

紫外辐射对磷脂和脂质体的过氧化损伤及 胆固醇对过氧化损伤的保护作用

王宁 王卫东 朱晓蕊 王俊玲 张大伟 秦广雍

(河南省离子束生物工程重点实验室, 河南郑州大学物理工程学院 郑州 450052)

摘要 以卵磷脂(L- α -phosphatidylcholine)和以卵磷脂制备的单层脂质体为材料, 研究紫外线引发磷脂和脂质体膜的过氧化反应以及胆固醇对过氧化反应的保护作用。用 $20\mu\text{mol}$ 的 L- α -phosphatidylcholine 和胆固醇按一定的摩尔比混合制备的磷脂溶液和脂质体, 经过紫外线照射后, 用硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)法检测接受照射的样品中过氧化产物的量。结果表明, 磷脂和脂质体过氧化程度随紫外线照射量增加, 且由卵磷脂制备的单层脂质体对辐射的敏感性明显强于磷脂。含胆固醇的脂质体的过氧化程度明显低于不含胆固醇, 而胆固醇对磷脂无明显保护作用。磷脂和脂质体的过氧化程度与其浓度和照射量都相关, 而胆固醇只对脂质体有保护作用。

关键词 紫外辐射, 脂质体, 脂质过氧化, 卵磷脂

中图分类号 Q691.9, O571.33, Q274, Q691.1

生物膜具有很重要的生物学功能, 与 DNA 的复制存在着非常密切的关系。膜的破坏将会影响到细胞内生物活性分子的转移和膜结合酶的活性, 从而严重干扰代谢的方向性、有序性和协调性, 进而导致细胞的死亡。辐射生物学研究表明, 生物膜是仅次于 DNA 的辐射损伤的靶, 对辐射非常敏感。已有的研究表明生物膜的辐射损伤主要是生物膜中的不饱和脂肪酸受到辐射后, 不饱和脂肪酸的过氧化反应而造成的^[1]。目前, 生物膜的研究主要集中在真核细胞上, 但由于真核细胞的复杂性, 人们很难分离出其膜系统。因此, 其结果多为多种因素产生的复合效应, 不足以说明是由于膜脂质过氧化造成的损伤。而用脂质体作为过氧化研究的材料与生物膜相比有其独特的优点, 首先脂质体为双分子层脂膜, 接近于真实的膜系统, 另外其成分单一包括脂质体的尺寸、曲率以及其成分等都可以人为地进行控制。因此, 脂质体宜于作为辐射生物膜损伤研究的材料。自然界的紫外线来自太阳辐射, 适当的紫外线照射对人体有益, 过度的紫外线照射则可能引起机体损伤。紫外线产生生物效应的能力, 以短波紫外线最强, 大约是中波紫外线的 10 倍, 是长波紫外线的 10 万倍^[2]。研究表明, 近 20 年来全球范围内臭氧总量已减少了 1%—3%^[3], 到达地球表面的紫外线强度逐年增强。而且, 紫外线波长越短,

其穿透率越大, 臭氧层若损耗 10%, 地面 320nm 紫外辐射增加 5%, 300nm 紫外辐射则增加 100%^[4]。以目前 O_3 的消耗速度, 人类得癌症的几率会增大一倍。未来 50 年里因 O_3 减少而引起紫外线增加量, 将会对地球表面生物带来巨大的影响。鉴此, 研究紫外线对生物膜的损伤, 具有实际意义。

本实验以卵磷脂及由卵磷脂制备的脂质体为材料, 研究了紫外线对其辐射损伤效应, 以及胆固醇对辐射损伤的保护作用。通过对卵磷脂和细胞膜的模型脂质体辐射损伤的研究来探究紫外辐射对生物膜损伤的特点, 从而推动膜辐射损伤的机理研究。

1 材料

卵磷脂 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 购自 Sigma, 其中含有大约 33% 的棕榈酸, 18% 的硬脂酸, 31% 的油酸, 15% 的亚油酸。胆固醇, 购自上海生工, 其余试剂均为分析纯。仪器设备主要有旋转蒸发仪 (RE-52 型), 超声波振荡仪 (KQ3200 型), TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计等。

