

## 类胡萝卜素对磷脂酰胆碱脂质体过氧化的抑制作用<sup>①</sup>

赵文恩<sup>②</sup> 韩雅珊 乔旭光

(中国农业大学食品学院)

广田才之

(日本大学生物资源部)

**摘要** 将蛋黄磷脂酰胆碱(PC)制成的脂质体用于类胡萝卜素抑制脂质过氧化研究, $\beta$ -胡萝卜素抑制TBARS积累没有诱导期。当存在于脂质体膜上时,类胡萝卜素抑制脂质过氧化能力的顺序如下:鸡油菌黄质>叶黄素 $\approx$  $\beta$ -胡萝卜素>胭脂树橙。类胡萝卜素在水分散液中存在时,抑制脂质过氧化能力按胭脂树橙>叶黄素>鸡油菌黄质> $\beta$ -胡萝卜素顺序递减。结果表明,类胡萝卜素抑制脂质过氧化与其作用的介质环境密切相关。

**关键词** 类胡萝卜素; PC 脂质体脂质过氧化

**分类号** Q562

## Inhibitory Effect of Carotenoids on Lipid Peroxidation of Phosphatidylcholine Liposomes

Zhao Wen'en Han Yashan Qiao Xuguang

(College of Food Sciences, CAU)

Saishi Hirota

(College of Bioresources, Nihon University, Japan)

**Abstract** Egg yolk phosphatidylcholine liposomes were used for studying the inhibition of lipid peroxidation by carotenoids.  $\beta$ -carotene suppressed the accumulation of TBARS without clear induction period. When located in liposomal membrane, ability of carotenoids to inhibit lipid peroxidation was follows as: canthaxanthin > lutein $\approx$  $\beta$ -carotene > bixin. In the presence of carotenoids in aqueous dispersion the antioxidant potency of carotenoids against lipid peroxidation decreased in the order of bixin > lutein > canthaxanthin >  $\beta$ -carotene. The result showed that the antioxidant activities of carotenoids against lipid peroxidation were associated with the microenvironment of their action.

**Key words** carotenoids; lipid peroxidation of PC liposomes

磷脂酰胆碱是生物膜中发现的重要磷脂之一。它含有相当多的不饱和脂肪酸,这些不饱和脂肪酸对氧化作用很敏感<sup>[1]</sup>,易生成脂过氧化物。脂过氧化物在生物机体体内起着很重要的作用,如前列腺素生物合成与白三烯的生物合成中便有不饱和脂肪酸的氢过氧化物参与<sup>[2]</sup>。然而膜脂不饱和脂肪酸的氧化会引起膜的损害,氧化生成的脂过氧基又会攻击其他生物大分子,导致病理过程发生,包括癌症与衰老等<sup>[3,4]</sup>。因此,脂质过氧化,尤其是包括磷脂酰胆碱在内的膜脂过氧化是活性氧自由基致病的一个重要病因。

近年研究表明,类胡萝卜素具有预防癌症与心血管疾病的作用<sup>[5,6]</sup>。类胡萝卜素,特别是 $\beta$ -

收稿日期: 1998-01-06

①本研究获河南省自然科学基金资助

②赵文恩,郑州大学化工系,450052

胡萝卜素功能与作用得到了全面的研究<sup>[7]</sup>。类胡萝卜素作为抗氧化剂更是吸引了人们广泛注意,已推测类胡萝卜素的抗癌活性是与它们的抗氧化性质相联系的。研究表明, $\beta$ -胡萝卜素可抑制单线态氧干预的脂质光敏氧化作用<sup>[8]</sup>。 $\beta$ -胡萝卜素可抑制自由基调节的脂质氧化,包括对磷脂脂质体与微粒体脂质过氧化的抑制<sup>[9~11]</sup>,已经提出类胡萝卜素是通过清除脂过氧基来抑制脂质过氧化的。然而其他类胡萝卜素对脂质过氧化的抑制作用研究报道不多,了解还有限。本研究通过研究类胡萝卜素存在下过氧基介导的磷脂酰胆碱脂质体的脂质过氧化,探讨膜磷脂过氧化中类胡萝卜素的抗氧化活性。

