

表 1 滤纸片法实验数据

被测菌量 CFU/ml	抑菌环直径(mm)				
	1	2	3	4	5
微小消化链球菌 3×10^3	7.0	8.0	8.5	9.0	8.0
小韦荣氏球菌 3×10^3	7.0	8.0	8.5	9.0	8.9
产黑素拟杆菌 3×10^4	6.5	7.0	9.0	9.0	8.0
牙龈拟杆菌 3×10^4	6.5	7.0	8.5	9.0	8.5
乳酸杆菌 3×10^5	7.5	7.0	8.5	9.0	8.0
变异链球菌 3×10^6	7.5	8.0	8.5	8.5	7.0

表 2 最低抑菌浓度 MIC(mg/ml)

被测菌量 CFU/ml	1	2	3	4	5
最小消化链球菌 3×10^3	1.25	1.25	0.31	0.075	0.150
产黑素拟杆菌 3×10^4	2.5	0.63	0.63	0.15	0.31
小韦荣氏球菌 3×10^3	2.5	2.5	0.31	0.15	0.31
牙龈拟杆菌 3×10^4	1.25	2.5	0.63	0.15	0.31
乳酸菌 3×10^5	0.63	0.63	0.125	0.31	0.31
变异链球菌 3×10^6	1.25	0.63	0.31	0.15	0.31

1.3 抑菌实验方法

1.3.1 滤纸片法

1.3.2 倍比稀释最小抑菌浓度检验法

1.3.3 质控 四环素产气荚膜梭菌(ATCC 13123)

1.4 实验内容

1.4.1 滤纸片法

取新华 102 型滤纸,用打孔器制成 6mm 的圆形纸片,分装于洁净的小培养皿内,每皿 50 张,用 5% 的鞣化柞蚕丝素粉混悬液浸泡吸附 3h,干热灭菌法灭菌 2h,用无菌镊子夹取三片,放置在 5cm 含菌培养皿中,另取 9cm 无菌培养皿,在皿底加入焦性没食子酸约 1g,将接种过的小培养皿倒置于其中,并迅速注入 5% NaOH 溶液于两皿之间,至 1.3cm 高度止,焦性没食子酸溶解后,迅速将液体石蜡加入 NaOH 液面,厌氧条件下,置 37℃ 恒温箱中培养 48h。

1.4.2 平板稀释法测抑菌 MIC 值

将 5% 柞蚕丝素粉混悬液用无菌水倍比稀释成 100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.563% 系列浓度溶液,用无菌吸管将稀释液分别定量加到无菌培养皿中,与定量倒入的培养基混合均匀,制成含样品的平板,用无菌棉蘸取被试菌液涂于平板,按 1.4.1 中的厌氧条件 37℃ 培养 48h 观察各菌的生长情况,以完全没有菌生长的最低混悬液浓度为该混悬液的

最低抑菌浓度(MIC)。

2 不同鞣化方法对柞蚕丝素粉抑菌能力的影响

2.1 滤纸片法

实验数据如表 1:

从抑菌环宽度可知,用茶多酚处理的 4 号样品抑菌能力最强,抑菌环直径在 8.5~9.0mm,高于未鞣化处理的 1 号样及单纯 0.2% 的茶多酚溶液,说明柞蚕丝素与茶多酚之间存在抑菌协同作用。

2.2 最低抑菌浓度(MIC)的测定

由表 2 中数值可见,鞣化柞蚕丝素粉对常见的口腔致病及致龋菌有较明显的抑菌作用,特别是用茶多酚鞣化处理的柞蚕丝素粉抑菌能力更强,最小抑菌浓度 MIC 值 0.075~0.31mg/ml,而未鞣化处理的柞蚕丝 MIC 值在 0.65~2.5mg/ml,说明鞣化处理可以显著地增加柞蚕丝素粉的抑菌能力。

3 结论

从实验结果可见经鞣化处理后柞蚕丝素粉抑菌能力明显增强,在不同的鞣化处理方法中,以茶多酚处理法的抑菌效果最为明显。茶多酚是一种优良的食品添加剂,确有多种保健功能,经临床观察证明,添加 0.2% 鞣化柞蚕丝素粉的口香糖可有效地防止儿童龋齿的发生,而且对口腔粘膜的刺激性小、安全。

龋齿是一种最常见的口腔疾病,全世界约有 60% 的人患有不同程度的龋齿,城市儿童发病率几乎为 100%,抑菌柞蚕丝素粉无疑给人们防龋提供了一种安全、有效、儿童易于接受的方法。

参考文献

- 周帮清. 常用中药的抗菌作用及其测定方法. 科学技术文献出版社重庆分社, 1987. 7.
- 曾莹. 马蹄皮的抗菌作用研究. 食品科学, 1996. 10.
- 松田敏生. 天然抗菌成分. Food industry. 1991. 33(9).
- 制丝化学. 纺织工业出版社, 1993.
- 章淑艳. 柞蚕丝素口香糖防治儿童龋齿的研究. 基础医学, 1997. 3.
- Lund F, Filtenborg O, Frisvad D, Frisvad J, C. Food Microbiology, 1995(12): 173~185.
- Mor—Mur M, Carretero C, Pla R. Food Microbiology, 1994(11): 177~170.

