

微胶囊化儿茶素对阿霉素肾病大鼠总抗氧化能力的影响

党西强, 何小解*, 易著文, 莫双红

(中南大学小儿肾脏病研究室, 湖南省小儿肾脏病临床中心, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的: 探讨微胶囊化儿茶素对阿霉素肾病大鼠总抗氧化能力的影响。方法: 将60只雌性SD大鼠随机分为对照组、肾病组、激素组、VE组、儿茶素组和微胶囊组共六组, 尾静脉一次性注射阿霉素(5mg/kg)制备肾病模型; 实验第六周末杀鼠取尿、血、肾及肝脏, 利用生化法测定血、肾及肝脏总抗氧化能力和·OH, 利用考马斯亮蓝法测定24h尿蛋白的排泄量。结果: 微胶囊组大鼠血、肾及肝脏中总抗氧化能力显著高于儿茶素组($p < 0.01$); 微胶囊组大鼠·OH的浓度在肾与肝脏中显著低于儿茶素组(p 分别 $< 0.05, 0.01$), 在血清中无显著性差异; 微胶囊化儿茶素治疗组24h尿蛋白排泄量显著低于儿茶素治疗组($p > 0.05$)。结论: 微胶囊化儿茶素可能是通过提高肾病大鼠总抗氧化能力, 有效清除·OH, 达到降低肾病大鼠尿蛋白排泄的目的。

关键词: 儿茶素; 微胶囊; 肾变病综合征; 总抗氧化能力; 大鼠

Effect of Catechin Microcapsule on Total Antioxidation Competence in Rats with Nephritic Adriablastine Induced Syndrome

DANG Xi-qiang, HE Xiao-jie*, YI Zhu-wen, MO Shuang-hong

(Laboratory of Pediatric Nephrology, Institute of Pediatrics, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Province Clinical Center of Pediatric Nephrology, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective: To study the effect of catechin microcapsule on total antioxidant competence in rats with adriablastine induced nephritic syndrome. Methods: 60 female SD rats are randomly distributed as control group, nephritic syndrome group, glucocorticoid group, vitamin E group, catechin group and microcapsule group. Catechin microcapsule is made by the way of mist spray dehydration. Nephritic syndrome rats are caused by injecting adriablastine before rats are killed. Blood, urine, liver tissue and kidney tissue are collected. ·OH concentration and total antioxidant competence are detected by biochemistry assay. 24h urinary protein excretions are detected by Comb's bright blueness assay. Results: Total antioxidant competence of microcapsule group in serum, liver tissue and kidney tissue is higher than that of catechin group ($p < 0.01$). ·OH concentrations of microcapsule group in liver tissue and kidney tissue respectively are lower than those of catechin group ($p < 0.05, 0.01$ respectively). There is no marked difference in serum. 24h urinary protein excretion in microcapsule group is lower than that of catechin group ($p < 0.05$). Conclusion: Catechin microcapsule can successfully reduce 24h urinary protein excretion in rats of adriablastine induced nephrotic syndrome and may have achieved through enhancing total antioxidant competence and depressed ·OH concentration.

Key words: catechin; microcapsule; nephrotic syndrome; total antioxidant competent; rat

中图分类号: O505

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0299-04

肾病综合征的发生、发展与氧化应激密切相关, 这已经在动物模型及成人与儿童肾病综合征患者体内得以证实^[1-4], 因氧化应激产生的活性氧自由基的持续存在可使肾组织持续受损, 进而导致肾脏病理慢性进展^[5], 注

射或者口服抗氧化剂通过清除体内活性氧自由基可有效缓解临床症状, 延缓肾病病理慢性进展^[6-9]。儿茶素作为天然抗氧化剂和自由基清除剂, 已经广泛应用于食品、医药及化工等领域^[10], 但由于儿茶素分子中的酚

收稿日期: 2005-08-11

*通讯作者

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(02JJXY3020); 湖南省教育厅重点项目(02A015)

