

微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠及抗氧化性能的影响

余思佳^{1,2}, 徐建雄^{1,2}

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

【摘要】 目的 探究不同剂量微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠及其抗氧化性能的影响。方法 60只雄性昆明小鼠随机分为4组,低、中、高剂量组分别灌喂0.5 g/kg体重、1.0 g/kg体重和1.5 g/kg体重微生物源性抗氧化剂,对照组使用生理盐水进行灌胃,试验期30 d。在末次灌胃后,各组动物腹腔注射戊巴比妥钠,通过翻正反射实验观察小鼠睡眠状况,并在结束后,检测小鼠血清抗氧化性能。**结果** 与低、高剂量组相比,中剂量组的微生物源性抗氧化剂可以显著延长戊巴比妥钠睡眠时间($P < 0.05$)。与对照组、低、高剂量组相比,中剂量组极显著提高GSH-Px活力($P < 0.01$)、显著提高SOD活力($P < 0.05$)。与对照组相比,中剂量组MDA和8-ISO-PGF2 α 含量有显著降低($P < 0.05$)。**结论** 提示微生物源性抗氧化剂有促进小鼠的睡眠、提高机体抗氧化能力的作用,且在1.0 g/kg体重剂量下效果最显著。

【关键词】 微生物源性抗氧化剂;翻正反射;抗氧化性能;睡眠小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.006

Effects of microbe-derived antioxidant on sleep and antioxidant ability in the rat

YU Si-jia^{1,2}, XU Jian-xiong^{1,2}

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of different doses of microbe-derived antioxidant on sleep and antioxidant ability in mice. **Methods** Sixty male Kunming mice with similar body weight were randomly divided into 4 groups. The control group received normal saline, and the experimental groups received microbe-derived antioxidant in a dose of 0.5 g/kg bw, 1.0 g/kg bw or 1.5 g/kg bw once per day, respectively. The experiment period was 30 days. At the end of experiment, the mice of each group were intraperitoneally injected sodium pentobarbital to induce sleep. The mice fall sleep was judged by righting reflex. After the test of sleep, blood was taken for detection of serum antioxidant ability.

Results Compared with the low dose and high dose groups, the middle dose group showed a significantly prolonged sodium pentobarbital-induced sleeping time ($P < 0.05$). Compared with the control group, low and high dose groups, the middle dose group had highly significantly increased GSH-Px activity ($P < 0.01$) and significantly increased content of SOD. Under these conditions, the middle dose group reduced both the contents of MDA and 8-ISO-PGF2 α ($P < 0.05$) compared with the control group.

Conclusions Our results suggest that microbe-derived antioxidant exerts effect on sleep and antioxidant ability in rats. Supplement of 1.0 g/kg bw/d shows the most significant effects.

[作者简介] 余思佳(1992-),女,研究方向:动物营养与饲料科学 E-mail: scarlettyu@yeah.net。

[通讯作者] 徐建雄(1962-),男,教授,博士,研究方向:动物营养 Email: jxxu1962@sjtu.edu.cn。

【Key words】 Microbe-derived antioxidant; Righting reflex; Antioxidant ability; Sleep; Rat

伴随着社会的发展和生活方式的加快,失眠已成为困扰人们正常生活的重要问题之一。失眠是指无法入睡或无法保持睡眠状态,导致睡眠不足,又称入睡和维持睡眠障碍。失眠往往会给患者带来极大的痛苦和心理负担。目前治疗失眠的药物主要是化学合成类镇静催眠药,但长期使用会产生依赖和毒副作用,因此研发安全高效的保健品成为新的方向。睡眠与觉醒是中枢神经系统主要活动的结果,由于脑组织具有高密度膜不饱和脂肪酸、较高的脂肪代谢率、低含量抗氧化剂以及依赖完整神经元突触传递等特性,易受活性氧攻击导致损伤,引起细胞膜脂质过氧化及通透性增加;神经元发生细胞毒性水肿;线粒体遭到破坏,功能丧失等^[1]。抗氧化剂能够干扰自由基连锁反应的引发以及扩散,从而抑制脂质过氧化。而微生物源性抗氧化剂则是由一些具有抗氧化作用的菌体本身以及有抗氧化能力的微生物发酵产物组成。本试验通过灌喂小鼠不同剂量微生物源性抗氧化剂,探究其对小鼠抗氧化能力及睡眠的影响,为研究促进睡眠的新型保健食品提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 微生物源性抗氧化剂:由上海创博生态工程有限公司提供,该产品是刺梨、沙棘等果实,经枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、酪酸杆菌、啤酒酵母等有益微生物经固、液复合发酵后,再经提取、浓缩、灭活性、冻干等加工工艺制成。含有 VC、VE、异黄酮、SOD、谷胱甘肽、皂苷、牛磺酸和多种微量元素的金属衍生物。

