

羟化赖氨酸清除活性氧自由基能力的研究

张 英

王树英

曹霖

(浙江农业大学食品科技系,杭州 310029) (无锡轻工大学食品学院,无锡 214036)

摘要 在竹叶及其提取物中检出了一种特殊的非蛋白氨基酸 δ -OH-Lys,为了解其生物学意义,用化学发光法和电子自旋共振法(ESR)对 δ -OH-Lys 和 Lys 清除超氧阴离子自由基(O_2^-)的能力作了比较,结果表明赖氨酸在 δ 位羟化以后,抗活性氧自由基的活性有了显著提高。

关键词 羟化赖氨酸;超氧阴离子自由基(O_2^-);清除能力

分类号 Q517

0 前 言

氨基酸、肽和蛋白质的抗氧化活力,尤其是作为油脂自动氧化的链中断剂的能力已有许多研究^[1~8],但较多的工作是通过 Maillard 反应得到具有抗氧化作用的产物^[9]。

从 70 年代末人们开始关注氨基酸的生物抗氧化活性,氨基酸已被建议作为活体内潜在的抗活性氧(特别是 1O_2 和 O_2^-)的生物抗氧化剂^[10],但有关氨基酸的抗氧化机理至今未见有成功的解释。

我们在研究竹叶中抗氧化和抗衰老的功能因子时,在桂竹叶、金毛竹叶及其提取物中检出了相当数量的 δ -OH-Lys,主要以游离单体和小肽的形式存在。我们选取了 19 种氨基酸单体及谷胱甘肽(GSH)的标样,用化学发光法测试它们对活性氧自由基(O_2^- 和 $OH\cdot$)的清除能力,证实了氨基酸普遍具有生物抗氧化活性,抗 O_2^- 的有效浓度范围在 $\times 10^{-2} \sim \times 10^{-4}$ mol/L,且 GSH 表现出远高于氨基酸单体的抗氧活力^[11],又用化学发光和 ESR 两种方法对 Lys 和 δ -OH-Lys 的清 O_2^- 活力作了专项的比较,并对其增效机理进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 氨基酸试样

赖氨酸: Lys·HCl, BR, BDH 进口分装

羟化赖氨酸: δ -OH-Lys·HCl, BR, Sigma 公司出品。

氨基酸试样用 pH7.8 的磷酸盐缓冲溶液配成 0.1 mol/L 的应用液待用。

1.2 化学发光法测定清O⁻活力

1.2.1 仪器和试剂 生物化学发光仪: SHG-Ⅱ型, 上海技术监督局实验工厂制造 测试时样品室温度 30℃、高压 550 V、甄别电压 0.2 V; 黄嘌呤 (X) 和鲁米诺 (Luminol) 均为 Sigma 公司产品, 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 为中科院上海生化所生产, 其余试剂和药品均为 AR 级, 发光所用试剂用超纯水配制。

1.2.2 测定方法 用 X-XOD-Luminol 的稳态体系^[11]产生 O⁻, 加入不同浓度的氨基酸应用液进行抑制, 用发光仪测定 这是一个相当稳定的体系, 发光强度在 30 min 内基本保持稳定 反应步骤: 发光杯中依次加入 10^μL 的 0.1 U/mL 的 XOD 和 100^μL 的样品应用液, 预恒温 30℃, 用同样温度的 900^μL 的 X-Luminol 混合液 (9:1) 启动发光反应, 记录每 6 秒的发光强度积分 Cp6s。空白用 pH7.8 的 PBS 代替。与空白对照计算抑制率。

1.3 ESR 测定清O⁻活力

1.3.1 仪器和测试条件 JES-FEIX G 电子自旋共振仪 (JEOL 公司, 日本) 共振腔温度 -120℃, X 波段, 微波功率 4 mW, 磁场强度 (330±50) mV·s/m², 响应时间 0.1 s, 检测时间 3 min。选择 Na₂O₂-DM SO 体系产生 O⁻^[12] 波谱特征的 G 因子是 g_∥ = 2.085 9, g_⊥ = 2.007 6。

