

## 论著

## 基于斑马鱼幼鱼的抗氧化物筛选模型建立及其应用

刘海波,支媛,汪会玲,张倩男,崔文明,刘珊

(国家食品安全风险评估中心,国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

**摘要:**目的 建立一种基于斑马鱼幼鱼的抗氧化物质识别模型,并初步应用于候选物质的筛选。方法 以受精后3 d的斑马鱼幼鱼为受试对象,以12种已知抗氧化物、2种氧化物和4种候选物为受试物,将幼鱼置于含有受试物的养鱼水中处理20 h,根据幼鱼的急性毒性表现确定每种受试物的最大耐受剂量,并以此为最高剂量向下设计多个剂量组处理幼鱼,同时在培养体系中添加活性氧(ROS)指示剂CM-H<sub>2</sub>DCFDA,20 h后检测处理体系的荧光强度,并计算自由基清除率。结果 12种已知抗氧化物中的11种抗氧化物处理的幼鱼荧光强度降低,表现出清除ROS的作用,2种氧化物增加幼鱼荧光强度,4种候选物中有3种具有清除ROS的作用。结论 该试验体系具有较好的灵敏度。用该体系对实验室的开发产物进行筛选,结果提示其具有一定的应用价值。

**关键词:**斑马鱼幼鱼;活性氧;抗氧化

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)05-0871-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.05.002

**Establishment and application of antioxidant screening model based on zebrafish larva**

LIU Haibo, ZHI Yuan, WANG Huiling, ZHANG Qiannan, CUI Wenming, LIU Shan

(NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To establish a zebrafish larva model for identifying antioxidants and screen candidate substances.

**Methods** Zebrafish larvae with 3 d post fertilization (dpf) were treated with the fish culture water containing 12 known antioxidants, 2 oxidants and 4 candidate substances for 20 h. The maximum tolerant concentration (MTC) was determined by the acute toxic effect including death. With the highest dose of MTC, different dosages of tested substance were used to treat 3dpf larvae respectively, and the reactive oxygen species (ROS) indicator CM-H<sub>2</sub>DCFDA was added to the water at the same time. After 20 h treatment, fluorescent density was detected to calculate ROS clearance rate. **Results** Eleven tested known antioxidants showed lower fluorescent density in treated zebrafish larvae compared to the control, which suggested their ROS clearance potency. Two oxidants increased the fluorescent density, and three of four candidate substances were found to decrease fluorescent density in zebrafish larvae. **Conclusion** The study provided a sensitive test system for screening candidate antioxidants. The system was used to screen the products developed in the laboratory, and the results showed that it had certain application value.

**Key words:** Zebrafish larva; reactive oxygen species; antioxidant

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是分子氧在还原过程中的一系列中间产物,在能量代谢、信号传导等方面起关键作用。正常情况下机体保持氧化还原的平衡状态,过高的自由基水平则会引起氧化损伤,与衰老、心血管疾病、肿瘤发生等密切相关。适当地补充抗氧化物质可以降低自由基水平,

减少氧化损伤的发生。

抗氧化功能的评价可以通过传统的动物试验实现,主要依据血清氧化产物以及抗氧化酶水平判断受试物的抗氧化作用<sup>[1-2]</sup>。相比传统动物试验,斑马鱼作为一种低等模式生物被越来越多的实验室引进,其具有鱼卵透明、幼鱼个体小、发育快等特点,在实验中可以节约样品和试验成本。相比基于分子或细胞的体外试验体系,斑马鱼作为完整个体能够实现较完整的生物转化过程。ROS指示剂CM-H<sub>2</sub>DCFDA在细胞内的ROS作用下能产生相对稳定的高强度荧光,将其加入斑马鱼幼鱼的培养体系一段时间后,通过检测荧光强度则可以了解斑马

收稿日期:2022-06-08

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0400601)

作者简介:刘海波 男 副主任技师 研究方向为食品毒理与食品功能 E-mail:liuhaibo@cfsa.net.cn

通信作者:刘珊 女 研究员 研究方向为食品毒理与食品功能 E-mail:liushan@cfsa.net.cn

鱼自由基的产生情况,试验周期短,操作过程方便快捷,适合应用于产品研发前期抗氧化因子的中高通量筛选。

本研究以人体可能摄入的多种物质为受试物,包括食品中允许添加的抗氧化剂、动植物中天然存在的物质等,分别处理斑马鱼幼鱼,根据荧光强度的变化判断受试物对自由基水平的影响,从而推测其是否具有抗氧化作用。一方面根据已知抗氧化物质的表现检验测试体系的可靠性和适用性,另一方面尝试运用该体系对合作实验室制备的候选物质的抗氧化性进行检测,为后期应用积累经验。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 主要仪器与试剂

