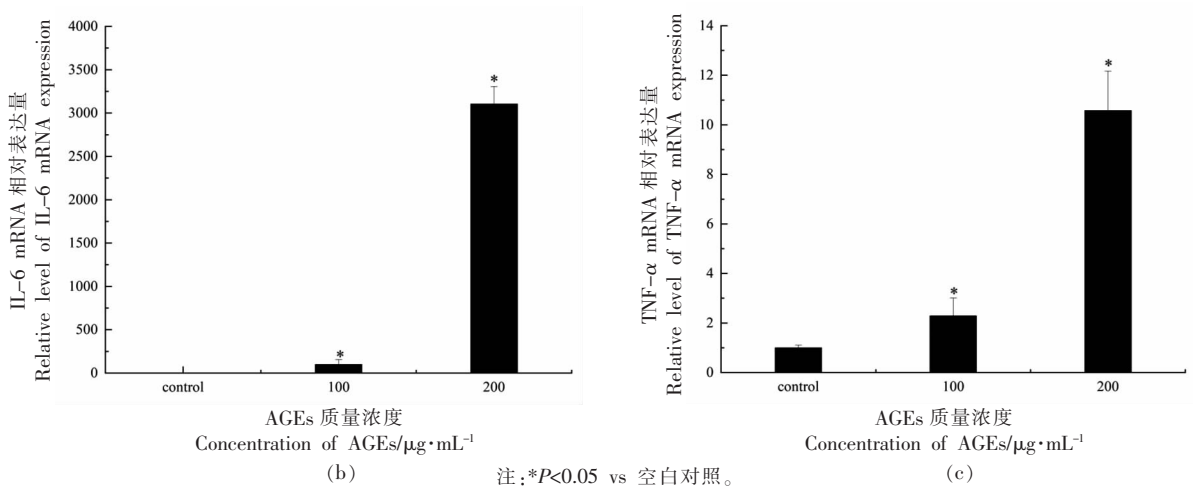


图4 不同浓度 AGEs 对 RAW264.7 细胞活性(a)及炎症因子 IL-6(b)、TNF- $\alpha$ (c)的影响

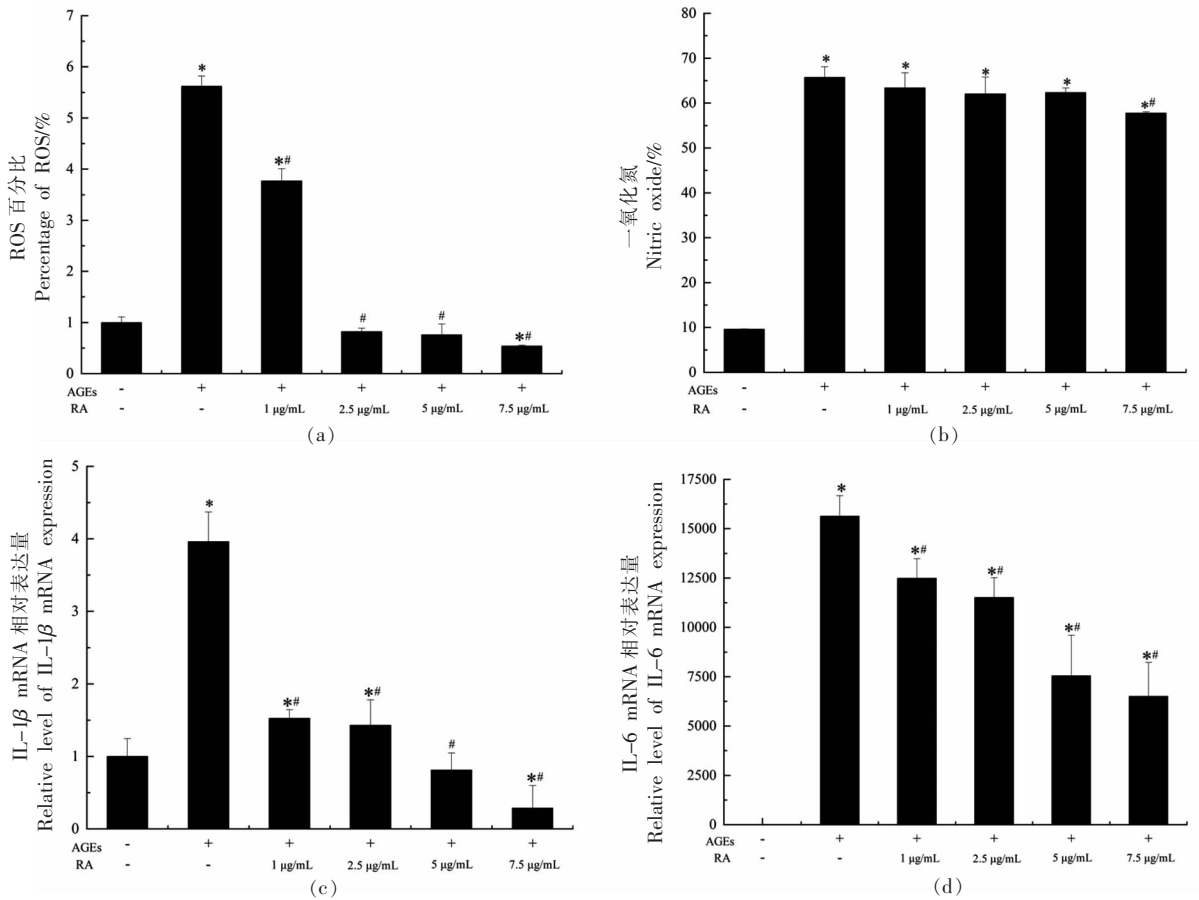
Fig.4 Effects of different concentrations of AGEs on RAW264.7 cell activity(a) and inflammatory factors IL-6(b), TNF- $\alpha$ (c)

