

紫外辐射对亚油酸的过氧化损伤研究

朱晓蕊 王卫东 王俊玲 秦广雍

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

摘要 以亚油酸制备的薄膜和水溶液为材料, 研究不同剂量、剂量率紫外线对亚油酸的过氧化损伤。分别采用硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)法和紫外分光光度法检测受照样品中丙二醛(MDA)和共轭二烯的变化情况。结果表明, 剂量率相同时, 亚油酸的过氧化程度随紫外照射量增大而增大; 总照射量不变时, 亚油酸的过氧化程度随着剂量率的增大而减小; 膜状态下亚油酸对紫外辐射敏感性比溶液状态下强。

关键词 紫外辐射, 亚油酸, 脂质过氧化

中图分类号 Q691.9, O571.33, Q274, Q691.1

辐射生物学中, 细胞膜被认为是氧化作用敏感场所。已有的研究表明细胞膜中的多聚不饱和脂肪酸对辐射产生的氧化损伤非常敏感, 生物膜的辐射损伤主要由生物膜中不饱和脂肪酸的过氧化反应造成的^[1]。亚油酸属于不饱和脂肪酸, 其成分单一且易于取得, 是研究脂质过氧化反应较理想的模型材料。紫外辐射为非电离辐射中研究最多的辐射源, 其产生的辐射损伤已被学者认可, 而且在所有的非电离辐射中其辐射损伤最强。目前低剂量环境辐射研究越来越被人们所重视, 紫外线作为日常环境辐射中接触最多的辐射源, 其辐射损伤效应倍受重视。在具有辐射环境生物效应的紫外线中, 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]。本实验以亚油酸为材料, 选用短波紫外线为辐照源, 研究其对不饱和脂肪酸的过氧化损伤, 拓展生物膜紫外辐射损伤机理研究。

1 材料与方法

1.1 材料

亚油酸($C_{18}H_{32}O_2$) (购自Sigma) 等所用试剂均为分析纯。仪器设备主要有循环水式真空泵, TU-1901型双光束紫外可见分光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 亚油酸干膜的制备 参照 Chatterjee 等^[3]的

方法并略有改动。将亚油酸和无水乙醇以相同的摩尔比混合, 分别取1mL置于直径为3cm的玻璃培养皿中, 放在密闭玻璃容器中用循环水式真空泵抽真空, 待溶剂挥发完后亚油酸在玻璃皿底部成膜, 置于真空容器中备用。

1.2.2 亚油酸溶液的制备 参照 Raleigh 等^[4]的方法, 将亚油酸和三蒸水按所需摩尔比混合, 用NaOH调节PH=11.5, 置于真空容器中备用。实验发现, 当亚油酸浓度为 10×10^{-3} mol/L时, 亚油酸溶液比较均匀、稳定, 浓度过大时易成为悬浊液。已有研究表明, 亚油酸过氧化损伤程度与亚油酸溶液浓度有关, 当亚油酸浓度大于 2.3×10^{-3} mol/L时, 过氧化损伤会有一个显著提高^[5]。因此选用亚油酸浓度为 10×10^{-3} mol/L。

1.2.3 样品辐射 紫外线可根据其波长的不同分为长波紫外线UV-A (400~320 nm)、中波紫外线UV-B (320~280 nm) 和短波紫外线UV-C (280~180nm)。三种紫外线中UV-C的波长最短, 生物学效应也最明显, 因此本试验采用波长为254 nm、功率为40 W的国产紫外灯管为辐照源。

将制备好的实验样品分别放在直径为3cm的培养皿中, 亚油酸溶液的厚度为2 mm, 放在紫外灯正下方进行照射, 每个剂量点3个重复。通过调节照射时间和样品距紫外灯的距离, 即可得到不同的照射剂量(J/cm^2)和剂量率(mW/cm^2)。

国家自然科学基金项目(10505018) 资助

第一作者: 朱晓蕊, 女, 1981年2月出生, 2004年毕业于信阳师范学院物理教育专业, 现为郑州大学在读硕士研究生, 研究方向为紫外辐射效应

通讯联系人: 王卫东, E-mail: wwd413@zzu.edu.cn

收稿日期: 初稿 2008-01-14, 修回 2008-02-29

1.3 过氧化检测

1.3.1 MDA 检测 用 TBA 法来检测由辐照引起的亚油酸脂质过氧化, 参照 Ming-Kuei Shih 和 Miao-Lin Hu 使用的方法并进行改进。在 1 mL 辐照过的样品中加入 1 mL 的 TBA 和 1 mL 2.5% 的三氯乙酸(TCA), 于沸水浴中加热 10 min。冷却后以 12400 r/min 离心 10min, 取上清在 532 nm 处测量过氧化产物丙二醛(MDA)的摩尔吸光值(MDA 的摩尔吸光系数为 $1.56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [6,7])。

