

安吉白茶、桑叶复合功能性饮料对 D-半乳糖致小鼠氧化损伤的拮抗效应研究

夏道宗¹, 于新芬², 倪达美¹

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江杭州 310053) (2. 杭州市疾病预防控制中心, 浙江杭州 310021)

摘要: 本文采用 D-半乳糖建立小鼠氧化损伤(应激)模型, 研究了不同剂量安吉白茶、桑叶复合功能性饮料喷雾干粉 DPCB (100、200、500 mg/kg·bw) 对小鼠体重、脏器指数, 血清、肝脏中丙二醛(MDA)含量和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以及对肝脏组织病理学的影响。结果表明, DPCB 可使氧化损伤小鼠体重增量、胸腺指数显著升高, 使肝脏、肾脏和脾脏指数也出现一定程度的升高; DPCB 可有效降低氧化损伤小鼠血清和肝脏中 MDA 含量, 最大降幅分别为 21% 和 15%; 同时有效增高氧化损伤小鼠血清和肝脏中 GSH-Px、SOD 的活性, 且具有量效关系; 此外, DPCB 对肝脏组织的病理学改变有一定拮抗效应。本研究为安吉白茶、桑叶天然抗氧化功能性食品的开发奠定了基础。

关键词: 安吉白茶; 桑叶; 饮料; 健康保护; D-半乳糖; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2013)7-1482-1485

Antagonism Effects of a Compound Functional Beverage with *Camellia sinensis* L. and *Morus alba* L. on D-Galactose Induced Oxidative Damage in Mice

XIA Dao-zong¹, YU Xin-fen², NI Da-mei¹

(1. Zhejiang Chinese Medical University College of Pharmaceutical Sciences, Hangzhou 310053, China)

(2. Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The present study mainly investigated the dry powder of compound functional beverage with *Camellia sinensis* L. and *Morus alba* (DPCB) on D-galactose induced oxidative stress in mice, and determined the changes of body weight, viscera index, serum and liver MDA content, GSH-Px, SOD activities, and hepatic histopathology. The results indicated that the body weight gain, thymus index, spleen index, liver index, and kidney index in different dose groups of DPCB significantly increased, compared with the oxidative stress model group. The serum and hepatic MDA content in high dose DPCB mice decreased 21% and 15%, respectively, compared to oxidative stress mice. DPCB could increase the serum and hepatic GSH-Px and SOD activities in a dose-dependent manner. In addition, DPCB could protect the hepatic histopathologic changes. This study laid a foundation for DPCB exploitation to antioxidant functional foods.

Key words: anjibaicha (*Camellia sinensis* L.); *Morus alba* L.; beverages; health care; D-galactose; oxidative stress

随着生活水平的提高, 人们对健康更为重视, 抗氧化功能性食品研究是我国乃至国际上的热门课题。安吉白茶是茶叶色白化而形成的一种变异类型, 为山茶科茶属木本植物, 以“叶白、脉绿、香郁、味醇”而独树一帜^[1-2]。研究表明, 安吉白茶含氨基酸 6.92%、酚 18.4%、咖啡碱 2.86%, 其氨基酸含量是普通绿茶

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(81102861); 浙江省自然科学基金(Y2110031); 中国博士后科学基金特别资助(2012T50562)

作者简介: 夏道宗(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为天然产物与功能性食品

的一倍以上, 赋予了该茶滋味鲜爽的特点。现代研究表明安吉白茶有辅助降血糖、保护视力、提高免疫力、抑菌、抗氧化等功效。桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥叶, 是卫生部指定的药食两用物品。近年来, 国内外研究人员对桑叶的化学组成和保健功能进行了较为系统的研究, 发现桑叶中含有多种黄酮类化合物、维生素、氨基酸和碳水化合物; 具有降压、降脂、抗氧化等多种功效^[3-5]。人体内的氧化与抗氧化处于动态平衡, 当这种平衡被打破, 就会发生氧化应激。茶多酚和黄酮类化合物是有效的天然抗氧化剂, 是茶叶和桑叶中的主要活性成分, 具有抗氧化能力较强的