AGEs 诱导的 RAW264.7 细胞氧化应激。

细胞炎症因子表达结果如图 5c~5f 所示, AGEs 刺激后,细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 浓度显著增加( $P < 0.05$ )。与 AGEs 相比,花色苷处理可显著降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的

表达( $P < 0.05$ ),并表现出剂量效应。

上述结果说明,花色苷可抑制 AGEs 诱导的 ROS、NO 生成及细胞炎症因子的表达,具有一定的抗氧化及抗炎作用。





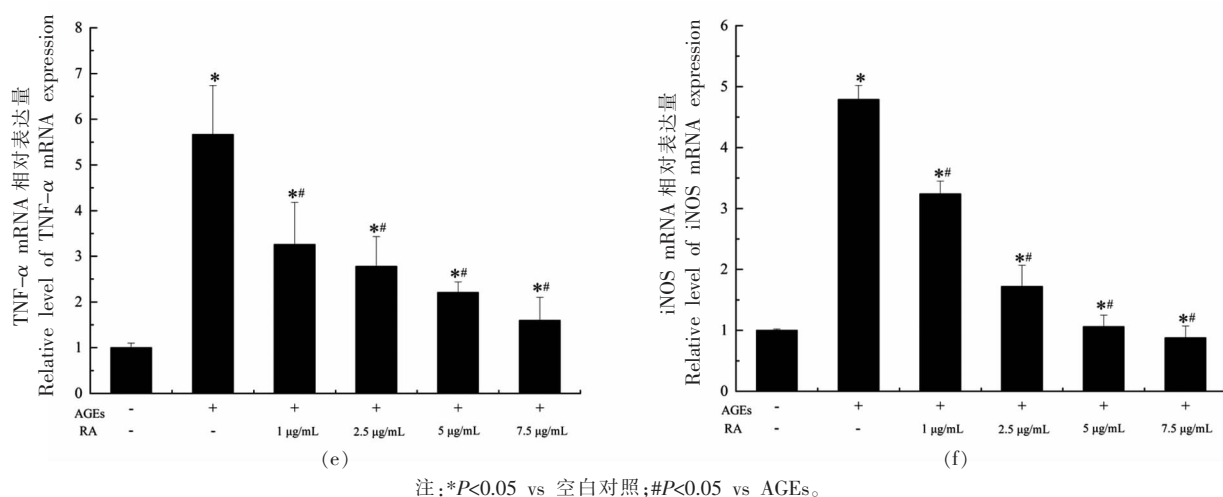


图 5 不同浓度玫瑰花色苷对 AGEs 处理的 RAW264.7 细胞 ROS(a)、NO(b)及细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ (c)、IL-6(d)、TNF- $\alpha$ (e)、iNOS(f)的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of rose anthocyanin on ROS(a), NO(b) and inflammatory factors IL-1 $\beta$ (c), IL-6(d), TNF- $\alpha$ (e), iNOS(f) in RAW264.7 cells induced by AGEs

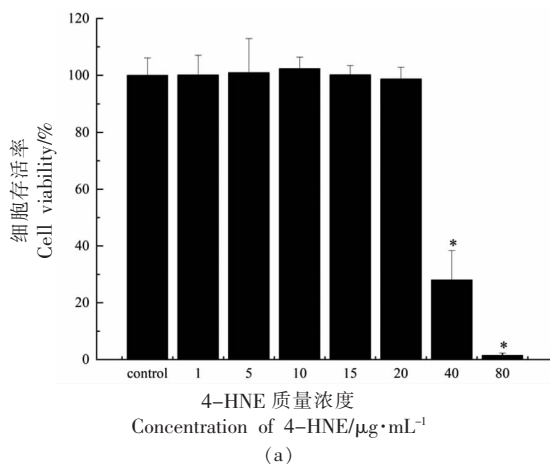
## 2.6 4-HNE 诱导 RAW264.7 细胞炎症的浓度选择

采用 1, 5, 10, 15, 20, 40, 80  $\mu\text{g/mL}$  的 4-HNE 处理 RAW264.7 细胞, 研究 4-HNE 对 RAW264.7 细胞活力的影响。如图 6a 所示, 当 4-HNE 质量浓度低于 20  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力大于 90%, 对 RAW264.7 细胞活力无显著影响。当 4-HNE 质量浓度大于 40  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞活力均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 说明过高浓度 4-HNE 对细胞会产生一定的毒性, 从而降低细胞活力。因此, 选择对细胞活力无影响的 4-HNE 浓度建立炎症模型。从图 6b, 6c 中可以看出, 4-HNE 质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时, 可以显著增加 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达, 刺激 RAW264.7 细胞产生炎症。因此, 选择 10  $\mu\text{g/mL}$  4-HNE 刺

激 RAW264.7 细胞产生炎症, 并评价平阴玫瑰花色苷对 4-HNE 诱导 RAW264.7 细胞氧化应激和炎症水平的影响。

## 2.7 花色苷对 4-HNE 诱导的 RAW264.7 细胞氧化应激及炎症水平的影响

采用 1, 2.5, 5, 7.5  $\mu\text{g/mL}$  的花色苷质量浓度与 10  $\mu\text{g/mL}$  4-HNE 共同处理 RAW264.7 细胞, 测定花色苷对 RAW264.7 细胞氧化应激及炎症水平的影响。如图 7a 所示, 4-HNE 刺激后, RAW264.7 细胞释放 ROS 水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。与 4-HNE 组相比, 花色苷处理可显著抑制 ROS 的生成 ( $P < 0.05$ ), 并表现出剂量效应。有理由推测, 花色苷主要通过降低 ROS 的生成抑制 4-HNE 诱



