

Effects of CHP, H₂O₂ and Antioxidants on Contents of NO, Carbonyl and malondialdehyde of Cultured Hepatoma Cells in Different Phases of Cell Cycle

过氧基异丙苯和 H₂O₂ 及抗氧化剂对不同时相肝癌细胞的 NO、羰基和丙二醛的影响

LIANG Xin, HAI Chun-xu *

(Department of toxicology, the Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

梁欣/海春旭*

(第四军医大学毒理学教研室 陕西 西安, 710032)

【摘要】背景与目的: 研究有机氧化剂过氧基异丙苯 (CHP) 和无机氧化剂过氧化氢 (H₂O₂) 及抗氧化剂单独和联合作用对不同细胞周期时相肝癌细胞的一氧化氮 (NO)、羰基和丙二醛 (MDA) 的影响。材料与方法: 同步化原发性肝癌细胞系 H299 细胞 (1 × 10⁶/ml) 分别设对照组 (DMSO)、CHP 组 (50 μmol/ml)、H₂O₂ 组 (50 μmol/ml)、CHP + H₂O₂ 组 (H₂O₂ 和 CHP 各 50 μmol/ml)、Vit A 组 (10 μmol/ml)、Vit E 组 (10 μmol/ml)、Na₂SeO₃ 组 (50 nmol/ml Na₂SeO₃)、AO 组 (Vit A + Vit E + Na₂SeO₃, 其中 Vit A、Vit E 各 5 μmol/ml, Na₂SeO₃ 25 nmol/ml)。分别于细胞周期 G₁、S、G₂ 和 M 期加入上述试剂, 观察 NO、总羰基和 MDA 含量。结果: 细胞同步于 G₁ 期者为 86%、S 期为 78%、G₂/M 期为 61%。与对照组相比, 复合氧化剂 (CHP + H₂O₂ 组) 对 G₁ 期肝癌细胞的 NO 含量有刺激作用 (P < 0.05), 单独 Vit A 组有显著的抑制作用 (P < 0.05)。复合氧化剂 (CHP + H₂O₂ 组) 对 G₁ ~ M 期肝癌细胞的总羰基含量均有显著的刺激作用 (P < 0.05), 而单独应用 Vit A、Vit E、Na₂SeO₃ 时对整个细胞周期的总羰基含量也有显著的抑制作用 (P < 0.05)。H₂O₂ 使 G₂/M 期细胞的 MDA 含量增加 (P < 0.05), 而 AO 组 MDA 含量减少 (P < 0.05)。结论: 细胞经同步化处理, CHP 和 H₂O₂ 以及 Vit A、Vit E、Na₂SeO₃ 对肿瘤细胞的影响存在一定的敏感点和敏感时相, 复合氧化剂 (CHP + H₂O₂) 和 Vit A 对 DNA 合成前期 (G₁ 期) 肿瘤细胞内的氧化损伤信号分子 NO 作用显著, H₂O₂ 与复合抗氧化剂 (Vit A + Vit E + Na₂SeO₃) 作用于 DNA 合成后期 (G₂ 期) 的肿瘤细胞后, 细胞氧化损伤的终产物 MDA 明显改变。

【关键词】 自由基; 抗氧化剂; 细胞周期; 调控

中图分类号: R142

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)05-0399-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To study isolated and combined effects of the organic oxidant cumene hydroperoxide (CHP), the inorganic oxidant H₂O₂ and several antioxidants, on nitric oxide (NO) contents, total carbonyl and malondialdehyde (MDA) of hepatoma cells in different phases of cell cycle. MATERIALS AND METHODS: Hepatoma cells H299 (1 × 10⁶/ml) were synchronized, and then divided into eight groups: the control group (DMSO), CHP (50 μmol/ml), H₂O₂ (50 μmol/ml), CHP + H₂O₂ (oxidant compounds: H₂O₂ of 50 μmol/ml plus CHP of 50 μmol/ml), Vit A (10 μmol/ml), Vit E (10 μmol/ml), Na₂SeO₃ (50 nmol/ml), AO (antioxidant compounds of Vit A + Vit E + Na₂SeO₃, among them: Vit A and Vit E were 5 μmol/ml each, Na₂SeO₃ was 25 nmol/ml). They were separately added to cultured cells at G₁, S, G₂ and M phase of the cell cycle. The cell contents of NO, total carbonyl (T-carbonyl) and MDA were determined. RESULTS: The cell cycle showed better synchronization. The synchronized cells in G₁ phase was 86%, in S phase was 78%, and in G₂/M phase was 61%. We found that NO of cells stimulated by oxidant compounds (CHP and H₂O₂) at G₁ phase were significantly increased (P < 0.05) while they were inhibited by Vit A (P < 0.05). The oxidant compounds (CHP and H₂O₂) had stimulatory function, and Vit A, Vit E, Na₂SeO₃ had

