

# L-苹果酸对老年大鼠组织中转氨酶活性的影响

吴军林, 吴清平\*, 张菊梅

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070)

**摘要:** L-苹果酸(malic acid)是生物体代谢过程中产生的重要有机酸, 在线粒体产生能量物质 ATP 的代谢过程中起到重要作用。为探讨苹果酸对老年机体不同组织中酶活性的影响, 将实验动物 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 连续灌胃苹果酸 30d, 测定大鼠体内丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性。发现老年大鼠肝脏中 ALT 及 AST 活性低于年轻对照大鼠, 苹果酸可提高老年大鼠肝脏中 ALT 活性 41.98%, 提示苹果酸可改善老年肝脏酶代谢能力, 有利于提高新陈代谢。

**关键词:** L-苹果酸; 转氨酶; 丙氨酸氨基转移酶; 天冬氨酸氨基转移酶

## Effects of L-malate on Activities of Transferases in Different Tissues of Aged Rats

WU Jun-lin, WU Qing-ping\*, ZHANG Ju-mei

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** L-malate, an important organic acid on the process of metabolism, plays an important role in generating mitochondria ATP(adenosine triphosphate). To investigate the effects of L-malate on activities of ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) in different tissues of aged rats, Sprague-Dawley male rats were randomly divided into 4 groups, each group consisting of 6 animals. L-malate was orally administrated via intragastric canula for 30 days, then the rats were sacrificed and the liver and heart were removed to determine the activities of ALT and AST. Activities of ALT and AST in liver of aged rats decreased compared with control young rats. The activities of ALT in liver of aged rats were enhance ( $p < 0.05$ ) 41.98% by L-malate administration. Our data indicate that enzyme metabolism of liver in aged rats was strengthened by dietary supplementation with L-malate.

**Key words:** L-malate; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; aminotransferase

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0507-04

L-苹果酸(malic acid)是一种重要的天然有机酸, 广泛分布于植物、动物与微生物细胞中, 其口感接近天然苹果的酸味。1967年, 美国食品和药品管理局登记确认为一种安全、无毒、无害、可食用的有机酸。近来研究证明, L-苹果酸能促进 TCA 循环及苹果酸天冬氨酸穿梭, 其分子生物学机理与 L-苹果酸提高 AGC 的基因表达水平有关<sup>[1]</sup>。且苹果酸具有多种生理学功能, 通过减少老年机体组织内自由基的产生或加速清除, 可起到防止自由基对机体组织的损伤, 本研究以 24 月龄大鼠作为老年的动物模型, 通过给大鼠灌胃苹果酸 30d 后, 观察了苹果酸对老年大鼠多种组织中转氨酶活性的影响, 探索苹果酸增强老年机体代谢能力的作用机理,

并为苹果酸作为营养补剂提供动物实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物和实验室

雄性 SD 大鼠 24 只, 体重分别为 180~220g(2 月龄,  $n=12$ ), 480~560g(16 月龄,  $n=12$ ), 由第一军医大学实验动物中心提供, 其中 16 月龄组购入后分笼饲养至 24 月龄与购进 2 月龄 SD 大鼠同时开始实验。动物实验室(广东省疾病预防控制中心): SPF 级, 合格书粤检证号 2001C059, 室温室温( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 60%~80%, 自

收稿日期: 2007-07-11

\* 通讯作者

作者简介: 吴军林(1977-), 男, 博士, 研究方向为食品科学与工程。

万方数据

由饮食, 饲料为标准啮齿类饲料, 由第一军医大学实验动物中心提供, 照明同自然条件变化。老年鼠表现为毛发末梢发黄, 有不同程度的倦怠, 尾部有明显褐色斑状沉着。伴随月龄增加脱毛现象加剧, 体脂在腹部大量贮积。

### 1.1.2 仪器和试剂

流式细胞仪(FACS Calibur) 美国 Becton Dickinson; Teflon 电动匀浆器 B.Braun 公司; 高速冷冻离心机 Hitachi 公司; DU7400 分光光度计 Beckman 公司。

