

抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体损伤的实验研究

路 雪 雅

(北京中医学院气功所生化研究室)

提 要

本文是探讨抗坏血酸和硫酸亚铁对诱导鼠肝线粒体损伤的机理。这两种物质对鼠肝线粒体损伤是通过产生自由基反应破坏线粒体膜结构和功能,其主要表现在线粒体脂质过氧化反应增加,脂褐素增多,膜流动性降低以及线粒体膨胀等异常现象。

抗坏血酸参与生物体组织细胞内许多物质的氧化还原、解毒和代谢作用。近年来,关于抗坏血酸与自由基反应的关系已引起许多学者的兴趣。据文献报道,抗坏血酸与铁离子作用发生自由基反应^[1]。自由基可直接作用于细胞膜的不饱和脂肪酸,破坏膜的脂质双层结构,促使蛋白质交联,酶活性降低和基因突变,并可诱发多种疾病:如动脉粥样硬化,糖尿病,风湿性关节炎,癌症等,它也是促进机体衰老的原因之一。本实验是为探讨抗坏血酸和硫酸亚铁对离体鼠肝线粒体膜结构和功能的损伤与自由基反应的机理,为防止这些物质在体内沉积而导致组织细胞的损伤提供了资料。并可用于体外研究抗氧化损伤和抗衰老药物的模型。

材 料 和 方 法

一、材料

四乙氧基丙烷(1, 1, 3, 3-Tetraethoxypropan), Fluk 产品; 1, 6-二苯 1, 3, 5-己三烯(1, 6-Diphenyl 1, 3, 5-Hexatriene, DPH), Sigma 产品; 抗坏血酸、硫酸亚铁及其它试剂均为分析纯, 北京化学试剂厂产品。MPF-4 型荧光分光光度计, 日立公司产品。Wister 种雄性大白鼠本院动物室提供。

二、方法

1. 鼠肝线粒体的制备: 按照前文[2]方法

制备, 分离介质含有 0.18mol/l KCl, 20mmol/l Tris-HCl, pH7.4, 以牛血清蛋白为标准, 用 Lowry 法测定线粒体蛋白质含量。

2. 线粒体脂质过氧化物的诱导和测定: 反应体积 1.0ml 中含有 0.5mg 线粒体蛋白质, 加入不同浓度的抗坏血酸和硫酸亚铁(对照组加入反应介质)置于 37℃ 恒温水浴中振荡温育 60 分钟, 1mmol/l EDTA 终止反应后按常规法^[3]测定光密度值。结果以四乙氧基丙烷为标准计算每毫克蛋白质所产生的脂质过氧化物含量(MDA nmol/mg 蛋白质)。

3. 荧光色素(脂褐素)的测定: 参照 Shimo-Saki^[4] 方法稍加更改。将诱导脂质过氧化物生成的反应管用 1.0mmol/l EDTA 终止反应后, 加入氯仿与甲醇(2:1) 5.0ml, 振荡提取 2 分钟, 3000 转/分离心 10 分钟, 弃上清。加入氯仿和双蒸水各 1.0ml, 再振荡提取 2 分钟, 离心, 取氯仿相 3.0ml 加入甲醇 150ml, 混匀, 在 MPF-4 型荧光分光光度计以硫酸奎宁(1μg 标准奎宁溶解在 1ml 0.05mol/L 的硫酸中)为标准, 激发波长 360nm, 发射波长 430nm 测定其荧光强度。结果以每毫克线粒体蛋白质的荧光单位表示(荧光单位/mg 蛋白质)。

4. 线粒体膜流动性的测定: 根据 Fukuza-wa^[5] 方法标记和测定鼠肝线粒体膜偏振度。线粒体与诱导剂作用后, 加入 4×10^{-3} mol/l DPH

荧光探针 $20\mu\text{l}$ 混匀, 37°C 继续恒温振荡 40 分钟, 在荧光分光光度计, 激发波长 360nm , 发射波长 428nm 测定线粒体膜荧光偏振度。荧光偏振度反映膜脂流动性的大小, 用 P 表示。 P 值小, 膜流动性大; P 值大, 膜流动性小。

5. 线粒体膨胀的测定: 参考前文^[3]方法, 反应体积 3.0ml 中含有 1.0mg 线粒体蛋白质, 加入 0.1mmol 抗坏血酸和 $5\mu\text{mol}$ 硫酸亚铁, 对照组加入同体积介质, 37°C 恒温水浴中缓慢振荡, 不同时间取出, 在 UV-120 型分光光度计波长 520nm 处分别测定浊度变化。光密度下降表示线粒体膨胀度增加。

