

简 报

羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的 TBA 反应*

王 爱 国 罗 广 华

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

关键词 羟自由基, 脱氧核糖, 硫代巴比妥酸反应

1894 年 Fenton 发现了过氧化氢与亚铁反应生成一种强氧化物。40 年后 Haber 和 Weiss 证明这一氧化物是羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)。到 1979 年, Lai 等人用电子顺磁共振 (ESR) 直接观察到羟自由基^[1]。近些年人们开始重视研究检测生物系统羟自由基的简易方法。Halliwell 设计了脱氧核糖作为羟自由基分子探针的反应系统, 检测脱氧核糖降解物与硫代巴比妥酸 (TBA) 显色反应^[2]。文中除了进一步验证羟自由基对脱氧核糖降解和产生的 TBA 反应的专一性外, 还探讨了反应系统中羟自由基与脱氧核糖降解而产生的 TBA 反应之间的线性关系, 为此法应用于检测生物体系羟自由基提供依据。

1 材料与方 法

1.1 羟自由基反应系统 在 2ml 反应液中有 2-脱氧-D-核糖 (30mmol/L) 170 μl ; EDTA (5mmol/L) 40 μl ; FeSO_4 (2mmol/L) 40 μl ; 次黄嘌呤 (2mmol/L) 200 μl ; 磷酸缓冲液 (0.15mol/L; pH 7.4) 1.5 ml; H_2O_2 (17.6mmol/L) 10 μl ; 反应开始加入黄嘌呤氧化酶 (0.4U/ml) 40 μl 。反应混合液在 35 $^\circ\text{C}$ 培养 15min。

1.2 超氧化物自由基反应系统 用 0.15mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液代替上述羟自由基系统中的 FeSO_4 和 H_2O_2 。

1.3 硫代巴比妥酸显色反应 取上述培养液 1ml 加入 TBA (1% W/V; 在 0.05mol/L NaOH) 1ml 和冰醋酸 1ml。混合后在沸水浴内加热 30min, 冷却后在 Beckman DU-7 测 $A_{532\text{nm}}$ 。

1.4 丙二醛标准液制备 按照王爱国方法^[3,4], 用 $1.5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的 1,1,3,3-四甲氧基丙烷经 HCl (最终浓度 0.1mol/L) 水解 6h 可得 $1.5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 丙二醛溶液。

1.5 试剂 2-脱氧-D-核糖来自 SERVA 公司, 次黄嘌呤是 Fluka 公司产品, 黄嘌呤氧化酶和 TBA 是 Sigma 产品, 其它试剂为分析纯的国内产品。

2 实 验 结 果

2.1 几种碳水化合物在羟自由基作用下产生的 TBA 反应

表 1 说明, 葡萄糖、果糖、核糖、2-脱氧-D-核糖等 7 种碳水化合物, 当分别用 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 系统于 35 $^\circ\text{C}$ 作用 15min 时, 只有 2-脱氧-D-核糖在 $\cdot\text{OH}$ 作用下发生明显的降解, 而且降解产物与 TBA 起显色反应, 在 $\lambda_{532\text{nm}}$ 处有显著光吸收。这表明, 羟自由基导致 2-脱氧-D-核糖降解并产生 TBA 反应, 有较好的专一性。

表 1 氧自由基 (O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$) 作用下碳水化物的 TBA 反应

碳水化合物	TBA 反应 ($A_{532\text{nm}}$)		
	对照	O_2^-	$\cdot\text{OH}$
葡萄糖	0.0663	0.0539	0.0681
果糖	0.0593	0.0621	0.0770
核糖	0.1089	0.1270	0.1064
2-脱氧-D-核糖	0.1159	0.1496	0.4033
蔗糖	0.0687	0.0699	0.0639
麦芽糖	0.0674	0.0720	0.0709
乳糖	0.0689	0.0674	0.0693

对照的反应液只含糖和磷酸缓冲液 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 的反应液如“材料与方法”所述

2.2 羟自由基的清除剂对脱氧核糖降解和 TBA 反应的抑制作用

根据 Cederbaum 等人报道^[5,6], 二甲亚砜、异丙醇、苯甲酸、乙醇、甘露醇和硫脲都是羟自由基的清除剂。本试验观察到上述清除剂对羟自由基系统内脱氧核糖降解以及产生的 TBA 反应有不同程度的抑制作用 (表 2)。其中, 硫脲和二甲亚砜能较有效地清除系统中的羟自由基, 从而明显地抑制 2-脱氧-D-核糖的降解以及产生的 TBA 反应。这不仅表明是清除剂的效

