

大鼠肝过氧化物酶体中脂肪酸的分析

刘惠敏, 骆子生, 魏素珍, 姜玲玲

(河北医科大学基础医学研究所, 河北 石家庄 050017)

摘要 :用双(2-乙基己基)酚酞酸酯(DEHP)诱导大鼠肝过氧化物酶体增殖,再用蔗糖密度梯度离心法分离大鼠肝细胞过氧化物酶体,并用十七烷酸作内标,以毛细管气相色谱法在非极性 SPB-1 石英毛细管柱上对其中的 11 种脂肪酸进行分离测定。正常组和诱导组的大鼠肝过氧化物酶体中的饱和脂肪酸和长链脂肪酸所占总脂肪酸的比例及总脂肪酸的统计结果是:诱导组的饱和脂肪酸的含量高于正常组的($P < 0.05$),而两个组的脂肪酸总量及长链脂肪酸的含量无明显差别。结果提示:诱导组的大鼠肝过氧化物酶体的脂肪酸成分发生了变化,其膜结构与正常组的不相同。

关键词 :毛细管气相色谱法 过氧化物酶体 脂肪酸

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-871X(2001)05-0475-03

1 前言

过氧化物酶体是细胞中的一个与极长链脂肪酸、胆汁酸、缩醛磷脂等代谢有关的重要亚细胞器。它除了参与过氧化氢的清除作用外,还将极长链脂肪酸分解成短链的脂肪酸,是极长链脂肪酸代谢的惟一场所。多不饱和脂肪酸为生物体内自由基反应的主要作用对象,主要分布在细胞膜及亚细胞器膜的类脂中。当自由基与细胞膜上的饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应时即产生脂质过氧化物,使膜的结构破坏,功能减退,最终导致细胞衰亡^[1]。这一过程是机体衰老和许多疑难疾病的病因之一。近年来已发现 10 多种与过氧化物酶体有关的疾病,其发病率高达 1/2.5 万。因此,研究过氧化物酶体的脂肪酸代谢变化,将对进一步研究此类疾病有十分重要的意义。本文用毛细管气相色谱法对一组健康大鼠和一组用双(2-乙基己基)酚酞酸酯(DEHP)诱导增殖的大鼠肝过氧化物酶体中的脂肪酸进行了测定,并对获得的数据进行了统计分析。

2 实验部分

2.1 材料

健康、自发分娩(SD)的大鼠 16 只(由河北实验动物中心提供,鼠龄 2~3 个月,雄雌各半)。将它们平均分为两组,一组喂普通饲料,作为对照组;一组喂含 2%(质量分数)DEHP 的饲料,作为诱导组。

所有实验用试剂均为国产分析纯。脂肪酸标准品购自 Alltech 公司和 Sigma 公司。

663-50 气相色谱仪(带有数据处理系统)UV-

330 紫外-可见分光光度计和 80P-7 超速离心机均为日立公司产品。

2.2 过氧化物酶体的分离

将大鼠断头处死后,立即取出肝脏,用冷生理盐水洗净。参照 Osumi 等人^[2]的方法,用蔗糖密度梯度离心法分离大鼠肝过氧化物酶体,用透射电镜观察,结果发现其形态完整,纯度高。

2.3 过氧化氢酶的活性测定

按 Aebi^[3]的方法用分光光度法测定,以每分钟催化 1 μmol H_2O_2 底物分解的酶量为 1 酶活性单位(u)。

2.4 脂肪酸的提取与酯化

参照文献[4]的方法,取 0.5 mL 过氧化物酶体悬浮液,加入 0.5 mL 生理盐水、2 mL 无水甲醇及 3 mL 氯仿,用力振摇,然后再加入 3 mL 氯仿,振摇,再加入 1 mL 水,再振摇(每次振摇约 1.5 min)。于 2000 r/min 下离心 10 min,弃去上层水相,加入 1 g 无水硫酸钠脱水,过滤到螺口试管中,滤液用氮气吹至 0.5 mL。

参照文献[5]的方法,在上述提取液中加入 2 mL 无水甲醇、1 mL 47% 的三氟化硼乙醚液和 0.5 mL 苯,再加入 200 μL (1 g/L)十七烷酸($\text{C}_{17:\text{n}}$)内标溶液,将试管帽拧紧,缓缓加热至沸,30 min 后取出,放至室温。再加入 2 mL 二次蒸馏水,用二氯甲烷萃取两次,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹至 100 μL ,进样 1 μL 。