1.1.2 实验动物:60 只清洁级雄性昆明小鼠,体重 15~18 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司(许可证号:SCXK(沪 2007-0005))。

1.1.3 实验试剂:血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、8-异前列腺素 F_{2α}(8-ISO-PGF_{2α})检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

戊巴比妥钠:购于默克化工技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理:小鼠随机分为 4 组,每组

15 只,分别为对照组、低(L-MA)、中(M-MA)、高剂量组(H-MA)。各组小鼠均饲喂基础日粮(购自上海斯莱克实验动物有限公司),实验组分别灌喂 0.5 g/kg 体重、1.0 g/kg 体重、1.5 g/kg 体重微生物源性抗氧化剂,对照组灌喂等体积的生理盐水,灌胃容量为 0.2 mL/10 g 体重,每天灌胃 1 次。实验小鼠饲养于上海交通大学农业与生物学院动物室内,自由进食与饮水,保持动物房温度为(22~25)℃,相对湿度为 50%~60%,光照明暗各 12 h。

1.2.2 测定指标和方法:

1.2.2.1 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验:在末次灌胃 15 min 后,试验动物按 57 mg/kg 体重剂量腹腔注射戊巴比妥钠,注射量为 0.1 mg/10 g 体重,以小鼠翻正反射消失 1 min 以上作为入睡判断标准,翻正反射消失至恢复这段时间为动物睡眠时间,记录入睡动物数及睡眠时间。

1.2.2.2 抗氧化指标测定:(1)样品采集制备:翻正反射试验结束后,小鼠摘眼球采血,3 800 r/min 离心 10 min,制备血清。(2)测定指标与方法:按照南京建成检测试剂盒说明书对血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、8-异前列腺素 F_{2α}(8-ISO-PGF_{2α})这四个指标进行检测。

1.2.3 统计学方法:数据处理与分析采用 SPSS 17.0 的单因素方差分析,并用 LSD 法进行多重比较,分别以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 为差异显著与极显著判断标准。结果以平均值以标准差表示。

2 结果

2.1 戊巴比妥钠延长小鼠睡眠时间

从表 1 可以看出,在实验条件下,对照组的入睡动物数少,试验组入睡动物数皆高于空白对照组,其中低剂量组和中剂量组入睡动物数分别是对照组的 2 和 1.8 倍。四组动物的睡眠潜伏期差异无显著性。中剂量组与低剂量组和高剂量组对比,小鼠的睡眠时间均高于后两者且呈现差异显著性($P < 0.05$)。中剂量组睡眠时间高于空白对照组($P > 0.05$),无统计学意义。表明中剂量微生物源性抗氧化剂对延长戊巴比妥钠小鼠的睡眠时间有促进作用。

表 1 受试物对戊巴比妥钠延长小鼠睡眠时间的影

Tab. 1 The effect of microbe-derived antioxidant on duration of sleep induced by pentobarbital sodium

组别	动物数(只)	入睡动物数	睡眠潜伏期(min)	睡眠时间(min)
对照组	15	5	18.60 ± 0.55	29.00 ± 0.00ab
低剂量组	15	10	20.00 ± 4.03	26.90 ± 7.55b
中剂量组	15	9	20.00 ± 2.87	36.33 ± 2.00a
高剂量组	15	7	20.00 ± 2.83	28.14 ± 6.96b

注:在同一列中,值不同的小写上标表示差异显著($P < 0.05$),而相同上标表示无显著差异($P > 0.05$)。

Note. The different lowercase superscript means significant difference ($P < 0.05$), the same superscript means no significant difference ($P > 0.05$) in the same column.

