

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2006)03-0181-02

· 实验研究 ·

谷胱甘肽对香烟烟雾作用大鼠淋巴细胞氧化应激的影响

刘珊¹, 孙贵范², 宛超³, 徐海滨¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021;

2. 中国医科大学公共卫生学院; 3. 国家食品药品监督管理局保健食品审评中心)

关键词: 谷胱甘肽; 香烟烟雾; 氧化损伤

谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽类巯基物质, 以 2 种形式存在: 还原型(GSH)和氧化型(GSSG)。GSH 与许多重要的生物学现象, 如基因表达调控 DNA 生物合成、酶活力和代谢调节、免疫功能调节代谢等密切相关, 作为细胞内重要的抗氧化剂和解毒剂, 对保护细胞、延缓衰老有重要作用, 广泛应用于多种疾病的治疗。人群流行病学调查发现吸烟者血浆、肺组织 GSH 水平下降^[1-2], 而戒烟 3 周后血浆 GSH 水平显著回升^[3], GSH 水平的变化被认为是吸烟导致损伤的一个重要机制^[4]。本研究用 GSH 预处理大鼠淋巴细胞后, 再以水溶性香烟烟雾溶液染毒, 观察细胞活力及氧化应激指标的变化情况, 了解 GSH 在吸烟相关氧化应激中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 市售香烟, 谷胱甘肽(日本和光纯药工业株式会社), Alamar Blue (Trek Diagnostic Systems, Inc), 2, 7-二乙酰二氯荧光素(美国 Sigma), DYY-6B 型稳压稳流电泳仪, NIKON 荧光显微镜, F-2500 荧光分光光度计(日本 Hitachi)等。

1.2 淋巴细胞制备 Wistar 雄性大鼠, 体重(200±20)g, 由中国医科大学实验动物部提供。无菌采血并分离大鼠淋巴细胞。

1.3 水溶性香烟烟雾溶液(CSS)制备 用 2 个串联的大包氏管各装 5 ml 磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.2)作为吸收液, 2 s 内抽吸 35 ml 主流烟雾, 间歇 58 s 后再吸, 制成 0.2 支/ml 的香烟烟雾溶液, 立即作用于细胞。

1.4 细胞预处理和染毒 用 GSH 预处理细胞(检测细胞活力时 GSH 质量浓度为 0.5 和 1 mmol/L, 选择提高细胞活力效果较好的质量浓度 1 mmol/L 作用于细胞检测其他指标), 37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 孵育

2 h。用新制备的 CSS 以 8×10^{-3} 支/ml 染毒细胞, 继续孵育 2 h。

1.5 细胞活力的测定 以 RPMI 1640 为培养液, 调节细胞至 3×10^6 /ml。收集并洗涤处理后的细胞, 加入体积分数为 10%的 Alamar Blue 继续孵育 4 h。用酶标仪分别于 540 和 620 nm 测定吸光度值, 并计算还原率。

1.6 活性氧群(ROS)测定 荧光分光光度计激发光 485 nm、狭缝 5 nm, 发射光 530 nm、狭缝 10 nm, 测定各组细胞的二氯荧光素(DCF)荧光强度。

1.7 彗星试验 制备三明治细胞夹层后, 经裂解、解旋、电泳、中和等过程, 溴化乙锭染色, 荧光显微镜绿光激发, 测定细胞头长及全长, 计算尾长。

1.8 超氧化物歧化酶(SOD)活力及脂质过氧化物(LPO)水平测定 Nitrite 法测定 SOD 活力, TBA 荧光法测定 LPO。考马斯亮蓝 G 250 测定蛋白质水平校正 SOD 及 LPO 值。

1.9 统计学方法 对细胞活力、ROS 水平、SOD 活力和 LPO 水平进行单因素方差分析, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。彗星实验结果用 *t* 检验。

2 结果

2.1 GSH 对 CSS 作用细胞活力的影响 经 0、0.5、1 mmol/L 3 个剂量 GSH 预处理, 0 或 8×10^{-3} 支/ml CSS 染毒的 6 组细胞活力见图 1。无 CSS 作用时, 1 mmol/L GSH 组细胞活力增加显著。CSS 作用使细胞活力显著下降, 而 0.5 和 1 mmol/L GSH 预处理使 CSS 作用组细胞活力显著增加, 接近对照组。

2.2 GSH 对 CSS 作用细胞内 ROS 水平的影响(图 2)

GSH 组只经 1 mmol/L GSH 处理, CSS 组只经过 8×10^{-3} 支/ml 香烟烟雾溶液处理, GSH + CSS 组在 1 mmol/L GSH 预处理后又施加 8×10^{-3} 支/ml 香烟烟雾溶液, 对照组未经任何处理。用有细胞组 DCF 荧光强度值减去相应无细胞组, 对结果进行方差分析, GSH 和 GSH + CSS 组之间差异无显著性, 其余任何 2 组之

