

比色法测定抗坏血酸体系产生的·OH 自由基

王 成 莲 刘 莉

(上海医科大学放射医学研究所)

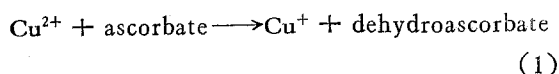
提 要

本文介绍一种用细胞色素 c 的氧化来比色测定抗坏血酸体系产生的·OH 自由基的方法。实验证明,它不受 SOD 的抑制,仅受硫脲的抑制。所以,该体系可作为筛选抗·OH 自由基的清除剂和有效药物的体系。

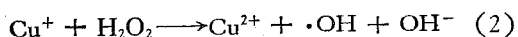
在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种自由基^[1]。研究表明,这些自由基与机体的许多功能障碍和疾病的发生,如吞噬、解毒、炎症、衰老、肿瘤、辐射损伤^[2]等有着密切关系。超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基(·OH)和脂自由基(ROO^*)是三种具有代表性的自由基, O_2^- 形成最早,·OH 的作用最强。因此,·OH 自由基的检测对于其生物学作用的研究及与其相关疾病的防治甚为重要。

在生理浓度,铜离子(Cu^{2+})存在下,用抗坏血酸作还原剂,能与中间生成的 H_2O_2 反应,使 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ,生成·OH 自由基^[3],反应机理如下:

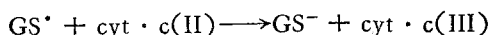
首先,



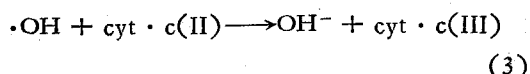
接着, Cu^+ 与抗坏血酸中间产生的 H_2O_2 ^[4] 反应



根据巯基自由基能使还原型的细胞色素 c [cyt · c(II)] 氧化的原理^[5],



推测·OH 自由基同样能使 cyt · c(II) 转化为氧化型 (III)



还原型细胞色素 c(II) 呈浅红色,而氧化型

(III) 呈浅黄色。因此,可采用比色分析^[6],通过测定还原型细胞色素 c(II) 含量的变化了解·OH 的生成。

自由基的检测方法很多,如电子顺磁共振法,气-液色谱法,发光法等。这些方法大多需昂贵的仪器,操作也较复杂,一般实验室难以应用。目前国外文献报道的测定抗坏血酸体系产生的·OH 自由基是采用气-液色谱法测定它的水杨酸羟化产物或乙烯气,制样较麻烦。本文采用比色法测定在痕量铜离子(Cu^{2+})存在下,由抗坏血酸体系产生的·OH 自由基,该反应体系模拟生物体内的反应,方法简便实用,易为一般实验室采用。

材 料 和 方 法

试剂 1. 抗坏血酸,分析纯(国产)。2. 硫酸铜,分析纯(国产)。3. 水杨酸,分析纯(国产)。4. 细胞色素 c(Sigma 公司进口)。5. SOD(上海东风生化试剂厂产品)。6. 磷酸二氢钾,分析纯。

方法 将上述试剂按下述不同要求浓度混合: 抗坏血酸, $100 \mu\text{mol/L}$; $CuSO_4$, $100 \mu\text{mol/L}$; 水杨酸, 2mmol/L ; 细胞色素 c(II), $100 \mu\text{mol/L}$; SOD 0.081mg/ml ; 磷酸二氢钾缓冲液, 0.15mol/L ; pH7.4。最终体积为 2ml , 25°C 温育, 90 分钟后,宏观可见反应体系从浅红色逐渐转变为浅黄色,用 730 紫外分光光度计测

定 550nm 下透光率 T 或吸收率 A ，通过测定 $\cdot\text{OH}$ 自由基形成前后的 T 或 A 值，从透光率或吸光率的变化 (ΔT 或 ΔA)，了解 $\cdot\text{OH}$ 自由基的生成。从方程 (3) 可知，被 $\cdot\text{OH}$ 作用掉的还原型细胞色素 $c(\text{II})$ 的量即为 $\cdot\text{OH}$ 的量。

讨 论

不同的温育时间和温度生成的 $\cdot\text{OH}$ 自由基的量不同，我们经过一系列温育时间预试验，认为温育 90 分钟后测定的 T 或 A 值较稳定。因此，本实验均采用 90 分钟温育时间，温度通常采用 25℃ 恒温。

1. 对照组 T (或 A) 值的测定

本文在比色分析中使用的是还原型细胞色素 $c(\text{II})$ 的氧化法，故必须测得细胞色素 $c(\text{II})$ 的本底含量作对照组。

表 1 不同条件对照组还原型细胞色素 $c(\text{II})$ 含量的本底值

	对照组制样条件	$T_{550\text{nm}}$	$A_{550\text{nm}}$
1	细胞色素 $c(\text{III})$ + 抗坏血酸 + KH_2PO_4 缓冲液	55.0	0.2596
2	细胞色素 $c(\text{III})$ + 水杨酸 + KH_2PO_4 缓冲液	81.1	0.0910
3	细胞色素 $c(\text{III})$ + KH_2PO_4 缓冲液	81.0	0.0915

