

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2007)03-0205-03

实验研究

山冈藁吾碱对 HEK293 细胞谷胱甘肽含量及相关酶活力的影响

季莉莉¹, 陈莹^{1,2}, 王峥涛^{1,2}

(1. 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203; 2. 中国药科大学生药研究室)

关键词: 吡咯里西啶生物碱; 山冈藁吾碱 (clivorine); 谷胱甘肽 (GSH); 谷胱甘肽硫转移酶 (GST); 谷胱甘肽还原酶 (GR)

吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 是一类天然的植物性毒素, 广泛存在于 6 000 多种高等植物中^[1]。山冈藁吾碱 (clivorine) 是从菊科藁吾属药用植物鹿蹄藁吾 (*Ligularia hodgsonii*) 中分离得到的 otonecine 型吡咯里西啶生物碱, 藁吾属部分药用植物的根及根茎在民间习称为山紫菀或川紫菀, 常用来代替紫菀 (*Radix Asteris*), 治疗咳嗽、肝炎和其他炎症, 并收入四川、云南等省的地方标准。我们前期的研究已对 clivorine 的肝细胞毒性及其机制进行了初步的探讨^[2-4], 同时我们已经发现 clivorine 对人胚肾 HEK293 细胞有明显的毒性^[3], 然而其毒性机制并不十分明确。谷胱甘肽 (GSH) 被认为是细胞内最重要的抗氧化剂, 本实验主要观察 clivorine 对 HEK293 细胞内 GSH、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量及其 GSH/GSSG 比值的影响, 对 GSH 相关的谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 酶活力的影响, 从而探讨 GSH 及其相关酶在 clivorine 所致的肾细胞毒性过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 HEK293 细胞 (American Type Culture Collection, ATCC), GSH 和 GSSG 检测试剂盒 (江苏碧云天), GST 酶活力测定试剂盒 (南京建成), Spectramax190 酶标仪 (Molecular Device), 其余试剂为美国 Sigma 公司产品。

1.2 细胞培养 HEK293 细胞培养于含体积分数为 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中, 常规加入青霉素 (100 KU/L) 与链霉素 (100 KU/L), 37℃, 恒温培养。

1.3 GSH、GSSG 含量及 GSH/GSSG 的测定 HEK293 细胞按 10⁶ 个每盘铺入 60 mm 培养皿中, 12 h 后待细

胞贴壁生长状态良好时加入 clivorine (100 μmol/L) 作用 48 h, 或加入不同浓度的 clivorine 作用 48 h, 严格按照试剂盒说明书中的方法收下细胞、测定 GSH、GSSG 含量, 并计算 GSH/GSSG 的比值。

1.4 GST 酶活力测定 HEK293 细胞按 3 × 10⁶ 个每盘铺入 100 mm 培养皿中, 12 h 后待细胞贴壁生长状态良好时加入 clivorine (100 μmol/L) 作用 48 h, 然后将细胞裂解于冰冷的细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 液氮和 37℃ 反复冻融 2 次, 10 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 取上清, 以小牛血清白蛋白 (BSA) 为标准用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 按试剂盒方法测定并计算 GST 酶活力。

1.5 GR 酶活力测定 GR 酶活力测定采用 Carlberg 和 Mannervik^[5] 改良的还原型辅酶 (NADPH) 法。将正常细胞和 clivorine 孵育 48 h 后的细胞溶于细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 液氮和 37℃ 反复冻融 2 次, 10 000 r/min, 4℃, 离心 10 min, 取上清测定酶活力, 反应体系由磷酸钾缓冲液 (125 mmol/L, pH7.3)、乙二胺四乙酸 (EDTA) (0.25 mmol/L)、GSSG (1 mmol/L)、NADPH (0.1 mmol/L) 和上清样品组成, 并以裂解液为样品对照, 混匀后测定 340 nm 处的吸光度 (A) 值, 以 BSA 为标准用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。GR 酶活力计算如下: GR_{活力} = [(A_{340/min} (样本) - A_{340/min} (空白)) × 稀释倍数] / [0.00622 × 蛋白浓度 (g/L)]

1.6 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 *t* 检验检测各组间的差异。

2 结果

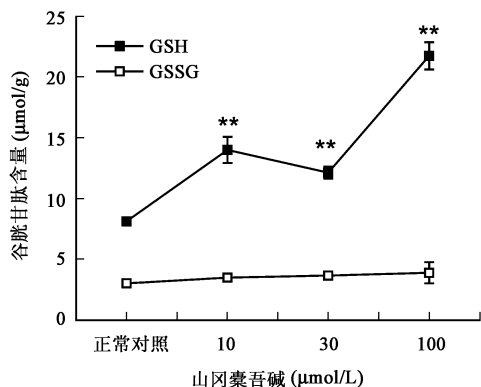
2.1 clivorine 对 HEK293 细胞内 GSH、GSSG 含量的影响 不同浓度的 clivorine 与 HEK293 细胞孵育 48 h 后, 细胞内 GSH 含量随 clivorine 浓度的增加而明显增加, GSSG 的含量略有增加, 并不十分明显 (图 1)。

