

# 枸杞多糖 - 2 的抗羟基自由基氧化作用

王建华 华中农业大学食品科技系 武汉 430070

张民 甘璐 张声华 山东农业大学理学院 泰安 271018

**摘 要** 用水杨酸法检测羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )研究枸杞多糖组分2(LBP2)清除 $\cdot\text{OH}$ 的效果;用硫代巴比妥酸法测定小鼠肝丙二醛含量,用以DPH为荧光探针的荧光偏振法测定小鼠肝线粒体膜流动性,以及用分光光度法测定小鼠红细胞溶血和肝线粒体膨胀程度研究LBP2的抗 $\cdot\text{OH}$ 氧化效果。结果表明,LBP2可以清除 $\cdot\text{OH}$ ,抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致丙二醛的产生,抑制 $\cdot\text{OH}$ 所致膜流动性下降,减少 $\cdot\text{OH}$ 所致红细胞溶血,减轻 $\cdot\text{OH}$ 所致肝线粒体膨胀程度。可以得出LBP2具有抗 $\cdot\text{OH}$ 所致氧化的作用。

**关键词** 枸杞 多糖 羟基自由基 抗氧化

**Abstract** The scavenging effect of LBP2 (one component of polysaccharides from *Fructus Lycii*, the fruit of *Lycium barbarum* L.) on hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) was studied by salicylic acid method. To study the anti-oxidative effect of LBP2 on  $\cdot\text{OH}$ , the content of MDA in liver was measured by TBA assay, the mitochondria membrane fluidity in liver was measured by the fluorescence polarization assay with DPH fluorescence probe, and the hemolysis extent of red blood cells and the swelling extent of mitochondria of liver were detected by spectrophotometric methods. The result showed that LBP2 had the  $\cdot\text{OH}$  scavenging activity. It could inhibit the generation of MDA, the decrease of mitochondria fluidity, the swelling of mitochondria, and the hemolysis of red blood cells induced by  $\cdot\text{OH}$ . The conclusion was that LBP2 had the effect of anti- $\cdot\text{OH}$  induced oxidation.

**Key words** *Lycium barbarum* L. Polysaccharide Hydroxyl radical Anti-oxidation

枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP)即是药用成分,又是保健食品的功能因子,具有多种药理作用和保健功能<sup>[1]</sup>,是枸杞研究的热点之一。一些研究表明,枸杞多糖包含多个组分<sup>[2,3]</sup>,然而,由于分离和纯化的困难,在其功能研究中,大多使用的是枸杞粗多糖,对其各组分的功能研究只有几篇报道<sup>[4~8]</sup>。王玲等发现组分2(LBP2)能明显促进辐射损伤小鼠免疫功能的恢复<sup>[4]</sup>,本室在研究中发现LBP2具有清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用,并对其抗氧化活性作了进一步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 LBP2 由本室从枸杞子中提取、分离纯化而得<sup>[2]</sup>。枸杞子为宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥果实,由武汉市广夏枸杞开发公司提供。

1.1.2 动物:昆明种小白鼠,雄性,体重(g)  $28 \pm 2$ ,由湖北省医学院实验动物中心提供。

1.1.3 试剂:硫代巴比妥酸(TBA)为生化试剂;硫酸亚铁、维生素C(VC)、双氧水、三氯乙酸(TCA)和蔗糖为国产分析纯;1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)为Sigma产品。

1.1.4 仪器:岛津UV-120-02紫外可见分光光度计;日立-850型荧光分光光度计。

### 1.2 方法

1.2.1 动物样品的制备:(1)红细胞悬浮液的制备:小鼠摘眼球取血,制成抗凝血,  $3000 \times g$ 离心得红细胞,冷生理盐水洗三次,制成0.5%悬浮液。(2)肝组织匀浆液的制备:迅速取上述取血后小鼠的肝,用冷的生理盐水洗净后称重,冰浴下匀浆,制成0.5%的悬浮液,  $100 \times g$ 离心去杂得匀浆液。(3)肝线粒体悬浮液制备:同上取肝,冰浴下以0.25mol/L蔗糖制成10%匀浆,  $1000 \times g$ 离心20min,上层液再以  $10000 \times g$ 离心20min,沉淀用pH7.4的20mmol/L Tris-HCl缓冲液洗涤两次后,配成含蛋白质0.5mg/ml线粒体悬浮液。冰箱冷藏室中存放备用。

