

# 不同生理时期梅花鹿血液 GSH-Px 含量测定及其纯化

张光超<sup>1</sup>, 王晓松<sup>1</sup>, 马泽芳<sup>1\*</sup>, 唐超<sup>1</sup>, 崔凯<sup>1</sup>, 刘永举<sup>1</sup>, 蒋小明<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学, 青岛 266109; 2. 新疆库尔勒万通鹿业科技有限责任公司, 库尔勒 841000)

**摘要:** 研究不同生理时期梅花鹿全血中 GSH-Px 含量变化及其纯化技术, 为开发鹿血抗衰老资源奠定理论基础。用 DINB 法测定梅花鹿的溶血液、血细胞内容物、血浆和血细胞细胞膜中 GSH-Px 含量并计算全血 GSH-Px 含量; 利用 10%~100% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析和柱层析技术纯化 GSH-Px; 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其亚基相对分子质量。试验结果表明: 全血 GSH-Px 含量以生茸期最高为  $(1\ 973.07 \pm 25.43) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与配种期的  $(1\ 727.74 \pm 12.46) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 与生茸前期的  $(1\ 961.83 \pm 16.54) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  差异不显著 ( $P > 0.05$ ); GSH-Px 的初始比活力为  $24.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 经纯化后得到 GSH-Px  $0.37 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 最终比活力  $1\ 347.7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 纯化倍数为 54.1 倍, 回收率 25.00%; 鹿血 GSH-Px 亚基的相对分子质量为 17.2 ku。结果提示生茸期鹿血的 GSH-Px 含量最高, 开发利用价值最大, GSH-Px 含量与生理特性相关; 鹿血 GSH-Px 盐析条件为 40%~80% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 此时所得 GSH-Px 纯化倍数较高。

**关键词:** 梅花鹿; 血液; 谷胱甘肽过氧化物酶; 纯化

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0138-07

## Measurement and Purification of GSH-Px in Different Physiological Period of Sika Deer Blood

ZHANG Guang-chao<sup>1</sup>, WANG Xiao-song<sup>1</sup>, MA Ze-fang<sup>1\*</sup>, TANG Chao<sup>1</sup>,  
CUI Kai<sup>1</sup>, LIU Yong-ju<sup>1</sup>, JIANG Xiao-ming<sup>2</sup>

(1. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Xinjiang Korla Wantong Deer Technology Limited Liability Company, Korla 841000, China)

**Abstract:** The contents of GSH-Px in the whole blood of sika deer within different physiological period and the technique for purification GSH-Px, were studied for developing anti-aging resources of deer blood and laid a theoretical basis. The contents of GSH-Px in the blood cells, plasma, dissolved blood and cell membrane were detected by using DTNB method and the contents of GSH-Px in the whole blood were calculated. A 10%-100% of saturation  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  salting-out and column chromatography technology were used to purify the GSH-Px and the SDS-PAGE was used to measure its subunit molecular weight. The results showed that the highest contents of GSH-Px appeared during the time of antler developing period ( $(1\ 973.07 \pm 25.43) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), which was significantly higher ( $P < 0.01$ ) than that in the service period ( $(1\ 727.74 \pm 12.46) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). However, no significant difference ( $P > 0.05$ ) was found between the value in antler developing period and the pre-antler period ( $(1\ 961.83 \pm 16.54) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). GSH-Px initial specific activity was  $24.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  and  $0.37 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  purified GSH-Px was achieved. Finally specific activity was  $1\ 347.7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  and 54.1 times purification rate and 25% recovery rate were a-

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 青岛农业大学高层次人才启动基金资助项目(620813); 新疆自治区科技厅科技支疆资助项目(201091240)

作者简介: 张光超(1985-), 男, 山东省莱阳市人, 硕士生, E-mail: guang135064@126.com

\* 通讯作者: 马泽芳, 教授, Tel: 15092124338, E-mail: mazefang@163.com

chieved. The relative molecular weight of subunit for GSH-Px was 17.2 kDa. The results demonstrated that there are some certainly correlation between the change of GSH-Px content and the physiological period of the deer. The saturation of 40%~80%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  is the best condition for GSH-Px purification.

