

分 类 号：R284.2
研究生学号：2201808073

单位代码：10190
密 级：公 开

長春工業大學
碩 士 学 位 论 文

李 旭

2021 年 6 月



蓝靛果花色苷的提取工艺及其复方制剂对干眼症治疗机制的网络药理学研究

Study on the extraction technology of *Lonicera edulis* anthocyanin and the treatment mechanism of Xerophthalmia

硕士研究生：李 旭

导 师：高 冷教授

申 请 学 位：理学硕士

学 科：生物学

所 在 单 位：化学与生命科学学院

答 辩 日 期：2021 年 6 月

授予学位单位：长春工业大学

摘要

蓝靛果是一种营养价值极高的野生食用浆果，并具有广阔的开发前景。本文以蓝靛果为原料，通过超声波法提取蓝靛果花色苷，应用大孔树脂对其进行分离纯化；通过 HPLC-MS/MS 确定其组成成分，基于分子对接对蓝靛果花色苷的抗炎活性进行分析；通过网络药理学对蓝靛果复方压片治疗干眼症作用机制的分析，并考察其活性。研究内容如下：

通过单因素实验确定提取蓝靛果花色苷的影响因素，响应面法优化最佳工艺为：超声功率 160 W，超声时间 55 min，乙醇体积分数 85%，料液比 1: 35 g/mL，此时花色苷提取量最高，为 (298.22 ± 1.13) mg/100g。通过静态吸附-解吸实验比较 4 种大孔树脂纯化效果。研究了 AB-8 型大孔树脂对其的动态吸附-解吸条件：上样溶液 pH 3.0、上样流速 1.0 mL/min、洗脱剂乙醇体积分数 80%、洗脱流速 1.0 mL/min，在此条件下蓝靛果花色苷的含量为 (317.35 ± 0.82) mg/g。

通过 HPLC-MS/MS 对其组成进行分析，得出蓝靛果花色苷共 4 种。分别为矢车菊-3-己糖苷-儿茶素、矢车菊-3-己糖苷二聚体、矢车菊-3,5-二己糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷。其中矢车菊-3-葡萄糖苷含量最高，为 68.971%。基于分子对接对蓝靛果花色苷的抗炎活性作用机制进行分析。

通过蓝靛果复方压片（蓝靛果、菊花、枸杞）构建与干眼症的“成分-靶点-通路”网络和靶点互作网络，分析其治疗干眼症的作用机制。结果表明：蓝靛果 4 种活性成分与菊花、枸杞通过口服生物利用度、类药性筛选出的 7 种活性成分调控 10 个治疗干眼症的关键靶点与 10 条主要信号通路，由此呈现出多种成分、靶点、通路共同调节作用的网络。蓝靛果复方压片治疗干眼症的作用机制是通过调节潜在作用靶点的表达，调控与炎症反应、细胞凋亡等相关的通路，从而抑制干眼。

通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞构建细胞炎症模型，采用 MTT 法检测细胞生存率，考察不同剂量蓝靛果复方压片对 RAW264.7 中 NO、PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 的释放量。结果表明：药物剂量分别为 50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL 和 400 μ g/mL 时，细胞存活率均维持在 90% 以上，表明其对细胞均无毒害作用。通过 Griess 法检测 NO 释放含量，ELISA 法检测 IL-6、IL-1 β 及 PGE₂ 的释放含量。各剂量的药物均对模型组 NO、PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 释放水平抑制效果显著 ($P < 0.05$)，表明蓝靛果复方压片可以通过减轻炎症反应而缓解干眼症的发生与发展。

关键词：蓝靛果 花色苷 高效液相色谱-质谱联用 干眼症 网络药理学 分子对接

Abstract

Lonicera edulis is a wild edible berry with high nutritional value, which has broad development prospects. In this paper, the anthocyanins were extracted from the fruit of Lonicera edulis by ultrasonic wave, and then purified with macroporous adsorption resin. HPLC-MS/MS was used to identify the anthocyanin of compounds. The anti-inflammatory activity of Lonicera edulis anthocyanins was analyzed based on molecular docking. And the mechanism of action and activity of Lonicera edulis compound tablet in the treatment of xerophthalmia was analyzed based on network pharmacology. The research contents were showed as following:

The optimal process for extracting Lonicera edulis anthocyanins through single factor experiment and response surface method is as follows: ultrasonic power 160 W, ultrasonic time 55 min, material liquid ratio at 1:35 g/mL, and the ethanol volume fraction 85%. The extraction of anthocyanins from Lonicera edulis was (298.22 ± 1.13) mg/100g. The static Lonicera edulis anthocyanins adsorption-desorption characteristics in 4 kinds of macroporous resins were compared, and the dynamic Lonicera edulis anthocyanins adsorption-desorption conditions in AB-8 type macroporous resins were studied, and the purification conditions were determined as follows: sample solution-pH 3.0, sample flow rate-1.0 mL/min, the eluent ethanol concentration-80%, and the eluent flow rate-1.0 mL/min. Under these conditions, the content of Lonicera edulis anthocyanins is (317.35 ± 0.82) mg/g.

Four kinds of Lonicera edulis anthocyanins were identified by HPLC-MS/MS, which were Cyanidine-3-hexoside-catechin, Cyanidine-3-hexoside dimer, Cyanidine-3,5-dihexoside and Cyanidine-3-glucoside, respectively. Among them, the content of cyanidine-3-glucoside is the highest (68.971%). The anti-inflammatory mechanism of Lonicera edulis anthocyanins was analyzed based on molecular docking.

Construct the "component-target-pathway" network and target interaction network with xerophthalmia through Lonicera edulis compound tablet (Lonicera edulis, chrysanthemum, medlar) Analyze its mechanism of action in the treatment of xerophthalmia. The results showed that the 4 active ingredients of Lonicera edulis and the 7 active ingredients screened by oral bioavailability and drug-like properties of chrysanthemum and wolfberry, they regulates 10 key targets and 10 main signal pathways for the treatment of xerophthalmia, forming a multi-ingredient; multi-target, and multi-channel Network characteristics with

integrated regulation effect. The mechanism of *Lonicera edulis* compound tablet in the treatment of xerophthalmia is to inhibit the occurrence and development of xerophthalmia by regulating the expression of potential targets and regulating pathways related to inflammation and cell apoptosis.

LPS was used to stimulate RAW264.7 to create a cell inflammation model. Use MTT method to detect cell survival rate, investigate the release amount of NO, PGE₂, IL-6 and IL-1 β in RAW264.7 at different doses of *Lonicera edulis* compound tablet. The results showed that when the doses of drug were 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, and 400 $\mu\text{g/mL}$, the cell survival rate was maintained above 90%, indicating that it has no toxic effect on cells. Griess method was used to detect the release amount of NO in RAW264.7 cells induced by LPS, and ELISA method was used to detect the release amount of IL-1 β , IL-6 and PGE₂ in RAW264.7 cells induced by LPS. Each dose of drug has a significant inhibitory effect on the release levels of NO, PGE₂, IL-6 and IL-1 β in the model group ($P < 0.05$), indicating that *Lonicera edulis* compound tablet can reduce inflammation by reducing inflammation to relieve the occurrence and development of xerophthalmia.

Key words: *Lonicera caerulea* Anthocyanins High-performance liquid chromatography-electrospray ionization/mass Xerophthalmia Network pharmacology Molecular docking

摘 要.....	I
Abstract.....	II
第 1 章 绪 论.....	1
1.1 蓝靛果的研究进展.....	1
1.2 干眼症的研究现状.....	1
1.2.1 干眼症的概述.....	1
1.2.2 干眼症的发病机制.....	2
1.3 网络药理学.....	3
1.4 分子对接技术.....	4
1.5 体外抗炎模型.....	4
1.5.1 炎症的概述.....	4
1.5.2 抗炎模型评估.....	4
1.6 本课题研究目的意义.....	5
第 2 章 蓝靛果花色苷的提取、分离纯化工艺的研究.....	6
2.1 材料与仪器.....	6
2.1.1 材料与试剂.....	6
2.1.2 仪器与设备.....	6
2.2 实验方法.....	7
2.2.1 原材料的预处理.....	7
2.2.2 蓝靛果花色苷提取工艺优化.....	7
2.2.3 大孔吸附树脂分离纯化花色苷.....	9
2.2.4 数据处理.....	11
2.3 结果与讨论.....	11
2.3.1 超声波提取花色苷单因素实验结果.....	11
2.3.2 超声波提取花色苷响应面优化实验结果.....	14
2.3.3 大孔吸附树脂种类的筛选.....	23
2.3.4 大孔树脂静态吸附实验.....	23
2.3.5 大孔树脂动态吸附实验.....	26
2.4 本章小结.....	28
第 3 章 HPLC-MS/MS 结合分子对接技术对蓝靛果花色苷活性的研究.....	30

3.1 材料与仪器.....	30
3.1.1 材料与试剂.....	30
3.1.2 仪器与设备.....	30
3.2 实验方法.....	30
3.2.1 蓝靛果花色苷的 HPLC-MS/MS 分析.....	30
3.2.2 蓝靛果花色苷与抗炎靶点分子 IL-6 对接.....	31
3.3 结果与讨论.....	31
3.3.1 蓝靛果花色苷 HPLC-MS/MS 分析.....	31
3.3.2 蓝靛果花色苷与抗炎靶点分子对接结果.....	33
3.4 本章小结.....	35
第 4 章 基于网络药理学对蓝靛果复方压片治疗干眼症作用机制的研究.....	36
4.1 材料与方法.....	36
4.1.1 材料与试剂.....	36
4.1.2 仪器与设备.....	36
4.1.3 数据库与软件.....	37
4.2 实验方法.....	37
4.2.1 蓝靛果复方压片的样品制备.....	37
4.2.2 蓝靛果复方压片对干眼症的网络药理学分析.....	38
4.2.3 体外抗炎实验.....	39
4.2.4 数据处理.....	40
4.3 结果与讨论.....	40
4.3.1 药物活性成分.....	40
4.3.2 活性成分-靶点网络.....	41
4.3.3 靶点相互作用分析.....	41
4.3.4 基因富集分析.....	43
4.3.5 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞活力的影响.....	46
4.3.6 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞释放 NO、PGE ₂ 含量的影响.....	46
4.3.7 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞释放 IL-6、IL-1 β 含量的影响.....	47
4.4 本章小结.....	47
第 5 章 结 论.....	49
致 谢.....	50
参考文献.....	51
作者简介.....	55

攻读硕士学位期间研究成果..... 56

第1章 绪论

1.1 蓝靛果的研究进展

蓝靛果 (*Lonicera edulis*) 属忍冬科忍冬属, 在我国产地主要分布东北长白山脉。其形状细长呈现椭圆形, 颜色为紫黑色, 营养价值颇高, 干物质有 10%~16%、含糖 5~10%、含酸 2%~5%。其富含氨基酸、维生素、矿物质, 以及花色苷、黄酮、儿茶素等多种活性物质。蓝靛果花色苷含有葡萄糖苷、芸香糖苷、飞燕草素以及矢车菊素并且其含量显著高于其他浆果, 具有抗氧化、抗炎、降血脂等保健功效。Suwen^[1]等研究发现对大鼠进行高胆固醇造模, 蓝靛果能够降低胆固醇的累积, 显著降低体重与器官重量。Wang^[2]等人发现蓝靛果对 LPS 诱导的 BRL-3A 细胞毒性起到抑制作用, 通过抗凋亡途径能够减轻肝毒性。由于蓝靛果资源丰富, 开发出如蓝靛果果酒、蓝靛果饮料、蓝靛果果酱、蓝靛果果干等多种产品。并且在食品、医药等方面有重要开发的价值与前景。

花色苷作为构成果实的色素之一, 属于黄酮类化合物。并且易溶于水及乙醇、甲醇等有机溶剂。其颜色与 pH 值有关, pH<7 时显现为红色; pH=8 时为紫色; pH>8 时显现为蓝色。其最大吸收波长为 500~550 nm。

蓝靛果中花色苷含量丰富, 并具有多种药理活性。(1) 抗炎作用, 伍树松^[3]等通过动物实验与体外细胞培养发现蓝靛果提取物对大鼠关节炎具有抑制作用, 降低血清中的炎症因子含量。有研究表明黄酮类化合物可以抑制干眼兔模型 IL-6 炎症因子的表达, 通过抑制炎症反应减轻干眼病症^[4], 表明花色苷等黄酮类化合物可以抑制炎症反应治疗干眼症。(2) 抗氧化作用, 李凤凤^[5]等通过对蓝靛果花色苷并进行抗氧化实验, 表明蓝靛果花色苷具有很强的抗氧化能力。(3) 抑菌作用, 包怡红^[6]等研究发现蓝靛果中的花色苷抗菌作用明显, 能够有效抑制大肠杆菌的生长繁殖。(4) 防辐射作用, 刘力源^[7]等研究发现蓝靛果花色苷能够减轻辐射对小鼠造成的损伤。(5) 降血脂作用, 于伟^[8]等研究蓝靛果花色苷对高脂血症大鼠具有明显的调节血脂的效果, 花色苷对降血脂作用效果显著。

1.2 干眼症的研究现状

1.2.1 干眼症的概述

干眼症 (Xerophthalmia) 又称角结膜干燥症, 是一种常见的眼科疾病。病因包括眼表炎症、泪液渗透性增加、泪膜不稳定与神经调节异常等^[9-10], 以及气候环境、生活习惯和手机长期使用^[11]。在日常生活中, 干眼症可以使人眼部感受到刺激乃至疼痛, 严重

时会破坏眼部角膜结构,以至失明。干眼症的发病率约为5%至35%^[12],因人种的不同、年龄的不同、地区的不同,干眼症的发病率在我国一般为21%至30%。

1.2.2 干眼症的发病机制

(1) 泪膜稳定性失衡及泪液渗透性升高

泪膜稳定性失衡是干眼症的核心特征,其主要依赖于泪膜各层数量与质量以及泪液动力学^[10]。泪膜可以保护眼表环境与结构不受外界破坏,还可以防止细菌等抗原形成免疫反应^[13]。泪液动态循环主要有泪液生成、泪液分布、泪液蒸发与泪液清除。泪液主要由脂质、水样液与粘蛋白组成,通过反射弧、角膜与脑神经完成眨眼使泪液均匀分布至泪膜表面,从泪道进入鼻腔完成泪液动态循环^[14]。以上任一环节出现异常都会导致其稳定性失衡引发干眼症。

(2) 眼表炎症反应

当眼表发生炎症时,会破坏泪膜稳定使泪膜结构发生异常,炎症反应得不到控制时会导致眼表的慢性炎症而加重干眼状况。干眼症主要发病因素为炎症反应,高渗透的泪液通过激活炎症反应使炎症因子被释放,导致上皮细胞受到伤害。由于炎症的刺激与泪液多次分泌致使泪膜稳定性下降,从而加重干眼病症。炎症因子通过激活相关信号通路,引发患者眼表的炎症状况,致使干眼症的发生。眼表炎症的引发方式一般有:患者眼部的抗炎因子发生减小,如乳铁蛋白,而泪液中促炎因子显著增加,如IL-1、TNF- α 。研究发现干燥环境、泪液渗透性升高可以导致眼表细胞释放炎症因子,如IL-1、IL- α 、L-1 β 、THF- α 、IL-6^[15-16]等。IL-1可以使炎症因子的表达与释放量增加,导致炎症反应的发生,同受体结合来激活炎症通路,如蛋白激酶通路,使IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子表达量增加,从而引发炎症。其中泪液渗透性升高、泪膜稳定性下降均可以引发炎症反应,并与炎症反应共同加重干眼症状,国际干眼研究组也特别强调干眼与炎症反应的关系。有研究表明菊花总黄酮通过抑制干眼兔模型L-1 β 、THF- α 的表达来抑制炎症反应,减轻干眼症的损害^[17]。陈爱菊^[18]等人通过枸杞子、菊花、熟地黄组成的杞菊地黄丸对于眼症患者泪液中IL-1 β 、IL-8、MMP-9表达水平进行检测,发现杞菊地黄丸可以减少这些炎症因子的分泌量抑制炎症反应与干眼症。因此,菊花、枸杞对眼表的炎症反应有较好的抑制作用,可以显著抑制炎症因子,达到减轻及治疗干眼症的效果。

(3) 细胞凋亡

研究发现,干眼症病人大多有角膜细胞、腺泡细胞、结膜细胞的凋亡情况,并且抑制淋巴细胞的凋亡活动。因此,当患者眼部组织受到伤害,而淋巴细胞却无法进行凋亡,会导致炎症反应持续发展。患者眼表存在炎症反应,泪液中还有炎症因子如IL-1、TNF- α 、

INF- γ 均表达量增加并激活凋亡通路^[19]。角膜中心与上皮细胞凋亡等情况在小鼠的干眼症模型中发生,说明诱发干眼症的机制之一是细胞凋亡。

(4) 氧化应激

有研究表明眼表的氧化-抗氧化系统会被干燥环境破坏,引发抗氧化应激中的还原酶 SOD 与 CAT 释放受到抑制,并且促进了氧化应激产物 ROS 释放^[20]。ROS 会破坏蛋白质、脂质等大分子,从而损伤眼表细胞。随着病情加重,结膜上皮细胞产生大量一氧化氮合酶,并伴随炎症因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)的变化。这些都证明了氧化应激在干眼症中发挥作用。

