

## 摘 要

本论文选取四种常见的天然抗氧化剂——茶多酚、维生素 C、维生素 E 和  $\beta$ -胡萝卜素，利用它们之间的协同增效作用，应用均匀设计方法优选出一种新型复合天然抗氧化剂，其配方为茶多酚：维生素 C：维生素 E： $\beta$ -胡萝卜素的质量比为 4：4：1：1。

通过 DPPH·清除实验，证明复方具有很强的清除 DPPH·的能力。其清除 DPPH·的能力是四种抗氧化剂单独使用时清除 DPPH·能力加和的 11 倍。

在动物实验中，通过急性毒性实验表明复方对动物体无毒性；通过果蝇实验表明复方能有效提高果蝇平均寿命，提高其飞翔能力和耐高温能力，并降低果蝇体内 MDA 和脂褐素含量；以正常小鼠为模型的实验表明，复方可以显著提高正常小鼠脾脏系数和胸腺系数，提高血清 SOD 活性、血清总抗氧化能力和血清中游离羟脯氨酸含量，降低血清 MDA 含量，同时可以提高组织中羟脯氨酸含量，降低组织 MDA 和脂褐素含量；以衰老小鼠为模型的实验表明，复方可以提高衰老小鼠脾脏系数，提高血清 SOD 活性，降低血清 MDA 含量，降低肝、脑中 MDA 含量，提高脑中 SOD 活性；抗应激实验表明复方可以显著提高实验小鼠游泳及耐高温能力。

通过细胞试验初步表明复方有一定的抑制癌细胞生长，促进其凋亡的效果。

关键词：抗氧化剂、协同作用、茶多酚、维生素 C、维生素 E、 $\beta$ -胡萝卜素

## Abstract

Four natural antioxidants—tea polyphenols, vitamin C, vitamin E and  $\beta$ -carotene were intermixed into a new synergic antioxidant in order to use the synergic action among different antioxidants. The proportion of the four antioxidants in weight is tea polyphenols: vitamin C: vitamin E:  $\beta$ -carotene = 4: 4: 1: 1.

The synergic antioxidant showed stronger ability in scavenging DPPH $\cdot$  comparing with the four constituents when they were used alone. It showed no harm to mice in acute toxicity test. In fruit fly experiment, the synergic antioxidant could longer the average life-span of fruit flies, improve the ability of flying and the ability of tolerating high temperature, reduce the MDA and lipofuscin content in fruit flies.

The results of the experiments using normal mice as model showed that the synergic antioxidant could improve the spleen coefficient and the thymus coefficient markedly; and it could strengthen the SOD activity, total antioxidant ability and increase the Hpro content in serum, reduce the MDA content in serum; also it could improve the Hpro content, reduce the MDA and lipofuscin content in tissue. The results of the experiments using aged mice as model showed that the synergic antioxidant could improve the spleen coefficient markedly; also it could strengthen the SOD activity, reduce the MDA content in serum; and it could strengthen the SOD activity in brain, reduce the MDA content in liver and brain.

The results of the antistress test showed that the synergic antioxidant could elevate the swimming time and tolerating high temperature function in mice. And the results of the cell test indicated that the synergic antioxidant had anti-cancer ability.

**Key Words:** Antioxidant, Synergism, Tea Polyphenols, Vitamin C, Vitamin E,  $\beta$ -carotene

# 原创性声明

本人声明：所呈交的论文是本人在导师指导下进行的研究工作。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已发表或撰写过的研究成果。参与同一工作的其他同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签 名：\_\_\_\_\_日期\_\_\_\_\_

# 本论文使用授权说明

本人完全了解上海大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留论文及送交论文复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容。

（保密的论文在解密后应遵守此规定）

签 名：\_\_\_\_\_ 导师签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

## 第一章 前言

### 1.1 自由基

#### 1.1.1 自由基的概念<sup>[1]</sup>

自由基(free radical)是指能独立存在的,含有一个或一个以上不配对电子的任何原子或原子团。一个或一个以上不配对电子的存在使自由基能受到磁场的吸引(即顺磁性),并使它们具有高度活性。在化学反应中和生物体内有很多自由基(如氢原子等)。当化合物的共价键断裂时成对的电子由二个原子均分,这一过程称为均裂。很多自由基即通过均裂产生,共价键均裂所需要能量可由热能、电磁辐射等供给。很多共价键如—C—C—、—C—H、—C—O—键需要在450—600℃的高温才会断开。化学家研究了高温气相反应中的很多自由基反应,认为燃烧就是一种自由基过程。水分子中的一个共价键均裂,则生成氢自由基(H·)和羟自由基(·OH),和均裂相反的是异裂,水的异裂生成H<sup>+</sup>和OH<sup>-</sup>,它们分别称为氢离子和氢氧根离子。它们都不存在不配对的电子,因此不是自由基。

虽然自由基常为带有一个不成对电子的原子、分子或离子,但自由基的确切与严格定义还难以规定。例如,凡带有不成对电子的分子、原子或离子尚不一定是自由基。过渡金属元素及其离子内轨道上就有不成对电子,而且Cu<sup>2+</sup>仅有一个轨道上有不成对电子,但均未被承认为自由基。虽然氧分子中最外层的两个轨道上各有一个不成对电子,但也未被当作自由基<sup>[2]</sup>,而是称为双自由基。

#### 1.1.2 自由基的性质

自由基都带有不成对电子,因而显示顺磁性的共同性质,但自由基的其他性质,不仅决定于不成对电子,还决定与自由基的其他部分,甚至全部结构。按稳定性来区分,自由基可分为暂存性自由基(transient radical)与稳定性自由基(stable radical)。

暂存性自由基化学性质很活泼,其存在时间很短暂,它们常可参加许多化学反应,显示其特性。常参加的反应有自由基—自由基反应、氢抽提反应、芳香族取代反应、分裂反应、加成反应、链式反应、氧化还原反应、歧化反应等,其中以链式反应最具特色。

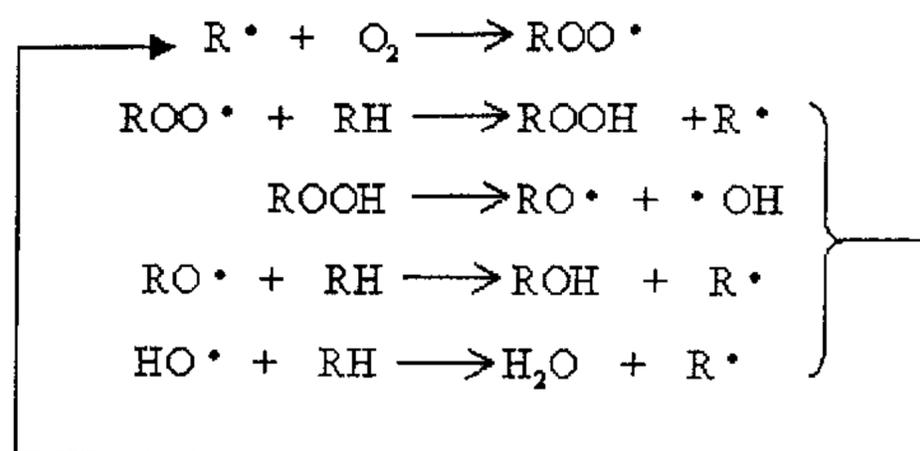


图 1 自由基链式反应

由于电子效应、空间效应、共振体系的大小等多因素影响，一些自由基可以稳定存在，即稳定性自由基，如三苯甲基、二苯基苦肼基自由基等。

### 1.1.3 生物体内的自由基

生物体内的自由基主要是指氧自由基，即活性氧。活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 是指性质活泼的氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物，主要包括：氧的单电子还原物 ( $O_2^{\cdot -}$ 、 $HO \cdot$ )、氧的双电子还原物 ( $H_2O_2$ )、烷基过氧化物 ( $ROOH$ 、 $RO \cdot$ 、 $ROO \cdot$ ) 及处于激发态的氧 (单线态氧、羰基化合物) 等。其中具有不配对电子的含氧化合物，称为氧自由基；另一些为非自由基的含氧化物，但可在自由基反应中产生，并可直接或间接诱发自由基反应。

#### 1.1.3.1 生物体内自由基的产生

生物体内的活性氧不断的通过非酶反应与酶反应产生，如每人每日约有 1~3% 的摄入氧转变为  $O_2^{\cdot -}$  及其衍生物<sup>[3]</sup>，但在抗氧化酶及外源性和内源性抗氧化剂的协同作用下不断的被清除，在生理情况下活性氧可维持于有利无害的极低水平。平衡浓度的活性氧一部分可履行生理作用，而另一部分则损伤生物分子。已探明，每日每个细胞的生物分子约受到  $10^4 \sim 10^5$  次活性氧的攻击而发生损伤。损伤分子可以得到修复、置换、降解代谢和重新合成，因此不会发生活性氧对机体的损伤。但在衰老、应激及某些病理情况下活性氧增多或清除能力减弱，从而发生活性氧对机体的损伤。ROS 的具体产生途径包括<sup>[4]</sup>：

- (1) 吞噬细胞的呼吸爆发途径 在补体系统、钙离子、白三烯等刺激下，吞噬细胞的氧摄取量增加，胞内 NADPH 氧化酶活性增高，产生系列氧自由基。
- (2) 黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶途径 组织缺血时，ATP 降解产生黄嘌呤与次黄嘌呤，同时，钙泵功能减低，胞内钙离子浓度增加，激活蛋白水解酶，该酶使黄

嘌呤脱氢酶水解成以  $O_2$  为电子受体的黄嘌呤氧化酶。在氧充足的情况下，次黄嘌呤、黄嘌呤氧化为尿酸，同时产生  $O_2^{\cdot-}$ 。

(3) 磷脂—花生四烯酸途径 膜磷脂在磷脂酶  $A_2$  作用下生成花生四烯酸(AA), AA 在环加氧酶作用下生成  $PGI_2$ 、 $PGF_2$ 、 $PGE_2$ 、 $PGD_2$ 、 $TXA_2$ ，在脂氧酶作用下生成白三烯过程中均伴 ROS 产生。

(4) 体内小部分氧尚可通过线粒体、微粒体的电子传递系统还原，还原不完全时生成  $O_2^{\cdot-}$ ；通过 CAT 作用生成  $H_2O_2$ ，通过 Fenton—Haberweiss 反应生成  $\cdot OH$ ，进一步完成自由基的连锁反应。

(5) 体内的醌类化合物如辅酶 Q 的代谢产物可在氧化还原中产生半醌自由基，后者将单电子交给  $O_2$  生成  $O_2^{\cdot-}$ 。

(6) 细胞内有的酶促反应以  $O_2$  为受氢体， $H_2O_2$  可以与  $O_2^{\cdot-}$  在  $Fe^{2+}$  或  $Cu^+$  存在下反应生成  $\cdot OH$ 。

(7) 红细胞内的氧合血红蛋白可自发转变为高铁血红蛋白，从而铁供出电子给  $O_2$ ，生成  $O_2^{\cdot-}$ 。

(8) 儿茶酚胺的增加。交感—肾上腺髓质系统是机体在应激时的重要调节系统，在各种应激情况下，此系统分泌大量的儿茶酚胺，过多的儿茶酚胺特别是它的氧化产物，又成为对机体的有害的产物。儿茶酚胺氧化能产生具有细胞毒性的氧自由基。肾上腺素代谢产生肾上腺素红的过程中也有  $O_2^{\cdot-}$  的产生。

### 1.1.3.2 生物体内自由基的清除

在生物体内，除了极微量的活性氧被利用外，几乎所有的活性氧都应及时被清除，否则活性氧会损伤生物分子，引起细胞或组织损伤，从而产生更多活性氧，加重损伤。生物体防御活性氧所致氧化损伤的体系主要为抗氧化酶、抗氧化物质和与修复损伤或重新合成有关的体系。在广义上，这些物质都起到抗氧化损伤的作用，因此有的学者将它们都归于抗氧化剂。

#### 1.1.3.2.1 抗氧化酶

① 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD):  $O_2$  还原成水的过程中第一个中间物就是  $O_2^{\cdot-}$ ，如果  $O_2^{\cdot-}$  及时得到清除，则其衍生物  $\cdot OH$  产生的可能性就极小，因此对生物体而言，SOD 对  $O_2^{\cdot-}$  的清除是极为重要的。

② 过氧化氢酶(Catalase, CAT): 主要存在于过氧化体中，可清除过氧化氢。

在过氧化体中，酶反应产生  $H_2O_2$ ，可被 CAT 清除。其他细胞器，如线粒体产生的  $H_2O_2$ ，可透过细胞膜，进入胞浆，其中尚未得到清除的可进入过氧化体，最后被 CAT 清除。

③ 谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px): 在线粒体及胞浆中所产生的  $H_2O_2$  常靠 GSH-Px 清除。同时也可清除体内脂质氢过氧化物。

④ 其他的抗氧化酶: 如谷胱甘肽转移酶、细胞色素 C 过氧化物酶, 抗坏血酸过氧化物酶, 以及 NADH 过氧化物酶, 髓过氧化物酶, 甲状腺过氧化物酶、子宫过氧化物酶、氯过氧化物酶、溴过氧化物酶等。

#### 1.1.3.2.2 非酶类抗氧化物质

生物体内的非酶类抗氧化物质按其来源可分为内源性抗氧化物质和外源性抗氧化物质。内源性抗氧化物质包括谷胱甘肽、尿酸、牛磺酸、辅酶 Q、 $\alpha$ -硫辛酸、胆红素、血浆铜蓝蛋白、金属硫蛋白等。

外源性抗氧化物质来之饮食, 包括抗氧化维生素(如  $V_C$ 、 $V_E$ 、 $V_A$  等)、植物多酚类等, 它们不仅可在胃肠道内发挥清除活性氧的作用, 而且还可吸收到体内, 同抗氧化酶和内源性抗氧化剂起到协同抗氧化效能。

#### 1.1.3.3 生物体内自由基的利用

大量实验表明, 自由基参与了许多重要的生命过程。细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤的诱发与抑制、肌肉收缩、神经传导、细胞吸附、基因表达等都与自由基有着密切的关系<sup>[5]</sup>。其中以自由基与基因表达的关系最为基础, 信号传导通过对基因表达的影响和作用往往会引发其他的生物效应。自由基作为细胞毒素的作用已被人们基本认可。而它还具有作为第二信使参与细胞信号转导的作用, 这一新的观点使人们对自由基的认识提高到新的高度。自由基也正是利用它参与信号转导的作用对基因表达进行调节的。

##### 1.1.3.3.1 信号传导作用<sup>[6]</sup>

现已发现, 细胞旁分泌或自分泌的一氧化氮和超氧阴离子、过氧化氢等活性氧在神经、内分泌、循环、免疫等生理活动中作为信号分子发挥着重要作用, 在细胞稳态的调节等细胞生命活动中作为第二信使参与多种因子细胞生物学效应的启动。自由基的信号传导途径具有细胞种类和刺激因子特异性, 从现有资料分析, 活性氧的信号传导通过下列途径实现:

- ① 环鸟苷酸相关信号传导途径
- ② 蛋白酪氨酸激酶相关信号传导途径
- ③  $\text{Ca}^{2+}$ 相关信号传导途径
- ④ 蛋白激酶 C 相关信号传导途径
- ⑤ 转录因子 NF- $\kappa$  B 相关信号传导途径
- ⑥ 转录因子 AP-1 相关信号传导途径

#### 1.1.3.3.2 参与酶促反应<sup>[7]</sup>

已知一些酶的活性中心部位的某些氨基酸残基自由基在酶的催化机制中起着重要作用，如酪氨酸残基自由基就是核糖核苷酸还原酶的活性部位中的功能部分。同时，生物体内的活性氧还参与琥珀酰辅酶 A、乙醇胺氨裂解酶、二乙醇脱水酶、吲哚胺双氧酶等的催化反应。

#### 1.1.3.3.3 参与某些生物活性成分的合成<sup>[8]</sup>

目前已知自由基参与体内前列腺素、凝血酶原、胶原蛋白等的生物合成。

#### 1.1.3.3.4 解毒作用

机体对外来毒物的解毒主要在肝脏微粒体中进行，其解毒系统包括细胞色素 P450，需 NADPH 的细胞色素 P450 还原酶和卵磷脂。通过  $\text{O}_2^{\cdot-}$  的产生发生羟化作用，使外来毒物 (TH) 转变为 TOH 而排出体外，达到“解毒”的目的。

#### 1.1.3.3.5 吞噬细胞的杀菌作用

吞噬细胞之所以能杀死侵入机体内的有害微生物是由于其产生的活性氧具有的杀菌作用。如当白细胞进行吞噬作用时耗氧量增加 10~15 倍，即呼吸爆发，其中包括的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\cdot\text{OH}$  的杀菌作用可因髓过氧化物酶 (MPO) 的存在而大量增加，从而共同组成的抗微生物体系可形成杀死细菌的毒剂。

