

用镉还原 NO_3^- 法测定小鼠血清及肝组织一氧化氮的含量

曹劲松 徐 强 吴斐华

(中国药科大学中药药理学教研室, 南京 210038)

摘 要 采用镉还原法测定了小鼠血清及肝组织内一氧化氮(NO)的含量,并观察了 ip 细菌内毒素(LPS)后小鼠血清 NO 含量变化。通过检测 NO 在体内稳定的代谢产物 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 来表示 NO 的含量。用本法测定的正常昆明 ICR BALB/c 小鼠血清及肝组织内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量分别为 $38.7 \pm 7.9, 48.8 \pm 4.4, 44.2 \pm 5.9 \mu\text{mol/L}$ 及 $64.4 \pm 2.2, 79.5 \pm 12.1, 73.3 \pm 29.3 \text{ nmol/g}$; 应用本法测定的正常 ICR 小鼠血清及肝组织内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量与应用硝酸根还原酶试剂盒法测得值基本吻合; ip 1, 2, 3 mg/kg 细菌内毒素后, ICR 小鼠血清的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量分别上升至 $162.5 \pm 47.8, 494 \pm 123.6, 674.8 \pm 259.7 \mu\text{mol/L}$ 。表明本法测定这些生物样品中 NO 的含量是简便、可靠、有效的。

关键词 一氧化氮; 镉; 血清; 肝组织; 含量测定

一氧化氮在体内的半衰期极短,仅数秒钟,其释放后在体内迅速被氧化为稳定的代谢产物 NO_3^- 及 NO_2^- ^[1], 因此人们可通过检测 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量来表示 NO 的产生量。有人运用 HPLC, GC-MS 连用,或高效毛细管电泳等方法将生物样品中 NO_3^- 及 NO_2^- 分离后检测含量^[1-3], 但需昂贵的仪器,步骤复杂,难以推广。Griess 反应被广泛运用于 NO_2^- 的定量检测,即在酸性条件下, NO_2^- 与 α -萘乙二胺及磺胺反应生成紫红色的产物,在 540 nm 处有最大吸收,该法特异性较好,灵敏度较高,但 NO_3^- 则缺乏此类较好的分光光度法,通常需将 NO_3^- 转化为 NO_2^- 来定量。有人应用硝酸根还原酶来完成转化^[4], 反应定量,迅速,特异性好,缺点是该酶难以制备,价格昂贵。一些还原性金属如镉、锌等可将 NO_3^- 转化为 NO_2^- , Laura C. Green 等^[5]采用高压镉柱自动分析装置来分析生物样品中的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, 迅速,特异性好,灵敏度较高,但需要特殊的设备及技术,不易推广应用。本文参照文献^[6],加以改进,以镀铜的金属镉粒为还原剂,将 NO_3^- 转化为 NO_2^- , 方法简便,所需试剂价廉,易得,无需特殊设备,一般实验室即可开展。我们还运用该法检测了正常昆明 ICR BALB/c 小鼠血

清及 ICR 小鼠肝组织内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量,应用硝酸根还原酶试剂盒法测定 ICR 小鼠血清及肝组织内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量并与本法测定值进行了比较,还比较了 ip 脂多糖(LPS)后 ICR 小鼠血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 及 NO_2^- 含量的变化情况

1 材料与方 法

动物: 昆明种, ICR 小鼠(中国药科大学实验动物中心), BALB/c 小鼠(江苏省实验动物中心)

试剂与制备: 3% 磺基水杨酸(上海试剂一厂,批号 860808); 5% NH_4Cl ; 5% NaOH ; 镉粒,将镉丝(上海化学试剂站分装厂,批号 910906)用剪刀剪成 20~ 40 mg 的小片段以制备镉粒,保存于 0.1 mol/L 盐酸内备用; 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,溶解 15 g 甘氨酸(上海化学试剂采购供应站,批号 910303)于重蒸水内,以 2 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 9.7,定容至 1L 备用; 75 mmol/L ZnSO_4 ; 55 mmol/L NaOH ; 5 mmol/L CuSO_4 (以甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制); Griess 试剂,即 1% 磺胺(衢州化学试剂工业公司试剂厂,浙江,批号 930602)(溶于 2.5% H_3PO_4)与等体积的 0.1% 萘乙二胺盐酸盐(上海化学试剂站分装厂,批号 930908)混合液,应现用现

配; 10 mmol/L NaNO_2 及 KNO_3 (标准贮存液,使用时以重蒸水稀释成不同浓度); 硝酸根还原酶法 NO 测定试剂合(南京建成生物工程研究所,批号 980305)。

