

五种抗氧化剂对丙烯酰胺引起小鼠氧化损伤和肾损伤的保护作用

袁梦莹,张璐璐,汪恩婷,李 新,梁春禄,袁 媛*

(吉林大学军需科技学院,吉林长春 130062)

摘要:丙烯酰胺(AA)是一种对人体具有潜在致癌性的物质,可导致细胞遗传物质DNA的损伤。主要研究了五种抗氧化剂(葛根素、木犀草素、染料木素、槲皮素、柚皮素)对AA引起小鼠氧化损伤和肾损伤的保护作用。56只雄性BALB/c小鼠随机分为7组:对照组,AA染毒组,五个抗氧化剂保护组,通过测定血清中还原性谷胱甘肽(GSH)、尿素氮(BUN)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,研究五种抗氧化剂的保护作用。结果表明,与AA染毒组小鼠相比,抗氧化剂保护组小鼠能明显升高小鼠血清中GSH、SOD的含量,降低BUN和MDA的含量。五种抗氧化剂都能不同程度地降低AA引起小鼠氧化损伤和肾损伤,其中染料木素的保护作用最为明显。

关键词:抗氧化剂,丙烯酰胺,氧化损伤,肾损伤

Protective effect of five antioxidants against acrylamide-induced oxidative injury and kidney injury

YUAN Meng-ying, ZHANG Lu-lu, WANG En-ting, LI Xin, LIANG Chun-lu, YUAN Yuan*

(College of Quartermaster Technology, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Acrylamide(AA) is a toxic compound that could lead the damage of DNA in cells. In present paper, it was mainly discussed the protective effect of five antioxidants (puerarin, luteolin, genistein, quercetin, and naringenin) on AA-induced oxidative injury and kidney damage. Fifty-six male Balb/c mice were randomly divided into seven groups, Control group, AA group, five antioxidant groups. The oxidative injury and kidney injury were evaluated by the indexes of serum, including glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and serum urea nitrogen (BUN). The results showed that compared with AA group, antioxidants groups could increase the content of GSH and SOD activity and decrease the levels of MDA and BUN in the serum of the mice significantly. Genistein had significant protective effects on AA-induced oxidative injury and kidney injury was most obviously.

Key words: antioxidant; acrylamide; oxidative injury; kidney injury

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0358-04

2002年4月,瑞典国家食品管理局和瑞典斯德哥尔摩大学研究证明,一些普通食品,尤其是碳水化合物食品,在经过煎炸烤等高温加工处理时会产生含量不等的丙烯酰胺(Acrylamide, AA),而且随着加工温度的升高,其含量也越高。AA是一种常见的有机合成原料,在工业上具有很广泛的应用。但是经研究发现,AA具有肝脏和神经毒性,还对动物有生殖毒性,可导致细胞DNA的损伤,并对啮齿动物具有致癌性^[1],因此,国际癌症机构(International Agency

Research on Cancer, IARC)^[2]将AA列为2A类,即“人类可能的致癌物”。正是由于AA的潜在的致癌作用,世界各国科学家和研究机构对控制其含量进行了大量的研究工作,以往对丙烯酰胺毒性的防护研究主要集中在其形成抑制方面,尤其是在热加工过程中如何采取各种措施以降低食品中丙烯酰胺的含量,并在利用天然产物作为其抑制剂领域取得了显著的成果^[3-5]。近年来,已有不少研究者开始关注构建丙烯酰胺防护的第二道防线,即利用天然产物抑制丙酰胺在体内的毒性。我们的前期研究中发现,以大蒜素为代表的生物抗氧化剂对AA所致氧化损伤具有非常好的保护作用^[6],那么自然界中存在的大量生物抗氧化剂对AA所致损伤是否具有保护作用呢?本实验主要研究了葛根素、木犀草素、染料木素、槲皮素、柚皮素这几种抗氧化剂对丙烯酰胺引起小鼠氧化损伤及肾损伤的保护作用,以期为AA体内毒性防护提供可靠的理论依据。

收稿日期: 2012-10-25 * 通讯联系人

作者简介: 袁梦莹(1991-),女,大学本科,研究方向:食品加工有害产物形成及控制。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000750);国家“973”计划项目(2012CB720805);中国博士后特别资助(201104527);吉林大学杰出人才基金(4305050102Q9)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

