

吸烟烟气对鼠肺细胞膜的损伤 和茶多酚的保护作用*

杨法军 赵保路 忻文娟

(中国科学院生物物理研究所, 北京, 100101)

沈生荣 杨贤强

(浙江农业大学茶学系, 杭州, 310029)

摘 要

本文以香烟气相物质作用鼠肺细胞膜为模型, 用脂肪酸自旋标记物5-DOXYL和16-DOXYL分别研究膜浅层和深层的动态性质受气相烟的影响, 并用紫外可见分光光度法研究气相烟对膜脂的作用。结果发现, 在实验的气相烟流量下, 香烟气相物质能引发鼠肺细胞膜的脂质过氧化, 并且使膜浅层的流动性增大。但对膜深层的动态性质没有明显的改变。如果在鼠肺细胞中预先加入粗晶态或粉态茶多酚, 则肺细胞的过氧化和膜的动态性质改变受到抑制, 而且这种抑制作用与茶多酚浓度呈量效关系。而茶多酚本身对膜浅层无明显作用, 但对膜深层的流动性有一定影响。而且两种茶多酚的作用相似。

关键词: 吸烟烟气, 鼠肺细胞, 茶多酚,

吸烟严重危害人体健康。有研究结果表明, 吸烟者肺癌、局部缺血性心脏病、慢性支气管炎和肺气肿的发病率比不吸烟者有显著的增高^[1]。吸烟成分包括固相和气相两部分, 两者可以用标准Cambridge滤纸分开, 而通过滤纸的气相物质中含有NO, NO₂以及烷基和烷氧基自由基等具有氧化性的活泼物质, 它们与气相烟对人体的损伤作用有密切关系^[1-3]。茶多酚(green tea polyphenols, 缩写: GTP)是从绿茶中提取的多酚类物质, 已经研究发现它对O₂和OH·有清除作用^[4]。现在我们以香烟气相物质损伤大白鼠肺细胞膜为模型, 研究了粗晶态、粉态GTP对这样损伤的抑制作用。

材 料 与 方 法

本实验所用雌性Wistar大白鼠(年龄60±4 d, 重200—250g)取自本所动物房; 5-DOXYL和16-DOXYL脂肪酸自旋标记物购自美国Sigma化学公司; 粗晶态和粉态茶多酚(茶多酚含量分别大于90%和45%)由浙江农业大学茶学系提取; 试验用“长乐”牌香烟购自北京卷烟厂; 其他试剂为国产AR级。

1. 鼠肺细胞提取和气相烟处理

将大白鼠开胸取肺, 在冻水温度下切碎后匀浆, 用纱布过滤, 在4℃下用3000g离

* 国家自然科学基金部分资助项目

心10min, 沉淀细胞用0.9%NH₄Cl溶液胀破红细胞, 用PBS(0.05mol/l, pH7.4的磷酸缓冲液)洗涤两次. 合并几只大白鼠的肺细胞, 以每只鼠肺加3.0ml PBS配制成鼠肺细胞悬液. 在2.2ml鼠肺细胞(rat lung cells, 缩写: RLC)悬液中通入经一层Cambridge滤纸过滤后的气相烟, 流量为100ml/min.

2. 脂质过氧化程度的测定

鼠肺细胞的过氧化程度用TBA(thio-barbituric acid)反应物TRS(TBA reactive substances)的含量来表示, 根据文献[5]略作改进. RLC悬液0.4ml, 0.1mol/l盐酸0.8ml, 0.67%TBA0.8ml, 1%SDS(sodium lauryl sulfate)0.4ml充分混合后在95℃下加热1h, 取出用正丁醇抽提, 在Perkin-Elmer紫外可见分光光度仪上测上清液的吸光度, TRS的最大吸收峰在533nm. 用TMP作TRS的标准物. TRS含量用下述公式计算: $[TRS] = f/F \times 4$ (nmol/ml). 其中f为样品的吸光度; F为TMP的吸光度.

3. 鼠肺细胞膜的标记和ESR(electron spin resonance)测试

用5-DOXYL和16DOXYL脂肪酸自旋标记物, 以 1.5×10^{-8} mol/l与大白鼠肺细胞混合后在37℃下温育1h, 然后在4℃下用3000g离心10min, 倒去上清液, 用玻璃毛细管吸细胞在Varian, E-109 ESR波谱仪上测试. 测试条件: 微波功率20mW, 调制0.2mT, 扫宽20mT, 时间常数0.128s, 测试温度24℃. 所得谱图如图1中A和B所示, 序参数S和旋转相关时间 τ_c 按文献[6]方法计算.

