

• 药理学 •

云硒冲剂(SeY)对小鼠 GSH- Px 活力和 LPO 含量影响的研究

张军东, 常 英, 王麦莉, 谷 莉, 肖建华, 王其田(解放军第 534 医院, 洛阳 471003)

摘要:目的: 研究云硒冲剂(SeY)对正常鼠及 CCl₄ 损伤肝鼠的肝脏保护及抗氧化作用。方法: 以常用的硒制剂 Na₂SeO₃ 为对照来研究云硒冲剂(SeY)对正常鼠及 CCl₄ 损伤肝鼠血、肝 GSH- Px 活力和正常鼠血 LPO 含量影响, 以 DTNB 直接法测定 GSH- Px 活力, 硫代巴比妥酸荧光法测定 LPO 含量。结果: 云硒冲剂能显著提高正常鼠血、肝 GSH- Px 活力($P < 0.001$), 及 CCl₄ 损伤肝鼠肝 GSH- Px 活力, 并可显著降低正常鼠血 LPO 含量。结论: 云硒冲剂(SeY)具有一定的抗氧化和抗肝损伤的作用。

关键词: 硒; 云硒冲剂; 谷胱甘肽过氧化物酶; 脂质过氧化物;

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0111(2001)06- 0330- 03

硒是人体必需的微量元素, 具有抗衰老、防治癌症, 治疗心血管疾病、肝炎、肝硬化、不育症、克山病、大骨节病等作用^[1], 因此引起了人们的普遍关注。云硒冲剂(SeY)是我院研制的一种硒制剂。

本文报告了云硒冲剂(SeY)对正常鼠及 CCl₄ 损伤肝鼠血和肝 GSH- Px 活力的影响, 为表明其抗氧化作用的效果, 并测定了正常鼠在给 SeY 后血 LPO 含量的变化。

1 实验材料

1.1 实验动物

昆明种小白鼠 ♂, 20~ 22g (购自 150 医院实验动物中心)。

1.2 试剂和药品

1.2.1 Na₂SeO₃ 溶液 称取 Na₂SeO₃ (化学纯, 金山兴塔化工厂产品) 3.00、0.75、0.19mg 分别置于 100ml 容量瓶中, 双蒸水溶解并定容至 100ml, 得到 30、7.5、1.9μg/ml 的 Na₂SeO₃ 溶液。

1.2.2 云硒冲剂(SeY)溶液 称取云硒冲剂(SeY) 170、42.5、10.6mg 分别置于 100ml 容量瓶中, 双蒸水溶解并定容至 100ml, 得 0.1700%、0.0425%、0.0106% 的 SeY 溶液。

1.2.3 0.17% 云芝多糖溶液 称取 170mg 云芝多糖, 双蒸水溶至 100ml。

1.2.4 试剂 GSH 为生化试剂, 其余为分析纯或优级纯。

1.3 主要仪器

日立 F- 4000 型荧光分光光度计, 722 型紫外可见分光光度计, SHZ- 82 型水浴恒温振荡器, H- 1 微型混合器。

2 实验方法

2.1 动物分组

2.1.1 云硒冲剂(SeY)对正常鼠作用 ①正常对照组: 生理盐水 50 ml/(kg·d), ig。②云芝多糖组: 0.17% 云芝多糖溶液 50ml/(kg·d), ig。③云硒冲剂(SeY): 分 3 个剂量组, 即 0.1700, 0.0425, 0.0106%, 按上述浓度的 SeY 液 50 ml/(kg·d), ig, 给 Se 量分别为 0.676, 0.169, 及 0.055mg/(kg·d) ④Na₂SeO₃ 组: 分 3 个剂量组, 分别 ig 给 30、7.5、1.9μg/ml 的 Na₂SeO₃ 液 50ml/(kg·d), 给 Se 量分别为 0.676、0.169、及 0.055 mg/(kg·d)。