1.3.2 共轭二烯检测 参照 Klein [8] 方法检测共轭二烯。用分光光度计将辐射制备的样品在 233 nm 处测量过氧化产物共轭二烯 (Dienen conjugation) 的摩尔吸光值 (共轭二烯的摩尔吸光系数为 $3.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [9])。

1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS3.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果与讨论

2.1 紫外线对亚油酸薄膜的辐射损伤

2.1.1 相同剂量率下紫外线对不同浓度亚油酸的辐射损伤 图 1 和图 2 是不同浓度的亚油酸所制成的薄膜接受紫外线照射(剂量率为 3.33 mW/cm^2)后, 其过氧化产物 MDA、共轭二烯量与照射剂量的关系。结果表明, 随着照射剂量和亚油酸浓度的增加, 亚油酸的过氧化产物 MDA、共轭二烯的量均会增大。在相同紫外线照射剂量下, 随亚油酸浓度增大, 其过氧化产物绝对值会随之增加, 从增幅来看, 浓度为 $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的亚油酸膜产生的共轭二烯的量大概是 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 2 倍, $40 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 是 $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的大约 2 倍。随浓度增加, 其过氧化物量并没有随浓度线性增加, 其原因可能是随浓度增加膜厚度也增加, 由于空气中氧较难扩散到底层亚油酸, 使其不能充分参与过氧化反应。

2.1.2 不同剂量率紫外线对相同浓度亚油酸的辐射损伤 在紫外线照射总剂量相同情况下, 图 3、图 4 为 $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 亚油酸薄膜的过氧化产物 MDA、共轭二烯的量与不同照射剂量率的关系。结果表明, 在总剂量相同的情况下, 亚油酸的过氧化程度随着紫外线剂量率的增大而减小。 t 检测显示差异极显著。众所周知, 脂质的过氧化是由于辐射产生的自由基引发的自由基级联反应造成的, 氧在这一过程

中起着重要作用。在辐射总剂量相同时, 剂量率越大, 辐射时间越短, 亚油酸接触到的氧越少, 因此过氧化产物越少。所以, 总剂量相同时, 亚油酸过氧化程度随着剂量率的增大而减小。

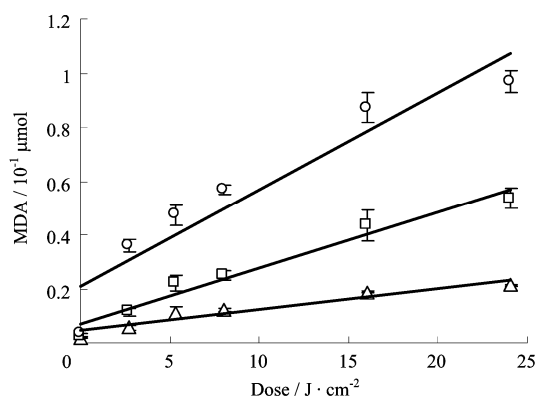


Fig.1 Formation of MDA in dried thin film of linoleic acid prepared with different concentration as a function of doses: (○) $40 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; (□) $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; (△) $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

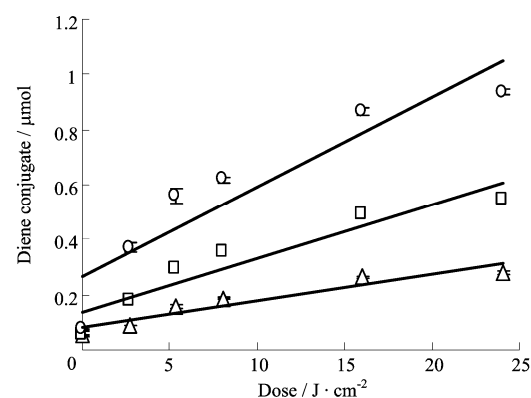


Fig.2 Formation of diene conjugate in dried thin film of linoleic acid prepared with different concentration as a function of doses: (○) $40 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; (□) $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; (△) $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

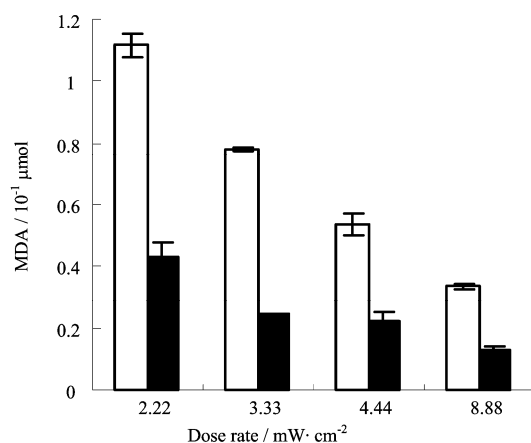


Fig.3 The production of MDA in dried thin film of linoleic acid with different dose rate of UV light(254 nm): (□) 24.03 J/cm^2 ; (■) 5.34 J/cm^2

