

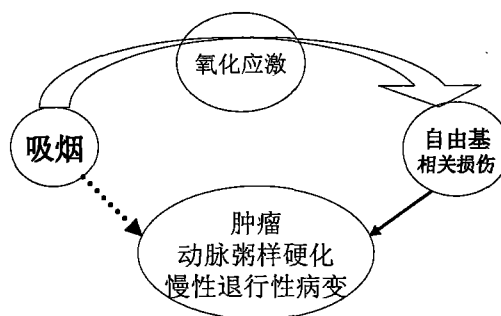
## 谷胱甘肽对香烟烟雾溶液作用下 大鼠淋巴细胞氧化应激的影响

中国疾病预防控制中心

刘 珊

杭州，2006-4

## 前 言



## 吸烟引起氧化应激的依据

- 燃烧过程中直接产生ROS + RNS  
气相：1015/puff，烷氧基、过氧基、C.  
粒子相：10<sup>17</sup>/g，半醌类、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OH·
- 进入体内后间接产生自由基：体内代谢；细胞膜内外氧化还原；巨噬细胞；中性粒细胞；铁离子；醛类耗竭GSH
- 流行病学资料提示机体抗氧化能力降低：VC、VE、胡萝卜素，SOD、CAT、GSH-P<sub>x</sub>

## 谷胱甘肽的分布及作用

- 胞内0.5-10mmol/L，血浆0.02-0.025mmol/L
- 具有活性巯基，影响基因表达调控、DNA生物合成、酶活性和代谢调节、免疫功能调节等过程
- 人群资料显示吸烟者GSH水平下降、戒烟后回升

## 材 料

- 动物：Wistar雄性大鼠200±20g
- 主要试剂：谷胱甘肽、市售香烟、淋巴细胞分离液、RPMI1640、Alamar Blue、NMA、LMA、溴化乙锭、DCFH-DA、TBA
- 主要仪器：培养箱、超净工作台、倒置显微镜、低温高速离心机、酶标仪、电泳仪、荧光显微镜、荧光分光光度计、722分光光度计

## 方 法

- 淋巴细胞制备
- 水溶性香烟烟雾溶液制备
- 施加处理因素
- 细胞活力测定
- 彗星试验
- SOD测定、LPO测定
- 数据分析

## 香烟烟雾溶液 (CSS) 制备

- 两个串联的大包氏管, 5ml PBS×2
- 抽吸香烟烟雾, 50ml/min, 2s吸、间歇58s
- 每次2支烟燃至距烟蒂0.5cm处

0.2支/ml香烟烟雾溶液 (CSS)

## 施加处理因素

- 0, 0.05, 0.1mmol/L GSH预处理2h
- $8 \times 10^{-3}$ 支/毫升香烟烟雾溶液作用 2h

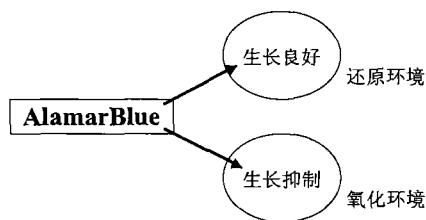
设: 对照组

CSS组——仅经香烟烟雾作用

GSH组——仅经GSH作用

GSH+CSS组——GSH和香烟烟雾共同作用

Alamar blue摄入法是综合评价细胞毒性的方便敏感指标, 能简便、敏感、快速、连续检测细胞活力



## 细胞活力检测

- 收集待检测细胞, 调节细胞浓度为 $10^6$ /ml级
- 96孔板中加入细胞悬液90  $\mu$ l, Alamar Blue原液10  $\mu$ l, 即终浓度为10%
- 同时设立无细胞的AlamarBlue对照和培养液对照
- 37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育, 观察各组颜色变化, 连续监测540nm和620nm吸光度值