(5) 神经调节异常

眼表、泪腺组织中含有大量的神经,它们通过神经反射可以完成泪液生成、扩散、清除的完整过程,当有环节出现异常将会导致泪液质量的异常、泪膜稳定性异常^[21]。三叉神经、面神经与交感神经的调控会导致干眼症的发生。糖尿病会导致角膜神经受到损伤,因此糖尿病人患有干眼症的几率被加大^[22]。在眼科手术中,当角膜神经受到影响会导致眨眼次数减少、感觉异常的现象,也会导致干眼症。当眼表发生炎症时,会导致神经免疫炎症发生。当抑制性电流被减小、持续增加兴奋性电流,会促使神经递质释放引起患者的神经性疼痛。

1.3 网络药理学

网络药理学是以生物学与药理学为基础,通过整合药物、蛋白质、基因数据库和计算机算法,对药物与疾病之间的作用机制进行分析。网络药理学能够从药物分子的结构、药理作用、基因注释与生物网络多层面分析药物作用机理。从药物数据库对有效成分进行收集并计算对应靶点,与疾病基因数据库进行比对,通过可视化工具将药物、疾病内在联系呈现出来,通过基因注释对其进行分析。得出药物治疗疾病的途径与作用机制。通过网络药理学可以发现新的靶点与机制,探索药物治疗新功能,提高临床试验效率,减小研发药物治疗疾病的成本,并提供药物研发的新思路与新方法。

经过这些年的发展,网络药理学在中药领域被不断应用。通过网络药理学能够直观了解药方的成分、靶点、通路的作用机制,预测药物的有效成分、生物功能与信号通路,为进一步的应用提供理论基础。张丽明^[23]等通过网络药理学对葡萄籽油抗癌与抗肿瘤机制进行分析结果显示葡萄籽油主要参与调控酶结合、蛋白质结合等生物学功能,并激活相关信号通路。作为研究药物与疾病的新方法,也有一些问题需要完善。数据库的更新直接影响数据分析的准确性,不完整数据库的使用无法完整阐明药物与疾病的关系,需要进一步的实验验证。不过,随着药物与疾病数据库的完善与发展,网络药理学也会逐

渐完善发展。

1.4 分子对接技术

分子对接是通过计算机来辅助药物设计的新方法。原理来源于锁钥模型，指蛋白与配体如同锁与钥匙，一一对应。主要用来预测受体配体之间的亲和力与相互作用模式。在靶标分子活性位点上连接分子，通过连续优化靶标分子的构象与位置，得出他们之间的最优结合构象，并对其连接方式与亲和力打分，挑选出最佳配体再进行药物实验^[24]。柔性对接、半柔性对接与刚性对接是分子对接分的三种方式。随着计算方法的不断完善与创新，分子对接的结果也会逐渐精确，为疾病的治疗机制与新药开发提供助力。

1.5 体外抗炎模型

1.5.1 炎症的概述

炎症是外界大量致炎因子侵入活体组织时被激活时引起的机体免疫防御反应，当反应过度时会使机体产生发热、增生等情况。炎症反应的发生说明机体的免疫系统正发挥作用，防止机体受到微生物的感染与损害，并进行组织修复。炎症反应过度时会对机体造成较大伤害，渗出液对组织进行压迫并造成机能障碍，严重时危害生命^[25]。炎症反应发生时，免疫细胞会释放各类因子，如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等。这些因子会提高吞噬细胞的识别效率，促进巨噬细胞与淋巴细胞的分裂分化。

当致炎因子引起机体免疫防御时，会促进机体释放炎症介质，调控机体的免疫防御，细胞生长与分化，如 NO、PGE₂。NO 维持细胞的生命活动，当其大量表达时会催化炎症反应并引起 PGE₂ 的生成与机体反应。所以，NO 与 PGE₂ 的释放量增加表明炎症的发生。

在炎症反应中，致炎因子侵入机体导致多种炎症介质表达，涉及到炎症信号通路及相关基因的表达。炎症反应主要涉及 MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路、JAK-STAT 信号通路等，并且这些信号通路并非独立运作而是共同参与协同进行。李建设^[26]等发现姜黄素可以抑制炎症信号通路的激活，抑制炎症因子 IL-6、TNF- α 与 NO 的释放。

1.5.2 抗炎模型评估

(1) NO 的检测：机体内多种细胞均可生成 NO，由一氧化氮合成酶催化而来。NO 能够抑制黏附因子的表达，减小超氧阴离子的产生。当 NO 浓度过高时会激活 NF- κ B 通路，促使 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 生成。而 TNF- α 又会促进 NO 的产生，致使炎症反应加重

[27]。因此，NO 的含量可以验证炎症反应的发生。

(2) PGE₂ 的检测：PGE₂ 具有扩张血管的作用，在炎症初期能够促进血液中嗜中性粒细胞与巨噬细胞的浸润使炎症反应增强^[28]。因此检测 PGE₂ 来判定炎症反应的发生。

(3) IL-6 的检测：IL-6 是一类糖蛋白。其分子量大小与肽链糖基化的程度有关。IL-6 与其配体使中性粒细胞转变为单核和巨噬细胞来控制炎症的剧烈程度，并具有抗炎能力^[29]。IL-6 同时也能加速 B 细胞的增殖分化。检测 IL-6 来判定炎症反应的程度。

(4) IL-1 β 的检测：IL-1 β 是促炎性细胞的一种。通过影响下丘脑的活动来引起发热，在体内诱导作用很强。当单核巨噬细胞被激活时可以产生 IL-1 β ，提升造血功能并参与免疫反应^[30]。可以检测 IL-1 β 来判定炎症反应的程度。

1.6 本课题研究目的意义

蓝靛果果实中含有大量的花色苷，并在食品、药品等领域具备极高的潜力与价值，但目前大多只是加工成果汁、果酒等产品。本研究采用生物技术手段对蓝靛果花色苷进行提取与分离纯化，制成缓解干眼症的复方压片，并通过分子对接与网络药理学等新技术对其抗干眼症的作用机制进行分析，为蓝靛果资源的开发提供支持与依据。

第2章 蓝靛果花色苷的提取、分离纯化工艺的研究

超声波可以产生空穴效应，作用于植物的细胞壁，使其中内容物成分渗透到提取液当中，可以用于提取材料中的高价值组分。通过超声波法辅助提取蓝靛果花色苷，与酶解法相比，操作简便、并能够保护花色苷不被破坏；与溶剂提取法相比，具有提取时间短、提取效率高等优点。以野生蓝靛果为原料，研究超声波法提取对蓝靛果花色苷提取量的影响，优化提取工艺参数，并对其进行分离纯化。为蓝靛果花色苷的工业制备提供了依据。

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

野生蓝靛果：由长春金荷药业有限公司提供。

表 2-1 实验试剂

试剂名称	生产厂家
浓盐酸	北京化工厂
氯化钾	北京化工厂
无水乙酸钠	山东浩中化工有限公司
无水乙醇	山东浩中化工有限公司
氢氧化钠	天津福晨化学试剂厂
柠檬酸	天津福晨化学试剂厂
D101 大孔树脂	天津南开大学化工厂
AB-8 大孔树脂	天津南开大学化工厂
HPD-100 大孔树脂	天津南开大学化工厂
NKA-9 大孔树脂	天津南开大学化工厂

2.1.2 仪器与设备

表 2-2 实验仪器

仪器名称	仪器型号	生产厂家
组织捣碎机	MJ-BL25C3	广东美的电器制造公司
紫外可见分光光度计	TU-1800	杭州俊升科学器材有限公司

续表 2-2

仪器名称	仪器型号	生产厂家
pH 计	PHSJ-3F	上海仪田精密仪器有限公司
真空冷冻干燥机	LGJ-30	北京松源华兴科技发展有限公司
电子天平	HX2002T	慈溪市天东衡器厂
旋转蒸发器	RE-300	上海亚荣生化仪器厂

2.2 实验方法

2.2.1 原材料的预处理

将冷冻保存的蓝靛果在常温下自然解冻，用组织捣碎机对蓝靛果进行破碎匀浆。

2.2.2 蓝靛果花色苷提取工艺优化

2.2.2.1 花色苷含量的测定

花色苷的测定方法主要依据其光学特性，花色苷中发色团结构的转换与 pH 有关，而杂质不会随着 pH 的变化而产生影响^[31]，因此选择 pH 示差法。当 pH 为 1.0 时花色苷会形成 2-苯基苯并吡喃；当 pH 为 4.5 时以甲醇假碱形式存在^[32]。

pH 1.0 缓冲溶液配置方法：将 1.86 g 氯化钾与 980 mL 的蒸馏水混合，盐酸校正至 pH (1.0±0.1)，定容至 1 L。

pH 4.5 缓冲溶液配置方法：将 32.82 g 乙酸钠与 960 mL 的蒸馏水混合，盐酸校正至 pH (4.5±0.1)，定容至 1 L。

取 2 mL 蓝靛果花色苷提取液加入 KCl-HCl 缓冲液，20 mL 容量瓶定容，静置 60 min 后测定 A₅₄₀ 和 A₇₀₀，CH₃COONa-HCl 缓冲液同前操作，根据下式计算：

$$\text{花色苷含量 (mg/100g)} = \frac{\Delta A \times M \times D \times V}{m \times \epsilon \times L} \times 100 \quad (\text{式 2-1})$$

式中： $\Delta A = (A_{540} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{540} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$;

A₅₄₀ 表示蓝靛果花色苷在 540 nm 的吸光值；

A₇₀₀ 表示蓝靛果花色苷在 700 nm 的吸光值；

M 表示矢车菊-3-葡萄糖苷相对分子质量，449.2；

D 表示蓝靛果花色苷的稀释倍数；

V 表示提取液总体积，mL；

m 为蓝靛果质量；

ε 为摩尔消光系数, 26900;

L为比色皿的光距, 数值为1 cm。

2.2.2.2 提取蓝靛果花色苷单因素实验

超声功率: 超声波提取花色苷时会使花色苷溶液产生空穴效应, 从而加快了花色苷的溶出速度, 提高蓝靛果花色苷的提取量。但由于超声波携带能量, 当功率过高时, 会破坏花色苷的结构, 影响提取量。取蓝靛果匀浆 5.00 g, 按照料液比 1: 30 g/mL 加入 80%乙醇溶液 (0.1%HCL), 在超声功率 50、100、150、200、250 W 条件下提取 50 min。

超声时间: 超声时间的长短会影响提取溶剂渗透到蓝靛果原料中的效果。为了确定适宜的超声时间, 对不同的超声时间产生的影响进行探究, 取 5.00 g 蓝靛果匀浆, 按料液比 1: 30 g/mL 加入 80%乙醇溶液 (0.1%HCL), 在超声功率 150 W 条件下提取 10、30、50、70、90 min。

乙醇体积分数: 花色苷能够较好的溶于乙醇, 乙醇溶液会使花色苷从果实中溶出。为了研究乙醇体积分数对蓝靛果花色苷提取量的影响, 取 5.00 g 蓝靛果匀浆, 按料液比 1: 30 g/mL 加入 50%、60%、70%、80%、90%乙醇溶液 (0.1%HCL), 在超声功率 150 W 条件下提取 50 min。

料液比: 料液比会影响蓝靛果原料与溶剂的接触面积, 影响溶剂进入蓝靛果原料中的时间。为了探究料液比对蓝靛果花色苷提取量的影响, 取 5.00 g 蓝靛果匀浆, 按照料液比 1: 10、1: 20、1: 30、1: 40、1: 50 g/mL 加入 80%乙醇溶液 (0.1%HCL), 在超声功率 150 W 条件下提取 50 min。

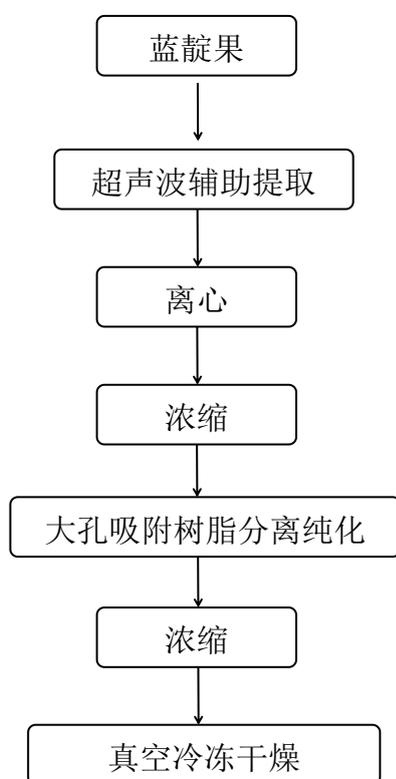
2.2.2.3 超声波提取花色苷响应面优化实验

以单因素实验结果为基础, 通过响应面法优化实验参数^[33]。采用四因素三水平实验研究超声功率、超声时间、乙醇体积分数、料液比对蓝靛果花色苷的提取影响, 从而确定最佳的提取工艺。

表 2-3 响应面优化因素水平表

实验因素	实验因子	因素水平		
		-1	0	1
A	超声功率/(W)	100	150	200
B	超声时间/(min)	30	50	70
C	乙醇体积分数/(%)	70	80	90
D	料液比/(g/mL)	1: 20	1: 30	1: 40

2.2.3 大孔吸附树脂分离纯化花色苷



2.2.3.1 样液的制备与吸附树脂预处理

根据最佳工艺参数，在 40 °C、110 r/min 条件下对蓝靛果花色苷粗提取液进行旋转蒸发。将浓缩液在 4 °C 的冰箱冷藏。

大孔吸附树脂使用前需用无水乙醇进行隔夜浸泡。用玻璃棒搅拌树脂，将树脂碎渣捞出弃去，并用蒸馏水清洗。分别使用含 5% 的盐酸与 3% 的氢氧化钠浸泡 4 h，备用。

2.2.3.2 大孔吸附树脂的筛选

表 3-4 大孔树脂型号及参数

型号	比表面积 (m ² /g)	平均孔径 (nm)	粒子直径 (nm)	极性
D101	500-550	9.0-10.0	0.2-0.6	非极性
HPD-100	650-700	9.0-10.0	0.3-1.25	非极性
AB-8	480-520	13.0-14.0	0.3-1.25	弱极性
NKA-9	250-290	15.5-16.5	0.3-1.25	极性

称取大孔吸附树脂 D101、AB-8、HPD-100、NKA-9 各 2.0g，移入 100 mL 三角瓶

中。分别量取蓝靛果花色苷样液 25 mL, 并在 540 nm 处测定其吸光度 A_0 。然后在 30 °C、110 r/min 条件下恒温振荡器中吸附 24 h, 取上清液测定吸光度 A_1 。对其进行过滤, 于 30 °C、110 r/min 条件下向饱和的大孔吸附树脂中加入 25 mL 80% pH 3.0 的乙醇溶液解吸 24 h。滤出树脂, 测定吸光度 A_2 。通过吸附率与解吸率选择大孔树脂。计算公式如下:

$$\text{吸附率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (\text{公式 2-2})$$

$$\text{解吸率} = A_2 / (A_0 - A_1) \times 100\% \quad (\text{公式 2-3})$$

式中: A_0 : 吸附前花色苷溶液吸光度

A_1 : 吸附后花色苷溶液吸光度

A_2 : 解吸后花色苷溶液吸光度

2.2.3.3 大孔树脂静态吸附实验

静态吸附曲线: 在三角瓶中, 加入处理好的 AB-8 大孔吸附树脂 2.0 g, 并加入蓝靛果花色苷样液 25 mL, 在 30 °C、110 r/min 条件下于恒温振荡器中进行静态吸附, 每隔 0.5 h 取上清液测定其吸光度, 绘制静态吸附曲线。

静态解吸曲线: 用蒸馏水冲洗 2.0 g 吸附充分的大孔吸附树脂并擦干, 放入三角瓶中。加入 pH 为 3.0 的 80% 乙醇溶液 25 mL 并振荡, 进行静态解吸, 以 0.5 h 为间隔取上清液测定吸光度, 绘制静态解吸曲线。

样液 pH 值: 在蓝靛果花色苷溶液中加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调整 pH 值分别为 1.0 至 5.0 并分别取 25 mL。在三角瓶中, 加入处理好的 AB-8 大孔吸附树脂 2.0 g 和处理好的酸化样液振荡静态吸附 4 h, 在 520 nm 处取上清液测定吸光值, 测定样液 pH 值对 AB-8 大孔树脂的吸附影响。

解吸液 pH 值: 将 2.0 g 吸附充分的大孔吸附树脂用蒸馏水冲洗, 并擦干表面残留的蒸馏水, 放入三角瓶中。用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 25 mL, 调整 80% 乙醇溶液 pH 分别为 1.0 至 5.0 并振荡, 进行静态解吸 4 h, 取洗脱液测定吸光值, 以乙醇溶液 pH 值与解吸率为坐标轴, 测定解吸液 pH 值对 AB-8 大孔树脂解吸的影响。

乙醇体积分数: 将 2.0 g 吸附充分的大孔吸附树脂用蒸馏水冲洗, 并擦干表面残留的蒸馏水, 放入三角瓶中。分别加入 pH 3.0 的 50%、60%、70%、80%、90% 体积分数的乙醇溶液 25 mL 并振荡, 进行静态解吸 4 h, 取洗脱液测定吸光值, 测定乙醇体积分数对 AB-8 大孔树脂解吸的影响。

2.2.3.4 大孔树脂动态吸附实验

上样浓度：称取 20 gAB-8 大孔树脂，通过湿法装柱的方式放入层析柱中，加入稀释后 pH 3.0 的 0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL 的花色苷样液，选择 1.0 mL/min 流速通过层析柱，并检测吸附前后其吸光度，计算吸附率，选择最佳的上样浓度。