## 1 材料与方法

$\beta$ -胡萝卜素为 Sigma 公司产品;叶黄素与胭脂树橙为 Extrasynthese 公司产品;鸡油菌黄质由日本大学生物资源科学部广田才之教授提供。2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷)盐酸(AAPH)是 Wako Pure Chem. (Osaka, Japan)公司产品。蛋黄磷脂酰胆碱由鸡蛋黄提取。大豆磷脂酰胆碱购自北京海淀微生物培养基制品厂。其他试剂与溶剂均为国内购买的分析纯级。

按以下方法制备脂质体。将蛋黄磷脂酰胆碱,在需要时与类胡萝卜素溶于氯仿,用氮气将液体蒸发至干。得到的薄膜在室温下用磷酸缓冲液(pH7.4,含 NaCl 0.9%)振荡混合 5 min,然后超声 1 min。即得到脂质体乳液。

脂质体的氧化在空气中进行。反应混合液(总体积 450  $\mu$ L)含有脂质体与磷酸缓冲液。通过加入水溶性自由基启动剂 AAPH 来启动脂质体脂质过氧化,混合液于 37  $^{\circ}$ C 下按所需时间保温。保温结束后加入 5  $\mu$ L 2% 丁基羟甲苯(BHT),1 mL 10% 三氯乙酸,再加 1 mL 0.67% 2-硫代巴比妥酸。将样品于沸水浴中反应 30 min,冷却后加入 2 mL 甲醇正丁醇混合液( $\varphi=15:85$ ),剧烈摇动混合液,然后离心,在 532 nm 处测有机层(上层)液中巴比妥酸反应物(TBARS)的吸光值。TBARS 的量用吸光度来计算(吸光系数= $1.17 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>。

如果类胡萝卜素是在水液中抑制脂质过氧化,则制成的脂质体膜中不含类胡萝卜素,脂质过氧化用  $\text{Fe}^{2+}$  启动。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磷脂酰胆碱脂质体的氧化

使用蛋黄的与大豆的磷脂酰胆碱制成脂质体,用偶氮化合物 AAPH 来启动脂质过氧化。这种水溶性的自由基启动剂可在水相中产生过氧基,从而在脂质体膜表面攻击磷脂<sup>[12]</sup>。通过测量硫代巴比妥酸与脂质过氧化产物反应可估量脂质氧化程度。表 1 说明了在不同 AAPH 浓度下 2 种脂质体被氧化形成 TBARS 的量,可以看到蛋黄的磷脂酰胆碱脂质体比大豆的易于被氧化,其氧化程度与脂质体和 AAPH 二者的浓度比率关系密切。尽管 Niki 等<sup>[13]</sup>曾指出,大豆磷脂酰胆碱因含约 70% 亚油酸适合于作脂质体氧化体系的底物,但在本试验条件下,为了便于研究类胡萝卜素对脂质过氧化的抑制作用,采用第 5 种反应体系,即用 AAPH 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  在 37  $^{\circ}$ C 降解而生成的过氧基来引发过氧化,以蛋黄磷脂酰胆碱制成的脂质体为(PC 9.9  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )底物。