**Key words:** spotted deer; blood; GSH-Px; purification

鹿血,为鹿科动物梅花鹿(*Cervus nippon Temminck*)或马鹿(*Celaohus L*)的腥血或茸血,自古就有记载其具有延缓衰老和抗疲劳等功效<sup>[1-3]</sup>,而衰老与抗衰老是现代医学界的研究热点之一<sup>[4-5]</sup>。为此,近年来,人们对鹿血抗衰老机制和鹿血抗衰老产品开发进行了初步研究。蒋蕾等<sup>[6]</sup>研究证明鹿血中含有超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)等多种抗衰老酶类。崔丽等<sup>[7]</sup>和宋高臣等<sup>[8]</sup>分别采用给大鼠口服鹿血清和鹿血口服液的方法,证明鹿血能降低大鼠血清及肝、脑组织中 LPO 的含量,增强抗衰老能力。张启迪等<sup>[9]</sup>和曹荣峰等<sup>[10-11]</sup>分别对梅花鹿血液中卵磷脂含量的测定方法和不同饲养时期鹿血中抗衰老物质(卵磷脂、次黄嘌呤和尿嘧啶)的含量进行了研究,结果表明卵磷脂含量以生茸期最高,次黄嘌呤和尿嘧啶含量以配种期最高。王晓松等<sup>[12]</sup>对不同生理时期鹿血中 SOD 含量变化研究发现, SOD 含量以生茸期最高。GSH-Px 是细胞中抗过氧化酶系统中的一种酶,该酶对抗衰老及保护肝脏起着重要作用<sup>[13-14]</sup>,但目前关于不同生理时期鹿血中 GSH-Px 含量的变化及其纯化技术方面的研究尚未见报道。本研究以生茸前期、生茸期和配种期的雄性东北梅花鹿血液为试验对象,测定其溶血液、血细胞内容物、血浆和血细胞细胞膜中 GSH-Px 含量并进行纯化技术研究,为鹿血抗衰老产品的开发利用及提取提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

胰蛋白酶( $13\ 000\ \text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ ):大连保税区联合博泰生物技术有限公司;考马斯亮蓝 G-250 和 R-250(无锡日用化工应用研究所);牛血清白蛋白(中国医药集团上海化学试剂有限公司);硫酸铵:(中国宿州化学试剂有限公司);EDTA-2Na(沈阳市试剂三厂);30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ (天津泰兴试剂厂);十二烷基磺酸钠(天津化学试剂三厂);二硫代对二硝基苯甲酸(Fluka 产品);以上试剂及其它试剂均为分析纯;叠

氮钠-磷酸盐缓冲液: $2.5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NaN}_3$ ,  $0.2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{EDTA-2Na}$ ,  $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $1.0\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{GSH}$  溶液: $3.07\ \text{mg}\ \text{GSH}$ ,以叠氮钠-磷酸盐缓冲液溶解并稀释至  $10.0\ \text{mL}$ ,需当日配制;偏磷酸沉淀液: $\text{HPO}_3\ 16.7\ \text{g}$ ,先用蒸馏水溶解再加入  $\text{EDTA-2Na}\ 0.5\ \text{g}$ ,  $\text{NaCl}\ 280\ \text{g}$  加蒸馏水至  $1\ 000\ \text{mL}$ ,用普通滤纸过滤,室温保存; $1.5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{H}_2\text{O}_2$ :取 30%  $\text{H}_2\text{O}_2\ 15\ \mu\text{L}$ ,以双蒸水定容至  $100\ \text{mL}$ ,需当日配制;DTNB 显色液:DTNB  $20\ \text{mg}$  加 1%柠檬酸三钠  $50\ \text{mL}$  溶解,冰箱中可保存 1 月。

### 1.2 主要仪器设备

移液器( $20, 1\ 000\ \mu\text{L}$ ,德国 Eppendorf);电子分析天平(ACCULAB,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司),精度  $0.01\ \text{mg}$ ;低速冷冻离心机(GTR10-1,北京时代北利离心机有限公司);紫外可见分光光度计(UV-2102PC,尤尼柯(上海)仪器有限公司);多用脱色摇床(TY-80S,江苏海门医用仪器厂);冷冻干燥机(DS5-020NW,浙江分析仪器有限公司);柱层析系统 LKB(Pharmacia);电泳仪 DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

