

羊胎盘复合物对老年小鼠抗氧化作用的研究

郭秋平*, 陈贵英, 周 泉

(广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心, 广州 510240)

摘 要: **目的** 评价羊胎盘复合物的抗氧化作用。**方法** ICR 老年小鼠, 分别以 0.45、0.90 和 2.70 g/kg 剂量连续灌胃 30 d 后, 检测血液丙二醛(malondialdehyde, MDA)、蛋白质羰基、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)等指标评价其抗氧化功能。**结果** 老年小鼠经口给予羊胎盘复合物 30 d 后, 羊胎盘复合物能减少血液 MDA 的含量, 升高 GSH 和 SOD 的含量。**结论** 结果显示, 羊胎盘复合物对老年小鼠显示了一定的抗氧化作用。

关键词: 羊胎盘; 抗氧化; 丙二醛; 蛋白质羰基; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽

Antioxidant effects of composite extraction of goat placental preparations on aged mice

GUO Qiu-Ping*, CHEN Gui-Ying, ZHOU Quan

(Drug Nonclinical Evaluation and Research Center of Guangzhou Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou 510240, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the antioxidant effects of composite extraction of goat placental preparations. **Methods** ICR aged mice were consistently administered intragastrically with the composite extraction (0.45, 0.90 and 2.70 g/kg) for 30 days. Subsequently, function indexes including malondialdehyde (MDA), protein carbonyl, superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were detected. **Results** After oral administration of composite extraction of goat placental preparations in aged mice for 30 d, the content of MDA was decreased, and the content of GSH and SOD were increased. **Conclusion** The results show that the composite extraction of goat placental preparations can enhance the antioxidant function of aged mice.

KEY WORDS: goat placental preparations; antioxidant; malondialdehyde; protein carbonyl; superoxide dismutase; glutathione

1 引 言

羊胎盘复合物含有羊胎盘冻干粉、大豆提取物、月见草油、维生素 E 等成分, 具有改善免疫、改善耐缺氧等作用。羊胎盘及其提取物中含有丰富的小分子多肽、酶、氨基酸和核酸等生物活性物质, 在提高机体抗氧化、抗衰老能力, 增强免疫力, 保护和营养皮肤及调节睡眠方面具有

一定功效^[1-5]。研究表明羊胎盘复方制剂可以改善小鼠的免疫功能, 提高小鼠的免疫器官指数, 还可以改善耐缺氧的能力, 改善亚硝酸中毒时间和急性脑缺血的缺血情况^[6]。羊胎盘提取物还可改善小鼠的细胞免疫和体液免疫功能^[7,8]。此外, 大豆异黄酮具有抗氧化作用和抗肿瘤活性^[9], 月见草油具有抗氧化、降血脂、降糖等作用^[10]。本研究通过提高抗氧化功能评价试验, 探讨羊胎盘冻干粉、大豆提

*通讯作者: 郭秋平, 高级工程师, 主要研究方向为功能性评价和毒理学评价。E-mail: vipvivenguoguo@163.com

*Corresponding author: GUO Qiu-Ping, Senior Engineer, Drug Nonclinical Evaluation and Research Center of Guangzhou Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou 510240, China. E-mail: vipvivenguoguo@163.com

取物、月见草油、维生素 E 复合提取物抗氧化的功效, 为其开发应用提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 药物、试剂与仪器

羊胎盘冻干粉、大豆提取物、月见草油、维生素 E 复合提取物, 由广州医药研究总院有限公司研制, 推荐成人日服用量为 5.4 g, 每 100 g 复合物含蛋白质 12.0 g, 大豆异黄酮 396 mg, γ -亚麻酸 6 g。试验时样品均用蒸馏水配制和稀释。

丙二醛(malondialdehyde, MDA)、蛋白质羰基、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

BSA224 型电子天平(德国 Sartorius 公司), Elx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司), WFJ720 型分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。

