

生物系统中脂质过氧化检测方法的评述*

汤丽霞 沈 恂

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 生物体系中脂质过氧化的检测方法是脂质过氧化反应机理研究能否取得成功的关键因素之一。检测生物体系中脂质过氧化的方法有多种, 但各种检测方法在不同的实验中都显示出一定的优缺点, 近年来应用较多并且很有前途的实验方法是高压液相色谱法以及化学发光法等。

关键词 生物体系, 脂质过氧化, 检测方法

脂质过氧化在自由基损伤领域中处于十分重要的地位。近几年来, 人们对其反应机理的研究作了大量的工作, 但是由于脂质过氧化是一个复杂的过程, 尤其在生物体系中使得该反应变得更加多样化, 因此, 目前人们对脂质过氧化机理的了解还不十分透彻。基于上述原因, 脂质过氧化的检测方法在该反应机理的研究中就显得尤为重要。在生物体系中膜脂与膜蛋白、碳水化合物、具有催化活性的酶以及一些微量金属之间都有密切关系, 因此对如此复杂的体系进行脂质过氧化检测, 就要求研究者要针对自己的实验目的来选择不同的检测方法, 不能笼统地用某一种方法去检测。许多技术都可以用来检测膜脂质过氧化, 只是每一种技术所检测的对象不同而已。如果对具有生物活性的醛类感兴趣, 就要选择对此类物质具有专一性的检测方法; 如果只想定量地了解脂质过氧化进行的程度选用一种比较简单的方法就可以了。另外有的方法只适用于体外而不适用体内实验。因此, 对脂质过氧化的检测方法做一简单地回顾是很必要的。

1 脂质过氧化底物的检测及优缺点

1.1 不饱和脂肪酸的消失

众所周知, 不饱和脂肪酸最易发生脂质过氧化反应, 那么不饱和脂肪酸的消失就可以作为指标来检测脂质过氧化, 这一方法普遍适用于生物体系的体外实验。最早应用这种方法来

检测脂质过氧化的是 May 和 McCay^[1], 他们在鼠肝微粒体的脂质过氧化过程中检测到了二十碳烷酸和二十二碳六烯酸的消失。在鼠肝质膜的过氧化中也检测到了这两种酸的消耗情况。首先要经过不饱和脂肪酸的提取, 该步骤必须小心进行以防操作过程中造成不饱和脂肪酸进一步的氧化损伤, 最好在暗室中进行。然后还要经过皂化作用、酯化作用和气相色谱分离等多步实验。此方法的优点是在忽略不饱和脂肪酸以其他方式损耗的条件下, 可以作为检测脂质过氧化的一个很确切的指标, 并且通过这种方法还可以定性地知道是何种脂肪酸参与了脂质过氧化反应, 它的缺点是操作繁琐, 不十分灵敏。

1.2 氧气的利用

不饱和脂肪酸发生脂质过氧化伴随着氧气的消耗, 因此氧耗也可以成为检测脂质过氧化的指标之一。很显然, 该方法只适用于体外实验, 因为自由基反应消耗的氧只是体内氧耗的一小部分, 因此该方法不适用于体内或者一些呼吸器官的脂质过氧化实验。最初是由 Hochstein 和 Ernster^[2]用该方法来检测鼠肝微粒体的脂质过氧化的。此方法操作简便只需一个氧电极就行, 另外它还可以连续监测脂质过氧化的进程。该方法还可以证明中断链反应的抗氧化剂的抑制作用, 用抗氧化剂可以使某系

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-03-23, 修回日期: 1994-07-05

统中存在诱导期,同时通过改变抗氧化剂的浓度还可以控制诱导期的长短.在生物系统中,脂质过氧化的起始速率很难控制,该方法虽然可以通过改变抗氧化剂的浓度来加以控制,但很不精确.

2 脂质过氧化产物的检测及优缺点

2.1 脂自由基

在脂质过氧化反应中有许多自由基产生,对于这些自由基而言可利用的有效检测手段是ESR.忻文娟等人^[3]应用该技术利用POBN做为捕捉剂在亚油酸体系的脂质过氧化反应中检测到了L的存在.对不同种类的自由基应选择合适的捕捉剂,这样才能有效地提高实验的灵敏度.通过ESR信号来判断一个产物有时是很困难的,但是通过该技术我们可以从中获得一些有用的信息,正如Kozlov^[4]在他的文章中所说的那样.