### 1.3 血样的采集和处理

选择 3~7 岁,体质量、体况相近,常规饲养条件下的健康雄性东北梅花鹿共计 16 头,分别于 2009 年 6 月中旬(生茸期,6 头)、2009 年 11 月上旬(配种期,5 头)和 2010 年 3 月上旬(生茸前期,5 头)用鹿眠宝 3 号对梅花鹿麻醉,进行颈静脉采血。

用  $50\ \text{mL}$  注射器抽取  $40\sim 50\ \text{mL}$  血液,并立即移入已加有  $0.2\ \text{mL}$  肝素钠溶液( $500\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 8 支  $5\ \text{mL}$  离心管内,放于  $4\ ^\circ\text{C}$  冰盒冷藏,于 2 h 内送回实验室。试验采集血样共计 16 个(生茸期 6 个、配种期 5 个、生茸前期 5 个)。将血样分为两部分,一部分用于 GSH-Px 纯化,另一部分按下述方法制备成溶血液(成分为血浆和血细胞内容物)、血细胞内容物稀释液、血浆和细胞膜酶解液,用于 GSH-Px 含量的测定。

1.3.1 溶血液的制备 取  $1\ \text{mL}$  全血加入等体

积的蒸馏水,充分混匀后在 4 °C 过夜,然后 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上层液体即为溶血液。

1.3.2 血细胞内容物稀释液的制备 取 1 mL 全血在 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,弃去上清液,得血细胞;向血细胞中加入等体积的蒸馏水,充分混匀后 4 °C 过夜,然后 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上层液体即为血细胞内容物稀释液。

1.3.3 血浆的制备 取 1 mL 全血在 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集上清液,得血浆。

1.3.4 细胞膜酶解液的制备 取 1 mL 全血加入等体积的蒸馏水,充分混匀后在 4 °C 下过夜,然后在 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集沉淀,向沉淀中加入 1 mL 胰蛋白酶液体(浓度为 1 300 IU · mL<sup>-1</sup>),在 37 °C 反应 2 h,得细胞膜酶解液<sup>[15]</sup>。

#### 1.4 样品中 GSH-Px 含量的测定方法

对上述样品采用 DTNB 法<sup>[16-20]</sup> 进行 GSH-Px 含量测定。

1.4.1 配制 GSH 标准液 取 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 100 μmol · L<sup>-1</sup> GSH 溶液,分别加入 2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.0 mL 偏磷酸沉淀液,得到浓度分别为 0、20、40、60、80、100 μmol · L<sup>-1</sup> 的 GSH 标准液。

1.4.2 制作标准曲线 向上述 GSH 标准液中加 0.32 mol · L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 mL 和 DTNB 0.5 mL,显色 5 min,用紫外可见分光光度计于 412 nm 处比色,用双蒸水调零,进行吸光值的测定。根据所测吸光值制作标准曲线。

1.4.3 样品测定 对样品进行酶促反应(表 1),3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 2 mL,作显色反应(表 2),室温静置 15 min 后,在 412 nm 处比色,蒸馏水调零,测定各管 OD 值。

酶活力单位定义:每分钟氧化 1 μmol GSH 所需酶量。按下式进行计算:GSH-Px 活力(U · mL<sup>-1</sup>) = (非酶管 OD 值 - 酶管 OD 值) × A × 稀释倍数

全血中 GSH-Px 含量的计算:取 1 mL 全血在 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,上清液为血浆,下层为血细胞,用微量移液器测量血浆的体积,计算血细胞体积。向血细胞中加入等体积的蒸馏水,充分混匀后在 4 °C 过夜,然后在 4 °C、3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,测量血细胞内容物稀释液体积,计算细胞膜体积。全血 GSH-Px 含量(U · mL<sup>-1</sup>) = 血细胞内容物稀释液体积 × 血细胞内容物稀释液 GSH-Px 含量 + 血浆体积 × 血浆 GSH-Px 含量 + 血细胞

