

茶多酚及其儿茶素单体对过氧化氢诱导的线粒体通透性改变孔道开放的影响^{*}

沈生荣 金超芳 陈子元

(浙江大学农学院, 杭州 310029)

曹远林 赵保路^{**}

(中国科学院生物物理研究所脑与认知科学研究中心, 北京 100101)

摘要 线粒体是细胞内重要的细胞器, 是生成 ATP 的主要场所. 线粒体通透性改变孔道 (PT 孔道) 的开放会引起线粒体许多功能的紊乱而导致细胞死亡. 对茶多酚及其单体儿茶素对过氧化氢诱导的线粒体膨胀及膜电势变化过程中 PT 孔开放的影响进行了研究. 实验结果表明茶多酚及其儿茶素单体对 PT 孔开放的影响显著不同: 茶多酚及其主要成分 EGCG 和 ECG 能够有效地抑制 PT 孔道的开放; 而 ECG, (+)-C 和 EGC 却加速 PT 孔道的开放过程. 从总体效果来看, 茶多酚及其单体 EGCG 和 ECG 对线粒体的保护作用占主导地位.

关键词 茶多酚, 线粒体, 自由基

学科分类号 Q244

茶是人们喜爱的世界范围内的大众饮料, 而茶叶中主要成分之一——茶多酚 (green tea polyphenols, GTPs), 是一种重要的抗氧化剂及自由基清除剂^[1,2]. 研究表明, 茶多酚及其主要成分, 如(-)-epigallocatechin gallate (EGCG), 具有多种药理学功能, 如抗由诱变剂及致癌物引起的病变等^[3~5]. 最近几年以来, 茶多酚在治疗癌症方面的巨大潜力引起了美国国家健康研究院 (National Institutes of Health, NIH) 的高度重视, 他们正在投资研究和开发茶多酚产品, 用于治疗癌症、衰老、神经损伤等疾病^[6]. 在国内, 已经有一些产品问世, 用于治疗各种慢性疾病等. 但是, 茶多酚及其单体的作用机理尚不明确.

线粒体是细胞内最重要的细胞器之一, 它不仅是细胞的能量工厂, 而且积极主动地参与细胞的信号转导. 最近, 实验表明, 线粒体在许多生理或病理情况下, 可作为细胞凋亡的感受器及放大器, 对细胞的存活起重要的调控作用. 在许多病变过程中, 如人类退行性疾病、衰老、以及肿瘤等, 人们都可以发现线粒体的这种变化^[7,8].

线粒体通透性改变孔道 (permeability transition pore, PT pore) 位于线粒体内外膜结合处, 是受 CsA (cyclosporin A) 特异性抑制的高通透性的由多种蛋白质组成的孔道, 它主要存在于内外膜接触点^[9,10]. 许多因子能影响线粒体通透改变孔道的变化, 象诱导剂 Ca^{2+} 、Pi 等以及抑制剂 CsA、ADP 等^[9]. 线粒体通透改变孔道的开放能引起线粒体膜电势的下降或消失、线粒体的膨胀以及外膜

的破裂, 细胞色素 c 及其他的一些因子会通过线粒体通透改变孔道本身或破裂的外膜直接泄漏出来, 对细胞的凋亡起重要的调控作用^[10].

许多细胞和动物水平的实验表明, 茶多酚对细胞凋亡有明显的抑制作用, 但对于茶多酚在细胞凋亡过程中具体的作用机制及其作用位点尚不明确, 我们在离体的线粒体水平, 利用过氧化氢诱导线粒体通透改变孔道开放的体系, 来研究茶多酚对线粒体的损伤是否有保护作用.

