

桉叶多酚对大鼠乙醇急性氧化损伤保护作用的研究

汤杰, 陈运娇, 陈洪章, 周爱梅, 赵力超, 刘晓娟, 曹庸, 肖苏尧

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为了评价桉叶多酚对昆明大鼠体内乙醇急性氧化损伤的保护效果, 本文以桉叶多酚饲喂昆明大鼠, 以乙醇灌喂大鼠进行急性氧化损伤造模, 对血液和肝脏总抗氧化能力、各抗氧化蛋白酶活性和肝脏组织病变情况进行检测。结果显示: 体内总抗氧化能力提升, 其中血清最高增强 33.12%, 肝脏最高增强 56.83%; 能有效降低体内 MDA 的含量, 其中血清最高降低 23.89%, 肝脏最高降低 50.73%; T-SOD 活性有一定程度增强; 实验组 GSH-Px 活性有所降低, 但是给药组与阳性对照组无差异; 肝脏切片观察发现, 三个给药组肝脏组织的细胞排列规则, 不规则空泡减少, 肝小叶炎性细胞浸润较少, 少见有局部坏死灶的出现, 表明乙醇急性氧化损伤受到抑制, 肝脏组织得到保护。综合所述, 桉叶多酚具有体内抗氧化保护作用, 这为桉叶多酚作为抗氧化剂的应用提供了研究基础。

关键词: 桉叶多酚; 大鼠; 乙醇急性氧化损伤; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2015)5-1-5

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.001

Protective Effect of *Eucalyptus* Polyphenols on Acute Ethanol-induced Oxidative Damage in Rats

TANG Jie, CHEN Yun-jiao, CHEN Hong-zhang, ZHOU Ai-mei, ZHAO Li-chao, LIU Xiao-juan, CAO Yong, XIAO Su-yao

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To evaluate the protective effect of *Eucalyptus* polyphenols on acute ethanol-induced oxidative damage in Kunming rats, *Eucalyptus* leaves were fed to Kunming rats, and a rat model of acute oxidative damage was established by ethanol feeding. The total antioxidant capacities (T-AOC) of the blood and liver, activity of each antioxidant enzyme, and liver tissue lesions of the rats were examined. *Eucalyptus* polyphenols enhanced the total antioxidant capacity, to a maximum of 33.12% and 56.83% in the serum and liver, respectively. The malondialdehyde (MDA) content was effectively reduced; the largest reductions in the serum and liver were 23.89% and 50.73%, respectively. The total superoxide dismutase (T-SOD) activity was increased to some extent. The glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was decreased in the experimental group, but there was no significant difference from the positive control group. The observation of liver slices showed that the cells of three liver tissues from the experimental group were arranged regularly, the number of irregular vacuoles was reduced, and lobular inflammatory cell infiltrations and local necrosis were rarely found, indicating that acute ethanol-induced oxidative damage was inhibited and the liver tissue was protected by *Eucalyptus* polyphenols. In summary, *Eucalyptus* polyphenol confers *in vivo* antioxidant protection, which provides a research basis for the use of *Eucalyptus* polyphenols as an antioxidant.

Key words: *Eucalyptus* polyphenols; rat; acute ethanol-induced oxidative damage; antioxidant activity

桉树的种植面积极广, 因此桉叶资源极为丰富, 且桉叶中多酚类物质含量很高, 是不可多得的一种天然活性物质来源, 具有良好的应用前景^[1]。桉叶多酚是从桉树叶中得到的提取物, 其中主要含有包括没食

收稿日期: 2015-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100433); 林业重大公益性科研行业专项 (201104003-03)

作者简介: 汤杰 (1987-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然活性物提取分离、结构鉴定及功能评价

通讯作者: 肖苏尧 (1974-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品功能成分研究

子酸、鞣花酸、多聚鞣酸等在内的多酚类物质。目前国内外对桉叶多酚的研究主要集中在单体的分离鉴定和活性评价, Swanston-Flatt SK 等^[2]的研究表明桉叶是一种传统的治疗糖尿病的植物药, 而 Gray 和 Alireza Nakhaee 等^[3-4]发现桉叶制备成的抗高血糖药主要通过对小鼠胰腺的作用达到抑制高血糖的作用, 而其作用机理在于桉叶中化合物的强抗氧化作用, 而且早在半个世纪前就有文献报道桉叶中富含活性物质, 且发现提取的混合物中各成分间具有明显抗氧化协同作用^[5]。本实验室在桉叶多酚研究与开发方面做了系统工作, 首先对我国种植面积较大的品种进行桉