作者简介: 党西强(1962-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为小儿肾脏病。

羟基很活泼, 在外界各种条件下极易发生氧化、聚合或缩合等, 从而失去抗氧化活性及其它生物学功能, 使之在贮存和应用过程中受到了很大的限制; 另外, 儿茶素的水溶性较强、脂溶性差导致其生物利用度低, 微胶囊技术则是解决这一问题的有效途径^[11]。微胶囊化儿茶素对抗氧化系统影响与儿茶素有何差异, 目前尚不清楚。为此, 本研究利用微胶囊技术制备了微胶囊化儿茶素, 通过动物试验, 系统地探讨微胶囊化儿茶素对阿霉素肾病大鼠体内毒性最强的氧自由基($\cdot\text{OH}$)及总抗氧化能力的影响, 旨在为肾病综合征的治疗及儿茶素的药用产业化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 微胶囊的制备

由本实验室自制, 具体见参考文献[12]。

1.2 实验动物及标本采集

60只周龄相同(6周龄)体重相近(180~220g)的雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠(购自中国科学院上海实验动物中心), 实验第一天实验组大鼠均尾静脉一次注射阿霉素(5mg/kg, 意大利爱宝大药厂), 制备肾病模型^[19], 对照组注射等量的生理盐水; 自实验第二周末开始, 将实验组随机分为肾病组、激素组、VE组、儿茶素组及微胶囊化儿茶素组(简称微胶囊组)。儿茶素组(100mg/kg·d)、VE组(50mg/kg·d)、微胶囊组(含儿茶素100mg/kg·d)均行灌胃治疗至第六周末实验结束、激素组自实验第二周末皮下注射地塞米松(1.8mg/kg·d)至第六周末实验结束。

在整个实验过程中, 所有大鼠均被饲养在12h白昼、12h黑夜的标准温度(21~22℃)和湿度(50%~70%)环境中, 均食用我院动物实验中心自产的全价颗粒饲料和自来水。

在实验第六周末每组杀鼠。动物处死前, 从腹主动脉取血, 一份为抗凝血用于分离血浆, 一份为普通血用于分离血清, 分离后的血浆与血清均置-20℃冰箱保存备用。同时取肝脏和肾脏液氮速冻保存备用。

1.3 血清、肾组织及肝组织中总抗氧化能力与羟自由基($\cdot\text{OH}$)测定

试剂盒购自南京建成生物工程有限公司, 测定方法见试剂盒说明书。

1.4 尿蛋白定量

采用传统的考马斯亮蓝法进行。

1.5 统计学分析

采用SPSS-10.0统计软件包进行统计学处理, 所有资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组资料间和同组多个时点资料间比较, 方差齐者, 采用One-Way ANOVA分析, 组间两两比较采用LSD法, 方差不齐者, 采用Kruskal-Wallis分析, 组间两两比较采用Mann-Whitney法, 对

有相关趋势的变量采用Pearson相关分析; 以 $\alpha=0.05$ (two tailed)作为检验水准, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 实验末微胶囊化儿茶素对六组大鼠总抗氧化能力的影响

实验末, 在肝脏, 各组大鼠总抗氧化能力低于对照组, 高于肾病组, 差异有非常显著意义(p 均 < 0.01), 激素组、儿茶素组以及微胶囊组大鼠高于VE组, 差异有显著意义(p 分别 < 0.05 、 0.05 、 0.01), 激素组与儿茶素组之间差异无显著意义, 微胶囊组明显高于激素组与儿茶素组, 差异有非常显著意义(p 均 < 0.01)。在肾脏, 各组大鼠肾组织总抗氧化能力由高至低依次为: 对照组 $>$ 激素组 $>$ 微胶囊组 $>$ 儿茶素组 $>$ VE组 $>$ 肾病组, 除微胶囊组与激素组两组之间差异无显著意义外, 其它各组之间相比, 差异均有显著意义(p 均 < 0.01)。各组大鼠血清总抗氧化能力均低于对照组, 高于肾病组, 差异有显著意义(p 均 < 0.01), VE组和儿茶素组大鼠总抗氧化能力明显低于激素组, 差异有显著意义(p 均 < 0.01), 微胶囊组与激素组差异无显著意义, 微胶囊组和儿茶素组总抗氧化能力明显高于VE组, 差异有显著意义(p 均 < 0.01), 微胶囊组高于儿茶素组, 差异有非常显著意义($p < 0.01$)。具体见表1。