上样流速：称取 20 gAB-8 大孔树脂，加入 pH 3.0、0.8 mg/mL 的花色苷样液，以 0.5 mL/min、1.0 mL/min、1.5 mL/min、2.0 mL/min、2.5 mL/min 的流速通过层析柱，并检测吸附前后其吸光度，计算吸附率，选择最佳的上样流速。

泄露曲线：称取 20 gAB-8 大孔树脂，加入浓度为 pH 3.0、0.8 mg/mL 的花色苷样液 200 mL，以 1.0 mL/min 的流速通过层析柱，以 5 mL 的流出体积为间隔测定吸光度，当吸光度为样液的 1/10 时终止。

洗脱流速：称取 20 gAB-8 大孔树脂，分别加入 0.8 mg/mL 的 pH 为 3.0 的花色苷样液 200 mL，以 1.0 mL/min 的流速通过层析柱，测定其吸附前后吸光度。用蒸馏水冲洗饱和的大孔树脂及层析柱，加入 pH 为 3.0 的 80%乙醇溶液，以 0.5 mL/min、1.0 mL/min、1.5 mL/min、2.0 mL/min、2.5 mL/min 的流速通过层析柱，并检测吸光度，根据公式 3-2 计算解吸率，选择最佳的洗脱流速。

动态解吸曲线：称取 20 gAB-8 大孔树脂，分别加入浓度为 pH 3.0、0.8 mg/mL 的花色苷样液 200 mL，以 1.0 mL/min 的流速通过层析柱，使其饱和。然后用蒸馏水冲洗，加入 pH 3.0、80%乙醇溶液 180 mL，以 1.0 mL/min 的流速通过层析柱，每流出 5 mL 测定吸光度，绘制解吸曲线。

2.2.4 数据处理

实验重复三次，并取平均值；运用 Design-Expert 8.0.6 软件确定最佳工艺参数；通过 Excel 绘图；实验数据分析处理采用 SPSS 17.0 软件。

2.3 结果与讨论

2.3.1 超声波提取花色苷单因素实验结果

2.3.1.1 超声功率对花色苷提取量的影响

不同的超声功率的影响见图 2.1，在 50~150 W 范围内，蓝靛果花色苷提取量与超声功率成正比，在 150 W 处达到最大值 293.17 mg/100g，随后开始出现下降趋势，可能由

于超声功率的增加体系中温度也随之升高,加快了分子运动速度,使花色苷的加速溶出^[34],当功率超过150 W时产生更强的热效应,花色苷的结构受到损伤,杂质随之溶出,提取量出现下降。因此,最佳超声功率为150 W。

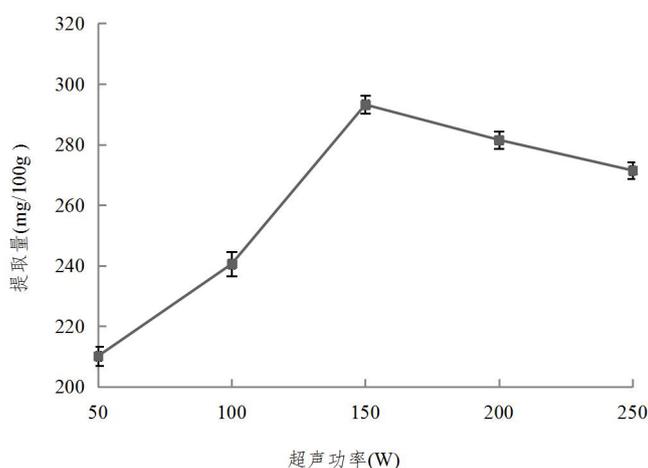


图 2.1 不同超声功率对蓝靛果花色苷提取量的影响

2.3.1.2 超声时间对花色苷提取量的影响

由图 2.2 可知,超声时间在 10~50 min 内,花色苷溶出导致提取量上升,由于超声波会使蓝靛果细胞壁破裂,结构被破坏,加速了花色苷的溶出,在 50 min 处达到最大值 292.53 mg/100g,随后出现下降。可能由于时间增加使体系温度逐渐升高,降低了花色苷结构的稳定性并发生降解,表现为提取量降低^[35]。因此,蓝靛果花色苷最佳超声时间为 50 min。

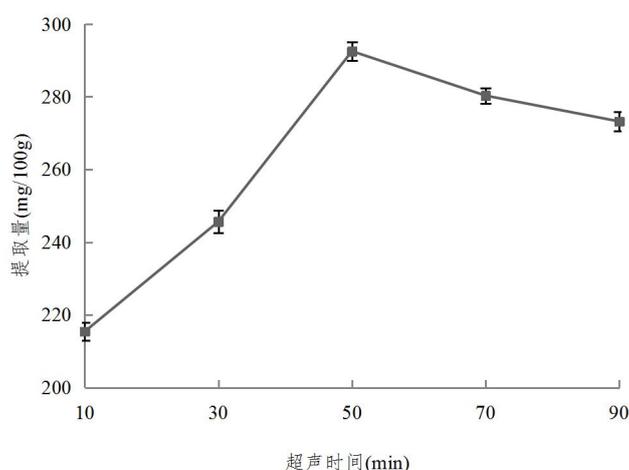


图 2.2 不同超声时间对蓝靛果花色苷提取量的影响

2.3.1.3 乙醇体积分数对花色苷提取量的影响

乙醇体积分数影响见图 2.3, 在 50%~80%的乙醇体积分数, 花色苷提取量出现上涨, 可能由于相似相溶的原理, 随着极性增加, 溶解度也在增加^[36], 在乙醇体积为 80%时与花色苷极性接近而达到最大 290.78 mg/100g, 当高于 80%后醇溶性杂质溶出, 花色苷提取量下降。因此, 选择 80%为最佳的乙醇体积分数。

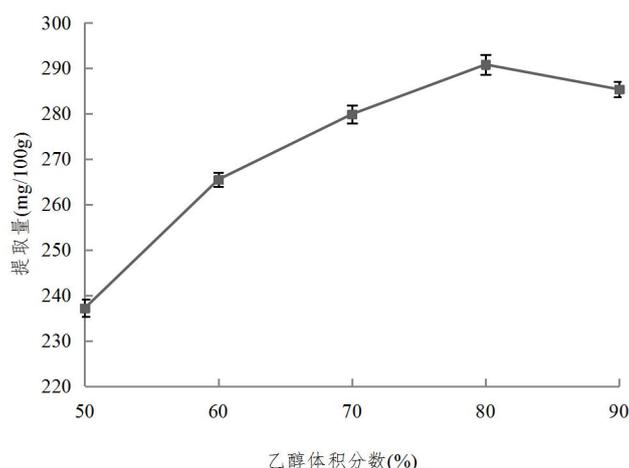


图 2.3 不同乙醇体积分数对蓝靛果花色苷提取量的影响

2.3.1.4 料液比对花色苷提取量的影响

由图 2.4 可知, 在料液比 1: 10~1: 30 之间蓝靛果花色苷提取量与料液比成正比, 溶剂增加导致花色苷也加速溶出。当料液比为 1: 30 g/mL 时最大值为 284.12 mg/100g。随后出现下降的趋势, 可能由于随着料液比的增加, 蓝靛果细胞内外产生浓度梯度, 加速了花色苷从蓝靛果细胞中的溶出速度, 促使花色苷向溶剂中扩散, 当料液比超过 1: 30 g/mL 时, 大部分花色苷已经溶出, 干扰杂质逐渐溶出, 影响花色苷提取量^[37]。因此, 蓝靛果花色苷最佳料液比为 1: 30 g/mL。

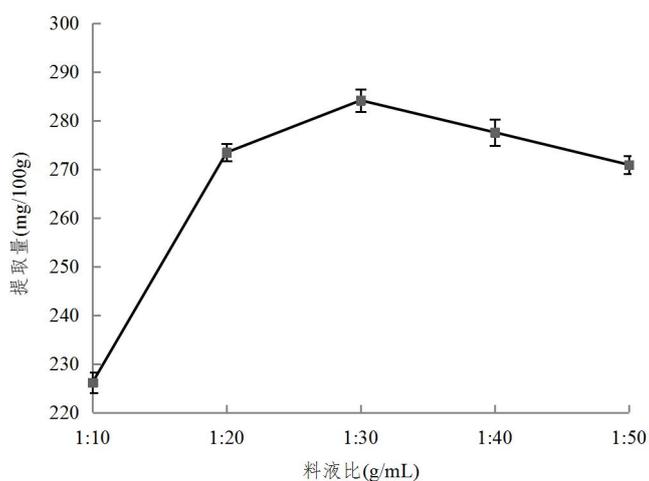


图 2.4 不同料液比对蓝靛果花色苷提取量的影响

2.3.2 超声波提取花色苷响应面优化实验结果

通过四因素三水平优化实验研究超声功率、超声时间、乙醇体积分数、料液比对蓝靛果花色苷的提取影响，数据结果如表 2-5 所示。

表 2-5 响应面法分析实验方案与结果

实验号	A	B	C	D	花色苷提取量 (mg/100g)
1	-1	-1	0	0	215.73
2	1	-1	0	0	233.71
3	-1	1	0	0	255.53
4	1	1	0	0	253.40
5	0	0	-1	-1	241.51
6	0	0	1	-1	255.97
7	0	0	-1	1	267.52
8	0	0	1	1	291.43
9	-1	0	0	-1	248.71
10	1	0	0	-1	250.57
11	-1	0	0	1	279.67
12	1	0	0	1	289.31
13	0	-1	-1	0	225.99

续表 2-5

实验号	A	B	C	D	花色苷提取量 (mg/100g)
14	0	1	-1	0	243.41
15	0	-1	1	0	238.97
16	0	1	1	0	266.96
17	-1	0	-1	0	255.93
18	1	0	-1	0	243.79
19	-1	0	1	0	252.81
20	1	0	1	0	284.41
21	0	-1	0	-1	223.51
22	0	1	0	-1	239.21
23	0	-1	0	1	241.31
24	0	1	0	1	274.11
25	0	0	0	0	295.19
26	0	0	0	0	292.15
27	0	0	0	0	291.71
28	0	0	0	0	290.73
29	0	0	0	0	290.94

2.3.2.1 模型方程的建立及显著性检验

通过超声功率A、超声时间B、乙醇体积分数C与料液比D为变量进行响应面法优化分析，优化蓝靛果花色苷的提取量。设计结果如表2-5，对表2-5进行回归分析得方差分析表2-6，并建立回归方程：花色苷提取量 (mg/100g) = 292.14 + 3.90 × A + 12.78 × B + 9.37 × C + 15.32 × D - 5.03 × A × B + 10.94 × A × C + 1.95 × A × D + 2.64 × B × C + 4.27 × B × D + 2.36 × C × D - 16.19A² - 35.15B² - 15.55C² - 11.28D²

表 2-6 响应面方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	15765.79	14	1126.13	102.90	0.0001**
A	182.60	1	182.60	16.69	0.0011**
B	1960.96	1	1960.96	179.19	0.0001**

续表 2-6

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
C	1052.81	1	1052.81	96.21	0.0001**
D	2817.35	1	2817.35	257.45	0.0001**
AB	101.10	1	101.10	9.24	0.0088**
AC	478.30	1	478.30	43.71	0.0001**
AD	15.13	1	15.13	1.38	0.2592
BC	27.93	1	27.93	2.55	0.1324
BD	73.10	1	73.10	6.68	0.0216*
A ²	1699.58	1	1699.58	155.31	0.0001**
B ²	8015.68	1	8015.68	732.47	0.0001**
C ²	1567.59	1	1567.59	143.25	0.0001**
D ²	825.26	1	825.26	75.41	0.0001**
残差	153.21	14	10.94		
失拟项	140.29	10	14.03	4.34	0.0848
纯误差	12.92	4	3.23		
综合	15919.00	28			
R ²	0.9904				
R _{2Adj}	0.9808				

由表 2-6 结果可知, 通过模型 P 值极显著、失拟项 P 值不显著, 可以判断此回归方程拟合性良好。而且模型的决定系数 R^2 为 0.9904, 表明实验数据与回归方程的相关度良好, 实验值与预测值的差异性不大; 校正决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9808, 表明可以正确反应 98.08% 花色苷提取量的变化, 可用于超声波提取蓝靛果花色苷的理论预测。影响花色苷提取量因素的强弱顺序为: 料液比 (D) > 超声时间 (B) > 乙醇体积分数 (C) > 超声功率 (A)。

2.3.2.2 各因素交互作用的响应面分析

由绘制的响应曲面图可知, 每个 3D 分析图都代表当两个因素保持在 0 水平时, 除此之外的因素之间交互作用。

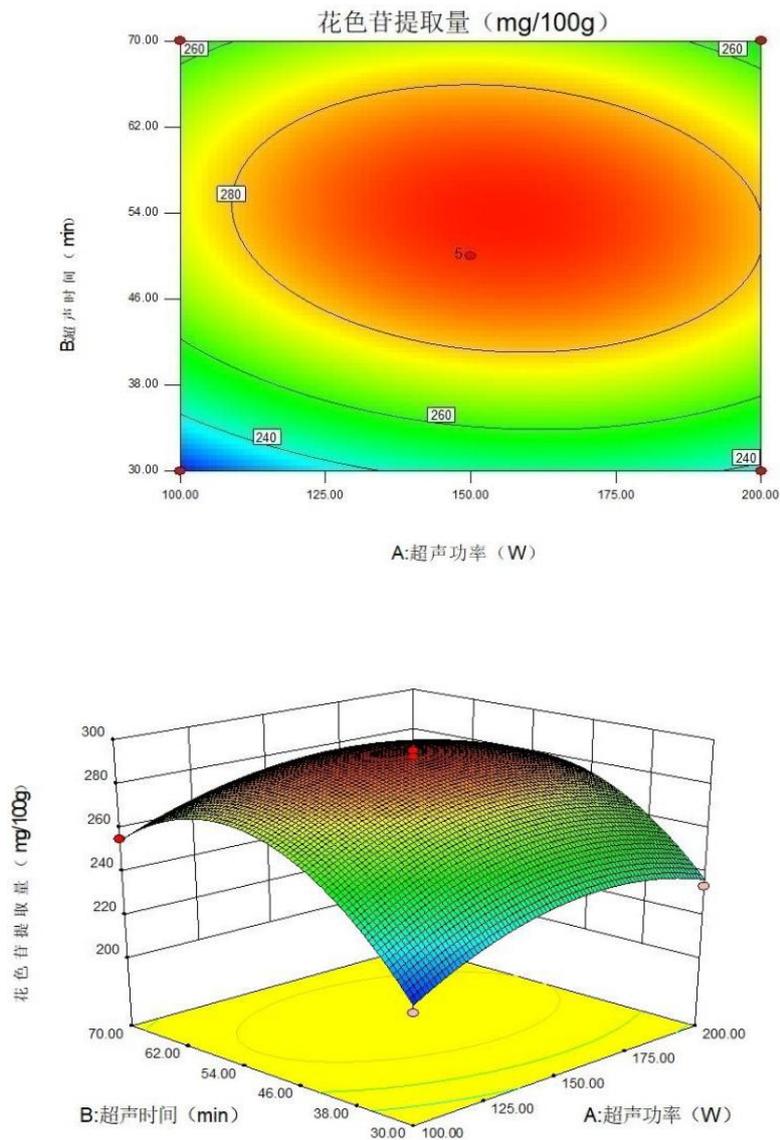


图 2.5 超声功率和超声时间对蓝靛果花色苷提取量的影响

由图 2.5 可知，在超声功率一定时，蓝靛果花色苷提取量随着超声时间的增加先上升后下降。当超声时间一定时，超声功率增加会使蓝靛果花色苷提取量先增加后减小。等高线呈椭圆，表明超声功率与超声时间作用下对蓝靛果花色苷提取量影响显著。

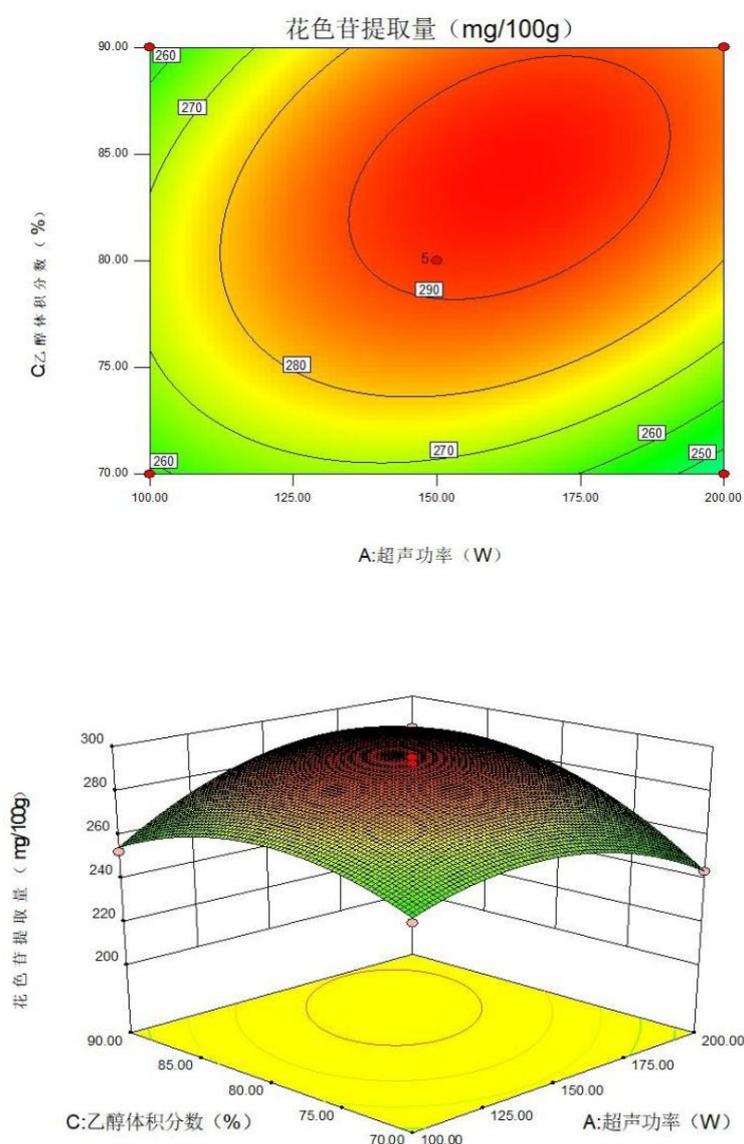


图 2.6 超声功率和乙醇体积分数对蓝靛果花色苷提取量的影响

由图 2.6 可知，在超声功率一定的条件下，蓝靛果花色苷提取量会随着乙醇体积分数增大表现为先增大后减小。而在乙醇体积分数固定时，超声功率增加时蓝靛果花色苷提取量会先上升后下降。呈现椭圆形，表明超声功率与乙醇体积分数交互下对蓝靛果花色苷提取量影响显著。

