

银杏叶中槲皮素黄酮苷类抗紫外线作用的研究

山东大学生命科学院(济南 250100) 李 艳* 张举仁 徐誉泰

摘 要 小鼠肝细胞接受不同剂量的紫外线照射后,线粒体的结构和功能受到不同程度的损伤,而且具有明显的剂量效应,这种损伤主要表现在脂质过氧化程度增大以及由此导致的线粒体膜流动性下降和细胞色素 C 氧化酶(CCO)活力的降低。从银杏叶中提取的槲皮素黄酮苷类可以显著抑制线粒体的这种变化,从而保护紫外线引起的线粒体的结构和功能的损伤。

关键词 银杏叶 紫外线 线粒体 槲皮素黄酮苷

Studies on the Anti-UV-Irradiation Effect of Quercitrin Extracted from Ginkgo Leaves (*Ginkgo biloba*)

Li Yan, Zhang Juren and Xu Yutai (College of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract When mouse liver cells were irradiated with different doses of UV radiation, the structures and functions of cell mitochondria were found to be effected, dose dependently, to varies degrees. The effects mainly resulted in an increase of degree of lipid peroxidation, and a decrease of the fluidity of mitochondrial membrane and the activity of cytochrome C oxidase. Quercitrin, extracted from the leaves of *Ginkgo biloba* L. showed a marked protective effect on the function of mitochondria before incubating with UV irradiation.

Key words UV irradiation mitochondria quercitrin

黄酮类化合物的抗氧化作用早已被人们所重视,以黄酮和内酯为有效成分的银杏叶提取物临床上广泛用于改善与脂质过氧化有关的疾病及衰老症状。近代工业的发展,大量氟化物和氮氧化合物排入大气,臭氧层遭到一定破坏,地球上的生物接受的紫外照射剂量显著增加,紫外线对机体的有害效应已有充分资料证明。我们研究了银杏叶中槲皮素黄酮苷类对于紫外照射引起的线粒体损伤的保护作用,为从银杏叶中开发抗紫外线药物奠定了基础,对于银杏叶的开发应用有十分重要的意义。

1 材料

1.1 试剂:硫代巴比妥酸(TBA,上海生化试剂厂),细胞色素 C(齐鲁生化制药厂),

RMPI-1640 细胞培养粉(GIBCO 产品),1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH,Fluka 公司产品),四乙氧基丙烷(TEP,Sigma 公司产品),其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器:冷冻高速离心机,721 型分光光度计,UV-240 型紫外分光光度计,日立 850 型荧光分光光度计,LC-10A 型高效液相色谱仪,CO₂ 细胞培养箱。

2 方法与结果

2.1 银杏叶中槲皮素黄酮苷类物质的提取:应用硅胶薄板层析的方法^[1]从银杏叶总黄酮中分离得到,进一步通过 HPLC 分析^[2]、苷元及糖的分析^[3]确定该组分是以槲皮素为苷元的黄酮糖苷。

2.2 不同剂量的紫外线对线粒体的影响:取

* Address: Li Yan, College of Life Sciences, Shandong University, Jinan

李 艳 1991~1995 年在山东大学生命科学院生化专业学习,1995~1998 年在本院攻读细胞生物学专业的硕士学位,主要研究方向是天然抗氧化、抗癌药物的筛选及药理,发表有关论文 3 篇。现在本院发育生物学研究所读博士,研究方向是发育机制及基因调控。

3月龄昆明种小鼠,断颈椎法处死,取出肝脏,分离肝细胞,方法参照文献^[4],得 5×10^6 个细胞/毫升的细胞悬液。将适量的小鼠肝细胞悬液置于剂量率为 $760 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的紫外线下照射不同时间,收集细胞,应用差速离心法^[5]提取线粒体(线粒体蛋白含量测定用Coomassie 亮蓝染色法^[6],以牛血清白蛋白为标准),测定线粒体脂质过氧化程度、膜流动性和细胞色素C氧化酶(CCO)活力的变化。

2.2.1 紫外线对于线粒体脂质过氧化的影响:过氧化脂质的含量测定,采用TBA比色法^[6],以四乙氧基丙烷为标准,以丙二醛(MDA)含量表示脂质过氧化程度。过氧化脂质形成的抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{损伤组 MDA} - \text{保护组 MDA}}{\text{损伤组 MDA} - \text{对照组 MDA}} \times 100\%$$

