

螺旋藻 (*Spirulina*) 对慢性肝损伤小鼠肝组织 抗氧化能力的影响*

丁晶晶¹ 金安娜² 施丽丽³ 霍天瑶³ 黄 成^{3**}

(1: 南京大学医学院, 南京 210093; 2: 江苏省职工医科大学 210029; 3: 南京大学生命科学学院, 南京 210093)

提 要 用四氯化碳导致小鼠肝损伤, 各组每日灌胃不同剂量螺旋藻, 检测了饲养 45d 的小鼠血清的 ALT 活力、肝组织的 SOD 活力和 MDA 含量, 分别建立 ALT、SOD 活力以及 MDA 含量随剂量 (C) 变化的函数, 求出各项临界参数值, 并对参数的生物学意义进行解释, 以观察螺旋藻对肝损伤小鼠肝组织中 SOD 活力和 MDA 的影响。实验结果显示: 螺旋藻能提高小鼠 SOD 的活力并降低其 MDA 含量, 进一步验证了螺旋藻可提高肝损伤小鼠肝组织的抗氧化能力, 分析结果还显示螺旋藻对肝组织抗氧化能力的提高既具有一定的量效累积性, 也存在量效局限性。

关键词 螺旋藻 慢性肝损伤 ALT SOD MDA

分类号 Q949.212

螺旋藻 (*Spirulina*) 是生长于碱性盐湖中的单细胞或多细胞组成的丝状藻类, 早在数百年前发现于非洲乍得盐湖, 当地的居民一直将其当作食物和能源加以利用。螺旋藻富含蛋白质, 且所含丰富的赖氨酸、苏氨酸和含硫氨基酸等是谷物蛋白所缺少的。螺旋藻尤其富含 γ -亚麻酸和 β -胡萝卜素。从上世纪 70 年代末开始, 螺旋藻作为一种保健食品, 在日本、中国台湾、美国、德国、法国等备受欢迎。螺旋藻在我国西部盐湖水体中添补少量的限制性营养元素也可大量生长, 有可能成为西部盐湖养殖业的重要发展对象。本文因“盐湖资源开发利用”研究之需要, 选择了螺旋藻作为试验材料, 旨在为盐湖产业发展积累相关的成果资料。

近年来, 已有研究发现螺旋藻具有保肝、降血脂、抗应激等药效功能^[1-5], 特别是其保肝功能研究受到重视, 并已被制成保健品投放市场。但是, 目前螺旋藻产品品牌较多, 藻粉含量不一, 服用剂量也不统一, 各个产品说明书的剂量划定也没有明确的依据。以往对于螺旋藻保健品效价的分析, 很少进行梯度定量分析。仅仅有杨翔等人曾针对高血脂疾病, 采用多剂量饲喂高脂症模型动物, 建立了量效关系及求解各项临界参数^[2]。本实验拟采用多梯度剂量灌胃肝损伤模型动物, 选取谷丙转氨酶 (ALT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 作为指标, 并建立 ALT 活力 (A)、SOD 活力 (S)、MDA 含量随剂量 (C) 变化的函数, 以求从理论上找到服用螺旋藻的最佳剂量及最大极限剂量, 为螺旋藻产品统一质量标准提供依据。

* 江苏省职工医科大学和南京大学合作科研项目资助。

2003-09-08 收稿; 2004-04-12 收修改稿。丁晶晶, 女, 1982 年生, 硕士研究生, E-mail: dingflower@sina.com。

** 通讯作者。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与实验场所

雄性昆明种小白鼠, 体重 $22 \pm 2\text{g}$, 由南京安立默实验动物繁殖调剂中心提供(许可证号 SYXK2002-0059), 小鼠饲养于南京大学药业集团实验动物房(许可证号: SCXK 2002-0016)。

1.2 藻粉

实验所用藻粉为极大螺旋藻(*Spirulina maxima*), 由江苏东方农业生物化学公司出品, 卫食健字(97)第 443 号真空包装, 4°C 避光保存。实验时将螺旋藻粉临时配成混悬液。

1.3 药品与仪器

四氯化碳, 分析纯, 江苏洪声化工厂出品, 批号 961124; 橄榄油(化学纯, 上海化学试剂采购供应站分装厂, 国产分装, 批号 910518)用时配成 40% 的溶液。ALT 试剂盒由上海科欣生物技术研究所提供, SOD、MDA 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。其它试剂均为国产, 规格为分析纯产品; SIGMA 冷冻离心机; HH-W21-600S 型恒温水浴箱, 上海跃进医疗仪器厂产品; U-3000 型紫外-可见分光光度计, 日立公司产品。