以上各组均给药 10d, d10 测 GSH- Px 活力和 LPO 含量。

2.1.2 云硒冲剂(SeY)对 CCl₄ 损伤肝鼠作用 ①对照组: 生理盐水 50ml/(kg·d), ig。②CCl₄ 损伤肝对照组: 生理盐水 50ml/(kg·d), ig。③SeY+ CCl₄ 组: 分两个剂量组, 分别按 0.1700、0.0425% 的 SeY 溶液 50 ml/(kg·d), ig, 给 Se 量分别为 0.676、0.169 mg/(kg·d)。④Na₂SeO₃+ CCl₄ 组: 分两个剂量组, 分别按 30、7.5μg/ml 的 Na₂SeO₃ 液 50 ml/(kg·d), ig, 给 Se 量分别为 0.676、0.169mg/(kg·d)

②③④各组在给药的 d9, ip30% CCl₄ 橄榄油溶液 2.5ml/kg, d10 测血、肝的 GSH- Px 活力。

2.2 GSH- Px 活力测定

硒是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH- Px)的重要组分, GSH- Px 可清除自由基和 LPO^[1], 保护膜结构免遭氧化损伤, 因而 GSH- Px 对于硒化物药理作用的研究具有重要的意义, 本实验按文献方法^[2]测定 GSH- Px 活力, 722 型紫外可见分光光度计在 422nm 波长处测定吸收度值。

2.3 血 LPO 含量测定

脂质过氧化物(LPO)是氢过氧化物对细胞膜脂质过氧化作用的产物,其量可表明细胞受损伤程度及GSH-Px抗氧化能力,本实验按文献方法^[3]测定LPO含量,日立F-4000型荧光分光光度计进行荧光测定,激发光波长为515nm,发射波长为553nm。

2.4 统计学方法

用方差分析, $P < 0.05$ 水平接受差异。

3 结果

3.1 GSH-Px 活力测定

表 1 对正常鼠血和肝中 GSH-Px 活力作用的测定

组别	血		肝	
	动物数	GSH-Px 活力(u/ml)	动物数	GSH-Px 活力(u/mg)
对照	12	15.6±0.9	18	9.6±1.9
云芝多糖	10	15.2±1.9*	10	10.4±2.2*
SeY (%)				
0.0106	10	25.1±3.6**	10	22.5±4.4**
0.0425	8	27.4±6.8**	12	27.9±2.9**
0.1700	11	28.8±6.9**	12	29.9±3.0**
Na ₂ SeO ₃ (μg/ml)				
1.9	10	24.8±1.5**	10	23.9±1.8**
7.5	7	29.5±1.9**	12	26.9±3.0**
30	8	31.0±6.0**	12	28.8±2.8**

* 与正常组差异不显著

** 与正常组差异显著($P < 0.001$)

3.1.2 对 CCl₄ 损伤肝鼠血和肝 GSH-Px 活力的作用 结果见表 2。小鼠 ip 30% CCl₄ 橄榄油溶液 2.5ml/kg, 18~24h 内测 GSH-Px 活力, CCl₄ 损伤肝组血 GSH-Px 未见下降, 肝 GSH-Px 活力则显著低于对照组($P < 0.01$), 这可能也是 CCl₄ 肝损伤的机理之一, SeY 和 Na₂SeO₃ 能显著增强 CCl₄ 损伤肝鼠肝的 GSH-Px 活力($P < 0.001$), 且增加后的值显著高于对照鼠肝 GSH-Px 活力值($P < 0.01$), 这可能有利于减轻 CCl₄ 引起的肝损伤。另外 SeY + CCl₄ 与 Na₂SeO₃ + CCl₄ 仍能显著升高血 GSH-Px 活力, 且与表 1 中相应剂量组的血 GSH-Px 活力相近, 而表 2 中肝 GSH-Px 活力却显著低于表 1 相应剂量组的肝 GSH-Px 活力, 这可能也与 CCl₄ 引起的肝损伤有关。