#### 1.1.3.4 自由基对生物体的损伤

在需氧生物体内，活性氧不断在产生，同时也不断被清除，过量的活性氧可导致生物体脂质过氧化，进而破坏 DNA 及蛋白质结构，产生一系列不利影响。所幸在漫长的进化过程中，需氧生物体内产生了抵抗自由基的体系。但在衰老、疾病等情况下，自由基对生物分子的损伤程度超过了机体修复能力，损伤程度将会进一步加剧。若氧化损伤生物分子的降解产物有毒性，不仅可以损伤其他生物分子，而且还可引发或加重细胞，组织或全身的机能紊乱与病理

变化。

#### 1.1.3.4.1 自由基对生物膜的损伤

生物膜是细胞中多种膜结构的统称，包括质膜、线粒体膜、高尔基体膜、内质网膜、溶酶体膜、过氧化物体膜、核膜等。各种生物膜有着不同的生物学功能，但它们的结构却有着共同性：其化学组成主要为脂类和蛋白质，其基本结构为脂双层结构，富含多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA）。

自由基对生物膜的损伤即主要针对其中的 PUFA，该过程为典型的自由基链式反应，可反复进行，导致脂质不断消耗，脂质过氧化物大量生成，从而引起膜流动性降低、通透性增强，导致红细胞溶血、线粒体膨胀、溶酶体酶释放、酶失活等。同时，其氧化终产物丙二醛（malondialdehyde, MDA）可在细胞内沉积，导致细胞死亡。

#### 1.1.3.4.2 自由基对 DNA 的损伤

自由基可引起细胞内 DNA 的氢键断裂、碱基损伤、糖基破坏和主链解旋或交联，所有核酸成分均可受到自由基的攻击，这种损伤可被一些特殊机制修复，但亦可造成永久性损伤。研究表明，DNA 上结合的金属离子(如 Fe 和 Cu)与  $H_2O_2$  反应产生的  $\cdot OH$  是造成链断裂的主要原因<sup>[9]</sup>。 $\cdot OH$  可导致 DNA 分子碱基的改变，链的断裂。MDA 能使核酸碱基间发生交联或碱基与蛋白质间发生交联，导致核酸的模板功能障碍。当细胞 DNA 受损时，轻者会引起细胞的生物学活性改变，重者造成基因突变、致癌和细胞死亡。

#### 1.1.3.4.3 自由基对蛋白质的损伤<sup>[10]</sup>

蛋白质广泛存在于细胞内外，因而极易受到自由基攻击而发生损伤。自由基对蛋白质的主要作用是修饰氨基酸残基，引起结构和构象的改变，造成肽链断裂、聚合和交联。 $O_2^{\cdot -}$  和  $\cdot OH$  能介导蛋氨酸、组氨酸、半胱氨酸、脯氨酸、赖氨酸的修饰反应。随脂质过氧化形成的蛋白质自由基可致蛋白质分子的聚合、肽键断裂。脂质过氧化反应的终产物 MDA 可与蛋白质或酶交联形成 Schiff 氏碱，导致蛋白质结构、功能改变，酶失活。 $O_2^{\cdot -}$  可能不直接参与对氨基酸的作用，但可通过歧化反应产生  $H_2O_2$ ，后者在有过渡金属离子存在时，发生典型的 Fenton 反应，生成  $\cdot OH$ 。 $\cdot OH$  是化学性质最活泼的活性氧，能与所有氨基酸反应，尤其是含不饱和键和巯基的氨基酸如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨

酸、蛋氨酸、半胱氨酸和脯氨酸等更容易受到自由基攻击，破坏其有序结构，使蛋白质的氨基酸链断裂。许多酶和受体分子上的活性基团——巯基是自由基攻击的靶基团，自由基与巯基反应，可使酶和受体等的生物学活性改变，功能破坏。

#### 1.1.3.4.4 自由基对糖类的损伤

很多活性很强的自由基如 $\cdot\text{OH}$ 可以无选择地攻击糖类，抽提氢，使糖类带有碳中心的自由基(carbon-centered radical)，后者与 $\text{O}_2$ 结合成为过氧化物，进而降解。

在关节发炎时，中心粒细胞聚积至关节周围，其活化时产生的 $\cdot\text{OH}$ 使滑液中透明质酸受到损伤。透明质酸是 $\beta$ -葡糖醛酸-N乙酰葡糖胺重复系列组成的复杂多糖。它受到 $\cdot\text{OH}$ 的攻击成为自由基并与 $\text{O}_2$ 结合为过氧化物，从而降解。由于发炎及发炎中产生的活性氧作用，透明质酸的损伤就不易消除。

#### 1.1.4 自由基与衰老

衰老是一个复杂而微妙的生命过程，在长期的研究过程中，科学家从不同方面探讨了衰老发生的过程，形成了如衰老的免疫学说、衰老分子生物学、衰老的膜假说等。然而根据自由基理论，从深入探讨这些学说理论基础来考虑，自由基在上述学说中都起着不可缺少的启动、介导作用，因此，Herman<sup>[11]</sup>提出的衰老自由基理论已成为有关衰老的最权威学说，并不断被大量实验事实所证实。

在以线虫、果蝇、小鼠、大鼠等为实验动物的寿命实验中，用科学的调配饮食来研究自由基与衰老的关系，一方面在饮食中减少某种可以提高自由基水平的化合物，另一方面添加某些抗氧化剂以清除动物体内的自由基，可以有效地提高实验动物的平均寿命，但并不能延长某一物种的最大寿限。

线粒体作为细胞内的能量转换细胞器，广泛存在于各种真核细胞中，通过氧化磷酸化将质子浓度梯度转换为ATP，为细胞的各种生命活动提供能量。由于哺乳动物90%以上的氧是在线粒体中被利用，因此线粒体既是内源性自由基产生的重要地方，又是内源性自由基主要攻击的对象。有研究表明<sup>[12]</sup>，自由基对线粒体DNA的损伤程度比对核DNA高16倍，这一方面是由于线粒体DNA更接近内源性自由基的发源地，另一方面是由于线粒体内缺乏修复机制。自由

基引起的损伤，导致线粒体 DNA 译码能力降低，并导致其进行性缺失。而线粒体 DNA 功能下降又会导致线粒体内膜的缺损，进而引起线粒体功能的降低，加速衰老的发生。

### 1.1.5 自由基与疾病

在稳态平衡失调的情况下，体内过剩的自由基和活性氧产生及引发的脂质过氧化反应与衰老的过程及许多疾病的发生密切相关。降低脂质过氧化物的生成和/或加速过氧化物的清除，以防止过氧化脂质对组织细胞的损伤作用，有利于延缓衰老进程和某些疾病的发生<sup>[13]</sup>。目前已发现不少疾病的发生、发展、防治与诊断均与自由基有关，可以说机体各个系统及各个脏器发生的各种疾病或多或少、直接或间接都与自由基有关。

#### 1.1.5.1 自由基与循环系统疾病

心血管系统的内皮细胞是自由基产生的最主要和最原始来源，而自由基代谢失衡已证明是心血管系统疾病形成的重要因素。近年来发现，血管内皮细胞膜上的 NADPH 氧化酶是高血压机体自由基的最重要来源<sup>[14]</sup>。Hibino<sup>[15]</sup>发现  $O_2^{\cdot-}$  可刺激花生四烯酸经环氧化酶 (COX) 途径代谢产生  $TxA_2$ 、 $TxB_2$ 、 $PGH_2$ 、 $PGF-1a$  等缩血管物质。更为重要的是， $O_2^{\cdot-}$  和继发产生的  $\cdot OH$ 、 $ONOO^-$  可进一步氧化脂蛋白和脂质，这些氧化产物都具有比  $O_2^{\cdot-}$  更强的破坏作用，是加速高血压发展为冠心病和心力衰竭的重要机制<sup>[16]</sup>。同时，Masini<sup>[17]</sup>等应用电子自旋共振波谱技术 (ESR) 及电子自旋捕捉技术已直接检测到心肌缺血-再灌注后氧自由基的产生。

#### 1.1.5.2 自由基与呼吸系统疾病

机体正常时，呼吸系统具有强大的抗氧化能力，方能抗拒高浓度氧对机体的损伤。但当氧自由基/抗氧自由基失衡时，就会发生呼吸系统疾病。如 Kietzmann<sup>[18]</sup>发现患有急性呼吸窘迫综合症 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 病人肺水肿液中 TBARS 及呼出的气体中过氧化氢含量增加；同样，Dekhuijzen<sup>[19]</sup>也从患有严重慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的病人呼出气体中检测到过氧化氢，这说明这些疾病的发生都与氧自由基有关。临床在肺部手术时，通常给病人吸入能有效灭活  $O_2^{\cdot-}$  的 NO，可有效减少肺缺血一再灌注损伤<sup>[20]</sup>。

### 1.1.5.3 自由基与消化系统疾病

近年来研究表明,胃溃疡、胰腺炎、肠炎、肝炎与肝硬化等消化系统疾病均与自由基有关。如 Rokutan<sup>[21]</sup>发现胃上皮细胞可自发产生大量  $O_2^{\cdot-}$ ; 后者正是造成胃溃疡的主要原因; 而 Vaquero<sup>[22]</sup>发现胰腺炎是由体内自由基代谢异常引起的。丙型肝炎病毒感染患者后, 导致血浆中 TBARS 增多, GSH 等抗氧化物质减少, 说明丙型肝炎感染产生的自由基与肝损伤有关<sup>[23]</sup>。

### 1.1.5.4 自由基与神经系统疾病

脑由于脂质含量高, 代谢耗氧量大(约占机体总耗氧量的 1/5), 且脑中相对缺乏各种抗氧化酶和抗氧化物质, 因而脑更容易受到自由基的损伤, 从而发生各种老年病, 严重影响老年人的生活质量<sup>[24]</sup>。如阿尔茨海默病(Alzheimer's, AD)患者脑内金属离子如铁、铝含量增加, 可催化产生  $\cdot OH$  等, 后者可促进脂质过氧化, 导致脑坏死<sup>[25]</sup>; 帕金森症(Parkinson's disease, PD)则是由于脑内自由基代谢异常, 导致脑黑质内多巴胺退行性变化与消失引起的<sup>[26]</sup>。

### 1.1.5.5 自由基与癌症

癌症是威胁人类健康的大敌, 其发展分为诱癌和促癌两大阶段。大量实验证明, 活性氧在各种癌变过程中具有重要作用, 在诱癌与促癌阶段均有自由基参与。各种诱癌因素和促癌因素通过不同途径, 最终可引起自由基水平增高。癌组织中 SOD、CAT 和维生素 E 的含量明显低于正常组织及癌旁组织, 而癌组织的脂质过氧化水平则明显升高<sup>[27]</sup>。已知电离辐射、化学致癌物、吸烟、慢性炎症等多种诱变因素均可诱发癌症, 这直接或间接证明了自由基在诱发癌变过程中可能发挥重要作用。以化学致癌物为例, 许多化学致癌物在发生致癌作用前必须经过一个活化阶段, 活化后的致癌物一般都是极活泼的亲电子化合物或自由基。而自由基可诱导细胞突变, 其诱变过程开始于 DNA 水平, 它们可破坏碱基, 使 DNA 链断裂或交联, 引起染色体异常, 最终导致细胞癌变。

### 1.1.5.6 自由基与其他疾病

已有的研究表明, 糖尿病<sup>[28]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[29]</sup>等疾病的发生与发展均与机体内自由基代谢失衡有关。

## 1.2 抗氧化剂

### 1.2.1 抗氧化剂简介<sup>[30]</sup>

抗氧化剂是指能通过各种途径有效清除内源性和外源性自由基或抑制氧化扩散及提高机体内源性清除活性氧酶系统活性和数量的物质，并对自由基所致病变有防治作用。

根据作用性质可将抗氧化剂分为两大类：第一类为预防性抗氧化剂，此类抗氧化剂可以清除脂质过氧化链启动阶段的自由基引发剂，如 SOD, CAT 等；第二类为脂质过氧化链式反应的阻断剂，这类抗氧化剂可以捕捉脂质过氧化链式反应中产生的自由基，减少脂质过氧化反应链长度，因此可以阻断或减缓脂质氧化的进行，如维生素 C, 维生素 E 等。抗氧化剂作用机理大致有：①减少局部氧气浓度；②清除启动脂质氧化的引发剂；③结合金属离子，使其不能产生启动脂质氧化的自由基；④将脂质过氧化物分解为非自由基产物；⑤阻断脂质氧化的反应链，即清除脂质过氧化中间自由基。

### 1.2.2 抗氧化剂的协同作用

当两种抗氧化剂并用，其抗氧化效果大于两者的加和时，则称这两种抗氧化剂之间存在着协同作用。协同作用是抗氧化剂间存在的一种普遍现象，最典型的例子是  $V_E$  与  $V_C$ 。1962 年，Tappel 率先开展了  $V_E$  与  $V_C$  间协同作用的研究，并提出了  $V_C$  再生  $V_E$  的观点，随后这个结论被 Paker 和 NIKi 等证实。随后人们又发现  $V_E$  与  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[31]</sup>之间、 $V_E$  与茶多酚之间<sup>[32]</sup>、茶多酚与类胡萝卜素之间<sup>[33]</sup>、 $V_C$ 、 $V_E$  与茶多酚之间都存在协同增效作用。利用不同抗氧化剂之间的协同增效作用有利于避免使用单一抗氧化剂负荷过重所造成的伤害，且单一抗氧化剂不能全面提高机体的抗氧化能力，多抗氧化剂复合使用则可全面提高机体的抗氧化能力。

目前人们对抗氧化剂协同增效作用的机理了解还不十分透彻，总结已有的研究工作，协同抗氧化方式主要有以下四种：

① 偶联作用 一方面降低了直接反应的两种物质间的电位落差，使反应更易于进行；另一方面，偶联的抗氧化剂油水分配系数互为补充，在体系中合理分布，充分发挥每一种抗氧化剂的功能。

② 再生抗氧化剂 最典型的例子即为  $V_C$  再生  $V_E$ 。在  $V_C$  与  $V_E$  共存体系中，反应初期  $V_E$  含量基本不变，而  $V_C$  含量降低；待  $V_C$  完全消耗后， $V_E$  浓度开始下降。据此推断， $V_C$  可以还原  $V_E$  自由基。同样，茶多酚也可以再生  $V_C$ 、 $V_E$ 。

③ 清除氧气 类胡萝卜素与氧气反应可形成类胡萝卜素过氧化物，而体系中若有  $V_c$  存在，则可有效降低氧气浓度，减少类胡萝卜素被氧气氧化，从而表现出协同增效作用。

④ 螯合金属离子 酚性抗氧化剂与柠檬酸、EDTA 等酸性物质混合使用时表现出非常显著的抗氧化效果，是因为这些酸性物质可以螯合微量金属离子，抑制了金属离子对过氧化物的催化分解，从而表现出协同抗氧化作用。

### 1.2.3 几种常见的天然抗氧化剂

#### 1.2.3.1 茶多酚 (Tea polyphenol, TP)

茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称，为白色无定形粉末，易溶于水，可溶于乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯，不溶于氯仿。绿茶中茶多酚的含量较高，占其质量的 15%~30%。茶多酚类物质大致可分为 6 种：黄烷醇类，4-羟基黄烷醇类，花色苷类，黄酮类，黄酮醇类和酚酸类。其中以黄烷醇类（主要是儿茶素类化合物）最为重要，占茶多酚总量的 60%~80%。茶多酚类具有较活泼的羟基，能提供氢原子，如使脂质自由基 ( $L\cdot$ ) 恢复为原脂质分子，遂不致于和  $O_2$  结合，产生  $LOO\cdot$ ，从而防止脂质过氧化，故可作为天然抗氧化剂<sup>[34]</sup>。

