

蓝莓花青素对糖尿病小鼠器官抗氧化能力的研究

Effects of blueberry anthocyanin on organ tissue antioxidant defense function in experimental diabetic mice

韦艳双 田密霞 张美娇 袁烽皓

WEI Yan-shuang TIAN Mi-xia ZHANG Mei-jiao YUAN Feng-hao

(大连民族大学, 辽宁 大连 116600)

(Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China)

摘要:为研究蓝莓花青素对糖尿病小鼠肝、肾、心脏组织的抗氧化能力的影响,以腹腔注射链脲佐菌素,成功制得糖尿病小鼠模型后进行分组。连续给药 4 周后,测定各组小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中的丙二醛含量,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活力,总抗氧化能力以及抑制羟基自由基能力。结果表明:在小鼠器官组织中,模型+剂量组与模型对照组相比,丙二醛含量显著降低($P < 0.05$),谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性、总抗氧化能力和抑制羟基自由基能力显著增加($P < 0.05$),表明蓝莓花青素能保护受损的器官,具有一定的抗氧化作用。

关键词:蓝莓;花青素;糖尿病小鼠;抗氧化能力

Abstract: To study the effects of blueberry anthocyanin on organ tissue antioxidant activity in experimental diabetic mice. The streptozotocin-induced diabetic mice were divided into different groups. Diabetic mice were administered for 4 weeks, Malondialdehyde content, the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidases, total antioxidant capacity, inhibiting ability of hydroxyl radicals on organ tissue were determined. The experimental data showed that model with blueberry anthocyanin group compared with model control, the content of Malondialdehyde were significantly reduced ($P < 0.05$) while glutathione peroxidase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity, inhibiting hydroxyl free radical ability increased markedly in the tissue of all organ ($P < 0.05$). It shows that Blueberry anthocyanin can enhance the cell tissue antioxidant activity.

Keywords: blueberry; anthocyanin; diabetic mice; antioxidant activity

基金项目:大连民族大学自主青年基金(编号:DC201501082);大连民族学院“大学生创新创业训练计划”项目(编号:X201503055)

作者简介:韦艳双,女,大连民族大学在读本科生。

通讯作者:田密霞(1979—),女,大连民族大学工程师,硕士。

E-mail: tmx@dlnu.edu.cn

收稿日期:2016-03-29

蓝莓(blueberry),又称越橘、蓝莓果,属杜鹃花科越橘属多年生落叶或常绿灌木,富含丰富的花青素^[1]。花青素又称花色素,是一种水溶性天然色素,属黄酮类化合物^[2]。研究表明,蓝莓果含有的花青素是所有水果与蔬菜中最高的,而且花青素清除体内自由基的能力比 V_C 和 V_E 强^[3];蓝莓具有极强的抗氧化能力^[4-6]和防御抵抗功能^[7-8],还有保护视力^[9]、延缓衰老^[8,10]、抗癌^[10]以及预防心脑血管^[11-12]等一系列疾病的功能。

近年来,中国糖尿病患者日益增多。人体胰岛 β 细胞分泌胰岛素平衡整个葡萄糖代谢体系,氧化应激可使胰岛 β 细胞受损,胰岛素分泌不足,是糖尿病慢性并发症的主要发病机理之一^[13-14]。研究^[15-16]证明,蓝莓花青素是一种有效的自由基清除剂,可以防治自由基引发的一系列疾病。孟宪军等^[17]通过采集糖尿病小鼠的血液测定蓝莓花青素的抗氧化能力,钟兰兰等^[8]测定了小鼠中肝脏组织的抗氧化指标,但对小鼠三大脏器组织生化指标测定的综合研究评价尚少。糖尿病可使小鼠的器官受到不同程度的损伤,因此本试验通过注射链脲佐菌素建立糖尿病小鼠模型,再喂食蓝莓花青素后测定小鼠器官组织中丙二醛含量、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性、总抗氧化能力及抑制羟基自由基能力来探讨蓝莓花青素的抗氧化防御功能,旨在为研发治疗糖尿病多种并发症药物提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

蓝莓:来自于吉林农业大学果园,新鲜,均匀;

IRC 健康小鼠:清洁型,大连医科大学实验室提供;

鼠粮:鼠粮成分有水分、小米、玉米、花生、绿豆、蔬菜、维生素、矿物质、钙、铁,所含成分不会导致小鼠患糖尿病,江苏省协同医药生物工程有限责任公司;

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)测试

盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)测定试剂盒、羟基自由基测定试剂盒;南京建成生物工程研究产品;

无水乙醇、盐酸、氢氧化钠;分析纯,济宁宏明化学试剂有限公司;

