

GPx 对活性氧诱发细胞程序性死亡的影响

孙娟 陈瑗 周玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 是细胞内清除活性氧的主要抗氧化酶之一. 以稳定表达 GPx 的 CHO 细胞系为模型, 研究 GPx 对百草枯 (paraquat) 和叔丁基脂氢过氧化物 (tBOOH) 细胞毒性的影响, 发现 paraquat 和 tBOOH 都能够诱导 CHO 细胞产生典型的细胞程序性死亡的形态学改变和特征性的 DNA “梯子状” 断裂, 而稳定表达 GPx 的细胞系能明显抵抗 tBOOH 诱发的细胞程序性死亡, 但不能抵抗 paraquat 诱发的细胞程序性死亡. 该结果揭示, GPx 能选择性抑制活性氧诱发的细胞凋亡.

关键词 谷胱甘肽过氧化物酶, 基因转染, 百草枯, 叔丁基脂氢过氧化物, 细胞程序性死亡

学科分类号 Q28

细胞对活性氧损伤因素的敏感性取决于细胞的抗氧化能力, 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 是细胞内的主要抗氧化酶之一, 百草枯 (1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride, paraquat) 和叔丁基脂氢过氧化物 (t-butylhydroperoxide, tBOOH) 都能引起细胞大量死亡, 它们的毒性作用均是由于在细胞内氧化还原代谢过程中产生活性氧所致, 其中百草枯产生 $O_2^{\cdot-}$, 而 tBOOH 产生 $\cdot OOH$ ^[1,2]. 本文观察了 paraquat 和 tBOOH 是否诱导 CHO 细胞发生细胞程序性死亡以及稳定表达 GPx 的 CHO 细胞系对 paraquat 和 tBOOH 毒性作用的影响.

1 材料和方法

1.1 主要材料

含有全长为 1.46 kb 的人 GPx cDNA 真核表达载体 SPT 19 Hygro HCMV-GPx 由加拿大 Laval 大学 Dr. Mirault 惠赠, CHO 细胞购自中科院上海细胞生物所细胞库, RPMI 1640 和 Lipofectin 购自 GIBCO 公司, Hygromycin B 和 DIG Labelling and Detection Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司, paraquat、tBOOH 购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和基因转染: 以含有 10% 小

牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 CHO 细胞, 培养基中补充 100 U/ml 青霉素 G 和 100 mg/L 链霉素. 细胞置 5% CO_2 的孵育箱内 37℃ 培养. 采用 Lipofectin 基因转染方法^[3]将 GPx 质粒载体导入 CHO 细胞, 以含有 1 g/L Hygromycin B 的选择性培养基筛选培养, 第 12 天时用克隆环挑出 Hygromycin B 抗性克隆进行扩大培养.

1.2.2 GPx 基因转染细胞的 Northern 狭线杂交分析: 按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[4]提取细胞总 RNA, 按地高辛标记与检测试剂盒说明进行杂交、显色. 采用 G3PDH cDNA 探针为内标.

1.2.3 抗氧化酶活性测定: 按我室已建立的方法^[5]分别测定 GPx、MnSOD 和 CuZnSOD 活性.

1.2.4 Paraquat 和 tBOOH 处理细胞: 用 PBS (pH 7.4) 分别将 paraquat 和 tBOOH 配成 2 mmol/L 和 1 mmol/L, 过滤除菌, 4℃ 保存. 用时按终浓度为 0.2 mmol/L paraquat 和 0.1 mmol/L tBOOH 加入培养基, 细胞在该条件下培养 48 h 后进行以下测定和分析.

1.2.5 细胞核形态学观察: 用新鲜配制的 4% 多聚甲醛于 4℃ 固定细胞后, 加入 5 mg/L

收稿日期: 1997-03-13, 修回日期: 1997-06-10

Hoechst 33258 染液于 37 °C 染色 15 min, 在荧光显微镜下观察核形态学改变.

