

复合抗氧化剂对小鼠氧化应激与自由基代谢的影响

韩雪, 陈小连, 徐建雄

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘要: 研究探讨了复合抗氧化剂对小鼠生长以及力竭运动后氧化应激的影响。将35只小鼠随机分为7组, 安静对照组和游泳对照组饲喂基础日粮, 其余5组分别在基础饲料中添加维生素C、维生素E、茶多酚、微生物抗氧化剂和复合抗氧化剂; 除安静对照组外, 所有小鼠在试验结束日进行力竭游泳实验。试验结果表明, 与安静对照组相比, 力竭游泳显著提高小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)和肝脏中一氧化氮合成酶(NOS)活性($P<0.05$), 提高丙二醛(MDA)含量和过氧化氢酶(CAT)活性, 但差异不显著。与游泳对照组相比, 复合抗氧化剂能使小鼠血清中MDA含量显著降低了37.66%, 血清中SOD活力、肝脏中CAT活力和NOS分别显著提高了20.44%、46.43%和28.86%($P<0.05$)。复合抗氧化剂还能使小鼠力竭游泳时间显著提高了199.26%($P<0.05$), 复合抗氧化剂对小鼠体重及胸腺、脾脏指数有提高作用, 但差异不显著($P>0.05$)。本研究结果表明, 复合抗氧化剂的抗氧化能力要强于单一抗氧化剂。

关键词: 复合抗氧化剂; 氧化应激; 抗氧化性能; 小鼠

中图分类号: S816.7 **文献标识码:** A

Effects of Composite Antioxidants on Oxidative Stress and Free Radicals Metabolism in Mice

HAN Xue, CHEN Xiao-lian, XU Jian-xiong

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University; Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China)

Abstract: The try was conducted to study the effects of a kind of composite antioxidant on oxidative stress during exhaustive exercise in mice. Thirty-five mice were randomly divided into 7 groups with 5 mice in each group: quiet control group, swimming control group, vitamin E experiment group, vitamin C experiment group, tea-polyphenols experiment group, microbiotic antioxidant experiment group, composite antioxidant experiment group. Exhaustive swimming time were determined at the end of the experiment in each group (except quiet control group). The activities of serum SOD and the contents of serum MDA were also determined. **Results:** Compared with quiet control group, exhaustive swimming can noticeably decrease the contents of serum MDA by 22.86%, increase the activities of serum SOD by 94.98%. Fed with composite antioxidants, mice can significantly extent exhaustive swimming time by 199.26% ($P<0.05$); crease the activities of serum SOD by 20.44% significantly ($P<0.05$) and remarkably decrease the contents of serum MDA by 37.66% ($P<0.05$) after exhaustive swimming. **Conclusion:** The antioxidant capacity of composite antioxidant is stronger than single antioxidant.

Key words: composite antioxidants; oxidative stress; antioxidant capacity; mice

机体内过量的自由基可导致氧化应激, 造成机体损伤, 大量的研究表明, 抗氧化剂能有效清除体内过多的自由基。但是各种抗氧化剂单独使用往往存在不足, 因为自由基链式反应、自由损伤的多态性、自由基的信使作用等并未引起足够重视。Yano等(1994)提出“抗氧化剂复合链”的假说, 是指单一的

自由基清除剂或抗氧化剂作用有限, 必须由具有不同脂/水溶性、不同分子量、不同作用位点、不同存在部位、带有不同电荷组成的“复合自由基清除剂”或“抗氧化剂复合链”体系, 即可达到高效清除自由基损伤作用^[1]。这一假说对于指导联合使用抗氧化剂以清除自由基研究具有重要的意义。人们对抗氧化

收稿日期: 2010-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972103)

作者简介: 韩雪(1984-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士生, 研究方向: 动物营养与饲料科学; 徐建雄、陈小连为本文共同通讯作者,

Email: jxxu1962@sjtu.edu.cn, xiaolianchen@126.com.

