维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2001 年第 10 卷第 3 期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2001, Vol. 10, No. 3

极谱法测量大鼠脑线粒体细胞色素氧化酶活性的改良方法

谭小玲* 柳君泽*

细胞色素氧化酶，即呼吸链复合体 IV，它位于呼吸链的最末端，催化细胞色素 C（cytochrome C, cyt. c）的氧化，同时驱动 ATP 的合成，它也是线粒体的标志酶，其酶活性的发挥对于维持线粒体结构和功能以及细胞能量的产生有非常重要的意义。虽然国内外有关细胞色素氧化酶活性测量的报道很多，但运用较广的方法主要有三种：紫外分光光度法，极谱法和组织化学法。紫外分光光度法根据 cyt. c 的还原型和氧化型有不同的光吸收这一原理，通过测量还原型 cyt c 的氧化率来反映细胞色素氧化酶的活性；极谱法是根据还原型 cyt c 被酶氧化的同时消耗 O_2 这一原理，通过测量反应体系中氧耗率来反映酶活[1]。相对而言，运用紫外分光光度法以及组织化学法的报道较多，而用极谱法测量的报道较少，但早在 1983 年 Rafael J[2] 就提出极谱法测量细胞色素氧化酶活性更具优越性。本文结合实践经验对极谱法测量大鼠脑线粒体细胞色素氧化酶活性的方法进行了改良。

一、材料和方法

1. 实验动物：成熟健康 Wistar 大鼠，雄性，13 周龄，由本校动物所提供。

2. 仪器设备：(1)低温高速离心机（TGL－16，中国科学院武汉仪器厂），(2)生物组织氧耗测量系统（北京 304 医院，航天医学工程研究所），(3)电子显微镜（本校中心仪器室提供）。

3. 药品与试剂：ADP，cyt. c，W－1 系 Sigma 公司产品，TMPD，抗坏血酸，聚蔗糖溶液，蔗糖，甘露醇，Tris 碱等均为国产分析纯。

4. 实验方法：(1)实验分组：按测量的标本类型分为四组：脑匀浆组、粗制线粒体组、提纯线粒体组，提纯线粒体组又分为两组：W-1 处理组和非处理组。(2)大鼠脑线粒体的提取采用本室建立的改良的 Clark JB 脑线粒体提取法[3]，Lowry 法测定各悬浮液蛋白含量。(3)W-1 处理[2,5]：将 100mgW-1 溶解于 10 ml 磷酸-EDTA 缓冲液中制得 1% W-1 溶液；分别按 1:9(V/V)和 1:10(V/V)的比例在线粒体悬浮液和组织匀浆中添加预冷的 1% W-1 溶液。非处理组添加等量的线粒体分离介质。(4)细胞色素氧化酶活性的测定：采用 Rafael J 的方法[4]。反应总体积 1.4 ml，反应温度 25℃。就反应底物、反应标本量的不同测量酶的活性，设置平行管。测量方法如下：在反应池中加入磷酸－EDTA 缓冲液，孵育 3min（使液体被空气充分饱和），然后依次加入抗坏血酸溶液（0.1 mol/l），细胞色素 C 溶液（2 mmol/l），TMPD 溶液（50 mmol/l），反应 2～3 min，待描记的曲线斜率（既反应空白值，是 TMPD－抗坏血酸体系还原 cyt. c 的氧耗率）恒定后，加入样本，记录氧耗曲线。酶活性计算公式：COXA = 960 × 反应总体积 × 每秒的耗氧量/每升样本中的蛋白量，活性单位为 ukat/mg 样本蛋白。

二、结果

四种测量样本中，提纯线粒体的测量效果最好，它可以在冰浴中保存至少 6 小时，而酶活性没有显著改变，而匀浆组测量效果最差，且长时间保存后活性基本丧失（表 1）；W－1 处理组酶活性测量值比非处理组高，两组在保存时间 6 小时以内酶活性测量值没有显著变化（表 2）。

表 1 不同时间、加样浓度、反应底物浓度及样本类别的 COX 活性测量值

时间	TMPD（$\times 10^{-4}$M）	抗坏血酸（$\times 10^{-3}$M）	cyt. c（$\times 10^{-5}$M）	样本 COX 活性（ukat/mg 样本蛋白）		
				加样体积（ul）	提纯线粒体	匀浆	粗提线粒体
0 h	7.00	7.00	8.50	20	1.35	0.67	1.02
0 h	3.50	3.50	4.25	10	1.37	0.51	0.98
0 h	1.75	1.75	2.13	5	2.62	1.45	2.04
3 h	7.00	7.00	8.50	2	1.32	0.28	0.84
3 h	3.50	3.50	4.25	10	1.29	0.20	0.72
3 h	1.75	1.75	2.13	5	3.26	0.43	2.26
6 h	7.00	7.00	8.50	20	1.36	0	0.32
6 h	3.50	3.50	4.25	10	1.29	0	0.18
6 h	1.75	1.75	2.13	5	3.06	0	0

