

文章编号:1673-1689(2009)06-0777-04

钝顶螺旋藻的体内抗氧化和护肝作用

鲁军^{1,2,3}, 任迪峰^{*1}, 王建中¹, 鲁勇³, 江头祐嘉合²

(1. 北京林业大学 食品科学与工程系,北京 100083;2. 千葉大学大学院 食品营养研究室,日本千葉 271-8555; 3. 北京物资学院 科技处,北京 101149)

摘要: 探索了钝顶螺旋藻对 D-氨基半乳糖(D-GalN)所致急性肝损伤的防护作用和体内抗氧化效果。ICR 系小鼠在饲喂一周 AIN-93^G 标准饲料或含质量分数 5% 钝顶螺旋藻粉末的实验饲料后,第七天腹部注射 D-GalN(300 mg/kg)建立急性肝损伤模型。血清谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)活性、肝组织丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)以及维生素 C 水平在 6 h 后通过专用试剂盒或 TBARS、DTNB 和 DNPH 法分别测定。D-GalN 处理显著提高血清 GOT 和 GPT 活性以及肝 MDA 水平,并显著降低了肝 GSH 和维生素 C 含量,而饲喂含螺旋藻饲料能够显著地抑制这些变化。研究结果表明:钝顶螺旋藻具有显著的体内抗氧化效果,对 D-GalN 所致肝损伤具有很好的防护作用。

关键词: 抗氧化;螺旋藻;肝损伤;小鼠

中图分类号: R 965

文献标识码: A

Anti-Oxidant and Hepato-Protective Effect of *Spirulina platensis* in Vivo

LU Jun^{1,2,3}, REN Di-feng^{*1}, WANG Jian-zhong¹, LU Yong³, Egashira Yukari²

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Laboratory of Food and Nutrition, Graduate School of Science and Technology, Chiba University, Chiba 271-8555, Japan; 3. Science and Technology Agency, Beijing Wuzi University, Beijing 101149, China)

Abstract: In this study, the anti-oxidant and hepato-protective effect of *Spirulina plantensis* on D-galactosamine (D-GalN) induced liver injury in mice were investigated. ICR mice were fed a control diet (AIN-93G) or a diet containing 5% *Spirulina plantensis* for one week and on the last day of feeding the mice were treated with D-GalN (300 mg/kg body weight, i. p.). The serum glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) activities, hepatic malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and vitamin C levels were determined 6 h later by kits or by the method of TBARS, DTNB or DNPH, respectively. It was found that D-GalN induced increased in serum GOT, GPT and hepatic MDA level, but decreased in the GSH and vitamin C content. The results presented here demonstrated that *Spirulina plantensis* exhibited a significant antioxidant and protective on the D-GalN induced

收稿日期:2009-01-17

基金项目:国家留学基金项目([2007]3021)

作者简介:鲁军(1973-),男,安徽六安人,农产品加工与储藏博士研究生,主要从事植物药用成分化学与生物技术研究。Email:johnljsmith@163.com

*通讯作者:任迪峰(1973-),女,湖南岳阳人,工学博士,副教授,主要从事食品营养与生物技术研究。Email:rendifeng@163.com

hepatotoxicity.

Key words: antioxidant, *Spirulina plantensis*, liver injury, mice

螺旋藻是一种微型多细胞螺旋状海洋微生物,目前规模化培养的品种多为钝顶螺旋藻(*Spirulina plantensis*)或极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)。螺旋藻含有丰富的蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素、多糖和微量元素。研究表明,螺旋藻具有抑制肿瘤细胞生长、促进免疫和增强抵抗病毒的能力^[1-2],毒理学实验也未发现螺旋藻的毒副作用^[3]。但是,有关螺旋藻的体内抗氧化和护肝效果鲜有报道。肝病是一种全球性疾病,其中病毒性肝炎是对人们威胁较大的一种肝病。D-氨基半乳糖(D-GalN)所致肝损伤在形态学和组织病理学特征上与人类病毒性肝炎的特征十分相似^[4-5],在研究中经常作为病毒性肝炎的实验模型。作者通过对小鼠腹部注射D-GalN建立急性肝损伤模型,探讨钝顶螺旋藻的体内抗氧化作用及其对D-GalN所致肝损伤的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

钝顶螺旋藻冷冻干燥粉末:内蒙古再回首生物工程公司产品,经灭菌处理,4℃低温保存;戊巴比妥钠:Sigma Aldrich Japan产品;D-氨基半乳糖(D-GalN)、转氨酶分析试剂盒(Transaminase C II-test Wako)、5,5-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)以及其他试剂(除非文中另有说明)均从日本Wako Pure Chemicals Industries公司购买,所有试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

