

生物和化学发光技术在生物医学中的应用

·编者按·生物和化学发光分析技术应用于基础医学研究和临床生化指标检测已日益受到重视,并以蓬勃之势在许多领域,如自由基医学及生物学、药理学、免疫学、生物化学深入发展。本刊特邀国内造诣深厚的有关专家介绍这些方面的基本概貌、研究进展和前景预测,旨在促进该分析技术在全国的广泛开展。在分子生物学研究方面,该技术虽亦崭露头角,但因我国起步较晚,这次未能组织综合介绍,希广大同仁在这方面努力工作,积累经验,为进一步交流提供基础。

发光法测量自由基、脂质过氧化及抗氧化剂

胡天喜

(华东师范大学生物系,上海,200062)

引言

自由基生物学研究中涉及到自由基、活性氧(ROS)的产生,自由基引发的脂质过氧化(LPO)、自由基的清除,以及活性氧、自由基对生物体的影响及防护。研究体系有体外的模式体系和亚细胞、细胞、组织、器官、完整机体的生物体系。常见的活性氧包括自由基O₂⁻、OH[·]、脂质自由基(R[·]、RO[·]、ROO[·])及H₂O₂、¹O₂、ROOH。抗氧化剂包括自由基的清除剂,有酶〔超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)〕,含巯基的化合物〔谷胱甘肽(GSH)、硫脲、胱胺、半胱胺酸等〕,醇类(酒精、甘露醇),维生素(Vit-A、Vit-C、Vit-E),酚羟基化合物(咖啡酸、茶多酚、槲皮素、芦丁)及一些中草药。研究的方法涉及到顺磁共振(ESR)、比色法、荧光法、气相和高压液相法、示踪原子法及免疫分析法。近年来新

崛起一种超灵敏的自由基研究方法是生物和化学发光法,它渗透入自由基生物学的各个领域,应用面较广,操作简便、分析迅速、耗资较少、易于普及。目前该法正在完善之中,但已显示出其生命力。国外有几个研究小组已发表了不少论文,也有一些综述文章^[1~3]。从第4和第5次国际自由基生物学会的论文集^[4,5]来看,发光法在自由基生物学研究中已占有一定的地位。

本文就体外化学反应产生的自由基,生物体内伴随代谢、病变、中毒产生的自由基,脂质过氧化、活性氧自由基的清除等方面如何用发光法测定作一简要的介绍。

一、化学反应体系产生的

ROS的发光检测

多种酶促和非酶促的反应都可产生活性氧和自由基,这些反应体系可用以筛选抗氧化剂或自由基的清除剂。

1. 超氧阴离子自由基(O₂⁻)

2 (总82)

酶促反应: 黄嘌呤 (X) 或次黄嘌呤 (HX) + 2O₂ + 黄嘌呤氧化酶 (XO) → 尿酸 + 2H⁺ + 2O₂。在此反应体系中存在鲁米诺 (Luminol) 时, O₂ 的能量转移给鲁米诺, 使后者激发, 在其回基态时产生425nm的光。这种光较强, 很易为一般的发光计所测

到。SOD能歧化O₂: $2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$, 使该体系的化学发光强度下降。发光强度下降50%作为SOD的1个活力单位, 可以用以判断SOD的活性^[6], 此法已广泛地被用来筛查动植物、微生物、中草药、食物中类SOD物质。我室已用此体系测量了丹参酮磺酸盐A₂、红藤、当归、黄芪^[7]、云芝糖肽等^[8]中草药及中草药有效成份。

非酶促反应: 碱性条件下有鲁米诺时连苯三酚自氧化^[10], 二甲基亚砷^[11]自氧化也可产生O₂, 并发射光子。

2. 过氧化氢 (H₂O₂) (见本期章竹君的综述)。

3. 羟自由基 (OH·)

常见的产生OH·的体系有:

a. Fenton 反应: $H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow OH\cdot + H_2O + Fe^{3+}$

