

自由基 O_2^- 水平与人的血癌

—— O_2^- 相对含量的间接测定

翁其亮 万田郎

(西安医学院化学教研室)

苏祖佑 曹容珍

(西安医学院第一附属医院)

Emanuel^[1] 和 Lohmann^[2,3] 等人曾对白血病鼠等的氧自由基用直接法 ESR 所进行的研究做过报道。本文系用间接法——分光光度法测定小儿和成人血癌患者血中红细胞的超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, 简称 SOD) 的活性, 以观察 O_2^- 的相对含量, 说明血癌与 O_2^- 含量高低的关系。

一、原理、方法与材料

原理

实验按如下反应系统^[4,5]进行的:

有关, 它也是膜上受体的成份之一。因此, 它好象一把钥匙决定着细胞膜的特征。细胞膜上唾液酸的含量减少将导致细胞一系列的生物学变化, 如细胞凝集性的增加和溶血, 抗原、抗体性质的改变, 细胞老化的加速等, 由此看来, 老年人细胞膜唾液酸含量减少或许是机体免疫功能降低及癌症高发率的原因之一。

人们总是希望青春常在, 渴望能找到判断衰老的指标, 以便及时防衰。我们检测的 30 名老年前期及 39 名长寿老人, 从外表看来, 精神状态很好, 身体健康, 各器官的生理功能基本正常。但从分子水平看, 红细胞膜上 ATP 酶活力已经降低, 膜上唾液酸的含量明显减少, 提示膜的结构出现异常。可见随着年龄的增长, 虽然在器官水平上还没有表现出生理变化, 但在分子水平上已较早有所反映, 可能分子水平的变化是器官水平变化的前兆。由此设想, 红细胞

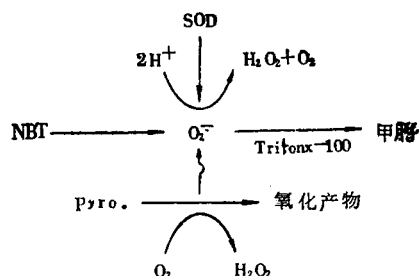


图1 用间接法测定 O_2^- 相对含量原理图

以焦性没食子酸 (Pyro.) 作为产生超氧化物自由基 (O_2^-) 的试剂, 氮蓝四唑 (NBT) 为竞争膜 ATP 酶活力及膜上唾液酸含量的变化有可能做为人的生理老化指标。

参 考 文 献

- [1] Keys, A. et al.: *Metabolism*, 22, 579, 1973.
- [2] Gambert, S. R. et al.: *Journal of Gerontology*, 38 (1) 23, 1983.
- [3] 蔡贵民等: 《中华老年医学杂志》, 4(1), 6, 1985.
- [4] 董伟等: 《生物化学与生物物理进展》, 3, 31, 1983.
- [5] Schmalzing, G. et al.: *J. Membrane Biol.*, 69, 65, 1982.
- [6] MMuszbeck, L. et al.: *Anal. Biochem.*, 77, 286, 1977.
- [7] Markwell, M. A. K. et al.: *Anal. Biochem.*, 87, 206, 1978.
- [8] 董伟等: 《生物化学与生物物理进展》, 2, 66, 1985.
- [9] 今村喜久子等: 《生体の科学》, 33(2), 109, 1982.
- [10] Burich, R. L. et al.: *Journal of Gerontology*, 30, 537, 1975.

[本文于 1985 年 9 月收到]

O_2^- 的显色剂, 用 SOD 作参比酶。当 pH 为 8.25, 温度为 25°C 波长在 530nm 时, 测定光密度随时间的变化。

材料

1. 试剂 甲胍酸钠 (Merk 产品), NBT (生化试剂), Tritonx-100 (Carl Roth KG Chemische Farabrik Karlsruhe 产品), 焦性没食子酸 (A. R.), SOD (牛) (Sigma Chemical Co. 产品)。

2. 采血对象 小儿病组 9 例, 急性淋巴细胞性白血病 7 例, 急性红白血病 1 例, 急性淋巴细胞性白血病 1 例。成人病组 13 例, 均为淋巴性白血病, 其中急性 7 例, 慢性急发作者 6 例。正常组采血对象的年龄、性别等均与病组相仿。