细胞膜体积 × 血细胞细胞膜 GSH-Px 含量。

表 1 酶促反应过程

Table 1 The process of enzyme catalysis

试剂/mL	非酶管(对照管)	酶管(测定管)
Reagent	Contrast	Determination
1 mmol · L <sup>-1</sup> GSH	0.4	0.4
样品 Sample	0	0.4
	37 °C 水浴反应 3 min	
1.5 mmol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.2	0.2
	37 °C 水浴反应 3 min	
偏磷酸沉淀液 MPA	4.0	4.0
样品 Sample	0.4	0

MPA. Metaphosphoric acid

表 2 显色反应过程

Table 2 The process of color reaction

试剂/mL	空白	非酶管(对照)	酶管(测定)
Reagent	Blank	Contrast	Determination
偏磷酸沉淀液 MPA	1.6	0.0	0.0
双蒸水 DDW	0.4	0.0	0.0
上清液 Supernatant	0.0	2.0	2.0
0.32 mol · L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	2.5	2.5
DTNB	0.5	0.5	0.5

MPA. Metaphosphoric acid; DDW. Double distilled water

#### 1.5 GSH-Px 的纯化

1.5.1 蛋白质含量 为了计算纯化倍数,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,按照 Bradford<sup>[21]</sup> 的测定步骤。

1.5.2 硫酸铵盐析范围的选取 向鹿血溶血液中加入 2 倍体积的 0.1 mol · L<sup>-1</sup> PH7.4 的磷酸缓冲液(A 液),4 °C 静置 20 min,3 000 r · min<sup>-1</sup> 冷冻离心 30 min,上清液为粗提液。分别加不同量的固体(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 细粉于粗提液中,使其(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,溶解后,4 °C 静置 5~6 h,3 000 r · min<sup>-1</sup> 冷冻离心 30 min,弃上清液,收集沉淀溶于 5 mL A 液中,测定不同(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 饱和度盐析产物的 GSH-Px 含量及蛋白质含量,计算酶活力和纯化倍数,选择沉淀 GSH-Px 的最适(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 饱和度。

1.5.3 GSH-Px 纯化过程 取鹿血 20 mL,加入

等体积的蒸馏水,得到溶血液,以 1:2 的比例加入 A 液,4 °C 静置 20 min,3 000 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 30 min,收集上清液,向其中加细粉至 40% 饱和度,4 °C 静置 5~6 h,3 000 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 30 min,弃沉淀收集上清液,继续向上清液中加入 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 细粉至饱和度 80%,于 4 °C 静置 12 h,3 000 r·min<sup>-1</sup> 冷冻离心 30 min,收集沉淀,将其溶于少量 0.05 mol·L<sup>-1</sup> pH8.0 的磷酸缓冲液中。加入到已经平衡的 DEAE 层析柱。用含 0~0.5 mol·L<sup>-1</sup> 线性梯度的 NaCl 溶液进行洗脱,流速 30 mL·h<sup>-1</sup>,收集具有酶活性的管,冷冻干燥后,得到 GSH-Px 纯品。

#### 1.5.4 鹿血 GSH-Px 亚基相对分子质量测定

样品用等体积样品缓冲液溶解<sup>[22]</sup>,煮沸 3 min,用微量注射器在电泳仪上加样,上样量为 10 μL。电压 90 V,电泳 4 h,完毕后轻轻撬开玻璃板,用蒸馏水冲胶面的一端,取下胶片,考马斯亮蓝染色 12 h,脱色,照像,计算其 Rf 值。

#### 1.6 数据处理

试验所得数据采用 SPSS17.0 进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析。数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

