

黑芝麻总黄酮的体内抗氧化作用研究

王 荣, 赵 佳, 冯 怡, 秦 蓓

(西安医学院 药学院, 西安 710021)

摘要:为了评价黑芝麻总黄酮的体内抗氧化活性,通过颈部皮下注射 *D*-半乳糖建立小鼠衰老模型,灌胃给药,用转棒式疲劳仪和负重游泳实验检测小鼠运动能力,计算胸腺、脾脏及脑指数,分别检测小鼠血清和脑组织匀浆液中丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力,HE染色法观察脑组织病理变化。结果表明:与衰老模型小鼠相比,黑芝麻总黄酮高剂量组可显著延长小鼠负重游泳时间,增加脑指数($P < 0.05$),显著增加血清中T-SOD和GSH-Px活力,降低MDA含量($P < 0.05$);黑芝麻总黄酮高、中剂量组能显著升高脑组织中T-SOD的活力,降低MDA含量($P < 0.05$);HE染色结果显示黑芝麻总黄酮高剂量组能改善脑组织损伤程度。黑芝麻总黄酮具有抗衰老活性,其可能通过抗氧化活性发挥抗衰老作用。

关键词:黑芝麻;总黄酮;抗氧化;衰老模型

中图分类号:TS222+.1;TS201.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2020)07-0042-04

Antioxidation in vivo of total flavonoids from black sesame

WANG Rong, ZHAO Jia, FENG Yi, QIN Bei

(Department of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: To evaluate the antioxidation in vivo of total flavonoids from black sesame, the aging model mice were induced by subcutaneous injection of *D*-galactose at neck back, and intragastrically administered with total flavonoids from black sesame. Behavioral changes of mice were evaluated by rotary rod fatigue tester and weight-bearing swimming test. The indexes of thymus, spleen and brain were calculated. The activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and malondialdehyde (MDA) content in serum and brain tissue homogenate were detected. The pathological morphological changes in brain tissue were observed by HE staining. The results showed that compared with the model group the high dose of total flavonoids from black sesame could significantly prolong the weight-bearing swimming time, significantly increase brain index and the activities of T-SOD and GSH-Px ($P < 0.05$), and decrease MDA content in serum ($P < 0.05$). The high and medium dose of total flavonoids from black sesame could significantly increase the activity of T-SOD in brain tissue, and reduce MDA content ($P < 0.05$). HE staining results showed that the high dose of total flavonoids from black sesame could relieve brain tissue damage. The total flavonoids from black sesame had anti-aging activity via antioxidant capacity.

Key words: black sesame; total flavonoids; antioxidation; aging model

收稿日期:2019-10-30;修回日期:2020-02-19

基金项目:西安医学院药学省级重点学科建设项目(2016YXXK09,2016YXXK16);西安市未央区科技计划项目(201930);西安医学院国家自然科学基金培育项目(2017GJFY13);国家自然科学基金(81903288);西安市科技计划项目(2020KJRC0135)

作者简介:王 荣(1981),女,副教授,博士,研究方向为药理学(E-mail) wr_ljz@163.com。

通信作者:秦 蓓,教授(E-mail) qinbei0526@163.com。

黑芝麻为胡麻科芝麻的种子,具有药食同源的特性。现代药理学研究表明,黑芝麻具有抗衰老、降压、促进黑素生成等多种药理活性,而这些药理活性主要与其抗氧化作用有关^[1]。黑芝麻富含木脂素、多酚、不饱和脂肪酸、黄酮等生物活性成分^[2]。目前已有文献报道黑芝麻中木脂素的抗氧化作用^[3],张伶俐^[4]研究了芝麻油对 *D*-半乳糖诱导的 HepG2 细胞氧化应激的保护作用,但以上研究并不能完全