酚羟基结构,可促进和激活体内抗氧化酶活性,使机体免于氧化损伤^[6-7]。

茶饮料以其能解渴、口感好、饮用方便等优点在饮料市场所占的比例越来越大,其中含有各种保健功效成分的复合型茶饮料,更加顺应时代潮流,有着很大的开发空间。我们已经完成安吉白茶、桑叶复合功能性饮料的研制及其体外抗氧化作用研究^[1]。但是,安吉白茶或其功能性饮料体内抗氧化研究尚未见报道。本文旨在通过体内外试验研究安吉白茶、桑叶复合功能性饮料喷雾干粉(dry powder of compound functional beverage with anjibaicha and *Morus alba*, DPCB)对D-半乳糖诱导的小鼠氧化损伤的保护作用,为安吉白茶、桑叶天然抗氧化功能性食品的开发提供科学实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品与试剂

安吉白茶、桑叶复合功能性饮料喷雾干粉:本实验室自制,总黄酮含量 17.67 mg/g,总酚含量 25.71 mg/g。D-半乳糖,国药集团化学试剂有限公司;维生素C,广东光华化学厂有限公司;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;其它试剂均为分析纯。

1.1.2 动物

实验用清洁级雄性ICR小鼠由浙江中医药大学动物实验中心提供,来源于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号SCXK(沪)2008-0016。

1.1.3 仪器

B-290 喷雾干燥仪, Buchi; UV-2600 紫外可见分光光度仪, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; TDL-5-A 离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及饲养

60只雄性ICR小鼠随机分为六组,即正常对照组(NC)、D-半乳糖致氧化损伤模型组(MC)、Vc阳性对照组(PC)和低、中、高剂量DPCB组(DPCB I、DPCB II和DPCB III)。NC组小鼠每只每天颈背部皮下注射生理盐水0.5 mL,其余各组小鼠每只每天颈背部皮下注射D-半乳糖400 mg/kg·bw;同时,NC组、MC组每天灌胃去离子水0.5 mL,PC组每天灌胃Vc 100 mg/kg·bw, DPCB I组、DPCB II组和DPCB III组每天分别灌胃DPCB 100、200、500 mg/kg·bw,连续5周。

每天观察动物外观、体征、行为活动等,每周记录体重2次。外观和体征主要包括皮毛颜色、完整性、是否充血、皮毛松散,眼睑是否下垂等。行为活动主要包括不正常叫声、烦躁、不安、易怒、感觉过敏、少动、嗜睡或昏迷等。

末次灌胃后禁食不禁水24 h,摘眼球取血,快速取肝脏、肾脏、脾脏和胸腺并称量,计算相应脏器指数;一部分肝脏-86℃保存,用于生化指标测定;另一部分肝脏经10%福尔马林固定后,用于一般组织病理学观察。

1.2.2 肝脏、血液中脂质过氧化指标的测定

取小鼠肝脏和血液,按试剂盒要求制备组织匀浆和血清,并测定GSH-Px、SOD活性和MDA含量。各项指标的具体测定原理、测定前各试剂的配制方法,以及每项指标蛋白含量的测定方法详见各试剂盒说明书。酶活力及MDA等含量的计算均严格按照试剂盒说明书提供的公式进行。

1.2.3 数据处理

采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理。数据均采用均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)的表示方法,不同处理间的差异采用t检验和单因素方差分析进行比较,以 $p < 0.05$ 为有显著性。

2 结果

2.1 DPCB对小鼠行为、体重及肝脏、肾脏、脾脏和胸腺指数的影响

与正常对照组相比,D-半乳糖致氧化损伤模型组小鼠逐渐表现出活动减少,毛色灰暗并渐有脱毛现象;而各受试物组小鼠总体状态好于模型组。如表1所示,与正常对照组相比,氧化损伤模型小鼠终末体重以及肝脏、肾脏、脾脏和胸腺指数显著降低($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。低、中、高剂量DPCB和Vc均可使氧化损伤小鼠脾脏指数和胸腺指数显著增高($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。高剂量DPCB也可使氧化损伤小鼠肝脏、肾脏指数显著增高($p < 0.05$)。