斑马鱼养殖系统(爱生),低温培养箱(Thermo),酶标仪(BIOTEK),体视显微镜(Zeiss)。

受试物大致分为三类:一类为纯度较高的试剂级受试物,包括丁基羟基茴香醚(BHA,99%)、二丁基羟基甲苯(BHT,98%)、没食子酸丙酯(PG,98%)、茶多酚(98%)和人参总皂苷(80%)购自上海源叶生物科技股份有限公司,葛根黄酮(98%)购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司,烟酰胺单核苷酸(NMN,98%)购自合肥博美生物科技有限责任公司,姜黄素(70%)购自Sigma-Aldrich;第二类为市场售卖的食品添加剂,包括番茄红素和叶黄素(浙江一诺生物科技有限公司),超氧化物歧化酶(SOD,嘉致生物科技有限公司),竹叶提取物(江苏奥轩食品添加剂商行);第三类为合作实验室中试产品,包括原花青素、低聚花青素和环黄芪醇(由厦门北化生物产业研究院有限公司提供),以及高锌牡蛎肽(由中国食品发酵工业研究院提供)。对照品甲萘醌和过氧化氢(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),CM-H<sub>2</sub>DCFDA(Invitrogen)。

### 1.2 斑马鱼卵收集

选择健康状况良好、未经任何受试物处理的 AB 系野生型斑马鱼(引种于国家斑马鱼资源中心),饲养于爱生斑马鱼饲养系统中,设置系统水 pH 值 7.2~7.4、电导率 450~550  $\mu\text{S}/\text{m}$ 。系统使用经过滤器纯化的水,通过自动吸取氯化钠和碳酸氢钠调节系统水 pH 值和电导率以符合上述参数设置。鱼房温度 26~28  $^{\circ}\text{C}$ ,光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗。在试验前 1 天晚上将雄性和雌性(2:1)分放在交配盒的两侧。试验当天早上给予光照后撤去交配盒中间的隔板,1 h 后收集鱼卵、弃去死卵和碎卵后置于 28  $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中孵育。满足受精率 $\geq 70\%$ 、受精卵存活率 $\geq 90\%$ 、3 dpf(受精后天数)孵出率 $\geq 70\%$  的条件

时,该批次幼鱼方能用于实验。

### 1.3 受试物对幼鱼毒性作用检测及受试物浓度确定

随机挑选发育正常且阶段一致的 3 dpf 斑马鱼幼鱼转移至 6 孔板中,每孔 30 尾。根据受试物性质用养鱼水或 DMSO 配制储备液(处理幼鱼时 DMSO 终浓度为 1%)。用含有受试物终浓度为 31.3、62.5、125、250、500、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的养鱼水处理幼鱼,同时设置正常对照组(养鱼用水和 DMSO 处理组),每孔容量为 3 mL。受试物处理 20 h 后,观察各组斑马鱼幼鱼状况并记录死亡情况,包括幼鱼体位、弯曲、水肿、心跳、死亡等。以幼鱼不出现死亡或其他毒性表现的最大浓度为该受试物的最大耐受浓度(Maximum tolerant concentration, MTC)。如果按照上述浓度设计不能得到 MTC,则扩大检测浓度范围重新开展试验。

### 1.4 ROS 水平检测

随机选取发育正常且阶段一致的 3 dpf 斑马鱼幼鱼置于 24 孔板中,每孔 10 尾。分别给予受试物,以 MTC 为最高剂量、后续剂量 2~4 倍倍比降低,同时设置无鱼对照组(没有斑马鱼、其余与处理组相同)和正常对照组(有斑马鱼、未添加受试物的实验组)。同时以 300、600、1 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  过氧化氢以及 0.75、1.5 和 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的甲萘醌处理幼鱼,作为过氧化物阳性组。加入 CM-H<sub>2</sub>DCFDA,使终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。充分混匀后将斑马鱼转移至 96 孔板中,每孔 1 尾幼鱼 100  $\mu\text{L}$  液体。随后用铝箔纸将 96 孔板避光包裹,28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中孵育 20 h。实验结束后用多功能酶标仪(激发光波长为 485 nm,发射光波长为 535 nm)检测得荧光值 S。受试物处理组的荧光值减去无鱼对照组的荧光值,为受试物处理组斑马鱼的体内 ROS 相对含量。

### 1.5 ROS 清除率计算

ROS 清除率(%)=[1-(S 受试物组-S 无鱼对照组)/(S 正常对照组-S 无鱼对照组)] $\times 100\%$

### 1.6 统计学分析

荧光强度的结果以 Mean $\pm$ SE 表示,用 ANOVA 进行分析,采用 Dunnett's T-检验进行组间比较, $P < 0.05$  判断为差异有显著性。受试物任一剂量组荧光强度低于对照组且差异有显著性,则认为该受试物在本体系中具有抗氧化作用。

