

海藻中清除氧自由基的物质

罗广华 王爱国 柯德森

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 新鲜海藻的提取液含有超氧化物歧化酶(SOD)活性物质, 能清除超氧自由基(O_2^-)。海藻的SOD活性通常为60-280 U g⁻¹FW, 而在孔石莼(*Ulva pertusa*)、江蓠(*Gracilaria verrucosa*)和凤尾菜(*G. eucheumoides*)中活性较高, 约为300 U g⁻¹FW。一般来说, 海藻的SOD活性和稳定性为: 绿藻 > 红藻 > 褐藻。绿藻的SOD以CuZn-型为主, 而蓝藻的SOD以Fe-型为主。以江蓠和琼枝(*Eucheuma gelatinae*)提取液作PAGE并SOD活性染色时, 除了观察到SOD同工酶带之外, 还发现在前沿指示剂附近有一区域, 此区域与高效自由基清除剂SPD(Superphycodismutase)的电泳行为和对氮蓝四唑(NBT)负染色的抑制相同, 可能两者为同一种物质。

关键词 海藻; 超氧化物歧化酶; 自由基清除剂

分类号 Q946.5

THE SUBSTANCES SCAVENGING OXYGEN FREE RADICALS IN MARINE ALGAE

Luo Guanghua Wang Aiguo Ke Deshen

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Some substances with activity of superoxide dismutase (SOD) extracted from fresh algae can scavenge superoxide radical (O_2^-). The activity of SOD in algae is usually 60-280 U g⁻¹FW, but that in *Ulva pertusa*, *Gracilaria verrucosa* and *G. eucheumoides* is higher (about 300 U g⁻¹FW). In general, the activity and stability of SOD in algae are in order: green algae > red algae > brown algae. The main types of SOD in green algae are CuZn-SOD, but in blue algae, Fe-SOD. The result of PAGE and SOD active staining of the extracts from *G. verrucosa* and *Eucheuma gelatinae* showed that besides some bands with SOD activity, there was also one region near the front of indicator which had similar electrophoreses behavior and similar inhibition of photochemical reduction by NBT, as seen on the band of SPD (Superphycodismutase) which is a highly effective scavenger of free radicals, showing that they may be the same substance.

Key words Marine algae; SOD; Free radical scavenger

Steinman 引用 Asada 等各种进化水平生物的 SOD 类型的研究所整理出的《不同进化水平生物 CuZn-、Mn- 和 Fe-SOD 的系统发育分布图》，并指出 SOD 的类型与物种进化和生物对氧浓度的适应有密切关系。原核生物中较原始的种类如嫌气细菌(其中包括硫细菌)只含 Fe-SOD; 较进化的原核生物, 如好气细菌包括非硫细菌、蓝藻等则只含 Fe- 和/或 Mn-SOD; 较高等的真核生物, 一般只含 CuZn- 和 Mn-SOD, 极少有 Fe-SOD 存在^[1]。我们注意到: 处于特异生长环境的海藻种类很多, 蓝藻是植物中最进化的原核生物, 红藻是真核生物最原始的^[2], 褐藻和绿藻的某些种类非常接近陆地植物^[3], 因此, 海藻中既有高等动植物中比较缺乏的 Fe-SOD^[4], 也有动植物中普遍存在的 CuZn-SOD 和 Mn-SOD, 即三种不同类型的 SOD 在海藻中均普遍存在。海藻自古以来就是一种用途很广的海洋生物资源, 最近, 瑞士的 WBAG RESOURCER 公司从爱琴海(Aegean Sea)的海藻中提取出一种新产品 SPD, 是一种低分子量, 高渗透性的高效自由基清除剂, 因此, 海藻中清除自由基物质的研究具有大的开发潜力。

1 材料与方 法

材料 部分海藻采自青岛海洋研究所附近海面, 样品浸于海水, 冷冻空运, 次日用于实验, 另一部分海藻采自海南三亚附近的后海、大东海或广东南澳岛后宅等地, 样品半干放胶袋内, 常温保持湿润, 次日用于实验。杜氏盐生藻和螺旋藻为本实验室常规培养(表 1)。SPD (Superphycodismutase) 购于瑞士 WBAG RESOURCER 公司。

清除 O_2^- 能力的检测 核黄素在光照下产生 O_2^- , 加入海藻提取液后, 由于提取液中含有清除 O_2^- 的组分, 降低了 O_2^- 还原 NBT 的速度^[5], 通过 560 nm 光吸收的变化, 可测定提取液中 SOD 活性或对 O_2^- 的清除能力。

SOD 同工酶显示和 SOD 类型的鉴别 同以前的方法^[6,7]。

2 实验结果与讨论

2.1 海藻的 SOD 活性

21 种常见的海藻, 绝大部分是有食用价值的经济海藻^[8]。检测其提取液歧化 O_2^- 的能力, 以 SOD 酶单位(U)表示, 结果说明绿藻与红藻对 O_2^- 的清除能力相当, 而褐藻的清除能力较弱。