1.4 实验方法

取雄性小白鼠 88 只, 随机分成 11 组, 每组 8 只, 即: 空白组、模型组、螺旋藻组(100, 200, ..., 900mg/kg 共 9 个剂量组)。模型组、螺旋藻组的动物皮下注射 40% CCl_4 的橄榄油溶液 10mL/kg, 每周 2 次, 建立小鼠慢性肝损伤模型, 空白组注射生理盐水; 各剂量组每日灌胃螺旋藻, 模型组和空白组每日灌胃生理盐水。在给药后第 45d, 摘除眼球进行眼眶取血, 自然凝血后离心取上层血清测定 ALT 活力; 断颈处死并迅速取出肝组织, 用冰冷的 PBS ($\text{pH} = 7.4$) 缓冲液制备 1% 和 10% 肝匀浆, 1% 离心取上清液进行 SOD 活力测定, 10% 肝匀浆取上清液进行 MDA 含量测定。按试剂盒说明书完成各项测定步骤。

1.5 分析方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm S_{n-1}$ 表示, 用 Origin7.0 软件对各剂量组各个指标的数据先作图象分析, 确认 ALT-C、SOD-C、MDA-C 的走向后再用最小二乘法进行拟合, 并做统计检验, 然后用数学分析手段求解函数的各项临界参数。

2 结果

2.1 血清 ALT 活力、肝组织 SOD 活力及 MDA 含量

灌胃螺旋藻 45d 后, 检测给药组、空白组及模型组的肝组织 ALT 活力、SOD 活力及 MDA 含量, 各统计量列于表 1。

2.2 螺旋藻剂量对小鼠血清 ALT 活力的影响规律

ALT 活力的变化在一定程度上反映了小鼠的肝损伤程度。从表 1 中可以看到, ALT 的活力随螺旋藻剂量的增加而逐渐下降, 而且下降速率在不断减缓。观察其图像走势, ALT(A)与剂量(C)的函数为双曲线, 曲线见图 1。ALT 随剂量(C)的函数表达式为:

$$CA - 113.0C - 106.4A + 7451.7 = 0 \quad (1)$$

相关系数 $r = 0.9977$ 。经检验拟合得到的曲线相关性极显著。

表 1 小鼠血清 ALT 活力(U/L)、肝组织 SOD 活力(NU/mg(pro))及 MDA 含量(nmol/mg(pro))
Tab. 1 ALT activity(U/L) in Serum, SOD activity(NU/mg(pro)) and MDA content(nmol/mg(pro)) in liver

组别	剂量 C(mg/kg)	n	ALT	SOD	MDA
空白	0.00	8	26.02 ± 1.99**	318.97 ± 12.65**	2.064 ± 0.267**
模型	0.00	8	184.05 ± 5.25	210.05 ± 13.23	4.615 ± 0.587
组 1	100	8	183.77 ± 3.24	213.59 ± 15.01	4.622 ± 0.302
组 2	200	8	171.34 ± 7.71	222.54 ± 14.22	3.525 ± 0.558
组 3	300	8	142.36 ± 6.54	238.88 ± 16.69	2.905 ± 0.571
组 4	400	8	130.30 ± 8.97	256.48 ± 18.07	2.723 ± 0.269
组 5	500	8	126.89 ± 5.36	286.12 ± 10.33	2.655 ± 0.395
组 6	600	8	124.02 ± 4.98	291.01 ± 11.52	2.635 ± 0.204
组 7	700	8	121.69 ± 4.20	301.98 ± 13.67	2.606 ± 0.327
组 8	800	8	120.58 ± 2.56	302.25 ± 18.55	2.535 ± 0.232
组 9	900	8	121.13 ± 4.01	302.04 ± 16.88	2.507 ± 0.564

求解两条渐进线为： $C_0 = \lim_{A \rightarrow \infty} C = 106.4\text{mg/kg}$; $A_m = \lim_{C \rightarrow \infty} A = 113.0\text{U/L}$

