

# 不同生理时期东北梅花鹿血液 SOD 含量分析

王晓松<sup>1</sup>, 唐超<sup>3</sup>, 马泽芳<sup>1\*</sup>, 雷玉发<sup>2</sup>, 刘永举<sup>3</sup>, 蒋小明<sup>4</sup>

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109; 2. 吉林松花湖实验林场, 吉林 132108;

3. 青岛农业大学生命科学院, 青岛 266109; 4. 新疆库尔勒万通鹿业科技有限责任公司, 库尔勒 841000)

**摘要:** 本文旨在研究梅花鹿不同生理时期全血中的 SOD 含量变化, 各生理时期鹿血的抗衰老作用是否存在差异。选用雄性梅花鹿不同生理时期的全血, 经离心后用连苯三酚自氧化法测定 3 个时期溶血液、血细胞内容物、血浆和血细胞细胞膜中 SOD 含量并计算全血 SOD 含量。试验结果表明: 全血 SOD 含量以生茸期最高 ( $1\ 007.07 \pm 11.03$ )  $U \cdot mL^{-1}$ , 且与配种期和生茸前期含量差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 而配种期和生茸前期含量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。结果提示 SOD 的变化与梅花鹿的生理时期有相关性。生茸期鹿血的 SOD 含量最高, 提高了鹿血的药用价值, 特别是抗衰老功效。但各个生理时期鹿血中又以溶血液的 SOD 含量为最高, 因此可以把溶血液作为生产鹿血抗衰老酶产品的原料。

**关键词:** 东北梅花鹿; 血液; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S825; S852.21

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)02-0267-05

## Analysis the Contents of SOD in Blood Taken from the Male Sika Deer in Different Physiological Periods

WANG Xiao-song<sup>1</sup>, TANG Chao<sup>3</sup>, MA Ze-fang<sup>1\*</sup>, LEI Yu-fa<sup>2</sup>, LIU Yong-ju<sup>3</sup>, JIANG Xiao-ming<sup>4</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao

266109, China; 2. Experimental Forest of Jilin Songhua Lake, Jilin 132108, China; 3 College of

Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 4. Xinjiang Korla

Wantong Deer Technology Limited Liability Company, Korla 841000, China)

**Abstract:** Study on content of SOD in whole blood of sika deer from different physiological period. The blood of male sika deer in different physiological periods was centrifugated, and then using pyrogallol method to detect the content of SOD in blood corpuscle, plasma, dissolve blood and cell membrane, lastly estimated content of SOD in whole blood. The results showed that the highest content of SOD ( $1\ 007.07 \pm 11.03$ )  $U \cdot mL^{-1}$  appears during the time of developing antler, besides we found that there was a remarkable discrepancy between developing antler period and remaining two periods ( $P < 0.01$ ). But no significant difference there was between pre-antler period and service period ( $P > 0.05$ ). The research demonstrated that there were some certainly correlative between the change of SOD content and being different physiological periods. The developing antler period have the highest SOD content in deer blood, that could be to improve and increase the medicine value, especially the function of anti-aging. In addition, during various physiological stages, we found the dissolve blood should be the best raw material for producing deer blood against aging, because of the highest SOD content has had been happening in it.

收稿日期: 2010-09-13

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

作者简介: 王晓松(1983-), 男, 河北栾城人, 硕士生, E-mail: wangxiaosong1983@163.com

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

**Key words:** northeast spotted deer; blood; SOD

鹿血,为鹿科动物梅花鹿(*Cervus nippon Temminck*)或马鹿(*Celaohus L*)的腥血或茸血,具有延缓衰老、抗疲劳、助强壮、促进创伤愈合、补肾益精、补血、提高机体免疫力、美容养颜、抗辐射等作用<sup>[1-4]</sup>。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。其中SOD是生物体内重要的自由基清除剂。不仅在生物体内抗氧化、抗衰老,而且也有抗辐射、抗肿瘤、解毒等功效,因此受到科技界、医药界的极大关注<sup>[5-7]</sup>。研究雄性梅花鹿不同生理时期全血中SOD含量的变化规律,为鹿血SOD的提取提供理论基础,为鹿血生理生化研究提供数据支持。前人对鹿血研究较多<sup>[8-11]</sup>,大部分都集中在血液常规和微量元素检测。崔丽等<sup>[12]</sup>研究表明:以梅花鹿血清给予老龄Wister大鼠,结果表明能降低大鼠血清及肝组织、脑组织中LPO的含量,使SOD活性增高。宋高臣等<sup>[13]</sup>研究表明:服用适量的鹿血口服液可明显降低大鼠血、肝中过氧化脂质的含量,证明鹿血口服液具有对LPO代谢有明显的影响作用。各生理时期鹿血的抗衰老作用是否存在差异,至今未见报道。而且当前鹿全血的处理技术尚不成熟,未精确测定出血细胞和血浆中SOD的含量。本研究以雄性东北梅花鹿为试验对象,测定其生茸前期、生茸期和配种期溶血液、血细胞内容物、血浆和血细胞膜中SOD含量,进而探明雄性梅花鹿不同生理时期全血中SOD含量的变化规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 鹿血 选择3~7岁,体质量、体况相似,常规饲养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)进行颈静脉采血。

