

# t9, t11 - CLA 抗大鼠氧化应激损伤的机理研究

钟先锋<sup>1</sup>, 黄建锋<sup>1</sup>, 张继如<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 黄桂东<sup>2</sup>, 华东<sup>1</sup>

(1. 江南大学附属医院, 江苏无锡 214062; 2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:**以大鼠为研究对象, 以大鼠血清和肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量为指标, 研究 t9, t11 - CLA 的体内抗氧化作用效果。结果表明, 喂养4周后, t9, t11 - CLA 添加组中的中剂量组、高剂量组大鼠血清和肝组织中的 SOD 和 GSH - Px 活性明显高于正常组( $P < 0.05$ ), MDA 含量的变化则与之相反, 说明 t9, t11 - CLA 对大鼠氧化应激损伤有较好的保护作用, 且产生这种保护作用的原因一方面是激活了机体抗氧化酶类, 另一方面与 t9, t11 - CLA 的抗氧化能力有关。

**关键词:** t9, t11 - CLA; 抗氧化活性; 超氧化物歧化酶(SOD); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px); 丙二醛(MDA)

中图分类号: R 151 文献标识码: A 文章编号: 1007 - 7561(2015)03 - 0050 - 03

## Mechanisms of t9, t11 - CLA against oxidative stress injury in rats

ZHONG Xian - feng<sup>1</sup>, HUANG Jian - feng<sup>1</sup>, ZHANG Ji - ru<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, HUANG Gui - dong<sup>2</sup>, HUA Dong<sup>1</sup>

(1. Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi Jiangsu 214062;

2. College of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi Jiangsu 214122)

**Abstract:** The antioxidant effect of t9, t11 - CLA was investigated based on the indicators of the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH - Px) and the content of malondialdehyde (MDA) in rats serum and liver tissue. The results showed that after feeding for 4 weeks, the activities of SOD and GSH - Px in the serum and liver tissues of middle and high dose group were distinctly higher than that of control group ( $P < 0.05$ ), while the change of the content of MDA was opposite, which indicated that t9, t11 - CLA had good protective effect on oxidative stress injury in rats and this protective effect came from their own antioxidant capacity as well as the activated antioxidant enzymes of the body.

**Key words:** t9, t11 - CLA; antioxidant activity; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; malondialdehyde

共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是人类近年来发现的最重要的一种功能性脂肪酸, 已被广泛应用于食品和药品当中<sup>[1]</sup>。许多研究表明, CLA 具有多种生理功能, 如抗癌<sup>[2-3]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[4]</sup>、降低身体脂肪含量<sup>[5-6]</sup>等。但关于 CLA 生物活性的具体机理至今仍无定论。有研究者认为 CLA 的抗氧化性能可能是导致 CLA 产生抗癌活性或抗动脉粥样硬化活性的原因之一<sup>[7-8]</sup>, 但由于实验体系、测定方法、CLA 存在形式及其浓度、有无溶剂以及溶剂种类的差异, 致使至今对于 CLA 氧化稳定性和是否属于抗氧化剂的观点仍然存在较大分歧<sup>[9]</sup>。

反式脂肪酸 (Trans fatty acids, TFAs) 是指含一个以上独立的 (即非共轭) “反式” 构型双键的不饱和脂肪酸<sup>[10]</sup>。近年来, 大量研究结果表明, 摄入过多的 TFAs 对人体健康有危害。一些发达国家已先后对食品中 TFAs 的含量做出限制<sup>[11]</sup>。但是也有报道证实部分反式脂肪酸异构体具有抗癌活性<sup>[12]</sup>, 并与体内抗氧化酶体系激活有关。当细胞受到内外环境的刺激后, 活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 产生增多, 从而破坏了机体氧化与抗氧化系统之间的平衡, 最终导致氧化应激, 蛋白质和 DNA 也是 ROS 的攻击靶标, ROS 能够造成蛋白质结构突变或丧失生物活性、DNA 链断裂、DNA 位点突变、DNA 双链畸变和原癌基因与肿瘤抑制基因突变, 最终导致机体产生氧化损伤<sup>[13]</sup>。

收稿日期: 2014 - 09 - 09

基金项目: 无锡市卫生局科研项目计划资助 (Q201307)