Shimadzu UV-1700 PharmaSpec型紫外可见分光光度计;日本Shimadzu Corporation产品;MT-2型均质机;日本Nakamura Scientific Instruments Industry Co. Ltd.产品;TOMY MRX-150型微量高速冷冻离心机;日本Tomy Seiko Co. Ltd.产品。

1.3 实验动物

体重为24~26g的24只5周龄SPF雄性ICR系小鼠购自日本SLC公司,饲养环境温度(22±1)℃,每日照明时间为7:00 AM到7:00 PM。适应一周后,小鼠按平均体重分为4组,分别为标准组、负对照组、正对照组和处理组。标准组和负对照组饲料为AIN-93^G^[6]配方饲料,正对照组

和处理组的饲料在其基础上分别添加质量分数0.5%的食品抗氧化剂2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)和质量分数5%的钝顶螺旋藻粉末。在第7日的10:30 PM通过腹部注射D-GalN(300 mg/kg)建立急性肝损伤模型,标准组小鼠注射等量的生理盐水代替。绝食时间为注射前后各4h,在D-GalN注射6h后通过腹部注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)对小鼠实施麻醉,进行解剖。血液在1200g下离心20min,获得的血清保存于-20℃备用,肝脏迅速用液氮冷冻并保存于-80℃备用。

1.4 血清转氨酶的活性测定

血清中谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)的活性按照Transaminase C II-test Wako试剂盒的说明进行测定。

1.5 肝脂质过氧化水平的测定

0.2 mL肝组织匀浆混于0.2 mL质量分数8.1%十二烷基硫酸钠、1.5 mL体积分数20%乙酸(pH 3.5)、1.5 mL质量分数0.8% 2-硫代巴比妥酸(TBA)和0.6 mL去离子水中,在95℃下水浴60min。水冷后,加入1 mL去离子水和5 mL正丁醇和吡啶(体积比15:1)混合液,充分振荡后在2100g下离心10min,取上清在532 nm下检测吸光度。

1.6 肝中抗氧化物质含量的测定

肝组织GSH含量采用DTNB比色法测定,肝组织匀浆在4℃,3300g下离心10min,取0.2 mL上清混于0.8 mL 0.3 mol/L Na₂HPO₄和0.1 mL DTNB溶液中,然后在5min之内检测412 nm下吸光度。

肝组织维生素C含量采用2,4-二硝基苯肼(DNPH)比色法测定。0.5 mL肝组织匀浆混于1.5 mL体积分数6% TCA溶液中,在3500g下离心10min,取0.5 mL上清混于0.5 mL DNPH溶液中,室温放置3h后加入2.5 mL体积分数85%硫酸,放置30min,在530 nm下检测吸光度。

1.7 统计学处理

结果数据以平均值±标准偏差表示,在单因素方差分析后采用日本Esumi Co. Ltd.的Excel Toukei 6.0版软件进行Duncan多重比较分析,显著水平设为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 小鼠的成长参数和指标

在试验期中未发生小鼠死亡,有关体重增长、饲料效率和肝重等指标如表 1 所示。

表 1 小鼠的体重增长状况、饲料效率和肝比率

Tab. 1 Initial and final body weight, weight gain, diet efficiency and liver ratio of mice

组别	初 体 重/g	终 体 重/g	体 重 增 加 值/(g/周)	饲 料 效 率/g ¹	肝 比 率/% ²
标准组	32.00±0.55	37.80±1.11	5.80±0.73 ^b	2.08±0.26 ^b	8.28±0.53
负对照组	32.00±0.37	36.00±0.73	4.00±0.58 ^a	1.54±0.22 ^a	8.18±0.27
正对照组	32.17±0.60	37.84±0.79	5.67±0.42 ^b	2.13±0.17 ^b	8.57±0.23
处理组	32.00±0.58	37.83±0.79	5.83±0.48 ^b	2.19±0.18 ^b	8.72±0.31

注:¹ $n=6$,字母不同表示差异显著, $p<0.05$ 。²饲料效率按每日 100 g 饲料所对应的体重增加值计算;³肝比率(%)=(肝质量/屠体质量)×100%。

虽然小鼠各实验组小鼠的初体重基本相同,但体重增加值却有明显差异,正对照组和处理组的体重增加值和标准组无明显差异,而负对照组的终体重与之差异显著。相对应的是,在实验处理期中各实验组的饲料效率也不相同,负对照组与其它 3 组有显著差异。由于负对照组和标准组使用的都是 AIN-93⁶ 配方饲料,所以此差异不是因为饲料不同引起,而是因为注射 D-GalN 造成肝损伤而引起的结果。正对照组和处理组与标准组的饲料效率无明显差异,说明饲料中分别添加的 BHT 和钝顶螺旋藻成分很大程度上消除了注射 D-GalN 所造成的影响。另外,各组之间的肝比率无明显差异。