2 方法

2.1 磷脂溶液的制备

将 $20\mu\text{mol}$ (0.015g) 的 L- α -phosphatidylcholine

国家自然科学基金 (10505018) 资助

第一作者: 王宁, 男, 1980 年 12 月出生, 2004 年毕业于信阳师范学院, 物理教育专业, 现为郑州大学生物物理专业在读硕士

通讯联系人: 王卫东

收稿日期: 初稿 2006-12-05, 修回 2007-01-18

和胆固醇按一定的摩尔比混合,溶解在 5mL 的乙醇中实验备用。

2.2 脂质体的制备

脂质体样品制备参照文献[5]、[6]的方法,并对其略加以改进。将 20 μ mol (0.015g) 的 L- α -phosphatidylcholine 和胆固醇按一定的摩尔比混合,溶解在 3mL 的氯仿中,加入少量小玻璃珠,置于 500mL 的圆底烧瓶中,用旋转蒸发仪把有机溶剂蒸干,使烧瓶内壁和玻璃珠表面上形成一层薄膜,再把薄膜深度蒸干(至少 2h),溶解在 5mL、10mmol/L 的 PBS (pH7.4) 中。溶液在玻璃珠作用下轻轻震荡,形成多层脂质体 (MLVs)。在 0 $^{\circ}$ C 用超声波振荡仪振荡 MLVs 4—5h, 得到单层脂质体, 3000r/min 离心 10min, 取上清保存备用。

2.3 脂质体浓度的测量

测量脂质体的磷含量以测定脂质体^[7]。取 KH_2PO_4 在 105 $^{\circ}$ C 烘干 2h, 冷却后准确称取 0.136g KH_2PO_4 , 用双蒸水定容至 1L 配制成浓度为 1mmol/L 的磷标准液母液^[8]。取一定量的磷标准液母液配制成磷浓度分别为 5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 μ mol/L 的标准溶液系列。分别吸取磷标准液 4mL, 在搅拌下连续加入 1mL, 5mol/L 的 H_2SO_4 、0.4mL 5% (w/v) 钼酸铵、0.4mL Fisk and SubbaRow 试剂, 用双蒸水稀释至 8.2mL。在沸水浴中加热溶液 7min, 用分光光度计测量其吸光值 (830nm), 根据磷的浓度和吸光值绘制标准曲线(式 1) 如。

$$y=0.0127x-0.0114 \quad (1)$$

y 为标准液中磷的吸光度; x 为标准液中磷的浓度, $R^2=0.999$ 。

将实验样品用磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 稀释, 用上述方法测量, 将测得的吸光值代入, 求出其浓度。

2.4 样品照射

紫外线可分为 UV-A (400—320nm)、UV-B (320—280nm) 和 UV-C (280—180nm) 等三种波长的紫外线, 其中 UV-C 的生物学效应最为明显, 本试验采用波长为 254nm、功率为 20W 的国产紫外灯管。

将实验样品用 pH 为 7.4 的 PBS 稀释。放在 $\Phi 3\text{cm}$ 培养皿中, 脂质体溶液的厚度为 2mm, 距紫外灯约 20cm, 照射量率为 $1.83\text{m}\cdot\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 调节照射时间, 可达不同的照射量 ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)。

2.5 过氧化检测

用硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric acid, TBA) 法检测由照射引起磷脂和脂质体的脂质过氧化, 参照 Ming-Kuei Shih 和 Miao-Lin Hu 的方法并加以改进。在 1mL 照射样品中加入 1mL 的 TBA 和 1mL 2.5% 的三氯乙酸 (Trichloro acetic acid, TCA), 于沸水浴中加热 10min。冷却后以 12400 r/min 离心 10min, 取上清用在 532nm 处测量过氧化产物丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 的摩尔吸光的吸光值 (MDA 的摩尔吸光率为 $1.56\times 10^5\text{mol/L}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[9,10])。