作者简介: 钟先锋, 1981 年出生, 男, 副研究员。

通讯作者: 华东, 男, 博士, 教授。

我们前期的体外细胞实验研究结果表明,  $t9, t11 - CLA$  抑制了人结肠癌细胞 Caco-2 增殖<sup>[14-15]</sup>, 并具有保护血管内皮细胞防止其氧化损伤的作用, 这些结果是否与  $t9, t11 - CLA$  的抗氧化作用有关, 需要进一步证实。因此, 本研究拟以大鼠为研究对象, 探讨  $t9, t11 - CLA$  的抗氧化性能, 以期为  $t9, t11 - CLA$  有益健康的推测提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

$t9, t11 - CLA$ , 实验室自制, 即采用乳酸菌生物转化合成  $t9, t11 - CLA$ , 具体实验步骤参照刘晓华博士论文<sup>[16]</sup>; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒购自南京建成生物试剂公司。

### 1.2 实验动物、分组和实验方法

Wistar 大鼠 (100 只) 购自江南大学实验动物中心, 雌雄各半, 体重 125 ~ 150 g。所有大鼠随机分为正常对照组: 饲喂基础饲料 + 特丁基对苯二酚 (TBHQ, 8 mg/kg bw); CLA 添加组: 低剂量组 ( $t9, t11 - CLA$  5 mg/kg bw + TBHQ 8 mg/kg bw)、中剂量组 ( $t9, t11 - CLA$  25 mg/kg bw + TBHQ 8 mg/kg bw) 和高剂量组 ( $t9, t11 - CLA$  50 mg/kg bw + TBHQ 8 mg/kg bw), 每组 20 只, Wistar 大鼠自由采食和饮水, 按常规饲养管理进行。连续喂养 4 周。大鼠于末次给药后, 停药禁食 12 h, 摘眼球采全血, 分离血清, 大鼠引颈处死取肝, 测定血液和肝组织中相关指标。

### 1.3 $t9, t11 - CLA$ 对大鼠体内脂质过氧化程度的影响

本实验通过硫代巴比妥酸反应物 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TEARS) 测定试剂盒测量脂质过氧化程度。分离的组织称重再加入 0.1 mol/L 磷酸钠, 匀浆后按试剂盒说明书操作, 利用酶标仪测定上清液在波长 532 nm 处的吸光值。

### 1.4 $t9, t11 - CLA$ 对大鼠体内氧化相关酶类的影响

SOD 活性的测定方法为黄嘌呤氧化酶法; GSH-Px 活性用催化 GSH 氧化的反应速度及单位时间内 GSH 减少的量来表示; 样品提取同 1.3, 按照试剂盒说明书测定 SOD 和 GSH-Px 活性的变化。

### 1.5 检测 $t9, t11 - CLA$ 对大鼠血清中甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇的影响

实验分组和采样方法见 1.2, 使用 BS-190 全自动生化分析仪测定大鼠血清中甘油三酯 (Triglyceride, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 的含量。

### 1.6 数据处理

实验数据采用 SPSS 18.0 的 One Way Anova 进

行统计学分析, 结果均以  $\bar{X} \pm SD$  表示,  $P < 0.05$  表明差异具有显著性,  $P < 0.01$  表明差异具有高度显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 $t9, t11 - CLA$ 对大鼠血清中抗氧化分子含量和活性的影响

SOD、GSH-Px 是机体免受氧自由基损害的主要防御酶, 其含量及活性能反映机体氧自由基存在的水平及脂质过氧化反应程度<sup>[17]</sup>。MDA 是细胞膜脂过氧化最重要的一种产物, 它的产生还能加剧膜的损伤, 因此可通过 MDA 了解膜脂过氧化程度。

由表 1 可知, 与正常对照组相比, 添加 CLA 实验组大鼠血清 MDA 水平随 CLA 添加量的增加而下降, 趋势明显, 而 SOD 和 GSH-Px 的活性随着 CLA 添加量的增加而明显升高, 呈剂量依赖关系 ( $P < 0.05$ ), 说明  $t9, t11 - CLA$  能够提高机体抗氧化能力, 且高剂量的  $t9, t11 - CLA$  作用效果更佳。

表 1  $t9, t11 - CLA$  对血清 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性的影响