作者简介: 刘珊, 博士, 研究方向: 吸烟与氧化应激, 食品毒理学。

通讯作者: 孙贵范, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品毒理学。

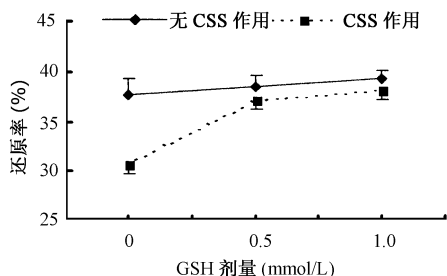


图 1 GSH 对 CSS 细胞 Alamar Blue 还原率的影响

间差异均有显著性。

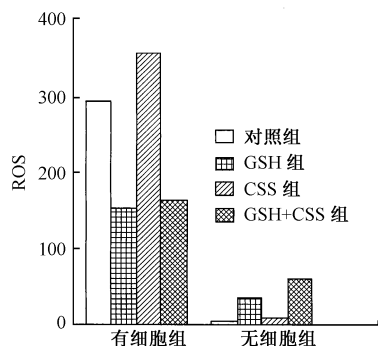


图 2 GSH 对 CSS 作用 ROS 生成的干预作用

2.3 GSH 对 CSS 作用细胞 DNA 损伤的影响 (表 1)

CSS 组彗星细胞尾长显著大于其他 3 组, GSH+CSS 组显著大于对照组, GSH 组与对照组相比, 差异无显著性。

表 1 GSH 对 CSS 所致细胞彗星尾长改变的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	拖尾级别					尾长 (μm)
		0	I	II	III	IV	
GSH 组	50	24	26	0	0	0	1.98 ± 2.21^b
CSS 组	50	8	1	7	16	18	14.76 ± 7.94^a
GSH+CSS 组	50	17	8	7	15	3	$8.22 \pm 7.55^{a,b}$
对照组	50	34	5	10	1	0	2.32 ± 3.86^b

与对照组比较, $^a P < 0.05$ 与 CSS 组比较, $^b P < 0.05$ 。

2.4 GSH 对 CSS 作用细胞 SOD 活力及 LPO 水平影响 (表 2)

经方差分析, CSS 组 SOD 活力显著低于对照组, GSH 组显著高于对照组, CSS+GSH 组与对照组相比, 差异无显著性。CSS 组细胞内 LPO 水平显著高于其他 3 组, GSH 组和 GSH+CSS 组显著低于对照组, 见表 2。

表 2 GSH 对 CSS 作用细胞内 SOD 活力及 LPO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	SOD (NU/mgPr)	LPO (nmol/mgPr)
GSH 组	6	$11.73 \pm 1.11^{a,b}$	$0.36 \pm 0.18^{a,b}$
CSS 组	6	7.70 ± 0.86^a	1.41 ± 0.37^a
CSS+GSH 组	6	11.21 ± 0.44^b	$0.47 \pm 0.02^{a,b}$
对照组	6	10.05 ± 1.01^b	0.84 ± 0.29^b

与对照组比较, $^a P < 0.05$ 与 CSS 组比较, $^b P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究中, 1 mmol/L 的 GSH 能显著提高正常细胞的活力, 0.5 和 1 mmol/L GSH 均能有效拮抗 CSS 引起的细胞活力下降, 在进一步实验时选择 1 mmol/L 作为 GSH 的干预剂量。

GSH 显著降低正常细胞和 CSS 作用细胞内 ROS 水平, GSH 作为供氢体参与 GSHPx 催化的过氧化物还原反应, GSH 还有直接清除 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 和 $^1\text{O}_2$ 的能力。 $\cdot\text{OH}$ 可以部分地解释 ROS 下降的现象。本研究中 GSH 使正常细胞内 SOD 活力增加, 并能使 CSS 作用细胞 SOD 活力达到正常水平, 可能与 GSH 的活力巯基保护酶蛋白活力位点免受自由基损伤有关, GSH 是否在表达水平使 SOD 增加需要进一步研究确定。此外, 本研究中 GSH 引起的 ROS 水平下降和 SOD 活力增加可能互为因果, 一方面 SOD 清除自由基能力增强降低了 ROS 水平; 另一方面, ROS 水平的降低减轻其对 SOD 的损伤。

香烟烟雾中有许多直接或间接致癌物, 本身或在细胞内代谢活化后具有亲电子性, GSH 能在解毒酶谷胱甘肽硫转移酶作用下与亲电子物质结合, 阻断其对 DNA 的损伤, 这是 GSH 干预减轻 CSS 作用细胞 DNA 损伤的一个重要原因。GSH 直接或间接清除自由基减少其对 DNA 的攻击也是保护 DNA 的重要机制之一。本研究中 GSH 降低正常细胞和 CSS 作用细胞脂质过氧化的作用也很明确, 这与 ROS 水平下降和 SOD 活力增强是一致的。表明 GSH 对脂质和 DNA 都能提供有效的保护作用。针对吸烟者 GSH 水平下降的现象, 本研究结果提示, 适量的补充 GSH 可能会减轻吸烟导致的损伤。

本研究中 1 mmol/L GSH 能提高大鼠淋巴细胞活力, 清除细胞内自由基, 增强 SOD 活力, 减轻脂质过氧化和 DNA 损伤, 拮抗 CSS 的损伤作用。为吸烟危害的预防提供了可行方法。

参考文献:

- [1] Moriarty SE, Shah JH, Lynn M, et al. Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. Free Radic Biol Med. 2003; 35: 1582-1588.
- [2] Rahman I, Li XY, Donaldson K, et al. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. Am J Physiol. 1995; 269: 1285-292.
- [3] Lane JD, Opara EC, Rose JE, et al. Quitting smoking raises whole blood glutathione. Physiol Behav. 1996; 60: 1379-1381.
- [4] Manzanana A, Mehlhorn RJ. Loss of glutathione, ascorbate recycling, and free radical scavenging in human erythrocytes exposed to filtered cigarette smoke. Arch Biochem Biophys. 1998; 350: 169-182.

(收稿日期: 2005-12-20)