

茶多酚-淀粉复合体系 对D-半乳糖所致衰老小鼠的保护作用

王明珠 张根义

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:目的: 探讨茶多酚-淀粉复合体系对 D-半乳糖诱导的快速衰老小鼠的保护作用。方法: 采用 1.25mg/kg bw · d D-半乳糖腹腔注射小鼠致快速老化, 同时分别饲喂茶多酚(TP)-高直链淀粉复合饲料、茶多酚饲料和普通生长繁殖饲料, 观察小鼠生活状态, 记录小鼠体重变化情况和摄食量, 测定葡萄糖耐量变化情况; 观察饲料对小鼠免疫器官指数、肝、脑组织脂褐素含量的影响; 测定小鼠血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白(HDLC)、低密度脂蛋白(LDLC)水平; 测定血清和肝脏丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果: 该茶多酚-淀粉复合体系能够部分抑制 D-半乳糖引发的小鼠快速衰老。能够使小鼠体重维持较为稳定, 提高衰老小鼠对葡萄糖的耐受量。同时能够降低肝、脑脂褐素含量, 略微降低血清中总胆固醇和甘油三酯含量。能够对血清和肝脏中抗氧化酶的破坏起到部分保护作用, 减少 MDA 含量。

关键词: 茶多酚, 高直链淀粉, D-半乳糖, 衰老

Protective effects of tea polyphenol-starch composite diet on aging mice induced by D-galactose

WANG Ming-zhu, ZHANG Gen-yi

(School of Food Science and technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract [Objective] To examine the protective effects of tea polyphenol-starch composite diet on aging mice induced by D-galactose. [Method] Mice were injected 1.25mg/kg bw D-galactose once a day while fed with different diets including TP-high amylose diet, TP diet and normal diet for different groups. The life conditions of mice were carefully observed and the changes of bodyweight were recorded. The glucose tolerance test was measured at the last period of experiment. The immune organ index, content of lipofuscin brain and liver were measured respectively at the end of the experiment. In the mean time, the content of serum fat and MDA as well as the activities of SOD, GSH-Px, CAT in blood and liver were also studied. [Conclusion] The TP-high amylose diet showed a protection effect on the aging of mice and it might be used in functional food development as an anti-ageing diet component.

Key words: tea polyphenol; high amylose starch; D-galactose; aging

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)11-0390-04

慢消化淀粉(SDS)能够维持一个稳定、持久的血糖水平,这对人体健康的益处是不言而喻的^[1-2]。近年来国际上对慢消化淀粉的研究日益重视,但是至今市场上仍然没有价格低廉、来源广泛、适合商业销售的慢消化淀粉产品,国内对于 SDS 的研究则更少之又少。现在随着对人体健康的越来越关注,此方面的研究已经开始逐步得到重视。茶多酚是一种具有多种生物活性的功能性物质,国内外对其降糖、降血脂、抗氧化等活性多有研究,茶多酚对糖尿病及其

并发症改善作用的研究尤其热门^[3-5]。半乳糖是动物体内的正常代谢产物,体内半乳糖及其代谢物浓度异常升高可致代谢障碍,导致机体老化症状的出现,累及肝脏、肾脏、脑组织和晶状体,可引发白内障、肝肿大、肝硬化等并发症^[6]。采用具有控制血糖和抗氧化的功能食品有可能延缓衰老的发生,对于提高老年人的生活质量具有重要意义。本文将采用高直链玉米淀粉和茶多酚一起探讨它们对小鼠老化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

