

油脂化学

石榴籽油的体内抗氧化性评价

苗利利¹, 吴浩浩¹, 仇农学¹, 庞福科²

(1. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 西安 710062; 2. 陕西恒兴果汁饮料有限公司研发中心, 陕西农业机械研究所, 西安 710062)

摘要:利用水酶法提取石榴籽油,以5、10、15 mL/(kg·bw·d)3种剂量的石榴籽油分别给低剂量组(5 mL/(kg·bw·d))、中剂量组(10 mL/(kg·bw·d))和高剂量组(15 mL/(kg·bw·d))的昆明小鼠经口灌胃,空白对照组以蒸馏水灌胃,30 d后全部小鼠颈椎脱臼处死,快速取出肝、脑组织并测定其中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性和丙二醛(MDA)的含量。结果显示:低剂量石榴籽油试验组小鼠肝、脑组织中SOD、GSH-PX等抗氧化酶活性明显高于正常对照组($p < 0.05$),而脑中的MDA含量明显低于正常对照组($p < 0.05$)。表明适当剂量石榴籽油可以增强机体的抗氧化机能,从而延缓衰老的发生。

关键词:石榴籽油;抗氧化酶;体内抗氧化

中图分类号:TQ641;R965

文献标志码:A

文章编号:1003-7969(2010)01-0037-04

Assessment on antioxidant activity of pomegranate seed oil in vivo

MIAO Lili¹, WU Haohao¹, QIU Nongxue¹, PANG Fuke²

(1. College of Food Engineering and Nutrition Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Research and Development Center of Shaanxi Hengxing Fruit Juice Company, Agricultural Machinery Research Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710062, China)

Abstract: Pomegranate seed oil extracted through aqueous enzymatic method was administered to the low-dose group, middle-dose group and high-dose group of Kunming mouse by oral gavage every day at three consecutive doses of 5, 10, 15 mL/(kg·bw·d), while the control group was given distilled water. After 30 days, all mice were killed through cervical dislocation, and liver and brain tissues were quickly removed and assayed for their superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) activities and malondialdehyde (MDA) contents. The results showed that SOD, GSH-PX activities in liver and brain tissues of the low-dose group were significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$), and MDA contents in brain tissues were significantly lower than that of the control group ($p < 0.05$). It indicated that an appropriate dose of pomegranate seed oil could enhance the antioxidant function of the body, thus had an anti-aging ability.

Key words: pomegranate seed oil; antioxidantase; antioxidation in vivo

石榴(*Punica granatum* Linn)为石榴科石榴属植物,我国各地均有种植,2005年我国以产果为主的各石榴主产区的石榴种植面积已达64 668 hm²,

居世界第1位,产量高达38万t^[1]。石榴不仅是生食鲜果,也是传统中药的重要来源^[2,3]。石榴叶、根皮、果皮、果汁以及石榴籽中含有丰富的多酚类物质。各种动物试验证实石榴果汁及其发酵产品,石榴叶、根皮和果皮的提取物,石榴籽油等,具有抗癌和防治心血管疾病的功效^[4-8]。近年来,随着石榴种植面积的不断扩大,以石榴为原料的加工业发展迅速,故石榴籽的综合利用在我国具有重要的经济意义。

收稿日期:2009-06-02

作者简介:苗利利(1985),女,硕士研究生,主要从事食品分离技术方面的研究工作。

通讯作者:仇农学,教授,博士生导师(Tel)029-85310517 (E-mail)nongxueq@snnu.edu.cn。

石榴籽中石榴籽油含量达 12% ~ 20%。石榴籽油含有大量的共轭亚麻酸 (CLNA, 约 31.8% ~ 86.6%), 其次是亚油酸 (0.7% ~ 24.4%)、油酸 (0.4% ~ 17.7%)、硬脂酸 (2.8% ~ 16.7%) 和棕榈酸 (0.3% ~ 9.9%), 不同品种的脂肪酸成分含量有差异^[9]。石榴籽油中的共轭亚麻酸全部是 9, 11, 13-异构体, 而石榴酸 (9c, 11t, 13c) 又是其中最主要的共轭三烯酸, 在体内可能具有抗氧化、抗癌、抗心血管疾病等功效, 但尚待动物试验的进一步证实, 本试验以此为依据, 研究石榴籽油的体内抗氧化性能。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

1.1.1 原材料 石榴籽取自陕西恒兴果汁饮料有限公司 (产地为陕西临潼), 洗净后低温烘干备用。

1.1.2 动物及饲料 健康雄性昆明种小白鼠, 5 周龄, 体重 22 ~ 28 g, 由第四军医大学试验动物中心提供; 基础饲料由第四军医大学试验动物中心提供。