2.2 DPCB对血清MDA含量及GSH-Px、SOD活性的影响

如表2所示,与正常对照组相比,D-半乳糖致氧化损伤模型小鼠血清中MDA含量显著增高($p < 0.01$),GSH-Px和SOD活性显著降低($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。三个剂量DPCB均可显著降低氧化损伤小鼠血清中MDA含量,并显著增高GSH-Px活性;中剂量DPCB的作用效果与阳性对照Vc相当。高剂量DPCB和Vc均可显著增高氧化损伤小鼠血清中SOD活性,而中、低剂量DPCB效果并不明显。

表 1 DPCB 对小鼠体重及肝脏、肾脏、脾脏和胸腺指数的影响

Table 1 Influence of DPCB on body weight and index of liver, kidney and spleen thymus in oxidative damage mice

指标	组别					
	NC	MC	PC	DPCB I	DPCB II	DPCB III
初始体重/g	21.3±0.76	21.6±0.77	20.9±0.75	21.4±0.68	21.4±0.76	21.4±0.75
终末体重/g	30.8±1.10	28.8±1.03*	29.2±1.04	28.9±1.01	29.8±1.03	30.2±1.01
增重/g	9.5±0.34	7.2±0.26**	8.3±0.30 ^{##}	7.5±0.24	8.4±0.32 ^{##}	8.8±0.31 ^{##}
肝脏指数/(mg/g-bw)	38.64±1.37	35.07±1.25*	38.42±1.36	37.94±1.32	38.13±1.41	38.63±1.33 [#]
肾脏指数/(mg/g-bw)	13.96±0.49	12.50±0.42*	13.53±0.46	13.17±0.45	13.54±0.49	13.79±0.46 [#]
脾脏指数/(mg/g-bw)	4.12±0.15	3.44±0.14**	3.86±0.15 [#]	3.83±0.11 [#]	3.83±0.15 [#]	3.86±0.16 [#]
胸腺指数/(mg/g-bw)	2.21±0.08	1.46±0.05**	2.07±0.06 ^{##}	1.93±0.07 ^{##}	2.06±0.07 ^{##}	2.11±0.07 ^{##}

注: *与 NC 相比 p<0.05, **与 NC 相比, p<0.01; #与 MC 相比 p<0.05, ^{##}与 MC 相比, p<0.01。

表 2 DPCB 对小鼠血清 MDA 含量及 GSH-Px、SOD 活性的影响

Table 2 Influences of DPCB on serum MDA content and activities of GSH-Px and SOD in oxidative damage mice

指标	组别					
	NC	MC	PC	DPCB I	DPCB II	DPCB III
MDA/(nmol/mL)	5.06±0.65	7.01±0.90**	5.91±0.76 ^{##}	6.02±0.84 [#]	5.78±0.74 ^{##}	5.52±0.70 ^{##}
GSH-Px/U	440.62±56.88	275.38±33.39**	366.71±49.12 ^{##}	337.36±42.22 ^{##}	358.39±41.35 ^{##}	387.62±47.38 ^{##}
SOD/(U/mL)	143.25±18.49	125.82±16.11*	142.16±18.35 [#]	134.69±15.83	140.26±17.55	147.02±17.68 [#]

注: *与 NC 相比, p<0.05, **与 NC 相比, p<0.01; #与 MC 相比 p<0.05, ^{##}与 MC 相比, p<0.01。

表 3 DPCB 对小鼠肝脏 MDA 含量及 GSH-Px、SOD 活性的影响

Table 3 Influence of DPCB on hepatic MDA content and activities of GSH-Px and SOD in oxidative damage mice