2.2 clivorine 对 HEK293 细胞内 GSH/GSSG 的影响 由图 2 可见, GSH/GSSG 的比值随着 clivorine 浓度的增加而增加。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30530840)

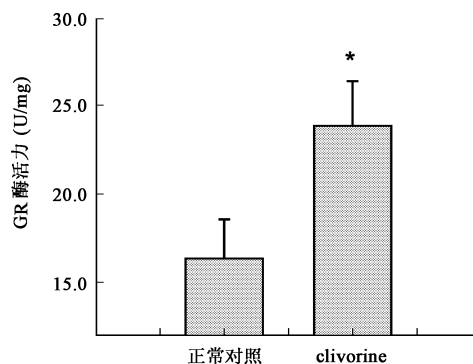
作者简介: 季莉莉, 助理研究员, 研究方向: 中药药理与毒理学。

通讯作者: 王峥涛, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药活性成分和质量标准的研究。



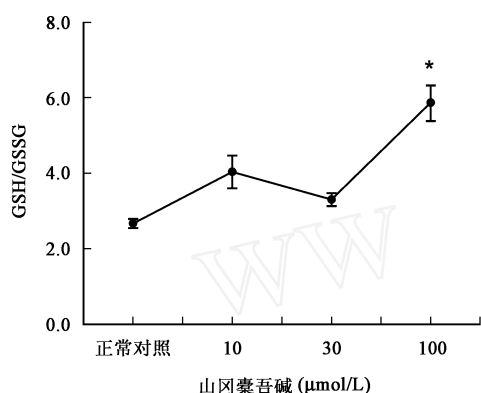
与正常对照比较, ** $P < 0.01$

图 1 山冈藜吾碱对 GSH、GSSG 含量的影响



与正常对照组比较, * $P < 0.05$

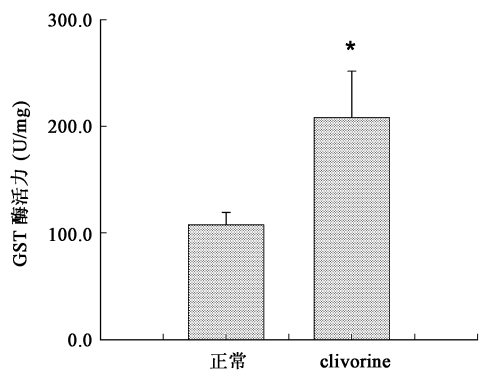
图 3(b) 山冈藜吾碱对 GR 酶活力的影响



与正常对照比较, * $P < 0.05$

图 2 山冈藜吾碱对 GSH/GSSG 的影响

2.3 clivorine 对 HEK293 细胞内 GST 和 GR 酶活力的影响 GST 和 GSH-Rx, GR 在调节细胞内 GSH 含量的过程中起重要作用,从图 3a 和 3b 可见 clivorine (100 μmol/L) 与 HEK293 细胞孵育 48 h 后,细胞内 GST 和 GR 酶活力明显增加(图 3a, b)。



与正常对照组比较, * $P < 0.05$

图 3(a) 山冈藜吾碱对 GST 酶活力的影响

3 讨论

还原型 GSH 是广泛存在于细胞内的小分子三肽化合物,具有维持细胞蛋白质结构和功能、抑制细胞凋亡等方面发挥着重要作用^[6],缺乏或耗竭 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用或加重其中毒作用,因而 GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。GSSG 为 GSH 的氧化形式,在氧化剂作用下 GSH 通过 GSH-Px 氧化成 GSSG, GSSG 的量一般占总 GSH 量的 1% ~ 10%^[7]。本研究结果显示 clivorine 处理 HEK293 细胞后,细胞内 GSH 含量明显增加,相应 GSH/GSSG 的比例也增加,暗示 GSH 抗氧化系统参与了吡咯里西啶生物碱 clivorine 的 HEK293 细胞毒性作用。