结 果

1. 气相烟对鼠肺细胞膜的作用

随通烟时间的延长, 鼠肺细胞中TBA反应物(TRS)含量增加(见图2A), 说明鼠肺细胞的脂质过氧化程度增大. 同时, 用5-DOXYL和16-DOXYL脂肪酸自旋标记物标记通烟后的鼠肺细胞, 结果发现, 5-DOXYL的序参数(S)随通烟时间呈明显的下降趋势(见图2B), 而16-DOXYL的序参数和旋转相关时间(τ_c)没有明显变化

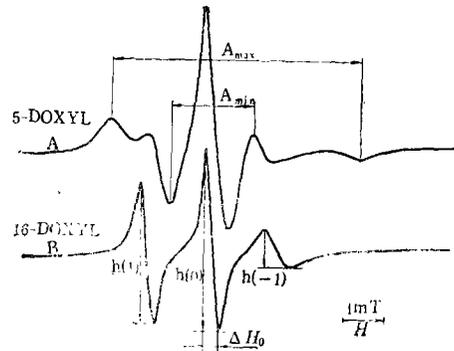


图1 用5-DOXYL(A)和16-DOXYL(B)脂肪酸自旋标记物标记鼠肺细胞膜的ESR波谱
Fig.1 The ESR spectra of the RLC membrane labeled by 5-DOXYL (A) and 16-DOXYL (B) stearic acid

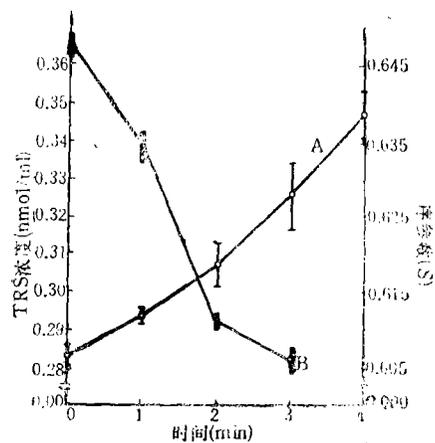


图2 随通烟时间的延长, 鼠肺细胞膜的脂质过氧化程度增大(A); 膜的流动性增加(B, 用5-DOXYL标记的序参数S下降)

(图中数据为平均士方差, n=5)

Fig. 2 Increase of the amount of TRS (curve A) and the membrane fluidity (curve B, S value decreases by using 5-DOXYL stearic acid as spin label) of RLC with increasing bubbling time of gas-phase cigarette smoke through the suspension of RLC

(见表1)。说明香烟气相物质使鼠肺细胞膜表层流动性增大,而对深层则影响不大。

表1 通烟时间对16-DOXYL脂肪酸自旋标记物标记的鼠肺细胞膜波谱参数的影响
(平均±方差, $n=3$)

Table 1 Effects of the GPCS bubbling time on spectrum parameters of RLC membrane spin labeled by 16-DOXYL stearic acid

通烟时间(min)	0	1.0	2.0	3.0
S	0.147	0.147	0.148	0.148
	±0.019	±0.016	±0.018	±0.028
$\tau_c (\times 10^{-10}s)$	10.08	10.27	10.10	10.25
	±1.02	±0.51	±2.05	±1.00

2. 茶多酚对鼠肺细胞受气相烟损伤的保护作用

如果预先在鼠肺细胞中加入粗晶态和粉态GTP, 37°C下温育15min后再通烟, 结果发现, 在相同的通烟时间下, 鼠肺细胞的脂质过氧化程度随GTP浓度增加而降低(见图3)。说明GTP对气相烟过氧化鼠肺细胞膜有明显的抑制作用。同时, 随GTP浓度升高, 5-DOXYL的序参数逐渐回升, 在GTP浓度为0.1mg/ml左右时, 其序参数几乎恢复到不通烟时的值(见图4)。因此, GTP能抑制香烟气相物质改变鼠肺细胞膜的动态性质, 而且粗晶态和粉态GTP的作用相近。

3. 茶多酚对鼠肺细胞的作用

为了弄清GTP本身对鼠肺细胞膜的作用, 我们将GTP与鼠肺细胞混合, 在37°C下温育15min后, 用5-DOXYL和16-DOXYL标记(自旋标记物浓度为 1.5×10^{-6} mol/l), 结果发现, 5-DOXYL的序参数和旋转相关时间没有显著的变化; 16-DOXYL的序参

表2 茶多酚对5-DOXYL脂肪酸自旋标记物标记的鼠肺细胞膜的影响
(平均±方差, $n=3$)