指标	组别					
	NC	MC	PC	DPCB I	DPCB II	DPCB III
MDA/(nmol/mg prot)	1.74±0.15	2.21±0.18**	1.95±0.16 [#]	2.09±0.18	1.96±0.13 [#]	1.88±0.15 [#]
GSH-Px/(U/mg prot)	101.59±8.16	70.63±5.25**	92.15±7.13 ^{##}	83.55±5.62 ^{##}	90.62±7.84 ^{##}	94.75±8.14 ^{##}
SOD/(U/mg prot)	342.44±20.01	307.59±17.19*	340.87±19.82 [#]	321.42±16.35	340.15±18.77 [#]	344.38±24.64 [#]

注: *与 NC 相比 p<0.05, **与 NC 相比, p<0.01; #与 MC 相比 p<0.05, ^{##}与 MC 相比, p<0.01。

2.3 DPCB 对肝脏 MDA 含量及 GSH-Px、SOD 活性的影响

如表 3 所示,与正常对照组相比,D-半乳糖致氧化损伤模型小鼠肝脏中 MDA 含量显著升高($p<0.01$),GSH-Px 和 SOD 活性显著降低($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。三个剂量 DPCB 均可显著增高氧化损伤小鼠肝脏中 GSH-Px 活性;DPCB 在中、高剂量时可显著降低氧化损伤小鼠肝脏中 MDA 含量,并显著增高 SOD 活性;阳性对照 Vc 的作用效果与中剂量 DPCB 相当。

2.4 肝脏组织的一般病理学观察

由图 1 所示,正常对照组小鼠肝脏肝小叶结构正常,中央静脉明显,肝细胞呈条索状排列,肝窦可见,汇管区为正常结构。模型组小鼠肝脏出现一定程度的损伤,表现为少量肝细胞灶性坏死,少量细胞核碎裂或固缩,局部脂肪变性。中、高剂量 DPCB 和阳性对照 Vc 均可在一定程度上改善肝脏组织,并接近于正常小鼠。

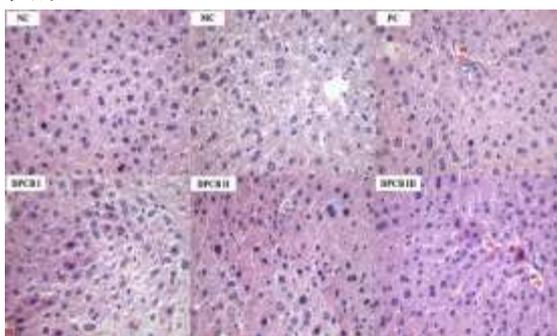


图 1 DPCB 对小鼠肝脏组织的影响

Fig.1 Influence of DPCB on hepatic histopathologic changes in oxidative damage mice

3 讨论

研究表明,D-半乳糖致氧化损伤模型动物的多种组织病理变化符合自然衰老时出现的症状^[8,9]。在正常情况下,机体内 GSH-Px、SOD 等抗氧化酶可有效清除自由基,维持细胞氧化/抗氧化动态平衡;MDA 是脂质过氧化的分解产物,其含量常常反映机体组织内脂质氧化的程度^[10-12]。过量注射 D-半乳糖可引起糖代谢紊乱,使机体过氧化反应增强,产生大量自由基损伤组织器官;现已证明上百种疾病与自由基有关,其中包括对人类威胁最大的心脑血管病和肿瘤^[13]。本研究发现小鼠连续颈背部皮下注射 D-半乳糖 5 周后,模型组小鼠的血清及肝脏 MDA 含量明显高于正常组,同时血清和肝脏中 GSH-Px、SOD 的活性显著降低,说明造模是成功的。DPCB 可有效降低氧化损伤小鼠血清和肝脏中 MDA 含量,有效增高氧化损伤小鼠血清和肝脏中 GSH-Px、SOD 的活性,且具有量效

关系,这种作用效果在一定程度上优于阳性对照 Vc。给予高剂量 DPCB 后,氧化损伤小鼠血清和肝脏中 MDA 含量分别下降 21% 和 15%,提示血液的氧化/抗氧化体系可能更容易受外界因素的影响,其 MDA 含量变化更能反映机体的脂质过氧化状况。本实验结果表明,DPCB 可有效保护血液和肝组织的氧化损伤,且其作用机制可能与 Vc 相同。此外,D-半乳糖诱导的氧化损伤小鼠体重增量及肝脏、肾脏、脾脏和胸腺指数显著降低,给予 DPCB 后,体重增量、胸腺指数显著升高($p<0.01$),肝脏、肾脏和脾脏指数也出现一定程度的升高($p<0.05$),肝脏组织病理学改变减轻,提示 DPCB 能明显拮抗过量 D-半乳糖引起的组织退化,特别是免疫器官退化,有一定增强免疫力的功能。

