

番茄红素吸收与体内抗氧化的机理研究

范远景, 黄璐

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230069)

摘要: 番茄红素是有效的生物抗氧化剂, 近年来人们对番茄红素进行了大量的研究, 发现番茄红素具有多种生物学功能, 如淬灭单线态氧、清除自由基、诱导细胞通讯和细胞信号、抑制肿瘤等。本实验进行了番茄红素(Lycopene, LP)对小鼠抗氧化酶体系影响的研究。小鼠饲喂番茄红素4d后取血, 测定血清和肝匀浆的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性、丙二醛(MDA)的含量。各番茄红素给药组的小鼠血清和肝组织的SOD、CAT和POD活性上升、MDA含量降低。与空白组比较, 结果有显著性差异。番茄红素的体内抗氧化与内源性抗氧化酶体系的活性激活有关。

关键词: 番茄红素; 吸收; 小鼠; 抗氧化

Study on Mechanism of Lycopene Absorption and Antioxidation Effects on Mice in vivo

FAN Yuan-jing, HUANG Lu

(Institute of Biological and Food industry, Hefei University of Technology, Hefei 230069, China)

Abstract: It has been suggested that lycopene has many biological functions, such as quenching singlet oxygen and eliminating free radical, promoting cell communication and signal cells and inhibiting cellular malignant transformation. Since the subject of lycopene bioefficacy and bioavailability has not been studied thoroughly yet, this experiment carried out the study on lycopene affection with anti-oxidative enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) from mice liver. Lycopene was firstly extracted from tomatoes by petroleum ether. The group of 6 mice was fed 1 week with the lycopene then killed for assay. The activities of SOD, POD, CAT and the content of malondialdehyde (MDA) were determined respectively. Due to lycopene treatment, the activities of SOD, POD increase, while the content of MDA decreases. Compared to control group, the results showed that lycopene can enhance mice's anti-oxidative capability and inhibit their lipid peroxidation.

Key words: lycopene; absorption; mice; anti-oxidative

中图分类号: S571.1; TS272.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)11-0545-04

很多研究结果都证实了番茄红素具有抗氧化、清除自由基的生物学效应。但是番茄红素的体内吸收和生物利用上存在一些不明确的问题。对人体而言, 很多因素影响番茄红素的吸收。有人将番茄红素吸收可分为4步: 食物基质的消化、形成固定的磷脂微团、被小肠粘膜细胞摄取以及经淋巴系统转运。每一步脂肪都是必需的。因此, 食物基质的组成、颗粒大小、加工处理和人体脂肪代谢状况等因素都可能影响到番茄红素的吸收^[1]。吸收后进入体内的番茄红素所显示的淬灭氧自由基和上调内源性抗氧化酶类活性效应成为番茄红素生物学效应研究的重点内容。在生物体内由于番茄红素的生物学性质^[2], 伴随着消除氧自由基的发生, 产生着一系列生理生化反应过程, 了解和研究这些过程机理有助于促进番茄红素在预防疾病应用方面的深入研究。本

研究进行番茄红素的不同溶剂液灌胃小鼠实验, 比较小鼠血液番茄红素的含量浓度和体内抗氧化效果, 探讨提高番茄红素的生物学效应和生物利用度的机理过程。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄 市售; 菜子油 市售。

1.2 试剂

丙酮、乙醚、乙酸乙酯、氯仿、氢氧化钠、盐酸、石油醚。

1.3 番茄红素的提取方法

提取工艺流程如下所示: 番茄 捣碎成泥 有机溶剂浸提 提取液—番茄红素。石油醚与丙酮以1:2的比例混合作为提取液, 浸提6h, 再将混合物过滤, 蒸馏

收稿日期: 2006-09-09

作者简介: 范远景(1958-), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品营养与安全方面研究。

干燥,除去有机溶液,制得番茄红素粗提粉状物。按照3mg/ml浓度调制制成水乳浊液和油溶液的灌胃液。番茄红素溶液在475nm比色计算含量。

1.4 实验动物

选用18只购自安徽医科大学纯种雌性健康小鼠,随机分为3组,每组6只,实验灌胃不同溶剂的番茄红素灌喂剂后的血液番茄红素浓度;54只同样小鼠随机分为3组,每组6只,测定油溶番茄红素灌喂剂后的血浆SOD、CAT和POD酶活性;18只同样小鼠随机分为3组,每组6只,测定油溶番茄红素灌喂剂后的血浆MDA含量。

