

鲤鱼精巢 DNA 对自然衰老小鼠体内抗氧化酶活性的影响

中山医科大学药理学教研室(广州 510089)
中山大学生命科学院药理学系
广东药学院预防医学系卫生室

唐孝礼* 颜光美
许实波
周永红

摘 要 以自然衰老小鼠为实验对象,采用邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性、紫外分光光度法测定 CAT 活性、愈创木酚法测定 POD 活性、DTNB 直接比色法测定 GSH-Px 活性,研究了鲤鱼精巢 DNA 对老龄动物体内抗氧化酶活性的影响。结果表明,鲤鱼精巢 DNA 可明显提高自然衰老小鼠体内抗氧化酶的活性。

关键词 鲤鱼精巢 脱氧核糖核酸 抗氧化酶

Effects of Carp Spermary DNA on Some Oxidoreductase Activities
in Naturally Senile Mice

Tang Xiaoli, Xu Shibo, Zhou Yonghong, *et al.* (Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

Abstract Effects of carp spermary DNA on various oxidoreductase activities in naturelly senile mice were investigated. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured by means of pyrogallol auto-oxidation, ultraviolet spectrometry, guaiacol oxidation and DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) direct colorimetry, respectively. The results showed that DNA from carp spermary could enhance the activities of these enzymes in naturally senile mice.

Key words carp spermary deoxyribonucleic acid (DNA) naturally senile mice

鲤鱼既是一种常见食用鱼类,又是一种常用滋补中药,能利小便、去水气。据《食物本草备考》记载,鲤鱼能“消水肿、黄疸、脚气”,又能“安胎,治怀孕以后身肿”。雄性鲤鱼在发情期,它的精巢约占体重的十分之一,精巢的主要成分是核蛋白,由鱼精蛋白和脱氧核糖核酸(DNA)组成。鲤鱼精巢的药价值未见文献报道,为了科学合理地利用鲤鱼精巢,我们进行了鲤鱼精巢 DNA 的分离提取及其药理作用研究,发现鲤鱼精巢 DNA 的毒性极低,为实际无毒级物质^[1];小鼠服用鲤鱼精巢

DNA 后,对动物体内自身 DNA 的损伤具有明显的保护作用^[2];鲤鱼精巢 DNA 对果蝇和小鼠的生存寿命有显著的延长作用^[3]。本文报道鲤鱼精巢 DNA 对自然衰老小鼠体内抗氧化酶活性的影响。

1 实验材料

1.1 动物和样品:NIH 小鼠由广东省医学实验动物中心提供。DNA 由作者从鲤科鲤 *Cyprinus (Cyprinus) carpio haemtopterus* Temminck et Schlegel 的精巢中提取得到,经鉴定纯度为 96.52%,实验时用蒸馏水配

* Address: Tang Xiaoli, Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou
唐孝礼 男,1997 年 12 月毕业于中山大学生命科学院药理学系,博士学位,现在中山医科大学药理学教研室从事博士后研究工作,研究方向为衰老生物学和神经药理学。曾参加国家自然科学基金、广东省自然科学基金等多项科研课题,已发表论文 10 余篇。

成所需浓度的受试液。

1.2 试剂:Vit E,广州星群药业股份有限公司生产,批号 951208;邻苯三酚,沈阳化学试剂厂生产,批号 960514;还原型谷胱甘肽,购自 Serva 公司;5,5'-硫代对硝基苯甲酸,购自 Sigma 公司;愈创木酚,上海余山化工厂生产,批号 950117;三羟甲基氨基甲烷,购自 Merck 公司,其余均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 对超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响:选取 12 月龄健康 NIH 小鼠 40 只,雌雄各半,体重(34±3) g,随机分成 4 组,每组雌雄各 5 只。实验设空白对照组,DNA 高、低剂量组和 Vit E 阳性对照组。每天分别 ig 生理盐水,鲤鱼精巢 DNA 120、60 mg/kg,Vit E 120 mg/kg 1 次,给药体积为 0.25 mL/10 g 体重。各组小鼠在相同条件下常规饲养。连续给药 45 d 后,自小鼠眼眶取血,提取 SOD 测其活性,SOD 活性测定采用邻苯三酚自氧化法^[4]。同时选 2 月龄健康 NIH 小鼠雌雄各 5 只,同样取血提取 SOD 测活性,作青年小鼠对照组,结果见表 1。

