

苜蓿总黄酮对小鼠脂类代谢及氧自由基的影响

李宝兰¹, 张咏梅², 卢小康¹, 邓海平³, 刘英¹, 曹致中²

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070;

3. 西北师范大学生命科学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为了明确观察苜蓿总黄酮(TFA)对小鼠脂类代谢和氧自由基的影响,给5周龄的小白鼠灌胃TFA,连续1周后,采用生化方法测定小鼠全血中甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇的含量,并且检测小鼠肝脏和肾脏组织中过氧化物歧化酶的活性和丙二醛的含量。结果显示:灌胃TFA的小鼠全血中甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇的含量明显降低($P < 0.05$),而高密度脂蛋白胆固醇含量升高。小鼠的肝脏和肾脏组织匀浆中过氧化物歧化酶的活性显著升高($P < 0.05$),丙二醛的含量降低。因此得出结论:TFA具有降血脂、降低低密度脂蛋白胆固醇、预防和减轻动脉硬化的作用;同时也具有抑制氧自由基损伤防止脂质过氧化的作用。

关键词:苜蓿总黄酮;降血脂;抗氧化;脂类代谢;氧自由基

中图分类号: S865.1⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2009)08-0093-04

① 紫花苜蓿 *Medicago sativa* 是世界上广泛种植的一种多年生优质豆科牧草,有“牧草之王”的美誉,在我国已有 2 000 多年的栽培历史^[1]。黄酮类化合物是一类天然、具有抗氧化活性的化合物,广泛存在于植物体内。紫花苜蓿作为世界上栽培历史悠久、种植面积最大的一种多年生豆科牧草,其内也含有丰富的黄酮类化合物^[2]。何春年等^[3]也提出苜蓿属植物含有的次生代谢产物主要为皂苷和黄酮类物质。Malinow 等^[4]曾报道,苜蓿皂甙可以显著降低血清胆固醇,其机制包括:防止内、外源性胆固醇在肠中吸收,并可促进胆固醇降解成胆酸排出。试验还证实,苜蓿皂甙能使试验动物冠状动脉和主动脉 AS 病变明显消退。因此,苜蓿皂甙被认为是一种有希望的抗 AS 药物。王成章等^[5]通过研究苜蓿草粉对产蛋鸡蛋黄中胆固醇含量的影响发现,随着苜蓿草粉添加水平的提高,每克蛋黄中胆固醇含量和鸡蛋中胆固醇含量逐渐降低。但迄今为止,人们对紫花苜蓿中黄酮类化合物的抗氧化作用、免疫以及其它药理作用的探索却少见报道。本试验采用灌胃苜蓿总黄酮(TFA)的方法,探索 TFA 对小鼠全血中血浆脂蛋白含量的影响以及对组织的抗氧化作用,以期苜蓿总黄酮在降血脂,预防和减轻动脉硬化以及抗氧化方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 采取甘农三号紫花苜蓿整株,用 40%乙醇的苜蓿浸提液,去除蛋白质和皂苷后的苜蓿粗黄酮和多糖的棕色混合液,以黄酮含量作为提取液试验标准,测得提取液黄酮质量浓度为 5.12 mg/mL,由甘肃农业大学草业学院提供;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒,购于南京建成生物工程研究所;甘油三酯液体试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒和高密度脂蛋白胆固醇试剂盒,均购自上海申能一德赛诊断技术有限公司。主要仪器为:日立 7180 全自动生化分析仪,Lightware S2000 US/Vis Spectrophotometer 紫外/可见分光光度计,隔水式电热恒温培养箱 WMK-08 型。

1.2 动物及试验分组 清洁级昆明小鼠由兰州大学医学院提供。选 5 周龄小鼠 30 只,体质量 18~22 g,雌雄兼半,随机分为 3 组,每组 10 只。即:生理盐水组、TFA 低剂量组(40 mg/kg)和高剂量组(80 mg/kg),对每组小鼠编号如表 1。

① 收稿日期:2008-09-20

基金项目:国家科技支撑计划奶牛优质饲草生产技术研究及开发(2006BAD04A04-01)

