不高,我们的结果也证实了这一点。所提RNA经TE 70 ℃孵育60 min去修饰处理后,RT-PCR效率得到相当程度的提高,其中福尔马林固定16 h的FFPE淋巴组织扩增出19个片段(总共22个预期片段)。但是,这种RT-PCR效率的恢复随福尔马林固定时间的延长而降低,表明不可逆修饰(相邻碱基二聚体形成)增加。由于碱基A的修饰率最高,形成相邻碱基二聚体的可能性增加,因此,寡聚(dT)作为逆转录引物与mRNA多聚A退火可能受到抑制。同时,不同固定时间淋巴组织所提RNA经RT-PCR扩出的片段并不完全重合,表明RNA的这些修饰是随机的。

综上所述,我们认为从FFPE组织提取RNA是可行的,但要注意5个要点:①宜采用蛋白酶K消化后提取;②用磷酸盐缓冲的10%中性福尔马林固定,时间应限制在24 h以内;③提取的RNA最好经TE 70 ℃孵育60 min去修饰处理;③所选择扩增的目的片段限制在1 000 bp以内,100~300 bp片段的扩增效率更高。⑤综合应用寡聚(dT)和随机引物作为逆转录引物,可能有助于提高逆转录效率。

关键词:RNA;淋巴组织;RT-PCR
中图法分类号:R322.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 章 容,郭乔楠,麻 莉,等. PCR检测非霍奇金淋巴瘤IgH和TCRβ基因重排[J]. 第三军医大学学报,2003,25(4):347-348.
[2] Korbler T, Grskovic M, Dominis M, *et al*. A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 74(3): 336-340.
[3] Ohe N, Saio M, Kijima M, *et al*. *In situ* detection of O6-methylguanine-DNA methyltransferase messenger RNA in paraffin-embedded human astrocytic tumor tissues by nested *in situ* RT-PCR is useful in predicting chemotherapy-resistance of tumors[J]. Int J Oncol, 2003, 22(3): 543-549.
[4] Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies[J]. Methods, 2001, 25(4): 409-418.
[5] Beaulieux F, Berger M M, Tcheng R, *et al*. RNA extraction and RT-PCR procedures adapted for the detection of enterovirus sequences from frozen and paraffin-embedded formalin-fixed spinal cord samples[J]. J Virol Methods, 2003, 107(2): 115-120.
[6] Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, *et al*. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(22): 4436-4443.
[7] Kurt R A, Park J A, Panelli M C, *et al*. T lymphocytes infiltrating sites of tumor rejection and progression display identical V beta usage but different cytotoxic activities[J]. J Immunol, 1995, 154(8): 3969-3974.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2004)02-0171-02

技术方法

微量元素硒、锰、氟对SOD活性的影响

Effects of microelements Se, Mn, and F on SOD activity

赵先英,刘毅敏,覃 军,王祥智,赵华文 (第三军医大学基础医学部化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨微量元素硒、锰、氟对SOD活性的影响。方法 采用Vit C阻断法测定了不同浓度Se、Mn、F对SOD活性的影响。结果 ①Se浓度由0 μg/L增加到40.0 μg/L时,SOD活性由5 100 U/mg上升到5 400 U/mg;Se浓度继续增加到60.0 μg/l,SOD活性下降至5 140 U/mg;②Mn浓度由0 μg/L增加到400 μg/L,SOD活性由5 100 U/mg上升到5 900 U/mg;Mn浓度继续增加500 μg/l,SOD活性下降5 200 U/mg;③F浓度由0 μg/L增加到100 μg/L,SOD活性由5 100 U/mg上升至5 280 U/mg;继续增加F浓度到200 μg/L,SOD活性下降为5170 U/mg;再增加F浓度至400 μg/l,600 μg/l,800 μg/L,SOD活性基本维持在5 200~5 180 U/mg之间。结论 微量元素Se、Mn、F与抗氧化物酶SOD活性具有密切关系,低浓度Se、Mn、F对SOD活性起激活效应,高浓度Se、Mn、F对SOD活性起抑制效应。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一类重要的金属酶,能催化超氧阴离子自由基(O_2^-)发生歧化反应:$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ 从而将其清除。根据金属辅基的不同,可将其分为3类:Cu Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD。文献[1,2]证明,SOD活性受微量元素Cu、Zn、Fe影响较大。而SOD活性与人体内其它重要微量元素Se、Mn、F关系如何,则少见详细体外实验报道。为此,本实验用Vit C阻断法测定了不同浓度Se、Mn、F对SOD活性的影响,并从得出了一些有意义的结论。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

