

外源性还原型谷胱甘肽对亚砷酸钠诱导遗传毒性及氧化应激的保护作用

陈承志 蒋学君 张遵真¹

四川大学华西公共卫生学院环境卫生学教研室, 成都 610041

摘要: 目的 探讨外源性还原型谷胱甘肽(GSH)能否拮抗亚砷酸钠(NaAsO_2)诱导的遗传毒性及氧化损伤。方法 以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象,按处理方式分为对照组、单独 NaAsO_2 或 GSH 处理组及不同浓度 GSH 和 NaAsO_2 联合组,观察 GSH 处理对细胞存活、氧化应激水平、DNA 单链断裂及染色体损伤的影响。结果 NaAsO_2 单独染毒处理可导致细胞存活率、集落形成率、SOD 酶活性和 GSH 含量低于对照组,而 ROS 水平、彗星率、Oliver 尾距和微核细胞率较对照组增加($P < 0.05$)。GSH 浓度为 0.5 ~ 5 mmol/L 时,联合处理组与单独 NaAsO_2 处理组比较上述各项检测指标差异无显著性;而当 GSH 剂量为 10 和 20 mmol/L 时, NaAsO_2 处理产生的毒性作用虽有所改善,却仍显著低于对照组($P < 0.05$);随着 GSH 剂量水平的增加,在 GSH 为 40 或 50 mmol/L 时,细胞存活、集落形成、氧化应激水平及 DNA 和染色体损伤情况与对照组比较差异已无显著性。结论 外源性添加高浓度的 GSH 能够显著减弱 NaAsO_2 的细胞毒性,减轻 DNA、染色体损伤及氧化应激水平。

关键词: 亚砷酸钠 谷胱甘肽 DNA 损伤 染色体断裂 氧化应激

中图分类号: R994.6 R734.2 Q517

文献标志码: A

Protective effects of exogenous reduced glutathione on sodium arsenite-induced genotoxicity and oxidative stress

CHEN Chengzhi, JIANG Xuejun, ZHANG Zunzhen

Department of Environmental Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To explore the protective effects of exogenous reduced glutathione (GSH) on the genotoxicity and oxidative stress induced by sodium arsenite (NaAsO_2). **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 cells were divided into several groups according to the treatments as follow: untreated group, single NaAsO_2 or GSH treated group and the groups co-treated with NaAsO_2 and different concentrations of GSH. Then the differences of cell viability, level of oxidative stress, DNA and chromosomal damage were compared after single or combined treatments. **Results** The rate of cell survival and colony formation, the contents of GSH and the activity of SOD in NaAsO_2 treated group were significantly lower than the non-treated group, whereas, the level of ROS, comet rate, OTM and the frequency of micronucleus in NaAsO_2 treated group were significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). At the 0.5 - 5

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81172632)

作者简介: 陈承志,男,博士研究生,研究方向: 环境毒理学, E-mail: spencerchen@foxmail.com

1 通信作者: 张遵真,女,教授,研究方向: 环境毒理学, E-mail: zhangzunzhen@163.com

mmol/L concentrations of GSH, these indicators of the co-treatment groups did not show any significant difference when compared with single NaAsO₂-treated group. However, at the 10 mmol/L and 20 mmol/L concentrations of GSH, the NaAsO₂-induced toxic effects were found to be weakened by GSH, but it was still significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Moreover, there was no significant difference among co-treated groups and control group on the cell viability, colony formation, level of oxidative stress and DNA and chromosomal damage at the 40 or 50 mmol/L of GSH. **Conclusion** High concentrations of exogenous GSH can significantly decrease the cytotoxicity of NaAsO₂, and alleviate DNA and chromosomal damage and the level of oxidative stress.

Key words: sodium arsenite, glutathione, DNA injury, chromosomal breakage, oxidative stress