健康雄性Balb/c小鼠 6~7周龄,体重25~30g,吉林大学动物中心提供;AA(CAS:79-06-1,纯度>99.8%)、葛根素(CAS:3681-99-0,纯度>99.9%)、木犀草素(CAS:491-70-3,纯度>97.0%)、染料木素(CAS:446-72-0,纯度>97.0%)、槲皮素(CAS:6151-25-3,纯度>98.0%)、柚皮素(CAS:67604-48-2,纯度>98.0%) 均购于Sigma公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyd, MDA)、还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒 均购于南京建成生物工程研究所。

恒温水浴箱 上海博讯有限责任公司;LD5-2A型离心机 北京医用离心机厂;721型分光光度计 上海光谱仪器有限公司;漩涡混匀器 北京北德科学器材有限公司。

1.2 动物分组

56只健康雄性Balb/c小鼠,随机分为7组,每组8只,分笼饲养,自由采食、饮水^[7]。动物分组情况如下:

对照组:生理盐水连续灌胃14d。

葛根素保护组:葛根素以20mg/kg·d的剂量连续灌胃14d,第8d开始以50mg/kg·d的剂量腹腔注射AA,连续7d。

木犀草素保护组:木犀草素以20mg/kg·d的剂量连续灌胃14d,第8d开始以50mg/kg·d的剂量腹腔注射AA,连续7d。

染料木素保护组:染料木素以20mg/kg·d的剂量连续灌胃14d,第8d开始以50mg/kg·d的剂量腹腔注射AA,连续7d。

槲皮素保护组:槲皮素以20mg/kg·d的剂量连续灌胃14d,第8d开始以50mg/kg·d的剂量腹腔注射AA,连续7d。

柚皮素保护组:柚皮素以20mg/kg·d的剂量连续灌胃14d,第8d开始以50mg/kg·d的剂量腹腔注射AA,连续7d。

AA组:前7d用75%生理盐水灌胃,第8d开始按50mg/kg·d的剂量腹腔注射AA连续7d。

最后一次给药24h后处死动物,进行各相关指标的测定。

1.3 动物的一般情况观察

实验期间观察动物的行为活动、饮食及体重变化等情况,记录实验第1、8d(注射AA前)和15d(处死前)时小鼠的体重。

1.4 小鼠血浆制备及各指标检测

用摘眼球法取小鼠外周血,次日离心,然后吸取上层血清部分。

严格按照试剂盒说明测定小鼠血清中还原性谷胱甘肽(GSH)、尿素氮(BUN)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。

1.5 数据分析

用SPSS软件分析差异显著性,实验结果以均数±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠一般情况

实验期间,对照组小鼠被毛有光泽,体态活泼,反应敏捷,整个实验阶段小鼠体重逐渐增加。与对照组相比,AA组小鼠在AA染毒期间精神萎靡,食欲稍下降、被毛凌乱无光泽,体重增长缓慢,增加量减少,但小鼠的体重与对照组小鼠无显著性差异($p>0.05$),可能是AA染毒时间的蓄积不足以引起体重的明显减轻。给予抗氧化剂葛根素组、木犀草素组、染料木素组、槲皮素组、柚皮素组保护的小鼠症状较轻,14d后小鼠的体重增加量略大于AA组小鼠,但低于对照组小鼠,但无显著性差异($p>0.05$)。各组在实验过程中均无死亡现象发生(见表1)。

2.2 小鼠血浆中SOD、GSH、MDA、BUN含量的测定结果

以50mg/kg·d的AA的剂量连续染毒7d后,小鼠血浆中SOD、GSH含量明显下降,而MDA、BUN含量明显上升,与对照组相比具有显著性($p<0.05$)。而有抗氧化剂保护的各组小鼠与AA小鼠相比血浆中的SOD、GSH含量明显上升,MDA、BUN含量明显下降($p<0.05$),而且已基本恢复到对照组水平,其中染料木素的保护作用最好(见表2)。

3 讨论

肾脏是机体中主要的代谢器官,在应激负荷状态下因氧自由基大量产生和蓄积而发生脂质过氧化,进而影响细胞膜功能,导致肾脏器质性及功能性病变^[8]。抗氧化剂可以通过清除体内自由基来缓解自由基对机体所带来的损伤。因此我们选用了这五种