AB-8大孔树脂;上海开平树脂有限公司。

1.2 仪器与设备

精密电子天平:PL203型,上海梅特勒—托利多仪器有限公司;

酸度计:phs-3c型,上海诺科仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:WFZUV-2100型,上海尤尼柯仪器有限公司;

台式高速冷冻离心机:BR4i型,德国IKA公司;

旋转蒸发器:RE52-98型,上海亚荣生仪器厂;

冷冻干燥机:Scientz30F型,美国Millrockteck Technology公司;

水浴锅:HH-4型,巩义市英峪仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 AB-8大孔树脂预处理 称取一定量的AB-8大孔树脂置于干净的烧杯中,用无水乙醇浸泡24h,在铺有滤纸的漏斗中用去离子水冲洗,酸度计检测至中性为止;然后用5%的盐酸冲洗2h,去离子水洗至中性;再用5%氢氧化钠冲洗2h,去离子水洗至中性,一边冲洗一边搅拌,过滤备用^[19]。

1.3.2 蓝莓花青素的制备 取一定量的蓝莓果,破碎匀浆,用事先调成酸性的85%无水乙醇浸提,真空抽滤得到花青素初提液。旋转蒸发器(60℃)浓缩得到浓稠液,加入大孔树脂纯化后用65%的乙醇洗脱,再用旋转蒸发器(60℃)浓缩得到纯化液,冷冻干燥^[20]。

1.3.3 糖尿病小鼠制备与分组给药 清洁型ICR健康小鼠给药前称重,禁食12h(自由饮水),腹腔注射75mg/kg体重的1%链脲佐菌素溶液,每天1次,连续给药2d,注射后让小鼠自由进食,5d后称重。禁食不禁水5h,取小鼠尾巴的血测空腹血糖浓度,血糖大于10mmol/L的小鼠确定为糖尿病小鼠^[21]。

将造模成功的糖尿病小鼠随机分配为4组:模型对照组(DC)、模型+高剂量组(DC+H)、模型+中剂量组(DC+M)、模型+低剂量组(DC+L),每组10只。高、中、低剂量组分别以200,150,100mg/kg灌胃^[22-23],每天1次,连续灌胃28d。

1.3.4 正常对照组小鼠的给药 随机取正常小鼠20只,分为正常+空白组(NC)和正常+高剂量组(NC+H),每组10只。正常+空白组给予蒸馏水,正常+高剂量组用200mg/kg的蓝莓花青素灌胃,每天1次,连续28d。

1.3.5 指标的测定方法 连续灌胃花青素4周后,用夹子夹住小鼠的颈部,右手抓住小鼠的尾巴,用力猛地拉扯,使小鼠快速死亡,分别取出肝脏、肾脏、心脏组织。称取一定量的各个部位组织洗净,加适量的冷生理盐水匀浆,在2500r/min,4℃条件下离心取上清液,测定组织中的超氧化歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力,总抗氧化能力

(T-AOC)、抑制羟基自由基能力以及丙二醛(MDA)的含量。具体方法按照试剂盒要求进行。

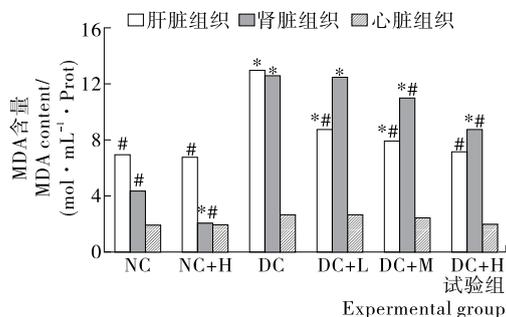
1.4 统计分析

试验数据用SPSS19.0版本进行统计学分析,不同试验组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,excel做图表对比分析。

2 结果与分析

2.1 花青素对各组小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中MDA含量的影响

人体代谢如果发生混乱,氧自由基会改变细胞的膜结构而发生脂质过氧化作用,产生MDA,所以MDA含量常作为机体氧化损伤最具代表性的指标之一。由图1可知,与正常组比较,在肝脏组织中,正常+高剂量组小鼠的MDA含量略有下降,而肾脏组织中MDA含量显著降低($P<0.05$),表明正常人食用蓝莓能降低肾脏组织中MDA含量,保护肾脏。模型对照组小鼠的肝、肾、心脏组织中MDA含量均高于正常组和模型+剂量组,表明链脲佐菌素成功导致小鼠患糖尿病,小鼠器官中MDA含量升高。给药后,高、中、低剂量组小鼠的肝脏和肾脏组织中MDA含量均低于模型对照组,模型+高剂量组MDA含量显著低于模型对照组($P<0.05$),并随着花青素剂量的增加,MDA含量逐渐减少,但在心脏组织中差异不明显。说明蓝莓花青素可以防止因MDA含量过多而导致的器官受损,使细胞膜得到修复和保护。