4 结论

多酚类和黄酮类化合物是有效的天然抗氧化剂,是茶叶和桑叶中的主要活性成分。DPCB 中总黄酮和总酚含量分别为 17.67 mg/g 和 25.71 mg/g,这是其发挥抗氧化功效的关键物质基础。本研究证实 DPCB 可显著增高氧化损伤小鼠体内抗氧化酶(GSH-Px、SOD)活性,改善脂质过氧化,从而明显保护 D-半乳糖诱导的氧化损伤。这将为我国安吉白茶资源的深度开发奠定基础,为以安吉白茶、桑叶为原料研制天然抗氧化功能性食品提供依据。

参考文献

- [1] 倪达美,夏道宗,许蕾婷.安吉白茶、桑叶复合功能性饮料的研制及其抗氧化特性研究[J].中国食物与营养,2010,10:58-61
Ni D M, Xia D Z, Xu L T. Development and antioxidant properties of compound functional beverage with anjibaicha (*Camellia sinensis*) and *Morus alba* L. [J]. Food and Nutrition in China, 2010, 10: 58-61
- [2] Ma C L, Chen L, Wang X C. et al. Differential expression analysis of different abescent stages of 'Anji Baicha' (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using cDNA microarray [J].Scientia Horticulturae, 2012, 148: 246-254
- [3] Nam S, Jang H W, Shibamoto T. Antioxidant activities of extracts from teas prepared from medicinal plants, *Morus alba* L. *Camellia sinensis* L, and *Cudrania tricuspidata*, and their volatile components [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 9097-9105
- [4] Nade V S, Kawale L A, Yadav A V. Protective effect of *Morus alba* leaves on haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress [J]. Pharmaceutical Biology, 2010, 48(1):

17-22

- [5] Yang Y, Zhang T, Xiao L, et al. Two new chalcones from leaves of *Morus alba* L. [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(6): 614-616
- [6] Jiang H, Zhan W Q, Liu X, et al. Antioxidant activities of extracts and flavonoid compounds from *Oxytropis falcate* Bunge [J]. *Natural Product Research*, 2008, 22(18): 1650-1656
- [7] Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 403(1-2): 136-138
- [8] Liu Y Y, Nagpure B V, Wong P T H, et al. Hydrogen sulfide protects SH-SY5Y neuronal cells against d-galactose induced cell injury by suppression of advanced glycation end products formation and oxidative stress [J]. *Neurochemistry International*, 2013, 62(5): 603-609
- [9] Ho S C, Liu J H, Wu R Y. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose [J]. *Biogerontology*, 2003, 4(1): 15-18
- [10] Gupta D K, Inouhe M, Rodríguez-Serrano M, et al. Oxidative stress and arsenic toxicity: Role of NADPH oxidases [J]. *Chemosphere*, 2013, 90 (6): 1987-1996
- [11] Shalan M G, Mostafa M S, Hassouna M M, et al. Amelioration of lead toxicity on rat liver with vitamin C and silymarin supplements [J]. *Toxicology*, 2005, 206(1): 1-15
- [12] 夏道宗, 潘东曼, 龚金炎, 等. 青梅提取物防治氧嗉酸钾致小鼠高尿酸血症的研究 [J]. *现代食品科技*, 2013, 29(1): 8-10, 28
Xia D Z, Pan D M, Gong J Y, et al. Study on the prevention and treatment of *Prunus mume* extracts against potassium oxonate induced hyperuricemia in mice [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(1): 8-10, 28
- [13] Shivanna N, Naika M, Khanum F, et al. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana* [J]. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2013, 27(2): 103-113

现代食品科技