## 2 结果

### 2.1 最大耐受浓度 MTC

将不同浓度的受试物分别作用于斑马鱼幼鱼处理 20 h 后,可见 SOD、番茄红素、叶黄素、葛根黄酮和竹叶提取物处理组以及各对照组则未见死亡

及其他毒性表现。经 BHT、BHA、PG、茶多酚、姜黄素、人参总皂甙、环黄芪醇、原花青素、低聚原花青素和高锌牡蛎肽处理的幼鱼在部分剂量出现死亡或其他毒性表现。此外,叶黄素、竹叶提取物及姜

黄素在某些剂量组有明显颗粒析出。结合不同受试物作用下幼鱼的毒作用表现以及受试物的析出情况,确定后续实验中不同受试物的最大测试剂量。具体见表 1。

表 1 受试物对斑马鱼幼鱼的毒性作用

Table 1 Toxic effect caused by tested substance in zebrafish larva

受试物	试验剂量/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	主要毒性表现	最大耐受度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
BHA	0.313~1 000	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组幼鱼侧翻、卵黄囊变黑,62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起全部死亡	5
BHT	0.781~1 000	12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起有幼鱼死亡(4/30)	6.25
PG	3.13~1 000	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组出现心包水肿(1/30),100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组幼鱼侧翻(20/30)、弯曲(3/30)	25
茶多酚	125~1 000	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组及以上全部死亡	125
竹叶提取物*	62.5~1 000	各组幼鱼未见异常(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上剂量组有析出)	250
叶黄素*	31.3~1 000	各组幼鱼未见异常(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上剂量组有析出)	125
人参总皂苷	125~1 000	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起有幼鱼死亡(6/30)	125
NMN	62.5~2 000	2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组有幼鱼死亡(2/10)	1 000
SOD	62.5~2 000	各组幼鱼未见异常	2 000
葛根黄酮	125~2 000	各组幼鱼未见异常	2 000
番茄红素	62.5~8 000	各组幼鱼未见异常	8 000
姜黄素	0.489~1 000	1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起有幼鱼死亡(6/30)(3.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起有析出)	0.977
原花青素	1~100	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起幼鱼出现死亡(9/10)	1
低聚原花青素	1~100	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起全部死亡	1
环黄芪醇	31.3~1 000	62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起幼鱼出现死亡(2/30)、心率减慢(2/30)	31.3
高锌牡蛎肽	15.6~1 000	62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组起幼鱼出现死亡(4/20)	31.3

注:\*依据受试物析出情况确定剂量

## 2.2 模型有效性验证

以 MTC 为各受试物的最大浓度,后续剂量 2~4 倍比降低,作用 20 h 后检测荧光强度。两种氧化物过氧化氢(300、600 和 1 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  组)和甲萘醌(3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  组)处理的过氧化物阳性组荧光强度显著增加( $P<0.05$ ),不具有清除 ROS 的作用,结果见表 2。

表 2 两种氧化物对斑马鱼幼鱼荧光强度的影响( $n=8$ )

Table 2 Effect of 2 oxidant on fluorescent density of zebrafish larva( $n=8$ )

受试浓度/ ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	甲萘醌		过氧化氢	
	相对荧光强度	受试浓度/ ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	相对荧光强度	受试浓度/ ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )
0.00	2 244±685	0	2 244±685	
0.75	1 881±703	300	216 315±24 461*	
1.50	3 858±1 789	600	404 625±119 234*	
3.00	13 431±4 793*	1 200	559 055±35 255*	

注:与对照组比较,\* $P<0.05$

人参总皂甙和竹叶提取物处理的斑马鱼幼鱼,除最高剂量外其他剂量组荧光强度显著降低( $P<0.05$ )。BHA 和姜黄素在测试各个剂量均能有效清除 ROS。而 BHT、PG、茶多酚和叶黄素的 ROS 清除能力随着剂量升高先增加后降低,且 BHT 和茶多酚的高剂量组 ROS 水平增加。NMN 和番茄红素的 ROS 清除能力在测试范围内随着剂量升高而增加,300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及以上剂量组番茄红素的 ROS 清除率达 90% 以上。不同受试物清除自由基的剂量效应曲线见图 1。

SOD 各剂量组均未见荧光强度的降低,且 500 和

1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组荧光强度显著高于对照组( $P<0.05$ ),即 ROS 水平增加、计算得 ROS 清除率为负数。葛根黄酮仅最高剂量 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组荧光强度降低,具有 ROS 清除能力。见图 2。