收稿日期: 2006-09-01; 修订日期: 2006-12-18

作者简介: 梁欣 (1956-), 女, 哈尔滨人, 研究生, 高级实验师, 研究方向: 自由基生物学与医学。

* Correspondence to: HAI Chun-xu. Tel: 029-84774879, E-mail: cx-hai@

fmmu.edu.cn

obvious inhibitory effects on T-carbony contents throughout the whole cell cycle ($P < 0.05$). The levels of MDA in synchronized cultured cells were elevated by H_2O_2 at G_2/M phase, and were decreased by antioxidant compounds Vit A + Vit E + Na_2SeO_3 at G_2 phase ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** After synchronization, the actions of organic oxidant, inorganic oxidant, and the tested antioxidants varied according to the different phases in the tumor cell cycles. Hepatoma cells in G_1 phase were sensitive to oxidant compounds (CHP and H_2O_2) and Vit A on the oxidative injury NO level. The cellular oxidative injury marker MDA contents in hepatoma cells in G_2 phase were significantly altered by H_2O_2 and antioxidant compounds (Vit A + Vit E + Na_2SeO_3).

【KEY WORDS】 free radicals; antioxidants; cell circle; modulation

研究发现,活性氧含量变化具有调控肿瘤细胞增殖、凋亡和杀伤的作用^[1],这种调控作用在细胞周期的不同时相呈现不同的反应性。本文采用低温冷冻法使细胞同步化,利用氧化物诱发肿瘤细胞周期不同时相的自由基(或活性氧)反应,同时使用抗氧化剂共同培养,研究细胞周期不同时相的细胞内源性一氧化氮(NO)、总羰基和丙二醛(MDA)的含量变化,以期为进一步寻找活性氧对肿瘤细胞作用的敏感点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

原发性肝癌细胞系 H299,由第四军医大学病理学教研室惠赠。过氧基异丙苯(cumene hydroperoxide, CHP)、二甲基亚砷(DMSO)为 BDH 公司产品;无机氧化物过氧化氢(H_2O_2)为上海试剂公司分装。Vitamin A(Vit A)、Vitamin E(Vit E)、 Na_2SeO_3 (Se)、硫代巴比妥酸(TBA)均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 细胞培养及分组

用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基进行传代培养,当细胞密度达到 $1 \times 10^6/ml$ 时,进行分组(每组设 3 瓶平行样)。以低温培养法即细胞于 $37^\circ C$ 培养 1 h 后,立刻放入 $4^\circ C$ 冰箱中使细胞同时进入 G_1 期,阻止 DNA 继续合成,经过 4 h 后取出,获得同步化肝癌细胞。根据流式细胞技术测得 H299 细胞周期为 22 h,分别于 G_1 、S、 G_2 、M 期(依次为同步化后第 22、30、34、38 h),按下列实验分组加入氧化剂和抗氧化剂,孵育后收集细胞,用生理盐水清洗、500 g 离心 3 次,按细胞 $1 \times 10^6/ml$ 定容于 10 ml 生理盐水中,备用。

