

表3结果表明,高脂模型组与空白对照组之间动脉硬化指数存在极其显著( $p < 0.001$ )差异,高脂血症模型建立;与高脂模型组比较,中剂量和高剂量红枣汁组小鼠动脉硬化指数分别存在显著( $p < 0.05$ )或极显著( $p < 0.01$ )差异,表明它们具有抑制高脂饲料小鼠动脉硬化指数升高的作用。

### 3 讨论

本试验通过给高脂饲料小鼠饮用不同浓度的红枣汁后,结果表明中剂量的红枣汁(15%)即可有明显降血脂和降低动脉硬化指数的作用。至于其功能成分及降脂机理,有待于做进一步更细致的实验研究。

参考文献:

- [1] 张清安. 柿霜成份研究及柿霜、柿霜红枣粉减肥功能初探[D]. 陕西师范大学硕士研究生学位论文, 2002.
- [2] 凌关庭. 保健食品原料手册[M]. 化学工业出版社, 2002. 2.
- [3] 王继贵. 临床生化检验[M]. 湖南科技出版社, 1996. 7.
- [4] 傅剑云, 夏勇, 吴蕙岭等. 银杏叶提取液对大鼠血脂水平的影响[J]. 营养学报, 1999, 21(3): 347-348.
- [5] 吴小南, 汪家梨. 柿叶茶抗氧化、降血脂保健作用的初步实验[J]. 食品科学, 1998, 19(11): 39-41.
- [6] 卫生部卫生监督司. 保健食品功能学评价程序和检验方法[M]. 北京, 1996. 11.
- [7] 李向红, 袁秀玲, 吴开国等. 螺旋藻对高脂饲料大鼠血脂水平的影响[J]. 营养学报, 1996, 18(2): 206.

## 大蒜细胞溶质中超氧化物歧化酶的性质研究

谢岩黎<sup>1</sup>, 李元瑞<sup>1</sup>, 张广彬<sup>2</sup>, 谷瑞芳<sup>2</sup>, 魏国翔<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

(2. 河南职业技术师范学院食品科学与工程系, 新乡 453003)

**摘要:** 利用热变性、等电点沉淀和 DEAE-纤维素柱层析分离纯化大蒜细胞溶质中的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD), 并对其性质进行了研究。结果表明: 温度 40~60℃、pH4~9 范围内酶的活性稳定对 KCN 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感紫外光区的吸收峰在 258nm, 可见光区的吸收峰在 680nm, 表明酶的类型可能是 Cu·Zn-SOD。

**关键词:** 大蒜细胞溶质, 超氧化物歧化酶, 性质

**Abstract:** A superoxide dismutase from *Allium Sativum* plasma has been isolated and purified by the heat treatment, sedimentation with isoelectric point and chromatograph on DEAE-cellulose, and its property was studied. The study shows that the enzymatic activity is stable within the temperature 40~60℃ and pH 4~9. And the enzyme is sensitive to KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the absorption apex exhibits at 258nm in ultraviolet spectrum and at 680nm in visible spectra, the facts indicate that the enzyme is copper/zinc SOD.

**Key words:** *allium sativum* plasma; superoxide dismutase; property

中图分类号: TS201.2+5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)04-0140-03

1969年 Mccord 和 Fridovich 从牛血红细胞中发现了一种专一清除超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)的关键酶, 并命名为超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, EC. 1. 15. 1. 1)<sup>[1]</sup>。此后, 关于 SOD 的性质、结构及纯化的研究及应用开发日益深入发展, 同时也促进了自由基生物学的发展。

大蒜为百合科葱属植物蒜(*Allium Sativum*)的磷茎, 近年来国内外研究表明大蒜具有保护心血管系统、抗肿瘤、保护肝脏、调节血糖水平、提高免疫功能、清除

自由基、抗炎等功能; 大蒜还是含 SOD 丰富的天然植物之一。SOD 具有清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 有效地预防 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 对机体的毒害作用, 从而具有抗衰老、抗炎、抗肿瘤及抗辐射等功能, 在保健品、医药和化妆品中具有重要的应用价值。SOD 作为药用酶在美国、德国、澳大利亚等已有产品, 商品名有 orgotein、ormetein、outosein 等, 这些产品均为修饰酶, 其配方由于专利关系未公开发表<sup>[2]</sup>。在国外, SOD 在临床上应用是广泛的, 但主要是作为针剂肌肉或静脉注射, 如作为新型抗炎症药物治疗关节炎

