DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.023

简易、灵敏的超氧化物歧化酶活力测定法

A simple and sensitive method for the measurement of superoxide dismutse activity

冯华芳 高丽清 (第三军医大学西南医院检验科) 630038

超氧化物歧化酶(E.C 1.15.1.1.简称SOD)是一类存在于生物体内的金属酶,能专一地催化超氧自由基发生歧化反应。该酶活性的测定对医学、生物物理学等的研究愈来愈显示其重要性。我们参考有关报道[1],建立了红细胞SOD活力测定法,现将方法介绍如下。

1 原理

次黄嘌呤(hypoxanthine)、黄嘌呤氧化酶(XOD)反应生成的超氧自由基能使试剂中的羟胺氧化为亚硝酸盐,亚硝酸盐与氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺行重氮反应生成红色化合物。由于SOD能专一地清除超氧自由基,故能抑制此反应的进行,因而可根据抑制率的高低,计算出样本中SOD亚硝基活力单位(NU)。

2 试剂

2.1 试剂Ⅰ

用78 mmol/L $Na_2B_4O_7$和104 mmol/L KH_2PO_4配成pH7.0的缓冲液,该缓冲液1 L中含次黄嘌呤1.0 mmol和盐酸羟胺1.0 mmol。

2.2 试剂Ⅱ

用78 mmol/L $Na_2B_4O_7$和104 mmol/L KH_2PO_4配成pH8.7的缓冲液,该缓冲液1 L中含EDTA·Na_2 0.5 mmol。用此液按10 ml加入黄嘌呤氧化酶30～35 μl(Sigma产品,5 U/0.5 ml)供用。加黄嘌呤氧化酶之试剂放4℃冰箱冷藏可使用约2个月。

2.3 试剂Ⅲ

(1)5.2 mmol/L对氨基苯磺酸,用160 ml/L(V/V)冰乙酸配制;(2)77.2 μmol/L盐酸萘乙二胺,用160 ml/L(V/V)冰乙酸配制。临用前将(1)(2)试剂等量混合为试剂Ⅲ供用。

以上试剂均存放于4℃冰箱。

3 方法

3.1 红细胞抽提液制备[2]

肝素抗凝血2 ml,离心分离血浆及白细胞层,红细胞层用3～4倍体积冷生理盐水洗涤两次,每次3 000转/min离心5 min,除去上层清液,下层红细胞加冷蒸馏水约3倍体积,振摇,使溶血,测血红蛋白,并调节至50 g/L,取该溶血液0.5 ml,加1.5 ml冷蒸馏水,振摇使其充分溶血(如不调节血红蛋白至50 g/L,则可根据测得浓度按此比例取溶血液和冷蒸馏水),加无水乙醇0.5 ml,三氯甲烷0.3 ml,于快速混合器上混合约1 min,稍置,3 000转/min离心5 min,上层清晰透明之水——乙醇混合液即为10 g/L血红蛋白的红细胞SOD抽提液,取出备用。

3.2 SOD活力测定

将上述红细胞提取液用蒸馏水稀释20倍,按表1测定酶活力。

表1 酶活力测定加样表(μl)

管号	对照管(3管)	20倍稀释红细胞提取液(相当未稀释提取液)△		
		50 (2.5)	100 (5.0)	200 (10.0)
蒸馏水	600	550	500	400
试剂Ⅰ	200	200	200	200
试剂Ⅱ(已加XOD)	200	200	200	200
混匀,37℃水浴30 min				
试剂Ⅲ	2000	2000	2000	2000
混匀,置30℃水浴15 min呈色				

△:未稀释提取液为血红蛋白10 g/L之红细胞提取液

取出,静置室温15 min,用蒸馏水调零,在分光光度计550 nm处比色,记录各管吸光度。

3.3 酶单位定义

一个亚硝基单位(NU)是指在特定条件下对氧化羟胺产生50%的抑制所需的酶量。

3.4 酶活力单位计算

(1)按下式求出各测定管酶抑制率:

$$\text{酶抑制率}=\frac{\text{对照管平均A}-\text{测定管A}}{\text{对照管平均A}}\times 100\%$$

以抑制率为纵座标,未稀释10 g/L血红蛋白红细胞提取液(μl)为横座标,在半对数纸上绘出抑制曲线,找出抑制50%时对应的红细胞提取液微升数,再按下式求出每毫克血红蛋白所含酶活力单位(NU/mg·Hb)。

(2)酶活力单位计算式:

$$\frac{100000}{V}\times\frac{1}{1000}=\text{SOD NU/mg·Hb}$$

V:抑制50%时红细胞提取液微升数

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

酶活力曲线示例见图1。

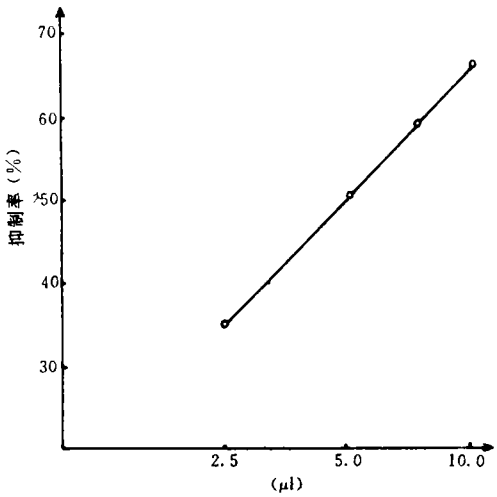


图1 酶活力曲线(红细胞提取液)