表1 实验末六组大鼠肝组织、肾组织及血清中总抗氧化能力比较 ($\bar{x} \pm s$, U/ml)

Table 1 Total antioxidation competence in liver, renal and serum among six groups rats in the end of experiment ($\bar{x} \pm s$, U/ml)

组别	例数	肝组织	肾组织	血清
对照组	10	56.02 \pm 6.43	19.41 \pm 4.67	20.76 \pm 5.83
肾病组	10	10.48 \pm 1.15 ^a	4.07 \pm 0.99 ^a	3.42 \pm 0.89 ^a
激素组	10	26.95 \pm 3.09 ^a ^{bd}	12.37 \pm 1.24 ^{ab}	14.21 \pm 1.72 ^{ab}
VE组	10	20.75 \pm 4.64 ^a ^b	6.66 \pm 0.64 ^{ab} ^h	8.29 \pm 0.91 ^{ab} ^h
儿茶素组	10	27.79 \pm 5.27 ^a ^{bd}	8.63 \pm 0.92 ^{ab} ^{hd}	10.06 \pm 2.68 ^{ab} ^{hd}
微胶囊组	10	37.01 \pm 6.32 ^a ^{bedf}	11.59 \pm 1.25 ^{ab} ^{cd}	13.63 \pm 1.71 ^{ab} ^{cd}
F		30.49	32.30	21.65
p		0.00	0.00	0.00

注: 与对照组相比, ^a $p < 0.01$; 与肾病组相比, ^b $p < 0.01$; 与激素组相比, ^c $p < 0.05$; 与VE组相比, ^d $p < 0.01$, ^e $p < 0.05$; 与儿茶素组相比, ^f $p < 0.01$, ^g $p < 0.05$ 。

2.2 实验末微胶囊化儿茶素对六组大鼠 $\cdot\text{OH}$ 的影响

实验末, 肝组织中 $\cdot\text{OH}$ 的浓度由高至低依次为: 肾病组 $>$ VE组 $>$ 激素组 $>$ 儿茶素组 $>$ 微胶囊组 $>$ 对照组, 其中, 激素组、儿茶素组及微胶囊组明显低于VE组(p 均 < 0.01), 儿茶素组与激素组差异无统计学意义, 微胶囊组则明显低于激素组与儿茶素组($p < 0.01$ 、 0.05)。肾组织中各组 $\cdot\text{OH}$ 的浓度均较对照组增高, 肾病组降低, 差异有非常显著意义(p 均 < 0.01), VE组与儿茶素

组明显高于激素组(p 均 < 0.01), 微胶囊组与激素组差异无显著意义, 与 VE 组相比, 儿茶素组及微胶囊组均明显降低(p 均 < 0.01), 微胶囊组大鼠肾组织中 $\cdot OH$ 的浓度显著低于儿茶素组($p < 0.01$)。血清中各组 $\cdot OH$ 的浓度均较对照组增高, 肾病组降低, 差异有非常显著意义(p 均 < 0.01), 与激素组相比, VE 组与儿茶素组明显增高($p < 0.01$ 、 0.05), 微胶囊组虽有所增高, 但差异无显著意义, 与 VE 组相比, 儿茶素组及微胶囊组均明显降低(p 均 < 0.01), 儿茶素组与微胶囊组两组之间相比, 差异无显著意义。具体见表 2。

