DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.02.035

氢过氧化枯烯引起离体线粒体脂质过氧化作用的初步研究

熊 业 陈宗荣 〔防原教研室 复合伤研究室〕

摘 要 氢过氧化枯烯(CHP)能非常显著地引起小鼠肝离体线粒体脂质过氧化作用(LP)。CHP在低浓度时，脂质过氧化物(LPO)与CHP浓度成线性增加，CHP在150μmol/L时，LPO形成达最大。LPO与温育时间(20 min内)成线性增加，以后保持在较高不变水平。还原型谷胱甘肽(GSH)、维生素E(Vit.E)和依地酸(EDTA)能非常显著地抑制CHP引起的线粒体LP。而且GSH含量减少，Vit.E几乎不变。用二甲基亚砜(DMSO)和超氧化物歧化酶(SOD)排除了OH·及O_2^-的形成。本文讨论了CHP引起LP的可能机理及抗氧化剂的作用。

关键词 过氧化脂质类；线粒体；谷胱甘肽还原酶类；维生素E；超氧化物歧化酶类

脂质过氧化作用可引起细胞成分损伤，是许多疾病的发病机理之一[1]。国外对有机过氧化物引起LP的研究主要集中于红细胞，微粒体及离体肝细胞等[2][3][4]。国内尚无此方面的报道，尤其是关于线粒体LP。基于线粒体为能量代谢中心，对线粒体LP的研究有一定的理论意义。本实验用氢过氧化枯烯成功地引起离体线粒体LP，并为GSH、Vit.E等显著抑制。探讨了LP发生的机理和抗氧化剂的作用。

材料和方法

1. 动物 昆明小白鼠，雄性，体重25±5 g，本校动物所供给。

2. 主要试剂与仪器 CHP(CP，上海)，GSH (Sigma公司)，DL-α-生育酚 (E Merck)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷(Fluka AG)，硫代巴比妥酸 (CP，上海)，5,5′-二硫代硝基苯甲酸(CP，国产)、过氧化氢酶(牛肝，4100 U/mg蛋白，Sigma公司)，超氧化物歧化酶 (牛红细胞，50000 U/mg蛋白，国产)。MPF-4型荧光分光光度计(日立)，紫外-可见光分光光度计(Beckman，美国)。

3. 小鼠肝线粒体按 Aprille 等[5]方法制备 LPO含量采用Ohkawa等[6]法测定(激发波长515 nm，发射波长553 nm)，标准品为四乙氧基丙烷。GSH按Sedlak法[7]，稍改动。即0.5 ml含GSH的体系加3.0ml 0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.2)和0.1 ml 0.01 mol/L二硫代硝基苯甲酸，摇匀，在412 nm处读吸光值。维生素E用荧光法测定[8]。

4. 基础温育体系 0.5 ml 0.1 mol/L磷酸钾缓冲液(pH 7.4)，含150 μmol/L CHP及一定量线粒体(0.3～1.11 mg蛋白)，平行三管。条件改变，后文指出。

5. 统计分析 数据以均数±标准误表示。组间比较用t检验，显著 *P<0.05、非常显著 **P<0.01。指数曲线拟合回归效果的检验用方差分析。

结果

1. CHP引起小鼠肝离体线粒体LP

150 μmol/L CHP引起线粒体产生大量的LPO(12.81±0.17 nmol MDA/mg蛋白、正常线粒体为1.67±0.13)。图1表明CHP引起线粒体的LPO与硫代巴比妥酸(TBA)反应的物质以及标准品四乙氧基丙烷与TBA反应的物质最大吸收峰均在534nm处。而CHP与TBA反应的物质最大吸收

