

鲤鱼精巢 DNA 对自由基的清除作用

广东药学院预防医学系(广州 510224) 周永红*

中山医科大学药理学教研室

中山大学生命科学学院药理学系

周永红*

唐孝礼 颜光美

许实波

摘要 目的:研究鲤鱼精巢 DNA 对自由基的清除作用。方法:采用化学发光法测定鲤鱼精巢 DNA 对 Cu^{2+} -Vit C- H_2O_2 发光体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用,采用分光光度法检测鲤鱼精巢 DNA 对大鼠腹腔多形核白细胞(PMNs)呼吸爆产生 O_2^- 自由基的清除作用,采用电子自旋共振(ESR)法测定鲤鱼精巢 DNA 对 DPPH 有机自由基的清除作用。结果:鲤鱼精巢 DNA 使 Cu^{2+} -Vit C- H_2O_2 发光体系的发光计数率降低,使 PMNs 呼吸爆产生 O_2^- 自由基的数量减少,使 DPPH 的特征波峰逐渐降低直至消失。结论:鲤鱼精巢 DNA 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基、 O_2^- 自由基和有机自由基均有显著的消除作用。

关键词 鲤鱼 精巢 脱氧核糖核酸 自由基

Scavenging Action of DNA from Carp Spermary on Free Radicals

Department of Preventive Medicine, Guangdong College of Pharmacy (Guangzhou 510224) Zhou Yonghong

Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Tang Xiaoli and Yan Guangmei

Department of Pharmacy, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University Xu Shibao

Abstract To investigate whether DNA from carp spermary scavenges free radicals. Chemical luminescence, spectrometry and electronic spin resonance (ESR) methods were used to measure the scavenging action of deoxyribonucleic acid (DNA) from carp spermary on $\cdot\text{OH}$ radical produced by Cu^{2+} -Vit C- H_2O_2 chemoluminescent system, O_2^- radical produced by the breathing burst of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and DPPH radical respectively. DNA from carp spermary scavenged $\cdot\text{OH}$ radical produced by Cu^{2+} -Vit C- H_2O_2 chemoluminescent system, O_2^- radical produced by the breathing burst of PMNs and DPPH radicals. It could be concluded that DNA from carp spermary scavenges free radicals.

Key words carp spermary deoxyribonucleic acid free radicals

鲤鱼既是一种常见食用鱼,又是一种常用滋补中药,性平,味甘。归脾、肾经。具有利水、消肿、下气、通乳之功效。常用于水肿胀满、脚气、黄疸、咳嗽、气逆、乳汁不通。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。鲤鱼精巢的药用价值未见文献报道,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;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^[1];鲤鱼精巢 DNA 对果蝇和小鼠的生存寿命有显著的延长作用^[2]。本实验研究鲤鱼精巢 DNA 对自由基的清除作用。

1 实验材料

1.1 动物和样品:SD 大鼠由广东省医学实验动物

中心提供。鲤鱼精巢 DNA 由作者从鲤科鲤 *Cyprinus carpio* Linnaeus 的精巢中提取得到,纯度为 96.52%,实验时用蒸馏水配成所需浓度的受试液。

1.2 主要试剂和仪器:Vit E 购自广州星群药业股份有限公司;糖原, Serva 公司;台盼蓝, Sigma 公司;二苯代苦味酰基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DHHP),日本关东化学株式会社;酵母多糖, Sigma 公司;其余均为市售分析纯试剂。7550 分光光度计,惠普上海分析仪器有限公司;TGL-5 型离心机,上海安亭科学仪器厂;GL20C 高速冷冻离心机,中国科学院武汉科学仪器厂;生物超弱发光仪,中国科学院生物物理研究所;JES-FEIXG 电子自旋共振波谱仪,日本岛津制作所。

1.3 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用:采用化学发光法测定鲤鱼精巢 DNA 对 Cu^{2+} -Vit C- H_2O_2 发光体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用^[3]。反应在 50

* Address: Zhou Yonghong, Department of Preventive Medicine, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou
周永红 女,广东药学院预防医学系实验师,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。

mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中进行,以酵母扩增化学发光强度,反应体系总体积 2 mL,其中含 Vit C 90 μ mmol/L、CuSO₄ 360 mmol/L、酵母 50 mg/mL、H₂O₂ 15 mmol/L 及一定浓度受试药或等体积溶媒。H₂O₂ 最后加入,立即于生物超弱发光仪上测定 30 min 内反应体系发光强度的变化。测定时室温 23.6 $^{\circ}$ C,管温-11.9 $^{\circ}$ C。结果统计:记录各管第 30 分钟时的发光计数率,作组间 *t* 检验。