叶多酚含量和抗氧化能力的筛选,然后优化桉叶多酚的提取工艺,再对桉叶多酚中的强抗氧化成分进行分离纯化、结构鉴定和活性检测^[6-8],从桉叶中分离提取到12种单体,9种单体具有较强抗氧化活性,而单体PGG和OeB不仅具有强抗氧化活性,还有线虫抗衰老效果^[9-10]。根据前期研究结果,最终选择以我国种植面积广泛的尾巨桉广林九号为对象,以10月份采集的树叶为实验原料,使用乙酸乙酯提取桉叶,再以乙醇水溶液(10%~50%)作为流动相,经过大孔树脂分离纯化,得到的组分中基本是多酚类物质,其中以30%乙醇水溶液分离组分的体外抗氧化活性最强,抗氧化能力可与目前公认的天然抗氧化剂茶多酚相媲美,而且小鼠急性毒性实验结果表明桉叶多酚属于实际无毒^[11]。但是目前国内外对桉叶多酚的应用研究还不多见。

为了评价桉叶多酚的体内抗氧化活性和将来作为动物抗氧化剂的应用,本文以30%组分的桉叶多酚为实验药物,用昆明小鼠为研究对象对桉叶多酚的急性毒性进行评价,再以安全的药物量饲喂昆明大鼠(便于提取血液和组织器官),然后采用灌喂乙醇法对大鼠进行急性乙醇氧化造模,通过检测大鼠血液、肝脏中的总抗氧化能力、各种抗氧化蛋白酶和肝脏组织病变情况来研究桉叶多酚对昆明大鼠急性乙醇氧化损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与动物

1.1.1 材料与试剂

广林九号桉叶的乙酸乙酯提取物,采用经过大孔树脂过柱后的30%乙醇组分进行实验,本实验室制备。

乙醇(分析纯,天津富宇精细化工);MDA、T-AOC、SOD、GSH-Px试剂盒(南京建成生物工程

研究所)。

1.1.2 实验动物

SPF级健康雄性SD大鼠,广州市中医药大学实验动物中心,体重 200 ± 20 g,许可证号scxk(粤)2008-0020,实验前正常饲养一周以适应环境。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(LC-10ATVP plus型),日本岛津;电热恒温水浴锅(HWS24型),上海恒科科技有限公司;玻璃匀浆器,美国Equil;万分之一电子天平(AL104),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;多功能酶标仪(MK-3),Thermo Labsystems公司;高速冷冻离心机(427R),德国Eppendorf。

1.3 实验方法

1.3.1 桉叶多酚抑制急性乙醇氧化损伤试验

雄性SD大鼠正常饲养适应1周后按体重随机分成5组(表2):空白组1、空白组2、桉叶多酚低剂量组(80 mg/kg bw)、中剂量组(160 mg/kg bw)、高剂量组(320 mg/kg bw),每组4只。空白组1、空白组2饲喂10 mL/kg bw 0.9%生理盐水,低剂量组80 mg/kg bw桉叶多酚,中剂量组160 mg/kg bw桉叶多酚,高剂量组320 mg/kg bw桉叶多酚,连续灌胃30天。实验期间SD大鼠自由摄食和饮水。

第30天末次灌胃后,空白组2和中、低、高剂量组禁食16 h(过夜),然后一次性灌胃给予50%乙醇12 mL/kg bw,6 h后取材。乙醚麻醉后摘眼球采血,常温离心分离血清(3000 r/min离心5 min),-20℃保存待测。取血后SD大鼠大腿股动脉放血处死,取肝脏,以冰生理盐水洗净浮血,滤纸吸干,称重。肝脏组织与生理盐水按 $m:V=1:10$ 在低温条件下匀浆,8000 r/min转速下10 min,取上清液-20℃保存备用。部分肝脏置于福尔马林溶液(10%甲醛)中保存,组织切片备用。