砷及其化合物是国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 确认的人类致癌物,可引起皮肤、膀胱、肺脏和肝脏等多器官肿瘤。作为三价无机砷中最为主要的一种砷化物,亚砷酸钠(NaAsO₂)因广泛分布于水和土壤中而备受关注,也是饮水型砷中毒的重要元凶^[1]。因此,寻求合理、有效和经济的 NaAsO₂ 毒性拮抗剂,为制定预防砷中毒策略提供科学依据已迫在眉睫。还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)是机体重要的含巯基(-SH)非酶性抗氧化物,它可清除 O₂⁻、H₂O₂、·OH 等自由基,保护细胞内含-SH 酶或蛋白质免受外源性氧化剂的损害。GSH 的缺乏或耗竭均会加剧多种化学物质或有害环境因素的毒性作用,增加氧化损伤^[2]。由于-SH 易被氧化或交联,是 NaAsO₂ 细胞内毒性产生的主要方式,因而含有-SH 基团的蛋白质如 GSH 极可能是 NaAsO₂ 毒作用的主要靶分子。已有多项研究表明,胞内 GSH 含量可作为预测砷剂敏感性的指标,并参与促进砷的甲基化代谢,加速体内 NaAsO₂ 的排泄^[2-3]。然而有趣的是,NaAsO₂ 对胞内 GSH 含量的影响可因染毒剂量、作用时间和受试对象的不同而呈现截然相反的效应^[1,4],且胞外添加 GSH 能否拮抗 NaAsO₂ 的毒性目前尚不十分清楚。由于既往研究发现砷化物暴露不仅是导致职业工人肺癌的危险因素,也与普通人群的肺癌发病率存在显著的剂量-效应关系^[5-6],因此本研究以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象,检测在 NaAsO₂ 染毒情况下,不同浓度 GSH 联合处理对细胞生长存活能力、氧化应激水平以及 DNA 和染色体损伤状况的影响,拟为揭示 GSH 拮抗砷剂毒性机制及进一步用于砷中毒的预防提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

L-还原型谷胱甘肽,日本 kyowa; 亚砷酸钠(NaAsO₂),瑞士 Fluka,纯度 ≥ 99.0%; 活性氧(ROS)试剂盒,北京普利莱; 超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒,南京建成; 吉姆萨,美国 Chroma; 吖啶橙,美国 Sigma; 高糖 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 细胞培养液,美国 Gibco; 溴化乙锭(EB)、正常及低熔点琼脂糖(NMPA/LMPA)、5,5-二硫代二硝基苯甲酸(5,5-dithiobis-2-nitro-benzoic acid, DTNB)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]均购于美国 Amresco; WJ 7200 型紫外分光光度计,上海尤尼柯; 荧光倒置显微镜,德国 Leica; Medol 550 型酶联免疫检测仪,美国 Bio-Rad。其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞购于华神集团成都基因治疗肿瘤药物工程技术研究中心,细胞采用开放式单层贴壁培养。培养条件:饱和湿度、5% CO₂、37 °C,每 2 天传代一次。培养液组成:90% DMEM + 10% 新生小牛血清 + 双抗(终浓度:青霉素 100 IU/ml,链霉素 100 μg/ml)。

1.3 四氮唑盐比色(MTT)实验

取生长良好且处于对数生长期的细胞,制成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液,并按 200 μl/孔的量接种于标准 96 孔培养板。待细胞贴壁后,分别予以单独 50 mmol/L GSH,30 μmol/L NaAsO₂,以及 30 μmol/L NaAsO₂ 联合不同浓度(0.5、1、2.5、5、10、20、40 和 50 mmol/L) GSH 处理。各处理浓度设置 12 个平行复孔。处理 24 h 后,弃去培养液, PBS 液洗涤细胞,每孔中加入 100 μl 含 MTT 浓度为 0.5 mg/ml 的培养液,避光 37 °C 孵育 4 h,弃去

含 MTT 培养液,每孔中加入 100 μl 二甲亚砜,室温混匀 2 min,充分溶解蓝紫色结晶甲瓚。以二甲亚砜孔调零,酶标仪测定 570 nm 波长的吸光度值(A_{570})。按照公式:细胞存活率(%) = 处理孔 A_{570} /未处理孔 $A_{570} \times 100\%$,计算细胞存活率,实验独立重复 3 次。

1.4 集落形成实验

将处于对数生长期的细胞以 200 个/孔的量接种于 24 孔培养板中。细胞贴壁后,分别给予 GSH 及 NaAsO_2 单独处理及不同浓度 GSH 和 NaAsO_2 联合处理,浓度设置与 MTT 实验相同,每个处理设 3 个平行。处理 24 h 后,弃去培养液, PBS 清洗 3 次,继续加入新鲜培养液,连续培养 10 天,弃培养液,甲醇固定后 10% Gimesa 染色 15 min。镜下计数不同处理方式下集落数(由 50 个及以上细胞所形成的细胞团视为 1 个集落),按照集落形成率(%) = (集落数/接种细胞数) $\times 100\%$,计算集落形成率。

