

· 技术与方法 ·

一种新型优化的肺组织羟脯氨酸水平测定方法的建立*

彭方毅^{1,2}, 周欢¹, 姜海蓉^{1△}, 袁兵占¹, 崔玉花¹

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2. 重庆市江津区中心医院, 重庆 402260)

摘要:目的 建立大鼠肺组织羟脯氨酸(HYP)水平测定方法,以评价大鼠肺组织纤维化程度。方法 比较不同酸水解时间、氧化时间、显色时间等对大鼠肺组织 HYP 水平测定结果的影响,据此建立大鼠肺组织 HYP 水平测定方法,并初步应用于博来霉素诱导大鼠肺纤维化 HYP 水平的测定。结果 通过优化得出 HYP 水平测定最佳条件为 110 ℃ 7.50 mol 盐酸(HCL)水解 16 h,常温氧化 10 min,60 ℃ 显色 25 min。本方法灵敏度为 0.067 μg/mL,回收率为 88.85%~110.88%,平均 CV 为 4.70%~6.60%。该法应用于博来霉素诱导大鼠肺纤维化研究中,模型组 HYP 水平明显高于对照组。结论 该法灵敏度与回收率均较高、重现性较好,可用作临床对肺纤维化程度判定的定量方法。

关键词:大鼠;肺;组织;羟脯氨酸;检测;方法;优化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1354-03

Establishment of a new and optimized assay method of HYP in lung tissue*

Peng Fangyi^{1,2}, Zhou Huan¹, Jiang Hairong^{1△}, Yuan Binzhan¹, Cui Yuhua¹

(1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

2. Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China)

Abstract: Objective To establish the assay method of hydroxyproline(HYP) level in rat lung tissue for evaluating the lung fibrosis degree. **Methods** The impact of different acid hydrolyzable time, oxidative time, developing time on the assay results of the HYP level in rat lung tissue was studied. On this basis, the assay method for determining the HYP level was established and preliminarily applied in the detection of the HYP level in rat lung tissue. **Results** The optimal condition for the HYP level detection in rat lung tissue was as follows: 7.50 mol HCL was hydrolyzed for 16 h at 110 ℃, oxidized for 10 min at room temperature and developed for 25 min at 60 ℃. The sensitivity of this method was 0.067 μg/mL. The recovery rate and the average CV of this method were 88.85%~110.88% and 4.70%~6.60%, respectively. In the study of bleomycin induced rat lung fibrosis, the HYP level of the model group was obviously higher than that of the control group. **Conclusion** This method has high sensitivity, high recovery rate and good reproducibility, and may be used as a reliable quantitative method to judge the lung fibrosis level in clinic.

Key words: rat; lung; tissue; hydroxyproline; detection; methods; optimization

羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)作为胶原纤维中特有的一类非必需氨基酸,主要存在于胶原蛋白中,约占 13.4%,少量存在于弹性蛋白中^[1],易溶于水,变性温度在 200 ℃ 附近^[2]。胶原蛋白是组织纤维化过程中细胞外基质的主要成分,因此,测定 HYP 在组织中的水平能客观反映组织纤维化程度。近年来,HYP 已成为评价组织纤维化程度的重要指标之一^[3]。

目前,国内外关于 HYP 水平的测定方法有很多^[1,3-6],但针对大鼠肺组织中 HYP 水平的测定方法还少有系统的研究,本研究在文献^[5-6]对 HYP 水平测定方法的基础上,针对博来霉素诱导大鼠肺纤维化后肺组织中 HYP 水平的变化,通过对水解时间、氧化时间、显色时间等实验条件的优化,建立了一种准确、可靠的大鼠肺组织 HYP 水平测定方法。其基本原理为先将肺组织酸水解成游离的 HYP 经过氯胺 T 氧化,生成含吡咯环的氧化物,氧化物与 4-二甲氨基苯甲醛反应生成红色的吡咯化合物进行比色定量^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料 氯胺 T(Sigma-Aldrich),醋酸钠(Fluka),柠檬酸(Sigma-Aldrich),异丙醇(Sigma-Aldrich),4-二甲氨基苯甲醛