解析黑芝麻抗氧化的物质基础。已有研究表明黄酮类化合物具有抗氧化活性^[5-6],但黑芝麻中黄酮的抗氧化作用还未见报道。自由基损伤是目前被科学界所共识的衰老机制。皮下注射D-半乳糖是经典的衰老造模方法^[7-8],该模型通过连续大剂量注射D-半乳糖造成小鼠体内糖代谢紊乱^[9],目前认为该模型最接近自然衰老的规律。D-半乳糖能够改变脑内的氧化应激状态,使自由基清除减缓,过量的自由基引起机体衰老。生物体内存在清除自由基的酶系,如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等。该酶系可通过氧化还原反应将自由基氧化,而抗氧化酶系会随机体年龄增加而减弱。丙二醛(MDA)是活性氧损伤细胞线粒体系统时所产生的脂质过氧化物,被认为是衰老模型重要的指标^[10]。脾脏和胸腺是机体的主要淋巴器官,D-半乳糖连续大剂量注射可引起脾脏和胸腺初始T细胞水平下降,进而导致免疫老化^[11]。本研究通过D-半乳糖注射构建小鼠衰老模型,选择通过检测小鼠脏器指数以及小鼠血清和脑组织中的总SOD、GSH-Px活性和MDA含量变化,研究黑芝麻中黄酮的体内抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黑芝麻,购自西安贝斯特药材市场。采用超声提取法提取黑芝麻总黄酮,提取条件为65%乙醇、料液比1:33、超声时间50 min,以芦丁为标准品,紫外分光光度法测得总黄酮得率为1.65%。

雄性昆明小鼠48只,购自成都达硕实验动物有限公司,体重(20±2)g,动物生产许可证号为SCXK(川)2015-030。

芦丁标准品(批号Y16M9S61523,含量98%),上海源叶生物科技有限公司;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、BCA法蛋白定量测试盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒,南京建成生物工程研究所。

1510型自动全波长酶标仪、Biofuge stratos高速冷冻离心机,Thermo Fisher Scientific;AX224ZH型分析天平,奥豪斯仪器有限公司;YLS-4C型转棒式疲劳仪,济南益延科技发展有限公司;T10型手持匀浆机,IKA公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组建立衰老模型

48只雄性昆明小鼠适应性饲养3 d,分为两组,空白组8只,其余为模型组。空白组颈部皮下注射生理盐水,模型组颈部皮下注射D-半乳糖(0.5

g/kg),注射剂量为0.1 mL/10 g,注射30 d。建模成功后将40只模型小鼠随机分为5组,即模型组、阳性组(V_C,200 mg/kg)、黑芝麻总黄酮高剂量组(300 mg/kg)、中剂量组(150 mg/kg)和低剂量组(75 mg/kg),灌胃剂量10 mL/kg,灌胃时间21 d。

1.2.2 小鼠行为学实验测定

给药过程中观察并记录小鼠的精神状态、饮食情况及皮肤毛发状况;利用转棒式疲劳仪和负重游泳实验检测小鼠运动能力,记录小鼠在棒与负重游泳时间,将各组进行比较。

1.2.3 脏器指数测定

脱颈处死小鼠,分离出胸腺、脾脏及脑,用滤纸吸去表面的血,然后进行称量,记录称取的质量,计算脏器指数。

1.2.4 生化指标的测定

小鼠眼眶取血,4℃、3 000 r/min离心10 min,取上清液得血清。取脑组织,加冷藏的生理盐水制备成10%的脑组织匀浆液,取上清液,-20℃冷藏备用。按照说明书对血清和脑组织匀浆液的T-SOD、GSH-Px活力和MDA含量进行测定。

1.2.5 病理学观察

取部分脑组织块,4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片、HE染色后,进行病理组织学检查。

1.2.6 数据统计

结果以“均数±标准差”表示。采用SPSS 22.0统计软件进行数据处理,组间比较采用Oneway-ANOVA Dunnett 双侧t检验,P<0.05认为差异有统计意义。

2 结果与分析

2.1 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠行为学的影响(见表1)

表1 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠负重游泳时间和在棒时间的影响

组别	和在棒时间的影响		s
	负重游泳时间	在棒时间	
空白组	214.75 ± 15.01	201.25 ± 26.43	
模型组	44.00 ± 12.14*	56.50 ± 24.20*	
高剂量组	65.86 ± 22.52#	60.43 ± 15.55	
中剂量组	63.50 ± 15.96	55.60 ± 27.41	
低剂量组	50.29 ± 16.05	34.71 ± 25.00	
阳性组	71.88 ± 15.37#	98.25 ± 25.14#	

