论著

文章编号:1000-5404(2007)20-1954-04

光皮木瓜多酚粗提物的体内外抗氧化效应

张 婷,糜漫天,唐 勇,赵 靖 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 评价光皮木瓜多酚粗提物的体内外抗氧化效应。**方法** 采用体外DPPH自由基清除系统测定多酚粗提液的EC_{50}和反应动力学效应,采用$^{60}Co\gamma$辐照法建立小鼠过氧化损伤模型,以多酚粗提液喂养小鼠,观察体内MDA和SOD水平。**结果** 光皮木瓜多酚粗提物具有较强的抗DPPH自由基效应,显著降低小鼠体内MDA含量,提高SOD活性。**结论** 光皮木瓜多酚粗提物具有较强的体内外抗氧化效应。

关键词:光皮木瓜;多酚;DPPH;抗氧化;MDA;SOD
中图法分类号:R151.1;R459.3 **文献标识码**:A

In vivo and *in vitro* antioxidant effect of polyphenol extracts from Chinese flowering quince

ZHANG Ting, MI Man-tian, TANG Yong, ZHAO Jing (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Chongqing Key Lab of Nutrition and Food Safety, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To appraise the *in vivo* and *in vitro* antioxidant effect of polyphenol extracts from Chinese flowering quince. **Methods** DPPH radical scavenging system was adopted to evaluate the EC_{50} and kinetic indexes of the polyphenol extracts which were respectively supernatant without cellulase digestion, supernatant with cellulase digestion, the alcohol extracts from the sediment after cellulase digestion or not. Polyphenol extracts of different concentrations (40, 80, 120, 200 mg/kg) were intragastrically administered to Kunming mice at dose of 0.1 ml/kg for 30 days, the total body gamma irradiation (^{60}Co) was used to establish the mice model of peroxidation injury. Meanwhile the normal control group and irradiation model group without polyphenol extracts interference were set. On the third day after irradiation, MDA contents and SOD activity in mouse serum and tissues were observed. **Results** Polyphenol extracts from Chinese flowering quince had strong effect against free radical *in vitro* and *in vivo*. The intervention of polyphenol extracts can effectively reduce the MDA contents and increase the SOD acvtivity in mice. **Conclusion** Polyphenol extracts from Chinese flowering quince have strong antioxidant effect both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Chinese flowering quince; polyphenol extracts; DPPH; antioxidant effect; MDA; SOD

木瓜为蔷薇科植物帖梗海棠[*Chaenomeles speciosa* (*sweet*) *Nakai*]的果实,主要分为两大类:皱皮木瓜(川木瓜、云木瓜、藏木瓜、日本木瓜等)和光皮木瓜(山木瓜),本实验所用材料为光皮木瓜[*Chaenomeles. sinesis* (*Touin*) *Koehne*],属于木瓜同科植物榠楂,是我国传统的中药材,具有祛风除湿、舒筋活络的功效[1]。据报道,光皮木瓜含有丰富的膳食纤维[2]和有机酸,特别是含有大量的酚类物质[3]和维生素C。多酚类包括单宁(原花青素)、黄酮类及各种酚酸等成分,是颇具有应用价值的抗氧化剂。抗氧化剂无论在体内还是体外对自由基均显示出不同程度的强清除作用,在对癌症、心血管的治疗中的功效已有报道。近年来天然的抗氧化剂特别是多酚类物质的研究比较多,如葡萄多酚、苹果多酚。国内外关于光皮木瓜中多酚类物质和抗氧化能力的报道很少[4]。

本研究将采用DPPH·(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)系统对光皮木瓜多酚(polyphenols from Chinese flowering quince, PCQ)粗提液的体外抗氧化能力进行评价,辐照法建立小鼠过氧化损伤模型,测定小鼠体内过氧化脂质含量和抗氧化酶活性,考察光皮木瓜多酚粗提液的体内抗氧化能力。

基金项目:重庆市医学重点学科建设项目(2005AC1023)
Supported by the Funds for the Key Medical Projects of Chongqing (2005AC1023)
作者简介:张 婷(1982-),女,重庆市荣昌县人,硕士研究生,助教,主要从事食品加工与营养方面的研究。电话:(023)68753585, E-mail: zhtin0128@yahoo.com
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2007-07-02;**修回日期**:2007-08-30

1　材料与方法

1.1　实验材料

光皮木瓜(Chinese flowering quince)购自重庆市綦江县打通镇木瓜基地。

1.2　实验动物

昆明种雄性小白鼠 60 只,8 ~ 10 周龄,体质量 18 ~ 20 g,由第三军医大学实验动物中心提供,置于标准动物房喂养,喂养基础颗粒饲料,自由进食和饮水。

