

技术与方法

检测脂质过氧化的化学发光-高效液相色谱法*

蔺福宝 潘华珍

(中国协和医科大学基础医学部, 北京)

提 要

化学发光-高效液相色谱法具有分离鉴定不同种类脂质过氧化物的特点。本研究应用化学发光-高效液相色谱法研究异丙苯过氧化氢引发的红细胞膜及血浆脂质的自由基反应和抗氧化剂对膜脂质的保护作用。本方法可用于不同脂质对自由基反应的敏感性, 脂质过氧化反应机理及抗氧化剂作用机理研究。

关键词 脂质过氧化, 化学发光, 高效液相色谱

许多疾病的发生与发展与自由基引发的脂质过氧化反应有关^[1]。自由基链反应引起的脂质过氧化反应的初级产物为脂质过氧化物 (Lipid hydroperoxide, L-O-O-H)^[2]。因此, 检测鉴定生物样品中脂质过氧化物是很有意义的。目前测定脂质过氧化的通用方法主要是硫代巴比妥酸法 (TBA 法), 但此法只能测脂质过氧化物分解产物的总量, 不能确定过氧化脂质的种类。本文应用化学发光-高效液相色谱法 (CL-HPLC) 分析异丙苯过氧化氢 (Cumene hydroperoxide, CuOOH) 对红细胞膜及血浆中不同脂质的过氧化作用^[3,4], 以研究某些生物样品中各种脂质成分对自由基引发的过氧化反应的敏感性以及抗氧化药物的作用机理。

材 料 与 方 法

一、材料 鲁米诺, 微过氧化物酶 (microperoxidase, MP-II), 亚油酸, 异丙苯过氧化氢, AMVN (2, 2'-Azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile) 购自 Sigma 公司, 胆固醇购自北京化工厂, 经无水乙醇重结晶纯化。甲醇 (优级纯), 四硼酸钠, 三乙胺, 氯仿, 异丙醇 (均为分析纯) 均购自北京化工厂, 人全血取自协和医院血

库, 离心得血浆, 血球用 PBS 洗三次, 按 Dodge 法^[5]制备红细胞膜。

二、仪器 HPLC 图谱采用 Beckman 110 AA 型仪检测; HPLC 分析柱 (LC18DB, 25 cm 4.6 mm i.d) 和保护柱 (LC18DB, 5 μ m, 2cm) 均购自 Superco; 用关闭激发光源的荧光检测器进行化学发光的检测。

三、分离条件 流动相为含有 0.01% 三乙胺的甲醇溶液, 流速为 1ml/min; 柱后反应的发光液为 pH10.2, 50mmol/L 的硼酸缓冲液内含 1 μ g/ml 鲁米诺和 10 μ g/ml 的微过氧化物酶, 流速为 1.6ml/min。

四、标准脂质过氧化物的制备

1. 胆固醇过氧化物 (ChOOH) 的制备 采用 AMVN 法^[3]。用四氯化碳配制 10mmol/L 胆固醇液, 加 AMVN (终浓度为 10mmol/L), 50 $^{\circ}$ C 保温 4 小时, 用 TLC 法纯化, 展开相为甲醇: 叔丁醇 (70:30, V/V)。

2. 亚油酸过氧化物 (18:200H) 的制备 用四氯化碳配制 5mmol/L 亚油酸, 加异丙苯过氧化氢 (终浓度为 10mmol/L) 在 37 $^{\circ}$ C 保温

* 本课题由自然科学基金资助

20 小时,然后用 N_2 吹干。

3. 人血浆和红细胞膜样品的制备 0.2ml 血浆或 0.2ml 红细胞膜(2.7 mg 蛋白 /ml 红细胞膜)加异丙苯过氧化氢(终浓度为 10mmol/L)在 37℃ 保温 20 小时,然后按 Rose 法^[6]提取脂质,取 3ml 有机相,用 N_2 吹干,用 0.2ml 甲醇溶解后进行 CL-HPLC 分析。