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-10-31 修回日期: 1992-01-16

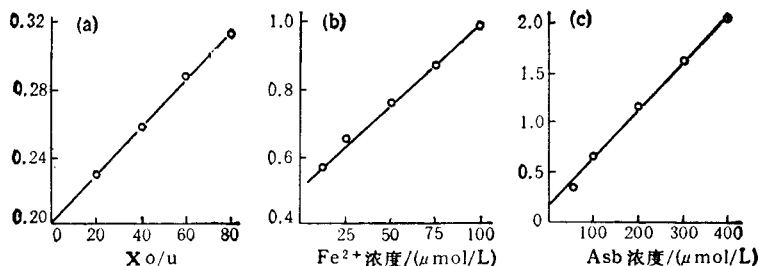


图 1 反应系统内的羟自由基与脱氧核糖降解的 TBA 反应相关性

图 1 中(a),(b),(c)中的横座标分别表示 XO, Fe^{2+} (5 mmol/L), Asb (10mmol/L)
纵座标表示 A_{532}

表 2 羟自由基的清除剂对脱氧核糖降解和 TBA 反应的抑制作用

清除剂 (10 mmol/L)	$A_{532\text{nm}}$	清除率(%) ¹⁾
对 照 ¹⁾	0.4412 ± 0.0704	—
二甲亚砷	0.1945 ± 0.0295	55.92
硫 脲	0.1864 ± 0.0136	57.75
苯 甲 酸	0.2918 ± 0.0342	33.87
甘 露 醇	0.3638 ± 0.0105	17.54
异 丙 醇	0.4267 ± 0.0654	3.28
乙 醇	0.4251 ± 0.0124	3.78

1) 对照: 不含清除剂的羟自由基反应系统(见“材料与方法”)

$$2) \text{清除率} = \frac{100(A_0 - A_x)}{A_0} \times \%;$$

A_0 = 对照的 $A_{532\text{nm}}$ A_x = 有清除剂的 $A_{532\text{nm}}$

果, 而且反过来证明了羟自由基导致脱氧核糖的降解并产生 TBA 反应。

2.3 羟自由基与脱氧核糖的 TBA 反应的相关性

Fenton 反应是一种常被采用的羟自由基源。已证实, O_2^- , Fe^{2+} 和抗坏血酸 (Asb) 能驱动 Fenton 反应加速, 使之增加系统中的 $\cdot\text{OH}$ ^[7]。由于 O_2^- 可通过黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶 (X-XO) 获得, 因此在本实验的羟自由基系统内, 分别增加 XO, Fe^{2+} 和 Asb 量来观察 2-脱氧-D-核糖降解产生的 TBA 反应的强度。图 1 表明, 无论是增加 XO 或 Fe^{2+} 或 Asb 量, 脱氧核糖降解而产生的 TBA 反应都随之加强。结果一致表明, 系统内的羟自由基与 TBA 反应的 A_{532} 呈较好的正相关。

2.4 羟自由基启动的脱氧核糖降解产物的吸收光谱

早期许多研究者常用 TBA 反应来作为膜脂过氧化作用的指标, 而且已知与 TBA 起显色反应的膜脂过氧化产物是丙二醛 (MDA) 或丙二醛类似物^[8,9]。属于简单糖类的 2-脱氧-D-核糖在 $\cdot\text{OH}$ 作用下其降

解产物也同样能与 TBA 显色反应并在 $\lambda = 532\text{nm}$ 有显著的吸收峰。由此推测, 2-脱氧-D-核糖的降解物也可能有 MDA 或它的类似物。本试验采用 Sigma 公司的 1, 1, 3, 3-四甲氧基丙烷, 经 HCl 水解可获得标准 MDA^[3,4], 将标准 MDA 和脱氧核糖降解液作紫外和可见光吸收光谱的比较。结果发现, 降解液在 $\lambda = 243\text{nm}$ 处有一吸收峰与标准 MDA 的紫外光吸收峰相一致(图 2a); 降解液进一步与 TBA 反应, 其显色溶液的可见光吸收峰也同样与标准的 MDA-TBA 反应液的可见吸收峰 $\lambda = 532\text{nm}$ 相叠合(图 2b)。这一结果, 表明了 2-脱氧-D-核糖在羟自由基作用下, 其降

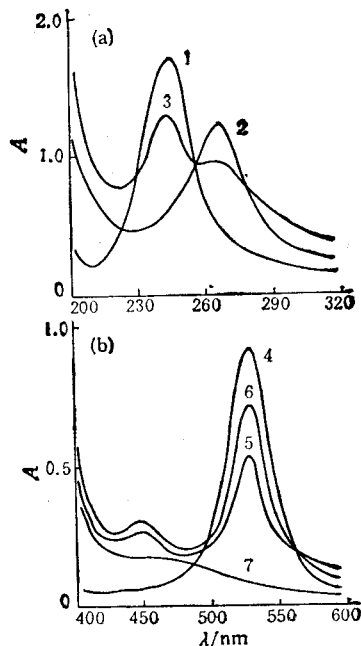


图 2 2-脱氧-D-核糖降解物的紫外(a)和可见(b)吸收光谱

1: $5 \times 10^{-2}\text{mmol/L}$ MDA 2: 2.25mmol/L 2-脱氧-D-核糖 3: 2-脱氧-D-核糖在 $\cdot\text{OH}$ 作用下(15min)的降解液 4: $5 \times 10^{-2}\text{mmol/L}$ MDA-TBA 反应 5: 同 3, 但与 TBA 起反应 6: 同 5, 但是 $\cdot\text{OH}$ 作用 30min 的降解液 7: 同 2, 但与 TBA 起反应