表 2 对 CCl₄ 损伤肝鼠血和肝 GSH-Px

活力作用的测定

组别	动物数	血 GSH-Px 活力 (μ/ml)	肝 GSH-Px 活力 (μ/mg)
对照	12	15.6±0.9	9.6±1.9
CCl ₄ 损伤对照	5	15.1±6.4**	5.3±1.9*
SeY (%)			
0.0425+ CCl ₄	6	26.0±2.2	14.3±1.1**
0.1700+ CCl ₄	5	28.1±6.4	14.1±2.5**
Na ₂ SeO ₃ (μg/ml)			
7.5+ CCl ₄	5	26.9±4.4	17.1±2.2**
30+ CCl ₄	5	28.9±1.6	17.9±2.6**

* 与正常组差异显著($P < 0.001$)

** 与正常组及损伤肝对照组差异显著($P < 0.001$)

*** 与正常组差异不显著

3.1.1 对正常鼠血和肝中 GSH-Px 活力的作用

结果见表 1。云芝多糖组的 GSH-Px 活力与对照组无差异, SeY 3 个组与 Na₂SeO₃ 3 个组的血、肝 GSH-Px 活力都显著高于对照组($P < 0.001$), 说明补 Se 可显著增强 GSH-Px 活力, 肝 GSH-Px 活力单位的增加倍数高于相应组血中 GSH-Px 活力的增加倍数, 肝 GSH-Px 活力平均比对照组增加 2.3~3.1 倍, 而血 GSH-Px 活力平均比对照组增加 1.5~2.0 倍, SeY 与 Na₂SeO₃ 相应的剂量组间无差异。

3.2 LPO 含量测定—对正常鼠血 LPO 含量的作用

结果见表 3。单给云芝多糖不能降低血 LPO 含量, SeY 与 Na₂SeO₃ 均可明显降低鼠血 LPO 含量($P < 0.01$), 说明补 Se 有抗氧化作用。

表 3 对照组和给药组血 LPO 含量变化

组别	动物数	LPO 含量(nmol/ml)
对照	15	15.9±1.2
云芝多糖	8	14.3±2.6*
SeY (%)		
0.0106	10	10.9±5.6**
0.0425	7	11.1±1.6**
0.1700	16	10.2±2.0**
Na ₂ SeO ₃ (μg/ml)		
1.9	10	9.9±3.4**
7.5	11	11.1±1.4**
30	13	10.4±2.6**

* 与正常组差异不显著

** 与正常组差异显著($P < 0.01$)

4 讨论

GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶, 增强 GSH-Px 活力对于维持正常的生理状态及改善病理状态都有重要意义。GSH-Px 的活性中心是 Se, 增强 GSH-Px 清除自由基抗氧化活性是 Se 发生作用的重要机理。

从实验结果看, 分别给 SeY 和 Na₂SeO₃, 两者都能显著增强正常鼠血和肝的 (下转第 355 页)

0.1mol/L 盐酸溶液适量, 超声振荡使溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml 置 50ml 量瓶中, 各加入磷酸萘酚喹溶液 (75 μ g/ml) 5ml, 再加 0.1mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 于 271nm、361nm 波长处测定其吸收度。以浓度 C 为横坐标, 吸收度差值 ΔA 为纵坐标作图, 求得线性方程为: $\Delta A = 0.027C + 0.00156$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明, 甲氧苄啶溶液浓度与吸收度均呈良好的线性关系, 在 6.24~ 31.20 μ g/ml 浓度范围内符合比耳定律。

处方中辅料在 250~ 400nm 波长处扫描, 测得辅料溶液在 271nm 波长处的吸收值为 0.007, 表明辅料对双波长法测定基本无影响。

精密称取甲氧苄啶和磷酸萘酚喹的干燥对照品适量按复方制剂处方比例加入辅料, 混匀, 依法测定, 求得甲氧苄啶的回收率分别为: 100.8, 100.6, 101.2, 100.8, 100.9, 101.2%。平均回收率为 100.9%, RSD 为 0.24% ($n = 6$)。

2.4 稳定性实验

取样品 3 批, 分别精密称取 0.62g, 按样品测定项下方法配制成供试品溶液, 立即测定和分别于 24h、48h 在 271nm 和 361nm 波长处测定其吸收度, 测定结果表明样品在 48h 内均无变化, 说明样品溶液比较稳定。