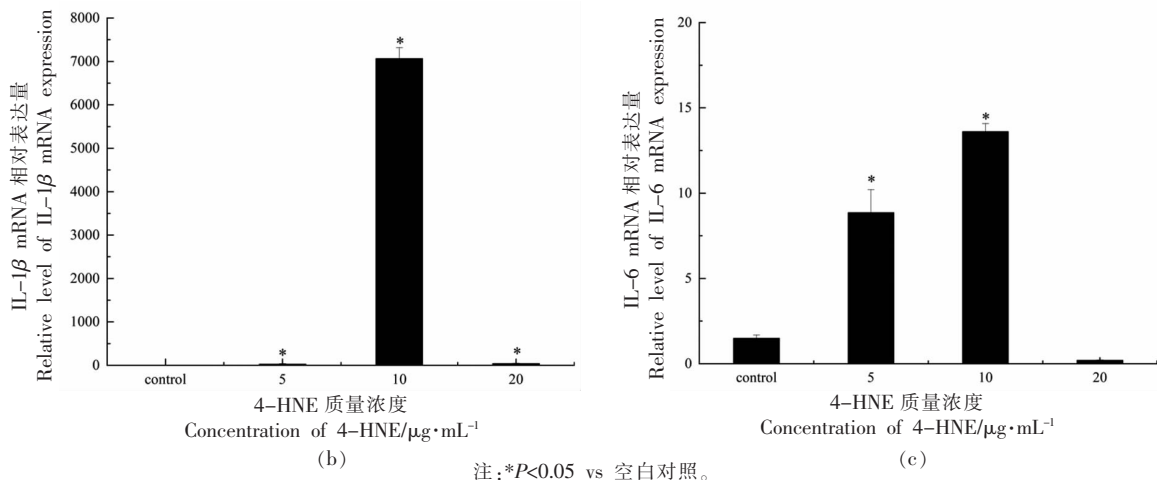


图6 不同浓度4-HNE对RAW264.7细胞活性(a)及炎症因子IL-1β(b)、IL-6(c)的影响

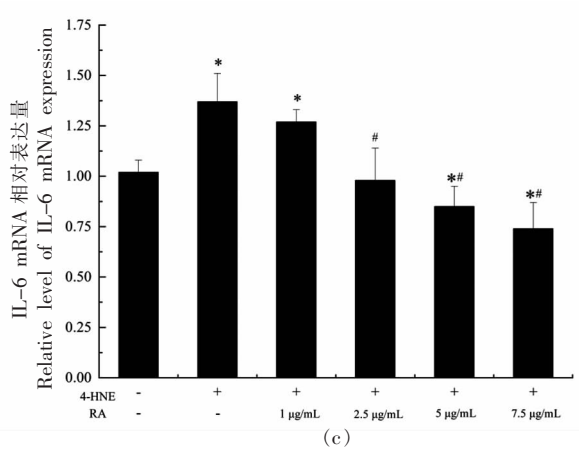
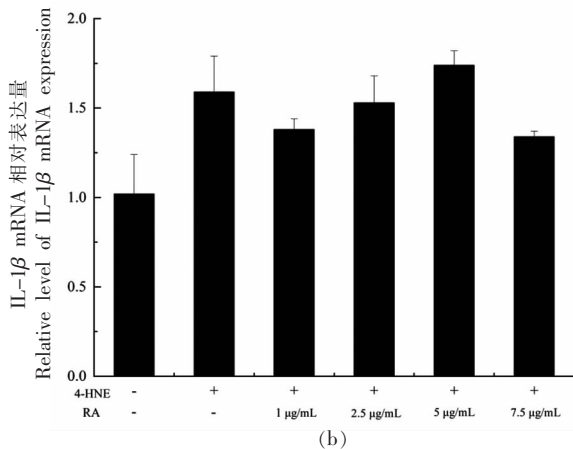
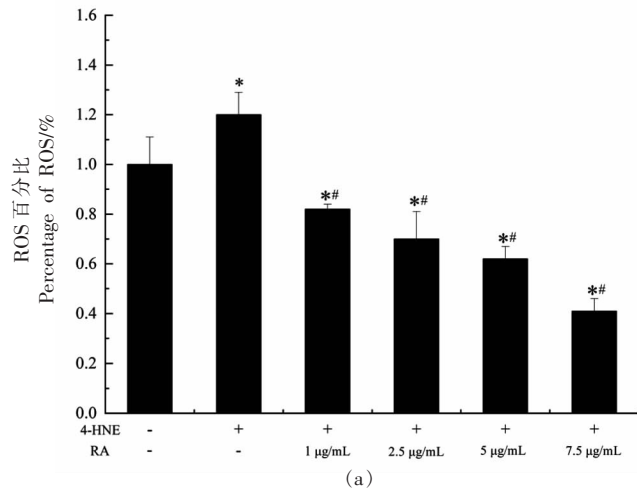
Fig.6 Effects of different concentrations of 4-HNE on RAW264.7 cell activity (a) and inflammatory factors IL-1β(b), IL-6(c)