收稿日期: 2002-04-15

作者简介: 谢岩黎(1971-), 女, 讲师, 主要从事营养学和功能因子方向的研究。

和类风湿关节炎;因 SOD 能有效地抑制淋巴细胞染色体的断裂速度,在治疗自身免疫性疾病上有较好的效果;SOD 还能有效地抑制化疗引起的骨髓损伤和白血球减少。

国内 SOD 的研究相对滞后,国内的产品较少。20 世纪八十年代主要是 SOD 的功能研究。进入九十年代以后, SOD 的研究深入发展,其性质和分离纯化进入了一个新的阶段。可以预测,在未来发展中,除了临床应用研究, SOD 在保健品、化妆品的应用将成为一个趋势。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和主要试剂

大蒜(市售)、连苯三酚(遵义化工厂生产)、磷酸钾缓冲液(分析纯)、巯基乙醇(化学纯)、DEAE-纤维素(Whatman 产品)。

### 1.2 主要设备

UV-11000 紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司紫外生化部)、高速冷冻离心机(Beckman)、恒温水浴(江苏国华仪器厂)、酸度计、多功能加工机。

### 1.3 酶活力测定方法

改良的连苯三酚自氧化法。酶活性单位采用 1ml 反应液中每分钟抑制连苯三酚自氧化速度达 50% 时的酶定量为一个活力单位<sup>[3]</sup>。

### 1.4 大蒜细胞溶质中 SOD 分离和纯化

#### 1.4.1 粗酶液的制备

取 500g 大蒜鳞茎加 750ml pH7.8 50mmol 磷酸钾缓冲液(含 1mmol EDTA, 0.01% 巯基乙醇)匀浆,浸提 1h 纱布过滤。滤液经 12000r/min 离心 20min,上清液即为大蒜细胞溶质 SOD 粗酶液。

#### 1.4.2 热变性除杂蛋白

将粗酶液在 45~85℃ 温度范围内进行热变性除杂蛋白,同时以酶活力和上清液蛋白质的总量作为评价指标。

#### 1.4.3 等电点沉淀除杂蛋白

热变性除杂蛋白后,酶液用磷酸缓冲液调整 pH,在室温下测酶活力。同时以酶活力和上清液中蛋白质的总量作为评价指标。研究发现大部分蛋白质在 pH3~4 之间沉淀,而 SOD 活性良好。因此用磷酸调整 pH 至 3.5 后,12000r/min 离心 20min 可除去大部分杂蛋白。

#### 1.4.4 离子交换进行纯化

将上清液过 DEAE-纤维素离子交换柱,用 2.5~

250mmol/L pH7.8 磷酸钾缓冲液梯度洗脱,收集活性部分<sup>[4]</sup>。

#### 1.4.5 酶的类型鉴定

采用 KCN 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感性试验<sup>[5]</sup>。

#### 1.4.6 吸收光谱测定

利用紫外-可见分光光度计扫描在 200~800nm 波长段的吸收光谱<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SOD 对温度的稳定性

将粗酶液于不同温度保温后,在室温下测酶活力,结果见图 1。SOD 是一种热稳定性很好的酶,60℃ 30min 活性仅下降 19.1%,而大部分杂蛋白的变性温度是 55℃,但 70℃ 以后,随保温时间的延长, SOD 的活性损失较大。

### 2.1 SOD 对 pH 的稳定性

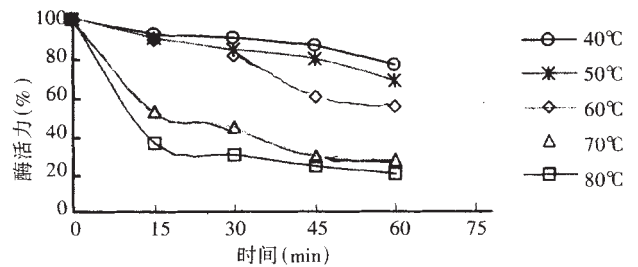


图 1 温度对大蒜细胞溶质 SOD 酶活力的影响

用磷酸缓冲液调整 pH,在室温下测酶活力,结果见图 2。可知在 pH4~9 范围内, SOD 的酶活力较好,显示一个较宽的峰,且 pH6~8 之间,其活性最大。而大部分杂蛋白的等电点在 pH3~4 之间,而此时上清液中 SOD 的活性很好。因此,可以通过等电点的差异把杂蛋白与 SOD 分离。

