

实验技术与方法

酒精诱导氧化应激小鼠模型建立及姜黄素抗氧化活性的初步研究

刘小兵 朴建华 黄振武 田 园 李卫东 陈 竞 杨艳华  
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

**摘要:**目的 建立酒精诱导的氧化应激小鼠模型,对姜黄素的抗氧化活性进行初步评价,探讨补充生物活性因子的抗氧化功能评价方法。**方法** 8 周龄,昆明小鼠 60 只,动物房适应 1 周,按体重随机分为 5 组。实验周期内,每日按 0.2 ml/10 g · BW 给予各组实验小鼠连续灌服相应剂量受试物。实验结束时,处死全部小鼠,取血,测定肝脏相关生化指标。**结果** 酒精模型组血浆和肝脏谷胱甘肽过氧化酶 GPx 的酶活性均显著低于正常对照组 ( $P < 0.05$ ); 肝脏蛋白质羰基含量(PCO)显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 长期摄入低浓度酒精,可以诱导建立氧化应激小鼠模型; 实验中姜黄素的抗氧化活性得到初步证实; 蛋白质羰基含量的测定显示,其可有效补充生物活性因子抗氧化功能评价方法。

**关键词:**氧化应激; 动物模型; 姜黄素; 蛋白质羰基含量

中图分类号:R992 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0258-04

**Establishment of an Oxidative Stress Mice Model Induced by Ethanol and the Antioxidant Capacity of Curcumin**

LIU Xiao-bing, PIAO Jian-hua, HUANG Zhen-wu, TIAN Yuan, LI Wei-dong, CHEN Jing, YANG Yan-hua

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To establish an ethanol-induced oxidative stress mice model and evaluate the antioxidant capacity of curcumin; and to explore an evaluation method for bioactive antioxidants. **Methods** Sixty Kunming mice on the age of 8 weeks were accommodated for 1 week and then divided into 5 groups. The test substance was given at the dosage of 0.2 ml/10 g · BW by gavages for 5 weeks. The activity of GPx and SOD in plasma and GPx, SOD, MDA and PCO (protein carbonyl content) in liver were tested at the end of the experiment. **Results** The activity of GPx both in plasma and in liver was lower than the control group ( $P < 0.05$ ) and the PCO in liver was higher than the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Oxidative stress model could be established in mice induced by lower concentration of ethanol for a long time; and the antioxidant capacity of curcumin was identified in the model. PCO could be used as an effective biomarker for the evaluation of oxidative stress.

**Key words:** Oxidative Stress; Animal Model; Curcumin; Protein Carbonyl Content

大量人群流行病学和临床研究显示,因酒精的滥用而诱发的氧化应激性损伤可涉及到机体的多个组织器官<sup>[1]</sup>; 实验研究揭示,酒精的危害主要源于其在体内代谢过程中产生的过量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)、活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)以及诸如组织缺氧、内毒素血症、细胞因子释放等体内不利微环境的形成<sup>[2]</sup>。当前,全世界范围内广泛进行的关于酒精诱

导机体组织氧化应激性损伤研究,包括人体研究<sup>[3,4]</sup>、动物研究<sup>[5]</sup>以及体外细胞研究<sup>[1,6]</sup>,其中动物研究包括急性酒精摄入试验<sup>[7]</sup>和慢性酒精摄入试验<sup>[8]</sup>,都取得了显著的成果。特别是基于氧自由基理论而开展的,旨在通过摄入足量具有抗氧化生物活性的外源性生物因子,以增强机体内源性抗氧化防御能力的干预性研究,正在成为抗氧化、抗衰老研究领域的热点<sup>[9,10]</sup>。

姜黄素是一种从姜黄中分离出来的桔黄色天然多酚类化合物。研究发现,其具有多种显著的生物学功效,如抗微生物、抗癌和抗氧化<sup>[11,12]</sup>,其中,抗氧化最受关注<sup>[13]</sup>。

