

90~92

三尖杉酯碱对大鼠心肌肌质网膜脂过氧化及膜脂分子运动的影响

朱明晏, 金万宝¹, 赵乃才¹(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ¹中国医科大学药理教研室, 沈阳 110001, 中国)

R977.1

Effects of harringtonine on peroxidation and dynamic microstructure of membrane lipids of myocardial sarcoplasmic reticulum in rat

ZHU Ming-Yan, JIN Wan-Bao¹, ZHAO Nai-Cai¹
(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; ¹Department of Pharmacology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

KEY WORDS harringtonines; lipid peroxidation; viscosity; phospholipids; Ca²⁺-transporting ATPase; myocardium; membrane lipids; sarcoplasmic reticulum

AIM: To study the effects of harringtonine (Har) on peroxidation and dynamic microstructure of membrane lipids and the relationship between them. METHODS: A nanosecond time-resolved fluorometer was used to study the effects of Har on dynamic microstructure of sarcoplasmic reticulum (SR) vesicles from rat myocardium. The amount of lipid peroxide was measured with thiobarbituric acid test and expressed as amount of malonaldehydic acid (MAA). RESULTS: Har 10 mg · L⁻¹ increased MAA in SR (from 1.7 ± 0.8 to 5.4 ± 5.1 μmol/g protein, P < 0.05). With the increase of MAA, the membrane viscosity also increased, while the wobbling angle of the phospholipid molecules decreased (r = -0.8565, P < 0.01), the Ca²⁺-ATPase activity decreased (r = -0.8714, P < 0.01), the fluorescence intensity and the fluorescence life time decreased. CONCLUSION: Har may cause the peroxidation of membrane lipids in SR, which affected the mobility of the phospholipid bilayers and the function of membrane proteins.

关键词 三尖杉酯碱类; 脂质过氧化; 粘度; 磷脂类; 钙转运 ATP 酶; 心肌; 膜脂质; 肌浆网

目的: 研究三尖杉酯碱(Har)对膜脂过氧化及膜脂运动的影响。方法: 膜脂过氧化用硫代巴比妥酸法测定, 其含量用 MAA 表示; 用纳秒荧光偏振技术研究膜脂过氧化对膜脂分子运动的影响。结果: Har 10 mg · L⁻¹ 可使 MAA 由 1.7 ± 0.8 增加至 5.4 ± 5.1 μmol/g 蛋白质; 随过氧化脂质含量的增加, 膜脂双层的微粘度增加, 磷脂分子摆动角减小(r = -0.8565, P < 0.01), Ca²⁺ 转运 ATP 酶活性降低(r = -0.8714, P < 0.01); DPH 的荧光强度减弱, 荧光寿命缩短。结论: Har 引起肌浆网膜脂过氧化, 因而影响膜脂双层的运动和膜蛋白的功能。

生物膜脂的性状直接影响膜脂双层中磷脂分子的运动状态及膜蛋白质功能^[1]。生物体内存在微量氧化磷脂, 对生理功能调节起重要作用^[2]。我们曾证明, 氧化脂质在相当程度上影响膜脂双层分子运动状态, 阿霉素(doxorubicin, Dox)等能造成膜脂的过氧化, 改变膜脂的运动状态^[3,4]。三尖杉酯碱(harringtonine, Har)与 Dox 等有类似的药理作用和心肌损害。其是否也有膜脂的过氧化作用尚未见报告。我们研究了膜脂氧化对大鼠心肌肌质网膜脂分子运动状态的影响。

MATERIALS AND METHODS

肌质网的分离^[1] Wistar 大鼠 30 只, ♂, 体重 275 ± 20 g。Pentobarbital 20-30 mg · kg⁻¹ ip 麻醉, 切取心室肌。冰浴下切成 1-3 mm³ 的小块, 于 10 倍体积的缓冲液 A (glucose 250; NaHCO₃ 10; NaNO₃ 5; Tris-HCl 15 mmol · L⁻¹; pH 7.4) 中匀浆, 四层纱布过滤, 反复差速超速离心 (40 000 × g, 45 min) 获肌质网。肌质网悬浮于缓冲液 B (glucose 250; KCl 100; MgCl₂ 1.5; CaCl₂ 0.05; Tris-HCl 20 μmol · L⁻¹; pH 7.0), 手操作玻璃-尼龙匀浆器上下运动 10 次使匀, 用于以下实验。

药物预处理 在样品液 (0.2-0.4 g protein · L⁻¹) 中加入 Har, 终浓度为 0.01-10 mg · L⁻¹, 35 °C 温育 30 min, 4 °C, 40 000 × g, 离心 60 min, 洗涤 2 次, 沉淀悬浮于缓