99%茶多酚 日照力德士化工有限公司;高直链淀粉 国民淀粉公司;抗性淀粉 杭州纸友科技有限公司;D-半乳糖 生物级,国药集团;硫酸奎宁

收稿日期:2010-11-08

作者简介:王明珠(1986-),女,硕士,研究方向:碳水化合物营养。

基金项目:国家自然科学基金项目(21076095)。

生物级 阿拉丁试剂; 总胆固醇、甘油三酯、HDLc、LDLc 试剂盒 SOD、CAT、GSH-Px、MDA 试剂盒 南京建成生物试剂生物工程研究所。

1.2 动物饲料制作

动物饲料营养配方由上海斯莱克动物实验中心提供。其中蛋白质、脂肪、碳水化合物所占比例分别为 19.2%、67.3% 和 4.3% ,此外还包括维生素与矿物质等成分。以不同碳水化合物代替普通饲料中的碳水化合物组分 ,与其他组分混合均匀后造粒 ,晾干待用。各组饲料中所使用的碳水化合物组分如下:

a.高直链淀粉组:高直链淀粉加入 5% (w/w) 的茶多酚后 ,置于高压锅中糊化 20min ,所得产品喷雾干燥 ,再加入 5% 茶多酚 ,混合均匀。

b.茶多酚组:维持原配比中碳水化合物不变 ,加入占碳水化合物 10% (w/w) 的茶多酚。

c.模型对照组:维持原组分不变。

1.3 实验动物与设计

雄性昆明小鼠 30 只 ,购于上海斯莱克实验动物研究中心 ,平均体重 25~30g。所有小鼠随机分成 3 组 ,每组 10 只。小鼠进入实验室后适应性喂养一周。各组小鼠均按每日 1.25mg/kg bw 腹腔注射 D-半乳糖^[7-8] ,高直链淀粉组、茶多酚组 ,分别饲喂相应饲料 ,模型对照组饲喂普通饲料。各组小鼠分养于塑料不锈钢笼内 ,自由进食 ,饮用煮沸冷却的自来水。实验期间每日观察小鼠生活状态 ,记录小鼠摄食情况 ,每周称量小鼠体重。于实验初期和末期分别对各组小鼠葡萄糖耐量进行测定。实验第 24d ,小鼠隔夜禁食后 ,脱颈椎处死。

1.4 指标测定

1.4.1 葡萄糖耐量测定 灌胃小鼠 1g/kg bw 葡萄糖 ,于灌胃后 0、15、30、45、60、90、120min 分别于尾静脉取血测定葡萄糖含量。

1.4.2 免疫器官指数测定 剥离胸腺和脾脏 ,滤纸吸干残血 ,用电子天平称重。计算胸腺指数 [胸腺重量(mg) / 体重(g)] 和脾脏指数 [脾脏重量(mg) / 体重(g)]。

1.4.3 血清 SOD、GSH-Px、CAT 活力测定及 MDA 含量测定 摘眼球取血 ,分离血清 ,参照试剂盒说明测定血清总胆固醇、甘油三酯、HDLc、LDLc 水平 ,MDA 含量 ,SOD、GSH-Px 和 CAT 活力。

1.4.4 肝、脑脂褐素含量测定及肝脏 SOD、GSH-Px、CAT 活力测定及 MDA 含量测定 分离小鼠肝、脑组织。分别取 100mg 采用氯仿/甲醇(2:1) 2mL 匀浆 ,再加 2mL 蒸馏水剧烈振荡 3min ,3000r/min 离心 10min ,吸取氯仿层于另一试管中 ,加氯仿 5mL ,紫外灯照射 30s ,以硫酸奎宁为标准品 ,采用荧光分光光度计测定肝、脑脂褐素含量。激发波长 360nm ,发射波长 450nm。剩余组织匀浆及处理方法参照试剂盒说明 ,测定 MDA 含量 ,SOD、GSH-Px 和 CAT 活力。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 进行统计学分析 ,p < 0.05 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 实验期间小鼠体重变化情况

实验初期 ,各小组小鼠随机分组 ,进食、饮水正常。随实验进行 ,老化小鼠出现行动迟缓、精神萎靡、毛发变黄、失去光泽等症状。高直链淀粉组和茶多酚组小鼠在实验初期适应阶段体重出现明显下降 ,随后逐渐趋于稳定。模型对照组老鼠在实验后期随老化程度加剧体重发生缓慢下降。

