

褪黑素清除活性氧作用的研究

陈季武 朱振勤

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

张 慧

(海军医学研究所, 上海 200432)

摘要 采用多种分析体系检测了褪黑素清除活性氧的作用. 结果表明, 褪黑素能有效地清除包括 O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 在内的多种活性氧, 能显著地抑制 $\cdot OH$ 对 DNA 的损伤, 是一种有效的抗氧化剂.

关键词 褪黑素, 活性氧, DNA 损伤, 化学发光, 抗氧化剂

1 引 言

褪黑素(Melatonin, 简称 MT)的化学名为 N-乙酰-5-甲氧基-色胺, 是松果腺分泌的一种重要激素, 分泌呈现日低夜高的昼夜节律, 并与年龄密切相关, 随着年龄增大, 松果腺钙化程度增加, MT 生物合成与分泌下降^[1,2].

MT 有众多功能, 能增强机体免疫作用, 能调整人体生物钟, 改善睡眠等. 这些功能的发现, 引起人们对 MT 的重视, 尤其是 MT 延缓衰老、抗癌作用的新发现^[1-3], 使 MT 很快成为近年来的研究热点, 迅速被应用于临床, 并成为国内外热门的保健品. 随着研究的继续深入, 揭示 MT 之所以能延缓衰老和抗癌的一个重要机制是 MT 具有免疫增强作用, 另一个重要机制是 MT 清除活性氧作用, 这也是本实验全力探究的主题. Tan 等人已证实 MT 具有清除 $\cdot OH$ 作用^[4]. 而本实验则采用多种化学发光体系和比色体系, 较为全面地研究了 MT 对多种活性氧的清除作用, 为 MT 抗癌和延缓衰老作用提供了有价值的理论依据.

2 材料与方 法

2.1 材 料

褪黑素、鲁米诺均系 Sigma 产品; 过氧化氢酶系西德产品; 邻苯三酚、抗坏血酸、细胞色素 C、硫酸铜、甘露醇、硫脲、过氧化氢、邻啡罗啉(1, 10-Phenanthroline, Phen)均系国产分析纯; 小牛胸腺 DNA 系中科院东方仪器公司生化部产品; SOD 系上海久丰生物制品厂产品; 茶多酚购自浙江农业大学茶叶系, 纯度 99%; 调理酵母多糖系本实验室自制; 新鲜人全血由上海市中心血站提供.

2.2 仪 器

SHG-1 型生物化学发光测量仪(上海技术监督局工厂); DU-7HS 紫外可见分光光度计(美国贝克曼产品); 日立 850 型荧光分光光度计(日本).

2.3 实验方法

2.3.1 产生 O_2^- 的化学发光体系

参考文献 [5], 采用邻苯三酚自氧化产生 O_2^- 的化学发光体系, 并以 O_2^- 特异清除剂 SOD 作为参比标准.

2.3.2 产生 $\cdot OH$ 的比色体系

参考文献 [6], 采用 $CuSO_4-Vit. C-Cyt. C$ 的比色体系, 并以 $\cdot OH$ 清除剂甘露醇作为参比标准.

2.3.3 DNA 损伤的化学发光体系

参考文献 [7, 8], 采用 $CuSO_4-Phen-Vit. C-DNA-H_2O_2$ 化学发光体系. 该体系生成 $\cdot OH$, $\cdot OH$ 损伤 DNA 产生一迟于 Phen 本身发光信号的滞后的 DNA 的化学发光, 其发光强度与 DNA 的量成正比关系. 具体操作是: 用 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 5.5) 配制 $CuSO_4-Phen-Vit. C-DNA-MT$ 溶液, 使 $CuSO_4$ 、Phen、Vit. C、DNA 终浓度为 5×10^{-5} mol/L、 3.5×10^{-4} mol/L 和 50 $\mu g/ml$ 根据需要加入一定量的 MT. 取该混合液 0.8 ml, 放入发光仪样品管中, 加入 200 μl 3% 的 H_2O_2 原液, 使其终浓度为 0.6%, 立即测量化学发光反应动力学曲线. 在本体系中以 $\cdot OH$ 清除剂硫脲作为参比标准.

2.3.4 H_2O_2 的化学发光体系

在不同浓度的 MT 各 100 μl 中, 加入 200 μl 磷酸缓冲液 (pH 8.0), 再加入 100 μl 0.18% H_2O_2 , 混匀. 37 保温 3 分钟. 再将测量管置于发光仪中, 原位注入 600 μl 4×10^{-4} mol/L 鲁米诺溶液启动化学发光反应, 测量 10 秒钟的积分发光强度 (counts of per 10 seconds, 简称 CP10S), 以无 MT 的测量管的积分发光强度为对照, 计算 MT 对本体系化学发光的抑制率^[9]. 在本体系中以 H_2O_2 特异清除剂过氧化氢酶作为参比标准.

