

文章编号: 1674-5566(2014)04-0629-05

## 曼氏无针乌贼内脏提取物的抗炎作用研究

沙 龙, 吴文惠, 吴慧斌, 侯媛媛, 许剑锋

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘 要:** 研究了天然产物——曼氏无针乌贼内脏脂溶性提取物 (the extract from visceral organs of *Sepiella maindroni*, ESM) 的抗炎功效, 以探索其作为天然安全无副作用的抗炎营养增补剂的可能。采用二氧化碳超临界萃取法, 提取中国产曼氏无针乌贼内脏脂溶性提取物。构建二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶诱导大鼠足肿胀、大鼠棉球肉芽肿这3种炎症模型, 将不同剂量组验证模型鼠的疗效与空白对照组、阳性对照组相比较, 观察 ESM 对不同炎症模型的抗炎作用。从上述3项抗炎模型的实验结果发现, 当 ESM 剂量为 100 mg/kg 时, 具有较强的急性及慢性抗炎功效。发现和确认了乌贼内脏脂溶性提取物的抗炎作用, 为深入研究乌贼抗炎机理奠定了基础。

**研究亮点:** 首次以乌贼内脏为原料, 采用二氧化碳超临界萃取法, 提取乌贼内脏脂溶性成分, 并且利用三种动物抗炎模型(二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶诱导大鼠足肿胀、大鼠棉球肉芽肿增生)发现了其具有较好的急性和慢性抗炎作用。

**关键词:** 曼氏无针乌贼; 抗炎模型; 炎症抑制率

**中图分类号:** S 968.2

**文献标志码:** A

曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 俗称花粒子、麻乌贼、血墨。隶属于软体动物门 (Mollusca)、头足纲 (Cephalopoda)、乌贼目 (Sepioidea)、乌贼科 (Sepiidae)<sup>[1]</sup>。曼氏无针乌贼全身都是宝, 食用和药用价值都相当高。远在公元前三百年, 我国最早的医学著作《黄帝内经》中, 便有了乌贼的药用记载。其肉、骨、墨、血均可入药, 并呈现出祛风除湿、滋阴、养血、通淋、收敛、中和胃酸、敛疮、止血等功效<sup>[2]</sup>。乌贼内脏是乌贼生理活动的主要场所, 与肉、骨、墨、血的组织构建密不可分, 也是多种功能性化合物的合成场所。内脏中含量丰富的不饱和脂肪酸类物质的抗炎作用已经得到证实<sup>[3]</sup>, 而且近年国外最新研究发现了新型海洋生物的抗炎活性物质——呋喃脂肪酸<sup>[4]</sup>, 它与 n-3 多不饱和脂肪酸一起, 是海洋动物抗炎活性的主要物质基础。

经过多年的研究, 很多海洋动物脂质提取物的功效得到了人们的重视, 例如深海鱼油<sup>[5]</sup>、新

西兰绿唇贻贝油等都具有较好的抗炎作用<sup>[6]</sup>。目前新西兰绿唇贻贝脂溶性提取物作为抗关节炎营养增补物和功能性食品已经得到广泛的应用, 并有商业化产品——Lyprinol 上市<sup>[7]</sup>。海洋动物脂质提取物作为抗炎保健功能食品或新型抗炎药物具有纯天然、安全、无毒副作用的特点, 因此倍受青睐。

近年, JOSEPH 等还发现虎斑乌贼的肝油具有明显的抗炎效果和促血小板聚集作用<sup>[8]</sup>。这是继发现贻贝油的抗炎作用以来又一种海洋动物脂质被证明具有抗炎功效。本文从小鼠耳廓肿胀、大鼠足肿胀、大鼠棉球肉芽肿增生3个方面<sup>[9]</sup>研究了中国产曼氏无针乌贼内脏脂溶性提取物 (the extract from visceral organs of *Sepiella maindroni*, ESM) 的抗炎作用, 为深入研究乌贼内脏脂溶性提取物和开发利用乌贼加工废弃物奠定基础。

收稿日期: 2014-01-12 修回日期: 2014-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(81341082)

作者简介: 沙 龙(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋天然产物。E-mail: 191723224@qq.com

通信作者: 许剑锋, E-mail: jfxu@shou.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