结果与讨论

一、抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体脂质过氧化反应

脂质过氧化物 (Lipidperoxide) 是细胞膜的多不饱和脂肪酸经自由基参与的过氧化反应产物^[2]。本实验观察抗坏血酸和硫酸亚铁对鼠肝线粒体作用与脂质过氧化物的关系。当鼠肝线粒体与不同浓度抗坏血酸和硫酸亚铁在 37°C 温育后, 发现线粒体脂质过氧化物含量比对照组明显增加, 随着抗坏血酸和硫酸亚铁浓

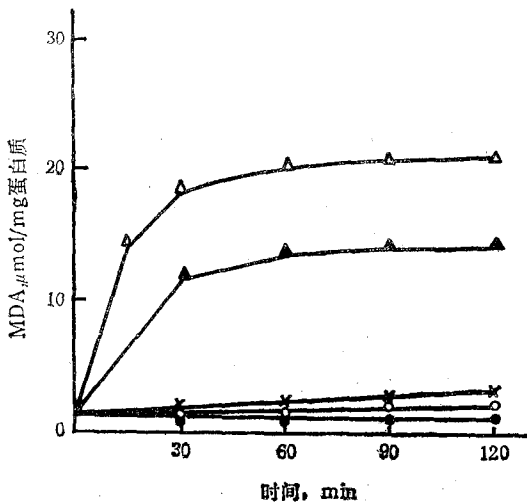


图1 抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体脂质过氧化物的生成

· · · 线粒体+反应介质, ○-○ 线粒体+ $5\mu\text{mol}$ 硫酸亚铁, ×-× 线粒体+ 1mmol 抗坏血酸, △-△ 线粒体+ 0.5mmol 抗坏血酸+ $2.5\mu\text{mol}$ 硫酸亚铁, △-△ 线粒体+ 1mmol 抗坏血酸+ $5\mu\text{mol}$ 硫酸亚铁

度加大, 脂质过氧化物增加愈多。而在反应体系中分别加入抗坏血酸和硫酸亚铁则有少量脂质过氧化物生成。说明抗坏血酸和硫酸亚铁参与自由基生成的氧化还原电子传递反应。自由基导致线粒体膜脂质过氧化损伤反应与抗坏血酸和硫酸亚铁的浓度互为相关(见图1)

二、抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体脂褐素的生成

脂褐素 (Lipofuscin) 是细胞膜多不饱和脂肪酸的过氧化产物——丙二醛与膜上乙醇胺磷脂, 氨基酸, 蛋白质末端氨基酸交联形成的 Schiff 碱。本实验在抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体脂质过氧化反应体系中, 观察了脂褐素的含量变化。结果发现: 反应物的荧光强度随着线粒体蛋白质浓度增加呈线性升高, 反应体系中 1.0mg 线粒体蛋白质, 荧光强度为 31.13 ± 1.09 ; 2.0mg 线粒体蛋白质, 荧光强度

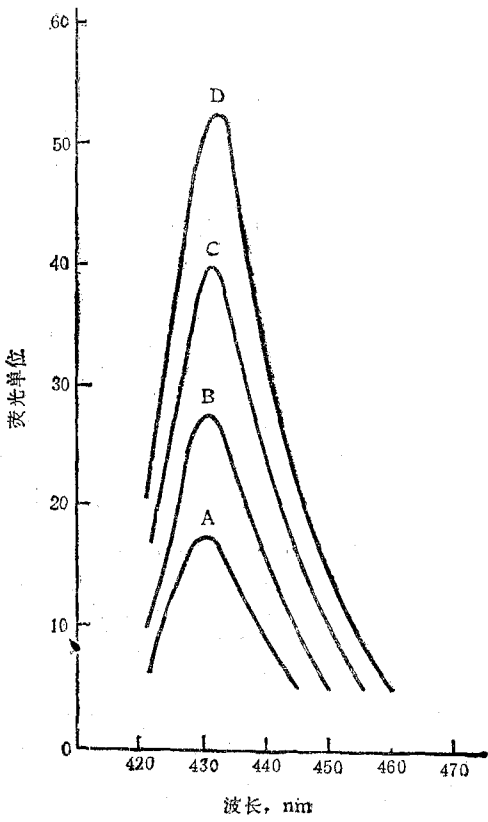


图2 抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体形成脂褐素

A: 0.5mg 线粒体蛋白质, B: 1.0mg 线粒体蛋白质, C: 2.0mg 线粒体蛋白质, D: 4.0mg 线粒体蛋白质

为 42.00 ± 2.60 ; 4.0mg 线粒体蛋白质, 荧光强度为 53.27 ± 1.97 (见图 2)。说明抗坏血酸和硫酸亚铁诱导的鼠肝线粒体脂质过氧化产物交联形成脂褐素。同时也观察到, 鼠肝线粒体脂褐素的生成与反应时间有关。当反应到 30 分钟时, 脂褐素的荧光强度为 18.60 ± 0.36 , 反应到 60 分钟时, 脂褐素的荧光强度为 19.83 ± 0.29 , 120 分钟时, 脂褐素生成仍有上升的趋势 (见图 3)。

