

# 嘉南藥理學院教師專題研究計畫成果報告

計畫名稱：Nitroblue tetrazolium 法檢測血中自由基活性

計畫編號：CNPH-89-04

執行期間：88年9月1日至89年6月30日

計畫類別：個別型

主持人：黃正財

## 摘要

A nitro blue derivative: XTT (3'-1-phenylamino-carbonyl-3,4-tetrazolium-bis-4-methoxy-6-nitro-benzenesulfonic acid hydrate) was used to react with superoxide generated from the xanthine xanthineoxidase reaction in plasma. The XO adduct product of XTT was known to be diformazone like substance, which was a brown color and could be detected by Uv-Vis at 480 nm. A calibration curve was established. This project was currently done in Chi-Mei Medical Center for advance study.

## 關鍵字

XTT, superoxide, diformazone, UV-Vis spectrum.

## 題目：臨床血中自由基濃度的分析

### 背景

Superoxide Dismutases(SODs)1) 是一特殊的 metalloproteins, 可以催化 hydrogen peroxide 及 molecular oxygen 的反應, 一般認為 SODs 在活細胞內扮有很重要的自由基傷害保護作用, 且被廣泛用於藥理及臨床生理機轉的研究. 自從 1973 年被發現迄今有關自由基及 SODs 的分析方法多有發表 2). 然而因為方便性及準確性的緣故, 迄今未有合適於臨床簡便之快速分析方法開發成功, 以至於各種 sod-like 物質之實際生體反應均因分析的界限, 而無法明確判識. 在前一研究: 我們已指出 chemiluminescent 分析方法的缺點, 並據以提出以 nitroblue tetrazolium 之 colorimetric 法分析 free radical 及 SODs 之生體反應關係, 此分析方法的確立實為研究 free radicals 之最重要課題. 生體分析方法不確立, 則相關各項生理研究均難於確實.

## 摘要

XTT(3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate)在 plasma 中被 xanthine-xanthine oxidase (XO) 產生之 superoxide anion 還原成水溶性之安定 formazon 物質, 此物於 480nm 有吸光, 由於此水溶性物質可以被輕易分離分析, 上述反應可應用於臨床 free radical 和 SODs 之間之分析, 此 colorimetric 分析方法之準確性, 可以 hplc 法單離分析其反應產物而得以確知. 此法為迄今已知較適合臨床分析之方法.

## 緒言

Superoixide(XXO)之分析方包括 electron spin resonance ( ESR)3) chemiluminescent(CE)4) salicylic acid(SA)5) 以及 nitroblue tetrazolium(NTB)6)法等. 在體外化學分析上可以簡便而精準的分析, 然而由於研究 XXO 與健康關係的最終目的在於以 SODs 或 sod-like 等物阻絕 XXO 對人體的傷害, 任何在體外分析的 SODs 或 sod-like 最終皆需證明其於人體內仍有相似作用者方是有效, 然而上述分析方法皆因 ESR 分析的高度技術操做, CE 之 lucigenine 做為 luminator 時有半衰期太短的困擾 7), SA 分析

法則僅限於 on-line 的 hplc 分析, NTB 法雖可用於臨床分析但是由於其 reduced product 物質 diformazon 爲酯容性, 在生物檢  
品上易因細胞間的作用及萃取上的差異導至分析誤差大於 10%.  
由於 XXO 的體內臨床分析有上述諸多困難 故迄今未有有效臨  
床檢測體內 XXO 及 sod-like 等物相互作用之方法 甚至於常態  
與病態的體內的 XXO 濃度均未明確.