1.5 氧化应激指标检测

1.5.1 细胞内 ROS 水平测定 取生长良好的细胞,计数后按每孔 10^6 个细胞接种于放置有盖玻片(24 mm \times 24 mm)的 6 孔培养板中,分别予以单独及联合 GSH 和 NaAsO_2 处理。干预结束前 1 h,每孔中加入 1 μl 荧光探针二氧荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA, 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$),混合后继续培养,1h 后弃去培养液,用 PBS 洗涤 3 次,以充分除去未进入细胞内的 DCFH-DA。随后取出玻片并置于载玻片上,荧光显微镜下观察、拍摄。ROS 含量采用 Image-Pro[®] Plus 6.0 图像分析软件进行分析并计算,并以平均光密度值(average optical density, AOD)表示。

1.5.2 细胞内 GSH 含量测定 取对数生长期细胞,以 10^6 /孔的密度接种于 6 孔培养板中培养,待细胞贴壁后,分别予以单独及联合 GSH 和 NaAsO_2 处理。处理 24 h 后,弃去原培养液, PBS 清洗细胞 3 次,用 0.25% (W/V) 胰酶收集细胞,以 2000 r/min 的转速离心细胞悬液 3 min,随后向细胞沉淀中加入 100 μl 细胞裂解液[0.05 mmol/L EDTA, 1% Triton-X100 (V/V), pH8.0],混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h,3000 r/min 离心 5 min。取上清液,加入 1.9 ml 新鲜配制磷酸氢二钠和 0.5 ml 0.004% DTNB,在紫外分光光度计 420 nm 波长下测定吸光度值,以 GSH 标准曲线计算 GSH 含量值并用细胞蛋白含量进行校正。蛋白浓度测定

方式采用考马斯亮蓝法。

1.5.3 细胞内总 SOD 活性检测 取生长状态良好细胞,以 10^6 /孔的密度接种于 6 孔培养板中,待细胞贴壁后,分别给予单独及联合 GSH 和 NaAsO_2 处理 24 h。收集细胞,并加入细胞裂解液(配方同 GSH 测定)4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h,3000 r/min 离心 5 min。测定方法严格按照试剂盒说明进行。取上清液进行总 SOD 活性检测,紫外分光光度计 550 nm 波长下测定吸光度值,并用细胞蛋白含量校正。

1.6 彗星实验检测细胞 DNA 损伤

将生长良好且处于对数生长期的细胞以 10^5 /孔的密度接种于 24 孔培养板中,待细胞贴壁后分别予以单独及联合 GSH 和 NaAsO_2 处理,孵育 24 h,并在处理结束后用台盼蓝染色法确认细胞存活率,以存活率 > 70% 为标准,进行后续实验。彗星实验的详细操作步骤按照文献[7]的方法进行制片、裂解、解旋和电泳。荧光显微镜 200 倍放大倍数下观察,每张片子随机计数 200 个细胞,按照公式:彗星率 = 彗星细胞数/计数细胞数(200 个细胞) $\times 100\%$,计算彗星率,并利用彗星图像分析软件 CASP 计算 50 个彗星细胞的 Oliver 尾距。

1.7 微核实验检测细胞染色体损伤

生长良好的细胞,胰酶消化后调整细胞密度为 10^6 /ml,每孔 1 ml 细胞悬液,接种 6 孔培养板中培养。细胞贴壁后用单独及联合的 GSH 和 NaAsO_2 处理 24 h,收集细胞,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,向细胞沉淀中加入 0.075 mol/L 的氯化钾 2.5 ml,静置 5 min 后立即加入甲醇冰乙酸(3:1, V/V)混合固定液 2.5 ml,重复固定 3 次。然后用 1% (V/V) 甲醇冰乙酸溶液重悬细胞,滴于预先冰冻的玻片上,室温晾干,吖啶橙(40 $\mu\text{g/ml}$)染色,荧光显微镜 400 倍下观察结果,随机计数 1000 个细胞并计数含有微核的细胞个数,按公式计算微核细胞率。微核细胞率(‰) = (含有微核的细胞个数/1000) $\times 1000\%$ 。

1.8 统计学方法

所有实验均独立重复 3 次,且所有数据均采用均数 \pm 标准差表示,数据均采用 SPSS 17.0 统计软件分析,并进行方差齐性和正态性检验。若方差齐,多组间的比较采用单因素 ANOVA 分析,组间的两两比较应用 LSD- t 检验;方差不齐时则采用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSH 对 NaAsO₂ 作用下细胞存活率和集落形成的影响