表 2 实验末六组大鼠肝组织、肾组织及血清中 $\cdot OH$ 比较
($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 2 $\cdot OH$ in liver, renal and serum among six groups rats in the end of experiment($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	例数	肝组织	肾组织	血清
对照组	10	75.76 \pm 11.00	113.13 \pm 26.78	88.05 \pm 8.19
肾病组	10	375.36 \pm 28.69 ^c	489.55 \pm 42.39 ^c	392.73 \pm 49.81 ^c
激素组	10	203.09 \pm 18.78 ^{ca}	271.31 \pm 29.67 ^{ca}	176.27 \pm 18.32 ^{ca}
VE 组	10	282.75 \pm 27.39 ^{cah}	422.30 \pm 49.47 ^{cah}	276.44 \pm 37.58 ^{ca}
儿茶素组	10	185.71 \pm 17.66 ^{cad}	365.60 \pm 38.24 ^{cad}	209.73 \pm 31.01 ^{caed}
微胶囊组	10	143.40 \pm 15.55 ^{cahdi}	300.40 \pm 27.11 ^{cdf}	182.59 \pm 19.83 ^{cad}
F		128.39	138.77	89.67
p		0.00	0.00	0.00

注: 与对照组相比, ^c $p < 0.01$; 与肾病组相比, ^a $p < 0.01$; 与激素组相比, ^b $p < 0.01$, ^e $p < 0.05$; 与 VE 组相比, ^d $p < 0.01$; 与儿茶素组相比, ^f $p < 0.01$, ⁱ $p < 0.05$ 。

2.3 六组不同处理大鼠不同时期 24h 尿蛋白排泄量的比较

实验初, 模型组与对照组大鼠尿蛋白排泄量无明显差别(p 均 > 0.05)。实验末, 各组大鼠 24h 尿蛋白的排泄量依次为: 肾病组 $>$ VE 治疗组 $>$ 儿茶素治疗组 $>$ 微胶囊化儿茶素治疗组 $>$ 激素治疗组 $>$ 对照组, 与 VE 治疗组相比, 微胶囊化儿茶素治疗组与儿茶素治疗组在实验末 24h 尿蛋白的排泄量均显著降低, 差异有非常显著意义(p 均 < 0.01), 微胶囊化儿茶素治疗组则显著低于儿茶素治疗组($p < 0.05$)。具体见表 3。相关分析表明: 实验末 24h 尿蛋白的排泄量与大鼠肝组织、肾组织及血清中 $\cdot OH$ 含量高度正相关(分别 = 0.671、0.691、0.735, p 均 < 0.01); 与大鼠肝组织、肾组织及血清中总抗氧化能力高度负相关(分别 = -0.709、0.686、0.723, p 均 < 0.01)。

3 讨 论

近几十年来的研究证明, 活性氧自由基在肾综征的发生与发展中起着十分重要的作用^[14], 活性氧自由基种类很多, $\cdot OH$ 是目前我们所知道的生物活性最强、毒性最大的自由基^[15-17]。正常情况下, 人体细胞

表 3 六组不同处理大鼠 24h 尿蛋白的排泄量($\bar{x} \pm s$, mg/d)
Table 3 24h urinary protein excretion among six groups rats during experiment($\bar{x} \pm s$, mg/d)

组别	例数	实验初	第六周末
对照组	10	6.30 \pm 1.73	22.50 \pm 4.53
肾病组	10	6.22 \pm 1.93	462.00 \pm 44.07 ^a
激素组	10		208.40 \pm 10.50 ^{ac}
VE 组	10		374.00 \pm 53.41 ^{acd}
儿茶素组	10		311.00 \pm 49.09 ^{acd}
微胶囊组	10		251.00 \pm 22.14 ^{aceg}
F 值			75.352
p 值			0.00