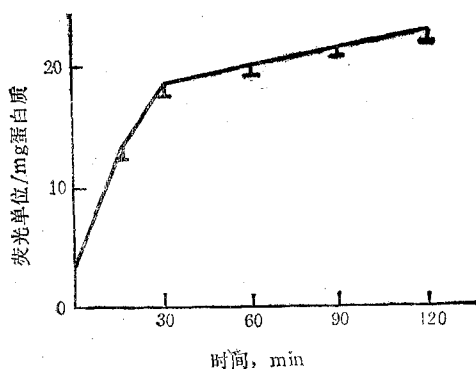


图 3 反应时间对鼠肝线粒体脂褐素形成的作用

三、抗坏血酸和硫酸亚铁对鼠肝线粒体膜流动性的作用

由于抗坏血酸和硫酸亚铁能诱导鼠肝线粒体脂质过氧化物和脂褐素的生成。这些损伤反应必然影响线粒体膜流动性。实验结果表明: 受到过氧化反应的线粒体膜流动性比对照组明显降低, 随着检测温度的升高, 两组膜流动性均平行增加。当检测温度在 20°C , 对照组 P 值为 0.234, 损伤组 P 值为 0.372。在 30°C , 对照组 P 值为 0.216, 损伤组 P 值为 0.330。在 40°C , 对照组 P 值为 0.171, 损伤组 P 值为 0.320。由于不饱和脂肪酸保持膜结构的柔软, 使膜流动性处于最适状态, 以利于膜内外信息传递和物质交换。膜经过氧化反应不饱和脂肪酸相对减少, 同时也涉及一系列的蛋白与蛋白, 蛋白与磷脂的相互作用, 所以膜流动性处于降低状态。温度可增加损伤膜的流动性, 对损伤的线粒体膜也可能起到调节作用 (见图 4)。

四、抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体膨胀

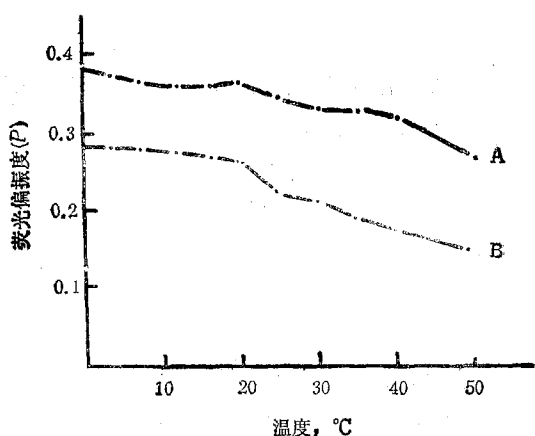


图 4 抗坏血酸和硫酸亚铁对鼠肝线粒体膜流动性的影响

A: 线粒体+抗坏血酸+硫酸亚铁 B: 线粒体+反应介质。

线粒体膨胀和收缩是呼吸过程中的正常生理性反应, 但是异常的膨胀可导致线粒体的解体, 死亡。本实验结果表明: 鼠肝线粒体经抗坏血酸和硫酸亚铁诱导后, 线粒体膨胀程度比对照组增加 (见图 5), 并随着反应时间的延长膨胀越显著 (开始时光密度值为 0.60, 反应 10 分钟时为 0.302, 30 分钟时为 0.228)。说明自由基引起的过氧化反应不仅使线粒体膜流动性降低, 同时自由基也作用于组成膜的蛋白质或者与膜结合的酸引起线粒体的形态发生变化。

以上实验是基于 Fenton 反应^[7]原理:

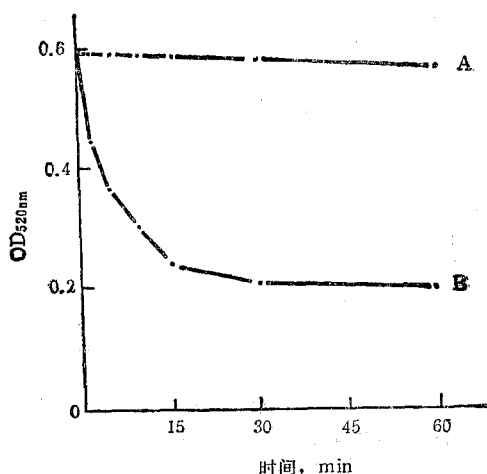
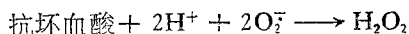