1.4 对 O₂⁻ 自由基的清除作用:采用分光光度法检测鲤鱼精巢 DNA 对大鼠腹腔多形核白细胞 (PMNs)呼吸爆发生 O₂⁻ 自由基的清除作用^[4]。取体重 250~300 g 的健康 SD 大鼠,雄性,ip 1%糖原生理盐水 20 mL,4 h 后吸取大鼠腹腔液,以 10 mmol/L PBS(pH7.4,含肝素 20 U/mL)洗涤 2 次,每次以 800×g 离心 5 min,用 PBS 将沉淀配成 10⁷ CFU/mL 的 PMNs 悬浮液。以台盼蓝染色检查 PMNs 成活率>95%,采用 10 mmol/L PBS, pH 7.4,反应体系总体积 1 mL,内含 PMNs 5×10⁶ CFU,羟胺 2 mmol/L 及一定浓度的受试药,37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min。加调理化酵母多糖 0.1 mL,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,冰水浴终止反应,800×g 离心 5 min。取上

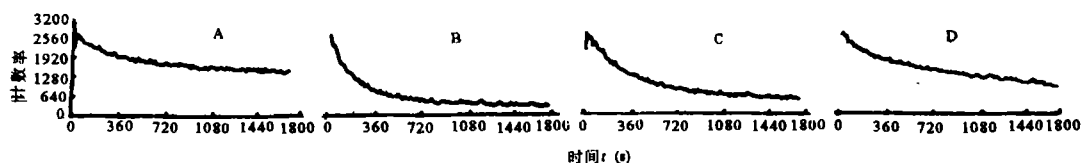
清液 0.5 mL,加 10 mmol/L PBS、17.26 mmol/L 对氨基苯磺酸、7 mmol/L 茶胺各 0.5 mL,摇匀,室温静置 20 min,以试剂空白管调零,测波长 530 nm 处的吸光度值(A_{530nm}),O₂⁻ 自由基的量由亚硝酸钠标准曲线计算求得。

1.5 对有机自由基的清除作用:DPPH 是一种稳定的有机自由基,常用于天然抗氧化剂的筛选。DPPH 用无水酒精溶解,反应体系总体积为 1 mL,其中含 30 μ mmol/L DPPH 及一定浓度受试药或等体积溶媒,25 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后,用测定管吸取 10 μ L 反应液于 JES-FEIXG 电子自旋共振波谱仪测 DPPH 的 ESR 波谱^[6]。

2 结果

2.1 对 $\cdot$ OH 自由基的清除作用:结果(图 1)表明,鲤鱼精巢 DNA 对 Cu²⁺-Vit C-H₂O₂ 发光体系产生的 $\cdot$ OH 自由基有显著的清除作用。DNA 1.2,0.3 mg/mL 对 $\cdot$ OH 自由基的清除率分别为 81.8% (*P*<0.001),72.7% (*P*<0.001);0.25 mg/mL Vit E 对 Cu²⁺-Vit C-H₂O₂ 发光体系产生的 $\cdot$ OH 自由基的清除率为 26.4% (*P*<0.05)。

2.2 对 O₂⁻ 自由基的清除作用:结果(表 1)表明,鲤



A-空白对照; B-鲤鱼精巢 DNA 1.2 mg/mL; C-鲤鱼精巢 DNA 0.3 mg/mL; D- Vit E 0.25 mg/mL

图 1 鲤鱼精巢 DNA 对 Cu²⁺-Vit C-H₂O₂ 发光体系产生的 $\cdot$ OH 自由基的清除作用(*n*=3)

鱼精巢 DNA 对大鼠 (PMNs)呼吸爆发生 O₂⁻ 自由基有显著的清除作用。250,25,2.5 μ g/mL DNA 的清除率分别为 53.45% (*P*<0.001),35.56%

(*P*<0.01),22.63% (*P*<0.05)。50 μ g/mL Vit E 的清除率为 43.75% (*P*<0.01)。

2.3 对有机自由基的清除作用:结果(图 2)表明,

表 1 对 PMNs 呼吸爆发生 O₂⁻ 自由基的清除作用($\bar{x}\pm s$,*n*=6)

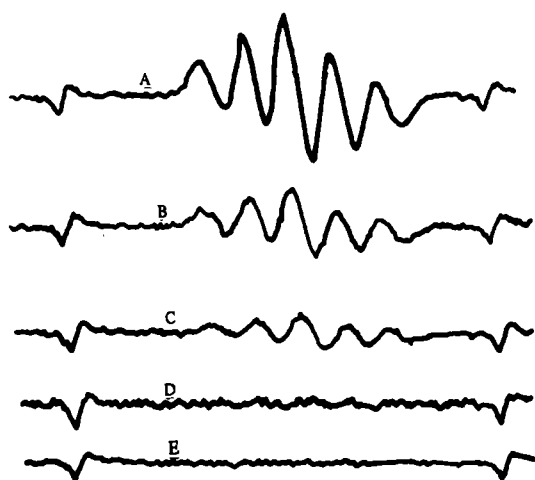
组别	浓度 (μ g/mL)	A _{530 nm}	O ₂ ⁻ (nmol)	清除率 (%)
空白对照	—	0.064±0.012	46.4±7.3	—
鲤鱼精巢 DNA	250	0.031±0.009***	21.6±5.5***	53.45
	25	0.042±0.011**	29.9±6.6**	35.56
	2.5	0.050±0.013	35.9±8.1*	22.63
Vit E	50	0.037±0.014**	26.1±8.8**	43.75