1.3　主要试剂

DPPH·(二苯代苦味酰肼自由基, Sigma 公司);Folin-Ciocalteu 试剂(第三军医大学生物化学与分子生物学教研室试剂中心);Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4);MDA 试剂盒,SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所);D-半乳糖(北京博大泰克生物基因技术有限责任公司);其余试剂均为分析纯。

1.4　光皮木瓜多酚的提取

新鲜采集成熟光皮木瓜,洗净、去核、切成小块。称取两份相同质量(100 g)的木瓜分别加入两倍重量的水(200 ml)打浆,得匀浆,向其中一份匀浆加入 1% 纤维素酶,放入摇床中震摇酶解(45 ℃,30 min),将酶解和未酶解的匀浆冷冻离心,得上清液水提物(CS)和酶解上清液水提物(CES)和沉淀,将沉淀用一定浓度有机溶剂提取一定时间,过滤得醇提物(CR)和酶解醇提物(CER)。

1.5　体外 DPPH·清除实验

1.5.1　样品粗提液处理　　分别吸取样品溶液 CS、CES、CR、CER 0.1 ml 于 1 ml 离心管中,蒸馏水定容至 1 ml,移取此溶液 50、100、150、200、250 μl 于 1 ml 离心管中,蒸馏水定容至 1 ml,制成不同浓度待测液。

1.5.2　DPPH·的清除率和剩余率

具体方法详见文献[5]。

1.5.3　反应动力学研究　　DPPH·起始浓度为 0.12 mg/ml,测定加入待测液后不同时间点 DPPH·剩余量。考察随着时间推移,多酚与 DPPH·反应的动力学关系。

1.5.4　EC_{50} 和 APR　　将反应平衡时所对应的多酚浓度与 DPPH·剩余率做曲线,可得知 DPPH·降到初始浓度 50% 时所需抗氧化剂的最小量,此值为 EC_{50}。并以 $1/EC_{50}$ 表示清除自由基的能力 APR(Antiradical power)。

1.6　体内抗氧化效应研究

1.6.1　受试样品的制备　　将烘干的木瓜用 50% 乙醇提取、过滤得粗多酚提取物,真空旋转蒸发浓缩挥发掉乙醇并至尽量小容积,离心弃沉淀,得上清液。按照多酚含量(Folin-ciocalteu 法测定)稀释为 40、80、120、200 mg/kg 4 个剂量组。

1.6.2　辐照模型　　将 60 只小鼠分为 6 个组,每组 10 只,1 个空白对照组,1 个模型对照组和 4 个受试样品剂量组,4 个剂量组灌胃给予受试样品 0.1 ml·kg^{-1}·d^{-1},对照组给予同体积蒸馏水,30 d后,除空白对照组外,各组给予 5Gy $^{60}Co\gamma$ 射线一次性全身照射,照射后第 3 天,摘眼球取血,分离血清,处死后取脑、肝脏、心脏、肾脏,测定血清和组织中的 MDA 含量和 SOD 活性。