注:与空白组相比,*表示P<0.05;与模型组相比,#表示P<0.05。下同。

衰老模型小鼠出现掉毛、行动迟缓等现象。由表1可知,模型组与空白组相比,小鼠负重游泳时间和在棒时间均显著缩短(P<0.05),说明衰老造成

小鼠运动能力下降。与模型组相比,阳性组能显著延长小鼠负重游泳时间和在棒时间($P < 0.05$);黑芝麻总黄酮高、中、低剂量组均能延长小鼠负重游泳时间,其中高剂量组具有显著差异($P < 0.05$),黑芝麻总黄酮高剂量组能延长小鼠在棒时间,但与模型组相比无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠脏器指数的影响(见表2)

表2 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠胸腺指数、脾脏指数和脑指数的影响

组别	胸腺指数	脾脏指数	脑指数
空白组	1.45 ± 0.30	4.51 ± 0.38	10.73 ± 1.23
模型组	0.69 ± 0.13*	3.18 ± 0.31*	9.03 ± 0.90*
高剂量组	0.88 ± 0.22	3.47 ± 0.61	10.44 ± 1.03 [#]
中剂量组	0.74 ± 0.28	3.29 ± 0.53	9.13 ± 0.68
低剂量组	0.92 ± 0.31	3.34 ± 0.34	9.10 ± 1.28
阳性组	0.83 ± 0.17	3.58 ± 0.83	9.31 ± 0.90

脾脏和胸腺在人体中起重要的免疫作用,二者体积的缩小表明机体一定程度的衰老。当机体衰老后,一般会伴随着脑萎缩,所以取脑、胸腺、脾脏进行称重,计算其脏器指数。由表2可知,相较于空白组,模型组胸腺、脾脏和脑指数均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, V_c 能增加模型小鼠的胸腺、脾脏和脑指数,但无显著差异($P > 0.05$),黑芝麻总黄酮能增加胸腺、脾脏和脑指数,其中高剂量组的脑指数显著升高($P < 0.05$)。以上结果表明,黑芝麻总黄酮能改善小鼠的衰老。

2.3 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠 T-SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量的影响(见表3、表4)

表3 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠血清中 T-SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量的影响

组别	T-SOD/ (U/mg)	GSH-Px/ (U/mg)	MDA/ (nmol/mg)
空白组	65.82 ± 12.55	406.08 ± 21.87	9.61 ± 4.00
模型组	46.12 ± 11.75*	375.74 ± 15.58*	11.99 ± 3.87*
高剂量组	72.89 ± 5.56 [#]	402.72 ± 29.28 [#]	7.53 ± 1.00 [#]
中剂量组	57.70 ± 5.52 [#]	409.69 ± 29.25 [#]	11.06 ± 3.71
低剂量组	80.85 ± 10.57 [#]	402.77 ± 25.19 [#]	7.76 ± 1.20
阳性组	65.11 ± 8.19 [#]	422.13 ± 22.18 [#]	16.16 ± 5.58

由表3可知,与空白组相比,模型组小鼠血清中 T-SOD 和 GSH-Px 活力显著降低($P < 0.05$),MDA 含量显著升高($P < 0.05$)。 V_c 能显著增加模型小鼠血清中 T-SOD 和 GSH-Px 的活力($P < 0.05$),对 MDA 含量无显著影响($P > 0.05$);黑芝麻总黄酮高、中、低剂量组与模型组相比,血清中 T-

SOD 和 GSH-Px 活力显著升高($P < 0.05$),黑芝麻总黄酮高剂量组显著降低了 MDA 的含量($P < 0.05$)。

表4 黑芝麻总黄酮对衰老小鼠脑组织中 T-SOD、GSH-Px 活力和 MDA 含量的影响

组别	T-SOD/ (U/mg)	GSH-Px/ (U/mg)	MDA/ (nmol/mg)
空白组	24.46 ± 0.77	22.29 ± 3.01	6.11 ± 0.47
模型组	17.87 ± 0.71*	14.65 ± 4.76*	7.80 ± 0.26*
高剂量组	24.57 ± 0.52 [#]	15.10 ± 4.84	6.55 ± 0.75 [#]
中剂量组	22.29 ± 0.46 [#]	15.59 ± 2.76	5.84 ± 0.20 [#]
低剂量组	24.73 ± 0.68 [#]	16.20 ± 3.59	7.36 ± 0.74
阳性组	23.95 ± 0.95 [#]	20.06 ± 4.42 [#]	6.53 ± 0.63 [#]