茶多酚降低卷烟烟气毒性的研究

姜绍通 罗建平 潘丽军 黄静 合肥工业大学生物与食品工程学院 230009

摘 要 卷烟烟气会导致鼠肺细胞膜脂质过氧化损伤。采用适当的方法将茶多酚添加到卷烟中,能有效地抑制烟气引发的鼠肺细胞膜脂质过氧化水平,抑制率可达 30%~40%,抑制效果优于维生素 C 和维生素 E,且抑制作用的稳定性较好。实验还证明了把纳米 SiO₂ 与茶多酚溶液经超声波处理后再添加到卷烟中,其抑制烟气对鼠肺细胞膜脂质过氧化

损伤效果更佳。

关键词 茶多酚 卷烟烟气 鼠肺细胞 脂质过氧化

Abstract Cigarette smoke has markedly induced lipid peroxidation in rat lung cell suspension. However, smoke produced by cigarettes that were processed with green tea polyphenols (GTP) has showed a reduced damage to rat lung cell membranes. This result suggested that GTP added into cigarette could significantly inhibit lipid peroxidation induced by cigarette smoke through scavenging free radicals. GTP could inhibit lipid peroxidation by 30% ~ 40%, which was better than that of vitamin C or E. If GTP was also added into cigarettes in combination with nano SiO₂, the result showed that this combination was superior to the inhibition of lipid peroxidation induced by cigarette smoke.

Key words Green tea polyphenols Cigarette smoke Rat lung cell Lipid peroxidation

吸烟严重影响人体健康,可以引发肺部疾病、心血管疾病和癌症^[1]。吸烟的毒害除来自尼古丁外,在卷烟燃烧过程中产生大量稳定和不安定的自由基可以直接或间接地对吸烟者呼吸道及肺部细胞成分产生毒害,这可能是吸烟引起各种疾病的重要原因之一。卷烟燃烧过程中产生的烟气能激发不饱和脂类的脂质过氧化,损伤正常细胞的功能,并使巨噬细胞在肺部聚集和活化,产生呼吸爆发,释放大量活性氧自由基进一步过氧化损伤肺细胞,产生恶性循环,导致疾病的发生和发展^[2]。

茶多酚(GTP)是从茶叶中提取的多酚类物质,具有很强的抗氧化活性和清除自由基的能力,其效果是其它抗氧化剂(VC、VE、BHA等)2~20倍^[3]。在离体动物细胞中加入GTP可抑制吸烟气相物质所诱导的氧化猝发以及对细胞膜脂质的过氧化损伤,表明GTP可以清除吸烟产生的自由基,降低烟气的毒害作用,保护身体健康^[2]。本文以卷烟烟气引发大白鼠肺细胞脂质过氧化损伤为实验体系,研究茶多酚加入到卷烟中的降害效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用卷烟自制。

茶多酚(GTP)由合肥工业大学生物与食品工程系农产品分离工程研究所提取^[4]。其它试剂均为国产化学纯或分析纯。

实验用大白鼠由中国科学技术大学动物房提供。

1.2 实验仪器

紫外可见分光光度计(WFZ800-D3A),恒温水浴锅(HH-S6),高速冷冻离心机(GL-20G-II),超声波混合器、具塞试管,自制抽烟器等。

1.3 茶多酚在卷烟中的添加方法

称取一定量的茶多酚配制成茶多酚溶液或一定量纳米SiO₂溶解于茶多酚溶液中,经超声波处理后,均匀喷加到卷烟中,再制成测试用卷烟。未添加茶多酚或纳米材料的卷烟为空白对照。

1.4 卷烟烟气毒性的测定

按杨法军的方法^[5],将大白鼠开胸取肺,在冰浴下切碎后匀浆,用纱布过滤,在4℃下3000×g离心10min,沉淀细胞用0.9% NH₄Cl溶液胀破红细胞,用0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH7.4)洗涤两次,用磷酸缓冲液定溶备用。卷烟烟气毒性作用以鼠肺细胞通入烟气后膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量表示。将一定量的烟气通入鼠肺细胞后,用TBA(thiobarbituric acid)法测定

