

简 报

大鼠肝脏的四种抗过氧化酶类的活性与鼠龄的关系*

段有金 王维哲 李芳生

(辽宁省基础医学研究所, 沈阳 110005)

关键词 谷胱甘肽过氧化物酶, 单体谷胱甘肽过氧化物酶, 谷胱甘肽转硫酶, 超氧化物歧化酶

近年来的研究证实不少疾病的起因和老化的发生均与自由基和脂质过氧化的作用有关, 因而一些与自由基和脂质过氧化物的正常代谢密切相关的抗过氧化酶类的研究越来越受到生物学家和医学家的重视。虽然对于抗过氧化酶类的化学和生物学特性^[1]及与某些疾病发病的关系^[2]都作了较为详尽的研究, 但对于生物年龄与这些酶类活性的关系的研究还很少报道。本文报道了四种抗过氧化酶类与鼠龄的关系。

材 料 与 方 法

一、实验材料

实验动物是 Wistar 种系相同动物室常规饲料饲养的雄性大鼠, 每组 6 只。磷脂酰胆碱二亚油酸 (Avanti Polar Lipids 公司), 谷胱甘肽还原酶 (Sigma Chemical 公司), NADPH 和 GSH (Kohjin 公司)。其余试剂均为分析纯。

二、实验方法

1. 肝匀浆的制备 脊椎脱臼法处死大鼠。用冷 0.9% NaCl 洗净肝脏血液后用同液作完全透析。按 1:9 (W/V) 加入缓冲液 (25mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.175mol/L KCl) 用组织捣碎机 (10000r/min) 制成 10% 的匀浆后以 600g 离心 10min 作为组织匀浆液。

2. 磷脂酰胆碱二亚油酸氢过氧化物的制备 取磷脂酰胆碱二亚油酸于迴旋蒸发器中, 在 N_2 流下制成薄膜, 在避光处放置 72h 后溶于甲醇中。按共轭双键的紫外吸收法^[3]测定其氢过氧化物浓度。用 HPTLC 确定其纯度, 排除含自由脂肪酸氢过氧化物。使用前保存于 -40°C 。

3. 单体谷胱甘肽过氧化物酶 (M-GSH-Px) 的测定 按 Duan 等人的酶联分光光度计法^[4]。反应液含有: 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 20 mmol/L

EDTA, 1.5mmol/L NaN_3 , 5.0mmol/L GSH, 0.25 mmol/L NADPH, 0.6U/ml 谷胱甘肽还原酶, 0.1% Triton X-100, 80nmol/ml 磷脂酰胆碱二亚油酸氢过氧化物和一定量样品, 总容量为 1.0ml。在 37°C 下用岛津 UV 265FW 自动计录分光光度计在 340nm 处观察光吸收的下降。

4. 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性的测定 按 Wendel 的酶联分光光度计法^[5]。反应液含有: 0.1mol/L K-PO_4 , pH 7.0, 1.5mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L NaN_3 , 1.0 mmol/L GSH, 0.25 mmol/L NADPH, 0.6 U/ml 谷胱甘肽还原酶, 0.25 mmol/L H_2O_2 和适量样品, 总容量为 1.0ml。在 37°C 下用上述光度计在 340nm 处观察光吸收下降。

5. 谷胱甘肽转硫酶 (GST) 活性测定 按 Habig 等人的分光光度计法^[6]。反应液含有: 50mmol/L K-PO_4 , pH 6.5, 1.0mmol/L GSH, 1.0 mmol/L 1-氯 2,4-二硝基苯 (CDNB) 和适量样品, 总容量为 1.0ml 在 25°C 下用上述光度计在 340nm 处观察光吸收的上升值。

6. 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定 按联苯三酚自氧化紫外法^[7]。反应液含有: 50mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 0.1mmol/L 联苯三酚和适量样品提取液, 总容量为 5.0ml 反应温度为 25°C , 自氧化速率控制在 0.070 OD/min。酶活性单位是在 1.0ml 反应液中每 min 抑制联苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量。

7. 蛋白定量按 Lowry 等人的方法^[8]