由表 1 可见,与对照组相比,30 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 单独染毒处理可导致细胞存活率和集落形成率明显降低($P < 0.05$),而单独 GSH 处理则对细胞存活率、集落形成率均无明显影响。联合处理组细胞在 GSH 浓度为 0.5 ~ 5 mmol/L 时,细胞存活率、集落形成率与单独 NaAsO₂ 处理组比较差异无显著性;当 GSH 剂量为 10 和 20 mmol/L 时,细胞存活率和集落形成率虽可显著高于 NaAsO₂ 单独染毒组,但却仍显著低于对照组($P < 0.05$);而 40 和 50 mmol/L GSH 与 NaAsO₂ 联合处理,细胞存活率和集落形成率显著高于 NaAsO₂ 单独处理组,且与

表 1 GSH 对 NaAsO₂ 作用下细胞存活率和集落形成率的影响

Table 1 Effect of GSH on the rate of cell survival and rate of colony formation induced by NaAsO₂ ($\bar{x} \pm s$)

处理方式		细胞存活率/ %	集落形成率/ %
GSH/ (mmol/L)	NaAsO ₂ / ($\mu\text{mol/L}$)		
0	0	100.0 \pm 0.00	47.00 \pm 5.08
0	30	62.27 \pm 5.83 ⁽¹⁾	22.83 \pm 3.06 ⁽¹⁾
50	0	97.19 \pm 4.38	46.58 \pm 3.37
50	30	99.30 \pm 1.31 ⁽²⁾	46.17 \pm 2.09 ⁽²⁾
40	30	93.31 \pm 2.91 ⁽²⁾	43.83 \pm 2.01 ⁽²⁾
20	30	82.49 \pm 7.48 ^(1,2)	37.67 \pm 1.93 ^(1,2)
10	30	76.58 \pm 6.73 ^(1,2)	33.83 \pm 1.40 ^(1,2)
5	30	73.08 \pm 6.05 ⁽¹⁾	27.67 \pm 1.82 ⁽¹⁾
2.5	30	68.78 \pm 7.51 ⁽¹⁾	24.25 \pm 1.18 ⁽¹⁾
1	30	64.83 \pm 5.16 ⁽¹⁾	22.75 \pm 2.08 ⁽¹⁾
0.5	30	64.44 \pm 4.47 ⁽¹⁾	22.33 \pm 2.17 ⁽¹⁾

注: (1) 与对照组比较, $P < 0.05$; (2) 与 30 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 单独处理组比较, $P < 0.05$

对照组相比,差异无显著性。

2.2 GSH 对 NaAsO₂ 作用下胞内 ROS 水平、GSH 含量、SOD 酶活性的影响

由表 2 可见,与对照组比较,单独 NaAsO₂ 处理导致胞内 ROS 水平显著增高, GSH 含量和 SOD 酶活性显著降低($P < 0.05$),而 GSH 单独处理对胞内 ROS 水平, SOD 活性均明显无影响,且未造成胞内 GSH 含量的改变。联合处理组细胞在 GSH 浓度为 2.5 和 5 mmol/L 时,胞内 ROS 水平、GSH 含量和 SOD 酶活性与单独 NaAsO₂ 处理组比较差异无统计学意义且显著低于对照组($P < 0.05$);当 GSH 剂量为 10 和 20 mmol/L 时,ROS 水平虽显著低于 NaAsO₂ 单独染毒组,但却仍明显高于对照组($P < 0.05$);胞内 GSH 含量和 SOD 酶活性高于 NaAsO₂ 单独处理组且亦低于对照组($P < 0.05$);40 和 50 mmol/L GSH 与 NaAsO₂ 联合处理后,胞内 ROS 水平和 SOD 酶活性与对照组比较差异无显著性;而胞内 GSH 含量则在 50 mmol/L 时与对照组无显著性差异。

2.3 GSH 对 NaAsO₂ 作用下细胞 DNA 损伤的影响

由表 3 可见,NaAsO₂ 单独染毒组与对照组相比,彗星率和 OTM 值均显著增高($P < 0.05$)和单独 GSH 处理则对两项指标均无影响。在联合处理组中,尽管浓度范围为 2.5 和 5 mmol/L GSH 可降低彗星率和 OTM 值,差异却未达到统计学意义,但 10 和 20 mmol/L GSH 与 NaAsO₂ 联合作用时,彗星率和 OTM 值虽显著低于 NaAsO₂ 单独染毒组却仍高于对照组($P < 0.05$);而 40 和 50 mmol/L GSH 与 NaAsO₂ 联合作用时,两项指标与对照组相比无明显差异。