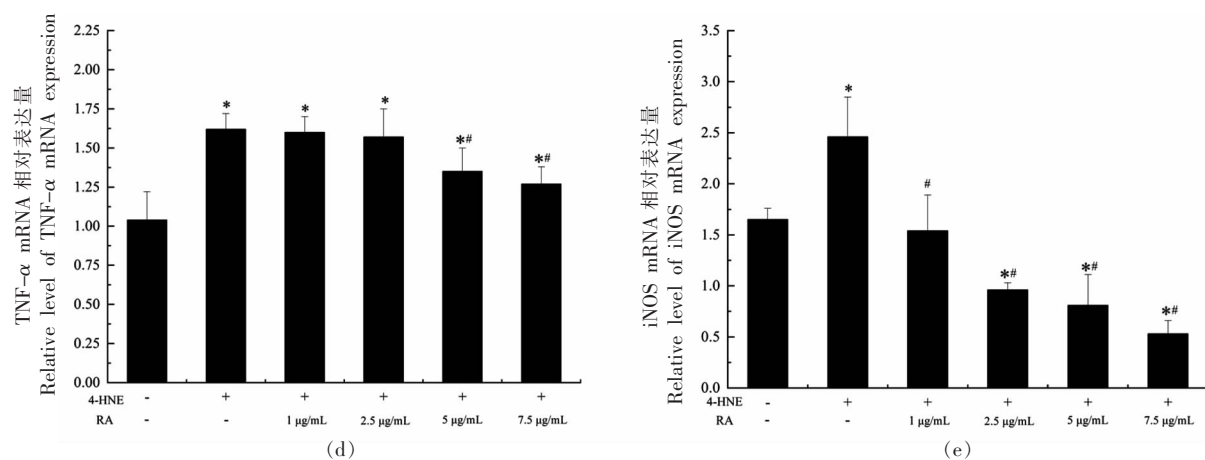
导的RAW264.7细胞氧化应激。

细胞炎症因子表达结果如图7b~7e所示,4-HNE刺激后,细胞炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS浓度显著增加( $P < 0.05$ )。与4-HNE组相比,花色苷对IL-1β的抑制效果不明显,但花色苷处

理可显著降低IL-6、TNF-α、iNOS的表达( $P < 0.05$ ),并表现出剂量效应。

上述结果说明,花色苷可抑制4-HNE诱导的ROS生成及细胞炎症因子IL-6、TNF-α、iNOS的表达,具有一定的抗氧化及抗炎作用。





注: \* $P < 0.05$  vs 空白对照; # $P < 0.05$  vs 4-HNE。

图 7 不同浓度玫瑰花色苷对 4-HNE 处理的 RAW264.7 细胞 ROS(a) 及细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ (b)、IL-6(c)、TNF- $\alpha$ (d)、iNOS(e) 的影响

Fig.7 Effects of different concentrations of rose anthocyanin on ROS(a) and inflammatory factors IL-1 $\beta$ (b), IL-6(c), TNF- $\alpha$ (d), iNOS(e) in RAW264.7 cells induced by 4-HNE

