

荞麦粉对高脂膳食大鼠体内抗氧化活性的影响

王丹^{1,2}, 沈楠³, 于天龙¹, 葛洪娟^{1,2}, 宋春梅^{1,2,*}

(1. 吉林医药学院公共卫生学院, 吉林吉林 132013;

2. 吉林省中医药管理局二级实验室, 吉林吉林 132013;

3. 吉林医药学院实验中心机能实验室, 吉林吉林 132013)

摘要:研究了荞麦粉(buckwheat, BW)对高脂膳食大鼠体内抗氧化活性的影响。将50只成年Wistar雄性大鼠随机分为基础对照组、高脂模型对照组、荞麦粉低、中、高剂量组(1、5、10g/kg·d), 喂养30d后, 测定血清中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性及丙二醛(MDA)的含量和肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)的含量; 并观察主动脉结构。结果显示, 荞麦粉中、高剂量组与模型对照组相比, 荞麦粉可使高脂膳食大鼠血清SOD、GSH-PX的活性增强($p < 0.05$)及MDA的含量显著减少($p < 0.05$); 可使肝脏中SOD活性显著增强($p < 0.05$), 但MDA的含量显著减少($p < 0.05$); 主动脉光镜结构显示荞麦粉对高脂膳食大鼠肝脏具有保护作用。说明荞麦粉具有调节高脂膳食大鼠抗氧化的能力。

关键词:荞麦粉, 高脂膳食, 抗氧化活性, 光镜结构

Effect of buckwheat on high-fat diet rat lipid metabolism

WANG Dan^{1,2}, SHEN Nan³, YU Tian-long¹, GE Hong-juan^{1,2}, SONG Chun-mei^{1,2,*}

(1. Department of Public and Health, Jilin Medical College, Jilin 132013, China;

2. Lever Two Laboratory of Administration of Traditional Chinese Medicine of Jilin Province, Jilin 132013, China;

3. Department of Functional Experimental Science in Experimental Center, Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

Abstract: The aim of this study was to point out the effect of buckwheat on antioxidant activity of hyperlipidemia rats. Fifty male Wistar hamsters were assigned randomly to the following groups: control diet, high-fat diet (HFD) and low, medium, high dosage BW (1, 5, 10g/kg·d) groups. The SOD, GSH-PX and MDA in serum and SOD, MDA in livers were detected after 30 days. The results showed that compared with model group, the levels of SOD, GSH-PX were increased ($p < 0.05$), MDA was decreased ($p < 0.05$) in serum, the buckwheat group SOD was increased ($p < 0.05$), MDA was decreased ($p < 0.05$) in liver of buckwheat group. Buckwheat may improve the antioxidant activity of high-fat diet-induced rats.

Key words: buckwheat (BW); high-fat diet (HFD); antioxidant activity; light microscope structure

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)14-0370-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.14.068

高脂膳食结构能够刺激机体代谢速率加快^[1], 刺激体内活性氧基团(reactiveoxygenspecies, ROS)和活性氮基团(reactivenitrogenspecies, RNS)等高活性分子过度生成, 不能被及时清除而堆积在细胞内, 这样造成机体氧化系统与抗氧化系统失衡, 发生机体氧化应激^[2]。同时过量的ROS会攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 造成脂质过氧化, 并形成脂质过氧化产物, 堆积在细胞内使得细胞正常的生物活性下降, 能量代谢、细胞信号转导等其他功能紊乱; 而且自由基

和过氧化物对血管壁细胞又具有毒性作用, 这样增加了多种慢性疾病发生的危险性。有研究报道, 小鼠经过短期(3周或6周)的高脂膳食可导致机体氧化应激反应, 经过长期(26周后)的高脂膳食会导致机体严重氧化应激和脂质过氧化。从分子生物角度来讲, 高脂膳食激活了GSK-3 β 和Nrf2信号通路, 破坏了机体氧化还原状态的平衡, 同时影响了肝脏脂质代谢过程中关键基因的表达^[3]。

