

复合抗氧化剂对小鼠脂质过氧化及果蝇生存期的影响

张 丁 张 杰 孟 光 张 焱 刘翠娥 叶 冰

(河南省卫生防疫站,河南 郑州 450003)

摘 要:为探讨复合抗氧化剂(碧萝芷^R + 葡萄籽提取物 + 银杏叶提取物)抗氧化、清除体内自由基和延缓衰老的动物学效应,根据受试物含量的多少将老龄昆明种小鼠分为低、中、高 3 个剂量组,1 个老龄对照组和 1 个幼龄对照组,每组 17 只。连续灌胃 90 d,分别采全血、血清,测定全血丙二醛(MDA)值和血清超氧化物歧化酶(SOD)的活力。另选 Oregon K 野生型黑腹果蝇,随机分为 4 个试验组和 1 个对照组,每组 400 只,雌雄各半,分别给予不同剂量的受试物,每两天观察记录果蝇生存数和死亡数,直到果蝇全部死亡为止。然后计算出半数死亡天数,平均寿命和平均最高寿命。结果显示:小鼠抗氧化试验高剂量组与老龄对照组比较有降低血中 MDA 和升高血清 SOD 活力的作用;果蝇生存试验中,0.06 % 剂量组雄性果蝇与对照组比较平均寿命延长,半数死亡时间高 5 d。因此,说明这种复合抗氧化剂具有抗氧化、清除体内自由基和一定的延缓衰老作用。

关键词:营养保健品;小鼠;抗氧化药;衰老

中图分类号:R15;TS218 **文献标识码:**A **文章编号:**1004 - 8456(2002)05 - 003 - 04

在生物衰老的机理中有许多学说,自由基学说认为体内过多的氧自由基诱发脂质过氧化,引起细胞的破坏、雕亡,最终导致机体的衰老和功能障碍。抗氧化剂可以减轻体内的脂质过氧化进程,提高体内抗氧化酶的活性,对增强体内抗氧化能力,延缓衰老有重要作用。本文选用一种新型复合抗氧化剂(碧萝芷^R——一种法国松树皮提取物 + 葡萄籽提取物 + 银杏叶提取物)进行动物试验以观察该物质对小鼠脂质过氧化和果蝇生存期的影响。

1 材料与方法

1.1 样品 复合抗氧化剂由某营养制品科技发展有限公司提供。

1.2 动物 昆明种老龄小白鼠 68 只,雄性,12 个月龄,体重 40 ~ 50 g;幼龄小白鼠 17 只,8 周龄,雄性,体重 20 ~ 22 g,由河南省实验动物中心提供。动物合格证号:99012。Oregon K 野生型黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*),来源于上海铁道医学院卫生教研室。

1.3 动物饲养环境 二级动物房,生化恒温培养箱。

1.4 仪器 荧光分析仪,分光光度计。

1.5 实验方法

1.5.1 抗氧化试验

分组 实验前先测定老龄鼠的丙二醛值

(MDA)。根据其值的高低随机将老龄鼠分为低、中、高 3 个剂量组,1 个老龄对照组;另设一个幼龄对照组(8 周龄),每组 17 只。

剂量 3 个剂量组剂量分别为 30、100、300 mg/kg BW;对照组给予蒸馏水。

给受试物时间 连续给受试物 90 d。

给受试物途径 经口灌胃,其灌胃容积为 0.1 mL/10 g BW。

实验方法和观察指标 连续给受试小鼠受试物 90 d 后,分别采全血、血清,测定 MDA 值和超氧化物歧化酶(SOD)的活力。MDA 含量测定采用丙二醛与硫代巴比妥酸缩合,荧光法测定。SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法(试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。

1.5.2 果蝇生存试验

试验动物 Oregon K 野生型黑腹果蝇。

分组 将果蝇随机分为 1 个对照组和 4 个试验组,分别给予不同浓度的受试物。

方法 收集 8 h 内新羽化的果蝇成虫,乙醚麻醉下区分雌雄随机分组、分别称重后进行试验。每组用果蝇 400 只,雌雄各半。对照组给予普通玉米粉培养基;试验组分别给予含受试物 0.007 %、0.02 %、0.06 %、0.18 % 的培养基。实验条件:气温(25 ± 1),相对湿度 45 % ~ 75 %。每四天更换新鲜配制的培养基 1 次。每两天观察记录果蝇生存数和