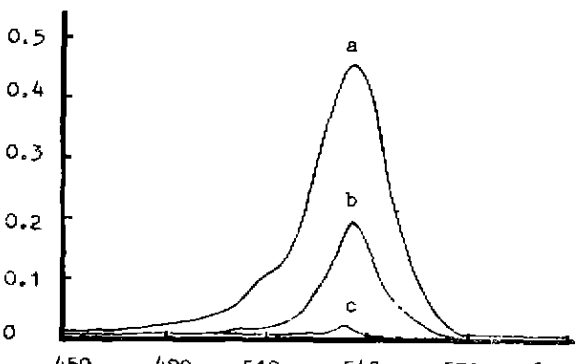


图1 150 μmol/L CHP(C)，5 nmol标准品(b)和1.11 mg线粒体蛋白+CHP(a)与硫代巴比妥酸反应形成产物的可见光光谱
纵座标：吸光值；横座标：波长(nm)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

峰在530nm处，在534nm处的吸光值很小，几乎不干扰TBA法测定LPO。

不同浓度的CHP(5～400 μmol/L)使线粒体产生的LPO非常显著地高于正常线粒体LPO值(图2)。

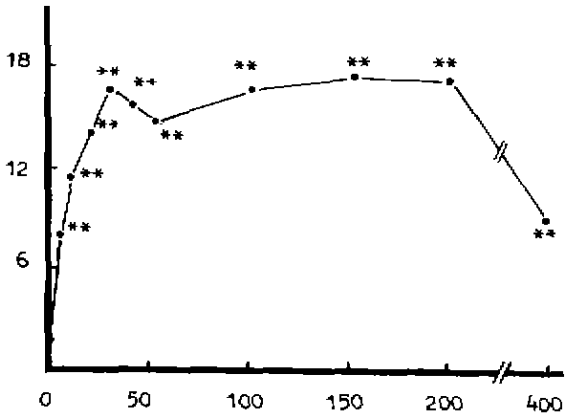


图2 CHP引起线粒体LPO形成

蛋白总量0.62 mg，4℃×60 min .**P<0.01，与0 CHP比较。

纵座标：LPO产量(nmol MDA/mg蛋白)；横座标：CHP浓度(μmol/L)

温育时间在20 min内，LPO产量与时间成线性增加；90 min时，LPO达最大值(图3)。

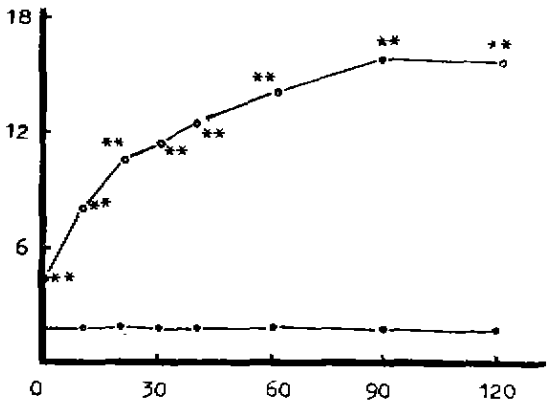


图3 CHP引起线粒体(1.1mg)LPO形成的动态变化

(·－·)：线粒体；(·—·)：线粒体+CHP. **与相应时间点的值比较，P<0.01. 纵座标：LPO产量(nmol MDA/mg蛋白)；横座标：温育时间(min)

2. GSH对CHP引起离体线粒体LP的抑制作用

GSH与线粒体在4℃温育30 min，加入CHP后继续温育30 min，5 μmol/L GSH非常显著地抑制150 μmol/L CHP引起的线粒体LP，5～40 μmol/L GSH抑制率为64%～83%(附表)，为了弄清GSH在抗氧化过程中的变化规律，将GSH与CHP温育。结果表明CHP使GSH减少的程度与CHP加入量相关非常显著($Y=0.1565\,e^{-0.7889X}+0.015$，X为CHP的浓度mmol/L，Y为GSH的吸光值，P<0.0001)，CHP在0.5mmol/L时，GSH显著减少；大于0.75 mmol/L时，GSH非常显著减少。

附表 GSH对CHP引起LP抑制作用

GSH浓度 (μmol/L)	LPO (nmol MDA/mg蛋白)	抑制率 (%对照)
0(对照)	1.45±0.17 **	(100)
0	12.87±1.29	(0)
5	4.41±0.07 **	74
10	5.61±3.00 **	64
20	4.27±0.13 **	75
30	3.44±0.35 **	83
40	3.48±0.51 **	82

注：蛋白总量0.62 mg，4℃×60 min，平行三管 ** 与0 μmol/L GSH比较，P<0.01.