表 2 GSH 对 NaAsO₂ 作用下胞内 ROS 水平、GSH 含量和 SOD 活性的影响

Table 2 Effect of GSH on the intracellular ROS level, GSH contents and SOD activity induced by NaAsO₂ ($\bar{x} \pm s$)

处理方式		ROS	GSH/(mg/g prot)	SOD/(U/mg prot)
GSH/(mmol/L)	NaAsO ₂ /($\mu\text{mol/L}$)			
0	0	0.0072 \pm 0.0007	127.49 \pm 9.29	21.62 \pm 2.02
0	30	0.0215 \pm 0.0033 ⁽¹⁾	63.39 \pm 8.92 ⁽¹⁾	8.46 \pm 2.17 ⁽¹⁾
50	0	0.0074 \pm 0.0004	131.15 \pm 5.43	20.47 \pm 1.37
50	30	0.0074 \pm 0.0003 ⁽²⁾	133.77 \pm 5.68 ⁽²⁾	19.99 \pm 2.75 ⁽²⁾
40	30	0.0080 \pm 0.0010 ⁽²⁾	104.12 \pm 7.95 ^(1,2)	18.38 \pm 1.50 ⁽²⁾
20	30	0.0110 \pm 0.0015 ^(1,2)	87.44 \pm 4.58 ^(1,2)	15.37 \pm 1.78 ^(1,2)
10	30	0.0148 \pm 0.0013 ^(1,2)	82.23 \pm 4.70 ^(1,2)	14.93 \pm 1.59 ^(1,2)
5	30	0.0177 \pm 0.0020 ⁽¹⁾	75.14 \pm 7.02 ⁽¹⁾	11.59 \pm 1.32 ⁽¹⁾
2.5	30	0.0204 \pm 0.0023 ⁽¹⁾	66.19 \pm 4.89 ⁽¹⁾	9.63 \pm 2.22 ⁽¹⁾

注: (1) 与对照组比较, $P < 0.05$; (2) 与 30 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO₂ 单独处理组比较, $P < 0.05$

表3 GSH对NaAsO₂作用下细胞DNA和染色体损伤的影响Table 3 Effect of GSH on the DNA and chromosomal damage induced by NaAsO₂ ($\bar{x} \pm s$)

处理方式		彗星率/%	OTM	微核细胞率/%
GSH/(mmol/L)	NaAsO ₂ /(μ mol/L)			
0	0	6.29 \pm 1.49	0.31 \pm 0.05	6.17 \pm 2.19
0	30	78.63 \pm 11.25 ⁽¹⁾	10.02 \pm 2.47 ⁽¹⁾	54.33 \pm 8.57 ⁽¹⁾
50	0	6.06 \pm 1.26	0.27 \pm 0.03	6.33 \pm 1.49
50	30	6.91 \pm 1.75 ⁽²⁾	0.44 \pm 0.07 ⁽²⁾	6.17 \pm 1.86 ⁽²⁾
40	30	8.48 \pm 1.66 ⁽²⁾	0.52 \pm 0.04 ^(1 2)	9.33 \pm 1.80 ⁽²⁾
20	30	19.24 \pm 7.55 ^(1 2)	1.26 \pm 0.53 ^(1 2)	17.50 \pm 4.76 ^(1 2)
10	30	34.65 \pm 9.92 ^(1 2)	2.99 \pm 0.75 ^(1 2)	34.33 \pm 6.32 ^(1 2)
5	30	57.28 \pm 9.36 ⁽¹⁾	5.28 \pm 1.56 ⁽¹⁾	37.33 \pm 3.94 ^(1 2)
2.5	30	69.32 \pm 10.57 ⁽¹⁾	8.36 \pm 1.37 ⁽¹⁾	48.83 \pm 2.19 ⁽¹⁾

注: (1) 与对照组比较 $P < 0.05$; (2) 与 30 μ mol/L NaAsO₂ 单独处理组比较 $P < 0.05$

2.4 GSH对NaAsO₂作用下细胞染色体损伤的影响

由表3可见,与对照组相比,30 μ mol/L NaAsO₂ 单独染毒处理可导致微核细胞率明显增高($P < 0.05$),而单独GSH处理则对微核细胞率无影响。在联合处理组中,尽管浓度范围为2.5和5 mmol/L GSH未能显著降低微核细胞率,但随着GSH剂量水平的增加,微核细胞率呈现逐渐降低的趋势;表现为10和20 mmol/L GSH与NaAsO₂ 联合作用时,微核细胞率虽显著低于NaAsO₂ 单独染毒组却仍高于对照组($P < 0.05$);在40和50 mmol/L GSH与NaAsO₂ 联合作用时,微核细胞率与对照组相比无明显差异。

