

乙酸乙酯抽提法在 ESR 检测一氧化氮 自由基中的应用*

张德良 李美芬 赵保路**

(中国科学院生物物理研究所, 中国科学院视觉信息加工开放研究实验室, 北京 100101)

摘要 改进了用有机溶剂抽提检测一氧化氮 (nitric oxide, NO) 自由基的方法, 并利用有机溶剂抽提法检测了小鼠心肌中 NO 的含量. 有机溶剂可以把二乙基二硫代氨基甲酸钠 (diethyldithiocarbamate, DETC) 捕集 NO 的产物 (DETC) $_2$ Fe $^{2+}$ -NO 由水相中萃取并富集到酯相中, 然后利用电子顺磁共振波谱仪 (ESR) 在常温下检测大体积样品中的 NO. 比较了几种不同的有机溶剂: 正丁醇、乙酸丁酯、乙酸乙酯、三乙酸甘油酯、乙酸异戊酯等的萃取能力, 发现乙酸乙酯是一种理想的提取溶剂. 乙酸乙酯提取法可以使 NO 的量与 ESR 信号强度在 20 μ mol/L 内有良好的线性, 使 ESR 的检测灵敏度提高到 200 nmol/L 以下; (DETC) $_2$ Fe $^{2+}$ -NO 对光比较敏感, 见光易于分解; 复合物在乙酸乙酯中避光保存于 4 $^{\circ}$ C 可稳定十几天而无显著的变化.

关键词 一氧化氮, 自由基, 自旋捕集, 二乙基二硫代氨基甲酸钠, 电子顺磁共振

学科分类号 Q6333

NO 自由基在生物体内是一种重要的信号分子, 它参与多种生理过程^[1]: 在循环系统中, NO 能够松弛血管平滑肌, 防止血小板凝聚^[2]; 在神经系统中具有信息传递功能^[3]; 在免疫系统中, 起着杀伤外来入侵微生物和肿瘤细胞的作用^[4]. 因此近年来, NO 一直是科学界普遍关注的热点.

要想深入研究 NO 在细胞、组织中的产生规律和生理功能, 就必须有灵敏和特异的检测方法. 常用的检测方法有化学发光法^[5]、Griess 法^[6]、血红蛋白法^[7]、同位素法^[8]等, 这些方法或者需要将 NO 转化为气体、或者不特异、或者易于氧化、不易操作等等, 都普遍存在着缺点. 电子顺磁共振法虽然是直接检测自由基的方法, 但是由于生物样品通常为含水样品, 易于吸收微波, 因此只能在液氮温度检测或在常温利用毛细管检测 NO 自由基, 灵敏度降低, 不易操作, 限制了它的应用.

二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DETC) 是近年发展起来的 NO 的捕集剂, 它首先与亚铁离子结合生成 (DETC) $_2$ Fe $^{2+}$ 复合物, 然后与 NO 反应形成捕集复合物 (DETC) $_2$ Fe $^{2+}$ -NO, 电子顺磁共振检测有三重峰特征谱线^[9]. 但是由于这种复合物易溶于酯相, 而不易溶于水相, 一定程度上限制了它的应用. 几十年前, 人们就根据 DETC 可以和多种重金属离子结合生成有颜色的疏水复合物的特点, 在水质检测中用有机溶剂抽提检测水中重金属离子

的含量^[10]. 我们实验室曾利用有机溶剂三乙酸甘油酯把 (DETC) $_2$ Fe $^{2+}$ -NO 复合物从生物样品中抽提出, 实现了在常温下对大体积生物样品中 NO 的 ESR 检测^[11]. 但是, 三乙酸甘油酯有三个缺点: a. 比较粘稠, 与样品中的蛋白质结合过于紧密, 不易与无机相分开; b. 密度大于水相, 分层后有机相在底层, 不易分离; c. (DETC) $_2$ Fe $^{2+}$ -NO 复合物在三乙酸甘油酯中的溶解度小, 捕集复合物无法被充分地提取, 影响检测灵敏度. 因此, 我们进一步筛选了几种有机溶剂, 发现 NO 复合物在乙酸乙酯中有最大的溶解度. 利用乙酸乙酯作为提取溶剂, 检测极限低于 200 nmol/L; 并且 NO 复合物在乙酸乙酯中十分稳定, 0~4 $^{\circ}$ C 避光保存可以稳定十几天而无显著变化. 我们利用这种新方法检测了小鼠心肌组织匀浆中产生的 NO, 证明乙酸乙酯抽提法是一种灵敏方便的检测 NO 的方法.