1.2.6 DNA 凝胶电泳分析: 按文献方法^[6]提取基因组 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察.

1.2.7 DNA 断裂定量: 按文献 [7] 方法分别测定降解 DNA 片段占裂解细胞总 DNA 含量的百分率来反映 DNA 降解程度.

2 结 果

2.1 基因转染细胞 Northern 狭线杂交分析

图 1 结果显示, GPx 基因转染细胞的三个克隆中有两个表达了较高的 GPx mRNA, 分别为 cGPx-c1 和 cGPx-c3, 而 G3PDH 探针杂交结果表明, 各组细胞的总 RNA 上样量一致.

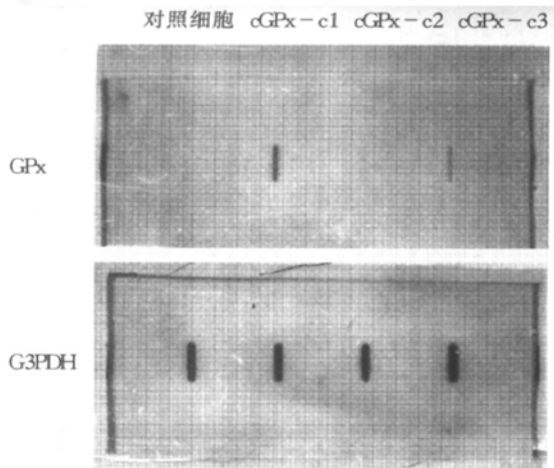


图 1 GPx cDNA 基因转染细胞 Northern 狭线杂交分析

将 25 μg 总 RNA 转移至尼龙膜上, 以地高辛标记的 GPx 和 G3PDH cDNA 探针分别杂交、显色.

2.2 基因转染细胞抗氧化酶活性分析

GPx 活性测定结果表明, 对照 CHO 细胞的内源性 GPx 活性很低, 而转染 GPx 基因后的三个细胞克隆均有不同程度的 GPx 活性升高, 其中克隆 1 和 3 (cGPx-c1 和 cGPx-c3) 的 GPx 活性较对照组细胞分别升高 4.15 和 3.11 倍, 而各细胞克隆的 MnSOD 和 CuZn-

SOD 活性均无明显变化.

表 1 GPx 基因转染细胞抗氧化酶活性

Cell lines	GPx	U / mg	
		MnSOD	CuZnSOD
Parent cells	0.065 ± 0.004	13.5 ± 1.6	45.7 ± 1.5
cGPx-c1	0.270 ± 0.010 ¹⁾	17.5 ± 1.8	46.8 ± 2.0
cGPx-c2	0.084 ± 0.006	13.9 ± 1.4	46.0 ± 2.1
cGPx-c3	0.202 ± 0.008 ¹⁾	15.8 ± 2.1	45.9 ± 1.7

注: $\bar{x} \pm s$, n = 6. ¹⁾与对照细胞相比 P < 0.01, 为差异显著.

2.3 Paraquat 和 tbOOH 致细胞核形态学变化

Hoechst 33258 荧光染色结果表明, 正常 CHO 细胞核染色质均匀分布, 核边界清晰, 而经 paraquat 和 tbOOH 处理 48 h 后的细胞核染色质凝聚, 部分核裂解成碎片, 呈现细胞程序性死亡的典型细胞核形态学特征, 而经 tbOOH 同样处理的 GPx 基因表达细胞克隆 cGPx-1 细胞核形态接近正常细胞, 与此相反, 经 paraquat 处理的 cGPx-c1 细胞克隆核呈程序性死亡核形态特征.

2.4 Paraquat 和 tbOOH 致 DNA 断裂

DNA 电泳结果显示, paraquat 和 tbOOH 处理细胞 48 h 后均能诱导明显的 DNA “梯子状” 断裂现象, 即产生约 180~ 200 bp 整倍数的系列 DNA 条带, 而 GPx 基因表达细胞 cGPx-c1 明显抑制了 tbOOH 诱导的 DNA 断裂现象的发生, 但对 paraquat 诱导的 DNA 断裂不显示抑制作用.