1.1.3 主要仪器 FW400A 型高速万能粉碎机, TGL-16G 台式高速离心机, DF-101 集热式磁力搅拌器, H-1 微型混合器, 722 型光栅分光光度计。

1.1.4 主要试剂 总蛋白标准品、超氧化物歧化酶测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶测试盒、丙二醛测试盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 石榴籽油的水酶法提取 工艺流程为: 石榴籽 → 清洗 → 烘干 → 粉碎 → 过 40 目筛 → 调节 pH → 水酶法提取 → 灭酶 → 离心分离 → 石榴籽油。

称取 100 g 石榴籽粉, 以蒸馏水为溶剂, 料液比为 1:5, 调节 pH 至 8.0, 加入 1% Alcalase 蛋白酶, 在 50℃ 下恒温水浴、电磁搅拌 5 h, 3 000 r/min 离心,

收集上层清油即为石榴籽油。

1.2.2 体内抗氧化性评价试验 选用健康雄性昆明小鼠 48 只, 体重 22 ~ 28 g, 在饲养室适应性喂养 7 d 后, 按体重随机分为 4 组, 各组分别为: 正常对照组 (NC)、低剂量组 (LD, 5 mL/(kg · bw · d))、中剂量组 (MD, 10 mL/(kg · bw · d))、高剂量组 (HD, 15 mL/(kg · bw · d)), 各组均饲以基础饲料、自由饮水。石榴籽油试验组每天定时经口灌胃 1 次, 正常对照组灌胃等量的蒸馏水, 持续 30 d。定期换水、垫料, 每周称 1 次体重。在试验期间, 观察试验动物的行为表现。试验结束后, 大鼠隔夜禁食, 不限制饮水。小鼠处死后, 进行解剖取出脏器, 剔除其上的结缔组织, 立即称重。

观察指标: ①一般临床症状及解剖学特征: 一般表现、行为、中毒症状和死亡情况, 脏体外观观察。②脏器重量和脏器系数: 小鼠解剖, 分别取出肝脏和脑, 置于生理盐水中, 剔除结缔组织后, 用滤纸将脏器上的水吸干, 立即称重。③肝脏、脑抗氧化体系检查: 解剖取肝和脑, 10% 匀浆, 3 500 r/min 离心分离得上层酶液, 然后分别进行超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 的活性测定, 以及丙二醛 (MDA) 和蛋白质含量的测定。

1.2.3 数据分析 本试验的全部数据均采用 SPSS Statics 17.0 软件处理。做完单因素 ANOVA (变量分析) 以后, 采用 LSD 法做均值间的显著性差异比较 ($p < 0.05$), 并生成均值图。

2 结果与分析

2.1 一般临床症状及解剖学特征

试验期间每天分别以 5、10、15 mL/(kg · bw · d) 3 个剂量的石榴籽油给小鼠灌胃, 持续观察, 试验结束后, 解剖取脏器, 进行脏器的外观观察, 结果见表 1。

表 1 灌胃石榴籽油小鼠的一般临床症状及解剖学特征

组别	动物只数	死亡只数	一般行为表现	中毒反应	脏器外观特征
NC	12	0	正常	无	正常
LD	12	0	正常	无	正常
MD	12	7	正常	从第 2 周开始陆续有小鼠发生抽搐, 直至死亡。第 4 周无小鼠死亡。	肝脏血红色明显变淡, 呈土黄色, 部分肝脏明显肿大, 表面布满明显斑点。
HD	12	7	精神萎靡	毛发缺少光泽, 从第 1 周开始陆续有小鼠发生抽搐, 直至死亡。第 3、4 周无小鼠死亡。	肝脏血红色明显变淡, 呈土黄色, 部分肝脏明显肿大, 表面布满明显斑点。

由表 1 可见, 中剂量组的小鼠在灌胃后的第 2、3 周发生死亡, 死亡率为 58.3%, 高剂量组的小鼠在灌胃后的第 1、2 周发生死亡, 死亡率为 58.3%, 低剂量组和空白对照组正常。中剂量组和高剂量组小

鼠的解剖结果显示, 这两组小鼠的肝脏受到了不同程度的损伤。小鼠死亡的原因可能是: ①生理性原因, 即油脂的剂量太高, 导致小鼠无法完成代谢而造成死亡; ②石榴籽油成分的原因, 即石榴籽油未经精

炼,其中含有某种或某几种成分的摄入量超过一定量时,对小鼠机体造成损伤而造成小鼠死亡。如果是生理性原因,也就是普通的油脂代谢问题,那就意味着不管什么油,只要给小鼠的灌胃量超过 10 mL/(kg·bw·d),就会引起小鼠死亡。石榴籽油的脂肪酸组成中,含量最高的是石榴酸(9c, 11t, 13c-十八碳三烯酸),可高达 80%,这是一种共轭亚麻酸(CLN),在体内的代谢过程可能和共轭亚油酸(CLA)相似。目前的研究虽然发现共轭亚油酸具有抗心血管疾病、抗癌、增强免疫等诸多益处,但也发现较高剂量的共轭亚油酸可能会对肝脏造成一定的损伤^[10-14],因而引起本试验中小鼠死亡的原因很有可能是石榴酸的过量摄入,有待进一步的研究鉴定。