L-苹果酸(经 HPLC 检验纯度在 99.9% 以上) 广东环凯微生物科技有限公司; 去脂牛血清白蛋白(Defatted BSA) Sigma 公司; Hepes Merck 公司产品; 其余化学试剂均为国产分析纯 广东环凯微生物科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分组与给样

采取随机分组方法将 2 月龄(Group I)与 24 月龄(Group II)大鼠分别分为对照组和苹果酸组, 每组 6 只。方法如下:

Group Ia: 青年对照组, 灌胃等体积的生理盐水。

Group Ib: 青年苹果酸组, 按照苹果酸剂量为 0.210g/kg bw 灌胃。

Group IIa: 老年对照组, 灌胃等体积的生理盐水。

Group IIb: 老年苹果酸组, 按照苹果酸剂量为 0.210g/kg bw 灌胃。

各组每天按照 1ml/100g bw 量灌胃, 其中空白对照组给予生理盐水, 苹果酸组按照剂量给予受试样品(苹果酸溶于纯净水后, 用 KOH 调 pH7.2 后, 配成所需浓度), 连续灌胃 30d 后进行各项实验。

### 1.2.2 动物取材

实验动物于末次分别给予生理盐水及苹果酸后 30min, 断头处死取血, 并迅速取肝脏、心脏。用冷的生理盐水洗净, 剔除脂肪组织及结缔组织, 用滤纸吸干, 液氮速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.3 血清的制备

实验动物宰杀后, 立即用小试管收取血液, 倾斜轻放、静置(严禁摇动), 置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱约 3h, 血凝固后 3000r/min 离心 15min, 取上清液, 血清析出后, 用 10ml 吸管吸出、分装血清, 分别置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.2.4 组织匀浆的制备

组织匀浆制备<sup>[2]</sup>: 实验结束后, 分别取 0.4g 左侧心肌组织和 1.0g 肝组织, 生理盐水冲洗、拭干后剪碎, 置匀浆器中, 按照 1:10(W/V)的比例加入预冷的匀浆介质: 70mmol/L 蔗糖、220mmol/L 甘露醇、5mmol/L Hepes、2mmol/L EDTA、pH7.4。以 20000r/min 匀浆 3 次, 间隔 30s, 每次持续 10s, 制成 10% 组织匀浆(W/V), 匀浆液转移至刻度离心管中, 1200g 离心 10min, 取上清, 弃沉淀(细胞核及细胞碎片), 取上清液分装储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  的冰箱中。

### 1.2.5 生化指标的测定

乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸激酶(CK)、血清尿素(BUN)、总蛋白(total protein, TP)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)的测定: 动物于末次给受试样品 30min 后, 制备组织样本后上自动生化分析仪进行分析。

### 1.2.6 蛋白含量的测定

用双缩脲法测定蛋白含量, 用 280nm 下校正的 BSA 作标准。本法测定蛋白浓度在 0.05~1.25mg/ml, 室温下测试<sup>[3]</sup>。

### 1.2.7 数据处理

各组数据均采用 mean  $\pm$  standard deviation (SD) 表示, 数据间的差异性比较采用 t 检验, 显著性差异以  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$  为标准。以上数据分析均采用 SPSS 10.0 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果酸对血清生化指标的影响

本研究观察到老年对照组大鼠(Group IIa)血清总蛋白(TP)含量较年轻对照组大鼠(Group Ia)增加 11.26%, 具有极显著性差异( $p < 0.01$ ), 老年苹果酸组大鼠(Group IIb)血清 TP 含量较老年对照组大鼠(Group Ib)升高 5.3%, 无显著性差异( $p > 0.05$ ), 年轻苹果酸组大鼠与年轻对照组相比没有显著性差异; 苹果酸组老年大鼠与苹果酸组年轻大鼠血清磷酸激酶活力分别较老年对照组与年轻对照组均有所下降, 但无显著性差异( $p > 0.05$ ), 老年对照组与年轻对照组血清磷酸激酶活力无显著性差异; 苹果酸组老年大鼠与苹果酸组年轻大鼠血清乳酸脱氢酶活力分别较老年对照组与年轻对照组均有所下降, 但无显