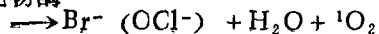
b. Haber Weiss反应: $H_2O_2 + O_2 + H^+ \rightarrow OH\cdot + H_2O + {}^1O_2$

c. 我们发展了用Vit-C-CuSO₄-酵母(或骨髓细胞)-H₂O₂产生OH·和化学发光的新体系^[12, 13], 其原理在于Vit-C还原Cu²⁺为Cu⁺, Cu⁺可以还原H₂O₂为OH·和OH⁻, OH·攻击细胞, 从细胞中获取电子, 伴随发射光子。加入羟自由基的清除剂如尿酸、咖啡酸可使化学发光强度下降, 从中可以判断OH·清除剂的效果。

4. 单线态氧 (¹O₂)

产生¹O₂的体系很多, 常见的有:

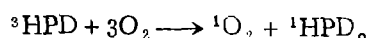
酶促反应 $H_2O_2 + KBr$ 或 $NaOCl$
髓过氧化物酶



非酶促反应:

a. 碱性条件下, 有Luminol(或MCLA*)时, NaClO与H₂O₂反应可以产生¹O₂并发光(425或465nm), 在重水(²H₂O)中, 此发光可以延长并增强^[14]。

b. 亚油酸氢过氧化物-Fe³⁺-MCLA体系, pH 4.8时产生¹O₂和化学发光(465nm)^[14]。此外光照光敏剂-血卟啉也会产生¹O₂: $HPD + h\nu \rightarrow {}^1HPD \rightarrow {}^3HPD$



¹O₂是活性氧分子, 当其退激到三线态氧(³O₂)时, 可以发射红外光或红光(详见脂质过氧化一节)。

¹O₂的发光体系中加入抗氧化剂, 例如β胡萝卜素、2, 5-二甲基咪唑可以抑制发光, 藉此可以筛查抗¹O₂的药物。

二、发光法测量脂质过氧化

自由基启动的脂质过氧化(LPO)是一个链锁反应的过程, 它包括链的启动, 链的增殖及链的完成诸过程。链锁反应过程中产生脂自由基(R·)、烷氧自由基(RO·)、共轭二烯、脂过氧化自由基(ROO·)等中间产物及脂氢过氧化物(ROOH); ROOH的分解可产生丙二醛、乙烷、戊烷等产物, Fe²⁺在链式反应中起着加速作用, 而Vit-E、GSH-PX则有减弱或中断脂质过氧化的作用。以往测定脂质过氧化, 有共轭二烯(233nm比色法), 乙烷、戊烷呼出气相色谱法, 但是用得最多的仍是硫代巴比妥酸(TBA)反应比色法或荧光法测丙二醛(MDA)的形成等等^[1]。据近年来的研究认为测MDA形成有诸多缺点, 比如分析时需要加热, 多次离心等步骤, 手续较繁琐, 耗时较多; MDA是LPO的后期过程, 较为间接,

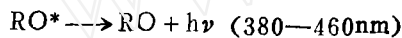
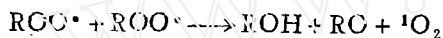
* MCLA--2 methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3, 7-dihydroimidazol(1, 2-a)pyrazin-3-one

不一定能反映LPO的本质；比色法灵敏度较差；最重要的是专一性不够强，尤其测血清（血浆）的LPO，因为血清中的唾液酸、前列腺素、凝血恶烷、脱氧核糖及其它一些碳氢化合物都会与TBA反应，干扰分析的准确性。不少学者发展出一些新方法，其中化学发光法较引人注目。化学发光指标可以反映LPO中ROO·的形成或ROOH的产生，相对来说较为专一、灵敏、快速、简便。

测LOO·的形成

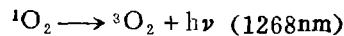
已有研究指出，血浆、组织匀浆、细胞膜、线粒体、微粒体、不饱和脂肪酸的低水平的化学发光（或称生物的超弱发光，UWCL）概起源于LPO产生的LOO·^[1]。

