

技术与方法

十四烷酰佛波醋酸酯刺激大鼠多形核白细胞释放 H_2O_2 的比色测定

孙士勇 韩锐

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

提 要

本文介绍了一种以大鼠多形核白细胞 (PMNs) 为材料、利用酚红氧化原理比色测定十四烷酰佛波醋酸酯 (TPA) 刺激 PMNs 生成 H_2O_2 的方法。研究表明, PMNs 为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 、TPA 为 100—300 ng/ml 和测定波长为 620 nm 是较理想的测定条件。该法简单易行、稳定、无需特殊的试剂及仪器设备, 适合于一般实验室常规研究抗氧化剂、抗促癌剂的作用和作用原理。

关键词 多形核白细胞, 氧化爆发, 过氧化氢

十四烷酰佛波醋酸酯 (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 是巴豆油 (croton oil) 中的成分, 为目前公认的强皮肤促癌剂 (tumor promoter)。TPA 刺激多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) 时产生的氧化爆发 (oxidative burst) 以 O_2 的迅速消耗和 O_2^- 等活性氧自由基产生为特征。由于 PMNs 受刺激后首先释放 O_2^- , O_2^- 被歧化为 H_2O_2 , 然后再进一步生成活性更强的 1O_2 和 $\cdot OH$ 。因此, H_2O_2 是从 O_2^- 生成 1O_2 和 $\cdot OH$ 的中间物质^[1]。测定 H_2O_2 能客观地反映氧化爆发时活性氧自由基产生情况。Frenkel 等人^[2,3]建立了以酚红氧化原理测定人血 PMNs 生成 H_2O_2 的实验系统, 用于研究筛选可能的促癌物或抗促癌物 (antipromoter)。鉴于人血来源的困难, 我们将该法用于大鼠血 PMNs 的 H_2O_2 生成测定, 并对有关的实验条件进行了研究。该法简单易行, 方法稳定, 无需特殊的试剂及仪器设备, 适合于一般实验室研究筛选抗氧化剂和抗促癌剂。

材 料 和 方 法

1. 动物 大鼠约 200—300 g, 雌雄不加选择, 由中国医学科学院实验动物中心提供。

2. 药品及试剂 辣根过氧化酶 (RZ 约 3; $\geq 250 \text{ U/mg}$) 为上海东风生化试剂厂产品, 酚红为北京化工厂产品, 右旋糖酐 (MW100000) 为上海长征制药厂产品, 超氧化物歧化酶 (3000 U/mg) 为夏河县生物制品厂产品, H_2O_2 (AR) 购自中国医药公司北京采购供应站。TPA 为美国 Sigma 公司产品, 用 DMSO 溶解后分装贮存于 -30°C , 临用时加 PBS 溶液稀释。

PBS 平衡盐溶液 (pH7.4) 按常法配制。酚红反应液用 PBS 溶液配制, 其中含酚红 (100 ng/ml) 和辣根过氧化酶 ($50 \mu\text{g/ml}$), 置 4°C 保存。

R8605、R11 和 R8921 均为我所合成的维甲类化合物。用时以 95% 乙醇配制。

3. 方法

(1) 大鼠 PMNs 的制备 参照文献[4,5]

方法。将大鼠用乙醚麻醉后，由心脏采血(1%肝素溶液抗凝)，然后加入等体积的6%右旋糖酐等渗溶液。混匀后，直立静置于37℃温箱中。45—60min后，小心吸取上清液转移到另一离心管中，1000r/min离心5min，弃上清。然后加2ml冰冷蒸馏水以破坏残留的红细胞，30s后立即加等体积1.8% NaCl溶液使成等渗，再1000r/min离心5min，弃上清。用PBS(pH 7.4)洗三次后加PBS配成适当浓度的细胞悬液。最后用2%醋酸溶液计数PMNs。

(2) H_2O_2 氧化酚红的标准曲线^[3,6] 取30% H_2O_2 溶液10 μ l，加蒸馏水至10ml即成0.01mol/L的 H_2O_2 贮液，于4℃保存。同时取该贮液稀释成0.001mol/L，然后取不同量的此溶液，加一定体积的酚红反应液(总体积为1.00ml)，在室温反应10min(或37℃，5min)后加1mol/L NaOH溶液10 μ l，马上在620nm处测OD值即可得出标准曲线。 H_2O_2 的实际浓度可根据在230nm处的OD值和消光系数81(mol/L)⁻¹cm⁻¹进行校正。