本計劃的目的在於改良 NTB 的反應, 並修正使用藥物使用  
allopurinol<sup>8</sup>) 或 pterine<sup>8</sup>)於 XO 的局部終止 free radical 產生法.  
使用 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]}-bis(4-  
methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate (XTT)和 XO 反應  
9} 分離其水溶性產物以中止反應 並以 UV-480nm 檢測其水溶  
性產物的量 以此直接檢測體內 XXO 的反應 此(XTT)和 XXO  
反應結果並以 hplc 分析確認其 UV 分析之準確度

## 實驗方法

### Chemicals and materials:

各項生物或化學試劑購自 Sigma Co. Ltd., (USA), Wako Chem.  
Co. Ltd., Japan 或 E Merck Co. Ltd., German 均爲特級試劑或  
分析特級試劑 hplc 購自 Gilson Co. Ltd., USA 離心機爲 Kubota

X-200, Kubota Co. Ltd., Japan, xanthine or hypoxanthine(50uM), xanthine oxidase(0.5 IU/2mL) EDTA(0.3 mM), ferrous sulfate (0.1mM), NTB(100uM)及 XTT(100uM)等均溶於 PBS 溶液中備用.

### XTT 標準濃度反應

將 xanthine oxidase(0.5 IU/2mL) ,EDTA(0.3 mM), ferrous sulfate(0.1mM)等試液各 50ul, 以 PBS 希釋至 4000ul, 並分別加入 xanthine(0, 5, 15, 30,50ul), 並希釋至 5000ul, 使成爲 0~50nm 的標準試劑, 再分別加入 XTT 溶液 100ul, 反應 15 分鐘後以 amicon filter(cut off: MW. 4000)過濾, 並取其濾液以 UV 或 hplc 檢測其 XTT 代謝物於 UV 480nm 的吸收光值, 此實驗並以 intra day (n=6) 及 inter-day(n=6)憑沽本分析方法的準確度.

### XTT 於血漿中的反應

於採血瓶內分別加入 XTT 溶液 100ul ,並採血 5000ul 後讓其於 37 C 下恆溫振盪反應 15 分鐘, 並以 amicon filter(millipore)(cut off: MW. 4000)離心過濾, 並取其濾液以 UV 或 hplc 檢測其 XTT 代謝物於 UV 480nm 的吸收光值.