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

雄性 Wistar 大鼠, 体重约 200 g, 购自中国科学院遗传研究所动物饲养场. 巯基乙醇为瑞典 Fluka 公司产品; NADPH、N ω -单甲基-L-精氨酸

* 国家自然科学基金资助项目 (A4974J09).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-01-26, 接受日期: 2000-02-29

(N^ω-monomethyl-L-arg, NMMA) 为 Sigma 公司产品; HEPES 为 Biomol 公司产品. 牛血清白蛋白为中国科学院上海生物化学研究所产品, 电泳纯; DETC、硫酸亚铁、连二亚硫酸钠、L-精氨酸、氯化钙、EDTA、蔗糖等为国产分析纯.

1.2 有机溶剂抽提 NO 复合物

按文献所述制取 NO 气体^[12], 取 20 g 铜与 50 ml 50% 硝酸混合, 产生的气体依次通过双蒸水与 2 mol/L 氢氧化钾溶液洗涤. 洗涤后的气体通入已经经过氮气除氧的双蒸水中, 其饱和浓度按 1.9 mmol/L^[13] 计算.

用 10 g/L 的牛血清白蛋白加入 6mmol/L DETC, 充分混匀后加入 3 mmol/L 硫酸亚铁, 混匀. 加入 1 μmol/L NO 溶液, 充分混匀, 反应 10 min 后, 每毫升加入 0.4 ml 有机溶剂, 充分混匀, 5 000 g 离心 6 min. 上清用于 ESR 检测.

1.3 标准曲线的绘制

用 10 g/L 的牛血清白蛋白加入 6mmol/L DETC, 3 mmol/L 硫酸亚铁, 混匀后. 加入稀释的不同浓度的 NO 溶液, 混匀, 10 min 后, 每毫升样品中加入 0.4 ml 乙酸乙酯, 剧烈振荡 3 min, 5 000 g 离心 6 min. 分离上清液, 4℃ 避光保存, 用于 ESR 检测. 根据数据绘制 NO 的标准曲线.

1.4 乙酸乙酯提取物稳定性的测定

光敏感性的测定, 取 2 μmol/L NO 气体的乙酸乙酯提取物溶液, 曝露于上午 9 时的直射光中. 分别于 0 min、5 min、10 min 等不同的时间取一定量的乙酸乙酯提取物溶液, 测量 ESR 信号的强度.

取 2 μmol/L NO 气体的乙酸乙酯提取物溶液, 分别避光保存于 -20℃、0~4℃、25℃, 24 h 后用 ESR 检测 NO 的信号强度, 以测定 NO 复合物在不同温度下的稳定性. 2 μmol/L NO 气体的乙酸乙酯提取物溶液, 避光保存于 0~4℃, 分别于 0 h、1 h、2 h 等不同时间测量 NO 信号的强度, 做信号强度随时间变化的曲线.

1.5 小鼠心肌中 NO 的测量

心肌组织抽提液的制备参考文献 [14], 并做适当地修改. 大鼠断头处死, 取出心脏, 在 0~4℃ 的缓冲液 (0.32 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L HEPES, 0.1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.4) 中剪碎、洗净、匀浆. 匀浆液 12 000 g 离心 30 min. 上清用作 NO 酶源, 现制现用. 蛋白质浓度用双缩脲方法测定, 牛血清白蛋白作为标准. 匀浆液蛋白质浓度用缓冲液调至约 10 g/L,

用于 NO 酶活性的测定.

取约 10 g/L 蛋白质浓度的心肌匀浆液, 加入 100 μmol/L Ca²⁺, 0.1 mmol/L L-Arg, 5 mmol/L Na₂S₂O₄, 6 mmol/L DETC, 3 mmol/L Fe²⁺, 用缓冲液调至 1 ml, 37℃ 保温 30 min 后, 迅速冷却终止反应, 然后加入 0.4 ml 乙酸乙酯, 剧烈振荡 3 min, 5 000 g 离心 6 min, 分离上清用于 ESR 测定.