2.2 血清 GOT 和 GPT 活性的变化

肝组织损伤通常表现为肝细胞中的一些酶在细胞受到损害后释放到血液中,从而引起血液中相应酶活性的升高,其中 GOT 和 GPT 就是肝损伤常用的两个指标^[7]。图 1 为各实验组血清中 GOT 和 GPT 活性的对比情况。

从图 1 可看出,负对照组的 GOT 和 GPT 活性显著高于标准组,表明建立了有效的急性肝损伤模型。正对照组和处理组的 GOT 和 GPT 活性基本相当,均显著低于负对照组,表明 BHT 和钝顶螺旋藻对 D-GalN 所致急性肝损伤具有抑制作用。此外,正对照组和处理组的 GPT 活性与标准组的差异显著,处理组的 GOT 活性与标准组的差异显著,说明 BHT 和钝顶螺旋藻能够在很大程度上减缓 D-GalN 所致急性肝损伤,但不能完全抑制。

万方数据

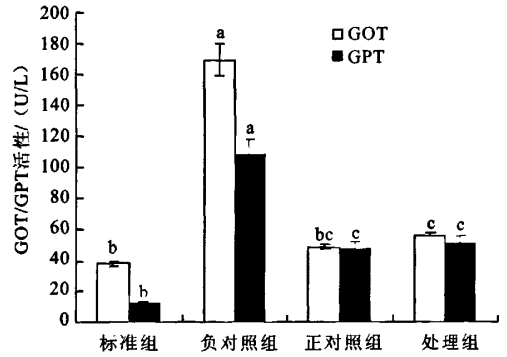


图 1 血清中谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)活性(字母不同表示差异显著, $p<0.05$)

Fig. 1 Activities of glutamate oxaloacetoacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) in serum (Different letters indicate significant difference, $p<0.05$)

2.3 肝脂质过氧化水平的变化

在 D-GalN 所致肝损伤中,肝细胞尿苷三磷酸(UTP)水平下降从而抑制 RNA 和蛋白质的合成是造成肝损伤的主要原因。近年来有研究指出 D-GalN 能够活化肝脏 Kupffer 细胞,产生自由基,氧化细胞蛋白质及生物膜脂质,形成脂质过氧化,从而导致肝细胞坏死^[8-9]。在文中,肝脂质过氧化水平按肝组织匀浆中丙二醛(MDA)含量计算,图 2 为各实验组肝组织中 MDA 含量的变化情况。

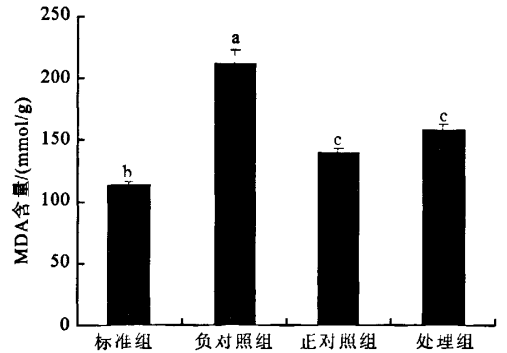


图 2 肝组织匀浆中的丙二醛(MDA)水平(字母不同表示差异显著, $p<0.05$)

Fig. 2 The malondialdehyde (MDA) level in liver homogenates (Different letters indicate significant difference, $p<0.05$)

从图 2 可看出,负对照组的 MDA 含量显著高于标准组,表明注射 D-GalN 引起显著的脂质过氧化过程,而正对照组和处理组的 MDA 含量均显著低于负对照组,与标准组之间也存在着显著差异,表明 BHT 和钝顶螺旋藻能够有效地减缓 D-GalN 引起的脂质过氧化过程。

2.4 肝 GSH 和维生素 C 含量的变化

GSH 和维生素 C 是机体抗氧化系统的重要组成部分,其含量高低反映了体内氧化胁迫的水平,表 2 显示了各实验组小鼠肝组织匀浆中 GSH 和维生素 C 含量的变化。