解产物很可能是含有 MDA 或 MDA 的类似物。

3 讨 论

实验结果表明上述含有 2-脱氧-D-核糖的羟自由基反应系统,可用于检测生物材料的羟自由基,并直接用 $\lambda = 532\text{nm}$ 光吸收值表示生物材料产生 $\cdot\text{OH}$ 的相对速率。此法简易快速、药品价廉,又能同时进行大量样品的比较分析。

MDA-TBA 反应不但存在于 $\cdot\text{OH}$ 启动下的膜脂过氧化作用,同时也发生在本试验所观察到的 $\cdot\text{OH}$ 作用下的脱氧核糖降解。据 Gutteridge^[10] 报道, DNA 和氨基酸在 $\cdot\text{OH}$ 作用下也同样会产生 MDA-TBA 反应。可见,MDA-TBA 反应不宜作为脂质过氧化作用的唯一指标。由于 MDA-TBA 反应包含许多重要生命物质在 $\cdot\text{OH}$ 作用下都会发生的,因此将它作为生物材料产生羟自由基的指标可能更为合适。

参 考 文 献

- 1 Lai C S, Piette L H. Further evidence for $\cdot\text{OH}$ radical production in Fentons reagent. *Tetrahedron Letters*, 1979; 9: 775
- 2 Halliwell B, Gutteridge J M C. Hydroxyl Radicals assayed by aromatic hydroxylation and deoxyribose degrad-

ation. In: Greenwald R A ed, *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton CRC Press, 1985: P 177—180

- 3 王爱国,邵从本,罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. *植物生理学通讯*, 1986; (2): 55—57
- 4 Philpot J s t. L. The estimation and identification of organic peroxides. *Radiation research supplement*, 1963; 3:55
- 5 Cederbaum A I, Cohen G. Microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging. In: Greenwald R A ed, *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton CRC Press, 1985: P81—87
- 6 Oberley L W. Radiation sensitivity testing of cultured eukaryotic cells. In: Greenwald R A ed. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton; CRC Press, 1985: P 417—423
- 7 Cohen G. The Fenton reaction. In: Greenwald RA ed, *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton CRC Press, 1985: P55—64
- 8 Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1978; 52: 302—310
- 9 Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.*, 1980; 65: 245
- 10 Gutteridge M C. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Letters*, 1981; 128: 343

猪小脑突触质膜糖皮质激素结合位点测定及特异性分析

傅 红 郭 佐 陈宜张

(第二军医大学生理学教研室,上海 200433)

关键词 突触质膜,小脑,糖皮质激素膜结合位点

随着对甾体激素作用机理研究的深入发展,越来越多的实验结果表明,甾体激素不仅能通过与细胞内的受体结合,进而影响 DNA 转录而发挥甾体激素重要的调节功能,它还能与位于细胞膜上的特导结合位点(膜受体?)结合,产生某些潜伏期极短的快效应^[1-3]。迄今为止,已有少量文献报道在大鼠脑、肝及垂体,狗脑,小鸡肝,家兔骨骼肌以及人胎盘等组织细胞的细胞膜上均有糖皮质激素的特异结合位点。目前尚未见有关猪小脑突触质膜糖皮质激素膜结合位点(GCMBs)的报道。

1 材 料 与 方 法

1.1 实验材料

实验动物 成年肉猪,雌雄不拘,在屠宰场电击放血致死后取出小脑,剥去软脑膜。

药品和仪器 [^3H] 皮质酮: 中国科学院上海原子核研究所产品,放射比度为 $1.39\text{TBq}/\text{mmol}$ ($38\text{Ci}/\text{mmol}$),放化纯度大于 95%。皮质酮、醛固酮、地塞米松、 17β -雌二醇、孕酮、睾酮为 Sigma 产品。R5020: NEN 产品。RU26988: 法国 Roussel-Uclaf 公司馈赠。MSE PREPSPIN-75 型超速冷冻离心机: 英国 MSE 公司。FJ-2108 液体闪烁计数仪: 西安 741 工厂。

1.2 猪小脑突触质膜制备 参照大鼠脑突触质