科 学 通 报
第 38 卷 第 13 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1993 年 7 月

黄腐酸引发大鼠肝细胞氧自由基产生的研究*

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、肝细胞、自由基

黄腐酸 (Fulvic acid) 可引起细胞的氧化性损伤[1]，导致大鼠血液、肝脏、肌肉及软骨等组织中的 GSH-Px 活力降低和 SOD 活力升高[2]. 这些结果提示黄腐酸可能引起机体组织的氧化-抗氧化平衡失调.

已知黄腐酸可促进体外黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤体系产生超氧自由基 ($\cdot O_2^-$)[3]，它所含的醌式结构部分可能参与生物体中单电子氧化还原过程. 但黄腐酸是否可以诱导细胞产生活性氧还未见报道. 本文研究了大鼠肝细胞在黄腐酸作用下是否可产生释放活性氧自由基及可能的机制.

1 材料和方法

1.1 实验材料

胶原酶 II(Collagenase II)和还原性辅酶 II(NADPH)购自 Sigma 公司，二硝基四氮唑蓝(NBT)和二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC)购自华美公司，其它均为国产分析纯试剂. 黄腐酸(FA)来自中国科学院生态环境中心. 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) 大鼠肝细胞的制备. 选择 180—250g 雄性 Wistar 大鼠，参照 Seglen[4] 肝脏原位胶原酶循环灌流方法分离肝细胞，用台盼蓝排斥试验检查细胞存活率在 90% 以上.

(2) 氧自由基检测. 新分离的肝细胞在 Krebs-Henseleit 缓冲液 (pH 7.4) 中 37℃振荡温育，保温介质中最终含有：肝细胞 2×10^6 个/ml，2% 牛血清白蛋白，12.5mmol/L Heppes，10mmol/L 葡萄糖和 0.05mmol/L NBT 及不同浓度的 FA 和 DDC. 在温育过程中，隔一定时间取 3.0ml 细胞悬液，离心 ($200\times g$, 5min) 后，小心取上清液于 560nm 处测光吸收.

(3) 丙二醛 (MDA) 测定. 方法 1：将 3.0ml 肝细胞 (2×10^6 个/ml) 离心 ($1200\times g$, 5min)，生理盐水洗涤 2 次，加入 10ml 蒸馏水并轻轻搅动 (4℃,10min) 使其破膜，$10000\times g$ 离心 30min，用 10.0ml 50mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 洗涤离心后，细胞膜悬浮在 3.0ml 50mmol/L 磷酸钠缓冲液中，加入 FA，37℃ 温育 2h. 参照文献 [5] 方法提取 MDA 并测定 530nm 处光吸收值，计算 MDA 含量. 方法 2：不同于方法 1 处是 FA 提前于破膜前加入，并与肝细胞 37℃温育 2h.

(4) 细胞内 NADPH 测定. 4.0ml 新分离的肝细胞悬浮于缓冲液 (137.5 mmol/L NaCl, 4.2mmol/L KCl, 1mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Tris, pH 7.4)中，分别与 FA 在 37℃温育数小时，参照文献[5]方法用荧光光度计(激发波长 366nm，发射波长 455nm) 测定细胞

1992-11-17 收稿，1993-02-27 收修改稿.
* 国家"八五"科技攻关资助项目.

内 NADPH 含量。

2 实验结果

2.1 FA 引发肝细胞氧自由基的产生

NBT 可在超氧自由基（$\cdot O_2^-$）作用下还原，其还原产物在 560 nm 处有一特征吸收。图 1 表示了大骨节病区黄腐酸（FA）和非病区黄腐酸（FA*）分别作用于肝细胞后，体系中 NBT 还原产物吸光度的变化。

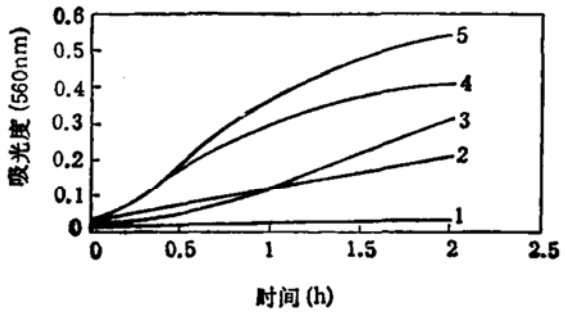

图 1 NBT 还原产物量与时间关系曲线

1——对照，2——50ppm 非病区 FA*，3——50ppm 病区 FA，4——50ppm FA* + 5mmol/L DDC，5——50ppm FA + 5mmol/L DDC

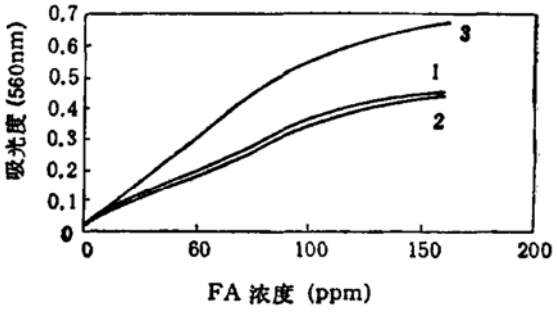

图 2 NBT 还原产物量与 FA 浓度关系曲线

1——FA，2——FA + SOD，3——FA + DDC

由图 1 可见：黄腐酸作用的肝细胞体系中 NBT 还原产物明显高于对照组。在 6 次不同的实验中，我们观察到加入 FA 并温育后，NBT 还原产物很快显现并持续增加，提示 FA 可能引发肝细胞产生氧自由基。当加入细胞内超氧化物歧化酶（SOD）的抑制剂 DDC 后，促进了 NBT 的还原（图 1），进一步支持了此观点。我们还可观察到不同来源的 FA 对肝细胞的作用效应有一定的差异。

