研究报告

地鳖多糖提取物的体内外抗氧化作用

谢梦蕊,邱思奇,沈红*

(北京农学院动物科学技术学院/兽医学(中医药)北京市重点实验室,北京 102206)

【摘要】 目的 研究地鳖多糖提取物体内外抗氧化作用。方法 体外试验采用分光光度法、邻苯三酚自氧化法和 Fe^{2+}-邻二氮菲法分别检测地鳖多糖对二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)、超氧阴离子自由基(O_2^-·)和羟自由基(·OH)的清除,检测体外红细胞氧化溶血和肝线粒体肿胀程度。体内试验小鼠连续灌胃不同剂量(0、40、80、160 mg/kg)地鳖多糖提取物 20 d,硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定小鼠组织中丙二醛(MDA)含量,分光光度法检测抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活力。结果 与对照组比较,地鳖多糖组对自由基清除率随多糖浓度升高而显著提高;体外红细胞氧化溶血和线粒体肿胀显著降低。多糖组小鼠肝肾中 MDA 含量降低,SOD、CAT、GSH-Px 抗氧化酶活力提高并明显高于对照组。结论 地鳖多糖提取物能够清除自由基,降低自由基引起细胞氧化损伤,抑制组织中过氧化物生成,提高抗氧化酶活力,具有显著的体内外抗氧化作用。

【关键词】 地鳖多糖提取物;自由基;抗氧化酶;小鼠
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2016)04-0427-06
Doi:10.3969/j.issn.1005 – 4847.2016.04.017

Antioxidant effects of polysaccharide extraction from *Eupolyphaga sinensis* Walker (ESW) *in vitro* and *in vivo*

XIE Meng-rui, QIU Si-qi, SHEN Hong*

(College of Animal Science and Technology/Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the antioxidant effects of polysaccharide extraction from *Eupolyphaga sinensis* Walker (ESW) *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The methods of spectrophotometry, pyrogallol autoxidation and Fe^{2+} phenanthroline were used to detect the free radicals scavenging (DPPH·, O_2^-·and ·OH), erythrocyte oxidative hemolysis and liver mitochondrial swelling of polysaccharide extraction from ESW *in vitro*. The mice were administered with different doses of polysaccharide extraction from ESW (0, 40, 80, 160 mg/kg) for 20 days *in vivo*. The contents of MDA in different tissues of the mice were determined by TBA method, and spectrophotometry was used to assay the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Px). **Results** Compared with the control group, free radical (DPPH·, O_2^-· and ·OH) scavenging rate was significantly improved with the increasing concentration of polysaccharide extraction. There was a significant decrease in the oxidation hemolysis of erythrocytes and mitochondrial swelling *in vitro*. MDA contents were decreased in the polysaccharide group, and the activities of SOD, CAT and GSH-Px were significantly higher than those in the control group. **Conclusions** Polysaccharide extraction from ESW can eliminate free radicals, reduce cell oxidative damage caused by free radicals, inhibit the formation of peroxide in tissues, and increase the activity of antioxidant enzymes, indicating a good antioxidant property.

【**Key words**】 Polysaccharide extraction from ESW; Free radicals; Antioxidant enzymes; Mice

Corresponding author: SHEN Hong. E-mail: shenhong912@sina.com

[基金项目]北京市教委项目(PXM2013014207000067);北京农学院科技创新团队科研能力提升工程项目(KCT2014012)。
[作者简介]谢梦蕊(1991 –),女,硕士研究生,研究方向为免疫药理。Email: xiemr_2010@126.com
[通讯作者]沈红(1961 –),女,教授。E-mail: shenhong912@sina.com

地鳖(*Eupolyphage sinensis* Walker, ESW)是我国传统活血化瘀类中药,在众多医药典籍中均有记载。近年来,随着对地鳖化学成分的深入研究,从中分离出蛋白质、糖类、有机酸、生物碱、氨基酸等有机物及多种微量元素[1]。研究表明,地鳖具有溶解血栓、抗凝血、抗肿瘤、促进骨折愈合、调节血脂、抗突变、耐缺氧等十分广泛的药理作用[2]。