在参照国内外研究的基础上,本次实验通过对

收稿日期:2009-03-30

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD27B01)

作者简介:刘小兵 男 硕士生 研究方向为营养学 E-mail: liuxiaobing007@yahoo.cn

通信作者:黄振武 男 研究员

实验小鼠连续灌服低浓度酒精溶液的方式,建立氧化应激小鼠模型;在实验过程中分不同时期给予不同剂量的姜黄素,借此对姜黄素的抗氧化活性进行功能评价;将蛋白质羰基含量(protein carbonyl content, PCO)作为抗氧化功能评价的生物标志物进行测定。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

姜黄素(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),胃蛋白酶抑制剂(Roche 公司),PMSF(Sigma-Aldrich 公司),亮抑酶肽(Amresco 公司),HEPES(Sigma-Aldrich 公司),盐酸胍(Sigma-Aldrich 公司),蛋白酶抑制剂、硫酸链霉素购于 Amresco 公司,维生素 C、2, 4-二硝基苯胍、羧甲基纤维素钠、无水乙醇购于北京化工厂,均为分析纯;MDA、SOD、TAC 等试剂盒购于南京建成生物制品研究所。

UV-9100 型紫外-可见分光光度计,电动玻璃匀浆机,小型三用恒温水浴箱,低温高速离心机。

### 1.2 实验动物

健康昆明雄性小鼠 60 只,清洁级,8 周龄,体重  $25 \pm 2$  g,由中国医学科学院实验动物研究所提供[SYXK(京)2002-0016],并在中国疾病预防控制中心营养与食品安全所清洁级动物房内饲养[SYXK(京)2003-0006],自由摄食、饮水。动物房内温度  $21 \sim 23$  °C,相对湿度 65% ~ 75%。试验经中国疾病预防控制中心伦理委员会批准。

### 1.3 受试物配制

0.5% CMC-Na: CMC-Na 与蒸馏水适量混合,25% (W/V) 酒精:以 0.5% CMC-Na 与无水乙醇适量混合。

预防性干预期:姜黄素混悬液:0.5% CMC-Na 与姜黄素适量混合;维生素 C 混悬液:0.5% CMC-Na 与维生素 C 适量混合。

实验期:姜黄素混悬液:25% (W/V) 的酒精与姜黄素适量混合;维生素 C 混悬液:25% (W/V) 的酒精与维生素 C 适量混合。

### 1.4 动物分组与处理

实验小鼠动物房环境适应 1 周后进入实验周期,按其体重随机分为 5 组,每组 12 只,即正常对照组、酒精模型组、低剂量姜黄素组、高剂量姜黄素组,维生素 C 阳性对照组。

实验周期维持 5 周,分为前后 2 个时期。小鼠灌胃体积为  $0.2 \text{ ml}/10 \text{ g} \cdot \text{BW}$ ,每隔 3 天称体重 1 次。

实验第 1 周为预防性干预期,给予正常对照组、酒精模型组小鼠以 0.5% CMC-Na 混悬液灌胃,分

别给予低、高剂量姜黄素组  $10$ 、 $30 \text{ mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$  姜黄素混悬液,给予维生素 C 阳性对照组小鼠  $75 \text{ mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$  维生素 C 混悬液灌胃,进行预防性干预处理。

自实验第 2 周至第 5 周,给予正常对照组小鼠以 0.5% CMC-Na 灌胃,给予酒精模型组小鼠以 25% (W/V) 浓度的酒精灌胃,低剂量、高剂量姜黄素组小鼠继续分别灌胃  $10$ 、 $30 \text{ mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$  姜黄素混悬液,给予维生素 C 阳性对照组小鼠继续灌胃  $75 \text{ mg}/\text{kg} \cdot \text{BW}$  维生素 C 混悬液。实验结束后,经眼静脉取血立即测定相关生化指标,同时施予颈椎拖法处死全部小鼠,取肝脏用生理盐水洗净后,  $-80$  °C 储存待测。