1.6 ESR 实验

将 150 μl 样品放入石英测试管, 用 BRUKE200 自旋共振仪在室温 (25℃) 记录. 测试条件如下: X 波段, 调制频率 100 KHz, 调幅 3.2 G, 微波功率 20 mW, 时间常数 0.3 s, 扫描时间 4 min, 扫描次数 4 次.

NO 信号强度以 $g = 2.034$ 处氮的三重超精细分裂的第一条峰高的高度计算. 每一数据至少重复三次.

2 结 果

2.1 不同有机溶剂提取能力的比较

有机溶剂: 乙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异戊酯、三乙酸甘油酯、正丁醇等抽提 1 μmol/L NO 水溶液, 提取物的信号强度如图 1 所示. 其中, 乙酸乙酯提取物 (图 1a) 的 NO 信号强度最大, 乙酸乙酯提取物 NO 复合物有三条超精细分裂峰

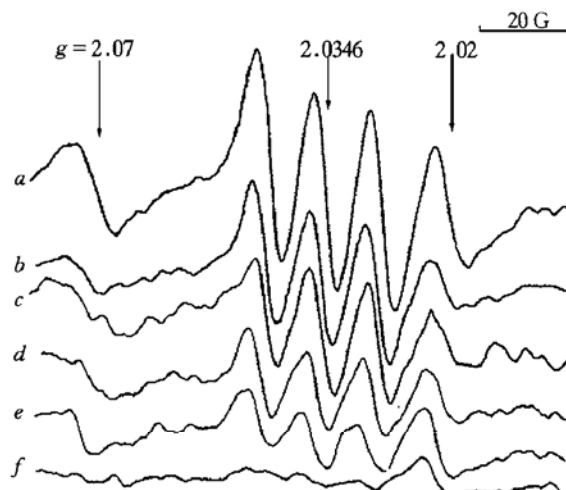


Fig. 1 Spectra of (DETC)₂Fe²⁺-NO complex extracted by different organic solvents

a: ethyl acetate, b: butyl acetate, c: glycerol triacetate, d: isoamy acetate, e: n-butanol, from 1 μmol/L NO solvent. f: spectrum of water phase after ethyl acetate extraction, detected in quartz capillary at room temperature by ESR. Methods and ESR conditions were described in Materials and Methods.

($g = 2.0346$, $a_N = 12.5$ G), g 因子为 2.07、2.02 处为 Cu^{2+} 离子的第二、第三条峰^[11], 其他有机溶剂的提取信号与乙酸乙酯的相似, 它们提取 NO 信号强度的比例是 4.0: 2.8: 2.0: 1.5: 1. 结果表明, 在提取能力方面, 乙酸乙酯是几种溶剂中最合适的. 乙酸乙酯抽提后的水溶液, 在毛细管中常温下 ESR 检测, 图谱 (图 1f) 显示无明显的信号, 表明 NO 复合物几乎完全被抽提到了乙酸乙酯中.

2.2 NO 浓度滴定标准曲线

NO 的标准曲线如图 2 所示, 回归分析得到如下的线性方程: $Y = 10.1674X$, $N = 6$, $SD = 0.2395$, $R = 0.9969$.

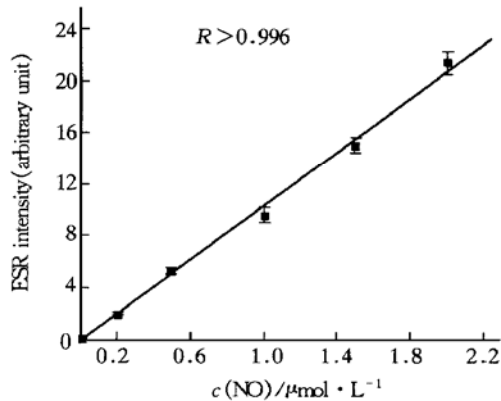


Fig. 2 Standard curve of the $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}$ -NO signal intensity with the concentration of NO. Obtained as described in Materials and Methods.

表明 NO 的浓度与 ESR 信号强度有良好的线性相关. 在信噪比大于 2 的条件下, 检测极限低于 200 nmol/L.