表 1 实验期间小鼠体重变化(g)

组别	时间(周)			
	1	2	3	4
高直链淀粉组	45.48 ± 1.55	37.43 ± 1.38	31.60 ± 1.23	31.98 ± 0.60
茶多酚组	44.80 ± 0.68	39.35 ± 0.55	34.60 ± 1.05	33.12 ± 1.00
模型对照组	42.95 ± 0.80	43.49 ± 1.00	40.58 ± 0.28	40.23 ± 0.89

2.2 茶多酚-淀粉复合体系对衰老小鼠葡萄糖耐量的影响

王双^[9]等人对自然衰老大鼠糖耐量的研究表明 ,与 6 月龄和 12 月龄的大鼠相比 ,20~24 月龄大鼠空腹血糖水平有增高 ,并且老年鼠即使在空腹血糖正常时也具备胰岛素抵抗的某些特征。据 pozetsky 等^[10]报告 ,老年人的糖耐量明显低于中年人和青年人 ,糖耐量的降低可作为机体衰老的重要指标之一。实验第一周 ,对每组小鼠测定其葡萄糖耐量 ,各组小鼠保持基本一致。实验进行到第四周 ,对各组小鼠再次进行葡萄糖耐量测定。由图 1 可知 ,高直链淀粉组与茶多酚淀粉组对葡萄糖的耐受性要高于模型对照组。说明茶多酚与高直链淀粉的协同作用 ,对机体老化后对葡萄糖耐量的降低起到了很大的保护作用。

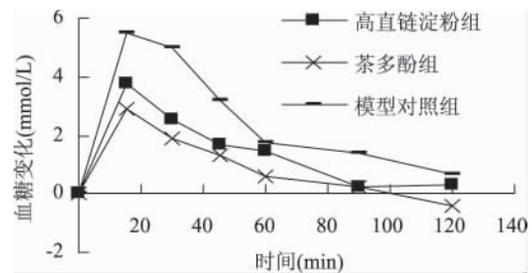


图 1 茶多酚-淀粉体系对小鼠糖耐受量的影响

表 2 各组小鼠空腹血糖 (mmol/L)

组别	高直链淀粉组	茶多酚组	正常对照组
空腹血糖	2.85	5.1	5.275

2.3 茶多酚-淀粉复合体系对小鼠免疫器官指数的影响

胸腺为机体的重要淋巴器官 ,其功能与免疫紧密相关。注射 D-半乳糖的普通饲料组小鼠的胸腺指数低于正常对照组 ,胸腺发生萎缩性病变。高直链淀粉组小鼠在解剖过程中发现胸腺严重萎缩 ,几乎完全消失。茶多酚组也出现严重萎缩 ,但仍有一定的改善作用 ,与模型对照组具有显著性差异。

脾脏正常的生理功能是清除血液里衰老的血细胞 ,当脾脏增大时 ,其生理功能出现亢进 ,过度破坏血细胞 ,除了清除衰老的血细胞外 ,同时将未衰老的血细胞一并破坏清除。这会导致机体血细胞减少 ,

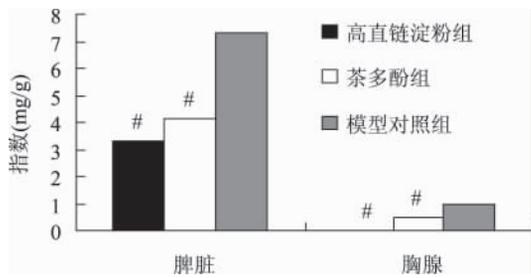


图2 茶多酚-淀粉体系对小鼠免疫器官指数的影响
注: # $P < 0.05$ 与模型组相比; 图3~图5同。

抵抗力下降、贫血等的发生,而且临床上往往与肝脏病变联系在一起。因此,脾脏肿大时,病人往往出现白细胞、红细胞及血小板下降。白细胞下降导致病人机体抵抗力下降。模型对照组小鼠脾脏在解剖过程中观察到明显的肿大,其脾脏指数显著高于正常对照组。而高直链淀粉和茶多酚饲料均表现出对脾脏增生的显著改善作用。推测这是由于对肝脏的良好保护作用,从而使与其密切相关的脾脏增生得到缓解。