(Fluka),70%~72%高氯酸(Fluka),37%盐酸(HCl,北京化工厂),HYP(Sigma-Aldrich);酶标仪(VersaMax, Molecular Devices);移液器(Eppendorf);漩涡混合器(QL-901,江苏海门其林贝尔);电热恒温鼓风干燥箱(上海森信,DGG-9053A);电子天平(SATRIOUS, BT124S);实验动物选用 2 月龄 SD 雄性大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。对照组($n=5$)气管内注入生理盐水,模型组($n=6$)气管内喷雾注入博来霉素。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 (1)HYP 标准储备液:准确称取 HYP 标准品 10 mg 溶解于 10 mL 的 1 mmol HCl 中制得 1 mg/mL 的 HYP 标准储备液,储存于 4 ℃ 下。(2)氯胺 T 试剂:准确称取 1.75 g 氯胺 T 溶解于 25 mL 纯化水中,深色瓶储存于 4 ℃ 下。(3)pH6.0 的柠檬酸缓冲溶液:溶解 28.50 g 醋酸钠、18.75 g 柠檬酸三钠、2.75 g 柠檬酸于 193 mL 的异丙醇中,加纯化水至 500 mL,用乙酸调节至 pH 6.0 于深色瓶储存于 4 ℃ 下。(4)4-二甲氨基苯甲醛试剂:准确称取 10 g 4-二甲氨基苯甲醛溶解于 15 mL 的高氯酸(60%)中,深色瓶储存于 4 ℃ 下。(5)

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571714、60873103);国家自然科学基金重点资助项目(30830090);重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC,2008BB5331、2009BB7231);教育部科技重点资助项目(210178)。 作者简介:彭方毅(1970—),副教授,博士研究生,主要从事免疫学研究。 △ 通讯作者, Tel: (023)66546528; E-mail: r0102@cqut.edu.cn。

试剂 I:取 1 mL 氯胺 T 试剂与 4 mL pH6.0 的柠檬酸缓冲溶液混合,现用现配。(6)试剂 II:取 3 mL 4-二甲氨基苯甲醛试剂与 13 mL 异丙醇混合,现用现配。

1.2.2 样品处理与测定 精密称取适量肺组织于 EP 管中以 1:50 倍体积加入 7.50 mol HCl 试剂研磨,在 110 °C 电热恒温鼓风干燥箱中酸水解 16 h 后,过夜烘干,加入 250 μ L 异丙醇/水(2:1)溶解,取 10 μ L 溶液于 96 孔板中,复孔,依次加入 20 μ L 异丙醇和 10 μ L 试剂 I 混合后室温氧化 10 min 后,加入 130 μ L 试剂 II,60 °C 孵育 25 min,冷却至室温后在波长 558 nm 处测定其吸光度值。

1.2.3 标准曲线制备 取 10 μ L HYP 标准储备液于 EP 管中,加入 190 μ L 1 mmol HCl 混合制得 50 μ g/mL 工作液,稀释制备得到 50.000、25.000、12.500、6.250、3.125、1.560、0.780、0.391、0.000 μ g/mL 标准线工作液。分别取 10 μ L 加入 96 孔板中,复孔,按照 1.2.2 中方法测定其吸光度。

2 结果

2.1 标准曲线绘制 以 HYP 标准品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,其回归方程为 $Y = 0.0189X + 0.0523$,相关系数 $r^2 = 0.9998$,HYP 水平为 0~50 μ g/mL 时与吸光度值呈线性关系,见图 1。