下图为茶多酚主要的四种成分结构式：

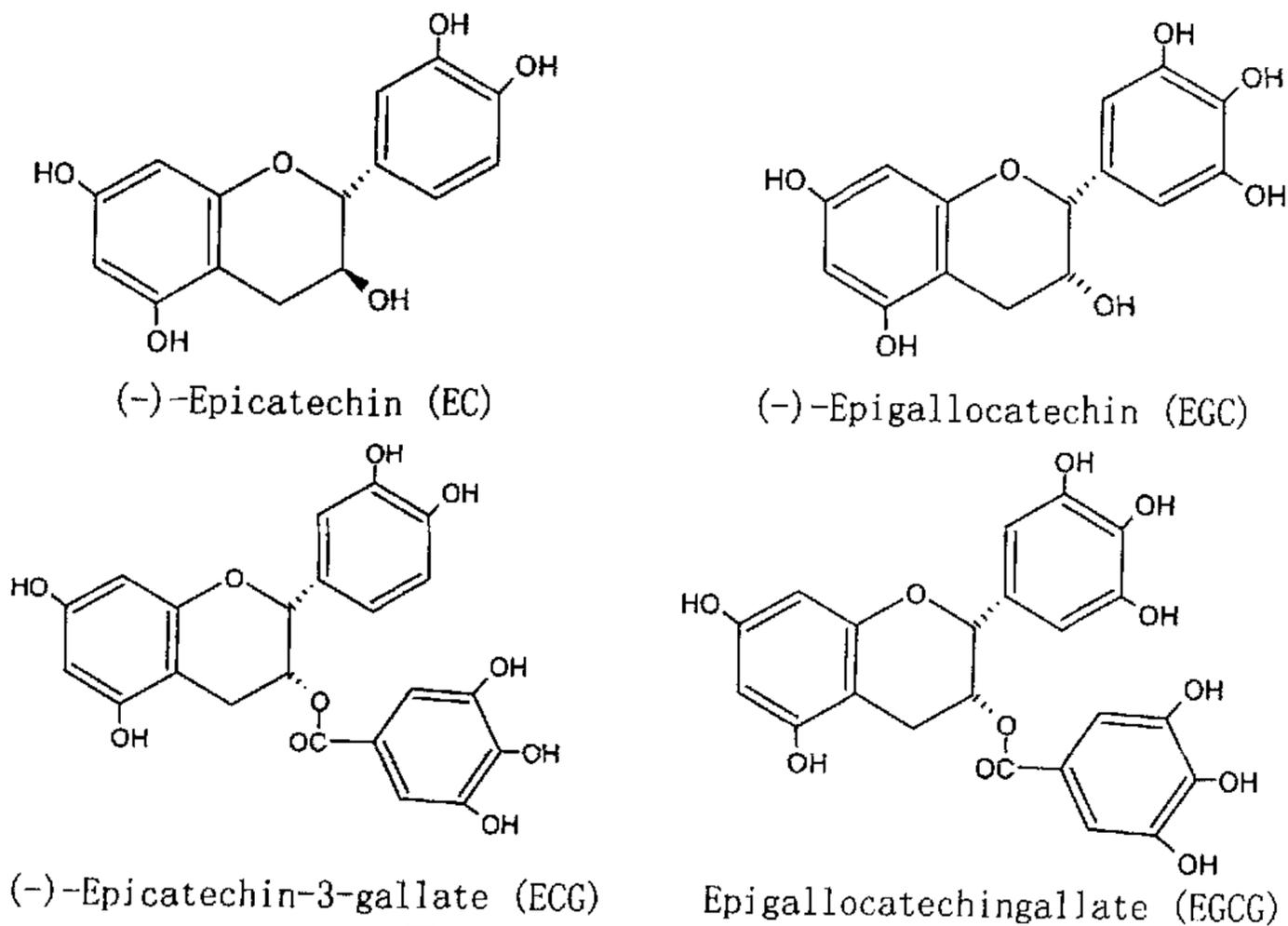


图 2 四种主要茶多酚成分结构式

茶多酚的保健功能主要有:

(1) 抗肿瘤作用 流行病学调查表明, 茶叶具有抗肿瘤作用, 而 TP 是其起作用的主要成份<sup>[35]</sup>。已有的研究表明, TP 可以有效抑制结肠癌<sup>[36]</sup>、小肠癌<sup>[37]</sup>、肺癌<sup>[38]</sup>、食道癌<sup>[39]</sup>、胃癌<sup>[40]</sup>、皮肤癌<sup>[41]</sup>、前列腺癌及乳腺癌<sup>[42]</sup>等癌症, 而对正常细胞无毒副作用<sup>[43]</sup>。TP 的抗肿瘤作用可能有多种机制: ①增强抗氧化剂(如 GSH-Px、CAT 等)和 II 相酶(如 GSH-硫转移酶等)活性; ②抑制化学诱导的脂质过氧化; ③抑制射线和 12-氧-四萜酰佛波-13-乙酸(TPA)诱导的皮肤鸟氨酸脱羧酶(ODC)和环加氧酶活性; ④抑制蛋白激酶 C 和细胞增殖; ⑤抗炎作用; ⑥加强细胞间缝隙连接作用; ⑦抑制促瘤剂诱导的癌基因表达等<sup>[44][45]</sup>。

(2) 抗动脉粥样硬化 动脉粥样硬化(AS)的发生与血浆脂质关系密切。低密度脂蛋白(LDL)可致 AS, 而高密度脂蛋白(HDL)则起拮抗作用。载脂蛋白缺乏和异常可影响血脂的运输和代谢, LDL 的氧化修饰可使血管内皮受损, 胆固醇沉积于血管壁而发生 AS。TP 中含有丰富的多酚类物质, 可通过调节血脂代谢、抗凝促纤溶及抑制血小板凝聚、影响血液流变学特性等多种机制, 从多个环节起抗 AS 作用<sup>[46]</sup>。

朱向明等的实验表明, TP 能降低血甘油三脂、胆固醇及 LDL, 提高 HDL 含量, 降低载脂蛋白 apoB<sub>100</sub> 和升高 apoA<sub>1</sub>, 影响 LDL 的氧化修饰等。动物实验和临床观察发现茶叶能全面降低血液粘度, 改善血液高粘状态, 防止局部血栓形成<sup>[47]</sup>。有报道 TP 能降低家兔血压, 使大鼠后肢灌注液流出量增加。说明 TP 能降低外周血管阻力, 直接扩张血管。TP 还通过促进内皮依赖性松弛因子的形成, 松弛血管平滑肌而起抗高血压作用<sup>[48]</sup>。

(3) 延缓衰老 清除内源性自由基的物质常有延缓衰老的作用, 能清除氧自由基的 TP 具有延长果蝇寿命的作用。我国学者进一步观察到 TP 可延缓家蝇衰老, 延长其寿命。0.1%和 0.05%的 TP 均可显著提高家蝇脑组织内的 SOD 活性, 降低脂褐素含量。摄取 TP 的家蝇的平均寿命、平均存活日数与最长寿命不仅高于对照, 而且显示量效关系<sup>[49]</sup>。

(4) 抗菌作用 TP 能强烈抑制八种致病菌的活性, 且其起作用最低浓度为 0.08~0.1%<sup>[50]</sup>。TP 能使致龋链球菌 JC-2 活力下降, 还能抑制该菌对唾液覆盖的羟磷灰石盘的附着, 强烈抑制该菌葡糖苷基转移酶催化的水溶性葡聚糖合成,

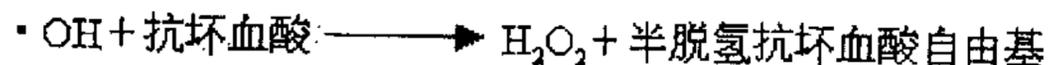
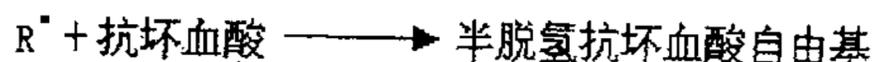
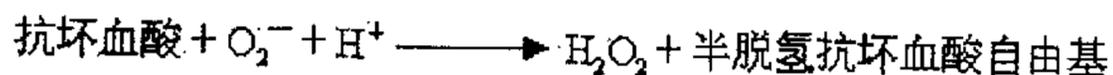
减少龋洞数量。因 TP 有较强的防龋作用，在日本已有防治龋病的 TP 制剂。

(5) 调节体内 NO 水平 NO 作为一种重要的体内信号分子，在机体生长、发育、分化和凋亡过程中起着重要作用<sup>[51]</sup>。但 NO 浓度过高易形成氮氧自由基 (NO·)，会对机体产生毒害作用，如氧化低密度脂蛋白，导致心血管疾病<sup>[52]</sup>，损伤神经元，引起 DNA 断链<sup>[53]</sup>等。Lin<sup>[54]</sup>等发现，TP 可以阻止 NO 合成酶的生成，进而防止 NO 合成过量，可以起到调节 NO 浓度的作用。其机理为：TP 阻止核因子 κ B (NF-κ B) 与 NO 合成酶基因启动子结合而使得基因转录受到限制，从而减少了 NO 合成酶蛋白的生成。Jos<sup>[55]</sup>等发现 TP 还可以直接与一氧化氮自由基反应，清除过量的 NO·，从而减轻其毒副作用。

(6) 其它作用 TP 还可用于治疗糖尿病<sup>[56]</sup>、除臭<sup>[57]</sup>、降血糖、抗紫外线照射、防辐射损伤、提高白细胞数、提高机体免疫功能等。

### 1.2.3.2 维生素 C (Vc)

Vc 又名抗坏血酸，属水溶性维生素，是人体必需的营养素之一，体内需要 Vc 作为几种酶的辅助因子。Vc 最突出的性质是它的还原性，通过还原作用在体内消除有害氧自由基的毒性。Vc 清除自由基的机理如下：



脱氢抗坏血酸很不稳定，很快经分解反应生成草酸和苏糖酸。Vc 还能清除单线态氧，还原硫自由基，并能同次氯酸快速反应。Vc 是体内抗氧化损伤的重要还原剂，作为细胞外抗氧化剂，是对细胞内 SOD 和 CAT 等抗氧化酶的补充，同时，Vc 虽不直接参与维生素 E 的抗氧化作用，但它对维持维生素 E 含量起到重要作用。Vc 的保健作用如下：

(1) 营养作用 Vc 参与脯氨酸、赖氨酸的羟基化作用，使之形成羟脯氨酸和羟赖氨酸，因此能促进胶原蛋白和粘多糖的合成，维持软骨、牙质和骨的正常细胞间质，促进伤口愈合和减低微血管的通透性及脆性。当 Vc 缺乏时，细胞间质中的粘多糖合成受阻，不能维持正常的胶态，从而引起微血管壁通透性增加，脆性增强，血管易破裂、伤口愈合延缓和发生骨折等症状，即患坏血病<sup>[58]</sup>。

(2) 抗癌作用 许多体外实验证明, Vc 有抗癌作用。自 60 年代起有 7 个国家的 16 个研究小组经过几十年的跟踪调查结果发现, 胃癌的发生与 Vc 摄入量呈负相关。Henquin<sup>[59]</sup>等人的研究表明 Vc 是一种很好的化疗辅助剂, 而 Taper<sup>[60]</sup>等人的研究则表明 Vc 在放疗中也有很强的辅助作用。Kurbacher<sup>[61]</sup>等人发现 Vc 可以加强阿霉素的抗癌效果, Venugopal<sup>[62]</sup>等也发现 Vc 与维生素 K3 在治疗尿道癌上有很强的协同作用。

(3) 抗心血管疾病作用 Vc 能改善心脏功能, 增加冠状血管血流量及心输出量。经常食用水果和蔬菜能有效降低心血管疾病的发生率, 其原因就在于水果与蔬菜中含有丰富的 Vc。周德勤<sup>[63]</sup>等对不同 Vc 摄取量对豚鼠胆固醇代谢及动脉粥样硬化中动脉壁组织形态的影响进行了观察, 证明 Vc 长期供应不足, 可导致动脉粥样硬化的初步病变。

(4) 其它保健作用 Vc 可以保护人体不受毒物的侵害, 增强免疫应答, 增强吞噬细胞的吞噬作用, 调节细胞内能量的产生。同时, Vc 还可维持结缔组织、神经系统、呼吸系统与肝胆的功能, 促进造血, 维持机体代谢, 减轻感冒症状<sup>[64]</sup>, 排除毒物等<sup>[65]</sup>。

### 1.2.3.3 维生素 E (V<sub>E</sub>)

V<sub>E</sub> 是广泛存在于动植物食物中的一种脂溶性维生素, 是生育酚与三烯生育酚的总称。主要分布于线粒体膜、内质网膜和浆膜的特异部位。其种类较多, 如 α-、β-、γ-、δ-生育酚, 其中以 α-生育酚的活性最强。一分子 α-生育酚氧化成生育醌, 可还原 2 分子自由基。V<sub>E</sub> 抗氧化机理为它可使脂质过氧自由基 (LOO·) 转变为 LOOH, 遂阻断 LOO· 的链式反应, 而且又可清除单线态氧 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), 防止 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 对机体的损伤。其保健作用如下:

(1) 抗不育作用 V<sub>E</sub> 能增加卵巢重量并促进其功能。有相当多的报告说明长时间给不孕症妇女以 V<sub>E</sub> 而妊娠。V<sub>E</sub> 可使成熟卵泡增加、黄体细胞增大, 从而增强孕酮的作用, 故可用于治疗妇科疾病。临床上可以防止早产、流产, 对不孕症患者基础体温的改善, 更年期综合症等都有一定效果<sup>[66]</sup>。

(2) 增强免疫机能 研究表明 V<sub>E</sub> 能直接刺激 B 细胞, 使得脾脏抗体生成细胞的数目增加, 提高脾组织杀菌能力。促进 T 细胞成熟、刺激 T 细胞和混合淋巴细胞的免疫反应, 影响动物体内类甘烷的合成, 这是调节动物体内免疫系统

的主要机制；对促进血凝的血栓素的产生具有降低作用，并增进抗血凝的 PGI 的产生。 $V_E$  还具有抗应激作用，可以抑制前列腺素的形成，从而抑制了淋巴器官中的环腺苷酸含量的增加，保护了免疫功能<sup>[67]</sup>。

(3) 对蛋白质及酶系统作用 研究表明， $V_E$  治疗后的老年性痴呆(AD)大鼠  $\beta$ -淀粉样前体蛋白( $\beta$ -APP)呈弱阳性表达，说明  $V_E$  可以降低  $\beta$ -APP 在脑内的过度表达，从而抑制  $\beta$ -淀粉样蛋白的产生和沉积，这是治疗 AD 的可能机理<sup>[68]</sup>。近年来研究发现，二酰基甘油(DAG)是细胞内重要的信息脂质，主要功能是激活蛋白激酶 C(PCK)， $V_E$  能抑制血管细胞 DAG 的合成，降低与糖尿病微血管并发症(如糖尿病肾病)密切相关的 DAG-PCK 通路的活性<sup>[69]</sup>。

#### 1.2.3.4 $\beta$ -胡萝卜素 ( $\beta$ C)

$\beta$ -胡萝卜素是含有 40 个碳原子的碳氢化合物，两端各有一个紫罗兰酮环，中间由一条含有多个共轭双键的直链连接。 $\beta$ C 具有多个双键，能传递高能量从而使活性氧变成稳定的氧分子。现已知 1 分子  $\beta$ C 可抑制 1000 个分子的活性氧。除能消除活性氧以外， $\beta$ C 还可作为一种弱氧化剂直接与自由基反应，阻止自由基的连锁反应，从而减少它对细胞的损伤<sup>[70]</sup>。其保健作用如下：

(1) 提高机体免疫力  $\beta$ C 是维生素 A 的前体物质，在酶的催化下可生成两分子维生素 A，体内外实验证明， $\beta$ C 及其它不具有维生素 A 原活性的类胡萝卜素能保护吞噬细胞免受自身氧化的损伤，促进 T、B 淋巴细胞的增殖，刺激效应 T 细胞的功能，增强巨噬细胞、细胞毒素 T 细胞和天然杀伤细胞的杀伤肿瘤细胞的能力以及促进某些白介素的产生， $\beta$ C 可促使巨噬细胞释放肿瘤坏死因子和干扰素等细胞因子<sup>[71]</sup>。

(2) 抗癌作用 大量流行病学资料表明， $\beta$ C 有很强的防癌作用。其摄入量及血液浓度与恶性肿瘤的发病率呈负相关。已有大量资料证实  $\beta$ C 能降低肺癌、口腔癌、咽喉癌、鼻癌的发病率<sup>[71]</sup>。但有报道  $\beta$ -胡萝卜素在体外高氧分压下会起促氧化作用，且可能增加吸烟者患癌几率<sup>[72]</sup>。

### 1.3 立题目的与依据

随着人们生活水平的不断提高，追求健康长寿已成为人们向往的生活目标。调查表明，近几十年来，我国老年人口以每年 3% 的速度增长。上海在 1979 年就已跨入老年型城市，2000 年 60 岁以上人口已达 19%。据联合国估计，到 2025

年全世界老年人口将为 11 亿。随着老年人数的迅猛增加老年病也随着增加。在美国有一粗略估计：老年痴呆病患病率在 65 岁以上的人群中，年龄每增高 10 岁，患病率就明显翻番，65 岁为 5%，75 岁以上为 10%，85 岁以上为 25%。这些老年病给患者本人及其家属带来了极大痛苦，也给社会造成了很大负担。

目前，治疗老年病尚未有比较成熟且易推广的疗法。服用抗氧化剂，从清除体内多余自由基的角度预防此类疾病，符合中医“防重于治”的指导思想。我国自古就有“药食同源”传统，且目前国际上“回归大自然”的呼声也日益高涨，从植物中提取高效无毒的成分，加以组合筛选，也是当前我国中医中药现代化的大趋势。

目前市售抗氧化剂保健品，大都组分单一，要么为水溶性成分，要么为脂溶性成分，且存在作用机理不清，作用靶点不明的缺点，不能有效清除体内水溶性及脂溶性两种自由基，故其使用具有局限性。我们所设计的组方，选用四种常用抗氧化剂，包含水溶性（茶多酚、Vc）及脂溶性（V<sub>E</sub>、β-胡萝卜素）两类自由基清除剂，能够清除不同类型的自由基，从而综合清除体内多余自由基，同时利用多种抗氧化剂在人体内分布的不同，清除某些特定部位（如脑）的自由基，达到预防疾病，延缓衰老的目的。