2.2 试验动物

SPF(specified pathogen free, 无特定病原体动物)级 ICR(institute of cancer research)小鼠(老年小鼠, 8~10 月龄), 雄性, 40 只, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(许可证号 SCXK(湘)2014-0003)。动物饲养于 SPF 级动物房, 温度 22~24 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 52%~58%, 12 h 照明/12 h 黑暗交替, 动物自由摄食和饮水, 适应性喂养 1 周后进行试验。

2.3 试验方法

试验前, 将 40 只老龄小鼠称重, 随机分为对照组和羊胎盘复合物 3 个剂量组, 每组 10 只。对照组给予等体积食用植物油, 样品 3 个剂量组分别是 0.45、0.90、2.70 g/(kg·bw), 分别相当于人推荐剂量的 5、10、30 倍, 灌胃体积 10 mL/kg。连续灌胃 30 d。第 31 d, 采尾尖血测定 4% 溶血液过氧化脂质降解产物丙二醛(含量)、全血抗氧化物还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量; 摘眼球采血, 血清测定蛋白质氧化产物蛋白质羰基含量, 抗氧化酶、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力。

2.4 统计学处理方法

实验检测数据用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 用平

均数 $\pm$ 标准差表示, 方差齐时采用单因素方差分析进行比较, 发现差异再用 Dunnett 法进行剂量组与对照组间两两比较。若方差不齐则对原始数据进行适当的变量转换进行统计; 若变转换后仍未达到方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计, 发现总体比较有差异, 则采用 Tamhane's T2 检验进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 对老龄小鼠体重的影响

结果显示(表 1), 各剂量组实验初期、中期、末期小鼠体重及增重与对照组相比, 无明显差异($P>0.05$)。

3.2 对老龄小鼠 4%溶血液过氧化脂质的影响

氧化应激反应是机体的损伤机制之一。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, 引起脂质过氧化作用, 并因此形成脂质过氧化产物。如醛基(丙二醛, MDA)、酮基、羟基、氢过氧基或内过氧基, 以及新的氧自由基等。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂, 即非自由基性的脂类分解产物, 而且通过链式或链式支链反应, 放大活性氧的作用。因此, 初始的一个活性氧能导致很多脂类分解产物的形成, 这些分解产物中, 一些是无害的, 另一些则能引起细胞代谢及功能障碍, 甚至死亡。氧自由基不但通过生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化引起细胞损伤, 而且还能通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞膜的损伤。因而, 测定 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接地反映细胞损伤的程度^[11]。

结果显示(表 2), 经口给予不同剂量的羊胎盘复合物 30 d 后, 高剂量 MDA 明显降低, 与对照组相比, 有显著性差异($P<0.05$)。

3.3 对老龄小鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

超氧化物歧化酶(SOD)是一种源于生命体的活性物质, 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质。SOD 具有特殊的生理活性, 是生物体内清除自由基的首要物质。它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损伤, 并及时修复细胞, 在抗氧化机制中, 地位非常重要^[12]。

表 1 羊胎盘复合物对老龄小鼠体重的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 1 The effect of composite extraction of goat placental preparations on weight of aged mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(g/(kg·bw))	动物数(只)	初期体重(g)	中期体重(g)	末期体重(g)	增重(g)
对照组	-	10	50.49 $\pm$ 2.49	52.46 $\pm$ 2.08	53.93 $\pm$ 2.15	3.44 $\pm$ 1.38
低剂量组	0.45	10	50.45 $\pm$ 2.38	52.84 $\pm$ 2.17	53.91 $\pm$ 2.25	3.46 $\pm$ 1.05
中剂量组	0.90	10	50.38 $\pm$ 2.50	52.92 $\pm$ 2.14	53.97 $\pm$ 3.05	3.59 $\pm$ 1.11
高剂量组	2.70	10	50.76 $\pm$ 2.16	52.88 $\pm$ 2.10	54.20 $\pm$ 2.33	3.44 $\pm$ 0.88

