

硒多糖的抗氧化活性及与过氧化氢酶协同作用的研究

李华为¹ 赵素云² 刘晓波² 宋琳琳² 铁梅^{* 2}

¹(沈阳师范大学化学与生命科学学院 沈阳 110034)

²(辽宁大学环境学院 沈阳 110036)

摘 要 对自行培养的富硒蛹虫草中提取的有机硒多糖进行抗氧化活性研究。采用循环伏安法(CV)在铂电极表面构筑支撑磷脂双层膜(Supported bilayer lipid membrane, s-BLM),以 0.1 mol/L KCl-1.0 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ -1.0 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ 为探针溶液,利用 Fenton 体系中 Fe^{2+} 和 H_2O_2 反应产生的羟自由基对模拟生物膜的损伤程度考察有机硒多糖的生物活性。结果表明:羟自由基使 s-BLM 的通透性增强,造成膜体损伤;而在硒多糖存在下,可使羟自由基对膜的这种损伤受到抑制,硒多糖能够清除自由基保护生物膜;采用紫外-可见(UV-Vis)吸收光谱法比较研究不同浓度的过氧化氢酶与硒多糖对羟自由基的清除率。结果表明:硒多糖对羟自由基的清除效果好于过氧化氢酶,且当体系中硒多糖和过氧化氢酶共存时,二者对羟自由基的清除效果具有协同作用。进一步讨论了硒多糖抗氧化活性的可能机理,为有机硒多糖在保护生物膜、抗氧化活性方面的开发与利用提供科学的理论依据。

关键词 硒多糖;羟自由基;支撑磷脂双层膜;过氧化氢酶

1 引言

自由基是人体生命活动中多种生化反应的中间代谢产物。人体在正常及病理过程中均有自由基参与反应,自由基参与的各种发病机理研究受到越来越广泛的重视,它们不仅可以通过与核酸、蛋白质及许多不饱和脂质反应造成细胞永久性损伤^[1],甚至可以导致细胞的死亡,其病原学意义得到普遍承认。而羟自由基($\cdot OH$)则是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基。它可以破坏蛋白质的构象、促使线粒体 DNA 单链断裂、引发细胞的体外分化等^[2]。生物膜上的许多不饱和脂肪酸对活性氧自由基的进攻非常敏感,而且一旦反应启动,就会以连锁反应方式进行下去,造成大量脂质过氧化物的产生。这些过氧化物被断裂成不同大小的醛类分子,对细胞产生很强的毒性,使生物膜的结构发生改变,影响其活性和功能的正常发挥,进而导致生物系统的严重损害。因此如何抑制自由基以防治各种疾病的发生,已引起人们的广泛关注^[3~5]。

过氧化氢酶(CAT)是生物体内重要物质,其中最主要的生理功能就是参与活性氧代谢过程。氧分子对生物体是无毒性的,一旦氧分子的电子分布发生改变,就会变成活性氧。在活性氧代谢过程中,过氧化氢酶可以使 H_2O_2 发生歧化生成 H_2O 和 O_2 ^[6]。

硒多糖能发挥微量元素硒和多糖的双重功能,并且活性高于硒与多糖。目前对有机硒药物的合成及在生物体内的作用和代谢机制研究较多,但对硒多糖的研究较少。硒多糖在抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、抗衰老等方面可能具有发挥越来越多作用的潜力,所以对其生物活性的研究备受关注。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

7500c 型电感耦合等离子体质谱(ICP-MS,美国 Agilent 公司);273A 循环伏安仪(美国 Princeton Applied Research 公司);三电极体系:工作电极为铂电极($\phi 1.0$ mm),参比电极为 Ag/AgCl(饱和 KCl)电极,对电极为铂片电极。0.1 mol/L KCl-1.0 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ -1.0 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$ 为探针溶液。

富硒蛹虫草(自行培养);过氧化氢酶、磷脂酰胆碱 $L-\alpha$ -Phosphatidylcholine(PC,美国 Sigma 公司);

