

# 人血 PMN 呼吸爆发中活性氧测定的探讨——化学发光法

康建 初俊杰 赖舒华 常奎忠

(沈阳军区总医院,沈阳)

## 提 要

本文利用辣根过氧化物酶作为生理 pH 条件下 PMN-鲁米诺化学发光催化系统。借以提高测定活细胞发光灵敏度。选用不同自由基清除剂对爆发反应中活性氧的生成影响进行了初步探讨。超氧化物歧化酶对细胞发光抑制较过氧化氢酶显著, Con A 诱导的发光亦较其他刺激物为低,提示超氧化物阴离子系细胞爆发反应中含量水平较高,且对发光影响较大的活性氧。

**关键词** 呼吸爆发,活性氧,化学发光,多形核细胞

多形核白细胞 (PMN) 呼吸爆发是基于 NADPH 氧化酶催化并伴有活性氧生成的一种细胞代谢反应。NADPH 氧化酶催化分子氧还原成超氧化物阴离子 ( $O_2^-$ ), 后者经酶促或非酶促歧化迅速生成  $H_2O_2$  等氧自由基。测定爆发反应中生成的活性氧和自由基清除剂对细胞氧代谢的影响, 可为进一步探讨 PMN 功能以及与 PMN 功能障碍有关的疾病有一定参考意义。鉴于鲁米诺化学发光系统的最适条件为强碱性环境且用常规方法检测化学发光尚存有  $H_2O_2$  蓄积, 非  $H_2O_2$  产物形成等。本文参考 Wymann 等<sup>[1]</sup>方法选用适量辣根过氧化物酶 (HRPO) 提高系统灵敏度, 防止  $H_2O_2$  蓄积。用不同自由基清除剂和淬灭剂对 PMN 发光影响进行了实验评价。现将实验结果报告如下。

## 材 料 与 方 法

**一、仪器** SHG-1 型生物化学发光测量仪配装 APPLE-II 微机系统 (上海计量局实验工厂产品)。甄别电压 0.2V, 温度 37°C, 同步加样计数装置, 手动或吞噬发光专用程序。

**二、试剂及配制** 鲁米诺 (氨基苯二甲酰肼), 上海试剂一厂产品; HRPO (250 U/mg),

中科院上海生化研究所产品; 酵母聚糖、聚赖氨酸, 过氧化氢酶 (CAT), 伴刀豆素 A (ConA) 为 Sigma 产品; 超氧化物歧化酶 (SOD), 甘肃夏河生物制剂厂产品; 叠氮钠, Serva 产品; 右旋糖酐 (T = 500), Pharmarcia 产品; 其他为国产分析纯。

1. 实验缓冲液: 含 130mmol/L NaCl, 4.6mmol/L  $KH_2PO_4$ , 1.1mmol/L KCl, 20mmol/L HEPES, 5.0mmol/L 葡萄糖, 1.0mmol/L  $CaCl_2$  (用去离子水配制, 以氢氧化钠调 pH 至 7.4)。

2. Hank 平衡液 (HBSS): 参见文献 [2] 配制。

3. PMN 分离液: 称取右旋糖酐 6.0g, 明胶 0.5g, 溶于 100ml HBSS。

4. 调理酵母聚糖及细菌的制备: 取 10mg 酵母聚糖或适量 ATCC 25922 菌株于正常人 "O" 型血浆 1ml 中 37°C 培育 30min, 随后用 HBSS 离心洗弃血浆, 浸悬于实验缓冲液, 于 751-GW 分光光度计波长 500nm 处, 调酵母聚糖和 ATCC 菌株吸光度为 0.50。

5. 单线态氧生成体系: 取次氯酸钠 0.5ml 于 pH 9.4 Tris-甘氨酸缓冲液 4.0ml, 加 10

10 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 ml 启动反应。

**三、PMN 分离** 新鲜抽取肝素抗凝血 3 ml, 加分离液 1.3 ml, 颠倒混合, 置 37°C 4, min, 吸富含 PMN 的血浆层移至另一试管 5 用 HBSS 洗涤, 离心 200 × g 5 min, 再以 0.83% NH<sub>4</sub>Cl 溶解残余红细胞, 按上述方法洗涤两次。以 0.2% 台盼蓝染色验证活细胞数 ≥ 95%, 悬于实验缓冲液, 调细胞数 1 × 10<sup>6</sup>/ml。