表1 乙醇氧化损伤模型分组

Table 1 Grouping for the ethanol-induced oxidative damage model

	空白组1	空白组2	低剂量组	中剂量组	高剂量组
桉叶多酚	-	-	80 mg/kg bw	160 mg/kg bw	320 mg/kg bw
生理盐水	10 mL/kg bw	10 mL/kg bw	-	-	-

注:低、中、高分别代表各组大鼠每日灌喂桉叶多酚量为80 mg/kg体重、160 mg/kg体重和320 mg/kg体重。

1.3.2 大鼠体内抗氧化指标检测

1.3.2.1 体重测定

每只大鼠每隔3 d测定一次体重,并记录。

1.3.2.2 总抗氧化能力(T-AOC)测定

抗氧化物质可将三价铁离子还原成二价铁离子,

后者与菲啉类物质形成稳定的络合物。在37℃,每分钟每毫升血清(每毫克组织蛋白)使反应体系的吸光度每增0.01为一个总抗氧化能力单位(U/mL或U/mg蛋白质)。具体操作见试剂盒。

1.3.2.3 丙二醛(MDA)测定

采用TBA法,其原理为脂质氧化过程中降解产生的MDA可与硫代巴比妥酸(TBA)反应,生成红色物质在532 nm下有最大吸收。具体操作见试剂盒说明书。

1.3.2.4 超氧化歧化酶(SOD)测定

采用黄嘌呤氧化酶法。规定血清中SOD活力以每ml反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个亚硝酸盐单位(NU)即U/mL组织中SOD活力以每mg组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个亚硝酸盐单位。具体操作见试剂盒说明书。

1.3.2.5 还原性谷胱甘肽(GSH-Px)测定

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)可以促使过氧化氢与还原性谷胱甘肽生成H₂O及氧化型谷胱甘肽。酶活力用其所催化的反应速度来表示。具体操作见试剂盒说明书。

1.3.2.6 组织蛋白质含量测定

采用考马斯亮兰法,当蛋白质加入棕褐色的考马斯亮兰显色剂中,考马斯亮兰上的阴离子与蛋白质中的-NH³⁺结合,致使溶液变蓝,通过测定吸光度计算样品中蛋白质的含量。血清中蛋白含量: g/L。组织匀浆蛋白含量单位: mg/g。具体操作见试剂盒。

1.3.2.7 肝脏病理切片观察

取10%甲醛固定液保存肝脏组织,用不同浓度乙醇溶液由低浓度至高浓度逐级脱水,透明、浸蜡、石蜡包埋,切片,常规HE染色,光镜下观察病理切片。

1.3.3 数据处理

实验数据均以均数±标准偏差(x±s)表示,组间差异比较采用SPSS 11.5统计软件进行分析,检验水平为p<0.05时为差异显著,具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 SD大鼠血清和肝脏中T-AOC活性

各组SD大鼠在连续不同剂量药物喂养30 d后,空白组2和给药组都一次性灌胃10 mL乙醇急性氧化损伤造模。T-AOC作为体内总抗氧化能力的评价指标用于衡量体内的抗氧化活性物质的含量。本实验检验了各实验组大鼠的血清和肝脏中总抗氧化活性,结果如图1所示,3个药物组的血清和肝脏中T-AOC活性均有明显提升,表明桉叶多酚增强了机体的总抗氧化能力。另外,从图1可见,活性增强最多的为中剂量组,与空白组比较,血清增强了约33.12%,肝脏增强了约56.83%,但是低、中、高剂量组之间没有差异,这表明桉叶多酚可能只需要少量就能对T-AOC有较好的增强作用,使用量不是越多越好。图1中还显

示,阳性对照组的T-AOC活性比空白组高,表明在乙醇急性刺激模型下,大鼠体内总抗氧化能力不减反增,这可能是乙醇刺激体内产生了更多内源性抗氧化物质,或者提高了抗氧化酶活力以应对体内的氧化应激,大鼠内源性抗氧化活性总体得到提升。