从表 1 中可见，水杨酸并不能使氧化型细胞色素 $c(\text{III})$ 还原，而从市场购得的细胞色素 c 通常为氧化型，故在制样过程中须先将足够浓度的抗坏血酸加入到细胞色素 $c(\text{III})$ 中，使之迅速转化为还原型 (II)，将此时测得的 $T_{550\text{nm}}$ (或 $A_{550\text{nm}}$) 为对照组的本底值。本文各表中对照组采用的本底值均为按表 1 中组 1 条件制样测得。 $\cdot\text{OH}$ 生成组为 $\cdot\text{OH}$ 的完全生成条件，由于生成的 $\cdot\text{OH}$ 自由基使还原型细胞色素 $c(\text{II})$ 不断氧化，故细胞色素 $c(\text{II})$ 浓度逐步减少，此时测得的 T (或 A) 值为经 $\cdot\text{OH}$ 氧化后剩下的未经氧化的细胞色素 $c(\text{II})$ 含量，那么，它与对照组本底值之差 Δc 即为被 $\cdot\text{OH}$ 氧化转换的细胞色素 $c(\text{II})$ 浓度，从而可观察 $\cdot\text{OH}$ 的生成量。

2. 痕量铜离子 Cu^{2+} 的存在和抗坏血酸是形成 $\cdot\text{OH}$ 自由基的必不可少条件

表 2 中 ΔT 、 Δc 分别为 $\cdot\text{OH}$ 生成组与对照组的透光率和浓度差， $\Delta c/c$ 为被 $\cdot\text{OH}$ 作用掉的细胞色素 $c(\text{II})$ 与对照组细胞色素 $c(\text{II})$ 本底含量的比值。

表 2 在 Cu^{2+} 存在下，抗坏血酸体系形成的 $\cdot\text{OH}$ 自由基

	$T_{550\text{nm}}$	$A_{550\text{nm}}$	ΔT	Δc (nmol)	$\Delta c/c$
对照组	54.93 ± 0.50 ($n = 12$)	0.2603 ± 0.0042			
$\cdot\text{OH}$ 生成组	69.85 ± 0.75 ($n = 24$)	0.1568 ± 0.0034	14.92	4.93	0.40
未加 CuSO_4	54.6 ± 1.1 ($n = 4$)	0.2622 ± 0.0088	≈ 0	≈ 0	
未加水杨酸	70.5 ± 0.8 ($n = 4$)	0.1518 ± 0.0050	15.57	5.17	0.42
加 SOD	68.1 ± 0.95 ($n = 6$)	0.1670 ± 0.0061	13.17	4.44	0.36
加硫脲	53.78 ± 0.89 ($n = 24$)	0.2693 ± 0.0071	≈ 0	≈ 0	

25 ± 1℃ 温育 90 分钟

根据朗伯-比耳定律，吸光率 A 与吸光物质浓度 C 的关系： $A = \epsilon \cdot L \cdot C$ ，其中 ϵ 为消光系数，不同的物质， ϵ 不同，对于细胞色素 c ， $\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{cm}^2/\text{mmol}^{[7]}$ ， L 为吸收池厚度，通常石英比色杯为 1cm。

从表 2 中，未加 CuSO_4 组与对照组的 T 值接近 ($\Delta T \approx 0$)，可见，如果没有痕量 Cu^{2+} 存在，该体系不能产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基。水杨酸在该体系中对 $\cdot\text{OH}$ 的生成仅起修饰作用，似乎影响不大，这与国外文献报道的利用测定水杨酸的羟化产物来测定 $\cdot\text{OH}$ 自由基有所不同^[1]。

如果没有抗坏血酸的参加，则反应中间所需的 H_2O_2 也就不存在， $\cdot\text{OH}$ 的形成必须有 Cu^{2+} 的存在，并依赖于抗坏血酸的条件。从表 3 中可见，改变抗坏血酸浓度无疑对 $\cdot\text{OH}$ 的生成引起差异。这是因为一方面随着抗坏血酸浓度的增加，中间生成的 H_2O_2 也增大，则促使 $\cdot\text{OH}$ 的生成也增加，另一方面，由于太过量的抗坏血酸存在，又使被 $\cdot\text{OH}$ 氧化的细胞色素 $c(\text{III})$ 被 H_2O_2 逐步还原为细胞色素 $c(\text{II})$ ^[8]，使 T 值下降， ΔT 变小，似乎 $\cdot\text{OH}$ 的生成量反而变小了。故必须选择适宜的抗坏血酸浓度，本文实验均采用 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度。而改变