**四、分析方法** 反应体系总体积为 0.6ml。取 PMN 悬液 0.4ml 置测量管内加入终浓度为 10 μmol/L 鲁米诺, 90 μmol/L 叠氮钠, 12 μg/ml HRPO, 空白对照以 0.4 ml 实验缓冲液替代 PMN 悬液, 37°C 预培育 10 min, 加调理酵母聚糖或其他刺激物 0.1 ml 启动反应, 每间隔 3min 记录发光脉冲至 60min 终止。

## 结果与讨论

### 一、HRPO 对无细胞体系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的发光影响

反应体系总体积为 0.6ml。用实验缓冲液将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 配成 0.5 nmol/L, 置发光仪内恒温 10 min, 采用同步计数装置同时加入终浓度为 10 μmol/L 鲁米诺, 90 μmol/L 叠氮钠和不同浓度 HRPO, 测其 2 秒钟发光脉冲, 随着 HRPO 浓度增加, 发光强度最初呈线性增高, 但当达 6

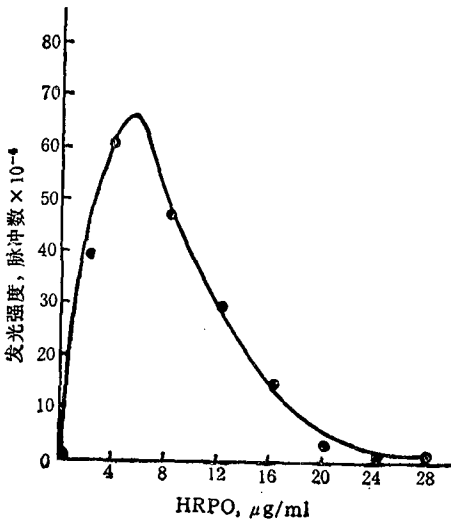


图1 HRPO 对本体系发光强度的影响  
每一测定计数时间为 2s

U/ml 以上, 发光强度陡然下降, 如图 1 所示。

虽然 HRPO 对鲁米诺发光系统的促发或抑制作用已有许多报道<sup>[3-5]</sup>, 但其详细机理尚不清楚。有关 HRPO 的促发因素可能与含有血红素结构所致。本实验观察到 HRPO 在同一系统中两种相反作用, 且作用类型取决于其浓度。高浓度的抑制作用是否与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除过度为同一机理, 有待进一步证实。

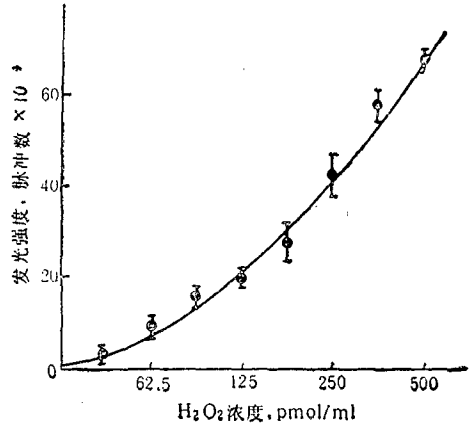


图2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度-发光强度曲线  
计数时间 2s。每一浓度平行测定三次, 取均值作图

鉴于 HRPO 用量对分析灵敏度的影响。本实验选用 12 μg/ml HRPO 即能有效清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄积, 又可达较佳灵敏度, 依此测得 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度曲线如图 2。

在图示浓度范围内, 发光强度基本呈线性。二者具有良好的相关关系。r = 0.9826, 回归方程  $\hat{Y} = 1487x - 11184$ 。

**二、自由基清除剂对 PMN 发光系统的影响** 表 1 例举了不同浓度 SOD、CAT 对 PMN 鲁米诺依赖系统的发光影响。依此分析

表1 SOD 和 CAT 对 PMN 化学发光的影响

清除剂	浓度	发光强度 ±SD	
		不加清除剂	+清除剂
SOD	100U/ml	4528 ± 797	3639 ± 899
SOD	200U/ml	4830 ± 690	2681 ± 783
CAT	100μg/ml	4682 ± 702	5077 ± 901
CAT	200μg/ml	4634 ± 881	3472 ± 720
CAT	600μg/ml	4491 ± 689	2306 ± 842