丙二醛的含量。

2 结果与讨论

2.1 卷烟烟气对鼠肺细胞膜的毒害

吸烟对人体健康的危害可能首先是卷烟烟气自由基对吸烟者呼吸道细胞和肺细胞的损伤,其直接表现是肺细胞膜发生脂质过氧化产生脂类自由基,造成膜蛋白质发生交联而失活,膜流动性改变,丧失正常生理功能^[2]。丙二醛是脂质过氧化终产物之一,其含量高低反映了膜脂质过氧化损伤的程度,因此测定烟气处理后肺细胞悬浮液中丙二醛含量可以表征烟气毒性的大小。实验表明,卷烟烟气显著引发肺细胞膜脂质过氧化,且随烟气量增加,膜脂质过氧化程度急剧上升(见图1)。实验结果和已有的报道一致^[2],但测得的损伤程度远高于他们的报道。此差异可能是本实验的烟气为全烟,不同于已有报道使用的是气相烟。所以,本实验结果也表明了烟气中固相部分也能引发膜脂质过氧化损伤,这虽和Pryor等人的观点不一致^[6],但Cohen和晏良军等都注意到烟气固相部分的过氧化损伤作用^[7,8]。

2.2 茶多酚对卷烟烟气损伤鼠肺细胞膜的保护

茶多酚的强抗氧化能力已被许多实验证实。虽然离体(in vitro)实验表明茶多酚有效抑制卷烟烟气相引发的膜脂质过氧化^[2],但将茶多酚添加在卷烟中是否同样能抑制烟气引发的膜脂质过氧化还不清楚。根据本文实验结果,每支卷烟添加2mg茶多酚就能明显抑制鼠肺细胞膜脂质的过氧化水平,再增加茶多酚量,其效果和2mg茶多酚效果相似,与对照相比,膜脂质过氧化抑制率达30%~40%(见图2),和鼠肺细胞悬浮液中添加0.1mg/ml茶多酚主要成分EGCG对鼠肺细胞膜的保护效果相近^[9]。在本实验中,茶多酚的作用可能是清除了烟气中的自由基或其它氧化物质^[2],保护了鼠肺细胞膜。

利用鼠肺细胞膜过氧化损伤损伤体系,实验比较了茶多酚和维生素C、维生素E等抗氧化剂在减轻卷烟烟气引发的膜脂质过氧化程度的差异,结果表明茶多酚清除烟气中自由基的能力最佳,维生素E次之,维生素C最小,对膜损伤抑制率分别比茶多酚低12%和20%(见图3)。卷烟烟气中自由基包括固相部分的醌类自由基和多环芳烃自由基与气相部分的NO、NO₂、烷基自由基和烷氧自由基等。赵保路等人也证实了茶多酚比维生素C能更有效地清除由NO激发产生的甲基自由基。Pact

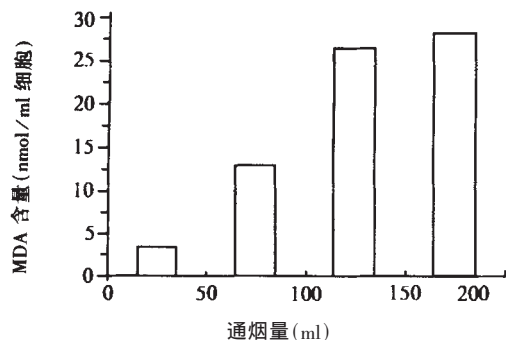


图1 卷烟烟气对鼠肺细胞膜过氧化损伤的作用

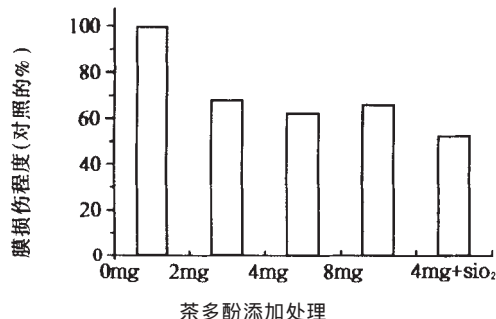


图2 不同茶多酚添加处理对卷烟烟气引发的鼠肺细胞膜损伤的抑制

卷烟在贮藏不同时间后考察烟气损伤鼠肺细胞膜的氧化程度表明, 卷烟中添加茶多酚对烟气自由基的清除作用较稳定 (见图4)。卷烟贮藏2个月后, 茶多酚的保护效果比刚生产的低8%, 贮藏6个月后, 茶多酚的保护效果不再降低。这种贮藏稳定性说明了卷烟的包装材料较好地阻隔了卷烟中茶多酚与氧气的接触, 避免了茶多酚的氧化。