3 讨论

GSH是由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的非酶类抗氧化剂,是细胞内富含-SH且含量最为丰富的低分子多肽,几乎遍布于机体的每个细胞。GSH在体内不需要经生物转化就可直接保护-SH,还可作为供氢体促进谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)和SOD等酶类催化的过氧化物还原反应,参与直接清除自由基,在维持细胞内氧化还原平衡中扮演极其重要的角色^[8]。体内、外研究均显示:外源性补充GSH可增加细胞自身的解毒功能,加快毒副产物的排泄速率,减弱环境污染物的毒性作用^[9-10]。鉴于此,目前外源性GSH已作为强效抗氧化剂和环境污染物解毒剂广泛应用于肿瘤、冠心病、早衰症等多种疾病的辅助治疗及预防保健。然而,外源性GSH能否拮抗NaAsO₂的细胞毒性尚无报道,且存在一定的争议:一方面,正常生理功能情况下,GSH常聚集于细胞内,而胞外的GSH含量极低,体外给予的GSH也较难进入胞内,本研究结果也同样发现

单独GSH处理组并没有增加胞内GSH的含量水平;而有趣的是,NaAsO₂联合处理组却能引起胞内GSH含量随胞外添加GSH量的增加而增加,这可能是由于NaAsO₂在诱发胞内GSH外溢导致胞内GSH含量降低的同时,又可与胞外的GSH结合形成砷-硫复合物As(GS)₃,进而减缓有效GSH成分转入胞内^[11]。另一方面,外源性GSH分解产生的氨基酸和肽又可经膜转入细胞内,通过谷胱甘肽、谷氨酸或半胱氨酸合成酶的催化反应,在胞内重新合成GSH,使胞内GSH水平得以增加,从而发挥其抗氧化作用;此外,外源性GSH亦可能直接与砷剂结合,释放蛋白巯基,促进砷的甲基化代谢过程,进而加速砷化物排出体外,降低砷的毒性作用^[12]。本研究联合应用MTT法和集落形成实验检测细胞存活和增殖能力,结果揭示外源性GSH仍可作为潜在拮抗剂用于降低NaAsO₂的细胞毒性,且保护效应的强度与GSH作用的浓度密切相关。主要表现为:0.5~5 mmol/L GSH作用时,细胞存活率、集落形成率与NaAsO₂单独处理组比较差异无显著性;而随着GSH剂量水平的增加,细胞毒性逐渐减弱,直至恢复到正常水平,而且胞内GSH含量可随外源性GSH剂量的增加而呈现逐渐升高的趋势,提示补充的GSH仍可转入胞内发挥拮抗作用。

目前,多项研究结果证实GSH在砷的解毒过程中发挥重要作用,但其解毒机制尚不清楚,且报道结果存在诸多分歧。首先,THOMPSON等^[13]揭示NaAsO₂染毒导致小鼠Hepa-4c1c7细胞GSH含量显著降低,且增加GSH的生物合成效率可显著减少细胞凋亡性死亡;其次,WANG等^[14]以人Chang肝细胞为研究对象,则证实NaAsO₂(0~30 μ mol/L)处理24h后,胞内GSH含量随染毒剂量增加而逐渐升高,并呈现明显的剂量-反应关

系;更为有趣的是,李富君等^[15]采用亚慢性 NaAsO₂ 染毒模型,发现小鼠血中 GSH 含量与染毒剂量的大小及时间的长短相关。此外,流行病学的研究结果也揭示地方性砷中毒可导致病人体内 GSH 含量显著增高,而职业性砷暴露工人血液 GSH 含量则低于正常人群^[16-17]。上述结果均表明 NaAsO₂ 对 GSH 含量的影响可因染毒剂量、时间、受试物和环境因素的不同而发生变化,亦提示 GSH 对 NaAsO₂ 的解毒机制可能存在不同的路径或方式。目前,NaAsO₂ 与 GSH 的关系可归纳于两种认识:(1) NaAsO₂ 可直接参与促进 O₂⁻ 等自由基的生成,而 GSH 在保护细胞免受 ROS 的损害过程中既能与碳中心自由基发生非酶性反应,又能作为供氢体参与催化 H₂O₂ 的分解。这个过程导致 GSH 的大量消耗甚至耗竭,引起了氧化应激和线粒体呼吸链的损伤,致使脂质过氧化或遗传损伤,进而启动细胞死亡机制^[18]。(2) NaAsO₂ 可通过代偿性增加机体 GSH 含量水平,导致抗氧化防御系统的失调,进而间接促进 ROS 的形成并损伤 DNA 和染色体^[19]。而且,NaAsO₂ 代谢和排泄过程中所需的甲基转移酶(Cyt19)和 S-腺苷甲硫氨均必须在 GSH 的协同下才能发挥作用^[20],这些反应都可能间接地刺激细胞代偿性增加 GSH 的合成。