另外，FA 的浓度对肝细胞产生超氧自由基的量有影响，但与外加的 SOD 没有关系（图 2）。提示 NBT 的还原可能在细胞内部完成的。

2.2 FA 与肝细胞膜脂质过氧化

氧自由基可引发细胞膜中不饱合磷脂过氧化。此种现象可通过测定反应产物之一丙二醛来研究。表 1 结果表明：在由 FA 处理的肝细胞制备的膜中（方法 2），MDA 含量明显高于对照，并与 FA 浓度呈正相关；但在由 FA 直接处理的膜中（方法 1），MDA 含量增加很少。

2.3 FA 对细胞内 NADPH 水平的影响

NADPH 可能是细胞内与 FA 作用而产生氧自由基的物质之一。本文测定了 FA 作用的肝细胞内 NADPH 含量（表 2）。由表 2 可见：细胞内 NADPH 含量降低了 30—60%，并

表 1 肝细胞膜中 MDA 含量（μmol/L 细胞）a)

FA 浓度 (ppm)	方法 1		方法 2	
	FA	FA*	FA	FA*
0	8.0±2.5		14.3±2.4	
15	12.1±3.5	12.0±3.4	25.5±4.3	21.2±4.5
50	17.8±3.8	15.9±4.2	50.2±4.8	36.7±3.9
100	25.4±4.1	16.0±3.3	68.0±5.9	49.5±3.2

a) $n = 9$, $\bar{X}\pm Sx$.

表 2　FA 对肝细胞内 NADPH 水平影响（μmol/L 细胞）[a)]

FA 浓度 (ppm)	温育时间 (h)		
	1	2	4
0	92.8±5.3	97.3±5.2	94.1±5.0
15	74.6±4.5	56.5±8.4	55.0±3.4
50	63.0±8.9	49.4±5.8	41.6±6.4
100	59.0±3.8	38.2±4.9	32.8±3.0

a) $n=8$, $\bar{X}\pm Sx$.

且这种效应也与 FA 浓度及温育时间有关。

3　讨　论

本文结果表明黄腐酸（FA）作用于大鼠肝细胞后可使体系中 NBT 还原产物持续增加，当加入超氧化物歧化酶（SOD）的抑制剂 DDC 后可加强 NBT 的还原，说明 FA 可引发大鼠肝细胞产生超氧自由基（$\cdot O_2^-$）。另外，FA 只有通过与活的肝细胞作用才能导致膜的氧化性损伤，进一步支持了氧自由基产生的观点。

外源性物质可通过刺激细胞膜或进入细胞内参与单电子氧化还原过程两种方式产生活性氧自由基。本文认为黄腐酸可能是通过后一种方式引发肝细胞产生超氧自由基。其根据有：(1) 尽管由于黄腐酸分子量较大可能无法进入细胞内，但其降解产物——小分子醌化合物 (Q)[6] 是有可能进入细胞。(2)外加的 SOD 未能抑制氧自由基的产生，而外加的 DDC 却能促进氧自由基（$\cdot O_2^-$）的产生。这可能因 SOD 不能进入细胞，而 DDC 则因进入细胞并抑制了细胞内的 SOD 的活性。因此说明氧自由基产生于肝细胞内部。

能与黄腐酸（FA）或具有醌结构的降解物（Q）反应的肝细胞底物的化学本质还是完全未知的。我们观察到在阻断糖酵解使 NADPH 不能复生的条件下，FA 作用的肝细胞中 NADPH 含量明显降低。因此，FA 引发肝细胞产生超氧自由基（$\cdot O_2^-$）可能的机制是：

$$\text{NADPH} + Q_{(ox)} \xrightarrow{\text{FA}} \text{NADP}^+ + Q_{(red)}$$

$$Q_{(red)} + O_2 \longrightarrow Q_{(ox)} + \cdot O_2^-$$

但是，FA是否是被肝细胞其它代谢物所还原，是否应有其它的作用机制，尚需进一步研究。

参　考　文　献

[1] Zhang, F. H., Wang, K., Xu, S. J., *J. Environ. Sci.* (China), 1991, 3(4): 48—54.

[2] Wang, W. Z., Feng, L. F., Ren, H. W. *et al.*, *J. Environ. Sci.* (China), 1991, 3(4): 79—86.

[3] Vaughan, D., Ord. B. G., *Plant and Soil*, 1982, 66: 113—116.

[4] Seglen, P. O., *Methods in Cell Biology* (ed. Prescott, D. M.), vol. XIII, New York, Academic Press, 1976, 29—83.

[5] Sabelle, M., Pierre, B., Ricardo, P. G., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258(5): 3107—3113.

[6] Schnitzer, M., Kunal, G., *J. Indian Chem. Soc.*, 1979, 56: 1090—1093.