实验结果表明紫外线可显著影响过氧化脂质的形成,在紫外线照射初始阶段,线粒体膜脂对之非常敏感。照射5 min,过氧化脂质含量几乎为正常状态时的2倍,随着紫外线剂量的继续增加,线粒体脂质过氧化水平继续升高,2 min之后,过氧化脂质的水平几乎接近最大(图1)。

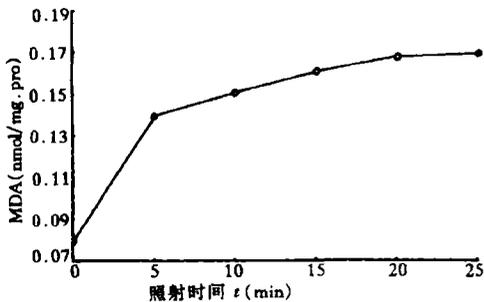


图1 紫外线照射对线粒体脂质过氧化的影响

2.2.2 紫外线照射对线粒体膜流动性的影响:线粒体膜流动性分析^[7]以DPH为荧光探针,应用日立荧光分光光度计测定 $I_{0,90}, I_{0,0}, I_{90,0}, I_{90,90}$,计算荧光偏振度(P),定量了解线粒体膜脂分子的运动情况,即微粘度(η),微粘度越大,膜流动性越小,反之亦然。

$$P = \frac{I_{0,0} - G \times I_{0,90}}{I_{0,0} + G \times I_{0,90}}, \quad G = \frac{I_{90,0}}{I_{90,90}}, \quad P = \frac{2P}{0.46 - P}$$

紫外线照射可以明显地降低线粒体膜的流动性,且剂量效应显著。在开始的一段时间内,膜流动性变化比较缓慢,到照射时间为10 min时,膜流动性陡然下降,20 min时,线粒体膜的流动性几乎达到最小(图2),这表明膜脂状态与膜流动性两者之间密切相关,膜流动性下降可能是膜脂过氧化达到一定程度后的结果。

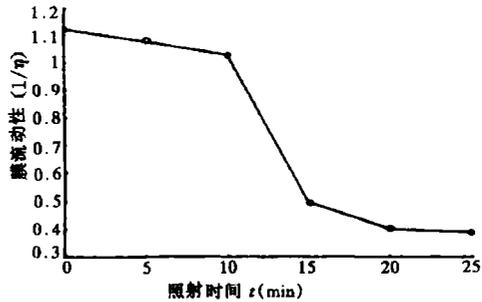


图2 紫外线照射对线粒体膜流动性的影响

2.2.3 紫外线照射对CCO活力的影响:CCO活力的测定采用底物氧化法,在细胞色素C逐渐被氧化的过程中做 $A_{550\text{nm}}$ 对时间 t 的连续扫描,具体操作参照文献^[8]。最后以 $\ln(A_t - A_\infty)$ 对时间 t 做图,并做回归分析,直线斜率 K 即表示酶活,比活为 $K/(\text{秒}, \text{毫克蛋白})$ 。

实验结果表明,紫外线照射可以降低CCO的活力,随着紫外剂量的增加,CCO活性逐渐降低(图3)。

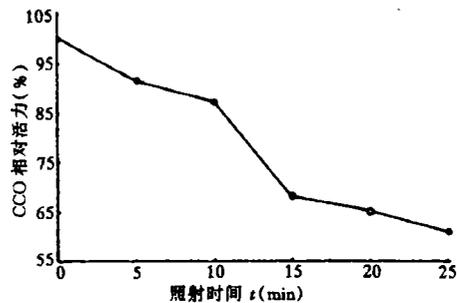


图3 紫外线照射对CCO活力的影响

2.3 槲皮素黄酮苷类对紫外线导致的线粒体损伤的保护作用:细胞悬液中加入不同浓度的槲皮素黄酮苷(浓度设定参照有关文献^[9]和预备实验),然后置于 37°C 的 CO_2 培

养箱中培养 2 h, 设为保护组, 对照组和损伤组只加入同体积的 PBS。将保护组和损伤组置于紫外灯下照射 20 min, 对照组置日光灯下相同时间, 然后提取线粒体, 分析线粒体的过氧化脂质含量、膜流动性以及 CCO 活力。

2.3.1 对线粒体脂质过氧化的影响: 见表 1。槲皮素黄酮苷显著地抑制了紫外线引起的过氧化脂质的形成, 而且随着浓度的升高, 这种抑制能力增加。

表 1 槲皮素黄酮苷对线粒体脂质过氧化水平的影响($\bar{x} \pm s$)

浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MDA(nmol/mg·pro)	抑制率(%)
对照组	0.119 \pm 0.063	
损伤组	0.265 \pm 0.056	
5.27	0.199 \pm 0.024	45.2
10.54	0.187 \pm 0.102	53.4
15.81	0.160 \pm 0.088	71.9
21.08	0.151 \pm 0.029	78.1

2.3.2 对线粒体膜流动性降低及 CCO 活力降低的影响: 见表 2, 3。槲皮素黄酮苷能够抑制紫外线引起的膜流动性降低和 CCO 活力的降低, 而且具有剂量效应。

表 2 槲皮素黄酮苷对线粒体膜流动性的影响($\bar{x} \pm s$)

浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	荧光偏振度 P	1/ η
对照组	0.142 \pm 0.069	1.12
损伤组	0.256 \pm 0.024	0.398
5.27	0.234 \pm 0.050	0.483
10.54	0.195 \pm 0.029	0.679
15.81	0.170 \pm 0.036	0.853
21.08	0.164 \pm 0.017	0.902

表 3 槲皮素黄酮苷对 CCO 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CCO 比活(U/mg)	相对活力(%)
对照组	0.663 \pm 0.102	100
损伤组	0.436 \pm 0.086	65.8
5.27	0.460 \pm 0.105	69.4
10.54	0.526 \pm 0.074	79.3
15.81	0.592 \pm 0.115	89.3
21.08	0.614 \pm 0.036	92.6

3 讨论

实验结果显示, 紫外线照射小鼠肝细胞后会对线粒体造成损伤, 这种损伤表现为线粒体脂质过氧化程度增加、膜流动性降低以及 CCO 活力降低等方面, 而且随着紫外线剂量的增加, 损伤作用更加严重。线粒体膜脂受

紫外线照射后发生过氧化, 导致过氧化脂质及其分解产物 MDA 含量显著增高, MDA 易与膜蛋白和膜脂上的-NH₂ 交联形成 shiff's 碱, 从而使膜的刚性增加^[10], 加上膜中不饱和脂肪酸含量的降低, 于是线粒体膜流动性下降。细胞色素 C 氧化酶活力下降的机制可能有两个方面, 一是酶分子中的二硫键和次级作用力对紫外线比较敏感, 紫外照射后遭到一定程度的破坏, 钝化了该酶的催化能力^[11]; 二是膜脂-膜蛋白相互作用的变化, 有文献报道^[12], CCO 活力的表达依赖于完整结构的心磷脂的存在, 心磷脂发生过氧化可能会间接影响 CCO 的活力。紫外线引起的线粒体膜流动性降低, 也可能限制 CCO 酶分子构象的调整, 从而影响 CCO 发挥正常的生物学功能。黄酮类化合物能够有效地清除自由基, 槲皮素黄酮苷的加入可能捕获了线粒体膜上的不饱和脂肪酸受紫外线照射后产生的脂类分子自由基, 如 L, LOO, 阻止了自由基链反应的进行, 从而有效地抑制膜中过氧化脂质的形成, 减少了过氧化脂质及其分解产物对膜性质的损伤, 保护了 CCO 的活力。CCO 是呼吸链最末端的氧化酶, 它的活力与线粒体的功能密切相关, 因此线粒体的功能得到了保护。

参考文献

- 1 中国科学院上海药物研究所编译. 黄酮化合物鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1981: 314
- 2 苑可武, 等. 中草药, 1997, 28(4): 211
- 3 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 31
- 4 方福德, 等编. 现代医学实验技巧全书. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版, 1995: 469
- 5 Low H, et al. Biochem Biophys Acta, 1963, 69: 361
- 6 陈勤主编. 抗衰老研究实验方法. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 489
- 7 张志鸿, 等编. 生物物理学实验. 上海: 复旦大学出版社, 1991: 81
- 8 刑辉, 等. 生物化学杂志, 1996, 12(4): 450
- 9 刘诗平, 等. 中草药, 1991, 22(4): 183
- 10 Hochstein P. Lipid Peroxides in Biology and Medicine. New York: Academic press, 1982: 81
- 11 Smith K C 编, 沈恂等译. 光生物学. 北京: 科学出版社, 1984: 126, 150, 220
- 12 程昆蓉, 等. 生物物理学报, 1992, 8(1): 143

(1998-03-28 收稿)