1.1.2 主要设备和药品 连苯三酚(分析纯):贵州遵义佳宏化工有限责任公司;肝素钠( $160 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ ):solarbio公司;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;三羟甲基氨基甲烷(分析纯):天津市巴斯夫化工有限公司;盐酸(分析纯):莱阳市康德化工有限公司;鹿眠宝3号:青岛

汉河动植物药厂有限公司;移液器( $20, 1\,000 \mu\text{L}$ ):德国Eppendorf;电子分析天平:奥豪斯国际贸易(上海)有限公司,Readability  $0.0001 \text{ g}$ ;低速冷冻离心机GTR10-1:北京时代北利离心机有限公司,最高转速 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ;UV-2102PC型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司。

### 1.2 试验处理与设计

1.2.1 血样的采集和处理 用鹿眠宝3号麻醉梅花鹿,用50 mL注射器抽取40~50 mL颈静脉血液<sup>[14]</sup>,并立即将其移入已加有0.2 mL肝素钠溶液( $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的8支5 mL离心管内,放于4℃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)。将每头鹿的全血制备成溶血液(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。

(1)溶血液的制备:取1 mL全血加入等体积的蒸馏水,充分混匀后4℃过夜,然后4℃、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上层液体即为溶血液。

(2)血细胞内容物稀释液的制备:取1 mL全血4℃、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 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℃过夜,然后4℃、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上层液体即为血细胞内容物稀释液。

(3)血浆的制备:取1 mL全血4℃、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,收集上清液,得血浆。

(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4℃过夜,然后4℃、 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 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 $1\,300 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),37℃反应2 h,得细胞膜酶解液。

将以上制备的样品置于一80℃保存,用于测定SOD活力。

1.2.2 样品中SOD活力的测定方法 对上述样品采用连苯三酚自氧化法<sup>[15-17]</sup>进行SOD活力测定。根据吸光值的变化,计算出自氧化速率和加样抑制后的氧化速率。要求自氧化速率控制在 $0.06 \sim 0.07 \text{ OD} \cdot \text{min}^{-1}$ ,加入样品后氧化的抑制率需控制在50%左右<sup>[18]</sup>。

计算公式:

$$\text{SOD 活力}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) =$$

$$\frac{\frac{\text{自氧化速率} - \text{抑制后速率}}{\text{自氧化速率}} \times 100\%}{50\%} \times$$

$$\text{反应液总体积(mL)} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{待测样品体积(mL)}}$$

1.2.3 全血中 SOD 含量的计算 取 1 mL 全血 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 4 °C 过夜, 然后 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 SOD 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 SOD 含量 + 血浆体积 × 血浆 SOD 含量 + 血细胞细胞膜体积 × 血细胞细胞膜 SOD 含量

1.2.4 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。文中数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 其中  $\bar{x}$  为算术平均值,  $s$  为标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 全血中血细胞内容物、血浆、血细胞细胞膜所占体积

将 1 mL 全血处理后, 即可得到血细胞内容物、

血浆、血细胞细胞膜所占体积, 结果列于表 1。

表 1 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 1 Volume of blood corpuscle, plasma and cell membrane in per mL of whole blood

全血组 Blood component	体积 $\bar{x} \pm s$ /mL Volume	百分比/% Percentage
血细胞内容物 Blood corpuscle	0.46 ± 0.003	45.85
血浆 Plasma	0.51 ± 0.004	50.90
血细胞细胞膜 Blood cell membrane	0.03 ± 0.002	3.25