1.5 番茄红素吸收与抗氧化实验

1.5.1 吸收实验

小鼠随机分为3组,每组6只,分别为空白对照组,水溶番茄红素组,油溶番茄红素组,空白组喂食普通饲料,番茄红素灌胃量按照30mg/kg·bw,胃底灌胃,连续4d,每天两次。第4d停止喂食空腹过夜后,次日早晨小鼠眼球取血,置于预先用肝素钠 1×10^{-6} U/L的溶液处理过的离心管。迅速放入高速离心机中,5000r/min离心5min后用微量进样器小心吸取上清液,用石油醚:丙酮=1:2的混合液定量浸提上清液,在475nm比色。

1.5.2 抗氧化实验

取3组小鼠,分别为即空白对照组,水溶番茄红素组和油溶番茄红素组,喂食方法同上,连续4d,每天两次。第4d停止喂食空腹过夜后,取小鼠肝脏制酶液。酶液制备:取肝脏,加9倍肝脏质量的预冷PBS溶液,冰水浴中匀浆,15000r/min,离心15min(离心时温度维持在4℃),上清液即为酶的提取液,置冰箱保存备用。

1.5.3 酶活性的测定^[3]

1.5.3.1 样液蛋白量测定

考马斯亮蓝法(G-250)测定蛋白质浓度。Bradford蛋白浓度测定试剂盒(碧云天试剂公司),包括:G250染色液(4℃保存)、蛋白标准(BSA)5mg/ml(-20℃保存)、PBS已配准备稀释用。按试剂盒说明,酶标仪在578nm的波长下测定(318MC型酶标仪上海三科公司),比色法分别检测肝脏酶液样蛋白量。

1.5.3.2 SOD酶活性的测定

3ml反应液中,磷酸缓冲液(pH7.0)的浓度为50mmol/L、甲硫氨酸的浓度为13mmol/L、氮蓝四唑(NBT)的浓度为75mmol/L、EDTA的浓度为0.1mmol/L、核黄素的浓度为4 μ mol/L,酶液200 μ l摇匀后快速置于光照培养箱进行光化学反应,结束时立即置于黑暗处终止反应,并在560nm下比色,1个酶活性单位相当于引起3ml反应液达到质量分数为50%抑制所需要的酶量,全值的

测定方法,3ml反应液置室温下让酶充分失活,然后比色所测值即为全值,以 A_{560nm} 变化百分率表示酶的活性^[4]。

1.5.3.3 CAT酶活性的测定

3ml反应液中,磷酸缓冲液(pH7.0)的浓度为50mmol/L、 H_2O_2 的浓度为8mmol/L、酶液200 μ l,30℃下反应1min,立即加入2ml体积分数为10%的 H_2SO_4 终止反应,然后用2mmol/L $KMnO_4$ 溶液滴定剩余 H_2O_2 ,根据 H_2O_2 的消耗量计算CAT活性^[5]。

1.5.3.4 POD酶活性的测定

3ml反应液中,磷酸缓冲液(pH7.0)浓度为100mmol/L,愈创木酚浓度为30mmol/L, H_2O_2 浓度为26mmol/L,酶液200 μ l。在470nm下比色,持续50min,记录初值和每反应1min时的比色值,以 A_{470nm} 表示酶的活性^[4]。

上述三种酶活性是分别在灌喂水混合番茄红素和油混合番茄红素后的肝脏酶活性表示,如果需要相对比较,则用肝脏样液蛋白量的相对酶比活力,即每毫克蛋白量中酶的活性。

1.5.3.5 丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定

硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)测定方法,上述反应终止后每支试管各加入0.7%的TBA水溶液3ml,沸水浴中加热1h,冰浴冷却后,535nm波长比色。

