

化学发光法研究培植牛黄清除 O_2^- 的作用[△]

沈阳农业大学(110161) 袁春莲* 王 芬 叶凤阁 温占华

摘 要 应用化学发光法研究培植牛黄对碱性二甲基亚砷体系产生 O_2^- 清除作用。结果显示,培植牛黄对 O_2^- 有较强的清除作用,其 50%清除率剂量为 0.03 $\mu\text{g/mL}$,清除活性远高于维生素 E。

关键词 培植牛黄 超氧负离子自由基 O_2^- 化学发光

超氧负离子自由基 O_2^- 是活性氧之一,具有细胞毒性,如不及时清除,过量的 O_2^- 可造成机体损伤,引发多种疾病^[1]。牛黄是传统的名贵中药,培植牛黄系在活牛胆囊内培育而成,按国家规定,优质培植牛黄可与天然牛黄同等药用,具有多种药理活性。以往研究发现,培植牛黄存在稳定的超氧自由基^[2]。因此,我们运用化学发光技术,研究培植牛黄对碱性二甲基亚砷体系产生的 O_2^- 的清除能力,在分子水平上为牛黄药理活性揭示新的作用机制。有关这一领域的研究,国内外未见报道。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

培植牛黄由云南农业大学提供,系多头牛产的混合样品。鲁米诺(Luminol)系美国 Sigma 公司产品,含量 97%;二甲基亚砷(DMSO)、氢氧化钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠,均为国产分析纯试剂。三蒸水配制 0.3 mol/L NaOH,含 0.1 mmol/L EDTA 的 0.2 mol/L PBS(pH=8.6),0.3 mmol/L 鲁米诺的 PBS 溶液。

1.2 仪器和方法

1.2.1 化学发光仪,LKB-Wallac 250 型。

1.2.2 用十万分之一分析天平准确称取一定量样品,溶于 DMSO 溶液中,转入容量瓶,

配制固定溶液,采用逐级稀释法获得系列浓度稀溶液。

1.2.3 DMSO 通氧数分钟制成氧饱和溶液。取此溶液 0.3 mL 放入 50 mm×12 mm 硬质玻璃管中,加入 0.3 mol/L NaOH 0.25 μL ,轻轻振荡混匀,30 min 后加入 pH 8.6 PBS 0.1 mL。置测定位置,注入 0.3 mmol/L 鲁米诺溶液 0.6 mL,总体积为 1 mL,立即启动发光仪并记录,检测样品时,可相应减少 PBS 的用量,使总体积保持 1 mL。

2 结果与讨论

2.1 DMSO(OH^-)-Luminol 发光体系的建立^[3,4]

2.1.1 NaOH 溶液的加入量对发光强度的影响:固定 DMSO 及鲁米诺的用量,改变 NaOH 溶液的加入量,结果如图 1 所示,随着 NaOH 溶液加入量的增加,发光强度开始呈线性增加,当 NaOH 溶液达 0.6 mmol/L 时,发光强度趋于稳定。表明实验条件不变,随 NaOH 溶液加入量的增加, O_2^- 的生成量逐渐趋于饱和状态。

2.1.2 二甲亚砷加入量对发光强度的影响:固定 NaOH 和鲁米诺的用量,改变二甲亚砷的加入量,用 pH8.6 的 PBS 溶液调节总体积保持 1 mL。由图 1 看出,其发光强度在 DMSO 的加入量为 0.1 mL~0.2 mL 时缓慢增加,0.2 mL~0.4 mL 时迅速增加,0.4 mL~

* Address: Yuan Chunlian, Shenyang Agricultural University, Shenyang

袁春莲 女,1962 年毕业于沈阳农学院土壤农化系化学专门化专业。副教授,多年从事分析化学的教学和科研工作,其主编的《分析化学》和《分析化学实验技术》等书,被采用为高等农林院校教材。多次参加国家和省、市的科研课题研究工作。发表论文 10 余篇,分别获得辽宁省以及沈阳市科技进步三等奖。

[△] 国家自然科学基金资助项目

0.5 mL 时趋于稳定。说明随着 DMSO 加入量的增加, O_2^- 的生成量逐渐达到饱和。

2.1.3 鲁米诺浓度对发光强度的影响: 固定 DMSO 的加入量和 NaOH 的浓度, 改变鲁米诺的浓度, 发现其发光强度随鲁米诺浓度的增加而增大。如图 1 所示, 当鲁米诺浓度为 0.18 mmol/L 时, 发光强度渐渐趋于稳定状态。

