

研究简报

羟自由基对培养细胞损伤作用的实验观察

汪德清 沈文梅 田亚平 董振南

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

刘国廉 孙仲怡 杨素霞 周淑珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 将不同浓度的 H_2O_2 与 V79 细胞共同孵育 24、48h 后, 结果显示 SOD 活性下降, LPO 含量增加, 细胞内 GPT、GOT、LDH 和 CPK 酶活性升高, 其变化程度与培养时间和 H_2O_2 浓度成正比。

关键词 羟自由基, V79 细胞, SOD, LPO

羟自由基 ($\cdot OH$) 是造成组织细胞损伤的重要活性氧之一, 它可引起膜脂质过氧化、蛋白质交联变性、核酸等生物大分子的过氧化反应, 结果轻则造成细胞代谢失调、加速细胞老化; 重则导致基因突变和细胞死亡^[1,2]。本文以中国仓鼠肺细胞 (V79) 为实验对象, 观察了 $\cdot OH$ 对 V79 细胞代谢和脂质过氧化物生成的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 RPIM-1640 培养基 GIBCO Lab 美国产品; 小牛血清系浙江温州生产; 鲁米诺 (luminol) 为 Merck-Schuehard 公司产品; 黄嘌呤 (Xan) Sigma 公司生产; 黄嘌呤氧化酶 (Xo) 由军事医学科学院二所惠赠; 硫代巴比妥酸 (TBA) 系上海试剂二厂生产; 四乙氧基丙烷 (TEP) 是 Fluka 公司产品; H_2O_2 为天津东方化工厂生产; 其余均为国产分析纯试剂。

1.1.2 仪器 日立 7150 全自动生化分析仪, 日立 850-荧光分光光度计, WDD-1 发光测试仪 (北京第二光学仪器厂生产)。

1.2 细胞培养

V79 细胞在 37℃ 条件下, 用含 10% 灭活小牛血清的 RPIM-1640 培养基培养。培养基中加入终浓度为 100IU/ml 的青霉素和 100mg/L 的链霉素。

1.3 实验方法

1.3.1 收集对数生长期细胞 每个样品接种 10^6 个细胞, 样品中加入 H_2O_2 (对照加生理盐水), 终浓度分别为 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-5} mol/L 和 5×10^{-5} mol/L, 37℃ 培养 24、48h 后收集培养上清和细胞, 细胞用 PBS 洗两次后, 反复冻融, 离心, 取上清 (即细胞内液), 测定样品中 SOD 的活性, 细胞内乳酸脱氢酶 (LDH)、磷酸肌酸激酶 (CPK)、谷丙转氨酶 (GPT) 及谷草转氨酶 (GOT) 的活性及 LPO 含量的变化。

1.3.2 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定 参见文献 [3]。Xan 和 Luminol 分别用 pH 10.2, 50mmol/L 的碳酸盐缓冲液配成 0.2mmol/L 溶液, 应用时按 1:1 混匀, 50 μ l Xo 启动反应 (反应总体积为 1ml), 记录第 1 分钟的发光值, 以碳酸盐缓冲液作对照, 其发光强度为 100%, 用发光抑制率表示 SOD 活性。

1.3.3 细胞内脂质过氧化物 (LPO) 含量测定 按文献 [4], 用日立 850-荧光分光光度计测定, 激发波长 515nm, 发射光波长 553nm, 以 TEP 作标准, 结果用 nmol 每毫克细胞蛋白表示。

1.3.4 LDH、CPK、GPT、GOT 的测定 用国际临床化学联合会 (IFCC) 推荐的连续监测

法在日立 7150 全自动生化分析仪上测定。

2 结 果

2.1 不同浓度的 H_2O_2 对 V79 细胞 SOD 活性的影响

从表 1 可知, H_2O_2 能使细胞的 SOD 活性

显著下降, H_2O_2 浓度越高 SOD 活性下降越明显, 三种浓度之间对 V79 细胞损伤所致 SOD 活性下降亦有显著差异 ($P < 0.01$)。此外, 细胞内液 SOD 活性低于细胞外液 ($P < 0.001$); 培养 48h 的 SOD 活性低于 24h 的活性。值得注意的是, 这种变化与 H_2O_2 浓度成正比。