自由基参与体内多种病理、生理过程,其平衡的破坏是多种疾病发生的一个重要因素[3]。同时,机体通过超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽等抗氧化物质来清除有害过氧化物、减轻和阻断脂质过氧化反应。由于对多糖的研究越来越深入,且天然抗氧化剂比合成抗氧化剂安全性更高,近年来对多糖抗氧化活性的研究日益增加。

昆虫作为地球上种类最多、数量最大的生物类群[4],目前对其研究主要集中在甲壳素、蛋白质类等的提取和应用,而对多糖的研究相对不足[5],有关地鳖多糖抗氧化功能鲜有报道。本研究通过体内外试验研究地鳖多糖提取物体内抗氧化活性,以期为地鳖多糖的深入研究和开发应用提供试验依据,为利用昆虫来源多糖,拓宽昆虫资源利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄清洁级 KM 小鼠 40 只,体重 20~22 g,购于中国军事医学科学院实验动物中心【SCXK-(军)2012-0004】。无菌手术在北京农学院实验动物示范中心屏障动物实验室进行【SYXK(京)2015-0004】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

邻二氮菲、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、二硫苏糖醇(DTT)、硫代巴比妥酸(TBA)、抗坏血酸(Vc)等购于美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、总蛋白定量试剂盒购于南京建成生物科技有限公司,地鳖多糖提取物由本实验室制备。UV-3 紫外可见分光光度计购于上海美普达有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

小鼠随机分成 4 组,每组 10 只,不同剂量地鳖多糖提取物(0、40、80、160 mg/kg)灌胃给药(根据预实验及参考文献确定)[6~7],连续灌服 20 d。

1.2.2 地鳖多糖提取物对自由基清除的测定

(1) 分光光度法测定二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)的清除

取 1.2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液、2.6 mL 双蒸水于试管内混匀,加入 0.2 mL 不同浓度地鳖多糖提取物(0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)和 1 mg/mL Vc 溶液,混匀后室温静止避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度值。根据公式计算清除率(%) = $[1-(A_1-A_2)]/A_0 \times 100\%$, A_0为未加样品管吸光度值, A_1 为样品反应管吸光度值, A_2 为样品本身吸光度值。

(2)邻苯三酚自氧化法测定超氧阴离子(O_2^-·)自由基的清除

取 25℃预热的 4.9 mL PBS 溶液(pH 8.2)、40 μL 25 mmol/L 邻苯三酚和 30 μL 不同浓度地鳖多糖提取物(0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL)于试管内,25℃反应 3 min,然后迅速向各管滴加 50 mg/mL DTT 50 μL,室温静置 5 min,测定 322 nm 处吸光度值。根据公式计算清除率(%) = $[1-(A_1-A_2)]/A_0 \times 100\%$, A_0为未加样品管吸光度值, A_1 为样品反应管吸光度值, A_2 为样品本身吸光度值。

(3) Fe^{2+}-邻二氮菲氧化法测定羟自由基(·OH)的清除

取 1 mL 0.75 mmol/L 邻二氮菲、1 mL 0.75 mmol/L $FeSO_4$、2 mL pH 7.4 PBS、1 mL 不同浓度地鳖多糖提取物(0、1、3、5、7、9 mg/mL)于试管内混匀,然后加入 1 mL 0.01% H_2O_2,37℃水浴反应 60 min,测定 536 nm 处吸光度值。根据公式计算清除率(%) = $(A_3-A_2-A_1)/(A_0-A_1) \times 100\%$, A_0为未加样品和 H_2O_2 管吸光度值, A_1 为未加样品管吸光度值, A_2 为样品本身吸光度值, A_3 为样品反应管吸光度值。

1.2.3 红细胞氧化溶血的测定

取 1 mL 1%红细胞悬液、50 μL 不同浓度地鳖多糖提取物(0、1、2、4、8、16 mg/mL)、50 μL 100 mmol/L H_2O_2 和 4 mL 生理盐水于试管制备样品反应管,37℃水浴反应 1 h,迅速冷却,2000 r/min 离心 5 min,检测 415 nm 处吸光度值。细胞溶血率(%) = $A_1/A_0 \times 100\%$, A_0和 A_1 分别为对照和样品反应管吸光度值。