1 材料与方法

1.1 材料

Hepes, 甘露醇和牛血清白蛋白购自 Serva 公司. Percoll 为 Pharmacia 公司产品. 罗丹明 123 (Rh 123) 为分子探针公司产品. 茶多酚, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin (EC) 和(+)-catechin ((+)-C) 均为色谱纯. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 线粒体的纯化

参照文献^[11]进行. 取 200 g 左右的雌性 Wistar 大鼠, 饥饿过夜后, 断颈处死, 迅速取出肝脏, 剪碎置于 10 倍溶液 A 中 (250 mmol/L 甘露

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (29935080).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 010-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-03-15, 接受日期: 2001-05-29

醇, 0.5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L Hepes, pH 7.2, 0.1%牛血清白蛋白及蛋白酶抑制剂), 用B型匀浆器匀浆(除非特别注明, 实验均于4℃操作). 匀浆液于4℃, $600 \times g$, 离心5 min, 除去细胞碎片及细胞核, 上清进一步于4℃, $8\,000 \times g$, 离心10 min. 用溶液A洗一遍后, 进一步用30% percoll于溶液B(225 mmol/L甘露醇, 25 mmol/L Hepes, pH 7.2, 0.5 mmol/L EGTA, and 0.1%牛血清白蛋白)中连续密度梯度离心, 4℃, $50\,000 \times g$, 1 h. 取离心管底部棕褐部分即为所需的线粒体. 洗涤两次后, 将之重悬于PT溶液(220 mmol/L mannitol, 70 mmol/L sucrose, 5 mmol/L琥珀酸钾, 5 mmol/L Hepes, pH 7.2)中, 此线粒体可于4℃放置达8 h.

1.2.2 线粒体通透改变孔道开放的检测

取线粒体用PT溶液(220 mmol/L甘露醇, 70 mmol/L蔗糖, 5 mmol/L Hepes, 5 mmol/L琥珀酸钾, pH 7.2)稀释至0.3 g/L蛋白质浓度. 于30℃条件下测定PT孔开放.

紫外分光光度计检测: 将纯化的线粒体用PT溶液于30℃保温2 min, 加入10 μ l 30%的过氧化氢, 诱导线粒体通透改变孔道的开放. 或首先将不同种类及浓度的茶多酚及单体与线粒体预保温2 min, 通过检测线粒体的光密度在540 nm处的变化测定PTP开放. 所用仪器为UV-2101紫外分光光度计(Shimadzu公司, 日本).

荧光分光光度计的检测: 通过检测线粒体膜电势的来反映线粒体通透改变孔道开关的状态. 取线

粒体, 加入0.1 μ mol/L的罗丹明123(Rh 123)作为膜电位探针, 在F-4010荧光分光光度计(Hitachi公司, 日本)上检测Rh 123荧光强度的变化. 反应温度为30℃, 激发波长为503 nm, 发射波长为533 nm.

2 结 果

线粒体通透改变孔道的开放可以导致线粒体内膜的通透性增加, 使得胞浆中的溶质内流进线粒体基质, 引起线粒体基质的膨胀, 外膜破裂, 从而使得线粒体体积增大, 光密度下降. 反应介质中加入10 μ l的30% H_2O_2 可引起线粒体光密度的下降(图1a中1).

不同浓度的茶多酚(0.05~1 mmol/L)加入到反应体系中与线粒体预保温2 min, 加入10 μ l 30% H_2O_2 诱导线粒体通透改变孔道的开放. 令人惊讶的是, 茶多酚对线粒体通透改变孔道的开放具有明显的抑制作用, 这种抑制作用具有浓度效应. 如图1a所示. 增加茶多酚的浓度, 只有部分线粒体发生明显的膨胀. 当茶多酚的浓度达到0.5 mmol/L时, 线粒体膨胀基本被完全抑制. 即使加入更多的过氧化氢, 线粒体通透改变孔道也不再开放. 茶多酚的这种抑制作用在1 min内即达到饱和.

实验结果还表明, 一定浓度的茶多酚即可以抑制部分线粒体通透改变孔道的开放, 另一方面, 它却又可以加速剩余部分线粒体膨胀的速率, 即促进线粒体通透改变孔道的开放(图1a中3和4).