结 果 与 讨 论

图 1 表示在不同鼠龄大鼠肝脏中 4 种抗过氧化酶

* 系国家自然科学基金资助课题。

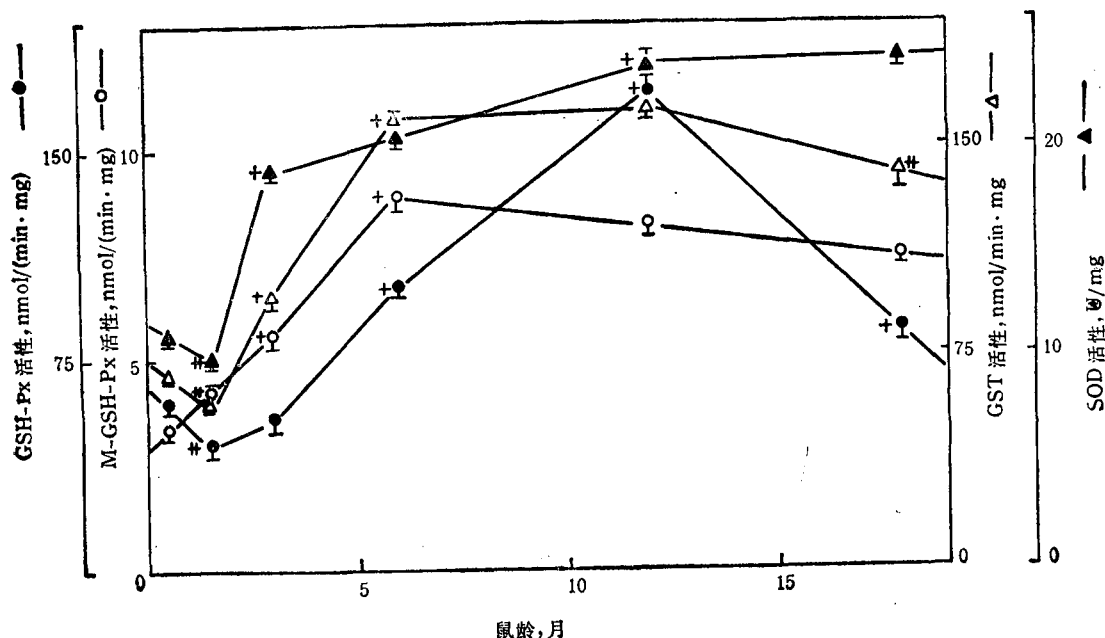


图1 四种抗过氧化酶活性随鼠龄的变化

图中各种酶活性的数值为 $M \pm SE (N = 6)$, 经方差分析: M-GSH-Px, $F = 100.3$, $P < 0.01$; GSH-Px, $F = 23.5$, $P < 0.01$; GST, $F = 91.4$, $P < 0.01$, SOD, $F = 273.6$, $P < 0.01$.

+ 表示与前一年龄组相比 $P < 0.01$ (t 值检验) ++ 表示与前一年龄组相比 $P < 0.05$ (t 值检验)

类活性的变化。经方差分析所有酶活性在 6 个年龄组均数间的差别都有非常显著意义。M-GSH-Px 活性在 6 个月内呈明显上升趋势, 从 6 个月到 18 个月呈逐渐下降趋势。GSH-Px 的活性在 15 天时略高于 1.5 个月, 之后到 12 个月呈明显上升, 在 18 个月时则明显低于第 12 个月。GST 的活性变化在 6 个月以前与 GSH-Px 活性变化相同, 12 个月与第 6 个月时相同, 12 个月以后呈下降趋势。SOD 活性在第 6 个月以前的变化与 GSH-Px 和 GST 相同, 从第 6 个月后呈轻度上升趋势。

GSH-Px 是 Mills 在 1957 年首次发现的^[9], 在 1973 年 Rotruck 等人^[10]证实该酶是含硒酶, 其活性与硒水平相平行。M-GSH-Px 是 Duan 等人^[4]在 1988 年首次报道的, 根据我们的实验结果(尚未发表)证实该酶可能是一种含硒酶。虽然 GSH-Px 和 M-GSH-Px 都是依赖于 GSH 的, 但前者作用于 H_2O_2 和自由基脂肪酸氢过氧化物, 而后者则主要作用于构成生物膜的主要脂质-磷脂的过氧化物, 它对于维护生物膜的正常功能, 避免过氧化伤害起着非常重要的作用。GST (EC 2.5.1.18) 是 60 年代初被证实存在于生物体内具有解毒功能的酶类^[11]。在 70 年代末被证实具有 GSH-Px 活性^[12]。SOD (EC 1.15.1.1) 是 McCord 和 Fridovich^[13]在 1969 年首次从牛红细胞中发现的一类金属酶, 能催化超氧化物自由基 (O_2^-) 发生歧化

反应以防御氧的毒性。综上所述这四种酶都是机体抗自由基和过氧化伤害方面具有非常重要意义的酶类。

本次实验结果表明, 这四种酶活性在幼鼠体内较低, 在中青年鼠中较高, 而在老年鼠体内低下 (SOD 除外), 这使我们对某些与过氧化有关的疾病的发病年龄有了新的认识。例如在我国某些地区存在着克山病和大骨节病, 这些疾病主要发生在低硒地区, 过氧化增强是其发病的原因之一^[14]。而这些疾病主要发生在幼儿和儿童阶段。另一些疾病如冠心病、癌症和白内障等则易发生在老年人。这些似乎都与这些年龄段抗过氧化酶类的活性低下有关。