作者简介:李宝兰(1981-),女,山西孟县人,在读硕士生,研究方向为动物解剖学与组织胚胎学。

E-mail:libaolan2008@yahoo.cn

通信作者:曹致中 E-mail:caozh@gsau.edu.cn

表1 生理盐水对照组、TFA 低剂量组和高剂量组试验用小鼠编号

分组	性别	年龄	平均体质量(g)
生理盐水对照组(S)	雌(F)雄(M)各半	5 周龄	20.8
低剂量组(40 mg/kg)(D)	雌(F)雄(M)各半	5 周龄	21.3
高剂量组(80 mg/kg)(G)	雌(F)雄(M)各半	5 周龄	21.5

小鼠灌胃给药和给生理盐水,灌胃容积为0.5 mL/只,每天1次,连续1周。各组小鼠于末次给药后次日称量并摘取眼球采血入dof管置于一80℃冻存待测。迅速处死小鼠,剖取肝脏和肾脏,用预冷的生理盐水冲洗表面残血,滤纸吸干水分称量后制备成组织匀浆于一80℃冻存待测。

1.3 小鼠全血中 TG、LDL-C 和 HDL-C 含量的测定 用日立全自动生化分析仪测定血清中的甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的值。

TG 采用酶试剂法,脂蛋白酯酶、甘油激酶、甘油-3-磷酸氧化酶、过氧化物酶、Trinder 反应偶联比色终点法^[6]; LDL-C 采用均相方法^[7]; HDL-C 采用第3代均相法^[8]。

1.4 小鼠肝脏和肾脏中 SOD 以及 MDA 含量的测定 取肝脏和肾脏 0.5~1.0 g,在冷生理盐水中漂洗去掉血液并用滤纸吸干水分,称量后放入 5 mL 小烧杯中。用移液器量取体积是组织块质量 9 倍的 0.86% 预冷的生理盐水,并将其 2/3 移入小烧杯中,用眼科小剪尽快剪碎组织块,这一过程要在冰水浴中进行。将剪碎的组织块倒入玻璃匀浆管中,再将剩余的 1/3 的生理盐水冲洗残留在烧杯中的碎组织块,一起倒入玻璃匀浆管中进行匀浆,充分研碎使匀浆化。组织匀浆制备好后按试剂盒说明书进行 SOD 和 MDA 含量测定。

1.5 统计学分析 试验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm S$)表示,采用 Statgraphics Plus 统计软件

和 Microsoft Excel 软件处理,组间差异显著性采用 *T* 检验, $P < 0.05$ 为显著性标准。

2 结果与分析

2.1 TFA 对小鼠全血中 TG、LDL-C 和 HDL-C 含量的影响 灌胃 TFA 的小鼠全血中 TG 和 LDL-C 的含量显著低于生理盐水对照组($P < 0.05$),而 HDL-C 的含量却比生理盐水组高($P < 0.05$),而且低剂量组中 HDL-C 的含量是最高的(表 2)。

2.2 TFA 对小鼠肝脏和肾脏组织中 SOD 活性以及 MDA 含量的影响 灌胃 TFA 的小鼠肝脏和肾脏组织匀浆中 SOD 酶活性明显高于生理盐水对照组($P < 0.05$),而且随着 TFA 剂量的加大,SOD 值也在增大;而试验组中 MDA 的含量显著低于对照组($P < 0.05$),而且灌胃给予低剂量 TFA 的小鼠肝脏中 MDA 的值比高剂量组的值还低,肾脏中 MDA 的值仍然是灌胃 TFA 的高剂量组的值小(表 3)。

3 讨论与结论

3.1 苜蓿总黄酮对小鼠血液生化指标的影响 目前,医学研究领域中最普遍而且能导致人类死亡的第一大疾病即为心血管疾病。膳食中脂肪的含量与心血管疾病的发生有着密切的关系^[9]。TG 作为一种重要的储能脂质,与心血管疾病的危险性成正相关性。主要是因为 TG 含量的增高会导致脂蛋白部分变性,使 LDL-C 在体内

表2 TFA 对小鼠全血中 TG、LDL-C 和 HDL-C 含量的影响

分组	TG(mg/mL)	LDL-C(mmol/mL)	HDL-C(mmol/mL)
对照组	0.88±0.18	0.60±0.36	1.50±0.25
TFA 低剂量组	0.76*±0.19	0.53*±0.37	1.62*±0.25
TFA 高剂量组	0.79*±0.23	0.54*±0.14	1.61*±0.38