图 5 抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体膨胀

A: 线粒体+反应介质, B: 线粒体+抗坏血酸+硫酸亚铁

(下转第 382 页)

凝胶电泳相对迁移率作图,由图 4 求得 α_1 -AGP 的分子量为 45000。

三、糖蛋白染色

采用过碘酸 Schiff 氏试剂作糖蛋白染色能使 α_1 -AGP 呈粉红色,说明提纯物系一糖蛋白。

四、氨基酸组成测定

取一定量的 α_1 -AGP 于水解管内,加 5.7mol/L 盐酸置 110℃ 烘箱内水解 24 小时,经日立 835 型氨基酸自动分析仪测定,其氨基酸组成列于表 1,其结果与 Charlwood 等^[6]所报告的基本一致。

讨 论

已表明,固相化的 Cibacron blue F3G-A 染料能够吸附血浆中约 98% 的白蛋白以及其它多种血浆蛋白^[12],而 α_1 -AGP 在 pH5.8 条件下并不被吸附^[13]。由于 α_1 -AGP 是一种酸稳定的糖蛋白,因此本实验先采用硫酸铵和三氯醋酸沉淀以除去血清中大量非酸稳定的蛋白,然后在 pH5.8 条件下,利用一个 4 × 16cm 大小的固相化染料凝胶柱,从血清中成功地分离得到了免疫电泳纯的 α_1 -AGP。其分子量和氨基

酸组成测定结果均与文献报道的基本一致。过碘酸 Schiff 化试剂染色亦证实为糖蛋白。本方法简便、省时,适合于一般实验室开展工作。

本工作得到北京医科大学细胞生物学教研室周柔丽教授的指导和帮助,谨致谢意。

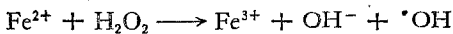
参 考 文 献

- [1] Kushner, I.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1982, 389, 39.
- [2] Mogensen, O. et al.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1986, 154, 1165.
- [3] Ganz, P. A. et al.: *Cancer. Res.*, 1984, 44, 5415.
- [4] Chin, K. M. et al.: *Immunology*, 1977, 32, 997.
- [5] Hao, Y. L. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 322, 99.
- [6] Charlwood, P. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 453, 81.
- [7] Böhme, H. J. et al.: *Chromatogr.*, 1972, 63, 219.
- [8] Davis, B. J. et al.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1964, 121, 404.
- [9] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406.
- [10] Glossmann, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 6339.
- [11] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 139, 265.
- [12] Travis, J. et al.: *Biochem. J.*, 1976, 157, 301.
- [13] Laurent, P. et al.: *FEBS*, 1984, 168, 79.

[本文于 1988 年 8 月 8 日收到]

(上接第 374 页)

+ 脱氢抗坏血酸



从反应方程式可见,少量抗坏血酸可清除超氧阴离子自由基 (O_2^-),对机体起到保护作用。当多量的抗坏血酸则生成 H_2O_2 增多,后者与铁离子作用生成羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$),该自由基的特点是很不稳定,半衰期短,损伤活性高^[6]。它可直接与线粒体膜多不饱和脂肪酸发生连锁反应,使膜不饱和双键断裂形成脂质过氧化产物——丙二酸。该物质与膜上的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、氨基酸、蛋白质等物质交联形成脂褐素。由于这些过氧化作用,一方面使调节线粒体膜流动性的脂质、蛋白质组分改变,导致线粒体膨胀。从而破坏线粒体膜结

构的完整,丧失其氧化磷酸化的生理功能。

本实验通过诱导自由基损伤实验模型,可为筛选清除自由基的药物提供手段。

参 考 文 献

- [1] Aruoma, O. I. et al.: *J. Biochem.*, 1987, 241, 273.
- [2] 路雪雅等:《药学报》,1987,22(8),586.
- [3] 王继峰等:《药学报》,1986,21(11),857.
- [4] Shimozaki, H. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, 792, 123.
- [5] Fukuzawa, K. et al.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1981, 206, 173.
- [6] Halliwell, B. Y. et al.: *J. Biochem.*, 1984, 219, 1.
- [7] Giorgio, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 1098.

[本文于 1988 年 5 月 27 日收到]