1.2.4 小鼠组织中 MDA 含量和肝线粒体肿胀度的测定

取 1 mL 1%肝、肾组织匀浆液、100 μL 6 mmol/

L 硫酸亚铁溶液、40 μL 60 mmol/L H_2O_2 及不同浓度地鳖多糖提取物(0、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64 mg/mL)于试管内,37℃水浴反应 1 h,加入 1 mL 15%的三氯乙酸终止反应,再加入 1 mL 0.6%硫代巴比妥酸(TBA)置于沸水中显色 15 min,冷却后检测 A_{532}值。计算 MDA 生成抑制率 = (1 − A_1/ A_0) × 100%,A_0和 A_1 分别为对照和样品反应管吸光度值。

制备小鼠肝线粒体液,总蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,将其调整浓度为 0.5 mg/mL。取 3 mL 线粒体液(0.5 mg/mL)、0.1 mmol/L $FeSO_4$ 溶液 50 μL、0.1 mmol/L V_C溶液 50 μL、2 mg/mL 地鳖多糖提取物 1 mL 混匀制备样品反应管,测定 A_{520}值。

1.2.5　抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活力及 MDA 含量的测定

末次给药 24 h 后小鼠眼眶采血,制备抗凝全血。迅速分离肝肾,用预冷生理盐水冲洗,制成10%组织匀浆备用。根据 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 试剂盒说明,检测组织和血液中 SOD、CAT、GSH-Px 活力及 MDA 含量。

1.2.6　统计分析

实验数据以平均数 ± 标准差表示,采用 t 检验分析比较各组数据,方差不齐时用 t' 检验,$P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　地鳖多糖提取物对自由基的清除

结果如图 1 所示,地鳖多糖组对三种自由基的清除率均低于阳性对照组,地鳖多糖提取物浓度在 0.4 ~ 2 mg/mL 范围内随着浓度升高对 DPPH·和超氧阴离子自由基的清除率逐渐提高,呈现剂量效应关系,多糖浓度在 2 mg/mL 时,自由基清除率接近阳性对照组;地鳖多糖在 9 mg/mL 时羟自由基清除率达到 81.7%,当浓度高于 7 mg/mL 时,清除率上升缓慢趋于平稳。

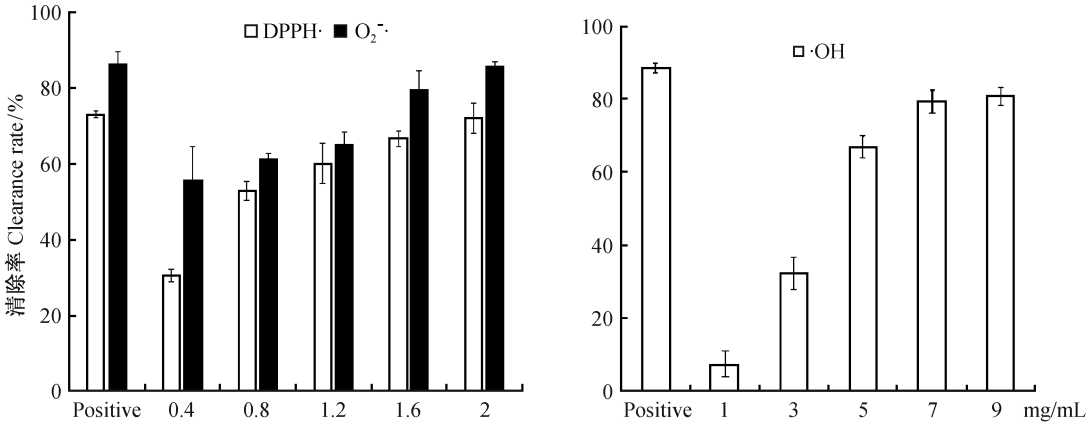


图 1　地鳖多糖提取物对自由基的清除作用

Fig. 1　Effects of polysaccharide extraction from ESW on free radical scavenging

2.2　地鳖多糖提取物抗氧化活性的分析

结果如图 2 所示,正常对照组体外红细胞溶血率为 20.74%,说明正常红细胞有一定程度的溶血,而地鳖多糖组红细胞溶血率高于 40%且明显高于正常对照组,地鳖多糖浓度在 1 ~ 4 mg/mL 范围内随着浓度提高,红细胞氧化溶血率呈降低趋势,当浓度大于 4 mg/mL 时红细胞溶血率下降趋于平稳。自由基攻击线粒体膜易引起线粒体膜肿胀,吸光度值改变,通过测定吸光度值变化,分析地鳖多糖提取物对线粒体肿胀的影响。结果随着自由基对线粒体作用时间延长,正常组吸光度值稍有下降,肿胀组吸光度值显著降低,地鳖多糖组吸光度值逐渐降低,低于正常对照组但高于肿胀组(图 3)。