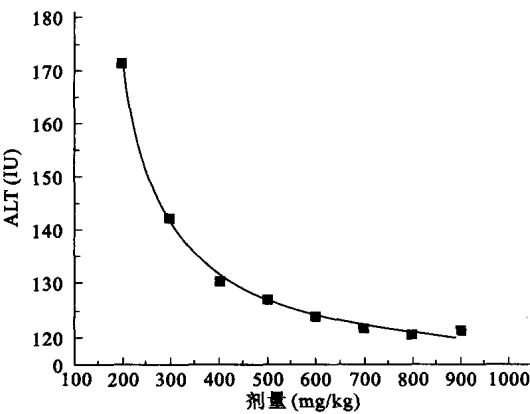


图 1 ALT 活力随螺旋藻剂量变化拟合曲线
Fig. 1 Curve of ALT activity with dosage (C)

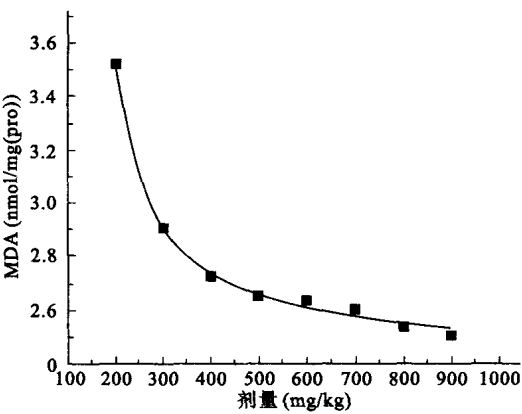


图 2 MDA 含量随螺旋藻剂量变化拟合曲线
Fig. 2 Curve of MDA content with dosage (C)

2.3 螺旋藻剂量对小鼠肝组织 MDA 含量的影响规律

从表 1 中可以看到，MDA 含量亦随螺旋藻剂量的增加而逐渐下降，且下降速率在不断减缓。同样，MDA 与剂量 C 的图像走势亦为双曲线。在曲线拟合过程中，发现模型组和第 1 组的数据点离其它数据点的趋势线较远，因此在曲线拟合中未包括模型组和第 1 组的数据。利用第 2-9 组的数据拟合出 MDA 含量随剂量(C)的函数表达式为：

$$CM - 2.4 C - 121.3 A + 204.6 = 0 \tag{2}$$

曲线的相关系数 $r = 0.9959$ 。经检验，拟合得到的曲线相关性极显著。

求解两条渐进线为： $C_0 = \lim_{A \rightarrow \infty} C = 121.3\text{mg/kg}$; $M_m = \lim_{C \rightarrow \infty} A = 2.4\text{nmol/mg(pro)}$

2.4 螺旋藻剂量对小鼠肝 SOD 活力的影响规律

由表 1 可得,随着螺旋藻剂量的增加,SOD 活力也逐渐增加,其增加趋势呈明显的 S 形,同样在曲线拟合过程中,模型组和第 1 组的数据点同样远离其它数据的趋势线,故利用第 2-9 组数据减去模型组数据,得到各组的相对增加值, SOD 活力相对增加值与剂量 C 的数学关系呈逻辑斯谛曲线(图 3).

$S-C$ 的逻辑斯谛方程为 $S = S_m / (1 + \exp(-k(C - C_m)))$, 经 Oringin7.0 软件对各剂量组 SOD 最小二乘法拟合,得到 Logistics 方程各项参数如下:

$S_m = 93.29\text{NU/mg(pro)}$, $k = 0.0105$, $C_m = 385.23\text{mg/kg}$, 即 Logistics 方程为 $S = 93.29 / (1 + \exp(-0.0105(C - 385.23)))$, 经相关性检验, $r = 0.9948$, 所拟合曲线方程相关性达到极显著水平.

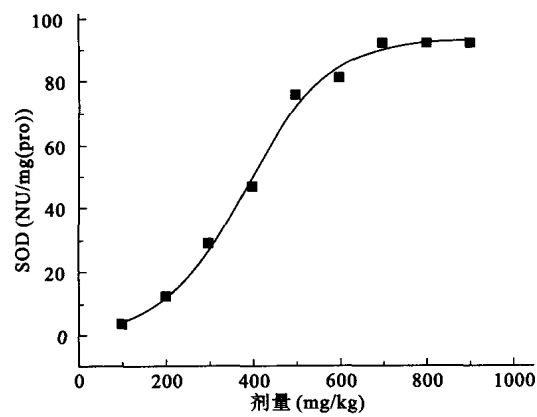


图 3 SOD 活力相对增加值相与螺旋藻剂量的拟合曲线
Fig. 3 Curve of relative SOD added value and dosage(C)