冲液 B 中, 用玻璃-尼龙匀浆器使匀。

过氧化脂质的定量 按照硫代巴比妥酸(TBA)试验^[5]进行。以四乙氧基丙烷(TEP)作标准指示物。过氧化脂质的量用生成的丙醛酸(MAA)量表示。

纳秒偏振荧光测定及数据分析^[3] 用 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) 作测定膜脂分子运动状态的荧光探针。对照组和药物处理组样品分别加入到含有 DPH 2 mmol·L⁻¹ 的缓冲液 B 中, 25℃ 温育 30 min, 用纳秒荧光光谱仪(nanosecond time-resolved fluorometer, 日本北海道大学应用电气研究所)测定 DPH 荧光的变化。通过测定 DPH 荧光强度及偏振方向的变化, 可获得荧光参数: r_s 是稳态荧光各向异性, 反映物质结构的致密程度(稠密程度); r_∞ 是经过充分衰减后的荧光各向异性; τ 是荧光寿命; φ 是荧光各向异性的衰减常数; I_{\parallel} 是平行向荧光强度; I_{\perp} 是垂直向荧光强度。由这些参数, 能计算出膜微粘度(η); 磷脂分子的摆动角(θ_c)等膜脂分子的运动信息。所有测定都在 30℃ 进行。

Ca²⁺ 转运 ATPase 活性测定 用 37℃ 下 ATP 水解后生成的游离磷酸量表示 Ca²⁺ 转运 ATPase 的 ATP 水解活性^[6]。

蛋白质定量 用比色法测定^[7]。

试剂 TBA (Fluka); TEP (Nakarai Chemicals, Japan); ATP (Sigma); DPH (Sigma); Har (常州健民制药厂, 批号: 910318); 其余为日本产特级试剂或国产 AR。

RESULTS

膜脂中氧化脂质含量的变化 对照组膜脂 MAA 浓度为 $1.7 \pm 0.8 \mu\text{mol/g protein}$ 。Har 处理后, 膜脂中 MAA 浓度明显增加。Har 浓度与 MAA 含量呈正相关 (Tab 1)。

Tab 1. MAA concentrations in rat cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles caused by harringtonine treatment. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. ^b $P < 0.05$ vs control.

Concentration, mg·L ⁻¹	MAA, $\mu\text{mol/g protein}$
Control	1.7 ± 0.8
0.01	3.4 ± 1.1
0.1	3.7 ± 1.7^b
1	4.7 ± 2.8^b
10	5.4 ± 4.3^b

Ca²⁺ 转运 ATPase 活性的变化 Har 处理后一定程度地改变了 Ca²⁺ 转运 ATPase 的 ATP 水解活性。膜脂中过氧化脂质含量与 Ca²⁺ 转运 ATPase 活性呈负相关 ($P < 0.01$, Fig 1)。

膜脂分子运动的变化 Har 处理后 DPH 荧光

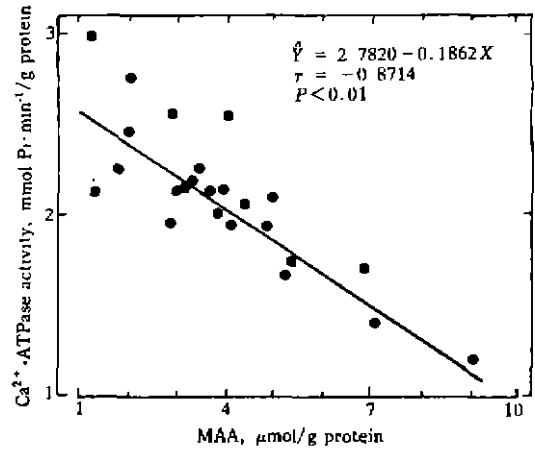


Fig 1. Relation between MAA concentration and Ca²⁺ transporting-ATPase activity in cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles.