2.3.5 全血嗜中性白细胞的吞噬发光

按李益新等^[10]方法稍加修改. 该方法使全血中的嗜中性白细胞吞噬调理酵母多糖, 产生“呼吸爆发”, 生成多种活性氧, 活性氧使鲁米诺受激发光. 修改后的具体操作是: 用 pH 7.4 的 PBS 配制鲁米诺、调理酵母多糖和 MT, 先在各管中加入 100 μl 新鲜全血, 再加入 100 μl 不同浓度 MT (对照以 PBS 代替)、600 μl PBS 和 100 μl 2 mmol/L 鲁米诺测扩增的积分发光强度, 再加入 100 μl 2.0 mg/ml 的调理酵母多糖, 摇匀后立即测 6 秒钟积分发光强度, 而后每隔 3 分钟测一次发光, 共测 45 分钟. 为了避免血源误差, 实验所用全血来源于同一供血者的同一血样.

除实验 2.3.5 外, 实验 2.3.1~2.3.4 四种体系均严格按照参考文献所列条件进行操作.

3 结果与讨论

3.1 对 O_2^- 的清除作用

如表 1 所示, MT 能有效地抑制邻苯三酚自氧化的化学发光, 在 25 至 400 $\mu g/ml$ 范围内, 随着浓度增加, 发光强度随之下降, 其发光抑制率 50% 的浓度 (IC₅₀) 为 72 $\mu l/ml$, 而对照实验结果表明, SOD 在本体系中的 IC₅₀ 为 6 单位/ml, 所以 72 μg MT 相当于 6 单位 SOD, 即 12 μg MT 相当于 1 单位 SOD.

表 1 MT 对 O_2^- 的清除作用 ($n=3, \bar{x} \pm SD$)Table 1 Effect of melatonin on scavenging O_2^- .

MT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	25	50	100	200	400
发光值 (CP10S)	538598 \pm 3894	424953 \pm 21315	291920 \pm 14216	244462 \pm 9547	74110 \pm 3278	20374 \pm 799
抑制 (%)	0	21.1	45.8	54.6	86.2	96.2

3.2 对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用

从 $\text{CuSO}_4\text{-Vit. C-Cyt. C}$ 的比色体系的实验结果来看, MT 具有良好的清除 $\cdot\text{OH}$ 作用. 随着 MT 浓度的增加, 清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用增强, 量效关系显著, 其 IC_{50} 为 $225\mu\text{g}$ (即 $122.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $484\mu\text{mol}/\text{L}$), 如表 2 所示. 而对照实验结果表明, 甘露醇在本体系中的 IC_{50} 为 $20.9\text{mmol}/\text{L}$, 所以 MT 清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力是甘露醇的 43 倍, MT 远优于甘露醇.

表 2 MT 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用 ($n=3, \bar{x} \pm SD$)Table 2 Effect of melatonin on scavenging $\cdot\text{OH}$.

组别	$A_{550\text{nm}}$	ΔA	抑制 (%)
空白	0.2622 \pm 0.0034		
$\cdot\text{OH}$ 生成组	0.1320 \pm 0.0002		
$50\mu\text{gMT}$	0.1849 \pm 0.0003	0.0529	40.1
$100\mu\text{gMT}$	0.1920 \pm 0.0024	0.0600	45.5
$200\mu\text{gMT}$	0.1960 \pm 0.0076	0.0640	48.5
$400\mu\text{gMT}$	0.2132 \pm 0.0024	0.0812	61.5
$800\mu\text{gMT}$	0.2224 \pm 0.0049	0.0904	69.4
$1500\mu\text{gMT}$	0.2466 \pm 0.0028	0.1146	86.8