实验分组	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)
正常对照组	38.66 ± 4.91	74.00 ± 3.63	81.75 ± 1.08
$t9, t11 - CLA$ 低剂量组	36.52 ± 2.68	82.51 ± 1.68*	110.39 ± 9.56*
$t9, t11 - CLA$ 中剂量组	28.24 ± 1.49*	117.28 ± 5.18*	135.13 ± 2.31*
$t9, t11 - CLA$ 高剂量组	19.78 ± 2.15*	129.76 ± 15.52*	140.13 ± 3.73*

注: \* 表示实验组与对照组差异显著 ( $P < 0.05, n = 20$ )。下表同。

### 2.2 $t9, t11 - CLA$ 对大鼠肝组织中抗氧化分子含量和活性的影响

$t9, t11 - CLA$  在肝组织中的抗氧化效果与在血清中的结果一致。CLA 添加组大鼠血清 MDA 水平随 CLA 添加量的增加而下降, 趋势明显, 而 SOD 和 GSH-Px 的活性随着 CLA 添加量的增加而明显升高, 呈剂量依赖关系 ( $P < 0.05$ , 表 2), 说明  $t9, t11 - CLA$  能够提高机体抗氧化能力, 而且高剂量 CLA 效果更佳。

表 2  $t9, t11 - CLA$  对肝组织 MDA 含量、SOD 和 GSH-Px 活性的影响

实验分组	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)
正常对照组	28.68 ± 2.15	70.12 ± 3.89	80.14 ± 3.33
$t9, t11 - CLA$ 低剂量组	22.31 ± 3.54*	87.62 ± 5.21*	96.35 ± 1.29*
$t9, t11 - CLA$ 中剂量组	15.42 ± 2.12*	102.54 ± 4.32*	118.55 ± 10.21*
$t9, t11 - CLA$ 高剂量组	8.65 ± 0.96*	110.028 ± 11.13*	123.19 ± 3.26*

### 2.3 $t9, t11 - CLA$ 对大鼠血清中 TG 及 HDL-C 的影响

TG 升高、HDL-C 降低是动脉粥样硬化的危险因素。 $t9, t11 - CLA$  对大鼠血清中 TG 及 HDL-C 的影响结果见表 3, 添加  $t9, t11 - CLA$  后各实验组

血清中 TG 及 HDL - C 水平与对照组无明显差异( $P > 0.05$ )。

表3 t9,t11-CLA 对大鼠血清中 TG 及 HDL - C 的影响

实验分组	TG/(nmol/mL)	HDL - C/(nmol/mL)
正常对照组	0.83 ± 0.18	0.96 ± 0.13
t9,t11-CLA 低剂量组	0.78 ± 0.15	0.89 ± 0.14
t9,t11-CLA 中剂量组	0.76 ± 0.12	0.98 ± 0.13
t9,t11-CLA 高剂量组	0.72 ± 0.16	0.93 ± 0.17

### 3 结论

由于 CLA 中共轭双键的存在,其异构体种类繁多,在众多异构体中,t9,t11-CLA 和 t10,c12-CLA 的生理功能基本确定,认为它们分别在抗癌和降低脂肪方面有着极强的作用效果<sup>[18]</sup>。但其他异构体生理活性的研究报道较少。

我们前期研究结果表明,t9,t11-CLA 能抑制人结肠癌细胞 Caco-2 增殖,并能防止血管内皮细胞的氧化损伤,这些结果说明,t9,t11-CLA 对人体健康有益,这与 Beppu 的结果相似,但 t9,t11-CLA 有益健康的生理活性机理是什么,是否与抗氧化作用有关,尚未被证实。

本研究中 SOD 和 GSH - Px 的活性随着 CLA 添加量的增加而升高,呈剂量依赖关系( $P < 0.05$ ,表 1 ~ 表 2),说明 t9,t11-CLA 具有一定的抗氧化作用。与正常对照组相比,添加 CLA 实验组大鼠血清和肝组织中 MDA 水平随 CLA 添加量的增加而下降,趋势明显( $P < 0.05$ ,表 1 ~ 表 2),呈剂量依赖关系,说明 t9,t11-CLA 能够提高机体抗氧化能力,且高剂量的 t9,t11-CLA 作用效果更佳。