曼氏无针乌贼购于江苏南通水产市场,SPF 级 SD 大鼠 64 只,体重(150 ± 20) g,雌雄各半,SPF 级昆明种小鼠 40 只,体重(18 ± 2) g,雌雄各半,均购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司;二甲苯为分析纯;阿司匹林购自拜耳医药保健有限公司。

### 1.2 实验设备

主要设备:可调高速匀浆机 FSH-1 型(江苏省金坛市环宇科学仪器厂);HA121-50-01 超临界流体萃取设备(江苏南通华安超临界萃取有限公司);AB204-N 电子天平(Mettler 公司);美国 Labconco FreeZone 1.0 L 冻干机;电子数显外径千分尺(上海量具刃具厂);9 mm 的打孔器。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 乌贼内脏脂溶性提取物(ESM)的制备

取新鲜的乌贼内脏,剪碎后经真空冷冻干燥的乌贼内脏粉末。用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取法提取其脂溶性物质<sup>[10]</sup>,条件参照其他海洋动物脂溶性提取物的超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取条件,经过预实验摸索,得到提取乌贼内脏的最佳条件:萃取压力为 35 MPa,温度为 40 °C,时间为 120 min。<sup>[11]</sup>

#### 1.3.2 ESM 对二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀模型的影响

选取昆明种小鼠 40 只,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 8 只,分别为:空白组(3% CMC-Na)、阳性对照组(阿司匹林 100 mg/kg)、ESM 低、中、高剂量组(25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg)。每组动物按 0.2 mL/10 g 连续灌胃给药一周,末次给药 30 min 后,根据《药理实验方法学》<sup>[9]</sup> 中的要求,于每只小鼠右耳前后两面各均匀涂抹二甲苯 20 μL,左耳作对照,45 min 后脱颈处死小鼠,沿耳廓基线剪下两耳,用直径为 9 mm 的圆形打孔器沿左右耳相同位置打下圆耳片,电子天平称重,以小鼠左右耳片重量的差值比左耳片重量计算肿胀度,以空白组与实验组小鼠肿胀度的差值比空白组小鼠肿胀度计算肿胀抑制率<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.3 ESM 对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型的影响

取大鼠 32 只,雌雄各半,随机分为 4 组,每组 8 只,分别为:空白组(3% CMC-Na)、阳性对照组

(阿司匹林 100 mg/kg)、ESM 低、高剂量组(30 mg/kg、100 mg/kg)。各组每天灌胃给药 1 次,给药量 1 mL/100 g,连续一周。末次给药 45 min 后,于大鼠右后足足底注射 1% 角叉菜胶 0.1 mL 致炎,并于致炎后 1、2、3、4、5 h 测定双后足足跖厚度,观察乌贼内脏脂溶性提取物对炎症的影响。以大鼠双后足足厚度差比左足足厚度得足肿胀度表示其持续抗炎效果<sup>[9,13]</sup>。

#### 1.3.4 ESM 对大鼠棉球肉芽肿增生的影响

SD 大鼠 32 只,雌雄各半,分组同上。乙醚浅麻醉下,在每只大鼠两侧腹股沟皮下切口,分别塞入 2 个重量为 30 mg 的灭菌干棉球。手术当天每组动物按 1 mL/100 g 连续灌胃给药一周,第 7 天处死,取出棉球,剥离多余脂肪组织,在 60 °C 烘箱内彻底烘干后称重。各实验组对肉芽肿大鼠的抗炎效果用实验后棉球的重量减去实验前棉球的重量得肉芽重表示足肿程度,以空白组与实验组大鼠肉芽重之差比空白组大鼠肉芽重计算肉芽肿抑制率<sup>[9,14]</sup>。

#### 1.3.5 数据统计分析

采用 SPSS 18.0 进行统计和分析,计量资料以平均数 ± 标准差表示,各组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  表示数据具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 ESM 对二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀抑制作用

从表 1 可以看出,与空白组耳肿胀度比较,ESM 在高剂量(100 mg/kg)条件下,差异极显著( $P < 0.01$ ),抑制率为 39.6%。阿司匹林对照组与空白组耳肿胀度比较,阿司匹林给药量 100 mg/kg 时,差异极显著( $P < 0.01$ ),抑制率为 45.1%。另外,中、低剂量组与空白组相比也有显著性差异( $P < 0.05$ ),说明 ESM 对二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀有一定的抑制作用。