2.5 DNA 断裂定量分析

分别经 paraquat 和 tbOOH 处理的对照、cGPx-c1 和 cGPx-c3 细胞 DNA 断裂定量分析结果表明 (图 2), 对照细胞 paraquat 和 tbOOH 处理后基因组 DNA 断裂成片段的比率分别为 69.7% ± 3.4% 和 73.4% ± 5.2%, 而在 GPx 表达程度较高的 cGPx-c1 细胞克隆, tbOOH 诱导 DNA 断裂形成百分率明显降低 (P < 0.01), 但对 paraquat 诱导的 DNA 断裂形成无明显影响, 同时, 在 GPx 表达程度低于 cGPx-c1 的细胞克隆 cGPx-c3, tbOOH 诱导

DNA 断裂也受到显著抑制,但其抑制程度低于 cGPx-c1 细胞克隆,同样,该细胞克隆对 paraquat 诱导的 DNA 断裂无明显抑制作用。

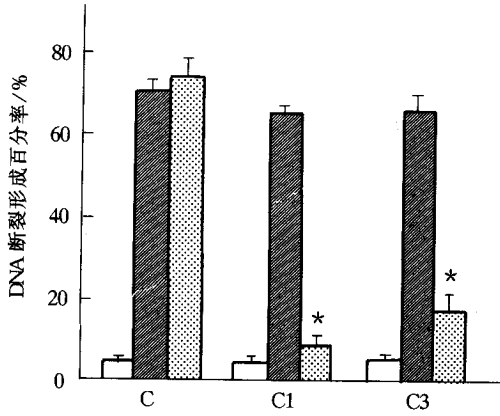


图 2 DNA 断裂定量分析

细胞经 paraquat 和 tBOOH 处理后分别提取断裂和完整 DNA,用 Hoechst 33258 荧光染色法测定各部分 DNA 含量。C: 对照组细胞; C1: cGPx-c1; C3: cGPx-c3。tBOOH 处理的对照细胞相比, * $P < 0.01$ 为差异显著。

□: 对照; ▨: paraquat; ▤: tBOOH

3 讨 论

近年来的研究表明,活性氧在诱发细胞程序性死亡中起重要作用^[8], paraquat 和 tBOOH 的细胞毒性作用都是通过活性氧而介导的,因此我们首先研究了 paraquat 和 tBOOH 是否能够诱发细胞程序性死亡。结果表明, 0.2 mmol/L paraquat 和 0.1 mmol/L tBOOH 都能诱发典型的细胞程序性死亡变化,包括核染色质凝聚和 DNA 断裂。进一步的研究发现,稳定表达 GPx 的细胞对 tBOOH 诱发的细胞程序性死亡有明显的抑制作用,且与转染细胞的 GPx 表达程度有量效依赖关系(图 2),但对 paraquat 诱发的细胞程序性死亡抑制作用不明显,该结果揭示,尽管 paraquat 和 tBOOH 都是通过活性氧而介导其细胞毒性作用的,但其作用机制可能有所不同,因此抗氧化酶 GPx 对清除活性氧的细胞毒性作用具有选择性。该结果为活性氧在细胞程序性死亡中的作用提供了新的依据,同时也为抗氧化剂应

用于与活性氧有关的疾病的防治提供了新的思路。

参 考 文 献

- 1 Chen Y, Zhou M, Li J *et al.* Injurious effect of reactive oxygen species on macrophage and its prevention by PSK. *J Clin Lab Immunol*, 1994, **43** (3): 99~115
- 2 St. Clair D K, Oberley T D, Ho Y-S. Overproduction of human Mn-superoxide dismutase modulates paraquat-mediated toxicity in mammalian cells. *FEBS* 1993, **293** (1, 2): 199~203
- 3 Felgner P L, Gadek T R, Holm M *et al.* Lipofectin: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (21): 7413~7417
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~159
- 5 孙 娟, 陈 媛, 周 玫等. Mn-SOD 对 CHO 细胞电离辐射敏感性的影响. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24** (1): 48~52
- 6 Schulze O K, Walczak H, Droge W *et al.* Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, **127** (1): 15~20
- 7 Ramakrishnan N, Catravas G N. N-(2-Mercaptoethyl)-1, 3-propanediamine (WR-1065) protects thymocytes from programmed cell death. *J Immunol*, 1992, **148** (6): 1817~1821
- 8 Wood K A, Youle R F. Apoptosis and free radicals. *ANN N Y Acad Sci*, 1994, **17** (738): 400~407