随着人们生活水平的提高, 抗氧化问题越来越

收稿日期: 2014-10-20

作者简介: 王丹(1988-), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 植物蛋白工程。

* 通讯作者: 宋春梅(1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 营养与慢性病。

基金项目: 吉林省科技发展计划基金(201105089)。

受人们的关注。关于探究功能因子抗氧化的机制及如何将其应用在食品和药品中已经成为研究领域中的热点问题。荞麦是一种重要的杂粮作物,富含蛋白质、不饱和脂肪酸、维生素、微量元素等营养成分。有研究表明,荞麦中的提取物具有抗氧化性及对羟基自由基的清除作用^[4]。但是关于荞麦在高脂饮食过程中体内抗氧化活性的研究报道很少。本研究以荞麦粉作为研究对象,通过对大鼠体内血清及肝脏组织的GSH-PX活力、SOD活力及MDA的含量测定,探讨其抗氧化活性,这将为荞麦食品及保健品的开发提供可靠的理论依据,为利用荞麦营养食疗高脂膳食所引发的慢性疾病提供可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荞麦粉 吉林市市售,采用凯氏定氮法测定其粗蛋白含量为9.2%,采用索式抽提法测定其脂肪含量为2.01%,按照国标GB/T 5009.88-2008测定其膳食纤维含量为1.04%,按照国标GB 5009.9-85测定其淀粉含量为62.34%,红外水分测定仪测定其水分含量为10.16%;胆固醇 长春鼎国生物技术有限公司;乌拉坦 上海谱振生物科技有限公司;鸡蛋黄粉 吉林金翼蛋品有限公司;猪油 吉林市大商超市;氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒 南京建成生物工程研究所;健康成年Wistar雄性大鼠 50只,体重(200±20)g,由吉林大学动物实验中心提供,许可证号码为SCXK(吉)-2011-0004。

TD-5A离心机 湖南凯达科学仪器有限公司; 202-1AB电热恒温干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司;FA1104N电子天平 上海精密科学仪器有限公司;722可见分光光度计 上海欣茂仪器有限公司;TAS-960原子吸收分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;Selectra XL全自动血生化分析仪 荷兰威图;Hitachi-7650透射电镜 日本日立公司;UC7超薄切片机 德国徕卡。

1.2 实验方法

1.2.1 高脂模型实验动物分组及给药方式 将50只大鼠,随机分为5组,每组10只,分别为基础对照组、模型对照组、荞麦低、中、高剂量组,每天定时喂食(每200g体重对应25g饲料),饮水自由。基础对照组喂食基础饲料,高脂模型对照组喂食高脂饲料,荞麦剂量组按照1、5、10g/(kg·d)的低、中、高剂量饲喂相应的荞麦,每周测一次体重,连续饲喂30d。各模型组饲料配方如下:

基础对照组饲料配方:玉米粉17.5kg、大豆粉15.0kg、面粉12.5kg、麸皮5.0kg、葵花子油1.0kg,另外加多种维生素和无机盐。

高脂饲料配方:基础饲料79%、蛋黄粉10%、猪油10%、胆固醇1%。

荞麦低剂量组:荞麦粉0.8%、基础饲料78.2%、蛋黄粉10%、猪油10%、胆固醇1%。

荞麦中剂量组:荞麦粉4%、基础饲料75%、蛋黄粉10%、猪油10%、胆固醇1%。

荞麦高剂量组:荞麦粉8%、基础饲料71%、蛋黄粉10%、猪油10%、胆固醇1%。

为防止油脂被空气氧化,每周做一次饲料。

1.2.2 血清中生化指标测定 高脂膳食大鼠模型末次喂养后禁食12h,不禁水,以10%乌拉坦6mL/kg腹腔注射对大鼠进行麻醉,腹主动脉取血,采用试剂盒测定血清中SOD、GSH-PX的活性,以及MDA的含量。

1.2.3 肝脏中生化指标测定 10%组织匀浆液制备:称取肝组织块1g,放到冰冷生理盐水中漂洗,除去血液,取出肝脏,滤纸吸干称重。加入冷生理盐水9g,眼科小剪剪碎,电动玻璃匀浆机匀浆10min,3000r/min离心10min。取上清液,分装于EP管中,-4℃保存。采用试剂盒测定测定肝脏组织中SOD活性和MDA的含量。

1.2.4 主动脉光镜结构测定 固定:各组随机取大鼠3只,将大鼠麻醉,固定在解剖台上,待取血后取出主动脉,用冰生理盐水漂洗,将部分血管置于多聚甲醛-戊二醛固定液(2%/2.5%),将其切成1mm×1mm×1mm组织块。二次固定:2.5%戊二醛(pH7.2~7.4)固定2h,PBS反复换液清洗,1%四氧化锇第二次固定2h。脱水:乙醇梯度脱水;干燥:环氧丙烷干燥;浸透和包埋聚合;超薄切片;透射电子显微镜观察照相。

1.2.5 数据处理 实验结果用Excel及SPSS统计软件进行单因素方差分析和组间两两比较(SNK),实验数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与讨论