表 2 羊胎盘复合物对老龄小鼠 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2 The effect of composite extraction of goat placental preparations on MDA content of aged mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/(kg·bw))	动物数(只)	给药前 MDA 含量(nmol/mL)	给药 30 d 后 MDA 含量(nmol/mL)
对照组	-	10	12.50±2.30	13.73±2.32
低剂量组	0.45	10	13.45±2.26	13.56±2.11
中剂量组	0.90	10	13.50±2.30	12.28±2.32
高剂量组	2.70	10	13.70±2.30	11.11±2.34*

注: *与对照组相比, $P<0.05$; ** 与对照组相比, $P<0.01$ 。

结果显示(表 3), 经口给予不同剂量的羊胎盘复合物 30 d 后, 中剂量组 SOD 有升高趋势($P=0.069$), 高剂量 SOD 明显升高, 与对照组相比, 有显著性差异($P<0.05$)。

表 3 羊胎盘复合物对老龄小鼠 SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3 The effect of composite extraction of goat placental preparations on SOD activity of aged mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/(kg·bw))	动物数(只)	SOD 活力(U/mL)
对照组	-	10	108.65±20.36
低剂量组	0.45	10	125.32±21.51
中剂量组	0.90	10	130.80±19.83
高剂量组	2.70	10	141.15±20.91*

注: *与对照组相比, $P<0.05$; ** 与对照组相比, $P<0.01$ 。

3.4 对老龄小鼠全血还原性谷胱甘肽 GSH 含量的影响

谷胱甘肽(GSH)是一种低分子清除剂, 它可清除 O_2 、 H_2O_2 、 $LOOH$ 。谷胱甘肽是谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的一种三肽, 是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物, 并且是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH- P_x)和 GST 2 种酶类的底物, 为这 2 种酶分解氢过氧化物所必需, 而且能稳定巯基的酶和防止血红蛋白及其他辅因子受氧化损伤, 最近还证明 GSH 也参与使维生素 E 恢复到原态的作用, 缺乏 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用或毒性加重作用, 这可能与增加氧化损伤有关, 因而 GSH 的量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素^[13]。

结果显示(表 4), 经口给予不同剂量的羊胎盘复合物 30 d 后, 中剂量组 GSH 有升高趋势($P=0.107$), 高剂量 GSH 明显升高, 与对照组相比, 有极显著性差异($P<0.01$)。

3.5 对老龄小鼠血清蛋白质羰基含量的影响

蛋白质是一类重要的生物大分子, 在生物体内占有特殊的地位。它是集体一切细胞的基本构成物质; 在构成机体的生命活性物质中含量最多, 包括酶类、激素类、抗体及免疫物质类, 也是体内很多重要的代谢物质、营养物质的载体, 例如多种脂类、维生素等都需要蛋白质携带和

转运。由于蛋白质种类多, 且广泛分布于细胞内外, 极易受到活性氧的攻击。蛋白质羰基的产生使蛋白质分子被自由基氧化修饰的一个重要标记, 由于这一特征具有普遍性, 因而通过测定蛋白质羰基的含量可判断蛋白质是否被氧化损伤^[14]。

结果显示(表 5), 经口给予不同剂量的羊胎盘复合物 30 d 后, 各剂量组与对照组相比, 均无显著性差异($P>0.05$)。

表 4 羊胎盘复合物对老龄小鼠 GSH 含量的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 4 The effect of composite extraction of goat placental preparations on GSH content of aged mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg·(bw))	动物数(只)	GSH 含量(U/mL)
对照组	-	10	0.152±0.073
低剂量组	0.45	10	0.209±0.0856
中剂量组	0.90	10	0.228±0.079
高剂量组	2.70	10	0.277±0.051**