剂之间是否具有协同或拮抗作用的认识仍较模糊,因此研制高效复合抗氧化剂成为现代自由基生物学的重点研究课题。维生素 C^[2]、维生素 E^[3]、茶多酚^[4]和微生物抗氧化剂^[5]是已被证实的具有抗氧化性能的单一抗氧化剂,本试验通过将单一抗氧化剂复合使用,研究各组分间的协同作用,以提高其抗氧化效果,为有效合理开发复合抗氧化剂,通过营养调控手段减缓动物应激提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

维生素 C(含量 92%)和维生素 E(含量 50%)均由上海富郎特动物保健品有限公司提供;茶多酚(含量 20%)由上海三维饲料添加剂有限公司提供;微生物抗氧化剂由上海创博生态工程有限公司提供;基础日粮购于上海斯莱克生物科技有限公司。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和一氧化氮合成酶(NOS)检测试剂盒购于南京建成生物工程公司。

1.2 实验动物分组及饲养管理

试验选用 35 只雄性 KM 小鼠(购自上海斯莱克生物科技有限公司,清洁级),随机分成 7 组,每组各 5 只。安静对照组和游泳对照组饲喂基础饲料,维生素 C 组、维生素 E 组、茶多酚组、微生物抗氧化剂组和复合抗氧化剂组分别在基础日粮中添加 1 g·kg⁻¹ 维生素 C、400 mg·kg⁻¹ 维生素 E、1.5 g·kg⁻¹ 茶多酚、20 g·kg⁻¹ 微生物源性添加剂和 5.75 g·kg⁻¹ 复合抗氧化剂(每 kg 复合抗氧化剂含有 200 mg 维生素 C、100 mg 维生素 E、450 mg 茶多酚和 5 g 微生物抗氧化剂)。小鼠饲养室温度为 28~32 ℃,相对湿度 50%~60%,光照明暗各 12 h,任意采食,自由饮水。

1.3 试验方法

预饲期 2 周,正试期 3 个月。在实验期开始和结束时分别对各组每只小鼠称重。在正试期结束的第 90 d,除安静对照组外,其他各组所有实验小鼠分别

在水温 25±1 ℃,长宽高 48 cm × 48 cm × 58 cm 的塑料桶中做无负重的力竭游泳实验。力竭标准为小鼠下沉后 10 s 不露出水面^[6]。游泳结束后,迅速取出小鼠擦干,乙醚麻醉,摘眼球取血。取血后,断头处死小鼠,剖开腹腔,取出肝脏、脾脏、胸腺,用生理盐水冲洗干净,拭干,称重,计算脏器指数;血液样品在室温中静置 2 h,4 ℃ 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,测定血清中 MDA 含量和 SOD 活性。将肝脏匀浆,测定肝脏中 CAT 和 NOS 活性。安静对照组的处理方法同游泳后的游泳对照组。

1.4 统计分析

数据用 Excel 2003 处理后,用 SAS 9.1.3 统计分析软件进行 ANOVA 单因素方差分析,采用 DUNCAN 法进行组间多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$,所有数据用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 不同抗氧化剂对小鼠体重变化的影响

由表 1 可知,各处理组小鼠的体重均有所提高,维生素 C、维生素 E、茶多酚、微生物抗氧化剂和复合抗氧化剂组分别比游泳对照组提高 2.92%、11.75%、5.40%、8.66%、15.85%,以复合抗氧化剂组小鼠增重最多,但各组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 不同抗氧化剂对小鼠脾脏和胸腺指数的影响

由表 2 可以看出,不同抗氧化剂具有一定增加小鼠脾脏和胸腺指数的趋势,与游泳对照组相比,维生素 C、维生素 E、茶多酚、微生物抗氧化剂和复合抗氧化剂分别能使小鼠脾脏指数增加 3.80%、4.77%、28.99%、0.87%、7.12%,胸腺指数增加 6.43%、8.65%、2.30%、17.35%、10.20%,但差异均不显著($P > 0.05$)。