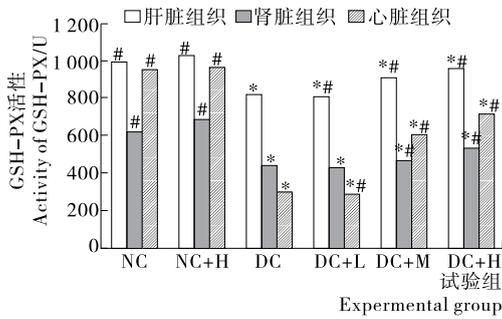
*. 与NC相比差异显著($P<0.05$) #. 与DC相比差异显著($P<0.05$)

图1 肝脏、肾脏、心脏组织内的MDA含量

Figure 1 Malondialdehyde content on liver, kidney and heart tissue

2.2 花青素对各组小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中GSH-PX活性的影响

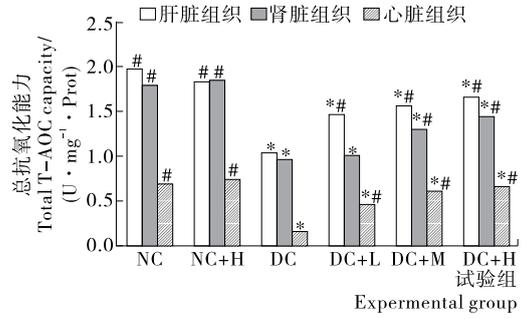
由图2可知,与正常组相比,正常+高剂量组小鼠的肝脏、肾脏、心脏组织中GSH-PX活性高于正常+空白组,但差异并不明显。GSH-PX是良好的抗氧化剂,正常组小鼠服用高剂量的蓝莓花青素后,机体器官内GSH-PX活性增加,表明蓝莓果具有抗氧化作用;模型对照组和模型+剂量组小鼠的肝、肾、心脏组织中的GSH-PX活性均显著低于正常组($P<0.05$),表明链脲佐菌素成功诱导小鼠患病;模型组小鼠组织中GSH-PX活性低于模型+剂量组,随着花青素含量增加,GSH-PX活性也升高($P<0.05$)。表明小鼠组织内过多的自由基被清除,受损的组织得到修复,蓝莓花青素起到抗



*表示与 NC 相比差异显著($P < 0.05$) #表示与 DC 相比差异显著($P < 0.05$)

图 2 肝脏、肾脏、心脏组织内的 GSH-PX 含量

Figure 2 Glutathione peroxidase activity on liver, kidney and heart tissue



*表示与 NC 相比差异显著($P < 0.05$) #表示与 DC 相比差异显著($P < 0.05$)

图 4 肝脏、肾脏、心脏组织内的总抗氧化能力

Figure 4 Total antioxidant capacity on liver, kidney and heart tissue

氧化保护作用。

2.3 花青素对各组小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中 SOD 活性的影响

由图 3 可知,在肝脏组织中,正常+高剂量组的 SOD 活性略低于正常+空白组,模型对照组低于正常组,高、中剂量组 SOD 活性略高于正常+高剂量组,但差异并不显著;在肾脏组织中,正常+高剂量组 SOD 活性低于正常+空白组 ($P < 0.05$)。模型对照组和模型+剂量组均低于正常组 ($P < 0.05$);相比于模型对照组和中、低剂量组,高剂量组 SOD 活性最强 ($P < 0.05$);心脏组织中,与肝脏、肾脏组织相反,正常+高剂量组 SOD 活性显著高于正常+空白组,正常组均高于模型对照组和模型+剂量组 ($P < 0.05$)。随着模型+剂量组给药量的增加,SOD 活性也升高 ($P < 0.05$)。SOD 与 GSH-PX 都是抗氧化酶,能清除体内各大重要器官的各种自由基,由数据分析,小鼠体内 SOD 活性都是随着蓝莓花青素剂量的增加而升高的,说明小鼠服用花青素后体内受损组织得到修复和保护。而正常的小鼠服用花青素后,肝脏和肾脏的 SOD 活性降低了,心脏组织的 SOD 活性却升高,说明服用过多的花青素可能会使肝脏和肾脏内 SOD 的活性受到抑制,心脏处于受保护的状态。