2.4 茶多酚-淀粉复合体系对小鼠肝、脑组织中脂褐素含量的影响

脂褐素是机体衰老的重要信号,为MDA侵害细胞生成,在人体各组织器官细胞中的沉积,会导致细胞代谢减缓,活性下降,从而造成人体器官功能衰退产生衰老。以荧光分光光度计测定脑组织匀浆和肝脏匀浆里的脂褐素含量,结果显示,与模型对照组小鼠相比,高直链淀粉组小鼠和茶多酚组小鼠脑组织中的脂褐素含量均没有明显差异。肝脏组织匀浆中,高直链组小鼠和茶多酚组小鼠脂褐素含量与模型对照组相比具有显著差异,很大程度上缓解了D-半乳糖对小鼠肝脏的衰老作用。

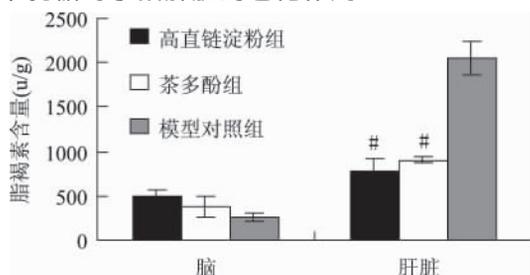


图3 茶多酚-淀粉体系对小鼠肝脏和脑组织中脂褐素含量的影响

2.5 茶多酚-淀粉复合体系对小鼠血脂水平的影响

由图4可以看出,高直链淀粉与茶多酚饲料血清中总胆固醇和甘油三酯水平与模型对照组相比没有较大差异。高直链淀粉组血清总胆固醇和甘油三酯水平均低于模型对照组。

高密度脂蛋白是一种抗动脉粥样硬化的血浆脂蛋白,是冠心病的保护因子。与此相反,低密度脂蛋白浓度的升高则与动脉粥样硬化的发病率增高成正相关。D-半乳糖诱导后,衰老小鼠血脂中HDL和LDL水平均略有增高,但没有显著性差异。茶多酚组小鼠也未见有显著改善,只有高直链淀粉组小鼠血清中LDL水平较模型对照组小鼠有显著下降。从整体上来看,D-半乳糖诱导的小鼠机体老化对小

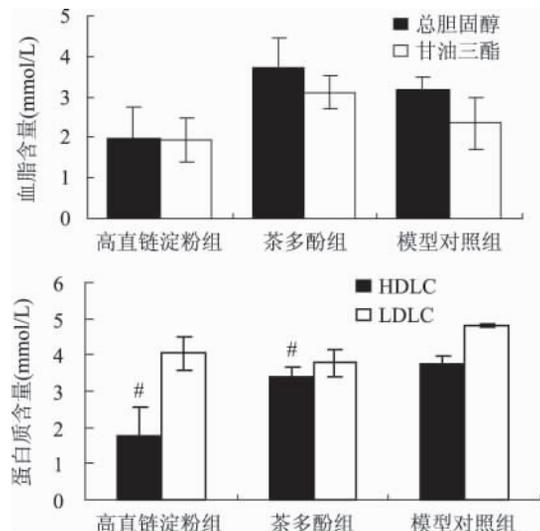


图4 茶多酚-淀粉体系对小鼠血脂含量的影响

鼠血脂水平没有显著的影响,其他两组饲料对小鼠的保护作用也不明显。

2.6 茶多酚-淀粉复合体系对小鼠肝脏和血清SOD、CAT、GSH-Px活力的影响

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)可以清除由活性氧和·OH诱发的脂质过氧化物,保护细胞膜结构和功能的完整性。SOD是机体内天然存在的超氧自由基清除因子,它可以把有害的超氧自由基转化为过氧化氢,进而在CAT的作用下将过氧化氢转化为完全无害的水。