表 1 磷脂酰胆碱(PC)脂质体在 37 C 50 mmol·L<sup>-1</sup> PBS 中的氧化

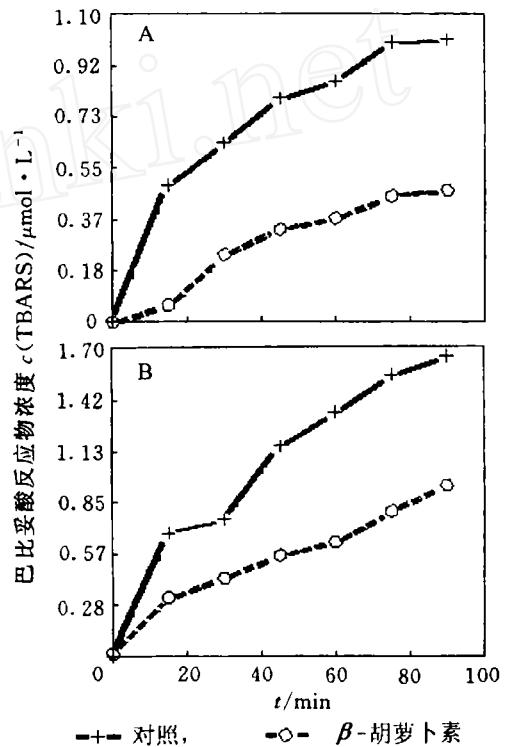
处理号	PC 来源	PC 浓度 c/ mmol·L <sup>-1</sup>	AAPH 浓度 c/ mmol·L <sup>-1</sup>	t/min	TBARS 浓度 c/ μmol·L <sup>-1</sup>
1	蛋黄	4.9	38.9	60	1.09
2	蛋黄	4.9	77.8	60	1.00
3	蛋黄	9.9	77.8	60	1.78
4	蛋黄	14.8	100	60	1.04
5	蛋黄	9.9	50	60	1.28
6	大豆	15.6	2	120	痕量
7	大豆	15.6	5	120	痕量
8	大豆	15.6	10	120	痕量
9	大豆	15.6	30	120	痕量
10	大豆	15.6	60	120	0.27
11	大豆	15.6	90	120	0.33

2.2 β-胡萝卜素对蛋黄磷脂酰胆碱脂质体氧化的抑制

图 1 表示了在有与无 β-胡萝卜素存在时蛋黄磷脂酰胆碱在水分散液中氧化的结果。无论是图 1A 中 AAPH 30 mmol·L<sup>-1</sup> 启动的脂质过氧化, 还是图 1B 中 AAPH 50 mmol·L<sup>-1</sup> 启动的脂质过氧化, β-胡萝卜素都显著地抑制这种作用。在前者 β-胡萝卜素 98.4 μmol·L<sup>-1</sup> 与后者 β-胡萝卜素 148 μmol·L<sup>-1</sup> 两种情况下, β-胡萝卜素抑制的氧化速率与未受抑制氧化速率之比分别是 0.38 与 0.51。同时还可看到 β-胡萝卜素抑制的 TBARS 的积累没有诱导期, 这与文献<sup>[9,10]</sup> 报道的 β-胡萝卜素对脂质体磷脂酰胆碱氢过氧化物形成的抑制没有诱导期的结果是极为一致的。

不同浓度 β-胡萝卜素对脂质体氧化的抑制作用之时间进程示于图 2。可以看到较低浓度的 β-胡萝卜素(如 24.4 μmol·L<sup>-1</sup>)抑制 TBARS 形成能力处于低水平, 基本上不随时间变化。而较高浓度下(如 148 μmol·L<sup>-1</sup>)的抑制能力是在较高水平上的, 也不随时间显著改变。但中等浓度的 β-胡萝卜素(如 48.5 与 98.4 μmol·L<sup>-1</sup>)抑制 TBARS 形成能力随时间延长而作用能力下降。看来 β-胡萝卜素在抑制脂质过氧化的过程中本身被消耗了。在此情况下, 随着 β-胡萝卜素捕获

过氧基中逐渐被耗损, 其对 TBARS 形成的相对抑制作用有所降低。但在高浓度时, 其对 TBARS 的较高抑制活力持续时间要长一些。由于是按不同时间进程下来计算的相对抑制率,



A AAPH, 30 mmol·L<sup>-1</sup>; β-胡萝卜素, 98.4 μmol·L<sup>-1</sup>  
 B AAPH, 50 mmol·L<sup>-1</sup>; β-胡萝卜素, 148 μmol·L<sup>-1</sup>

图 1 β-胡萝卜素对 AAPH 引发的蛋黄 PC 脂质体(9.9 mmol·L<sup>-1</sup>)脂质过氧化的影响

因此如图所示,  $\beta$ -胡萝卜素浓度高的处理其 TBARS 抑制率低于较低浓度的处理。这可能是浓度太高时反而会会影响其抑制作用的发挥。浓度太低时, 不能有效抑制脂质体的氧化, 抑制率很低。

