

常用真菌类中药清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的活力测定

向德军, 吕勇军, 王冲之, 冢宜(中国药科大学中药生物技术研究室, 南京 210038)

摘要:目的:为真菌类生药的抗衰老作用提出理论依据。方法:采用化学发光法,以保险粉-氢氧化钠-鲁米诺体系,检测灵芝、虫草、香菇等十六种常用真菌类中药对 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的清除作用。**结果和结论:**16种真菌类中药均有清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的作用,尤以灵芝、虫草、香菇、黑木耳的 SOD 样活力最高。

关键词:真菌类中药;清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基;化学发光法;活力测定

中图分类号:R285.6 文献标识码:B 文章编号:1006-0111(2000)05-0286-02

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)简称 SOD,是一种广泛存在于生物体内的金属酶,对机体内 $O_2^{\cdot-}$ 起着专一清除功能。而 $O_2^{\cdot-}$ 过多能引起多种疾病及皮肤衰老等。故 SOD 在医药工业,日用化工,食品工业中越来越被关注^[1]。真菌类中药多有抗衰老、免疫调节等作用。然而,有关药用真菌清除自由基研究的报道较少,目前仅见有关 SOD 同工酶研究^[2]以及药理作用方面有关抗氧化、抗衰老研究等^[3-4]。本研究对 16 种常用药用真菌的 $O_2^{\cdot-}$ 自由基清除活力进行了测定,得到一批有价值的实验数据。

SOD 活力的检测方法很多,常用的有:化学法、免疫法、等电聚焦法等几大类。其中化学法较常见,其原理是借助于二种物质,一种是可产生 $O_2^{\cdot-}$ 称为超氧自由基产生剂(Superoxide generator)如保险粉,邻苯三酚,6-羟基多巴等,另一种可与 $O_2^{\cdot-}$ 作用称为超氧自由基指示剂(Superoxide indicating scavenger)。而本实验的化学发光法是先产生定量的 $O_2^{\cdot-}$ 利用 Luminol 与其发生化学发光反应,再加入 SOD 或真菌类中药提取物抑制其发光反应来测定清除 $O_2^{\cdot-}$ 活力。

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器

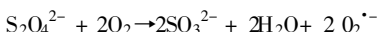
分析天平,上海天平仪器厂产品;PHS-25 型酸度计,上海雷磁仪器厂产品;进样枪(1000 μ l),上海求精玻璃仪器厂产品;微量进样器(100 μ l, 50 μ l, 25 μ l, 5 μ l),上海安亭微量进样器厂产品;自制反应池暗盒;自制发光仪;秒表;小试管;486 型计算机等

1.2 试剂

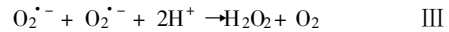
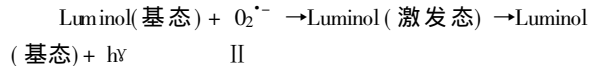
$Na_2S_2O_4$ (保险粉),分析纯,上海硫酸厂双流工贸公司产品;3-氨基邻苯二甲酰肼(Luminol),生化试剂,Sigma 公司产品;牛血标准 SOD,生化试剂,上海宝安生物技术公司产品

2 测定原理及方法

2.1 反应原理



$$K = 7.6 \times 10^{18} \quad I$$



由于 I 的 K 值很大,所以可用 $S_2O_4^{2-}$ 原始浓度来代替 $O_2^{\cdot-}$ 的浓度^[5],通过对发光抑制率的测定,可以间接地测出 SOD 的活力。

2.2 反应体系

底液: pH9.4 的 $Na_2CO_3 - NaHCO_3$ 缓冲液与 5mM Luminol 的 0.1M NaOH 液按 20:1 配成的溶液。

进样液:用 pH7.8 的 $KH_2PO_4 - NaOH$ 缓冲液配成不同浓度的 SOD 标准品溶液或样品液与 5mM 的保险粉溶液按 1:3 比例混合,冰浴保存 7 分钟后进样。取底液 1ml 注入反应池,启动反应。

2.3 采样顺序

反应池 \rightarrow (光信号) \rightarrow 光电倍增管 \rightarrow (电信号) \rightarrow 放大电路 \rightarrow 数模转换 \rightarrow 采集板 \rightarrow 进入微机自动程序 \rightarrow 显示积分

2.4 配液

2.4.1 PH9.4 $Na_2CO_3 - NaHCO_3$ (内含 0.1mM EDTA) 缓冲液的配制:

配好 0.1M Na_2CO_3 ,用移液管移取 50ml,加入 1.68 克 $NaHCO_3$ 固体,再加入 0.0093 克 EDTA,振荡,溶解后,定容至 250ml,调节 pH 值到 9.4。

2.4.2 pH7.8 $KH_2PO_4 - NaOH$ (内含 0.1mM EDTA) 缓冲液:

分别配置 0.2M KH_2PO_4 , 0.2M NaOH 溶液,用移液管取 62.5ml KH_2PO_4 和 53.1ml NaOH 溶液,再加入 0.0093 克 EDTA,振荡,溶解后定容至 250ml,调节 pH 值至 7.8。

2.4.3 5mM Luminol 的 0.1M NaOH 液的配制:

精密称取鲁米诺 0.443 克,置 50ml 容量瓶中,用 0.1M NaOH 溶解并定容(冰箱中长期保存)。

2.4.4 5mM $Na_2S_2O_4$ 的 0.1M NaOH 液的配制:

