

嘉南藥理學院專題研究計畫成果報告

以化學冷光法檢測 sod-like 活性物的活性

計畫編號：CNPH-88-06

計畫類別：個別型

主持人：黃正財

摘要

以 chemiluminescent 法，用 lucigenine 當 luminous 定量檢測 hydroxy free radical 的發生，已於期間報告詳述。由於 luminous 激光存在時間僅 120 秒，祇適用於 on-line 分析，並不適合臨床人體血液分析。

以 chemiluminescent 法分析 platonine 之 sod-like 活性，以 hypoxanthine(100uM)和 xanthinase 反應之 hydroxy free radical 為定量標準，實驗發現以 10uM 的 platonine 即可抑制 $68 \pm 2\%$ 的 free radical 活性，故 chemiluminescent 法適用於體外直接分析 sod-like 物質之活性。

Key words: chemiluminescent, lucigenine, sod-like, platonine

前言

Chemiluminescent 法分析 free radical 之活性，其原理是利用 hydroxy free radical 激發 luminous(lucigenine)產生 luminescent，並由檢測激光值而達到定量分析的目的。由於實驗操作簡單，快速，是現今最被廣為使用的方法之一。本計劃目的在於利用本院現有之 chemiluminescent detector 設備，嘗試開發適用於臨床分析之方法。

於今年六月的期間報告，以說明以 chemiluminescent 法分析 free radical 的活性，由於受限於 luminous(lucigenine)受 hydroxyl free radical 激光存在僅有 120 秒。由於這種特性，使得臨床檢品分析，因檢品製備時差而造成分析差異，甚至誤判。唯 chemiluminescent 分析法 由於可以直接受檢測 hydroxy freeradical 的存在，適用於直接定量分析或相對檢測 sod-like 物質活性。

實驗以 hypoxanthine 產生 hydroxy free radical 並以 sod-like 物質(platonin)與之反應後，檢測殘留之 hydroxy free radical 即可得之知該 sod-like 物之活性。此實驗之部份結果已發表於 1999 年 11 月之亞太藥理學會(見附件)

實驗方法

試藥&儀器

各項特級試藥均購自 Wako chem. Co., Tokyo, Japan 或 Sigma Co., NJ,USA . hypoxanthine(500ul), xanthanoxidase(50iu), lucigenine (100uM), ferrous sulfate(1uM), EDTA(3mM)均以 PBS 配製備用，chemiluminescence 檢品皆於 4°C 分析。

自由基檢測

Chemiluminescent 之分析

以 PBS 為溶媒配製 hypoxanthine(50uM), lucigenine(10uM), ferrous sulfate(0.1uM), EDTA(0.3uM) 溶液 1ml, 置於 chemiluminescent detector 之 reactor 內測其 luminescent reading 此值為 background. 同法於 reactor on-line 注入 xanthinoxidase 0.5iu 攪拌均勻反應並檢測其 luminescent (此值為定量之 hydroxy free radical), 同法於 background 檢測之溶液中加入 platonine(10~100uM)並 on-line 加入 xanthinoxidase 0.5iu, 檢測殘留之 free radical 所產生之 luminescent, 此值和前述定量產生之 free radical 之 luminescent 相比即可得知 platonine 之抗 hydroxy free radical 活性.

結果與討論

由 hypoxanthine 50uM 和 Fe⁺⁺被氧化之後產生的 hydroxy free radical 激發 lucigenine 產生 luminescent 經檢測之後其激光值為 95223 ± 933 counts/10seconds(CV% = 8%) (參見圖一)

以 50uM 的 hypoxanthine 所激發之 hydroxy free radical 為固定來源, 再於期中加入 platonine(10~100uM)(hypoxanthine 50uM 於最末 on line 加入反應). 此法可以直接檢測 platonine 抑制 hydroxy free radical 的相對活性, 由圖一可見 50uM 的 hypoxanthine 所產生之 free radical 以 10uM 的 platonine 即可有 68% 的抑制率, 可見 platonine 具有 sod-like 的活性(此相關結果已發表於 1999 年 11 月之亞太藥理學會).

由上述實驗可見以 lucigenine 來檢測 hydroxy free radical, 其有效檢測期僅有 120 秒, 且即使是以 on-line 分析以 50uM 的 hypoxanthine 為例, 因操做所致之偏差也有 8.1%. 在臨床上分析血液樣品, 由於一般抽血至送檢之時差約在 60 分鐘以上, 在此期間由於離體血液本身的變化和時差等不確定因素, 造成臨床分析差異可能高達 150% 以上. 即使將樣品於離體後立刻和 lucigenine 反應並以 chemiluminescent 分析, 也因 lucigenine 的 luminescence 僅有 120 秒, 易因人為操做而造成無法預期的偏差(一般約 30% 以上) 故以 lucigenine 當 luminous 不適用於臨床分析.

唯以 50uM 之 hypoxanthine 經 xanthinoxidase 等於 4°C 催化產生之 hydroxy free radical, 以

lucigenine 當 luminous, on-line 分析可以定量檢測其 free radical 之產生值為(95223±933 counts/10seconds (CV%=8%)), 以此法應用於分析 sod-like 物質之活性, 由於可以 on line 產生重複之化學反應. 實驗得知 10uM 的 platonine 相對可以抑制高達 68%的上述 free radical.

更高濃度的 platonine 並無法完全抑制 50uM 之 hypoxanthine 經由 xanthineoxidase 等於 4°C 催化產生之 hydroxy free radical, 其原因應為 hydroxy free radical 和 platonine 或 lucigenine 相碰撞之機率問題. 故更高濃度之 platonine 也無法完全抑製 hydroxy free radical 為合理結果.

References:

1. Rodriguez-Martinez MA and Ruiz-torres A (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. Mechanism of Aging Development. 66:213
2. Chirico S, Smith C, Marchant C, Mitchison MJ and Halliwell B (1993). Lipid peroxidation in hyperlipidemic patients. A study of plasma usingan HPLC-based thiobarbituric acid test. Free Rad. Res., 19: 51-57
3. Tatum VL, Chanchit C, and Chow CK (1990), Measurment of malonaldehyde by HPLC with fluorescence detection. Lipids 25: 226-229
4. Li Y, Stansbury KH, Zhu H, Trush MA(1999). Biochemical characterization of lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting intramitochondrial superoxide anion radical production. Biochem Biophys Res Commun 19;262(1):80-7
5. Blazovics A, Kovacs A, Lugasi A, Hagymasi K, Biro L, Feher (1999) Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with Active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. J Clin Chem;45(6 Pt 1):895-6
6. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA (1999), Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation.Circ Res;84(10):1203-11
7. Blazovics A, Kovacs A, Lugasi A, Hagymasi K, Biro L, Feher J (1999) Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. Clin Chem;45(6 Pt 1):895-6
8. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, (1999) Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation;84(10):1203-11