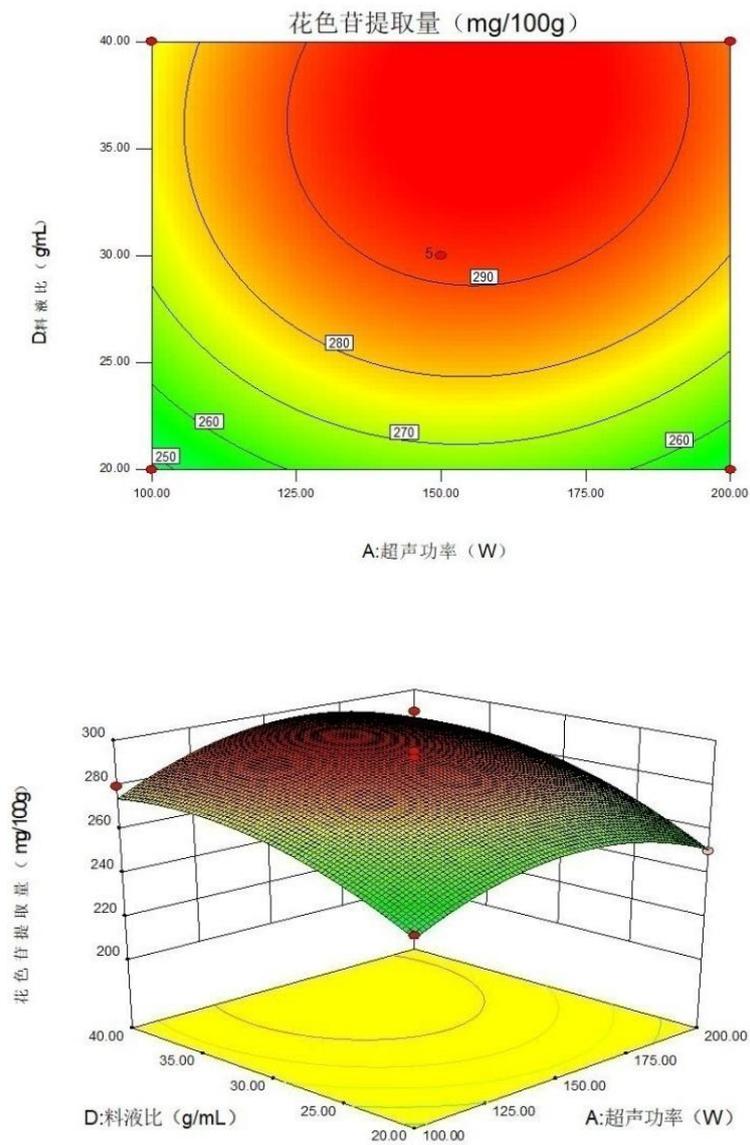


图 2.7 超声功率和料液比对蓝靛果花色苷提取量的影响

由图 2.7 可知，超声功率与料液比的交互作用对蓝靛果花色苷提取量不显著，表现为等高线呈现圆形。它们的交互对蓝靛果花色苷提取量的影响较小。

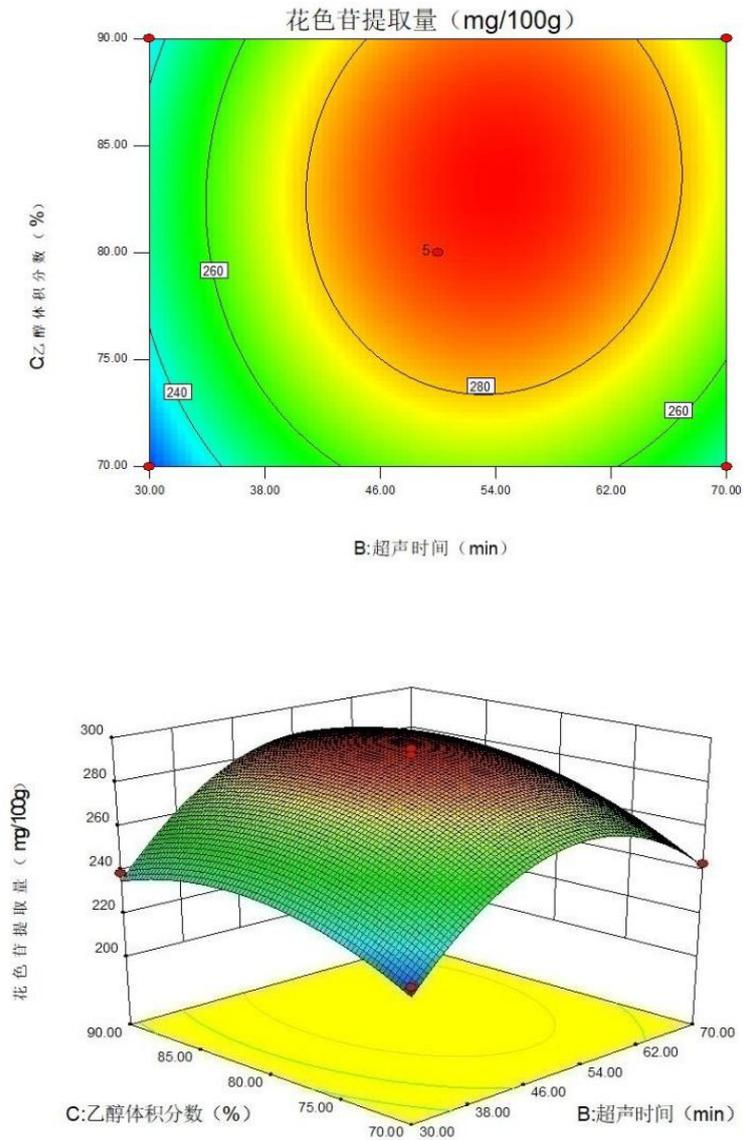


图 2.8 超声时间和乙醇体积分数对蓝靛果花色苷提取量的影响

由图 2.8 可知，超声时间与乙醇体积分数的交互对蓝靛果花色苷提取量的影响也不明显，他们的等高线呈现圆形，说明在超声功率、料液比一定时，他们的交互作用对蓝靛果花色苷提取量的影响较小。

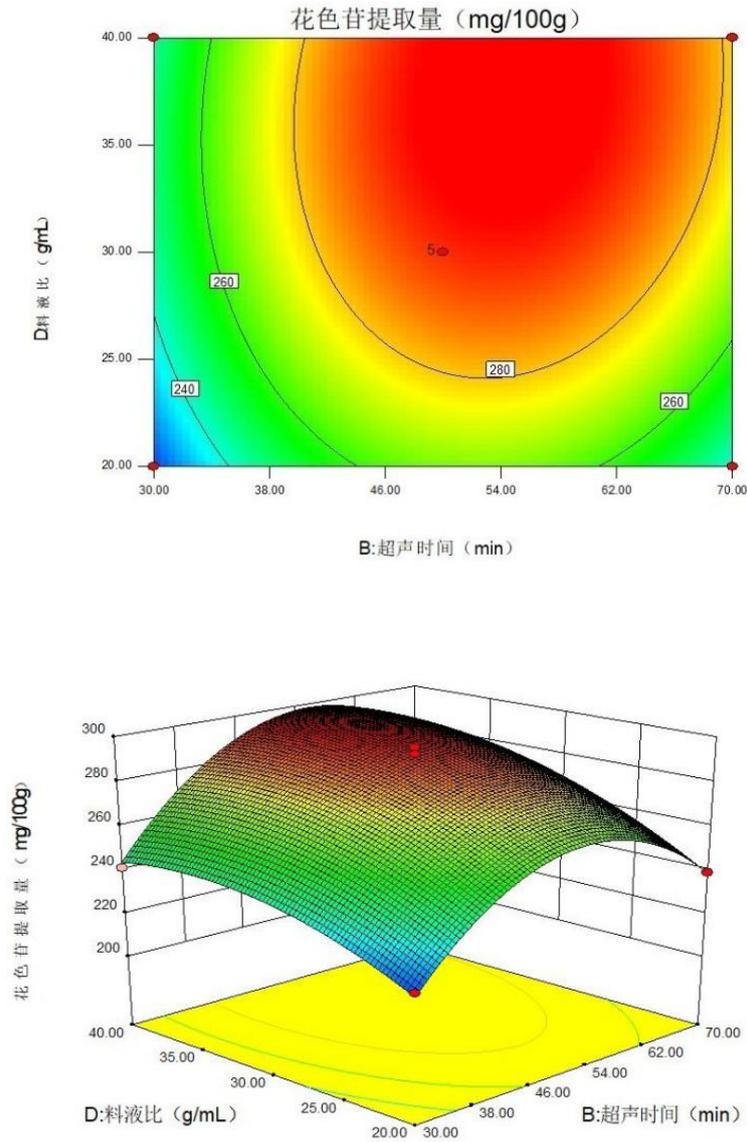


图 2.9 超声时间和料液比对蓝靛果花色苷提取量的影响

由图 2.9 可知，当超声时间一定时，料液比增加蓝靛果花色苷提取量会先上升后下降。而料液比一定时，蓝靛果花色苷提取量随着超声时间增加先增加后下降。它们的交互作用对蓝靛果花色苷提取量影响明显，呈现椭圆形。

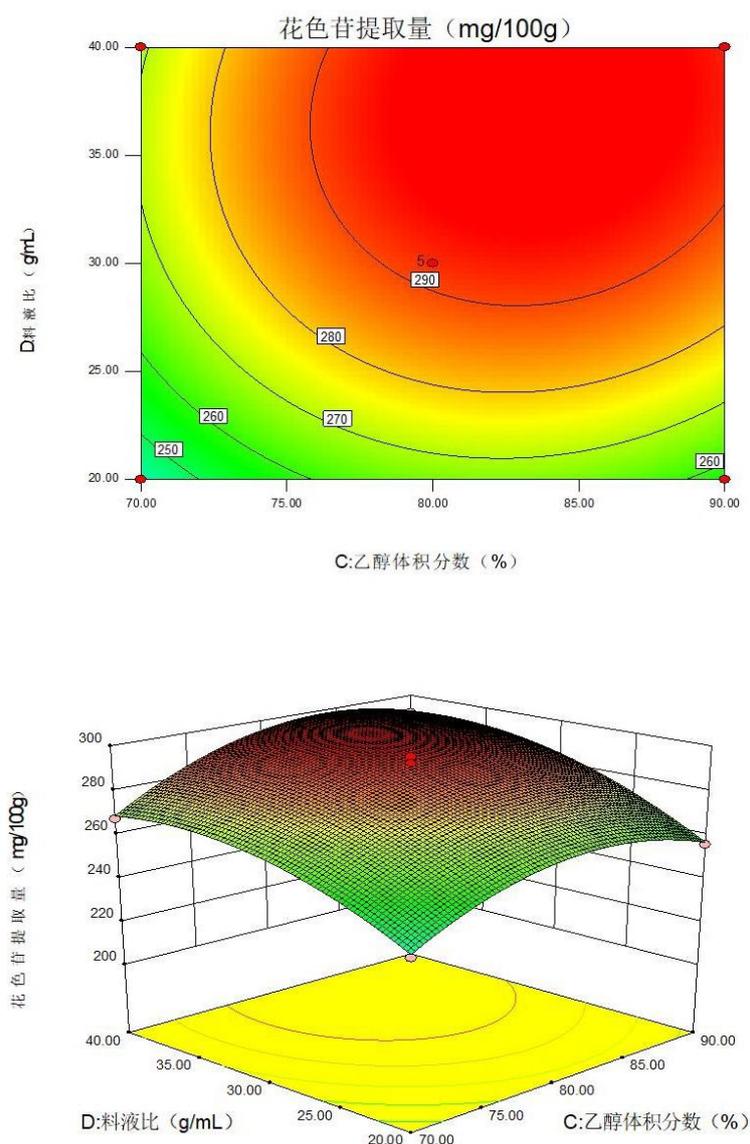


图 2.10 乙醇体积分数和料液比对蓝靛果花色苷提取量的影响

由图 2.10 可知，在乙醇体积分数一定时，蓝靛果花色苷提取量随着料液比的增加先上升后减小。当料液比固定时，乙醇体积分数增加蓝靛果花色苷提取量先增加后下降。他们的交互作用明显，呈现椭圆形，对蓝靛果花色苷提取量影响较大。

2.3.2.3 最优工艺条件的确定及验证

通过 Design-Expert 软件预测得到的最优提取方案为：超声功率 164.84 W，超声时间 54.55 min，乙醇体积分数 84.85%，料液比 1: 37.98 g/mL。此时花色苷提取量最大为 302.573 mg/100g。考虑实际可操作性选取超声功率 160 W，超声时间 55 min，乙醇体积

分数 85%，料液比 1:35 g/mL，此条件下进行得到花色苷提取量为 (298.22 ± 1.13) mg/100g，与理论值仅相差 1.5%，说明模型能较好测定花色苷提取量。

2.3.3 大孔吸附树脂种类的筛选

由表 3.7 可知，大孔吸附树脂对蓝靛果花色苷的吸附与解吸率。D101 与 AB-8 都对花色苷有较好的吸附效果，吸附率都在 70%以上，可能由于花色苷也是弱极性物质，它们之间存在着相似相溶，所以有较好的吸附率。而 AB-8 的解吸率最高，为 73.81%。综合吸附率与解吸率，AB-8 为最佳纯化的大孔吸附树脂。

表 3-7 四种大孔树脂吸附率与解吸率

型号	吸附率/%	解吸率/%
D101	70.32	68.98
HPD-100	63.51	54.37
AB-8	74.95	73.81
NKA-9	46.14	58.63

2.3.4 大孔树脂静态吸附实验

2.3.4.1 静态吸附曲线

大孔树脂的静态吸附曲线如图 2.11。在前 3.5 h 的时间内，大孔树脂对蓝靛果花色苷的吸附量逐渐上升，随着时间的增长，在 3.5 h 时达到平衡，吸附率不再变化，为 74.95%。因此，静态吸附的饱和时间为 3.5 h。

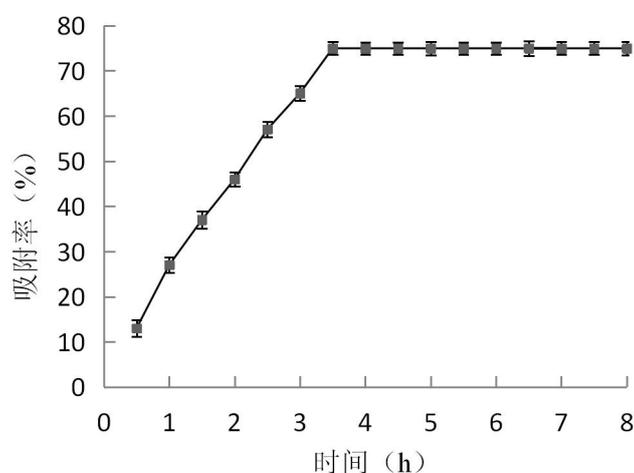


图 2.11 AB-8 大孔树脂静态吸附曲线

2.3.4.2 静态解吸曲线

大孔树脂的静态解吸曲线如图 2.12。在 3 h 前，大孔树脂对花色苷的解析率随时间的增长迅速增大，在 3 h 处达到最大，为 73.81%，解吸率趋于稳定。因此，大孔树脂的解吸时间为 3 h。