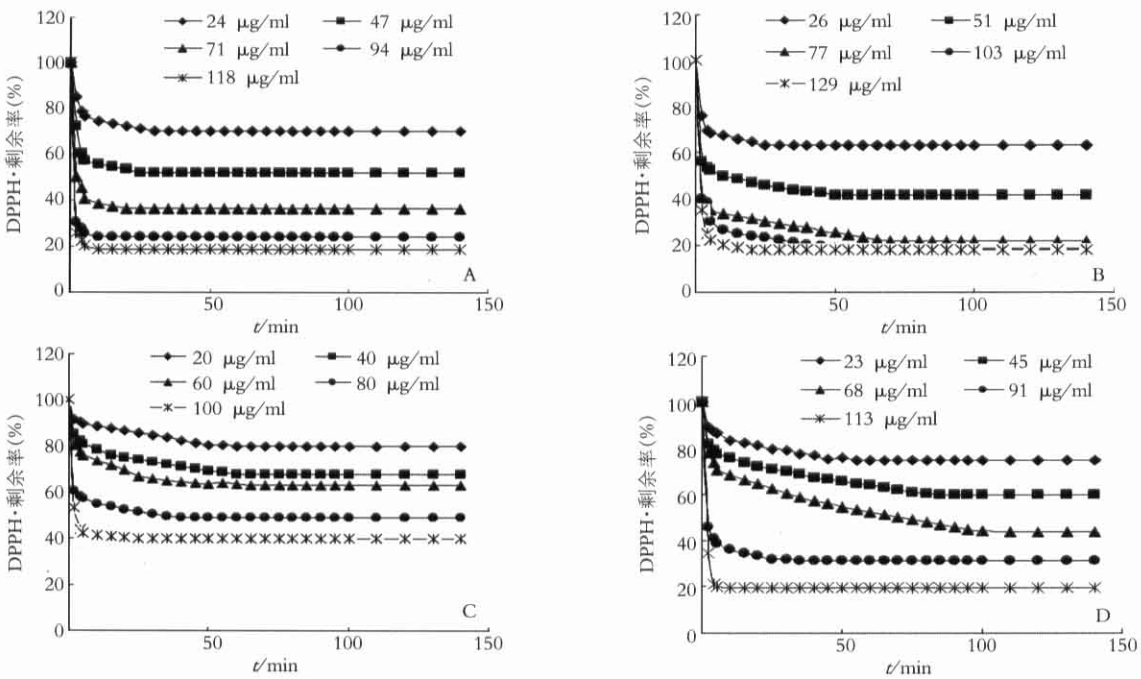
1.7　统计学处理

所有数据采用 SPSS 10.0 统计软件建立数据库,并对实验结果进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　PCQ 粗提物的抗 DPPH·效应

2.1.1　清除 DPPH 反应的动力学研究　　多酚粗提液与 DPPH·的反应均能较快达到平衡。其中水提物较醇提物能更快达到平衡,而酶解后的多酚粗提物达到反应平衡时间较未酶解的慢且各浓度组反应稳定性差异较大,见图 1。



A: 上清液水提物; B: 酶解上清液水提物; C: 醇提物; D: 酶解醇提物

图 1　不同的光皮木瓜多酚粗提液清除 DPPH·的反应动力学

2.1.2 清除 DPPH · 效应(抗氧化能力比较) 未经纤维素酶解处理的水提物的 EC_{50} 为 0.049 mg/ml,酶解后 EC_{50} 非常显著地减小($P<0.01$),为 0.040 mg/ml;未经纤维素酶解处理的醇提物的 EC_{50} 为 0.078 mg/ml,酶解后为 0.058 mg/ml,EC_{50} 非常显著地减小($P<0.01$)。酶解工艺的加入增强了木瓜提取物的 DPPH · 清除效应,特别是醇提物的 DPPH · 清除效应有非常显著的提高($P<0.01$);木瓜水提物的 DPPH · 清除效应强于醇提物。从 ARP 值大小可知,PCQ 各粗提物抗氧化性能依次为:CES(25) > CS(22.22) > CER(17.24) > CR(13.89)。

2.2 PCQ 体内抗氧化效应

2.2.1 PCQ 对小鼠体内 MDA 水平的影响 模型对照组中小鼠体内 MDA 含量均高于空白对照组,提示造模成功。各剂量组中小鼠血清和组织中的 MDA 含量显著低于模型对照组($P<0.05$),表明 PCQ 能够有效降低小鼠体内 MDA 含量,并呈现一定剂量效应关系(表 1)。

表 1 小鼠血清和组织中的 MDA 含量(nmol/mg, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清	脑匀浆	心匀浆	肝匀浆	肾匀浆
空白对照	2.516 ±0.139	13.242 ±1.04	15.654 ±1.864	5.143 ±0.571	2.438 ±0.331
模型对照	2.836 ±0.074	15.296 ±0.538	15.663 ±0.517	6.858 ±0.526	2.754 ±0.207
40 mg/kg	2.241 ±0.089^b	12.944 ±1.675	15.103 ±0.844	4.895 ±0.619^b	2.307 ±0.213
80 mg/kg	1.905 ±0.127^b	11.466 ±1.043^b	15.723 ±0.456	4.581 ±0.213^b	2.194 ±0.145^a
120 mg/kg	1.591 ±0.055^b	9.811 ±0.282^b	14.290 ±0.150^a	3.364 ±0.335^b	1.715 ±0.167^b
200 mg/kg	0.817 ±0.052^b	5.577 ±0.454^b	8.598 ±0.241^b	1.671 ±0.335^b	0.744 ±0.162^b

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与模型对照组比较

2.2.2 PCQ 对小鼠体内 SOD 活力的影响 模型对照组中小鼠体内 SOD 活性均低于空白对照组,提示造模成功。各剂量组中小鼠血清和组织中的 SOD 活性均高于模型对照组($P<0.05$),表明 PCQ 能够有效提高小鼠体内 SOD 活性,并呈现一定剂量效应关系(表 2)。