2.1 荞麦对高脂膳食大鼠血清中SOD、GSH-PX活性及MDA含量的影响

表1是荞麦对高脂膳食大鼠血清中SOD、GSH-PX活性及MDA含量的影响结果。

表1 荞麦对高脂膳食大鼠血清中SOD活性、GSH-PX活性及MDA含量的影响($n=10, \bar{x} \pm SD$)

Table 1 The effect of buckwheat on SOD, GSH-PX and MDA activity of mice serum in hyperlipidemia rats ($n=10, \bar{x} \pm SD$)

组别	SOD活性 (U/mL)	GSH-PX活性 (U/mL)	MDA (nmol/mL)
基础对照组	305.91±45.78	1692.89±120.29	4.06±0.47
模型对照组	204.58±66.64*	1370.58±111.91*	5.62±0.96*
荞麦低剂量组	242.42±24.04*	1400.33±152.66*	5.36±0.85*
荞麦中剂量组	278.53±43.61#	1549.92±81.12#	4.56±0.53#
荞麦高剂量组	283.76±34.31#	1549.5±100.06#	4.35±0.70#

注:*表示与基础对照组相比差异显著($p<0.05$);#表示与高脂模型组相比差异显著($p<0.05$);表2同。

SOD是细胞内一种重要的抗氧化酶,具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基的首要物质^[5],是机体天然存在的超氧自由基清除因子,所以SOD的活性可以反映机体抗氧化损伤的能力。GSH-Px是体内清除H₂O₂和许多过氧化物的主要酶,在清除脂类过氧化物和氧化防御反应中起着关键作用。MDA是机体内脂肪酸代谢受阻时,产生的氧自由基攻击

生物膜中的不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用而形成的一种脂质过氧化物。MDA常常可反映机体体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞氧化损伤的程度^[6]。

由表1可得,模型对照组与基础对照组相比,SOD和GSH-Px活性显著降低($p<0.05$),MDA含量显著升高($p<0.05$),说明高脂膳食能够降低大鼠体内的抗氧化活性。与模型对照组相比,荞麦剂量组大鼠血清SOD和GSH-Px活性均增加。随着荞麦剂量的增加,其活性逐渐增加,其中荞麦中、高剂量组大鼠SOD和GSH-Px活性与模型对照组比较具有显著性差异($p<0.05$)。与模型对照组相比,荞麦剂量组的MDA含量降低,而且随着荞麦剂量的增加,其含量逐渐降低,其中荞麦中、高剂量组大鼠血清MDA含量与模型对照组比较有显著性差异($p<0.05$)。这与荞麦中所含有的成分有着密切关系,Shun-Cheng Ren等^[7]从荞麦芽中提取酚类物质,发现它具有很好的抗氧化活性。P Jiang研究发现一定剂量的荞麦能够抑制低密度脂蛋白氧化,其中芦丁在抗氧化过程中占有重要的角色^[8]。除此之外,荞麦中蛋白质、膳食纤维均有抗氧化作用。

2.2 荞麦对肝脏组织中SOD活性、MDA含量的影响

表2是荞麦对高脂膳食大鼠肝脏中SOD活性MDA含量的影响结果。

表2 荞麦对高脂膳食大鼠肝脏组织中SOD活性及MDA含量的影响($n=10, \bar{x}\pm SD$)

Table 2 The effect of buckwheat on SOD, MDA activity of mice livers in hyperlipidemia rats ($n=10, \bar{x}\pm SD$)

组别	SOD活性(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
基础对照组	207.92±34.84	1.91±0.19
模型组对照组	175.04±16.77*	2.52±0.38*
荞麦低剂量组	175.55±22.52*	2.61±0.58*
荞麦中剂量组	199.47±29.62#	1.90±0.26#
荞麦高剂量组	192.65±12.24#	1.80±0.13#

由表2可得,与基础对照组相比,模型对照组大鼠肝脏组织中的SOD活性显著降低($p<0.05$),MDA含量显著升高($p<0.05$);与模型对照组相比,荞麦剂量组大鼠肝脏SOD活性增强,其中荞麦中、高剂量组与模型对照组比较具有显著性差异($p<0.05$);荞麦中、高剂量组大鼠肝脏MDA含量与模型对照组比较有显著性差异($p<0.05$)。说明荞麦粉在肝脏中也可能具有清除自由基、防止过氧化脂质产物产生和抗氧化损伤等的作用。同时,也可能减少过氧化脂质产物与脂类物质结合而发生动脉粥样硬化的可能性。Li-Yun Lin^[9]研究发现,将荞麦添加到小麦中做成面包,其芦丁和槲皮素含量增加,荞麦能够增强小麦面包的抗氧化活性及自由基清除能力。