与空白对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001

鲤鱼精巢 DNA 对 DPPH 自由基有显著的清除作用,随着 DNA 浓度的增大,DPPH 的 ESR 特征波峰逐渐变低,当 DNA 的浓度已达到 250 μ g/mL 时,DPPH 的 ESR 特征波峰全部消失,表明此时 DPPH 自由基已被全部清除;20 μ g/mL Vit E 也可将 DPPH 自由基全部清除。

3 讨论

自由基是带有不配对电子的原子或分子,自由基在体内的过量积累,可以破坏细胞正常代谢功能,引起类脂质的过氧化反应,促使 DNA、RNA 突变,导致蛋白质交联,从而引起许多与年龄相关的疾病,如白内障、动脉硬化、肿瘤、糖尿病、胃肠道慢性炎



A-空白对照; B-鲤鱼精巢 DNA 2.5 µg/mL ($P < 0.001$);
C-鲤鱼精巢 DNA 25 µg/mL ($P < 0.001$); D-鲤鱼精巢 DNA
250 µg/mL ($P < 0.001$); E-Vit E 20 µg/mL ($P < 0.001$)

图2 鲤鱼精巢 DNA 清除 DPPH 自由基
的 ESR 图谱 ($n=3$)

症、皮肤老化、软骨病变、神经功能失调等的产生和加速衰老进程^[6~9]。

自由基的测定方法有分光光度法、高效液相色谱(HPLC)法、化学发光法、电子自旋共振(ESR)波

谱法等。我们采用化学发光法检测鲤鱼精巢 DNA 对 Cu^{2+} -Vit C- H_2O_2 发光体系产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除作用,分光光度法检测鲤鱼精巢 DNA 大鼠(PMNs)呼吸爆发产生的 O_2^- 自由基的清除作用,采用 ESR 波谱法检测鲤鱼精巢 DNA 对 DPPH 有机自由基的清除作用,结果表明鲤鱼精巢 DNA 对这 3 种自由基均有显著的清除作用。因此,鲤鱼精巢 DNA 对机体内自由基的清除作用是其抗衰老作用的重要机制之一。

参考文献

- 唐孝礼,许实波,周永红. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(增刊):74;37(4):125
- 唐孝礼,周永红,颜光美,等. 中国老年学杂志,1999,19(2):101
- 陈勤主编. 抗衰老研究实验方法. 北京:中国医药科技出版社,1996:501
- 辛洪波,张宝恒. 药学报,1993,28(3):161
- 许士凯主编. 抗衰老药理学. 北京:中国医药科技出版社,1994:201
- Dean R T, Fu S, Stocker R, *et al.* Biochem J, 1997,324 (Pt1):1
- Kim K B, Lee B M. Cancer Lett, 1997, 113(1-2):205
- Stohs S J. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 1995,6(3-4):205
- Knight J A. Ann Clin Lab Sci,1997,27(1):11

(2000-02-20 收稿)

梦醒安神片的药理研究

吉林省中医中药研究院中药研究所药理室(长春 130021) 金春花* 王英军 姜秀莲

摘要 采用小鼠激怒打斗、“失望”行为及平衡运动,去水吗啡攀爬行动、大鼠定型活动、苯丙胺引起小鼠自发活动增强及小鼠脑中多巴胺含量的变化等实验,观察梦醒安神片的主要药效学作用,实验结果表明梦醒安神片明显减少小鼠激怒打斗次数,使小鼠“失望”不动时间延长,显著抑制动物的攀爬行动,使动物定型活动次数减少,明显减少苯丙胺引起的亢进小鼠的自主活动次数,明显减少小鼠脑中多巴胺的含量。表明梦醒安神片有明显安定作用,对多巴胺系统亢进功能有明显抑制作用。

关键词 梦醒安神片 安定作用 多巴胺系统亢进功能

梦醒安神片为一中药复方,由黄连、胆南星、丹参等组成。根据中医理论,用清火豁痰,理气安神法治疗狂病,西医诊断为反应性精神病、精神分裂症等躁动型。在临床试用,颇受患者欢迎,为验证其药效,我们进行了梦醒安神片的主要药效学研究。

1 实验材料

1.1 药物:梦醒安神片药粉由吉林市中药厂提供,批号 940606,3.6 g 生药/1 g 粉,每克含盐酸小檗碱不低于 20 mg,临用时取 8,4,2 g 药粉均溶至 20 mL

蒸馏水中,配成 40%、20%、10% 的浓度,以 0.2 mL/10 g 的剂量给小鼠 ig。礞石滚痰丸由天津达仁堂制药厂提供,批号:910803。苯丙胺由国家麻醉品实验室生产,去水吗啡由沈阳第一制药厂生产。

1.2 动物:健康昆明种小鼠,体重 18~22 g,健康 Wistar 大鼠,体重 180~200 g,雌雄各半,由吉林省中医中药研究院动物室提供。

2 实验方法与结果

2.1 梦醒安神片对小鼠激怒打斗、“失望”行为及平

* Address: Jin Chunhua, Institute of Chinese Materia Medica, Jilin Academy of TCM, Changchun