### 2.3 在不同介质环境中类胡萝卜素对脂质体脂质过氧化的抑制作用

已看到, 类胡萝卜素对鸡蛋磷脂酰胆碱脂质体的脂质过氧化之抑制作用显然依赖于它们存在的作用介质环境。如图 3A 所示, 当类胡萝卜素掺入到脂质体膜上时, 其抑制来自水相中 AAPH 的自由基引发的脂质过氧化能力按鸡油菌黄质 > 叶黄素  $\approx$   $\beta$ -胡萝卜素 > 胭脂树橙顺序递减, 而当类胡萝卜素在水液中存在时, 使用水相中的  $\text{Fe}^{2+}$  作为自由基启动剂 (图 3B), 这时其抑制脂质过氧化之能力顺序为: 胭脂树橙 > 叶黄素 > 鸡油菌黄质 >  $\beta$ -胡萝卜素。可以看到, 类胡萝卜素处在脂相与水相中其作用能力有很大变化, 这与其内在的捕集自由基能力有关, 还与它们的亲水亲脂性有关。如胭脂树橙较易溶于水, 故在水相中的相对作用能力要比在膜脂上的强, 因此在水相中, 它是 4 种类胡萝卜素中抑制脂质过氧化作用能力最强的。而在膜脂中它却是作用能力最弱的。鸡油菌黄质尽管水溶性差, 但因其本身抗氧化能力强, 如淬灭单线态氧, 清除超氧化物阴离子自由基等, 故在水相中时其抑制脂质过氧化相对能力也比  $\beta$ -胡萝卜素强。

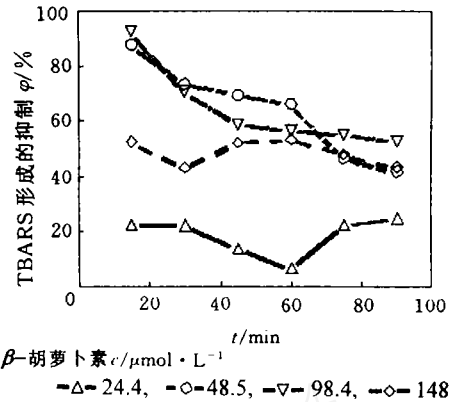


图 2 不同浓度  $\beta$ -胡萝卜素对 PC 脂质体 TBARS 形成的抑制作用

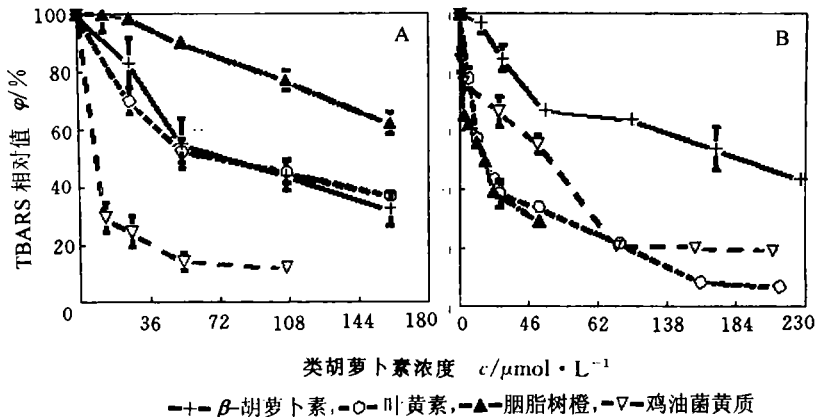


图 3 类胡萝卜素对 PC 脂质体脂质过氧化的抑制作用

生物抗氧化剂可分为 2 类: 预防性抗氧化剂, 抑制引发连锁反应的自由基的生成, 降低脂质过氧化; 阻断连锁抗氧化剂, 捕获引发与/或传播扩增的过氧基, 干预连锁的传播扩增。由于类胡萝卜素可使引起脂氢过氧化物形成的单线态氧失活, 从而抑制依赖于氢过氧化物的脂质过氧化<sup>[8]</sup>, 故被分类为预防性抗氧化剂。然而, Burton 与 Ingold 已指出类胡萝卜素如  $\beta$ -胡萝卜素可作为阻断连锁反应的抗氧化剂, 特别是在低氧分压下<sup>[15]</sup>。Terao 也证明几种类胡萝卜素通