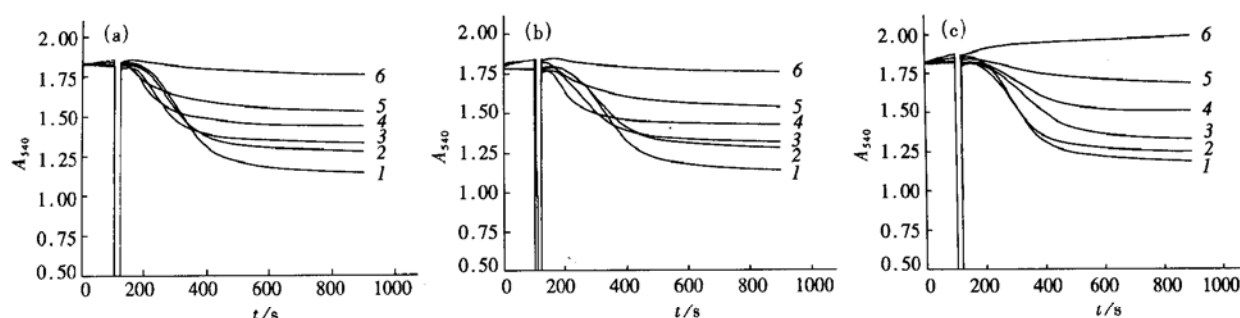


Fig. 1 Inhibitory effects of GTPs (a), EGCG (b) and ECG (c) on H_2O_2 induced PTP opening

Mitochondria treated with 0.1 mmol/L of H_2O_2 was used as control (curve 1). After preincubated with GTPs, EGCG or ECG in the concentration of 0.05 mmol/L (curve 2), 0.1 mmol/L (curve 3), 0.25 mmol/L (curve 4), 0.5 mmol/L (curve 5) and 1 mmol/L (curve 6) for 2 min, 0.1 mmol/L of H_2O_2 induced mitochondrial swelling were detected on A_{540} changes, respectively.

不同的单体, 对线粒体通透改变孔道的开放有不同的影响. 其中, EGCG和ECG对线粒体通透改变孔道的开放均具有抑制作用. 在0.5 mmol/L

浓度时, ECG比GTPs和EGCG表现出更高的抑制线粒体通透改变孔道开放的能力. 其抑制效果依次为ECG>EGCG>GTPs.

有意义的是, ECG 不但在相同浓度条件下具有更强的抑制线粒体膨胀的能力, 同时, 它与 ECGG 及 GTPs 不同, 无论在何种浓度下, 它都可抑制通透改变孔道的开放, 而不会对部分线粒体通透改变孔道的开放起加速作用。

与 GTPs 等不同的是, ECG, EC 和 (+)-C 均具有促进线粒体通透改变孔道开放的作用。它们均表现出明显的浓度效应, 即随着其浓度的增加, 促进线粒体通透改变孔道开放的作用越明显 (图 2)。

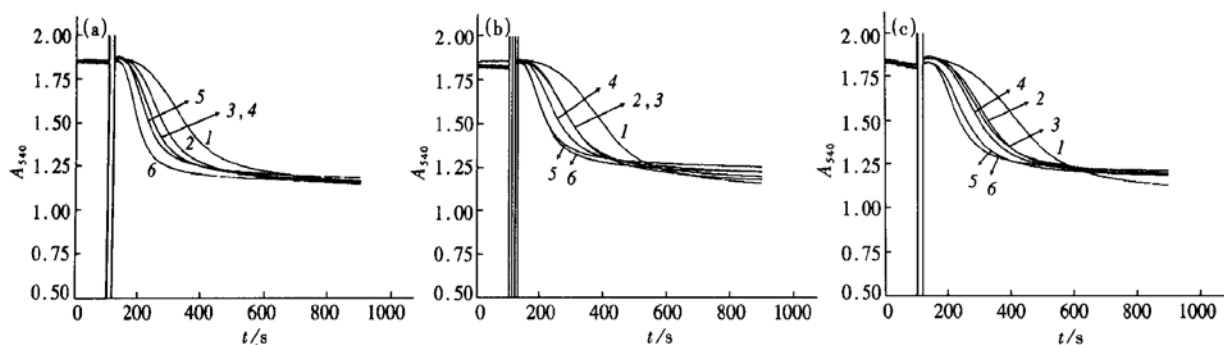


Fig. 2 Acceleration effects of EC (a), (+)-C (b) and ECG (c) on H_2O_2 induced PTP opening

Mitochondria treated with 0.1 mmol/L of H_2O_2 was used as control (curve 1). After preincubated with EC, (+)-C or ECG in the concentration of 0.05 mmol/L (curve 2), 0.1 mmol/L (curve 3), 0.25 mmol/L (curve 4), 0.5 mmol/L (curve 5) and 1 mmol/L (curve 6) for 2 min, 0.1 mmol/L of H_2O_2 induced mitochondrial swelling were detected on A_{540} changes, respectively.