* 作者单位：400038 重庆市第三军医大学高原军事医学系病理生理学教研室

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 W-1 处理对提纯线粒体 COX 测量的影响

时间	TMPD($\times 10^{-4}$M)	抗坏血酸($\times 10^{-2}$M)	cyt c($\times 10^{-5}$M)	样本 COX 活性(ukat/mg 样本蛋白)		
				加样体积(uL)	W-1 处理	非 W-1 处理
0 h	3.50	3.50	4.25	10	1.54	1.37
3 h	3.50	3.50	4.25	10	1.51	1.29
6 h	3.50	3.50	4.25	10	1.54	1.29

三、讨论

1. 酶活性测量用的样本选择：尽管 Rafael J 认为从组织匀浆到提纯线粒体，都可以作为测量 COX 活性的材料，但我们的实验结果显示提纯线粒体的效果最好，第一，用提纯线粒体测量酶活性稳定性高，可以置冰浴中保存至少 6 小时而不影响酶活性；第二，COX 活性受组织匀浆及粗提线粒体中多种成分的影响，如磷脂、脂肪酸等，提纯线粒体中有效地去除了这些物质，避免了它们对酶活性的抑制作用[2]。

2. 反应底物浓度的选择：(1) 从经济、节约方面：细胞色素 C 很昂贵，Rafael J 的报道中使用的终浓度为 85umol/l，本实验在不改变底物间浓度比的情况下，对不同底物浓度组合对酶活性测量进行了研究，结果表明，TMPD、抗坏血酸和细胞色素 C 终浓度分别为 0.35mmol/l、3.5mmol/l 和 42.5umol/l 的测量效果与 Rafael J 的报道中使用的终浓度组合所达到的测量效果没有显著差别。测量的酶活性稳定，而且从经济上考虑，节约经费。(2)从空白值稳定性方面：极谱法测量 COX 活性的要求之一，即由底物自身相互反应产生的耗氧率(空白值)应在 0.020 ~ 0.036ukat/mg 线粒体蛋白范围以内。本研究显示，使用该底物浓度组合，空白值在所许范围之内，而且有较好的稳定性。

3. W - 1 处理的非必要性：用 W - 1 处理的目的是保存酶活性，下至于因样本放置时间的不同而影响酶活性[2,5]。由于它是一种离子去污剂，能破坏提纯线粒体的膜结构，使测得的酶活性较非处理样本高[4]，本研究的结果表明，不论以哪种样本为测量材料，W - 1 处理组的酶活性都较非处理组高。而且非处理组样本的酶活性在贮存 6 小时以内与 W - 1 处理组的酶活性差异显著，因此在样本无需长期贮存(大于 6 小时)条件下，可以不用 W - 1 处理。

参 考 文 献

1. Yonetani T. Studies on cytochrome c oxidase IV The cytochrome c oxidase activity J Biol Chem, 1962, 237(2): 550 - 559.
2. Rafael J. Cytochrome c oxidase. Methods of Enzymatic Analysis, 1983, 3: 266 - 273.
3. 高文祥，柳君泽. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢. 中国病理生理杂志，2000, 16(10): 879 - 882.
4. 李露丝，郑彩梅. 大鼠脑线粒体呼吸功能测定的方法探讨. 第三军医大学学报，1994, 16(6): 451 - 453.
5. Robinson NC, Capaldi RA. Interaction of detergents with cytochrome c oxidase. Biochemistry, 1977, 16(3): 375 - 380.

(收稿日期：2001-06-28)

应用肺动脉控制阻断术扩大切除晚期肺癌

李春江* 杨阿久* 周 钢**

影响肺癌手术治疗的最主要因素是肿瘤向肺门及心血管等重要部位的浸润和转移。据统计能够接受外科手术的肺癌，仅占全部肺癌病例的约 20%[1]，而绝大部分病人却因此失去了手术治疗的机会。近年来，作者应用肺动脉控制阻断术，对常规手术方法不能手术的 III 和 IV 期肺癌，进行了扩大切除治疗，并收到了较好的疗效。

一、临床资料

1993 年 ~ 1999 年，共手术治疗肺癌 105 例，其中周围型肺癌 40 例，中心型 65 例。肺叶切除(包括全肺或双肺叶)85 例，肺段切除 7 例，剖胸探查术 15 例。术后病理诊断：鳞癌 57 例；腺癌 39 例；未分化癌 9 例。将资料进一步分成 2 组，前三年组和后三年组。结果前 3 年组的手术切除率为 79%(34/43)，后三年组的手术切除率为 90%(56/62)，两组间经统计，差异显著($P < 0.05$)。两组的手术方法：前三年组手术方法仅为常规的肺叶和肺段切除并淋巴结清除术。后三年组在前三年组常规术式的基础上，对其中的 15 例癌瘤或淋巴结严重侵及心肺大血管，常规手术方法切除难度大或不能切除的病例，采用肺动脉控制阻断的手术方法，结果顺利切除了肺癌和彻底清扫了淋巴结。后三年组无手术死亡及大出血，无术后支气管残留癌和严重并发症。

* 作者单位：156700 黑龙江省饶河县人民医院外科
** 佳木市大学附属一院胸心外科