GST 可以催化 GSH 与药物的毒性代谢产物结合,清除细胞内自由基,减轻药物的细胞毒性;还可通过氧化还原反应而降低毒物过氧化的能力,使含巯基酶免于被重金属和氧化剂激活或使已氧化的含巯基酶还原而使其恢复活力。GSSG 通过 NADPH 供氢,在 GSH-Rx, GR 作用下又还原成 GSH,二者构成一动态平衡水平^[7],从而构成一有效的抗氧化系统。图 3 的实验结果表明用 clivorine 处理 HEK293 细胞 48 h 后,细胞内 GST 和 GR 酶活力都有一定程度的增加,其活力的增加可能与其参与调节细胞内 GSH 和 GSSG 的含量有关。

细胞内 GSH 含量的增加被发现同许多物质诱导的细胞癌变有密切的关系,如 DMBA、NDEA 加四氯化碳等诱导的细胞癌变^[8-9];在许多肝癌或其他癌变组织中 GSH 含量也明显增加^[10-13]。早期已有实验报道发现 clivorine 具有致癌、致突变的毒性作用^[14-16],本实验结果提示 GSH 含量及其相关酶活力的增加可能有助于拮抗 clivorine 的细胞毒性,而长期刺激造成 GSH 含

量的增加又可能与 clivorine 的致癌作用有关,其具体的调节机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Stegelmeier BL, Edgar JA, Colegate M, et al. Pyrrolizidine alkaloids plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins*, 1999, 8:95-116.
- [2] Ji LL, Tan AM, Tang J, et al. Toxicity of several pyrrolizidine alkaloids on hepatocytes. *Chin J Nat Med (中国天然药物)*, 2004, 2:239-241.
- [3] Ji LL, Zhao XG, Chen L, et al. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells. *Toxicol*, 2002, 40: 1685-1690.
- [4] Ji LL, Zhang M, Sheng YC, et al. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induces apoptosis in human normal liver L-02 cells and reduces the expression of p53 protein. *Toxicol in Vitro*, 2005, 19: 41-46.
- [5] Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, 1985, 11:3448-3490.
- [6] Richie JP Jr, Skowronski L, Abraham P, et al. Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clin Chem*, 1996, 42:64-70.
- [7] Elliott SJ, Koliwad SK. Redox control of ion channel activity in vascular endothelial cells by glutathione. *Microcirculation*, 1997, 36: 341-347.
- [8] Dakshayani KB, Subramanian P, Manivasagam T, et al. Melatonin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2005, 8: 316-321.
- [9] Balasenthil S, Saroja M, Ramachandran CR, et al. Of humans and hamsters: comparative analysis of lipid peroxidation, glutathione, and glutathione-dependent enzymes during oral carcinogenesis. *Brit J Oral Max Surg*, 2000, 38: 267-270.
- [10] Huang Z, Chen C, Zeng Z, et al. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J*, 2001, 15: 19-21.
- [11] Ferruzzi E, Franceschini R, Cazzolato G, et al. Blood glutathione as a surrogate marker of cancer tissue glutathione-S-transferase activity in non-small cell lung cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*, 2003, 39: 1019-1029.
- [12] Zhang L, Mock D. Alteration in glutathione level during carcinogenesis of hamster buccal pouch mucosa. *J Dent Res*, 1991, 70:1061-1063.
- [13] Yu LP, You YR, Yen P, et al. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Res*, 1997, 57:1468-1474.
- [14] Mori H, Sugie S, Yoshimi N, et al. Genotoxicity of a variety of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Cancer Res*, 1985, 45: 3125-3129.
- [15] Kuhara K, Takanashi H, Hirono I, et al. Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Ligularia Dentata*. *Cancer Lett*, 1980, 10: 117-122.
- [16] Yamanaka H, Nagao M, Sugimura T, et al. Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella/mammalian-microsome test. *Mutat Res*, 1979, 68:211-216.

(收稿日期:2006-12-10)

中图分类号:Q-33 文献标识码:A 文章编号:1002-3127(2007)03-0207-03

实验研究 ·

两种方法检测 TETA 与卡铂联用对肿瘤细胞作用的比较

郭莉霞¹, 刘建辉, 陈刚, 邓小红

(重庆工商大学药物化学与化学生物学研究中心, 重庆 400067)

关键词: 硫化罗丹明法; 四甲基偶氮唑蓝法; 三乙烯四胺; 卡铂; 联用

检测药物对肿瘤细胞作用活性的方法是抗肿瘤药

物筛选的基本途径。四甲基偶氮唑蓝(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) 2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT)在不含酚红的培养液中溶解后呈黄色。活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能将 MTT 黄色溶液还原为紫

基金项目:重庆市科委重点项目(CSTC, 2005BA5023)

作者简介:郭莉霞, 助理研究员, 研究方向:细胞生物学及药物化学。