同时，复方中组分都有不同特点与程度地清除氧自由基的抗氧化和预防脂质过氧化效果，它们虽然是天然的小分子抗氧化剂，但在人体内可以促进大分子抗氧化酶（SOD、CAT 等）的生物合成。在体内大分子抗氧化酶和小分子抗氧化剂的协同作用下，清除自由基的效果会更强。每种抗氧化剂都有其独特的营养作用，可以起到各自不同的营养补充作用，且复方组分间也有很强的协同作用：如 Vc 与 V<sub>E</sub> 之间的相互作用可使 V<sub>E</sub> 抗脂质过氧化作用大为增强。因为 V<sub>E</sub> 自由基可在 Vc 作用下又转变 V<sub>E</sub>，仍可发挥阻断脂质过氧化链式反应的作用。同样，Vc 也可促使茶多酚的抗氧化效能大为增强。

综合几种不同性质的天然抗氧化剂，筛选高效的抗氧化剂复方，此类研究国内外均未见报道。本研究将有助于解决我国人口老龄化带来的一系列社会问题，同时，随着功能食品市场份额的不断扩大，其经济意义也是不言而喻的。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 主要试剂

茶多酚 (多酚含量大于 99.5%)		浙江大学茶叶研究所
维生素 C	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
维生素 E	AR	Merck 公司
$\beta$ -胡萝卜素	AR	Merck 公司
二苯基苦肼基自由基 (DPPH)	AR	日本东京化成工业株式会社
N-氯-对甲苯磺酰胺钠	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
对二甲氨基苯甲醛 (DMAB)	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
甲醇	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
乙醇	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
乙醚	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
乙酸	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
氯仿	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
丙酸	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
过氯酸	AR	中国医药集团上海化学试剂公司
小牛血清		上海生工生物工程技术有限公司
RPMI1640 完全培养基		Bibgo 公司
丙二醛测试试剂盒		南京建成生物工程研究所
SOD 测试试剂盒		南京建成生物工程研究所
总抗氧化能力测试试剂盒		南京建成生物工程研究所
羟脯氨酸测试试剂盒		南京建成生物工程研究所

### 2.2 主要仪器

电子天平 (感量 0.0001g)	北京赛多利斯电子天平有限公司
氧化稳定性测定仪 (OSI 仪)	美国 ADM 公司
荧光分光光度计	日本 Shimadzu 公司
RXZ 型智能人工气候箱	宁波江南仪器厂
倒置显微镜	Nikon 公司
CO <sub>2</sub> 培养箱	Thermo Forma 公司

Heraeus 高速冷冻离心机	Biofuge 公司
Pipetman 移液枪	法国 Gilson 公司
752 型紫外分光光度计	上海精密科学仪器有限公司分析总厂
电热恒温烘箱	上海跃进医疗器械厂
恒温磁力搅拌器	上海青浦沪西仪器厂
DK-S24 恒温水浴锅	上海精宏实验设备有限公司
BCD-237 冰箱	青岛海尔公司

### 2.3 实验细胞及动物

人胃腺瘤细胞 BGC-823、人肺癌细胞 95-D 由中科院细胞所提供；

美国野生型黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), Oregon k 品系, 复旦大学遗传所提供；

Wistar 大鼠, 3 月龄, ♀, 上海中科院动物中心提供；

昆明小鼠, 6 周龄, ♀、♂ 各半, 第二军医大动物中心提供；

ICR 老年小鼠, 12 月龄, ♀, 上海中科院动物中心提供。

### 2.4 实验方法

#### 2.4.1 复方的优化

复方优化采用均匀设计方法, 按照均匀设计原理, 选取均匀设计表格如下:

表 1 均匀设计表

1	2	3	4
1	1	9	15
2	3	19	31
3	5	29	13
4	7	5	29
5	9	15	11
6	11	25	27
7	13	1	9
8	15	11	25
9	17	21	7
10	19	31	23
11	21	7	5
12	23	17	21

13	25	27	3
14	27	3	19
15	29	13	1
16	31	23	17

根据上表，采用如下公式计算可得实验设计表：

$$C_{ki} = \frac{2^{q_{ki}} - 1}{2^n}, k = 1, \Lambda, n.$$

$$\begin{cases} X_{ki} = (1 - C_{ki}^{1/(s-i)}) \prod_{j=1}^{i-1} C_{kj}^{1/(s-j)}, i = 1, \Lambda, s-1. \\ X_{ks} = \prod_{j=1}^{s-1} C_{kj}^{1/(s-j)}, k = 1, \Lambda, n. \end{cases}$$

其中，s=4，n=16。

表 2 实验设计表（质量比）

茶多酚	维生素E	维生素C	胡萝卜素	总量
0.685	0.148	0.089	0.078	1.000
0.546	0.104	0.011	0.339	1.000
0.461	0.026	0.304	0.208	1.000
0.397	0.364	0.022	0.216	1.000
0.345	0.207	0.294	0.154	1.000
0.299	0.081	0.097	0.522	1.000
0.259	0.610	0.094	0.037	1.000
0.223	0.321	0.100	0.356	1.000
0.190	0.154	0.513	0.144	1.000
0.160	0.013	0.233	0.595	1.000
0.131	0.463	0.343	0.064	1.000
0.104	0.243	0.224	0.428	1.000
0.079	0.075	0.767	0.079	1.000
0.055	0.656	0.118	0.172	1.000
0.032	0.351	0.598	0.019	1.000
0.011	0.151	0.393	0.446	1.000

采用肝组织体外自氧化法，检测组织匀浆的自氧化程度，以 MDA 为指标，具体做法如下：取 Wistar 大鼠一只，♀，体重 247g，断头处死，取肝脏，滤纸擦干血迹，称重，用生理盐水在冰浴下用全玻璃组织匀浆机匀浆为 10%组织

匀浆, 取 0.1ml 组织匀浆, 按实验设计表加入不同比例的复合抗氧化剂, 测定总抗氧化剂浓度为  $40 \mu\text{g/ml}$  时的 MDA 含量。以 SPSS 10.0 进行回归运算, 得到清除率与各组分浓度关系的公式, 再以 MathCAD 2000 运算求所得公式极值, 进而得到不同抗氧化剂复配后的最佳比例。

将四种化合物按照计算所得最佳比例复配, 同上法等浓度做检验实验, 检验不同抗氧化剂复配效果。

#### 2.4.2 DPPH·清除实验<sup>[73]</sup>

DPPH·溶解在无水乙醇中配成  $8.927 \times 10^{-5} \text{mol/L}$  溶液, 各抗氧化剂也溶解于无水乙醇中并梯度稀释成一系列浓度。以无水乙醇为空白, 以 2.5ml DPPH·溶液 + 0.5ml 乙醇作为参比, 分别测定 2.5ml DPPH·溶液 + 0.5ml 不同浓度抗氧化剂溶液于光径 1cm 比色皿中在 517nm 处的吸光度 (以上溶液均混匀、密封、室温避光保存 24 小时), 每个样品做两个平行实验。

$$\text{清除率}(\%) = 1 - [(A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

$A_i$ : 2.5ml DPPH·溶液 + 0.5ml 抗氧化剂溶液的吸光度

$A_j$ : 2.5ml 无水乙醇 + 0.5ml 抗氧化剂溶液的吸光度

$A_0$ : 2.5ml DPPH·溶液 + 0.5ml 无水乙醇的吸光度

根据所得数据, 利用统计软件 SPSS 10.0 计算半数清除浓度 ( $EC_{50}$ )。

#### 2.4.3 急毒实验

昆明小鼠 10 只, 雌雄各半, 体重  $32 \pm 1\text{g}$ , 实验前禁食 6h, 将茶多酚等抗氧化剂按照比例配成混悬液, ig 给药 5g/kg 体重, 自由饮水及进食, 观察 14d。每天记录实验小鼠是否死亡, 且外观、活动、进食及排泄是否正常。

#### 2.4.4 果蝇抗衰老实验<sup>[74]</sup>

##### 2.4.4.1 培养方法及实验分组

按照陈奇等的方法进行, 收集 8 小时内新羽化未交配的果蝇。将雌雄果蝇分开饲养在  $3\text{cm} \times 10\text{cm}$  的平底培养管中, 每管基础培养基厚约 1cm。置  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度  $62 \pm 2\%$  的条件下饲养。空白组仅饲以基础培养基, 实验组先将抗氧化剂配成混悬液, 再将药液加入基础培养基中, 充分混匀即可。

收集在基础培养基中羽化后 8h 以内的成虫果蝇, 乙醚麻醉下区分雌雄并分成 6 组 (见下表)。

表 3 果蝇实验分组情况

No.	组别	培养基
1	空白组	基础培养基
2	高剂量组	基础培养基+0.81%复合抗氧化剂
3	中剂量组	基础培养基+0.27%复合抗氧化剂
4	低剂量组	基础培养基+0.09%复合抗氧化剂
5	对照组	基础培养基+0.27%雷震子
6	V <sub>E</sub> 组	基础培养基+0.27%V <sub>E</sub>

#### 2.4.4.2 果蝇寿命实验

收集在基础培养基中羽化后 8h 以内的成虫果蝇，乙醚麻醉下区分雌雄并分成 6 组，每组雌、雄各 200 只。每管放入 50 只，平放在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相对湿度  $62 \pm 2\%$  的恒温箱内培养，每三天更换一次培养基。每日定时统计果蝇死亡数，直至全部死亡。以每组果蝇生存时间的总和除以该组果蝇数得出果蝇的平均寿命。以每组最后死亡的 10 只果蝇的平均寿命为该组的最高寿命。

#### 2.4.4.3 果蝇耐力实验

飞翔实验：果蝇分组等同前。给药饲养 40d 后，逐个试验尚存果蝇的飞翔能力。凡能起飞者，计入“能飞翔”项，计算飞翔百分率，与对照组比较，判断药物是否具有提高果蝇飞翔能力的作用。

抗高温实验：果蝇分组等同前。给药饲养 30d 后，将果蝇放入  $40^\circ\text{C}$  的培养箱中，观察并记录每组果蝇的死亡时间，比较各组果蝇全部死亡的时间，判断药物是否具有提高果蝇抗高温能力的作用。

#### 2.4.4.4 果蝇衰老指标实验

SOD、MDA 测定：果蝇分组等同前。给药饲养 40d 后，乙醚麻醉称重，每 10mg 果蝇为一个样本，加入 0.5ml 生理盐水，在冰浴中以全玻璃组织匀浆器匀浆，6000r/min 离心 10min，取上清液测 SOD 及 MDA。

脂褐素测定：果蝇分组等同前。给药饲养 40d 后，乙醚麻醉，将每组果蝇分为 8 个样本，每样本雄性 12 只，雌性 10 只。以氯仿-乙醇混合液（体积比 2:1）制成匀浆，按 Sohal<sup>[75]</sup>等人的方法测定其荧光强度。脂褐素含量以每毫克果蝇所含相当于标准溶液（硫酸奎宁）荧光强度的荧光物质微克数计算，比

较各组间差异。

#### 2.4.5 正常小鼠抗衰老实验<sup>[76]</sup>

6 周龄昆明小鼠 60 只，雌雄各半，随机分为 5 组，每组 12 只。每日 ig 复合抗氧化剂乳浊液 0.2ml。其中，高剂量组 100mg/Kg·d，中剂量组 70 mg/Kg·d，低剂量组 40mg/Kg·d，阳性对照组(雷震子)为 78 mg/Kg·d。Ig 给药 60 天，于末次给药后 6h 摘眼取血，脱颈处死，随即解剖，取内脏，滤纸洗干血迹，在电子天平上称重。全血以 4000g/min 分离血清，用于测定血清 SOD，MDA，总抗氧化能力和血清游离羟脯氨酸。组织-20℃冷冻备用，用于测定组织中的 MDA，羟脯氨酸及脂褐素。

#### 2.4.6 老年小鼠抗衰老实验

12 月龄 ICR 小鼠 48 只，雌性，按体重随机分为 4 组，每组 12 只。其中高剂量组 100mg/Kg·d，低剂量组 50 mg/Kg·d，阳性对照组(雷震子) 78 mg/Kg·d。给药及取样方法同前。通过测定小鼠体重及脾脏系数，血清 SOD、MDA、总抗氧化能力，组织 SOD、MDA 及脂褐素含量，观察复合抗氧化剂对衰老小鼠有无延缓衰老作用。

#### 2.4.7 小鼠抗应激实验

##### 2.4.7.1 游泳抗疲劳实验

取昆明种小鼠 30 只，体重 20±2g，雌雄各半，随机分成 5 组，每组 6 只，其中给药高剂量组 100mg/Kg·d，中剂量组 70 mg/Kg·d，低剂量组 40mg/Kg·d，阳性对照组(雷震子)为 78 mg/Kg·d。小鼠适应 25±2℃的试验环境一周后，开始 ig 给药，每日一次，连续灌胃 28d，实验期间小鼠自由取食和饮水。在末次给药 6h 后，每只小鼠尾根负重体重的 5%重量，将负重小鼠置于水温 25±1℃的游泳箱内，水深不少于 30cm，观察并记录每只小鼠自游泳开始至沉入水中 8 秒钟不能浮出水面的时间，作为小鼠游泳时间。

##### 2.4.7.2 耐高温实验

取昆明种小鼠 30 只，雌雄各半，体重、分组、给药方法同前。在末次给药 6h 后，将小鼠置于 500ml 的烧杯中，每个烧杯中一只小鼠，然后将烧杯置于 50±1℃的恒温箱内，观察并记录每只小鼠从放入恒温箱到停止呼吸的时间，作为死亡时间。

### 2.4.8 抗癌实验

将对数生长的胃癌细胞 BGC-823 及肺癌细胞 95-D 接种在含 15%小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 置 37℃, 5%二氧化碳、饱和湿度下的培养箱内培养, 以 EDTA-胰酶混合溶液消化传代。

以 100  $\mu$ L ( $1.0 \times 10^5$ /mL) 剂量浓度接种在 24 孔平板上, 孵育 24 小时后, 倾去培养液, 将复合抗氧化剂以培养液稀释成一定浓度加入孔内, 每孔 100  $\mu$ L, 对照组加同量培养液, 孵育 24 小时后, 弃去培养液, 随后每孔加入 100  $\mu$ L LD-Hank's 液, 37℃继续孵育 4h, 倒置显微镜下拍照观察。

### 2.5 检测指标

MDA、SOD、总抗氧化能力及组织羟脯氨酸含量的测定采用试剂盒法, 操作严格按照试剂盒说明进行。

脂褐素测定采用 Sohal 法: 将组织匀浆以氯仿-甲醇 (体积比 2: 1) 抽提, 置 40℃水浴温育 5min, 3000r/min 离心 10min, 取上清液于荧光分光光度计上测定, 发射波长 435nm, 激发波长 365nm。以 0.1  $\mu$ g/ml 硫酸奎宁标准溶液的荧光强度为标准, 脂褐素含量以每 mg 组织中所含相当于标准溶液荧光强度的荧光物质的质量 ( $\mu$ g) 来计算。

血清游离羟脯氨酸测定采用改良的氯胺-T 法: 用氧化剂氯胺-T 将羟脯氨酸氧化, 再用过氯酸破坏多余的氯胺-T, 并停止氧化, 最后使氧化物与对二甲基苯甲醛反应, 生成紫红色并进行比色。具体方法如下:

取血清样品 0.5ml, 置 10ml 磨口刻度比色管中, 加入 6mol/L 盐酸 1.5ml, 混匀, 塞紧塞子, 在 124~126℃烘箱中水解 2h, 加入 10mol/L NaOH 0.9ml, 然后用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调 pH 为 5~7, 蒸馏水稀释至 5ml, 过滤。取滤液 1ml, 柠檬酸缓冲液 0.5ml, 0.05mol/L 氯胺-T 1ml, 混匀, 充分氧化 6min, 3.15 mol/L 过氯酸 1.0ml, 混匀, 终止氧化 5min, 10%DMAB 1.0ml, 混匀, 100℃水浴 2min, 冷水冷却, 空白调零, 562nm 1cm 光径比色。

### 2.6 统计分析

所有数据输入电脑, 采用 SPSS 10.0 for Windows 及 MathCAD 2000 进行统计分析。

### 第三章 结果与讨论

#### 3.1 复方的优化

采用均匀设计方法, 以大鼠肝组织自氧化产生 MDA 为指标, 考察多种抗氧化剂复合的效果, 如下表:

表 4 抗氧化剂复方优化实验表

组分 组别	X1 (TP)	X2 (V <sub>E</sub> )	X3 (V <sub>C</sub> )	X4 (β C)	Y (吸光度)	MDA (nmol/ml)
1	0.685	0.148	0.089	0.078	0.162±0.004	31.84±0.81
2	0.546	0.104	0.011	0.339	0.164±0.006	32.24±1.23
3	0.461	0.026	0.304	0.208	0.158±0.003	31.02±0.62
4	0.397	0.364	0.022	0.216	0.174±0.007	34.29±1.42
5	0.345	0.207	0.294	0.154	0.182±0.001	35.92±0.21
6	0.299	0.081	0.097	0.522	0.186±0.003	36.73±0.61
7	0.259	0.610	0.094	0.037	0.124±0.002	24.08±0.41
8	0.223	0.321	0.100	0.356	0.206±0.006	40.82±1.92
9	0.190	0.154	0.513	0.144	0.105±0.002	20.20±0.41
10	0.160	0.013	0.233	0.595	0.260±0.010	51.84±2.04
11	0.131	0.463	0.343	0.064	0.121±0.007	23.47±1.43
12	0.104	0.243	0.224	0.428	0.154±0.003	30.20±0.62
13	0.079	0.075	0.767	0.079	0.120±0.000	23.27±0.00
14	0.055	0.656	0.118	0.172	0.131±0.006	25.51±0.22
15	0.032	0.351	0.598	0.019	0.101±0.002	19.39±0.41
16	0.011	0.151	0.393	0.446	0.194±0.005	38.37±1.02
空白组					0.214±0.002	42.45±0.41
标准组					0.055±0.001	10.00±0.20
标准空白					0.006±0.000	0

