维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)04-0591-03

血红蛋白测定方法抗干扰能力的比较

程朝英[1],廖 蓉[1],夏 丽[2],李生兵[3],郭 睿[3],赵利娜[3],廖 飞[3]

(1.重庆市第八人民医院内科,重庆 400015;2.重庆医科大学附属第一医院;3.重庆医科大学生物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨抗氧化体系干预物质和维生素 C(VC)对血红蛋白(Hb)测定的干扰。方法:兔红细胞溶血后为样品。比较抗氧化酶抑制剂和 VC 对直接测定 Hb、测定碱化 Hb、测定叠氮 Hb 等的干扰。结果:直接测定 Hb 吸收、测定叠氮 Hb 都受到 VC、超氧化物歧化酶抑制剂、过氧化氢酶抑制剂等的干扰,碘乙酰胺和谷胱甘肽过氧化物酶抑制剂干扰较小。上述物质对测定碱化 Hb 几乎没有干扰。结论:测定碱化 Hb 用于评价高浓度 VC 的溶血作用和机制更可靠。

【关键词】血红蛋白测定;维生素 C;抗氧化体系;碱化血红蛋白;溶血

【中国图书分类法分类号】Q503 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-03-02

Resistance of different methods of hemoglobin assay to common interference

CHENG Chaoying, et al

(*The 8th Renming Hospital of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of common inhibitors of the antioxidation system and vitamin C on the measurement of hemoglobin (Hb). *Methods*: Hemolyzed rabbit red blood cell was used as the sample. The interferences of common inhibitors of the antioxidation system on assay of Hb by its absorbance at 540nm, alkalinized Hb by absorbance at 575nm, the azide-Hb complex by absorbance at 542nm were compared. *Results*: Vitamin C and the inhibitors of superoxide dismutase, catalase exhibited larger interferences with direct assay of Hb by absorbance at 540 nm and the assay of azide-Hb, and inhibitor of GSH and GSH peroxidase showed smaller effects. The assay of alkalinized Hb exhibited the strongest resistance to all these chemicals. *Conclusion*: The assay of alkalinized Hb shows the strongest resistance to common chemicals used to investigate the mechanism of peroxidative damage and can be applicable to the study of the mechanism of vitamin C-induced hemolysis.

【Key words】Hemoglobin assay; Vitamin C; Antioxidation system; Alkalinized hemoglobin; Hemolysis

维生素 C(VC)是经典抗氧化剂。通常认为大剂量 VC 没有毒性。但高浓度 VC 离体可促疲劳[1],在体可造成 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏患者急性溶血[2,3]。已证实 VC 和血红蛋白(Hb)等含铁复合物的相互作用可使其成为促氧化剂[4,5]。红细胞富含 Hb,故大剂量 VC 在体内可能有氧化溶血毒性。测定溶血最简单而可靠的指标是血红蛋白的释放。抗氧化体系干预物质常用于考察溶血机制[6]。但这类干预物质和高浓度 VC 对常用 Hb 测定方法有无干扰几乎没有报道。本文比较抗氧化体系干预物质和 VC 对测定 Hb 的干扰,为考察高浓度 VC 可能具有的诱发溶血作用和其机制奠定基础。

作者介绍:程朝英(1955-)女,副主任医师,主要研究方向:药物性肝脏疾病。

基金项目:重庆市教委高校首批优秀中青年骨干教师(廖飞)和重庆市科委应用基础项目(2002-7305)。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC)、N,N-二(β-氯已基)-N'-硝基脲(Carmustine,CAR)、氨基三唑(ATA)、碘乙酰胺(IAA)等购自 sigma。其余试剂为国产分析纯。重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 红细胞和血红蛋白的制备 健康家兔颈动脉取血,生理盐水洗,TGL 80-2 离心机 2000r/min 离心 5min 洗 4 次得压积红细胞。压积红细胞按 1:4 体积比用双蒸水稀释,加 0.1% 的 NP-40,漩涡振荡 10min,超声破碎 30min,4℃放置 24h 后 3000r/min 离心 20min,取上层清液 4℃储存备用。

1.2.2 血红蛋白(Hb)测定方法 Hb 吸收直接测定法(A_{540}):生理盐水 1ml 加 0.20ml 样品,反应 10min 测定 540nm 吸收。碱化血红蛋白法(A_{575})[7]:0.12mol/L NaOH 1.0ml 加 0.2ml 样品,反应 10min 后测 575nm 吸收。叠氮高

维普资讯 http://www.cqvip.com

铁血红蛋白法(A_{542})[8]:试剂照文献。显色原液棕色瓶 4℃储存,用水以 1:9 稀释后为测定液。1ml 测定液加 200μl 样品混匀,10min 后测定 542nm 吸收。其改进为测定液中叠氮钠浓度增加 1 倍、铁氰化钾浓度增加 8 倍,其余不变。