表 2 小鼠血清抗氧化能力

Tab. 2 The antioxidant ability of the mouse serum

组别	GSH-px (U)	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)	8-ISO-PGF2 α (pg/ml)
对照组	492.84 ± 168.98B	115.86 ± 12.76B	13.35 ± 2.81aA	59.31 ± 8.52a
低剂量组	398.03 ± 117.11B	149.83 ± 24.59bA	8.63 ± 1.21cB	50.96 ± 8.57b
中剂量组	696.30 ± 202.94A	176.45 ± 21.65aA	10.93 ± 2.43b	52.07 ± 7.70b
高剂量组	483.62 ± 50.17B	150.08 ± 23.08bA	12.17 ± 3.64ab	53.99 ± 9.65ab

注:在同一列,值不同小写上标表示差异显著($P < 0.05$),不同的大写上标表示非常重大的不同($P < 0.01$),而相同或没有上标表示无显著差异($P > 0.05$)。

Note. The different lowercase superscript means significant difference ($P < 0.05$), the different uppercase means very significant difference ($P < 0.01$), the same superscript means no significant difference ($P > 0.05$) in the same column.

2.2 血清抗氧化能力

从表 2 可以看出,中剂量组的 GSH-px 活力与其他各组相比有极显著的提高($P < 0.01$),低剂量组和高剂量组与对照组相比略有下降,但无统计学差异($P > 0.05$)。对于 SOD 含量,各剂量组与对照组相比,都有极显著提高($P < 0.01$),其中,中剂量组的 SOD 含量最高,且与低剂量组、高剂量组都有显著差异($P < 0.05$)。高剂量组较低剂量组 SOD 含量有提高,但无统计学意义($P > 0.05$)。对于 MDA 含量,各剂量组与对照组相比,皆有不同程度的降低。对照组与低剂量组差异极显著($P < 0.01$),与中剂量组差异显著($P < 0.05$),与高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。对于 8-ISO-PGF2 α ,各剂量组与对照组相比,皆有不同程度的降低。对照组与低剂量组和中剂量组差异显著($P < 0.05$),但与高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 不同剂量的微生物源性抗氧化剂对小鼠睡眠的影响

研究表明,失眠与氧化应激存在着一定的关系^[1,2]。因为中枢神经系统富含不饱和脂肪酸,容易受到氧化应激及脂质过氧化的干扰,而睡眠与觉醒又是主要通过中枢神经系统进行调控。所以,睡眠时间的长短及质量在很大程度上受到氧化应激的影响。

Ikeda M 等^[3](2005)在给小鼠第三心室以 100 $\mu\text{L}/10\text{h}$ 的流速注射叔丁基过氧化氢(TBHP,一种强氧化剂)的实验中表明,0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 TBHP 能够显著延长非快速眼动睡眠的时间(NREM)和快速眼动睡眠时间(REM),而 REM 的延长能够显著增加整个睡眠时间。但继续增加剂量(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$),睡眠时间并没有增加。高剂量(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)TBHP 反而减少了 NREM,显示出了显著的睡眠抑制效应。产生的原因可能是因为高浓度的 TBHP 所产生的氧化应激效应使中视前区区域神经(睡眠及体温的控制中心)受到损伤。而注射低浓度 TBHP 时,并不能观察到注射区附近的氧化损伤,这一结论与本实验的结果有一定的一致性。实验数据表明,在氧化应激程度最低时,小鼠睡眠时间最长。从表 2 可以看出,各实验组的 MDA 以及 8-ISO-PGF2 α 与对照组相比,皆有显著下降,说明在饲养过程中,小鼠受到了氧化损伤,而灌胃的微生物源性抗氧化剂在一定程度上缓解了氧化损伤的作用。同时,在中剂量组时,GSH-px 和 SOD 活力显著高于其他剂量组。说明在此剂量下微生物源性抗氧化剂的抗氧化效果最好,受到的氧化应激损伤最低。而从表 1 中可以看出,中剂量组小鼠的睡眠时间也显著高于低、高剂量组小鼠的睡眠时间。

根据本实验室之前的研究^[4,5],微生物源性抗氧化剂具有显著的抗氧化能力,其中含有 886 mg/100 g 含量的 GSH。GSH 是一种重要的抗氧化剂。

而氧化型谷胱甘肽(GSSG)可由 GSH 转化形成,是一种重要的睡眠促进物质,在谷氨酸受体的突触水平上能够抑制神经传递的兴奋性。在 10 ~ 100 nmol/L 范围注射氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽的实验中,发现 GSSH 及 GSH 对睡眠时间的的作用呈现钟形趋势。在 25 nmol (GSSG) 和 50 nmol (GSH) 时分别呈现最显著的提高^[6]。这一结论也与本实验中,在受到氧化应激损伤程度最小的中剂量组时睡眠时间显著高于低、高剂量组小鼠的睡眠时间这一钟形曲线相吻合。

