

U 碱基的实际位置是在所显示的带的 3' 位, 也就是在 G 或 A 碱基的 3' 位置. 在这个位置, 三种酶的水解物都不应有带显示. b. 但在 41、68、69 位显示的带的 3' 位, T1、U₂ 酶等的酶切图谱中分明有带, 是 G、A、G, 而不是 U 碱基, 因此在这种情况下, 应该以 T1、U₂ 酶的谱带为准. c. 除上述之外, RNase TCS 降解物中单独显示的带的位置 (如 71 位), 应该是 C 碱基, 其 3' 位是 U 碱基 (此处无带显示, 如 72 位). d. 从碱水解形成的阶梯中检出到的某些位置上, 没有 3 种酶的降解带显示时, 除 a. 中所述是 U 碱基的位置外, 则无疑应当是 C 碱基的位置, 如 56、77、80 位.

总之, 在了解了 RNase TCS 酶解 RNA 分子的特点和掌握了识读 RNase TCS 酶解谱带的方法之后, 用 RNase TCS 酶代替 phy M 和 *B. cereus* 酶来确定 U 碱基的位置是可能的, 配合 T1, U₂ 酶和碱解产生的阶梯能准确地定出 RNA 分子的核苷酸序列.

参 考 文 献

- 1 赵 昂, 华 陵, 黄青石. 生物物理学报, 1993; 9

(1): 32

- 2 Cheng Z Q, Zhang H, Li G Y *et al.* FEBS Lett, 1986; 200 (1): 193
- 3 华 陵, 赵 昂, 刘笑洋等. 生物物理学报, 1992; 8 (2): 351
- 4 蔡良琬主编. 核酸研究技术 (上册). 北京: 科学出版社, 1987: 193~198
- 5 Donis-Keller H, Maxam A M, Gilbert W. Nucl Acids Res, 1977; 4: 2527

Application of RNase TCS in RNA Sequence Analysis. Zhao Kun, Hua Ling (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract RNase TCS isolated from plant *Trichosanthes Kirilowii* Maxim has a high uracil-specific activity. In the absence of urea and under conditions of pH 3.5, 50°C, it cleaves almost exclusively and uniformly at -Np↓U-. In conjunction with RNase T1, U₂ and limited alkaline hydrolysis, the RNase TCS is useful in direct enzymatic RNA sequence analysis.

Key words *Trichosanthes Kirilowii*, RNase TCS, RNA sequence analysis

黄芪有效成分对氧自由基清除作用的 ESR 研究

汪德清 沈文梅 田亚平 孙仲怡¹⁾ 丛建波¹⁾ 吴 可¹⁾

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

摘要 用电子自旋共振技术研究了黄芪总黄酮 (TFA)、黄芪总皂甙 (TSA) 和黄芪总多糖 (TPA) 对次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基和 H₂O₂-Fe²⁺ 体系产生的羟自由基的清除作用. 结果表明, 这 3 种成分均有清除氧自由基的作用; 对超氧阴离子自由基的清除效能大于对羟自由基的清除作用; 其作用强度依次为 TFA>TSA>TPA. 结果提示清除氧自由基可能是黄芪抗衰老的主要机理之一, TFA 和 TSA 是黄芪抗氧化作用的主要药理活性成分.

关键词 黄芪, 电子自旋共振, 氧自由基

黄芪是中医抗衰老的常用药物之一, 具有补气、降压、利尿和保肝等多种功效^[1], 近年有研究表明, 黄芪具有抗氧化和清除自由基

作用^[2,3], 但用电子自旋共振 (ESR) 技术直

¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850.
收稿日期: 1995-07-26, 修回日期: 1995-10-09

接检测其清除效能尚未见报道. 为进一步明确黄芪清除自由基的有效成分和作用机理, 我们从黄芪中分离出黄芪总黄酮 (TFA)、黄芪总皂甙 (TSA) 和黄芪总多糖 (TPA), 用 ESR 手段观察了黄芪的三种成分对超氧阴离子自由基 (O_2^-) 和羟自由基 ($\cdot OH$) 的直接清除作用.

1 材料与方法

1.1 试剂和药物

5,5-二甲基吡咯邻氮氧化物 (DMPO)、次黄嘌呤 (HX) 和黄嘌呤氧化酶 (XO) 系美国 Sigma 公司产品, DMPO 使用前用活性炭提纯, 无杂质信号. 其余均为国产分析纯试剂. TFA、TSA 和 TPA 为本室分离^[4,5], 军事医学科学院二所鉴定, 用前以 PBS 配成所需浓度.