表 2 小鼠血清和组织中的 SOD 活性(nmol/mg, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清	脑匀浆	心匀浆	肝匀浆	肾匀浆
空白对照	60.769 ±5.493	47.729 ±3.983	39.666 ±3.112	41.840 ±1.983	51.644 ±1.285
模型对照	62.379 ±1.251	42.039 ±1.334	36.527 ±2.142	38.403 ±1.252	49.319 ±0.880
40 mg/kg	69.020 ±2.035^a	52.070 ±1.526^a	43.223 ±2.193	49.325 ±4.781	51.382 ±1.821^a
80 mg/kg	74.330 ±3.287^b	64.899 ±1.75^b	48.998 ±4.457	61.078 ±2.879^b	60.546 ±2.466
120 mg/kg	81.233 ±1.227^b	72.561 ±1.73^b	59.787 ±2.312^b	67.302 ±3.514^b	67.630 ±0.553^b
200 mg/kg	88.150 ±1.516^b	81.114 ±2.21^b	72.223 ±2.131^b	83.206 ±2.940^b	76.190 ±2.899^b

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与模型对照组比较

3 讨论

3.1 PCQ 清除 DPPH · 效应

EC_{50}的值与某种物质的抗氧化性能呈反比,它表示降低 DPPH · 自由基至初始浓度 50% 时所需的抗氧化剂浓度。$1/EC_{50}$表示抗自由基能力 ARP(Antiradical power)。EC_{50}值越小,ARP 越大,这种物质的抗氧化性能越强[5]。本研究表明,CS,CES,CR,CER 均有较强的清除 DPPH · 能力,而且反应能较快地达到平衡。水提物抗氧化速度大于醇提物,酶解后反应所需平衡时间较长。可能因为水提物中存在的 VC 与多酚协同作用是反应速度提高;而酶解后的产物丰富也令多酚与 DPPH · 的降解产物更加丰富,则使多酚的供氢能力更加持久。水提物及酶解后的水提物 ARP 值最大,是最强的抗氧化剂,其次是酶解后的醇提物和醇提物。水提物抗氧化性能较醇提物强,从反应动力学实验来看,反应速度也较快,反应能较快达到平衡。多酚的抗氧化效果同浓度,溶解性及其酚类物质组成有关。按照本工艺,水提物中的多酚浓度高于醇提物,而酶解后的木瓜提取物多酚浓度均非常显著的提高。因此,多酚浓度越高,EC_{50}越小,ARP 越大,DPPH · 清除效应越强。缩聚型单宁中,按聚合度大小,通常将 2 ~ 10 聚体成为寡聚体(procyanidolic oligomers),10 以上的成为相同高聚体(polymers oligomers),其中寡聚体有较强的生物活性,而聚合度不超过 10 的单体聚合物一般均为可溶性,随着聚合度的增加,溶解性相应降低。这说明在保持一定溶解度范围内,聚合度越大,其抗氧化能力也越强。如前所述,水提物中可能存在较醇提物中更多的寡聚单宁,而醇提物中则有较多高聚体,因此水提物具有较强 DPPH · 清除效应。

3.2 PCQ 的体内抗氧化效应

机体氧化反应产生脂质过氧化物(MDA 等),引起细胞损伤。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起这至关重要的作用,它能保护细胞免受自由基的伤害。MDA 的测定常常与 SOD 的测定相互配合,MDA 量常常可以反映机体内脂质过氧化的程度,间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度,而 SOD 活力的高低间接

反应了机体清除氧自由基的能力。通过MDA与SOD的结果分析可以了解PCQ的抗氧化能力。多酚广泛分布于许多普通的水果、蔬菜中，是人们每天从饮食中摄取的数量最多的抗氧化物质，经国内外大量的研究证实，其具有显著的清除自由基、抗氧化作用。金莹等[6]用苹果多酚剂量100、200、400、800 mg/kg喂养小鼠，发现除800 mg/kg组影响小鼠食欲，其他组均正常，苹果多酚提取物可以明显提高其血清和组织SOD活性和降低MDA含量，有较高生物抗氧化作用。本实验将PCQ提取物分为40、80、120、200 mg/kg 4个剂量组连续灌胃小鼠30 d，实验期间观察小鼠生理状况发现，最高200 mg/kg剂量组小鼠食欲有些不佳，毛色较差外，其余各组小鼠均与空白组和模型对照组相同。与模型对照组相比，各剂量组小鼠血清和组织中的MDA含量均降低，SOD活性提高，并呈现出一定剂量效应关系，说明了PCQ提取物具有较强的抗氧化能力，而其中发挥效应的物质主要为多酚类。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典：一部[S]. 广州：广东科技出版社，1995：46.
[2] Thomas M, Crepeau M J, Rumpunen K, *et al*. Dietary fibre and cell-wall polysaccharides in the fruits of Japanese quince (Chaenomeles japonica) [J]. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 2000, 33(2): 124-131.
[3] Ros J M, Laencina J, Hellin P, *et al*. Characterization of juice in fruits of different Chaenomeles species[J]. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 2007, 37(3): 301-307.
[4] Hamauzu Y, Yasui H, Inno T, *et al*. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (Pseudocydonia sinensis Schneid.), quince (Cydonia oblonga Mill.), and apple (Malus domestica Mill.) fruits[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(4): 928-934.
[5] 金 莹，孙爱东. 苹果多酚清除DPPH自由基活性的研究[J]. 中国酿造，2006，158(5)：48-51
[6] 金 莹，孙爱东. 苹果多酚对小鼠的抗氧化作用研究[J]. 中国食物与营养，2006，(1)：31-33.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2007)20-1957-01