2 结果与分析

2.1 番茄红素吸收

番茄红素的浸提可用氯仿、乙醚、石油醚、正己烷、丙酮、乙醇以及四氢呋喃等有机溶剂。通过几种有机试剂浸提比色分析对比,浸提效果比较好的溶剂为乙醚、丙酮、氯仿、石油醚等,但是从实际应用推广价值分析,采用石油醚与丙酮1:2体积混合的浸提以及吸光度比色分析效果为好,可以较好地消除 β -胡萝卜素吸光峰的干扰和影响^[6]。小鼠血浆经离心分离,上清液用石油醚与丙酮混合液浸提后的紫外可见分光光度计(UV757CRT)扫描图谱(图1),在475~500nm获得吸收峰及空白血清定量添加番茄红素的回归曲线(图2),并用此法检测血液中番茄红素含量。

不同小鼠个体间产生的番茄红素吸收差异较为明显;油溶和水溶的番茄红素灌胃剂产生的血液中含量差异达到极显著水平(见表1)。

2.2 肝脏酶活性及相对比活性

小鼠肝脏的SOD和POD活性以测定吸光度变化率表示酶的活性,CAT则以 H_2O_2 的消耗量表示其酶活性,MDA以吸光度的变化率表示其相对含量变化;用肝脏匀浆酶测试的样液进行蛋白量测定,可以获得酶的相对比

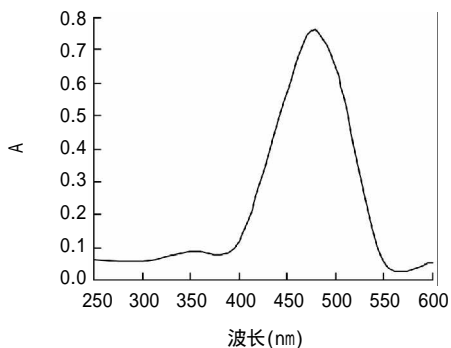


图1 血清番茄红素紫外-可见光扫描图谱

Fig.1 Peak of lycopene by UV-spectrophotometer

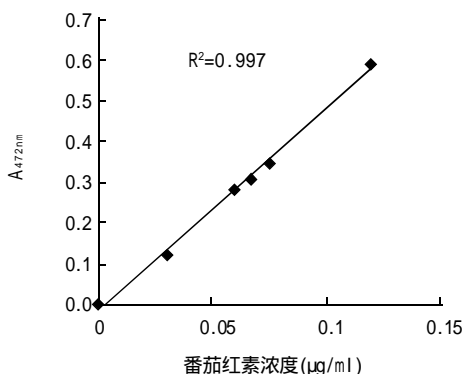


图2 番茄红素浓度含量与吸光度

Fig.2 Concentrations of lycopene and absorbance

活力,用以SOD、POD和CAT酶活的相对比较。根据试剂盒提供的标准蛋白溶液(0.5mg/ml)配制成0.0025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5等蛋白含量浓度(mg/ml),分别在酶标仪(578nm)上测定吸光度,得回归曲线为 $Y=0.9867X+0.0132(R=0.9989)$,水溶和油溶番茄红素饲喂的两组小鼠肝脏匀浆酶液各取三份,分别测定吸光度,并根据回归曲线方程计算蛋白量(表2)。

2.3 体内的抗氧化酶类活性

在肝脏中抗氧化酶主要是谷胱甘肽过氧化酶(含硒和不含硒谷胱甘肽过氧化酶,简称SeGPx和nonSeGPx)、

CAT、SOD、POD等。 H_2O_2 是肝脏细胞中主要的内源性过氧化物,其含量与内源性氧化酶体系活性有密切关系。因此实验选择SOD、POD和CAT为番茄红素的影响对象进行检测试验对比。小鼠肝脏经高速离心分离后的上清液,分别按照上述酶活测定方法进行,每份样液用量为 $200\mu l$,检测与计算结果见表3。通常情况下,各种酶活的变化趋势与比活基本相似,因此以(检测值-CK)÷(检测值×样液蛋白量×检测样品用量)关系计算出相对酶比活,用以比较酶活变化动态。

2.4 抗氧化酶活性效果

从实验小鼠购入至灌胃宰杀前给与正常喂食,体重变化为购入时 $20.25 \pm 1.03g$,宰杀前 $27.23 \pm 1.04g$,属于生长发育状况正常。在正常生长发育状态下的体内抗氧化酶活性以及受番茄红素的影响变化,则可以认为主要是食物代谢和体内正常生理活动所产生。如表3所示,与空白对照相比,SOD、POD及CAT的活性在水溶和油溶的饲喂后都有提高,但以油溶番茄红素饲喂后抗氧化酶活性提高显著,而伴随的结果是体内生物氧化产物丙二醛含量随之降低(表3),脂质过氧化作为发病机制的研究越来越受到人们的重视。因此,血清MDA是一项有临床意义的生物标志物^[7]。