注:*表示与生理盐水组比较,差异显著($P < 0.05$)。下表同。

表3 TFA对小鼠肝脏和肾脏组织匀浆中SOD活性和MDA含量的影响

分组	SOD(mmol/L)		MDA(nmol/mL)	
	肝脏	肾脏	肝脏	肾脏
对照组	135.20±53.79	118.88±48.15	20.00±10.00	25.00±12.91
TFA 低剂量组	275.00* ±143.61	168.75* ±76.53	18.14* ±8.35	15.43* ±6.48
TFA 高剂量组	223.88* ±111.00	165.75* ±85.17	18.21* ±8.73	13.80* ±6.54

沉积,从而诱发动脉硬化的发生。同时,血浆中LDL-C水平高而HDL-C低时,也极易发生心血管疾病。主要是由于血浆中高水平的LDL-C极易被氧自由基氧化,从而导致脂蛋白变性而沉积于血管内引起动脉的粥样硬化^[10]。因此,有效降低TG和LDL-C在血液中的含量,已成为生命科学领域的一项重要课题。雷祖玉等^[7]研究苜蓿总甙对AA肉仔鸡脂类代谢及生产性能的影响表明,苜蓿黄酮对肉仔鸡具有降低腹脂肪、降低胆固醇的功能。而试验结果显示,小鼠灌胃TFA后,小鼠全血中TG和LDL-C的含量明显降低($P<0.05$),HDL-C含量却增加,而且灌胃TFA的低剂量试验组中HDL-C的值是最高的($P<0.05$)。说明TFA可以通过降低TG以及LDL-C在动脉中的沉积来抑制血脂的升高和动脉硬化的发生。

3.2 苜蓿总黄酮对小鼠组织中氧自由基的影响 医学研究显示,困扰人类的许多疾病如肿瘤、冠心病、心血管疾病和衰老均与自由基引起的膜脂质氧化性损伤和DNA受损有关^[11]。膜脂质过氧化作用的机理为^[8],膜表面高浓度的氧与还原剂发生自由基的链式反应,反应终产物(主要是MDA的产物)引起膜蛋白的共价交联与聚合,使膜处于永久性缔合状态,严重影响了膜蛋白的流动性,导致膜功能的损害。在正常情况下,机体内存在一个自由基的清除系统,使自由基的产生与清除处于动态的平衡之中(自由基清除系统包括SOD等)^[12]。因此,MDA、SOD含量变化以及活性高低可以反映机体内氧自由基的清除能力,即机体的抗氧化能力。

近年来,朱宇旌等^[2]研究苜蓿黄酮对猪油的抗氧化性作用表明,添加苜蓿黄酮粗提物对猪油具有明显的协同抗氧化作用。由此提示苜蓿黄酮可能具有很强的抗氧化作用。而试验结果显示,

小鼠灌胃TFA后,在小鼠的肝脏和肾脏组织匀浆中,SOD的酶活性明显升高而MDA的含量显著降低($P<0.05$)。说明苜蓿黄酮可通过提高抗氧化酶的活性来增强机体清除氧自由基的能力,抑制自由基的损伤,防止脂质过氧化,提高机体抗氧化的能力。

3.3 苜蓿总黄酮发展存在的问题与应用前景

我国是紫花苜蓿种植面积最大的国家之一,长期以来,对紫花苜蓿的综合利用多局限于草粉和青绿苜蓿,关于精深加工和综合利用方面报道很少,目前对于紫花苜蓿中如皂甙、黄酮、多糖等功能因子和叶蛋白的深入研究和开发利用很少^[13]。虽然苜蓿皂甙的研究已取得了一定的效果^[14],紫花苜蓿中多糖等功能因子的研究也有报道^[15],但是对于苜蓿总黄酮抗氧化性作用以及降血脂等生理作用的研究还很少,生产总黄酮的原料苜蓿草粉的来源、品质得不到保证,其总黄酮随苜蓿的收割期、加工方式的不同变异太大,其在饲料配方中应用的比例、经济性也不容忽视,因而限制了其在饲料工业中的应用。而且,苜蓿总黄酮的加工技术不完善,其生产成本低,就国内来说,目前还局限于实验室研究生产,远未达到商业化生产的水平。同时,苜蓿总黄酮对人和动物的影响和作用机理有待通过更多的试验进一步验证。再者,目前的苜蓿总黄酮多为粗制品,其化学结构不明确,质量也很难控制,这使其效果存在很大的差异。并且总黄酮的生物活性和它的结构有密切关系,但目前对苜蓿总黄酮结构的研究还比较少,其结构测定方法未达到自动化、微量化和标准化。因此对苜蓿总黄酮的结构与功能的关系还不十分清楚;苜蓿总黄酮在体内的作用机制还不十分明了,有待进一步的研究。