1.3 统计学分析

结果为均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。用 SAS 8.2 作统计分析,用 t 检验比较均值,F 检验比较标准差。

2 结 果

2.1 VC 对不同方法测定 Hb 的影响

测定碱化血红蛋白对 VC 抵抗性最强,5.0mmol/L 的 VC 也无明显影响。VC 浓度依赖性地降低血红蛋白在 540nm 的吸收。VC 低于 0.050mmol/L 对测定叠氮高铁血红蛋白无干扰;但高浓度 VC 造成正干扰,10.0mmol/L VC 时反应体系出现沉淀。增加叠氮离子和铁氰化钾可使 0.50mmol/L 以下 VC 无干扰,但降低了灵敏度,且仍无法消除高浓度 VC 的干扰。

2.2 常见抗氧化干预物质的影响

超氧化物歧化酶抑制剂 (DDC)、封闭巯基的碘已酰胺(IAA)、谷光甘肽还原酶抑制剂 (CAR)、过氧化氢酶抑制剂氨基三唑(ATA)在常用有效浓度下对测定碱化血红蛋白都无干扰。DDC 对测定叠氮高铁血红蛋白有明显正干扰,且增加高铁氰化钾浓度则更易出现沉淀。但 DDC 可拮抗 VC 造成的 Hb 吸收降低。IAA 对直接测定 Hb 吸收无明显干扰,但使 VC 造成的叠氮高铁血红蛋白测定正干扰更显著。相对而言,CAR 和 ATA 对常用方法测定 Hb 的干扰最弱,与 VC 对测定 Hb 的干扰也无交叉影响。

A_{540}表示直接测定 Hb 吸收,A_{575}表示测定碱化 Hb,A_{542}表示测定叠氮 Hb。抑制剂终浓度分别为 DDC 10.0mmol/L, ATA 40mmol/L, CAR 10.0μmol/L, IAA 0.20mmol/L。全部为 3 次重复测定。

2.3 不同方法测定 Hb 的响应曲线比较

直接测定 Hb 吸收灵敏度最高。叠氮高铁血红蛋白测定方法线性关系最好,灵敏度也高。相反,碱化血红蛋白测定灵敏度最低。但在 VC 和其它各种干扰物质同时存在下,测定碱化血红蛋白响应曲线的斜率和截距依然没有明显变化(表 2)。

表 1 VC 和常见抑制剂对 Hb 测定的干扰

抑制剂	Vc, mmol/L	A_{540}	A_{575}	A_{542}
None	0.00	0.629 ± 0.003	0.279 ± 0.004	0.467 ± 0.003
	2.00	0.416 ± 0.011*	0.283 ± 0.005	0.524 ± 0.008*
DDC	0.00	0.680 ± 0.018[a]	0.274 ± 0.005	0.624 ± 0.004[a]
	2.00	0.674 ± 0.041	0.278 ± 0.002	0.653 ± 0.010*
IAA	0.00	0.670 ± 0.005[a]	0.282 ± 0.003	0.469 ± 0.004
	2.00	0.414 ± 0.030*	0.282 ± 0.005	0.506 ± 0.009*
ATA	0.00	0.628 ± 0.020	0.274 ± 0.006	0.468 ± 0.029
	2.00	0.615 ± 0.010	0.279 ± 0.005	0.534 ± 0.009*
CAR	0.00	0.631 ± 0.002	0.276 ± 0.006	0.464 ± 0.004
	2.00	0.408 ± 0.001*	0.286 ± 0.006	0.483 ± 0.014*
All[b]	0.00	0.663 ± 0.015[a]	0.283 ± 0.005	0.666 ± 0.002[a]
	2.00	0.648 ± 0.012	0.279 ± 0.006	0.756 ± 0.023

* $P<0.05$ versus that without 2.0 mmol/L VC, a $P<0.05$ versus that without the specified inhibitor(s). b In the presence of DDC, IAA, ATA, CAR plus 2.0 mmol/L VC.

表 2 不同方法测定血红蛋白的响应曲线比较

(血红蛋白浓度 x = 0 ~ 27.8mg/ml)。

方法	线性响应曲线方程	r^2
直接测定 Hb 法	$A_{540} = -0.0287 + 0.034x$	0.999
碱化血红蛋白法	$A_{575} = 0.015 + 0.014x$	0.995
叠氮高铁血红素法	$A_{542} = 0.007 + 0.026x$	0.999
碱化血红蛋白法[a]	$A_{575} = 0.022 + 0.014x$	0.997

[a] 测定体系含 2.0mmol/L VC, DDC, Carmustine, ATA 和碘乙酰胺等干扰物质。有无干扰时测定碱化血红蛋白响应曲线的截距和斜率都无差异($P>0.48$)。r^2 为决定系数。

