

螺旋藻激酶的体外抗氧化作用研究[△]

黄媛恒^{1*}, 庞辉¹, 王慧杰¹, 黎钦蓉², 纪舒舒², 黄为然², 凌家杰¹, 李映新^{3#}(1.广西医科大学基础医学院, 南宁 530021; 2.广西医科大学全科医学院, 南宁 530021; 3.广西医科大学药学院, 南宁 530021)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2184-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.07

摘要 目的:研究螺旋藻激酶(SPK)的体外抗氧化作用。方法:采用邻二氮菲-Fe²⁺氧化法、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法和邻苯三酚自氧化法,分别测定不同浓度SPK对羟基(OH⁻)自由基、DPPH自由基和对超氧阴离子(O₂⁻)自由基的清除能力,并计算半数抑制浓度(IC₅₀);采用普鲁士蓝反应法测定不同浓度SPK对Fe³⁺的还原能力(以吸光度值反映)。以上试验均以维生素C(VC)为阳性对照。结果:SPK对OH⁻自由基、DPPH自由基及O₂⁻自由基的清除能力均呈一定的浓度依赖性,SPK对OH⁻自由基、DPPH自由基最大清除率分别86.82%、78.89%(IC₅₀分别为54.31、0.636 g/L),比VC(64.77%、73.49%)高;SPK对O₂⁻自由基最大清除率为78.31%(IC₅₀为3.918 g/L),比VC(94.14%)低;在还原能力试验中,SPK使体系吸光度值增加,其最大吸光度值与VC相近,并呈明显浓度依赖性。结论:螺旋藻激酶具有明显的体外抗氧化活性。

关键词 螺旋藻激酶;体外;抗氧化;自由基

Study on Anti-oxidative Effects of Spirulina Kinase *in vitro*

HUANG Yuanheng¹, PANG Hui¹, WANG Huijie¹, LI Qinrong², JI Shuyu², HUANG Weiran², LIN Jiajie¹, LI Yingxin³(1.Preclinical Medicine School of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2.General Practice School of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3.Pharmaceutical School of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-oxidative effects of spirulina kinase (SPK) *in vitro*. METHODS: The methods of phenanthroline-Fe²⁺ oxidation method, DPPH and auto-oxidation of pyrogallol were used to measure the effects of different concentrations of SPK on scavenging hydroxyl (OH⁻) free radical, DPPH free radical and superoxide anion (O₂⁻) free radical; IC₅₀ of SPK was calculated. Prussian blue reaction was used to determine total reducing ability (by absorbance) of different concentrations of SPK to Fe³⁺. Vitamin C (VC) was used as positive control in above trials. RESULTS: SPK could eliminate the OH⁻ free radical, DPPH free radical and O₂⁻ free radical in concentration-dependant manner, and the maximum elimination rate of SPK to OH⁻ free radical and DPPH free radical were 86.82% and 78.98% (IC₅₀ were 54.31, 0.636 g/L), which were higher than VC (64.77%, 73.49%). The maximum elimination rate of SPK to O₂⁻ free radical was 78.31% (IC₅₀ was 3.918 g/L), which was lower than VC (94.14%). In reducing ability test, SPK improved absorbance in reducing ability test system, and maximum absorbance was similar to VC in concentration-dependant manner. CONCLUSIONS: SPK has obvious anti-oxidant activities *in vitro*.

KEYWORDS Spirulina kinase; *in vitro*; Anti-oxidant; Free radicals

螺旋藻(Spirulina)是一种水生植物,是蓝藻门颤藻目颤藻科的一个属,其外形呈丝状螺旋体,广泛分布于广西、浙江、海南等地区,富含蛋白质、维生素、微量元素、纤维素、多糖等成

分,具有抗衰老、抗损伤、抗疲劳、降血脂、提高免疫力等药理作用^[1]。笔者首次从螺旋藻的发酵物中分离出了一种蛋白激酶类活性成分,并将其命名为螺旋藻激酶(Spirulina kinase,

chanism of rhizoma atractylodes macrocephala[J]. *Molecules*, 2012, 17(11):13 457.

[7] Li XC, Lin J, Gao, YX, *et al.* Antioxidant activity and mechanism of rhizoma cimicifugae[J]. *Chem Cent J*, 2012, 6(1):140.

[8] 赵艳红,李建科,赵维,等.常见药食植物提取物体外抗氧化

△ 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2014GXNSF-BA118156, 2013GXNSFAA019176);2013年广西自治区区级大学生创新创业训练计划项目

* 讲师,硕士。研究方向:生化药理学。电话:0771-5358074。E-mail:huangyuanheng@163.com

通信作者:高级实验师,博士。研究方向:生化药理学。电话:0771-5358074。E-mail:261772759@qq.com

化活性的评价[J].食品科学,2009,30(3):104.