SOD:Sigma试剂;SOD标准液:用0.05 mol/L、pH 10.2的Na_2CO_3-$NaHCO_3$缓冲液配制,浓度为0.04 mg/ml,比活力为5 100 U/mg;Se标准液:准确称取一定量的Na_2SeO_3,用双蒸水配成含Se 100 μg/L的应用液备用;Mn标准液:准确称取一定量$MnCl_2$,

作者简介:赵先英(1966-),女,河南省郸城县人,硕士,副教授,主要从事微量元素方面的研究。电话:(023)68752216

收稿日期:2002-11-27;修回日期:2003-05-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用双蒸水配成含Mn 1.0 mg/L应用液备用；F标准液：准确称取一定量的NaF，用双蒸水配成含F 1.0 mg/L应用液备用；pH 10.2的Na_2CO_3-$NaHCO_3$缓冲液，1.0×10^{-3} mol/L肾上腺素溶液，1% Vit C溶液。以上试剂如未特别说明，均为国产分析纯试剂。7520型紫外可见分光光度计（上海第二分析仪器厂）。

1.2 实验方法

1.2.1 Vit C阻断法测定肾上腺素自氧化率[3] 在10 ml小烧杯中，依次加入pH 10.2的Na_2CO_3-$NaHCO_3$缓冲液2.5 ml，双蒸水2.0 ml，肾上腺素1.0 ml，立即混匀，待肾上腺素自氧化反应准确进行2 min后，迅速加入1% Vit C 0.5 ml，室温下放置2 min后，于40 min内每隔30 s测定一次A_{320}。以t～A作图，所得曲线的斜率即为肾上腺素的自氧化率V_0。

1.2.2 SOD活力测定加样条件 按表1所示，在Na_2CO_3-$NaHCO_3$缓冲液中，加入一定量的标准SOD液及ME标准液，用阻断法测定肾上腺素自氧化率VX。

表1 Vit C阻断法测定SOD活性及Se、Mn、F浓度对SOD活性的反应系统

试剂	空白管	SOD管	ME影响SOD管
pH 10.2 Na_2CO_3-$NaHCO_3$液(ml)	2.5	2.5	2.5
双蒸水(ml)	2.0	1.0	1.0-X
1.0(10^{-3} mol·L^{-1})肾上腺素液(ml)	1.0	1.0	1.0
1% Vitc液(ml)	0.5	0.5	0.5
ME标准液(ml)	-		X
标准SOD(ml)	-	1.0	1.0
标准SOD浓度(mg·ml^{-1})		6.7×10^{-3}	6.7×10^{-3}

*：(1)体系总体积为6 ml；(2)ME：①Se Mn F；②Se：0.00，10.0，20.0，30.0，40.0，50.0 μg·L^{-1}；③Mn：0.00，50.0，100.0，200.0，300.0，400.0，500.0，600.0 μg·L^{-1}；④F：0.00，50.0，100.0，200.0，300.0，400.0，600.0，800.0 μg·L^{-1}

酶活单位定义：在一定条件下，1 ml反应液中，每分钟控制肾上腺素在320 nm处的自氧化率达50%的酶量定义为一个活力单位[4]。

根据下列公式，计算SOD的单位活力：

$$SOD(U/ml)=\frac{V_0-V_X}{V_0}\times\frac{V_{总}}{V_{定义体积}}\times\frac{稀释倍数}{取酶体积}$$