如果将相同浓度的 ECG 及 EC 等量混合, 它们则表现出对线粒体通透改变孔道抑制开放的作用。即此时 EC 丧失促进线粒体通透改变孔道开放的能力, 混合物只表现出对线粒体通透改变孔道开放的抑制作用。这表明, ECG 及 EC 可协同作用, 其总效果为保护线粒体的作用 (图 3)。

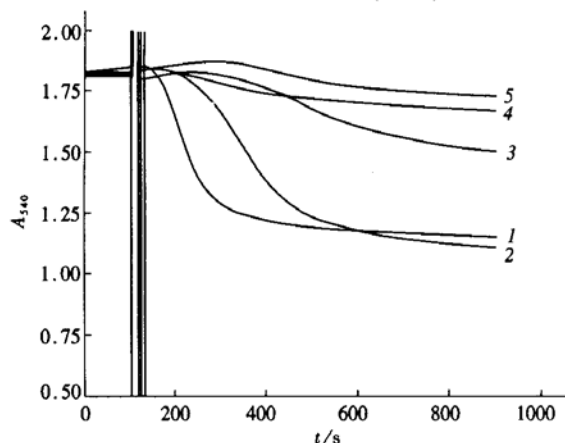


Fig. 3 Mixture effects of ECG and EC on H_2O_2 induced PTP opening

Mitochondria treated with 0.1 mmol/L of H_2O_2 was used as control (curve 1). After preincubated with 0.5 mmol/L of EC (curve 2), 0.25 mmol/L of ECG mixed with 0.25 mmol/L EC (curve 3), 0.5 mmol/L of ECG mixed with 0.5 mmol/L EC (curve 4) and 0.5 mmol/L ECG (curve 5) for 2 min, 0.1 mmol/L of H_2O_2 induced mitochondrial swelling were detected on A_{540} changes, respectively.

进一步, 我们用检测线粒体膜电势的方法测定了茶多酚及其单体对线粒体通透改变孔道开关的影

响 (图 4)。线粒体通透改变孔道的开放会引起线粒体膜电势的消散, 从而使得线粒体膜电势的敏感

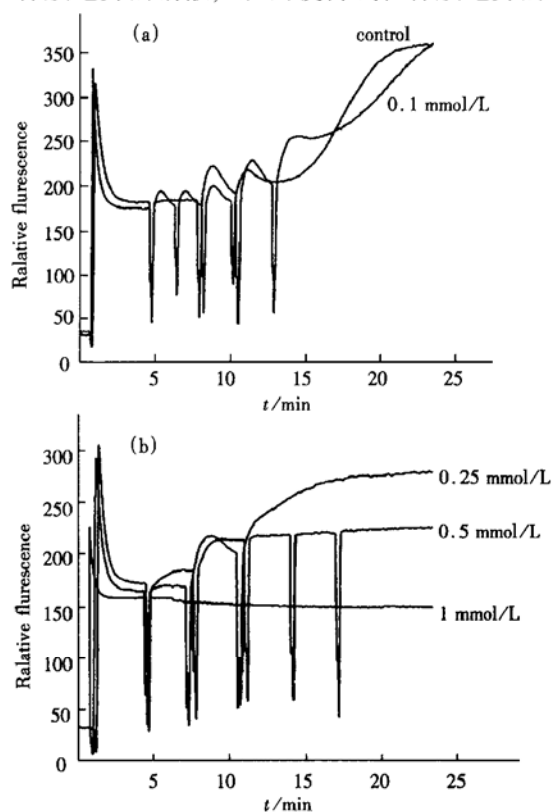


Fig. 4 Inhibitory effects of GTPs on H_2O_2 induced PTP opening

Mitochondria treated with 0.1 mmol/L of H_2O_2 was used as control. After preincubated with GTPs in the concentration of 0.1 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.5 mmol/L, and 1 mmol/L, the fluorescent change of Rh123 was measured respectively.