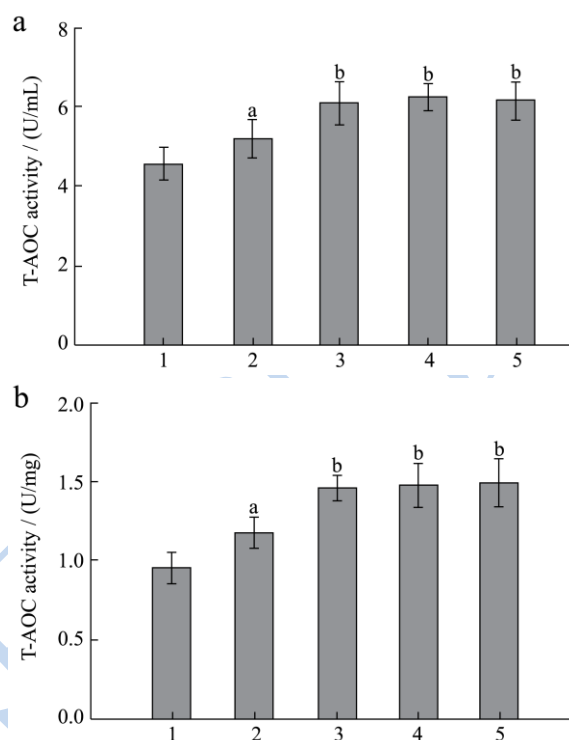


图1 大鼠血清和肝脏匀浆中T-AOC活性测定

Fig.1 Determination of serum (a) and liver (b) T-AOC in rats

注: a: 血清, b: 肝脏; 1.空白组; 2.阳性对照组; 3.低剂量组; 4.中剂量组; 5.高剂量组; n=3, a与空白组之间有显著差异(p<0.01), b与阳性对照之间有显著差异(p<0.01)。

2.2 SD大鼠血清以及肝脏中MDA含量测定

由于乙醇在体内氧化会产生自由基,攻击细胞膜,使得细胞受到损伤,丙二醛(MDA)是常用的膜脂过氧化指标,在酸性和高温条件下,可以与硫代巴比妥酸(TBA)反应生成红棕色的三甲川(3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮),其最大吸收波长在532 nm,MDA含量反应了机体的氧化损伤的程度,MDA含量越高,体内抗氧化程度越高。通过测定血清以及肝脏中MDA含量,结果如图2所示,与空白组相比,乙醇氧化作用对于体内脂质过氧化产物MDA有明显的促进作用,血清中MDA含量上升了约1.68倍,而肝脏中MDA含量上升了约1.91倍。与阳性对照组相比,药物组的MDA均有所降低,血清中三个药物组的MDA清除率分别为17.21%、20.93%、23.89%,肝脏中各组的MDA分别降低37.08%、48.11%、50.73%,因而桉叶多酚各剂量组对体内脂质过氧化产物的清除作用差异明显(P<

0.01),但是三个给药组在血清和肝脏中的MDA降低效果的差异并不显著,分析其原因,可能是因为桉叶多酚进入血液或者肝脏中的有效含量差异并不大,该推论还有待进一步验证,若该推论得到验证,则表明桉叶多酚的生物利用度还有待提高,这与多数天然活性物的生物利用度不高相吻合。

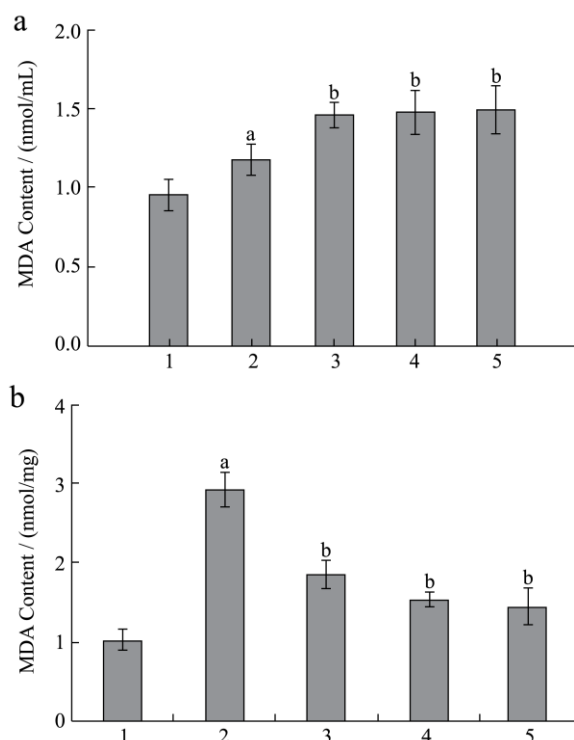


图2 大鼠血清和肝脏匀浆中MDA含量测定

Fig.2 Determination of serum (a) and hepatic (b) levels of MDA in rats

注: a: 血清, b: 肝脏; 1.空白组; 2.阳性对照组; 3.低剂量组; 4.中剂量组; 5.高剂量组; n=3, a与空白组之间有显著差异 ($p<0.01$), b与阳性对照之间有显著差异 ($p<0.01$)。