[9] 崔建敏,裴保方.广金钱草多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J].新乡医学院学报,2014,31(12):986.

[10] Li XC, Wu XT, Huang L. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix angelicae sinensis(danggui)[J]. *Molecules*, 2009, 14(12):5 349.

[11] 林焕泽,李红念,梅全喜,等.沉香叶的研究进展[J].今日药学,2011,21(9):547.

[12] 吴光华,孙明辉,魏涵.针毛蕨乙醇提取物体外抗氧化活性研究[J].医药导报,2013,32(5):558.

(收稿日期:2015-10-04 修回日期:2016-03-15)

(编辑:林静)

SPK)。在前期研究中笔者发现SPK有较好的抗凝溶栓作用^[2-3],但是SPK是否同螺旋藻一样具有抗衰老、抗损伤等其他药理作用尚未有试验证实。现代医学理论认为,人体许多疾病(如炎症、心血管疾病、衰老、缺血性疾病等)的发生都与体内自由基产生过多或清除自由基能力下降有着密切的关系^[4]。故本试验采用清除羟基(OH⁻)自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、超氧阴离子(O₂⁻)自由基和对Fe³⁺还原能力测定的不同体外抗氧化体系,对SPK的抗氧化活性进行研究,为综合开发、利用SPK提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

722s可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TU-1800SPC紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

SPK(广西医科大学基础医学院提取,活力:1 700 U/g);维生素C(VC,纯度:≥99.7%)、30%过氧化氢(H₂O₂)、无水乙醇(成都市科龙化工试剂厂,批号:20130408、20150316、2014120601);DPPH(上海金穗生物科技有限公司,批号:C18H12N5O6,纯度:≥97%);邻苯三酚(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号:20131104,纯度:≥99.0%);邻二氮菲(光华科技股份有限公司,批号:20141104);三氯醋酸(TCA,国药集团化学试剂有限公司,批号:F20140306);其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 SPK对OH⁻自由基清除能力的测定^[5-6]

采用邻二氮菲-Fe²⁺氧化法。按参考文献[5-6]中反应体系,依次取不同质量浓度的SPK溶液(12.8、25.6、51.2、76.8、102.4 g/L)0.5 ml、3.5 mmol/L邻二氮菲0.5 ml、150 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH为7.34)3 ml、4 mmol/L硫酸亚铁0.5 ml,混匀,再加入0.1% H₂O₂ 0.5 ml,37 °C水浴反应60 min。采用紫外-可见分光光度计测定各样品溶液在510 nm波长处的吸光度(A_{样品})(以同质量浓度药物调零,以消除药物本身在510 nm波长处的吸收)。另取试管,空白对照组以蒸馏水代替SPK溶液,同法测得A_{空白};对照组以蒸馏水代替SPK和H₂O₂溶液,同法测得A_{对照}(以pH 7.34的PBS调零)。计算OH⁻自由基清除率(%)=(A_{样品}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})×100%,并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。以VC(1.6 g/L)作为阳性对照,测定方法同SPK。每组试验平行测定5次。

2.2 SPK对DPPH自由基清除能力的测定^[7]

采用DPPH法。取不同质量浓度的SPK溶液(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 g/L)2 ml,加入0.1 mmol/L DPPH无水乙醇溶液2 ml,混匀,在室温避光环境下反应30 min后,在517 nm波长处测定吸光度(A₁);同时测定2 ml SPK与2 ml无水乙醇混合液的空白对照管A₂,2 ml蒸馏水与2 ml DPPH无水乙醇溶液的对照管A₀(以等体积无水乙醇和蒸馏水混合液作为空白液进行调零)。计算DPPH自由基清除率(%)=[1-(A₁-A₂)/A₀]×100%[其中(A₁-A₂)表示样品组中单电子未被配对的DPPH的吸光度值,其值越小,表明样品清除DPPH自由基的能力越强],并计算IC₅₀。以VC(0.06 g/L)作阳性对照,测定方法同SPK。每组试验平行测定5次。

2.3 SPK对O₂⁻自由基清除能力的测定^[8-9]

采用邻苯三酚自氧化法。取不同质量浓度的SPK溶液

(0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 g/L)1 ml、PBS(50 mmol/L, pH 8.34)4.5 ml和蒸馏水3.2 ml,混匀,25 °C水浴反应20 min,取出后立即加入0.3 ml在25 °C预热的邻苯三酚溶液(6 mmol/L),使反应总体积为9.0 ml。反应启动后在325 nm波长处每隔30 s测定1次吸光度(A),至4.5 min止(以同质量浓度药物调零,以消除药物本身在325 nm波长处的吸收)。将所得A值与时间(t, min)进行回归分析,其斜率为V_样。另取试剂,用蒸馏水代替SPK作为空白对照管,测定相应A_空(以pH为8.34的PBS调零),其斜率为V_空,计算O₂⁻自由基清除率(%)=(V_空-V_样)/V_空×100%,并计算IC₅₀。以VC(0.06 g/L)作阳性对照,测定方法同SPK。每组试验平行测定8次。