表 1 鲤鱼精巢 DNA 对 SOD 活性的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

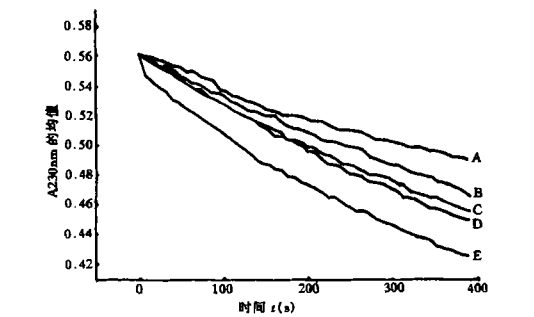
组别	剂量 (mg/kg)	SOD 活性 (U/mL)	提高率 (%)
青年小鼠空白对照	—	124.5±4.9***	—
老年小鼠空白对照	—	74.7±5.6	—
老年鼠 DNA 高剂量	120	103.4±5.3***	38.4
老年鼠 DNA 低剂量	60	99.3±6.1***	32.9
老年小鼠 Vit E	120	91.5±5.3***	22.5

与老年小鼠空白对照组比较:*** $P<0.001$

由表 1 可见,老龄小鼠红细胞中 SOD 活性比青年小鼠明显降低,其活力只有青年小鼠的 60%;老龄小鼠服用鲤鱼精巢 DNA 或 Vit E 后,其 SOD 活力明显提高。

2.2 对过氧化氢酶(CAT)活性的影响:动物分组及给药方法同实验 2.1。连续给药 30 d 后,每鼠眼眶取血 10 μ L,加入到 1.0 mL 蒸馏水中,制成全血溶血液;同时选 2 月龄健康 NIH 小鼠雌雄各 5 只,每鼠眼眶取血 10 μ L,

加入到 1.0 mL 蒸馏水中,制成同样浓度的溶血液,作青年小鼠对照组。CAT 活性测定采用紫外分光光度法^[5]。测试条件:温度 25℃,测试时间 400 s,间隔 8 s 测 1 次。以时间为横坐标、吸光度值 A_{230nm} 为纵坐标作图,得到 CAT 分解 H_2O_2 的速率曲线,结果见图 1。



A-老年小鼠空白对照; B-ig Vit E 120 mg/kg 的老年小鼠; C-ig 鲤鱼精巢 DNA 60 mg/kg 的老年小鼠; D-ig 鲤鱼精巢 DNA 120 mg/kg 的老年小鼠 E-青年小鼠空白对照

图 1 鲤鱼精巢 DNA 对 CAT 活性的影响

由图 1 可见,青年鼠的 CAT 分解 H_2O_2 的速度最快,老年空白对照鼠的 CAT 分解 H_2O_2 的速度最慢;老龄小鼠服用鲤鱼精巢 DNA 或 Vit E 30 d 后,其 CAT 活性明显提高,但仍然不及青年鼠;鲤鲤精巢 DNA 对 CAT 活性的提高作用强于 Vit E。

2.3 对过氧化物酶(POD)活性的影响:动物分组及给药方法同实验 2.1。连续给药 60 d 后,急性处死小鼠,每鼠取肝 200 mg,加 5 mL 预冷的 5%氯化钙于玻璃匀浆器中制成匀浆,于 4℃以 11 994×g 离心 20 min,上清液即为 POD 酶液;同时选 2 月龄健康 NIH 小鼠雌雄各 5 只作青年小鼠对照组,同样处理,制备 POD 酶液。POD 活性测定采用愈创木酚法^[4],结果见表 2。

由表 2 可见,老龄小鼠肝中 POD 活性比青年小鼠明显降低,其活力只有青年小鼠的 65.8%;老龄小鼠服用鲤鱼精巢 DNA 或 Vit E 后,其 POD 活力明显提高。

2.4 对谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的影响:动物分组及给药方法同实验 2.1。

连续给药 60 d 后,每鼠眼眶取血 10 μ L,用双蒸水稀释至 1.0 mL;同时选 2 月龄健康 NIH 小鼠雌雄各 5 只作青年小鼠对照组,每鼠眼眶取血 10 μ L,用双蒸水稀释至 1.0 mL。GSH-Px 活性测定采用 DTNS 直接比色法^[5,6],结果见表 3。