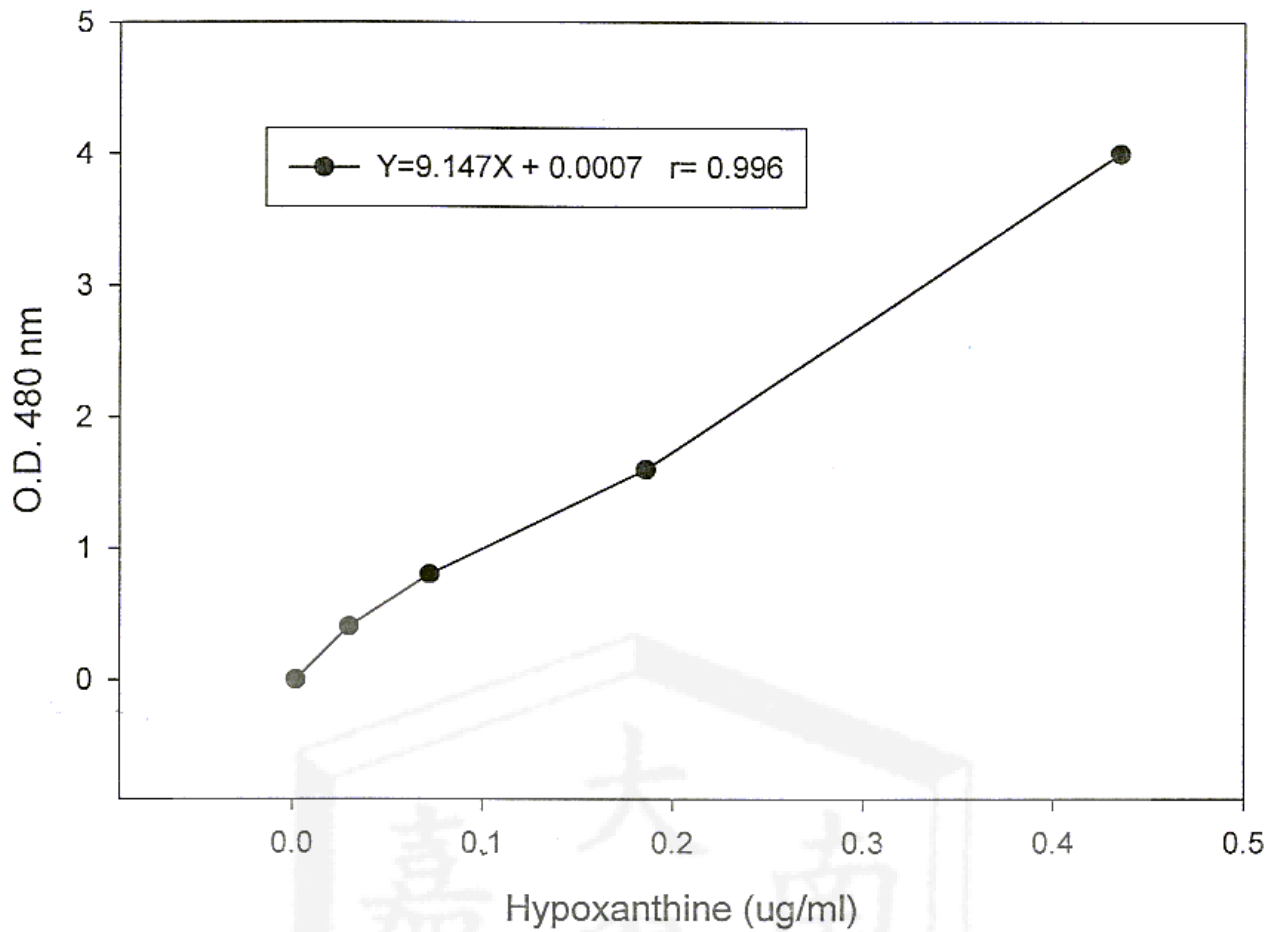


fig. 1. The calibration curve of the superoxide free radicals (XO) in deactive plasma, the chromophore was generated from the specific reaction of XTT with the generated XO from plasma hypoxanthine xanthine oxidase reaction to become a diformazone product (UV max. 480 nm).