1.2.2 LBP2清除 $\cdot\text{OH}$ 效果的测定:按Smirnoff等的方法改进<sup>[9]</sup>。用 $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ 产生 $\cdot\text{OH}$ ,以 $\cdot\text{OH}$ 氧化水杨酸所得产物的吸光值示 $\cdot\text{OH}$ 多少,吸光值越大, $\cdot\text{OH}$ 越多。3ml反应液中含0.15mol/L  $\text{FeSO}_4$ , 6mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2mmol/L水杨酸钠及不同浓度的LBP2,最后加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 启动反应,  $37^\circ\text{C}$ 反应1h,测510nm处的吸光值。吸光值越低,清除 $\cdot\text{OH}$ 效果越好。以 $[\text{Ao} - (\text{Ai} - \text{Aoi})] / \text{Ao} \times 100\%$ 计算 $\cdot\text{OH}$ 的清除率,其中Ao为对照,不加LBP2;

Ai为含某浓度LBP2时的吸光值 Aio为无显色剂时LBP2的本底值。

1.2.3 小鼠肝组织丙二醛(MDA)含量的测定<sup>[10]</sup> 各取肝匀浆液1ml, 加不同浓度LBP2和6mmol/L FeSO<sub>4</sub> 100 μl, 最后加60mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 μl。在37℃下水浴1h后, 加入1ml 15% TCA结束反应, 再加入1ml 6.7%TBA, 于沸水浴中显色15min, 冷却后离心, 测532nm处上清液吸光值, 以吸光值表示MDA含量多少, 吸光值越大, MDA含量越高。

1.2.4 小鼠肝线粒体肿胀度的测定<sup>[11]</sup> 用生理盐水配制吸光值为0.5~0.6的肝线粒体悬浮液备用。由FeSO<sub>4</sub>-VC产生·OH, 2.5ml悬浮液各加入不同浓度LBP2, 1mmol/L FeSO<sub>4</sub> 50 μl和1mmol/L VC 50 μl, 在520nm处测定某些反应时间的吸光值, 线粒体膜受氧化损伤而发生肿胀, 吸光值下降。

1.2.5 小鼠肝线粒体膜流动性测定<sup>[11]</sup> 总体积3ml的反应液中含线粒体蛋白0.5mg及不同浓度LBP2, 加入100mmol/L FeSO<sub>4</sub>和5 μmol/L VC启动反应, 37℃反应30min, 加入1mmol/L EDTA终止反应, 加入2 × 10<sup>-6</sup>mol/L DPH 100 μl, 37℃反应40min。以激发波长361nm, 发射波长431nm测荧光强度I<sub>vv</sub>、I<sub>vh</sub>、I<sub>hv</sub>、I<sub>hh</sub>, 其中v表示偏振光为垂直方向, h为水平方向, 前脚注为发射光, 后者示激发光。由此可计算荧光偏振度P=(I<sub>vv</sub>-I<sub>vh</sub>)/(I<sub>vv</sub>+I<sub>vh</sub>), 膜的平均微粘度η=2P/(0.46-P), 其中G=I<sub>hv</sub>/I<sub>hh</sub>。

1.2.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导红细胞氧化溶血的测定<sup>[12]</sup> 各取红细胞悬浮液1ml, 加不同浓度的LBP2, 最后加10mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应, 37℃作用1h, 生理盐水稀释6倍, 3000 × g离心5min, 取上清液测415nm吸光度。

1.3 数据处理: 以x ± s表示结果, 不同实验间差异用t检验, 由SAS软件处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 LBP2对·OH的清除作用