两种过氧化物处理幼鱼荧光强度均增加、即 ROS 水平增加,不具有抗氧化作用。已知抗氧化物中除 SOD 外,其他 11 种受试物在一定剂量范围内能降低荧光强度、有效清除 ROS,具有抗氧化作用。说明本体系具有一定的识别抗氧化物质的能力。各受试物的 ROS 清除率结果汇总见表 3。

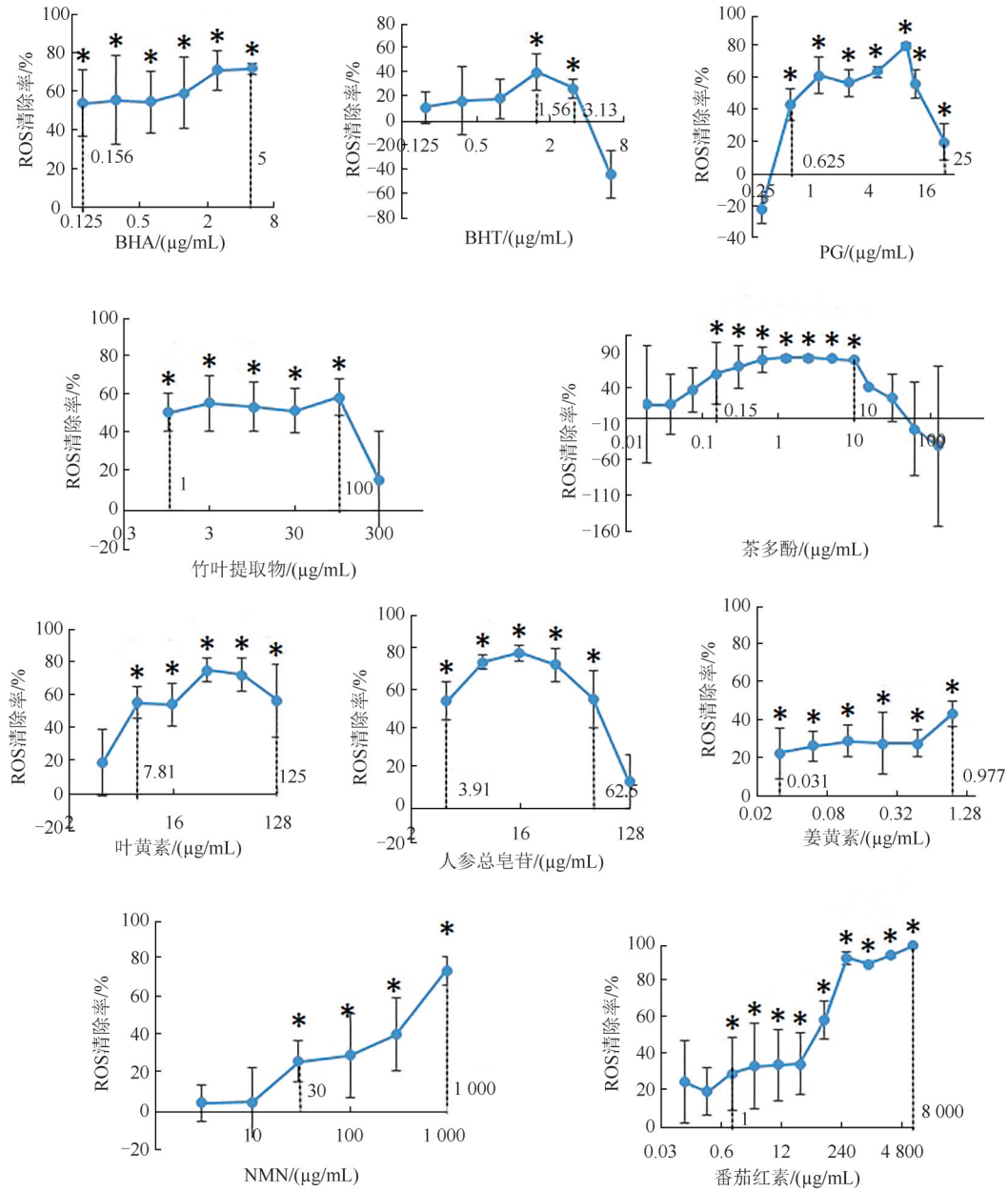
## 2.3 模型应用评价

原花青素和低聚花青素的 ROS 清除作用见表 4,可见两种受试物均能有效清除 ROS,且低聚花青素起效浓度(0.031  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )低于原花青素(0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