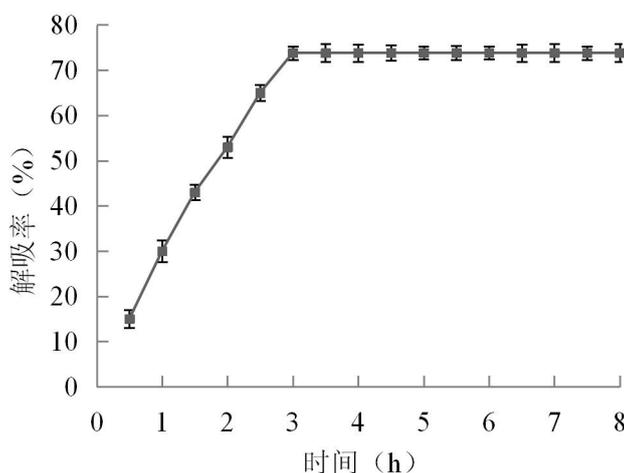


图 2.12 AB-8 大孔树脂静态解吸曲线

2.3.4.3 花色苷溶液 pH 值对大孔树脂吸附效果影响

溶液的 pH 值能够影响花色苷结构的稳定性，同时也会影响大孔树脂的吸附效果。由图 2.13 可知，大孔树脂的吸附率与溶液 pH 成正比。pH 值降低吸附率也随之降低。pH 值为 1.0、2.0、3.0 时，其吸附率效果相差不显著。但 pH 较低时花色苷糖基却会被水解。因此，溶液 pH 选择 3.0 进行后续实验。

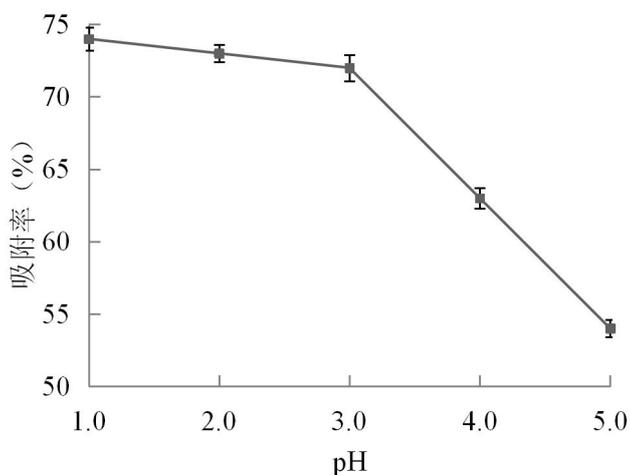


图 2.13 花色苷溶液 pH 值对大孔树脂吸附效果影响

2.3.4.4 解吸液 pH 值对大孔树脂解吸效果影响

由图 2.14 可知, 花色苷解吸率与 pH 也成正比。当解吸液 pH 值为 1.0、2.0、3.0 时, 其解吸率相差不显著。但 pH 较低时花色苷糖基会被水解, 结构不再稳定。故而 pH 值选择 3.0 为解吸液最佳 pH 值。

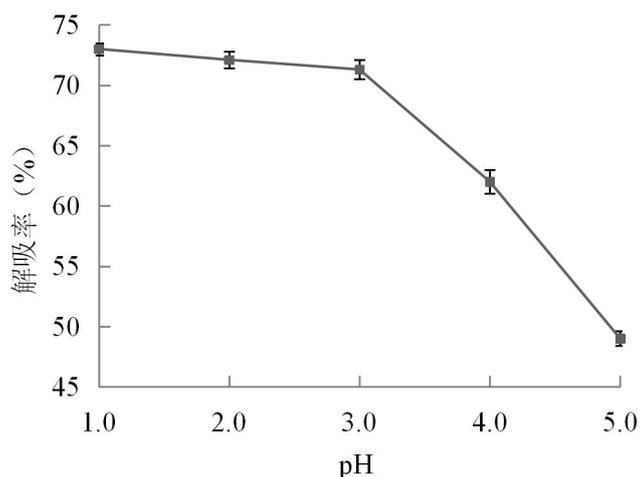


图 2.14 解吸液 pH 值对大孔树脂解吸效果影响

2.3.4.5 乙醇体积分数对大孔树脂解吸效果影响

花色苷与大孔树脂之间的作用力受到乙醇溶液的影响, 乙醇溶液增大时有利于花色苷从大孔树脂中洗脱。图 2.15 表明乙醇体积分数对大孔树脂解吸效果影响。当乙醇体积分数低于 80% 时, 乙醇体积分数与解吸效果成正比; 但当体积分数大于 80% 时解吸率, 体积分数与吸附率成反比。因此乙醇体积分数选择为 80%。

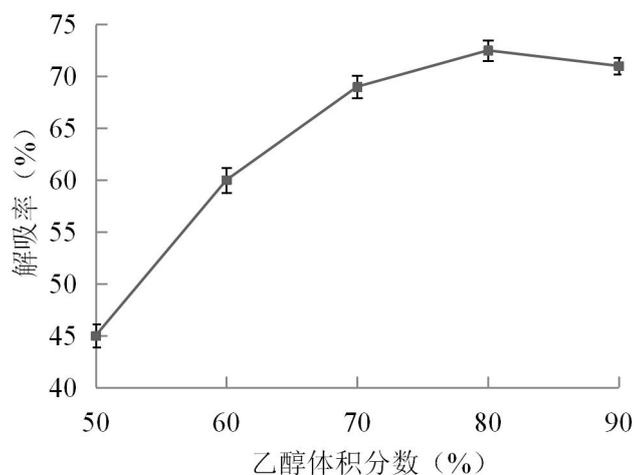


图 2.15 乙醇体积分数对大孔树脂解吸效果影响

2.3.5 大孔树脂动态吸附实验

2.3.5.1 上样浓度对大孔树脂吸附效果影响

当花色苷浓度增加时,其吸附率表现出下降的趋势。当浓度低时,大孔树脂有充分的时间对其进行吸附,但吸附效率也相应变低;提高浓度,会过早泄露,降低树脂吸附能力。通过图 2.16 可知,0.4、0.6、0.8 mg/mL 浓度的吸附率减小的并不明显。当超过 0.8 mg/mL 时,由于大孔树脂对花色苷的吸附需要更多时间,花色苷未能完全进入树脂。因此,吸附效果明显减小。考虑到对原料的节约与吸附率,花色苷浓度选择 0.8 mg/mL。

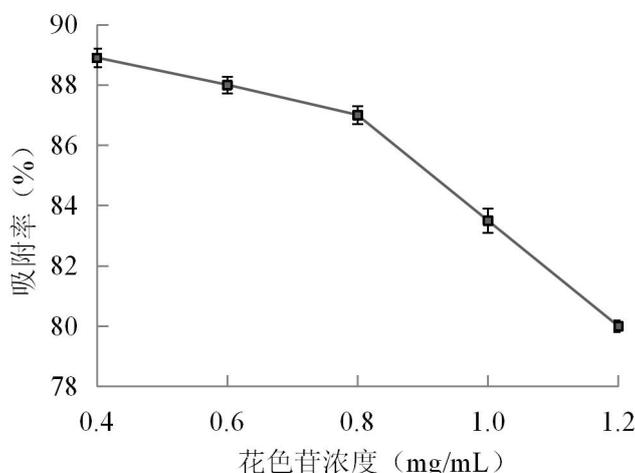


图 2.16 上样浓度对大孔树脂吸附效果影响

2.3.5.2 上样流速对大孔树脂吸附效果影响

上样流速的增大,使花色苷溶液吸附量逐渐较小。由图 2.17 可知,在 0.5-1.0 mL/min 范围,花色苷溶液吸附率减小的还并不明显,可能流速较低时花色苷溶液大多可以进入大孔树脂,表现为吸附率较高;当流速超过 1.0 mL/min 时,花色苷溶液来不及与进入树脂充分就从柱中流出,造成吸附率的降低。出于节约时间的考虑,上样速度选择 1.0 mL/min。

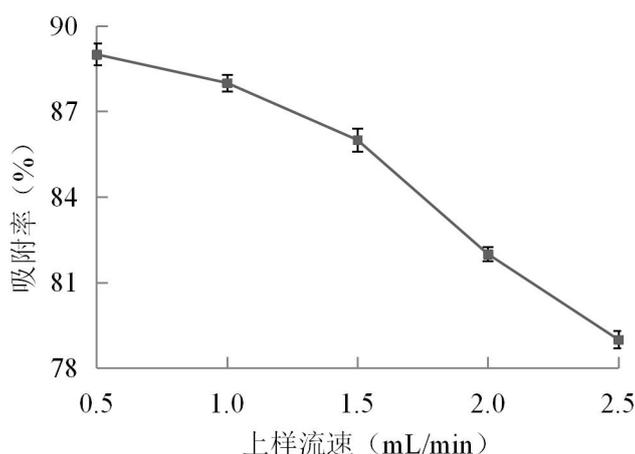


图 2.17 上样流速对大孔树脂吸附效果影响

2.3.5.3 泄露曲线的绘制

由图 2.18 可知,开始通过层析柱的液体不含有花色苷,随着上样体积的增大,逐渐由花色苷流出,吸光度增大,层析柱中树脂逐渐达到饱和,在 160 mL 处吸光度达到上样体积的 1/10,出现泄露现象。

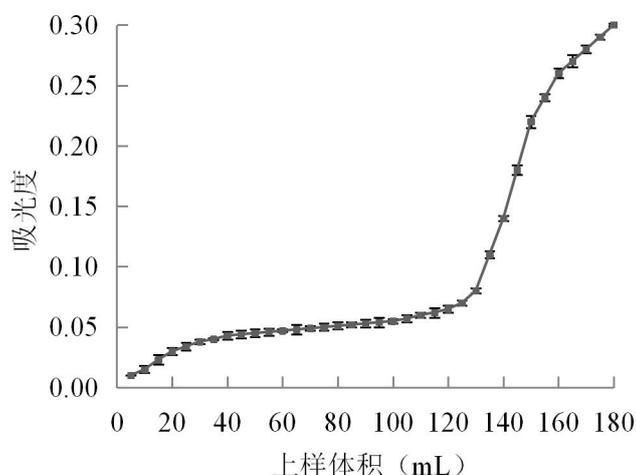


图 2.18 AB-8 大孔树脂泄露曲线

2.3.5.4 洗脱流速对大孔树脂解吸效果影响

由图 2.19 可知,洗脱液流经层析柱速度越大,解吸率越小。由于速度过快洗脱剂未能充分从树脂上洗脱花色苷,与树脂接触时间过小,导致解吸率降低;较小的洗脱速度因与树脂有长时接触,由更好的洗脱效果,解吸率增大。0.5-1.0 mL/min 的洗脱速度所反映的解吸率并不明显。结合时间与解吸效果,洗脱速度选择 1.0 mL/min。

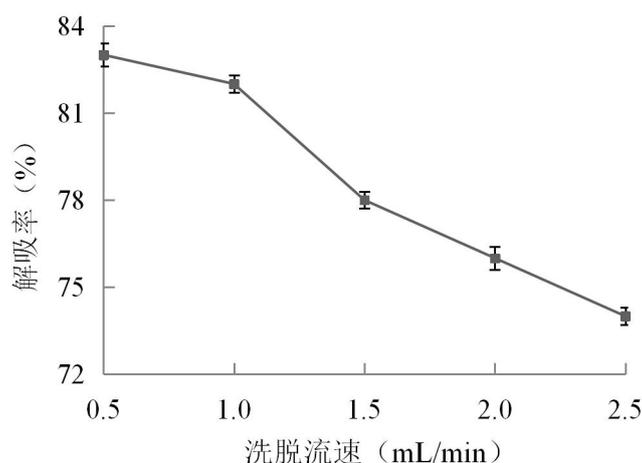


图 2.19 洗脱流速对大孔树脂解吸效果影响

2.3.5.5 动态解吸曲线的绘制

由图 2.20 可知, 洗脱下来的溶液在开始时不含花色苷, 当体积达到 5 mL 时, 开始有花色苷洗脱下来。随后吸光度迅速上升, 体积达到 40 mL 时最大。继续增加洗脱体积, 吸光度逐渐下降, 当超过 110 mL 时, 基本检测不到花色苷的存在, 则洗脱液体积为 110 mL。

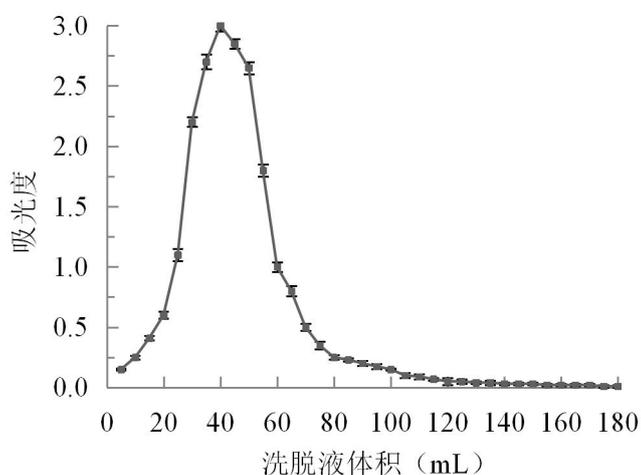


图 2.20 AB-8 大孔树脂动态解吸曲线

2.4 本章小结

(1) 提取蓝靛果花色苷采用超声波法, 通过 pH 示差法测定花色苷含量, 单因素实验确定提取影响因素为: 超声功率、超声时间、乙醇体积分数、料液比。

(2) 通过响应面优化法确定最佳工艺条件: 超声功率 160 W, 超声时间 55 min,

乙醇体积分数 85%，料液比 1: 35 g/mL，此条件下得到花色苷提取量为 (298.22±1.13) mg/100g。

(3) 通过蓝靛果花色苷的分离纯化验证 D101、AB-8、HPD-100、NKA-9 四种极性不同的大孔树脂的吸附与解吸效果。其中 AB-8 大孔树脂的性能相对较好，静态吸附率与解吸率分别为 74.95%、73.81%，吸附时间为 3.5 h，解吸时间为 3 h。

(4) 大孔树脂静态吸附实验中，蓝靛果花色苷样液 pH 为 3.0 时吸附效果较好；体积分数 80% 的乙醇溶液 pH 为 3.0 时解吸效果较好。大孔树脂动态吸附实验中，蓝靛果花色苷样液浓度选择 0.8 mg/mL、流速选择 1.0 mL/min 通过树脂柱，可以完成更好树脂饱和吸附效果，上样体积为 160 mL 时出现泄露；110 mL 的 80% 乙醇溶液当以 1.0 mL/min 的速度通过树脂柱时，能够使花色苷解吸完全，解吸效果更好。在此条件下蓝靛果花色苷粉末含量为 (317.35±0.82) mg/g。

第3章 HPLC-MS/MS 结合分子对接技术对蓝靛果花色苷活性的研究

高效液相色谱-质谱联用（HPLC-MS/MS）是通过液相色谱将待测样品中组分进行分离而质谱仪对分离的组分进行分析得到其分子量等信息。分子对接技术用来预测受体配体之间的亲和力与相互作用模式。本章采用高效液相色谱-质谱联用（HPLC-MS/MS）对纯化后的蓝靛果花色苷组成进行鉴定；并基于分子对接技术对其抗炎活性的作用机制进行分析。

3.1 材料与仪器

3.1.1 材料与试剂

表 3-1 实验试剂

药品	生产厂家
色谱级乙腈	北京化工厂
色谱级甲醇	北京化工厂
色谱级甲酸	北京化工厂

3.1.2 仪器与设备

表 3-2 主要仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
高效液相色谱仪、质谱仪	1260	美国 Agilent 公司
电子天平	HX2002T	慈溪市天东衡器厂

3.2 实验方法

3.2.1 蓝靛果花色苷的 HPLC-MS/MS 分析

在 2 mL 色谱级甲醇中加入 10 μg 冻干粉样品，经过 0.45 μm 膜过滤备用。

(1) 色谱条件：C18 色谱柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ）

DAD 检测器

流动相 A：0.1%的甲酸水溶液；

流动相 B：乙腈；0~45 min，B：0~45%；45~50 min，B：0%。

流速: 0.7 mL/min;
柱温: 25℃;
检测波长: 520 nm。

(2) 质谱条件: 正离子模式;
全自动二级质谱扫描, 扫描范围 m/z 50~1000;
干燥气压力 30 psi;
流速 12 L/min;
温度 350 ℃;
毛细管电压 3500 V。

3.2.2 蓝靛果花色苷与抗炎靶点分子 IL-6 对接

将经 HPLC-MS/MS 得出的四种蓝靛果花色苷通过 ChemBioDraw Ultra 软件画出 2D 结构, 再转化成 3D 结构。通过 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库选择人类为蛋白质来源、较小的解析度、X 衍射方法解析蛋白机构作为筛选条件确定白细胞介素 IL-6 的晶体结构。通过 Autodock 软件计算靶点蛋白与成分之间最低结合能, 完成分子对接并展示对接成果图片。