3. 维生素E对CHP引起离体线粒体LP的抑制作用

维生素E浓度为2.3～46 μmol/L时，非常显著地抑制150 μmol/L CHP引起的LP，抑制率为82%～91%。维生素E与线粒体于0℃温育30min，加CHP继续温育30 min，LPO产量减少非常显著；在同样条件下，先加CHP，后加维生素E，LPO形成无显著变化，这说明维生素E主要抑制LP的起始反应，对已形成的LPO无作用。CHP与维生素E或CHP加线粒体与维生素E温育，维生素E含量无变化。

4. EDTA、DMSO、SOD及CAT对CHP引起离体线粒体LP的抑制作用

2～8 mmol/L EDTA非常显著地抑制150 μmol/L CHP引起的LP，抑制率为68%～71%。为了弄清温育体系有无OH·及$O_2^{\cdot-}$形成，用23.5～70.5 mmol/L DMSO及0.48 mg/ml SOD未能抑制CHP引起的LP，故排除了OH·及$O_2^{\cdot-}$

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的形成。0.5 mg/ml 过氧化氢酶(CAT)能显著抑制 CHP 引起的 LP，抑制率为13%，说明温育体系中有少量的H_2O_2形成。

讨　论

Rush 等[4]用氢过氧化叔丁酯(TBHP)与肝细胞温育，发现 LPO 形成，GSH 快速氧化及细胞死亡。CHP 引起 LP 的机理尚不十分清楚。本实验结果表明 CHP 非常显著地引起离体线粒体 LP，并被 EDTA 强烈抑制。说明 CHP 在引起 LP 时，除它自身均裂产生自由基[4]外，可能还有过渡金属离子(Fe^{2+}、Cu^{2+})的参与，后者来源于线粒体或试剂。细胞色素 P－450 可使CHP 产生枯氧自由基[3]，后者使脂质形成 LPO 。细胞色素P－450 主要存在于微粒体中，而线粒体中含量较少。由于分离线粒体时，常有微粒体的成分，因此不能忽视细胞色素 P－450的作用。线粒体 LPO形成量与 CHP 浓度有关，但有波动。CHP 在 5～ 30 μmol/L 时，LPO 成线性增加； 50 μmol/L 时，LPO 有所下降；150 μmol/L 时，LPO 达最大值；400 μmol/L 时， LPO 反而下降。下降的原因尚不清楚。

GSH 为水溶性抗氧化剂。本实验用 5μmol/L GSH 能非常显著地抑制 150μmol/L CHP引起 LP，GSH 在抗氧化作用中同时被氧化。少量的 GSH 能抑制大量 CHP(30 倍)的作用，说明 GSH 可能是防止初始自由基的形成。这与 Guido 等[9]报导的 GSH 保护大鼠肝微粒体被抗坏血酸/铁引起的 LP 相类似。Sies 等[10]用 CHP 或 TBHP 灌注大鼠肝，证实肝细胞 GSH 减少，化学发光增加；加入 GSH 后，发光减少，说明 GSH 在清除自由基中起重要作用。

维生素 E 为脂溶性抗氧化剂。本实验用 2.3×10^{-6} mol/L 维生素 E 可非常显著地抑制 CHP 引起线粒体 LP，且其含量无改变，这与 Fukuzawa 等[11]报导的相类似。维生素 E 抗氧化的机理可能是：(1)向自由基提供氢原子，使之变为稳定的衍生物，维生素 E 变为生育醌或生育酚自由基，后者不易引起自由基链式反应[12]。(2)与多不饱和脂肪酸的脂酰链形成复合物，防止膜通透性增加及脂酶对多不饱和脂肪酸的降解[13]。(3)与维生素 C 偶联，使维生素 E 含量不变[11]：

$$ROO\cdot \xrightarrow{\alpha-TOH} ROOH \xrightarrow{A^-} \alpha-TO\cdot \xrightarrow{AH^-} A^-$$