4 结果与讨论

4.1 重氮反应产物光谱曲线

用 BECKMAN DU－7分光光度计取波长380～700 nm 扫描,有色物质的峰值在547 nm 处(见图2),故试验中取波长550 nm 比色。

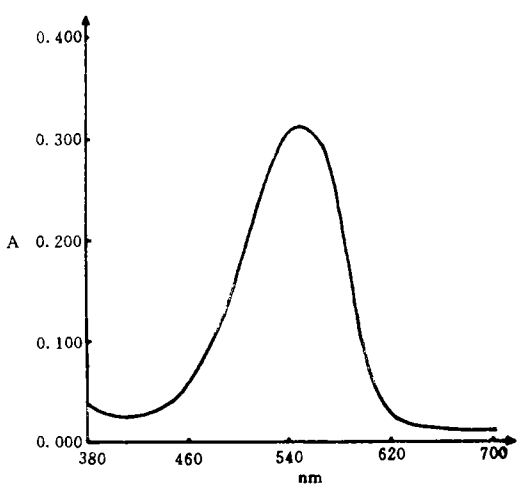


图2 有色产物光谱曲线

4.2 呈色稳定性

反应所生成的红色化合物稳定性良好,放置15 min 与3 h 比色抑制率无变化。

4.3 方法学指标

灵敏度:用系列酶标准液作出反应抑制曲线,抑制50%时的酶量为60 ng,每毫克酶蛋白为16 667 NU,灵敏度高于其他方法(见表2)。精密度:同一样本同时作10次测定,批内变异为4.75%;同一样本二周内分10次测定,批间变异为8.70%。

表2 与其它方法灵敏度之比较

方 法	作 者	抑制50%所需酶蛋白量(μg)	灵敏度高于他法之倍数
Cytochrome C	McCord,等	0.51	8.50
LDH+NADH	Oyanagui	0.20	3.33
PMS+NBT	Nishikimi	0.73	12.16
Phrogallol+NBT	Minami	0.55	9.17
Nitrite	Elstmer,等	0.12	2.00
Epinephrine	McCord,等	0.22	3.67
VB_2－NBT	冯华芳,等	0.08	1.33
VB_2－羟胺	汪义军,等	0.05	0.85
本 法	作者	0.06	

4.4 干扰试验

实验证明,用本法测定红细胞内 SOD 不受血浆内正常量的抗坏血酸盐、尿酸、还原型谷胱甘肽的干扰,血浆中存在的过氧化氢酶、铜兰蛋白对试验的灵敏度也无影响。且红细胞在抽提过程中经过两次洗涤,血浆成份已除,对试验可能产生一定影响的糖类也在洗涤和抽提中除去。因此,可以认为,本法与其它直接取末梢血作检测的方法所受的干扰要微。

4.5 正常参考值

测定101名健康人(年龄20～48岁,男48例,女53例)红细胞提取液 SOD 活力,从频率分布看,基本呈正态分布(见图3),中位数为21.5 NU/mg·Hb,范围为22.1±5.5($\bar{x}\pm s$)NU/mg·Hb。本年龄段以及男女性别均无显著差异。

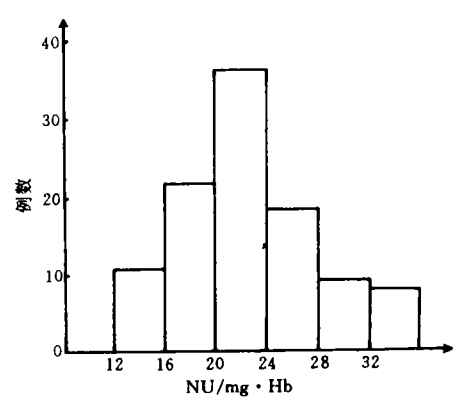


图3 101名健康人红细胞 SOD 频率分布

由于 SOD 所岐化的底物——超氧自由基是在反应体系中产生,因而,控制适量的超氧自由基浓度在实

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

验中至关重要。作者通过加入不同量的黄嘌呤氧化酶观察到，随着 XOD 量的增加，产生的超氧自由基也随之增加，而 SOD 在个体样本中是相对恒定的，因而出现随着 XOD 的增多和减少酶活性表达呈降低和升高的趋势。以5 μl 10 g/L 血红蛋白红细胞提取液实验为例，当 XOD 的浓度分别为15、30、45、60 μl/10 ml 时，其抑制率分别为52%、45%、34%、22%（见图4），说明