2.3 光镜观察主动脉的微观结构

由图1(A)可知,基础对照组横切面观察主动脉管壁有3层分别是内膜、中膜和外膜。内膜由内皮层、内皮下层与内弹性膜组成(内弹性膜与中膜无明显分界)。内皮细胞扁平,表面比较平滑细胞间连接紧密;中膜较厚,具有多层环形平滑肌和穿插其间的弹

性纤维,细胞间排列紧密有序,外膜由胶原纤维、弹性纤维与成纤维细胞等结缔组织构成。

由图1(B)可知,高脂模型组横切面观察主动脉管壁内膜较基础对照组明显增厚,内皮细胞突向管腔,腔面粗糙,细胞与细胞之间有分离空隙,内弹性膜不连贯。中膜平滑肌细胞明显肿胀,细胞间排列无序。未见吞噬细胞和粥样斑块。

由图1(C)可知,荞麦粉低剂量组横切面观察主动脉管壁内膜较基础对照组明显增厚,光镜结构与高脂模型组接近。从结果中可以发现低剂量的荞麦对于高脂膳食大鼠主动脉的改善状况不明显。但是有研究指出苦荞麦中芦丁对主动脉血管舒张确实有很好的作用^[10]。

由图1(D)可知,荞麦粉中剂量组横切面主动脉管壁内膜较基础对照组厚,较高脂模型组薄,内皮细胞突向管腔,腔面粗糙,内弹性膜连贯。中膜平滑肌细胞没有明显肿胀,细胞间排列有序。未见吞噬细胞和粥样斑块。可见中剂量的荞麦对高脂膳食大鼠主动脉微观结构有一定改善作用。

由图1(E)可知,荞麦粉高剂量组横切面主动脉管壁光镜结构接近基础对照组,内皮细胞扁平,表面比较平滑细胞间连接紧密。说明一定剂量的荞麦能够保护高脂膳食大鼠主动脉结构。

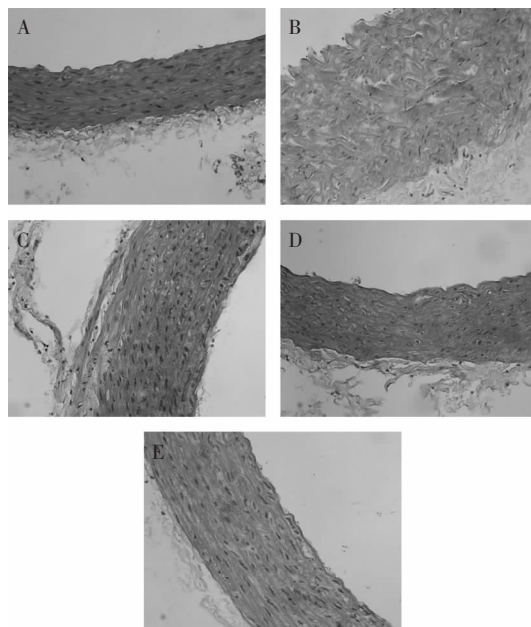


图1 给药30d后各组大鼠主动脉组织病理切片(200×)

Fig.1 The pathological slices of aorta tissue after 30-day treatment (200×)

注:A-基础对照组;B-高脂模型组;C-低荞剂量组;D-中荞剂量组;E-高荞剂量组。

3 结论

本文研究了荞麦粉对高脂膳食大鼠体内抗氧化活性的影响。将50只成年Wistar雄性大鼠随机分为基础对照组、高脂模型组、荞麦粉低、中、高剂量组(1、5、10g/kg·d),腹主动脉取血,分离血清,测定SOD、

(下转第378页)

(4):318-321.