2.2 海藻中能清除 O_2^- 的组分

由于匀浆是全细胞破碎, 提取液中基本上包含了海藻的所有组分, 表 1 海藻 SOD 活性主要是 SOD 对 O_2^- 的清除能力, 另外也包括了一些对 O_2^- 有清除作用的其它组分^[9], 如甘露醇是 $\cdot OH$ 的清除剂^[10], 海藻多糖的某些组分, 特别是多糖硫酸酯对外源系统产生的 O_2^- 、 $\cdot R$ 和 $\cdot OH$ 有显著的清除作用^[11,12]。大多数经济海藻含有约 10% 的甘露醇, 15-32% 的藻胶(多糖)^[8], 因此, 海藻中清除 O_2^- 的非酶促组份不容忽视。最近瑞士 WBAG RESOURCES 公司针对 SOD 分子量大而难以通透膜的弱点, 推出一种最新的产品 SPD, 它是从海藻中提取的低分子量(8-9kD) 的高效自由基清除剂, 是一种很有前途的药品。我们在做琼枝和江蓠的 PAGE 时, 观察到前沿指示剂附近(图 1: 2,3), 有一些与 SPD(图 1: 1) 的电泳行为相同、对 NBT 光化还原抑制相似的区域, 海藻中这种低迁移率的组份可能与 SPD 为同一种物质。

2.3 海藻 SOD 同工酶的稳定性

各种海藻(红藻: 海膜、甘紫菜; 褐藻: 裙带菜、海带; 绿藻: 孔石莼)在青岛附近海面同时同地采集, 同样方法保存空运, 次日用于实验。从PAGE染色的结果(图2)显示: 褐藻(裙带菜、海带)的SOD同工酶带(图2: 5,6,9,10)边缘模糊, 开始扩散, 表明酶的结构开始了某些异样的变化; 绿藻(孔石莼)的SOD同工酶带(图2: 7,8)周边清晰; 红藻(海膜、甘紫菜)则介乎两者之间(图2: 1-4), 表明了三种海藻SOD同工酶的稳定性为: 绿藻 > 红藻 > 褐藻。褐藻SOD的不稳定性与它含有大量的褐藻多酚有关, 多酚能使SOD和多糖降解^[13], 特别是马尾藻一类, 它们的提取液很快变成棕色至棕黑色, SOD同工酶带也全部消失(图2: 11)。

表1 海藻中的SOD活性

Table 1 The activities of SOD in algae

	种名 Species	采集时间 Sampling date	采集地点 Sampling sites	SOD活性 Activity (U g ⁻¹ FW)
褐藻 Brown algae	半叶马尾藻 <i>Sargassum hemiphyllum</i>	1995,1,12	海南大东海	75
	裂叶马尾藻 <i>S. siliquastrum</i>	1995,1,12	海南大东海	108
	匍枝马尾藻 <i>S. polycystum</i>	1995,1,12	海南大东海	84
	喇叭藻 <i>Turbinaria ornata</i>	1995,1,12	海南大东海	60
	海带 <i>Laminaria japonica</i>	1993,2,8	青岛附近海面	94
	鹅肠菜 <i>Endarachne binghamiae</i>	1995,2,20	广东南澳后宅	86
	铁钉菜 <i>Ishige okamurae</i>	1995,11,18	广东南澳后宅	121
	裙带菜 <i>Undaria pinnatifida</i>	1993,2,8	青岛附近海面	34
	团扇藻 <i>Padina</i> sp.	1995,1,12	海南大东海	60
	绿藻 Green algae	孔石莼 <i>Ulva pertusa</i>	1995,1,12	海南大东海
孔石莼 <i>U. pertusa</i>		1993,2,8	青岛附近海面	-
浒苔 <i>Enteromorpha prolifera</i>		1995,1,12	海南后海	226
总状蕨藻 <i>Caulerpa racemosa</i>		1995,1,12	海南大东海	36
刺松藻 <i>Codium fragile</i>		1995,9,6	广东南澳后宅	160
杜氏盐生藻 <i>Dunaliella salina</i>		1995,9,12	本实验室培养	250
红藻 Red algae		海膜 <i>Halymenia sinensis</i>	1993,2,8	青岛附近海面
	甘紫菜 <i>Porphyra tenra</i>	1993,2,8	青岛附近海面	165
	琼枝 <i>Euचेuma gelatinae</i>	1995,1,12	海南后海	216
	鹿角沙菜 <i>Hypnea cervicornis</i>	1995,1,12	海南后海	196
	江蒿 <i>Gracilaria verrucosa</i>	1995,1,12	海南后海	311
	凤尾菜 <i>G. euचेumoides</i>	1995,1,12	海南后海	315
蓝藻 Blue algae	钝顶螺旋藻 <i>Spirulina platensis</i>	1995,9,12	本实验室培养	287



图1 琼枝和江蒿提取液中的SPD
Fig. 1 SPD in extracts of *Euचेuma gelatinae* and *Gracilaria verrucosa*
1. SPD; 2. 琼枝提取液 Extract of *E. gelatinae*;
3. 江蒿提取液 Extract of *G. verrucosa*