注: ^a $p < 0.01$ Vs 对照组; ^c $p < 0.01$, ^{Nop} < 0.05 Vs 肾病组; ^d $p < 0.01$, ^e $p < 0.05$ Vs 激素组; ^g $p < 0.05$ Vs 儿茶素组。

也可产生自由基, 但因机体细胞本身具有非常有效的手段来清除这些毒物而使机体正常细胞免于损伤, 其中一个重要的机制是体内抗氧化能力的增强。一般说来, 机体内氧自由基的水平与体内抗氧化能力保持动态平衡, 然而在致病因素如炎症细胞、血小板活化因子、循环免疫复合物等的作用下, 可使机体抗氧化能力降低, 自由基生成酶活性增高导致活性氧自由基产生过多, 活性氧自由基的过度积聚导致脂质过氧化, 进而引起机体损伤^[14]。本研究发现, 肾病大鼠肾组织、血清以及肝脏中 $\cdot OH$ 明显增高, 总抗氧化能力明显下降, 24h 尿蛋白排泄量明显增高, 说明肾病状态下, 存在自由基生成与脂质过氧化增多, 抗氧化能力下降及大量蛋白尿排泄的现象。

儿茶素与 VE 均具有较强的抗氧化能力, VE 抗氧化能力主要表现为抗脂质过氧化, 儿茶素则为一种广谱抗氧化剂。本研究发现, 儿茶素组大鼠总抗氧化能力无论是在肝脏、血清抑或是肾脏中, 均显著高于 VE 组, 而 $\cdot OH$ 则明显低于 VE 组, 说明儿茶素的抗氧化能力强于 VE, 此时, 可以看出, 儿茶素组大鼠 24h 尿蛋白排泄量明显低于 VE 组, 提示总抗氧化能力的提高可能有助于降低肾病大鼠 24h 尿蛋白排泄, 相关分析表明, 24h 尿蛋白的排泄量与大鼠肝组织、肾组织及血清中 $\cdot OH$ 含量高度正相关, 与大鼠肝组织、肾组织及血清中总抗氧化能力高度负相关, 进一步支持以上推论。

我们在前期对微胶囊药代动力学的研究中发现, 儿茶素微胶囊化后, 在体内的半衰期明显延长, 说明微胶囊化儿茶素较儿茶素在体内能更持久地保持其生物学活性。本研究发现, 微胶囊组大鼠肾组织、血清以及肝脏中 $\cdot OH$ 明显低于儿茶素组, 总抗氧化能力明显高于儿茶素组, 说明儿茶素微胶囊化后, 其抗氧化能力明显好于游离儿茶素。综上所述, 微胶囊化儿茶素可能是通过提高肾病大鼠总抗氧化能力, 有效清除 $\cdot OH$, 达到降低肾病大鼠尿蛋白排泄的目的。

绿豆运动饮料缓解体力疲劳作用研究

刘爱萍¹, 郭慧媛¹, 庞 坤¹, 任发政^{1,2,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083; 2. 教育部-北京市功能乳品实验室 北京 100083)

摘 要: 本文研究了绿豆运动饮料对体力疲劳的延缓作用。实验小鼠一次灌胃 0.2ml/10g 体重剂量的绿豆运动饮料, 记录小鼠负重游泳时间, 并检测该样品对运动小鼠血尿素氮、肝糖元和血尿酸等指标的影响。结果表明, 绿豆运动饮料可以显著地延长小鼠负重游泳的时间($p < 0.01$); 增加小鼠肝糖原的储备量; 对小鼠在安静状态下的血乳酸的积累具有明显的抑制作用; 对于小鼠血清尿素的含量无影响, 具有一定的缓解体力疲劳作用。