2010-01-15 收稿;2010-04-01 接受

本文系国家自然科学基金(No.30671176)资助项目

* E-mail: TIEMEIJ07@yahoo.cn

胆固醇 Cholesterol(CH 北京奥博星生物技术有限公司); 硒标准溶液: (500 mg/L 国家环保总局标准样品研究所); FeSO_4 、 H_2O_2 、 NaSeO_2 、邻二氮菲、无水乙醇等试剂均为分析纯。所有实验均在 25 °C 室温及溶液通氩气除氧条件下进行。实验用水由德国 Sartorius 超纯水机提供。

2.2 实验方法

2.2.1 硒多糖的提取及其组分含量的测定 在最佳的浸提条件下提取硒多糖^[7]。分离纯化后,采用苯酚- H_2SO_4 比色法测定多糖含量^[8]。以 ICP-MS 法^[9~10]测定硒多糖中硒的含量。

2.2.2 支撑磷脂双层膜的制备 在铂电极表面构筑支撑磷脂双层膜^[11~13]。

2.2.3 羟自由基的产生及其测定 利用芬顿(Fenton)体系^[14,15]测定硒多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用。 Fe^{2+} 和 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$,由于 $\cdot\text{OH}$ 可特异地使铁-邻二氮菲褪色,根据褪色程度用比色法于 510 nm 处测定 $\cdot\text{OH}$ 含量。在芬顿体系中分别加入适量硒多糖试液,用去离子水定容至 10.0 mL。于 37 °C 恒温水浴中反应 30 min 后即与 s-BLM 作用。

3 结果与讨论

3.1 多糖及硒含量的确定

采用苯酚-硫酸法,在 490 nm 处分别读取浓度为 10、20、30、40、50 和 60 mg/L 多糖溶液的吸光度值,得到校准曲线 $y = 0.0067x + 0.004$, $r = 0.9990$,测定硒多糖中多糖含量;采用 ICP-MS 法,以⁸⁹Y 为内标元素,将硒标准储备液(500 mg/L)逐级稀释成硒标准溶液 1.0、5.0、10、20、50、100、200 和 500 $\mu\text{g/L}$,采用样品与内标同时进样,绘制校准曲线 $y = 7.643x + 5.190$, $r = 1.0000$,测定硒多糖中硒的含量。结果分别为多糖浓度为 649.12 mg/L,硒含量为 7.12 $\mu\text{g/L}$ 。

3.2 羟自由基对 s-BLM 的损伤

将修饰有 s-BLM 的铂电极浸入到不同 H_2O_2 浓度的羟自由基制备体系中,作用 60 min 后,将其放入 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中进行电化学测试,其循环伏安响应如图 1 所示。

由图 1 可知,在接触到 Fenton 体系产生的羟自由基后, s-BLM 的性质发生了明显的改变,探针分子在电极上的响应电流明显增大。说明羟自由基对膜的性质产生了影响,膜受到一定程度的损伤,通透性增强,因此探针分子更容易接近电极的表面。这种变化与 Fenton 体系中 H_2O_2 和 Fe^{2+} 的浓度有关^[13]。不同浓度 H_2O_2 的 Fenton 体系对 s-BLM 的影响如图 1(b、c、d)。随着体系中 H_2O_2 的浓度的增高,即羟自由基浓度的增大,探针分子 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的响应电流也变大,说明膜损伤的程度也越严重。同时,还对单一的 H_2O_2 体系与膜通透性的关系进行了探讨。在相同的条件下,如果只有 H_2O_2 存在,对膜的通透性几乎没有影响,结果如图 1e,进一步说明膜的损伤主要是由羟自由基引起的。由于羟自由基具有很强的氧化作用,使 s-BLM 上形成孔洞或缺陷,探针分子通过这些孔洞或缺陷到达电极表面、产生电化学响应。

3.3 硒多糖的浓度及作用时间对 s-BLM 的影响

在 Fenton 体系中,其它试剂浓度不变,分别加入 1.0、3.0、5.0 和 10.0 mL 浓度为 7.12 $\mu\text{g/L}$ 的硒多糖溶液,在与 2.2.3 相同条件下膜与自由基作用不同时间后进行循环伏安扫描,结果如图 2。