表1 实验期间小鼠体重变化

Table 1 Effects of antioxidants on body weight changes of AA-treated mice

组别	动物数(只)	小鼠体重(g)			小鼠体重增加量(g)		
		1d	8d	15d	前7d	后7d	14d
对照组	8	28.13±0.47	30.83±0.72	33.5±0.46	2.7±0.26	2.66±0.31	5.37±0.05
AA组	8	28.26±0.87	30.96±0.79	32.83±0.99	2.63±0.11	1.93±0.21	4.57±0.21
葛根素组	8	28.33±1.5	30.80±1.48	33.36±1.15	2.46±0.25	2.56±0.5	5.03±0.37
木犀草素组	8	28.1±0.36	30.6±0.3	33.03±0.15	2.5±0.4	2.43±0.37	4.93±0.25
槲皮素组	8	28.7±0.37	31.26±0.71	33.5±0.56	2.53±0.35	2.23±0.15	4.76±0.21
染料木素组	8	28.0±1.41	30.8±1.01	33.36±1.1	2.8±0.4	2.56±0.47	5.37±0.55
柚皮素组	8	28.36±1.33	30.6±1.4	33.16±1.10	2.26±0.25	2.53±0.32	4.8±0.4

表2 小鼠血浆中SOD、GSH、MDA、BUN含量的测定结果

Table 2 Effects of antioxidants on activity of SOD, levels of GSH, MDA, and BUN in serum of AA-treated mice

组别	SOD (U/mL)	GSH ($\mu\text{mol/L}$)	MDA (nmol/L)	BUN (mmol/L)
对照组	144.57 $\pm$ 13.35*	3.34 $\pm$ 0.24*	1.28 $\pm$ 0.08*	2.34 $\pm$ 0.13*
AA组	42.12 $\pm$ 7.49#	1.44 $\pm$ 0.24#	2.43 $\pm$ 0.29#	3.45 $\pm$ 0.16#
葛根素组	85.87 $\pm$ 7.66**	2.36 $\pm$ 0.18**	1.74 $\pm$ 0.15*	2.64 $\pm$ 0.23*
木犀草素组	133.52 $\pm$ 21.35*	2.84 $\pm$ 0.23*	1.38 $\pm$ 0.07*	2.59 $\pm$ 0.18*
槲皮素组	124.15 $\pm$ 11.49*	3.09 $\pm$ 0.16*	1.41 $\pm$ 0.24*	2.62 $\pm$ 0.01*
染料木素组	141.16 $\pm$ 5.36*	3.16 $\pm$ 0.25	1.30 $\pm$ 0.15*	2.42 $\pm$ 0.15*
柚皮素组	120.62 $\pm$ 15.94*	3.13 $\pm$ 0.08	1.45 $\pm$ 0.07*	2.74 $\pm$ 0.15*

注: *表示与AA组比有显著性差异 ($p < 0.05$); #表示与对照组比有显著性差异 ($p < 0.05$)。

抗氧化剂作为研究对象, 来确定其是否能够提高机体的内源性抗氧化能力来减缓或预防应激性氧化损伤和肾损伤的发生, 以期为后续研究提供理论基础。

AA可刺激机体细胞产生自由基, 并减弱自由基清除剂的活性, 造成氧化压力, 从而使机体内的自由基升高, 引起小鼠脂质过氧化, 使细胞功能受到损害^[9]。还原性谷胱甘肽 (GSH) 的含量则反映机体对抗氧化压力能力的大小^[10]。一些抗氧化剂如茶多酚和大蒜素能增加谷胱甘肽转移酶的活性提高细胞中的含量^[11]。本研究中, AA染毒组小鼠与对照组相比血浆中GSH的含量明显降低 ($p < 0.05$), 而添加了抗氧化剂的保护组小鼠与AA染毒组小鼠相比血浆中GSH含量明显增加 ($p < 0.05$)。木犀草素组、染料木素组、槲皮素组、柚皮素组小鼠GSH的含量基本恢复到对照组水平 ($p > 0.05$) (见表2)。