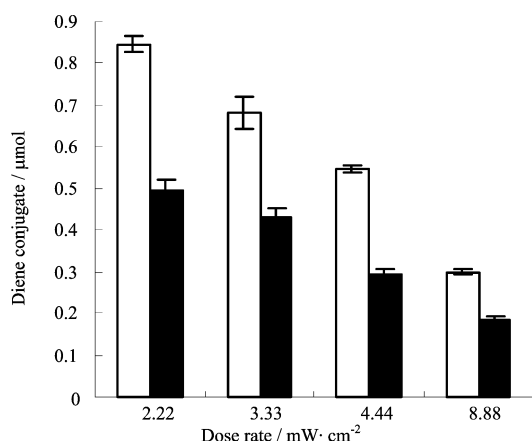


Fig.4 The production of diene conjugate in dried thin film of linoleic acid with different dose rate of UV light(254 nm): (□)24.03 J/cm²; (■)5.34 J/cm²

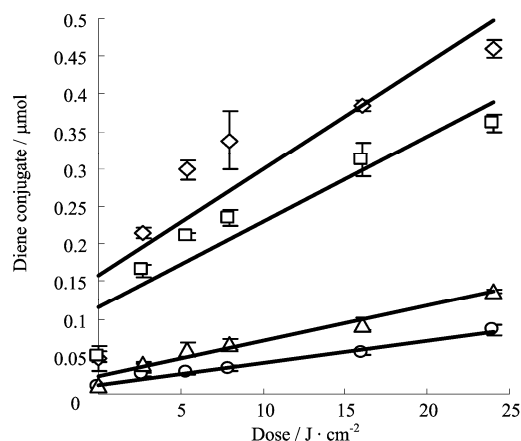


Fig.6 The production of diene conjugate in the solution of linoleic acid (10×10^{-3} mol/L, PH=11.5) with different doses of UV light: (◇) 2.22 mW/cm²; (□) 3.33 mW/cm²; (△) 4.44 mW/cm²; (○) 8.88 mW/cm²

2.2 紫外线对亚油酸溶液所造成的辐射损伤

图 5 和图 6 是紫外线照射总剂量相同情况下, PH=11.5、 10×10^{-3} mol/L 亚油酸溶液的过氧化产物 MDA、共轭二烯的量与不同照射剂量率的关系。结果表明, 剂量率相同时 MDA、共轭二烯的量与照射剂量成线性关系, MDA、共轭二烯的量随着照射剂量的增大而增大; 剂量率不同时, MDA、共轭二烯的量随着紫外线剂量率的增大而减小。同亚油酸薄膜辐射时情况大致相同, 剂量率增大时, 辐射时间减小, 溶液接触氧较少, 且水溶液中辐射产生的自由基较少, 自由基级联反应也随之较少。所以, 亚油酸溶液过氧化程度随着辐射剂量率的增大而减小。

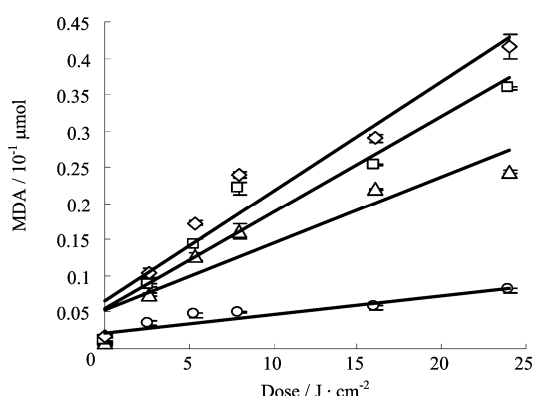


Fig.5 The production of MDA in solution of linoleic acid (10×10^{-3} mol/L, PH=11.5) with different doses of UV light: (◇) 2.22 mW/cm²; (□) 3.33 mW/cm²; (△) 4.44 mW/cm²; (○) 8.88 mW/cm².