探针 Rh123 从线粒体内释放出来, 造成 Rh123 荧光强度的升高. 我们的结果表明, 100 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 能够引起 Rh123 荧光强度的升高 (结果未示出); 与在线粒体膨胀实验上的结果类似, 茶多酚具有明显的抑制线粒体通透改变孔道开放的作用, 同时, 这种抑制作用具有浓度效应 (图 4).

3 讨 论

线粒体不仅在细胞的各种生理活动中发挥作用, 而且在许多病理条件下, 特别是在缺氧应激, 氧自由基胁迫, 以及各种有毒化学物质引起的细胞毒害过程中起重要的作用^[12, 13]. 由于可以释放可激活凋亡酶 caspases 的细胞色素 c 及凋亡介导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF), 线粒体被认为是细胞凋亡重要的调控器和放大器.

线粒体通透改变孔道是线粒体参与细胞的不同生理及病理活动, 以及细胞凋亡诱导过程的中心环节之一. 线粒体的通透改变孔道可以以不同方式 (低通透方式和高通透方式) 开放, 从而参与细胞的生理或病理活动. 我们用过氧化氢诱导的线粒体通透改变孔道的开放即属于一种高通透性的开放方式, 在许多病理情况下都会发生^[9, 10].

过氧化氢诱导的线粒体通透改变孔道的开放机理仍旧不是特别清楚, 推测它可以通过产生氧自由基, 作用于组成线粒体通透改变孔道的蛋白质组分中的 -SH 基团, 从而可以调控线粒体通透改变孔道的开放^[10].

在我们的实验中, GTPs, EGCG 和 ECG 均具有明显地抑制线粒体通透改变孔道开放的作用. 影响线粒体通透改变孔道开放的因素较多, 我们在国际上首次发现, 茶多酚及其单体具有明显影响线粒体通透改变孔道开放的作用. 我们推测其机理, 一方面, 茶多酚作为一种有效的抗氧化剂, 具有清除多余的氧自由基作用^[14], 从而使得线粒体免受活性氧的损伤, 线粒体通透改变孔道也就不再打开. 以前的报道也表明, EGCG 具有高效地清除氧自由基的能力^[15]. 不同的单体对脂质过氧化影响的研究也表明, ECG 及 EGCG 具有比 EC 及 EGC 更好的清除脂自由基的作用, 其作用效率为 $\text{ECG} > \text{EGCG} > \text{EC} > \text{EGC}$ ^[2]. 由此可见, 它们对脂质过氧化的保护作用与对线粒体膨胀破坏的保护作用是基本一致的.

另一方面, GTPs 也会表现出一定的潜在氧化特性, 在某些条件下, 它可产生一定量的氧自由

基^[16]. 在我们的实验中, EGC, EC 和 (+)-C 均表现出明显的促进线粒体通透改变孔道开放的作用, 这也许是其潜在的氧化特性在发挥作用.

线粒体通透改变孔道其确切的蛋白质组成现在尚不完全清楚^[10]. 除了可以清除多余的氧自由基以外, 茶多酚及其单体还有可能直接与线粒体通透改变孔道的蛋白质组分起作用, 从而抑制线粒体通透改变孔道的开放. Jankun 等^[17]曾经报道, 茶多酚的主要组分之一, EGCG, 能够与一些蛋白质结合, 如 *erokinase*, 能抑制癌症的发生. 加入过量的过氧化氢不能逆转或消除由茶多酚及其单体造成抑制线粒体通透改变孔道开放的作用, 这表明茶多酚对线粒体通透改变孔道的抑制作用可能是不可逆的. 我们推测, 茶多酚可能直接作用于线粒体通透改变孔道的蛋白质组分, 从而调控线粒体通透改变孔道的开放. 这种假说尚有待于进一步的实验验证.