1.3.2 测定方法 测试时取新鲜配制的 100^μL 的 Na₂O₂-DM SO 溶液, 加上 15^μL 的水或试液 (δ-OH-Lys 和 Lys 事先用超纯水配制成 3 种靠近 IC₅₀ 的浓度), 定量吸入石英毛细管内, 低温下进行测试, 纪录微商 ESR 谱, 用信号峰的高度表示所产生 O⁻ 的相对强度, 计算清除率。

2 结果与分析

2.1 化学发光法研究结果

图 显示了 δ-OH-Lys 和 Lys 试样在 5 mmol/L 终浓度时, 对 X-XOD-Lumiol 的 O⁻ 产生体系 (25℃, pH10.04, X 和 Lumiol 浓度均为 178 mmol/L) 化学发光的淬灭, 图 表示了相应的抑制率。表 则列举了在 3 种不同测试浓度时, Lys 和 δ-OH-Lys 对 O⁻ 的抑制率。

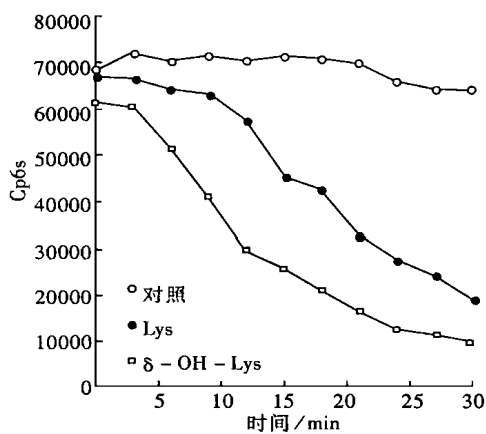


图 1 两种 Lys 对 O⁻ 化学发光的淬灭

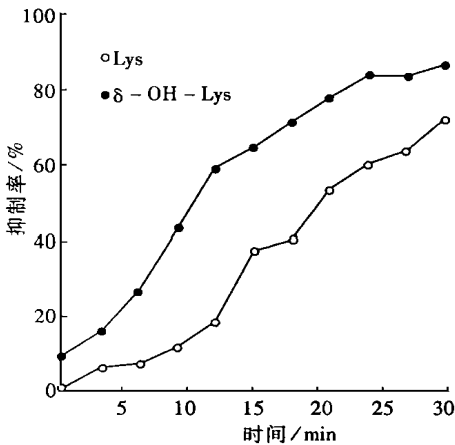


图 2 δ-OH-Lys 和 Lys 对 O⁻ 的清除能力

化学发光法测定的结果表明, Lys 在 δ 位羟化以后提高了抗氧活性, 并且这种活性呈显著的浓度依赖关系。

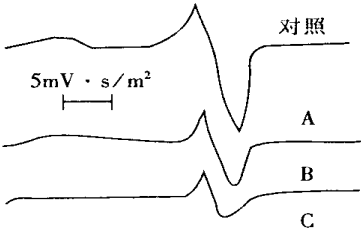
化学发光法虽然有方便和快速的特点, 但毕竟是一种检测自由基的间接方法, 要取得有关自由基存在、变化的直接证据, 还有待 ESR 的研究

2.2 ESR 研究结果

ESR 波谱分析 (用 $\text{Na}_2\text{O}_2\text{-DM SO}$ 体系产生 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 共振腔温度 -120°C) 的结果见表 2, 图 3, 图 4。

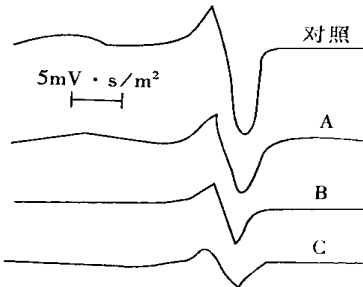
表 2 两种赖氨酸清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 能力的 ESR 测定

试样浓度 / (mmol/L)	$\delta\text{-OH-Lys}^+\text{HCl}$		Lys ⁺ HCl	
	信号强度 /mm	清除率 /%	信号强度 /mm	清除率 /%
对照	48	0	48	0
1.09	26	45.83	29	39.58
2.17	19	60.42	23	52.08
6.52	0	100	17	64.58



