文章编号:1000-5404(2006)01-0063-03

论著

还原型谷胱甘肽对抗硫芥诱导大鼠脾淋巴细胞毒性作用

曾 惠[1],刘 勇[1],朱明学[2],张黎明[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系,上海 200433)

提 要:目的 观察还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)对硫芥(sulfur mustard, SM)诱导大鼠脾淋巴细胞线粒体功能的保护作用。**方法** 用密度梯度离心法分离大鼠脾淋巴细胞,与硫芥共同进行体外培养。用MTT法检测线粒体功能状态;用荧光分光法检测细胞内GSH含量和用琼脂糖DNA凝胶电泳观察DNA的损伤。**结果** 硫芥作用的线粒体功能变化具有剂量和时间依赖性,它与细胞内GSH含量下降呈直线正相关($P<0.01$)。使用GSH后,对不同剂量组的线粒体功能早期均有保护作用。保护效果最好时间的DNA断裂情况有所减轻,甚至可以逆转坏死向凋亡发展。**结论** GSH可部分保护线粒体功能。

关键词:硫芥;淋巴细胞;GSH;线粒体功能;DNA ladder
中图法分类号:R322.21; R827.174; R977.4 **文献标识码**:A

Antagonizing effects of GSH against rat lymphocytotoxicity induced by sulfur mustard

ZENG Hui[1], LIU Yong[1], ZHU Ming-xue[2], ZHANG Li-ming[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of GSH on the mitochondria in rat lymphocyte *in vitro*. **Methods** Rat spleen lymphocytes were isolated by density gradient centrifugation and cultured with sulfur mustard of 100, 500, 1000 μmol/L *in vitro*. The mitochondria function was detected by MTT. The changes of GSH were detected by fluorescence spectrophotometry and DNA fragments were also detected. **Results** There was a positive line correlation between the changes of mitochondria function and the GSH content ($P<0.01$). GSH could protect the mitochondria function in the lymphocytes treated with sulfur mustard. GSH could alleviate the apoptosis, even change the necrosis to apoptosis sometimes. **Conclusion** GSH can maintain the mitochondria function and alleviate the apoptosis.

Key words: sulfur mustard; lymphocyte; GSH; mitochondria function; DNA ladder

由于锍离子的亲电特性,硫芥(sulfur mustard, SM)与不同组织细胞内的不同大分子结合产生不同的毒性,细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)浓度对其影响较大。GSH的消耗可能导致氧化应激和线粒体呼吸链损伤,致使是脂质过氧化,使膜流动性改变,膜蛋白功能丧失,膜完整性丧失和细胞死亡。

GSH是临床上使用的一种广谱的抗毒药物,既具有抵御细胞毒性作用,又有抗氧化作用,在体内不需转化就可直接起到保护巯基的作用。本研究从细胞水平上研究了用GSH对抗线粒体损伤从而达到干预硫芥的淋巴细胞毒作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备 离心机(上海),低温冷冻离心机(Sigma),细胞培养箱(美国),电泳仪,荧光分光光度计,酶标仪。

1.1.2 重要试剂 如无特指均为国产分析纯;硫芥为军事医学科学院6所提供,纯度为97.5%,先用1,3丙醇配成1%母液,临用时用生理盐水稀释至所需浓度;RPMI1640培养液(Hyclone产品),GSH(Sigma公司),OPT(Sigma),淋巴细胞分离液(上海),MTT,小牛血清。

1.1.3 实验动物 Wistar大鼠20只,体质量(180±20) g,

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01L054)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01L054)
作者简介:曾 惠(1978-),女,四川省隆昌县人,硕士,助教,主要从事烷化物的毒性作用机制方面的研究。电话:(023)68752293
通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2004-06-12;修回日期:2005-02-23