3 讨论与结论

本实验旨在探讨番茄红素在动物体内消化吸收以及对体内吸收后的抗氧化效果,也就是番茄红素的生物学效应(bioefficacy)和生物利用度(bioavailability)。番茄红素与含氧类胡萝卜素、羟基类胡萝卜素构成类胡萝卜素的三大类组成,小肠对类胡萝卜素的吸收率很低,约占膳食量的10%~30%,随着膳食中类胡萝卜素的增加和脂肪减少,其吸收率下降。表1所示结果显示,膳食条件对番茄红素的吸收影响较大,油脂有助于番茄红素的吸收。但是过分依赖于油溶或借助于脂肪代谢而提高番茄红素的吸收,可能会产生膳食均衡的问题。如何在满足膳食均衡前提下提高番茄红素的生物利用度,

表1 不同溶剂灌胃小鼠的血液番茄红素浓度(μg/ml)

Table 1 Lycopene concentrations in mice plasma fed lycopene dissolution in water and in oil respectively (μg/ml)

浓度(μg/ml)	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm S$
空白对照组	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
水溶番茄红素组	0.007	0.003	0.015	0.006	0.000	0.019	0.008 ± 0.0073
油溶番茄红素组	0.058	0.067	0.061	0.023	0.043	0.064	$0.052 \pm 0.0167^{**}$

注:与水溶番茄红素灌胃剂比较,** $p < 0.01$ 。

表2 G-250法测定样液蛋白量

Table 2 Tests for protein concentrations of sample from mouse liver by G-250

A_{578nm}	1	2	3	$\bar{X} \pm S$	样液蛋白量(mg/ml)
水溶番茄红素饲喂小鼠肝脏匀浆	0.176	0.179	0.172	0.1757 ± 0.0035	1.6469
油溶番茄红素饲喂小鼠肝脏匀浆	0.186	0.181	0.188	0.1850 ± 0.0036	1.7412

表3 番茄红素诱导小鼠体内的酶活性和MDA含量变化
Table 3 Lycopene induced activities of antioxidative enzymes in endobiotic mice and reducing MDA

测定内容	活性表示	检测与对照	实验分组						$\bar{X} \pm S$	相对酶比活 ^a (U/mg蛋白量)
			1	2	3	4	5	6		
SOD 值	A _{560nm}	C K	0.979	0.985	0.937	0.993	0.950	1.068	0.9853 ± 0.0459	
		检测 1	0.988	0.992	0.985	0.993	0.963	1.009	0.9883 ± 0.0149	0.0092
		检测 2	1.257	1.198	0.965	0.958	1.368	1.089	1.1392 ± 0.1645**	0.3879
POD 值	A _{470nm}	C K	0.080	0.072	0.093	0.097	0.076	0.087	0.0842 ± 0.0098	
		检测 1	0.102	0.099	0.092	0.108	0.085	0.114	0.100 ± 0.0105**	0.4797
		检测 2	0.132	0.11	0.119	0.14	0.126	0.136	0.1272 ± 0.0112**	0.9707
CAT 值	H ₂ O ₂ 消耗量	C K	984.5	1032.5	993.2	1006.1	935.1	976.6	998.00 ± 32.48	
		检测 1	993.2	1033.2	1009.3	1009.8	1008.2	998.6	1008.72 ± 13.74**	0.0323
		检测 2	1079.9	1065.7	1093.5	1105.5	1200.3	916.5	1076.90 ± 91.85**	0.2104
MDA 值	A _{535nm}	C K	2.12	2.01	1.98	2.23	2.06	2.19	2.0983 ± 0.0995	
		检测 1	2.12	2.00	1.98	2.15	1.99	2.08	2.0533 ± 0.07312*	
		检测 2	2.14	1.92	1.99	2.07	1.83	2.04	1.9984 ± 0.1109**	