LOO·自反应会产生激发的羰基（>C=O*或RO*）和¹O₂。

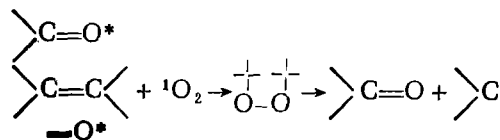


¹O₂的双分子发光 $2{}^1O_2 \rightarrow 2{}^3O_2 + h\nu$ (634和703nm)

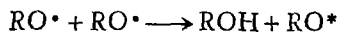
¹O₂的单分子发光



¹O₂与不饱和脂肪酸反应，生成二氧环丁酮 (dioxetane)，后者断裂也可产生



LPO中产生的RO·复合时可产生RO*



现时实验室自装的超灵敏的光子计数器或非符合相加方式的液体闪烁计数器都可测到RO*和¹O₂双分子回基态所发射的光。带光谱装置的光子计数器还能确定LPO发射的谱。

Inaba等^[2]用Vit-E缺陷的大鼠肝匀浆测量其UWCL，发现缺Vit-E的大鼠与正常

大鼠相比，肝匀浆的UWCL增强，同时也测试过2个月龄和11个月龄大鼠的血液的UWCL，11个月龄大鼠的血液UWCL比2个月龄者高4~5倍。UWCL的变化与并行测试的TBA荧光值变化相一致。胡天喜等^[15]研究了致死剂量^γ射线照射小鼠的脑、肝、肾、脾、睾丸匀浆的UWCL，发现照射组这些器官匀浆的发光强度都有所增强，照前注射过细菌SOD者则有所下降，尤以照后第三天更明显。Di Luzio等^[16]研究了大鼠喂饲四氯化碳所致肝中毒时的UWCL，发现中毒大鼠肝匀浆的UWCL明显高于对照鼠。这些试验都证明组织匀浆、血液的UWCL可以用来测定LPO的强度。

测RCOH的形成

近年来新发展出来的确定生物材料中LPC强度的方法是高压液相 (HPLC) 分离出各种脂氢过氧化物，而后用紫外吸收或化学发光法 (CL) 去测定ROOH的含量，认为这种方法较为专一和直接。Terao等^[17]用正相和反向HPLC法从喂过CCl₄大鼠的肝匀浆中分离出磷脂酰胆碱氢的过氧化物 (PCOOH) 和磷脂酰乙醇胺氢的过氧化物 (PEOOH)，并用203和234nm紫外吸收测定它们的变化，发现CCl₄处理的大鼠肝匀浆中PCOOH明显增高，而用TBA法却无变化。Yamamoto等^[18]发展HPLC与CL相结合的方法测出血浆中Pm级水平的脂氢过氧化物，用甲醇和乙烷分离血浆的脂氢过氧化物，并用异鲁米诺、H₂O₂、微过氧化物酶 (Microperoxidase) 化学发光体系定量ROOH的含量，认为HPLC除去血浆中的抗氧化剂的干扰，而发光体系对ROOH专一 (PGH₂等内过氧化物不敏感，未氧化的脂质不会干扰分析)。HPLC-CL是测定ROOH很有价值的技术。Miyazama^[19]用鲁米诺-细胞色素C发光体系去定量HPLC法从血浆中分离得到的磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸的氢过氧化物 (PCOOH、PEOOH)，也发现HPLC-CL

对ROOH高度灵敏、专一,羟基磷脂酰胆碱和羟基磷脂酰丝氨酸(PCOH和PEOH)都不干扰分析。初步测出健康人的PCOOH在10~500pmol/ml血浆之间,而糖尿病人、心、脑、肝细胞受损伤及高血脂病人在500~10000pmol/ml血浆之间,有临床应用的价值。