结 果

一、CuOOH, 18:200H 和 ChOOH 的 CL-HPLC 分析结果 混和的 18:200H, CuOOH 和 ChOOH 在 CL-HPLC 图谱中为三个完全分开的峰,保留时间分别为: 18:200H: 2.2min, CuOOH: 3.6min, ChOOH: 6.9min。

二、CuOOH 氧化的红细胞膜脂质 CL-HPLC 图谱 结果见图 1。在 CuOOH 的作用下,膜脂质中有多种脂质过氧化物出现,以 18:200H 和 ChOOH 含量最高。

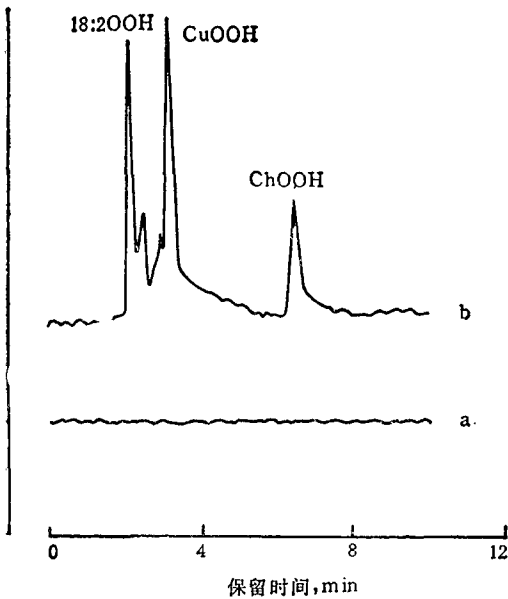


图 1 CuOOH 氧化的红细胞膜脂质的 CL-HPLC 图谱
a: 红细胞膜; b: 红细胞膜+CuOOH

三、CuOOH 氧化的血浆脂质的 CL-HPLC 图谱 结果和 CuOOH 氧化膜脂质的相似,脂质过氧化物也主要是 18:200H 和

CuOOH (见图 2)。

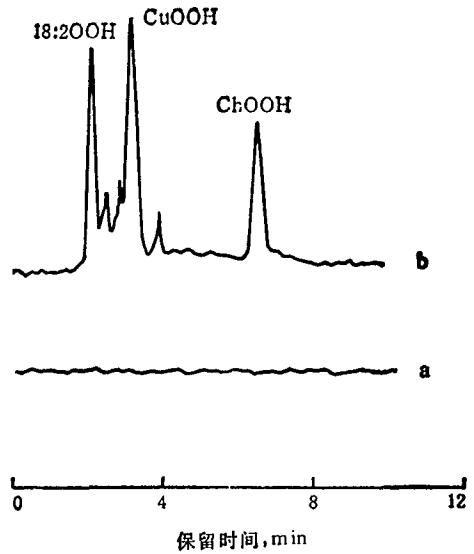


图 2 CuOOH 氧化的血浆脂质 CL-HPLC 图谱
a: 血浆; b: 血浆+CuOOH

四、麦芽醇对膜脂质的保护作用 结果见图 3,麦芽醇能有效地保护膜脂质免遭自由基损伤,但不能和 CuOOH 直接作用。

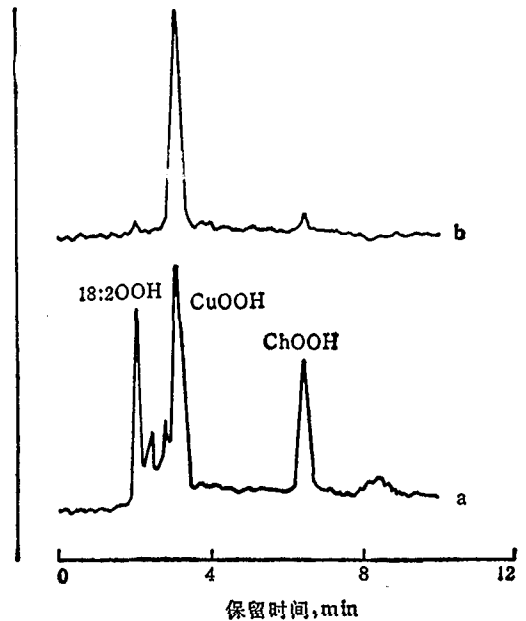
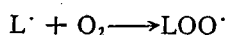