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, 几乎可以忽略不计。

### 2.2 全血中各组分 SOD 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 SOD 含量测定结果及统计分析结果见表 2。

表 2 全血中各组分 SOD 含量的测定结果

Table 2 SOD content of whole blood components

生理时期 Physiological period	组分 Component	SOD 含量/(U · mL <sup>-1</sup> ) ( $\bar{x} \pm s$ ) Content of SOD	各组分 SOD 在全血中所占比例/% Components percentage
生茸期 Antler development	血细胞内容物 Blood corpuscle	2 021.19 ± 24.56 <sup>F</sup>	95.26
	血浆 Plasma	93.34 ± 3.54 <sup>B</sup>	4.73
	细胞膜酶解液 Blood cell membrane	0.11 ± 1.39 <sup>A</sup>	0.01
	溶血液 Dissolving blood	1 023.94 ± 21.41 <sup>D</sup>	101.68
	全血 Whole blood	1 007.07 ± 11.03 <sup>D</sup>	100
配种期 Service period	血细胞内容物 Blood corpuscle	1 848.80 ± 40.86 <sup>Ea</sup>	95.38
	血浆 Plasma	83.39 ± 3.41 <sup>B</sup>	4.62
	细胞膜酶解液 Blood cell membrane	-0.06 ± 2.08 <sup>A</sup>	0
	溶血液 Dissolving blood	935.27 ± 11.41 <sup>C</sup>	101.64
生茸前期 Pre-antler development	全血 Whole blood	920.17 ± 19.89 <sup>C</sup>	100
	血细胞内容物 Blood corpuscle	1 872.02 ± 42.03 <sup>Eb</sup>	95.25
	血浆 Plasma	86.72 ± 3.84 <sup>B</sup>	4.74
	细胞膜酶解液 Blood cell membrane	0.10 ± 1.85 <sup>A</sup>	0.01
	溶血液 Dissolving blood	945.64 ± 14.95 <sup>C</sup>	101.37
	全血 Whole blood	932.88 ± 18.86 <sup>C</sup>	100

同列肩标小写字母(a,b)不同者表示差异显著( $P < 0.05$ ); 大写字母(A,B,C,D,E,F)不同者表示差异极显著( $P < 0.01$ )  
Value with differet letters (a,b) in a column mean significantly different ( $P < 0.05$ ); Within the same column values with different letters (A, B, C, D, E, F) were extremely significantly different ( $P < 0.01$ )

在同一生理时期内,血细胞内容物 SOD 的含量极显著高于血浆( $P < 0.01$ );血浆 SOD 含量极显著高于细胞膜酶解液( $P < 0.01$ );溶血液 SOD 含量虽高于全血,但差异不显著( $P > 0.05$ )。不同生理时期,血浆 SOD 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 SOD 含量以生茸期最高,且极显著高于配种期和生茸前期( $P < 0.01$ ),生茸前期显著高于配种期( $P < 0.05$ );全血 SOD 含量以生茸期最高,且极显著高于配种期和生茸前期( $P < 0.01$ ),配种期和生茸前期差异不显著( $P > 0.05$ );溶血液 SOD 含量以生茸期最高,且极显著高于配种期和生茸前期( $P < 0.01$ ),配种期和生茸前期差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 全血中 SOD 分布

朱希强等<sup>[19]</sup>报道 SOD 是自由基清除剂,多存在于细胞质、线粒体和细胞外,未见血细胞细胞膜上含 SOD 的相关报道。本试验中所测细胞膜酶解液 SOD 的含量极微( $0.05 \pm 1.65$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ,占全血 SOD 的比例为 0.005% 且所得数值有正有负,表明细胞膜不含 SOD,所得数值应是试验误差造成,这与朱希强等的报道相一致。因此在实践中可以去掉血细胞细胞膜,而不会降低鹿血的 SOD 含量。

#### 3.2 不同生理时期全血 SOD 含量

3 个时期全血 SOD 含量分别为:生茸期( $1\ 007.07 \pm 11.03$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ;生茸前期( $932.88 \pm 18.86$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ;配种期( $920.17 \pm 19.90$ )  $U \cdot mL^{-1}$ 。生茸期极显著高于配种期和生茸前期( $P < 0.01$ ),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>[20]</sup>。饲料中蛋白质含量的提高为体内 SOD 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。生茸前期基本上处于冬末春初,公鹿经过配种后,体质偏瘦,又逢气温较低。这两个时期营养物质缺乏造成全血 SOD 含量减少。曹荣峰等<sup>[21]</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。而卵磷脂能有效提高心、脑组织 SOD 活性,降低过氧化脂质和脂褐素含量<sup>[22]</sup>,所以生茸期血液卵磷脂含量升高