公式中，$V_{总}$：$V_{定义体积}$=6：1

且SOD的单位活力与比活力之间满足下列关系：

$$SOD(U/mg)=\frac{V_{总}\times SOD(U/ml)}{M_{SOD}}$$

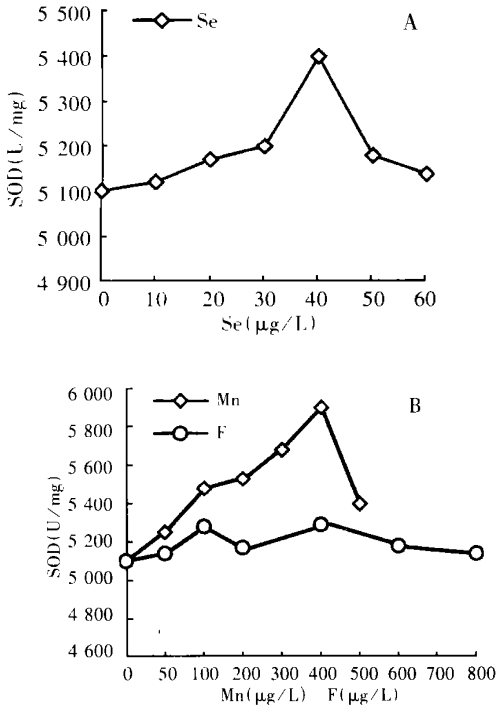
2 结果

2.1 Se、Mn、F对SOD活性影响

见表2、图1。

表2 Se、Mn、F对SOD活性影响

编号	Se		Mn		F	
	浓度(μg·L^{-1})	SOD活性(U·mg^{-1})	浓度(μg·L^{-1})	SOD活性(U·mg^{-1})	浓度(μg·L^{-1})	SOD活性(U·mg^{-1})
1	0.00	5 100	0.00	5 100	0.00	5 100
2	10.00	5 120	50.00	5 250	50.00	5 140
3	20.00	5 170	100.00	5 480	100.00	5 280
4	30.00	5 200	200.00	5 530	200.00	5 170
5	40.00	5 400	300.00	5 680	400.00	5 290
6	50.00	5 180	400.00	5 900	600.00	5 180
7	60.00	5 140	500.00	5 200	800.00	5 180



A：Se；B：Mn，F

图1 Se、Mn、F对SOD活性的影响

2.2 Se、Mn、F对SOD活性的影响

由表2及图1可知：①Se对SOD活性的影响并不是单纯的递增或递减关系。随着体系中Se浓度的增加，SOD活性逐渐增大。当Se浓度由0 μg/L增加到40.0 μg/L时，SOD活性由5 100 U/mg上升到5 400 U/mg；Se浓度继续增加到60.0 μg/L，SOD活性下降至5 140 U/mg；②Mn对SOD活性的影响同样也不是单纯的递增或递减关系。随着体系中Mn浓度的增加，SOD活性逐渐增大。当Mn浓度由0 μg/L增加到400 μg/L，SOD活性由5 100 U/mg上升到5 900 U/mg；Mn浓度继续增加500 μg/L，SOD活性下降5 200 U/mg；③F对SOD活性的影响则更为复杂。当体系中F浓度由0 μg/L增加到100 μg/L，SOD活性由5 100 U/mg上升至5 280 U/mg；继续增加F浓度到200 μg/L，SOD活性下降至5 170 U/mg；再继续增加F浓度至400 μg/L，600 μg/L，800 μg/L时，SOD活性基本维持在5 200～5 180 U/mg。

3 讨论

SOD作为体内重要的清除活性氧的金属酶，其活性的相对稳定对维持机体的正常生理功能极为重要。Se作为体内重要必需微量元素，直接参与机体重要抗氧化酶——谷胱苷肽过氧化物酶(GSH-PX)的组成，它能催化有毒的过氧化物还原为无害的羟基化合物，从而保护生物膜不被氧化降解。当Se浓度过高或过低时，均可引起机体抗氧化酶系的紊乱及机体的氧化损伤。本实验证明，Se不仅直接参与了抗氧化酶GSH-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PX 的构成，同时其浓度的高低也直接与 SOD 活性密切相关。只有在适当浓度时，其方可维持 SOD 具有较大的活性。而 Mn 作为体内重要的必需微量元素，其直接参与了 Mn-SOD 的构成。如果 Mn-SOD 的活性降低到相当程度，产生过量的自由基，可引发脂质过氧化反应，从而对生物膜产生有害的影响。很多试验都证明了食物中 Mn 含量低，可导致 Mn-SOD 活性下降。例如，断奶大鼠饲以低 Mn（0.75 mg/kg 饲料）和适量 Mn（22 mg/kg 饲料）的饲料，历时 2 月，结果显示，低 Mn 组大鼠心和肝脏的 Mn 浓度仅为适量组的 56%，且心脏的 Mn-SOD 活性仅及适量 Mn 组的 57%，不利于保护心脏线粒体免受脂质过氧化之害[5]。本实验从体外进一步证明，低浓度的 Mn 对 SOD 活性起应激效应，即当 Mn 浓度由 0 μg/L 增加到 400 μg/L，SOD 活性由 5 100 U/mg 上升到 5 900 U/mg；而高浓度 Mn，则对 SOD 活性起抑制作用，即当 Mn 浓度增加到 500 μg/L 时，SOD 活性下降为 5 200 U/mg。而 F 作为生物体内重要的必需微量元素，其含量高低对 SOD 活性也有较大的影响。本实验证明，只有当 F 维持适当浓度范围时，SOD 才有较大活性。

