

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

膜的制备方法^[1]。所有溶液均预先冷至 0—4℃。将猪小脑剪碎,放入玻璃匀浆管中,加入约 10 倍的 0.32 mol/L 蔗糖-10mmol/L Tris-HCl (pH 7.40) 溶液。匀浆后,先经 1500g 离心 10min,弃沉淀;上清再经 10000g 离心 20 min,弃上清;将沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.40) 缓冲液混悬,重复前一步骤 (10000g, 20min) 2 次;最后经不连续蔗糖密度梯度超离心 (90000 g, 90 min),收集滞留在 1.0 mol/L 和 1.2mol/L 蔗糖交界面处的突触质膜成分,再用约 40 倍体积的 10 mmol/L Tris-HCl 混悬,经 30000g 离心 10 min 后,弃上清,沉淀备用。

1.3 GCMBS 的测定 将突触质膜沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl 混悬,每一试管中加 50μl;总结合管 (A 管) 加入一定浓度的 [³H] 皮质酮 (30—300 nmol/L); 非特异结合管 (B 管) 除加入一定浓度的 [³H] 皮质酮外,还加入比 [³H] 皮质酮高 1000 倍的非标记皮质酮。于 37℃ 温育 1h 后,用多头细胞收集器将样品抽滤到 S6.9 型玻璃纤维滤膜上。滤膜置 90℃ 电烤箱中烤 1h,干燥后加入闪烁液 1.5ml,液闪测放射活性。

1.4 GCMBS 的甾体结合特异性测定 每一试管中各加入突触质膜混悬液 50μl, [³H] 皮质酮 100nmol/L; 竞争取代结合管 (非特异结合管) 中还分别加入比 [³H] 皮质酮高 1000 倍的各种非标记甾体: 皮质酮、醛固酮、地塞米松、17β-雌二醇、孕酮、R5020、RU26988、睾酮 (终浓度均为 100μmol/L)。于 37℃ 温育 1h 后测定各管的放射活性 (详细步骤同 GCMBS 的测定)。最后以皮质酮取代 [³H] 皮质酮的能力作为 100%, 按下列公式分别计算出各个甾体的竞争取代率:

$$\text{竞争取代率}(\%) = \frac{[\text{皮质酮总结合数}(\text{cpm}) - \text{各甾体取代}[\text{皮质酮}]\text{后的 cpm}]}{[\text{皮质酮总结合数}(\text{cpm}) - \text{皮质酮取代}[\text{皮质酮}]\text{后的 cpm}} \times 100\%$$

取代率的大小与该甾体和 GCMBS 亲和力的高低成正比。

1.5 蛋白质含量测定 参照 Bradford^[2] 方法。

2 实验结果

猪小脑突触质膜与不同浓度的 [³H] 皮质酮 (非特异结合管中加入 1000 倍浓度的非标记皮质酮) 在 37℃ 温育 1h 后,测定各种配体浓度下 [³H] 皮质酮的特异结合量,得到 [³H] 皮质酮特异结合的饱和曲线。结果显示:猪小脑突触质膜上 GCMBS 结合 [³H] 皮质酮的饱和曲线呈“S”型 (图 1), Scatchard 作图 为一条向上凸起的曲线 (图 2)。经计算机数学处理后得到 GCMBS 的最大结合量 ($B_{\max}$) 为每毫克蛋白 $486.95 \pm 46.07 \text{ fmol}$ ($n = 4$), 平衡解离常数 (K_d) 为

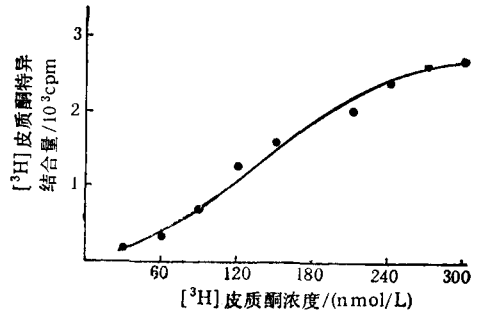


图 1 [³H] 皮质酮对猪小脑突触质膜 GCMBS 的特异结合

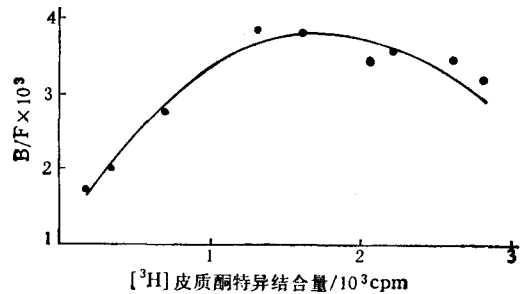


图 2 [³H] 皮质酮特异结合猪小脑突触质膜 GCMBS 的 Scatchard 作图

$231.67 \pm 65.26 \text{ nmol/L}$ ($n = 4$).