表 1 H_2O_2 对 V79 细胞 SOD 活性的影响

H_2O_2 /mol · L ⁻¹	细胞内液		细胞外液	
	24h	48h	24h	48h
对 照	52.58 ± 1.74	50.15 ± 1.22	82.45 ± 0.81	80.85 ± 1.96
1 × 10 ⁻⁶	47.63 ± 1.85 ¹⁾	43.42 ± 2.19 ¹⁾	75.42 ± 1.01 ²⁾	73.58 ± 1.92 ¹⁾
1 × 10 ⁻⁵	37.67 ± 0.91 ²⁾	33.78 ± 2.49 ²⁾	68.19 ± 1.16 ²⁾	66.07 ± 1.17 ²⁾
5 × 10 ⁻⁵	30.01 ± 1.71 ²⁾	29.28 ± 1.78 ²⁾	52.53 ± 1.16 ²⁾	49.39 ± 1.23 ²⁾

注: $n=3$, 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

2.2 H_2O_2 对 V79 细胞 LPO 含量的影响

LPO 是反应脂质过氧化的主要指标。从图 1 可看出, 当 H_2O_2 浓度一定时, 即可明显

加重细胞的脂质过氧化程度, 浓度降至 1 × 10⁻⁶ mol/L 的组, LPO 含量与对照组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。同时也看到细胞 LPO 的含量与培养时间有密切关系, 培养时间越长 LPO 含量升高越明显。

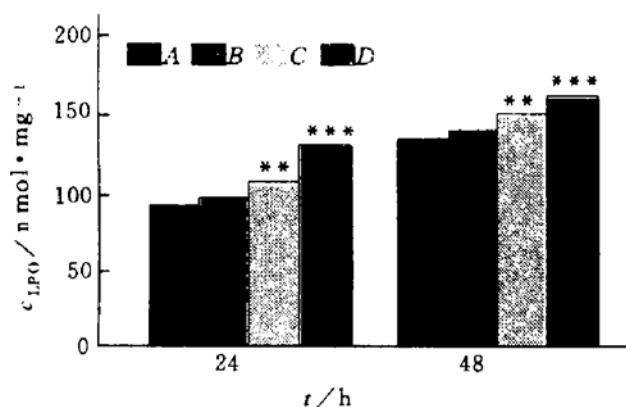


图 1 H_2O_2 对 V79 细胞 LPO 含量的影响

B, C, D 组与对照组 (A) 比较, ^{**} $P < 0.01$,

^{***} $P < 0.001$. A: 对照组; B: 1 × 10⁻⁶ mol/L

H_2O_2 ; C: 1 × 10⁻⁵ mol/L H_2O_2 ;

D: 5 × 10⁻⁵ mol/L H_2O_2 . $n=3$.

2.3 H_2O_2 对 V79 细胞酶含量的影响

GPT、GOT、CPK、LDH 是反映细胞代谢的重要指标。正常细胞的酶都有一定的浓度范围和变化规律, 如在一定的环境条件下, 酶含量随培养时间延长而增高。当细胞受损时, 这些酶就会发生明显改变, 受损越严重, 变化越明显。从表 2、3 可知, H_2O_2 可引起细胞严重损伤, 其损伤程度与 H_2O_2 浓度成正比。浓度为 1 × 10⁻⁶ mol/L 时, V79 细胞经过 24h 培养, 对 LDH 含量的影响不明显 ($P > 0.05$), 但随着 H_2O_2 的浓度加大和培养时间的延长, 四种酶的含量均显著升高, 提示细胞损伤加剧。

表 2 不同浓度的 H_2O_2 在 24h 时对 V79 细胞内酶活性的影响

H_2O_2 /mol · L ⁻¹	IU/L			
	GPT	LDH	GOT	CPK
对照组	4.26 ± 0.41	182.00 ± 23.27	18.23 ± 2.25	10.00 ± 1.63
1 × 10 ⁻⁶	5.00 ± 0.45 ¹⁾	225.00 ± 40.83	22.10 ± 2.20 ¹⁾	14.09 ± 0.86 ¹⁾
1 × 10 ⁻⁵	5.67 ± 0.65 ²⁾	240.03 ± 20.05 ¹⁾	23.80 ± 0.16 ²⁾	15.33 ± 0.47 ²⁾
5 × 10 ⁻⁵	6.27 ± 0.33 ³⁾	269.67 ± 17.23 ²⁾	27.50 ± 0.57 ³⁾	15.66 ± 0.47 ²⁾