2.3 SD 大鼠血清及肝脏中 T-SOD 活性测定

超氧化物歧化酶为机体对抗体内活性自由基的重要抗氧化物质,其活性强弱反应了机体抗氧化能力的强弱。本实验检测了各实验组血清和肝脏中的总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性,结果如图3所示,与空白组比较,阳性对照组和药物组血清和肝脏的T-SOD活性有一定程度提高($p<0.01$),但是药物组与阳性对照组之间无差异($p>0.1$),说明大鼠灌喂乙醇后,机体产生了一定程度氧化应激,总抗氧化活性得到提高,但是饲喂桉叶多酚却没有提升总抗氧化活性,表明桉叶多酚没有在大鼠体内诱导SOD酶的活性增强,因此桉叶多酚的抗氧化活性机理不是通过提升T-SOD活性实现。

2.4 SD 大鼠血清及肝脏中 GSH-Px 活性测定

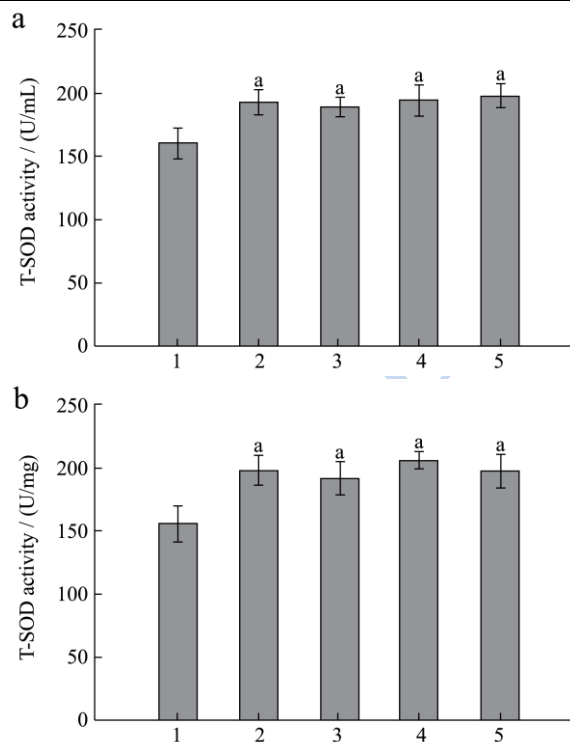


图3 大鼠血清和肝脏匀浆中T-SOD活性测定

Fig.3 Determination of serum (a) and liver (b) T-SOD activity in rats

注: a: 血清, b: 肝脏; 1.空白组; 2.阳性对照组; 3.低剂量组; 4.中剂量组; 5.高剂量组; n=3, a与空白组之间有显著差异 ($p<0.01$)。