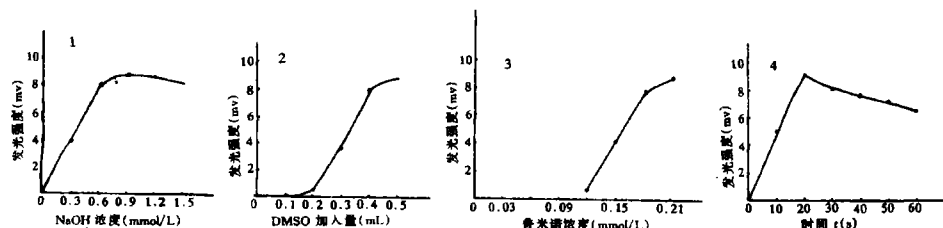


图 1 对发光强度的影响

1-NaOH 加入量 2-DMSO 加入量 3-鲁米诺浓度 4-反应时间

综合试验结果, 应用 DMSO-Luminol 发光体系研究培植牛黄对 O_2^- 的清除作用的最佳条件是: 反应时间 20 min, 0.6 mmol/L NaOH 溶液, DMSO 用量 0.3 mL~0.4 mL, 0.18 mmol/L 鲁米诺的 PBS 溶液。

2.2 培植牛黄对 O_2^- 的清除作用: 利用化学发光法, 已明显测出培植牛黄有清除超氧自由基 (O_2^-) 的能力。将培植牛黄原液稀释至一定量范围, 能够看出 O_2^- 致鲁米诺的发光强度随培植牛黄浓度的变化而改变。培植牛黄对 O_2^- 50% 清除率的剂量为 0.03 μ g/mL; V_E 是 O_2^- 的特异性清除剂, 其 50% 清除率的剂量为 2.0 μ g/mL。前者清除活性约为后者的 70 位 (见图 2)。

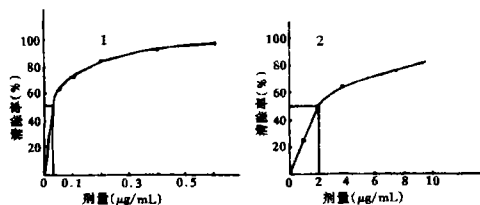


图 2 对 O_2^- 的清除作用

1-培植牛黄 2- V_E

已经研究证实, 培植牛黄是胆红素钙大分子聚合物沉积在粘蛋白上形成的复杂配合物, 这里主要存在胆红素类物质与粘蛋白间

2.1.4 反应时间对发光强度的影响: 二甲亚砷与 NaOH 反应产生 O_2^- 的过程是缓慢的, 为了找到该体系达到 O_2^- 最高浓度时的最佳反应时间, 分别在体系形成的 10、20、30、40、50 min 测其发光强度。由图 1 看到 20 min 产生的 O_2^- 浓度最大, 发光强度在 35 min~45 min 时体系趋于稳定状态。

的疏水结合作用, 也还存在氢键、静电力等相互作用^[4,5]。这些作用使得胆红素类物质的构象更加稳定, 大大抑制了 O_2^- 的释放, 从而稳定了培植牛黄本身存在的超氧自由基, 它们能起到自由基阱的作用。另外蛋白与胆红素钙结合时呈不对称, 使 C_{10} 上的氢裸露在外, 易被抽出形成自由基, 能阻断氧化反应的自由基链锁反应^[5,6], 也能俘获其他自由基, 其实质属自由基偶联的终止反应, 表现出了很强的清除 O_2^- 的能力, 因此可以认为培植牛黄具有断链型氧化剂的作用。DMSO 为非质子溶剂, 与溶于其中的培植牛黄构成疏水系统, 这与生物系统相似。就这个意义而言, 培植牛黄在机体内可起到内源性抗氧化剂的作用。这一研究结果为在分子水平上阐明牛黄的药理活性, 揭示新的作用机制, 提供了具有重要价值的信息。

参考文献

- 1 郑荣梁. 生物化学与生物物理进展, 1984, 1: 9
- 2 叶凤阁, 等. 吉林大学自然科学学报, 1995, 1: 74
- 3 Hyland K, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1981, 102(1): 531
- 4 赵琢道, 等. 生物化学与生物物理进展, 1987, 6: 55
- 5 Stocker R, et al. Science, 1987, 235: 1043
- 6 Stocker R, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5918

(1997-06-06 收稿)