注: $n=3$, 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

表 3 不同浓度的 H_2O_2 在 48h 时对 V79 细胞内酶活性的影响

$H_2O_2/mol \cdot L^{-1}$	IU/L			
	GPT	LDH	GOT	CPK
对照组	10.63 ± 1.49	423.33 ± 38.61	39.30 ± 0.37	27.67 ± 1.24
1×10^{-6}	13.23 ± 0.37 ²⁾	487.33 ± 24.93 ¹⁾	46.33 ± 0.53 ²⁾	32.67 ± 1.25 ²⁾
1×10^{-5}	13.30 ± 0.18 ²⁾	491.35 ± 26.97 ¹⁾	49.37 ± 0.43 ²⁾	32.69 ± 2.05 ²⁾
5×10^{-5}	13.90 ± 0.08 ²⁾	506.30 ± 28.37 ²⁾	53.07 ± 0.17 ³⁾	34.33 ± 0.47 ²⁾

注: $n=3$. 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

3 讨 论

H_2O_2 对细胞的损伤效应是多方面的, 但最基本的损害机制是通过 Haber-Weiss 或 Fentons 反应生成 $\cdot OH$ 造成的^[5]. $\cdot OH$ 是化学性质最活泼的活性氧, 它几乎与细胞内的每一类有机物如糖、氨基酸、磷脂、核苷酸和有机酸等都反应, 并且有非常高的速率常数, 因此它有极强的破坏性^[6]. 当其与细胞膜反应, 可引起膜脂质过氧化, 进而导致细胞内的蛋白质、酶、DNA 等生物大分子的结构和功能的改变, 造成细胞酶活性变化、代谢紊乱、DNA 损伤和细胞死亡^[1,2]. 本文结果表明, H_2O_2 可使 SOD 活性下降, LPO 含量升高. 变化程度与 H_2O_2 的浓度及细胞培养时间成正比. SOD 活性下降与 LPO 含量升高提示细胞内自由基水平升高, 脂质过氧化程度加重. 有报道, H_2O_2 可使细胞或组织中 SOD 活性下降和 LPO 含量升高^[7], 我们的实验支持了这一结果. 但 H_2O_2 对反映细胞代谢和膜稳定性的细胞内各种酶的变化尚未见报道, 本文表明 H_2O_2 对细胞的损伤不仅只表现在 SOD 活性下降和 LPO 含量的增加, 而且对细胞的多种代谢酶亦有明显的影响, 其机理可能是: 细胞内高浓度的自由基启动细胞的防护体系, 加强了能量的代谢和转换, 致促进氨基酸转运的 GPT、GOT、催化糖酵解的 LDH 和催化 ATP 分子释能的 CPK 含量都大量增加, 以维持新水平的平衡. 在代谢增加的同时, 自由基产生亦增加, 进一步加重脂质过氧化链式反应, 使膜稳定性下降, 通透性增加, 最终导致细胞裂解死亡.

参 考 文 献

- 1 Cacciuttolo M A, Trinh L, Lumpkin J A *et al.* Free Radical Biol Med, 1993; 14 (3): 267
- 2 Prise K M, Davies S, Stratford M R *et al.* Int J Radiat Biol, 1992; 62 (3): 297
- 3 田亚平, 方允中, 孙存普等. 中国科技首届青年学术年会执行委员会编. 中国科学技术学会首届青年学术会议论文集(理科分册). 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 378
- 4 翁玉椿, 王秀平, 卢泳才等. 细胞生物学杂志, 1985; 7 (3): 142
- 5 Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine, 2nd. Oxford: Clarendon Press, 1989: 28
- 6 Akest S D, Svingen B A. In: Pryor W A ed. Free radicals in biology, Vol. V. New York: Academic Press, 1982: 1
- 7 李 军, 陈 瑗, 周 玫. 基础医学与临床, 1991; 11 (2): 40