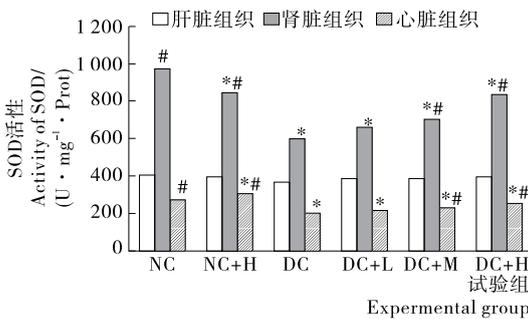
2.4 花青素对各组小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中总抗氧化能力(T-AOC)的影响

由图 4 可知,与正常组相比,在肝脏组织中,正常+高剂

量组的抗氧化能力略低于正常+空白组,肾脏、心脏组织相反,但都无显著差异。肝脏组织是机体的主要组成部分,它和肾脏都是重要的解毒器官,心脏也可促进血液的流动。小鼠患糖尿病后,机体清除自由基体系失衡,自由基不断增加,与细胞膜上的不饱和脂肪酸反应,发生脂质过氧化作用,降低细胞膜的流动性和通透性,导致细胞衰老死亡^[24],使机体的总抗氧化能力降低。数据显示,在这三大器官组织中,模型对照组和模型+剂量组抗氧化能力均低于正常组 ($P < 0.05$),表明小鼠患上糖尿病。模型+剂量组随着给药量的增加,各剂量组抗氧化能力逐渐增强 ($P < 0.05$),表明花青素清除了多余的自由基,脏器组织得到修复,机体总抗氧化能力提高。

2.5 花青素对各组小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中抑制羟基自由基能力的影响

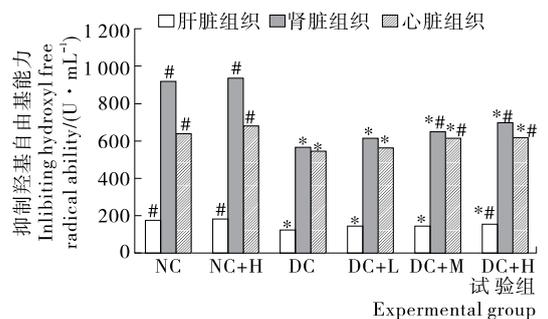
正常状态下机体能产生羟基自由基、超氧化物自由基、过氧化氢、单线态氧、过氧化脂质五类常见的自由基,但机体也有清除自由基体系。由图 5 可知,在肾脏和心脏组织中,正常+高剂量组略高于正常+空白组;肝脏组织中无显著变化,表明正常机体状态下食用蓝莓可以抑制羟基自由基,保护肾脏和心脏组织免受自由基的攻击,使器官处于健康状态。数据显示,在三大脏器组织中,模型对照组和模型+剂量组抑制羟基自由基能力均低于正常组 ($P < 0.05$),表明通过注射链脲佐菌素成功诱导小鼠患糖尿病后器官受损;随着



*表示与 NC 相比差异显著($P < 0.05$) #表示与 DC 相比差异显著($P < 0.05$)

图 3 肝脏、肾脏、心脏组织内的 SOD 含量

Figure 3 Superoxide mutase activity on liver, kidney and heart tissue



*表示与 NC 相比差异显著($P < 0.05$) #表示与 DC 相比差异显著($P < 0.05$)

图 5 肝脏、肾脏、心脏组织内的抑制羟基自由基能力

Figure 5 Inhibiting hydroxyl free radical ability on liver, kidney and heart tissue

蓝莓花青素剂量的增加,抑制羟基自由基的能力也增强($P < 0.05$),说明蓝莓花青素具有良好的抑制羟基自由基能力。

3 结论

近几年来,蓝莓被广泛地应用于保健食品和化妆品当中。蓝莓的抗氧化功能得到人们的认可。患有糖尿病的病患机体内的器官因过多自由基的攻击而受到不同程度的损伤,就会伴随各种并发症。虽然,肝脏、肾脏、心脏有解毒功能,但食用蓝莓果实效果可能会更好。试验结果也表明,花青素可以有效地清除小鼠肝脏、肾脏、心脏组织中自由基,抑制组织脂质过氧化,很好地保护 SOD、GSH-PX 活性,从而提高机体总的抗氧化能力。人体本身存在 SOD 和 GSH-PX 等抗氧化酶,如何提高酶的活性来保护器官组织还需要继续研究。组织病理学观察是检测脏器组织受损程度的有效方法,今后可进一步对蓝莓花青素治疗糖尿病小鼠的脏器组织病理学进行观察,证实蓝莓花青素对糖尿病小鼠脏器的保护和修复作用。

参考文献

[1] 李颖畅, 孟宪军, 修英涛, 等. 蓝莓果中花色苷的提取工艺研究[J]. 食品科技, 2007(11): 73-75.