2.2 肝体比和肝脑比

小鼠在禁食 24 h 后,称重,解剖,取出肝、脑脏器,在冰冷生理盐水中漂洗血渍、去除结缔组织,然后用滤纸吸干脏器表面水分,称取肝、脑重量。分别计算肝体比和肝脑比,利用 SPSS 数据分析软件,得表 2 所示的分析结果。

表 2 石榴籽油对小鼠脏体比的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	肝体比	肝脑比
NC	0.046 ± 0.006 5 ^a	4.87 ± 1.11 ^a
LD	0.045 ± 0.006 3 ^a	4.40 ± 0.67 ^a
MD	0.060 ± 0.014 ^b	6.37 ± 2.28 ^b
HD	0.050 ± 0.006 5 ^{ab}	4.92 ± 1.33 ^a

注:a、b 的显著性水平为 0.05。

脏体比是动物试验中的一项常见指标,用来指示脏体的异常,但也有专家指出,由于成年动物脑的重量基本恒定,脏脑比可能比脏体比更能准确地反映脏体的异常^[15]。由表 2 可见,中剂量组小鼠的肝体比偏高,且与低剂量组和空白组差异显著($p < 0.05$),表明 10 mL/(kg·bw·d)的石榴籽油已经造成小鼠肝脏肿大。肝脑比的结果和肝体比的结果基本吻合。

2.3 超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力

超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶是动物机体抗氧化体系中最重要两种酶,是机体内清除不断产生的自由基的两道主要屏障,这两种酶的活力可以反映机体抗氧化机能的强弱。石榴籽油对小鼠体内这两种酶活力的影响见表 3、表 4。由表 3、表 4 可见,4 组小鼠肝脏和大脑的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力均呈抛物线状变化,低剂量组的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力显著偏高,其他 3 组的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力差异不显著($p < 0.05$)。表明适

当剂量的石榴籽油可以显著提高小鼠机体的抗氧化能力。

表 3 石榴籽油对小鼠肝、脑 SOD 活力的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	肝 SOD 活力/(U/mg)	脑 SOD 活力/(U/mg)
NC	142.11 ± 37.01 ^a	47.62 ± 12.28 ^a
LD	305.29 ± 218.19 ^b	100.86 ± 13.02 ^b
MD	107.22 ± 29.54 ^a	72.50 ± 16.35 ^c
HD	190.20 ± 78.48 ^{ab}	63.04 ± 24.90 ^{ac}

注:a、b、c 的显著性水平为 0.05。

表 4 石榴籽油对小鼠肝、脑 GSH-PX 活力的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	肝 GSH-PX 活力/(U/mg)	脑 GSH-PX 活力/(U/mg)
NC	557.59 ± 38.61 ^a	46.04 ± 12.27 ^a
LD	1049.65 ± 96.20 ^b	71.01 ± 16.37 ^b
MD	452.25 ± 45.65 ^a	50.60 ± 11.94 ^a
HD	549.35 ± 93.84 ^a	43.54 ± 9.07 ^a

注:a、b 的显著性水平为 0.05。

2.4 丙二醛含量

丙二醛是动物体内多元不饱和脂质氧化的终产物之一,其含量的高低可以反映体内不饱和脂质的过氧化程度,间接地反映出细胞膜的损伤程度。石榴籽油对小鼠体内丙二醛含量的影响见表 5。由表 5 可见,4 组小鼠肝脏丙二醛的含量曲线也呈抛物线状,低剂量组的丙二醛含量显著偏高,其他各组差异不显著($p < 0.05$)。肝脏是脂质代谢的重要场所,而石榴酸是一种共轭不饱和脂肪酸,低剂量时可能由于石榴酸在肝脏中的代谢活跃而导致其代谢终产物丙二醛的含量增高,所以,低剂量组小鼠的丙二醛含量高并不说明低剂量组小鼠肝脏受损严重,可能只是反映了肝脏中石榴酸的代谢旺盛。4 组小鼠大脑中丙二醛的含量曲线呈 L 状,空白组和其他 3 组差异显著($p < 0.05$),表明石榴籽油可以显著地降低大脑中脂质过氧化的程度。

表 5 石榴籽油对小鼠肝、脑 MDA 含量的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	肝 MDA 含量	脑 MDA 含量
NC	0.82 ± 0.31 ^a	2.25 ± 1.23 ^a
LD	2.59 ± 0.84 ^b	1.28 ± 0.30 ^b
MD	0.89 ± 0.22 ^a	1.39 ± 0.33 ^{ab}
HD	1.50 ± 0.32 ^a	1.33 ± 0.49 ^a