## 2 结 果

表 4 全血中各组分 GSH-Px 含量

Table 4 GSH-Px contents in the components of the whole blood

生理时期 Physiological period	组分 Component	GSH-Px 含量/(U·mL <sup>-1</sup> ) GSH-Px content	GSH-Px 所占比例/% Components percentage of GSH-Px
生茸期 Antler development	血细胞内容物 Blood corpuscle	4 025.09±54.03 <sup>F</sup>	96.83
	血浆 Plasma	1 22.11±1.67 <sup>B</sup>	3.17
	细胞膜酶解液 Blood cell membrane	0.03±0.42 <sup>A</sup>	0.00
	溶血液 Dissolving blood	1 984.40±35.37 <sup>D</sup>	100.57
	全血 Whole blood	1 973.07±25.43 <sup>D</sup>	100.00
配种期 Service period	血细胞内容物 Blood corpuscle	3 522.90±24.17 <sup>E</sup>	96.78
	血浆 Plasma	108.53±4.42 <sup>B</sup>	3.24
	细胞膜酶解液 Blood cell membrane	-0.52±0.47 <sup>A</sup>	-0.02
	溶血液 Dissolving blood	1 757.09±40.18 <sup>C</sup>	101.70
	全血 Whole blood	1 727.74±12.46 <sup>C</sup>	100.00
生茸前期 Pre-antler development	血细胞内容物 Blood corpuscle	4 005.48±35.63 <sup>F</sup>	96.91
	血浆 Plasma	118.33±5.13 <sup>B</sup>	3.09
	细胞膜酶解液 Blood cell membrane	-0.04±0.87 <sup>A</sup>	0.00
	溶血液 Dissolving blood	1 968.43±11.45 <sup>D</sup>	101.37
	全血 Whole blood	1 961.83±16.54 <sup>D</sup>	100.00

同列肩标小写字母不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 大写字母不同者表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Value with differet letter(a,b) in a column means significantly different ( $P < 0.05$ ); Within the same column values with different letters (A,B,C,D,E,F) were extremely significantly different ( $P < 0.01$ )

#### 2.1 血细胞内容物、血浆、血细胞细胞膜所占体积

血细胞内容物、血浆、血细胞细胞膜所占体积见表 3。全血中绝大部分为血浆和血细胞内容物,两者体积之和占全血体积的 96.75%,血细胞细胞膜占全血体积的 3.25%,相较于血浆和血细胞内容物而言,其体积极其微小。

表 3 每毫升全血中血细胞内容物、血浆、血细胞细胞膜所占体积

Table 3 Volume of blood cells, plasma and cell membrane in the per ml of whole blood

全血组分 Blood component	体积/mL Volume	百分比/% Percentage
血细胞内容物 Blood corpuscle	0.460±0.003	45.85
血浆 Plasma	0.510±0.004	50.90
血细胞细胞膜 Blood cell membrane	0.030±0.002	3.25

#### 2.2 全血中各组分 GSH-Px 含量的测定结果

生茸期、配种期、生茸前期的血细胞内容物、血浆、细胞膜酶解液、溶血液、全血的 GSH-Px 含量测定结果见表 4。

在同一生理时期内,血细胞内容物 GSH-Px 的含量极显著高于血浆 ( $P < 0.01$ ); 血浆 GSH-Px 含量极显著高于细胞膜酶解液 ( $P < 0.01$ )。不同生理时期,血浆 GSH-Px 含量虽以生茸期最高,但各时期无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 血细胞内容物、全血和溶血液 GSH-Px 含量均是生茸期和生茸前期极显著高于配种期 ( $P < 0.01$ ), 生茸期和生茸前期无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 GSH-Px 的纯化结果

用不同饱和度盐析鹿血,离心收集沉淀,溶于磷酸盐缓冲液,测定 GSH-Px 含量和蛋白质含量,计算出比活力和纯化倍数,结果见表 5。从表 5 可以看出鹿血 GSH-Px 比活力和纯化倍数随  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱

和度的增加而增加,在饱和度 40%~50% 范围内增加较快,在 50%~80% 饱和度范围内增加较为缓慢,在饱和度 80%~100% 范围内开始逐渐下降,但酶活性仍较大。可见鹿血中 GSH-Px 主要集中在 40%~80% 饱和度范围内析出,故选择这一饱和度作为分离纯化的盐析范围。

GSH-Px 经过盐析和柱层析后纯化结果见表 6。初始比活力为  $24.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 最终比活力为  $1347.7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 纯化倍数为 54.1, 回收率为 25.00%。