2.5 样品测定

取本品 10 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量 (约相当于甲氧苄啶 0.62g) 置 500ml 量瓶中, 加 0.1mol/L 盐酸溶液解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密吸取澄清续滤液 25ml 置 200ml 量瓶

中, 加 0.1mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 分别在波长 361nm 和 271nm 处测定吸收度, 求得 ΔA , 计算样品百分含量 (见表 1)。

表 1 样品中甲氧苄啶含量测定结果

样品批号	含量(标示量%)				平均值(标示量%)	RSD
990326	99.7	100.6	99.6	100.0	100.0	0.45
990327	98.1	99.6	97.8	97.9	98.4	0.86
990328	101.1	100.9	99.5	99.7	100.3	0.81

3 讨论

实验表明本文采用的双波长分光光度法可不经分离, 能消除磷酸萘酚喹的干扰, 从而直接测定复方制剂中甲氧苄啶的含量, 该法操作简便、快捷、准确, 亦适用于其溶出度的测定。

在记录光谱曲线时, 采用慢速扫描, 使噪声叠加较少, 吸收光谱曲线比较平滑, 找等吸收点时设间隔 0.1nm 测得一吸收值, 得到的数据较精密, 有利于精选等吸收波长。

供试品溶液配制时, 由于滤过后溶液仍有一些浑浊, 可用 0.8 μ m 的滤膜滤过, 得到澄清溶液, 再稀释测定。用滤膜或滤纸作滤材, 结果一致, 如以滤膜滤过测得甲氧苄啶 $\Delta A = 0.5108$, 磷酸萘酚喹 $A = 0.6023$, 以滤纸滤过测得甲氧苄啶 $\Delta A = 0.5106$, 磷酸萘酚喹 $A = 0.6022$ 。

说明两种方法对其吸收度影响不大, 可采用滤纸滤过后直接稀释法测定。

参考文献:

[1] 陈国珍. 紫外-可见分光光度法(上册)[M]. 北京: 原子能出版社, 1983: 55- 61.
 [2] 中国药典[S]. 1995 版二部. 1995: 143- 144.

收稿日期: 2001- 06- 13

(上接第 331 页)

GSH- Px 活力 ($P < 0.001$), 肝 GSH- Px 活力增强得更明显; 并且 SeY 和 Na₂SeO₃ 还能明显升高 CCl₄ 损伤肝鼠的肝 GSH- Px 活力 ($P < 0.01$), 且升高后的值高于正常鼠肝 GSH- Px 活力, 可见 SeY 能显著改善 CCl₄ 损伤肝鼠肝的损伤状态, 肝损伤鼠血 GSH- Px 活力未见降低, 可能与 CCL₄ 主要损伤肝脏有关, 但 SeY 和 Na₂SeO₃ 仍明显增强了损伤鼠血 GSH- Px 活力, 与正常鼠 GSH- Px 活力的升高后的值相近; 通过测定正常鼠血 LPO 含量变化可知 SeY 和 Na₂SeO₃ 在升高 GSH- Px 活力的同时能显著降低血 LPO 含量 ($P < 0.01$), 达到了抗氧化的目的。表明 SeY 有显著的抗氧化抗肝损伤的作用, 作用与 Na₂SeO₃ 类似。

硒已应用于临床作为化疗辅助药及治疗克山病、大骨节病、抗衰老等, 取得了明显的疗效, 因此硒制剂的研究引起了人们的普遍重视, 云硒冲剂是种新的硒制剂, 这里探讨了 SeY 的抗氧化抗肝损伤作用, 结果表明 SeY 与 Na₂SeO₃ 有类似的抗氧化抗肝损伤作用。

参考文献:

[1] 陈新谦. 金有豫. 新编药理学[M]. 第 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 557.
 [2] 程继忠. 硒多糖, 亚硫酸钠对大鼠肝微粒体酶和 GSH- Px 等的影响[J]. 解放军医学杂志. 1998, 4: 245.
 [3] Riely CA. Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation [J]. Science, 1974, 183: 208.

收稿日期: 2001- 07- 13