与对照组相比,环黄芪醇的最高剂量 31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组荧光强度显著增高,其他剂量组荧光强度均显著降低( $P<0.05$ )。高锌牡蛎肽各剂量组荧光强度与对照组相比差异无显著性( $P>0.05$ )。结果见表 5。

## 3 讨论

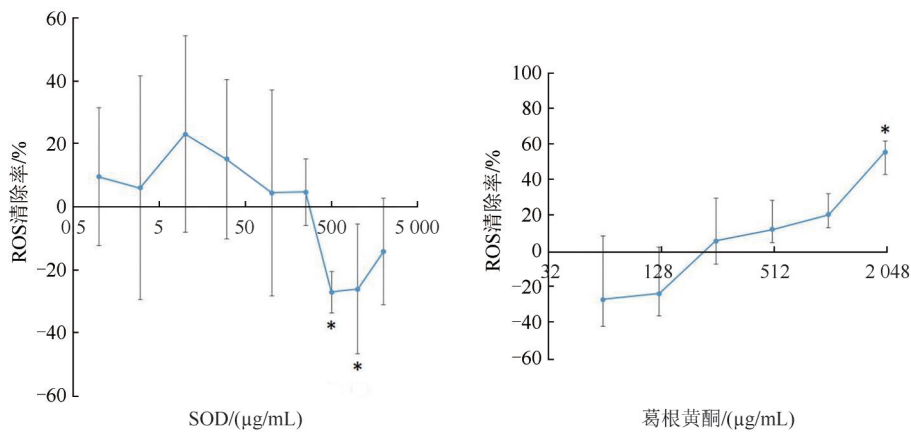
本研究以 CM-H<sub>2</sub>DCFDA 为指示剂检测斑马鱼幼鱼体系中的 ROS 水平。CM-H<sub>2</sub>DCFDA 是 H<sub>2</sub>DCFDA 的氯甲基衍生物,可被动扩散至细胞内,且在活细胞中的保留率比 H<sub>2</sub>DCFDA 高得多。CM-H<sub>2</sub>DCFDA 的乙酸酯基团被细胞内酯酶切割、氯甲基基团与细胞内谷胱甘肽和其他硫醇发生反应,在 ROS 作用下产生高荧光强度的加合物,该加合物被捕获在细胞



注:与对照组比较\* $P < 0.05$ ,虚线之间为显著降低ROS的受试物剂量范围,  $n = 8$

图1 不同受试物ROS清除作用的剂量效应曲线

Figure 1 Dose-effect curve of ROS clearance rate in larva treated by test substance



注:与对照组比较\* $P < 0.05$ ,  $n = 8$

图2 SOD和葛根黄酮对ROS清除作用的影响

Figure 2 Dose-effect curve of ROS clearance rate in larva treated by SOD or puerarin



表3 受试物对斑马鱼幼鱼的ROS清除作用汇总  
Table 3 Summary of ROS clearance rate of test substance

受试物	试验剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	有效剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ROS清除率/%
BHA	0.156~5	0.156~5	54~72
BHT	0.195~6.25	1.56~3.13	27~40
PG	0.313~25	0.625~25	20~81
茶多酚	0.009~125	0.15~10	65~86
竹叶提取物	1~300	1~100	52~59
叶黄素	3.91~125	7.81~125	54~75
人参总皂苷	3.91~125	3.91~62.5	55~80
NMN	3~1 000	30~1 000	27~74
番茄红素	0.1~8 000	1.0~8 000	30~100
葛根黄酮	62.5~2 000	2 000	56
SOD	1~2 000	—	—
姜黄素	0.031~0.977	0.031~0.977	23~44

注:—表示各剂量组均未见ROS的显著降低

表4 原花青素和低聚花青素对斑马鱼幼鱼荧光强度的影响( $n=8$ )

Table 4 Effect of procyanidins and oligomeric procyanidins on fluorescent density of zebrafish larva ( $n=8$ )

浓度/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	原花青素		低聚花青素	
	相对荧光强度	清除率/%	相对荧光强度	清除率/%
0	3 004±221		3 220±317	
0.031	2 627±452	13	2 564±183*	20
0.062	2 759±372	8	2 616±293*	19
0.125	2 891±388	4	2 392±303*	26
0.25	2 190±220*	27	2 373±224*	26
0.5	1 976±225*	34	2 193±126*	32
1	2 070±374*	31	1 852±230*	42

注:与对照组比较,\* $P<0.05$

表5 环黄茛醇和高锌牡蛎肽对斑马鱼幼鱼荧光强度的影响( $n=8$ )

Table 5 Effect of cycloastragenol and zinc-chelated oyster peptide on fluorescent density of zebrafish larva ( $n=8$ )

浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	环黄茛醇		高锌牡蛎肽	
	相对荧光强度	清除率/%	相对荧光强度	清除率/%
0	3 392±334		3 242±727	
0.977	2 635±501*	22	3 808±150	-17
1.95	2 656±211*	22	3 162±758	2
3.91	2 165±215*	36	3 097±250	4
7.81	2 622±403*	23	3 296±246	-2
15.6	2 664±494*	21	4 008±380	-24
31.3	4 339±421*	-28	2 863±308	12

注:与对照组比较,\* $P<0.05$

内,荧光信号相对比较稳定<sup>[3]</sup>。用CM-H<sub>2</sub>DCFDA检测斑马鱼幼鱼ROS水平已有文献报道,主要用于指示氧化应激状态<sup>[4]</sup>。研究组在本实验室前期工作的基础上对实验方案进行优化,并形成相对稳定的检测体系,对18种物质进行了测试,包括12种已知抗氧化物的商业化产品,2种非抗氧化物质(过氧化物阳性品),4种为实验室制备的中试产物。

12种已知抗氧化物既有天然来源也有人工合成的物质。其中5种为食品中允许添加的抗氧化剂,包括3种合成的化合物丁基羟基茴香醚(BHA)、

二丁基羟基甲苯(BHT)和没食子酸丙酯(PG),以及2种天然来源的提取物茶多酚和竹叶提取物<sup>[5-7]</sup>。另外7种为有文献报道具有抗氧化作用的动植物天然成分,包括番茄红素、叶黄素、姜黄素、人参总皂苷、葛根黄酮、烟酰胺单核苷酸(NMN)和超氧化物歧化酶(SOD)<sup>[8-15]</sup>,其中番茄红素、叶黄素和姜黄素允许作为食品添加剂中的着色剂使用<sup>[5]</sup>。在该测试体系中除SOD外其余11种均表现出抗氧化的作用,有较高的灵敏度(11/12)。斑马鱼幼鱼一般在5 dpf开口进食,本研究所用3 dpf幼鱼还不能进食,其营养主要由卵黄囊提供,在本研究体系中受试物主要通过直接接触方式影响幼鱼。SOD分子量相对分子质量大(约为30~40 kD),不易透过细胞膜,可能是其未表现出清除ROS作用的原因之一。

11种受试物清除ROS的有效浓度范围差异很大,结合MTC实验数据还可以看出有些受试物在较低浓度则表现出明显的毒性。如姜黄素在1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、BHA和BHT在10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右即出现明显毒性,茶多酚和人参总皂苷的毒作用剂量在100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上。此外,不同受试物的剂量效应曲线也不尽相同,有些受试物(如BHT和茶多酚)处理时幼鱼表现出一定程度的ROS增加(ROS清除率为负数),提示该剂量下可能产生一定的氧化损伤,但在该剂量下未观察到明显毒表现;而有些受试物如番茄红素在高达8 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量仍无明显的毒性表现。本研究中SOD高剂量组荧光增强,可能与水中高浓度的蛋白质致氮含量增加影响了水质、不利于幼鱼生长有关。参考国家食品安全风险评估中心食品毒理学数据库(<https://dl.cfsa.net.cn/>)中部分物质的大鼠急性毒性资料<sup>[16]</sup>发现,BHA的LD<sub>50</sub>为2.2 g/kg·BW、BHT为890 mg/kg·BW、PG为3.6~3.8 g/kg·BW、茶多酚为2.5 g/kg·BW,根据急性经口毒性标准(GB 15193.3—2014)将上述四种物质判定为低毒物质,葛根黄酮大鼠LD<sub>50</sub>大于10 g/kg·BW、番茄红素大于5 g/kg·BW,按照标准这两种物质为实际无毒物质<sup>[17]</sup>。可见本研究体系中受试物对斑马鱼幼鱼表现出的急性毒性强弱与哺乳动物基本一致,这对研发过程中开发高效低毒的产品有一定指导意义。

原花青素是由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成的多酚类化合物,一般将单体数小于5的称为低聚原花青素。研究发现原花青素具有较强的抗氧化活性,还有调节免疫、抗炎等作用,且低聚原花青素生物利用度更高<sup>[18-19]</sup>。本研究所用原花青素和低聚原花青素由葡萄籽提取而来,纯度大于95%,其中经过解聚工艺获得的样品中低聚物比例为总原花青素的25%~30%。本研究中两种受试物