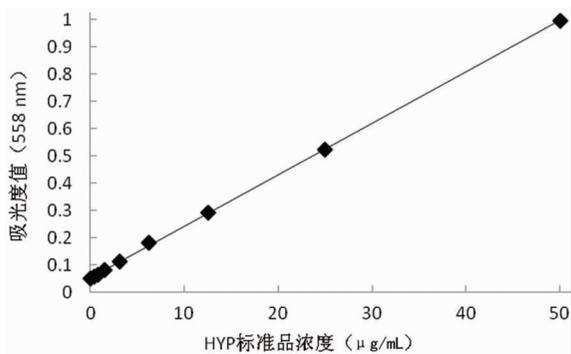


图 1 HYP 标准曲线图

2.2 不同酸水解时间对肺组织 HYP 测定结果影响 分别测定肺组织在 110 °C 条件下 7.50 mol HCl 水解 1、4、8、12、16、24 h 后 HYP 水平(图 2),随着酸水解时间延长,HYP 水平测定值逐渐增大,到 16 h 后逐步缓和,可认为达到峰值。因此,最佳酸水解时间为 16 h 左右。

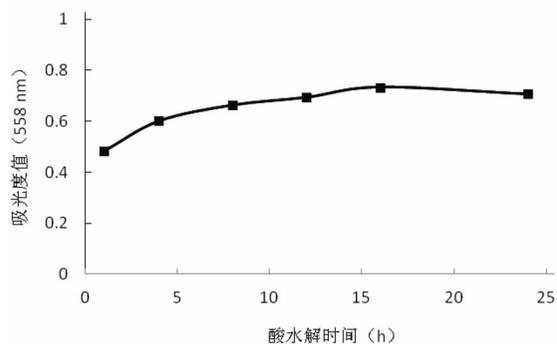


图 2 肺组织 HYP 不同酸水解时间测定结果

2.3 不同氧化时间对肺组织 HYP 测定结果影响 分别测定肺组织在加入氯胺 T 后 1、2、3、4、5、10、20、30 min 后 HYP 水平(图 3),随着氧化时间延长,HYP 水平逐步升高,5 min 后氧化较完全,10 min 后基本达到稳态。结果表明,最佳氧化时间为 10 min。

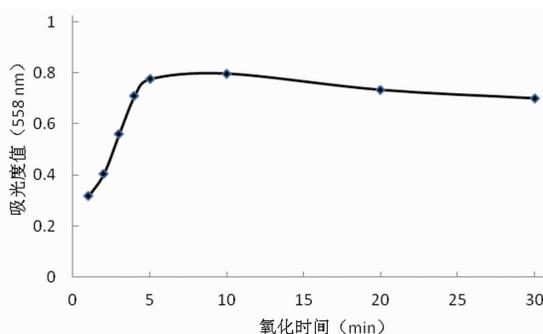


图 3 肺组织 HYP 不同氧化时间测定结果

2.4 不同显色时间对肺组织 HYP 测定结果影响 分别测定肺组织在加入 4-二甲氨基苯甲醛后于 60 °C 孵育 5、10、15、20、25、30、40、50、60、90、120 min 后 HYP 水平(图 4),随着时间延长,HYP 水平逐步升高,25 min 达到峰值,之后逐渐降低,时间过长,溶液颜色逐渐变黑,失去读数意义^[7]。结果表明,显色时间不宜过长,最佳显色时间为 25 min。

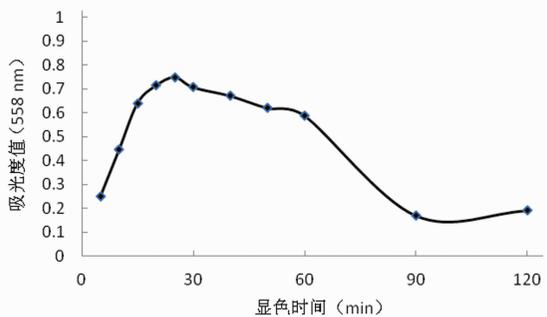


图 4 肺组织 HYP 不同显色时间测定结果

2.5 显色完全后酶标板冷却条件与读数稳定性测试 酶标板冷却条件对结果影响测试:置于冰上冷却 10 min,吸光度值为 0.744 6;室温冷却 10 min,吸光度值为 0.747 9。酶标板室温放置读数稳定性测试:酶标板室温放置 30、60、90、120 min 的吸光度值分别为 0.749 9、0.734 9、0.741 1、0.689 7。酶标板置于冰上冷却与室温冷却结果读数无差异,酶标板 90 min 内读数稳定。

