科 学 通 报
第 39 卷 第 20 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1994 年 10 月

黄腐酸与大鼠肝细胞微粒体的相互作用 *

张法浩 李 蓉 许善锦 王 夔
(北京医科大学药学院，北京 100083)

关键词 黄腐酸、微粒体、自由基

我们已报道过黄腐酸(Fulvic acid, FA)可引发大鼠肝细胞产生活性氧自由基[1]，并导致生物体的氧化性损伤[2]. 但是，作为一种外源性物质，黄腐酸在细胞内怎样转化，通过何种机制引发肝细胞产生内源性活性氧物质，尚不清楚. 一般认为，外源性物质多是通过肝细胞内氧化-还原酶体系进行生物转化，进而产生活性氧物质. 而此类酶体系多存在于线粒体或微粒体中. 本文以大鼠肝细胞线粒体和微粒体为研究对象，研究了黄腐酸与微粒体、线粒体的相互作用过程，并探讨了产生活性氧的可能机制.

1 材料和方法

1.1 实验材料

还原性辅酶 II(NADPH)购自 Sigma 公司，二硝基四氮唑蓝(NBT)购自华美公司，超氧化物歧化酶(SOD)为中国科学院生物物理研究所产品，其它均为国产分析纯试剂. 黄腐酸(FA)由中国科学院生态环境研究中心提供，实验用 Wistar 大鼠由北京医科大学实验动物部提供.

1.2 实验方法

(1)肝细胞线粒体和微粒体的分离制备. 选择 180—250g 雄性 Wistar 大鼠经连续 3d 腹腔注射苯巴比妥钠(75mg/kg·d)，禁食 16h 后，断头处死. 取出肝脏，参照文献[3]方法分别制备线粒体和微粒体，并按 Lowry 法[4]测定制备的线粒体和微粒体蛋白含量.

(2)氧自由基检测. 在磷酸缓冲溶液(50mmol/L, pH 7.4)中分别加入微粒体或线粒体(1.0mg 蛋白/mL)，37℃温育 5min. 加入 NADPH(1.0mmol/L)后用 NBT(50μmol/L)还原光度法测定超氧自由基($\cdot O_2^-$).

(3)紫外差谱. 将微粒体(1.5mg蛋白/mL)加入缓冲溶液(50mmol/L Na_2HPO_4, 0.10 mol/L NaCl, pH 7.4)中，制成微粒体悬浮液. 用 UV-260 分光光度计分别记录加入 FA 前后和加入 NADPH 前后的紫外吸收差谱.

(4)ESR 谱. 分别在有氧和无氧(通 N_2 密闭)条件下使微粒体(1.0mg 蛋白/mL)与 FA (25×10^{-6})温育(37℃)2min, 加入 NADPH(1.0mmol/L)后用 BRUKER ESP-300 型波谱仪记录 ESR 谱.

1994-03-12 收稿，1994-06-06 收修改稿.
* 国家"八五"科技攻关资助项目.

2　实验结果

2.1　活性氧自由基的产生

图 1 是微粒体或线粒体与 FA 作用体系中的 NBT 还原产物量(A_{560})的时间变化曲线. 由图 1 可见,反应体系中的 NBT 可被还原,并且在加入超氧化物歧化酶(SOD)后,可明显地抑制 NBT 的还原. 提示 NBT 是被反应体系中产生的超氧阴离子($\cdot O_2^-$)所还原. 说明微粒体和线粒体在 FA 的作用下,有活性氧物质产生,同时也证明微粒体的活性氧产生量远远高于线粒体.

表 1　反应体系中活性氧相对含量[a)]

反应体系	微粒体	线粒体
完全体系[b)]	100±11.4	15.7±5.6
+SOD(50 μg/mL)	37.8±18.0	6.8±3.5
− 微粒体(线粒体)	8.5±8.0	4.0±4.0
−NADPH	8.2±8.0	8.0±4.5
−FA	14.8±5.1	5.6±3.2
+ 咪唑(1.0 mmol/L)	56.5±8.5	9.8±3.0

a) $n=4$, 数据为 $X\pm Sx$. b) 完全体系中含有 1.0mg 蛋白/mL 微粒体(或线粒体), 1.0mmol/L NADPH, 25×10^{-6} FA. 其它反应体系均在完全体系的基础上加入或除去一种物质.