表 1 ESM 对二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀模型的影响

Tab.1 Effect of ESM on dimethylbenzene-induced ear edema in rats

组别	给药量/(mg/kg)	耳肿胀度	耳抑制率/%
空白组	-	20.08 ± 3.39	-
阳性对照组	100	11.03 ± 3.53 **	45.1
低剂量组	25	15.86 ± 3.99 *	21.0
中剂量组	50	15.33 ± 3.51 *	23.7
高剂量组	100	12.13 ± 3.75 **	39.6

注: \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\* 表示  $P < 0.01$ ; 表 2 同。

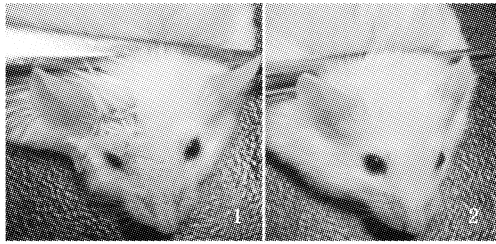


图1 二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀模型的建立

Fig.1 The establishment of dimethylbenzene-induced ear edema in rats

1. 二甲苯致炎后; 2. 二甲苯致炎前。

## 2.2 ESM 对角叉菜胶诱导大鼠足肿胀抑制作用

从表2中可以看出,各组大鼠在注射角叉菜胶以后,其致炎足均有红肿现象,在前3 h内,足肿胀度呈持续增加趋势,第3小时达到最高值,随

后肿胀症状有所减轻,第5小时的肿胀度接近第1小时肿胀度,说明模型建立较为成功。因此,可以足肿最严重的第3个小时为数据基础,计算炎症最严重时的足肿抑制率。结果见图2。表2中阳性对照组足肿胀度对比空白组具有极显著差异( $P < 0.01$ )。说明阿司匹林对角叉菜胶致大鼠的足肿从第1个小时开始有明显的抑制作用。ESM高剂量组对比空白组除第1个小时为显著外( $P < 0.05$ ),其余均具有极显著差异( $P < 0.01$ )。说明按100 mg/kg的剂量饲喂ESM对角叉菜胶致大鼠的足肿从第2个小时开始有明显的抑制作用。ESM低剂量组对比空白组仅在第3个小时,具有极显著差异( $P < 0.01$ )。因此按30 mg/kg的剂量饲喂ESM对角叉菜胶致大鼠的足肿仅第3个小时有明显的抑制作用。

表2 ESM 对角叉菜胶诱导大鼠足肿胀模型的影响

Tab.2 Effect of ESM on carrageenin-induced paw edema in rats

组别	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
空白组	1.17 ± 0.20	1.93 ± 0.15	2.68 ± 0.21	1.94 ± 0.30	1.38 ± 0.26
阳性对照组	0.81 ± 0.22**	1.21 ± 0.25**	1.57 ± 0.19**	1.26 ± 0.23**	0.95 ± 0.17**
低剂量组	1.07 ± 0.10	1.67 ± 0.15*	2.30 ± 0.09**	1.73 ± 0.13*	1.21 ± 0.13
高剂量组	0.97 ± 0.18*	1.43 ± 0.31**	1.91 ± 0.28**	1.35 ± 0.08**	1.10 ± 0.12**

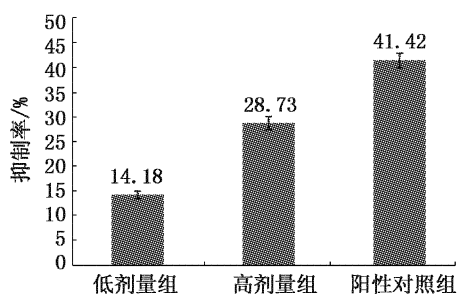


图2 ESM 对角叉菜胶诱导大鼠足肿胀模型第3小时的足肿抑制率

Fig.2 The inhibition rate of ESM on carrageenin-induced paw edema in rats in 3th hour