以 SPSS10.0 进行多元回归, 得方程为

$$Y = -0.469X_2 + 0.421X_2^2 - 0.113X_3^2 + 0.180X_4^2 + 0.815X_1X_2 + 0.274X_1X_3 + 0.637X_2X_3 + 0.809X_2X_4 - 0.0973X_3X_4 + 0.029$$

$F=58.216 > F_{0.01}(4, 11)=5.67$ , 方程可信。

以 MathCAD2000 计算方程极值得, 当  $X_1:X_2:X_3:X_4$  约为 4:1:4:1 时, 方程有极小值。  $Y_{\text{极小}}=0.076$ , 其对应最大抑制率为 66.3%。

进行检验实验, 将以上四种化合物按照 TP:  $V_C$ :  $V_E$ :  $\beta C$  质量比为 4:1:4:1 的比例复配, 同上法等浓度做检验实验, 得到其抑制率为 48.6%, 基本接近理论值。

同法, 以  $40 \mu\text{g/ml}$  浓度的 TP、 $V_C$ 、 $V_E$ 、 $\beta C$  及复合物 (AOM), 测定体外对 MDA 的抑制率, 得到以下结果:

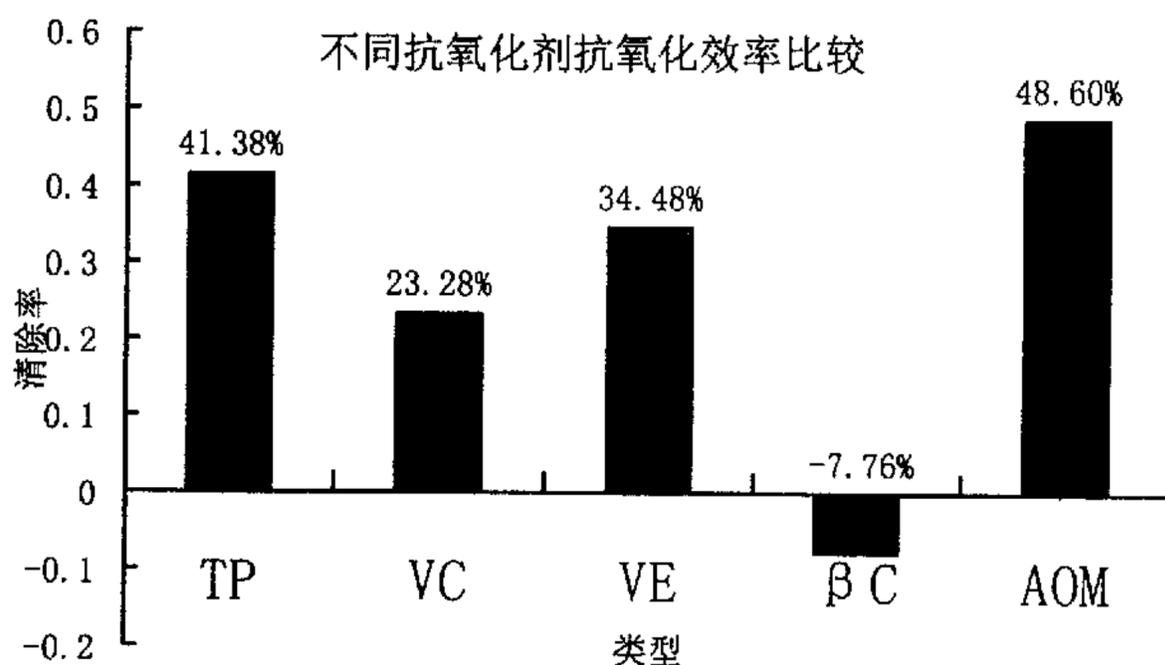


图 3 不同抗氧化剂抗氧化效率比较

均匀设计法是中国著名的数学家方开泰教授和王元院士于 1978 年应用数论而创立的一种新的试验设计法, 已在国防、科技、工业、农业等领域有了成效显著的应用, 越来越引起国内外人们的注意<sup>[77]</sup>。传统的正交试验法具有“均匀分散, 整齐可比”等特点, 而均匀设计法只考虑试验点在试验范围内更均匀分散而不考虑“整齐可比”, 故试验数据不能直接在表上处理而必须用回归分析处理数据, 而试验次数比正交试验法大大减少, 试验点在试验范围内分散得更均匀, 更有代表性。可以说, 试验次数少和要用回归分析是均匀设计法的特点。尤其在多水平多因素试验时, 均匀设计法更有优越性。如一个三因素五水平的试验, 若用正交设计法至少需 25 次试验, 而应用均匀设计法仅需 8 次试验即可, 且偏差基本相同, 优势显而易见。

本文应用均匀设计法,将四种抗氧化剂复合,共进行18批试验,得到不同抗氧化剂相互协同作用的方程,进而计算出其最佳比例,且经检验实验验证。从方程可以看出,TP与 $V_C$ 、TP与 $V_E$ 、 $V_C$ 与 $V_E$ 、 $V_C$ 与 $\beta C$ 、 $V_E$ 与 $\beta C$ 之间均有一定的协同作用。有报道 $\beta$ -胡萝卜素在正常氧分压下具有促氧化作用,而在体内氧分压下具有抗氧化作用,本实验也表明单独使用 $\beta$ -胡萝卜素在体外氧分压下确有促氧化作用。

目前对协同作用的研究多限于两种抗氧化剂之间,用均匀设计法对多种抗氧化剂进行协同作用研究国内尚未见报道,而本文对16个梯度四种抗氧化剂进行协同作用研究在国内外更属首次。

### 3.2 DPPH·清除实验

利用DPPH自由基被抗氧化剂清除后颜色变浅,且颜色与其浓度成正比,考查不同抗氧化剂及其复合后的抗氧化能力,结果如下图表:

表5 茶多酚清除DPPH·  
( $M \pm SD$ ,  $n=2$ )

茶多酚浓度 ( $\mu g/mL$ )	吸光度	清除率
1.5000	$0.592 \pm 0.006$	8.923
3.0000	$0.518 \pm 0.008$	20.385
4.5000	$0.451 \pm 0.002$	30.692
6.0000	$0.403 \pm 0.003$	38.000
7.5000	$0.347 \pm 0.005$	46.692
9.0000	$0.292 \pm 0.001$	55.077
10.5000	$0.255 \pm 0.001$	60.769
12.0000	$0.211 \pm 0.001$	67.615
13.5000	$0.174 \pm 0.005$	73.308
15.0000	$0.143 \pm 0.002$	78.077

$A_0 = 0.650 \pm 0.000$   $A_i$  均为0.000  
M表示数据平均值,SD表示数据相对标准偏差,  
n表示实验次数

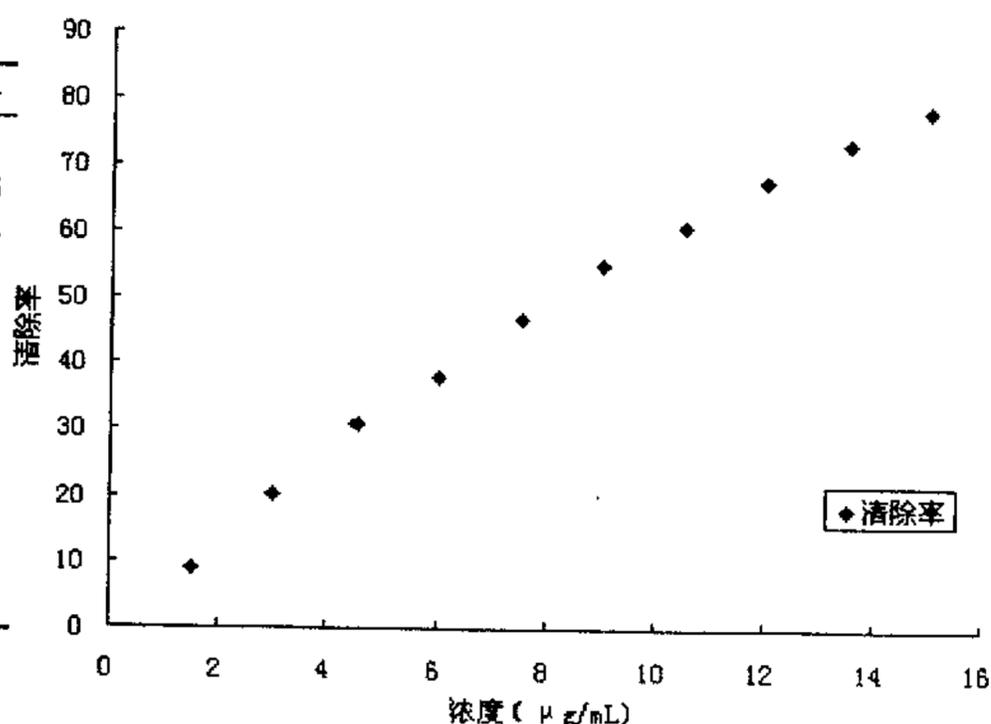


图4 茶多酚清除DPPH·

表 6 维生素 C 清除 DPPH·  
(M±SD, n=2)

浓度 (μg/mL)	吸光度	清除率
4.0000	0.604±0.001	6.790
8.0000	0.558±0.004	13.889
12.0000	0.518±0.002	20.139
16.0000	0.492±0.003	24.074
20.0000	0.445±0.002	31.404
24.0000	0.399±0.001	38.503
28.0000	0.375±0.011	42.130
32.0000	0.323±0.002	50.231
36.0000	0.278±0.001	57.099
40.0000	0.222±0.009	65.818

$A_0 = 0.648 \pm 0.000$   $A_i$  均为 0.000

M表示数据平均值, SD表示数据相对标准偏差,  
n表示实验次数

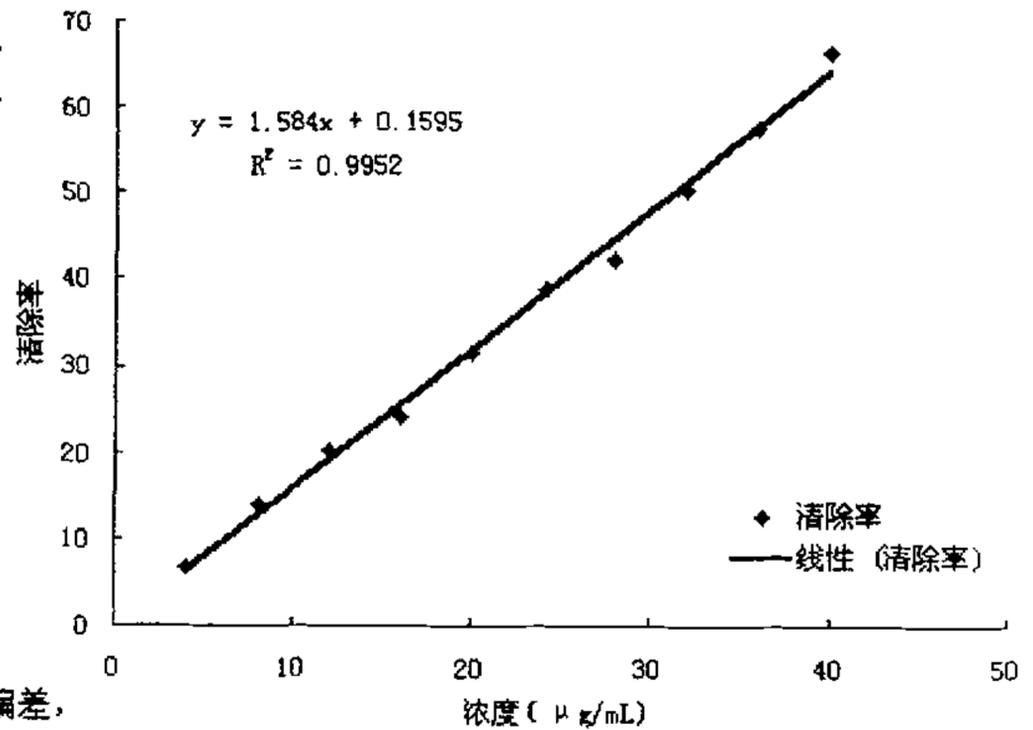


图 5 维生素 C 清除 DPPH·

表 7 维生素 E 清除 DPPH·  
(M±SD, n=2)

浓度 (μg/mL)	吸光度	清除率
4.0000	0.612±0.001	5.578
8.0000	0.581±0.001	10.555
12.0000	0.553±0.001	14.792
16.0000	0.524±0.004	19.260
20.0000	0.497±0.004	23.421
24.0000	0.458±0.004	29.507
28.0000	0.435±0.007	32.974
32.0000	0.411±0.001	36.749
36.0000	0.376±0.001	42.142
40.0000	0.346±0.008	46.687

$A_0 = 0.649 \pm 0.000$   $A_i$  均为 0.000

M表示数据平均值, SD表示数据相对标准偏差,  
n表示实验次数

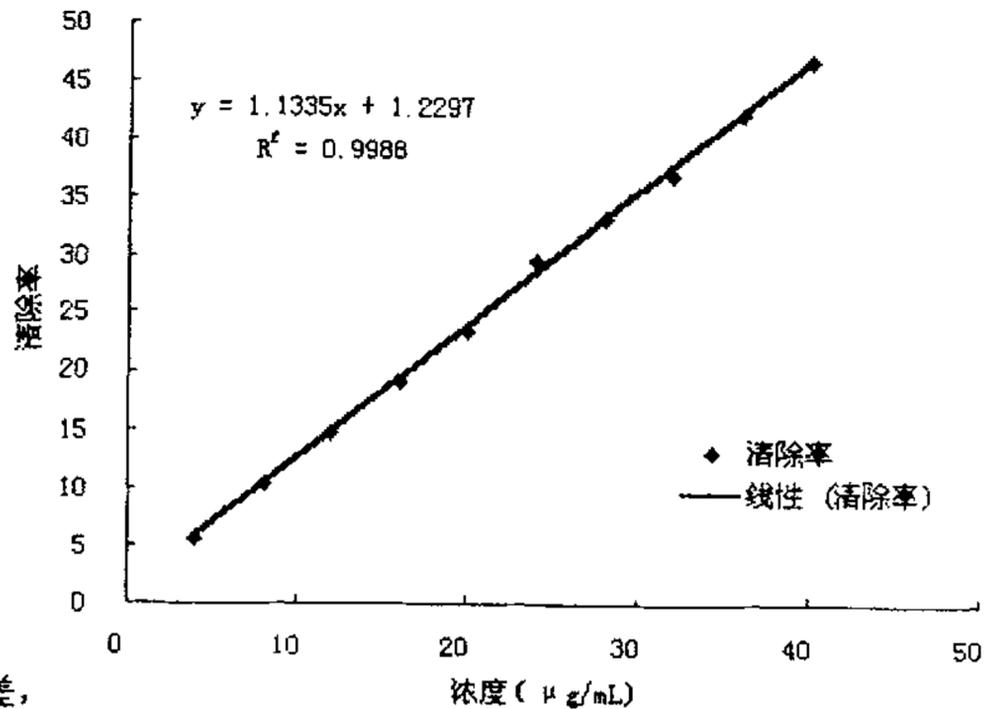


图 6 维生素 E 清除 DPPH·

表 8 β-胡萝卜素清除 DPPH·  
(M±SD, n=2)

浓度 (μg/mL)	吸光度	清除率
40.0000	0.633±0.003	3.799
80.0000	0.611±0.002	7.219
120.0000	0.595±0.001	9.650
160.0000	0.578±0.000	12.158
200.0000	0.566±0.001	14.058
240.0000	0.541±0.004	17.781
280.0000	0.538±0.001	18.313
320.0000	0.519±0.001	21.125
360.0000	0.513±0.001	22.112
400.0000	0.495±0.005	24.848

A<sub>0</sub>: 0.658±0.000 A<sub>i</sub>: 均为 0.000  
M表示数据平均值, SD表示数据相对标准偏差,  
n表示实验次数