三、细胞化学发光与ROS

细胞,包括吞噬细胞、多形核嗜中性白细胞(PMN)、嗜曙红白细胞、单核细胞、肺泡和腹膜巨噬细胞(MΦ);非吞噬细胞〔淋巴细胞(Ly),天然杀伤细胞(NK)、血小板〕。它们的发光与ROS有密切的关系。细胞伴随着新陈代谢产生多种多样的ROS。就吞噬细胞而言,正是这些ROS起着吞噬杀菌、解毒、免疫等功能。这一领域的论文较多,参见文献〔20~24〕。

四、器官灌流试验中ROS的CL检测法

离体模型:以离体灌流的肝、肺作为实验模型,已进行了不少研究〔25~27〕。灌流器官表面发射红区(>610nm)的UWCL,发光强度极低,只达3~10CPS(计数/秒·厘米²)。灌注液中加入2甲基-1,4-萘醌(2-methyl-1,4-naphthoquinone)发光强度增至1000CPS,加入无机和有机过氧化氢(H₂O₂、t-丁基过氧化氢、枯烯过氧化氢)引发器官氧化应激反应,发光强度剧增,甚至可达到5000CPS。检查应激反应器官中谷胱甘肽的释放和MDA的形成与化学发光强度基本上相并行。光谱测定表明,肝表面发射的是460、560、640nm三个带和525、615nm二条小带,属于¹O₂的双分子退激发光。Barsacchi等〔28〕用枯烯过氧化氢(Cumene-H₂O₂)灌注离体的心脏,检查化学发光与6-酮-前列腺素F_{1α}(6-Keto-PGF_{1α})含量的变化,以及环氧合酶的抑制剂—阿斯匹林对其影响,发现灌注Cumene-H₂O₂后,化

学发光与6-Keto-PGF_{1α}明显增高,并与所用的Cumene-H₂O₂量呈正比。补加2.77mM的阿斯匹林之后,化学发光完全被抑制,说明受氧化应激反应的心脏的化学发光指标可以反映心脏细胞的前列腺素合成和膜脂的氧化代谢过程。最近Okuda等〔5〕用鲁米诺溶液灌注离体的大鼠的心脏和肝脏,检查缺血重灌期间心和肝的鲁米诺增强的化学发光(LEC)强度的变化。研究表明,注入鲁米诺并不影响器官生理参数。缺血会即刻引起LEC下降,而后增高;重灌后使LEC进一步增强,然后渐渐下降。缺血时间长到60分钟,重灌后LEC的增强比缺血30分钟再重灌更为明显。SOD能抑制心脏缺血重灌期LEC的增高,而CAT则不能;对于肝脏,SOD既能抑制缺血期LEC的增高,也能抑制重灌期LEC的增强,使肝的LEC连续保持于低水平的状态,而CAT只能抑制重灌期LEC的增高。

根据以上的试验,不少学者认为离体灌流的器官上测CL是检查器官氧化应激反应的强有力的工具。

在体试验:已知肝、脑、心、肺、肾及皮肤的缺血重灌损伤是ROS所致的损伤。我们〔29〕用化学发光法检查了双颈动脉结扎的沙土鼠缺血重灌时脑的氧化损伤。发现缺血时UWCL略有升高,重灌时大幅度升高,证实了缺血重灌时自由基的形成和组织损伤。缺血前30分钟腹腔注入山莨菪碱、川芎嗪、胞二磷胆碱及维生素E等药物,可以明显地降低脑匀浆的UWCL。Flecha等〔30〕对经缺血重灌的大鼠心、肝、肌肉的匀浆,用t-丁基过氧化氢、葡萄糖+葡萄糖氧化酶反应产生的H₂O₂、黄嘌呤+黄嘌呤氧化酶产生O₂等ROS作体外氧化应激反应,发现这些器官的匀浆的化学发光明显增强,其中心脏CL最强。在匀浆中加入甘露醇、去铁氨、Vit-A和Vit-E则可使CL下降。此外还发现酒精处理过的大鼠肝的匀浆的t-丁基过氧化氢引发