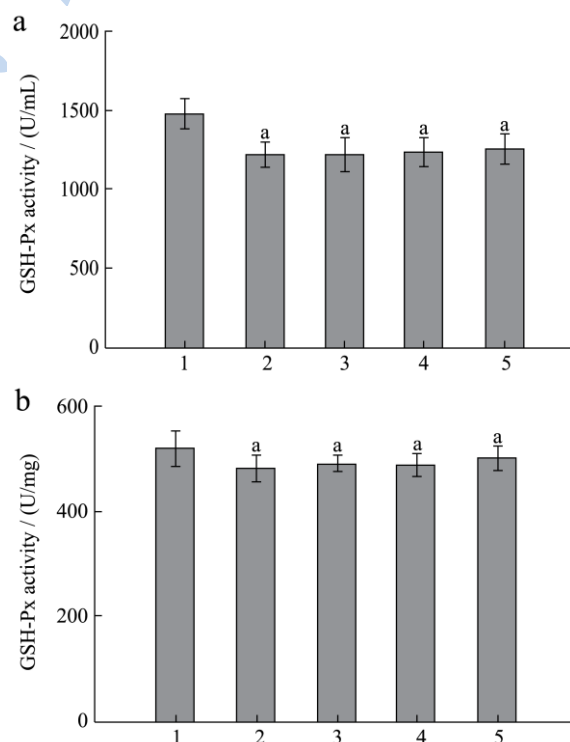


图4 SD 大鼠血清和肝脏匀浆中GSH-Px含量测定

Fig.4 Determination of serum (a) and hepatic (b) levels of GSH-Px in rats

注: a: 血清; b: 肝脏; 1.空白组; 2.阳性对照组; 3.低剂量组; 4.中剂量组; 5.高剂量组; n=3, a与空白组之间有差异 ($p<0.05$)。

GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的谷胱甘肽过氧化物酶,活性中心是硒半胱氨酸,其活力大小可以反映机体硒水平。硒是GSH-Px酶系的组成成分,它能催化GSH变为GSSG,使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。从SD大鼠血清及肝脏中GSH-Px活性结果来看,如图4所示,血清中阳性对照组的GSH-Px活性低于空白组,可能是因为灌喂的乙醇可能抑制了大鼠体内的GSH-Px的活性,而给药组和阳性对照组无差异,桉叶多酚没有提升GSH-Px的活性,表明桉叶多酚不能通过提高内源性抗氧化酶活性发挥抗氧化作用。

2.5 肝脏组织切片观察

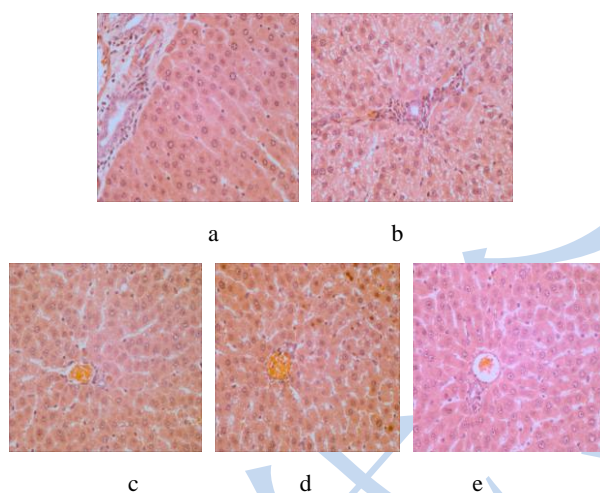


图5 大鼠肝脏切片图

Fig.5 Images of liver slices from rats

注: a空白组; b阳性对照组; c低剂量组; d中剂量组; e高剂量组; n=3, *与阳性对照之间有显著差异 ($p<0.01$), #与阳性对照之间有差异 ($p<0.05$)。

肝脏是活体最大的清除自由基器官,本文对各组大鼠的肝脏做了组织切片和常规HE染色进行观察,结果如图5所示,空白组肝组织形态正常,肝索整齐,辐射状排列,细胞多为单核,核圆,处于细胞中央,胞质均匀;而阳性对照组的肝组织细胞水样变性,细胞间界限模糊,胞浆浑浊,细胞核被挤向旁边,肝小叶内局灶性坏死,炎性细胞浸润,说明乙醇造模对大鼠肝脏细胞造成了损伤,造模成功;三个给药组的肝脏切片与阳性对照组比较,细胞排列规则,不规则空泡大量减少,肝小叶炎性细胞浸润较少,未见或少见有局部坏死灶的出现,初步说明桉多酚对大鼠肝脏的

乙醇急性损伤有较好的保护作用。

但是从图5看来,三个给药组之间的保护作用似乎差异不明显,可能的原因:实验大鼠经过桉叶多酚饲喂,体内抗氧化能力得到提升,但是生物活体具有强大的调控和缓冲能力,在机体健康状况良好的情况下,其体内抗氧化能力的改变应在某个范围内,而不会随着药物浓度的增加而成比例地增强,因此虽然每组大鼠给药量不同,但是经过大鼠体内的降解、吸收和对内源性抗氧化能力的调控,其总抗氧化能力维持在那个水平,从而对外界氧化损伤的抑制作用也基本相当。另有可能的原因就是关于药物的生物利用率问题,多数动物实验表明,很多活性物质的体内外生物活性相差很大,这是因为活体内的多重生理屏障抑制了物质的吸收和活性的发挥。因此,如何提高物质在体内的生物利用度是研究功能成分的重点和难点