2.3　地鳖多糖提取物对组织脂质过氧化的作用

由图 4 可知,地鳖多糖提取物浓度在 0.04 ~ 0.64 mg/mL 范围内,随着浓度增加,肝肾组织中 MDA 生成抑制率均呈明显升高趋势,肾中 MDA 生成抑制率明显高于肝组织(图 4A)。与对照组比较,随着地鳖多糖提取物剂量的增加,小鼠肝肾中 MDA 含量明显降低,肝中 MDA 含量降低显著且明显高于肾(图 4B)。

2.4　地鳖多糖提取物对抗氧化酶活力的影响

与对照组比较,随着地鳖多糖提取物剂量升高,小鼠肝肾中 SOD 活力逐渐增强,其中高剂量组

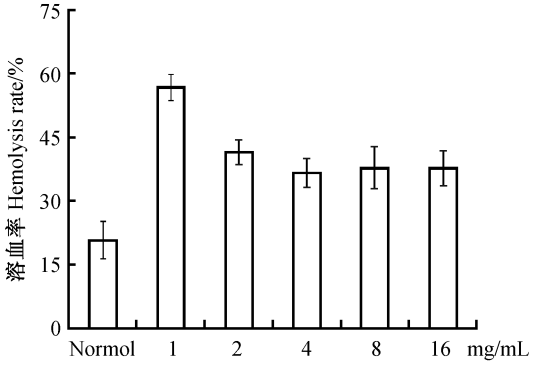


图 2 地鳖多糖提取物对红细胞氧化溶血的影响

Fig. 2 Effects of polysaccharide extraction from ESW on hemolysis of erythrocytes

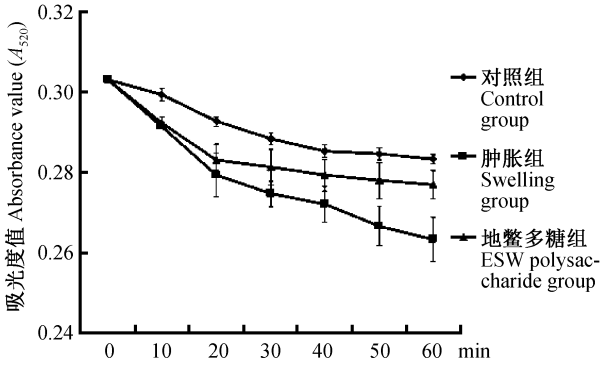


图 3 地鳖多糖提取物对肝线粒体肿胀的影响

Fig. 3 Effects of polysaccharide extraction from ESW on liver mitochondria swelling