3.2 不同剂量的微生物源性抗氧化剂对小鼠抗氧化性能的影响

从表 2 中可以看出,灌注中剂量微生物源性抗氧化剂,小鼠的 GSH-px 和 SOD 活力显著高于其他剂量组,且低、中、高剂量组的 MDA 和 8-ISO-PGF2 α 的浓度皆低于对照组。综上数据表明,微生物源性抗氧化剂有一定抗氧化功效,但抗氧化效能并非随着抗氧化剂剂量的增加而增加,在 1.0 g/kg 体重/d 剂量下效果最好。说明超高剂量的抗氧化会导致过氧化作用,实践中盲目使用抗氧化剂不仅不能有效发挥机体抗氧化作用,反而可能使氧化应激更加严重^[7]。本实验数据在一定程度上也验证了这一点。虽然 ROS 可攻击不饱和脂肪酸,促使其发生氧化或过氧化,生成脂质过氧化物,并降解成为丙二醛;可引发细胞内蛋白氧化,线粒体损伤,诱发 DNA 结构破坏,促使端粒变短,激活细胞凋亡信号,最终影响细胞寿命^[8]。但在正常生理条件下生成的微量的 ROS 对维持细胞的正常功能(包括信号传导和转录调控)具有十分重要的意义^[7]。在高等动物的神经细胞内,正常生理功能的维持需要较高水平的 ROS,且神经细胞对 ROS 浓度的变化能够作出较为敏感的反应。同时,研究发现,ROS 可增强体内胰岛素信号的敏感性^[9],这表明,ROS 可能作为细胞内生命代谢的介导体,并作为一种信号分子从细胞外环境到细胞进行传递^[7]。

综上,正常生理条件下低剂量的 ROS 处于平衡状态,并对维持细胞稳态和生理功能起着十分重要

的作用。当在生理条件下添加抗氧化剂过度清除 ROS,而导致氧化还原失衡,也可诱发细胞信号紊乱,触发机体中自我代偿性的促氧化系统的启动^[7]。由上可知,大剂量补充抗氧化剂对机体是有害的,非氧化应激条件下抗氧化剂的大量补充也存在着促氧化的潜在可能。因而,确定适宜的剂量对抗氧化剂的抗氧化效应的发挥极为关键。

4 结论

1.0 g/kg·d 体重的微生物源性抗氧化剂可以显著延长小鼠的戊巴比妥钠睡眠时间,显著提高 GSH-Px 和 SOD 活力,著降低 MDA 和 8-ISO-PGF2 α 含量,说明微生物源性抗氧化剂有促进小鼠睡眠、提高机体抗氧化能力的作用,且在 1.0 g/kg 体重剂量下效果最显著。

参考文献:

- [1] 管莉萍,刘存志. 氧化损伤标志物与中枢神经系统疾病[J]. 国际老年医学杂志, 2011, 32(3): 107-112.
- [2] 范利锋,王平仁,兰培敏. 睡眠机制的研究概况[J]. 临床内科杂志, 2005, 10: 18-20.
- [3] Ikeda M, Ikeda-Sagara M, Okada T, et al. Brain oxidation is an initial process in sleep induction [J]. Neuroscience, 2005, 130(4): 1029-1040.
- [4] 陈小连,孙婷婷,徐建雄. 微生物源性抗氧化剂对大鼠抗氧化及损伤修复的作用[J]. 中国饲料, 2010, 22: 11-15.
- [5] 龚灵芝,陈小连,徐建雄. 微生物源性抗氧化剂对高不饱和脂肪酸饲料致大鼠自由基损伤模型的影响[J]. 饲料工业, 2008, 20: 32-34.
- [6] Inoue S, Honda K, Komoda Y. Sleep as neuronal detoxification and restitution [J]. Behav Brain Res, 1995, 69(1): 91-96.
- [7] 陈伟,林映才,马现永,等. 一些抗氧化剂的抗/促氧化作用及其机制[J]. 动物营养学报, 2012, 24(4): 595-605.
- [8] 皇甫冰,高继萍,杨霞,等. 氧化应激与肾脏细胞凋亡[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 54-60.
- [9] Loh K, Deng H, Fukushima A, et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity [J]. Cell Metab, 2009, 10(4): 260-272.