3 结果和讨论

3.1 紫外线对磷脂和脂质体造成的辐射损伤

图 1 是紫外线照射的不同浓度磷脂溶液的过氧化产物 MDA 量与照射量的关系。随着照射量和磷脂浓度的增加, 磷脂的过氧化产物 MDA 的量均增大。在相同紫外线照射量的前提下, 随着磷脂浓度的增大, 其过氧化产物的增幅基本相等(略呈减少), 浓度为 3.2mmol/L 的磷脂溶液产生的 MDA 是 1.6mmol/L 的 1.26 倍, 6.4mmol/L 的是 3.2mmol/L 的 1.33 倍。另外, 与磷脂溶质分子的增加相比, MDA 增加量较少, 随着磷脂浓度增大, 单位摩尔浓度的磷脂接受照射后产生的 MDA 量减小。图 2 是不同浓度的脂质体接受紫外照射后, 其过氧化产物 MDA 的量与照射量的关系。此结果相似于用紫外照射磷脂溶液的结果。但是, 把磷脂溶液和脂质体都稀释为 6.4mmol/L, 进行 UV-C 辐照的结果如图 3 所示, 同一照射量下, 脂质体的过氧化产物 MDA 的量要比磷脂的大。

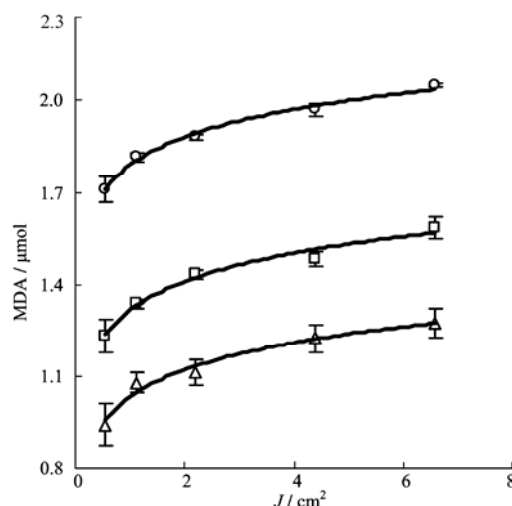


Fig.1 Formation of malondialdehyde in phosphatidylcholine solution prepared with different concentration as a function of radiation dose. Molar concentration is (○) 6.4mmol/L, (□) 3.2mmol/L, (△) 1.6mmol/L

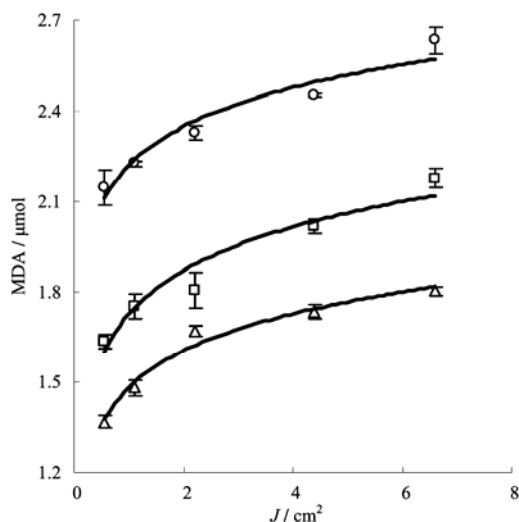


Fig.2 Formation of malondialdehyde in liposomal membrane prepared with different concentration as a function of radiation dose. Molar concentration is (○) 6.4mmol/L, (□) 3.2mmol/L, (△) 1.6mmol/L