3.3 结果与讨论

3.3.1 蓝靛果花色苷 HPLC-MS/MS 分析

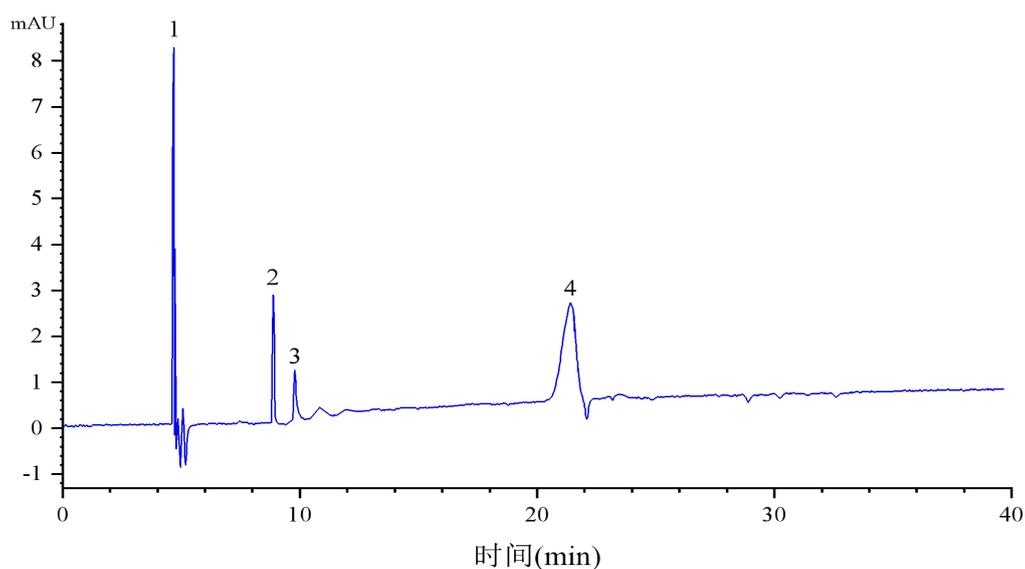


图 3.1 蓝靛果提取物中花色苷 HPLC 图

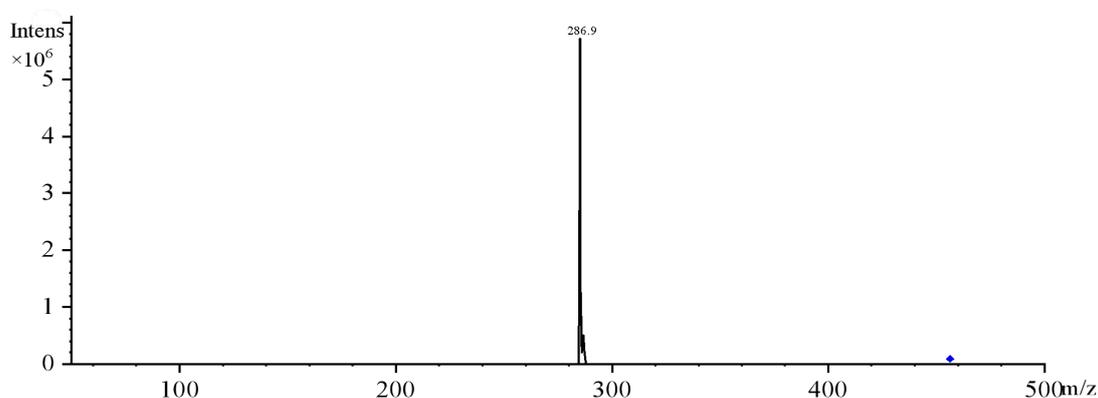
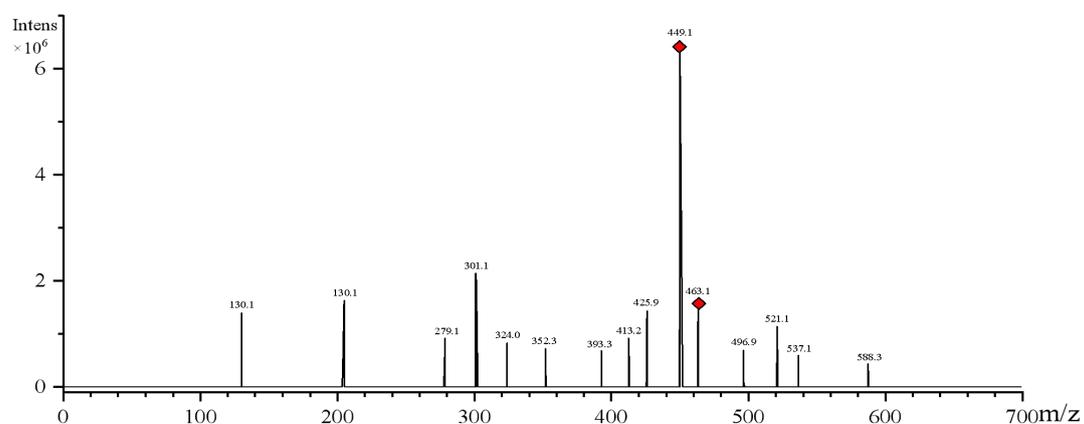


图 3.2 矢车菊-3-葡萄糖苷的一级、二级质谱图 (峰 4 物质)

表 3-3 蓝靛果提取物中花色苷的成分组成

峰号	保留时间 (min)	峰面积比例 (%)	分子离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	花色苷名称
1	4.669	14.497	737	575、287	矢车菊-3-己糖苷-儿茶素
2	8.669	7.395	897	735、573	矢车菊-3-己糖苷二聚体
3	9.767	6.137	611	449、287	矢车菊-3,5-二己糖苷
4	21.427	68.971	449	287	矢车菊-3-葡萄糖苷

由 HPLC-MS/MS 分析蓝靛果花色苷的组成, 其结果如图 3.1 与图 3.2。通过考察各花色苷的保留时间、分子离子峰以及碎片离子峰, 以峰 4 物质质谱图例进行详细分析, 由参考文献^[38-39]得知离子碎片 m/z 287 为矢车菊素, 分子碎片 m/z 449 为矢车菊-葡萄糖苷。峰 4 物质为矢车菊-葡萄糖苷 (m/z 449) 失去一分子葡萄糖 $[M-162]^+$, 综合保留时

间可得峰 4 物质为矢车菊-3-葡萄糖苷。鉴定得出蓝靛果花色苷 4 种, 分别为矢车菊-3-己糖苷-儿茶素、矢车菊-3-己糖苷二聚体、矢车菊-3,5-二己糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷(表 3-3), 其中峰 4 物质矢车菊-3-葡萄糖苷的含量最高为 68.971%。

3.3.2 蓝靛果花色苷与抗炎靶点分子对接结果

表 3-4 蓝靛果花色苷与 IL-6 分子对接结果

花色苷	结合能 kcal/mol
矢车菊-3-己糖苷-儿茶素	-3.66
矢车菊-3-己糖苷二聚体	-5.57
矢车菊-3,5-二己糖苷	-6.59
矢车菊-3-葡萄糖苷	-6.67

蓝靛果花色苷与 IL-6 分子对接结果如表 3-4 所示。结果表明蓝靛果花色苷与 IL-6 分子结合能分别为-3.66 kcal/mol、-5.57 kcal/mol、-6.59 kcal/mol、-6.67 kcal/mol。其中, 分子结合能绝对值越大说明结合效果越好。结合能绝对值 $|-6.67| \text{ kcal/mol} > |-6.59| \text{ kcal/mol} > |-5.57| \text{ kcal/mol} > |-3.66| \text{ kcal/mol}$, 其中矢车菊-3-葡萄糖苷与 IL-6 结合最为紧密。表明 4 种蓝靛果花色苷与 IL-6 蛋白有结合能力并且能够发挥抗炎作用。



图 3.3 矢车菊-3-己糖苷-儿茶素与 IL-6 分子对接图

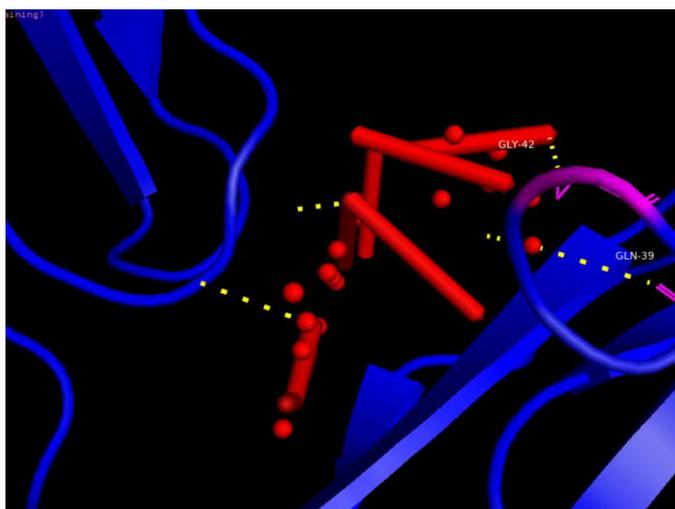


图 3.4 矢车菊-3-己糖苷二聚体与 IL-6 分子对接图

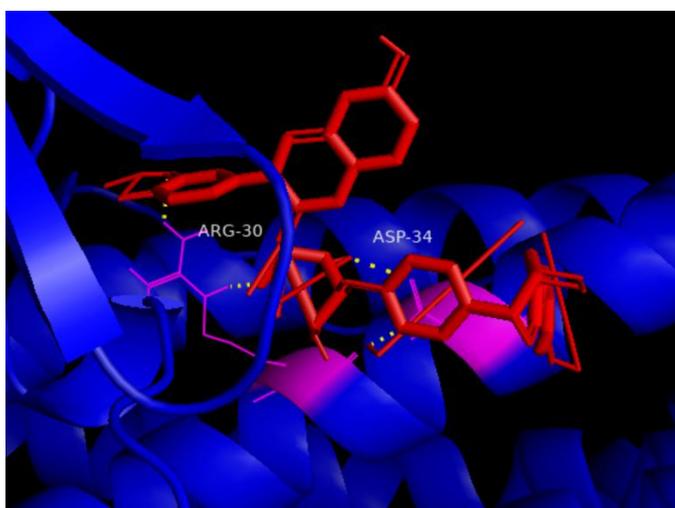


图 3.5 车菊-3,5-二己糖苷与 IL-6 分子对接图



图 3.6 矢车菊-3-葡萄糖苷与 IL-6 分子对接图

3.4 本章小结

(1) 通过 HPLC-MS/MS 鉴定出 4 种花色苷, 分别为矢车菊-3-己糖苷-儿茶素、矢车菊-3-己糖苷二聚体、矢车菊-3,5-二己糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷, 其中矢车菊-3-葡萄糖苷含量最高为 68.971%。

(2) 通过分子对接技术计算得出蓝靛果花色苷与抗炎靶点 IL-6 结合效果。结果表明 4 种蓝靛果花色苷与 IL-6 蛋白结合效果良好并且能够发挥抗炎作用。

第4章 基于网络药理学对蓝靛果复方压片治疗干眼症作用机制的研究

本章以蓝靛果、菊花、枸杞为原料制作蓝靛果复方压片。通过网络药理学对其活性成分、有效靶点及信号通路等方面分析蓝靛果复方压片治疗干眼症的作用机制，以及体外抗炎实验验证其对 NO、PGE₂、IL-6、IL-1 β 释放水平的影响，为进一步的蓝靛果的开发应用提供依据与思路。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料与试剂

表 4-1 实验试剂

药品	生产厂家
麦芽糊精	上海晶抗生物工程有限公司
硬脂酸镁	上海晶抗生物工程有限公司
IL-1 β ELISA 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
IL-6 ELISA 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
前列腺素 E ₂ (PGE ₂) ELISA 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
二甲基亚砜 (DMSO)	美国 Sigma 公司
脂多糖 (LPS)	美国 Sigma 公司
青霉素-链霉素	美国 Sigma 公司
PBS 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.2-7.4)	美国 Sigma 公司
四甲基偶氮唑蓝 (MTT)	美国 Sigma 公司
胎牛血清	赛默飞世尔生物化学制品有限公司
高糖 DMEM 培养液	赛默飞世尔生物化学制品有限公司
小鼠巨噬细胞 RAW264.7	南京凯基生物有限公司

4.1.2 仪器与设备

表 4-2 主要仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	HX2002T	慈溪市天东衡器厂
冷冻干燥机	LGJ-30	北京松源华兴科技发展有限公司

续表 4-2

仪器名称	型号	生产厂家
单充式压片机	TDP-1.5	上海天峰制药有限公司
旋转蒸发器	RE-300	上海亚荣生化仪器厂
恒温培养箱	PH-050A	上海一恒科学仪器有限公司
酶标仪	Biotek Elx808	美国 Bio-Tek 公司
紫外可见分光光度计	TU-1800	北京普析通用仪器有限责任公司
倒置显微镜	JDS300	北京京昊永成商贸有限公司
恒温水浴锅	HH-4	上海力辰邦西有限公司
高速离心机	LG16-W	北京京立离心机有限公司

4.1.3 数据库与软件

表 4-3 数据库与软件

数据库	网址
TCMSP	https://tcmospw.com/index.php
Pubchem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
SwissTargetPrediction	http://www.swisstargetprediction.ch
Genecards	https://www.genecards.org
String	https://string-db.org
DAVID6.8	https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp

4.2 实验方法

4.2.1 蓝靛果复方压片的样品制备

4.2.1.1 原料制备与配比

将干燥的菊花、枸杞用粉碎机粉碎，按料液比 1: 10 加入的 80%乙醇 150 W 超声波提取 30 min。抽滤后旋蒸蒸发出乙醇，经真空冷冻干燥成粉末状，备用。

表 4-4 蓝靛果复方压片原料配比

原料	比例
蓝靛果	30%
枸杞	25%

续表 4-4

原料	比例
菊花	20%
白砂糖	10%
麦芽糊精	15%
硬脂酸镁	0.2%

4.2.1.2 蓝靛果复方压片制作工艺

以蓝靛果、菊花、枸杞为原料，用白砂糖、麦芽糊精定型，过 100 目筛后加入 0.2% 的硬脂酸镁对原料进行混合，混合机转速为 12 r/min 混合 10 min，采用粉末直接压片工艺制作复合压片，每片 0.5 g。

4.2.2 蓝靛果复方压片对干眼症的网络药理学分析

4.2.2.1 药物活性成分的收集与靶点的预测

蓝靛果活性成分通过 HPLC-MS/MS 鉴定得到，菊花、枸杞活性成分查询中药系统药理学数据库，口服生物利用度 (OB) $\geq 45\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.2 作为筛选参数获得活性成分。

将获得的活性成分通过 Pubchem 检索对应的 SMILE 编码。并将活性成分的 SMILE 编码导入到 SwissTargetPrediction 数据库获得化合物作用靶点。

4.2.2.2 化合物靶点网络的构建

将菊花、蓝靛果、枸杞的活性成分靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件中，建立化合物与靶点为节点，关系为边，绘制化合物-靶点网络。

4.2.2.3 干眼症靶点的筛选

通过人类疾病基因数据库 Genecards 中输入“xerophthalmia”，检索干眼症相关的靶基因，并与菊花、蓝靛果、枸杞化合物靶点对比，筛选出共同靶点。

4.2.2.4 化合物靶点-干眼症靶点互作网络

将药物与疾病的共同靶点，通过 STRING 数据库构建蛋白互作网络。设置参数“homo sapiens”，置信度 > 0.7 。

4.2.2.5 基因富集分析

通过 DAVID6.8 导入药物治疗干眼症的潜在靶点,通过 GO 生物学功能分析与 KEGG 通路富集分析。KEGG 富集分析可以得到菊花、蓝靛果、枸杞和干眼症共同靶点所富集的信号通路。GO 和 KEGG 分析结果以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

4.2.3 体外抗炎实验

4.2.3.1 RAW264.7 细胞的培养

(1) 细胞复苏

用酒精对要使用的仪器进行擦拭消毒,从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出巨噬细胞,快速移入调节温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中,对其进行摇晃以加快细胞冻存液解冻。待冻存液解冻完毕后,再把细胞转移到 15 mL 离心管中,并加入向其 4 mL 细胞培养液,并进行离心处理,离心条件选择 1000 rpm,离心 5 分钟,使用移液枪加入 1 mL 细胞培养液,吹打均匀离心管中的细胞,最后将细胞转移至培养皿中,放入培养箱培养。

(2) 细胞培养及传代

培养箱的条件设定为:温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5%、相对湿度为 70%。在含有 10%胎牛血清与 1%青-链霉素双抗的 DMEM 培养基中放入 RAW264.7 细胞进行培养。使用显微镜定期观察巨噬细胞的生长情况,当其生长到培养皿的 80%以上的区域时进行传代处理。

将准备好的 RAW264.7 细胞倒掉旧培养基,再加入温度为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 对细胞洗涤操作三次,然后在巨噬细胞中加入 1 mL 浓度为 0.25%的胰蛋白酶,使巨噬细胞被胰蛋白酶完全覆盖,在温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中消化 5 分钟。使用显微镜对巨噬细胞的消化情况进行观察,消化后的巨噬细胞不会沾连成片,且随时间的增长细胞会逐渐趋于圆形,然后加入 DMEM 完全培养基 2 mL 使巨噬细胞的消化终止。为使巨噬细胞脱落可以用移液枪进行反复吹打,放入离心管中离心,离心条件为 1000 rpm,离心时间 5 分钟,完毕后弃去离心管中上清液,加入新的培养基吹匀。分 3 组分别放入培养皿中进行培养。

(3) 细胞冻存

向已经不再发生粘连的细胞加入冻存液。其中冻存液应该现用现配,培养液、DMSO、血清的比例为 4: 1: 5 准确配置 1 mL。先放入 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 30 分钟,再将其放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻存放 2 小时,最后在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行保存。

4.2.3.2 MTT 细胞活性实验

使用96孔板接种RAW264.7细胞,其中孔内体积均为200 μL ,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL。在温度为37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为5%的条件下对96孔板中的RAW264.7细胞培养,直到其发生粘连贴壁的现象,然后加入蓝靛果复方压片粉末,分成4组并设置3个复孔,分别为50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$,培养24 h。结束后向每孔加入20 μL MTT溶液,培养4 h。MTT溶液由MTT粉末与PBS中溶解,浓度为5 mg/mL 。用移液枪吸取上清液并弃去,然后向每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,当观察到细胞内晶体完全溶解后,使用酶标仪在490 nm波长下测定每孔吸光度。

4.2.3.3 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、IL-1 β 、IL-6 及 PGE₂ 释放量