注: *与对照组相比, $P<0.05$; ** 与对照组相比, $P<0.01$ 。

表 5 羊胎盘复合物对老龄小鼠蛋白质羰基含量的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 5 The effect of composite extraction of goat placental preparations on protein carbonyl content of aged mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/(kg·bw))	动物数(只)	蛋白质羰基含量(nmol/mgprot)
对照组	-	10	4.624±0.436
低剂量组	0.45	10	4.647±0.631
中剂量组	0.90	10	4.694±0.460
高剂量组	2.70	10	4.496±0.510

4 结 论

本复合物含有羊胎盘冻干粉、大豆提取物、月见草油、维生素 E, 结合其成分分析, 其中, 羊胎盘冻干粉能降低小鼠大脑 MDA 的含量, 并能增强免疫功能, 对小鼠有延缓衰老的作用^[15]; 大豆异黄酮能降低老年大鼠血清 MDA

的含量,提高 GSH-Px 的活力,使肝脏的脂褐素降低,具有明显的抗氧化作用^[16];月见草油能明显提高大鼠血清 SOD 和 MnSOD 的活性,降低大鼠血浆脂质过氧化物的生成,具有抗衰老作用^[17];维生素 E 能提高鹅血清和肝脏 GSH-Px 活性,降低 MDA 的含量,具有明显的抗氧化功能^[18]。

本研究结果显示,高剂量的羊胎盘复合物(2.70 g/(kg·bw))连续给药 30 d 后,能明显使动物体内 MDA 含量的下降,同时有效提高 SOD 活力和 GSH 含量,并且不影响小鼠的体质量。说明高剂量的羊胎盘复合物有助于清除体内 MDA 及促进 SOD 活力、提升 GSH 含量的功能,加快了自由基的分解和清除,能有效保护机体免受氧化损伤。

本研究证实了适宜剂量的羊胎盘复合物具有较为显著的抗氧化功能,具有较大的保健开发价值,值得进一步深入研究,尤其是对该复合物的抗氧化机制的研究,将有利于该复合物在进一步的开发和临床应用。