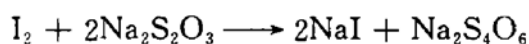
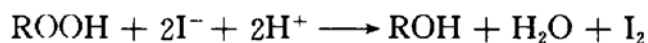
2.2 共轭二烯

在不饱和脂肪酸的侧链氧化过程中伴随有共轭二烯的生成,该共轭体系在230—235nm波长范围内具有很强的吸收,因此就提供了一个很灵敏的检测脂质过氧化的手段.该方法适用于检测纯度较高的脂的脂质过氧化反应,因为反应体系中的其他底物也可能在这个波长范围内有吸收,所以反应中的生物材料没有经过提纯这一步,就会产生很强的噪声,使结果不够精确.因此该方法要经过在氯仿:甲醇抽提脂这一步,然后将氯仿挥发掉,并将脂重新溶解在环己烷中作光谱分析用.由于上述原因,使得该方法不适用于检测人体的某些样品,人体内的一些材料如血清、胆汁和十二指肠液内所含的并不是单一的共轭二烯,而是结合了一些与脂质过氧化无关但在该波长范围内有吸收的化合物.二级衍生色谱法的诞生克服了上述缺点,它可以检测到具有不同的共轭二烯结构的物质存在^[5],并且该方法很灵敏.

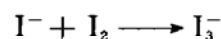
2.3 脂过氧化物

作为脂质过氧化的初级产物,脂过氧化物可能是人们最想测量的.可是,在生物体系中

检测脂过氧化物是很困难的,因为生物体内存在一些金属离子、还原剂的某些酶,使得脂过氧化物变得不稳定.检测脂过氧化物的最典型方法是碘量法,它依据碘化物的氧化反应.在实验所用的条件下,只有脂过氧化物可以与 I^- 反应,生成 I_2 ,然后用硫代硫酸钠滴定.

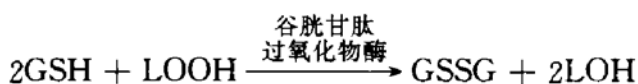
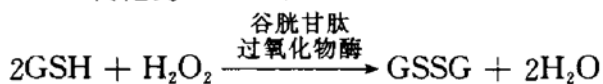


将此方法加以改进,可以通过色谱法直接检测三碘阴离子的含量来测定脂质过氧化的进程.

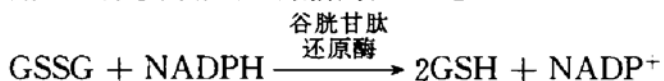


反应需要高浓度的碘存在使平衡向右移动,同时要防止碘化物试剂被氧化.由于反应中易产生除 $LOOH$ 以外其他氧化剂如 H_2O_2 的干扰,因此这种方法对生物体系很少采用.

另外也可以应用一些过氧化物酶来检测脂过氧化物.最早使用谷胱甘肽过氧化物酶方法的是Heath和Tappel^[6],反应的原理是谷胱甘肽过氧化物酶在与 H_2O_2 和 $LOOH$ 反应的同时GSH氧化为GSSG:



当过量的谷胱甘肽过氧化物酶存在时,GSH和谷胱甘肽还原酶消耗NADPH的速率与体系中过氧化物的含量有关.预先加入过氧化氢酶以除去体系中的 H_2O_2 .该方法具有很高的专一性和灵敏度.缺点是容易产生干扰,另外谷胱甘肽过氧化物酶难于在膜内与过氧化物作用,一般要预先加磷脂酶处理之.



另一种比较灵敏的方法是依据正铁血黄素分解脂过氧化物,生成一种氧化型产物,如果在该反应体系中同时加入还原型的二氯荧光素,该产物可以将它氧化成具有荧光特性的氧化型产物^[7].这种方法很灵敏,检测的最低极限为25pmol,并且操作简单.缺点是对脂过氧化物不具有专一性,一些试剂和抗氧化剂容易对该反应产生干扰.