[2] 兰欣, 汪东风, 徐莹, 等. 食品中酚类成分及其与其它充分相互作用研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 250-254.

[3] WOOD Jacqueline E, SENTHILMOHAN Senti T, PESKIN Alexander V. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pH [J]. Food Chemistry, 2002, 7(2): 155-161.

[4] 李斌, 雷月, 孟宪军, 等. 蓝莓营养保健功能及其活性成分提取技术研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 251-254.

[5] ANNA R, RENATO C N, DANIELA V, et al. Modification of glass transition temperature though carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices [J]. Food Eng., 2003, 56(2/3): 229-231.

[6] HOSSEINIAN F S, BEAT T. Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other manitoba berries [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2): 140-146.

[7] FRIA A, OLIVERIAJ, NEVESP, et al. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53(17): 6 896-6 902.

[8] 李颖畅, 宣景宏, 孟宪军. 蓝莓果中花色苷的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 178-180.

[9] 周剑忠, 单成俊, 刘晓莉, 等. 蓝莓复合饮料配方[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 236-238.

[10] 刘欢. “浆果之王”蓝莓的营养保健作用研究[J]. 中国新技术新产品, 2009(19): 228.

[11] 赵权, 王军. 山葡萄皮多酚物质的提取工艺[J]. 华北大学学报: 自然科学版, 2009, 10(1): 80-83.

[12] KONG J M, CHIA L S. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 923-933.

[13] STADLER K, JENEI V, VON Bolcszazy G, et al. Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus rats [J]. Orv Hetil, 2004, 145(21): 1 135-1 140.

[14] 俞璐, 罗敏. 氧化应激与血管并发症[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 2005, 26(6): 296-298.

[15] DU Qi-zhen, ZHENG Ju-feng, XU Yong-ji. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity [J]. Journal of Food composition and Analysis, 2008, 21(5): 390-395.

[16] PNTELIDISGE, VASILANKAKISMG, MANGANARIS A, et al. Antioxidant capacity phenol anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and comelian cherries [J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 777-783.

[17] 孟宪军, 宋德群, 史琳, 等. 蓝莓花色苷对环磷酰胺致大鼠心脏损伤保护作用[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(2): 187-189.

[18] 钟兰兰, 刘进辉, 杨亚, 等. 蔓越莓提取物对高脂大鼠抗氧化损伤的影响[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(1): 48-50.

[19] 田密霞, 李亚东, 胡文忠, 等. 60种蓝莓花青素的含量及抗氧化性的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(21): 1-5.

[20] 范明霞, 刘新桥, 陈莹, 等. 大孔树脂吸附纯化葡萄籽原花青素的研究[J]. 应用化工, 2009, 38(6): 864-867.

[21] 杨润军, 李青旺, 赵蕊. 四氧嘧啶与链脲佐菌素诱导小鼠糖尿病模型的效果比较[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 32(2): 17-19.

[22] 王金亭, 吴广庆, 杨敏一. 紫荆花红色素对模型动物血糖和血脂的影响研究[J]. 食品工业科技, 2013(13): 330-333.

[23] 梁军, 张志宁, 杨桂珍. 沙棘原花青素对糖尿病小鼠心肌保护作用机制的研究[J]. 长治医学院学报, 2012, 26(2): 91-93.

[24] 彭汉光, 戴春林, 魏屏, 等. 加味四逆散保护肝损伤的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 7(11): 25-26.

信息窗

哈佛研究:吃太多土豆易患高血压

土豆被不少人视作健康食品,是重要的维生素 C 和钾的来源。但美国哈佛大学医学院研究人员近日在《英国医学杂志》上发表文章说,对 18.7 万人长达 20 年的跟踪调查结果后发现,与平均每月吃土豆少于一次的人相比,每周吃四次或更多次烤土豆、煮土豆或土豆泥的人患高血压的几率高 11%。吃四次或以上炸薯条的人风险高 17%,但吃薯片对血压没有影响。

研究人员认为,这或许与土豆升糖指数高有关。食用土

豆后,其中含有的淀粉类碳水化合物会立即在体内转化为糖,让血糖迅速上升,时间一长就可能造成高血糖和高血压。不过,也有专家不赞成这一结果。英国心脏基金会资深营养学家维多利亚·泰勒说,哈佛大学医学院的研究只体现出土豆与高血压存在关联,却不能证明是因果关系。伦敦大学国王学院教授汤姆·桑德斯表示,当人们吃薯片,总喜欢放很多盐,这或许才是造成高血压的原因。

(来源:www.foodmate.net)