通过含胎牛血清的DMEM培养液调整对数生长期的RAW264.7细胞浓度为 1×10^5 个/mL,在96孔板中每孔加入200 μL ,在温度为37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为5%的条件下进行细胞培养24 h。吸取孔内培养液设置实验分为空白组,模型组,实验组。空白组,只加入细胞;模型组,只加入含1 $\mu\text{g/mL}$ LPS的培养液;实验组,加入50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 各浓度蓝靛果复方压片并进行三个复孔培养30 min后加入终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS,放入培养箱中培养24 h。用Griess法检测NO释放含量,用ELISA试剂盒检测LPS诱导的RAW264.7细胞的IL-1 β 、IL-6及PGE₂的释放含量。

4.2.4 数据处理

实验重复三次,对数据的统计分析采用SPSS17.0,进行单因素方差分析。

4.3 结果与讨论

4.3.1 药物活性成分

以 $\text{OB} \geq 45\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.2$ 作为筛选参数通过TCMSP数据库筛选出菊花5种活性成分:槲皮素、柚皮素、异鼠李素、艾黄素、(24R)-4 α -甲基-24-乙基胆甾-7,25-二烯-3 β -基醋酸酯;枸杞3种活性成分:槲皮素、黄豆黄素、花青苷,见表4-5。蓝靛果、菊花、枸杞有效成分共计11种。

表 4-5 菊花、枸杞活性成分

化合物名称	中文名称	OB(%)	DL
quercetin	槲皮素	49.60	0.31

续表 4-5

化合物名称	中文名称	OB(%)	DL
naringenin	柚皮素	46.43	0.28
isorhamnetin	异鼠李素	59.29	0.21
Artemetin	艾黄素	49.55	0.48
glycitein	黄豆黄素	50.48	0.24
cyanin	花青苷	47.42	0.76
(24R)-4alpha-Methyl-24-ethylcholesta-7,25-dien-3beta-ylacetate	(24R)-4 α -甲基-24-乙基胆甾-7,25-二烯-3 β -基醋酸酯	46.36	0.84

4.3.2 活性成分-靶点网络

通过 Cytoscape 构建活性成分-靶点网络，如图 4.1

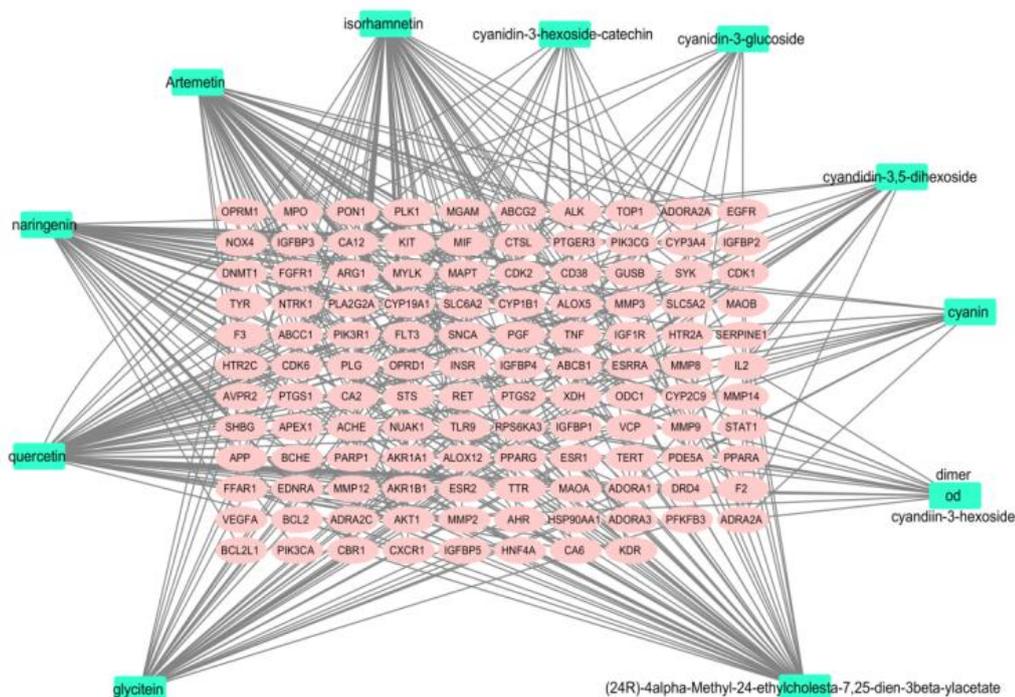


图 4.1 活性成分-靶点网络

4.3.3 靶点相互作用分析

靶点相互作用网络见图 4.2。由于设定 combined score>0.9,使网络显示更简洁。靶点相互作用网络中实际包含 59 个节点和 593 条相互作用连线。其中前 10 名关键靶点为: AKT1、VEGFA、TNF、EGFR、PTGS2、MMP9、HSP90AA1、PIK3CA、IL2、IL6。

AKT1 属于丝氨酸蛋白激酶，在机体中能够调控细胞凋亡并与生长增殖有关。VEGFA 是一种血管内皮生长因子，能够促进角膜血管的新生，并在干眼症病人泪液中有高表达量^[43]。EGFR 表皮生长因子通过与配体结合并激活相应通路来控制细胞增殖分化，促进角膜上皮细胞的修复^[44]。PTGS2 有研究表明 PTGS2 抑制剂用于干眼症小鼠模型并通过免疫炎症反应治疗干眼症^[45]。MMP9 研究发现在治疗干眼症患者的泪液中 MMP9 的表达水平减少，减轻干眼症的炎症反应^[46]。IL-2、IL-6 属于白细胞介素，能够激活机体中免疫细胞，活化 T、B 免疫细胞，对炎症反应有重要作用。干眼症是由炎症反应介导的眼部疾病，在患者与动物模型的泪液中 IL-6、IL-1 β 的表达量均有提升^[42]。在治疗干眼症的网络药理学分析中他们作为关键靶点，表示治疗干眼症可能与抑制炎症反应的发生、角膜细胞的损伤有关。

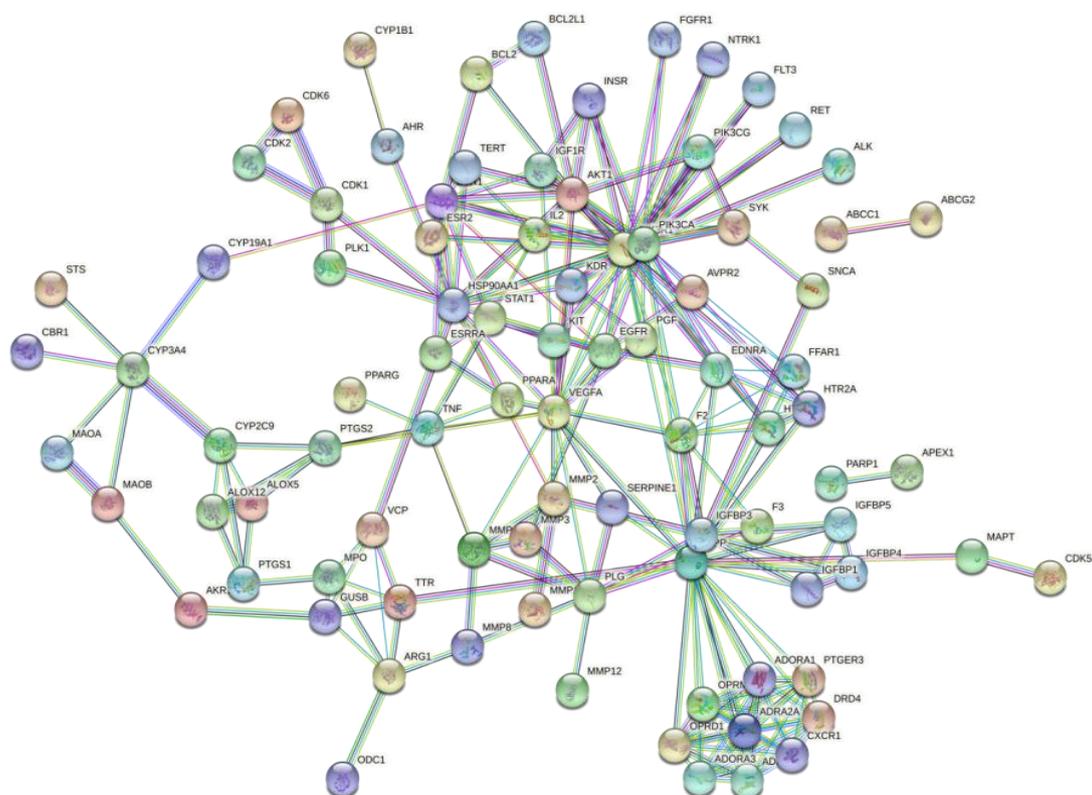


图 4.2 靶点相互作用网络

4.3.4 基因富集分析

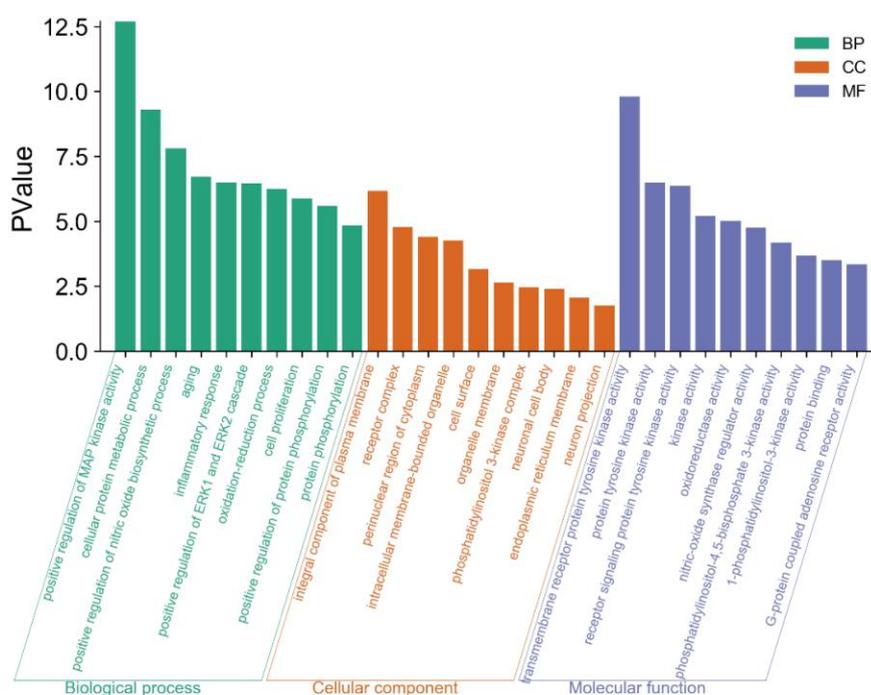


图 4.3 GO 生物功能富集分析

表 4.6 GO 功能富集分析

分类	生物功能	富集基因数	P	
BP	positive regulation of MAP kinase activity	12	2.03×10^{-13}	
	cellular protein metabolic process	12	4.95×10^{-10}	
	positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	8	1.54×10^{-8}	
	aging	11	1.96×10^{-7}	
	inflammatory response	15	3.16×10^{-7}	
	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	11	3.39×10^{-7}	
	oxidation-reduction process	18	5.62×10^{-7}	
	cell proliferation	14	1.33×10^{-6}	
	positive regulation of protein phosphorylation	9	2.58×10^{-6}	
	protein phosphorylation	14	1.45×10^{-5}	
	CC	integral component of plasma membrane	27	6.76×10^{-7}
		receptor complex	8	1.68×10^{-5}
		perinuclear region of cytoplasm	15	4.05×10^{-5}

续表 4-6

分类	生物功能	富集基因数	P
	intracellular membrane-bounded organelle	14	5.57×10^{-5}
	cell surface	12	6.84×10^{-4}
	organelle membrane	5	2.31×10^{-3}
	phosphatidylinositol 3-kinase complex	3	3.48×10^{-3}
	neuronal cell body	8	4.04×10^{-3}
	endoplasmic reticulum membrane	13	8.79×10^{-3}
	neuron projection	6	1.78×10^{-2}
MF	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	9	1.60×10^{-10}
	protein tyrosine kinase activity	10	3.33×10^{-7}
	receptor signaling protein tyrosine kinase activity	5	4.31×10^{-7}
	kinase activity	11	6.34×10^{-6}
	oxidoreductase activity	10	9.82×10^{-6}
	nitric-oxide synthase regulator activity	4	1.73×10^{-5}
	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase activity	6	6.65×10^{-5}
	1-phosphatidylinositol-3-kinase activity	5	2.12×10^{-4}
	protein binding	8	3.11×10^{-4}
	G-protein coupled adenosine receptor activity	3	4.62×10^{-4}

图 4.3 为菊花、蓝靛果、枸杞治疗干眼症的作用靶点 GO 功能富集结果。GO 功能富集分析分生物过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF)。这些作用靶点参与调控的功能主要有炎症反应、衰老、蛋白质磷酸化、氧化还原过程、神经元细胞体等。

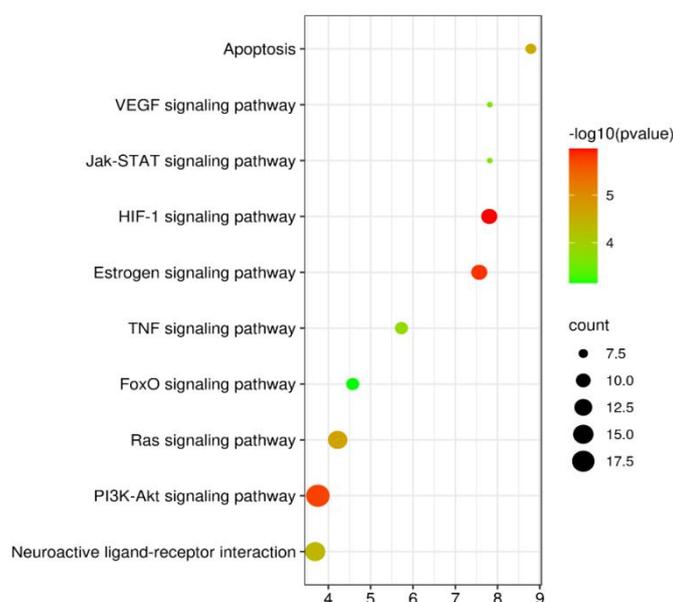


图 4.4 KEGG 通路富集分析

表 4.7 KEGG 通路富集分析

通路	富集基因数	P
HIF-1 signaling pathway	11	1.07×10^{-6}
Estrogen signaling pathway	11	1.43×10^{-6}
PI3K-Akt signaling pathway	19	1.82×10^{-6}
Ras signaling pathway	14	2.07×10^{-5}
Apoptosis	8	2.84×10^{-5}
Neuroactive ligand-receptor interaction	15	4.16×10^{-5}
TNF signaling pathway	9	1.50×10^{-4}
VEGF signaling pathway	7	2.36×10^{-4}
FoxO signaling pathway	9	6.95×10^{-4}
Jak-STAT signaling pathway	7	1.8×10^{-2}

KEGG 通路富集结果如图 4.4 所示, 在 HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、细胞凋亡、神经活动配体-受体相互作用、肿瘤坏死因子信号通路、血管内皮生长因子信号通路、FoxO 信号通路、Jak-STAT 信号通路有靶点富集。

通过通路富集结果发现, 这些作用靶点在炎症、细胞凋亡、氧化应激等相关通路上大量富集, 如 PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路、血管内皮生长因子信号通路、HIF-1 信号通路。其中, PI3K-Akt 信号通路参与细胞凋亡, 通过调节转录因子的结合来参与炎

症反应的调控^[47]。FoxO 信号通路可以参与如细胞凋亡、抗氧化应激等生物过程。HIF-1 包含 HIF-1 α 与 HIF-1 β ，能够调控炎症因子的表达与免疫细胞的存活，并影响细胞增殖、凋亡等过程^[48]

4.3.5 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞活力的影响

表 4-8 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞活性影响

组别	剂量/ ($\mu\text{g/mL}$)	细胞存活率/ (%)
空白组	-	100.35 \pm 0.77
给药组	50	104.98 \pm 0.65 ^{**}
	100	102.89 \pm 0.96 [*]
	200	98.12 \pm 1.32 ^{**}
	400	93.87 \pm 0.14 ^{**}

注：与正常对照组比较^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

分别采用不同剂量蓝靛果复方压片作用于 RAW264.7 细胞 24 h，通过 MTT 法检测各组细胞活力。RAW264.7 细胞与药物共同培养后发现，在药物剂量为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 时蓝靛果复方压片对细胞存活率都在 100%以上，药物剂量为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率出现下降并低于 100%，为 98.12%。当药物剂量为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率分别为 93.87%。药物剂量分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率均维持在 90%以上，表明蓝靛果复方压片对细胞无毒害作用。

4.3.6 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞释放 NO、PGE₂ 含量的影响

表 4-9 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞释放 NO、PGE₂ 含量的影响

组别	剂量/ ($\mu\text{g/mL}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	PGE ₂ ($\mu\text{g/mL}$)
空白组	-	2.14 \pm 0.86	3.13 \pm 1.36
模型组	-	40.34 \pm 0.77	81.35 \pm 2.11
给药组	50	37.23 \pm 1.21 [*]	73.89 \pm 2.69 ^{**}
	100	33.76 \pm 0.92 ^{**}	66.69 \pm 2.55 ^{**}
	200	27.98 \pm 1.63 ^{**}	59.74 \pm 2.14 ^{**}
	400	22.56 \pm 0.84 ^{**}	50.23 \pm 1.96 ^{**}