雌雄各半，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠脾脏淋巴细胞的培养及诱导处理 大鼠称重，戊巴比妥钠麻醉，无菌剖腹取脾后按常规方法分离提取淋巴细胞，调整细胞密度为 $2\times10^6\sim2\times10^7$/ml。加入一定体积的硫芥（军科院提供），使其终浓度分别为 100、500、1 000 μmol/L，分别培养 2、4、8、12 h，并设立实验对照，同时设 GSH（Sigma 公司）保护组，在中毒组剂量下分别加入 10 mmol/L GSH。根据实验要求每个时相点设立 3 组平行对照。培养细胞至各组时相点后收集洗涤细胞，进行检测。

1.2.2 线粒体功能检测 将前述中毒细胞按 10^6/ml 接种于 96 孔板上，孵育至相应时相点取出，按 MTT 法进行检测。

1.3 GSH 含量测定

取 4.0×10^6 细胞悬浮于 100 μl 冷的双蒸水（含 30 μmol/L EDTA），加入 15 μl 3 mol/L HPO_3，混匀，4 ℃ 12 000 g 离心 10 min 去蛋白。取 50 μl 上清用于 GSH 检测［加入 50 μl 0.1 mol/L磷酸钠缓冲液 pH 8.0，100 μl 新鲜配制的 1 mg/ml OPT（购自华美）溶液，室温孵育 15 min。在荧光分光光度计激发波长 420 nm，发射波长 350 nm 处测荧光强度］。

1.4 细胞 DNA 断裂测定[1]

离心收集 $10^5\sim10^6$ 个细胞，PBS 洗 2 次，加 50 μl 的细胞裂解液后提取 DNA，并于 1.8% 琼脂糖凝胶电泳，电泳完毕，将电泳凝胶置于 Gel Doc 2000 凝胶图像扫描分析系统，扫描图像。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件包进行方差分析，直线相关和回归分析。

2 结果

2.1 不同的染毒剂量下线粒体的整体功能变化

MTT 测试结果显示，随着硫芥染毒剂量的增加，线粒体整体功能逐渐降低，随着中毒时间的延长，线粒体整体功能也是逐渐下降的。在中毒后 8 h，3 个剂量组的下降均有显著性差异（表 1）。

表 1 GSH（10 mmol/L）对硫芥［100 μmol/L（A），500 μmol/L（B），1 000 μmol/L（C）］诱导淋巴细胞线粒体功能的保护作用（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	SM（100 μmol/L）	GSH（10 mmol/L）+ SM（100 μmol/L）	SM（500 μmol/L）	GSH（10 mmol/L）+ SM（500 μmol/L）	SM（1 000 μmol/L）	GSH（10 mmol/L）+ SM（100 μmol/L）
对照组	0.127 ± 0.044	0.127 ± 0.044	0.127 ± 0.044	0.127 ± 0.044	0.127 ± 0.044	0.127 ± 0.044
4 h	0.088 ± 0.025	0.157 ± 0.011[b]	0.053 ± 0.029	0.106 ± 0.016[b]	0.044 ± 0.027	0.082 ± 0.014
8 h	0.049 ± 0.012[a]	0.094 ± 0.054[b]	0.037 ± 0.017[a]	0.052 ± 0.016	0.032 ± 0.007[a]	0.068 ± 0.009[b]
24 h	0.037 ± 0.043[a]	0.048 ± 0.0019	0.013 ± 0.014[a]	0.045 ± 0.003	0.013 ± 0.004[a]	0.030 ± 0.008 9
48 h	0.014 ± 0.010[a]	0.009 ± 0.005	0.009 ± 0.009[a]	0.001 ± 0.008	0.000 ± 0.000[a]	0.000 ± 0.000[a]

a：$P<0.01$，与对照组比；b：$P<0.01$，与相应的实验组比较

2.2 不同染毒剂量下 GSH 含量的变化

对 3 个剂量下细胞内总的 GSH 的测定的结果也显示，随着中毒剂量的增加，GSH 水平下降的越显著。随着中毒时间的延长，GSH 水平下降也越显著，且与线粒体整体功能降低保持一致，均在硫芥中毒后 8 h 显著下降（表 2）。