关键词: 绿豆; 运动饮料; 抗疲劳作用

To Evaluate Mice Anti fatigue Effects of Sport Beverage Made of Mung Bean

LIU Ai-ping¹, GUO Hui-yuan¹, PANG Kun¹, REN Fa-zheng^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Functional Dairy, Ministry of Education and Municipal Government of Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: The objective of this study is to evaluate the anti fatigue effects of sport beverage made of mung bean. After single oral administration of the sample (0.2ml/10g dose) to mice by the gastric intubation, the weight-loaded swimming time of the mice

收稿日期: 2006-09-14

*通讯作者

基金项目: 教育部科技创新自选项目 (GJSY10090401)

作者简介: 刘爱萍 (1974-), 女, 博士研究生, 研究方向为乳品科学。

参考文献:

- [1] UEDA N, BALIGA R, SHAH S V. Role of catalytic iron in an animal model of minimal change nephrotic syndrome[J]. *Kidney Int*, 1996, 49: 370-373.
- [2] YOSHIOKA T, MOORE J T, ICHIKAWA I, et al. Reactive oxygen species (ROS) of extra-renal origin can induce massive functional proteinuria[J]. *Kidney Int*, 1990, 37: 497.
- [3] CLEMENS M R, BURZA Z Z. Lipid abnormalities and peroxidation of erythrocytes in nephrotic syndrome[J]. *Nephron*, 1989, 53: 325-334.
- [4] GINEVRI F, GHIGGERI G M, CANDIANO G, et al. Peroxidative damage of the erythrocyte membrane in children with nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 1989(3): 25-32.
- [5] WARWICK G L, WALLER H, FERNS G A. Antioxidant vitamin concentrations and LDL oxidation in nephrotic syndrome[J]. *Ann Clin Biochem*, 2000, 37: 488-491.
- [6] BEAMAN M, BIRTWISTLE R, HOWIE A J, et al. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats[J]. *Clin Sci (Colch)*, 1987, 73: 329-32.
- [7] OHTAKE T, KIMURA M, NISHIMURA M, et al. Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy[J]. *J Laboratory Clin Med*, 1997, 129: 81-88.
- [8] PEDRAZA C J, AREVALO A E, HERNANDEZ P R, et al. Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *Int J. J Biochem Cell Biol*, 1995, 27: 683-691.
- [9] BULUCU F, VURAL A, AYDIN A, et al. Oxidative stress status in adults with nephrotic syndrome[J]. *Clin Nephrol*, 2000, 53: 169-173.
- [10] ZHANG S, LIU Z H, HUANG J A, et al. Study on the preparation of high content tea catechins with macroporous adsorption resin[J]. *Journal of Tea Science*, 2002, 22(2): 125-130.
- [11] ZHANG K D, XU D M, WANG P. Microencapsulation method[J]. *Journal of Functional Polymers*, 2001, 14(4): 474-480.
- [12] 田云, 卢向阳, 何小解, 等. 水溶性儿茶素微胶囊的制备[J]. *中草药*, 2004, 35(8): 881-883.
- [13] KINRA, SANJAY, RATH, et al. Indirect quantification of lipid peroxidation in steroid responsive nephrotic syndrome[J]. *Archives of Disease in Children*, 2000, 82(1): 76-78.
- [14] 何小解, 易著文, 卢向阳, 等. 儿茶素对肾病综合征大鼠氧自由基与抗氧化酶的影响研究[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, 11(4): 342-346.
- [15] BAUD L, ARDAILLLOU R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney[J]. *Am J Physiol*, 1986, 251: 765.
- [16] WILSON C B. The renal response to immunologic injury[M]. //: BRENNER B M, RECTOR F C J, eds. *The kidney*, 4th ed. Philadelphia, W B Saunders, 1991: 1062-1081.
- [17] BAUD L, ARDAILLLOU R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney[J]. *Am J Physiol*, 1986, 251: 765.
- [18] CANAVESE C, STRATTA P. Oxygen free radicals in nephrology[J]. *Int J Art Organs*, 1987, 10: 379.
- [19] 王海燕. *肾脏病学*[M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 531-539.