3 讨论

3.1 四氯化碳导致慢性肝损伤效果

本实验采用皮下注射四氯化碳的方法建立小鼠慢性肝损伤模型^[6],四氯化碳在肝脏中被微粒体酶代谢成 $\text{CCl}_3 \cdot$, $\text{CCl}_3 \cdot$ 能与 O_2 结合产生氧化性更强的 $\text{CCl}_3 \cdot \text{O}_2$ 自由基,与肝细胞上的不饱和脂质共价结合,发生脂质过氧化反应,使肝细胞受损甚至死亡. 实验过程中也观察到模型组的小鼠毛色枯黄,烦躁不安,体重减轻,与空白组有显著差别,从 ALT 活力的变化也可以看出,模型组的 ALT 活

力极显著地高于空白组,这与文献中的报道相一致^[7].

3.2 ALT、MDA、SOD 随剂量变化的函数参数生物学意义解释

将方程(1)ALT(A)与剂量(C)与方程(2)MDA(M)与剂量(C)的函数一般式分别写成 $(C - C_0)(A - A_m) = K_1$ 与 $(C - C_0)(A - A_m) = K_2$ 的标准式即 $(C - 106.4)(A - 113.0) = 4571.5$ 和 $(C - 121.3)(M - 2.4) = 86.5$. 其中 K_1 为 $A-C$ 量效累积常数,其生物学意义为降低一定数值 ALT 所需的有效剂量积累值; C_0 为(1)式中产生降低 ALT 作用所需的最低有效剂量; A_m 为服用螺旋藻对 ALT 活力下降作用的理论极限值.

同理,方程(2)的 K_2 为降低一定数值 MDA 所需的有效剂量累积常数; C_0 为产生降低 MDA 作用所需的最低有效剂量; M_m 为服用螺旋藻对减少 MDA 含量的理论极限值. 即在造模 45d 时,当 $C > 106.4\text{mg/kg}$ 时,螺旋藻方可具有降低 ALT 的作用;当 $C > 121.3\text{mg/kg}$ 时,螺旋藻方能发挥减少 MDA 的作用.

同样的方法将方程(3)作数学解析得到 SOD 活力净增值与剂量 C 的逻辑斯谛函数各项参数生物学意义如下: $S_m = \lim_{C \rightarrow \infty} S = 93.29 \text{ nmol/mg(pro)}$

为 SOD 活力所能达到的相对增加极限值.

曲线的拐点为 $C_m(ds/dc = 0 \text{ 的数学解})$, 拐点的 SOD 活力数值 $= S_m/2$.

3.3 三项生化指标的意义和变化规律

当肝细胞变性、坏死, 细胞膜通透性升高时, 谷丙转氨酶从肝细胞中流入血液中, 使得血清中 ALT 活力升高. 故 ALT 活力的提高可反映肝脏的程度, 是检查肝功能受到损害的一项灵敏的生化指标. 从图 1 中和方程 (1) 数学解析可得, 螺旋藻可以降低小鼠血清中 ALT 活力, 但 ALT 不能随螺旋藻剂量的增加而无限的降低, 而是趋于极限值 113.0U/L.

MDA 是一种细胞脂质过氧化产物, 当生物的年龄增加到一定程度时, 生物体的抗氧化能力下降, 包括 MDA 在内的过氧化产物不断积累. 因此 MDA 含量升高也是机体抗氧化能力下降的表现之一. 从图 2 和方程 (2) 数学解析中可得, 螺旋藻可以降低小鼠肝组织 MDA 含量, 但 MDA 的减少也具有极限值 $M_m = 2.43\text{nmol/mg(pro)}$.

SOD 是生物机体抗氧化系统中的关键酶, 能特异性地清除体内的超氧阴离子自由基 ($\cdot O_2^-$). 抗氧化酶的活力逐渐下降, 表明机体的抗氧化能力下降. 在本实验中, SOD 活力随着螺旋藻剂量的逐渐增加而增加, 显示螺旋藻具有提高小鼠肝组织 SOD 活力的作用, 且具有良好的量效关系. 当剂量 C 达到曲线拐点 $C_m = 385.23\text{mg/kg}$ 时, SOD 的上升速率最大, 而后 SOD 上升速率减慢, 直至上升速率趋于零, 这时 SOD 的增加量趋向极限值 $S_m = 93.29\text{NU/mg(pro)}$.