表 2 鲤鱼精巢 DNA 对 POD 活性的影响
($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	POD 活性 (U/mL)	提高率 (%)
青年小鼠空白对照	—	413.1 $\pm$ 25.6***	—
老年小鼠空白对照	—	271.7 $\pm$ 20.5	—
老年鼠 DNA 高剂量	120	361.1 $\pm$ 22.7***	32.9
老年鼠 DNA 低剂量	60	348.6 $\pm$ 21.2***	28.3
老年小鼠 Vit E	120	355.2 $\pm$ 23.4***	30.7

与老年小鼠空白对照组比较:*** $P<0.001$

表 3 鲤鱼精巢 DNA 对 GSH-Px 活性的影响
($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	GSH-Px 活性 (U/mL)	提高率 (%)
青年小鼠空白对照	—	28.3 $\pm$ 2.1***	—
老年小鼠空白对照	—	16.3 $\pm$ 1.8	—
老年鼠 DNA 高剂量	120	22.9 $\pm$ 1.9***	40.5
老年鼠 DNA 低剂量	60	21.4 $\pm$ 1.8***	31.3
老年小鼠 Vit E	120	22.7 $\pm$ 2.2***	39.3

与老年小鼠空白对照组比较:*** $P<0.001$

由表 3 可见,老龄小鼠血中 GSH-Px 活性比青年小鼠明显降低,其活力只有青年小鼠的 57.6%,老龄小鼠服用鲤鱼精巢 DNA 或 Vit E 后,其 GSH-Px 活力明显提高。

3 讨论

SOD、CAT、POD、GSH-Px 是动物机体内的抗氧化酶,其作用是清除自由基,防止自由基对细胞结构的损伤,它们的活性随着年龄的增长而下降,因此是老化负相关酶,测定

它们的活性可以反映动物的衰老状况。随着年龄的增长,抗氧化酶清除活性氧自由基的能力逐渐下降,从而引起活性氧自由基及脂质过氧化产物日益增多,最终导致机体衰老和老年性疾病的发生^[7]。抗氧化酶的增龄性失活可能是由于编码抗氧化酶的基因及抗氧化酶本身受到自由基损伤所致^[8,9],老龄动物机体内由于抗氧化酶活力不足,细胞生命活动过程中产生的自由基不能得到有效的清除,自由基不断损伤细胞的结构,损伤的不断积累最终导致细胞衰亡和动物机体的衰老。老龄小鼠服用鲤鱼精巢 DNA 一段时期以后,其体内的 SOD、CAT、POD、GSH-Px 活性均显著提高,因而其衰老的速度得到一定程度的遏制。鲤鱼精巢 DNA 提高老龄小鼠体内抗氧化酶的活性的机制,可能是它能直接清除自由基,减少自由基对抗氧化酶的损伤,也可能是增加了抗氧化酶的表达,其具体作用机制正在研究之中。

参考文献

1 唐孝礼,等. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(增刊):74
2 唐孝礼,等. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(4):125
3 唐孝礼,等. 中国老年学杂志,1999,19(2):101
4 陈 勤主编. 抗衰老研究实验方法. 北京:中国医药科技出版社,1996:458,501
5 荣征星,等. 生物化学与生物物理进展,1994,21(4):362
6 柯雪红,等. 中国老年学杂志,1997,17(4):205
7 Jung K, et al. Free Radic Biol Med, 1996,20(4):613
8 Hayakawa M, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1996,226(2):369
9 Filser N, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 233(1):102

(1999-03-28 收稿)

(上接第 562 页)
(MeOH-CHCl₃), C₃₀ H₄₈ O₄, FABMS m/z: 471(M-H)⁺. ¹H 和 ¹³C NMR 数据和文献报道合欢酸的一致^[5]。

化合物 VII:无色块状结晶, mp272℃~274℃(MeOH),经薄层层析对照和已知标准品豆甾醇葡萄糖苷一致。

参考文献

1 中国植物志编委会. 中国植物志. 第七十四卷. 北京:科学出版社,1985:296
2 郭济贤,等. 中成药研究,1987,8:30
3 Markham K R, et al. Tetrahedron, 1978,34:1389
4 Farkas L, et al. Phytochemistry, 1976,15:215
5 Akai E, et al. Chem Pharm, Bull 1985,33(9):3715

(1998-11-18 收稿)