### 1.5 指标的测定

取血,于  $4$  °C,  $3000 \text{ r}/\text{min}$  离心  $10 \text{ min}$ ,按试剂盒说明书分别测定血浆总抗氧化能力(TAC),超氧化物歧化酶(SOD)活性,谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性。

取肝脏加入适量 0.9% 的生理盐水后将组织制成 10% 的匀浆液,以  $1600 \text{ g}$  离心  $10 \text{ min}$  后,测定肝组织中的 SOD、GPx、脂质过氧化物含量(MDA)及 PCO<sup>[14,15]</sup>,并在肝脏匀浆离心后,按照考马斯亮蓝试剂盒说明书测定其蛋白质含量。

### 1.6 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件对结果进行处理,数据以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;各组数据进行单因素方差分析,比较各组间生化指标的差异是否具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 血浆 SOD、GPx 和 TAC 结果

从表 1 可知,酒精模型组血浆中 GPx 活性低于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明长期灌胃低浓度酒精对于实验小鼠具有氧化损伤作用;低、高剂量姜黄素组血浆 GPx 活性高于酒精模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示姜黄素对机体具有一定程度的抗氧化损伤作用。与正常对照组比较,各组的血浆 SOD 活性均有不同程度的升高,且酒精模型组 SOD 活性与正常对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示在酒精与姜黄素的双重作用下,机体内可能发生较为复杂的应激反应。结果见表 1。

### 2.2 肝组织 SOD、GPx、MDA 和 PCO 结果

从表 2 可见,酒精模型组肝脏中 GPx 活性低于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );PCO 高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两项

表1 各实验组小鼠血浆生化指标的测定结果分析

| 组别        | GPx(mol/g)                | SOD(U/mg)                   | TAC(U/ml)      |
|-----------|---------------------------|-----------------------------|----------------|
| 正常对照组     | 20.68 ± 0.98              | 125.01 ± 14.38              | 268.68 ± 52.52 |
| 酒精模型组     | 17.53 ± 1.46 <sup>b</sup> | 166.35 ± 28.05 <sup>b</sup> | 268.64 ± 23.79 |
| 低剂量姜黄素组   | 19.84 ± 1.00 <sup>a</sup> | 156.95 ± 39.73              | 289.83 ± 36.24 |
| 高剂量姜黄素组   | 20.32 ± 1.32 <sup>a</sup> | 161.54 ± 28.78              | 276.28 ± 34.51 |
| 维生素C阳性对照组 | 18.65 ± 1.68              | 165.36 ± 23.45              | 272.54 ± 33.80 |

注:<sup>a</sup>表示与酒精模型组相比, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>表示与正常对照组相比, $P < 0.05$ 。

结果表明,长期摄入低浓度酒精,可引起肝脏组织的氧化损伤;PCO可作为蛋白质氧化损伤的生物标志物进行检测。脂质氧化损伤指标丙二醛(MDA)各组含量略有变化,其中酒精模型组肝脏中MDA含量高于正常对照组,但组内变异较大,差异无统计学

意义;高剂量姜黄素组肝脏MDA含量高于正常对照组,而维生素C阳性对照组MDA含量低于酒精模型组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示维生素C对机体有抗氧化作用。结果见表2。

表2 各实验组小鼠肝组织生化指标测定结果

| 组别        | GPx(mol/g min)           | SOD(U/mg prot) | MDA(nmol/mg prot)        | PCO(U/mg prot)             |
|-----------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|
| 正常对照组     | 4.09 ± 0.38              | 237.34 ± 20.59 | 1.10 ± 0.30              | 0.483 ± 0.08               |
| 酒精模型组     | 3.52 ± 0.49 <sup>b</sup> | 240.62 ± 8.31  | 1.53 ± 0.82              | 0.605 ± 0.045 <sup>b</sup> |
| 低剂量姜黄素组   | 3.54 ± 0.73              | 216.62 ± 30.65 | 1.25 ± 0.30              | 0.543 ± 0.133              |
| 高剂量姜黄素组   | 3.63 ± 0.78              | 236.11 ± 35.10 | 1.64 ± 0.22 <sup>b</sup> | 0.501 ± 0.080              |
| 维生素C阳性对照组 | 3.38 ± 0.53              | 228.16 ± 33.85 | 0.97 ± 0.33 <sup>a</sup> | 0.490 ± 0.136              |