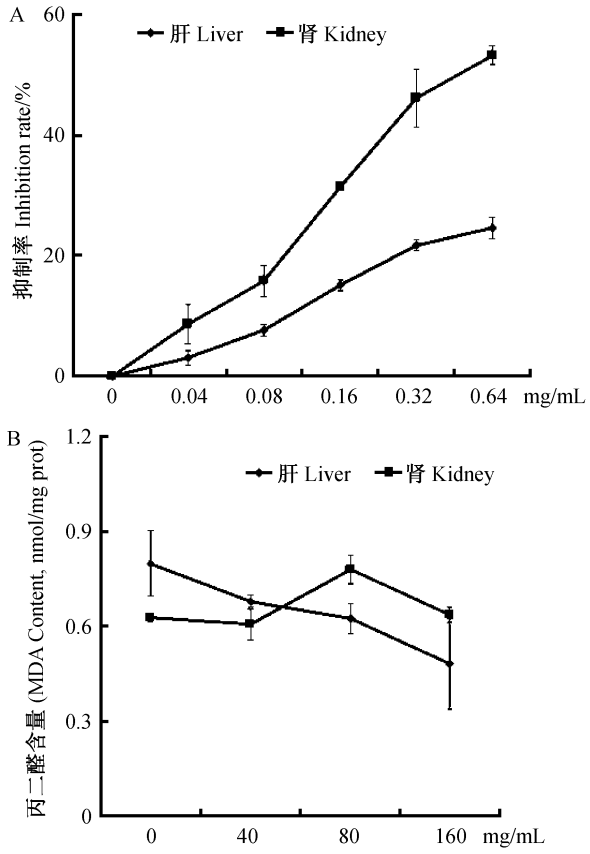


图 4 地鳖多糖提取物对体外(A)和体内(B)小鼠肝肾组织中 MDA 生成的影响

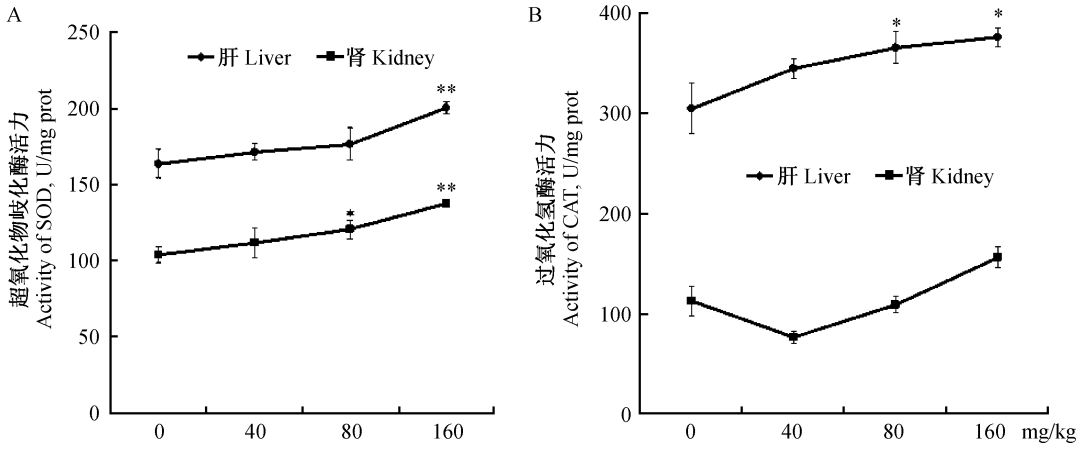
Fig. 4 Effects of polysaccharide extraction from ESW on the production of MDA in mouse liver and kidney tissues *in vitro* (A) and *in vivo* (B)

极显著高于对照组;肝中 SOD 活力明显高于肾(图 5A)。随着地鳖多糖剂量升高,肝中 CAT 活力逐渐提高;肾 CAT 活力低中剂量组降低,高剂量组明显高于对照组;组织之间比较,肝中 CAT 活力最高明显高于肾(图 5B)。地鳖多糖组小鼠肝和血液中 GSH-Px 活力明显高于对照组,且随着地鳖多糖剂量增加 GSH-Px 活力显著升高(图 6)。

3 讨论

自由基有很强的氧化反应活性,过量自由基易对蛋白质、脂质和核酸等生命活动的重要分子造成损害[8]。多糖作为一种天然抗氧化剂能够清除自由基,可减少自由基对人体的损伤及减缓慢性疾病的发生[9]。赵昕等[10]在对香菇菌柄基部多糖的研究中发现,经初步纯化,多糖对 DPPH·自由基有较强的清除活性。聂少平等[11]通过体外试验证实,茶叶多糖对超氧自由基和 DPPH·自由基均有较强的清除作用。本试验结果地鳖多糖提取物对 DPPH·、O_2^-·和·OH 自由基均表现出显著的清除效果,其清除率分别达到 72%、85% 和 81%,表明地鳖多糖提取物具有较强的清除自由基能力。