### 2.4 GSH-Px 亚基相对分子质量测定结果

SDS-PAGE 电泳图谱见图 1, 显示有 1 条亚基带, 分析其亚基相对分子质量为 17.2 ku。

表 5 不同饱和度  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析对酶活性的影响

Table 5 The influence of different saturation  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  salting-out on the activity of enzyme

饱和度 Saturation	0	20	30	40	50	60	70	80	90	100
蛋白含量/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ Protein content	79.00	8.14	22.66	35.89	39.04	45.61	51.43	55.32	55.60	52.17
酶活/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$ Enzyme activity	1973.07	12.66	154.23	667.07	991.69	1198.89	1466.09	1730.95	1504.76	1208.27
比活力/ $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ Specific activity	24.98	1.56	6.81	18.59	25.40	26.29	28.51	31.29	27.06	23.16
纯化倍数 Purification multiple	1.00	0.06	0.27	0.74	1.02	1.05	1.14	1.25	1.08	0.93

表 6 GSH-Px 的纯化

Table 6 Purification of GSH-Px

纯化步骤 Purification step	总蛋白/mg Total protein	总活力/U Total energy	比活力/ $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ Specific activity	纯化倍数 Purification multiple	回收率/% Recovery
溶血液 Dissolving blood	1580	39461.4	24.9	1.0	100.00
盐析 Salting-out	93.86	29836.6	317.9	12.7	75.61
柱层析 Chromatography	7.32	9865.2	1347.7	54.1	25.00

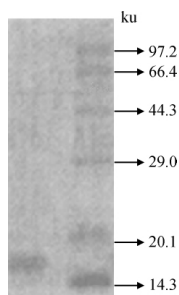


图 1 SDS-PAGE 测定 GSH-Px 亚基相对分子质量

Fig. 1 Determination of GSH-Px subunit molecular weight by SDS-PAGE

## 3 讨论

### 3.1 全血中 GSH-Px 分布

本试验中所测细胞膜酶解液 GSH-Px 的含量极微, 占全血 GSH-Px 的比例为万分之一, 且所得数值有正有负, 表明细胞膜不含 GSH-Px, 所得数值应是试验误差造成, 因此在实践中可以去除血细胞细胞膜, 而不会降低鹿血的 GSH-Px 含量。血细胞内容物的 GSH-Px 含量最高, 极显著高于其他

组分( $P < 0.01$ );溶血液、全血的 GSH-Px 含量极显著高于血浆( $P < 0.01$ );相同时期内溶血液 GSH-Px 含量均高于全血 GSH-Px 含量,但差异不显著( $P > 0.05$ )。虽然血细胞内容物 GSH-Px 含量最高,但为了不浪费血浆,应选用溶血液为原料来制作酶制剂和抗衰老产品。

### 3.2 不同生理时期全血 GSH-Px 含量

3 个时期全血 GSH-Px 含量:生茸期( $1\ 973.07 \pm 25.43$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ;生茸前期( $1\ 961.83 \pm 16.54$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ;配种期( $1\ 727.74 \pm 12.46$ )  $U \cdot mL^{-1}$ 。生茸期和生茸前期极显著高于配种期( $P < 0.01$ ),这可能与生茸期特殊的体况有关。公鹿的生茸期正值春夏季节,公鹿在此时期内新陈代谢旺盛,需要大量的蛋白质、无机盐和维生素。为满足生茸的营养需要,不仅要供给大量精饲料和青饲料,而且还要提高日粮蛋白质的含量<sup>[23-25]</sup>。饲料中蛋白质含量的提高为体内 GSH-Px 的生成提供了丰富的原料。在配种期公鹿性欲旺盛,食欲明显下降,争偶角斗体力消耗较大,身体变得瘦弱,营养物质缺乏造成全血 GSH-Px 含量减少。曹荣峰等<sup>[10]</sup>对不同饲养时期鹿血中卵磷脂的含量研究表明,生茸期血液卵磷脂含量最高。在体内,生物膜极易受到机体代谢产生的自由基攻击而损伤,而卵磷脂是构成生物膜的重要组成成分,它能减弱细胞膜受到的攻击,保护细胞内容物的活性,有效提高心、脑组织抗衰老能力,降低过氧化脂质和脂褐素含量<sup>[26]</sup>,因此生茸期鹿血中 GSH-Px 含量的升高,与卵磷脂在此时期的升高密切相关。曹荣峰等<sup>[11]</sup>认为生茸期和配种期机体代谢活跃,导致其产生的碱基增多;这与本试验的结果不相符合,分析其原因,可能是生茸期虽然代谢比较活跃,但是由于其饲料营养较为丰富,使得鹿血 GSH-Px 维持在一个较高的水平,而配种期食入不足,导致 GSH-Px 含量下降。王晓松等<sup>[12]</sup>发现不同生理时期东北梅花鹿血液 SOD 含量以生茸期最高。这与本试验的结果相符合,SOD 和 GSH-Px 均为抗衰老酶类,在生茸期梅花鹿因生茸需要,体内代谢加快,营养物质充足,使得 SOD 和 GSH-Px 含量达到最高。