2.3 不同抗氧化剂对小鼠游泳至力竭的时间的影响

由表 3 可见,各抗氧化剂均能提高小鼠的抗疲劳能力即延长小鼠力竭游泳时间。与游泳对照组相比,维生素 E、茶多酚、微生物抗氧化剂和复合抗氧

表 1 不同抗氧化剂对小鼠体重的影响

处理组	初始体重	结束体重	绝对增重
安静对照组	34.31±2.65	52.33±4.43	18.02±1.54
游泳对照组	35.46±2.78	53.25±4.64	17.80±2.24
维生素C组	35.61±1.78	53.92±3.16	18.31±1.43
维生素E组	33.16±1.84	53.04±3.51	19.86±1.27
茶多酚组	34.56±1.45	53.31±2.92	18.34±0.96
微生物抗氧化剂组	35.06±2.10	54.39±2.55	19.33±0.55
复合抗氧化剂组	34.02±2.62	54.63±6.87	20.61±4.49

表 2 不同抗氧化剂对小鼠脾脏及胸腺指数的影响
Table 2 Effects of different antioxidants on indices of spleen and thymus in mice

处理组	脾脏指数	胸腺指数
安静对照组	2.50±0.33	0.98±0.25
游泳对照组	2.62±0.43	0.96±0.23
维生素C组	2.72±0.45	1.02±0.24
维生素E组	2.74±0.76	1.04±0.15
茶多酚组	3.37±0.88	0.98±0.06
微生物抗氧化剂组	2.64±0.70	1.12±0.14
复合抗氧化剂组	2.80±0.36	1.05±0.21

表 3 不同抗氧化剂对小鼠力竭游泳时间的影响
Table 3 Effects of different antioxidants on exhaustive swimming time in mice

处理组	游泳时间/min
游泳对照组	51.39±9.99 ^c
维生素C组	71.40±13.96 ^{de}
维生素E组	112.84±18.45 ^b
茶多酚组	79.68±20.12 ^{cd}
微生物抗氧化剂组	101.45±17.16 ^{bc}
复合抗氧化剂组	153.79±24.65 ^a

注: 同列数据肩标小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$), 下同。

化剂均能显著延长小鼠力竭游泳时间, 时间分别延长 119.58%、55.05%、97.41%和 199.26%, 以复合抗氧化剂延长小鼠力竭游泳的时间最长($P<0.05$); 维生素 C 组延长了 38.94%, 差异不显著($P>0.05$)。

2.4 不同抗氧化剂对小鼠抗氧化能力的影响

不同抗氧化剂对小鼠抗氧化能力的影响见表 4。与安静对照组相比, 游泳对照组中的小鼠经过力竭游泳后, 血清 SOD 活性和肝脏 NOS 活性显著提高($P<0.05$), 血清 MDA 含量和肝脏 CAT 活性升高, 但差异不显著($P>0.05$)。与游泳对照组相比, 在基础饲料中添加抗氧化剂可降低小鼠血清中 MDA 含量, 其中维生素 E、茶多酚、微生物抗氧化剂和复合

抗氧化剂降低效果显著($P<0.05$), 以复合抗氧化剂降低程度最大。各抗氧化剂有提高血清中 SOD 活性、肝脏 CAT 和肝脏 NOS 活性的效果, 与游泳对照组相比, 微生物抗氧化剂和复合抗氧化剂提高小鼠血清中 SOD 作用效果显著($P<0.05$), 维生素 E、茶多酚、微生物抗氧化剂和复合抗氧化剂提高小鼠肝脏 CAT 含量升高的效果显著($P<0.05$), 维生素 C、维生素 E 和复合抗氧化剂提高游泳后小鼠肝脏中 NOS 活力的效果显著($P<0.05$)。