图 2 表明,体系在前 60 min,磷脂膜处于相对稳定状

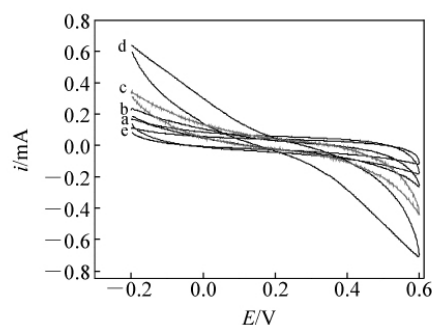


图 1 修饰 BLM 的铂电极与不同 H_2O_2 浓度的 Fenton 体系作用后,在测试溶液中的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of platinum electrode modified with bilayer lipid membrane (BLM) after interaction with Fenton system containing different concentration of hydrogen peroxide in testing solution

a. 作用前的 s-BLM(BLM before interaction); b ~ d. 分别为与 0.1%、0.5%、1% H_2O_2 的 Fenton 体系作用 60 min 后的 s-BLM(Representing BLM after interacting with Fenton system of 0.1%、0.5%、1.0% H_2O_2 for 60 min); e. 1% H_2O_2 , $\nu = 50 \text{ mV/s}$ 。

态羟自由基未对膜造成损伤。随着反应时间的增加,响应电流在逐渐增加,说明 s-BLM 受到相应的损伤,部分探针分子通过渗透穿过磷脂膜到达电极表面,而且作用时间越长,这种现象越明显。但当硒多糖的加入量达到一定值时,随着反应时间的延长,响应电流的变化无规律,这可能与 Wernberg 原理及硒多糖的毒性有关^[16]。

3.4 硒多糖对 s-BLM 的保护作用

从图 3 可知,有硒多糖保护的生物膜几乎没有受到损伤,其 CV 曲线与 s-BLM 的几乎重合,无探针分子通过渗透穿过磷脂膜到达电极的表面,磷脂膜的结构没有发生任何改变。结果表明:在一定条件下,硒多糖的存在可以有效的泯灭大部分羟自由基,抑制羟自由基对膜的损伤,进而起到保护生物膜的作用。推测硒多糖可能的抗氧化机制为:(1)对于脂质过氧化而言,硒多糖分子可以直接捕获脂质过氧化链式反应中产生的活性氧,阻断或减缓脂质氧化的进行;(2)硒多糖碳链上的氢原子可能与 $\cdot\text{OH}$ 结合生成水,达到了清除自由基的目的;(3)硒多糖分子中存在的醇羟基可以与产生 $\cdot\text{OH}$ 所必需金属离子 Fe^{2+} 络合,使体系中羟自由基的产生受到影响,进而影响脂质过氧化的启动,最终抑制活性氧的产生;(4)硒多糖中的 Se 在某种程度上也具有清除羟自由基的功能^[17]。

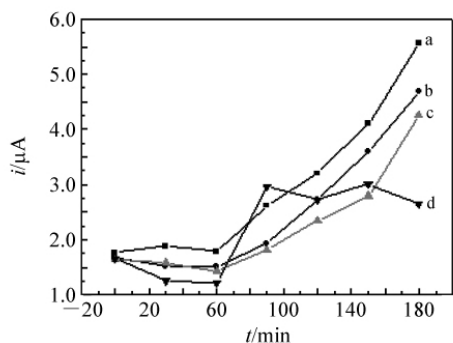


图 2 加入不同浓度硒多糖的 Fenton 体系作用时间与电流值变化关系

Fig. 2 Relationship between interaction time of different containing Se-polysaccharide and change of current

Se-polysaccharide concentration(a. 0.712 $\mu\text{g/L}$; b. 2.136 $\mu\text{g/L}$; c. 3.56 $\mu\text{g/L}$; d. 7.12 $\mu\text{g/L}$)。