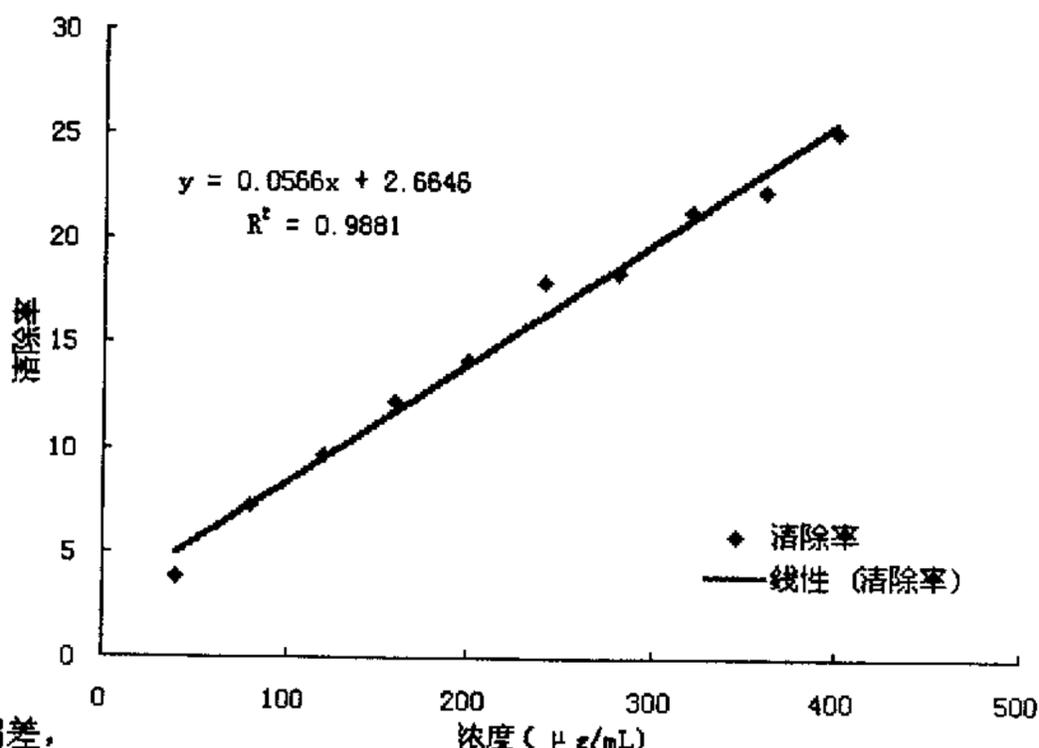


图 7 β-胡萝卜素清除 DPPH·

表 9 复合抗氧化剂清除 DPPH·  
(M±SD, n=2)

浓度 (μg/mL)	吸光度	清除率
2.0	0.541±0.001	17.781
4.0	0.435±0.002	33.891
6.0	0.348±0.001	47.112
8.0	0.282±0.001	57.143
10.0	0.210±0.004	68.085
12.0	0.148±0.003	77.508
14.0	0.093±0.000	85.886
16.0	0.054±0.001	91.793

A<sub>0</sub>: 0.658±0.000 A<sub>i</sub>: 均为 0.000  
M表示数据平均值, SD表示数据相对标准偏差,  
n表示实验次数

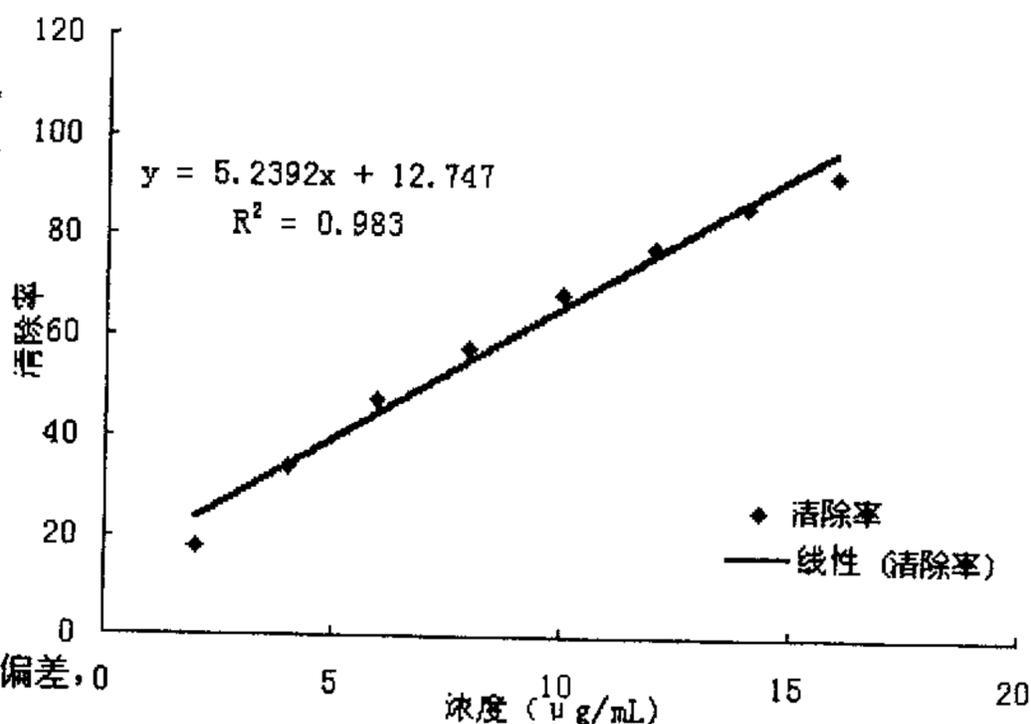


图 8 复合抗氧化剂清除 DPPH·

表10 不同抗氧化剂对DPPH自由基清除作用比较

名称	EC <sub>50</sub> (μg/mL)	EC <sub>50</sub> (mol/L)
茶多酚	8.707	
维生素C	31.412	0.1783×10 <sup>-3</sup>
维生素E	40.609	0.0943×10 <sup>-3</sup>
β-胡萝卜素	641.118	1.1942×10 <sup>-3</sup>
复合抗氧化剂	7.110	

1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,简称DPPH)在有机溶剂中是一种稳定的自由基,呈紫色,其乙醇溶液在紫外光下有两个特征吸收峰 330nm 和 517nm,其中 517nm 处的吸收不易受外界条件干扰。

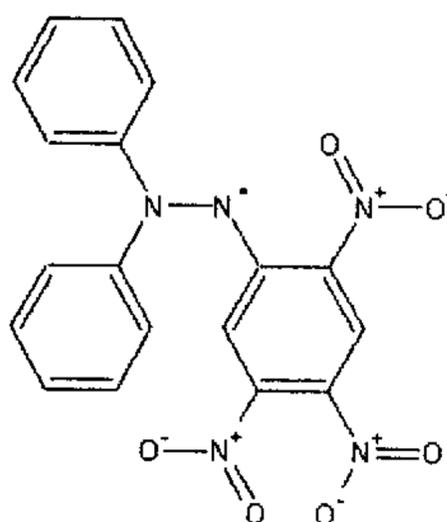


图9 DPPH 自由基

当有自由基清除剂存在时,DPPH的单电子由于被配对而使其颜色变浅,在517nm波长处的吸光度变小,而且,这种颜色变浅的程度与配对电子数成化学计量关系。因此,此处的吸光度可以用来检测自由基的清除情况,从而评价实验样品的抗氧化能力。此抗氧化能力用半数清除浓度(EC<sub>50</sub>)或抑制率来表示,半数清除浓度越小,抗氧化性越强;抑制率越大,抗氧化性越强。由于DPPH清除法能直观的反映抗氧化剂抗氧化能力的高低,因而已在海外被广泛用于抗氧化剂的筛选及抗氧化剂活性的研究<sup>[78][79][80]</sup>,而在国内相关研究尚处于起步阶段,鲜见类似报道。

在本实验中,相同量的DPPH自由基作为底物,茶多酚、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>、β-胡萝卜素所对应的EC<sub>50</sub>分别是8.707、31.412、40.609、641.118μg/mL,由于复合抗氧化剂中茶多酚、V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>、β-胡萝卜素的质量比为4:4:1:1因此若用简单加和

法计算, 四种抗氧化剂复合后其对应的 $EC_{50}$ 应为 $8.707 \times 40\% + 31.412 \times 40\% + 40.609 \times 10\% + 641.115 \times 10\% = 84.220 \mu g/mL$ , 而复合后抗氧化剂所对应的 $EC_{50}$ 为 $7.110 \mu g/mL$ , 抗氧化能力提高近11倍。表明几种抗氧化剂复合后其抗氧化能力得到显著提高, 不同抗氧化剂之间表现出很强的协同增效作用。

### 3.3 急毒实验

经一次性灌胃小鼠 $5g/Kg$ 剂量, 观察14天, 受试小鼠无一死亡, 且外观、活动、进食及排泄均正常, 尸检内脏无异常。说明复合物基本无毒性, 无必要进行更高剂量的试验<sup>[76]</sup>。

### 3.4 果蝇抗衰老实验

#### 3.4.1 果蝇寿命实验

表11 复合抗氧化剂对果蝇寿命的影响

组别	数量 (只)	平均寿命(天)		半数死亡(天)		平均最高寿命(天)	
		雌	雄	雌	雄	雌	雄
空白组	400	61.32±16.74	56.81±17.85	53	55	92.2±1.68	84.0±0.00
高剂量组	400	62.98±15.84	58.62±17.24	58	55	91.8±1.55	82.0±0.00
中剂量组	400	66.49±17.76*	62.13±16.25*	60	57	92.1±1.82	82.6±0.52
低剂量组	400	65.61±16.14*	62.58±17.86*	59	58	91.9±1.45	85.4±0.84
对照组	400	59.34±16.39	57.14±16.58	55	54	93.0±0.00	81.0±2.32
维生素E组	400	59.75±17.54	55.48±15.26	56	48	90.2±0.63	81.8±0.92

\*与空白对照组比,  $P < 0.05$       \*\*与空白对照组比,  $P < 0.01$

饲喂抗氧化剂后, 果蝇寿命有了一定程度的提高。就平均寿命而言, 中剂量抗氧化剂组雌性果蝇平均寿命比空白组增加5天, 雄性果蝇增加近6天; 低剂量组果蝇寿命也有同样的延长; 但高剂量组果蝇寿命延长较低, 仅有2天, 这可能是由于加入较高剂量的抗氧化剂, 改变了果蝇培养基的pH值, 使得果蝇出现一定程度的不适应所致。半数死亡时间, 雌性果蝇延长较大, 高、中、低剂量组分别延长了5天、7天和6天; 而雄性果蝇组延长仅0天、2天和3天, 表明其对果蝇的抗衰老作用可能与性别有一定关系。最高平均寿命空白组与给药组基本无差别, 说明受试药物对实验动物最高寿命无影响, 表明复合抗氧化剂仅能显著提高实验果蝇的平均寿命, 而不能提高其最大寿限。维生素E组果蝇平均寿命、半数死亡时间和平均最大寿命三个指标都较空白组小, 可能是由于大剂量维生素E的毒性所致。

## 3.4.2 果蝇耐力实验

表12 复合抗氧化剂对果蝇飞翔能力的影响

	总只数	能飞翔数	比例	提高百分比
空白组	90	62	68.89%	—
高剂量组	86	79	91.86%	33.3%
中剂量组	82	76	92.68%	34.5%
低剂量组	89	82	92.13%	33.7%
对照组	86	56	65.12%	-5.5%
V <sub>E</sub> 组	85	76	89.41%	29.8%

表13 复合抗氧化剂对果蝇耐热能力的影响

	总只数	全部死亡时间 (min)	提高百分比
空白组	53	15.36	—
高剂量组	53	31.02	102.0%
中剂量组	56	27.87	81.4%
低剂量组	54	26.32	71.4%
对照组	57	17.23	12.2%
V <sub>E</sub> 组	60	21.13	37.6%

由以上两表可知, 复合抗氧化剂可以显著提高实验果蝇的抗应激能力。就飞翔能力而言, 给药组果蝇平均较空白组果蝇飞翔能力提高30%以上; 就耐热能力而言, 高、中、低剂量给药组果蝇全部死亡时间较空白组提高了102.0%、81.4%和71.4%。实验动物耐力的提高说明在一定程度上, 复合抗氧化剂可以提高实验果蝇的生活质量。

## 3.4.3 果蝇衰老指标实验

表14 抗氧化剂对果蝇体内MDA、SOD及脂褐素影响

	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	脂褐素 ( $\mu$ g/mg)
空白组	3.35±0.41	4.18±0.32	0.089±0.034
高剂量组	2.37±0.12**	4.42±0.25	0.078±0.032
中剂量组	2.61±0.30*	4.28±0.34	0.082±0.027
低剂量组	1.86±0.19**	4.49±0.26	0.077±0.014*
对照组	2.25±0.15**	4.45±0.31	0.079±0.028
V <sub>E</sub> 组	1.88±0.21**	4.54±0.29	0.074±0.019*

\*与空白对照组比, P&lt;0.05

\*\*与空白对照组比, P&lt;0.01

由上表可知, 在培养基中添加不同剂量的抗氧化剂可有效降低果蝇体内MDA含量, 与空白组比较, 给药组果蝇体内MDA显著降低; 而果蝇体内SOD活性无显著变化; 果蝇体内脂褐素含量也出现不同程度的降低。说明复合抗氧化剂可以有效延缓果蝇衰老的发生。

果蝇属双翅目果蝇属昆虫，是需氧生物，其代谢途径、生理学功能、发育阶段及行为学活动与哺乳动物极为相似，且果蝇具有繁殖能力强、生长周期短、易于饲养等特点，因而常被用作衰老实验研究。衡量延缓衰老效果最准确的方法是动物生存实验，在本实验中，受试药物可明显延长果蝇寿命，延长率可达10%，但实验中对果蝇平均最高寿命并没有明显延长，表明受试药物仅能改变果蝇个体寿命，而不能改变其物种的寿限。抗应激实验中，受试药物可以显著提高果蝇的飞翔能力和抗高温能力。同时，受试药物可以显著降低果蝇体内MDA和脂褐素含量，而对SOD活性没有明显提高，这可能与受试药物在果蝇体内的作用机制不同有关。

### 3.5 正常小鼠抗衰老实验

#### 3.5.1 体重

表 15 复合抗氧化剂对实验小鼠体重及内脏重量的影响

	体重	心	脑	肝	肾	脾	胸腺
空白组	41.12±3.57	0.25±0.05	0.46±0.09	2.04±0.17	0.55±0.12	0.17±0.06	0.06±0.02
高剂量	41.52±2.99	0.24±0.07	0.47±0.08	2.10±0.18	0.52±0.13	0.22±0.03	0.08±0.03
中剂量	40.87±4.41	0.23±0.07	0.48±0.06	2.05±0.19	0.51±0.14	0.24±0.03	0.06±0.03
低剂量	41.79±4.29	0.27±0.08	0.47±0.05	1.83±0.29	0.53±0.13	0.20±0.03	0.06±0.02
阳性对照	42.11±4.39	0.25±0.09	0.47±0.03	1.86±0.31	0.55±0.09	0.20±0.03	0.06±0.01

\*与空白对照组比,  $P < 0.05$       \*\*与空白对照组比,  $P < 0.01$

经检验，以不同剂量给药的小鼠在体重、心、脑、肝、肾重量上没有显著差别，表明复合抗氧化剂对实验动物脏器无毒害作用。

#### 3.5.2 内脏系数

表 16 复合抗氧化剂对实验小鼠内脏系数的影响

	脾脏系数 ( $\text{mg} \cdot 10\text{g}^{-1}$ 体重)	胸腺系数 ( $\text{mg} \cdot 10\text{g}^{-1}$ 体重)
空白组	41.03±6.56	13.37±2.67
高剂量	52.99±7.98**	18.06±2.10**
中剂量	57.93±6.60**	15.72±2.27*
低剂量	47.62±6.88*	14.84±1.78
阳性对照	47.97±7.39*	14.72±1.09

\*与空白对照组比,  $P < 0.05$       \*\*与空白对照组比,  $P < 0.01$

组织器官的重量,特别是免疫器官脾、胸腺的重量变化,是反映生物体衰老程度的重要指标。脾脏是动物体内最大的免疫器官,胸腺是重要的中枢免疫器官,随机体的老化,脾脏及胸腺萎缩,功能衰退,机体免疫力下降,容易导致各种老年疾病的发生,加速老化的进程。实验表明,高剂量复合抗氧化剂能显著提高小鼠的脾脏系数 ( $P < 0.01$ ) 和胸腺系数 ( $P < 0.01$ ),提示其能有效地提高机体免疫力,提高抗病能力,延缓衰老的发生。

### 3.5.3 血清学检测

#### 3.5.3.1 SOD

表 17 复合抗氧化剂对实验小鼠血清 SOD 活性的影响

组别	N	♂ (NU/ml)	♀ (NU/ml)
空白对照	12	155.57 ± 18.82	90.14 ± 22.34
高剂量组	12	223.68 ± 20.83**	211.54 ± 24.05**
中剂量组	12	235.10 ± 19.99**	237.52 ± 26.88**
低剂量组	12	184.74 ± 23.35*	127.12 ± 20.09**
阳性对照组	12	196.12 ± 23.82**	211.5 ± 21.28**