的MTC均为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,低聚物的抗氧化起效剂量(0.031  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )则比非低聚物(0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )低一个数量级,与聚合度低的原花青素生物利用度更高的研究结果相一致<sup>[18-19]</sup>。环黄芪醇是一种三萜皂苷类物质,具有抗氧化、抗炎作用,还可以通过激活端粒酶活性抑制端粒的减少、从而拮抗细胞衰老<sup>[20-21]</sup>。本研究中环黄芪醇通过生物酶解黄芪甲苷而得,在31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下未见斑马鱼幼鱼有明显的表型异常,但荧光检测显示ROS水平增加,在0.977~15.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量范围内则有明显的清除ROS的作用。高锌牡蛎肽是通过水解牡蛎获得多肽再与锌螯合所得,主要目的是制备易于吸收利用、生理活性强的新型补锌剂<sup>[22]</sup>,本研究未见其有清除ROS的作用。用该体系对实验室开发的产物进行筛选可见,原花青素、低聚花青素和环黄芪醇表现出一定的抗氧化活性,未见高锌牡蛎肽有抗氧化作用,与现有文献报道<sup>[18-22]</sup>相符,体现该体系在抗氧化物质筛选中的应用价值。

综上,过氧化物阳性品过氧化氢和甲萘醌不具有清除ROS的作用,12种已知抗氧化物中有11种表现出清除ROS的作用,具有较好的灵敏度。该体系对实验室开发产物的筛选具有一定的应用价值。

## 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 食药监局: 抗氧化功能评价方法等9个保健功能评价方法印发[J]. 中国食品, 2012(11): 45.  
National Food and Drug Administration. Shiyao jianju: Kangyanghua gongneng pingjia fangfa deng 9 ge baojian gongneng pingjia fangfa yinfa[J]. China Food, 2012(11): 45.
- [2] 常应九, 束彤, 高庆超, 等. 黑枸杞花青素微胶囊溶液抗氧化功能的评价[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(22): 130-134.  
CHANG Y J, SHU T, GAO Q C, et al. The evaluation of antioxidant function of the solution of microcapsule loading anthocyanidins from *Lycium ruthenicum* Murr[J]. Food Research and Development, 2018, 39(22): 130-134.
- [3] REINIERS M J, VAN GOLEN R F, BONNET S, et al. Preparation and practical applications of 2', 7'-dichlorodihydro fluorescein in redox assays[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(7): 3853-3857.
- [4] WU Y T, LIN C Y, TSAI M Y, et al. B-Lapachone induces heart morphogenetic and functional defects by promoting the death of erythrocytes and the endocardium in zebrafish embryos[J]. Journal of Biomedical Science, 2011, 18(1): 70.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.  
National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Standards for uses of food additives: GB 2760—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [6] MA Y L, YANG Y, GAO J, et al. Phenolics and antioxidant activity of bamboo leaves soup as affected by *in vitro* digestion[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 135: 110941.
- [7] MA N H, GUO J, CHEN S H X, et al. Antioxidant and compositional HPLC analysis of three common bamboo leaves[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2020, 25(2): 409.
- [8] GRABOWSKA M, WAWRZYNIAK D, ROLLE K, et al. Let food be your medicine: Nutraceutical properties of lycopene[J]. Food & Function, 2019, 10(6): 3090-3102.
- [9] MITRA S, RAUF A, TAREQ A M, et al. Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 154: 112328.
- [10] KOTHA R R, LUTHRIA D L. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2019, 24(16): 2930.
- [11] LIANG W X, WANG S H, YAO L, et al. Quality evaluation of *Panax ginseng* adventitious roots based on ginsenoside constituents, functional genes, and ferric-reducing antioxidant power[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(8): e12901.
- [12] ZHANG L. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine[J]. Drug Delivery, 2019, 26(1): 860-869.
- [13] YOSHINO J, BAUR J A, IMAI S I. NAD<sup>+</sup> intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR[J]. Cell Metabolism, 2018, 27(3): 513-528.
- [14] CHEN X H, AMORIM J A, MOUSTAFA G A, et al. Neuroprotective effects and mechanisms of action of nicotinamide mononucleotide (NMN) in a photoreceptor degenerative model of retinal detachment[J]. Aging, 2020, 12(24): 24504-24521.
- [15] ROSA A C, BRUNI N, MEINER G, et al. Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 846-865.
- [16] 国家食品安全风险评估中心. 食品毒理学数据库[EB/OL]. [2022-05-01]. <https://dl.cfsa.net.cn/>.  
China National Center For Food Safety Risk Assessment. Food Toxicology Database (Food Tox)[EB/OL].[2022-05-01]. <https://dl.cfsa.net.cn/>.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 急性经口毒性试验: GB 15193.3—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.  
National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Acute toxicity test: GB 15193.3—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [18] ZHANG L, WANG Y J, LI D X, et al. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins[J]. Food & Function, 2016, 7(3): 1273-1281.
- [19] OTTAVIANI J I, HEISS C, SPENCER J P E, et al. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: revisited[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2018, 61: 63-75.
- [20] IKRAM M, JO M H, CHOE K, et al. Cycloastragenol, a triterpenoid saponin, regulates oxidative stress, neurotrophic dysfunctions, neuroinflammation and apoptotic cell death in neurodegenerative conditions[J]. Cells, 2021, 10(10): 2719.