3 讨 论

VC 可还原血红蛋白为亚铁血红蛋白,降低其在 540nm 吸收。增加铁氰化钾降低了低浓度 VC 对测定叠氮高铁血红蛋白的正干扰,却增加高浓度 VC 的正干扰,故 VC 干扰可能来自其还原性。SOD 抑制剂 DDC 对测定叠氮高铁血红蛋白的干扰也可能来自其所含负二价硫的还原性。氨基三唑高浓度下

维普资讯 http://www.cqvip.com

才有效。其在所用浓度下对 VC 造成的 Hb 测定干扰的改变机制不清。巯基封闭剂和谷胱甘肽还原酶抑制剂所用浓度最低,化学反应活性弱,干扰也最小。

总体而言,只有测定碱化血红蛋白才基本不受 VC 和抗氧化体系干预物质的影响。其它常用测定 Hb 方法都不宜用于考察高浓度 VC 的促溶血作用和机制。VC 促溶血需较长作用时间。乳酸脱氢酶稳定性有限,其释放不能可靠反映溶血[9]。因此,常用方法中只有测定碱化血红蛋白可考察高浓度 VC 的溶血作用和机制。用此方法发现,内源性抗氧化能力是高浓度 VC 对健康人红细胞没有毒副作用的关键原因(待发表结果)。

(本文通讯作者:廖飞(重庆医科大学生物化学教研室,重庆 400016. Tel: 86 - 23 - 68485073, Fax: 86 - 23 - 68485111. E - mail: liaofeish@vip.sina.com)。同时对本校 2001 级七年制学生李生兵和郭睿表示感谢。)

参 考 文 献

[1] 廖 飞,郑荣梁,陈富裕. 高浓度维生素 C 抑制离体蟾蜍腓肠肌收缩能力[J]. 中国应用生理学杂志,2000;16(3):230 - 234.

[2] Campbell G D, Steinberg M H, Bower J D. Ascorbic acid - induced homolysis in G - 6 - PD deficiency[J]. Annals Intern Med, 1975;82(6):810.

[3] 唐志浩,程琼俊,卢桂森,等. 大剂量维生素 C 致葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶缺乏患者发生急性溶血 1 例[J]. 中华血液学杂志,1999;20(10):545.

[4] Miller D M Aust S D. Studies of ascorbate - dependent, iron - catalyzed lipid peroxidation[J]. Arch Biochem Biophys, 1989;271(1):113 - 119.

[5] Levy A, Zhang L, Rifkind J M. Hemoglobin: a source of superoxide radiacal under hypoxic conditions[M]. In Oxy - radicals in molecular Biology and Pathology, New York: Alan R Liss, Inc., 1988;11 - 25.

[6] Michels C, Remacle J. Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to reveal its physiological importance[J]. Eur J Biochem, 1988;177(2):435 - 441.

[7] 卢淑文. 碱化血红蛋白光电比色法[M]. 北京:人民卫生出版社,1996;197 - 198.

[8] Vanzetti G. An azide - methemoglobin method for hemoglobin determination in blood[J]. J Lab Clin Med, 1966;67(1):116 - 126.

[9] 杨 晓,廖 飞,华 燚,等. 高浓度维生素 C 诱导离体的人红细胞溶血[J]. 中国应用生理学杂志,2003,19(3S):69.

(上接第 583 页)

药物效应更明显且无副作用。

LF 和 VLF 频谱能量相对值在使用阿托品后均减小,而在使用美托洛尔后均增加,相比之下,LF 变化的幅度比 VLF 大,可能提示 VLF 和 LF 均反映迷走和交感神经的双重活性,但其中各占比例或优势不一。这些需要扩大病例数以及应用于临床后进一步加以观察和验证。

本文初步显示了使用联合研制的心率变异计算机分析软件,ULF 频谱能较好的反映纯交感神经的作用。采用该心率变异分析软件对纯心脏 VVI 起搏病人 30min 心电信号分析显示 ULF 和 VLF 均为 0,提示其有很好的准确性和有效性。

参 考 文 献

[1] Berntson GG, Bigger JT, Eckberg DL, et al. HRV: Origins, methods, and interpretive caveats[J]. Psychophysiology, 1997;34(6):623 - 648.

[2] 中国心血管病杂志编委会心率变异性对策专题组. 心率变异性检测临床应用的建议[J]. 中华心血管病杂志,1998;26(4):252 - 255.

[3] 陆再英. 心率变异分析方法学的标准化及结果的正确评价[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,1996;10(4):222 - 224.

[4] 陈运贞,雷 寒,谢 杨,等. 检测心脏植物神经活性的定量方法[J]. 中华心血管病杂志,1992;20(2):101 - 103.