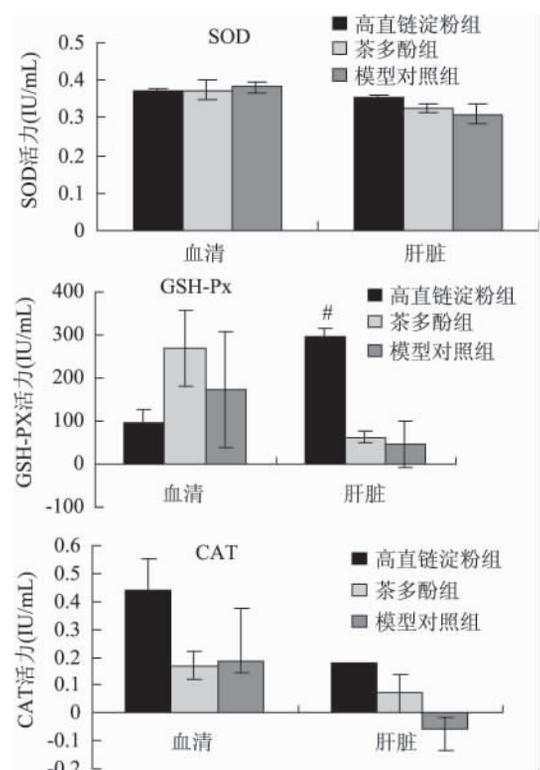


图5 茶多酚-淀粉体系对小鼠血清和肝脏中SOD、GSH-Px、CAT活力的影响

经D-半乳糖诱导的衰老模型小鼠血清和肝脏中CAT、GSH-Px、SOD活力均有下降,其中血清中分别降低了51%、14%、31%,肝脏中分别下降了

100%、14%、55%。这说明 D-半乳糖对小鼠血清和肝脏中抗氧化酶均有破坏作用,使其清除有害过氧化物、减轻和阻断脂质过氧化连锁反应的能力减弱。

高直链淀粉组小鼠血清中 CAT、SOD 活力均高于模型对照组,茶多酚组中小鼠血清中的 SOD、GSH-Px 活力高于模型对照组。对于肝脏组织,高直链淀粉组和茶多酚组小鼠肝脏中三种抗氧化物酶的活力均高于模型对照组,说明长期摄食这两种饲料对 D-半乳糖导致的快速老化小鼠的肝脏组织均具有较为明显的保护作用,可以减少对三种抗氧化物酶的破坏作用。

2.7 茶多酚-淀粉复合体系对小鼠血清和肝脏 MDA 含量的影响

机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,MDA 就是脂质过氧化物的一种。测定 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映出细胞损伤的程度。从图 6 可以看出,三组小鼠血清中 MDA 含量没有较大差异。而对于肝脏中的 MDA 含量,高直链淀粉饲料与茶多酚饲料均起到了很好的降低作用。也就是说这两种饲料能够缓解 D-半乳糖诱导的肝脏脂质过氧化,很好的保护了小鼠。