另外,改进的 TBA 法和化学发光法也是脂过氧化物的很好检测手段。

2.4 荧光产物

脂质过氧化的羰基化合物可以和蛋白质的氨基基团反应生成一种有很强吸收和发荧光的烯夫碱,此碱在酸性 pH 值时容易形成,当氨基供体是水溶性的,就可以生成极性的发荧光复合物,如果有磷脂参与反应,则生成的是无极性的发荧光复合物。在中性 pH 下,发荧光的二氢吡啶可以形成。醛类在没有氨基基团时也可以通过聚合反应产生具有荧光特性的产物,对于荧光产物的生成,MDA 只是一种次要的贡献者,其它醛类,如 4-羟基壬醛可能更为重要。荧光产物可以很容易地从生物体系中提取得到,荧光产物在过氧化的亚细胞器和体内都已经检测到了^[8],这些发光团的光谱特性与从老年斑中提取得到的脂褐质的光谱特性非常相近^[9]。此方法的优点是荧光产物只与脂质过氧化反应本身有关,不受其他因素的影响。

2.5 醛类

在生物体系的脂质过氧化反应中通过脂过氧化物的降解产生了许多醛^[10],有些醛具有很高的细胞毒性并能大范围地抑制细胞功能。Esterbauer^[10]是最初分析醛类化合物的。醛类化合物不仅在脂过氧化物的裂解中产生,在生物体系中也存在着大量的醛的产物。检测醛类化合物最通用的实验方法是依据醛和二硝基苯肼反应生成二硝基苯腙,由色谱法分离得到^[11]。生物体系中不仅存在游离的醛类,还有一些醛结合了部分的磷脂。Comporti 等人用烯夫试剂也从经溴苯中毒的小鼠肝脏中检测到了和蛋白结合的醛^[12]。对游离的醛类检测,Tomira 和 Yoshino^[13]依据反应中生成了可以发荧光的十氢吡啶衍生物提出了一个很灵敏的检测方法,该衍生物可以由 HPLC 分离得到。它比二硝基苯肼法灵敏得多,但缺乏特征性。在众多的醛中,人们研究得最多的是丙二醛(MDA)^[14],MDA 是脂质过氧化的终产物之一,它通过初级、次级产物裂解形成的,在低 pH 值和高温度下,可以与硫代巴比妥酸

(TBA)反应生成一种粉红色生色团,该物质的组成是 MDA : TBA = 1 : 2,可以在 532nm 波长下测得。该方法操作简单灵敏,但也存在着一些缺点,首先 TBA 法检测到的 MDA 并不是完全由脂质过氧化产生的,许多也是在酸加热阶段由过氧化物裂解产生的,一些过渡金属离子此时也可以起到催化作用,其次 TBA 反应严格说来对 MDA 并不具有专一性,对一些脂过氧化物衍生物的分解产物也起反应。MDA 本身不仅仅只与 TBA 反应,它也是代谢分解的底物。另外许多因素都可以调节 MDA 的产生,如实验中加入的 H_2O_2 ,抗氧化剂和一些络合剂以及该反应中的酸的种类和浓度对此都有影响。上述缺点中,有些还是可以克服的,如在与酸加热之前体系中加入丁基化羟基甲苯(BHT)可以抑制加热过程中 MDA 的产生^[15]。用荧光法检测 TBA-MDA 复合物比 TBA 法误差小,并且很灵敏。

2.6 烃类气体

利用气相色谱分析脂质过氧化的终端产物戊烷、乙烷和乙烯等气体,亦是测量脂质过氧化水平的常用方法之一。注意,这些气体都是次要的脂质过氧化的终端产物,而且所生成的这些终端产物与分解过氧化物的过渡金属离子的存在也有关,气体产物的增加同时也反应了过渡金属离子催化效能的增加。终端气体中的乙烷和戊烷是由 $\omega-3$ 和 $\omega-6$ 不饱和脂肪酸过氧化物分别裂解形成的。Riely^[16]最早证明通过检测呼出气体中的这些链烷可以作为无侵害指标检测体内脂质过氧化。此方法是检测体内脂质过氧化中唯一无损伤的方法,还可以长期连续检测动物(包括人在内),主要缺点是对体内气体的准确来源无法确定,并且需要一些特殊设备,同时要严格控制碳氢气体的产生,防止空气污染物的混入。