以上结果表明饲喂大鼠ESM能够减轻角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀症状。

## 2.3 ESM 对大鼠棉球肉芽增生的抑制作用

从表3可以看出,低剂量组肉芽干重与空白组相比,没有显著性差异,说明低剂量ESM对此模型无明显抑制作用。ESM高剂量组肉芽干重与空白组相比,表现为极显著,抑制率达到了36.21%。

因此,ESM在高剂量条件下具有较强的抗大鼠棉球肉芽增生的作用。

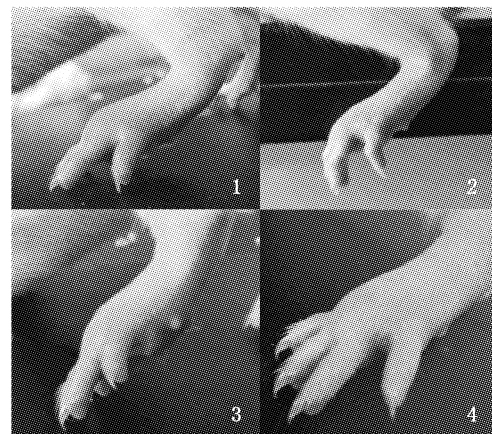


图3 角叉菜胶诱导大鼠足肿胀模型第3小时的足肿照片

Fig.3 The pictures of carrageenin-induced paw edema in rats in 3th hour

1. 空白组; 2. 阳性对照组; 3. 低剂量组; 4. 高剂量组。

表3 ESM 对大鼠棉球肉芽肿增生模型的影响  
Tab.3 Effect of ESM on cotton-ball-implantation-induced granulation hyperplasia in rats

组别	给药量/(mg/kg)	肉芽干重/mg	抑制率/%
空白组	-	31.84 ± 7.85	-
阳性对照组	100	19.57 ± 5.81 **	38.54
低剂量组	30	29.46 ± 6.69	7.47
高剂量组	100	20.31 ± 5.23 **	36.21

### 3 讨论

炎症是机体对有害刺激物所产生的一种重要的防御机制,是机体最基本的抗损伤反应。根据病程经过的不同,炎症可分为急性炎症和慢性炎症两大类。因此评价乌贼内脏提取物是否具有抗炎效果,要分别从急性抗炎活性和慢性抗炎活性两个方面进行研究<sup>[15]</sup>。本研究选取二甲苯诱导的小鼠耳廓肿胀作为非特异性急性抗炎实验的动物模型,角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀模型作为急性关节炎的动物模型,此二模型均能成功地复制化学性因素和生物性因素所导致的渗出性炎症变化,具有操作简便、重复性好、实验结果可靠等特点,因此被广泛应用于药物的急性抗炎活性研究<sup>[12-13]</sup>。而大鼠棉球肉芽肿模型作为慢性炎症模型,是局部异物持续刺激的迟缓性交态反应,有异物的病灶内表现为肉芽肿的形成,该模型是评价药物抗炎增生作用的常用模型<sup>[14]</sup>。这3种动物模型可以真实体现 ESM 的抗炎作用。

本文的研究结果表明,以我国东海捕捞的曼氏无针乌贼为原料提取的脂溶性提取物具有较好的抗炎活性,剂量为 100 mg/kg 时,能明显抑制二甲苯诱导小鼠耳廓肿胀,抑制率为 39.6%,高于金银花水提物同模型抑制率 37.96%<sup>[16]</sup>;低于茯苓总三萜抑制率 44.08%<sup>[17]</sup>。

对于角叉菜胶诱导大鼠足肿胀模型,高剂量组从第 2 小时开始有明显抑制作用,在炎症最严重的第 3 小时,其抑制率为 28.73%,低于虎斑乌贼肝油在 3 小时后测定的 56.87% 的抑制率<sup>[8]</sup>,这其中的原因可能是抗炎有效成分主要集中在乌贼的肝脏。

饲喂 100 mg/kg ESM 对大鼠棉球肉芽肿增生模型抑制率达到 36.21%。这与 JOSEPH 等<sup>[8]</sup>研究虎斑乌贼肝油的慢性抗炎结果相符。且高于茯苓总三萜抑制率 32.67%<sup>[17]</sup>,低于厚壳贻贝