3. 样品的制备 取血样 2.00ml, 离心后, 收集红血球, 用等体积冷生理盐水洗涤。取一定量红血球加入等体积重蒸馏水, 使其溶血。测定溶血物血红素浓度。加水适量将血红素浓度调至 10%。取该液 (10%) 0.50ml, 加重蒸馏水 2.00ml, 摇匀, 再加无水乙醇 2.00ml, 振摇, 最后加入氯仿 0.60ml, 搅拌使血红蛋白充分凝集。用 15,000g 冷冻离心, 取其上清液作为提取液, 待测定用。

4. SOD 标准液 系以氯仿-水-乙醇体系为溶剂, 浓度为 5.0% (mg/ml)。

方法

加提取液 0.30ml 于比色杯中, 再依次加入: 提取溶剂 0.70ml, Tritonx-100 (16% V/V) 0.20ml, 1.00ml 内含 1mM Diethylenetriamine-Pentaacetic acid 的 Tris-Cacodylic acid (50mM) 的缓冲液和 NBT (0.98mM) 0.50ml, 使其 pH 为 8.25。摇匀, 恒温, 加入 0.1mM 的焦性没食子酸 0.20ml (为 0.1M 盐酸溶液)。摇匀, 随即测定其光密度随时间的变化曲线 (图 2)。

按图 2^[5], 每次测定提取物时, 同时测定空白、SOD 标准液的光密度, 得到提取液 (正常组和病组的)、空白和 SOD 标准液的光密度对时间的曲线图。以 α 、 β 、 γ 值分别表示在反应进行了 3 分钟时 SOD 标准组、病组、正常组和空白组光密度的差值, 并以 β/α 、 γ/α 值分别作

为病组与正常组 SOD 活性的量度。比值大表示 SOD 活性高, “阻断”底物 O_2^- 能力强, 即 O_2^- 相对含量偏低, 反之, 则表示偏高。

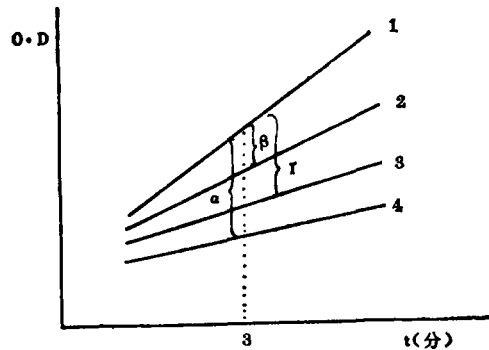


图 2 间接法测定 O_2^- 相对含量

1. 空白, 2. 病组, 3. 正常组, 4. SOD 标准组

二、结果与讨论

下表为病组 β/α 和正常组 γ/α 的测定。

表 1 小儿病组 β/α 和正常组 γ/α 值

病 组		正 常 组	
例号	β/α	例号	γ/α
1	0.55	1	1.18
2	0.36	2	0.82
3	0.98	3	0.67
4	0.64	4	0.77
5	0.56	5	1.19
6	0.90	6	0.86
7	0.53	7	0.93
8	0.74	8	1.02
9	0.78	9	0.69
		10	1.21
		11	0.76
		12	0.75
均值 \pm SD:		均值 \pm SD:	
0.67 \pm 0.20		0.90 \pm 0.20	
0.05 > P > 0.01			

从结果可知:

1. 小儿血癌患者与正常儿的 O_2^- 相对含量呈显著性差异, 成人组病人和正常人的 O_2^- 相对含量也具有非常显著差异。这说明患者 SOD 活性低下, O_2^- 的相对含量均偏高, 使该自由基

表2 成人病组 β/α 和正常组 γ/α 值

病 组		正 常 组	
例号	β/α	例号	γ/α
1	0.44	1	0.77
2	0.53	2	0.90
3	0.46	3	0.82
4	0.62	4	1.26
5	0.44	5	0.53
6	0.41	6	0.56
7	0.84	7	0.67
8	0.62	8	0.60
9	0.41	9	0.61
10	0.48	10	0.93
11	0.53	11	1.17
12	0.33	12	0.84
13	0.53	13	0.56
均值 \pm SD: 0.51 \pm 0.13		均值 \pm SD: 0.79 \pm 0.26	
$P < 0.01$			