NO_2^- 标准曲线的制作: 以上述 10 mmol/L 亚硝酸钠标准贮存液按标准方法配制浓度为 1, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液, 与等体积的 Griess 试剂室温下反应 10 min, 以蒸馏水调零以 72 型分光光度计于 540 nm, 0.5 cm 光径测定吸光度, 或以 96 孔板在酶标仪上相应波长测吸光度。然后以各标准浓度为 X 值, 以吸光度为 Y 值, 作直线回归, 所得曲线为工作曲线。

样品制备: 小鼠断头放血处死, 分离血清; 摘取肝脏, 以 1:1 (w/v, g/ml) 的比例加入重蒸水, 以玻璃匀浆器充分匀浆, 5,000 \times g 离心 15 min, 取上清。样品 - 20 $^\circ\text{C}$ 保存。

去蛋白: 单独测定 NO_2^- 时, 取 100 μl 血清, 加入 3% 磺基水杨酸 20 μl , 充分振荡, 于室温下静置 20 min, 然后 10,000 \times g 离心 20 min, 取上清备用。需要将 NO_3^- 还原为 NO_2^- 的情况下, 取 100 μl 血清或组织匀浆上清, 加入 75 mmol/L ZnSO_4 400 μl 及 55 mmol/L NaOH 500 μl , 充分振荡均匀, 室温下静置 10 min, 10,000 \times g 离心 30 min, 取上清备用。

NO_2^- 的检测: 取上述去蛋白操作项下处理后上清 40 μl 于 96 孔板内, 每孔加入 5% NH_4Cl 60 μl 及 5% NaOH 10 μl , 混合均匀, 然后每孔加入 Griess 试剂 110 μl , 室温下静置 10 min, 在 DG-3022A 型酶标仪上检测吸光度, 根据标准曲线及相应的稀释倍数求出样本内的 NO_2^- 含量。

镉粒的活化: 将保存于 0.1 mol/L 盐酸内的镉粒以重蒸水漂洗三次, 置 5 mmol/L CuSO_4 溶液内搅拌 1~2 min, 然后以甘氨酸-氢氧化钠缓冲液漂洗三次备用。

NO_3^- 转化为 NO_2^- : 在 10 ml 小锥型瓶内混合 0.9 ml 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液及 0.9 ml 空白对照(重蒸水), 标准对照(硝酸钾标准液)或测定样品(上述去蛋白项下上清), 用小药勺加入上述准备好的活化镉粒 2~3 g, 置水平震荡仪上于室温下震荡反应 2 h。

显色测定: 将上述反应液 1 ml 转移入试管, 加入 1 ml Griess 试剂室温下反应 10 min, 以蒸馏水调

零于分光光度计 540 nm, 0.5 cm 光径测定吸光度 (A_{540}), 根据标准曲线算出反应溶液中的 NO_2^- 浓度, 再乘以稀释倍数即得待测试样中的浓度。

硝酸根还原酶法测定 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量按试剂合说明书进行。

统计学方法: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异以 Student's t 检验表示。

2 结果

2.1 NaNO_2 及 KNO_3 标准曲线

图所示, NO_2^- 及 NO_3^- 浓度与吸光度成良好的线性关系, 相关系数分别为 0.9999 及 0.9992, 而两条直线的斜率几乎相等, 各点几乎重合, 亦表示在水溶液中 NO_3^- 转化为 NO_2^- 的效率几乎可达 100%。

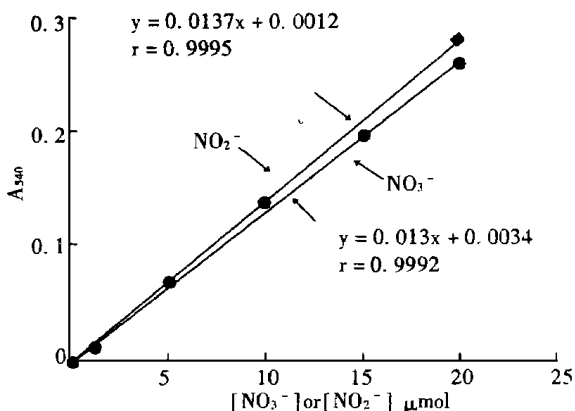


Fig 1. Standard curves for nitrate and nitrite in water solution

2.2 内标加入法测定小鼠血清及肝组织内的 NO_3^-

ICR 小鼠血清或肝组织匀浆上清内加入已知量的 KNO_3 标准物, 然后将测得的 NO_2^- 含量与加入的 NO_3^- 量作图, 见图 2 可见两者符合直线回归分析, 两条直线的斜率分别为 0.9548 及 0.94, 揭示 NO_3^- 在血清或肝组织内的转化率达 90% 以上。