### 3.3 GSH-Px 纯化

本试验中鹿血 GSH-Px 在 40% ~ 80%  $(NH_4)_2SO_4$  饱和度内盐析,再经层析后得到 GSH-Px  $0.37\ mg \cdot mL^{-1}$ ,比活力  $1\ 347.7\ U \cdot mg^{-1}$ ,纯化倍数为 54.1 倍,回收率 25.00%。本研究中采用  $(NH_4)_2SO_4$  作为沉淀剂,是因为自从 1957 年 GSH-

Px 被发现以来,人们一直用硫酸铵作为 GSH-Px 的沉淀剂。洪明光等<sup>[27]</sup>在对兔谷胱甘肽过氧化物酶纯化过程中,首先采用了  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀除去杂蛋白,不过他所采用的  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀液饱和度为 30% ~ 50%,在梅花鹿的研究中,还无人报道  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀液饱和度的选取范围,故本试验进行了  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀液饱和度的梯度试验,探索出鹿血 GSH-Px 的  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀液饱和度范围以 40% ~ 80% 效果最好,这可能与不同物种的 GSH-Px 结构不同有关。本试验中仅使用了  $(NH_4)_2SO_4$  盐析和柱层析分离,结果表明这是一种较理想的纯化方法。

### 3.4 GSH-Px 亚基相对分子质量

1976 年,Nakamura 报道了大鼠肝脏谷胱甘肽过氧化物酶亚基的相对分子质量为 19 ku,且每分子 GSH-Px 含有 8 个半胱氨酸残基,这些半胱氨酸残基在维持酶活性中起着重要作用,徐衢等<sup>[28]</sup>研究了人肝谷胱甘肽过氧化物酶,发现其 GSH-Px 亚基相对分子质量为 22 ku,洪明光等<sup>[27]</sup>报道兔谷胱甘肽过氧化物酶亚基相对分子质量为 19 ku。这些报道与本试验中测定的鹿血 GSH-Px 亚基相对分子质量为 17.2 ku 这一结果不太符合,这可能是由于不同种属间 GSH-Px 结构有一定的差异造成的。

## 4 结 论

4.1 鹿血 GSH-Px 主要集中在血细胞内容物上,其所占比例为 96.84%;血浆仅占 3.16%,细胞内容物 GSH-Px 含量极显著高于血浆( $P < 0.01$ ),而细胞膜上不含有 GSH-Px。

4.2 在 3 个生理时期的溶血液中,生茸期 GSH-Px 含量为  $(1\ 984.40 \pm 35.37)\ U \cdot mL^{-1}$ ,高于生茸前期( $P > 0.05$ ),极显著高于配种期( $P < 0.01$ ),应选取生茸期溶血液为原料开发抗衰老产品。

4.3 鹿全血 GSH-Px 盐析最适条件为 40% ~ 80% 饱和度的  $(NH_4)_2SO_4$ ,经柱层析后得到 GSH-Px  $0.37\ mg \cdot mL^{-1}$ ,比活力  $1\ 347.7\ U \cdot mg^{-1}$ ,纯化倍数为 54.1 倍,回收率 25.00%;鹿血 GSH-Px 亚基的相对分子质量为 17.2 ku。

### 参考文献:

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:中医古籍出版社,1994.
- [2] 苏 敬. 唐本草[M]. 上海:上海卫生出版社,1957.