苜蓿总黄酮毒性低,开发成有用的降血脂及治

疗冠心病的药物,是很有价值的,这对实现苜蓿资源的深层次开发,开辟苜蓿新的应用途径,提高苜蓿产品的经济附加值和科技含量,都有重要的意义。苜蓿总黄酮的开发已逐渐深入到食品、保健、医药和日用化工等多个领域,应用前景非常广阔。

参考文献

- [1] 王鑫,马永祥,李娟. 紫花苜蓿营养成分及主要生物学特性[J]. 草业科学, 2003, 20(10): 39-41.
- [2] 朱宇旌,李新华,张勇,等. 苜蓿黄酮抗氧化性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4): 615-618.
- [3] 何春年,李展,高微微,等. 苜蓿属植物的黄酮类化学成分研究概况[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(8): 565-568.
- [4] Malfnow M R. Alfalfa seeds Effects on cholesterol metabolism[J]. *Experientia*, 1980, 36(2): 662-665.
- [5] 王成章,杨雨鑫,胡喜峰,等. 不同苜蓿草粉水平对产蛋鸡蛋黄胆固醇含量影响的研究[J]. 草业学报, 2005, 14(2): 76-83.
- [6] Rifai N, Bachorik P S, Albers J J. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins[A]. Burtis C A, Ashwood R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* [M]. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders company, 1999: 809-861.
- [7] Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, *et al.* IFCC primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37. Part 3: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase [J]. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002, 40: 643-648.
- [8] Bachorik P S. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol[A]. Rifai N, Warnick G R, Dominiczak M H. *Handbook of lipoprotein testing* [M]. Washington: AACC press, 1997: 145-160.
- [9] 雷祖玉,韩卫涛,冯学勤. 苜蓿总甙对AA肉仔鸡脂类代谢及生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2002, 18: 9-10.
- [10] 沈同,王镜岩. 生物化学[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990: 44-78.
- [11] Hahn S M, Sullivan F J, Deluca A M, *et al.* Evaluation of tempol radioprotection in a murine tumor model[J]. *Free Radiac. Boil. Med.*, 1997, 22(7): 1211.
- [12] 严丽荣,周宏图,陈爱娟,等. 老年脑梗死患者高压氧治疗前后血清一氧化氮、过氧化物歧化酶、丙二醛含量的变化[J]. 重庆医学, 2004, 33(3): 331.
- [13] 潘俊良,李振田,王成章,等. 苜蓿草粉在动物饲料中的应用[J]. 饲料研究, 2006, 63(3): 63-65.
- [14] 樊文娜,王成章,史鹏飞,等. 苜蓿皂甙的研究应用进展[J]. 草业科学, 2008, 25(11): 65-69.
- [15] 王彦华,王成章,史莹华,等. 苜蓿多糖的研究进展[J]. 草业科学, 2007, 24(4): 50-55.

Impact of total flavone of alfalfa on the lipid metabolism and oxygen-derived free radicals in mice

LI Bao-lan¹, ZHANG Yong-mei², LU Xiao-kang¹, DENG Hai-ping³, LIU Ying¹, CAO Zhi-zhong²

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The impact of total flavone of alfalfa (TFA) on the lipid metabolism and oxygen-derived free radicals in mice studied. After the mice were drenched with TFA for seven days, the contents of tri-glyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) in blood as well as the activities of superoxide dismutase (SOD) and malonaldehyde (MDA) in liver and ren were determined by biochemical methods. In TFA group, the contents of TG and LDL in blood and MDA in tissues were obviously reduced ($P < 0.05$), but HDL-C content was high, and the activities of SOD in tissues were significantly increased ($P < 0.05$). So it could be concluded that TFA could perform the function of reducing TG and LDL as well as preventing angiosclerosis, and at the same time, it could obviously inhibit the damage from oxygen-derived free radicals and prevent lipid peroxidation.

Key words: total flavone of alfalfa; blood fat; antioxidation; lipid metabolism; oxygen-derived free radical