死亡数,直到果蝇全部死亡为止。计算出半数死亡天数、平均寿命和平均最高寿命等 3 个指标。

1.6 统计方法 实验数据用 SPSS 软件进行方差统计分析。

2 结果

2.1 复合抗氧化剂对受试小鼠全血中 MDA 的影响 见表 1。

表 1 复合抗氧化剂对受试小鼠全血 MDA 的影响				
组别	剂量 mg/kg	动物数 ⁽²⁾ 只	全血 MDA nmol/mL	P
老龄对照组	蒸馏水	12	34.32 ±4.73	
低剂量组	30	12	29.80 ±8.42	0.119
中剂量组	100	12	30.65 ±7.69	0.173
高剂量组	300	12	27.24 ±5.85 ⁽¹⁾	0.004
少龄对照组	蒸馏水	12	24.06 ±5.96 ⁽¹⁾	0.000

注:(1)表示与老龄对照组比较,差异具非常显著性意义(P<0.01)。
(2)由于试验期间意外死亡,动物数为实测数。

由表 1 可见,各剂量组与老龄对照组全血中 MDA 比较,高剂量组有明显降低,差异具非常显著

性意义(P<0.01)。表明该物质具有一定降低受试小鼠血中 MDA 作用。

2.2 复合抗氧化剂对受试小鼠血清中 SOD 活力的影响 由表 2 可见,各剂量组与老龄对照组血清中 SOD 活力比较,高剂量组血清中 SOD 活力增高,差异有显著性意义(P<0.05)。表明该物质具有一定升高受试小鼠血清中 SOD 活力的作用。

表 2 复合抗氧化剂对小鼠血清中 SOD 活力的影响				
组别	剂量 mg/kg	动物数 ⁽³⁾ 只	血清 SOD nU/mL	P
老龄对照组	蒸馏水	12	167.2 ±74.8	
低剂量组	30	12	213.8 ±84.4	0.090
中剂量组	100	12	171.0 ±74.1	0.175
高剂量组	300	12	232.5 ±69.8 ⁽¹⁾	0.038
少龄对照组	蒸馏水	12	263.9 ±49.0 ⁽²⁾	0.001

注:(1)表示与老龄对照组比较,差异具显著性意义(P<0.05)。
(2)表示与老龄对照组比较,差异具非常显著性意义(P<0.01)。
(3)由于试验期间意外死亡,动物数为实测数。

2.3 复合抗氧化剂对果蝇寿命的影响 见表 3。

表 3 复合抗氧化剂对果蝇生存试验的影响											d
受试物 浓度 %	样本数 只		平均体重 μg		半数死亡时间		平均寿命		平均最高寿命 ⁽¹⁾		
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	
对照	200	200	626	864	44	63	43.97 ±6.97	61.90 ±9.72	56.50 ±2.78	76.95 ±2.37	
0.007	200	200	624	858	43	62	42.48 ±7.25	60.44 ±10.76	55.05 ±3.17	75.40 ±2.68	
0.002	200	200	641	876	47	64	45.36 ±6.64	61.61 ±8.40	56.95 ±7.75	75.75 ±1.68	
0.06	200	200	649	874	49	64	46.34 ±7.39 ⁽²⁾	62.82 ±8.43	55.25 ±1.07	76.85 ±2.56	
0.18	200	200	643	863	45	62	43.07 ±6.89	59.70 ±10.72	54.00 ±3.58	74.20 ±2.68	

注:(1)由寿命最长的 20 只果蝇计算得出。(2)试验组与对照组相比寿命延长,统计学检验差异有非常显著性意义(P<0.01)。

由表 3 可见,0.06 %剂量组雄性果蝇与对照组比较,平均寿命延长(P<0.01),同时 0.06 %剂量组雄性果蝇半数死亡时间与对照组比较多 5 d。

3 讨论

衰老的自由基学说是从分子生物学角度来解释衰老现象,其实质是除遗传因素外,有氧生物在呼吸中产生的氧自由基造成的机体损伤是衰老的重要原因。近期的一些研究证实,体内自由基反应与一些疾病的发生、发展和老化进程密切相关,机体受外界环境的物理、化学和内环境物质代谢的相互影响而产生大量自由基,在平衡失调时,过剩的自由基对构成组织细胞的生物大分子进行攻击,发展到一定的规模,会使组织器官的形态结构和生物功能的完整性受到急性和慢性损伤,一旦损伤程度超过修复或丧失其代偿能力时,则出现疾病和衰老的征象。^[1]

本次试验所用的复合抗氧化剂由 3 种主要成分和辅料组成,即:碧萝芷^R(Pycnogenol)(占 3.5 %)、葡萄籽提取物(占 10 %)和银杏叶提取物(占 10 %)。

碧萝芷^R是多种抗氧化物质的聚合物,低聚原花青素占 80 %,其余由 40 多种含生物活性的成分组成,其中儿茶素、表儿茶素和黄杉素占约 10 %,带有酚羟基的酚酸,如阿魏酸、咖啡酸、没食子酸、香豆酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸和香草酸等占 8 %,剩余的 2 %为葡萄糖和葡萄糖酯。^[2]