实验共分 8 组。对照组,0.1 ml DMSO; CHP 组,0.1 ml CHP($50 \mu mol/ml$); H_2O_2 组,0.1 ml H_2O_2 ($50 \mu mol/ml$); C + H 组,加 H_2O_2 、CHP 各 0.05 ml ($50 \mu mol/ml$); Vit A 组, Vit A 0.1 ml ($10 \mu mol/ml$); Vit E 组, Vit E 0.1 ml ($10 \mu mol/ml$); Se 组, Na_2SeO_3 0.1 ml ($50 nmol/ml$); AO 组,共加入 0.1 ml (Vit A + Vit

E + Se; Vit A、Vit E 各为 $5 \mu mol/ml$ (Se 为 $25 nmol/ml$)。各组试剂均加入 0.1 ml 的 DMSO 溶液中。

1.3 生化指标的测定

1.3.1 氧化硝酸盐偶氮显色法测定一氧化氮(NO)含量

每组分别取 $10^6/ml$ 细胞混悬液 0.1 ml 加入 0.15 mmol/L 硫酸锌 0.6 ml 混匀,再加双蒸水 0.4 ml,加 4% NaOH 0.1 ml 混匀,冰上孵育 60 min, $12\ 000 g$ 离心 2 min。取上清 0.6 ml 加双蒸水 0.4 ml 及 0.3% 磺氨 0.1 ml,冰上孵育 15 min,之后加 6 mmol/L 茶乙烯二胺盐酸盐 0.1 ml,室温放置 1 h,测 OD_{545} 值,标准曲线法计算含量,单位为 $\mu mol/L$ 。

1.3.2 二硝基苯胍法测定总羰基含量

每组取 0.5 ml 细胞悬液,再加含 8.0 mol/L 盐酸胍的磷酸缓冲液、2,4-二硝基苯胍(9:1)混合液 2.5 ml,于 $25^\circ C$ 反应 30 min,测定 OD_{387} 值计算含量,计算公式为:

$$\text{总羰基含量} = OD_{387} \times 4.348 \mu mol/ml \text{ 细胞悬液。}$$

1.3.3 TBA 法测定 MDA 含量

每组取 200 μl 裂解后的细胞悬液,加入 10% 三氯醋酸 3 ml 混匀,室温静置 10 min, $3\ 000 r/min$ 离心 10 min,取上清 2 ml,加入 0.67% TBA 2 ml 混匀, $100^\circ C$ 孵育 10 min,流水冷却至室温,于波长 535 nm 处比色,测定 OD 值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,多组之间采用单因素 ANOVA,两组之间采用 t 检验, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一氧化氮(NO)含量测定结果

结果见表 1。

2.1 总羰基(T-carbonyl)含量测定结果

对细胞总羰基含量的影响测定结果见表 2。

2.3 丙二醛(MDA)含量的测定结果

对细胞 MDA 含量的影响测定结果见表 3。

表 1 药物对不同时相细胞 NO 含量的影响

Table 1 The effects of chemicals on NO of cells in different phases

Group	G ₁	S	G ₂	M
Control	0.21 ± 0.031	0.25 ± 0.026	0.24 ± 0.021	0.24 ± 0.025
CHP	0.25 ± 0.026	0.23 ± 0.027	0.27 ± 0.038	0.23 ± 0.018
H ₂ O ₂	0.24 ± 0.043	0.28 ± 0.038	0.24 ± 0.030	0.19 ± 0.029 ^{ab}
C + H	0.27 ± 0.025 ^a	0.27 ± 0.019	0.25 ± 0.019	0.25 ± 0.020
Vit A	0.08 ± 0.012 ^{ac}	0.24 ± 0.022	0.23 ± 0.025	0.24 ± 0.019
Vit E	0.24 ± 0.013	0.24 ± 0.017	0.25 ± 0.013	0.15 ± 0.015 ^{ac}
Se	0.23 ± 0.035	0.23 ± 0.032	0.23 ± 0.021	0.24 ± 0.022
AO	0.23 ± 0.021	0.25 ± 0.026	0.25 ± 0.027	0.24 ± 0.018

Compared with control, ^a*P* < 0.05; compared with C + H group, ^b*P* < 0.05; compared with AO group, ^c*P* < 0.05.