- [30] Ying W, Qin L, Xue Z. Isolation and purification of a modified phenazine, griseoluteic acid, produced by *Streptomyces griseoluteus* P510[J]. Research In Microbiology, 2011, 162(3): 311-319.
- [31] 张辉, 邓艾文, 杜敏娜, 等. 海洋链霉菌HS-HM-068中两个musacins成分的分离及结构鉴定[C]. 浙江: 2010年中国药学会大会论文集, 2010.
- [32] 彭飞, 谢阳, 江红, 等. 链霉菌FIM95-F1产生的抗真菌抗生素S1[J]. 天然产物研究与开发, 2011(23): 809-814.
- [33] 王娇艳. 从2株链霉菌次级代谢产物中寻找新化合物以及抗毒素6个组分的高速逆流分离[D]. 福州: 福建医科大学, 2011.
- [34] 韩少卿, 叶骥, 薛强, 等. 超滤和纳滤膜分离技术提取螺旋霉素[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(1): 54-59.
- [35] Ana I, Ana M, Brites A, et al. Nanofiltration of a clarified fermentation broth[J]. Chemical Engineering Science, 2006, 61: 2418-2427.
- [36] 陆颖健, 刘姝, 别小妹. 海洋链霉菌GB-2抗细菌物质的溶解性质和分离纯化[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 306-310.
- [37] Elleuch L, Shaaban M, Smaoui S, et al. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(2): 579-593.
- [38] Aibrohim D, Sutichai N, Wilunda C, et al. Antimalarial 20-membered macrolides from *Streptomyces* sp. BCC33756 [J]. Tetrahedron, 2013(69): 8205-8208.
- [39] 黎晶晶, 王旻. 一株链霉菌脂肽类抗生素SMN的分离纯化及生物学活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3717-3719.
- [40] Fourrti B F, Fotso S, Ben Mehdi B A, et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US80[J]. Research In

Microbiology, 2005, 156(3): 341-347.

- [41] Silva C S, Bovarotti E, Rodrigues M I. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems[J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2009, 32(5): 625-632.
- [42] Neto A B, Bustamante M C, Oliveira J H, et al. Preliminary studies for cephamycin C purification technique[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(1): 208-221.
- [43] 施跃峰, 桑金隆, 竺利红, 等. 新微生物农药抑霉菌素的研究[J]. 核农学报, 2004, 8(1): 68-71.
- [44] 饶又启. 中杀菌素链霉菌中的多烯抗生素[J]. 国外医药-植物药分册, 2008(1): 26-36.
- [45] 汪茂田, 谢培山. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [46] Arun D S, Prabhjot K G. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp[J]. Food Engineering, 2007(79): 1172-1178.
- [47] 胡博新, 顾鸽青, 冯军. 链霉菌磷脂酶D的分离纯化及酶学性质[J]. 中国医药工业, 2008, 39(9): 655-659.
- [48] Jignasha T T, Satya P S. Organic solvent tolerance of an alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009(36): 211-218.
- [49] Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 71(5): 499-504.
- [50] 洪秀清. 吸水链霉菌FIM99501次级代谢产物的研究-分离纯化、结构鉴定[D]. 福州: 福建医科大学, 2010.

(上接第372页)

GSH-PX的活性及MDA的含量和肝脏组织中SOD、MDA的含量;并观察主动脉结构。实验结果表明,一定剂量荞麦粉可使高脂膳食大鼠SOD、GSH-PX活性升高,MDA含量降低,可有效清除自由基,抑制脂质过氧化,减轻肝细胞受损。用荞麦粉干预大鼠的高脂膳食,提高机体内抗氧化能力,同时可以改善由高脂膳食引起的主动脉结构病理变化,具有保护动脉血管结构的作用。本实验结果为疾病的预防提供可靠的理论依据,同时为医药和保健品的开发奠定基础。但是关于荞麦抗氧化的分子机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Kou-Tai Yang, Chen Lin, Cheng-Wei Liu. Effects of chicken-liver hydrolysates on lipid metabolism in a high-fat diet[J]. Food Chemistry, 2014, 160: 148-156.
- [2] Lin Y L, Chang Y Y, Yang D J, et al. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters[J]. Food Chemistry, 2013, 140: 31-38.
- [3] 李龙因. 抗氧化功能因子对高脂膳食小鼠脂代谢的调节作用及其机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [4] 何永艳, 冯佰利, 邓涛, 等. 荞麦提取物抗氧化活性研究[J].

西北农业学报, 2007, 16(6): 76-79, 84.

- [5] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学研究进展, 2008, 29(4): 85-88.
- [6] 闫少芳, 李勇, 吴娟, 等. 葡萄籽提取物原花青素调节血脂作用及机理研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 302-304.
- [7] Shun-Cheng Rena, Jun-Tao Sun. Changes in phenolic content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and antioxidant capacity of two buckwheat sprouts in relation to germination[J]. Journal of Functional Foods, 2014(7): 298-304.
- [8] P Jiang, F Burczynski, C Campbell. Rutin and Xavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation[J]. Food Research International, 2007, 40: 356-364.
- [9] Li-Yun Lina, Hsiu-Man Liub, Ya-Wen Yu. Quality and antioxidant property of buckwheat enhanced wheat bread[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 987-991.
- [10] Yusuke Ushida, Toshiro Matsui, Mitsuru Tanaka. Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutin-free tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta[J]. Nutrition Research, 2003, 23(6): 803-814.