(3) PMNs 生成 H_2O_2 的测定 基本按文献[3,6]方法。各管按下述步骤(表1)混匀后，37℃温育30min，然后加1mol/L NaOH溶液10 μ l。摇匀后立即在620nm处测OD值。最后从标准曲线求出 H_2O_2 生成量。空白管的OD值为 H_2O_2 的自然释放量。

表1 研究 H_2O_2 生成抑制剂的反应系统

试 剂	空白管	对照管	样品管	终浓度
PMNs 悬液 (μ l)	50	50	50	1×10^6 /ml
酚红反应液 (ml)	0.94	0.93	0.93	
被试物质 (μ l)	—	—	10	$\leq 10^{-3}$ mol/L
溶媒 (μ l)	10	10	—	
TPA (μ l)	—	10	10	100—300ng/ml

结果与讨论

1. 氧化酚红测定的最佳波长选择

在外源性辣根过氧化酶的存在下，酚红被 H_2O_2 氧化后颜色由红变黄。当将pH升高到12.5左右时，黄色又变为紫红色，并在较长的时

间内保持不变。Pick 等人^[6]建立测定 H_2O_2 的酚红氧化法时，认为在600—620nm之间已氧化和未氧化酚红的吸收差为最大，从而选择了610nm作为测定波长。Frenkel 等人^[3]则选择了590nm为测定波长。但在本实验条件下，590nm明显不合适(图1)。我们选择了620nm作为测定波长。

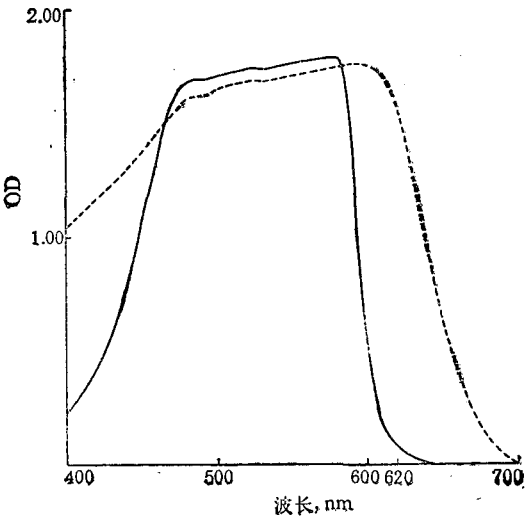


图1 测定氧化酚红最适波长的选择

——蒸馏水+酚红(20ng/ml)+辣根过氧化酶(50ng/ml)
----- H_2O_2 (100 μ mol/L)+酚红(20ng/ml)+辣根过氧化酶(50ng/ml)

2. H_2O_2 氧化酚红反应条件的观察

当已知量的 H_2O_2 在辣根过氧化酶存在下和酚红反应时，可得出 H_2O_2 氧化酚红的标准

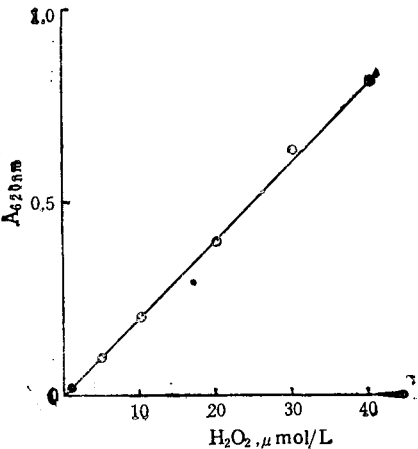


图2 H_2O_2 氧化酚红的标准曲线
反应在室温作用10min

曲线,反应在室温作用 10min 和 37℃ 作用 5min 并无差别。在本测定条件下, H_2O_2 浓度在 0—40 $\mu\text{mol/L}$ 之间时反应呈直线关系 ($r = 0.998$)(图 2)。