表 1 苹果酸对血清生化指标的影响( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

Table 1 Effects of L-malate on biochemical parameters in serum of control and treated rats ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

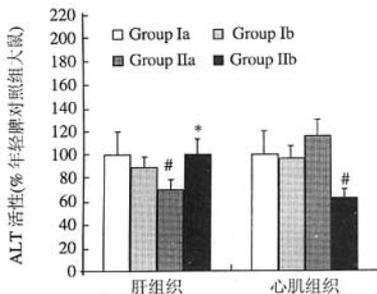
|          | Group Ia            | Group Ib            | Group IIa            | Group IIb          |
|----------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| TP(g/L)  | 70.67 $\pm$ 2.16    | 73.97 $\pm$ 7.36    | 78.63 $\pm$ 4.43**   | 82.80 $\pm$ 1.83   |
| CK(U/L)  | 6481 $\pm$ 2015     | 5956 $\pm$ 1692     | 6887 $\pm$ 1274      | 5352 $\pm$ 1384    |
| LDH(U/L) | 987.83 $\pm$ 298.74 | 849.67 $\pm$ 275.59 | 1157.83 $\pm$ 206.27 | 905.0 $\pm$ 296.31 |

注: 与年轻对照组大鼠(Group Ia)比较, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

著性差异( $p > 0.05$ ),老年对照组与年轻对照组乳酸脱氢酶活力升高 17.21%,但无显著性差异(见表 1)。

### 2.2 苹果酸对不同组织酶活力的影响

本研究观察到老年对照组大鼠(Group IIa)心肌组织丙氨酸氨基转移酶(ALT)活力较年轻对照组大鼠(Group Ia)增加 15.20%,但无显著性差异,肝组织中 ALT 活力则下降 30.32%,具有显著性差异( $p < 0.05$ ),老年苹果酸组大鼠(Group IIb)肝组织丙氨酸氨基转移酶活力较老年对照组升高 41.98%,具有显著性差异( $p < 0.05$ ),老年苹果酸组大鼠心肌组织丙氨酸氨基转移酶活力较老年对照组降低 46.09%,具有显著性差异( $p < 0.05$ ),年轻苹果酸组大鼠(Group Ib)与年轻对照组相比没有显著性差异(见图 1)。



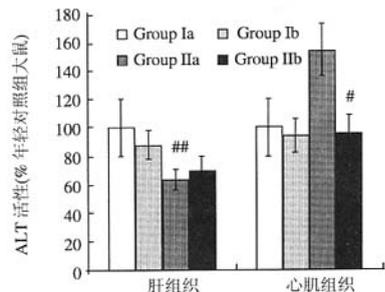
与年轻对照组大鼠(Group Ia)比较, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ; 与老年对照组大鼠(Group IIa)比较, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

图1 苹果酸对年轻大鼠与老年大鼠不同组织 ALT 活性的影响  
Fig.1 Effects of L-malate on activity of ALT in liver and heart of young and aged rats

老年对照组大鼠心肌天冬氨酸氨基转移酶(AST)活力较年轻对照组大鼠升高 54.37%,无显著性差异,肝组织中 AST 活力则下降 36.73%,具有显著性差异( $p < 0.05$ ),老年苹果酸组大鼠肝组织 AST 活力与老年对照组大鼠无显著性差异,老年苹果酸组大鼠心肌组织 AST 活力较老年对照组大鼠下降了 38.28%,有显著性差异( $p < 0.05$ ),年轻苹果酸组大鼠与年轻对照组相比没有显著性差异(见图 2)。