表 2 药物对不同时相细胞总羰基含量的影响

Table 2 The effects of chemicals on T-carbonyl of cells in different phases

Group	G ₁	S	G ₂	M
Control	2.12 ± 0.22	1.13 ± 0.17	1.82 ± 0.19	1.47 ± 0.16
CHP	3.48 ± 0.38 ^a	1.74 ± 0.20 ^b	2.26 ± 0.34 ^{ab}	2.70 ± 0.39 ^b
H ₂ O ₂	1.04 ± 0.16 ^{ab}	1.39 ± 0.11 ^b	2.26 ± 0.12 ^b	1.91 ± 0.12 ^a
C + H	3.57 ± 0.45 ^a	3.35 ± 0.39 ^a	2.96 ± 0.26 ^a	1.92 ± 0.30 ^a
Vit A	1.30 ± 0.27 ^{ac}	1.00 ± 0.22 ^a	1.35 ± 0.27 ^a	0.65 ± 0.11 ^{ac}
Vit E	1.00 ± 0.17 ^{ac}	1.04 ± 0.13 ^a	1.35 ± 0.13 ^a	1.39 ± 0.25
Se	0.78 ± 0.14 ^{ac}	0.48 ± 0.08 ^{ac}	0.78 ± 0.11 ^{ac}	0.91 ± 0.06 ^{ac}
AO	2.26 ± 0.38	1.84 ± 0.33 ^a	1.35 ± 0.31 ^a	1.61 ± 0.29

Compared with control, ^a*P* < 0.05; compared with C + H group, ^b*P* < 0.05; compared with AO group, ^c*P* < 0.05.

表 3 药物对不同时相细胞 MDA 含量的影响

Table 3 The effects of chemicals on MDA of cells in different phases

Group	G ₁	S	G ₂	M
Control	1.54 ± 0.34	1.85 ± 0.22	2.02 ± 0.42	1.49 ± 0.37
CHP	1.67 ± 0.45	1.38 ± 0.36 ^b	2.68 ± 0.47 ^b	1.59 ± 0.36 ^b
H ₂ O ₂	3.34 ± 0.52 ^{ab}	2.44 ± 0.27 ^b	8.44 ± 0.58 ^{ab}	3.13 ± 0.34 ^a
C + H	1.26 ± 0.44	3.57 ± 0.54 ^a	6.76 ± 0.58 ^a	3.09 ± 0.53 ^a
Vit A	3.08 ± 0.41 ^{ac}	2.44 ± 0.20 ^a	1.34 ± 0.32	1.66 ± 0.45
Vit E	1.65 ± 0.33	1.28 ± 0.38	1.94 ± 0.29	1.56 ± 0.39
Se	1.21 ± 0.36	1.47 ± 0.43	2.41 ± 0.31 ^a	1.95 ± 0.23
AO	1.00 ± 0.24	1.45 ± 0.28	1.29 ± 0.20 ^a	1.37 ± 0.21

Compared with control, ^a*P* < 0.05; compared with C + H group, ^b*P* < 0.05; compared with AO group, ^c*P* < 0.05.

3 讨论

细胞周期 (cell cycle) 是指各次细胞分裂之间的间隙, 每一细胞周期可分成 4 期: G₁(间隙 1 期)、S(DNA 合成期)、G₂(间隙 2 期) 及 M(有丝分裂期)。肿瘤细胞同步化作用就是人为的将肿瘤细胞阻止于某一特定时相, 施加不同干预作用后释放 (如低温释放) 等方法可以使绝大多数细胞同时进入某一分期, 进而有利于寻找肿瘤细胞周期不同时相的敏感点, 对于研究肿瘤的发生和抑制机制具有重要作用, 为进一步筛选有效的抗癌手段和减少副作用提供线索^[2]。