表 2 硫芥诱导淋巴细胞（10^6 细胞）GSH 水平的变化（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	*OD*		
	100 μmol/L	500 μmol/L	1 000 μmol/L
对照组	0.642 ± 0.104	0.642 ± 0.104	0.642 ± 0.104
4 h	0.598 ± 0.044	0.519 ± 0.033	0.494 ± 0.070
8 h	0.474 ± 0.057[a]	0.457 ± 0.060[a]	0.368 ± 0.043[a]
12 h	0.346 ± 0.073[a]	0.307 ± 0.051[a]	0.222 ± 0.124[a]
24 h	0.271 ± 0.070[a]	0.253 ± 0.099[a]	0.123 ± 0.215[a]
48 h	0.202 ± 0.121[a]	0.186 ± 0.095[a]	0.193 ± 0.102[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

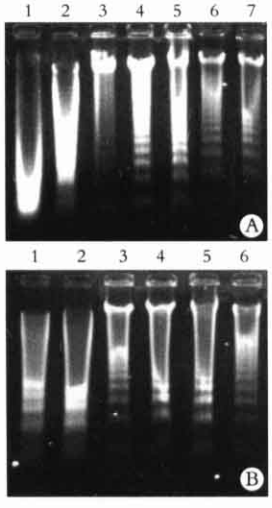
GSH 的变化和线粒体整体功能进行直线相关和回归分析：相关系数 $r_{100\ \mu mol/L}=0.897$，$r_{500\ \mu mol/L}=0.903$，$r_{1\ 000\ \mu mol/L}=0.897$，双侧 $P<0.05$，存在直线正相关关系；线粒体整体功能与 GSH 含量变化在时间上具有一致性，提示我们可用 GSH 保护线粒体功能。

2.3 GSH 的保护作用

100 μmol/L 硫芥中毒线粒体功能与 GSH 的保护作用：加入 GSH，在中毒后线粒体整体功能未有显著性下降的情况下（中毒 4 h），GSH 保护组细胞线粒体功能有显著增加。硫芥中毒后 8 h，线粒体整体功能显著下降，GSH 的保护组细胞线粒体功能也有显著增加，再随着中毒时间的延长，GSH 的保护作用不明显。500 μmol/L 硫芥中毒线粒体功能与 GSH 的保护作用：我们观察到，GSH 保护组的保护作用主要在中毒后 4 h。1 000 μmol/L 硫芥中毒线粒体功能与 GSH 保护作用：高剂量硫芥中毒后，线粒体功能下降显著，GSH 的保护作用在中毒后 8 h 才体现出来。可能是因为大剂量硫芥中毒后，加入 GSH 的量不足以与硫芥完全结合，只能保护部分线粒体功能，在中毒后 8 h，中毒组线粒体功能下降显著，GSH 保护组的保护作用才得以体现。

2.4 不同染毒剂量下淋巴细胞 DNA 断裂分析

根据上述实验结果，选择用干预剂（GSH）对线粒体功能保护明显的时间点（中毒后 4 h），用琼脂糖凝胶电泳法分析硫芥所致的淋巴细胞 DNA 断裂情况。结果显示：不同剂量硫芥中毒 DNA 裂解出现凋亡和坏死两种模式，100 μmol/L 以凋亡为主，1 000 μmol/L 以坏死为主，500 μmol/L 两者兼有（图 1）。保护组表现出，GSH 能诱导坏死模式向凋亡模式逆转，能减轻凋亡细胞的 ladder。这与前述的 GSH 对线粒体功能的保护作用结果相一致（图 1）。



A：SM；B：SM + GSH；1，2：1 000 μmol/L 硫芥；3：对照组；4，5：500 μmol/L 硫芥；6，7：100 μmol/L 硫芥

图 1　不同剂量硫芥作用及 GSH 保护后 DNA 降解分析

3　讨论

硫芥的部分细胞毒作用机制是基于硫芥导致 GSH 的消耗。GSH 通过清除自由基或与芥子气直接作用，阻止芥子气对靶分子的攻击，也可与含硫蛋白中的巯基作用形成二硫化物，暂时保护靶分子，从而避免受到硫芥的攻击。这就提示我们 GSH 与线粒体功能的维持有着千丝万缕的联系，我们可以通过增加机体 GSH 的含量，一方面直接与硫芥结合、排除体外；另一方面可以通过保护线粒体的途径来拮抗硫芥诱导的淋巴细胞毒作用。