注：与模型组比较^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

蓝靛果复方压片对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO、PGE₂ 水平的影响如表 4-9

所示,模型组的 RAW264.7 细胞经过脂多糖诱导相较未经诱导的空白组中 NO、PGE₂ 释放水平显著提高 ($P<0.01$),说明 LPS 可以诱导 RAW264.7 细胞产生 NO、PGE₂。50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度药物对模型组 NO、PGE₂ 释放水平抑制效果显著 ($P<0.05$),且呈现剂量依赖关系。说明蓝靛果复方压片能够抑制 NO、PGE₂ 的产生。NO 主要一氧化氮合酶 (iNOS) 合成,正常状态下 iNOS 极少表达,NO 的含量较少并促进机体免疫系统。当炎症发生时,iNOS 大量表达并产生大量 NO^[40]。PGE₂ 由花生四烯酸环氧化酶催化产生,当机体产生炎症反应时,会促进环氧化酶的生成,导致 PGE₂ 表达量加大加重炎症反应^[41]。

4.3.7 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞释放 IL-6、IL-1 β 含量的影响

表 4-10 蓝靛果复方压片对 RAW264.7 细胞释放 IL-6、IL-1 β 含量的影响

组别	剂量/ ($\mu\text{g/mL}$)	IL-6 ($\mu\text{g/mL}$)	IL-1 β ($\mu\text{g/mL}$)
空白组	-	21.87 \pm 1.52	15.14 \pm 1.01
模型组	-	160.08 \pm 1.95	64.52 \pm 1.78
给药组	50	130.78 \pm 0.57 ^{**}	58.19 \pm 1.14 ^{**}
	100	121.46 \pm 1.54 ^{**}	53.47 \pm 0.67 ^{**}
	200	102.83 \pm 2.01 ^{**}	48.71 \pm 1.34 ^{**}
	400	83.36 \pm 1.64 ^{**}	44.95 \pm 0.89 ^{**}

注:与模型组比较^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

由表 4-10 可知,模型组与空白组相比,IL-6、IL-1 β 的释放水平均高于空白组 ($P<0.01$),模型构建成功。经过各浓度蓝靛果复方压片处理后,IL-6 释放量分别为 83.36 $\mu\text{g/mL}$ ~130.78 $\mu\text{g/mL}$; IL-1 β 释放量为 44.95 $\mu\text{g/mL}$ ~58.19 $\mu\text{g/mL}$ 。与模型组相比,蓝靛果复方压片对 IL-6、IL-1 β 释放量有显著抑制效果。说明蓝靛果复方压片对细胞炎症因子 IL-6、IL-1 β 具有显著抑制作用 ($P<0.01$)。白细胞介素在机体免疫与细胞增殖过程中有着重要作用。IL-1 β 能够促进炎症的发生,并诱导 IL-6 与 TNF- α 的表达。IL-6 通过 T 细胞与 B 细胞的增殖参与炎症反应。有研究表明 IL-6 与 IL- β 在干眼模型兔泪腺组织表达量增加^[42]。

4.4 本章小结

(1) 通过构建“成分-靶点”网络与靶点互相作用网络,对蓝靛果复方压片治疗干眼症的潜在作用机制进行探究。结果显示共得到 11 个活性成分,通过基因富集分析发现通过炎症反应、衰老、蛋白质磷酸化、氧化还原过程、神经元细胞体等生物学过程影响

众多细胞因子，这些细胞因子及其配体的活动影响着炎症、氧化还原、细胞凋亡等相关发病过程。根据通路富集分析发现治疗干眼症的潜在作用靶点在炎症、细胞凋亡、氧化应激等过程的相关通路上富集。综上可推测，蓝靛果复方压片调节潜在作用靶点的表达，调控炎症反应、细胞凋亡等相关的通路，从而抗炎并抑制细胞凋亡，抑制角膜上皮损伤与干眼症的发生和发展。

(2) 细胞炎症模型通过 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 构建，采用 MTT 法检测细胞生存率，通过蓝靛果复方压片不同剂量对细胞中 NO、PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 的释放量进行研究。药物剂量分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，细胞存活率均维持在 90% 以上，表明蓝靛果复方压片对细胞均无毒害作用。通过 Griess 法检测 NO 释放含量与 ELISA 法检测 PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 的释放含量，它们的释放量均随着给药剂量的增加而下降。各剂量的药物均对模型组 NO、PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 释放水平抑制效果显著 ($P < 0.05$)，表明蓝靛果复方压片具有抗炎活性。

第5章 结论

以蓝靛果为原料,通过超声波法辅助提取蓝靛果花色苷。通过单因素实验确定提取蓝靛果花色苷的影响因素,响应面法优化最佳工艺为:超声功率 160 W,超声时间 55 min,乙醇体积分数 85%,料液比 1: 35 g/mL,此时花色苷提取量最高,为(298.22±1.13) mg/100g。比较 4 种大孔树脂对蓝靛果花色苷静态吸附-解吸特性,研究了 AB-8 型大孔树脂对其的动态吸附-解吸条件,确定纯化条件:上样溶液 pH 3.0、上样流速 1.0 mL/min、洗脱剂乙醇体积分数 80%、洗脱流速 1.0 mL/min,在此条件下蓝靛果花色苷的含量为(317.35±0.82) mg/g。

通过高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS/MS)对蓝靛果花色苷组成进行分析,鉴定出 4 种蓝靛果花色苷,分别为矢车菊-3-己糖苷-儿茶素、矢车菊-3-己糖苷二聚体、矢车菊-3,5-二己糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷,其中矢车菊-3-葡萄糖苷含量最高,为 68.971%。基于分子对接对蓝靛果花色苷的抗炎活性的作用机制进行分析;

通过蓝靛果复方压片(蓝靛果、菊花、枸杞)构建与干眼症的“成分-靶点-通路”网络和靶点互作网络,分析其治疗干眼症的作用机制。结果表明:蓝靛果 4 种活性成分与菊花、枸杞通过口服生物利用度、类药性筛选出的 7 种活性成分共同调控 10 个治疗干眼症的关键靶点与 10 条主要信号通路,由此呈现出多成分、多靶点、多通路整合调节作用的网络特点。蓝靛果复方压片治疗干眼症的作用机制是通过调节潜在作用靶点的表达,调控与炎症反应、细胞凋亡等相关的通路,从而抑制干眼。

通过 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 制造细胞炎症模型,采用 MTT 法检测细胞生存率,通过蓝靛果复方压片不同剂量对细胞中 NO、PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 的释放量进行研究。结果表明:药物剂量分别为 50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL 和 400 μ g/mL 时,细胞存活率均维持在 90%以上,表明蓝靛果复方压片对细胞均无毒害作用。通过 Griess 法检测 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 NO 释放含量,ELISA 法检测 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 IL-1 β 、IL-6 及 PGE₂的释放含量。各剂量的蓝靛果复方压片均对模型组 NO、PGE₂、IL-6 与 IL-1 β 释放水平抑制效果显著(P<0.05)。表明蓝靛果复方压片可以通过减轻炎症反应而缓解干眼症的发生与发展。

综上所述,蓝靛果花色苷具有一定的抗炎活性,蓝靛果复方压片能够抑制炎症因子的释放,通过调控炎症反应等通路,从而抑制干眼症的发生与发展,为蓝靛果资源的开发提供了支持与依据。

致 谢

时间如白驹过隙，转眼间已经七年时间过去。在长春工业大学度过了美好的四年本科、三年研究生的时光，学校为我们提供了优秀的教育环境，使我掌握了丰富的知识、处事的哲理，这将是宝贵的人生财富，使我终身受益。

我首先要感谢的是我的恩师高冷老师。在学习中，他凭借丰富的专业知识、一丝不苟的教学态度使我在专业方面受益无穷；在生活中，他对学生关心备至，让我感受到家人一样温暖；在为人处世中，他以身作则，让我看到为人处世的方法。同样感谢孙尧老师对我论文方面的指导与帮助。这三年时间，在专业知识与处事方法使我受益良多，非常感谢老师三年来对我的教导。

还要感谢的是身边的同学们，他们有我的同门，也有我的室友，还有我的朋友。感谢他们对我学习与生活的帮助。希望我们能够一同进步，共同赢得美好的未来。

更要感谢的是我的父母，他们多年来为我辛苦的付出，支持着我人生中每一个决定。感谢的话语对于父母来说总是那么苍白，因为他们付出是无私的、不求回报的。对我父母的感谢更多放在以后，放在我的行动。

最后感谢长春工业大学的全体老师，以及对我论文进行指导与批评的各位专家。

参考文献

- [1] Suwen Liu,Zhanyi Wu,Shuo Guo,et al. Polyphenol-rich extract from wild *Lonicera caerulea* berry reduces cholesterol accumulation by mediating the expression of hepatic miR-33 and miR-122, HMGCR, and CYP7A1 in rats[J]. *Journal of Functional Foods*,2018,40:648-658.
- [2] Yuehua Wang,Bin Li,Yang Lin,et al. Effects of *Lonicera caerulea* berry extract on lipopolysaccharide-induced toxicity in rat liver cells: Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities[J]. *Journal of Functional Foods*,2017,33:217-226.
- [3] 伍树松.蓝靛果提取物对大鼠佐剂关节炎的抑制作用及其分子机制研究[D].湖南农业大学,2013.
- [4] 王方,王姗,石玉恒,等.淫羊藿总黄酮含药血浆对干眼症泪腺上皮细胞模型IL-6表达的影响[J].*辽宁中医杂志*,2020,47(09):167-169+224.
- [5] 李凤凤,张秀玲,柳晓晨,等.响应面优化微波辅助提取蓝靛果花色苷工艺及其抗氧化活性[J].*食品工业科技*,2019,40(02):195-200+214.
- [6] 包怡红,于阳阳,彭冬香,等.提取条件对蓝靛果花色苷抑菌作用的影响[J].*食品科技*,2011,36(10):178-182.
- [7] 刘力源.矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的辐射防护作用及机制研究[D].哈尔滨工业大学,2018.
- [8] 于伟,张桂芳,宋雪建,等.蓝靛果花色苷对高脂血症大鼠肝脏 LDLR、ABCG1 及 ABCA1 基因表达的影响[J].*食品科学*,2018,39(13):205-210.
- [9] Craig Jennifer P,Nichols Kelly K,Akpek Esen K,et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report.[J]. *The ocular surface*,2017,15(3):276-283.
- [10] 吴洁丽.丹皮酚通过调节 NF- κ B 信号通路改善干眼动物模型中的炎症反应[D].厦门大学,2018.
- [11] 姜楠,刘启,韩云,等.利用光学相干断层扫描血管造影分析 PM2.5 对小鼠角膜上皮和角膜全层厚度的影响[J].*中国现代医学杂志*,2018,28(12):24-31.
- [12] Hassan Hashemi MD,Mehdi Khabazkhoob MSc,Ahmad Kheirkhah MD,et al. Prevalence of dry eye syndrome in an adult population[J]. *Clinical & Experimental Ophthalmology*,2014,42(3):242-248.
- [13] 万晨阳,张东蕾,卢山.干眼症的发病机制及中医药治疗研究进展[J].*实用中医内科杂志*,2020,34(04):36-43.

- [14] Braun R J, King-Smith P E, Begley C G, et al. Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle. [J]. Progress in retinal and eye research, 2015, 45: 132-64.
- [15] 朱峰, 柯峰. 自身免疫性干眼调节 T 细胞及细胞因子的表达 [J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(03): 427-431.
- [16] 蒋鹏飞, 彭俊, 彭清华. 密蒙花颗粒对去势诱导的干眼症兔泪腺细胞 IL-12 及 IL-6 的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(06): 477-482.
- [17] 时健, 陈立浩, 刘倩宏, 等. 菊花总黄酮及其含药血清对去势干眼雄兔和细胞模型的炎症机制研究 (英文) [J]. Digital Chinese Medicine, 2020, 3(04): 283-296.
- [18] 陈爱菊, 杨涛, 徐静. 杞菊地黄丸对干眼症基础泪液分泌的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(02): 222-224.
- [19] 许红昌, 马悦, 黄丽颖, 等. 角膜移植术后干眼的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(02): 253-256.
- [20] 王雯婕, 陈剑, 王园园, 等. 氧化应激与眼表疾病关系的研究进展 [J]. 眼科新进展, 2014, 34(06): 585-588.
- [21] 许红昌, 马悦, 黄丽颖, 等. 角膜移植术后干眼的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(02): 253-256.
- [22] 吴志航. 2 型糖尿病病程对干眼的影响 [D]. 苏州大学, 2020.
- [23] 张丽明, 马雅鸽, 张希, 等. 基于网络药理学的葡萄籽油抗癌和抗肿瘤功能成分及机制研究 [J]. 粮油食品科技, 2021, 29(01): 131-140.
- [24] 王文军, 丁一, 窦芳, 等. 分子对接在中药药效物质筛选及作用机制研究中的应用进展 [J]. 中国药师, 2018, 21(06): 1020-1023.
- [25] 陈磊. 山楂酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及其机制研究 [D]. 山西农业大学, 2019.
- [26] 李建设, 何文龙, 孟珂, 等. 姜黄素对 LPS 诱导的大鼠星形胶质细胞 NF- κ B 炎症因子信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(05): 1081-1085.
- [27] 何潇, 郭文静, 吴佳辉, 等. 鸦胆子中黄酮及其抗炎、抗补体活性的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2094-2100+1991.
- [28] 冯晨, 于洋. 枸杞多糖对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞的抗炎活性及 NF- κ B 信号通路的调控作用 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(03): 304-309+319.
- [29] 魏江春, 王安华, 贾景明. 筒鞘蛇菰中木脂素类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(08): 1915-1920.
- [30] 张浩, 胡悦, 陶炜焯, 等. 荆门上清丸对动物模型的抗炎活性及血清 PGE₂、IL-1 β 含量的影响 [J]. 湘南学院学报 (医学版), 2020, 22(04): 24-27.

- [31]李凤凤,张秀玲,柳晓晨,等.响应面优化微波辅助提取蓝靛果花色苷工艺及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(02):195-200.
- [32]耿然,刘贵巧,王慧真,等.pH 示差法测定黑小麦全麦粉花色苷及其体外抗氧化性[J].食品工业科技,2020,41(01):6-11.
- [33]罗凤,龙旭,高晓敏,等.响应面优化薄荷挥发油的提取工艺及其抗氧化性能研究[J].陕西农业科学,2020,66(11):11-14.
- [34]蒋海伟,杨婷婷,李佳桥,等.响应面法优化红米花色苷微波辅助提取工艺及其抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2015,15(05):74-81.
- [35]陈钢,黄立山,徐静,等.黑莓花色苷的超声波提取与抗氧化性活性研究[J].食品科学,2012,33(24):117-121.
- [36]秦晶晶,钱慧琴,赵媛,等.柿叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2020,41(13):32-38.
- [37]叶红玲,姚军,刘冬,等.蓝莓果渣花青素的超声提取及组成分析[J].食品研究与开发,2019,40(10):105-108.
- [38]张美娇,田密霞,韦艳双.蓝莓果实花色苷成分组成鉴定及分析[J].保鲜与加工,2017,17(03):107-110.
- [39]孙丹,陈为凯,何非,等.HPLC-MS/MS 法测定甜樱桃花色苷与非花色苷酚的组成与含量[J].食品科学,2017,38(04):181-186.
- [40]Xie Yuhuai,Wang Lixue,Sun Hua,et al. Polysaccharide from alfalfa activates RAW264.7 macrophages through MAPK and NF- κ B signaling pathways.[J]. International journal of biological macromolecules,2018,126:960-968.
- [41]Saha Jayasree,Sarkar Debanjan,Pramanik Anik,et al. PGE₂-HIF1 α reciprocal induction regulates migration, phenotypic alteration and immunosuppressive capacity of macrophages in tumor microenvironment.[J]. Life sciences,2020,253:117731.
- [42]张又玮. 密蒙花滴眼液对去势雄兔干眼泪腺组织中 ICAM-1、IL-6、IL-17 表达的影响[D].湖南中医药大学,2018.
- [43]崔红,李正日,孙丽霞,等.炎症因子在糖尿病性干眼患者中的表达变化及其意义[J].眼科新进展,2018,38(07):651-655.
- [44]李军,刘亚丹,陈红娟,等.泪液乳铁蛋白及表皮生长因子与干眼症相关性研究[J].第四军医大学学报,2009,30(16):1471.
- [45]Ji Yong Woo,Seo Yuri,Choi Wungrak,et al. Dry eye-induced CCR7+CD11b+ cell lymph node homing is induced by COX-2 activities.[J]. Investigative ophthalmology & visual science, 2014, 55(10):6829-38.

- [46]陈爱菊,杨涛,徐静.杞菊地黄丸对于眼症基础泪液分泌的影响[J].中华中医药学刊,2021,39(02):222-224.
- [47]黄洁.枸杞多糖对光诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[D].宁夏医科大学,2020.
- [48]杨梦思,周娜,王志钢,等.转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展[J].生物技术通报,2016,32(08):8-13.

攻读硕士学位期间研究成果

一、发表论文：

[1]李旭,高博,赵丽华,孙尧,尉松瑶,王庆波,高冷,高晓晨.响应面法优化超声波提取蓝靛果花色苷及其抗炎活性的研究[J].食品科技,2021,46(03):176-183.

二、参与科研项目：

[1]吉林省产学研引导基金：长白山特产野生蓝靛果资源综合开发，项目编号：20171227。