的CL和自发的CL, 带 Ehrlich ascites或fibrosarcoma肿瘤小鼠肝匀浆的t-丁基过氧化氢引发的CL和自发CL, 都普遍地比对照鼠增高50~100%, 认为心脏这种活检法可用以调查缺血重灌的氧化反应。

结 束 语

生物和化学发光技术已在检测ROS上作

了广泛地应用, 有不少试验将CL指标与ESR法、测MDA、6-Keto-PGF_{1α}、谷胱甘肽的释放等指标作了对比试验, 结果有良好的相关性。发光分析法有灵敏、快速、简便、价廉, 某些场合还有专一性好等优点, 是很有发展前途的ROS和LPO的分析技术。但该技术还不甚成熟, 有些场合稳定性、重现性还不甚理想, 待进一步发展和完善。

参 考 文 献

1. Cadenas E, Sies H. In: Packer L. ed. Method in Enzymology. Vol 105. New York: Academic Press, 1984: 221-231
2. Inaba H. *Experientia* 1988; 44: 550
3. Cadenas E. In: Sies H. ed. *Oxidative Stress*. London: Academic Press, 1985: 311-330
4. Hayashi O, et al. *Medical Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*. New York: Elsevier Science Publishing Company INC, 1989
5. Okuda M, et al. *Free Radical Biology & Medicine* 1990; 9: 61-97
6. 李益新, 方允中. *生物化学与生物物理进展* 1983; 2: 95
7. 胡天喜, 等. *上海中医药杂志* 1988; 9: 28
8. 胡天喜, 等. *生物化学与生物物理学报* 1992; 24(5): 415
9. 胡天喜, 等. *辐射研究与辐射工艺学术会议论文集*. 上海: 上海医科大学出版社, 1990: 52-55
10. 郭嵩光, 等. *植物生理通讯* 1989; 5: 54
11. 赵琢道. *生物化学与生物物理进展* 1987; 6: 55
12. 陈季武, 胡天喜. *生物化学与生物物理进展* 1992; 19(2): 136
13. English DK. In: Knox Van Dyke & Vincent Castranova, eds. *Cellular Chemiluminescence*. Vol 3. CRC Press, 1987: 153-160
14. Sugioka K, et al. In: Hayaishi O, et al. *Medical Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*. New York: Elsevier Science Publishing Company INC, 1989: 899-903
15. 胡天喜, 等. *辐射研究与辐射工艺学报* 1992; 3: 138
16. Di Luzio NR, Stege TE. *Life Sciences* 1977; 1457
17. Terao J, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1984; 235: 326
18. Yamamoto Y, et al. *Analytical Biochemistry* 1987; 160: 7
19. Miyazama T, In: Hayaishi O, et al. eds. *Medical Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*. New York: Elsevier Science Publishing Company, 1989: 789-795
20. Knox Van Dyke. In: *Cellular Chemiluminescence*. Vol 1. CRC Press, 1987: 3-22
21. 李益新, 董元林. *生物化学与生物物理进展* 1986; 1: 41
22. 张学军, 等. *生物化学与生物物理进展* 1990; 17(6): 444
23. 徐麟本, 孙晓明. *中国药科大学学报* 1987; 18(4): 264
24. Roder JC, et al. *Nature* 1982; 298: 569
25. Boveris A, et al. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 347
26. Cadenas E, et al. *Biochem J* 1980; 192: 303
27. Cadenas E, et al. *Eur J Biochem* 1981; 119: 531
28. Barsacchi R, et al. In: Novell GP. & Ursini F. eds. *Oxygen Free Radicals in Shock*. Basel: Karger, 1986: 175-179
29. Tianxi Hu, Jianying Xu. In: Fan Yunzhong ed. *Advance of Free Radical Biology and Medicine*. Vol 1. 1st ed. Beijing: Atomic Energy Press, 1991: 359-368
30. Flecha BG, et al. *Free Radical Biology & Medicine* 1991; 10: 93