猪小脑突触质膜 GCMBS 的甾体结合特异性测定结果表明, GCMBS 有很高的甾体特异性,其中以皮质酮、醛固酮和地塞米松的亲和力为最高, 17β-雌二醇、孕酮和 R5020 为中等,对 RU26988 和睾酮的亲和力最低 (图 3)。

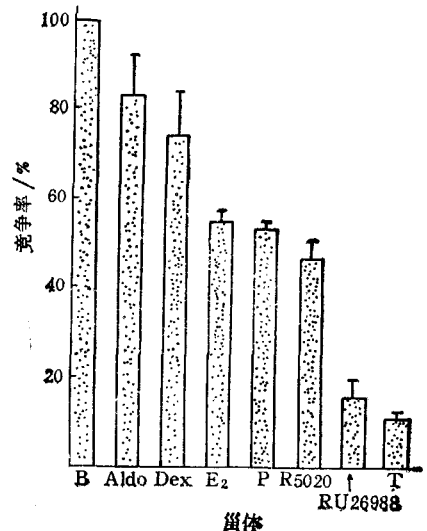


图 3 猪小脑突触质膜 GCMBS 的甾体结合特异性

3 讨 论

一步研究。

以 [^3H] 皮质酮为配体的放射配体结合测定结果表明,猪小脑突触质膜上存在皮质酮的特异结合位点。用不同浓度的 [^3H] 皮质酮所做的饱和曲线显示,这种结合是可饱和的,但饱和曲线不是典型的双曲线型,而是呈“S”型,这与本室郭佐博士在大鼠脑突触质膜上测得的结果一致。对这样的曲线,用常规的直线回归处理方法不能得到 $B_{\max}$ 和 K_d 值。本文采用计算机程序处理方法(根据最小二乘法原理进行多项式曲线拟合)求得猪小脑突触质膜 GCMBS 的最大结合量($B_{\max}$) 每毫克蛋白为 $486.95 \pm 46.07 \text{ fmol}$, K_d 为 $231.67 \pm 65.26 \text{ nmol/L}$ 。

甾体结合特异性是鉴定甾体激素受体的一项重要指标。我们的测定结果表明,猪小脑突触质膜 GCMBS 具有较高的甾体特异性,其中以皮质酮、醛固酮和地塞米松的亲和力为最高,17 β -雌二醇、孕酮和 R5020 为中等, RU26988 和睾酮的亲和力最低,这与郭佐在大鼠脑突触质膜所得的结果不完全相同,其原因有待进

参 考 文 献

- 1 Kelly M J, Moss R L, Dudley C A. Effects of microelectro phoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res*, 1977; 30:53
- 2 Sachs B D, Leipheimer R F. Rapid effect of testosterone on striated muscle activity in rats. *Neuroendocrinology*, 1988; 48: 453
- 3 Hua S Y, Chen Y Z. Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. *Endocrinology*, 1989; 124: 687
- 4 傅红,郭佐,陈宜张. 大鼠脑突触质膜糖皮质激素结合位点的等电点测定. *生物化学与生物物理进展*, 1992; 19: 296
- 5 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248

大鼠组织中铜锌及锰超氧化物歧化酶活性的比较*

魏重琴 张菊娥 艾建芳 付 蕾 王树立

(河南医科大学生化教研室, 郑州 450052)

关键词 CuZn-SOD, Mn-SOD, 动物组织

在真核生物中, CuZn-SOD (铜锌超氧化物歧化酶) 分布于细胞的可溶部分(胞浆及线粒体内膜间隙), Mn-SOD (锰超氧化物歧化酶) 则局限于线粒体基质。两种 SOD 均可催化超氧阴离子自由基 (O_2^-) 歧化为 H_2O_2 和 O_2 , 使组织免受过多的 O_2^- 所致的潜在损伤作用, 对机体起重要的保护作用。但二者的氨基酸组成、分子量、亚基数目、特定的吸收光谱等多种理化性质, 均有较大的差异, 如一定浓度的氰化物可抑制 CuZn-SOD 活性, 而 Mn-SOD 活性却不受氰化物的影响^[1,2]。因此, 根据氰化物存在与否可测定出 SOD 的总酶 (T-SOD), CuZn-SOD 及 Mn-SOD 的比活性^[3,4]。本文根据这一特性, 对正常 Wistar 大鼠不同组织中两种 SOD 的比活性进行了比较, 这将为研究某些疾病时需要测定实验动物组织中 SOD 的比活性而提供一种简单、快速、可靠的方法。

1 材 料 与 方 法

1.1 主要试剂

L-肾上腺素 (Fluka 公司产品)、碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等均为国产分析纯试剂。

1.2 实验动物

健康 Wistar 大鼠, 体重约 250g (由河南医科大学实验动物中心提供)。

1.3 方法

1.3.1 动物处理: 心脏取血约 1ml, 肝素抗凝, 分离红细胞, 用生理盐水洗涤 3 次, 以备测定红细胞 CuZn-SOD 比活性用。取血后将大鼠断颈椎白处死, 解剖取出心、肝、脾、肺及肾脏, 立即置于 4℃ 预冷的生理

* 属河南省卫生厅重大科研项目。

收稿日期: 1992-01-07 修回日期: 1992-03-30