注: CK. 空白对照; 检测 1. 水相组饲喂; 检测 2. 油溶番茄红素组。与小鼠实验 CK 组比较: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n=6$); &. 相对酶比活计算关系为 (检测 - CK) / 检测 × 样液蛋白量 × 检测样品用量。

这为进一步探讨番茄红素的微胶囊、纳米载体核心等材料的应用提出了思路空间。本实验的结果显示番茄红素对体内 SOD、POD 和 CAT 活性都有促进作用, 尤其是 POD 的活性促进。李秋霞等^[8]对力竭性运动后小鼠肝脏检测, 发现力竭性运动后肝脏的 POD 活性升高, 但 CAT 活性与 SOD 活性则无显著性变化; 付妍等^[9]利用旋转磁场对小鼠肝组织过氧化物酶活性影响的试验结果显示, 对 POD 的促进活性效果也是远高于促进 SOD 的效果。这说明动物的正常生理活动、体内外的理化环境, 包括膳食和药物都有可能影响体内的自由基、H₂O₂ 等多种活性氧的生成。POD 亦能清除体内的 H₂O₂, 但其作用机理有别于 CAT。番茄红素能多方位促进抗氧化酶系的活性, 具有重要的生理意义。CAT、POD 等过氧化物酶类是细胞微体的主要酶类, 在肝细胞或肾细胞中, 可以氧化分解血液中的有毒成分, 起到解毒的作用。番茄红素在体内参与抗氧化和上调内源性抗氧化酶系活性, 有助于进一步研究番茄红素对人体的抗衰老、预防动脉硬化以及调节人体免疫预防癌症等作用机理。

参考文献:

- [1] SIES H, STAHL W. Lycopene: antioxidant and biological effect and its bioavailability in the human[J]. Proc Exp Biol Med, 1998, 218(2): 121-124.
- [2] 赵文恩, 乔宪生, 俞宏, 等. 番茄红素的生物学性质[J]. 生物学杂志, 2000, 17(4): 4-6.
- [3] 李周直, 沈惠娟. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究[J]. 昆虫学报, 1994, 37(4): 399-403.
- [4] 刘井兰, 吴进才, 袁树忠. 经除草剂处理的水稻对褐飞虱体内几种酶及水稻受褐飞虱为害程度的影响[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4): 303-308.
- [5] 蒋继宏, 吴薇, 曹小迎. 苦豆碱对杨小舟蛾体内保护酶系统活力的影响[J]. 南京林业大学学报, 2005, 29(5): 91-93.
- [6] 侯纯明, 周鑫, 庞常健, 等. 紫外分离测定番茄红素[J]. 食品科技, 2006, 13(2): 11-14.
- [7] 张博文, 周贵菊, 姜晓梅. 贵阳地区正常人血清丙二醛MDA正常值探讨[J]. 微量元素与健康研究, 2006, 23(2): 69.
- [8] 李秋霞, 熊正英, 张全江. 一次性力竭运动对肝部分生化指标及肝细胞超微结构的影响[J]. 天津体育学院学报, 2002, 17(4): 24-17.
- [9] 付妍, 诸挥明, 张慧卿. 旋转磁场对小鼠血清超氧化物歧化酶及肝组织过氧化物酶活性的影响[J]. 中国医学物理学杂志, 1999, 16(3): 178-179.



新研究显示: 孕妇多吃苹果 宝宝不易哮喘

孕妇一天吃一个苹果, 有助于预防胎儿发生哮喘。一项新的研究显示, 与怀孕期间很少吃苹果的母亲所生的孩子相比, 那些经常吃苹果的母亲所生的孩子在 5 岁前不易发生哮喘或气喘。

发表在美国《胸腔》期刊上的这项研究称, 荷兰乌得勒支大学的研究人员对 1200 名妇女和她们的孩子进行了比较, 以了解孕妇所吃的食物和孩子在童年发生哮喘的几率之间的关系。

研究显示, 苹果是唯一与儿童哮喘发生率降低有关的食物, 吃最多苹果的母亲(一周至少 4 个)所生的孩子比吃最少苹果的母亲(一周不足 1 个)所生的孩子发生哮喘的几率低 50%。

研究人员称, 苹果的保护效果很可能是其植物成分起作用, 包括黄酮类化合物以及其他已知的有多种健康效果的化合物。