(O_2^-) 不能达到正常的生理水平,从而引起一系列的生物化学变化而导致血癌^[2-3]。这与八十年代初 Lohmann 等人用直接法 ESR 测定的结果可互为佐证^[2,3]。

2. 本间接法测定的是血样,适用于临床研究,且不必用价值昂贵的 ESR,合乎国情,较为实用。

3. 因被测物为血样,可避免因采用冰冻干

(上接第 41 页) 种方法涂膜的肉放在盐水中,于 -20°C 下冷冻,在 1~2 小时内即可达到 $-9\sim-20^\circ\text{C}$ 。经褐藻胶处理的肉类,水分损失可减少 40~48%^[7]。

褐藻胶用于水产品冷藏,可以防止鱼类在长期贮存中氧化,并且在取食时很容易分离或切开。经这种处理的鱼类于 -20°C 到 -25°C 下冷藏 5 个月,仍能保持其原来的外观、风味和新鲜度^[8]。

褐藻胶和苹果酸钠、少量表面活性剂配成的防护剂用于水果和蔬菜,可延长贮存期^[9]。

除了以上用途,褐藻胶在食品中还可以用于油乳化剂、粘结剂和增稠剂,以及凉菜调味品等。

燥样品法^[1]和直接冷冻样品法^[9]而带来的测定误差。

4. 作者曾同时测定一批症状已缓解者,他们的 O_2^- 相对含量比正常人的还低,从动力学角度看,此结果与 Emanuel 和 Kuzin 等人所做的工作是符合的^[1,10]。这可能是因为癌细胞能释放一种因子使巨噬细胞释放 O_2^- 和 H_2O_2 受到抑制^[11]。

参 考 文 献

- [1] Emanuel, N. M.: *Quarterly Reviews of Biophysics*, 9, 283, 1976.
- [2] Lohmann, W. et al.: *Blut.*, 39, 317—327, 1979.
- [3] Lohmann, W. et al.: *Free Radical Lipid Peroxidation and Cancer* (ed, D. C. H. Mcbrin and T. F. Slater.), 1982.
- [4] 翁其亮等:《医学化学教研交流》, 4, 15, 1985.
- [5] 冈昌 进·他:《临床免疫》, 14(9), 775, 1982.
- [6] Isao, Ishiguro, et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 22, 2935, 1974.
- [7] M. Minami and H. Yoshikawa: *Clin Chim. Acta*, 92, 337, 1979.
- [8] S. Marklund and G. Marklund: *Eur. J. Biochem.*, 49, 469, 1974.
- [9] Swartz, H. M. et al.: *Science*, 118, 936, 1977.
- [10] Kuzin, M. I. et al.: *Symposium: Free Radical States and their Role in Radiation Damage and Malignant Growth*, Moscow, 52, 1971.
- [11] Anna, Szhro-Sudol et al.: *J. Exp. Med.*, 156, 945, 1982.

[本文于 1985 年 6 月 25 日收到]

长期经过急性与亚急性药理与毒性试验,人们已证明褐藻胶在卫生上是安全的。长期食用未见有何生理上影响,所以是安全的食品添加剂。

参 考 文 献

- [1] 三島海云:日本特许 56, 6, 084, 1956.
- [2] 大木豊三:日本农芸化学会誌, 33, 885-889, 1959.
- [3] Wood, F. W., and R., Young: *Brit. Pat.*, No. 1, 139, 199, 1974.
- [4] Schuppner, H. R.: *U. S. Pat.*, No. 3, 770, 462, 1973.
- [5] 小谷秋治:日本公开 80, 50, 868, 1980
- [6] 伊东佐文:日本公开 80, 39, 710, 1980
- [7] Farle, R. D.: *Brit. Pat.*, No. 1, 539, 783, 1979.
- [8] Karl, B.: *Fr Pat.*, No. 1, 395, 312, 1965.
- [9] 佐藤治郎,加藤民次郎:日本公开 77, 60, 653, 1977.

[本文于 1985 年 11 月 22 日收到]