### 3 讨论

花色苷具有良好的抗氧化和抗炎作用,广泛存在于植物的花瓣、果实等器官中,本试验采用的平阴玫瑰是我国特有的玫瑰资源,花瓣中含有丰富的花色苷组分。本研究采用有机试剂法提取平阴玫瑰中的花色苷组分,通过大孔树脂层析,乙酸乙酯萃取和中压柱层析进行纯化,UPLC 结合 ESI/MS 分析鉴定,得到平阴玫瑰花色苷主要含有 2 种苷元(矢车菊素和芍药色素),6 种花色苷(3 种矢车菊素-二己糖苷、两种芍药素-二己糖苷及芍药素-芸香糖-己糖苷)。在此基础上,评价平阴玫瑰花色苷对 3 种食品和人体内常见的炎症刺激物(LPS、AGEs、4-HNE)诱导 RAW264.7 细胞氧化应激和炎症水平影响的差异。

本研究显示,不同炎症刺激物诱导细胞氧化应激的方式不同,而平阴玫瑰花色苷抑制氧化应激的途径也不同。LPS 和 AGEs 可通过刺激 ROS 和 NO 生成诱导细胞氧化应激,但 4-HNE 仅刺激 ROS 生成诱导细胞氧化应激,不影响 NO 的释放。花色苷可抑制 LPS 诱导的 ROS 和 NO 的生成,但主要通过降低 ROS 的生成抑制 AGEs 和 4-HNE 诱导的 RAW264.7 细胞氧化应激,且呈剂量依赖效应。3 种炎症刺激物 LPS、AGEs 和 4-HNE 均可通过刺激炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达诱导 RAW264.7 细胞炎症反应,而平阴玫瑰

花色苷抑制细胞炎症的作用效果也不同。花色苷可显著抑制 LPS、AGEs 诱导的细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达,可抑制 4-HNE 诱导的细胞炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达,且呈剂量依赖效应。因此,有理由推测平阴玫瑰花色苷对 LPS、AGEs 诱导细胞氧化应激和炎症水平的抑制效果优于 4-HNE。目前,关于花色苷抑制 LPS 诱导细胞炎症的报道较多,Li 等<sup>[27]</sup>从红树莓中提取花色苷并评估其对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的作用,发现花色苷可以显著抑制 NO 生成和 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达,抑制细胞炎症。Xu 等<sup>[28]</sup>发现从蓝莓中提取的花色苷可以显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应,降低 NO 的产生,抑制细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达。但是还未见有花色苷对于 AGEs 和 4-HNE 诱导细胞炎症作用的相关报道。结合本研究结果,可见花色苷对于不同炎症刺激物诱导细胞炎症的抑制途径不同,打破了人们采用 LPS 构建细胞炎症模型的局限性。