2.3 NO 信号在乙酸乙酯中的稳定性

2 $\mu\text{mol/L}$ NO 溶液的乙酸乙酯提取信号, 在 -20°C 、 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 、 25°C 避光保存 24 h 后, 信号变化如图 3 所示. NO 信号避光保存 24 h 后, 在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 时, 没有显著变化, 在 -20°C 中下降 5.4%, 在 25°C 中下降 25%. 在室温下降低可能与 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}$ -NO 复合物在较高温度下分解有关. 在 -20°C 时, 乙酸乙酯提取物中有一些透明的脂肪状物质产生 (原因有待于进一步研究), 这可能是在 -20°C 时信号减小的原因. 结果证明, $0\sim 4^\circ\text{C}$ 是保存的最佳温度.

乙酸乙酯提取物随光照时间变化的曲线如图 4 所示, 随光照时间的延长, NO 信号迅速下降, 20 min 后, 信号下降 50%, 180 min 后信号完全消失, 表明 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}$ -NO 复合物见光易于分

解. 因此, 在实验过程中应尽量避免光进行, 以避免光解的干扰.

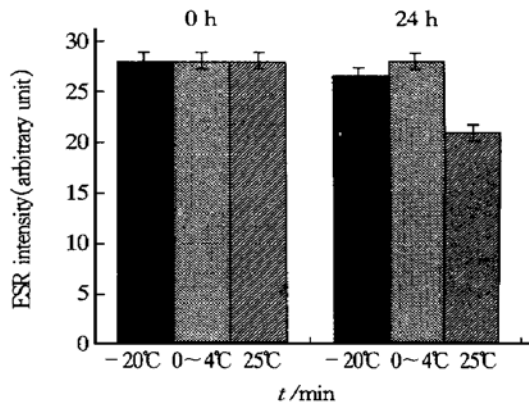


Fig. 3 Changing of ESR intensity of $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}$ -NO complex in organic phase being kept at different temperature in dark for 24 h

The operation and ESR conditions were described in Materials and Methods.

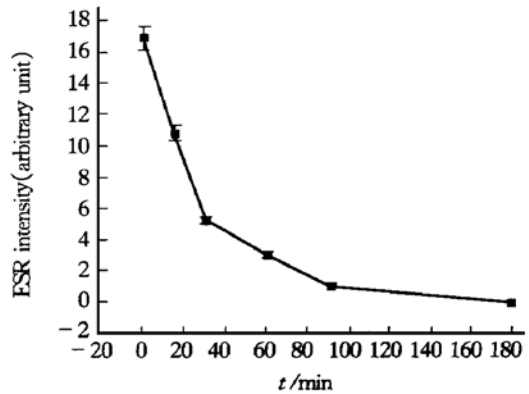


Fig. 4 Changing of ESR intensity of $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}$ -NO complex in ethyl acetate with time

The NO complex extracted from 2 μmol NO solution, being kept at $0\sim 4^\circ\text{C}$ in dark. The operation and ESR conditions were described in Materials and Methods.

图 5 是 NO 的提取信号在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 避光保存时, 随时间的衰变曲线. 由该曲线可以看出, NO 在 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 避光保存时信号十分稳定, 十几天后只有微弱的变化.

2.4 心肌匀浆中 NO 的信号

我们用乙酸乙酯抽提法, 检测了大鼠心肌匀浆中的一氧化氮的产量. 结果如图 6 所示, 加 L-arg 组心肌匀浆 (图 6a) NO 的产量为 0.166 nmol/mg, 加入 L-arg 的类似物 L-NMMA 后 (图 6b), NO 的产量下降为 0.078 nmol/mg, 表明 L-NMMA 抑制了 53% 的酶活性, 不加 L-arg 的对照组 (图 6c) 几乎没有 NO 产生.

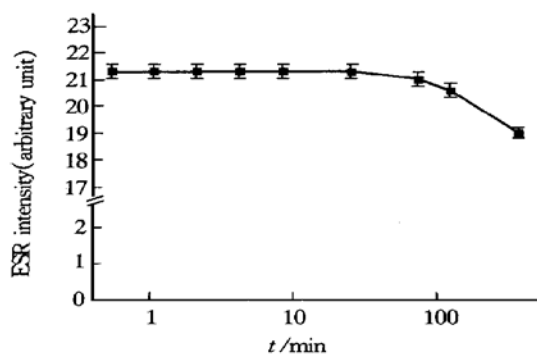


Fig. 5 Changing of ESR intensity of $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ complex in ethyl acetate with time

The NO complex extracted from $2\ \mu\text{mol}$ NO solution, being kept at $0\sim 4\ ^\circ\text{C}$ in dark. The operation and ESR conditions were described in Materials and Methods.