已有研究证实 GSH 可以作为抗氧化剂对抗硫芥毒性[2]，降低细胞内 GSH 浓度可以显著增加某些烷化剂的毒性，细胞死亡模式也从凋亡转向坏死。GSH 的巯基是硫芥烃化作用的主要功能基团。硫芥中毒后细胞内 GSH 水平随中毒时间的延长而不断下降。在硫芥中毒前用药物增加细胞内 GSH 水平，可减低硫芥的细胞毒性，用药物降低细胞内 GSH 水平可增加硫芥的细胞毒性[3]。调节 GSH 浓度可影响烷化剂的毒性，GSH 甚至能影响烷化剂诱导细胞的死亡模式。人们发现 GSH 可以调节基因转录和细胞凋亡[4]，GSH 浓度下降和随后的 ROS 增加，即便在缺乏其他任何外源凋亡刺激信号的情况下，也能诱导不同的凋亡信号；抗氧化剂如 GSH 的消耗比 ROS 的产生是更重要的凋亡调节者；单独的 GSH 减少可作为潜在的凋亡刺激信号[5]。

我们的研究结果提示：硫芥诱导的线粒体功能损害也有量效和时效关系，随着剂量增加，线粒体整体功能下降越大，随着作用时间的延长，线粒体功能逐渐消失[6]。细胞内 GSH 含量测定结果也与线粒体功能变化保持一致。对二者进行相关回归分析，结果显示线粒体功能与 GSH 含量呈直线正相关。GSH（10 mmol/L）对不同染毒剂量淋巴细胞线粒体功能均有保护作用：保护组的线粒体功能相对于对照组差别有显著性意义。但是保护作用并不持久。选择用干预剂（GSH）对线粒体功能保护明显的时间点（中毒后 4 h），用琼脂糖凝胶电泳法分析硫芥所致的淋巴细胞 DNA 断裂情况。结果显示：保护组的细胞坏死模式向凋亡模式逆转，细胞的凋亡减轻。从上述结果可以看出，GSH 可以从线粒体途径来拮抗硫芥诱导的淋巴细胞毒作用。

由于线粒体在细胞凋亡的中心作用已被确定[7]，研究线粒体功能保护对于拮抗硫芥细胞毒性有重要意义。我们的结果虽然只显示外源性 GSH 通过对线粒体功能的部分保护，从而减少核 DNA 的断裂，减轻细胞凋亡的发生，不能完全抑制硫芥的细胞毒性作用，但这为研究硫芥的细胞毒性效应中的线粒体拮抗途径提供了思路。对于开发老药新用途也提供了实验依据。

参考文献：

[1] 彭黎明，王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2000：177.

[2] SUN J，WANG Y X，SUN M J. Apoptosis and necrosis induced by sulfur mustard in Hela cells[J]. Acta Pharmacol Sin，1999，20(5)：445－448.

[3] PANT S C，VIJAYARAGHAVAN R，KANNAN G M，*et al*. Sulphur mustard induced oxidative stress and its prevention by sodium 2，3-dimercapto propane sulphonic acid (DMPS) in mice[J]. Biomed Environ Sci，2000，13(3)：225－232.

[4] COFFEY R N，WATSON R W，HEGARTY N J，*et al*. Thiol-mediated apoptosis in prostate carcinoma cells[J]. Cancer，2000，88(9)：2092－2104.

[5] ARMSTRONG J S，STEINAUER K K，HORNUNG B，*et al*. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line[J]. Cell Death Differ，2002，9(3)：252－263.

[6] 曾　惠，刘　勇，朱明学，等. 硫芥对大鼠脾脏淋巴细胞线粒体的损伤作用[J]. 第三军医大学学报，2005，27(18)：1820－1822.

[7] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature，2000，407(12)：770－776.

（编辑　王　红）