注:<sup>a</sup>表示与酒精模型组相比, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>表示与正常对照组相比, $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

酒精是一种具有高渗透性的氧化应激源,在体内代谢可诱发ROS、RNS的过量产生及不利微环境的形成,进而在机体内部组织器官引起氧化应激损伤<sup>[2,16]</sup>。给予氧化应激/衰老状态的实验动物或人体补充外源抗氧化生物活性因子,以缓解机体因氧化应激造成的损伤,预防和降低退行性疾病发生的做法,已得到了广大学者和专家的认同和支持<sup>[17,18]</sup>。姜黄素在人类有着悠久食用历史,其抗氧化活性更是受到民族医学的青睐<sup>[19]</sup>,其作为外源抗氧化生物活性因子,在本次实验中得到验证。

在本次实验中,由于对小鼠种属的选择与相关文献报道上有所不同<sup>[20-22]</sup>,因而可能影响了某些指标的稳定性。为此,该酒精诱导的氧化应激小鼠模型,在实验干预措施的选择上仍有待改进;尤其是在给予的酒精剂量、持续灌胃时间的选择上需要进一步摸索。实验中,酒精模型组的血浆GPx活性与酒精模型组肝脏中GPx活性均低于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明长期摄入低浓度的酒精对实验小鼠具有氧化损伤作用;低、高剂量姜黄素组血浆GPx活性高于酒精模型组,提示姜黄素具有抗氧化活性,对机体具有一定程度的保护作用。血浆SOD酶活性变异的发生,提示机体处于氧化应激状态下,可能会因抗氧化酶各自的灵敏度、反应速率或体内存量的不同而呈现差异性结局。脂质氧化损伤产物MDA和蛋白质氧化损伤产物PCO,二者均是反映氧化应激状态下机体受损伤严重程度的生物标志物。但PCO的检测与MDA相比更具有敏感

性的特点,在本次实验中也得到了确认,并与Raghavendra和Kulkarni<sup>[23]</sup>的研究结论一致。

基于氧自由基理论的干预性研究,需要建立较完善的动物实验模型;而选取灵敏度高的检测指标及方法,尤其是针对机体内部抗氧化系统氧化损伤后产物,选择的特异性指标显得更为重要。但是,对于机体酶系指标的测定常存在局限性,甚至有时难以对机体内部的氧化应激状况做出合理的解释。而且,测定反映机体损伤程度的指标,如MDA,目前的检测方法本身存在假阳性的缺陷<sup>[24]</sup>。所以,本次实验紧随国际抗氧化研究的最新进展<sup>[14,25]</sup>,将PCO纳为氧化应激损伤的生物标志物之一;在实验中证实其可作为有效生物标志物,补充抗氧化功能性评价的方法。

### 参考文献

- [1] WU Dong-mei, ZHAI Qi-wei, SHI Xiang-lin. Alcohol-induced oxidative stress and cell responses [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21: 26-29.
- [2] SERGENT O, GRIFFON B, CILLARD P, et al. Alcohol and oxidative stress [J]. Pathologie Biologie, 2001, 49 (9): 689-695.
- [3] SINGLETARY K W, GAPSTUR S M. Alcohol and breast cancer [J]. JAMA, 2001, 286(17): 2143-2151.
- [4] PETERSEN D R. Alcohol, iron associated oxidative stress, and cancer [J]. Alcohol, 2005, 35: 243-249.
- [5] SCOTT R B, REDDY K S, HUSAIN K, et al. Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung and kidney in rat [J]. Pathophysiology, 2000, 7: 25-32.
- [6] OSVALDOR K, PANI G, BORRELLO S, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol induced cell injury [J]. Molecul Aspect Med, 2004, 25:191-198.