Table 2 Effects of GTP on the RLC membrane labeled by 5-DOXYL stearic acid

波谱参数	GTP浓度(mg/ml)	0.0	0.00091	0.0091	0.091
S	粗晶态GTP	0.647	0.645	0.645	0.647
		±0.007	±0.004	±0.010	±0.006
	粉态GTP	0.647	0.646	0.647	0.643
		±0.007	±0.011	±0.008	±0.002
$\tau_c (\times 10^{-10}s)$	粗晶态GTP	22.42	19.12	18.84	21.31
		±1.24	±1.30	±0.83	±0.11
	粉态GTP	22.42	18.34	16.87	19.17
		±1.24	±4.58	±1.19	±3.35

数和旋转相关时间都略有降低(如表 2 和表 3 所示)。说明 GTP 对鼠肺细胞膜表层没有明显的影响, 但对深层有一定的影响。

表 3 茶多酚对 16-DOXYL 脂肪酸自旋标记物标记的鼠肺细胞膜的影响
(平均 ± 方差, $n=3$)

波谱参数	GTP 浓度(mg/ml)	0.00	0.00091	0.0091	0.091
S	粗晶态 GTP	0.147 ±0.019	0.143 ±0.002	0.139 ±0.006	0.140 ±0.002
	粉态 GTP	0.147 ±0.019	0.134 ±0.015	0.138 ±0.011	0.140 ±0.009
$\tau_c (\times 10^{-10} \text{s})$	粗晶态 GTP	10.08 ±1.02	6.43 ±0.01	6.65 ±0.20	6.42 ±0.06
	粉态 GTP	10.08 ±1.02	6.42 ±0.16	6.51 ±0.22	6.44 ±0.13

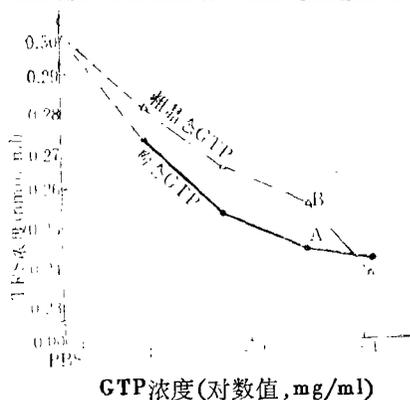


图 3 在通烟 1.5 min 情况下, 鼠肺细胞膜的脂质过氧化程度随茶多酚量增加而减小 (37°C)

Fig. 3 Decrease of lipid peroxidation of RLC (which treated by gas-phase cigarette smoke for 1.5 minutes) with increasing the concentration of GTP

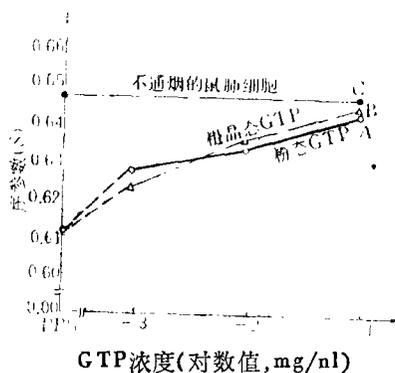


图 4 在通烟 2 min 情况下, 茶多酚浓度与 5-DOXYL 脂肪酸自旋标记物标记的鼠肺细胞膜序参数变化的关系

Fig. 4 The relationship between the concentration of GTP and the order parameter of RLC which labeled by using 5-DOXYL stearic acid and treated by gas-phase cigarette smoke for 2 min

讨 论

吸烟产生的气相物质组成比较复杂, 其中含有大量的 NO_2 和以氧为中心、碳为中心的活泼自由基, 还有其它一些有机物^[4]。活泼自由基和氧化性气体的存在使香烟气相物质能够引发脂质过氧化。我们的结果也表明, 香烟气相物质使鼠肺细胞中脂质过氧化终产物之一——MDA (malonaldehyde) 含量增高。生物膜中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化后, 有文献报道膜的流动性降低^[7], 但也有文献报道相反的结果^[8]。在气相烟作

用大鼠肺细胞的模型中,我们用脂肪酸自旋标记物标记方法研究发现,在试验的烟气流流量下,鼠肺细胞膜浅层的流动性增大,而深层的流动性变化不大。在哺乳动物的细胞膜中,脂肪酸链的不饱和键一般在4位到17位之间^[7]。香烟气相物质作用于鼠肺细胞膜时,首先作用于膜表层,由于烟气流流量和烟气流活泼物质的寿命有限,结果可能是气相烟只过氧化了膜浅层的不饱和键,在膜浅层形成过氧化物和短链烷烃,而对深层的作用不明显。因此表现为肺细胞膜浅层的流动性增大而深层的流动性变化不明显。

细胞膜的动态性质与细胞的生理功能密切相关,如选择性通透、酶的活性、受体应答及离子运输等都与膜的分子次序或膜流动性有关^[9]。香烟气相物质对肺细胞的作用结果是导致膜中不饱和脂肪酸的脂质过氧化,进而改变膜的流动性,因此导致了细胞膜的损伤,破坏了细胞的正常生理功能。