3.4 螺旋藻提高小鼠肝部的抗氧化能力的机理

螺旋藻富含不饱和脂肪酸, 氨基酸含量丰富且组成平衡合理. 已有研究发现, 用螺旋藻能明显改善肝硬化大鼠的血浆氨基酸谱^[7]. 多不饱和脂肪酸还可在生物体内有抗氧化作用, 在一定程度上防止细胞膜氧化, 降低 MDA 等脂质过氧化物的产生. 本文实验结果不仅验证了螺旋藻可以提高小鼠肝组织的抗氧化能力, 减轻四氯化碳对小鼠肝组织的损伤^[8, 9], 而且从不同剂量螺旋藻对小鼠抗氧化能力的正负两方面效应进行了探讨. 主要研究了螺旋藻对 ALT、SOD、MDA 的量效关系, 通过数学模型分析, 得出了较为明确的量效关系. 研究结果表明, 三个指标的临界极限值均不能达到正常水平, 说明在 45d 的服用时间内, 螺旋藻不能完全拮抗四氯化碳对肝组织的损害, 只能在一定程度上起到减缓、减轻肝损害的程度, 也就是说, 螺旋藻尚不能作为根治肝损伤的药物, 而只能作为保肝的保健品. 此外, 笔者只作了量效分析, 而自由基对肝的损伤是一个缓慢的过程, 因此还有必要对螺旋藻的保肝作用作进一步的时效分析.

参 考 文 献

- 1 孙东祥, 江艳秋, 黄诚. 健血宝对昆明小鼠抗疲劳耐缺氧的研究. 南京师范大学学报(自然科学版), 1997, 20(zology Issue): 3-12
- 2 杨 翔, 何舒宁, 曾令珂等. 螺旋藻对降低高血脂大鼠血清甘油三酯浓度的量效分析. 南京大学学报(自然科学版), 2002, 38(2): 180-186
- 3 Alan J A. Model for microalgae as human food, algae and human affairs. London: Cambridge University Press, 1988: 149-179
- 4 李定梅. 螺旋藻——全球人类最理想的食物. 北京: 中国农业科技出版社, 1995: 49-53
- 5 Gorban E M, Orynychak M A, Virstiuk N G. Clinical and experimental study of *spirulina* efficacy in chronic diffuse liver

- diseases. *Lik Sprava*, 2000, (6): 89 – 93.
- 6 陈 琦. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 624 – 625
- 7 黄键琴, 黄 诚. 绿太阳螺旋藻粉剂肝硬化动物的保健作用. 南京师范大学学报(自然科学版), 1998, 22(zoology Issue): 88 – 91.
- 8 Torres-Duran P V, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal M C. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride in the rat. *J Ethnopharmacol*, 1999, 64(2): 141 – 147
- 9 Upasani C D, Balaraman R. Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. *Phytother Res*, 2003, 17(4): 330 – 334

Effect of *Spirulina* on Antioxdation Ability of Liver during CCl₄ Induced Chronic Liver Injury in Mice

DING Jingjing¹, JIN Anna², SHI Lili³, HUO Tianyao³ & HUANG Cheng²

(1: College of Medicine, Nanjing Univeristy, Nanjing 210093, P. R. China; 2: Jiangsu Employee Medical College, Nanjing 210017, P. R. China; 3: College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

Abstract

In this experiment, CCl₄ was used to induce liver injury in mice. Different dosages of *Spirulina* are given in each group respectively for 45d. ALT activity in serum, SOD activity and MDA content in the mice's brain were assayed, the functions between the dosage of *Spirulina* (C) and ALT, SOD, MDA values were formed with statistical methods. Relative critical values were calculated according to these functions and their biological meanings were explained. The results show that *Spirulina* can reduce ALT activity, improve SOD activity and reduce MDA content, and when the dosage of *Spirulina* overruns a certain value, the antioxidant ability of *Spirulina* is reduced. The specific parameters are as follows, the minimum effectual dosage to decrease ALT is 106. 4mg/kg; and that of MDA is 121. 3mg/kg, the maximum dosage to increase SOD is 385. 3mg/kg. It proves that *Spirulina* can enhance the antioxidant ability of liver in mice and alleviate liver injury caused by CCl₄.

Keywords: *Spirulina*; chronic liver injury; ALT; SOD; MDA