MDA 是细胞膜不饱和脂肪酸脂质过氧化的终产物,其化学性质极其活泼,易与蛋白质、核酸等反应,其含量常用来表示机体内脂质过氧化水平及细胞的受损程度[12]。红细胞在体外与 H_2O_2 反应后也可产生 MDA,MDA 可使红细胞膜受损,发生溶血;线粒体膜在自由基攻击下极易发生脂质过氧化反应,破坏膜脂的结构,出现线粒体肿胀等异常现象。张德华等[13]研究发现,夏枯草多糖具有防止膜脂质过氧化的作用,减少红细胞溶血和降低 MDA 的生成。梁俊等[14]研究结果表明,石榴皮多酚能有效抑制体外金属离子诱导的脂质过氧化,并且具有良好的剂量效应关系。本试验结果发现,地鳖多糖提取物能够显著减少红细胞溶血和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的生成量,显著降低脂质过氧化物产生。

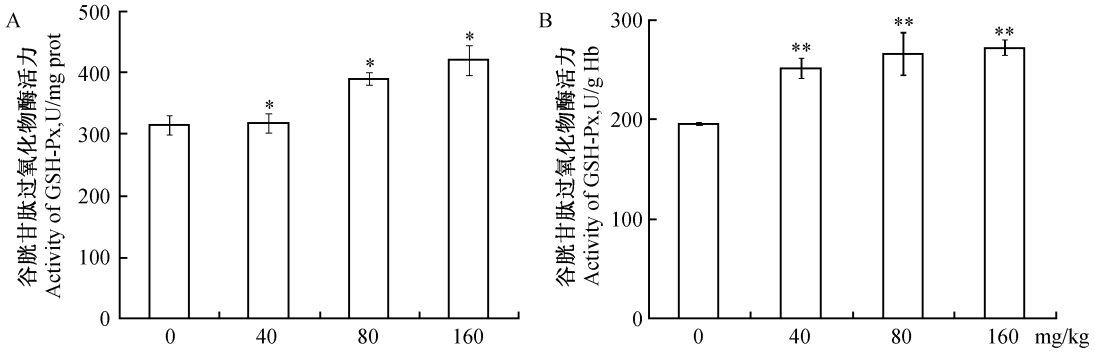


注:与对照组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$。

图 5　地鳖多糖提取物对小鼠肝肾组织中 SOD(A)和 CAT(B)中活力的影响

Note. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Fig. 5　Effects of polysaccharide extraction from ESW on the activity of SOD (A) and CAT (B) in mouse liver and kidney tissues



注:与对照组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$。

图 6　地鳖多糖提取物对小鼠肝(A)和血液(B)中 GSH-Px 活力的影响

Note. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Fig. 6　Effects of polysaccharide extraction from ESW on the activity of GSH-Px in mouse liver (A) and blood (B)

机体主要通过 SOD、GSH-Px 和 CAT 等抗氧化酶来抵抗过量自由基造成的损伤,其中,SOD 是第一道防线,它将 $O_2^-\cdot$ 转化为 H_2O_2 和其他氢过氧化物;第二道防线是 CAT 和 GSH-Px, CAT 能够分解 H_2O_2,而 GSH-Px 可同时清除 H_2O_2 和脂质过氧化物,从而有效地保护机体[15]。晏涛等[16]研究表明,灵芝多糖可抑制组织 MDA 的生成,同时能增高 SOD 活力。本试验地鳖多糖组小鼠肝肾及血液中的抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 活力均有显著提高,MDA 含量显著下降,结果表明地鳖多糖提取物可有效提高体内抗氧化酶活力,抑制脂质过氧化,表现良好抗氧化作用。

综上所述,地鳖多糖提取物可能是通过提高抗氧化酶活性,清除自由基,抑制脂质过氧化,从而增强机体抗氧化能力,但其抗氧化作用机理仍需探讨。本研究为地鳖多糖抗氧化作用的深入研究提供实验依据,以及为昆虫资源充分利用奠定一定的科学基础。

参　考　文　献

[1] 田军鹏, 黄文, 雷朝亮, 等. 地鳖虫药理作用研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 418-419.

[2] 周彦钢, 任玉翠, 江月仙. 地鳖虫的营养成分分析 [J]. 食品研究与开发, 1998, 19(2): 51-53.

[3] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88.