综上所述,平阴玫瑰花色苷可有效抑制 LPS、AGEs、4-HNE 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 ROS、NO 的释放及炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达,发挥抗炎抗氧化作用,但对于不同炎症刺激物,花色苷的抗炎及抗氧化作用不完全一样,其具体的抗炎抗氧化机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 孙冠丛, 邹星月, 赵望锋, 等. 平阴玫瑰产业发展现状及建议[J]. 现代农业科技, 2021, 1: 246-248.  
SUN G C, ZOU X Y, ZHAO W F, et al. Development status and suggestions of Pingyin rose industry[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2021, 1: 246-248.
- [2] 李子江. 平阴玫瑰花花色苷提取工艺及性质的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2010: 12-14.  
LI Z J. Study on the extraction technology and properties of anthocyanins from Pingyin rose[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2010: 12-14.
- [3] 牛小杰, 孙鲁阳. 黑豆中花色苷的研究进展[J]. 现代农业研究, 2021, 27(11): 48-49.  
NIU X J, SUN L Y. Progress in colorsides in black beans[J]. Modern Agricultural Research, 2021, 27(11): 48-49.
- [4] 张岩, 赵遵乐, 邹琴艳, 等. 超声辅助提取酿酒葡萄皮渣花色苷工艺的优化及4个品种花色苷组分分析[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(3): 181-189.  
ZHANG Y, ZHAO Z L, ZOU Q Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from grape skin residue and the analysis of anthocyanins components in four cultivars[J]. China Food Additives, 2022, 33(3): 181-189.
- [5] 张艳艳, 黄玉舟, 李丽, 等. 花色苷的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2019, 15: 155.  
ZHANG Y Y, HUANG Y Z, LI L, et al. Research progress of anthocyanins [J]. Food Safety Guide, 2019, 15: 155.
- [6] 王化, 周丽萍, 于志民, 等. 花色苷的提取及分析研究进展[J]. 国土与自然资源研究, 2018, 6: 85-88.  
WANG H, ZHOU L P, YU Z M, et al. Extraction techniques and analysis of anthocyanins[J]. Territory & Natural Resources Study, 2018, 6: 85-88.
- [7] 陈曦, 全争, 王渝, 等. 花色苷的功能及其稳态化保持技术研究进展[J]. 农产品加工, 2021, 22: 57-60, 65.  
CHEN X, TONG Z, WANG Y, et al. Research progress of the health functions of anthocyanin and its stable maintenance technology[J]. Farm Products Processing, 2021, 22: 57-60, 65.
- [8] 张静菊, 解洪涛, 郭永来. 蓬勃发展的平阴玫瑰产业[J]. 生命世界, 2020, 8: 34-36.  
ZHANG J J, XIE H T, GUO Y L. The booming Pingyin rose industry[J]. Life World, 2020, 8: 34-36.
- [9] 王月, 赵彦巧, 李建颖. 超声辅助提取紫苏叶花色苷及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(4): 128-135.  
WANG Y, ZHAO Y Q, LI J Y. Ultrasonic-assisted extraction of anthocyanins from perilla leaves and antioxidant activity analysis [J]. Food Research and Development, 2022, 43(4): 128-135.
- [10] M TERESA SATUÉGRACIA, MARINA HEINONEN A, FRANKEL E N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin?liposome systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(9): 3362-3367.
- [11] 王庆, 胡艳, 刘驰, 等. 花色苷对脂多糖诱导巨噬细胞炎症反应的影响[J]. 营养学报, 2009, 31(4): 366-369.  
WANG Q, HU Y, LIU C, et al. Effects of anthocyanin on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages [J]. Journal of Nutrition, 2009, 31(4): 366-369.
- [12] 谭兵, 庞琪期, 钱波, 等. 紫甘蓝总花色苷提取物抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞的炎症反应[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 8-14.  
TAN B, PANG Q Q, QIAN B, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells inflammatory reaction by total anthocyanins from red cabbage[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 8-14.
- [13] SWEET M J, HUME D A. Endotoxin signal transduction in macrophages[J]. Journal of Leukocyte Biology, 1996, 60(1): 8-26.
- [14] GAO Z, WU H, ZHANG K, et al. Protective effects of grape seed procyanidin extract on intestinal barrier dysfunction induced by a long-term high-fat diet [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103663-103676.
- [15] UCHIDA K. Redox-derived damage-associated molecular patterns: Ligand function of lipid peroxidation adducts[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 65(1): 94-96.
- [16] BINDER C J, PAPAC-MILICEVIC N, WITZTUM J L. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(8): 485-497.