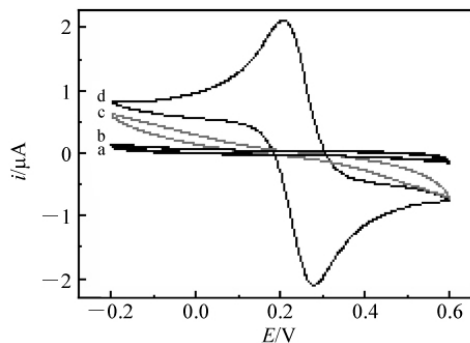


图 3 硒多糖对 s-BLM 的保护作用

Fig. 3 Protection of Se-polysaccharide to s-BLM

a. 单纯膜(s-BLM before interaction); b. 3.56 $\mu\text{g/L}$ 硒多糖(Se-polysaccharide); c. Fenton system of 1% H_2O_2 ; d. 裸铂电极(Bare platinum electrode)。

3.5 过氧化氢酶对羟自由基的抑制作用

图 4 为不同浓度的过氧化氢酶加入到 Fenton 体系后的 UV-vis 光谱。由图 4 可知,随着酶浓度的增加,吸收峰的强度也在增强,说明过氧化氢酶对羟自由基的清除能力也在增加。当酶的浓度 $> 10 \text{ mg/L}$ 时,其吸光度值接近 a 曲线的值,说明此时体系中的羟自由基已基本被清除^[18]。

3.6 硒多糖与过氧化氢酶的协同作用

根据 Combs 和 Scott 理论及多糖可通过提高超氧歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等酶的活性^[19],从而发挥抗氧化的作用等理论研究,在体系中同时加入硒多糖(其中硒多糖中硒的浓度为 $5.53 \mu\text{g/L}$,多糖的浓度为 154 mg/L)和过氧化氢酶,并对其清除羟自由基的能力进行了探索,图 5 为在一定浓度条件下体系中同时存在硒多糖和过氧化氢酶时的紫外-可见吸收光谱。从图 5 可知,在硒多糖中硒的浓度小于 $1.66 \mu\text{g/L}$ 时,硒多糖对羟自由基的清除效果好于过氧化氢酶,且同时加入二者的体系清除羟自由基的效果明显优于二者单独存在的体系。

对各种条件下的羟自由基清除率(D)进行了计算,计算方法为^[20]:

$$D(\%) = 100 \times (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

结果如表 1。通过对羟自由基清除率的计算可知,当体系中硒多糖和过氧化氢酶同时存在时,其清除率不仅是它们分别存在时的加合,而是有所增强。说明在此实验条件下,硒多糖和过氧化氢酶清除自由基的能力存在着互相促进的作用,这种互相激增的活性可能与提高体内原有过氧化氢酶的活性,间接

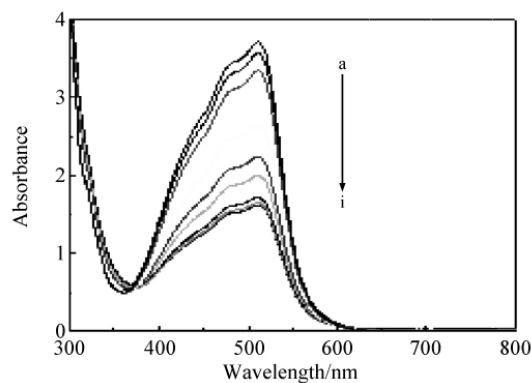


图 4 不同浓度过氧化氢酶对羟自由基的清除作用
Fig. 4 Scavenging effect of different containing Catalase to hydroxly free radical
a. 不含自由基(System without hydroxyl free radical) ; b ~ h. 酶的浓度对羟自由基的清除作用(Scavenging effect of different containing Catalase (10 5.0 2.5 , 1.0 0.5 0.25 , 0.05 mg/L) to hydroxly free radical) ; i. 不含过氧化氢酶(System not Catalase) 。