Cell Damage in Chinese Hamster V79 Cells Treated With Hydrogen Peroxide. Wang De-qing, Shen Wenmei, Tian Yaping, Dong Zhennan (Department of Biochemistry, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China); Liu Guolian, Sun Zhongyi, Yang Suxia, Zhuo Shuzhen (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract When Chinese Hamster V79 cells were incubated with H_2O_2 of different concentration for 24h and 48h, different degree damages in cells have been found. The activity of SOD decreased and lipid peroxides contents increased in cultured cells. It is also shown that the activities of metabolites, such as GPT,

GOT, LDH and CPK, are higher than those in control, is in direct proportion to the H_2O_2 concentration and the incubation time.

Key words hydroxyl radical, V79 cells, SOD, LPO

梨形环棱螺凝集素的初步研究

张吉强

(第三军医大学组织胚胎学教研室, 重庆 630038)

李清漪

(西南师范大学生物系, 重庆 630715)

摘要 通过 Sepharose 4B-甲状腺球蛋白亲和层析, 从梨形环棱螺 *Bellamya purificata* 体内分离到的一种凝集素, 不连续 PAGE 显示其为单一的蛋白质谱带。它能凝集兔、猪、鸭等动物的红细胞, 但不能凝集人的 A、B、O 及 AB 型血的红细胞和固定后的兔红细胞。其凝集活力可被 1.0mol/L 的乳糖、半乳糖和 60g/L 的甲状腺球蛋白抑制, 但不能被碱性硼酸缓冲液抑制。对温度变化敏感, 有较宽的最适 pH 范围。

关键词 梨形环棱螺, 凝集素, 理化性质, 纯化

软体动物凝集素大都来源于软体动物的体液或蛋白腺中, 具有调理、避害、识别等功能, 还具有促进细胞的有丝分裂、糖的代谢和利用等作用^[1-3]。我们从梨形环棱螺 (*Bellamya purificata*) 肌肉中提取一种凝集素 (BPL) 并对其部分理化性质及纯化方法进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 梨形环棱螺采自北碚磨滩水库, 经鉴定后取其肌肉用 PBS 按 1:4 (W/V) 匀浆, 4℃浸提过夜, 离心弃去沉淀, 上清液即为 BPL 提取液。

1.2 BPL 的血凝试验和糖抑制试验按孙册^[4]的方法; 采用甲醛和/或戊二醛固定兔红细胞^[5,6]; 按 Ahmed 等^[7]的方法测定碱性硼酸缓冲液对 BPL 血凝活力的影响; 以不同 pH 值的缓冲液 (pH1.89—11.98) 代替糖溶液测定 BPL 的酸碱稳定性。BPL 热稳定性的测定方法如下: 取提取液数份, 在不同温度下各孵育一定时间后迅速冷却至室温, 然后测其血凝活力。

1.3 凝集素的纯化, 采用溴化氰活化的 Sepharose 4B-甲状腺球蛋白亲和层析法^[8],

PBS 平衡并洗脱杂蛋白, 随后依次用 1.0mol/L 的乳糖、0.1mol/L 的醋酸解吸附。洗脱液经活性测定后合并有活性部分, 对 PBS 充分透析, 冷冻干燥后即得 BPL 纯品, 纯度鉴定采用碱性 PAGE。

2 实验结果

2.1 在梨形环棱螺肌肉组织中存在着血凝成分 (BPL), BPL 对不同种属及不同血型的凝血作用列于表 1。

实验结果表明, BPL 对兔血的凝集作用最强, 但不凝集人的各型血红细胞, 酶处理使其敏感性增强。

甲醛和/或乙醛固定的兔红细胞不再与 BPL 发生凝聚反应; 碱性硼酸缓冲液 (pH7.4—9.0) 对 BPL 的血凝活力没有影响。

糖抑制实验证明, 只有高浓度 (1.0mol/L) 的乳糖和半乳糖及 60g/L 的甲状腺球蛋白表现出较强烈的抑制作用, 其它的单双糖在各自的浓度下均无抑制作用 (表 2)。