2.4 SPK对Fe³⁺还原能力的测定^[10]

采用普鲁士蓝反应法。取不同质量浓度的SPK溶液(0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 g/L)1.0 ml、PBS(0.2 mol/L, pH 6.6)1.0 ml及1%铁氰化钾溶液1.0 ml,混匀,于50 °C水浴中反应20 min后急速冷却,再加入10%TCA溶液1.0 ml,振荡均匀后以离心半径为4 cm、3 000 r/min离心10 min;取上清液2.5 ml,加入蒸馏水2.0 ml和0.1%三氯化铁溶液0.5 ml,混合均匀,静置10 min。于700 nm波长处测定其吸光度(A)(以相同质量浓度药物调零,以消除药物本身在700 nm波长处的吸收),A值越大表明还原力越强。另取试管,以蒸馏水代替SPK溶液作为空白对照,以VC(0.06 g/L)作阳性对照,测定方法同SPK。每组试验平行测定5次。

2.5 统计学方法

采用SPSS 16.0软件进行统计分析。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SPK对OH⁻自由基清除能力的测定结果

SPK对OH⁻自由基有明显的清除作用。随着SPK质量浓度的增加,OH⁻自由基清除率逐渐升高,呈良好的浓度-效应关系,最大清除率为86.82%,比1.6 g/L VC(64.77%)高;SPK清除OH⁻自由基的IC₅₀为54.31 g/L。SPK对OH⁻自由基清除率的测定结果见表1。

表1 SPK对OH⁻自由基清除率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 The scavenging rate of SPK to OH⁻ free radical($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度, g/L	A	清除率, %
空白对照组		0.173 ± 0.007	
对照组		0.962 ± 0.005	
VC组	1.6	0.684 ± 0.013*	64.77
SPK组	12.8	0.250 ± 0.006*	9.76
	25.6	0.310 ± 0.005*	17.36
	51.2	0.503 ± 0.030*	41.83
	76.8	0.650 ± 0.042*	56.65
	102.4	0.858 ± 0.070**	86.82

注:与空白对照组比较,*P<0.01;与VC组比较,**P<0.05

Note: vs. blank control group, *P<0.01; vs. VC group, **P<0.05

3.2 SPK对DPPH自由基清除能力的测定结果

与空白对照的A₀(0.559 ± 0.007)比较,SPK各质量浓度组和VC组的(A₁-A₂)值都明显降低(P<0.01),且随着SPK质量浓度的增加降低越明显。这提示SPK对DPPH自由基的清除能力随着SPK的质量浓度增大而增强。SPK对DPPH自由基的最大清除率为78.89%,IC₅₀为0.636 g/L。SPK对DPPH自由

基清除率的测定结果见表2。

表2 SPK对DPPH自由基清除率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 The scavenging rate of SPK to DPPH free radical ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度, g/L	A_0	A_1-A_2	清除率, %
空白对照组		0.559 ± 0.007		
VC组	0.06		0.033 ± 0.002*	94.14
SPK组	0.1		0.520 ± 0.012*	6.98
	0.2		0.490 ± 0.006*	12.34
	0.4		0.364 ± 0.007*	34.88
	0.8		0.230 ± 0.002*	58.86
	1.6		0.118 ± 0.010*	78.89

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$

3.3 SPK对 O_2^- 自由基清除能力的测定结果

加入SPK后, O_2^- 自由基生成速率显著减小。12.8 g/L SPK对 O_2^- 自由基清除率达78.31%, 与0.06 g/L VC对 O_2^- 自由基生成的抑制相当。这表明SPK能有效地抑制 O_2^- 自由基, IC_{50} 为3.918 g/L。SPK对 O_2^- 自由基清除率的测定结果见表3。

表3 SPK对 O_2^- 自由基清除率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 The elimination rate of SPK to O_2^- free radical ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	质量浓度, g/L	V	清除率, %
空白对照组		0.083 ± 0.005	
VC组	0.06	0.022 ± 0.007*	73.49
SPK组	0.8	0.075 ± 0.005	9.64
	1.6	0.061 ± 0.010*	26.51
	3.2	0.049 ± 0.012*	40.96
	6.4	0.024 ± 0.001*	71.08
	12.8	0.018 ± 0.001*	78.31