来自爆发反应中两种主要自由基即  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  所占相对比重。SOD 对 PMN 发光抑制较 CAT 显著,二者呈线性相关。说明  $O_2^-$  在 PMN 爆发反应中占相对优势,同时亦表明  $O_2^-$  在过氧化酶发光体系中的重要作用。

在刺激物加入前,各浓度 CAT 均抑制 PMN 发光产额。提示 CAT 对静止状态 PMN 发光的抑制作用可能是清除胞外液  $H_2O_2$ 。加入酵母聚糖后,低浓度和高浓度 CAT 对 PMN 发光的贡献互为相反。高浓度 CAT 对  $H_2O_2$  清除作用随其浓度增大而显现。低浓度 CAT 促增 PMN 发光似与呼吸爆发有关。

虽然 SOD 可抑制 PMN 发光,但体外实验已证实其产物  $H_2O_2$  亦可与鲁米诺发光。因此,该机理是否仅涉及  $O_2^-$  的减少尚有待进一步证实。

**三、HRPO 对 PMN 爆发反应中活性氧测定的影响** 在无 HRPO 及叠氮钠条件下,PMN 经调理酵母聚糖刺激后的与加入 HRPO 和叠氮钠对照,其发光强度有明显不同。图 3 显示同一样品经  $12 \mu\text{g/ml}$  HRPO 促发后的光强度较无 HRPO 对照约增高 3 倍,半峰宽明显缩窄,峰前及峰后斜率较无 HRPO 对照显著增大,表明 HRPO 对系统灵敏度和清除  $H_2O_2$  蓄积有较大改善。

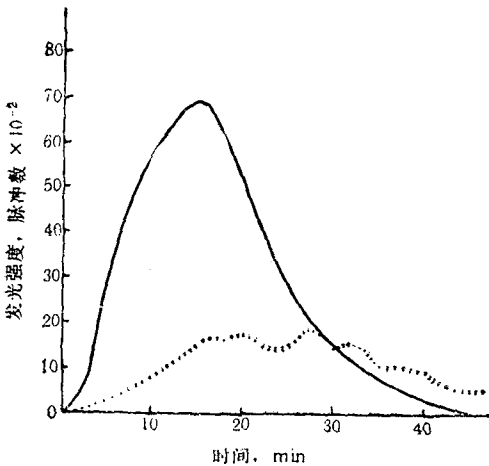


图 3 HRPO 对 PMN 发光体系的影响  
实线示 +HRPO,  $\text{NaN}_3$ ; 虚线示 -HRPO,  $\text{NaN}_3$ 。  
每一测定计数时间为 0.1 min

不同浓度 HRPO 对 PMN 发光系统各参数影响见表 2。

表 2 不同浓度 HRPO 对 PMN 发光影响

HRPO ( $\mu\text{g/ml}$ )	峰 值	积 分 值	峰前斜率
4	32868	248861	1900
8	35755	248722	1691
12	25286	185448	1366

由表 2 可见,发光强度和峰前斜率随 HRPO 增高而减低,揭示 HRPO 的抑制随之增强。 $H_2O_2$  清除率与无细胞体系比较亦不相同,可能与细胞发光成分复杂有关。

**四、刺激物对 PMN 发光影响** 在酵母聚糖用量为  $50-100 \mu\text{l}$  时,PMN 发光反应最初呈线性增加,当用量达  $100 \mu\text{l}$  以上反应程度趋于饱和,说明在本体系条件下,所用刺激物浓度未产生明显的活性氧蓄积,参见图 4。

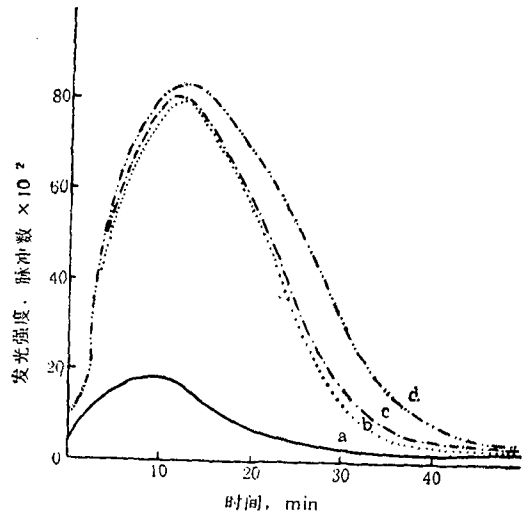


图 4 不同浓度酵母聚糖对 PMN 发光影响  
a—d 依次表示酵母聚糖加入量分别为  
 $50 \mu\text{l}$ ,  $100 \mu\text{l}$ ,  $150 \mu\text{l}$ ,  $200 \mu\text{l}$ 。计数时间为 0.1 min