添加 t9,t11-CLA 并没有改变大鼠血清 TG 和 HDL - C 的水平,提示 t9,t11-CLA 对体内血脂的清除并无效果,而在中断体内脂质过氧化方面发挥独特的作用。在我们以前的研究中也发现,在游离细胞系统中,CLA 的抗氧化性能与丁基羟基茴香醚 (butylated hydroxyanisole, BHA)相当<sup>[19]</sup>。

综上所述,t9,t11-CLA 是体内良好的抗氧化剂,其抑制氧化应激损伤的作用一方面与 t9,t11-CLA 激活了机体抗氧化酶类有关,另一方面与 t9,t11-CLA 自身的抗氧化能力有关,是否有其他作用机制还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Aryaeian N, Djalali M, Shahram F, et al. Effect of conjugated linoleic Acid, vitamin e, alone or combined on immunity and inflammatory parameters in adults with active rheumatoid arthritis; a randomized controlled trial [J]. *Int J Prev Med*, 2014, 5(12):1567 - 1577.

[2] Kızılsahin S, Nalbantsoy A, KarabayYavaşo ğlu N U. In vitro synergistic efficacy of conjugated linoleic acid, oleic acid, safflower oil and taxol cytotoxicity on PC3 cells [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(4):378 - 382.

[3] Mohammadzadeh M, Faramarzi E, Mahdavi R, et al. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on inflammatory factors and matrix metalloproteinase enzymes in rectal cancer patients undergoing chemoradiotherapy[J]. *Integr Cancer Ther*, 2013, 12(6):496 - 502.

[4] Lee J S, Shin J H, Hwang J H, et al. Malondialdehyde and 3 - nitrotyrosine in exhaled breath condensate in retired elderly coal miners with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Saf Health Work*, 2014, 5(2):91 - 96.

[5] Dilzer A, Park Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52(6):488 - 513.

[6] Carvalho R F, Uehara S K, Rosa G. Microencapsulated conjugated linoleic acid associated with hypocaloric diet reduces body fat in sedentary women with metabolic syndrome [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2012, 1(8):661 - 667.

[7] Gangidi R R, Lokesh B R. Conjugated linoleic acid (CLA) formation in edible oils by photoisomerization: a review [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(5):R781 - R785.

[8] Dhibi M, Issaoui M, Brahmi F, et al. Nutritional quality of fresh and heated Aleppo pine (Pinus halepensis Mill.) seed oil: trans - fatty acid isomers profiles and antioxidant properties [J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(8):1442 - 1452.

[9] 严梅荣,杨慧萍,施仰周,等. 共轭亚油酸氧化稳定性及其抗氧化性的研究[J]. *中国油脂*, 2003, 28(12):59 - 61.

[10] Young J F, Therkildsen M, Ekstrand B, et al. Novel aspects of health promoting compounds in meat [J]. *Meat Sci*, 2013, 95(4):904 - 911.

[11] Durmaz G, Gökmen V. Changes in oxidative stability, antioxidant capacity and phytochemical composition of Pistacia terebinthus oil with roasting [J]. *Food Chem*, 2011, 128(2):410 - 414.

[12] Beppu F, Hosokawa M, Tanaka L, et al. Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells [J]. *J NutrBiochem*, 2006, 17(12):830 - 836.

[13] 冉茂良,高环,尹杰,等. 氧化应激与 DNA 损伤 [J]. *动物营养学报*, 2013, 25(10):2238 - 2245.

[14] Kancheva V D, Kasaikina O T. Bio - antioxidants - a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(37):4784 - 4805.

[15] Prates E G, Alves S P, Marques C C, et al. Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulators trans - 10, cis - 12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) and forskolin [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2013, 49(5):335 - 345.

[16] 刘晓华. 共轭亚油酸的生物转化和异构体分析 [J]. 南昌:南昌大学, 2006.

[17] Li J, Li Q, Li J, et al. Peptides Derived from Rhopilema esculentum Hydrolysate Exhibit Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Antioxidant Abilities [J]. *Molecules*, 2014, 19(9):13587 - 13602.

[18] Huang G, Zhong X, Cao Y, et al. Antiproliferative effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line Caco - 2 [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 200, 16(Suppl 1):432 - 436.

[19] Zhong X, Luo T, Huang G, et al. Equimolar mixture of t9,t11 and t9,t11 CLA inhibits the growth and induces apoptosis in Caco - 2 cells [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2012, 114(4):479 - 485. 