氧化应激诱导的 DNA 和染色体损伤是砷诱导细胞凋亡的重要机制^[21],但该机制是否参与 GSH 的保护效应仍不清楚。因此,本研究通过氧化应激指标 ROS 水平,SOD 酶活性和 GSH 含量的测定,以及应用彗星和微核实验联合检测 GSH 对 NaAsO₂ 处理后细胞在 DNA 和染色体损伤程度方面的变化,探讨外源性 GSH 拮抗砷毒性的作用机制。结果显示,30 μmol/L NaAsO₂ 单独处理具有诱导 ROS 产生增加,SOD 活性和 GSH 含量下降,进而损伤细胞 DNA 和染色体的能力;与 GSH 联合作用后,细胞氧化应激水平、DNA 损伤和染色体断裂均呈现不同程度的改善,在高浓度(40、50 mmol/L) GSH 作用下甚至与对照组比较无明显差异,提示高剂量水平 GSH 可改善甚至逆转 NaAsO₂ 所致氧化/DNA 损伤。对于 DNA 而言,唯一防御自由基损伤的有效措施便是非酶性抗氧化系统,因此 GSH 含量水平的高低直接决定细胞抵御遗传损伤的能力^[22]。当 NaAsO₂ 削弱机体抗氧化防御系统(表现为 SOD 酶活性下降和 GSH 含量的降低)或诱导过多自由基产生时,DNA 便极易发生损伤,此时一旦 DNA 的损伤无法正常修复或难以修复,细胞便会启动凋亡机制,

最终诱发细胞死亡。反之,如果在损伤发生情况下及时给予补充 GSH,以维持或提高胞内 GSH 水平,则可大大减轻 NaAsO₂ 引起的氧化/DNA 损伤。

综上所述,高剂量水平的外源性 GSH 能显著改善 NaAsO₂ 对细胞毒性作用,减弱机体氧化应激水平,并可增加对 DNA 和染色体损伤的修复。这进一步说明,外源性给予 GSH 对砷中毒的治疗和预防具有较为显著的作用,值得作为砷的抗氧化剂推广应用。

参考文献

- [1] HUGHES M F, BECK B D, CHEN Y, et al. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 123 (2): 305-332.
- [2] NEMETI B, ANDERSON M E, GREGUS Z. Glutathione synthetase promotes the reduction of arsenate via arsenolysis of glutathione [J]. *Biochimie*, 2012, 94(6): 1327-1333.
- [3] HAYAKAWA T, KOBAYASHI Y, CUI X, et al. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyl-transferase Cyt19 [J]. *Arch Toxicol*, 2005, 79(4): 183-191.
- [4] JORGE G, MUNIZ O, ROBERT O, et al. Investigating arsenic susceptibility from a genetic perspective in drosophila reveals a key role for glutathione synthetase [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 107(2): 416-426.
- [5] MANNETJE A, BENCKO V, BRENNAN P, et al. Occupational exposure to metal compounds and lung cancer. Results from a multi-center case-control study in Central/Eastern Europe and UK [J]. *Cancer Causes Control*, 2011, 22(12): 1669-1680.
- [6] CELIK I, GALLICCHIO L, BOYD K, et al. Arsenic in drinking water and lung cancer: a systematic review [J]. *Environ Res*, 2008, 108(1): 48-55.
- [7] 车望军,吴媚,张遵真,等.汽油尾气对大鼠睾丸组织的氧化损伤和遗传毒性作用[J]. *卫生研究*, 2008, 37(4): 417-420.
- [8] TOWNSEND D, TEW K, TAPIERO H. The importance of glutathione in human disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(3-4): 145-155.
- [9] LU L, WANG X, LANG L, et al. Protective effect of reduced glutathione on the liver injury induced by acute omethoate poisoning [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2010, 30(3): 279-283.