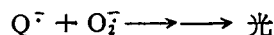
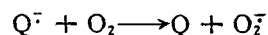
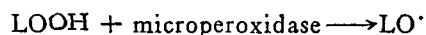
图 3 麦芽醇对膜脂质的保护作用
a: 红细胞膜+ CuOOH; b: 红细胞膜+麦芽醇+CuOOH

讨 论

CuOOH 为一含过氧键的化合物,其结构中的过氧键可发生均裂而形成羟自由基和异丙苯自由基,这两种自由基可引起不饱和脂肪酸及胆固醇的自由基链反应,从而形成各种脂质及胆固醇的过氧化物:



样品中的脂质过氧化物经 HPLC 柱而被分离,脂质过氧化物在柱后反应中与发光液中的微过氧化物酶及鲁米诺作用产生化学发光而被检测。脂质过氧化物发光反应的机理^[3]简示如下



CL-HPLC 结合了化学发光的高灵敏性和高效液相色谱的高分辨性,因而具有很高的灵敏度和分离鉴定各种脂质过氧化物的特点。因为目前应用于测定脂质氧化的方法中,一般测定的只是不饱和脂肪酸氧化总的结果,不能鉴定每一个脂肪酸氧化的量,也不能检测胆固醇过氧化物的存在。应用 CL-HPLC 法,就可以研究不同的脂质对自由基反应的敏感性。图 1,图 2 的结果说明红细胞膜及血浆中的亚油酸及胆固醇对自由基反应极为敏感。胆固醇是

生物膜的重要组成成分,它对于维持膜的稳定性起重要作用,研究胆固醇在生物膜内的自由基反应和胆固醇过氧化物对膜结构及功能的影响将有助于阐明某些疾病如动脉粥样硬化的发病机理^[7]。

CL-HPLC 法可以分离鉴定不同种类的脂质过氧化物,因此,就可应用此法检测抗氧化剂保护膜脂质免受氧化损伤的能力并对其抗氧化机理进行研究。根据过去的实验,麦芽醇为有效的抗氧化剂^[8],但不知其保护膜脂质的哪一个成分,图 3 表明它不能和 CuOOH 直接作用,但它能阻断 CuOOH 引发的自由基链反应,从而保护膜脂质免遭氧化损伤。

CL-HPLC 法有很高的灵敏度及分离鉴定各种脂质过氧化物的能力,可用于不同脂质对自由基反应的敏感性,脂质氧化反应和抗氧化剂作用机理研究。随着实验条件的改进,CL-HPLC 法可望用于生物样品中脂质过氧化物的直接测定。

参 考 文 献

- 1 陈爱等. 中华医学杂志, 1985; 65(11):730
- 2 Yamamoto Y *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1985; 819: 29
- 3 Yamamoto Y *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 160: 7
- 4 Teruo Miyazawa *et al.* *J Biochem*, 1988; 103: 744
- 5 Dodge J T *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1963; 100: 119
- 6 Rose H G. *J Lipid Res*, 1965; 6: 428
- 7 夏光焱. 生理科学进展, 1988; 19(1): 23
- 8 黄芬等. 科学通报, (待发表)

[本文于 1988 年 12 月 8 日收到]

(上接第140页)

增殖的效应。综合上述结果,可以认为,硒的抗癌作用与调节蛋白激酶系统有关,它在其中直接或间接地发挥了重要作用,其进一步的作用机制以及信号传导系统和 PKC 在肿瘤癌变中

的作用,正在研究中。

本工作曾得到于秉治副教授的帮助,特此志谢。

[本文于 1989 年 10 月 6 日收到]