CuSO_4 浓度对 $\cdot\text{OH}$ 的生成无多大影响,说明只要痕量 Cu^{2+} 存在就满足要求了。

表 3 不同抗坏血酸和硫酸铜浓度对生成 $\cdot\text{OH}$ 自由基的影响

	抗坏血酸 ($\mu\text{mol/L}$)	CuSO_4 ($\mu\text{mol/L}$)	$T_{550\text{nm}}$	$A_{550\text{nm}}$
1	100	200	70.3	0.1531
2	100	100	70.6 ± 1.5 ($n=10$)	0.1516 ± 0.0091
3	100	50	70.9	0.1494
4	200	100	68.3	0.1656
5	50	100	76.3	0.1175

3. 在铜离子 (Cu^{2+}) 存在下,依赖于抗坏血酸的 $\cdot\text{OH}$ 自由基形成不受 SOD 的抑制,而硫脲对 $\cdot\text{OH}$ 有很好的抑制作用

从表 2 中还可可见,经 90 分钟 25°C 温育后,生成的 $\cdot\text{OH}$ 自由基能使约 5nmol 的细胞色素 $c(\text{II})$ 氧化,而加 SOD 液的 T 值接近 $\cdot\text{OH}$ 生成组,说明该体系在形成 $\cdot\text{OH}$ 自由基过程中几乎未见有同时产生 O_2^- 的迹象,该体系与在铁盐存在下依赖于 O_2^- 的黄嘌呤加黄嘌呤氧化酶体系^[9]产生的 $\cdot\text{OH}$ 相比,前者不受 SOD 抑制,后者同时受到 SOD 抑制。加硫脲组的 T 值与对照组基本一致 ($\Delta T \approx 0$),可见,硫脲对本体系有很好的抑制作用。

从图 1 中可见,当硫脲浓度低于 2.5mmol/L 时,不能有效地抑制 $\cdot\text{OH}$ 的生成,只有当硫脲浓度大于 3.75mmol/L 时,才能对 $\cdot\text{OH}$ 自

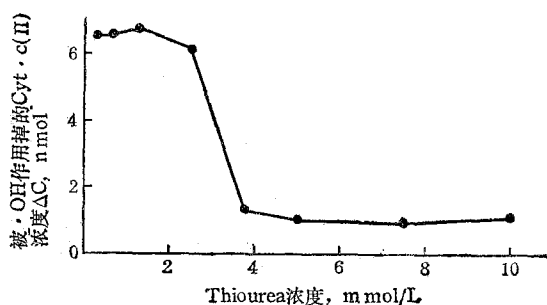


图 1

由基起到很好的抑制作用。

本工作得到本所金为翘教授、王洪复副教授和华东师大生物系胡天喜副教授的热忱指导, 特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Barry Halliwell et al.: *Free radicals in Biology and Medicine*, Charendon Press, Oxford, 1985, 37—45.
- [2] 吉林医科大学: 《放射医学》(上), 1975, 12, 154—159.
- [3] Rowley, D. A. et al.: *Archs Biochem. Biophys.*, 1983, 225, 279.
- [4] Kock, C. J., et al.: *J. Cell Physiol.*, 1978, 94, 299.
- [5] Luigig, Forni et al.: *Biochem. J.*, 1986, 240, 905.
- [6] Halliwell, B.: *Biochem. J.*, 1977, 167, 317.
- [7] Massey, V.: *Biochem Biophys. Acta*, 1959, 34, 255.
- [8] Vandewalle, P. L. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, 210, 195.
- [9] John M. C. Gutteridge et al.: *Biochem. J.*, 1982, 206, 605.

【本文于 1988 年 10 月 4 日收到】

(上接第 472 页)

量与 cmp 值成线性关系(图 2, 图 3)。一般所取样品中的总蛋白量约在 $100-300\mu\text{g}$ 之间, 均在线性范围内。

分别取 0.1ml 脑微管蛋白提取液 8 份, 测定微管蛋白含量, 结果表明多份相同样品的组内变异系数是 0.06。

本实验以 ^3H -秋水仙碱为探针, 结合微管蛋白, 用 DEAE-纤维素分离结合微管蛋白, 测其含量结果证明此法简单、易行、经济、可靠。

参 考 文 献

- [1] Chaudhury, S., et al.: *Developmental Brain Research*, 1983, 9, 291.
- [2] Chaudhury, S. & Saeker, P. K.: *Biochemica et Biophysica Acta*, 1983, 763, 93.
- [3] Fellous, A., et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1979, 101, 365.
- [4] Borisy, Gary G.: *Analytical Biochemistry*, 1972, 50, 373.
- [5] Hartree, E. F.: *Analytical Biochemistry*, 1972, 48, 422.

【本文于 1988 年 9 月 16 日收到】