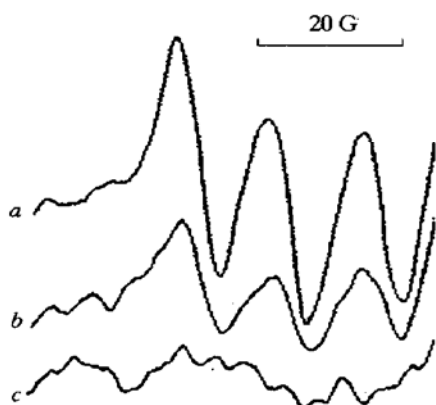


Fig. 6 Activity of nitric oxide synthase of mice myocardium
a: + L-Arg; b: + L-Arg+ NMMA; c: - L-Arg, ESR conditions were described in Materials and Methods.

3 讨 论

电子顺磁共振是检测自由基的最直接的方法。检测生物样品时，常用的是 X 波段，微波频率较高，而生物样品通常是含水样品，在此波段易于吸收微波，使微波功率不易提高。常用的解决方法，一是改用频率较低的 L 波段，可以检测大体积的含水样品，但是灵敏度受到影响；二是减小体积，利用毛细管常温检测，但由于生物样品中的自由基浓度本来就低，毛细管进一步减少了自由基的量，也使自由基的检测灵敏度降低；三是在液氮温度检测生物样品，由于使用液氮，操作比较麻烦。

DETC 与 M-methyl-D-glucamine dithiocarbamate (MGD) 是近年来发展起来的电子顺磁共振检测 NO 的捕集剂，它们与 Fe^{2+} 、NO 形成复合物后，ESR 检测形成三线峰的特征谱线。DETC 是一种酯溶性的捕集剂，捕集复合物 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 亲酯而不易溶于水，因此乙酸乙酯可以将水相

中的 NO-DETC 复合物抽提到酯相中，用于 ESR 检测。由于有机溶剂不易吸收微波，这就克服了含水样品吸收微波不易提高功率的缺点；同时，把低浓度的 NO 自由基从大体积的水相中萃取到酯相中，使自由基的浓度提高，进一步提高了 ESR 对 NO 的检测效率；并且，利用有机溶剂提取可以在常温下检测 NO 的信号，避免了必须利用液氮温度检测大体积生物样品的不便，更加经济方便。

我们实验室曾利用三乙酸甘油酯抽提法检测 NO 浓度^[11]，但是，三乙酸甘油酯作为提取溶剂有不易与蛋白质分离、不易与无机相分开、捕集复合物在其中溶解度小等几个缺点。因此，我们比较了正丁醇、乙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异戊酯、三乙酸甘油酯、正戊烷、正辛烷、石油醚等结构与极性不同的多种有机溶剂的提取效果，发现 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 复合物在极性弱的正戊烷、正辛烷、石油醚中几乎没有信号（图谱没有列出），而在酯类及醇类中信号较强，在乙酸乙酯中的信号最强。NO 复合物不易溶于强极性的水，也不易溶于极性很弱的烷醚等物质，而在酯类中尤其是在乙酸乙酯中有最好的提取效果。这可能与 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 极性与乙酸乙酯等酯类的极性相似，结构能与之互补有关。由于乙酸乙酯的提取效果最好，因此我们把乙酸乙酯作为提取溶剂。

NO 复合物在有机相中十分稳定， $0\sim 4\ ^\circ\text{C}$ 避光保存，可以稳定几天而无显著的变化，避免了制样后由于检测时间不统一而产生的差异，有利于生物样品的检测。值得注意的是，乙酸乙酯提取的 NO 复合物见光易分解，在直射光中曝露 3 h 后信号消失。因此，实验时应避免由于见光分解而带来的差异。同时，由于 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 复合物与生物样品中的蛋白质结合紧密，不易分离，故加入乙酸乙酯后必须剧烈振荡 3min 以上才能保证 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 充分与蛋白质分离被有机溶剂抽提，振荡时间也应尽量一致，否则影响检测。由于 $(\text{DETC})_2\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ 与蛋白质结合紧密，有机溶剂抽提不能保证把所有的 NO 都抽提到酯相中，因此检测的仍然是 NO 的相对含量。用有机溶剂抽提的方法，我们检测了大鼠心肌匀浆中 NO 合酶的活性（图 6），这表明乙酸乙酯提取法可以有效地检测生物样品中 NO 的产量。由于以每毫克蛋白质的 NO 产量，作为衡量 NO 产生量的标准，而不同组织样品中的蛋白质含量存在着差异，因此只能相对地比较不同组织中 NO 的产量。

致谢 在本工作的完成过程中, ESR 组的呼俊改等老师, 中日友好医院的安荣姝老师及本研究组的曹远林、卫涛涛、高军涛、聂广军及原本组的周光印等给与了无私的帮助, 在此表示感谢!