图 7、图 8 为不同剂量率条件下, 亚油酸薄膜和溶液过氧化损伤比较图。可以发现, 亚油酸在膜状态和溶液状态时的过氧化程度的变化大致相似, MDA、共轭二烯的量均随着照射剂量的增大而增大、随着剂量率的增大而减小; 在照射总量、剂量率相同时, 相同量亚油酸制成的溶液其辐射生成的 MDA、共轭二烯量小于膜产生的量。 t 检测显示差异极显著。其原因可能是膜比较薄, 接触到氧的亚油酸比较多, 而溶液只有表面的亚油酸才能接触到氧, 因此, 膜状态下过氧化程度较大。

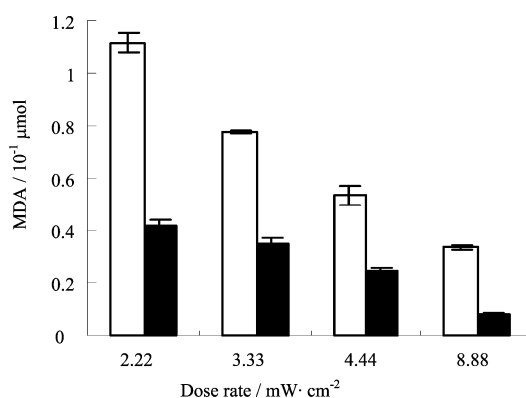


Fig.7 The formation of MDA in dried thin film and solution of linoleic acid with different dose rates of UV light (Dose: 24.03 J/cm²) (□) Dried thin film; (■) Solution

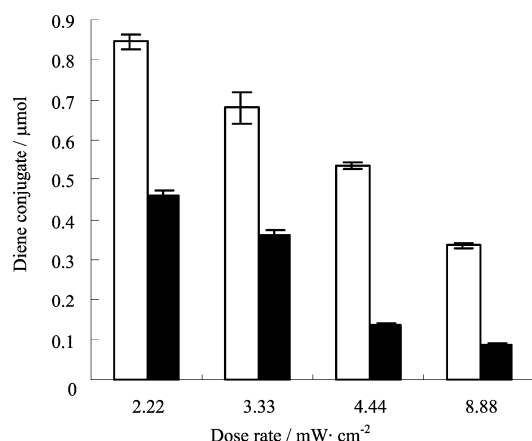


Fig.8 The formation of diene conjugate in dried thin film and solution of linoleic acid with different dose rates of UV light (Dose: 24.03 J/cm²) (□)Dried thin film;(■)Solution

3 结论

辐射生物研究表明,生物膜是辐射氧化损伤主要靶之一,因为细胞膜中的多聚不饱和脂肪酸对辐射氧化损伤非常敏感,使不饱和脂肪酸发生过氧化反应。本实验以不饱和脂肪酸亚油酸为细胞膜模型材料,构建氧化体系,研究了紫外线对亚油酸薄膜和溶液的过氧化损伤。结果表明,剂量率相同时,亚油酸的过氧化程度随紫外照射量增大而增大;总照射剂量不变,亚油酸的过氧化程度随剂量率增大而减小。本研究结果和 Biplab 等^[10]报道相一致。在辐射总量、剂量率相同时,相同量亚油酸所制成的溶液 MDA、共轭二烯的生成量小于膜,这一结果

和 Chatterjee 等^[3]的研究结果相反,对此本文进行了一定讨论。

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 Chatterjee S N, Agarwal S. *Radiat Environ Biophys*, 1983, **21**: 275-280
- 4 Raleigh J A, Kremers W, Gaboury B. *Int J Radiat Biol*, 1977, **31**(3): 203-213
- 5 Nagarsenker M S, Vaishali Y, Londhe G D, *et al.* *Int J Pharm*. 1999, **190**: 63-71
- 6 Shih M K, Hu M L. *J Inorg Biochem*. 1999, **77**: 225-230
- 7 Sujak A, Gabrielska J, Wojciech Grudzin ski, *et al.* *Aspects Archives Biochem Biophys*. 1999, **371**(2): 301-307
- 8 Klein R A. *Biochimica et Biophysica Acta* 1970, **210**: 486-489
- 9 New R R C. *Liposomes: A practical approach*. New York: Oxford University Press, 1990: 105-161
- 10 Biplab B, Sanjiv Agarwal, Chatterjee S N. *Radiat Environ Biophys*, 1989, **28**: 59-65

UV-radiation induced oxidative damage in linoleic acid

ZHU Xiaorui WANG Weidong WANG Junling QIN Guangyong

(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT In order to study the peroxidation reaction of lenoleic acid induced by UV the dried thin film and solution prepared by linoleic acid were irradiated by UV light (254 nm). The production, MDA and diene conjugate, formed in peroxidation reaction of dried thin film and lenoleic acid solution was measured by thiobarbituric acid (TBA) reaction and absorption spectra. The results show that the Lipid-peroxidation of the dried thin film and lenoleic acid solution increases with the UV irradiation dose and decreases with UV irradiation dose rate. The dried thin film is more sensitive to the UV radiation than the solution.

KEY WORDS UV-Radiation, Linoleic acid, Lipid-peroxidation

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