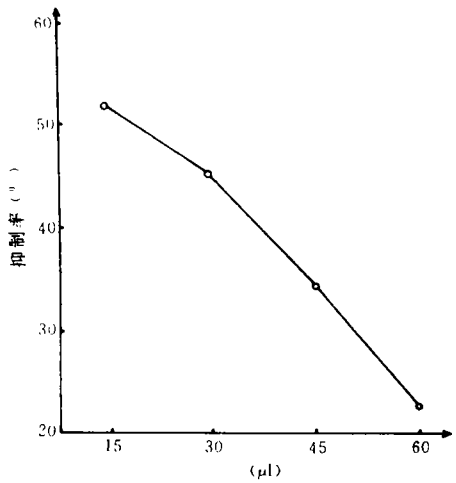


图4　不同浓度 XOD(XOD μl/10 ml)对酶活力的影响

XOD 的加入量是保证实验有良好的重现性和可比性的关键一环。应当说明的是不同厂家、不同批号的 XOD 以及保存时间、保存方法等均可使反应有一定差异，故应根据实际情况加入，使每次实验对照管的吸光度均值能保持在一定范围（本方法为0.300±0.02）。

由于酶活性是以血红蛋白所含单位表示，故低色素贫血患者可能出现 SOD 活性偏高，应予注意。

（方法建立中蒙博士生赵学同志提出参考意见，谨此致谢！）。

关键词　红细胞；超氧化物岐化酶类

中图法分类号　Q554.9

参考文献

1 Yoshihiko ŌYyanagui. Revaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Analytical Biochemistry，1984，142：290

2 Winterbourn CC，Hawkins RE，Brian M，et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med，1975，85：337

（收稿：1994-05-03；修回：1994-09-14）

（上接 356 页）

检钳展开时，嘱患者减小呼吸动度，不能用力咳嗽。如患者出现剧烈咳嗽，应立即关闭活检钳，以防损伤肺组织，形成气胸。

2.2.3　严密观察病情：注意患者有无发绀，观察心率、呼吸、面色及神志变化。出现呼吸急促者，给予吸氧3～4 L/min。患者口中分泌物应立即擦除，确保呼吸道通畅。术中可能出现支气管痉挛，呼吸心跳骤停，一旦发生异常情况，立即报告医生，停止操作，及时抢救。

2.3　*术后护理*

2.3.1　一般护理：拔管后患者卧床休息5～10 min，门诊患者观察30 min 后方可离去。禁食3 h。叮嘱患者不能用力咳嗽，同时说明可能发生的一些反应，如鼻腔、咽喉不适、疼痛、声嘶等。发生上述症状，不必处理，1～2日可自愈。

2.3.2　咯血的观察及护理：本组560例患者 BF 检查后，少量咯血者占82.5%，表现为痰中带血或少量血性痰液，其原因主要是 BF 导管对支气管壁摩擦，细胞刷检或活检后粘膜被刷破或撕裂所致的创伤性出血。未经特殊处理，上述患者2～3 d 内咯血均自愈。对于这类患者，应告之不必紧张，注意观察血丝或血块颜色，有无进行性咯血增多，当咯血总量＞50 ml 时，立即报告医生。3例患者拔管后即出现大咯血。大咯血的处理：①患者取患侧卧位，及时清除口、鼻腔内的血凝块，保持呼吸道通畅。②吸氧，建立输液通道。③肌注安定10 mg，立止血1 u 加入5%葡萄糖20 ml 内静注，垂体后叶素10 u 加入5%葡萄糖500 ml 内静滴，10～15滴/min。经及时抢救，3例大咯血患者病情缓解，无1例死亡。

2.3.3　体温的观察：BF 检查后，大多数患者体温正常，少数出现发热。本组560例患者中7例体温37.5～38℃，未做特殊处理自愈。对于低热患者，应密切观察体温变化趋势，当温度超过39℃，应及时照 X 线胸片，排除支气管异物，做细菌培养药敏试验。2例体温39℃以上，根据病情、体症、血象等，给予退热、抗感染治疗。3 d 后体温降至正常。

2.3.4　呼吸的观察：本组1例患者术中发生呼吸困难，立即拔出 BF 导管，停止操作，给予吸氧，静注地塞米松10 mg，10 min 后缓解。术后无1例患者发生呼吸困难。本组未见气胸发生，但有报道气胸发生率为1～6%[3]，因此，术后应注意观察呼吸次数、深度，有无呼吸困难。如患者发生呼吸困难进行性加重，及时给予胸部 X 光透视、拍片。如确诊气胸，首先使患者保持镇静，卧床休息，吸氧，配合医生做好应急处理。

（承蒙张楚毅教授指导，谨此致谢！）

关键词　支气管镜术；护理

中图法分类号　R768.1

参考文献

1 王安潮，吴　彬. 纤维支气管镜检查在可疑肺结核诊断中的应用价值. 中华结核和呼吸系疾病杂志，1993，16(5)：264

2 贾友明，洪应中，张其英，等. 经纤维支气管镜肺活检对肺部疾病的诊断价值. 中华结核和呼吸系疾病杂志，1982，5(3)：131

3 周　新，朱邦英. 纤维支气管镜检查的并发症及其预防和治疗措施. 国外医学：呼吸系统分册，1982，1：8

（收稿：1994-03-29；修回：1994-09-19）

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