3 结论

本论文通过对桉叶多酚在大鼠体内的抗氧化能力的检测,结果表明,桉叶多酚可以提升大鼠体内的总抗氧化能力,其中肝脏的总抗氧化能力增强较多,能有效降低体内MDA含量,其中肝脏的降低幅度也高于血清,T-SOD活性得到程度增强,肝脏切片结果显示,三个给药组的大鼠肝脏组织得到保护,肝脏组织细胞排列规则,不规则空泡大量减少,肝小叶炎性细胞浸润较少,未见或少见有局部坏死灶的出现,表明乙醇急性氧化损伤受到抑制。但是血清和肝脏的GSH-Px活性却有所降低,可能GSH-Px活性受到抑制,从给药组与阳性对照组的GSH-Px活性结果来看,他们之间无差异,因此初步认为可能乙醇对GSH-Px活性有抑制,而桉叶多酚对GSH-Px活性无抑制,但也没有增强效果。上述现象表明桉叶多酚具有体内抗氧化保护作用,这为桉叶多酚作为抗氧化剂的应用提供了研究基础。

参考文献

- [1] Aditya Kulkarni, Shunsuke Suzuki, Hideo Etoh. Antioxidant compounds from Eucalyptus grandis biomass by subcritical liquid water extraction [J]. Journal of Wood Science, 2008, 54: 153-157
- [2] Gray A M, Flatt P R. Antihyperglycemic actions of Eucalyptus globulus (Eucalyptus) are associated with pancreatic and extra-pancreatic effects in mice [J]. Journal of Nutrition, 1998, 128: 2319-2323
- [3] Swanston-Flatt S K, Day C, Bailey CJ, et al. Traditional plant treatment for diabetes: Studies in normal and streptozotocin

- diabetic mice [J]. *Diabetologia*, 1990, 33: 462-464
- [4] Alireza Nakhaee, Mohammad Bokaeian, Mohsen Saravani, et al. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin- induced diabetic rats by Eucalyptus Globules [J]. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2009, 24 (4): 419-425
- [5] F R Hewgill, F Legge. On the Antioxidant Activity of Phenols Obtained by Hydrogenation of Eucalyptus diversicolor Wood [J]. *Wood Science and Technology*, 1976, 10: 125-129
- [6] 陈海,田宏,肖苏尧,等.桉叶抗氧化物的提取与抗氧化性质研究[J].*湖南林业科技*,2009,36(2):25-29
CHEN Hai, TIAN Hong, XIAO Su-yao, et al. Research on extraction of antioxidants and antioxidant properties of Eucalyptus leaves [J]. *Hunan forestry science and technology*, 2009, 36(2): 25-29
- [7] 汤杰,赵力超,陈洪璋,等.桉叶提取物与常用抗氧化剂活性比较研究[J].*食品科技*,2013,38(08):247-251
TANG Jie, ZHAO Li-chao, CHEN Hong-zhang, et al. Comparison of antioxidant activities for eucalyptus leaf extract with common antioxidants [J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38 (08): 247-251
- [8] Suyao Xiao, Baoqing Wen, Haoyu Zhuang, et al. Extraction and antitumor activity of pedunculagin from eucalyptus leaves [C]. The 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB 2012), 2012, 7: 280-284
- [9] Yunjiao Chen, Junjiang Wang, Yangwen Ou, et al. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from Eucalyptus leaves (*Eucalyptus grandis* · *Eucalyptus urophylla* GL9) [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7, 737-745
- [10] Yunjiao Chen, Brian Onken, Hongzhang Chen, et al. Mechanism of longevity extension of *Caenorhabditis elegans* induced by pentagalloyl glucose isolated from eucalyptus leaves [J]. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2014, 62, 3422-3431
- [11] 汤杰.桉多酚提取分离工艺及其抗氧化活性研究[D].广州,华南农业大学,2013