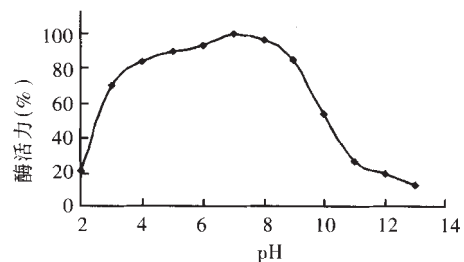


图 2 pH 对酶活力 (%) 的影响

### 2.3 KCN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 SOD 活性的影响

将经 DEAE-纤维素离子交换柱分离纯化后的酶液进行酶的类型鉴定。由于 Cu·Zn-SOD 对氰化物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均敏感;Fe-SOD 对氰化物不敏感,而对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均

敏感; Mn-SOD 对氰化物和  $H_2O_2$  均不敏感, 因此可用这两种抑制剂鉴定大蒜细胞溶质中 SOD 的类型。从表 1 可知, 1.5 mmol/L KCN 可抑制其活性的 93%, 4 mmol/L  $H_2O_2$  可抑制其活性的 89%, 因此该酶类型可能是 Cu·Zn-SOD。

表 1 大蒜细胞溶质中 SOD 对抑制剂的敏感性

KCN 浓度 (mmol/L)	抑制活力 (%)	$H_2O_2$ 浓度 (mmol/L)	抑制活力 (%)
0	0	0	0
0.5	65	1	59
1.0	87	2	76
1.5	93	4	89
2.0	100	8	100

#### 2.4 紫外可见吸收光谱

将经 DEAE-纤维素离子交换柱分离纯化后的酶

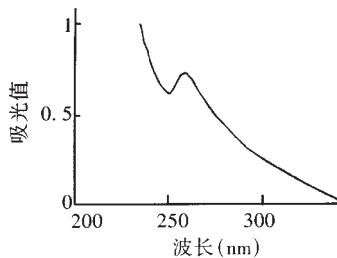


图 3 大蒜细胞溶质 SOD 在紫外光区的吸收光谱

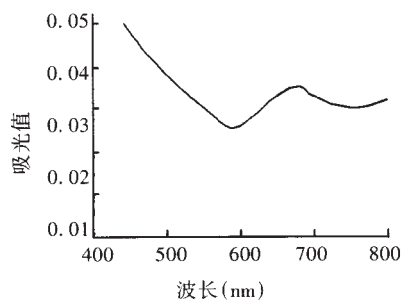


图 4 大蒜细胞溶质 SOD 可见光区的吸收光谱

进行紫外-可见吸收光谱测定, 结果见图 3、图 4。该酶紫外光区吸收峰是 258 nm, 这是因为它缺乏色氨酸, 酪氨酸的含量亦低; 可见光区的吸收峰在 680 nm 附近, 这是因为它含有  $Cu^{2+}$  的缘故。

#### 3 结论

通过对大蒜细胞溶质中 SOD 的研究, 得知 SOD 是一种热稳定较好的酶, 60℃ 30 min. 酶活力损失较小, 70℃ 15 min 以后, 随加热时间的延长, 其活性损失较大; SOD 的酸碱稳定性亦好, 在 pH 4.0~9.0 之间酶活力变化不大, 且 pH 6~8 之间, 其活性最大; 酶对 KCN 和  $H_2O_2$  敏感, 且其酶紫外光区吸收峰是 258 nm, 可见光区的吸收峰在 680 nm, 酶的类型可能是 Cu·Zn-SOD 型。

参考文献:

- [1] McCord J M, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reaction[J]. Biol Chem, 1969, 244: 6049-6055.
- [2] 梁毅, 汪寸信, 屈松生等. 超氧化物歧化酶研究的新进展. 湖北化工, 1995, (3): 20-22.
- [3] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理学进展, 1991, 18(2): 163.
- [4] 马安德, 李毓琦, 何俊等. 大蒜超氧化物歧化酶的纯化[J]. 第一军医大学学报, 1994, 14(1): 48-50.
- [5] 翟颐华, 邹国林, 扬熊. 韭菜细胞溶质超氧化物歧化酶的纯化和性质[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(1): 18-22.
- [6] 孙庆林, 常梅秀, 周书勤等. 牛乳中超氧化物歧化酶(SOD)的提纯与鉴定[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1998, 19(4): 34-36.

## 连续 51 天服用褪黑激素对小鼠肾脏、心肌与脑部分生化指标及体重变化的影响

张全江 李秋霞 熊正英 张全海

(陕西师范大学运动生物学研究所, 西安 710062)

**摘要** 观察连续 51d 服用褪黑激素(MT)对机体抗氧化系统及体重增长的影响。方法: 以雄性昆明种小鼠为实验对象, 连续 51d 服用 MT 建立动物模型。分别测试肾脏、心肌与脑超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)及整个服用期间的体重变化情况。结果: 连续 51d 服用

收稿日期: 2002-09-05

作者简介: 张全江(1974-), 男, 硕士, 助教。