- [17] 王威, 富莹雪, 陈璟, 等. 梓醇对 AGEs 刺激巨噬细胞介导肾系膜细胞损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(1): 110–114.  
WANG W, FU Y X, CHEN J, et al. Effect of catalpol on AGEs-stimulated RAW264.7 macrophage mediated mouse mesangial cell injury [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(1): 110–114.
- [18] ABDELKHALIK S M. High-resolution UPLC-MS profiling of anthocyanins and flavonols of red cabbage (*Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra DC.*) cultivated in egypt and evaluation of their biological activity[J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7567–7577.
- [19] 张娜娜, 刘建林, 郭欣欣, 等. 不同品种马铃薯花色苷提取物的种类鉴定及其抗氧化作用[J]. 食品科技, 2022, 47(2): 232–238.  
ZHANG N N, LIU J L, GUO X X, et al. Identification of anthocyanins extract from a variety of potato and their antioxidant activities[J]. *Food Technology*, 2022, 47(2): 232–238.
- [20] 许永, 蔡为荣, 闻志莹, 等. 荷花花色苷的分离、纯化及鉴定[J]. 安徽工程大学学报, 2020, 35(3): 31–38.  
XU Y, CAI W R, WEN Z Y, et al. Separation, purification and identification of anthocyanins from lotus [J]. *Journal of Anhui Polytechnic University*, 2020, 35(3): 31–38.
- [21] 邹波, 曾丹, 吴继军, 等. 不同品种紫肉甘薯抗氧化能力及花色苷成分分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 38–44.  
ZOU B, ZENG D, WU J J, et al. Antioxidant capacity and anthocyanins of purple-fleshed sweet potato cultivars[J]. *Food Science*, 2018, 39(2): 38–44.
- [22] 朱磊, 刘云清, 赵龙源, 等. 外源脱落酸处理对葡萄果实及葡萄酒中抗氧化成分的影响[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(3): 140–150.  
ZHU L, LIU Y Q, ZHAO L Y, et al. Effects of exogenous abscisic acid treatment on antioxidants in grapes and wines [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(3): 140–150.
- [23] 王晓天. 黑穗醋栗果皮中花色苷的鉴定及抗氧化能力的分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021: 31–40.  
WANG X T. Identification and analysis of antioxidant ability of anthocyanins in black currant peel [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021: 31–40.
- [24] 何丹, 孔钰婷, 宋洪波, 等. 紫果西番莲果皮花色苷鉴定及其生物活性[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 57–63.  
HE D, KONG Y T, SONG H B, et al. Identification and bioactivity evaluation of anthocyanins from *Passiflora edulis* sims peel [J]. *Food Science*, 2020, 41(11): 57–63.
- [25] SINGH S, BHATIA R, SINGH A, et al. Probiotic attributes and prevention of LPS-induced pro-inflammatory stress in RAW264.7 macrophages and human intestinal epithelial cell line (Caco-2) by newly isolated *Weissella cibaria* strains [J]. *Food & Function*, 2018, 9(2): 1254–1264.
- [26] JIN H G, KIM K W, LI J, et al. Anti-inflammatory components isolated from *Atractylodes macrocephala* in LPS-induced RAW264.7 macrophages and BV2 microglial cells [J]. *Applied Biological Chemistry*, 2022, 65(1): 11–24.
- [27] LI L, WANG L, WU Z, et al. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis [J]. *Scientific Reports*, 2013, 4: 6234–6245.
- [28] XU W, ZHOU Q, YAO Y, et al. Inhibitory effect of gardenblue blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) anthocyanin extracts on lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response in RAW 264.7 cells [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2016, 17(6): 425–436.

### Identification of Pingyin Rose Anthocyanins and Inhibition of LPS/AGEs/4-HNE Induced Inflammation

Lü Wenwen<sup>1</sup>, Wu Hua<sup>2</sup>, Xiao Junsong<sup>1\*</sup>, Cao Yanping<sup>1</sup>, Lei Shengming<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, College of Food and Health,

*Beijing Technology and Business University, Beijing 100048*

<sup>2</sup>*College of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048*

<sup>3</sup>*Jinan Zijin Rose Co., Ltd., Jinan 250000)*

**Abstract** Pingyin rose was approved as a new resource food in 2010, which is a unique rose resource food in Shandong province of China. Anthocyanins were extracted and preliminarily identified from Pingyin rose. RAW264.7 macrophages were induced by lipopolysaccharide (LPS), advanced glycation end products (AGEs) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) to construct inflammatory model. The effects of anthocyanins on the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the expression of some inflammatory factors in RAW264.7 cells were studied. Results showed that rose anthocyanins mainly contained two aglycones, namely cyanidin and peonidin. A total of six anthocyanins were identified, including three cyanidin-dihexoses, two peonidin dihexoses and peonidin-rutinose-hexose. Anthocyanins could significantly inhibit the production of ROS and NO and the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS in RAW264.7 cells, showing a good inhibitory effect on inflammation.

**Keywords** Pingyin rose; anthocyanin; identification; inflammatory; inhibition; RAW264.7 cells