2.5 色谱条件

参照文献[6]的方法,色谱条件设为:载气为氮气,流速为 70 mL/min,检测器为火焰离子化检测器

(FID), SPB-1 石英毛细管柱 0.32 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm(类似于 SE-30 和 OV-101, 购自北京康林公司), 柱温: 200 °C(3 min) $\xrightarrow{3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250 °C(4 min) $\xrightarrow{6\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280 °C(10 min), 分流比为 1:100, 检测器和进样器温度分别为 280 °C 和 230 °C。

3 结果与讨论

3.1 定性分析

由于标准品所限, 我们利用“碳数规律”对 C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0} 作了鉴定。以组分的保留时间的对数 Y 对相应的碳数 X 作线性回归, 线性方程为 Y = 0.32 + 0.05 X, r = 0.993。在上述色谱条件下, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0} 的保留时间分别为 6.6 min, 9.3 min 和 11.06 min。

3.2 定量分析

过氧化氢酶是过氧化物酶体的标志酶, 它的活性大小与过氧化物酶体中脂肪酸的含量呈线性关系, 因此我们用过氧化氢酶为标准, 计算单位酶活性所对应的脂肪酸的含量, 由此推算过氧化物酶体中脂肪酸的含量。即: 第一步用分光光度法计算出单位体积过氧化物酶体所对应的过氧化氢酶的活性 (u/mL); 第二步用内标法计算出单位体积过氧化物酶体对应的脂肪酸质量 (mg/L); 第三步用前两步的结果计算出单位酶活性所对应的脂肪酸的含量 (μg/u)。结果以均数 ± 标准差 (X̄ ± SD) 表示, 借助 Micro-Excel 97 软件进行 t 检验。

大鼠过氧化物酶体的脂肪酸色谱分离图如图 1 所示。在所选择的条件下, 所测 11 种脂肪酸 C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:1}, C_{16:0}, C_{18:2}, C_{18:1}, C_{18:0}, C_{20:5},

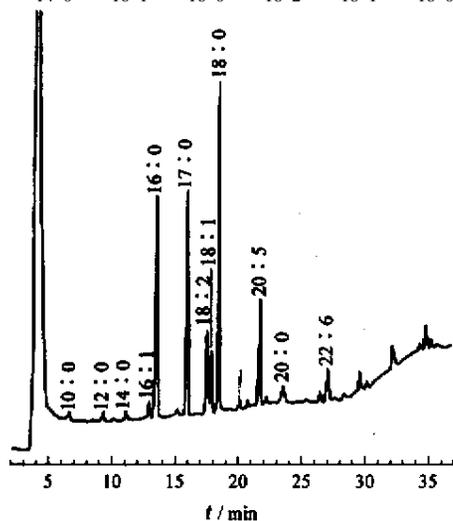


图 1 大鼠肝过氧化物酶体中脂肪酸甲酯的色谱图
Fig.1 Chromatogram of methyl esters of fatty acids in rat liver peroxisomes

(C_{20:0}, C_{22:6}) 在 30 min 内得到了完全分离。正常组和诱导组大鼠肝过氧化物酶体中脂肪酸的统计结果为: 不饱和脂肪酸 (C_{16:1}, C_{18:2}, C_{18:1}, C_{20:5}, C_{22:6}) 的含量之和占所测 11 种脂肪酸总含量的比例是诱导组高于正常组 (P < 0.05); 而两个组的脂肪酸总含量和 8 种长链脂肪酸 (C_{16:1}, C_{16:0}, C_{18:2}, C_{18:1}, C_{18:0}, C_{20:5}, C_{20:0}, C_{22:6}) 的含量之和与 11 种脂肪酸总含量的比例均无明显差异 (见表 1)。

表 1 正常组和诱导组的大鼠肝过氧化物酶体中脂肪酸含量的比较*

Table 1 The comparison of fatty acids in rat liver peroxisomes between control and induced groups*

Sample No.	Control			Induced		
	M(μg/u)	U/M	L/M	M(μg/u)	U/M	L/M
1	0.0952	0.2080	0.9863	0.0961	0.3122	0.9740
2	0.0867	0.1534	0.9769	0.1337	0.3029	0.9327
3	0.0461	0.1909	0.9848	0.0599	0.3606	0.9566
4	0.0688	0.3488	0.9797	0.1169	0.2412	0.9350
5	0.0610	0.1951	0.9672	0.0925	0.2811	0.9611
6	0.1346	0.3388	0.9770	0.0924	0.2835	0.9762
7	0.1107	0.1400	0.9684	0.0951	0.3880	0.9895
8	0.1996	0.2455	0.9519	0.0646	0.3483	0.9768
X̄ ± SD	0.1003 ± 0.0490	0.2276 ± 0.0787	0.9740 ± 0.0112	0.0939 ± 0.0243	0.3147 ± 0.0482**	0.9627 ± 0.0205

* M: the content of total fatty acids; L/M: the content ratio of long chain fatty acids to total fatty acids; U/M: the content ratio of unsaturated fatty acids to total fatty acids.