### 3 讨论

L-苹果酸是生物体代谢过程中产生的重要有机酸,是三羧酸循环(TCA 循环)及其支路乙醛酸循环代谢过程中的重要中间产物,也是 CO<sub>2</sub> 固定反应的中间产物<sup>[4]</sup>,L-苹果酸可以显著增加苹果酸天冬氨酸的穿梭效率,研究发现苹果酸能促进肝脏的氮代谢,降低血氨的浓度<sup>[5]</sup>,对肝脏具有保护作用。它是治疗肝功能不全、肝衰竭、肝癌,特别是多氨症的有效药物<sup>[6]</sup>。本研究目的在于探讨苹果酸对老年大鼠肝脏及心肌组织中转氨



与年轻对照组大鼠(Group Ia)比较, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ 。

图2 苹果酸对年轻大鼠与老年大鼠不同组织 AST 活性的影响  
Fig.2 Effects of L-malate on activity of AST in liver and heart of young and aged rats

酶活性的影响,以期苹果酸在促进肝脏代谢及保护作用方面提供理论依据。测定血清生化指标目的是比较老年大鼠与年轻大鼠在生理上的差别,评价苹果酸对大鼠在生理生化指标方面的影响。总蛋白的测定可以反应出大鼠的营养状况、肾病、肝病以及其他的多种生理病变<sup>[7]</sup>。本实验发现,老年大鼠血清总蛋白显著高于年轻大鼠,表明老年大鼠的健康状况明显低于年轻大鼠,但苹果酸的补充对老年与年轻大鼠血清总蛋白的影响不明显。

研究表明,随着衰老的进程,机体新陈代谢也不断衰退,一些参与体内糖原异生,线粒体生物氧化过程、氨基酸的代谢、糖无氧代谢、磷酸肌酸合成等过程的酶的活性也发生变化。其中参与氧化还原反应的酶如丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶等,其水平和活性随着增龄不断下降,是引起老年机体代谢功能不断衰退的主要原因之一<sup>[8-9]</sup>。ALT 是与糖原异生有关的酶,AST 参与线粒体生物氧化过程<sup>[10]</sup>。通过补充苹果酸,发现老年大鼠肝组织中天冬氨酸氨基转移酶及丙氨酸氨基转移酶活性显著降低,表明老年大鼠肝脏有一定程度损伤,肝脏机能发生退化,而苹果酸的补充可以提高肝组织中 ALT 活力,提示苹果酸具有改善老年酶代谢能力,有利于提高新陈代谢和抗氧化能力,减慢衰老的进程。老年对照大鼠心肌组织中天冬氨酸氨基转移酶及丙氨酸氨基转移酶活性有增高的趋势,苹果酸可以明显降低其活性,使其达正常水平,因此,苹果酸对不同组织中 AST、ALT 影响的作用机理不同,其机理尚需要进一步的实验研究。

### 参考文献:

[1] 吴军林,吴清平,韦明青,等. L-苹果酸对苹果酸天冬氨酸穿梭相关蛋白的基因表达研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 229-232.  
[2] SCHOLZ T D, TENEYCK C J, SCHUTTE B C. Thyroid hormone regulation of the NADH shuttles in liver and cardiac mitochondria[J]. J

# 除草剂百草枯对大鼠及胎儿的毒性研究

权伍荣<sup>1</sup>, 郭环宇<sup>2</sup>, 任大勇<sup>2</sup>, 沈明浩<sup>2,\*</sup>

(1. 延边大学农学院食品科学系, 吉林 龙井 133400; 2. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

**摘要:** 本实验研究了除草剂百草枯对大鼠及其胎儿毒性作用。结果表明, 雄性大鼠一次性接 1/10 LD<sub>50</sub>、1/5 LD<sub>50</sub> 和 1/2 LD<sub>50</sub> 的百草枯不会引起雄性生殖细胞的突变; 百草枯在 1/10 LD<sub>50</sub>、1/20 LD<sub>50</sub> 和 1/40 LD<sub>50</sub> 的剂量下不能影响雄性大鼠精子活率的改变和精子畸形率的上升, 却可以影响睾丸组织中碱性磷酸酶(AKP 或 ALP)的活性, 对睾丸造成一定程度的损伤; 百草枯可导致大鼠胎儿特殊循环系统动脉管(DA)的收缩, 对其存在毒性作用, 并且动脉管内径与染毒剂量剂量之间存在显著的剂量—效应关系。