- [3] 周辉撰. 清波杂志校注[M]. 北京:中华书局,1997.
- [4] 夏云阶. 衰老与抗衰老学[M]. 北京:学苑出版社,2001.
- [5] 冀敦福,季海刚. 关于衰老与老年病中医机制的探讨[J]. 天津中医学院学报,2004,23(4):169.
- [6] 蒋 蕾,赵文静,常惟智. 鹿血的药理作用及临床应用概况[J]. 中医药信息,2006,23,(6):12-13.
- [7] 崔 丽,王 宜,董崇田. 鹿血清对老龄大鼠抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志,1995,15(1):44-45.
- [8] 宋高臣,初彦辉,崔 荣. 鹿血口服液对大鼠体内代谢影响的实验研究[J]. 牡丹江医学院学报,1999,20(3):6-8.
- [9] 张启迪,崔丽春,马泽芳,等. 梅花鹿血液中卵磷脂含量的高效液相色谱法测定研究[J]. 动物生产,2009,45(5):53-55.
- [10] 曹荣峰,王继芳,马泽芳,等. 不同饲养时期雄性梅花鹿血液中抗衰老活性物质的 HPLC 分析[J]. 中国兽医学报,2009,29(12):1607-1612.
- [11] 曹荣峰,崔丽春,马泽芳. 不同饲养时期雄性梅花鹿血中尿嘧啶和次黄嘌呤含量的 HPLC 分析[J]. 特产研究,2009,(2):61.
- [12] 王晓松,唐 超,马泽芳,等. 不同生理时期东北梅花鹿血液 SOD 含量分析[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(2):267-271.
- [13] CZECOT H, SCIBIOR D, SKRZYCKI M. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Biochim Pol*,2006,53: 237-242
- [14] MINE E I, ASIYE A, AHMET K. The effects of exogenous glutathione on reduced glutathione level, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities of rats with different ages and gender after whole body  $\Gamma$ -irradiation[J]. *Amer Aging Assoc*, 2006,8:25-28.
- [15] 黄开华,周艳明,吴 畏,等. 胰蛋白酶酶解鹿血条件的优化[J]. 湖北农业科学,2007, 46(2):302-305.
- [16] ROTRUCK J T, POPE A L, GANTHER H E. Biochemical role as a component of glutathione peroxidase[J]. *Science*,1973,(17):588-590.
- [17] 荣征星,刘慧中,鲍景奇. 小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力的微量测定法[J]. 生物化学与生物物理进展,1994,21(4):324-327.
- [18] HAFEMEN D G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat[J]. *Nutr*,1974,104(5):580.
- [19] MAMDOUH M, NEMAT A M, BADAWI N M. Herbicide tolerance in maize is related to increased levels of glutathione and glutathione-associated enzymes[J]. *Acta Physiol Plant*,2008,30:371-379.
- [20] 夏奕明. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法:DTNB 直接法[J]. 卫生研究,1987,16(4):290.
- [21] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*,1976,72:248-254.
- [22] 郭耀军. 生物化学实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [23] 韩 坤,梁风得,王树志. 中国养鹿学[M]. 长春:吉林科学出版社,1993.
- [24] 孙勇钢. 公鹿不同生长时期的饲养管理[J]. 畜禽饲养,2010,8:18.
- [25] 李振贵,何正涛. 梅花鹿的饲养及繁殖管理[J]. 黑龙江动物繁殖,2008,16(4):41-42.
- [26] 衣艳君. 卵磷脂对大鼠过氧化损伤的保护作用[J]. 聊城师范学报,2001,14(1):73-74.
- [27] 洪明光,王茂音,方 敏. 层析纯化兔肝谷胱甘肽过氧化物酶[J]. 安徽医科大学学报,1991,26(3):168-171.
- [28] 徐 衢,裘 奇,胡梅清,等. 人肝谷胱甘肽过氧化物酶纯化及性质研究[J]. 生物化学杂志,1995,11(2):210-213.

(编辑 白永平)