1.2 对 H_2O_2 - Fe^{2+} 体系产生 $\cdot OH$ 的影响

0.6 mmol/L H_2O_2 、5 mmol/L EDTA、80 mmol/L DMPO、0.2 mmol/L $FeSO_4$ 和 25 μl 药物 (终浓度为 0.12~1.2 g/L, 总反应体积 50 μl) 混匀后 (对照用 PBS 代替), 立即吸入石英毛细管中, 置 ESR 谐振腔内测定.

1.3 对 HX/XO 体系产生 O_2^- 的影响

以 160 mmol/L DMPO、0.43 mmol/L HX、1 mmol/L 二乙烯三氨乙酸 (DETPAC)、70 U/L XO 和药物混匀 (药物浓度、反应总体积及对照均同上) 后, 立即测 ESR 波谱.

1.4 仪器和测试条件

BRUKER ESP-300 波谱仪. ESR 测试条件: X 波段, 调频 25 kHz, 调幅 1 G, 扫描宽度 100 G, 微波功率 10 mW, 时间常数 20 ms, 中心磁场 3470 G, 磁场频率 9.70 GHz.

1.5 清除率计算

O_2^- 的清除率以对照组波谱中第一个峰的峰高与测量组对应的波峰比较, $\cdot OH$ 的清除率以对照组波谱中第二个峰的峰高与测量组对应的波峰比较, 按公式计算其清除率.

$$\text{清除率} = \frac{\text{对照组均值} - \text{测量组均值}}{\text{对照组均值}} \times 100\%$$

2 结 果

2.1 对 Fenton 反应产生 $\cdot OH$ 的清除作用

图 1 是对照组的 ESR 波谱, 羟自由基被 DMPO 捕集后形成的 DMPO-OH 加合物, 黄芪提取成分清除 $\cdot OH$ 的效能见表 1. 从表 1 中可看出, TFA 和 TSA 对 $\cdot OH$ 有明显清除作用, TPA 的清除能力则较弱.

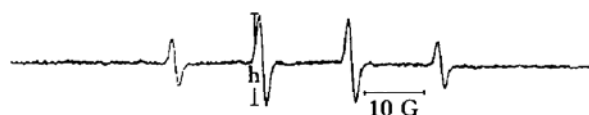


图 1 DMPO 捕集 $\cdot OH$ 的 ESR 对照波谱

表 1 黄芪活性成分对 $\cdot OH$ 的清除作用

组别	浓度/ $g \cdot L^{-1}$	波谱相对强度	清除率/%
对照		42.0 $\pm$ 0.7	
TFA	1.2	14.0 $\pm$ 0.7 ¹⁾	66.7 $\pm$ 1.2
TSA	1.2	16.0 $\pm$ 0.3 ¹⁾	61.9 $\pm$ 1.0
TPA	1.2	31.0 $\pm$ 1.8 ²⁾	26.2 $\pm$ 4.4
TFA	0.12	18.0 $\pm$ 0.6 ¹⁾	57.1 $\pm$ 1.3
TSA	0.12	22.0 $\pm$ 0.3 ¹⁾	47.6 $\pm$ 0.7
TPA	0.12	39.0 $\pm$ 1.6	7.1 $\pm$ 3.7

¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.01$, 与对照比较.

2.2 对 HX/XO 体系产生 O_2^- 的清除作用

图 2 是对照组的 ESR 波谱, O_2^- 被自旋捕集剂捕获后形成的 DMPO-OOH 加合物. 表 2 是药物对 O_2^- 的清除效果. 结果显示, 加药物组的 ESR 波谱明显减弱, 尤其是 TFA 和 TSA 的波峰, 这表明黄芪的提取成分对 O_2^- 有很强的清除效能.