参考文献

- [1] Stallings-Mann ML, Burke MG, Trout WE, *et al.* Purification, characterization and cDNA cloning of Kunitz-type proteinase inhibitor secreted by the porcine uterus [J]. *J Biol Chem*, 1994;269(39): 24090–24094.
- [2] Togashi S, Takahashi N, Iwama M, *et al.* Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract [J]. *Placenta*, 2002, 23(6): 497–502.
- [3] Simoes SI, Delgado TC, Lopes RM, *et al.* Developments in the rat adjuvant arthritis model and its use in therapeutic evaluation of novel non-invasive treatment by SOD in transfersomes [J]. *J Control Release*, 2005, 103(2): 419–434.
- [4] 周国华,洪浩龙,谭雷涛,等.牛和羊胎盘的制备及其生物活性研究[J].*中国生化药物杂志*, 2006, 27(3): 172–174.
Zhou GH, Hong HL, Tan LT, *et al.* Study on the preparation and bioactivity of placental peptide of cattle and sheep [J]. *Chin J Biochem Pharm*, 2006, 27(3): 172–174.
- [5] 张华,张爽,蔡亚平,等.羊胎盘肽对小鼠非特异性免疫功能的影响[J].*中国生化药物杂志*, 2007, 28(4): 266–268.
Zhang H, Zhang S, Cai YP, *et al.* Effect of placental peptide on non-specific immune function in mice [J]. *Chin J Biochem Pharm*, 2007, 28(4): 266–268.
- [6] 方廖琼,钟英英,张华,等.羊胎盘免疫调节因子对小鼠体液免疫的影响[J].*重庆医科大学学报*, 2005, 30(3): 356–358.
Fang LQ, Zhong YY, Zhang H, *et al.* The effect of immunomodulation factor on the humoral immunity of sheep in sheep [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2005, 30(3): 356–358.
- [7] 郑润宽,徐勇,赵忠,等.羊胎盘转移因子注射液细胞免疫调节作用的研究[J].*畜牧与饲料科学*, 2014, 35(1): 1–2.
Zheng RK, Xu Y, Zhao Z, *et al.* Study on immunomodulation of placental transfer factor injection in sheep [J]. *Anim Husbandry Feed Sci*, 2014, 35(1): 1–2.
- [8] 方廖琼,钟英英,张华,等.羊胎盘免疫调节因子对小鼠体液免疫的影响[J].*重庆医科大学学报*, 2005, 30(3): 356–357.
Fang LQ, Zhong YY, Zhang H, *et al.* The effect of immunomodulation factor on the humoral immunity of sheep in sheep [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2005, 30(3): 356–357.
- [9] 徐春华,张治广,谢明杰.大豆异黄酮的抗氧化和抗肿瘤活性研究[J].*大豆科学*, 2010, 29(5): 870–873.
Xu CH, Zhang ZG, Xie MJ. Studies on antioxidant and anti-tumor activity of soybean isoflavones [J]. *Soybean Sci*, 2010, 29(5): 870–873.
- [10] 曲彩虹.月见草油药理研究与临床应用[J].*时珍国医国药*, 1999, 10(8): 629–630.
Qu CH. Research and clinical application of herb oil pharmacology [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 1999, 10(8): 629–630.
- [11] 程元恺.脂质过氧化与抗氧化酶[J].*工业卫生与职业病*, 1993, 13(4): 256–257.
Cheng YK. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes [J]. *Ind Health Occupat Dis*, 1993, 13(4): 256–257.
- [12] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理学实验方法学(第3版)[M].北京:人民卫生出版社,2002.
Xu SY, Dian RL, Chen X. Experimental methodology of pharmacology(3rd Edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [13] 孙君志,王东辉,王纯,等.不同强度炮台对大鼠血清总抗氧化能力、超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的影响[J].*中国临床康复*, 2006, 10(48): 68–70.
Sun JZ, Wang DH, Wang C, *et al.* The effects of different strength battery on total serum antioxidant capacity, superoxide dismutase activity and malondialdehyde content in rats [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, 10(48): 68–70.
- [14] 王志辉,王燕一.蛋白质羰基与衰老疾病关系的研究进展[J].*中华老年口腔医学杂志*, 2015, 13(1): 47–50.
Wang ZH, Wang YY. [J]. Relationship between protein carbonyl and aging diseases [J]. *Chin J Geriatr Dent*, 2015, 13(1): 47–50.
- [15] 宋航,臧传宝,刘小盾,等.胎盘冻干粉对小鼠延缓衰老作用的研究[J].*中国生化药物杂志*, 2014, 34(1): 65–67.
Song H, Zang CB, Liu XD, *et al.* Anti-aging function of placenta freeze-dried powder on mice [J]. *Chin J Biochem Drug*, 2014, 34(1): 65–67.
- [16] 朱慧娟,赵岩,李世芬,等.大豆提取物抗氧化作用研究[J].*江苏卫生保健*, 2007, 9(1): 5–6.
Zhu HJ, Zhao Y, Li SF, *et al.* Study on antioxidant effects of soybean extraction [J]. *Jiangsu Health Care*, 2007, 9(1): 5–6.
- [17] 刘晓瑞,俞仲毅.月见草油抗衰老作用的实验研究[J].*中国老年学杂志*, 2007, 27(16): 1571–1572.
Liu XR, Yu ZY. Study on anti-aging effects of evening primrose seed oil [J]. *Chin J Gerontol*, 2007, 27(16): 1571–1572.
- [18] 王宝维,周小乔,葛文华,等.饲料维生素 E 水平对鹅免疫和抗氧化功能的影响[J].*动物营养学报*, 2013, 25(1): 59–68.
Wang BW, Zhou XQ, Ge WH, *et al.* Effects of dietary vitamin E level on immune and antioxidant functions of Geese [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2013, 25(1): 59–68.

(责任编辑:武英华)

作者简介

郭秋平,高级工程师,主要研究方向为功能性评价和毒理学评价。
E-mail: vipvenguoguo@163.com