葡萄籽提取物的主要成分也是低聚原花青素,含量约占 80 %~85 %,儿茶素和表儿茶素约占 5 %,咖啡酸等有机酸约占 2 %~4 %。低聚原花青素是自然界中广泛存在的一种多酚类聚合物,有人将其归为生物类黄酮,它广泛分布于植物中,如葡萄籽、松树皮、花生、高粱、苹果、可可豆以及野生植物,如玫瑰果、樱桃、木莓、黑莓、红莓、草莓中,以葡萄籽中含量最为丰富,经大量的国内外研究证实,其具有清除人体内自由基、抗氧化的功能。^[3~6]

银杏叶提取物是一类生物类黄酮,其分子中含有还原性羟基(—OH)功能基团,可直接发挥抗氧化作用。在体内它可以捕捉和清除超氧阴离子自由基和过氧化氢,通过对其起氢原子供体的作用而阻断

和终止自由基连锁反应链,阻止和抑制氧自由基反应和脂质过氧化反应的病理性加剧,抑制 LPO 及其代谢产物 MDA 和共轭二烯等毒性物质的生成。同时,黄酮类还参与调节和提高体内抗氧化酶的活性。^[7,8]

相比其它中草药成分(如小柴胡、五味子、丹参、人参、何首乌、茶叶等),碧萝芷[®]和葡萄籽提取物由于含有大量的原花青素而抗氧化清除自由基的能力最强,并且高效,低毒,生物利用率高。它具有羟基(—OH)和超氧阴离子自由基的双重清除活性,其抑制能力为 78 %和 81 %,在同等条件下,维生素 C 抑制上述 2 种自由基的能力为 12 %和 19 %,维生素 E 为 50 %和 70 %,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶联合抑制超氧化阴离子的能力约为 83 %。不仅如此,原花青素还可帮助保存和再生维生素 C、维生素 E,同时它还能通过制造弹性蛋白和胶原纤维加固毛细血管壁,从而进一步防御自由基的侵蚀。据资料报道,原花青素在体内的保留时间长达 72 h,而维生素 C 仅为 3 h,这将大大增强其抗氧化清除自由基的能力。^[2~12]

在体内代谢过程中所产生的自由基作用于生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化物,如丙二醛(MDA),进而与磷脂酰乙醇胺和蛋白质交联成大分子复合物——脂褐质(老年色素),这是机体老化的一种标志。而体内超氧化物歧化酶(SOD),却是一类重要的体内氧自由基清除酶。但是,随着年龄的增长,机体组织内的 SOD 活性逐渐减低。本试验显示,在抗氧化试验中,高剂量组与老龄对照组比较有降低血中 MDA 和升高血清中 SOD 活力的作用;结合果蝇生存试验,0.06 %剂量组雄性果蝇与对照组比较,平均寿命延长,统计学处理差异有极显著性($P < 0.01$),并且该组的雄性果蝇半数死亡时间与对照组比较多 5 d,进一步证明了这种复合抗氧化剂的实际效果与以往试验报导的一致性。

参考文献:

- [1] [美]威廉 R 克拉克,著. 许宝孝,译. 衰老问题探索——衰老与死亡的生物学基础[M]. 上海:复旦大学出版社,2001,149—167.
- [2] Audwin B. Nelson Benjamin H S, Lau Nagatoshi Ide, et al. 碧萝芷[®]抑制巨噬细胞的氧化分裂、脂蛋白氧化和羟基自由基引起的 DNA 损伤[J]. 药物开发与制药工业,1998,24(2):139—144,38—40.
- [3] 赵超英,姚小曼. 葡萄籽提取物原花青素的营养保健功能(综述)[J]. 中国食品卫生杂志,2000,12(6):38—41.
- [4] 吕丽爽. 天然抗氧化剂低聚原花青素的研究进展[J]. 食品科学,2000,123(2):147—149.
- [5] 郑光耀. 葡萄籽原花青素提取物的生理活性、药理作用及其应用[J]. 林产化工通讯,2000,34(1):28—32.
- [6] 凌智群,张晓辉,谢笔均. 原花青素的药理学研究进展[J]. 中药理学通报,2002,18(1):9—12.
- [7] 罗顺德,周本宏,吴克媛. 银杏叶药理作用研究进展[J]. 中国医药学报,1995,(6):48—49.
- [8] 应周年,宋继芬,周君富. 银杏叶制剂对心绞痛患者的抗氧化和抗脂质过氧化作用[J]. 中国现代应用药理学杂志,1999,16(3):53—55.
- [9] Blazso G, Gabor M, Sibbel R, et al. 含有原花青素的松树皮提取物的消炎及清除超氧自由基的活性[J]. 药物化学. 药理学通讯,1994,(3):217—220.
- [10] Noda Y, Anzai K, Mori A, et al. 运用计算机化的 JES-FR30 FSR(电子自旋共振)系统分析天然抗氧化剂对羟基和超氧阴离子自由基的清除活性[J]. 生物化学与国际分子生物学,1997,42(1):35—44.
- [11] Liu F J, Zhang Y X, Lau B H S. 碧萝芷能提高加速衰老的实验鼠的免疫力和造血功能[J]. 细胞与分子生命科学,1998,(54):1168—1172.
- [12] L Packer, G Rimbach, F Virgili. 一种富含原花青素的法国松树皮提取物——碧萝芷[®]的抗氧化活性的生物学特性[J]. 自由基生物学与医学,1999,27(5/6):704—724.