\*与空白对照组比,  $P < 0.05$       \*\*与空白对照组比,  $P < 0.01$

超氧化物歧化酶 (SOD) 是针对自由基损害的主要防御酶,是机体捕获超氧阴离子自由基唯一的酶。它能催化  $O_2^{\cdot-}$  转变为  $H_2O_2$  和  $O_2$  的歧化反应,从而使  $O_2^{\cdot-}$  转化为分子氧和对机体危害较轻的  $H_2O_2$ ,再由其他抗氧化酶连续代谢转化为  $H_2O$ ,从而消除了自由基,保护细胞免受损害。在 SOD 活性降低时,  $O_2^{\cdot-}$  经 Haber Weiss 反应生成对机体毒性更强的  $\cdot OH$ , SOD 清除  $O_2^{\cdot-}$ ,可以有效降低  $\cdot OH$  的含量。随着年龄的增长, SOD 活力下降,机体清除超氧阴离子的能力逐步降低,从而表现出衰老的症状。不同剂量的复合抗氧化剂对小鼠血清 SOD 活性都有显著的提高作用,表明其有延缓衰老的作用。

#### 3.5.3.2 总抗氧化能力

表 18 复合抗氧化剂对实验小鼠血清总抗氧化能力的影响

组别	N	♂ (单位/ml)	♀ (单位/ml)
空白对照	12	10.28 ± 2.42	11.59 ± 1.64

高剂量组	12	17.08±1.86**	25.23±3.06**
中剂量组	12	15.74±1.56**	19.34±1.46**
低剂量组	12	14.26±2.75*	18.23±3.54**
阳性对照组	12	15.67±2.77**	15.27±2.48**

\*与空白对照组比, P<0.05      \*\*与空白对照组比, P<0.01

机体防御体系的抗氧化能力强弱与健康程度存在密切都关系, 该防御体系有酶促与非酶促两个体系, 前者包括超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH)、过氧化氢酶 (CAT) 等, 后者包括  $V_E$ 、 $V_C$ 、胡萝卜素等。总抗氧化能力的高低直接反映了机体抵御外界氧化损伤的能力。复合抗氧化剂对小鼠血清总抗氧化能力有显著的提高作用, 表明其有延缓衰老的作用。

### 3.5.3.3 MDA

表 19 复合抗氧化剂对实验小鼠血清 MDA 含量的影响

组别	N	♂ (nmol/ml)	♀ (nmol/ml)
空白对照	12	8.82±1.87	8.09±1.10
高剂量组	12	4.85±1.09**	4.26±1.16**
中剂量组	12	6.47±1.36*	6.32±1.54*
低剂量组	12	7.21±2.04	7.04±2.37
阳性对照组	12	6.62±1.54*	6.13±1.68*

\*与空白对照组比, P<0.05      \*\*与空白对照组比, P<0.01

自由基可攻击细胞膜中的多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA), 形成过氧化脂质 (LPO), 它直接反映着机体内氧自由基的代谢情况。LPO 可进而分解生成大量的醛、醇和烃类。其中丙二醛 (MDA) 具有很强的毒性, 可与磷脂蛋白质、核酸等形成稳定的不溶性代谢终产物, 积聚在细胞内而影响功能, 导致细胞代谢及功能障碍, 甚至死亡。因而测定 MDA 的量常常可以反映机体内脂质过氧化的程度, 间接地反映出细胞损伤的程度。实验表明, 复合抗氧化剂能有效清除小鼠血清内 MDA, 降低 MDA 水平, 有一定的延缓衰老作用。

### 3.5.3.4 羟脯氨酸 (Hpro)

表 20 复合抗氧化剂对实验小鼠血清羟脯氨酸含量的影响

组别	N	♂ (nmol/ml)	♀ (nmol/ml)
空白对照	12	26.12±0.92	22.78±1.08
高剂量组	12	30.38±2.35**	28.13±2.14**
中剂量组	12	30.57±1.29**	26.86±1.54**
低剂量组	12	28.71±2.44**	27.79±2.10**
阳性对照组	12	26.31±1.26	25.01±1.53*

\*与空白对照组比, P<0.05 \*\*与空白对照组比, P<0.01

羟脯氨酸在胶原蛋白中占 13.4%，在弹性蛋白中占极少量，其他蛋白中均不存在。而胶原蛋白大多分布在皮肤、腱、软骨、血管等处，因此羟脯氨酸的量能反映结缔组织疾病的胶原代谢情况。血清羟脯氨酸含量与年龄关系密切。幼年骨骼正在发育，胶原代谢率高，所以年龄越小血清羟脯氨酸含量越高。随着年龄增长，胶原代谢率下降，血清羟脯氨酸含量下降。成人及成年动物骨骼发育已成熟，胶原代谢稳定，血清羟脯氨酸含量在一定范围内。所以，血清羟脯氨酸含量已作为衡量胶原代谢的指标，用于反映机体发育年龄。实验表明，复合抗氧化剂可使血清羟脯氨酸含量升高，表明其有加速胶原转化率的作用，进一步证明其有延缓衰老的作用。

### 3.5.4 组织学检测

将冷冻保存的小鼠组织从冰箱中取出，解冻，用生理盐水在冰浴下以玻璃匀浆管制成 10% 组织匀浆，采用 TBA 显色法测定组织 MDA 含量，氯胺-T 法测定组织羟脯氨酸含量，Sohal 法测定组织中脂褐素含量。

#### 3.5.4.1 组织 MDA

表 21 复合抗氧化剂对实验小鼠组织 MDA 含量的影响

组别	肝 (nmol/g)	心 (nmol/g)	脾 (nmol/g)	肾 (nmol/g)
空白组	218.18±22.36	165.15±24.52	201.52±32.71	102.27±15.22
高剂量组	182.58±27.53**	98.48±21.91**	157.58±22.54**	64.02±10.19**
中剂量组	195.45±24.27*	114.77±19.52**	126.52±19.22**	68.56±11.64**
低剂量组	196.59±26.74*	112.12±16.86**	165.15±21.14**	90.91±13.48
阳性对照组	203.79±24.38	123.71±18.32**	134.47±18.57**	79.55±12.96**

\*与空白对照组比, P<0.05 \*\*与空白对照组比, P<0.01

自由基攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸，生成过氧化脂质，进而分解生成丙二醛（MDA），其聚集在细胞内影响细胞功能，甚至导致细胞死亡。MDA 的高低间接的反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。通过测定实验小鼠肝脏、心脏、脾脏和肾脏 MDA 含量，看到复合抗氧化剂可以显著降低组织中 MDA 含量，表明其有延缓衰老作用。

#### 3.5.4.2 Hpro 测定

表 22 复合抗氧化剂对实验小鼠组织 Hpro 含量的影响

	心 ( $\mu\text{g/g}$ )	肝 ( $\mu\text{g/g}$ )
空白组	3.96±0.48	2.84±0.48
高剂量组	4.45±0.40*	3.05±0.53
中剂量组	4.41±0.57*	2.95±0.45
低剂量组	4.09±0.52	2.50±0.51
阳性对照组	4.26±0.62	2.56±0.44

\*与空白对照组比,  $P<0.05$  \*\*与空白对照组比,  $P<0.01$

试验表明，复合抗氧化剂能显著提高试验小鼠心肌羟脯氨酸含量，维持心肌弹性，保持心脏健康。但对肝脏羟脯氨酸含量无明显提高。其原因有待于进一步的试验研究。

#### 3.5.4.3 脂褐素测定

表 23 复合抗氧化剂对实验小鼠组织脂褐素含量的影响

	心 ( $\mu\text{g/g}$ )	脾 ( $\mu\text{g/g}$ )
空白组	5.48±1.02	11.28±2.03
高剂量组	2.97±0.86**	6.19±1.45**
中剂量组	4.22±0.93**	8.34±1.66**
低剂量组	4.19±1.04**	8.92±2.14*
阳性对照组	4.79±1.15*	9.36±2.51*

\*与空白对照组比,  $P<0.05$  \*\*与空白对照组比,  $P<0.01$

脂褐素又称为老年色素，它在细胞中的蓄积量随年龄而增加，脂褐素的形成与自由基有关。Brunk认为，在次级溶酶体内，脂质过氧化物经分子交联即形成脂褐素，因此脂质过氧化反应可促进脂褐素的形成，抑制脂质过氧化可减少

脂褐素的沉积。试验表明,复合抗氧化剂能显著降低试验小鼠体内的脂褐素含量,有较强的延缓衰老作用。

小鼠由于易于饲养、存活力较强因而是目前应用最为广泛的实验动物模型。在本实验中,受试药物对实验小鼠的体重及内脏重量无明显影响,通过测定脾脏系数及胸腺系数,表明受试药物可能具有提高机体免疫力的作用;血清学检验发现,受试药物可以显著提高血清中SOD活力、总抗氧化能力和游离羟脯氨酸含量,而显著降低血清中MDA含量;组织学检测也发现,受试药物可以明显降低组织中MDA和脂褐素含量,而能增加组织中羟脯氨酸含量。以上实验表明,复合抗氧化剂可以有效延缓实验小鼠衰老。

### 3.6 老年小鼠抗衰老实验

随年龄增长,动物体呈退行性变化,自然衰老小鼠能很好的反映这一变化,本实验以自然衰老小鼠为模型,研究复合抗氧化剂对小鼠的延缓衰老作用。通过测定小鼠体重及脾脏系数,血清SOD、MDA、总抗氧化能力,组织SOD、MDA及脂褐素含量,观察复合抗氧化剂对衰老小鼠有无延缓衰老作用。

#### 3.6.1 体重

表 24 复合抗氧化剂对老年小鼠体重及内脏重量的影响

	体重 (g)	心 (g)	脑 (g)	肝 (g)	肾 (g)	脾 (g)
衰老组	37.78±1.68	0.18±0.02	0.53±0.02	1.48±0.16	0.38±0.03	0.12±0.04
50mg/kg	38.94±2.52	0.19±0.02	0.54±0.04	1.61±0.25	0.44±0.03	0.13±0.02*
100mg/kg	37.30±4.70	0.18±0.01	0.54±0.01	1.38±0.30	0.35±0.08	0.17±0.12**
阳性对照	40.77±3.88	0.18±0.02	0.52±0.02	1.56±0.01	0.41±0.06	0.14±0.01*

\*与衰老组比,  $P < 0.05$  \*\*与衰老组比,  $P < 0.01$

由上表可知,就衰老小鼠而言,给药组和空白组除脾脏重外其他基本无显著差别,提示复合抗氧化剂对老年小鼠无毒副作用,且可能有提高免疫力的功能。

#### 3.6.2 脾脏系数

表 25 复合抗氧化剂对老年小鼠脾脏系数的影响

	体重 (g)	脾重 (g)	脾脏系数
衰老组	37.775±1.68	0.120±0.04	31.77±7.20

50mg/kg	38.943±2.52	0.133±0.02*	34.15±10.27
100mg/kg	37.295±4.70	0.165±0.02**	44.24±5.36**
阳性对照	40.765±3.88	0.135±0.01*	33.12±2.45

\*与衰老组比, P<0.05 \*\*与衰老组比, P<0.01

结果显示, 正常衰老组小鼠体重、脾脏重及脾脏系数都明显低于青年组, 给药组小鼠的脾脏系数有了一定程度的提高, 尤其以 100mg/Kg 灌胃的小鼠脾脏重及脾脏系数明显升高, 与衰老组比较有极显著差别 (P<0.01), 表明复合抗氧化剂能提高衰老小鼠的免疫机能。

### 3.6.3 血清学检测

表 26 复合抗氧化剂对老年小鼠血清 SOD、MDA 的影响

	SOD (NU/ml)	MDA (nmol/ml)
衰老组	41.28±11.12	17.24±3.55
50mg/kg	74.94±15.92**	13.19±2.38*
100mg/kg	82.35±17.66**	10.12±1.27**
阳性对照	68.25±13.78**	14.25±1.89

\*衰老组比, P<0.05 \*\*与衰老组比, P<0.01

衰老小鼠与青年小鼠相比, 体内抗氧化能力显著降低, 而氧化产物含量显著升高, 表现为血清 SOD 活性降低, 血清 MDA 含量增加, 血清总抗氧化能力降低。本实验中给药组小鼠血清 SOD 活性较衰老组有极显著提高, 50mg/kg 组小鼠提高 81.5%, 100mg/kg 组小鼠提高 99.5%; 给药组小鼠血清 MDA 含量较衰老组有极显著降低, 50mg/kg 组小鼠降低 23.5%, 100mg/kg 组小鼠降低 41.3%。血清中 SOD 活性、MDA 含量是衡量机体衰老程度的重要指标, 其数值随年龄增长而出现不同程度的变化, 本实验表明复合抗氧化剂对老年小鼠有很强的延缓衰老作用。

### 3.6.4 组织学检测

#### 3.6.4.1 组织 MDA 检测

表 27 复合抗氧化剂对老年小鼠组织 MDA 含量的影响

	肝(nmol/g)	脑(nmol/g)
衰老组	379.29±40.12	452.72±47.35

50mg/kg	304.28±34.80**	371.49±43.16*
100mg/kg	240.56±24.26**	280.15±32.59**
阳性对照	347.91±50.42	388.25±45.25

\*与衰老组比, P<0.05 \*\*与衰老组比, P<0.01

结果表明, 复合抗氧化剂能显著降低老年小鼠肝、脑 MDA 含量, 尤其是 100mg/kg 组复合抗氧化剂能降低肝、脑中 MDA 含量的 36.6%和 38.1%, 表明其有较强的抗衰老作用。

#### 3.6.4.2 组织 SOD 检测

表 28 复合抗氧化剂对老年小鼠组织 SOD 活性的影响

	脑 (NU/g)
衰老组	60.41±12.29
50mg/kg	75.44± 9.73*
100mg/kg	83.76±14.64**
阳性对照	72.35±15.74

\*与衰老组比, P<0.05 \*\*与衰老组比, P<0.01

脑对于动物体而言其重要性不言而喻, 由于其含有丰富的不饱和脂肪酸, 且其耗氧量占整个机体耗氧量的40%, 因而脑特别容易受到自由基攻击而出现氧化损伤。由于有血脑屏障的存在, 很多外源性抗氧化剂不能进入脑, 所以脑自身的抗氧化能力强弱显得尤为重要。在本实验中, 复合抗氧化剂可以有效提高老年小鼠脑中的SOD活性, 降低脑中氧化产物MDA的含量, 表明可能对于预防老年性脑部疾病, 如老年痴呆症、帕金森氏症有一定作用。

随着衰老的发生, 机体各器官及组织不可避免的出现退行性变化, 表现为器官萎缩 (如胸腺萎缩), 体内各种代谢废物累积 (如脂褐素) 等。老年动物无疑是研究药物对衰老作用最好的模型。本实验以自然衰老小鼠为实验对象, 其实验结果可与正常小鼠实验组相互对照, 相互补充, 更能全面阐明复合抗氧化剂对小鼠的抗衰老作用。本实验中, 复合抗氧化剂可以显著提高衰老小鼠血清SOD活力和总抗氧化能力, 且降低血清中MDA含量; 同时复合抗氧化剂又能降低组织中MDA含量, 提高脑中SOD活力。表明复合抗氧化剂确有明显的延缓衰老作用。

#### 3.7 小鼠抗应激实验

表 29 复合抗氧化剂对实验小鼠游泳抗疲劳能力的影响

组别	死亡时间 (秒)	延长时间 (秒)	延长比率
空白对照	521±147	—	—
高剂量组	1257±374**	736	141.2%
中剂量组	981±259**	460	88.3%
低剂量组	788±287*	267	51.2%
阳性对照组	583±107	62	11.9%

\* 与空白对照组比,  $P<0.05$  \*\* 与空白对照组比,  $P<0.01$

结果表明, 复合抗氧化剂能显著提高小鼠游泳抗疲劳能力。其中高剂量组复合抗氧化剂组能较空白组游泳时间提高 736 秒, 延长比率为 141.2%; 中剂量组复合抗氧化剂组能较空白组游泳时间提高 460 秒, 延长比率为 88.3%; 低剂量组复合抗氧化剂组能较空白组游泳时间提高 267 秒, 延长比率为 51.2%。这显示了复合抗氧化剂能极大地提高实验小鼠的抗应激能力。

表 30 复合抗氧化剂对实验小鼠耐高温能力的影响

组别	死亡时间 (分钟)	延长时间 (分钟)	延长比率
空白对照	12.7±2.7	—	—
高剂量组	44.2±22.7**	31.5	248.0%
中剂量组	21.0±5.1**	8.3	65.4%
低剂量组	17.3±2.2**	4.6	36.2%
阳性对照组	16.8±3.2*	4.1	32.3%

\* 与空白对照组比,  $P<0.05$  \*\* 与空白对照组比,  $P<0.01$

结果表明, 复合抗氧化剂能显著提高小鼠耐高温能力。尤其是高剂量的复合抗氧化剂能延长实验小鼠耐高温时间 31.5 分钟, 延长比率为 248%; 中剂量的复合抗氧化剂能延长实验小鼠耐高温时间 8.3 分钟, 延长比率为 65.4%; 低剂量的复合抗氧化剂能延长实验小鼠耐高温时间 4.6 分钟, 延长比率为 36.2%。