2.6 回收率测试 配制水平分别为 2.500、5.000、10.000、20.000、40.000 μ g/mL 的 HYP 标准液加入肺组织中,完全参照 1.2.2 中肺组织样品操作方法测定,回收率分别为 93.24%、98.04%、96.39%、110.88%、88.85%,其回收率均在 80%~120%,表明此方法较为可靠。

2.7 灵敏度测定 不加入肺组织,重复测定 10 个零标准孔,计算 $\bar{x} \pm s$ 在标准曲线中对应的浓度值即为灵敏度,本方法灵敏度为 0.067 μ g/mL。

2.8 精密性测定 取 3 份肺组织研磨后分别做 10 个平行管,批内连续测定 10 次,变异系数 CV 分别为 6.10%、3.10%、4.90%,平均 CV 为 4.70%。批间检测 10 批,变异系数 CV 分别为 8.30%、4.80%、4.60%,平均 CV 为 6.60%。批内批间重复性实验 CV 值均在 15.00% 以内,重复性较好。

2.9 在博莱霉素诱导大鼠肺纤维化中的应用 将上述大鼠肺组织 HYP 水平测定方法应用于气管喷雾注入博莱霉素诱导大鼠肺纤维化研究中,于给药 4 周后处死大鼠测定肺组织 HYP 水平,对照组平均 HYP 为(1.45 \pm 0.27)mg/g;模型组平均 HYP 为(2.15 \pm 0.45)mg/g。

3 讨 论

肺纤维化是成纤维细胞受到化学性或物理性伤害时分泌胶原蛋白进行的组织修复,肺间质组织由胶原蛋白、弹性素及蛋白糖类构成^[8-12]。目前还少有有关直接反应肺纤维化检测程度的血清指标的报道。HYP 作为胶原蛋白中的主要成分之一,测定其在肺组织中的水平能反映胶原的代谢情况,进而能客观反应肺组织纤维化程度。寻找一种准确可靠的测定肺组织中 HYP 水平的方法,对于筛选预防与治疗肺纤维化的药物具有重要意义^[13-17]。

目前关于肺组织 HYP 水平测定的报道较少,本文在参考了文献[5-6]建立的 HYP 水平测定方法的基础上,对酸水解时间、氧化时间、显色时间等条件进行优化,研究发现,在 110 ℃ 条件下用 7.50 mol HCl 水解肺组织 16 h, HYP 测定水平即达到最高,与李文才等^[5]报道中 120 ℃ 条件下 6 mol HCl 水解 28 h 条件相比,提高了酸的浓度,缩短了水解时间。针对酸水解后溶液 pH 值对结果的影响,本研究采取了过夜烘干的方法,避免了调节溶液 pH 值的繁琐,操作更为简便,更适合大批量样本测定。关于氧化与显色时间,经过优化得出最佳条件为氯胺 T 常温氧化 10 min, 60 ℃ 显色 25 min, 与荆玉梅等^[6]关于尿 HYP 测定方法报道中相比,氧化时间缩短了 10 min, 显色时间相近。酶标板上冷却与室温冷却 10 min 结果无差异,因此,本研究认为可以省去冰浴冷却的繁琐,室温冷却更为方便快捷。本研究方法灵敏度为 0.067 μg/mL, 回收率为 88.85%~110.88%, 批内与批间实验均显示重现性较好。本方法在博莱霉素诱导大鼠肺纤维化的研究中得到了很好的应用,经测定模型组 HYP 水平明显高于对照组,验证了博莱霉素的肺纤维化诱导作用。