大量研究表明, 相同因素作用于细胞及核酸时, 与

细胞周期的敏感时相 (点) 密切相关。Segre 等^[3]采用自由基电子顺磁共振技术, 对 HeLa 等细胞中的自由基的水平与细胞生长阶段之间的相关性研究结果表明, 自由基或活性氧对肿瘤细胞作用在细胞周期中存在敏感作用时间点。另外, 国内外研究也表明抗氧化剂具有调控氧化损伤作用^[4-5], 因此, 探讨不同的活性氧在肿瘤细胞周期中是否存在敏感时相, 对研究肿瘤代谢和抗癌机制, 寻找有效的抗癌药物, 无疑具有重要意义。本研究中, 我们采用低温同步化技术使培养肿瘤细胞同步化, 分别施加氧化与抗氧化等干预因素, 以氧化损伤相关的信号因子一氧化氮 (NO)、膜损伤指标总羰基 (T-carbonyl) 和终反应指标丙二醛 (MDA) 为观测指标, 利用流式细胞技术分别测定 G₁ 期、S 期、G₂ 期及 M 期的细胞反应性, 结果表明, 细胞经同步化处理后, CHP 和 H₂O₂ 以及 Vit A、Vit E、Se 对肿瘤细胞的影响存在一定的敏感点和敏感时相。

研究发现, 在不同细胞系中, 既存在相对高活性的精氨酸酶和低活性一氧化氮合酶 (NOS), 也存在相对较低的精氨酸酶活性和极高的 NOS 活性的情况^[6]。NO 本身作为自由基, 在细胞内发挥着重要的信号转导作用, 因而容易受到氧化剂和抗氧化剂的影响。本研究发现与对照组相比, 复合氧化剂 (CHP + H₂O₂) 会刺激 G₁ 期肝癌细胞 NO 生成增加; 而此期加入 Vit A 对其生成有显著的抑制作用 (*P* < 0.05) (表 1), 提示肿瘤细胞在 G₁ 期对活性氧敏感, 胞内受到氧化刺激的信号分子增加, 从而可能诱发细胞凋亡。

由于细胞膜结构中广泛存在多糖物质, 机体代谢紊乱引起氧化应激的同时, 也会引起羰基应激, 细胞内反应性羰基化合物 (RCO) 大量增生, 细胞的总羰基含量就会增多^[7], 预示着自由基对蛋白分子的损伤加速。本实验中, 与对照组相比, 复合氧化剂 (CHP + H₂O₂) 对 G₁ ~ M 期肝癌细胞的总羰基含量均有显著的刺激作用, 总羰基均显著增加 (*P* < 0.05), 而抗氧化剂 Vit A、Vit E、Se 单独应用时对整个细胞周期的总羰基含量也有显著的抑制作用 (*P* < 0.05, Vit A 在 S 期, Vit E 在 S、M 期除外) (表 2), 说明活性氧对肿瘤细胞的膜损伤并未存在敏感相。另外还发现, 复合抗氧化剂 (Vit A + Vit E + Se) 并不比它们的单独作用强, 只在 G₂ 期对细胞总羰基有显著抑制作用, 提示抗氧化剂之间还可能存在着拮抗作用。

丙二醛 (MDA) 是常用而重要的细胞氧化损伤的标志物。MDA 含量增加, 说明氧化应激作用增强, 使细胞含有的不饱和双键断裂, 进而造成细胞损伤^[8]。本实验中, H₂O₂ 和复合氧化剂 (CHP + H₂O₂) 对 G₂/M 期肝癌细胞的 MDA 含量增高有显著的刺激作用 (*P* < 0.05), 亲



脂性氧化剂 CHP 对细胞周期各时相均无显著影响,提示许多外来化合物,如抗癌药所造成的细胞氧化应激,是由于其水溶性的具有氧化作用的残基引起的。在培养细胞中加入复合抗氧化剂(AO)后,与对照组相比,在 G_2 期呈现一定抑制作用($P < 0.05$) (表 3)。

以上研究结果提示,在本实验条件下复合氧化剂(CHP + H_2O_2) 和 Vit A 对肿瘤细胞 DNA 合成前期(G_1 期)细胞内的氧化损伤信号分子 NO 作用显著; H_2O_2 与复合抗氧化剂(Vit A + Vit E + Se) 作用于 DNA 合成后期(G_2 期)的肿瘤细胞后,细胞氧化损伤的终产物 MDA 明显改变。氧化剂与抗氧化剂对细胞膜损伤(T-carbonyl)的影响存在于整个细胞周期,并未发现敏感时相。本实验为更深入地探讨肿瘤细胞代谢和外来化合物的作用机制,同时为研究抗癌药物与抗氧化药物的合理应用提供了依据。