Impact on lipid-peroxidation in mice and survival time in Oregon Kflies induced by a complex anti-oxidant/ Zhang Ding, Zhang Jie, Meng Guang, et al. // Chinese Journal of Food Hygiene. - 2002, 14(5): 3~6.

Abstract: To observe the change of anti-oxidation, free radicals eliminating and aging postponing in mice induced by a complex anti-oxidant (pycnogenol + grape seeds extracts + ginkgo leaves extracts), the Kunming mice were divided into three dose groups and two control groups, aged mice control groups and young mice control groups, 17 mice in each group for all. After consecutive administration of the test complex anti-oxidant by oral injection for 90 days, whole blood and serum were sampled and the MDA contents and SOD activity were determined. Oregon Kflies were randomly assigned into four test groups and one control group, 400 flies in each group, male and female in half. Different doses of the test substance were administered. Records of the numbers of the alive and the dead were taken until all flies were dead and LT_{50} , mean life span and maximum life-span were calculated. The results showed that the serum Malondialdehyde(MDA)

was lower and serum SOD activity was higher in high dose groups than those in control group of aged mice. The flies in the group of 0.06 % dose outlived the average expectancy of control group , the LT₅₀ was high up to 5 days during the survival experiment. These demonstrated that the complex anti-oxidant had some extent of effects on anti-oxidation , elimination for free radicals and anti-ageing.

Author 's address: Zhang Ding , Henan Health and Anti-epidemic Station , Zhengzhou 450003 ,PRC.

Key Words: Dietary Supplements ; Mice ; Antioxidants ; Aging

[收稿日期 :2002 - 05 - 02]

卫生部文件
卫法监发[2002]58 号

卫生部关于申请变更卫生部健康相关产品
卫生许可批件项目有关问题的通知

各省、自治区、直辖市卫生厅局 ,卫生部卫生监督中心 ,中国疾病预防控制中心 :

为促进经济发展 ,适应我国加入 WTO 后的发展要求 ,更好地为健康相关产品生产企业和申报单位服务 ,现就申请变更卫生部健康相关产品卫生许可批件项目的有关问题通知如下 ,请遵照执行。

一、对涉及产品卫生、安全和功能内容的卫生许可批件项目变更 ,应按新产品重新申报。

二、申请变更产品名称的 ,申报单位应提供下列资料 :

- 1. 原申报单位出具的产品名称变更说明 ;
- 2. 申报单位或生产企业所在地省级卫生行政部门出具的该产品近两年内未受过查处、通报的证明。

三、一次性全权转让的产品 ,接受转让单位应提供下列资料 :

- 1. 转让和接受转让双方签订的有效转让合同 ;
- 2. 公证机关出具的转让合同的公证文件 ;
- 3. 原卫生许可批件原件。

四、申请变更其他项目的 ,原申报单位应在申请中详细说明变更理由 ,对于符合有关法律法规规定的给予办理。

中华人民共和国卫生部
二 二 年三月六日

中华人民共和国卫生部
卫办法监函[2002]206 号

卫生部办公厅关于请查处掺矿物油“黑香米”的紧急通知

辽宁省卫生厅、内蒙古自治区卫生厅、吉林省卫生厅 :

近日 ,贵州省卫生厅针对当地发生一起因食用掺矿物油“黑香米”导致 2 人食物中毒的事件 ,发出《关于查处掺矿物油黑香米的紧急通知》(发电[2002]01 号) 。现请你厅立即对涉嫌违法生产经营掺矿物油“黑香米”的行为进行查处 ,并将查处结果及时函告我部法监司和贵州省卫生厅。

附件 :贵州省卫生厅关于查处掺矿物油黑香米的紧急通知(略)

卫 生 部 办 公 厅
二 二 年六月十九日