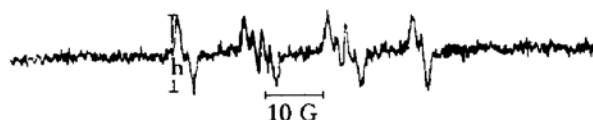


图 2 DMPO 捕集 O_2^- 的 ESR 对照波谱

表2 黄芪活性成分对 O_2^- 的清除作用

组别	浓度/ $g \cdot L^{-1}$	波谱相对强度	清除率/%
对照		35.2 ± 0.6	
TFA	1.2	$2.0 \pm 0.3^{1)}$	94.3 ± 0.8
TSA	1.2	$3.0 \pm 0.6^{1)}$	91.5 ± 1.6
TPA	1.2	$16.0 \pm 0.3^{1)}$	54.3 ± 0.8
TFA	0.12	$6.1 \pm 0.5^{1)}$	82.8 ± 1.4
TSA	0.12	$9.1 \pm 0.2^{1)}$	74.3 ± 0.6
TPA	0.12	$17.1 \pm 1.0^{1)}$	51.4 ± 2.8

¹⁾ $P < 0.001$, 与对照比较。

3 讨 论

ESR 自旋捕集技术是目前检测 O_2^- 、 $\cdot OH$ 等氧自由基较直接的手段, HX/XO 和 H_2O_2 - Fe^{2+} 是分别产生 O_2^- 与 $\cdot OH$ 的经典反应体系^[6], 实验结果表明, TFA 和 TSA 对这两个体系产生的氧自由基均有清除作用, 对 O_2^- 的清除效能强于对 $\cdot OH$ 的清除效能, TPA 的清除能力则较弱, 尤其是对 $\cdot OH$ 的清除作用。

黄芪中含有黄酮、皂甙和多糖等成分, 有报道表明黄酮类物质抗氧化清除自由基的主要机理是酚羟基类基团在与过氧化物作用时, 通过提供氢原子, 发生氧化还原反应而发挥作用^[7]; 从 Kitagawa 等^[8]测定黄芪皂甙的几种分子结构式可以看出, 黄芪中的皂甙类成分为含有一个以上的酚羟基基团的多环状化合物, 其结构与黄酮类化合物类似。因此, 我们认为黄芪中黄酮和皂甙类成分清除自由基可能也是其结构中的酚羟基基团与自由基反应而发挥功效。但我国学者刘星谱等^[3]认为黄芪总皂甙清除自由基作用的机理是由于含有以环黄芪醇为甙元的糖甙, 这些糖甙与自由基发生反应, 阻止了新的自由基生成。

TPA 具有免疫活性作用, 可提高机体免疫功能^[9,10], 本文结果表明 TPA 对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的清除能力较弱。提示黄芪可能是通过清除 O_2^- 和 $\cdot OH$ 而起到抗氧化作用的, TFA 和 TSA

是黄芪清除氧自由基的主要活性成分。

参 考 文 献

- 1 刘志一. 中西医结合杂志, 1991; 11 (5): 312
- 2 胡天喜, 陈季武, 李承珠. 上海中医药杂志, 1988; 3 (9): 28
- 3 刘星谱, 江明华, 俞正坤等. 天然产物研究与开发, 1991; 3 (4): 1
- 4 贺正全, 王宝琴. 药学报, 1991; 25 (9): 694
- 5 王志学, 马启凤, 何 群等. 中草药, 1983; 14 (3): 1
- 6 Markert M, Andrews P C, Babior B M *et al.* Methods in enzymology, 1984; 105: 358
- 7 Younes M, Siegers C P. Plant Med, 1984; 43 (3): 240
- 8 Kitagawa I, Wang huikang, Takagl *et al.* Chem Pharm Bull, 1983; 31: 689
- 9 沈美玲, 翟世康, 罗英德等. 中西医结合杂志, 1984; 10: 615
- 10 中国科学院药物研究所, 上海第二医学院病理解剖教研室, 电镜室. 科学通报, 1979; 24 (16): 764

Scavenging Effects of Active Principles from *Astragalus mongholicus* Bunge on Oxygen Free Radicals Studied by ESR. Wang Deqing, Shen Wenmei, Tian Yaping, Sun Zhongyi¹⁾, Cong Jianbo¹⁾, Wu Ke¹⁾ (*Department of Biochemistry, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ¹⁾ Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Scavenging effects of total flavonoids of *Astragalus* (TFA), total saponins of *Astragalus* (TSA) and total polysaccharide of *Astragalus* (TPA) on superoxide anion radical and hydroxyl radical have been studied by ESR method. The results showed that all the three principles have stronger scavenging effect on superoxide anion radical than on hydroxyl radical. The intensity of scavenging effect of the three principles was TFA > TSA > TPA. It is suggested that the TFA and TSA are the main component in *Astragalus mongholicus* Bunge for protection against free radical damages.

Key words *Astragalus mongholicus* Bunge, ESR, oxygen free radical