不同种类刺激物对 PMN 发光亦示明显差异,本文以四种刺激物对 PMN 发光实施比较。结果见表 3。

PMN 对可溶性刺激物的应答较不溶性刺激物快,揭示了异种刺激物与细胞作用方式可能不同,以致影响活性氧的生成及释放速率而

表3 不同刺激物对 PMN 化学发光的影响

刺激物	加入量	曝时	峰值 (cpm)±SD	
			无附加物	CAT(200μg)
酵母浸精	0.1 ml/ml	12min	5040±814	3972±884
ATCC 菌株	0.1 ml/ml	18min	2621±572	1994±793
聚赖氨酸	10 <sup>-3</sup> mol/ml	3min	6889±935	5307±1369
ConA	100 μg/ml	9min	1714±604	1561±772

产生峰时和强度的变异。已报道在 PMN 发光系统 Con A 只诱导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成<sup>[6]</sup>。本实验观察到经 Con A 诱导的发光强度较其他刺激物弱,经 SOD 作用无明显发光抑制。CAT 的抑制作用较其他刺激物弱。该现象除间接反映 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成水平外,亦表明部分发光起源于细胞内。

**五、淬灭剂的抑制作用** 本实验以 β 胡萝卜素、叠氮钠和氰化钠对 PMN 和单线态氧生成体系实施发光淬灭抑制实验。结果显示叠氮钠对单线态氧和 PMN 发光淬灭率明显不同,其淬灭率分别为 11.3% 和 49.8%。或许对 PMN 体系中 MPO 酶活性具有较强抑制而导致发光产率明显减低<sup>[1,6,7]</sup>。

β 胡萝卜素对单线态氧清除率为 24.7%。

揭示单线态氧在 PMN 爆发反应中所占比例较 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 少。爆发反应开始,1 mmol/L 氰化钠可促增 PMN 发光 9.5%,其机理与增加 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产率有关<sup>[6]</sup>,但随培育时间延长,发光强度呈线性跌落,活细胞减少 14%。故 CN<sup>-</sup> 与细胞呼吸受抑仍有相关。

用化学发光分析法研究吞噬细胞功能潜力很大,许多疾病的诊断、治疗及预后均可从这种生物物理现象探索出新的途径。为此,对发光原理和方法重现性尚需进一步探索使其更臻完善。

### 参 考 文 献

- 1 Wymann M P *et al.* *Anal Biochem.* 1987; **165**:371
- 2 李彭林. 临床医学检验手册. 长春: 吉林科学技术出版社, 1987; 894—895
- 3 康建,朱忠勇. 生物化学与生物物理进展, 1984;(5): 52
- 4 Bergmeyer H U *et al.* *Methods of Enzymatic analysis.* Vol I. Weinheim, Verlag Chemie. 1983: 348—349
- 5 Misra H P *et al.* *Arch Biochem Biophys.* 1982; **215**:59
- 6 Loch R *et al.* *Anal Biochem.* 1988; **173**:450
- 7 Dahlgren C *et al.* *Infect Immunol.* 1983; **39**:736
- 8 Spitz D *et al.* *Anal Biochem.* 1989; **179**:8

[本文于 1989 年 5 月 22 日收到]

## 大豆饼粕中蛋白质的制取及用途

大豆中不仅含有 16—22% 的大豆油,而且含有 40% 左右营养价值高的蛋白质。本资料详细介绍了大豆蛋白的结构、变性、制取以及大豆蛋白的豆腥味及其脱除。资料费 20 元。(5664 号)

[北京 867 信箱 20816 组,邮政编码: 100024, 李群]

## 其它几种饼粕中蛋白质的制取及用途

本资料介绍了花生、棉籽、菜籽和葵花籽等饼粕中蛋白质的制取和用途,以及超滤与反渗透技术在分离、提取纯油籽蛋白上的应用。资料费 20 元。(5665 号)

[北京市星火技术研究所,北京 867 信箱 20816 组,邮政编码: 100024, 李群]