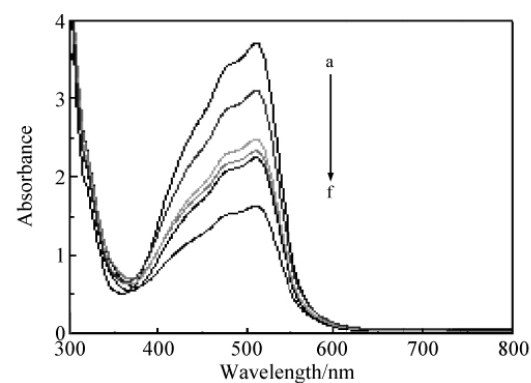


图 5 硒多糖与过氧化氢酶的协同作用
Fig. 5 Synergistic action of Se-polysaccharide(Se-p) and Catalase
a. 不含自由基(System without hydroxyl free radical) ; b. 酶 + 硒多糖(Catalase(1 mg/L) + Se-polysaccharide(1.66 μ g/L)) ; c. 酶 + 硒多糖 (Catalase (1 mg/L) + Se-polysaccharide (0.83 μ g/L)) ; d. 硒多糖(Se-polysaccharide (1.66 μ g/L)) ; e. 酶(Catalase (1 mg/L)) ; f. 不含过氧化氢酶(System not Catalase) 。

发挥抗氧化作用有关,而不再是各自独立发挥其作用来抑制羟自由基的活性。二者在清除羟自由基和提高生物活性方面具有协同作用。

表 1 体系中含有不同硒多糖和过氧化氢酶的自由基清除率
Table 1 Percentage clearance(PC) in the presence of Se-polysaccharide and Catalase of different quantity

	1	2	3	4	5
酶的浓度 Content of Catalase(mg/L)	0.0	0.015	0.075	0.15	0.3
硒多糖的浓度 Content of Se-polysaccharide(μ g/L)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
$D_{\text{酶清除率}}(\text{ PC of catalase}) (\%)$	0.0	2.12	4.73	18.39	29.55
硒多糖的浓度 Content of Se-polysaccharide(μ g/L)	1.66	0.0	0.0	0.0	0.0
$D_{\text{硒多糖清除率}}(\text{ PC of Se-P}) (\%)$	33.78	33.78	33.78	33.78	33.78
$D_{\text{酶清除率}}(\text{ PC of catalase}) (\%) + D_{\text{硒多糖清除率}}(\text{ PC of Se-P}) (\%)$	33.78	35.9	38.51	52.17	63.33
硒多糖的浓度 Content of Se-polysaccharide(μ g/L)	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
$D_{\text{协同}}(\text{ PC of synergistic}) (\%)$		38.12	57.19	67.15	70.84

References

1 Du J ,Gebicki J M. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* ,**2004** ,36(11) : 2334 ~ 2343
2 Scotti C ,Iamele L ,Alessandrini ,Vannini V ,Cazzalini O ,Lazze M C ,Melli R ,Savio M ,Pizzala R ,Stivala L A ,Biglieri S ,Tomasi A ,Bianchi L. *Mitochondrion* ,**2003** ,2(5) : 361 ~ 373
3 JIN Chun-Ying(金春英) ,CUI Jing-Lan(崔京兰) ,CUI Sheng-Yun(崔胜云) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) ,**2009** ,37(9) : 1349 ~ 1353
4 Liu X H ,Huang W M ,Wang E K. *Journal of Electroanalytical Chemistry* ,**2005** ,577(2) : 349 ~ 354
5 Liu X H ,Bai H X ,Huang W M. *Electrochimica. Acta* ,**2006** ,51(12) : 2512 ~ 2517
6 Frank V ,Eva V ,James F D ,Dirk I. *Plant Science* ,**2001** ,161(3) : 405 ~ 414
7 TIE Mei(铁梅) ,LI Chuang(李闯) ,FEI Jin-Yan(费金岩) ,ZHAO Su-Yun(赵素云) . *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报) ,**2008** ,27(2) : 158 ~ 161
8 LI Xiao-Hui(李晓晖) ,LI Shu-Ping(李书平) ,He Yun-Qing(何云庆) . *Chinese J. Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药) ,**1997** ,28(9) : 530 ~ 531
9 TIE Mei(铁梅) ,ZANG Shu-Liang(臧树良) ,FANG Yu-Zhi(方禹之) ,SUN Tie-Biao(孙铁彪) ,LI Hua-Wei(李华为) . *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) ,**2006** ,27(7) : 1232 ~ 1236