MDA是目前反映机体氧化损伤最具代表性的指标之一, 其含量间接反映了细胞受自由基攻击的脂质过氧化程度^[12]。MDA含量的升高意味着机体受自由基攻击的严重性增加。MDA含量的测试常常与SOD活性的测试相互配合, SOD活性对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用, 能够清除超氧阴离子自由基, SOD酶活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力, 其活性变化与体内自由基的变化呈负相关^[13-14]。本研究中发现, AA染毒组小鼠与对照组小鼠相比血浆中的MDA含量升高 ($p < 0.05$), SOD活力显著下降 ($p < 0.05$), 而添加抗氧化剂保护组的小鼠与AA组小鼠相比MDA含量下降 ($p < 0.05$), SOD活力显著上升 ($p < 0.05$) (见表2)。这与马红莲等^[15]的研究结果一致。本实验结果表明, AA能够使小鼠体内GSH、SOD的含量下降, 升高MDA的含量。在AA染毒前及染毒过程中, 给予一定量的抗氧化剂, 可使小鼠体内MDA含量下降, SOD活性升高, 显著减轻AA对小鼠氧化损伤作用 (见表2)。血清尿素氮 (BUN) 为蛋白质分解代谢的产物, 90%以上通过肾脏排泄, 其余的则由肠道和皮肤排出, 当肾脏发生各种病变时, 正常的排泄功能遭到破坏时, 即引起血液尿素氮浓度升高, 血液中尿素氮的含量是肾功能变化的一项重要指标^[16]。本研究中发现, 与对照组相比AA小鼠尿素氮含量明显升高 ($p < 0.05$), 而添加抗氧化剂保护组的小鼠与AA组的小鼠相比, 尿素氮的含量明显下降 ($p < 0.05$), 且基本已恢复到对照组水平 ($p > 0.05$)

(见表2)。综合以上实验结果说明, AA能够引起小鼠氧化损伤和肾损伤, 而抗氧化剂能够降低AA引起的小鼠氧化损伤和肾损伤, 其作用机制为抗氧化剂可以通过消除自由基缓解丙烯酰胺诱发的氧化损伤和肾组织过氧化状态。

4 结论

在本研究中发现, AA可引起小鼠氧化损伤和肾损伤, 而抗氧化剂葛根素、木犀草素、染料木素、槲皮素、柚皮素均能够降低AA所引起的小鼠氧化损伤和肾损伤。其中抗氧化剂染料木素的保护作用最好。由于AA在食品中广泛存在这提示我们可以通过摄入抗氧化剂来抑制膳食AA在体内的毒性, 构建人类丙毒防护的第二道屏障。

参考文献

- [1] 韩嘉媛, 张淳文. 丙烯酰胺的毒性研究[J]. 卫生研究, 2006, 35(4): 513-515.
- [2] IARC (International Agency Research on Cancer) Some introductrial chemicals Acrylamide[R]. IARC monographs on the evaluation of Carcinogen Risks to Humans, 1994, 60: 389-433.
- [3] 袁媛, 刘野, 陈芳, 等. 葡萄糖/天冬酰胺模拟体系中丙烯酰胺的产生及其机理研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 1-5.
- [4] Yuan Y, Chen F, Zhao G H, *et al.* A comparative study of acrylamide formation induced by microwave and conventional heating methods[J]. J Food Sci, 2007, 72(4): C212-C216.
- [5] Zhang Y, Chen J, Zhang X L, *et al.* Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and french fries[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 523-528.
- [6] Zhang L L, Zhang H J, Miao Y T, *et al.* Protective effect of allicin against acrylamide-induced hepatocyte damage *in vitro* and *in vivo*[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50, 3306-3312.
- [7] Li W G, Zhang X Y, Wu Y J, *et al.* Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22: 1117-1120.
- [8] Chipman J K, Davies J E, Parsons J L, *et al.* DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation?[J]. Toxicology, 1998, 126(2): 93-102.
- [9] Luczaj W, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid proxidation products[J]. Cell Mol Biol Lett, 2003(8): 391-413.