精密称取 0.0435 克 $Na_2S_2O_4$,置 50ml 容量瓶中,用 0.1M NaOH 溶解并定容(供当天使用)。

2.4.5 SOD 标准品溶液的配制:

用 pH7.8 的缓冲液稀释牛血标准 SOD,配成 1, 3, 5,

7, 10, 30, 50, 70, 100 μ l 的标准品溶液。

2.5 测定步骤

2.5.1 空白测定

用进样枪吸取 1ml 底液加入反应池, 另取 pH7.8 缓冲液 20 μ l, 5mMNa₂S₂O₄ 溶液 60 μ l 加入一小试管中混合, 立刻计时, 7 分钟时吸取 2 μ l 小试管中的混合液注入反应池, 同时启动程序, 记录积分值。

2.5.2 标准曲线的绘制

将空白测定中的 20 μ l 缓冲液换成 20 μ l 不同浓度的 SOD 标准品溶液, 其余步骤同空白测定。计算 SOD 对发光强度的抑制率并制备标准曲线。

$$\text{抑制率} = (I_0 - I_1) / I_0 \times 100\%$$

I_0 : 空白测定时发光强度的积分值

I_1 : 加入抑制剂后发光强度的积分值

2.6 样品的测定

2.6.1 样品的制备

分别称取粉碎后的灵芝、香菇、黑木耳、云芝、猪苓、茯苓、紫芝、银耳、蝉花、红曲、僵蚕、雷丸、猴头、马勃、竹黄各 5 克, 虫草 1 克, 用甲醇-水(1:1)回流提取 4 小时, 过滤, 残渣以同法再提取一次, 合并提取液定容至 100ml 后, 置于冰箱中保存待用。

2.6.2 样品抑制率的测定

测定步骤及抑制率计算同标准品。需注意控制测定样品的稀释程度, 使得发光抑制率在标准曲线的线性范围内。

样品清除 O₂⁻ 活力的计算: 样品的 SOD 样活力 (μ g) = $U \times 1 / W$

U : 通过标准曲线计算得样品的 SOD 样活力单位数

W : 测定体系中含有的生药量 (g)

3 实验结果

3.1 SOD 对发光强度抑制的标准曲线

反应体系中 SOD 浓度与发光抑制率之间的关系(见表 1)。

表 1 SOD 浓度与发光抑制率之间的关系

SOD 浓度 (μ l/ml)	1	3	5	7	10	30	50	70	100
发光抑制率 (%)	15	24	37	45	51	58	66	70	76

将前 4 点进行线性回归, 得标准曲线: $U = 0.193P - 1.83$, $r = 0.996$

U : SOD 样活力单位数

P : 发光抑制率

3.2 不同真菌提取液对 O₂⁻ 的抑制作用测定结果(见表 2)。

表 2 不同药用真菌的 SOD 样活力测定结果

种名	拉丁学名	采购地	SOD 样活力 (μ g)
香菇	<i>Lentinus edodes</i>	昆明	1700
黑木耳	<i>Auricularia auricula</i>	黑龙江	1400
灵芝	<i>Ganoderma lucidum</i>	昆明	1300
虫草	<i>Cordyceps sinensis</i>	福州	1200
竹黄	<i>Shirai a bambusicola</i>	安徽黄山	578.1
猴头	<i>Heridium erinaceus</i>	福建莆田	558.8
僵蚕	<i>Bombyx batryticatus</i>	武汉	539.6
紫芝	<i>Ganoderma japonicum</i>	福州	504.9
红曲	<i>Monascus purpureus</i>	武汉	491.4
马勃	<i>Cabatia gigantea</i>	武汉	466.4
银耳	<i>Tremella fusiformis</i>	福建莆田	452.9
茯苓	<i>Poria cocos</i>	昆明	437.5
雷丸	<i>Polyporus mylittae</i>	昆明	437.5
蝉花	<i>Cordyceps sobolifera</i>	福州	368.1
猪苓	<i>Polyporus umbellatus</i>	昆明	366.2
云芝	<i>Coriolus versicolor</i>	福州	183.2

4 讨论

本实验采用碱性连二亚硫酸钠产生 O₂⁻ 自由基, 该反应产生的 O₂⁻ 自由基比较稳定, 在 0 $^{\circ}$ C 下能保持 3-4 小时的稳定状态。这就有利于实验的顺利进行。

由于 pH 值对测定结果的影响较大, 所以每次配制溶液前应检查所用缓冲液的 pH 值。该方法的稳定性与温度关系密切, 环境温度较低时稳定性好, 采用冰浴保存所有试剂, 所得数据稳定性明显增加。

实验结果表明, 所选的 16 种药用真菌都能不同程度地清除 O₂⁻ 自由基, SOD 样活力为 183.2~1700 μ g。其中, 以香菇、黑木耳、灵芝、虫草最为突出, SOD 样活力超过 1000 μ g。灵芝、虫草的药理学研究很多, 它们都具有抗衰老及免疫调节作用, 所开发的制剂也较多。自由基是造成人体衰老的一个因素, 本实验证明二者都有较强的 O₂⁻ 自由基清除活力, 因此, 清除自由基活力有可能是其药效的一个部分。香菇、黑木耳为药食兼用, 其清除自由基活力较为突出, 它们是很好的保健食品, 建议人们应注意食用。

本研究首次较全面地测定了常用药用真菌清除 O₂⁻ 自由基的活力。用“SOD 样活力”数据可以较直观地反映各样品清除 O₂⁻ 自由基的能力, 实验结果令人满意。

参考文献(略)

收稿日期: 2000-08-28