由表4可知,与空白组相比,模型组 T-SOD 和 GSH-Px 活力显著降低($P < 0.05$),MDA 含量显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, V_c 显著增加了模型小鼠脑组织中 T-SOD 和 GSH-Px 的活力($P < 0.05$),显著降低了 MDA 的含量($P < 0.05$);黑芝麻总黄酮高、中、低剂量组能显著升高 T-SOD 的活力($P < 0.05$)。黑芝麻总黄酮高、中、低剂量组能增加脑组织中 GSH-Px 活力,但与模型组相比无显著差异($P > 0.05$)。黑芝麻总黄酮高、中剂量组则显著降低了 MDA 的含量($P < 0.05$)。以上结果说明黑芝麻总黄酮能够明显增强小鼠血清和脑组织中 T-SOD 和 GSH-Px 活力,并一定程度降低 MDA 含量,表明其具有一定的抗氧化能力。

2.4 黑芝麻总黄酮对衰老模型小鼠脑组织病理形态的影响(见图1)

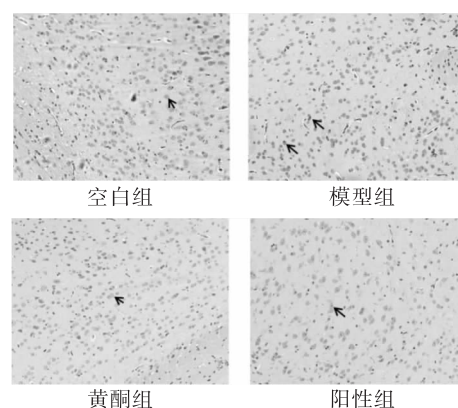


图1 黑芝麻总黄酮对衰老模型小鼠脑组织病理形态的影响

由图1可见,空白组小鼠脑组织细胞排列有序,模型组小鼠脑组织细胞排列松散,核固缩。与模型组相比,黑芝麻总黄酮(300 mg/kg)组小鼠脑组织细胞排列有序,细胞核清晰,明显好转。

(下转第66页)