(下转第 438 页)

[5] 张勇, 朱晓宇, 郭胜亚, 等. 苯肼诱发建立斑马鱼血栓模型的方法 [J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1): 27 – 31.
[6] 邹煜, 应华忠, 潘永明, 等. 冠心宁片对犬急性心肌缺血时冠脉流量的影响 [J]. (8): 482 – 485.
[7] 陈民利, 寿旗扬, 潘永明, 等. 冠心宁片对气滞血瘀大鼠抗血小板聚集和保护血管内皮作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(5): 586 – 589.
[8] Westemeld M. The Zebrafish Book [M]. Eugene: University of Orgen Press, 1955, 16 – 21.
[9] 庞兴学, 王显. 血栓形成的过程与机制研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(11): 1613 – 1615.
[10] 兰志新, 林秀山. 阿司匹林临床应用的不良反应分析 [J]. 医学理论与实践, 2016, 29(3): 384 – 385.
[11] 刘芳, 刘加春, 王大明, 等. 症状性颈动脉和椎-基底动脉狭窄患者的阿司匹林和氯吡格雷抵抗现象 [J]. 中国脑血管病杂志, 2008, 5(1): 15 – 18.
[12] 任德旺, 叶淳淳, 倪必辉, 等. 盐酸苯肼致小鼠化学损伤性血虚证模型的改良 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 108 – 110.
[13] 陈民利, 吕建敏, 潘永明, 等. 冠心宁片对 Beagle 犬急性心肌缺血的作用 [J]. 浙江中医药大学学报, 2005, 29(4): 54 – 56.
[14] Jouve R, Rolland PH, Delboy C, et al. Thromboxane B, 6-keto-PGF 1a, PGE 2, PGF 2a and PGA 1 plasma levels in arteriosclerosis obliterans: Relationship to clinical manifestations, risk factors, and arterial pathoanatomy [J]. Am Heart J, 1984, 107: 45.
[15] Ghatalia P, Je Y, Kaymakcalan MD, et al. QTc interval prolongation with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Br J Cancer, 2015, 112(2): 296 – 305.
[16] 张亚楠, 孙继红, 黄新益, 等. 普纳替尼对人血管内皮细胞功能的影响 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 156 – 160.
[17] 令狐克刚, 曾玉, 张彦燕, 等. 基于 p-Akt/eNOS 信号的阿司匹林对 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(8): 785 – 788.

[收稿日期] 2016-05-10

(上接第 431 页)

[4] Dossey AT. Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discover y [J]. Natural Product Reports, 2010, 27(12): 1737 – 1757.
[5] Garenaux E, Maes E, Levêque S, et al. Structural characterization of complex O-linked glycans from insect-derived material [J]. Carbohydrate Res, 2011, 346(9): 1093 – 1104.
[6] 唐静. 不同剂量川牛膝多糖对小鼠抗氧化活性的影响 [D]. 四川: 四川农业大学, 2013.
[7] 侯潇, 刘剑利, 常浩, 等. 香蕉皮多糖对小鼠抗氧化损伤作用 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(11): 1398 – 1399
[8] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85 – 88.
[9] Xu WT, Zhang FF, Luo YB, et al. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from pteridium aquilinum [J]. Carbohydrate Res, 2009, 344:217 – 222.
[10] 赵昕, 吴子龙, 陈立凤, 等. 香菇菌柄基部多糖的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究 [J]. 北方园艺, 2012, 24: 165 – 168.
[11] 聂少平, 谢明勇, 罗珍. 茶叶多糖的抗氧化活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(5): 549 – 552.
[12] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malongdialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker [J]. Wiad Lek, 2004, 57(9 – 10): 453 – 455
[13] 张德华. 夏枯草多糖德分离纯化与抗氧化活性研究 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(4):410 – 414.
[14] 梁俊, 李建科, 赵伟, 等. 石榴皮多酚体外抗脂质过氧化作用研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(2): 102 – 108.
[15] 张彬, 谭琼, 李丽立, 等. 金属硫蛋白对奶牛血液抗氧化酶 GSH-Px 和 CAT 基因表达的影响 [J]. 草业学报, 2010, 19(3): 132 – 138.
[16] 晏涛, 陈世保, 徐蕾, 等. 灵芝多糖对阿尔茨海默病大鼠学习记忆和氧化应激的影响[J]. 陕西医学杂志, 2011, 40(4): 387 – 389.

[收稿日期] 2016-01-29