** P < 0.05.

本文结果表明, 用 DEHP 诱导大鼠肝过氧化物酶体增殖, 会引起其脂肪酸成分改变, 影响过氧化物酶体膜的结构。

过氧化物酶体是一种单层膜包裹的圆形结构, 提取时应用力振动, 以便提取完全。过氧化物酶体极易氧化, 不易放置时间过长。提取分离时切忌温度过高, 一般控制在 4 °C 以下为宜。

参考文献:

[1] YANG Qi, LIU Huang, LI Xiu-hua, et al. Acta Nutrimenta Sinica, 1995, 17(3): 284-286
杨琦, 柳黄, 李秀花, 等. 营养学报, 1995, 17(3): 284-286

[2] Osumi T, Hashimoto T. J Biochem, 1979, 85: 131-139

[3] Aebi H. In: Beigmeier H U ed. Methods of enzymatic analysis(II). 2nd English Ed. New York: Verlag Chemie Weinheim, 1974. 673-678

[4] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. J Biol Chem, 1957, 226: 497-509

[5] Wolfgang S, Herbert P, Marianne H, et al. J Anal Biochem, 1991, 198: 184-190

[6] Eder K, Reichlmayr-Lais A M, Kirchgessner M. J Chromatogr, 1991, 588(1-2): 265-272

Analysis of Fatty Acids in Rat Liver Peroxisomes

LIU Hui-min, LUO Zi-sheng, WEI Su-zhen, JIANG Ling-ling

(Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Peroxisomes of rat liver from normal and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-treated animals were isolated by density gradient centrifuge method. The fatty acids in the liver peroxisomes were extracted with chloroform and methanol, and were esterified with boron trifluoride and methanol. The fatty acids methyl esters were separated on SPB-1 (similar to SE-30, OV-101) capillary column, and were determined using heptadecanoic acid ($C_{17:0}$) as an internal standard for the eleven fatty acids ($C_{10:0}$ - $C_{22:6}$) in these peroxisomes by gas chromatography. The ratio of unsaturated fatty acids to total fatty acids in the control was significantly less than that in DEHP-treated animals ($P < 0.05$), but there was no difference between the control and DEHP-treated animals for the content of total fatty acids and the ratio of long chain fatty acids to total fatty acids. The results show that DEHP-treatment can alter the fatty acid composition of peroxisome. The membrane structure of the treated peroxisome was different to that of the control.

Key words: capillary gas chromatography; peroxisome; fatty acid

《分析化学》(2002 年)

欢迎向各地邮局订阅 邮发代号 12-6

本刊承办广告业务

《分析化学》(ISSN 0253-3820, CODEN FHHHDT, CN 22-1125/O6) 是中国科学院和中国化学会共同主办的专业性学术期刊, 主要报道我国分析化学创新性研究成果, 反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 荣获 1999 年首届国家期刊奖和 2000 年中国科学院优秀期刊特别奖。论文已被包括美、英、日、俄的国内外近 20 种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所历年来发布的“中国科技期刊引证报告”获悉, 本刊总被引频次和影响因子均居中国科技期刊排序前列, 1999 年其被引频次和影响因子均居化学类期刊第一名。多年来, 本刊逐年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA) 摘引量最大的 1000 种期刊(简称“CA 千种表”)中, 并居我国入选“CA 千种表”期刊的前列。从 1999 年第 27 卷第 1 期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information)正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index-Expanded, SCIE, 又称 SciSearch), 同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等 ISI 系列。本刊是我国发行量、报道容量和国内外影响较大的科技学术期刊之一。

本刊为月刊, 每期 128 页(大 16 开), 由科学出版社出版。国内单价 9.00 元, 全年(含邮费)108.00 元。邮发代号 12-6, 全国各地邮局订阅, 国外代号 M336, 中国国际书店订购, 漏订读者可与编辑部联系。广告经营许可证: 吉工商广字 0085 号。

编辑部地址: 长春市人民大街 159 号 邮政编码: 130022 电话: (0431) 5262017/5262018

传真: (0431) 5685653 E-mail: fxhx@ciac.jl.cn/fxhx@ciac.ac.cn