个案与短篇

侵袭性非典型垂体腺瘤1例

赵红艳，叶明福，王亚丽，汤金梁，叶家伸，孔莹琴 （第三军医大学新桥医院病理科，重庆 400037）

患者，男性，35岁。垂体瘤术后14年，视物模糊3个月，左眼视力丧失1周。14年前，患者因视物成双影，视物模糊2个月就诊，外院诊断为垂体腺瘤，行开颅垂体肿瘤切除。术后1年，上述症状复发，再次行肿瘤切除术，两次术后病理检查均诊断为垂体腺瘤。3个月前患者再次出现视物成双影逐渐加重并于1周前出现左眼视力丧失。MRI提示垂体瘤术后改变，仍有肿瘤残余，侵及双侧额叶、蝶窦、筛窦。术中见肿瘤向额叶生长，向前达额极处，内侧越过中线向对侧生长。肿瘤包膜存在，边界清楚，表面颜色发黑，呈多结节状。鞍内肿瘤有陈旧性出血，肿瘤向后侵及垂体柄，可见包膜。

巨检：灰白灰褐色不规则组织1块，大小4 cm×2.5 cm×1 cm，切面灰褐色，质细嫩，另有灰红色囊壁样组织2块，面积4.1 cm×3 cm，囊壁厚0.1 cm，囊内面灰白色。镜检：肿瘤细胞片块状或弥散分布，片块状区域，瘤细胞密集，细胞体积较小，细胞质红，界限不清，核异型及分裂像可见，间质极少（图1）；部分区域瘤细胞弥散排列，细胞大，核大，不规则，深染，可见多核，核分裂像及核内坏死，间质内可见疏松纤维组织和毛细血管（图2）。免疫组化：肿瘤细胞CK(++)（图3），ACTH(+)（图4），PCNA>50%，Ki-67(-)，P53(-)。病理诊断：侵袭性非典型垂体腺瘤。

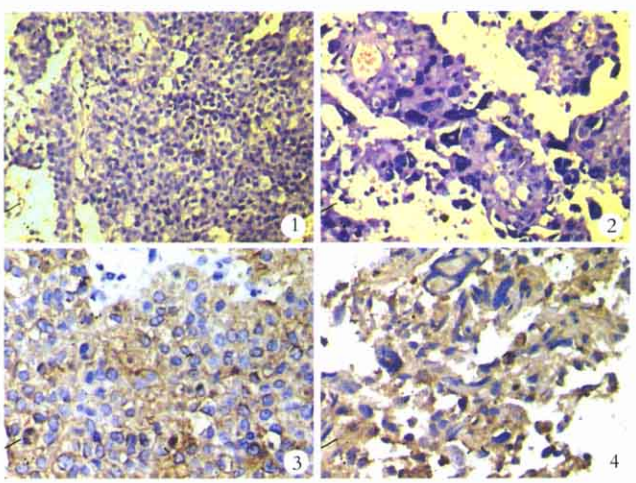


图1 片块状分布的肿瘤细胞 (HE×100)
图2 弥散排列的肿瘤细胞 (HE×400)
图3 肿瘤细胞CK(++) (S-P×200)
图4 肿瘤细胞ACTH(+) (S-P×400)

作者简介：赵红艳(1971-)，女，山西省五寨县人，硕士，主治医师，主要从事生殖系统肿瘤病理方面的研究，发表论文6篇。E-mail：zhaohongyan26@163.com

收稿日期：2007-01-23；修回日期：2007-04-05

（下转1960页）