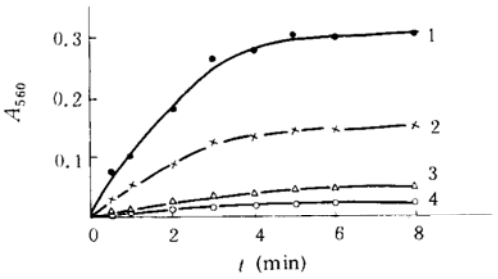


图 1　NBT 还原产物量与时间关系曲线

1 为微粒体(1.0 mg/mL) +NADPH(1.0 mmol/L) +FA (25×10^{-6}), 2 为微粒体 +NADPH+FA+SOD (50 μg/mL), 3 为线粒体(1.0mg/mL)+NADPH(1.0mmol/L) +FA (25×10^{-6}), 4 为线粒体 +NADPH+FA+SOD (50 μg/mL)

另外,表 1 列出了各反应体系用 NBT 还原光度法测定的活性氧相对含量的结果(按 FA 和 NADPH 同时作用于微粒体所产生的活性氧为 100 计算).

由实验结果可见,只有 FA, NADPH 和微粒体同时存在的反应体系(完全体系)才可产生大量的活性氧物质,除去 FA, NADPH 和微粒体 3 种组分的任 1 种只产生很少或可忽略量的活性氧. 另外 2 个值得注意的结果是,线粒体产生活性氧的能力非常显著地低于微粒体,提示 FA 引发肝细胞产生活性氧的部位主要在细胞内的微粒体;咪唑明显地抑制微粒体产生活性氧.

不同浓度的 FA 及不同来源的 FA(大骨节病区和非病区的 FA)在 NADPH 存在下与微粒体作用产生活性氧的相对量也有明显差异(表 2),这一结果与我们细胞实验的结果[1]是一致的.

表 2　FA 浓度和来源与微粒体产生活性氧含量的关系[a)]

FA 浓度($\times10^{-6}$)	5.0	15	25	35	50
病区 FA	14.5±3.7	57.0±6.4	100±11.4	117±13.5	123±11.2
非病区 FA	13.6±4.0	24.5±9.5	53.0±12.7	59.8±10.3	62.9±3.2

a) $n=4$, 数据为 $X\pm Sx$.

2.2　FA 与细胞色素 P-450 的作用

已知咪唑作为细胞色素 P-450 的中心铁离子的 1 个结合配体,可抑制细胞色素 P-450 的电子传递功能[5]. 本文的咪唑可抑制微粒体产生活性氧的结果提示大量存在于微粒体中的细

胞色素 P-450 可能参与了 FA 的生物转化. 由 FA 与微粒体作用后的紫外差谱(图 2)可见, 在 ≈380nm 有一峰, 在 ≈420nm 有一谷, 提示 FA 与微粒体中的细胞色素 P-450 分子发生了结合作用[6], 并与加入的 FA 浓度呈正相关.

另外, 在 FA 与微粒体体系中加入 NADPH 并通入 CO 气体可见 450nm 处出现还原态 P-450 与 CO 结合的特征吸收峰 (图 3), 而未加 FA 的体系中未见 450nm 处出现强吸收峰. 提示与 FA 结合后的 P-450 更易被 NADPH 还原.

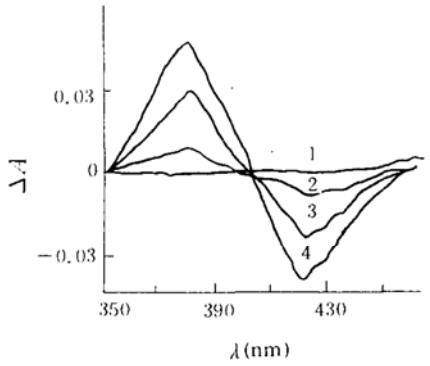


图 2 FA 与微粒体作用的差谱

1 为基线, 2 为加入 15×10^{-6}FA, 3 为加入 25×10^{-6} FA, 4 为加入 50×10^{-6}FA

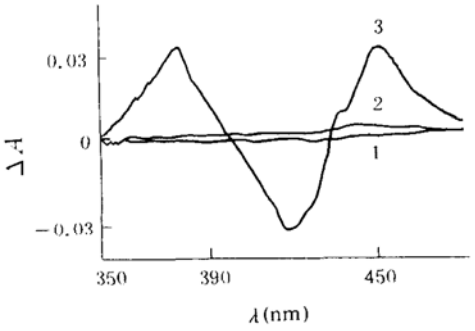


图 3 NADPH 与微粒体作用的差谱(测定前通入 CO)