## 细胞活力计算

AlamarBlue 还原率 % =  $(A_{540} - A_{620} \times R) \times 100$

$R = (A_{A540} - A_{R540}) / (A_{A620} - A_{R620})$

$A_{A540}$ : 波长540nm时Alamar Blue对照的吸光度

$A_{R540}$ : 波长540nm时RPMI1640对照的吸光度

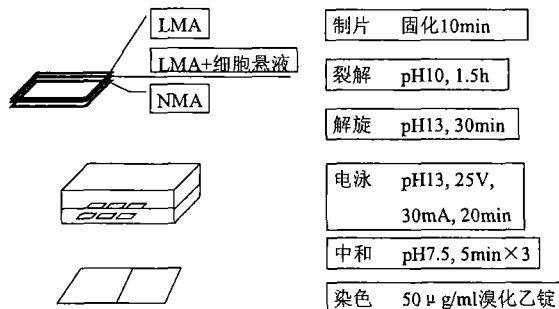
$A_{A620}$ : 波长620nm时Alamar Blue对照的吸光度

$A_{R620}$ : 波长620nm时RPMI1640对照的吸光度

$A_{540}$ : 波长540nm时样品的吸光度

$A_{620}$ : 波长620nm时样品的吸光度

## 彗星试验步骤



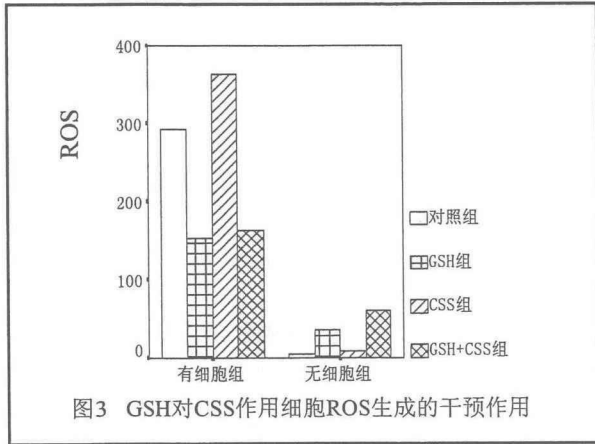
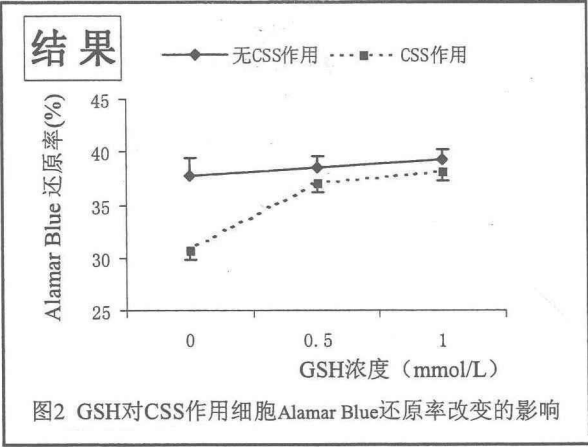
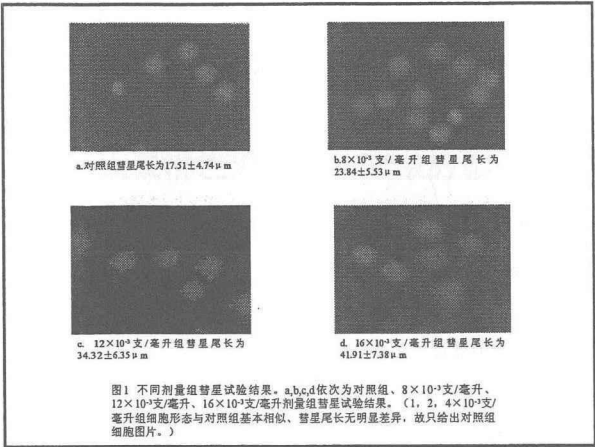
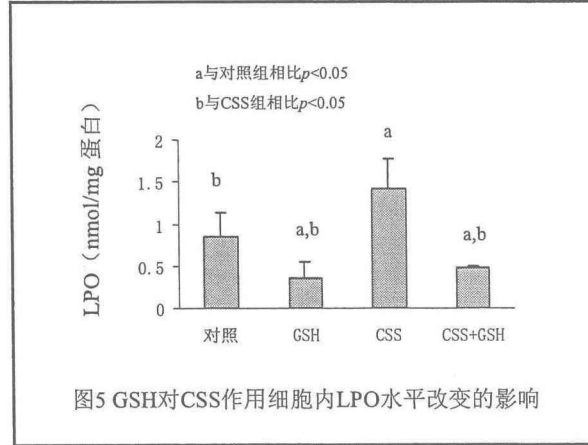
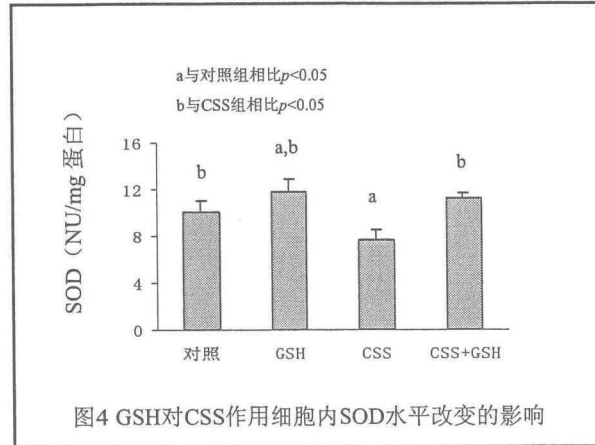


表 GSH对CSS所致细胞彗星尾长改变的影响

	n	0级	1级	2级	3级	4级	拖尾率 (%)	尾长 ( $\mu\text{m}$ )
对照组	50	34	5	10	1	0	32	$2.32 \pm 3.86^a$
GSH组	50	24	26	0	0	0	52	$1.98 \pm 2.21^b$
CSS组	50	8	1	7	16	18	84	$14.76 \pm 7.94^a$
GSH+CSS组	50	17	8	7	15	3	66	$8.22 \pm 7.55^{a,b}$

a: 与对照组相比 $p < 0.05$ ; b: 与CSS组相比 $p < 0.05$ 。



## 讨 论

- 1mmol/L GSH显著增加正常细胞活力，增加CSS作用细胞活力的作用强于0.5mmol/L、与正常细胞活力相近。
- 选择1mmol/L GSH作为干预剂量

GSH作用使ROS下降，使CSS作用细胞内ROS

低于正常水平，可能原因：

- GSH作为供氢体参与GSH-P<sub>x</sub>催化过氧化物还原
- GSH直接清除·OH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和<sup>1</sup>O<sub>2</sub>

GSH作用使SOD活性增强，使CSS作用细胞达到正常水平

- GSH活性巯基保护酶蛋白
- 表达水平？
- ROS降低与SOD活性增强互为因果，都有利于减轻脂质过氧化损伤

GSH作用使DNA损伤减弱

- GSH直接或间接清除自由基
- 在解毒酶GST作用下与亲电子物质结合，阻断对DNA的损伤，CSS本身或其代谢产物因具有亲电子性而致癌

## 结 论

- GSH提高正常细胞的抗氧化能力
- 拮抗CSS作用细胞的氧化应激损伤
- 可以考虑应用于吸烟相关疾病的防治