参 考 文 献

- 1 赵保路, 陈惟昌. NO 自由基的性质及其生理功能. 生物化学及生物物理进展, 1993, **20** (6): 409~ 411
Zhao B L, Chen W C. Prog Biochem Biophys, 1993, **20** (6): 409~ 411
- 2 Furchgott R F, Vanhoutte P O. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J, 1989, **3** (9): 2007~ 2018
- 3 Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. TINS, 1991, **14** (2): 206~ 214
- 4 Gross S S, Wolin M S. Nitric oxide: Pathophysiological Mechanism. Annu Rev Physiol, 1995, **57**: 737~ 769
- 5 Radi R, Cosgrove T P, Beckman J S, *et al.* Peroxynitrite induced luminol chemiluminescence. Biochem J, 1993, **290** (1): 51~ 57
- 6 Verdon C P, Burton B A, Prior R L. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose 6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. Anal Biochem, 1995, **224** (2): 502~ 508
- 7 Kosaka H, Watanabe M, Yoshihara H, *et al.* Detection of nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats by ESR using carbon monoxide hemoglobin. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **184** (2): 1119~ 1124
- 8 Pufahl R A, Nanjappan P G, Woodard R W, *et al.* Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages. Biochemistry, 1992, **31** (29): 6822~ 6828
- 9 Mordvintsev P, Müsch A, Busse R, *et al.* On-line detection of nitric oxide in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. Anal Biochem, 1991, **199** (1): 142~ 146
- 10 日本工业用水协会编. 陈履安译. 水质实验法, 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 590~ 598
Japanese Industry Water Association, Chen L A translated. Methods in Water Quality Test. Beijing: Chinese Environment Science Press, 1990. 590~ 598
- 11 Zhou G Y, Zhao B L, Hou J W, *et al.* Detection of nitric oxide in tissue by spin trapping EPR spectroscopy and triacetyl glycerol extraction. Biotechnology Techniques, 1999, **13** (8): 507~ 511
- 12 Zhao B L, Shen J G, Li M, *et al.* Scavenging effect of chinonin on NO and oxygen free radicals and its protective effect on the myocardium from the injury of ischemia reperfusion. Biochim Biophys Acta, 1995, **1315** (2): 131~ 137
- 13 Borutaite V, Brown G C. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. Biochem J, 1996, **315** (1): 295~ 299
- 14 Knowles R G, Salter M, Brooks S L, *et al.* Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. Biochem Biophys Res Commun, 1990, **172** (3): 1042~ 1048

Application of Ethyl Acetate Extraction in Detecting Nitric Oxide by ESR*

ZHANG De-Liang, LI Mei-Fen, ZHAO Bao-Lu**

(Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The extraction method with organic solvent extraction to detect nitric oxide was improved, and the production of nitric oxide in mice myocardium *in vitro* was detected with this method. Using organic solvent (DETC) ZnFe^{2+} -NO complex was extracted from water phase into ester phase, and nitric oxide in sample of large volume can be detected by ESR at room temperature. The extracting ability of several organic solvents such as ethyl acetate, butyl acetate, glycerol triacetate, *iso*-amy lacetate, and *n*-butanol, was compared, and it was found that ethyl acetate was a good kind of organic solvent. There was a good linear relationship between the concentration of nitric oxide and ESR intensity within concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, and the detected limit was improved to below 200 nmol/L; (DETC) ZnFe^{2+} -NO complex is easy to decompose in light but it is very stable in dark at 0~ 4 °C which, there is only a little change after ten days.

Key words nitric oxide, free radical, spin trapping, diethyldithiocarbamate (DETC), electron spin resonance (ESR)

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (A4974J09).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

Received: January 26, 2000 Accepted: February 29, 2000