抗应激能力实验目的在于考察实验动物的耐力、敏捷性、反应力等, 在一定程度上反映了实验动物的生活质量, 与单纯的寿命实验、抗老化指标互为补充, 二者结合能充分说明受试药物对动物衰老的影响。本实验中, 复合抗氧化剂能提高小鼠游泳时间和耐高温时间一倍以上, 表明复合抗氧化剂不但能显著提高受试动物的抗衰老能力, 而且能显著提高受试动物的生活质量。

### 3.8 抗癌实验

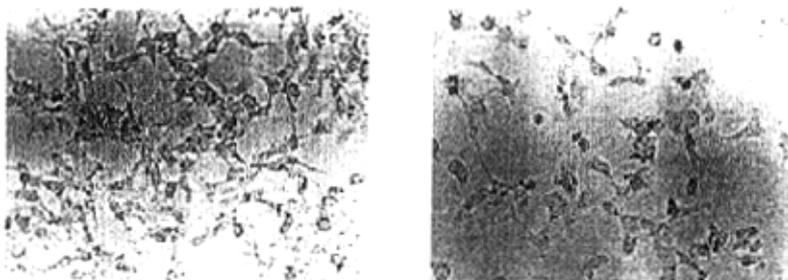


图 10 加入复合抗氧化剂前（左）后（右）的人胃腺癌细胞 BGC-823

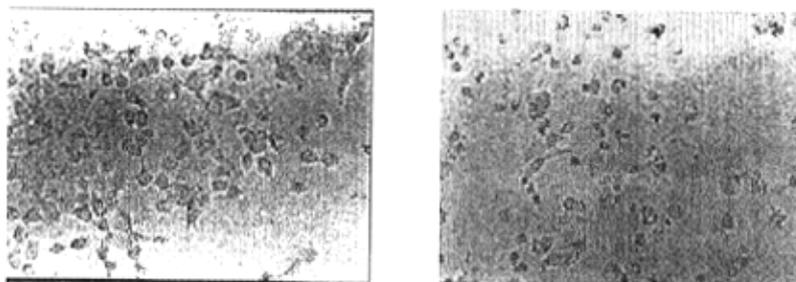


图 11 加入复合抗氧化剂前（左）后（右）的人肺癌细胞 95-D

细胞形态学观察表明，对照组细胞生长旺盛，贴壁生长良好。而给药组细胞生长明显受抑制，细胞变圆，部分细胞从培养瓶上脱落，已死亡。如上图 10、11 所示，加入复合抗氧化剂后培养的胃腺癌细胞和肺癌细胞都出现了不同程度的细胞数目减少，生长速度降低。初步表明复合抗氧化剂有一定的抗癌细胞生长的作用，但其作用机制仍有待于进一步的实验。

本研究中，我们选用了四种最常见的天然抗氧化剂，应用均匀设计方法，对其复方进行优化，得到一种有强抗氧化能力的抗氧化剂复方。所选用的四种抗氧化剂，按其极性可分为水溶性组分和脂溶性组分两组，其在体内的分布部位不同、作用靶点不同、作用机理也各不相同，可以综合清除机体内不同类型的自由基。且各组分都有各自独特的营养作用，更重要的是，四种抗氧化剂之间有着很强的协同作用，联合使用时能发挥比单独使用时更强的抗氧化效果。

我们通过自由基清除实验，证实复合抗氧化剂清除自由基的效果远远强于每种抗氧化剂单独使用时的效果，其抗氧化效果比单独使用时提高近 11 倍。急

毒实验表明复合抗氧化剂安全无毒，不会对机体产生毒害作用。随后我们分别以果蝇、正常小鼠和老年小鼠为实验模型，研究复合抗氧化剂对实验动物的抗氧化、抗衰老作用。之所以采用不同的实验动物模型，是因为可以更全面的考察受试药物对生物体的作用，同时结果也可以相互印证、相互补充。大量的生理活性实验，表明复合抗氧化剂有着很强的提高机体抗氧化能力、降低体内氧化代谢产物、提高实验动物免疫力、延长实验动物寿命、延缓衰老的作用。初步的细胞实验也表明复合抗氧化剂有一定的抗癌作用。以上实验表明，我们所优选的复合抗氧化剂是一项很有应用前景的产品。

## 结 论

本论文根据不同抗氧化剂之间具有协同增效作用,应用均匀设计方法将四种常见的天然抗氧化剂加以复合,优选出最佳配方,其中茶多酚:维生素 C:维生素 E:  $\beta$ -胡萝卜素的质量比为 4: 4: 1: 1。并就其生理活性进行了检验。

1. 首次将均匀设计方法应用于抗氧化剂协同作用研究。
2. 得到了一个由四种天然抗氧化剂组成的抗氧化剂复合物的最佳配方。
3. 自由基清除实验表明复方有很强的清除自由基能力,是四种抗氧化剂单独使用时抗氧化能力的 11 倍。
4. 急毒实验表明复方对动物体无毒性。
5. 果蝇实验表明复方能有效提高果蝇平均寿命,提高其飞翔能力和耐高温能力,并降低果蝇体内 MDA 和脂褐素含量。
6. 以正常小鼠为模型的实验表明,复方可以显著提高小鼠脾脏系数和胸腺系数;提高血清 SOD 活性、血清总抗氧化能力和血清中游离羟脯氨酸含量,降低血清 MDA 含量;同时可以提高组织中羟脯氨酸含量,降低组织 MDA 和脂褐素含量。
7. 以衰老小鼠为模型的实验表明,复方可以提高小鼠脾脏系数;提高小鼠血清 SOD 活性,降低血清 MDA 含量;降低肝、脑中 MDA 含量,提高脑中 SOD 活性。
8. 抗应激实验表明复方可以显著提高实验小鼠游泳及耐高温能力。
9. 抗癌实验初步表明复方有一定的抗癌效果。

## 致 谢

本论文是在导师翁新楚教授的悉心指导下完成的。导师高尚的作风、渊博的学识、严谨的科学精神、锲而不舍的钻研态度使我受益匪浅，两年多来言传身教使我不仅学会做事，更使我懂得做人的道理。衷心感谢翁老师对我的培养与关怀！

论文完成过程中得到了雍克岚教授、文铁桥教授、吴侯老师、于志国老师、李坤师兄、郭江宁师姐的指导，并得到同学李嘉焱、侯建平、王海雄、邱小勇、李海龙、俞蔚的帮助，同时也得到师妹陈如、李清华、焦丹华的协助，在此一并表示感谢！

感谢我的父母及兄长对我的理解与支持！

## 参考文献:

1. 方允中, 郑荣梁主编. 自由基生物学的理论与应用. 科学出版社. 2002
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press 1989
3. Fredovich I. Superoxide Dismutase. *Meth. Enzymol*, 58: 61~97, 1986
4. 陈瑗, 周玫主编. 自由基医学. 人民军医出版社, 1998
5. 李文杰. 生物体内自由基的利用. 见方允中、李文杰主编, 自由基与酶. 科学出版社. 1989
6. Suzuki Y.J., Forman H.J., Seanian A. Oxidants as stimulation of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 22: 269~285, 1997
7. Perron A.L., Sahlin M., Sjoberg. CysteinyI and substrate radical formation in active site mutant E441Q of Escherichia coli class 1 ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*, 273(47): 31016~31020, 1998
8. Liu D, Li L. Postaglandin F2 alpha rises in response to hydroxyl radical generated in liver. *Free Radic Biol Med*. 18: 571~576, 1995
9. Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 23: 783~792, 1997
10. Starke D.W., Chen Y.C., Bapna C.P., et al. Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 23: 373~384, 1997
11. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*. 11: 298~300, 1956
12. Kowaltowski A.J., Vercesi A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 26: 463~471, 1999
13. Knight J.A. The produce and theories of aging. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 25:1, 1995
14. Zhong H, Schmeisser A, Garlich C.D., et al. Angiotensin II -induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidase. *Cardiovasc Res*. 44: 215~222, 1999
15. Hibino M, Okumura K, Iwama Y, et al. Oxygen derived free radical induced vasoconstriction by thromboxane A2 in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc pharmacol*. 33: 605~610, 1999

16. Regitz Zagrosek V, Neu B.M., Holzeristeer J, et al. Molecular biology of angiotensin receptor and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med.* 74: 233~251, 1999
17. Masini E, Salvemini D, Nidisang JF, et al. Cardioprotective activity of endogenous and exogenous nitric oxide on ischemia reperfusion injury in isolated guinea pig heart. *Inflamm Res.* 48: 561~568, 1999
18. Kietzmann D, Kahl R, Muller M, et al. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Int Care Med.* 19: 78~81, 1993
19. Dehuijzen PN, Aben KK, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 154: 813~816, 1996
20. 张位星, 龚光甫. 吸入 NO 对体外循环术中肺缺血再灌注损伤的保护作用. *湖南医科大学学报.* 25(5): 483~486, 2000
21. Rokutan K, Teshima S, Nikawa T, et al. Regulation of superoxide anion production by gastric surface epithelial cells in culture. *Gastroenterology.* 114: 11082, 1998
22. Vaquero E., Molero X, Tian X, et al. Peroxynitrite mediated tissue damage in necro-haemorrhagic but not edematous pancreatitis. *Gastroenterology.* 114: 2063, 1998
23. Farinati F, Cardin R, Demaria N, et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol.* 22: 449~456, 1995
24. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 262: 689~695, 1993
25. Markesbry WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23: 134~147, 1997
26. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 32: 804~812, 1992
27. Mikhaevitch O.D., Mikhaevitch I.S. and Gorodzanskaya E.G. Antioxidant defence in tissues of patients with lung, stomach and renal cancer. *J.Exp.Clin.Cancer Res.*

- 14(2): 247~253, 1995
28. Hofmann MA, Schickofer S, Isermann B et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B. *Diabetologia*. 42: 222~232, 1999
29. Kroncke KD, Fehsel K, Kold BV. Inducible nitric oxide synthase in human disease. *Clin Exp Immunol*. 113: 147~156, 1998
30. 赵保路, 氧自由基和天然抗氧化剂. 科学出版社. 1999
31. Fritz Bohm, Ruth Edge, Edward J. Land, et al. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. *J.Am.Chem.Soc*. 119: 621~622, 1997
32. Jia A.S., Zhou B., Yang L., et al. Antioxidant synergism of tea polyphenols and  $\alpha$ -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *J.Chem.Soc*. 2: 911~915, 1998
33. Laura Unten, Mamoru Koketsu, Mujo Kim. Antioxidant activity of green tea polyphenols on  $\beta$ -carotene. *J.Agric.Food.Chem*. 45: 2009~2012, 1997
34. Iris F. F. Benzie and Y. T. Szeto. Total antioxidant capacity of teas by ferric reducing / antioxidant power assay. *J.Agric.Food.Chem*. 47: 633~636, 1999
35. Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*. 387:561. 1997
36. M.Lodovici, C.Casalini, C.De Filippo, et al. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage in rat colon mucosa by black tea complex polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*. 38: 1085~1088, 2000
37. Giovanna Caderni, Carlotta De Filippo, Cristina Luceri, et al. Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F334 rats. *Carcinogenesis*. 21(11): 1965~1969, 2000
38. Chung F.L., Wang M., Rivenson A., et al. Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in Dishcher rats treated with a tobacco-specific carcinogen: caffeine as an important constituent. *Cancer Res*. 58: 4096~4101, 1998
39. Han C. and Xu Y. The effect of Chinese tea on the occurrence of esophageal tumor induced by N-nitrosomethylbenzylamine in rats. *Biomed.Environ.Sci*. 3: 35~42,

1990

40. Hibasami H., Komiya T., Achiwa Y., et al. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol.Rep.* 5: 527~529, 1998
41. Wang Z.Y., Agarwal R., Bickers D.R., et al. Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 12: 1527~1530, 1991
42. Liao S, Umekita Y, Guo J, et al. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett.* 96: 239~243, 1995
43. Chen Z.P., Schell J.B., Ho C.T., and Chen K.Y. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer. Lett.* 129: 173~179, 1998
44. Jen-Kun Lin and Yu-Chin Liang. Cancer chemoprevention by tea polyphenols. *Proc.Natl.Sci. Counc.* 24(1): 1~13, 2000
45. Ivor E. Dreosti, Michael J. Wargovich, and C.S. Yang. Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 37(8): 761~770, 1997
46. Zhenhua D., Yuan C., Mei Z., et al. Inhibitory effect of China green tea polyphenols on the oxidative modification of low-density lipoprotein by macrophages. *Med. Sci. Res.* 19:767~768, 1991
47. 朱向明, 赵振东. 茶叶提取物茶多酚防治动脉粥样硬化的研究进展. *临床荟萃* 11 (9): 416~418, 1996
48. Sagesaka Mitane Y, Miwa M, Okada S. Platelet aggregation inhibitors in hot extracts of green tea. *Chem Pharm Bull.* 38(3): 790~793, 1990
49. 杨贤强. 茶多酚防衰延寿的研究. *自由基生命科学进展 (第一集)*. 205~208, 1993
50. 董金甫 李瑶卿. 茶多酚 (TPP) 对 8 种致病菌最低抑制浓度的研究. *食品科学* 16(1): 6~12, 1995
51. Moncada S., R.M.J.Palmer, and D.A.Higgs. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43: 109~142, 1992

52. Liu R.H., and J.H.Hatchkiss. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat.Res.* 339: 73~89, 1995
53. Nguyen T., D. Brunson, C.L.Cresp, et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 89:3030~3034, 1991
54. Yu-Li Lin and Jen-Kun Lin. (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$  B. *Molecular Pharmacology.* 52: 465~472, 1997
55. Jos B.G.Paquay, Guido R.M.M.Haenen, Gerard Stender, et al. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J.Agric.Food.Chem.* 48: 5768~5772, 2000
56. Yoko Kobayashi, Miho Suzaki, Hideo Satsu, et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J.Agric.Food.Chem.* 48: 5618~5623, 2000
57. Hiroyoshi Hara, Naomi Orita, Sigru Hatano, et al. Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *J.Vet.Med.Sci.* 57(1): 45~49, 1995
58. 候祥川. 临床营养学. 上海科技出版社. 129~132, 1989
59. Henquin N, Havivi E, Reshef A, et al. Nutritional monitoring and counselling for cancer patients during chemotherapy. *Oncology.* 46(3): 173~177, 1989
60. Taper HS, Keyeux A, Roberfroid M. Potentiation of radiotherapy by nontoxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor. *Anticancer Res.* 16(1): 499~503, 1996
61. Kurbacher CM, Wagner U, Kolster B, et al. Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Letters.* 103(2): 183~119, 1996
62. Venugopal M, Jamison JM, Gilloteaux J, et al. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K3 on human urologic tumor cell lines. *Life Sci.* 59(17): 1389~1400, 1996
63. 周德勤. 维生素 C 对豚鼠血清、肝中胆固醇含量及动脉壁组织形态影响的初步观察. *营养学报.* 4: 99~104, 1992
64. Hemil H. Does vitamin C alleviate the symptoms of the common cold? A review of current evidence. *Scand J Infect Dis.* 26:1~6, 1994

65. Hinz B, Schroder H. Vitamin C attenuates nitrate tolerance independently of its antioxidant effect. *FEBS Lett.* 428(1-2): 97-99, 1998
66. 葛毅强. 维生素 E 的生理保健功能. *营养与保健* 4: 43~44, 2000
67. 高宁, 杨家驹.  $V_E$  对小鼠胸膜及脾脏 T 淋巴细胞转化及  $M\phi$  诱导 IL-1 的影响. *解放军预防医学杂志* 12(2): 94, 1994
68. 钱亦华. 维生素 E 抑制痴呆模型大鼠海马结构淀粉样前体蛋白表达的实验研究. *中国老年医学杂志* 19(4): 234, 1999
69. 毛晓明, 王洪济. 维生素 E 对糖尿病大鼠肾脏的保护作用. *中华肾脏病杂志* 14(4): 256, 1998
70. 薛敏波.  $\beta$ -胡萝卜素的应用进展. *国外医学: 妇幼保健分册* 7(3): 113~116, 1996
71. 刘会臣, 吴德政.  $\beta$ -胡萝卜素对肿瘤的防治作用. *中国药学杂志* 27(11): 643~645, 1992
72. Burton GW, Ingold KU.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224: 569~573, 1984
73. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 28 (1): 25~30, 1995
74. 陈奇. 中药药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2000
75. Sohal R S, Donato H. Effect of experimental prolongation of lifespan on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly. *J Geront*, 34: 489~496, 1979
76. 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 (第三版). 人民卫生出版社, 2002
77. 方开泰. 均匀设计与均匀设计表. 科学出版社, 1994
78. Zhu-Qiu Jin and Xiu Chen. A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 39: 63~70, 1998
79. Thidffy Fargere, Mohamed Abdennadher, Michel Delmas, et al. Determination of peroxides and hydroperoxides with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) application to ozonized ethylene vinyl acetate copolymers (EVA). *Eur. Polym. J.* 31(5): 489~497, 1995

80. V. Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss Technol.* 30: 609~615, 1997

上海大学

本论文经答辩委员会全体委员审查，确认符合上海大学硕士学位质量要求。

答辩委员会签名：

主任：王峰涛

委员：程裕良 王明

张元

孙卫

导师：翁新楚 教授

答辩日期：