- [ 7 ] ENACHE M, van WAES V, VINNER E, et al. Impact of an acute exposure to ethanol on the oxidative stress status in the hippocampus of prenatal restraint stress adolescent male rats [J]. *Brain Res*, 2008, 55-62.
- [ 8 ] MOLINA M F, SANCHEZ-REUS I, IGLESIAS I, et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(10): 1398-1402.
- [ 9 ] KOCH O, FARRE S, de-LEO M E, et al. Regulation of manganese superoxide dismutase ( MnSOD ) in chronic experiment alcoholism; effects of vitamin E-supplemented and deficient diets [J]. *Alcohol Alcoholism*, 2000, 35: 159-163.
- [ 10 ] OZARAS R, TAHAN V, AYDIN S, et al. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rat [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 125-128.
- [ 11 ] PRIYADARSINI K I, MAITY D K, NAIK G H, et al. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(5): 475-484.
- [ 12 ] AK T, GULCIN I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 174(1): 27-37.
- [ 13 ] RUBY A J, KUTTAN G, BABU K D, et al. Antitumor and antioxidant activity of natural curcuminoids [J]. *Cancer Lett*, 1995, 94: 79-83.
- [ 14 ] 段丽菊,刘英帅,朱燕,等. DNPH 比色法:一种简单的蛋白质羰基含量测定方法 [J]. *毒理学杂志*, 2005, 19(4): 320-322.
- [ 15 ] LEVINE R L, GARLAND D, OLIVER C N, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [J]. *Methods Enzymol*, 1990, 186: 464-478.
- [ 16 ] SUBIR K D, VASUDEVAN D M. Alcohol-induced oxidative stress [J]. *Life Sc*, 2007, 81: 177-187.
- [ 17 ] DASGUPTA N, DE B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study [J]. *Food Chem*, 2006, 101: 471-474.
- [ 18 ] HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease [J]. *Annu Rev Nutr*, 1997, 16: 33-50.
- [ 19 ] BARCLAY L R C, VINQVIST M R, MUKAI M, et al. On the antioxidant mechanism of curcumin: Classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity [J]. *Org Lett*, 2000, 2: 2841-2843.
- [ 20 ] MCDONOUGH K H. Antioxidant nutrients and alcohol [J]. *Toxicology*, 2003, 189: 89-97.
- [ 21 ] BALASUBRAMANIYAN V, KALAIVANISAILAJA J, NALINI N. Role of leptinon alcohol induced oxidative stress in Swiss mice [J]. *Pharmacolog Res*, 2003, 47: 211-216.
- [ 22 ] PUSHPAKIRAN G, MAHALAKSHMI K, ANURADHA C V. Taurine restores ethanol induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat [J]. *Amino Acids*, 2004, 27: 91-96.
- [ 23 ] RAGHAVENDRA V, KULKARNI S K. Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30: 595-602.
- [ 24 ] GROTTO D, SANTA MARIA L D, BOEIRA S, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography visible detection [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2007, 43(2): 619-624.
- [ 25 ] MARIA B K, BETH C G, DONNA D B, et al. Biomarkers of oxidative stress study: are plasma antioxidants markers of CCl4 poisoning [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(6): 838-845.

## 法规文件

# 卫生部监督局关于公开征求取消《食品中污染物限量》 标准中硒指标意见的函

卫监督食便函[2010] 087号

各有关单位:

根据食品安全风险评估结果,拟取消《食品中污染物限量》(GB 2762—2005)中硒限量指标。现公开征求意见,请于2010年5月24日前按以下方式反馈意见:传真010-67711813或电子信箱 food204@163.com。

二〇一〇年三月二十六日