LBP2在10 μg/ml浓度时对·OH就有一定的清除能力, 达极显著水平, 说明LBP2具有较强的·OH清除

表1 LBP2对·OH的清除作用

LBP2 浓度 (μg/ml)	A <sub>510nm</sub>	抑制率 (%)
0 (Control)	0.568±0.004	-
10	0.529±0.002 <sup>b</sup>	6.9
21	0.523±0.006 <sup>b</sup>	8.6
42	0.501±0.007 <sup>b</sup>	11.8
83	0.476±0.006 <sup>b</sup>	16.2
167	0.440±0.0012 <sup>b</sup>	22.5
334	0.373±0.007 <sup>b</sup>	34.3

n=3, b:p<0.01 vs control

作用, 见表1。LBP2的浓度与清除率之间呈量效关系。

### 2.2 LBP2对肝组织脂质过氧化产物丙二醛生成的影响

表2 LBP2对Fe<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的丙二醛生成的影响

实验组	LBP2 浓度 (μg/ml)	A <sub>32nm</sub>	抑制率 (%)
Control	0	0.762±0.10 <sup>b</sup>	-
Fe <sup>2+</sup> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	2.03±0.05	-
Fe <sup>2+</sup> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +LBP2	50	2.03±0.04	0
	200	1.884±0.012 <sup>b</sup>	7.2
	800	1.680±0.018 <sup>b</sup>	17.2
	1600	0.708±0.013 <sup>b</sup>	61.6

n=3, b:p<0.01 vs Fe<sup>2+</sup>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

由表2可知, 加·OH (Fe<sup>2+</sup>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → ·OH) 组丙二醛含量比对照显著增加, 说明·OH可诱导脂质过氧化反应, 若同时加入LBP2, 丙二醛生成量比只加·OH组显著减少, 说明LBP2可抑制·OH诱导的肝组织氧化作用, 其半抑制量(IC<sub>50</sub>)约为1.39mg/ml。

### 2.3 LBP2对小鼠肝线粒体肿胀的影响

随着时间的延长, 各组在520nm吸光值下降, 见表3, 说明线粒体膜被氧化损伤而发生了肿胀, 其中对照组60min下降率为26.2%, 而VC+Fe<sup>2+</sup>组60min下降率达48%, 说明·OH诱导加速了氧化损伤, 肿胀严重; 加LBP2两组与VC+Fe<sup>2+</sup>组相比下降趋势减缓, 60min下降率分别为32.9%、15.3%, 表明LBP2可抑制·OH所致氧化损伤程度, 肿胀减轻, 甚至LBP2高浓度组损伤程度低于对照组, 这可能是因为对照组在37℃可发生自氧化, 而LBP2组抑制了诱导氧化和自氧化对膜流动性的双重损害。

表3 LBP2对VC+Fe<sup>2+</sup>诱导的小鼠肝线粒体肿胀的影响

实验组	LBP2 浓度 (μg/ml)	A <sub>520nm</sub>				
		0min	10min	20min	30min	60min
Control	0	0.512±0.001	0.505±0.001	0.452±0.038	0.405±0.001	0.378±0.006 <sup>ab</sup>
VC+Fe <sup>2+</sup>	0	0.521±0.002	0.474±0.004	0.378±0.040	0.329±0.004	0.267±0.007 <sup>c</sup>
VC+Fe <sup>2+</sup> +LBP2	179	0.519±0.001	0.445±0.021	0.430±0.026	0.393±0.011	0.348±0.031 <sup>b</sup>
VC+Fe <sup>2+</sup> +LBP2	357	0.515±0.004	0.499±0.026	0.476±0.034	0.459±0.018	0.436±0.037 <sup>a</sup>

a-c: Values in the column with different superscript are most significantly different (p<0.01)

## 2.4 LBP2对小鼠肝线粒体膜流动性的影响

表4 LBP2对小鼠肝线粒体膜流动性的影响

实验组	LBP2 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	荧光偏振度 ( $p$ )	微粘度 ( $\eta$ )
Control	0	$0.101 \pm 0.003^b$	0.536
VC+Fe <sup>2+</sup>	0	$0.146 \pm 0.003$	0.930
VC+Fe <sup>2+</sup> +LBP2	158	$0.137 \pm 0.007^b$	0.848
	316	$0.096 \pm 0.014^b$	0.527

n=3, b:  $p < 0.01$  vs VC+Fe<sup>2+</sup>

表4显示VC+Fe<sup>2+</sup>诱导组的P和 $\eta$ 显著高于对照,即膜的流动性显著下降,加入LBP2组,其P和 $\eta$ 值显著低于诱导组,表明LBP2可保护膜的流动性。LBP2高浓度组的流动性,甚至高于对照,其原因可能同2.3。