与 SOD 含量的升高有一定的相关性。本试验中生茸期全血 SOD 含量极显著高于配种期和生茸前期( $P < 0.01$ ),这与曹荣峰的报道相符合。

#### 3.3 不同生理时期溶血液 SOD 含量

3 个时期溶血液 SOD 含量分别为:生茸期( $1\ 023.94 \pm 21.41$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ;生茸前期( $945.64 \pm 14.95$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ;配种期( $935.27 \pm 11.41$ )  $U \cdot mL^{-1}$ 。在各个生理时期内溶血液 SOD 的含量均高于同时期的全血,这是因为全血中血细胞细胞膜不含有 SOD,从而导致其总体含量降低。在传统鹿血酒生产中,完整的鹿血血细胞形成大量沉积物影响了鹿血酒的美观,因此可以把溶血液作为生产鹿血酒的原料,在增加鹿血酒美观性的同时也保证了 SOD 不损失。

### 4 结论

4.1 全血 SOD 主要集中在血细胞内容物上,其所占比例为 95.30%;血浆仅占 4.70%,细胞内容物 SOD 含量极显著高于血浆( $P < 0.01$ ),而细胞膜上不含有 SOD。

4.2 血细胞内容物的 SOD 含量最高( $1\ 920.70$ )  $U \cdot mL^{-1}$ ,且极显著高于溶血液( $971.76$ )  $U \cdot mL^{-1}$ 、全血( $956.73$ )  $U \cdot mL^{-1}$ 、血浆( $88.17$ )  $U \cdot mL^{-1}$ );溶血液、全血的 SOD 含量极显著高于血浆( $P < 0.01$ );相同时期内溶血液 SOD 含量均高于全血 SOD 含量,但差异不显著。虽然血细胞内容物 SOD 含量最高,但为了不浪费血浆,考虑以溶血液为原料来制作酶制剂和鹿血酒效果最佳。

4.3 在 3 个生理时期的溶血液中,生茸期溶血液的 SOD 含量( $1\ 023.94 \pm 21.41$ )  $U \cdot mL^{-1}$ 极显著高于配种期和生茸前期( $P < 0.01$ )。因此在利用梅花鹿血液制作鹿血酒和提取酶制剂时应考虑多使用生茸期溶血液。

#### 参考文献:

- [1] 马泽芳,王伟峰. 中国的茸鹿产品及药用价值 [J]. 农牧产品开发,2000,3:23-25.
- [2] 张晓莉,唐晓云,刘亚威. 鹿血酒口服液对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国林副特产,1997,11(4):20-21.
- [3] 赵世臻. 鹿产品及其保健 [M]. 北京:中国农业出版社,2001:42.
- [4] PORTER M B, PEREIRAR O M, SMITH J R. Novel monoclonal antibodies identify antigenic determinants

- unique to cellular senescence [J]. *Cell Physiol*, 1990, 142:425-433.
- [5] JANY K D. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bony fish, *Carassius auratus gibelio* (Bloch): Endopeptidases [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1976, 536:31-38.
- [6] SATOMIS A, HASHIMOTO T. Tissue superoxide dismutase (SOD) activity and immunohistochemical staining in acute appendicitis: Correlation with degree of inflammation [J]. *J Gastroenterol*, 1996, 31:639-645.
- [7] KEN J H, MAKIYA N. SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal [J]. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2008, 25(5):531-536.
- [8] 韦旭斌,李进国,夏尊平. 鹿外周静脉血成分研究 [J]. 特产研究, 2001, 2: 19-22.
- [9] 邓干臻,吴兴兵. 生茸期梅花公鹿血常规检测 [J]. 河南畜牧兽医, 1996, 17(3):18-19.
- [10] 张黎. ICP-AES法测定鹿血及其产品中 11 种微量元素 [J]. 云南大学学报, 1994, 16(2):113-115.
- [11] 董万超. 鹿茸血酒生物效应研究 [J]. 特产研究, 1998, 4:13-15.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 孙泉云,潘水春,鞠龚讷. 动物采血技术 [J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(4):34-35.
- [15] JOSETTE B M, BERNARD G. Evaluation of the effects of GD complexes used as magnetic resonance imaging contrast agents, on superoxide dismutase: comparison of two methods [J]. *Inflammation*, 1999, 23(5):425-436.
- [16] PATEL S P, KATYARE S S. Differential pH sensitivity of tissue superoxide dismutases [J]. *Indian J Clinical Biochem*, 2006, 21(2):129-133.
- [17] PERCIVAL S S. Cu/Zn superoxide dismutase activity does not parallel copper levels in copper supplemented HL-60 cells [J]. *Biological Trace Element Research*, 1993, 38:63-72.
- [18] 张彩莹,袁勤生. 羊红细胞铜锌超氧化物歧化酶的纯化及部分性质研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(1):4-7.
- [19] 朱希强,袁勤生. EC-SOD 研究概况 [J]. 食品与药品, 2005, 7(4):5-10.
- [20] 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.
- [21] 曹荣峰,王继芳,崔丽春,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.
- [22] 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.

(编辑 朱绯)