- [21] YU Y J, ZHOU L M, YANG Y J, et al. Cycloastragenol: an exciting novel candidate for age-associated diseases [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 16(3): 2175-2182.
- [22] 刘艳, 鲁军, 陈亮, 等. 牡蛎肽锌螯合物的制备工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(8): 257-261.
- LIU Y, LU J, CHEN L, et al. Preparation of oyster peptide-zinc chelates[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(8): 257-261.

[上接第870页]

2.12 所引的参考文献仅限于作者亲自阅读过的。未公开发表或在非正式出版物上发表的著作如确有必要引用,可用圆括号插入正文或在当页地脚加注说明。原文作者若不超过3人应将作者姓名依次列出,中间用“,”隔开,3位以上作者则列出前3位,逗号后加“等”。参考文献格式如下:

期刊文章:[序号] 主要责任者(外文人名首字母缩写,缩写名后不加缩写点). 文献题名[文献类型标志]. 刊名,年,卷(期): 起页-止页.

举例 [1] 汪国华,马进,季适东,等. 急性出血坏死性胰腺炎的手术治疗[J]. *中级医刊*,1995,30(8):22-25.

[2] BERRY R J,LI Z,ERICKSON J D,et al. Preventing neural tube defects with folic acid in China[J]. *N Engl J Med*,1999, 314: 1485-1490.

著作或编著:[序号] 主要责任者. 文献题名[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项(版次为第一版的不用标明). 出版地:出版者,出版年: 起页-止页.

举例 图书:[3] 吴阶平,裘法祖,黄家驹. 外科学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,1979: 82-93.

译著:[4] ZIEGLER E E, FILER L J. 现代营养学[M]. 闻之梅,陈君石,译. 7版. 北京:人民卫生出版社,1998: 126-129.

著作中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志]//原文献主要责任者. 原文献题名. 版本项. 出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页.

举例 [5] 白书农. 植物开花研究[M] // 李承森. 植物科学进展. 北京:高等教育出版社,1998: 146-163.

会议文献中的析出文献:[序号]析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志/文献载体标志]//会议文献主要责任者. 会议文献题名:其他题名信息. 出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页[引用日期]获取和访问路径.

举例 [6] 董家祥,关仲英,王兆奎,等. 重症肝炎的综合基础治疗[C]//张定凤. 第三届全国病毒性肝炎专题学术会议论文汇编,南宁,1984. 北京:人民卫生出版社,1985: 203-212.

科技报告:著录格式同著作或编著。

举例 [7] World Health Organization. Factors regulating the immune response: report of WHO Scientific Group [R]. Geneva:WHO,1970:1-74.

法令、条例:[序号]主要责任者. 题名[文献类型标志]. 公布日期.

举例 [8] 中华人民共和国全国人民代表大会. 中华人民共和国著作权法[A]. 2012-03-31.

标准:[序号]主要责任者. 标准名称:标准编号[文献类型标志]. 出版地:出版者,出版年.

举例 [9] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. 科学技术期刊编排格式:GB / T 3179—1992 [S]. 北京:中国标准出版社,1992.

电子文献:[序号]主要责任者. 题名[文献类型标志 / 文献载体标志]. 出版地:出版者,出版年(更新或修改日期) [引用日期].

获取和访问路径.

举例 [10] 肖钰. 出版业信息迈入快速道 [EB/OL]. ( 2001-12-19 ) [ 2002-04-15 ]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

专利文献:[序号]专利申请者. 题名:专利国别,专利号[P]. 公告或公开日期.

### 3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库,本刊所付稿酬已包含这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改,若涉及内容修改会与作者商榷。编辑部收到稿件后,于3个月内通知处理意见。投稿6个月后如未收到修稿或录用通知,作者可自行处理稿件,所收稿件纸质版概不退还。来稿一经采用,即收取版面费,按规定向作者支付稿酬,并赠送杂志。

### 4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>,并同时邮寄单位介绍信和稿件纸版1份(需第一作者、通信作者和副高以上作者签名)。来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和E-mail地址。编辑部地址:北京市海淀区紫竹院南路17号院3号楼102室《中国食品卫生杂志》编辑部邮政编码:100048 电话:010-68707221 E-mail:spws462@163.com