茶多酚的抗氧化作用目前已引起人们极大兴趣^[10]。我们研究发现粗晶态和粉态GTP能够抑制香烟气相物质引发的鼠肺细胞膜的损伤。GTP在此过程中的作用一方面可能是清除了气相烟中的活泼自由基,而保护细胞膜;另一方面也可能清除了由气相烟引起的脂质过氧化过程中的脂类自由基,从而阻断了脂质过氧化的链式反应,抑制了气相烟对细胞膜的进一步损伤。

任何抗氧化剂在高浓度时都可能有一定的毒性。为此,我们研究了粗晶态和粉态GTP本身对细胞膜的作用,结果表明,在试验的浓度范围内,GTP对膜的浅层影响很小,对膜的深层有一些影响,使膜深层的流动性略有降低,这可能是由于GTP介入了细胞膜的结果。

致谢:本所ESR组提供了ESR技术帮助,郭尧君副教授提供了紫外技术。

参 考 文 献

- [1] Church D F, Pryor W A, 1985. Free-Radical Chemistry of Cigarette Smoke and Its Toxicological Implications. *Environ. Health Perspect.*, 64:111—126
- [2] 赵保路, 晏良军, 侯京武, 忻文娟, 1990. 电子自旋共振自旋捕集吸烟气相自由基的研究. *中华医学杂志*, 70(7):386—388
- [3] Yan L J, Zhao B L, Xin W J, 1991. Experimental Studies on Some Aspects of Toxicological Effects of Gas Phase Cigarette Smoke. *Res. Chem. Intern.*, 16:15—28
- [4] Zhao B L, Li X J, Xin W J, 1989. Scavenging Effect of Extracts of Green Tea and Natural Antioxidants on Active Oxygen Radicals. *Cell Biophysics*, 14:175—185
- [5] Athos O, 1959. Interaction of Ascorbic Acid and Mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 79:355—363.
- [6] 赵保路, 张清刚, 张建中, 忻文娟, 1982. 用脂肪酸自旋标记研究中国地鼠肺正常细胞V₇₀和癌变细胞V₇₀-B₁膜的流动性. *科学通报*, 11:686—689
- [7] Curtis M T, Gilfor D, Farber J L, 1984. Lipid Peroxidation Increase the Molecular Order of Microsomal Membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 235:644—649
- [8] Grzelinska E, Bartosz G, Gwozdziński K, Leyko W, 1979. A Spin-label Study of the Effect of Gamma Radiation on Erythrocyte Membrane. Influence of Lipid Peroxidation on Membrane Structure. *Inter. J. Radiat. Biol.*, 36:325—334
- [9] Castuma C E, Brenner R R, 1983. Effect of Fatty Acid Deficiency on Microsomal Membrane Fluidity and Cooperativity of the UDP-Glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, 729:9—16
- [10] 程书钧, 何其俊, 罗焕造, 包永德, 1986. 绿茶抗氧化剂成分抑制突变作用的初步研究. *实验生物学报*, 19(4):429—434.

1991年10月31日收到。

TOXICOLOGICAL EFFECTS OF GAS-PHASE CIGARETTE
SMOKE ON RAT LUNG CELLS AND PROTECTION
EFFECTS OF GREEN TEA POLYPHENOLS IN THE SYSTEM

Yang Fajun Zhao Baolu Xin Wenjuan

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

Shen Shengrong Yang Xianqiang

(Department of Tea Science, Zhejiang Agriculture University, Hangzhou)

ABSTRACT

Toxicological effects of gas-phase cigarette smoke (GPCS) on rat lung cells (RLC) were investigated by using ESR spin label and Ultraviolet-Vision techniques. 5-doxyl and 16-doxyl stearic acid were used as spin labels. It was found that GPCS was able to induce lipid peroxidation of RLC and increase the membrane fluidity in shallow-layer, while had little effect on the deep-layer. If powder and crude-crystal green tea polyphenols (GTP) were added into the suspension of RLC before GPCS treatment, it was discovered that lipid peroxidation of RLC declined and the membrane fluidity recovered with increasing the concentration of GTP. GTP itself had little effect on the shallow-layer of RLC membrane and had a little influence on the deep-layer.

Keywords: gas-phase cigarette smoke, rat lung cells, green tea polyphenols

《环境科学进展》征订启事

经国家科委批准,《环境科学丛刊》1993年更名为《环境科学进展》,双月刊,双月26日出版,由北京市报刊发行局发行,邮发代号82-448。定价:每期4元,全年24元。请在当地邮局办理订阅手续。

编辑部邮政编码:100085

通讯信箱:北京2871信箱

地址:北京市海淀区双清路15号

电话:北京2545511—2159