3. PMNs 及 TPA 浓度对 H_2O_2 生成的

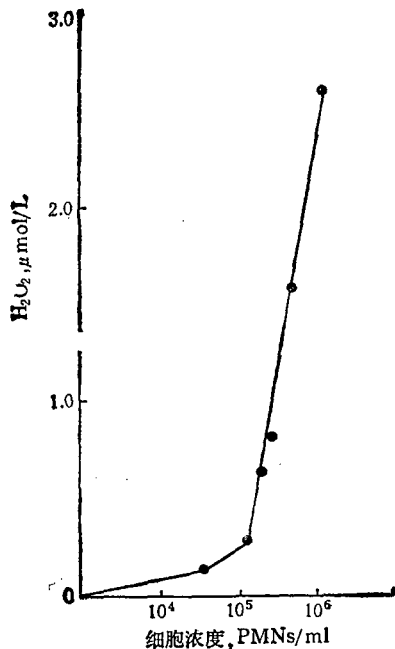


图3 PMNs 浓度对 H_2O_2 生成的影响
TPA 300ng/ml
温育时间 30min

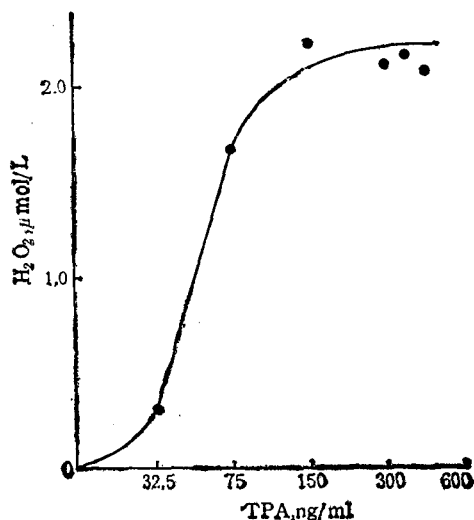


图4 TPA 浓度对 H_2O_2 生成的影响
PMNs 浓度 $1 \times 10^6/\text{ml}$
温育时间 30min

影响

适当浓度的 PMNs 和 TPA 是本实验系统生成 H_2O_2 的必须条件。Frenkel 等人^[3]用人 PMNs 研究 TPA 刺激释放 H_2O_2 时,选择的细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 、TPA 为 25nmol/L (15.4ng/ml)。用大鼠 PMNs 进行实验时,发现其 H_2O_2 释放活力要低于人 PMNs,故需较多 PMNs 和较高浓度的 TPA (图 3 和图 4)。实验证明, PMNs 为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 和 TPA 为 100—300ng/ml 较为适宜。若 TPA 为新鲜配制时,可适当降低其浓度。

4. 温育时间对 H_2O_2 生成的影响

TPA 刺激 PMNs 释放 H_2O_2 的量随温育时间的延长而增加,在 30min 内呈线性关系,以后 H_2O_2 生成速度降低 (图 5)。所以测定 H_2O_2 时选择 30min 为温育时间。若要观察药物对 H_2O_2 生成的动态影响,可选择 0—60min 内不同时间点进行测定。

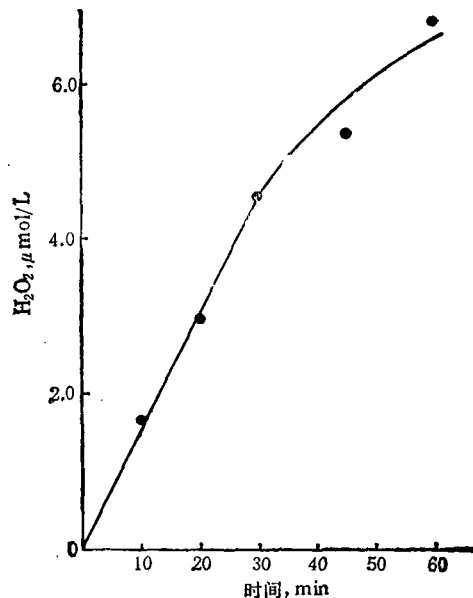


图5 不同温育时间对 H_2O_2 生成的影响
PMNs 浓度 $1 \times 10^6/\text{ml}$, TPA 300ng/ml

5. 外源性超氧化物歧化酶对 H_2O_2 生成的影响

超氧化物歧化酶 (SOD) 可将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 。因此,当加入外源性 SOD 时,可促进 PMNs 释放的 O_2^- 完全转化为 H_2O_2 , H_2O_2 的