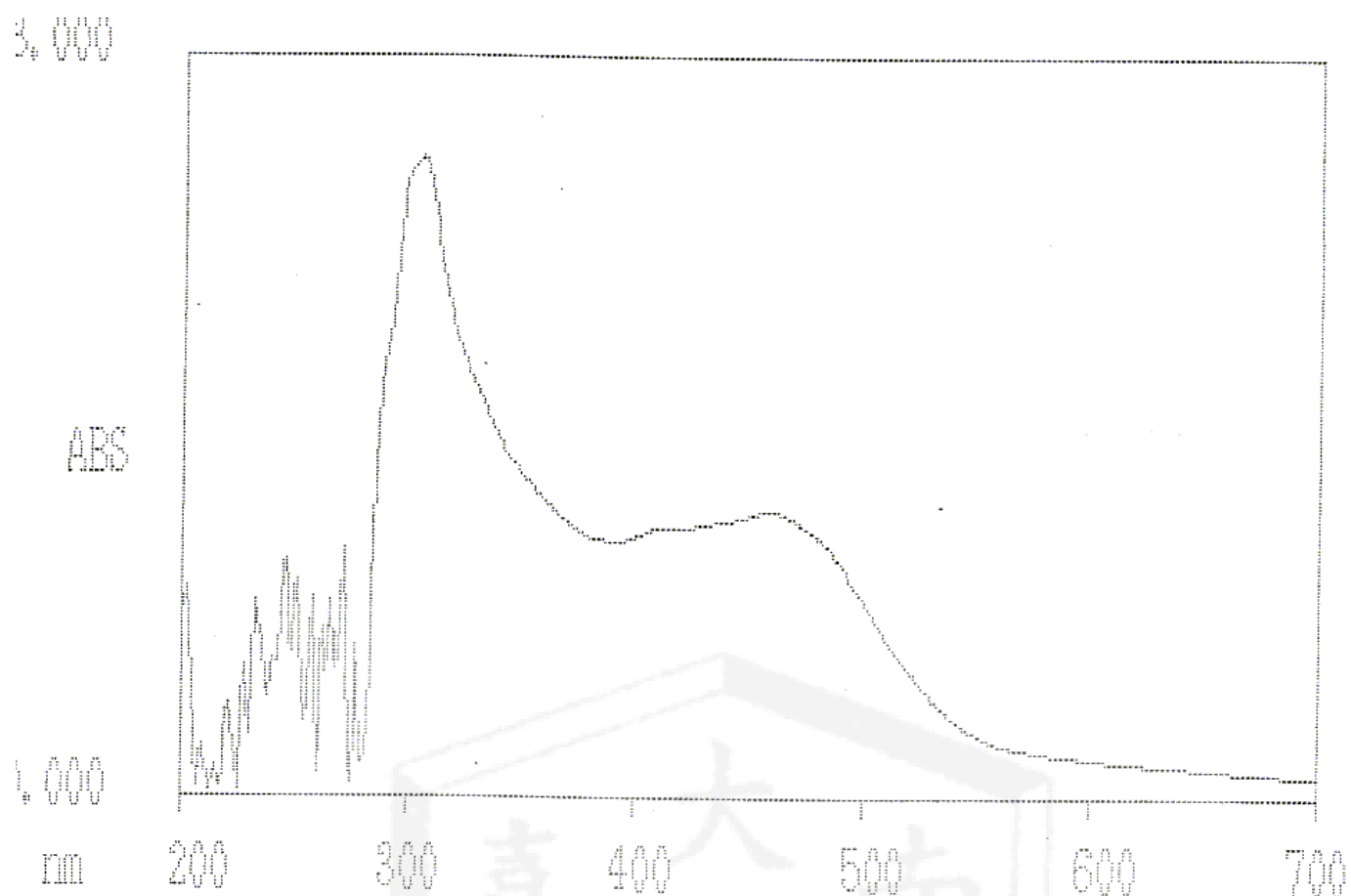


Fig. 2. UV-Vis spectrum of the reacted diformazone from the reaction of XTT with XXO.

## 臨床健康人及病人之血中 superoxide 濃度分析

經 8 小時 fast 的檢測對相，於一般自然條件下採血，方法如下；於採血瓶內分別加入 XTT 溶液 100ul，並採血 5000ul 後，讓血液於 37 C 下衡溫振盪反應 15 分鐘，並以 amicon filter(cut off: MW. 4000)離心過濾，取其濾液冷藏，並於 8 小時之內，檢測其 XTT 代謝物於 UV 480nm 的吸收光值，並由前述檢量線中推知其相當於多少 xanthine 代謝之 XO 值。

### XTT 的 hplc 分析

XTT 氧化物 以及其 internal standard 均需獨立開發，其分析方法目前無任何資料可尋，僅由 XTT 之 TLC 資料知悉其合適之 separation column 可能是 C8 或 phenyl-column.

### 討論

本實驗以 xtt 來接受血中所產生之 XXO 自由基 在 hypoxanthine 0.4 ~ 4.0 ug/ml 的範圍內可以很清處的以線性關係表示出來 若血中之 XXO 濃度超出檢微範圍則必須加以稀釋之後使得檢測 本實驗現正於奇美醫院 病理部做更進一步之分析以便得知正常人及病人之血中 xxo 平均分佈值 並再據以決定血液樣品之合理稀釋倍數



本計化之終止 free radical reaction 的方法，為非侵害性的界限過濾法，對活細胞無任何刺激，故不會造成任何因人工操做所產生 free radical，且每一分析之 reference sample 皆為無 XTT 的空白 sample，故實驗誤差可控制於小於 5% (見附圖)，由於本法的最終值均已換算為單位 hypo xanthine 或 XO 之 XXO 反應值，故即使於不同環境下操做，均因是換算為 XXO 值，故均可以互相比較 免除當今因 ESR 或 chemiluminescent 法，所用分析條件不同，乃至於相互之間的值，難以比較。並且此法又經以 hplc 法雙重確認，故可信度明確，此法若得以發展成功，將是世界於 free radical 臨床精確分析的首例，除對本院日後的研究，甚至世界上對 SOD-like 的生體相關研究均有貢獻。

本實驗最大的困難在於如何完全獨立開發 XTT 之 hplc 生體分析(現無前例可尋)，且本院現有之人物力支援，仍有些許不足。