人类机体的衰老是一个很复杂的过程, 有许多学说阐明机体衰老机理, 其中自由基学说近年最引人注意。由于机体衰老时自由基产生增多^[2], 而一些清除自由基的酶类活性降低, 使过剩的自由基对机体造成伤害导致衰老。我们的实验结果为此学说提供了证据。这次实验 SOD 活性在第 18 个月时没有降低, 并不完全说明该酶活性在老化阶段不降低, 如果用年龄更大的大鼠做实验, 也许会出现不同的结果, 同时其它酶活性也可能会降低的幅度更大。因此进一步的研究是很有必要的。

参考文献

- 1 方允中, 李文杰编: 自由基与酶, 北京: 科学出版社,

He-Ne 激光照射奥利亚罗非鱼对其生长和生化特性的影响

谢瑞生 章之蓉 胡夏阳*

(中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

关键词 激光照射, 罗非鱼, 酶, 体长, 体重

近几年, 我们研究了激光对水生生物繁殖、生长、抗病、遗传的影响。希望为水产养殖新技术提供理论依据。本文探讨了激光照射罗非鱼后对其体长、体重及三种酶的影响。

实验材料与方法

1. 照射方法

取同批同胎奥利亚罗非鱼 (*Tilapia aurea*) 仔鱼, 平均体长 12.5mm, 平均体重 0.07g。将罗非鱼随机分为四组, 每组各 60 条鱼, 量长称重, 饲养四天后, 开始分组用 He-Ne 激光(波长为 6328 Å)照射。鱼放在特制的器具中, 激光束经导向仪在固定距离下进行照射, 保证照射部位为头部、侧线部。功率为 0mW, 8mW, 12mW, 15mW (即 B₀, B₁, B₁₂, B₁₅), 持续时间均为 1min。照射次数为每隔 5 天一次, 共 90 天, 每隔 10 天测体长、体重, 求平均值。在整个实验中, 投饵量、光照、温度、充氧等饲养条件一致。

2. 激光器

He-Ne 激光器有效光斑直径为 0.6 cm, 最大输出功率 38mW, 输出功率可通过管腔准直微调调节。He-Ne 为连续激光, 稳定度高, 照射 4 小时不发生明显改变。

3. 生化研究方法

经激光照射, 饲养 90 天后的罗非鱼, 迅速冷冻于低温冰箱, 以备生化研究。

(1) 细胞色素 c 的制备及产率测定: 按文献

[1]。产率测定用铁氰化钾法; 蛋白质测定用 Folin 酚法。产率定为每克鲜组织中所含细胞色素 c 的毫克数 (mg/g)^[1]。

(2) 过氧化物酶的制备及活力测定: 将捣碎组织用蒸馏水低温搅拌抽提, 硫酸铵分级盐析、透析等。测定用愈创木酚法^[2] (1 活力单位 = 每分钟 OD₄₇₀ 增加 0.001 所需酶量)。

(3) 碱性磷酸酶的制备及活力测定: 将罗非鱼加 0.01mol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液捣碎, 加入 20% (V/V) 正丁醇匀浆抽提, 硫酸铵分级盐析、透析后用于分析测定。活力测定采用磷酸苯二钠-氨基萘替比林法^[3-4]。[1 活力单位 = 1 分钟内转化 1 分子底物 (酚) 所需酶量]。

(4) He-Ne 激光直接照射碱性磷酸酶: 取碱性磷酸酶匀浆液及透析液(纯化约 100 倍) 0.5ml, 置于短试管中, 试管固定于冰浴中, 激光以一定角度由上射入。

实验结果

1. 体长和体重

不同时期、不同功率激光照射与未照射组体长差异的结果见表 1, 其体重的差异结果见表 2。从表 1、表 2 看出, 激光照射组鱼的体长、体重比未照射组增长显著, 进行显著性检验, 结果全部通过 [$F_{(29, 29)}(0.05) =$

* 89 级硕士研究生毕业, 现在广州市医药工业研究所。

1989; 71—161

2 方允中, 李文杰编: 自由基与酶, 北京: 科学出版社, 1989; 193—303

3 Pryor W A, Castle L. *Method in Enzymology*, New York: Acad Press, 1984; 105: 293

4 Duan Y J *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 19003

5 Wendel A. *Method in Enzymology* New York: Acad Press, 1981; 77: 325

6 Habig W H *et al. J Biol Chem*, 1974; 249: 7130

7 邹国林, 生物物理与生物化学进展, 1986; 4: 71

8 Lowry O H *et al. J Biol Chem*, 1951; 193: 265

9 Mills G C. *J Biol Chem*, 1957; 229: 189

10 Rotruck J T *et al. Science*, 1973; 179: 588

11 Booth J *et al. Biochem J*, 1961; 79: 516

12 Prohaska J R, Ganther H F. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977; 76: 437

13 Mccord J M, Fridovich I J. *J Biol Chem*, 1969; 244: 6049

14 李芳生. 中国地方病学杂志, 1985; 4: 1

[本文于 1990 年 1 月 31 日收到, 4 月 20 日修回]