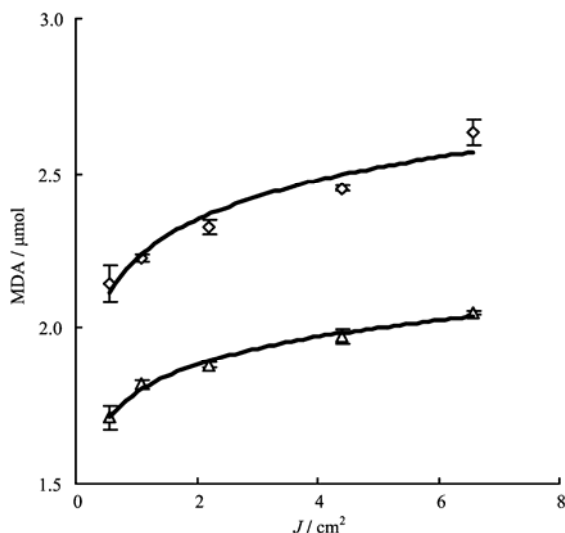


Fig.3 The relationship between liposomal membrane phosphatidylcholine solution in formation of malondialdehyde. Both liposomal membrane and phosphatidylcholine solution is 6.4mmol/L, (○) liposomal membrane, (△) phosphatidylcholine solution

3.2 胆固醇对脂质过氧化的保护作用

图4为胆固醇对磷脂接受UV-C辐照的影响。在相同照射量的紫外线照射下,含胆固醇与不含胆固醇的磷脂的过氧化产物MDA量差别不大,说明胆固醇对由UV-C照射引起的磷脂的过氧化并无明显的保护作用。图5为胆固醇对脂质体受UV-C照射的影响,含有胆固醇脂质体在各个照射量点上的MDA产量都明显减少(比未加胆固醇的脂质体减少30.0%左右),说明胆固醇对由UV-C辐射引起的脂质过氧化损伤起到很好的保护作用。众所周知,脂质的过氧化是由于照射产生的自由基引发的自由基

级联反应造成的,UV-C照射样品时,可检测到脂质过氧化产物MDA随着照射量增大。胆固醇对磷脂和脂质体样品的保护作用差别很大,这可能与磷脂与胆固醇的结合方式有关。加入胆固醇后的脂质体膜中磷脂与胆固醇分子间隔定向排列的,胆固醇可阻止部分的自由基级联反应,故有明显的保护作用。而在加入胆固醇的磷脂分子溶液中,胆固醇分子与磷脂分子系随机排列,不能有效地阻止自由基级联反应,故无明显的保护作用。

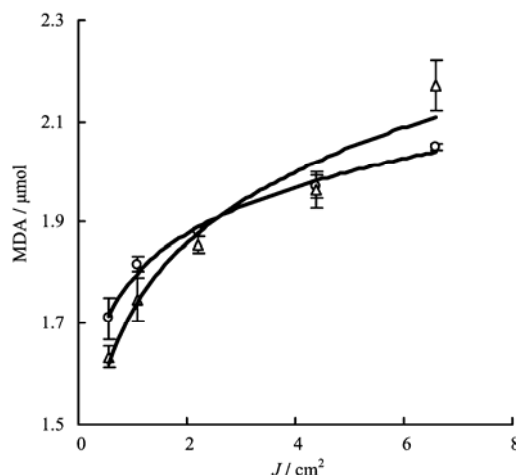


Fig.4 Formation of MDA in phosphatidylcholine solution prepared with and without as a function of radiation dose. Phosphatidylcholine: cholesterol ratio 1:0 (○), 1:1 (△)

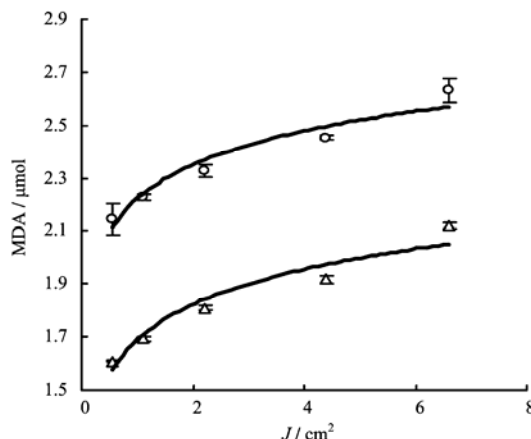


Fig.5 Formation of malondialdehyde in liposomal membrane prepared with or without cholesterol as a function of radiation dose. Phosphatidylcholine: cholesterol molar ratio 1:0 (○), 1:1 (△)