**关键词:** 百草枯; 毒性; 大鼠; 胎儿

## Toxic Effect of PQ on Rats and Embryo

QUAN Wu-rong<sup>1</sup>, GUO Huan-yu<sup>2</sup>, REN Da-yong<sup>2</sup>, SHEN Ming-hao<sup>2,\*</sup>

(1. Department of Food Science, College of Agronomy, Yanbian University, Longjing 133400, China;

2. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** The toxic effect of PQ on rats and fetus was studied in this paper. The results indicated that PQ cannot induce germinal mutation at the dose of 1/10 LD<sub>50</sub>, 1/5 LD<sub>50</sub> and 1/2 LD<sub>50</sub> and also cannot enhance the rat's spermatic activity ratio or induce genital toxicity on rats at the dose of 1/40 LD<sub>50</sub>, 1/20 LD<sub>50</sub> and 1/10 LD<sub>50</sub>. But PQ can affect the activity of AKP(ALP) by digestive tract at these doses; PQ can induce contraction of DA of embryo showing that PQ has embryonic toxicity; with the dose increasing, the inner diameter of DA decreasing, indicating that there is dose-reaction relationship between the dose and inner diameter of DA.

**Key words:** PQ; toxicity; rats; embryo

中图分类号: TS207.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0510-04

百草枯, 又名对草快<sup>[1]</sup>; 商品名为克芜踪; 英文名 Paraquat(PQ), 是一种速效触杀型灭生性季胺盐类除草剂, 1962年由ICI公司注册并开始生产, 因其具有良好的除草效果, 目前在120多个国家和地区的50多种作物上

广泛使用。百草枯大鼠经口LD<sub>50</sub>为112~150mg/kg, 兔经口LD<sub>50</sub>为210mg/kg<sup>[2]</sup>。近年来关于百草枯毒性的报告很多, 但多集中在研究其急性中毒的机制和中毒后治疗方法上, 对于其对大鼠的生殖系统的毒性及其对大鼠胎

收稿日期: 2007-08-10

\* 通讯作者

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(20050548)

作者简介: 权伍荣(1961-), 男, 副教授, 研究方向为食品安全、食品工程。

Mol Cell Cardiol, 2000, 32: 1-10.

[3] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analyt Biochem*, 1976, 72: 248-254.

[4] 吴清平, 周小燕. L-苹果酸研究进展[J]. *微生物学通报*, 1990, 17(1): 30-33.

[5] CALLIS A, MAGNAN DE B B, SERRANO J J, et al. Activity of citrulline malate on acid-base balance and blood ammonia and amino acid levels: study in the animal and in man[J]. *Arzneimittelforschung*, 1991, 41(6): 660-663.

[6] 张菊梅, 吴清平, 周小燕, 等. L-苹果酸的生理功能及应用前景[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(2): 116-117.

[7] DORCHY H. Sports and type I diabetes: personal experience[J]. *Rev Med Brux*, 2002, 23: A211-A217.

[8] 夏廉博, 肖德杭, 王厚德, 等. 衰老生物学——长寿与衰老的探索[M]. 上海: 知识出版社, 1987: 60.

[9] 李爱华, 李国强. 自由基清除剂I号配方对中长跑运动员的影响 II——肌酐和酶[J]. *中国运动医学杂志*, 1996, 15(1): 52.

[10] 王胜奎, 李爱华. 健身锻炼对老年男子身体素质的影响 II——酶和自由基[J]. *中国运动医学杂志*, 1999, 18(1): 89-90.