2.5 LBP2对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导小鼠血红细胞(RBC)溶血的抑制作用

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>自身可引起氧化反应,但主要是与Fe<sup>2+</sup>(如在血中)结合产生的·OH引发氧化作用。红细胞中加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后,溶血量显著高于对照,说明红细胞膜受氧化而损伤,物质外流, LBP2则可显著抑制溶血的发生,见表5,表明LBP2可抑制氧化损伤,保护红细胞膜。LBP2对红细胞溶血的半抑制量(IC<sub>50</sub>)约为175  $\mu\text{g/ml}$ 。

表5 LBP2对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导小鼠血红细胞(RBC)溶血的影响

实验组	LBP2 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	A <sub>415nm</sub>	溶血度 (%)	抑制率 (%)
Control	0	$0.568 \pm 0.038^b$	49.1	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	$1.136 \pm 0.042^b$	100	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +LBP2	168	$0.870 \pm 0.006^b$	75.3	48.6
	336	$0.686 \pm 0.052^b$	59.3	79.9

n=3, b:  $p < 0.01$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 3 结论

3.1 羟基自由基被认为是毒性很强的自由基,可通过VC+Fe<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sup>2+</sup>、辐射等体系产生,能诱导膜系统的氧化损伤<sup>[13]</sup>,本实验结果也表明了这一点。

3.2 膜的流动性是生物膜结构的基本特征,膜的各种重要功能(如能量转换、信息传递、细胞识别等)都与膜的流动性有关,维持膜的流动性是细胞维持正常生理功能的必要条件,膜的过氧化损伤对膜的流动性有很大影响。脂质过氧化还会使膜的通透性增加,从而引起膜内外物质的外泄和内流,造成如红细胞溶血和线粒体膨胀等现象的发生。通过本实验可以认为: LBP2具有防止膜脂质过氧化的作用,从而维持膜的流动性,减轻线粒体膨胀和减少红细胞溶血的发生,维

护正常的生物功能。

3.3 LBP2可以有效地清除·OH,可以认为LBP2抗氧化的机理是通过清除·OH,从而抑制·OH所致过氧化发生,保护膜系统免受损伤。

3.4 由于自由基与许多病理生理现象,如衰老、肿瘤、心血管疾病和炎症等有关,目前国内外已将抗氧化检测用于抗衰老等保健食品的评价,对保健食品的开发具有积极作用<sup>[14]</sup>。枸杞及其多糖可以抗衰老、抑制肿瘤、抗疲劳和减少放疗化疗损伤等与自由基有关的疾病<sup>[1]</sup>。本实验用纯组分LBP2确证了枸杞多糖具有清除自由基和抗氧化作用,进一步明确了枸杞多糖是枸杞的抗氧化功能因子,这对开发以枸杞为原料的第三代功能食品具有一定的指导意义。

## 参考文献

- 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998, 762~768.
- 何进, 张声华. 枸杞多糖的分离纯化及组成研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(2): 716~720.
- 黄琳娟, 林颖, 田庚元, 计国帧. 枸杞子免疫活性成分的分离、纯化及物理化学性质的研究[J]. 药学学报, 1998, 33(7): 512~516.
- 王玲, 李欣, 钱玉昆. 枸杞多糖2对辐射损伤小鼠免疫功能恢复的影响[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15(4): 209~211.
- 罗琼, 阎俊, 李瑾玮, 张声华. 枸杞及其多糖对家兔血脂的影响[J]. 营养学报, 1997, 19(4): 415~418.
- 罗琼, 李瑾玮, 张声华. 枸杞多糖-X组分对糖尿病家兔降血糖的效果[J]. 营养学报, 1997, 19(2): 173~177.
- 罗琼, 阎俊, 李瑾玮, 张声华. 枸杞多糖粗品与纯品抗疲劳作用比较[J]. 营养学报, 1999, 21(3): 310~317.
- 罗琼, 阎俊, 李瑾玮, 张声华. 纯品与粗品枸杞多糖对小鼠的免疫药理作用[J]. 中药材, 1999, 22(5): 246~249.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057~1060.
- 向荣, 王鼎. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(3): 241~242.
- 路雪雅. 抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体损伤的实验研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(5): 327~332.
- 李志孝, 黄成钢, 蔡育军等. 天门冬多糖的化学结构及体外抗氧化活性[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 358~362.
- 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 77~153.
- 郑晶泉. 抗氧化剂抗氧化实验研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(1): 37~40.