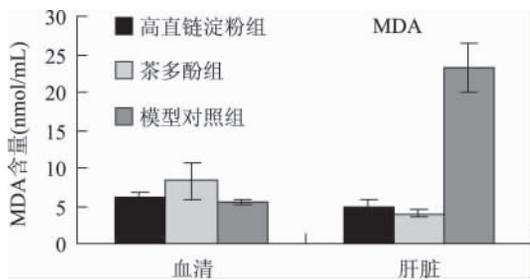


图 6 茶多酚-淀粉体系对小鼠血清和肝脏中 MDA 含量的影响

3 结论

综合所有结果来看,实验所采用的茶多酚-高直链淀粉复合饲料能够对 D-半乳糖所诱导的小鼠机体老化起到一定程度的保护作用。而对各器官、组织的保护作用进行比较,该体系对肝脏的保护作用

最强,对肝脏损伤所导致的脾脏等其他组织的损伤也具有很强的保护作用,这与 D-半乳糖主要引起肝脏损伤的作用机制较为一致。

由本工作的结果可以看出,开发一种新的功能性淀粉质产品,能够起到茶多酚与慢消化淀粉二者对机体不同的健康作用,是我们日后的一个研究方向。此外,如何能够将本工作中的淀粉由价格较高的高直链玉米淀粉推广到普通淀粉原料以降低成本,同时,减少产品中茶多酚的添加量,以降低其对机体带来的其他副作用,也是日后研究的重要内容。

参考文献

[1] Ludwig D S. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes and cardiovascular disease [J]. JAMA, 2002, 287: 2414-2423.
 [2] Frost G, Dornhorst A. The relevance of the glycaemic index to our understanding of dietary carbohydrates [J]. Diabet Med, 2000 (17): 336-345.
 [3] Tetsuya Mizoue, Taiki Yamaji, Shinji Tabata, et al. Dietary Patterns and Glucose Tolerance Abnormalities in Japanese Men [J]. J Nutr, 2006, 136: 1352-1358.
 [4] Swen Wolfram, Daniel Raederstorff, Mareike Preller, et al. Epigallocatechin Gallate Supplementation Alleviates Diabetes in Rodents [J]. J Nutr, 2006, 136: 2512-2518.
 [5] Wu Liangyi, Juan Chi chang, Low-Tone HO, et al. Effect of Green Tea Supplementation on Insulin Sensitivity in Sprague Dawley Rats [J]. Agric Food Chem, 2004, 52: 643-648.
 [6] 许扬, 吴涛, 顾佳黎, 等. D-半乳糖诱导衰老动物模型研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29: 1710-1713.
 [7] 余资江, 应大君, 董世武, 等. 半乳糖急性致衰老动物模型剂量的探讨 [J]. 解剖学杂志, 2005, 28(4): 422-424.
 [8] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model [J]. Mech Aging Develop, 1999, 108(3): 239-251.
 [9] 王双. 自然衰老大鼠糖耐量变化及其机理的研究 [D]. 四川大学医学院, 2007.

(上接第 389 页)

Journal of Lipid Research, 1989, 30: 1117-1126.
 [12] Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, et al. High density lipoprotein. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase [J]. Journal of Clinical Investigation, 1987, 80: 341-347.
 [13] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation [J]. Free Radical & Biology Medicine, 2000, 28: 463-499.
 [14] Lambeth JD. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy [J]. Free Radical & Biology Medicine, 2007, 43: 332-347.
 [15] Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. Current Drug Metabolism, 2007, 8(5): 519-525.
 [16] Moustaid N, Sakamoto K, Clarke S, et al. Regulation of fatty

acid synthase gene transcription. Sequences that confer a positive insulin effect and differentiation-dependent expression in 3T3-L1 preadipocytes are present in the 332 bp promoter [J]. Biochemical Journal, 1993, 292: 767-772.
 [17] Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, et al. Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes [J]. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2001, 15: 2527-2529.
 [18] Shi H, Norman AW, Okamura WH, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits uncoupling protein expression in human adipocytes [J]. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2002, 16: 1808-1810.
 [19] Xiao Y, Cui J, Shi YH, et al. Effects of duodenal redox status on calcium absorption and related genes expression in high-fat diet-fed mice [J]. Nutrition, 2010, 26(11-12): 1188-1194.