2.3 正常昆明种, ICR 及 BALB/c 小鼠血清及肝组织内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量

按照上述方法, 我们测定了正常昆明种、ICR 及 BALB/c 小鼠血清及肝组织内的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量, 样品的获得及处理方法见材料与方法中样品制备项, 肝组织 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量以单位重量 (g) 湿肝的 nmol 数表示, 结果见表 1。

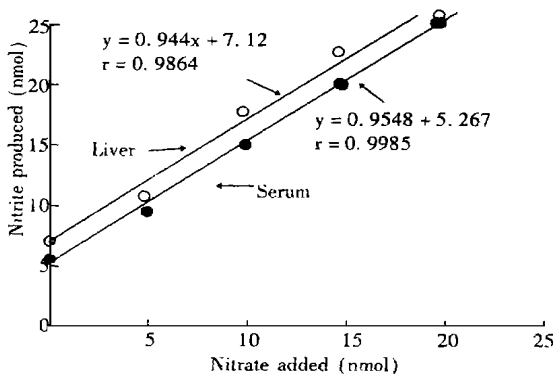


Fig 2 Method of standard addition for determination of nitrate in serum and liver

Tab 1. Nitrite/nitrate levels in serum and liver tissue from the three different strains of normal mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$)

Strain of the mice	Kunming	ICR	BALB/c
Serum nitrite/nitrate ($\mu\text{mol/L}$)	38.7 \pm 7.9	48.8 \pm 4.4	44.2 \pm 5.9
Liver nitrite/nitrate (nmol/g)	64.1 \pm 2.2	79.5 \pm 12.1	73.3 \pm 29.3

2.4 本法与 NO 测定试剂盒(硝酸根还原酶法)测定值比较

Tab 3. Changes of nitrite and nitrite/nitrate levels in the serum of ICR mice received a single ip injection of LPS 12h before ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$)

Groups	Control	LPS (ip, mg/kg)		
		1	2	3
Nitrite ($\mu\text{mol/L}$)	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Nitrite/nitrate ($\mu\text{mol/L}$)	48.8 \pm 4.4	162.5 \pm 47.8	494 \pm 123.6	674.8 \pm 257.9

^a ND nondetectable, $< 0.5 \mu\text{mol/L}$.

3 讨论

本文运用了表面镀铜的金属镉粒为还原剂,将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,然后以 Griess 反应为原理,以分光光度法来测定生物样品内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量。在这个过程中, NO_3^- 还原为 NO_2^- 这一步至关重要,即还原的效能如何,能否完全转化是关键。为此我们首先验证了在水溶液中的转化情况,如图 1 所示, NO_2^- 与 NO_3^- 的标准曲线几乎重叠,提示定量 NO_3^- 几乎全部转化为等量的 NO_2^- 。但生物样品成分复杂,干扰因素较多,我们应用标准加入法考察了在生物样品(血清及肝匀浆上清)中的转化效率,如图 2 所示,所加入的标准 NO_3^- 与所产生的 NO_2^- 成良好的线性正变关系,相关系数达 0.9985

表 2 列出了同时应用镉还原法与 NO 测定试剂盒测得的正常 ICR 小鼠血清及肝组织 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 值, t 检验显示,两种方法得到的结果基本相同,无显著性差异。

Tab 2. Comparison of Cd-reduction method and enzymatic assay with nitrate reductase for determining nitrite/nitrate in serum and liver of normal ICR mice. ($\bar{x} \pm s$)

Method	No. of mice	Nitrite/nitrate	
		Serum ($\mu\text{mol/L}$)	Liver (nmol/g)
Cd-reduction	7	48.8 \pm 4.4	79.5 \pm 12.1
Enzyme	8	51.4 \pm 9.5	85.7 \pm 11.2

2.5 ICR 小鼠 ip 不同剂量 LPS 后血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量变化

Escherichia Coli Lipopolysaccharide (脂多糖, LPS) 可刺激机体产生 $\text{NO}^{[9-10]}$, 我们比较了用本法测定经 LPS 刺激前后 ICR 小鼠血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 及 NO_2^- 的含量变化,结果见表 3

由此可见, ip LPS 后,血清 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平显著上升,而 NO_2^- 的浓度则始终小于 $0.5 \mu\text{mol/L}$, LPS 刺激后也未能上升。