(下转第372页)

- biotechnological applications of porcine pancreatic lipase [J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic,2012,78(6):119-134.
- [13] Ozcan HM, Sagioglu A. Production of ricinoleic acid from castor oil by immobilised lipases[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2009,39(2):170-182.
- [14] 刘海洲,刘均洪,张媛媛,等. 微生物脂肪酶的最新应用研究进展[J]. 食品研究与开发,2009,30(1):141-143.
- [15] Kulkarni SR, Pandit AB. Enzymatic hydrolysis of castor oil: an approach for rate enhancement and enzyme economy[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2005,4(2):241-245.
- [16] Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, *et al.* Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998,20(5):304-307.
- [17] Kulkarni N, Gadre RV. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002,28(6):344-348.
- [18] Braga A, Gomes N, Belo I. Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil hydrolysis and its effect on γ -Decalactone production[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012,89(6):1041-1047.
- [19] Foglia TA, Jones KC, Sonnet PE. Selectivity of lipases: isolation of fatty acids from castor, coriander, and meadowfoam oils[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2000,102(10):612-617.
- [20] Goswami D, Basu JK, De S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2012, (doi:10.3109/07388551.2012.672319).
- [21] Rathod VK, Pandit AB. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009,47(1):93-99.
- [22] Goswami D, Basu JK, De S. Optimization of process variables in castor oil hydrolysis by *Candida rugosa* lipase with buffer as dispersion medium[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009,14(2):220-224.
- [23] Bódalo A, Bastida J, Máximo MF, *et al.* Influence of the operating conditions on lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid estolides in solvent-free systems[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009,44(2/3):214-219.
- [24] Horchani H, Bouaziz A, Gargouri Y, *et al.* Immobilized *Staphylococcus xylosus* lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid esters[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2012,75(3):35-42.
- [25] Kulkarni SR. Studies in Enzyme Modification[D]. Mumbai, India: Mumbai University, 2001.
- [26] Chamorro S, Sanchez-Montero JM, Alcantara AR, *et al.* Treatment of *Candida rugosa* lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities [J]. Biotechnology Letters, 1998,20(5):499-505.
- [27] Yang D, Rhee JS. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992,40(6):748-752.
- [28] Khor HT, Tan NH, Chua CL. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1986,63(4):538-540.
- [29] Yamamoto K, Fujiwara N. Purification and Some Properties of a Castor-oil-hydrolyzing Lipase from *Pseudomonas* sp. (Biological Chemistry)[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988,52(12):3015-3021.
- [30] Goswami D, Sen R, Basu JK, *et al.* Surfactant enhanced ricinoleic acid production using *Candida rugosa* lipase [J]. Bioresource Technology, 2010,101(1):6-13.
- [31] Wang YJ, Sheu JY, Wang FF, *et al.* Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004,31(6):628-633.
- [32] Liu Y, Chen DW, Yan YJ, *et al.* Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents[J]. Bioresource Technology, 2011,102(22):10414-10418.
- [33] Pan ST, Liu X, Xie YD, *et al.* Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media[J]. Bioresource Technology, 2010,101(24):9822-9824.
- [34] Liu Y, Chen DW, Xu L, *et al.* Evaluation of structure and hydrolysis activity of *Candida rugosa* Lip7 in presence of sub-/super-critical CO₂[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, (51):354-358.
- [35] Goswami D, Sen R, Basu JK, *et al.* Maximization of bioconversion of castor oil into ricinoleic acid by response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2009,100(18):4067-4073.

(上接第360页)

- [10] 李栋, 金成, 汤谷平, 等. 丙烯酰胺代谢机理及其体内毒性防护的研究进展[J]. 中国食品学报, 2011,11(4):139-146.
- [11] Xie Q Y, Liu Y, Sun H F, *et al.* Inhibition of acrylamide toxicity in mice by three dietary constituents[J]. J Agric Food Chem, 2008,56:6054-6060.
- [12] 于晓彦, 魏欣冰, 陈琳, 等. TNHH对大鼠全脑缺血再灌注损伤的抗氧化性保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2009,30(1):36-38
- [13] 刘胜学, 曹佳, 杨梦, 等. 丙烯酰胺诱导人白血病HL-60和

- NB4细胞hprt基因的分子突变谱[J]. 中国药理学与毒理杂志, 2001,15(4):276-281.
- [14] Besaratinia A, Pfeifer G P. Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells[J]. J Nat Cancer Inst, 2003,95(12):889-896.
- [15] 马红莲. 丙烯酰胺致小鼠细胞DNA损伤及抗氧化剂的保护作用研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2008.
- [16] 唐莹. 小鼠三聚氰胺急性与蓄积性毒性实验研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.