- 10 TIE Mei(铁 梅) , ZANG Shu-Liang(臧树良) , ZHANG Wei(张 葳) . *Chinese J. Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析) , **2006** , 26(3) : 551 ~ 553
- 11 DING Min(丁 敏) , CHENG Gui-Fang(程圭芳) , ZHAO Jie(赵 洁) , HE Pin-Gang(何品刚) , FANG Yu-Zhi(方禹之) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2005** , 33(1) : 5 ~ 8
- 12 WANG Jian-Guo(王建国) , JIANG Li-Li(江黎丽) , HUI Fei(惠 飞) , YANG Wei-Wei(杨薇薇) , LÜ Hui(吕 慧) , SUN Qiao-Hua(孙巧花) . *Acta Chimica Sinica*(化学学报) , **2007** , 65: 239 ~ 245
- 13 WANG Jian-Guo(王建国) , JIANG Li-Li(江黎丽) , YANG Wei-Wei(杨薇薇) , CHI Hong-Xun(迟红训) , SUN Qiao-Hua(孙巧花) , LÜ Hui(吕 慧) . *Acta Chimica Sinica*(化学学报) , **2007** , 65: 1234 ~ 1238
- 14 Villa R D , Trovo A G , Nogueira R F. *Chemosphere* , **2008** , 71(1) : 43 ~ 50
- 15 JIN Ming(金 鸣) , CAI Ya-Xin(蔡亚欣) , LI Jin-Rong(李金荣) . *Prog. Biochem. Biophys.* (生物化学与生物物理进展) , **1996** , 23: 553 ~ 555
- 16 WANG Hai-Hong(王海宏) , XIE Zhong-Zhen(谢忠枕) . *Chinese Journal of Acta Zoonutrimenta Sinica.* (动物营养学报) , **2003** , 3: 6 ~ 11
- 17 Sapuri-Butti A R , Li Q J , Groves J T , Rarikh A N. *Langmuir* , **2006** , 22(12) : 5374 ~ 5384
- 18 Frey P A , Hegeman A D , Reed G H. *Chem. Rev.* , **2006** , 106(8) : 3302 ~ 3316
- 19 Das K , Jacob V , Bouqueneau J M. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* , **2002** , 131(3) : 245 ~ 251
- 20 Qin C G , Zhou J , Xu H B. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* , **2001** , 33(2) : 215 ~ 218

Research on Antioxidative Activity of Se-polysaccharide and Synergistic Action of Se-polysaccharide and Catalase

LI Hua-Wei¹ , ZHAO Su-Yun² , LIU Xiao-Bo² , SONG Lin-Lin² , TEI Mei^{* 2}

¹(College of Environmental and Life Sciences , Shenyang Normal University , Shenyang 110034)

²(School of Environmental Science Liaoning University , Shenyang , 110036)

Abstract The antioxidative activity of organic Se-polysaccharide drew from the selenium enriched cordyceps militaris cultured by ourselves was investigated. To study the biological activity of organic Se-polysaccharide , the degree of injury to the simulating biomembranes caused by hydroxyl free radicals which were produced from the reaction of Fe^{2+} and H_2O_2 in the Fenton system was examined , by means of voltammetry (CV) , constructing Supported Bilayer Lipid Membrane (s-BLM) as well as using 0.1 mol/L KCl , 1.0 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ and 1.0 mmol/L $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ as probe solutions. The results showed that hydroxyl free radicals enhanced the permeability of s-BLM , and damaged the membrane bodies as well. On the other hand , the injury to biomembranes caused by hydroxyl free radicals was restrained in the presence of Se-polysaccharide , as Se-polysaccharide could eliminate free radicals and , therefore , protect biomembranes. In addition , the clearance rates of hydroxyl free radicals by various concentrations of catalase and Se-polysaccharide were investigated using Ultraviolet-visible(UV-Vis) absorption spectra. The results showed that Se-polysaccharide had a better clearance effect on hydroxyl free radicals than catalase. And when Se-polysaccharide and catalase coexisted in systems , there was a synergistic clearance effect on hydroxyl free radicals. The possible mechanism of the antioxidative activity of Se-polysaccharide was further discussed. It would provide a scientific and theoretical basis for the exploitation and application of organic Se-polysaccharide on protecting biomembranes and the antioxidative activity.

Keywords Selenium-polysaccharide; Hydroxyl free radical; Supported bilayer lipid membrane; Catalase

(Received 15 January 2010; accepted 1 April 2010)