2.3 同时添加茶多酚和纳米 SiO₂ 对烟气的降害效果

实验采用纳米 SiO₂ 和茶多酚充分混合后添加到卷烟中, 再检测其烟气对鼠肺细胞膜损伤的减轻作用。结果发现这种混合处理降低烟气毒性效应更佳, 膜损伤抑制率近50% (见图2), 表明纳米 SiO₂ 能清除烟气中的有害物质。但和对照相比, 单独纳米 SiO₂ 添加对鼠肺细胞膜脂质过氧化的抑制为21%, 还不到茶多酚和纳米 SiO₂ 共同添加效果的一半, 也不及单独茶多酚添加的保护效果, 可能说明纳米 SiO₂ 对烟气中自由基的清除不及GTP。

3 结 论

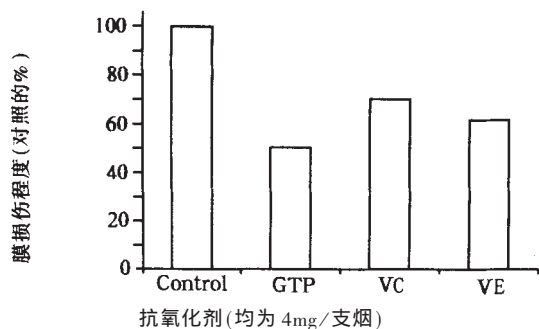


图3 茶多酚、维生素C和维生素E对卷烟烟气引发的鼠肺细胞膜损伤的抑制作用比较

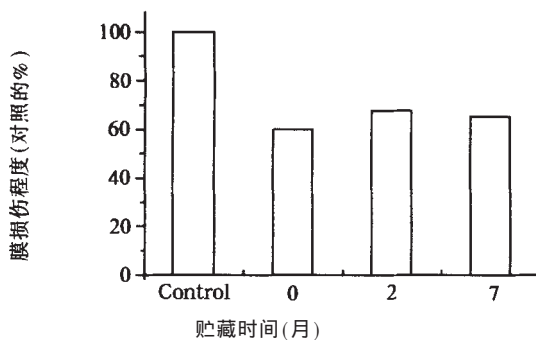


图4 茶多酚对卷烟烟气损伤鼠肺细胞膜的抑制作用稳定性分析

3.1 卷烟烟气对鼠肺细胞膜脂质过氧化损伤作用显著, 这种损伤作用可能和烟气中含有大量自由基有关。

3.2 茶多酚 (GTP) 是一种强抗氧化剂, 在卷烟中添加一定量GTP能抑制细胞膜脂质过氧化水平, 抑制效果优于其它抗氧化剂, 抑制作用稳定性好, 且在GTP中混合纳米 SiO₂能增强对脂质过氧化的抑制作用。

3.3 实验结果说明, GTP具有很强的抗氧化活性和清除自由基能力。采用适当方法, 在卷烟中添加GTP, 可抑制卷烟烟气引发的肺细胞膜脂质过氧化损伤, 可降低吸烟对身体的毒害作用。

参考文献

- 1 Church D. F. and Pryor W. A. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 1985, 64: 111 - 123.
- 2 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂. 北京: 科学出版社, 1999, 182 - 221.
- 3 程书均, 何其岱等. 绿茶抗氧化剂成分抑制突变作用的初步研究. *实验生物学报*, 1986, 19(4): 429 - 434.
- 4 姜绍通, 潘丽军等. 醋酸乙酯逆流萃取绿茶茶多酚的研究. *农业工程学报*, 1997, 4.
- 5 杨法军, 赵保路等. 吸烟烟气对鼠肺细胞膜的损伤和茶多酚的保护作用. *环境化学*, 1992, 11(6): 50 - 55.
- 6 Pryor W. A. An ESR spin trapping study of the radicals produced in NO/olefin reactions: a mechanism for the production of the apparently long-lived radicals in gas phase smoke. *J. Amer. Chem. Soc.* 1984, 106: 5073 - 5086.
- 7 Cohen A. B. et al. Reduction of the elastase inhibitory capacity of alpha₁-antitrypsin by peroxides in cigarette smoke: an analysis of brands and filters. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1982, 126: 25.
- 8 晏良军, 赵保路等. 吸烟气相物质引起的脂质过氧化的研究. *环境科学*, 1992, 11(2): 58 - 61.
- 9 杨法军, 沈荣生等. 茶多酚单体 L-EGCG 对气相烟引起书肺细胞膜损伤的抑制作用. *生物物理学报*, 1992, 8(3): 450 - 454.