表 2 肝组织匀浆中的还原性谷胱甘肽(GSH)和维生素 C 含量

Tab. 2 The reduced glutathione (GSH) and vitamin C content in liver homogenates

组别	GSH 质量分数/ (mg/g)	VC 含量/ ($\mu\text{mol/L}$)
标准组	3.68 \pm 0.16 ^b	1.39 \pm 0.03 ^b
负对照组	1.78 \pm 0.19 ^a	0.81 \pm 0.05 ^a
正对照组	3.59 \pm 0.19 ^c	1.32 \pm 0.01 ^{bc}
处理组	3.58 \pm 0.10 ^c	1.24 \pm 0.03 ^c

注:n=6,字母不同表示差异显著, $p<0.05$ 。

如表 2 所示,负对照组的 GSH 和维生素 C 含量显著低于标准组,正对照组和处理组显著高于负对照组,而与标准组水平基本相当,表明 BHT 和钝顶螺旋藻对 D-GalN 所致急性肝损伤引起的体内氧

化胁迫有很好的抑制作用,能够维持正常的 GSH 和维生素 C 水平,具有较高的体内抗氧化能力。

3 结 语

D-GalN 引起肝损伤的机制一般认为是由于肝脏中积累生成 UDP-GalN 衍生物,消耗肝内 UTP,从而导致 mRNA 和蛋白质合成受阻,并产生过量氧自由基。当其超出机体内抗氧化系统的防护能力时,就会引起胞质蛋白质的氧化和细胞膜脂质的过氧化,从而损害肝细胞质膜的完整性,造成一些胞液中的酶流入血液中,表现为相关酶(如 GOT 和 GPT)活性的升高^[10,11]。

钝顶螺旋藻的护肝作用可能与其丰富的抗氧化物质成分有关,如 β -胡萝卜素、维生素 E 和超氧化物歧化酶等,另外,螺旋藻主要成分藻蓝蛋白的抗氧化作用最近亦有报道^[12]。

作者研究证实钝顶螺旋藻具有显著的体内抗氧化效果,能够有效地减缓 D-GalN 引起的急性肝损伤,表明了螺旋藻在病毒性肝炎防治中的潜在应用前景。

参考文献(References):

- [1] Hayashi K, Hayashi T, Morita N, et al. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells[J]. *Phytotherapy Research*, 1993, 7(1): 76-80.
- [2] 陈新美, 王晓华. 螺旋藻藻蓝蛋白的稳定性及抗癌活性研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(1): 59-62. CHEN Xin-mei, WANG Xiao-hua. The Characteristics and Anticancer Activity of Phycocyanin from *S. platensis*[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2006, 28(1): 59-62. (in Chinese)
- [3] Salazar M, Chamorro G, Salazar S, et al. Effect of *Spirulina maxima* consumption on reproduction and peri- and postnatal development in rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1996, 34(4): 353-359.
- [4] Keppler D, Lesch R, Reutter W, et al. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 1998, 9(2): 279-290.
- [5] 白新鹏, 裘爱泳. 美味猕猴桃根正丁醇提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 115-118. BAI Xin-peng, QIU Ai-yong. The liver-protective effect of the extracts from the *Actinidia deliciosa* root[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(6): 115-118. (in Chinese)
- [6] Reeves P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 123(11): 1939-1951.
- [7] Miyake S. The mechanism of release of hepatic enzymes in various liver diseases. II. Altered activity ratios of GOT to GPT in serum and liver of patients with liver diseases[J]. *Acta medica Okayama*, 1999, 33(5): 343-358.
- [8] Anukarahanonta T, Shinozuka H, Farber E. Inhibition of protein synthesis in rat liver by d-galactosamine[J]. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 2003, 5(2): 481-491.
- [9] 赵雪, 薛长湖, 王静凤, 等. 海带岩藻聚糖硫酸酯低聚糖对小鼠肝损伤的保护作用[J]. 营养学报, 2003, 25(3): 286-289. ZHAO Xue, XUE Chang-hu, WANG Jing-feng, et al. Hepatoprotective activity of low molecular fucoidan oligosaccharides from *Laminaria japonica* in mice with liver injury[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2003, 25(3): 286-289. (in Chinese)
- [10] Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, et al. Glycine and uridine prevent d-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells[J]. *Hepatology*, 1999, 29(3): 737-745.
- [11] Boindogurong J, Higaki T, Egashira Y, et al. Protective Effect of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats[J]. *Journal of Oleo Science*, 2005, 54(3): 153-159.
- [12] 唐攻, 王曼, 郭宝江. 富硒藻蓝蛋白对小鼠免疫功能及抗氧化活性的影响[J]. 营养学报, 2001, 23(3): 275-278. TANG Mei, WANG Man, GUO Bao-jiang. Effects of Selenium-enriched phycocyanin on immune capacity in mice[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2001, 23(3): 275-278. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)