1 为基线, 2 为微粒体中加入 NADPH, 3 为微粒体中加入 FA 和 NADPH

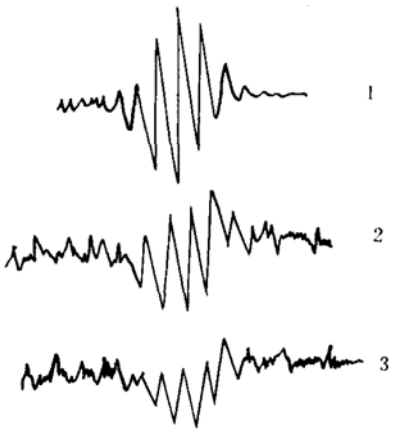


图 4 FA、微粒体及 NADPH 反应体系的 ESR 波谱

1 为无氧条件下反应 5min, 2 为有氧条件下反应 2min, 3 为有氧条件下反应 5min

2.3 ESR 谱与半酯自由基

由 FA 与微粒体及 NADPH 反应体系所测得的 ESR 谱(图 4)可见, 有半醌自由基信号出现, 并在无氧条件下可保持信号较长时间(10min)恒定, 但在有氧条件下, 信号强度较弱并随时间降低. 说明在 NADPH 存在下, 与微粒体中 P-450 结合的 FA 可被还原活化为半醌自由基, 活性较强的半醌自由基又可进一步与分子氧作用而呈不稳定状态.

3 讨 论

微粒体和线粒体是已知的肝细胞内可发生氧化还原作用的 2 个主要亚细胞组分, 在外源性物质的分解、生物转化过程中起重要作用. 本文的结果说明, 黄腐酸(FA)主要与微粒体作用而产生活性氧自由基, 咪唑能抑制活性氧产生的结果提示了细胞色素 P-450 参与了 FA 的转化的可能性. 进一步的实验证明, FA 与微粒体中细胞色素 P-450 发生了结合, 并使低自旋态的 P-450 转化为易被 NADPH 还原的高自旋态. 半醌自由基的产生可能是还原态的 P-450 分子将单电子转移给已结合在其分子上的 FA, 使含醌式结构的 FA 还原的结果. 生

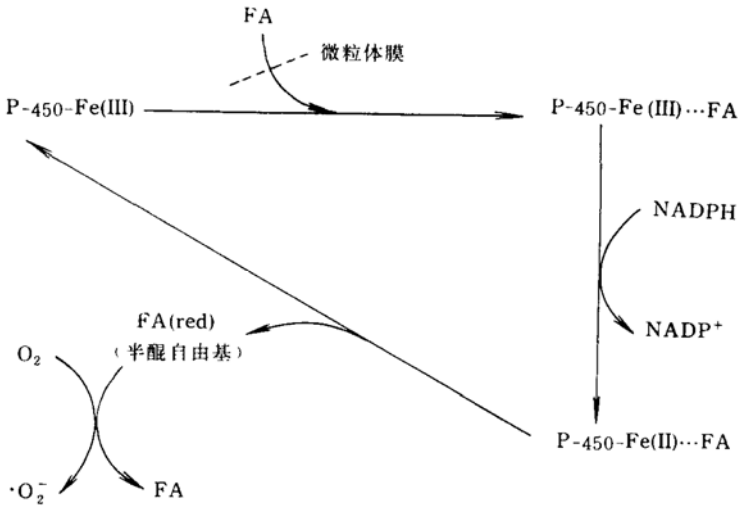


图 5　FA 与 P-450 相互作用及产生活性氧的过程

成的半醌自由基在无氧条件比较稳定而在有氧条件下不稳定的结果说明活性较强的半醌自由基可与分子氧发生反应，而活性氧自由基可能就产生于半醌自由基将单电子再转移给分子氧的过程中.

综上所述，黄腐酸与微粒体相互作用并产生活性氧自由基的可能机制如图 5.

参　考　文　献

[1] 张法浩等，科学通报，1993，**38**(13)：1235.
[2] Zhang, F. H. *et al.*, *J. Environ. Sci.* (China), 1991, **3**(4): 48.
[3] Won, W. D. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, **31**: 576.
[4] Lowry, O. H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**: 265.
[5] Testa, B., Jenner, P., *Drug. Met. Rev.*, 1981, **12**: 1.
[6] Gibson, G. G., Tamburine, P. P., *Xenobiotica*, 1984, **14**: 27.