脂溶性成分 42.83% 的抑制率<sup>[14]</sup>。

综上所述,ESM 具有较强的抗炎作用,其功效虽不及现有抗炎药物,然而其纯天然、安全、无毒副作用的特点<sup>[18]</sup>在一定程度上可以弥补现有抗炎药物具有副作用的缺陷。本研究为进一步研究其抗炎机理奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 中国动物志[M].北京:科学出版社,1987:107-126.
- [2] 杨晓燕,贾福星.乌贼的综合药用[J].中国海洋药物,1999,18(2):46-47.
- [3] MACHADO A P, TAVARES C M. Dietary long-chain omega-3 fatty acids and anti-inflammatory action: potential application in the field of physical exercise[J]. Nutrition, 2004, 20(2):243.
- [4] TOSHIYUKI W, HIKARU K, HIROHIKO N, et al. Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel *Perna canaliculus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(42):17533-17537.
- [5] 李琳,李远红,马文君,等.类风湿关节炎患者深海鱼油补充干预效果评价[J].中国公共卫生,2012,28(8):1013-1016.
- [6] WHITEHOUSE M W, MACRIDES T A, KALAFATIS N, et al. Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (Lyprinol) from the NZ green-lipped mussel [J]. Inflammopharmacology, 1997, 5(3):237-246.
- [7] FERREIRA S H. Proposal to use pentoxifylline and Lyprinol therapy for chronic inflammatory diseases [J]. Inflammopharmacology, 2005, 13(5/6):429-430.
- [8] JOSEPH S M, GEORGE M C, NAIR J R, et al. Effect of feeding cuttlefish liver oil on immune function, inflammatory response and platelet aggregation in rats [J]. Current Science, 2005, 88(3):507-510.
- [9] 徐叔云.药理学试验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2001:911.
- [10] ANTUNES C, ARANTES P, GUARALDO G, et al. Fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88(3):381-387.
- [11] GHASEMI E, RAOFIE F, NAJAFI N M. Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves [J]. Food Chemistry, 2011, 126(3):1449-1453.
- [12] 马越鸣,闫晶超,王天明,等.泻心汤在急性炎症动物模型上的抗炎效应[J].中国药理学通报,2006,22(11):1393-1398.
- [13] 肖保全,朱少璇,杨威,等.角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究[J].中国实用医药,2008,3(23):63-65.

- [14] 袁高峰,姚婷,励炯,等. 厚壳贻贝脂溶性提取物抗炎生物活性研究[J]. 浙江大学学报,2007,33(2):169-173.
- [15] 李玉林,病理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:205.
- [16] 雷玲,李兴平,白筱璐,等. 金银花抗内毒素、解热、抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(1):115-117.
- [17] 汪电雷,陈卫东,徐先祥. 茯苓总三萜的抗炎作用研究[J]. 安徽医药,2009,13(9):1021-1023.
- [18] PARK J H, PARK Y C, LEE H, et al. Safety evaluation of refined cuttlefish (*Todarodes pacificus*) oil [J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(4):905-912.

## Anti-inflammatory effect of the extract from *Sepiella maindroni* visceral organs

SHA Long, WU Wen-hui, WU Hui-bin, HOU Yuan-yuan, XU Jian-feng

(College of Food science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** To study the anti-inflammatory effect of the extract from visceral organs of *Sepiella maindroni* (ESM), supercritical carbon dioxide extraction was used to extract the lipid from the visceral organs of *Sepiella maindroni* (ESM). The acute inflammation and chronic inflammation models were adopted, such as ear-swelling of mice induced by dimethylbenzene, edema of rat paw induced by carrageenin and granuloma induced by implanting cotton ball. The effects of various doses of the lipid extract on the inflammatory rat models were compared with those of the blank control and the positive control group for observing the anti-inflammatory actions of ESM on different inflammatory models. Compared with the blank control group and the positive control group, the high dose group could inhibit ear-swelling of mice induced by dimethylbenzene, edema of rat paw induced by carrageenin and granuloma induced by implanting cotton ball. The high dose of ESM had a significant effect on the inflammation models.

**Key words:** *Sepiella maindroni*; anti-inflammatory model; inhibit rate of inflammation