3.3 MT 对 $\cdot\text{OH}$ 引起的 DNA 损伤的保护作用

如图 1 所示, MT 的加入使发光峰值明显下降, 随着 MT 浓度增大, 发光峰值下降程度增大, 说明 MT 能有效地保护 DNA 免受损伤. 从图 1 还可以看出, MT 的加入仅使发光峰值下降, 无发光峰位后移现象. 因为发光峰值下降主要表明 DNA 损伤受抑制, 发光峰位后移主要表明 DNA 损伤被延迟^[8]. 所以 MT 只是显著地抑制了 DNA 损伤, 不具有延迟 DNA 损伤作用. 这就提示 MT 并未作用于 DNA 损伤链的延伸过程 (涉及多种自由基和非自由基中间产物), 而是作用于链反应之前的非链反应过程, 清除了启动链反应的活性物质 $\cdot\text{OH}$, 所以 MT 在本体系中起到预防性抗氧化剂的作用^[8]. 由图 1 可知, MT 的 IC_{50} 为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$. 相当于 $8.61\mu\text{mol}/\text{L}$. 而对照实验结果显示, 硫脲在本体系中虽然具有延迟 DNA 损伤的作用 (发光峰位后移), 但其 IC_{50} 为 $190\mu\text{g}/\text{ml}$. 相当于 $2.5\text{mmol}/\text{L}$, 是 MT 的 IC_{50} 的 290 倍. 可见 MT 保护 DNA 免受 $\cdot\text{OH}$ 损伤的能力比硫脲要大

得多。

3.4 MT 对 H_2O_2 的抑制作用

H_2O_2 能在有 O_2 和碱性条件下氧化鲁米诺产生化学发光。MT 能显著抑制该体系的化学发光, 并呈剂量依赖关系(如图 2 所示), 说明 MT 或具有清除 H_2O_2 的作用, 或能竞争性地夺取 H_2O_2 能量, 或者这两个作用兼而有之。图 2 显示, MT 的 IC_{50} 为 $25\mu g/ml$; 而对照实验结果显示, 过氧化氢酶在本体系中的 IC_{50} 为 0.51 单位, 所以本体系中 $25\mu g$ MT 与 0.51 单位过氧化氢酶相当。

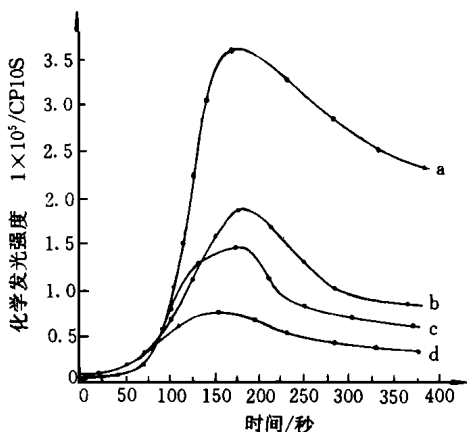


图 1 MT 对 $\cdot OH$ 引起的 DNA 损伤的保护作用

Fig. 1 Protection effect of melatonin on DNA damage caused by $\cdot OH$. Concentration of melatonin ($\mu g/ml$): a. 0; b. 2; c. 5; d. 10.

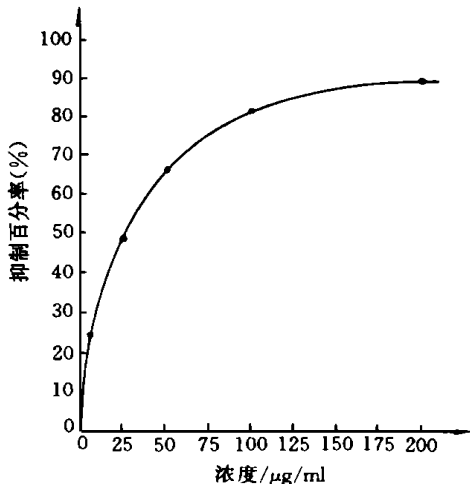


图 2 MT 对 H_2O_2 化学发光的抑制作用

Fig. 2 Effect of melatonin on inhibiting H_2O_2 chemiluminescence.

3.5 MT 对全血吞噬细胞化学发光的影响

在血清调理的酵母多糖刺激下, 血中嗜中性的白细胞(PMN)被激活, 出现“呼吸爆发”, 产生 1O_2 、 H_2O_2 、 O_2^- 和 $\cdot OH$ 等活性氧, 这些活性氧的能量传递给体系中的鲁米诺, 使其激发发光。如果清除了活性氧, 就可明显地降低化学发光强度。实验表明, MT 能有效地抑制吞噬细胞化学发光, 并呈量效关系, 这一现象提示 MT 具有清除 1O_2 、 H_2O_2 、 O_2^- 和 $\cdot OH$ 等多种活性氧的作用(如图 3 所示)。前面所做的 O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 三个独立体系的实验结果又可以认为是对 MT 具有清除或抑制 O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 能力的旁证。图 3 表明, MT 对全血吞噬细胞化学发光的 IC_{50} 为 $100\mu g/ml$, 相当于 $430\mu mol/L$ 。而对照实验结果表明, 茶多酚的 IC_{50} 为 $19\mu g/ml$, 相当于 $45.9\mu mol/L$ 。可见 MT 清除或抑制 O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 等活性氧的综合能力约为茶多酚的 11%。