注:a、b 的显著性水平为 0.05。

2.5 蛋白质含量分析

石榴籽油对小鼠肝、脑蛋白质含量的影响见表 6。由表 6 可见,中剂量组和高剂量组小鼠肝脏和大脑组织中蛋白质的含量均显著高于空白组和低剂量组($p < 0.05$),表明一定剂量的石榴籽油具有改变机体成分的作用。关于共轭亚油酸的研究揭示了共

饱和脂肪酸可能具有提高蛋白质和脂肪比例的作用,本试验的结果也可以揭示石榴酸在提高机体蛋白质成分方面具有一定作用,当然,这有待更多的动物试验来验证。

表6 石榴籽油对小鼠肝、脑蛋白质含量的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	1% 肝匀浆蛋白含量 (g/L)	1% 脑匀浆蛋白含量 (g/L)
NC	1.02 ± 0.22 ^{ab}	0.76 ± 0.23 ^a
LD	0.92 ± 0.37 ^a	0.85 ± 0.22 ^a
MD	1.27 ± 0.28 ^b	0.99 ± 0.24 ^{ab}
HD	1.26 ± 0.10 ^b	1.19 ± 0.29 ^b

注:a、b的显著性水平为0.05。

3 结论

随着年龄的增长,机体抗氧化能力逐渐下降,清除自由基的能力减弱,过剩的自由基会攻击生物膜多不饱和脂肪酸、DNA、蛋白质和其他生物大分子。机体抗氧化酶系统中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活力高低反映了机体清除自由基能力的强弱,而机体组织中丙二醛的含量则反映细胞膜被氧化的程度。本试验结果显示:剂量为5 mL/(kg·bw·d)的石榴籽油对小鼠肝、脑组织中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力有显著的提高作用,可以显著降低小鼠大脑组织的脂质过氧化程度,并可能具有提高机体蛋白质含量的作用,但是,当石榴籽油剂量大于等于10 mL/(kg·bw·d)时,便会对小鼠的肝脏造成一定程度的损伤。表明适量石榴籽油(不大于5 mL/(kg·bw·d))有助于增强机体清除自由基的能力,具有一定的抗氧化作用,至于其提高抗氧化酶活力、降低丙二醛的含量的量效关系、作用机理和有效活性成分则有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 王爱伟. 我国石榴产业现状、发展对策及前景分析[J]. 中国果业信息, 2006, 23(6): 6-8.
 [2] 赵云荣, 王文领, 王勇, 等. 石榴籽中脂肪酸成分分析[J]. 化学研究, 2005, 16(2): 72-74.
 [3] 王秋霞, 贾美艳, 唐荣平, 等. 石榴籽化学成分及应用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2006(1): 53-56.
 [4] HORA J J, MAYDEW E R, LANSKY E P, et al. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD₁ Mice[J]. Journal of Medicinal Food, 2003, 6

(3): 157-161.

[5] YAMASAKI M, KITAGAWA T, KOYANAGI N, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice[J]. Nutrition, 2006, 22: 54-59.
 [6] ALBRECHT M, JIANG W, KUMI DIAKA J, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells[J]. Journal of Medicinal Food, 2004, 7(3): 274-283.
 [7] SCHUBERT S Y, LANSKY P, NEEMAN I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 66: 11-17.
 [8] KOHNO H, SUZUKI R, YASUI Y, et al. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats[J]. Cancer Science, 2005, 95(6): 481-486.
 [9] El-SHAAAWY M I, NAHAPETIAN A. Studies on pomegranate seed oil[J]. Fette Seife Anstrichmittel, 1983, 85(3): 123-126.
 [10] WEILER H A, FITZPATRICK S, FITZPATRICK-WONG S C. Dietary conjugated linoleic acid in the cis-9, trans-11 isoform reduces parathyroid hormone in male, but not female, rats[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19(11): 762-769.
 [11] Park Y. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? [J/DB]. Journal of Food Composition and Analysis 2008[2009-01-24], <http://doi:10.1016/j.jfca.2008.12.002>.
 [12] BHATTACHARYA A, BANU J, RAHMAN M, et al. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2006, 17: 789-810.
 [13] KRITCHEVSKY D, TEPPER S A, WRIGHT S, et al. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2000, 19(4): 472-477.
 [14] Fa M, DIANA A, CARTA G, et al. Incorporation and metabolism of c9, t11 and t10, c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1736: 61-66.
 [15] 李建科. 食品毒理学[M]. 北京: 中国计量出版社, 2007: 122-196.

《中国油脂》——

中国科学引文数据库核心期刊