3 化学发光法

在脂质过氧化过程中伴随有发光的激发态生成,这样我们就可以应用化学发光法检测脂质过氧化反应的发生。生物体系的化学发光是

由 Tarusov^[17]于 1961 年在前苏联最早发现的。在离体膜系统或灌注的动物器官, 脂质过氧化反应的激发伴随着光发射的增强。体内膜脂的过氧化是化学发光的重要来源。在脂质过氧化体系中, 当两过氧自由基相遇时产生单线态氧 $^1\text{O}_2$, 即发射某种波长的光。另一方面, 所产生的羰基化合物可处于激发态, 当其返回基态时亦有光的发射。化学发光的另一来源是烷氧自由基自身反应生成激发态酮。此外, 单线态氧与不饱和脂肪酸侧链反应生成环过氧化物, 该物质分解也可生成激发态的羰基化合物。化学发光由光电倍增管监测, 以每秒钟多少计数表示光强。沈恂等人^[18]用该技术研究了亚油酸体系的脂质过氧化。最近 Vladimirov 等人^[19]用化学发光法研究了二价铁离子对脂质体脂质氧化的作用, 并且取得了满意的结果。该方法对离体细胞或膜化学发光的测量结果与用其它测量脂质过氧化的方法的测量结果有较好的平行关系, 是一种很有前途的方法, 此方法还具有高灵敏度和连续监测等优点。因此, 对上面提到的用氧耗技术测定抗氧化剂的作用, 用化学发光法也可以通过测定脂质过氧化反应的时间曲线来观察抗氧化剂的作用。该方法虽然很有前途, 但也存在一定的缺点, 如缺乏专一性, 其它化学发光反应也可能导致化学发光。

4 高压液相色谱法 (HPLC)

丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化反应中的终产物之一, 通常人们是用 TBA 法来检测的, 但是由于 TBA 法对 MDA 并不具有专一性, 因此实验中存在一定的误差。应用 HPLC 技术已经成功地分离并且定量地测定了 MDA-TBA 产物以及游离的 MDA 产物^[20], 该方法灵敏度高并且具有很好的专一性。最近, Holley 等人^[21]应用该技术在生物样品脂质过氧化产物中分离得到了正-链醛和羟基链烯醛的存在。高压液相色谱法灵敏、操作简单迅速、需要的样品量也很少。但是单独使用将会产生一定的局限性, 如果和其它技术一起使用将会使它本身的优越性更好的得以体现。

综上所述, 我们介绍了多种检测脂质过氧化的方法, 但是我们可以这样说, 没有哪一种方法可以单独精确地测量脂质过氧化反应。共轭二烯法只能告诉我们有关体外简单体系中脂质过氧化早期的一些信息; 脂肪酸的消失以及氧耗法只适用于体外, 而对体内的脂质过氧化检测无能为力; 烃类气体和荧光产物的测定也只能检测脂质过氧化反应的终产物。总之, 每种方法都各有利弊, 只要我们能针对自己的实验目的来选择不同的实验方法, 就可以扬长避短, 使实验结果更加精确。同时对脂质过氧化启动机理的研究也会起到相当大的作用。

参 考 文 献

- 1 May H E, McCay P B. *J Biol Chem*, 1968; **243**: 2288
- 2 Hochstein P, Nordenbrand K, Ernster L. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964; **14**: 323
- 3 张建朝, 赵保路, 忻文娟. *生物物理学报*, 1991; **7** (2): 189
- 4 Kozlov A V, Yegorov D Y, Vladimirov Y A *et al.* *Free Radical Biology and Medicine*, 1992; **13**: 9
- 5 Corongiu F P, Poli G, Dianzani M U *et al.* *Chem Biol Interact*, 1986; **59**: 147
- 6 Heath R L, Tappel A L. *Anal Biochem*, 1976; **75**: 184
- 7 Cathcart R, Schwieters E, Ames B N. *Methods Enzymol.* 1984; **105**: 352
- 8 Takao Ohyashiki, Norio Sakata, Tetsuro Mohri *et al.* *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991; **284**: 375
- 9 Tsuchida M, Miura T, Aibara K. *Chem Phys Lipids*, 1987; **44**: 297
- 10 Esterbauer H, Schaur R J, Zollner H. *Free Radical Biol Med*, 1991; **11**: 81
- 11 Poli G, Dianzani M U, Cheeseman K H. *Biochem J*, 1985; **227**: 629
- 12 Pompella A, Maellaro E, Casini A F *et al.* *Lipids*, 1987; **22**: 296
- 13 Yoshino K, Fujita M. *Chem Pharm Bull*, 1986; **34**: 5184
- 14 Esterbauer H, Cheeseman K H. *Meth Enzymol*, 1990; **186**: 407
- 15 Holley A E, Slater T F. *Free Radic Res Comm*, 1991; **15**: 51
- 16 Riely C A, Cohen G, Lieberman M. *Science*, 1974; **183**: 208
- 17 Tarusov B N, Polidova A I, Zhuravlev A I. *Radiobiologiya*, 1961; **1**: 150