$\alpha-TOH$ 为维生素 E，$\alpha-TO\cdot$为其自由基，A^- 为维生素 C 自由基，A 为脱氢维生素 C，AH^- 为维生素 C。

过氧化氢酶在本实验中的抑制率为 13%，推测在温育体系中有少量 H_2O_2 形成。而 DMSO 及 SOD 无明显的抑制作用，故分别排除了 $OH\cdot$ 及 O_2^-的形成。

本实验结果表明 CHP 使线粒体产生大量的 LPO，说明线粒体膜脂类发生了过氧化损伤，这必然会影响线粒体结构和功能，使能量代谢发生障碍。而维生素 E 及 GSH 具有良好的抗氧化作用，可防止线粒体脂质的过氧化损伤。

(注：在本文图表制作中，得到卫勤教研室许汝福同志的帮助，特此致谢！)

参　考　文　献

1. Tappel AL . Lipid peroxidation damage to cell components . Fed Proc 1973; 32(8): 1870
2. Trotta RJ , et al . Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t－butyl hydroperoxide: The relative roles of haem－and glutathione－dependent decomposition of t－butyl hydroperoxide and membrane lipid peroxides in lipid peroxidation and haemolysis . Biochem J 1983; 212: 759
3. Weiss RH , et al . The mechanism of cumene hydroperoxide－dependent lipid peroxidation : the function of cytochrome P－450 . 1986; 251(1): 348
4. Rush GF , et al . Organic hydroperoxide－induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes . Toxicol Appl Pharmacol 1985; 78: 473
5. Aprille JR , et al . Liver and skeletal muscle

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mitochondrial function following burn injury J Trauma 1977; 17(4): 279
6. Ohkawa H, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351
7. Sedlak J, et al. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. 1968; 25: 192
8. 侯少范, 等. 生物材料中生育酚的荧光测定法. 分析化学 1981; 10(9): 535
9. Guido RMM, et al. Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor FEBS Lett 1983; 159(1-2): 24
10. Sies H, et al. The role of glutathione hepatic hydroperoxide metabolism. Biochem Soc Trans 1982; 10(2): 79
11. Fukuzawa K, et al. Antioxidant effect of α-tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid-Fe^{2+}-induced lipid peroxidation Arch Biochem Biophys 1980; 206(1): 173
12. 潘碧霞. 维生素E对生物膜及蛋白合成的作用. 国外医学医学分子生物学分册 1979; 3(1): 135
13. Mak, IJ, et al. Temporal relationship of free radical-induced lipid peroxidation and loss of latent enzyme activity in highly enriched hepatic lysosomes. J Biol Chem 1983; 258(22). 13733

(收稿: 1988. 4. 8, 修回: 1988. 12. 27)

Preliminary Study on Cumene Hydroperoxide-Induced Mitochondrial Lipid Peroxidation in Vitro

Xiong Ye and Chen Zongrong

(*Department of Antiatomic Medicine, Third Military Medical College*)

Cumene Hydroperoxide(CHP)-induced mouse mitochondrial lipid peroxides (LPO) are significantly higher than those of the normal mitochondria ($P<0.01$). Those LPO increase lineally with the CHP at the lower concentration. The LPO appear the maxium at CHP being 5 ~ 400 μmol/L. The LPO increase lineally with the incubation time within the first 20 min, and keep on a higher constant level after that time. Reduced glutathione (GSH), vitamin E (Vit E) and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) inhibit the LPO production significantly ($P<0.01$). Moreover, GSH content decreases markedly, but Vit E doesn't change when it is incubated with CHP. Dimethyl sulphoxide(DMSO) and superoxide dismutase (SOD) without inhibiting effect on CHP-induced LPO exclude the formation of hydroxyl radical and superoxide anion. The possible mechanism of CHP-induced LPO and antioxidant effects of GSH and Vit E is discussed.

Key words: Lipid peroxide; Mitochondria; Glutathione reductase; Vitamin E; Superoxide dismutase

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net