强度降低。 r_s 值由对照组的 0.149 ± 0.017 增加至 Har $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后的 0.155 ± 0.014 。膜微粘度由 $56 \pm 12 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 增加至 $65 \pm 10 \text{ mPa} \cdot \text{s}$; 磷脂分子摆动角减少了 5° ; DPH 的荧光寿命缩短至 $5.7 \pm 1.7 \text{ ns}$ 。膜微粘度与磷脂分子摆动角的变化呈负相关 ($P < 0.01$), 随膜脂中氧化脂质的增加, 膜微粘度加大、磷脂分子摆动角减小 (Fig 2)。

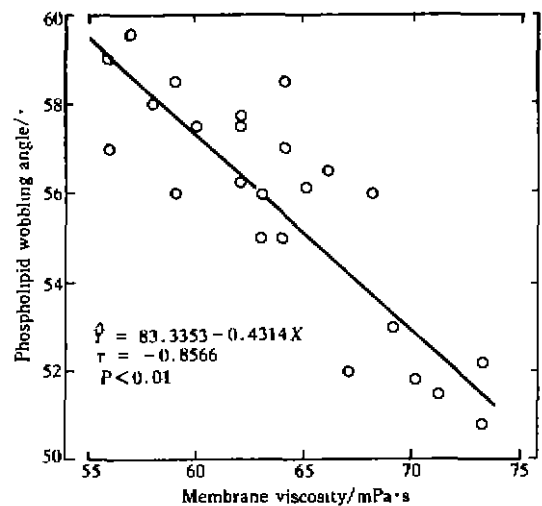


Fig 2. Relation between membrane viscosity and wobbling angle of phospholipids in cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles during harringtonine treatment.

DISCUSSION

本文证明 Har 使肌质网膜脂中 MAA 浓度明显增加, 与 Har 的浓度呈正相关 (Tab 1)。膜脂氧化多发生在不饱和脂肪酸的不饱和双键部位, 形成氢过氧化物侧链、脂分子侧链的环化^[8]、磷脂分子交联^[9]等。DPH 是疏水性荧光分子, 荧光强度随周围环境极性增加而减弱。用 Har 处理后, DPH 的荧光强度降低, 荧光寿命呈缩短趋势, 提示氧化脂质的增加可能造成膜脂双层疏水性的改变。我们认为, 分子结构的改变使膜脂分子间出现紧密联结, 从而提高了膜脂双层的稠密程度 (表现为 r_s 值的增加), 限制了磷脂分子的运动, 引起磷脂分子摆动角减小。

肌质网 Ca^{2+} 转运 ATPase 是贯通膜脂双层的功能性蛋白质, 其功能受膜脂性状的影响^[10]。Har $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 Ca^{2+} 转运 ATPase 活性比对照组降低约 3%; Har $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 Ca^{2+} 转运 ATPase 活性降低约 10%, 膜脂中 MAA 浓度与 Ca^{2+} 转运 ATPase 活性呈负相关 (Fig 1), 提示膜脂中氧化脂质含量在一定程度上影响 Ca^{2+} 转运 ATPase 的 ATP 水解活性。

许多研究证明, 醌类结构化合物 (如 Dox) 作为电子传递体, 能接受 NADPH 的电子并传递至氧分子, 生成超氧阴离子, 造成膜脂过氧化。我们的实验结果表明, 非醌类结构化合物 Har 也能造成膜脂的过氧化, 但其作用明显低于 Dox 等醌类结构化合物。高浓度 Har 处理 30 min, 氧化脂质的生成量仅为相同剂量 Dox 处理的 50% 左右^[3]。这可能是 Har 心肌毒性作用低于 Dox 的主

要原因之一。

REFERENCES

- 1 Koyama T, Zhu MY, Araiso T. Effects of phospholipids on function and dynamic microstructure of the phosphorylation domain of sarcoplasmic reticulum from rat cardiac muscle. *J Appl Cardiol* 1991; **6**: 229-39.
- 2 Vladimirov YA, Olenov VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv Lipid Res* 1980; **17**: 173-249.
- 3 Koyama T, Zhu MY, Song LQ, Nakabayashi T, Keatisuwan W, Kinjo M, Araiso T. Dynamic microstructure and hydration of peroxidized membrane of rat cardiac mitochondria and effects of doxorubicin. *Jpn J Physiol* 1990; **40**: 635-49.
- 4 Zhu MY, Li ZM, Wang YJ, Li YJ, He BJ. Effects of mitomycin C on membrane lipid regions of mouse ascites hepatoma cells. *J China Med Univ* 1988; **17**: 178-81.
- 5 Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; **86**: 271-8.
- 6 Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959; **234**: 466-8.
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-75.
- 8 Porter NA, Lehman LS, Weber BA, Smith KJ. Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation, competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction, beta-scission and cyclization. *J Am Chem Soc* 1981; **103**: 6447-55.
- 9 Masotti L, Casali E, Galeotti J. Lipid peroxidation in tumour cells. *Free Rad Biol Med* 1988; **4**: 377-86.
- 10 Zhu MY. Effects of phospholipid layer on the dynamic microstructure of phosphorylation domain of Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum prepared from rabbit skeletal muscle. *Hokkaido J Med Sci* 1992; **67**: 398-407.