- 18 Shen Xun, Tian Jingdong, Li Xingyuan *et al.* Biophysical Chemistry, 1991; **40**: 161
- 19 Driomina E S, Sharov V S, Vladimirov Y A. Free Radical Biology and Medicine, 1993; **15**: 239
- 20 Draper H H, Hadley M. Meth Enzymol, 1990; **186**: 421
- 21 Holley A E, Walker M K, Cheeseman K H *et al.* Free Radical Biology and Medicine, 1993; **15**: 231

A Review of the Method in Measuring Lipid Peroxidation in Biological Systems. Tang Lixia, Shen Xun (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract To study the reaction mechanism of

lipid peroxidation, methodology is of critical importance. Many methods have been used to measure lipid peroxidation in biological systems, but every one has some advantage and also some disadvantage in different experiments. Recently people often use some advanced methods, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), chemiluminescence and so on.

Key words biological systems, lipid peroxidation, measuring method

绿脓杆菌外毒素 A 的结构、功能及其重组毒素

杜世或

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010)

摘要 绿脓杆菌外毒素 A 有三个结构功能区, 氨基端区 (I) 通过关键位点 Lys57 结合靶细胞表面受体, 中心区 (II) 负责该毒素的跨膜转位功能, Arg276 和 Arg279 是关键位点, 在胞吞泡内此毒素于 Arg279 与 Gly280 间酶解成 28 000 和 37 000 两片段, 羧基端区 (III) 所在的 37 000 片段由其末端氨基酸序列 REDLK 介导到内质网再转位入胞浆通过 Glu553 位点结合 NAD⁺ 使延伸因子-2 受 ADP-核糖基化而抑制细胞蛋白质合成导致细胞死亡, 改造的毒素基因同识别蛋白基因融合成的重组毒素有应用前景。

关键词 绿脓杆菌外毒素 A, 免疫毒素, 重组毒素

绿脓杆菌外毒素 A (*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, PE)、白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 和蓖麻毒素 (ricin) 等某些微生物和植物毒素在导向治疗上的应用潜力正刺激着对这些毒素的分子结构和功能的研究。PE 是由机会病原菌绿脓杆菌以无活性的酶原形式分泌到胞外的毒素, 酶原必须经历结构修饰才能呈现 ADP-核糖基转移酶及相伴的 NAD 糖苷水解酶活性。PE 同白喉毒素、蓖麻毒素一样, 是有效的细胞杀伤剂, 只要一个毒素分子进入细胞浆就足以杀死细胞, 它对若干种动物有致死作用。PE 的毒性本质是它催化真核细胞的延伸因子-2 (elongation factor-2, EF-2) 的

ADP-核糖基化、阻止肽链延长、中断细胞蛋白质合成而行使细胞毒作用。近年一个很重要的进展是搞清了 PE 的三维结构, 即 Allured 及其同工者^[1]提出了 PE 酶原的分子模型; 同时, PE 结构基因业已克隆和序列分析, 这些成果进而促进了 PE 的细胞毒作用机理及其嵌合毒素应用的研究^[2]。

1 PE 的基本结构与细胞毒作用

Allured 等人^[1]对 PE 晶体的 X 线衍射分析表明 PE 是 613 肽的单链毒素蛋白, 分子量