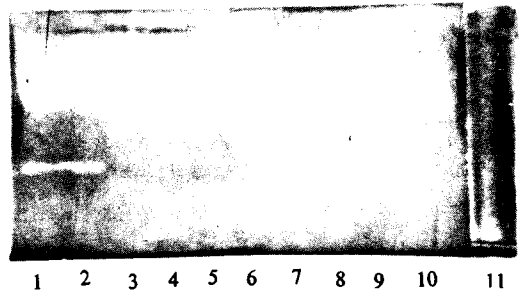


图2 海藻SOD同工酶的稳定性
Fig. 2 The stability of SOD isoenzymes in algae
1, 2 海膜(红藻) *Halymenia sinensis*; 3, 4 甘紫菜(红藻) *Porphyra tenra*; 5, 6 裙带菜(褐藻) *Undaria pinnatifida*; 7, 8 孔石莼(绿藻) *Ulva pertusa*; 9-11 海带(褐藻) *Laminaria japonica*. 材料放置四天测定 Tested after sampling for 4 days.

2.4 蓝藻的 Fe-SOD

钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 是蓝藻的一种, 它的 SOD 同工酶主要是 $R_f=0.57$ 的带(图 3: 1), 此酶带对氯仿-乙醇(图 3: 2)和过氧化氢(图 3: 4)敏感, 而对氰化物不敏感(图 3: 3), 因此是 Fe-SOD^[7]。蓝藻是一种古老的植物, 25 亿年前, 原始大气缺乏游离氧, 随着光合细菌出现, 生物氧化代谢及氧毒害随之发生, 从厌氧细菌要经多少次突变才产生一个蓝藻细胞是不得而知的^[15]。Fe-SOD 的产生是蓝藻逐渐适应有氧的环境, 避免了氧的毒害, 它的产生比其它 SOD 早, 是较原始的 SOD。CuZn-和 Mn-SOD 则是较进化的^[1]。Fe-SOD 在动物中缺乏, 高等植物中也不普遍存在, 它是一种特殊的 SOD, 研究螺旋藻的 SOD 对开发 SOD 资源和进一步利用螺旋藻是有意义的。

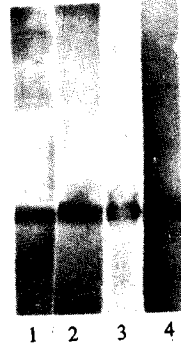


图 3 螺旋藻的 SOD 同工酶

Fig. 3 The SOD isoenzymes in *Spirulina platensis*
1-4. 螺旋藻提取液 Bands from extract of *S. platensis*
1. 对照 Control; 2. 经氯仿-乙醇处理 Treated with chloroform-ethanol; 3. 经 KCN 处理 Treated with KCN; 4. 经 H_2O_2 处理 Treated with H_2O_2 .

参考文献

- 1 Steinman. Superoxide dismutase protein chemistry and structure-function relationships. In: Oberley L W ed. Superoxide Dismutase. Vol. 1, CRC Press, USA, 1982, 11-23
- 2 Misra H P, Fridovich I. Purification and properties of superoxide dismutase from a red alga, *Porphyridium cruentum*. J Biol Chem, 1977, 18:6421-6423
- 3 徐仁. 生物史. 第二分册, 植物的发展. 北京: 科学出版社, 1980, 64-69
- 4 方允中. 超氧化物歧化酶的性质. 方允中, 李文杰主编. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989, 82-87
- 5 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 1983, 9(1):77-84
- 6 罗广华, 王爱国, 邵从本等. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示. 植物生理学通讯, 1983, (6):44-45
- 7 罗广华, 王爱国, 付爱根等. 鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(4):356-359
- 8 曾呈奎等编著. 中国经济海藻志. 北京: 科学出版社, 1962, 55-94
- 9 方允中. 生物体内自由基的产生和清除. 方允中, 李文杰主编. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989, 147-161
- 10 王爱国, 罗广华. 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的 TBA 反应. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2):150-152
- 11 周志刚, 刘志礼, 刘雪娟. 螺旋藻多糖的分离, 纯化及其抗氧化特性的研究. 中国海藻学会四届八次学术讨论会论文摘要集. 成都: 中国藻类学会, 1995, 67
- 12 施定基, 许彩云, 田小华等. 从海带中提取清除自由基的活性物质. 中国海藻学会四届八次学术讨论会论文摘要集. 成都: 中国藻类学会, 1995, 87
- 13 李智恩, 徐祖洪, 张星君等. 红藻多糖药用价值的研究. 中国海藻学会四届八次学术讨论会论文摘要集. 成都: 中国藻类学会, 1995, 67
- 14 严小军, 张燕霞, 范晓. 褐藻多酚对褐藻胶降解作用的研究. 中国海藻学会四届八次学术讨论会论文摘要集. 成都: 中国藻类学会, 1995, 85
- 15 吉斯 A C 著. 高天礼译. 细胞生理学. 北京: 科学出版社, 1984, 1-50