(血清), 0.9864(肝匀浆上清),斜率分别为 0.9548, 0.944,表明应用本法测定生物样品 NO_3^- 时转化率可达 90% 以上。我们还考察了本方法的精密度,结果表明批内变异系数小于 10%,批间变异系数小于 20%。

我们运用本法测定了正常昆明种 ICR BALB/c 小鼠血清及 ICR 小鼠肝脏中的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量,与其他研究者的数据^[7-8]相近。与硝酸还原酶试剂合法相比较也得出了近似的结果(表 2)。本法通过将样品中的 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,再运用 Griess 反应测定其中的 NO_2^- ,因此测得的是样品中的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 总含量,但实际上血中的 NO_2^- 基础值含量极低,甚至在 Griess 反应测定法的检测限以下(小于 $0.5 \mu\text{mol/L}$),而 NO_3^- 的含量

则较高,约为 $50\mu\text{mol/L}$,从这个意义上来说,血液中代表 NO 含量的指标应为 NO_3^- ;另外, LPS 可刺激机体产生 $\text{NO}^{[9-10]}$,为此我们用本法测定了 ICR 小鼠 ip 不同剂量 LPS 12 h 后血清 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 的含量变化,结果列于表 3,可见 LPS 剂量依赖性引起体内 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 含量增加,但 NO_2^- 的含量不管是 LPS 注射前还是后都检测不到(小于 $0.5\mu\text{mol/L}$),由此可进一步看出,体内 NO_2^- 的水平并不能反映出 NO 的产生量,只有 NO_3^- 才能反映出这种变化,这是由于由 NO 生成的 NO_2^- 在体内迅速被氧合血红蛋白氧化为 NO_3^- 的缘故^[1,4]。

参考文献

- 1 Leone AM Francis PL, Rhodes P, *et al.* A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem Biophys Res Comm*, 1994, **200**(2): 951
- 2 Romero Jm, Lara C, Guerrero MG. Determination of intracellular nitrate. *Biochem J*, 1989, **259**: 545
- 3 Tesch JW, Rehg WR, Sievers RE. Microdetermination of nitrates and nitrites in saliva, blood, water and suspended partic-

- ulates in air by gas chromatography. *J Chromatog*, 1976, **126**: 743
- 4 Phuong NB, Christian B. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem*, 1995, **41/6**: 904
- 5 Laura C. Green, David A. Wagner, Joseph Glogowski, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131
- 6 Najwa K. Cortas, Nabll W. Wakld. Determination of inorganic nitrate in serum and Urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, 1990, **36/8**: 1440
- 7 Stephen H. Gregory, Edward J. Wing, Rosemary A. Hoffman, *et al.* Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to listeria. *J Immunol*, 1993, **150**(7): 2901
- 8 Miriam Palacios, Julio Padron, Luis Glaria, *et al.* Chlorpromazine inhibits both the constitutive nitric oxide synthase and the induction of nitric oxide synthase after LPS challenge. *Biochem Biophys Res Comm*, 1993, **196**: 280
- 9 Stuehr, DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 7738
- 10 Lai CS, Komarov AM. Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-shock mice. *FEBS Letters*, 1994, **345**: 120

Nitric Oxide Determination in Serum and Liver Tissue in Mice by Cadmium Reduction Nitrate Method

Cao Jingsong, Xu Qiang, Wu Feihua

Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

Abstract Nitric oxide (NO) in serum and liver tissue of mice was determined by the method of the cadmium-reduction and the changes of NO level in serum of mice received ip injection of LPS were also observed. Its stable metabolic product, namely, nitrite/nitrate, can indicate the level of NO in biological fluids. By using this method, the nitrite/nitrate in serum of normal Kunming, ICR, and BALB/c mice and in liver tissue were 38.7 ± 7.9 , 48.8 ± 4.4 , $44.2 \pm 5.9\mu\text{mol/L}$ and 64.4 ± 2.2 , 79.5 ± 12.1 , $73.3 \pm 29.3\text{ nmol/g}$, respectively. The values of nitrite/nitrate in serum and liver of normal ICR mice were in agreement with those determined by NO kit using nitrate reductase. The ip injection of 1, 2, 3 mg/kg LPS to ICR mice caused the increases of serum nitric oxide to 162.5 ± 47.8 , 494 ± 123.6 , $674.8 \pm 259.7\mu\text{mol/L}$, respectively. The results showed that it was a simple, reliable and effective method in determining the content of NO in biological fluids.

Key words Nitric oxide; Cadmium; Serum; Liver tissue; Determination of content