许多研究已表明, 机体失衡时会产生和积累过量的活性氧, 损伤机体, 其中 O_2^- 产生最早, $\cdot OH$ 毒性最大, 这些过量的活性氧会引起脂质过氧化、蛋白质变性、酶失活、多糖降解、DNA 链断裂、细胞解体乃至机体病变和死亡。所以, 清除过量活性氧, 生理意

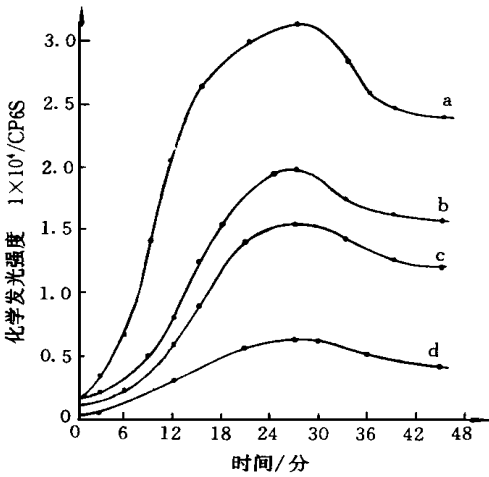


图 3 MT 对全血吞噬细胞化学发光的影响
MT 浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$): a: 0; b: 50; c: 100,
d: 600

Fig. 3 Effect of melatonin on chemiluminescence
of whole blood phagocyte.

义重大. 本实验证明, MT 具有良好的清除活性氧作用, 尤其是对 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 的清除或抑制作用特别显著, 对其它多种化学和生物(如吞噬细胞)来源的活性氧也有清除作用, 表明 MT 有可能不同程度地减轻活性氧危害.

MT 清除上述活性氧的作用与 MT 本身的结构有关, 主要是依赖于吲哚环上 5 位的甲氧基, 其侧链上乙酰基具有协同作用^[4], 说明 MT 能直接清除活性氧. 同时 MT 具有高亲脂性, 使其易通过生物膜, 又具有部分亲水性, 使其能够进一步穿过胞浆进入细胞膜, 更好地发挥抗氧化作用^[11], 与活性氧有关的疾病很多, 典型的是衰老和癌变. 已经发现, 活性氧是细胞癌变的原初引发机制之一^[12]; 活性氧含量随着年龄老化而增高, 是人体衰老的一个重要原因^[13]. 其中由 $\cdot\text{OH}$ 引起的 DNA 氧

化损伤在癌症和衰老发生过程中起着重要作用. 由此推断有效地清除多种活性氧和使 DNA 免受 $\cdot\text{OH}$ 氧化损伤是 MT 抗癌和抗衰老的共同药理作用之一. 本研究表明, MT 是一种有效的活性氧清除剂. 这个结果可为 MT 作为药物和保健品的功能开发提供新的资料.

参 考 文 献

- [1] Schmid H A *et al.*, J. Pineal Res., 1994, **16**: 178.
- [2] Humbert W *et al.*, Ann. NY Acad. Sci., 1994, **719**: 43.
- [3] Roeggeler B. J. Pineal Res., 1993, **14**: 151.
- [4] Tan D X *et al.*, Endocrine J., 1993, **1**: 57.
- [5] 郭蔼光等. 植物生理学通信, 1989, **3**: 54.
- [6] 王成莲等. 生物化学和生物物理进展, 1989, **16**(6): 473.
- [7] 帖建科等. 生物物理学报, 1995, **11**(2): 276.
- [8] 张 健等. 生物物理学报, 1997, **13**(1): 123.
- [9] 胡天喜, 陈季武等. 生物化学和生物物理学报, 1992, **24**(5): 465.
- [10] 李益新等. 生物化学和生物物理进展, 1986, **13**(1): 41.
- [11] Shida C S. J. Pineal Res., 1994, **16**: 198.
- [12] Marx J L. Science, 1987, **235**: 520.
- [13] 李文杰. 工业生化杂志, 1992, **2**: 8.

A STUDY ON ACTIVE OXYGEN SCAVENGE BY MELATONIN

Chen Ji w u Zhu Zhenqin

(*Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062*)

Zhang Hui

(*Institute of Naval Medicine, Shanghai 200432*)

Abstract

Effect of melatonin on active oxygen scavange were measured by using several analytic systems. The results showed that melatonin could effectively scavenge active oxygen including $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 and obviously inhibit DNA damage caused by $\cdot\text{OH}$. We suggest that melatonin is a efficiency antioxidant.

Key words melatonin, active oxygen, DN A damage, chemiluminescence, antioxidant