生物膜是辐射作用的一个重要靶分子,其辐射损伤也一直是研究热点,膜的辐射损伤主要由自由基引起的过氧化损伤。目前,较好的过氧化损伤检测方法是硫代巴比妥酸反应(TBA)法。本实验用TBA法研究了紫外线照射对磷脂、磷脂脂质体以及含有胆固醇的磷脂脂质体脂质过氧化损伤情况。实验表明,脂质体对辐射的敏感性要强于同等浓度的磷脂,

紫外照射后过氧化产物 MDA 的量也高于磷脂。这和 Mead 和 Raleigh 等^[11,12]的研究结果一致。

胆固醇对磷脂和脂质体的过氧化损伤抑制机制研究中,发现胆固醇对磷脂的过氧化损伤无明显抑制作用,而胆固醇对脂质体的过氧化损伤有很好保护作用。

参考文献

- 1 Stark G. *Biochimica Biophysica Acta*, 1991, **1071**(2): 103-122
- 2 丁振华, 范建中. 紫外辐射生物学与医学. 北京: 人民军医出版社, 2000. 147-148
DING Zenhua, FAN Janzhong. *Ultraviolet radiation biology medicine*. Beijing: People's Military Medicine Publication Press, 2000. 147-148
- 3 张武, 张蕾, 张婕, 等. 兰州大学学报, 2004, **40**(5): 100-105
ZHANG Wu, ZHANG Lei, ZHANG Jie, *et al.* *J Lanzhou Univ*, 2004, **40**(5): 100-105
- 4 杨和福. 极地研究, 2000, **12**(1): 40-61
YANG Hefu. *Chinese J Polar Res*, 2000, **12**(1): 40-61
- 5 Nagarsenker M S, Vaishali Y. Londhe G D. Nadkarni. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, **190**: 63-71
- 6 Pandey B N, Mishra K P. *Radiation Physics and Chemistry*, 1999, **54**: 481-489
- 7 Bartlett G R. *Journal of Biological Chemistry*, 1958, **234**(3): 466-468
- 8 刘巍. 磷肥与复肥, 1996, (2): 63-64
LIU Wei. *Phosphate Compound Fertilizer*, 1996, (2): 63-64
- 9 Ming-Kuei Shih, Miao-Lin Hu. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1999, **77**: 225-230
- 10 Agnieszka Sujak, Janina Gabrielska, Wojciech Grudzin ski, *et al.* *AspectsArchives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, **371**(2): 301-307
- 11 Mead J F. *Irradiation-induced Autoxidation of Linoleic Acid*, *Science*, 1952, **115**: 470-472
- 12 J. A. Raleigh, W. C, Gaboury B. *linoleic acid*, *Int J Radiat Biol*, 1977, **31**: 203

UV-Radiation induced oxidative damage modification by cholesterol in phosphatidylcholine and liposomal membrane

WANG Ning WANG Weidong ZHU Xiaorui WANG Junling ZHANG Dawei QIN Guangyong
(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT In order to study the peroxidation reaction of phosphatidylcholine and liposome induced by UV and the protection of cholesterol to phosphatidylcholine and liposome, predominantly unilamellar vesicles (ULVs) prepared by L- α -phosphatidylcholine were used as an alternate biological model. Phosphatidylcholine and liposome made by 20 μ mol of L- α -phosphatidylcholine with or without cholesterol were irradiated by 254 nm UV ray. Radiation induced peroxidation in phosphatidylcholine and liposome was measured spectrophotometrically by thiobarbituric acid (TBA) reaction. The results show that, the peroxidation of phosphatidylcholine and liposome increased with the UV irradiation dose. The liposome was more sensitive to UV radiation than phosphatidylcholine. Cholesterol significantly prevented Liposomal peroxidation, but had no effect on phosphatidylcholine peroxidation. The peroxidation of phosphatidylcholine and liposome is apparently related to the concentration and dose, and cholesterol can only protect liposome.

KEYWORDS UV-Radiation, Liposome, Lipid-peroxidation, Phosphatidylcholine

CLC Q691.9, O571.33, Q274, Q691.1