本实验结果提示：微量元素 Se、Mn、F 与抗氧化物酶 SOD 活性具有密切关系；只有当微量元素在适当的浓度范围时，SOD 活性才可达最高；低浓度 Se、Mn、F 对 SOD 活性起激活效应，高浓度 Se、Mn、F 对 SOD 活性起抑制效应。因此，在治疗某些因微量元素缺乏而产生的疾病时，应考虑体内的最适浓度，切不可给予过量补充，以免引起体内其它物质的代谢紊乱和疾病。

关键词：超氧化物歧化酶；硒；锰；氟
中图法分类号：Q554　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘　军. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 天津药学，2000，12(4)：23－24.
[2] 徐　荷. 超氧化物歧化酶与微量元素、热休克蛋白的关系[J]. 现代预防药学，1998，25(2)：226－228.
[3] 赵先英，刘毅敏. 抗坏血酸为阻断剂肾上腺素法测定超氧化物歧化酶活力[J]. 药物生物技术，1996，3(3)：147－149.
[4] 李　力. 超氧化物歧化酶分析方法进展[J]. 内蒙古预防治研究，1995，20(1)：43－44.
[5] 颜世铭，洪昭毅，李增喜. 实用元素医学[M]. 郑州：河南医科大学出版社，1999. 231－232.

（编辑　张大春）

文章编号：1000-5404(2004)02-0173-02

技术方法

PELA-BSA 微球体外释药特性与释药方程

Characteristics of PELA microspheres loaded with BSA and the drug-release equations

任建敏，肖正华，张梦军　（第三军医大学医学检验系分析化学教研室，重庆 400038）

提　要：目的　研究白蛋白 PELA 微球的体外释药特性，得出释药方程。方法　应用复乳法制备牛白蛋白 PELA 微球，探讨亲水相大分子β-CD、PEG、明胶对“爆释作用”影响，并对实验数据应用计算机拟合，获得通用的微球释药方程。结果　内水相的亲水大分子在提高微球蛋白运载量、成球率的同时，可降低牛白蛋白爆释率 65%以上；运用计算机编程得出的释药方程，其释药量随时间 t 的指数成正比，t 的指数值大多在 1/2 和 1 范围内。结论　通用释药方程更符合控释微球的实际释药，适用性更广。

可生物降解材料作为药物载体，特别是作为运载蛋白质、多肽的微球载体，已引起人们的极大关注[1~4]。聚乙二醇改性聚乳酸共聚物（PELA）其亲水性与生物相容性优于聚乳酸（PLA）及聚乳酸与乙醇酸共聚物（PLGA），但运载蛋白质、多肽等药物时，在生物介质中，扩散速度快，难以实现长效缓释。为了解决这些问题，我们以牛白蛋白（bovine serum albumin，BSA）为药物模型，应用复乳法制备 PELA-BSA 微球，探讨内水相中一些亲水大分子如β-CD、PEG、明胶等对释药特性的影响，并对体外释药数据应用计算机编程，获得拟合的释药通用方程。

1　材料与方法

1.1　材料

聚乙二醇改性聚乳酸 PELA[PLA-PEG2000]（95∶5）：特性粘度 0.022 8 ml/g（在 25 ℃，用四氢呋喃为溶剂，粘度法测得）。牛

作者简介：任建敏（1964－），男，四川省渠县人，博士，副教授，主要从事生物分析化学与药物新制剂的教学与科研方面的研究。电话：（023）68753046

收稿日期：2003-04-07；修回日期：2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net