试样浓度 /mmol/L: A 1.09; B 2.17; C 6.52

图 3 $\delta\text{-OH-Lys}$ 清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的 ESR 谱图



试样浓度 /mmol/L: A 1.09; B 2.17; C 6.52

图 4 Lys 清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的 ESR 谱图

ESR 研究的结果与化学发光法相吻合, 证实了两种赖氨酸盐酸盐均有清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的活力, IC_{50} 1~ 2 mmol/L, 且浓度与抗氧活性之间呈显著的量效关系; 当终浓度均为 6.25 mmol/L 时, $\delta\text{-OH-Lys}$ 已完全清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 而 Lys 的清除率仅为 64.58%; 2.17 mmol/L 的 $\delta\text{-OH-Lys}$ 的清除能力与 6.25 mmol/L 的 Lys 接近, 证实赖氨酸在 δ 位羟化以后活性确有显著提高。同时还发现, 在清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的同时, 体系中没有出现新的信号峰, 表明在该反应过程中没有新的自由基产生。

3 讨 论

化学发光和顺磁共振的研究结果一致表明, 赖氨酸羟化以后清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的能力显著提高。 $\delta\text{-OH-Lys}$ 中除了氨基酸共有的功能团 (α -氨基和 α -羧基) 外, 在 $\epsilon\text{-NH}$ 的邻位上增加了一个 OH。关于其增效机理, 我们认为主要是由于 $\delta\text{-OH}$ 的供氢作用和分子内氢键的稳定效应。邻位氨基和羟基的存在有利于形成分子内氢键, 一旦供氢以后, 由于分子内氢键的形成, 使 $\delta\text{-OH-Lys}$ 的氧化态产物具有相当的稳定性, 从而增强了它作为自由基清除剂淬灭 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的能

力。竹叶及其提取物中存在相当数量的 δ -OH-Lys, 并且具有显著高于 Lys 的生物抗氧化活性, 羟化赖氨酸在理论和实践上均能部分替代赖氨酸, 应用于食品和医药的某些方面, 将起到营养和保健的双重功效, 具有十分诱人的前景。

参 考 文 献

- 1 Marcuse R. Nature, 1960, 186 886~ 887
- 2 Andrews F. JAOSC, 1965, 42 779~ 781
- 3 Karel M. J Food Sci, 1966, 31 892~ 896
- 4 Bishov S J. Food Tech, 1967, 21 148 A~ 150 A
- 5 Nagano Y. Agric Biol Chem, 1968, 32 846~ 850
- 6 Zirlin A. J Food Sci. 1969, 34 160~ 164
- 7 Bishov S J. J Food Sci, 1975, 40 345~ 348
- 8 Yamaguchi N. New Food Ind, 1989, 31 18~ 22
- 9 Mitsuo Namiki. Agric Biol Chem, 1982, 46(5): 1199~ 1206
- 10 Krasnovsky A A. Photochem Photobiol, 1979, 29 29~ 36
- 11 张英. 竹叶保健功能因子的研究. [学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1995
- 12 冯亚菲. 波谱学杂志, 1995, 12(2): 185~ 188

Studies on the Scavenging Capacity of Hydroxyl Lysine to Active Oxygen Radical

Zhang Ying

(Dept. of Food Sci. and Tech., Zhejiang Agric. Univ., Hangzhou 310029)

Wang Shuying Ding Xiaolin

(School of Food Sci. and Tech., Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract A kind of specific non-protein amino acid, δ -OH-Lys, was detected out both from bamboo leaves and their extracts. Its biologic significance of antioxidation was investigated by Chemiluminescence and ESR. The results showed that the scavenging capacity of this hydroxyl lysine on $O_2^{\cdot -}$ was much stronger than lysine.

Key words hydroxyl lysine; superoxide anion radical($O_2^{\cdot -}$); scavenging capacity

(责任编辑: 陈 娇)