过捕获传递连锁的脂过氧基来作为阻断连锁抗氧化剂在起作用<sup>[14]</sup>。本试验中类胡萝卜素对膜磷脂过氧化的抑制作用也能归因于它们捕获传递连锁的脂过氧基来阻断连锁反应。它们既可以抑制  $\text{Fe}^{2+}$  引发的膜磷脂过氧化, 也可抑制水溶性自由基产生剂 AAPH 引发的脂质过氧化。

研究类胡萝卜素清除自由基的反应机理表明, 它们可通过电子传递或自由基加成反应来进行。尽管在实验上未证明类胡萝卜素与脂过氧基反应是加合反应, 但由过氧基与  $\beta$ -胡萝卜素反应生成的环氧化物与聚合体产物提示了它们是通过加合反应机理进行的<sup>[9,10,15]</sup>。

作为脂溶性抗氧化剂, 类胡萝卜素存在于生物膜与低密度脂蛋白的脂区域, 以及血浆中。在膜中, 它们常与生育酚共同承担抗氧化防御作用, 对抗过氧基的攻击。而在血液中, 它们与生育酚, 抗坏血酸等抗氧化剂构成组织完善的抗氧化防卫系统, 对抗水液自由基的攻击<sup>[16]</sup>。已表明, 摄取富含类胡萝卜素的饮食可提高血液中类胡萝卜素的水平。这样有助于增加膜磷脂对氧化损伤的抗性, 使膜磷脂更稳定, 这种作用可能与摄取含类胡萝卜素丰富的水果与蔬菜会提高机体防癌能力有关。

### 参 考 文 献

- 1 Barclay L R C, Ingold K U. Autoxidation of biological molecules; II. The autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *J Am Chem Soc*, 1981, 103:6478~6485
- 2 Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes; III. Effects of ionophore A23184. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:2148~2152
- 3 Sies H, ed. *Oxidation Stress; Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press, 1991
- 4 Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:7915~7922
- 5 Rousieau E J, Davison A J, Dunn B. Protection by  $\beta$ -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and geno-toxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Rad Biol Med*, 1992, 13:407~433
- 6 Gerster T. Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Int J Vitam Nutr Res*, 1991, 61:277~291
- 7 Krinsky N I. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem*, 1994, 66:1003~1010
- 8 Terao J, Yamauchi R, Murakami H, Matsushita S. Inhibitory effects of tocopherols and  $\beta$ -carotene on singlet oxygen-initiated photooxidation of methyl linoleate and soybean oil. *J Food Proc Preserv*, 1980, (4):79~83
- 9 Tsuchihashi H, Kigoshi M, Iwatsuki M, Niki E. Action of  $\beta$ -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 323:137~147
- 10 Kennedy T A, Liebler D C. Peroxyl radical scavenging by  $\beta$ -carotene in lipid bilayers. *J Biol Chem*, 1992, 267:4658~4663
- 11 Palozza P, Monalla S, Krinsky N I. Effects of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes. *Free Rad Biol Med*, 1992, 13:127~136
- 12 Yamamoto Y, Niki E, Kamiya Y, Shimasaki H. Oxidation of lipids 7. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and water dispersion. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 795:332~340
- 13 Niki E. Free radical initiators as source of water-or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol*, 1990, 186:100~108
- 14 Lim B P, Nagao A, Terao J, Tanaka K, Suzuki T, Takama K. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1126:178~184
- 15 Burton G W, Ingold K U.  $\beta$ -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 1984, 224:569~573
- 16 Frei B, England L, Ames B N. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:6377~6381