3 讨论

近年来, 许多研究表明, 自由基是引起许多疾病和损伤等病理过程的重要因素。在力竭性疲劳运动中, 机体耗氧量急剧增加, 自由基的生成明显增多, 引起血液、心肌、肝脏等组结构和功能变化^[7-9]。过多的自由基会攻击生物膜上的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA), 产生脂质过氧化产物 (MDA), 它直接反映着机体内氧自由基的代谢情况。SOD 是一种可催化超氧阴离子自由产生歧化反应的金属酶, 是体内最为重要的自由基清除剂, 反映了机体清除氧自由基的能力。本试验中, 与安静对照组小鼠相比, 游泳对照组小鼠在力竭游泳后血清中 MDA 含量升高了 22.86%, 这表明力竭游泳加速了小鼠机体组织脂质过氧化反应, 产生了较多的有害物质 (MDA), 同时, 研究也发现小鼠血清中 SOD 和肝脏中 NOS 活力在力竭游泳应激后出现明显增高($P<0.05$), 这可能是机体自由基大量产生刺激了体内的自由基清除系统, 一定程度上激活了机体的抗氧化酶系统功能, 这是机体的一种代偿保护作用。这与宋小珍等(2008)和 Borsiczky 等(2003)报道的应激后, 随着机体应激反应, 脂质过氧化活动的增强, 自由基诱发了抗氧化酶的表达, SOD 活性也随之升高, 结果一致^[10,11]。

近年来, “抗氧化复合链”也即“抗氧化网络”已

表 4 不同抗氧化剂对小鼠抗氧化能力的影响
Table 4 Effects of different antioxidants on antioxidant capacity in mice

处理组	血清MDA (nmol·mL ⁻¹)	血清SOD (U·mL ⁻¹)	肝脏CAT (U·mg ⁻¹)	肝脏NOS (U·mg ⁻¹)
安静对照组	3.57±0.10 ^a	133.08±28.24 ^c	27.80±1.50 ^a	13.97±2.69 ^c
游泳对照组	4.39±1.14 ^a	259.48±22.32 ^b	31.34±6.96 ^a	17.87±2.17 ^b
维生素C组	3.48±1.21 ^{ab}	262.65±22.48 ^b	32.18±4.06 ^a	23.00±2.32 ^a
维生素E组	2.80±0.76 ^b	266.07±28.39 ^b	44.82±7.36 ^b	23.11±2.54 ^a
茶多酚组	3.03±0.78 ^b	283.22±19.97 ^{ab}	45.64±3.08 ^b	20.39±2.11 ^{ab}
微生物抗氧化剂组	3.08±0.57 ^b	310.37±23.33 ^a	48.88±4.76 ^b	20.64±3.41 ^{ab}
复合抗氧化剂组	2.74±0.71 ^b	312.52±24.33 ^a	45.89±13.45 ^b	23.03±3.59 ^a

逐渐成为抗氧化剂研究的一个热点。一般的抗氧化剂只能发挥一次作用,由多种抗氧化剂构成的复合抗氧化剂即网络抗氧化剂,由于抗氧化剂之间的协同作用,当其他抗氧化剂单独工作时,网络抗氧化剂成员一起工作,而使其抗氧化能力大大增强,网络抗氧化剂各组分之间存在动态的循环性相互作用,即它们都可将自身以外的至少一种抗氧化剂还原再生,使其重新拥有抗氧化能力。当它们联合作用时,还可显著提高彼此的活性,使机体维持良好的抗氧化平衡状况,而且它们在细胞内同时还能发挥各自独特的保护作用^[2]。在体内,网络抗氧化剂再生循环瞬间可发生无数次,但它们在细胞内同时发挥着各自独特的保护功能。本复合抗氧化剂中各单一抗氧化剂具有不同特点,能不同程度地清除氧自由基和预防脂质过氧化效果,在体内可以促进大分子抗氧化酶的生物合成。在体内大分子抗氧化酶和抗氧化剂的协同作用下,清除自由基的效果会更强。各种抗氧化剂一方面起到营养补充作用,另一方面各组分间也有很强的协同作用:如维生素 C 与维生素 E 之间的相互作用可使维生素 E 抗脂质过氧化作用大为增强。维生素 E-自由基可在维生素 C 作用下又转变成维生素 E,仍可发挥阻断脂质过氧化链式反应的作用。同样,维生素 C 也可促使茶多酚的抗氧化效能增强。本研究通过比较单一抗氧化剂及复合抗氧化剂对小鼠抗运动氧化应激能力的研究发现,使用单一的抗氧化剂的保护作用是有限的,提示我们必须考虑抗氧化剂在体内的链式结构作用,利用综合协同效应来设计复合抗氧化剂,以达到更好的抗氧化应激效果。