试用滤膜电泳提纯流行性出血热病毒 114 株

高又新 戴天力 杨占秋

(湖北医学院病毒所, 武汉 430071)

提 要

用自制火棉胶滤膜对流行性出血热病毒 114 株进行快速电泳纯化, 其技术原理, 是以电场力作为趋动力, 推动破碎处理后的病毒感染细胞悬液, 经一组孔径大小不同的火棉胶滤膜分级拦截作用后, 使病毒与其它成分分离从而达到纯化的目的。其制备和操作方法简单、适用、提纯效果好, 并能保持病毒原有的一切生物特性, 为病毒的深入研究工作提供了有利条件。有推广开发价值。

关键词 滤膜电泳, 出血热病毒

流行性出血热病毒 (EHFV) 的纯化, 是对其病毒进行深入研究的基本条件和关键环节, 也是棘手问题之一。随着超离心及亲和层

析技术的运用, 使这个问题已基本解决。但对尚不具备条件的实验室, 或者即使已具备条件的实验室, 也并不排斥使用一种更简便、更经

生成量就会增加。当加入 $5\mu\text{g/ml}$ SOD 时, 可使 H_2O_2 生成平均增加 31.97% (表 2)。利用外源性 SOD, 可以判定抑制 H_2O_2 生成的物质是否影响了歧化过程。若抑制歧化过程减少 H_2O_2 生成, 外源性 SOD 的加入就可降低或取消这种抑制作用。

表 2 外源性 SOD 对 H_2O_2 生成的影响 ($n=5$)

	-SOD	+SOD
生成的 H_2O_2 ($\mu\text{mol/L}$)	3.69 ± 0.52	4.87 ± 0.32
增加率(%)		31.97

6. 几种维甲类化合物对 TPA 刺激大鼠 PMNs 生成 H_2O_2 的影响

由图 6 结果可见, R8605 从 10^{-7} — 10^{-4} mol/L 都不同程度地抑制 TPA 刺激 PMNs 生成 H_2O_2 , 呈明显的浓度依赖性; RII 在一定浓度下 (10^{-4} 和 10^{-5} mol/L) 可抑制 H_2O_2 生成, 但无明显量效关系; 而 R8921 仅在 10^{-4} mol/L 有抑制作用, 在其它浓度下则无效。目前我们已用小鼠二阶段皮肤促癌模型证实了 R8605 的抗促癌作用。

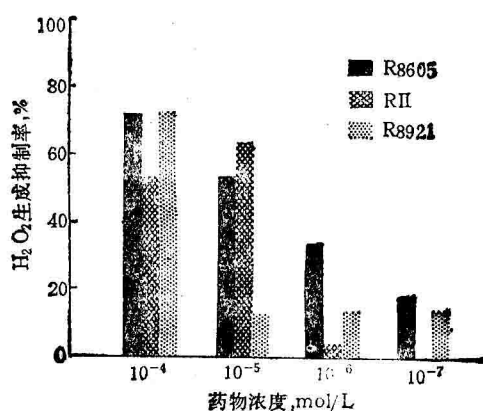


图 6 几种维甲类化合物对 TPA 刺激大鼠 PMNs 生成 H_2O_2 的影响

参 考 文 献

- 1 Goldstein B D et al. *Cancer Letter*, 1981; **11**:257
- 2 Frenkel K et al. *Carcinogenesis*, 1987; **8**:1207
- 3 Frenkel K et al. *Carcinogenesis*, 1987; **8**:455
- 4 Kensler T W et al. *Cancer Res*, 1981; **41**:216
- 5 Taniguchi K et al. *Biochem Pharmacol*, 1984; **33**:3165
- 6 Pick E et al. *J Immunol Methods*, 1980; **38**:161

[本文于 1990 年 6 月 4 日收到, 7 月 30 日修回]