(下转第 949 页)

参考文献

- [1] BOTVIN G J, GRIFFIN K W. School-based programmes to prevent alcohol, tobacco and other drug use [J]. *Int Rev Psychia*, 2007, 19(6): 607-615.
- [2] 王才康, 胡中锋, 刘勇. 一般自我效能感量表信度和效度研究 [J]. *应用心理学*, 2001, 7(1): 37-40.
- [3] ELDER J P, SALLIS J F. Tobacco-refusal skills and tobacco use among high-risk adolescents [J]. *J Behav Med*, 1993, 16(6): 629-641.
- [4] Pacific Institute for Research and Evaluation Research Triangle Institute, School of Public Health, University of No. Carolina-Chapel Hill. Project alert best practices case study findings, in *The ALERT Educator*[R]. CA: Los Angeles, 2003.
- [5] 王琼, 魏咏兰, 杜其筠, 等. 成都市青少年吸烟现状调查 [J]. *现代预防医学*, 2005, 32(9): 1139-1140.
- [6] 徐小生, 赵赞, 凌建军, 等. 长沙市中小学生控烟效果的研究 [J]. *中国预防医学杂志*, 2005, 6(4): 289-300.
- [7] FISHER J D, FISHER W A. Changing AIDS risk behavior [J]. *Psychol Bull*, 1992, 111: 455-474.
- [8] FISHER J D, FISHER W A, BRYAN A D: Information-motivation-behavioral skills model-based HIV risk behavior change intervention for inner-city high school youth [J]. *Health Psychol*, 2002, 21(2): 177-186.
- [9] 林丹华, 方晓义, 郑宇. 社会榜样与青少年吸烟行为的关系 [J]. *心理发展与教育*, 2000(3): 20-23.
- [10] 方晓义, 林丹华, 房超. 感知的和实际的同伴吸烟行为对青少年吸烟行为的影响 [J]. *心理发展与教育*, 2001(2): 28-30.
- [11] 林丹华, 方晓义. 青少年个性特征、最要好同伴吸烟行为与青少年吸烟行为的关系 [J]. *心理发展与教育*, 2003(1): 31-36.
- [12] 石荣兴, 王会, 芦然, 等. 丰台区中学生吸烟行为及其危险因素分析 [J]. *中国学校卫生*, 2010, 31(2): 221-222.
- [13] 李融, 马迎华, 庄丽丽, 等. 环境感知系统与高中生吸烟行为的关系 [J]. *中国学校卫生*, 2011, 32(11): 1309-1311.
- 收稿日期: 2012-12-07
-
- (上接第942页)
- [10] PALLER M, PATTEN M. Protective effects of glutathione, glycine, or alanine in an in vitro model of renal anoxia [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1992, 2(8): 1338-1344.
- [11] THORSEN M, JACOBSON T, VOOLIJIS R, et al. Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 84(6): 1177-1188.
- [12] HAYAKAWA T, KOBAYASHI Y, CUI X, et al. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19 [J]. *Arch Toxicol*, 2005, 79(4): 183-191.
- [13] THOMPSON J, FRANKLIN C. Enhanced glutathione biosynthetic capacity promotes resistance to As^{3+} -induced apoptosis [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 193(1): 33-40.
- [14] WANG Y, XU Y, WANG H, et al. Arsenic induces mitochondria-dependent apoptosis by reactive oxygen species generation rather than glutathione depletion in Chang human hepatocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2009, 83(10): 899-908.
- [15] 李富君, 孙贵范, 砷对小鼠血液及组织中 GSH 含量影响的实验研究 [J]. *中国公共卫生学报*, 1997, 6(2): 370-371.
- [16] 李富君, 孙贵范, 戴国钧, 等. 地方性砷中毒患者生物膜损伤机制的探讨 [J]. *中国地方病学杂志*, 1998, 17(1): 9-11.
- [17] MARCOS R, MARTINEZ V, HERNANDEZE A, et al. Metabolic profile in workers occupationally exposed to arsenic: role of GST polymorphisms [J]. *J Occup Environ Med*, 2006, 48(3): 334-341.
- [18] SHI H, SHI X, LIU K. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 255(1-2): 67-78.
- [19] SHEN H, YANG C, LIU J, et al. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(7): 1115-1124.
- [20] REICHARD J, PUGA A. Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation [J]. *Epigenomics*, 2010, 2(1): 87-104.
- [21] ROSSMAN T G, KLEIN C B. Genetic and epigenetic effects of environmental arsenicals [J]. *Metallomics*, 2011, 3(11): 1135-1141.
- [22] FLORA S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(2): 257-281.
- 收稿日期: 2013-03-04