游泳至力竭时间是反映运动能力的常用指标,运动能力的提高是机体抗疲劳能力加强的最有力的宏观体现。本实验结果表明,各种单一抗氧化剂均能延长小鼠游泳至力竭时间的,而复合抗氧化剂延长了小鼠游泳至力竭时间的效果显著优于各单一抗氧化剂。所以,复合抗氧化剂对于提高小鼠抗疲劳能力具有显著效果。复合抗氧化剂由于是将 4 种单一抗氧化剂复合,各组分之间具有较好的协同作用,所以对于运动氧化应激小鼠体内的自由基有显著地清除效果,还能提高小鼠抗氧化系统的抗氧化能力,具体表现在复合抗氧化剂组小鼠力竭游泳后血清中

MDA 含量显著降低 37.66%,SOD 活力显著提高 20.44%,且作用效果均优于单一抗氧化剂组。说明复合抗氧化剂是能有效清除小鼠力竭运动时氧化应激造成的小鼠体内多余产生的自由基,它还能有效提高小鼠抗氧化系统的抗氧化能力。

通过本试验,可以推断本研究所用复合抗氧化剂是一种能提高动物抗疲劳能力,降低运动氧化应激损伤程度的有效的抗氧化剂。

参考文献:

- [1] Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, et al. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G₀/G₁ [J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 448-454.
- [2] Frei B, England L, Ames B N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(16): 6377-6381.
- [3] 汪求真,马爱国,孙永叶,等.大剂量 VE 对大鼠抗氧化和 DNA 损伤的影响[J].*营养学报*,2005,27(6): 467-470.
- [4] Kyoji Y, Tomita I, Sano M, et al. Effects of long-term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats [J]. *Age*, 1994, 17(3): 79-85.
- [5] 龚灵芝,陈小连,徐建雄.微生物源性抗氧化剂对高不饱和脂肪酸饲料致大鼠自由基损伤模型的影响[J].*饲料工业*, 2008, 29(20): 32-34.
- [6] Dawson C A, Horvath S M. Swimming in small laboratory animals [J]. *Med Sci Sports*, 1970, 2(2): 51-78.
- [7] 李翠珍,贾 静.力竭游泳对大鼠红细胞膜脂质过氧化及红细胞变形性的影响[J].*中国临床康复*,2005,9(28): 198-199.
- [8] 张蕴琨,焦 颖,郑书勤,等.力竭游泳对小鼠脑、肝、肌组织自由及代谢和血清 CK、LDH 活性的影响[J].*中国运动医学杂志*,1995,14(2): 69-72.
- [9] 刘丽萍,柴戩臣,唐卫平,等.游泳训练对大鼠肝组织自由基代谢及肝脏超微结构的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 1998, 17(2): 121-123.
- [10] 宋小珍,王占赫,毛 帅,等.中药添加剂对高温下猪血清抗氧化功能的影响[J].*畜牧与兽医*,2008,40(5): 5-8.
- [11] Borsiczky B, Szabó Z, Jaberansari M T, et al. Activated PMNs lead to oxidative stress on chondrocytes: A study of swine knees [J]. *Acta Orthop Scand*, 2003, 74(2): 190-195.
- [12] Packer L, Colman C. *The Antioxidant Miracle* [M]. Wiley & Sons Inc, 1999.