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$

3.4 SPK对 Fe^{3+} 还原能力的测定结果

与空白对照组比较, SPK和VC均能使体系的 A 值增加($P < 0.01$); 且随着SPK质量浓度的升高, 体系的 A 值增加越明显。这表明SPK对 Fe^{3+} 的还原能力呈浓度依赖性。SPK对 Fe^{3+} 还原能力的测定结果见表4。

表4 SPK对 Fe^{3+} 还原能力的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 The reducing capacity of SPK to Fe^{3+} ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度, g/L	A
空白对照组		0.095 ± 0.013
VC组	0.06	0.672 ± 0.011*
SPK组	0.8	0.120 ± 0.012*
	1.6	0.330 ± 0.015*
	3.2	0.415 ± 0.015*
	6.4	0.481 ± 0.008*
	12.8	0.602 ± 0.005*

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$

4 讨论

自由基是人体进行正常生化和生理过程中产生的副产物, 然而过多的自由基可对生物大分子(如脂质、蛋白质、DNA等)造成氧化损伤, 从而引发癌症、动脉粥样硬化、糖尿病、心脏和神经退行性疾病等^[1]。活性氧自由基主要包括 OH^- 、 O_2^- 及DPPH自由基等, 在测定样品的抗氧化活性时, 应采用多种

方法综合评价。 Fe^{2+}/H_2O_2 体系可通过Fenton反应使 H_2O_2 产生 OH^- 自由基, 邻二氮菲- Fe^{2+} 可被氧化成邻二氮菲- Fe^{3+} , 从而使邻二氮菲- Fe^{2+} 在510 nm波长处的最大吸收峰消失; 然而当体系中存在 OH^- 自由基清除剂时, 此氧化过程受到抑制。因此, 测定此波长处吸光度的变化可判断样品溶液对 OH^- 自由基的清除能力。邻苯三酚自氧化过程中有 O_2^- 自由基和有色中间产物生成, 而该有色中间产物在325 nm波长处有1个特征吸收峰, 利用这一特点用动态方法观察SPK对 O_2^- 自由基清除作用。DPPH自由基是一种以氮为中心的稳定自由基, 当往DPPH溶液中加入能清除自由基的物质时, 其DPPH乙醇溶液在517 nm波长处的吸光度会变小。还原力是抗氧化活力的一个重要指标, 抗氧化剂是通过自身还原作用供给电子清除自由基的, 测定SPK对 Fe^{3+} 还原能力, 在一定程度上反映了其抗氧化功能的强弱。

本试验结果显示, SPK对 O_2^- 、 OH^- 、DPPH自由基均有明显的清除作用。与清除 O_2^- 自由基(IC_{50} 为3.918 g/L)和DPPH自由基(IC_{50} 为0.636 g/L)的作用相比, 其发挥 OH^- 自由基清除作用需要较高的质量浓度(IC_{50} 为54.31 g/L)。此外SPK也显示出了一定的还原能力。以上作用均呈一定的浓度依赖性。综上所述, 本研究初步证明了SPK具有一定的体外抗氧化活性, 为后续的体内抗氧化研究奠定了试验基础。

参考文献

- [1] 包国良, 王茵. 螺旋藻中营养成分检测及其生物学活性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(5): 1 034.
- [2] 庞辉, 蒋皓, 李小花, 等. 螺旋藻蛋白激酶溶栓作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2 521.
- [3] 李小花, 陈高斯, 庞辉, 等. 螺旋藻蛋白激酶提取物对血栓形成的抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(3): 337.
- [4] 邹江冰, 袁进, 蒋琳兰. 2种西番莲叶中黄酮的抗氧化活性研究[J]. 中国药房, 2010, 21(35): 3 280.
- [5] 金鸣, 蔡雅欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553.
- [6] 刘曦, 黄仁彬, 孙懿, 等. 六月青多糖体外抗氧化作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23): 1 983.
- [7] 张耀雷, 黄立新, 张彩虹, 等. 壶瓶枣多糖的分离及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1 267.
- [8] 李艳菊, 杜浩, 李琴山, 等. 贵州产天冬醇提液体外氧自由基清除作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 182.
- [9] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种SOD的测活方法: 邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 13(4): 71.
- [10] 高蓉, 杨鑫磊, 骆军容, 等. 黄色素的抗氧化活性研究[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2016, 46(1): 61.
- [11] Gul MZ, Bhakshu LM, Ahmad F, et al. Evaluation of abelmoschus moschatus extracts for antioxidant, free radical scavenging, antimicrobial and antiproliferative activities using in vitro assays[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011, 11(5): 64.

(收稿日期: 2015-11-04 修回日期: 2016-01-23)

(编辑: 林 静)