参考文献:

[1] 海春旭,雷建军,梁欣. 活性氧对细胞增殖、凋亡及损伤作用的剂量效应关系研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2001,

- 13(4):275.
 [2] Beck HP. A new analytical method for determining duration of phases, rate of DNA synthesis and degree of synchronization from flow-cytometric data on synchronized cell populations [J]. *Cell Tissue Kinet*, 1978, 11(2): 139-148.
 [3] Segre AL, Benedetto A, Eremenko T, et al. An electron paramagnetic resonance study of free radicals in cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 497(2):615-621.
 [4] 海春旭. 抗氧化剂、抗衰老与疾病控制的研究进展 [J]. 疾病控制杂志, 2002, 6(4): 289-293.
 [5] Menon SG, Sarsour EH, Spitz DR, et al. Redox regulation of the G_1 to S phases transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9):2109-2117.
 [6] Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(5):915-22.
 [7] Roberts MJ, Wondrak GT, Laurean DC, et al. DNA damage by carbonyl stress in human skin cells [J]. *Mutat Res*, 2003, 522(1-2):45-56.
 [8] Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma [J]. *Biochem Med*, 1976, 15(2):212-216.

(上接第 398 页)

5. 观察细胞数

观察细胞数应根据被检物质诱发 MN 形成的作用强度、假阳性率的出现频率的程度等来决定。MNT 用作化合物毒理安全性评价时,一只动物一般应观察 1000~2000 个 PCE 细胞。

6. 给药剂量

一般来说在化合物毒性评价中,量效反应关系的研究十分重要,因此用药剂量组设置应考虑这一因素。在决定所给药物如何设置剂量组别时,可根据实验目的,采用等差或等比方法分组,选择恰当的公差或公比数。诱发 MN 形成作用的效应,常出现于狭小剂量范围内,如果公比数设置为 10 而决定给药剂量组别,诱发 MN 形成的效应很可能落在被检化合物的受试剂量范围之外,因而有检测不出被检化合物的诱发 MN 形成作用抑或观察不到量效反应关系。一般来说,选用公比数为 2 的等比数量组给药,设置 3 或 4 个用药剂量组比较合适。

在被检化合物 MN 形成实验中,应充分考虑的最重要因素是给药剂量及组别设定。作为急性短期实验考虑时,最大耐受剂量的给药实验是十分必要的,多数化合物诱发 MN 形成的效应,出现在接近该化合物的致死剂量附近。以骨髓为观察靶器官的红细胞 MN 诱发试验,应该使用尽可能大的最大耐受剂量,动物的最大耐受剂量常与用药途径有关。以 LD_{50} 值为例,相同实验条件下不同给药途径的同一化合物的 LD_{50} 值是有差别的,选择被检化合物的最大耐受剂量时应考虑这一因素,尽可能地参照文献资料的数据。

当然,也会有例外发生,有些被检化合物确在远远低于最大耐受量的剂量水平即表现出诱发 MN 形成的效应,在实际工作中,被检化合物的用药剂量与组别设置均应根据预试验来决定。

7. 对照组

MNT 应设置阴性对照与阳性对照组,这两个对照组的设置,对检验所用实验动物是否符合要求、被检化合物用药剂量是否适当、标本制备是否达到要求等实验技术问题,是十分重要的。此外,文献报道实验动物饲养环境的变化也可诱发 MN 出现,因此必要时可考虑设置实验对照组。

阴性对照组给予被检化合物配制的溶媒剂,阴性对照组 PCE 的 MN 出现频率在不同品系的动物都应在 0.2% 左右。阳性对照组动物给予已知的阳性诱发 MN 形成的诱变剂,阳性对照的设置,对于检验实验方法的灵敏度、用药剂量与途径是否合适、标本制作是否符合要求等实验技术问题,是必不可缺少的。

(下转第 415 页)