- raphy[J]. J Chromatogr A, 1988, 44:81-90.
- [17] LIU L, OUYANG J, BAEYENS W R G. Separation of purine and pyrimidine bases by ion chromatography with direct conductivity detection[J]. J Chromatogr A, 2008, 1193(1/2):104-108.
- [18] 李存红,徐燕,丁明玉. 毛细管电泳法测定啤酒中的 11 种嘌呤和嘧啶碱[C]//第十七届全国色谱学术报告会及仪器展览会会议论文集.长沙:中国化学学会色谱专业委员会、中国色谱学会,2009.
- [19] 吕武清,颜华荣. 薄层扫描法测定金水宝胶囊中腺嘌呤的含量[J]. 药物分析杂志,1996(3):197-198.
- [20] 彭裕文. 生物化学[M].上海:复旦大学出版社,2005:127-130.
- [21] GUO H L. Specialized ribosomes and the control of translation[J]. Biochem Soc Trans,2018,46(4):855-869.
- [22] 荣胜忠,邹立娜,崔新宇,等. 中国居民膳食嘌呤摄入量评估[J]. 营养学报,2015,37(3):226-228,234.
- [23] 杨月欣. 中国食物成分表 2004[M].北京:北京大学医学出版社,2004:77-191.
- [24] 潘洪志,荣胜忠,邹立娜,等. 中国常见动物性食品中嘌呤的含量[J]. 营养学报,2012,34(1):74-78.
- [25] 荣胜忠,邹立娜,王朝旭,等. 中国常见植物性食品中嘌呤的含量[J]. 卫生研究,2012,41(1):92-95.
- [26] 查锡良,周春燕. 生物化学[M].北京:人民卫生出版社,2009:207-219.
- [27] 蔡路昀,张滋慧,曹爱玲,等. 食品中的嘌呤含量分布及在贮藏加工中变化研究进展[J]. 食品科学,2018,39(19):260-265.
- [28] KIYOKO K, YASUO A, TOMOKO F, et al. Total purine and purine base content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia[J]. Biol Pharm Bull, 2014,37(5):709-721.
- [29] 谢芳钦,陈爱平,罗朝晨,等. 常见饮品中嘌呤含量的测定[J]. 中国预防医学杂志,2013,14(7):77-78.
- [30] 靳羽慧,邓楚君,赵慧,等. 3 种常见食用菌营养成分和嘌呤物质含量分析[J]. 中国食用菌,2018,37(4):66-69,85.
- [31] 时玉强,鲁绪强,马军,等. 湿法粉碎豆粕对大豆分离蛋白生产的影响[J]. 中国油脂,2017,42(5):45-47.
- [32] 左青,钱胜峰,甘光生,等. 醇法大豆浓缩蛋白的生产及功能性改性[J]. 中国油脂,2017,42(9):44-48,71.
- [33] 谢俊旭. 去除大豆嘌呤简易方法之探讨[J]. 营养学会志,2005,24(4):366-378.
- [34] 毛玉涛,王明力,张洪,等. 盐析法脱除豆浆中嘌呤物质的探究[J]. 食品科技,2013(4):70-74.
- [35] 毛玉涛,王明力,张洪,等. 吸附剂对豆浆中嘌呤物质的吸附[J]. 食品与机械,2012(6):52-54,59.
- [36] 刘少林. 大豆中嘌呤含量的测定及分离研究[D].合肥:安徽农业大学,2009.

(上接第 44 页)

3 结论

本文通过建立 *D*-半乳糖致小鼠亚急性衰老模型,评价了黑芝麻总黄酮的体内抗氧化作用。研究表明:黑芝麻总黄酮能延长衰老小鼠负重游泳时间,增加脑指数,改善衰老小鼠脑组织的损伤;黑芝麻总黄酮能显著增加血清中 GSH-Px 活力,显著增加血清和脑组织中 T-SOD 活力,同时降低 MDA 含量。以上结果表明黑芝麻总黄酮通过抗氧化发挥抗衰老活性。

参考文献:

- [1] 刘君,张丽艳,幕杨娜,等. 中药黑芝麻不同炮制品体外抗氧化作用研究[J]. 西部中医药,2018,31(8):27-30.
- [2] 李亚会,汪学德,李晨曦,等. 黑芝麻与白芝麻各组分抗氧化物质及抗氧化活性研究[J]. 中国油脂,2018,43(4):37-41.
- [3] 封铎,张锦丽,李向阳,等. 黑芝麻的营养成分及保健价值研究进展[J]. 粮油食品科技,2018,26(5):36-41.
- [4] 张伶俐. 芝麻油对 *D*-半乳糖诱导的氧化损伤保护作用的研究[D]. 郑州:河南工业大学,2015.
- [5] 单科开,王鸿飞,许凤,等. 苦菜总黄酮超声波辅助提取及抗氧化能力研究[J]. 核农学报,2019,33(9):1755-1764.
- [6] 林款,徐丛玥,梁征,等. 肉桂黄酮的提取纯化及其体外抗氧化活性[J]. 食品科技,2019,44(7):267-272.
- [7] 王荣,杨宽,陈春妮,等. 亚麻籽提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化保护机制研究[J]. 中国油脂,2019,44(8):92-95.
- [8] 冯沼润,何先元,黄英如. 天葵子对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国新药杂志,2018,27(4):446-453.
- [9] 朴日龙,吴红梅,张红英. 马齿苋不同提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠的抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(14):240-243.
- [10] 张莹莹,王银环,史亚,等. 金银花水煎剂对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化作用[J]. 浙江中医药大学学报,2014,38(3):321-326.
- [11] 卢海庆,李俊,刘成军,等. 鲎血中超氧化物歧化酶对 *D*-半乳糖致衰老小鼠抗氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(12):1733-1736.