Effect of Glutathione Peroxidase on Programmed Cell Death Induced by Reactive Oxygen Species. SUN Juan, CHEN Yuan, ZHOU Mei (*Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract Glutathione peroxidase (GPx) is one of the major cellular antioxidant enzymes in scavenging reactive oxygen species (ROS). The effects of GPx on cytotoxicity mediated by paraquat and t-butylhydroperoxide (tBOOH) in GPx overexpressing in cell lines were investigated. It was found that both paraquat and tBOOH could induce the typical features of programmed cell death (PCD) including chromatin condensa-

tion and DNA fragmentation. The GPx expressing cell clones could efficiently inhibit PCD induced by tbOOH, but not by paraquat. The results suggested that GPx selectively inhibits

cytotoxicity induced by ROS.

Key words glutathione peroxidase, gene transfection, paraquat, t-butylhydroperoxide (tbOOH), programmed cell death

三链 DNA 的形成抑制 DNA 结合蛋白与启动子的结合

刘定燮

(第一军医大学南方医院, 广州 510515)

王昌才

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

摘要 电泳迁移分析方法及 DNase I 足迹实验表明 21nt 脱氧寡核苷酸 G3TG2T GT2G5TG2TGT (CP1) 与乙肝病毒 (HBV) 核心启动子 (Cp) 片段之间三链 DNA 的形成有较高的特异性及稳定性. 凝胶滞留实验显示, 在大鼠肝细胞核提取物体外转录系统中, CP1 可特异地抑制 DNA 结合蛋白与 Cp 片段的结合, 而不能与 Cp 结合形成三链 DNA 的脱氧寡核苷酸 CP3 (TGTG2TG5T2GTG2TG3) 对蛋白与 Cp 的结合并无抑制作用. 这些结果表明, 三链 DNA 的形成有可能抑制 HBV DNA 的转录.

关键词 三链 DNA, 反基因策略, 脱氧寡核苷酸, 乙肝病毒, DNA 结合蛋白

学科分类号 Q71

建立在 DNA 三螺旋结构基础上的反基因策略 (antigene strategy) 是基因治疗的一个新方向, 它通过能形成三链 DNA 的寡核苷酸 (triplex-forming oligo-nucleotide, TFO) 与靶基因结合形成局部的三链结构来抑制基因的转录^[1]. 已在体外或体内实验证实了 TFO 能有效地抑制人免疫缺陷病毒及 c-myc 等基因的转录^[1]. 鉴于我国 HBV 感染率高而目前尚缺乏有效的治疗方法, 我们选择 HBV Cp 内一位点为靶序列, 研究了三链 DNA 的形成及其对细胞核内因子结合的抑制作用, 以为反基因策略应用于 HBV 感染的治疗提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 寡核苷酸的合成

脱氧寡核苷酸在 ABI381A DNA 合成仪上以亚磷酰胺三酯固相法合成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化.

1.2 核心启动子片段的分离及标记

含两个 HBV DNA (ayw 亚型) 串联拷贝的质粒 pCP10 由上海生物化学研究所惠赠. 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化 pCP10 中含核心启动子 (Cp) 全部或部分序列的片段, 包括: Hinc II-Dra I (1687~1727nt, 以 EcoR I 切点为 +1, 以下均同)、Dra I-Rsa I (1727~1774nt)、Sty I-Rsa I (1645~1774nt) 及 Hinc II-Sty I (1687~1885nt) 片段. 前二者用于蛋白质-DNA 结合的竞争性抑制实验, 后者用大肠杆菌 Klenow 片段及 [α -³²P] dCTP (北京亚辉公司) 标记 Sty I 切点的 3' 凹端, 用于三链 DNA 形成的电泳迁移分析、足迹实验或凝胶滞留实验.

1.3 电泳迁移分析 (EMSA)

Hinc II-Sty I 片段 (约 10^{-10} mmol/L) 与