参考文献:

- [1] 刘芳,李德富,林炜. 羟脯氨酸水平的测定方法与应用[J]. 中国皮革, 2007, 36(15): 51-54.
- [2] Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, et al. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition[J]. J Biomed Master Res, 1980, 14(2): 107-132.
- [3] Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportions of this amino acid[J]. Arch Biochem Biophys, 1961(93): 440-447.
- [4] 魏东,陈文慧. 羟脯氨酸水平的测定方法优化[J]. 现代中

西结合杂志, 2005, 14(18): 2479-2480.

- [5] 李文才,张锦生,李华,等. 肝组织羟脯氨酸水平测定方法的优化[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(4): 295-297.
- [6] 荆玉梅,白薇. 尿羟脯氨酸测定方法的质量控制[J]. 山西医药杂志, 2001, 30(3): 264-265.
- [7] 郭勇,邵士俊,何丽君,等. Meso-四甲基-meso-四对氨基苯基杯[4]吡咯的合成及表征[J]. 化学试剂, 2002, 24(6): 344-345.
- [8] Samah M, El-Aidy Ael-R, Tawfik MK, et al. Evaluation of the antifibrotic effect of fenofibrate and rosiglitazone on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 689(1/2/3): 186-193.
- [9] 齐曼古丽. 吾守尔,夏宇,巴哈尔古丽. 米吉提,等. 博莱霉素致大鼠肺纤维化模型的建立方法及比较[J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(6): 495-498.
- [10] 蒋之,万珂,肖霞. 苦参碱对肺纤维化大鼠肺组织 HYP 与 HGF 表达的影响[J]. 实用预防医学, 2011, 18(6): 998-1001.
- [11] 曾鸣,刘丹. 雾化吸入布地奈德对肺纤维化大鼠肺组织羟脯氨酸和 I、III 星胶原 mRNA 表达的影响[J]. 四川医学, 2008, 29(10): 1293-1295.
- [12] 柴文成,李永春,刘玉玲,等. 博莱霉素致肺纤维化大鼠形态学变化的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(2): 77-80.
- [13] 陈丽,吴本清,涂惠英. 博莱霉素制备新生 SD 大鼠慢性肺部疾病模型[J]. 广东医学, 2012, 33(8): 1087-1089.
- [14] Babin AL, Cagnet C, Gérard C, et al. Noninvasive assessment of bleomycin-induced lung injury and the effects of short-term glucocorticosteroid treatment in rats using MRI[J]. J Magn Reson Imaging, 2011, 33(3): 603-614.
- [15] 刘凤民,李同树. 鸡肉羟脯氨酸水平测定及其嫩度比较[J]. 中国禽业导刊, 2003, 20(6): 17.
- [16] 王再华. 血清羟脯氨酸测定及影响因素[J]. 医学检验进修杂志, 1997, 4(4): 158-159.
- [17] 许志勤,高兰兴. 组织羟脯氨酸测定方法的改进[J]. 解放军预防医学杂志, 1990, 8(1): 40-42.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-12)

(上接第 1353 页)

- 突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 51-57.
- [7] 王梁燕,洪奇华,张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 62-67.
- [8] 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2011, 40(10): 700-702.
- [9] 张树鹏,赖仁胜,林路加,等. 直接测序法检测结肠癌 K-ras 基因的灵敏度确认及评估[J]. 山东医药, 2011, 51(11): 31-33.

- [10] Sahoo R, Harini VV, Babu VC, et al. Screening for EGFR mutations in lung cancer, a report from India[J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 316-319.
- [11] Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(3): 190-198.
- [12] 陈慧娟,喻长顺,李洪波,等. 广东地区非小细胞肺癌 EGFR 基因的突变研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 29-32.

(收稿日期: 2013-09-05 修回日期: 2013-12-07)