在动物, 细胞水平上及药理学的研究均表明, 茶多酚具有明显的保护作用, 使细胞及动物免受或降低由许多疾病造成的损害^[3~5]. 但是, 迄今为止, 人们尚不清楚茶多酚确切的作用机理及作用位点. 我们的实验表明: 细胞内重要的产能工厂及在细胞凋亡中起关键作用的线粒体可能是茶多酚的一个直接作用位点. 茶多酚能有效地保护由过氧化氢引起的线粒体损伤. 同时, 有趣地是部分茶多酚单体还具有促进线粒体通透改变孔道开放的作用, 这在以前也没有引起人们的重视. 同时, 实验还表明, 将抑制线粒体通透改变孔道开放的茶多酚单体与促进线粒体通透改变孔道开放的单体混合, 表现出的总的作用是抑制线粒体通透改变孔道的开放, 即其总的效果是保护线粒体免遭破坏的作用. 进一步开展这方面的研究对于进一步了解茶多酚的保护机理及更好的开发茶多酚产品必将是一个有力的推动.

参 考 文 献

- 1 Guo Q, Zhao B L, Shen S R, *et al.* ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1427** (1): 13~23
- 2 Guo Q, Zhao B L, Li M F, *et al.* Studies on protective mechanism of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1304** (1): 210~222
- 3 Wang Z Y, Cheng S J, Zhou Z C, *et al.* Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutat Res*, 1989, **223** (1): 273~289
- 4 Mukhtar H, Wang Z Y, Katiyar S K, *et al.* Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev Med*, 1992, **21**

- (1): 351~ 360
- 5 Dong Z G, Ma W Y, Huang C S, *et al.* Inhibition of tumor promoter induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins. *Cancer Res*, 1997, **57** (5): 4414~ 4419
 - 6 Steele V E, Bagheri D, Balentine D A, *et al.* Preclinical efficacy studies of green tea and black tea extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, **220** (1): 210~ 212
 - 7 Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281** (4): 1309~ 1312
 - 8 Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1366** (1): 52~ 67
 - 9 Icha S, Jouaville L S, Mazat J P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 1997, **89** (3): 1145~ 1153
 - 10 Zoratti M, Szabo I. The mitochondria permeability pore. *Biochem Biophys Acta*, 1995, **1241** (1): 139~ 176
 - 11 Luo X, Budihardjo I, Zuo H, *et al.* Bid, a Bcl-2 interaction of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, **94** (2): 481~ 490
 - 12 Desagher S, Martinou J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 2000, **10** (9): 369~ 377
 - 13 Gottlieb R A. Mitochondria: execution central. *FEBS Lett*, 2000, **82** (1~ 2): 6~ 12
 - 14 Ahmad N, Feyes D K, Niemen A L, *et al.* Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 1997, **89** (3): 1881~ 1886
 - 15 Salah N, Miller N J, Paganga G, *et al.* Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, **322** (1): 339~ 346
 - 16 Yang G Y, Liao J, Kim K, *et al.* Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 1998, **19** (4): 611~ 661
 - 17 Jankun J, Selman S H, Swiercz R, *et al.* Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*, 1997, **387** (1): 561

Effects of Green Tea Polyphenols and Catechins on H₂O₂-induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening^{*}

SHEN Sheng-Rong, JIN Chao-Fang, CHEN Zi-Yuan

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

CAO Yuan-Lin, ZHAO Bao-Lu^{**}

(Laboratory of Visual Information Processing, Center for Brain and Cognitive Sciences,
Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Mitochondria are important intracellular organelles in which energy is generated. Mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening will induce mitochondrial dysfunction, then result in cell death. The study was carried out to investigate the influence of green tea polyphenols (GTPs) and five kinds of catechins on mitochondrial PTP opening. The results showed that GTPs and catechins have obvious and different effects on H₂O₂-induced mitochondrial PTP opening. GTPs and its major components EGCG, ECG have inhibitory effects on it, while other kinds of catechins, EGC, EC and (+)-C can accelerate the process. The data provide an alternate interpretation of the potent protective function of GTPs, EGCG and ECG.

Key words green tea polyphenol, mitochondria, free radical

^{*} This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (29935080).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 15, 2001 Accepted: May 29, 2001