DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.008
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0957-03

论著

活性氧在顺铂致 $HepG_2$ 凋亡中的作用

陈伟庆,沈 薇,沈鼎明 (重庆医科大学第二临床学院消化内科,重庆 400011)

提 要:目的 利用 Acivicin 阻断 GGT 的功能,观察其单独对 $HepG_2$ 凋亡及联用顺铂后对 $HepG_2$ 的凋亡、细胞内 ROS 产生的影响。方法 细胞毒性测定采用 MTT 法。Acivicin 和顺铂分别或联合处理 $HepG_2$ 细胞。采用 DCFH-DA 能被 ROS 作用发光的特性。通过流式细胞仪测定细胞内 ROS 的变化。凋亡检测采用细胞凋亡原位检测法(TUNEL 法)。结果 MTT 法测定 $HepG_2$ IC_{50} 值 Acivicin 为 1.4 mmol/L,顺铂为 67 μmol/L。Acivicin 1.4 mmol/L 和顺铂 67 μmol/L 以及 Acivicin(1.4 mmol/L)+顺铂(67 μmol/L) $HepG_2$ 24 h 细胞内的 ROS 显著升高,尤其是在当与顺铂联用时 $HepG_2$ 细胞内的 ROS 升高就更加明显。TUNEL 法测定 Acivicin(1.4 mmol/L)在 24、48、72 h 致 $HepG_2$ 的凋亡率分别分(16.3±3.5)%、(27.9±4.3)%、(47.2±3.0)%。与对照组相比差异显著($P<0.05$)。顺铂(67 μmol/L) $HepG_2$ 24 h 的凋亡率为(73.4±1.5)%,Acivicin(1.4 mmol/L)+顺铂(67 μmol/L) $HepG_2$ 24 h 的凋亡率为(94.7±0.5)%,较单用显著增加($P<0.01$)。结论 顺铂致 $HepG_2$ 凋亡的机制之一是增加细胞内 ROS 的产生。Acivicin 抑制 GGT,干扰 GSH 代谢,可致 $HepG_2$ 细胞内的 ROS 升高,使细胞凋亡,并增强顺铂的细胞毒性。

关键词:顺铂;活性氧;凋亡;$HepG_2$
中图法分类号:R73-36;R914.3;R979.19 文献标识码:A

Roles of reactive oxygen species in $HepG_2$ cell apoptosis induced by CDDP

CHEN Wei-qing, SHEN Wei, SHEN Ding-ming (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of acivicin on $HepG_2$ cell apoptosis and the effects of acivcin with cis-diaminedichloroplatinum (CDDP) on $HepG_2$ cell apoptosis and on production of intracellular ROS. **Methods** $HepG_2$ cells were treated with acivcin, CDDP, and acivicin combined with CDDP. The cytotoxicity was measured by MTT assay. Flow cytometry was used to detect the intracellular ROS, and the rate of apoptosis was determined by TUNEL assay. **Results** The concentration of acivicin to cause $HepG_2$ IC_{50} was 1.4 mmol/L, and CDDP was 67 μmol/L. Significant increases in intracellular ROS content were observed in $HepG_2$ cells 24 h after treatment with acivicin (1.4 mmol/L), CDDP (67 μmol/L), or acivicin (1.4 mmol/L) plus CDDP (67 μmol/L), especially with acivicin (1.4 mmol/L) plus CDDP (67 μmol/L). $HepG_2$ cell apoptotic rates induced by acivicin (1.4 mmol/L) at 24, 48, and 72 h were (16.3±3.5), (27.9±4.3), (47.2±3.0), respectively, and a significant difference was observed compared to that of control group ($P<0.01$). $HepG_2$ apoptotic rate induced by CDDP (67 μmol/L) at 24 h was (73.4±1.5), while that by acivicin (1.4 mmol/L) plus CDDP (67 μmol/L) at 24 h was (94.7±0.5). The increase caused by combination of acivcin and CDDP was more significant than that by either of them ($P<0.01$). **Conclusions** One of the mechanisms of $HepG_2$ apoptosis induced by CDDP is to increase intracellular ROS. Acivicin inhibits GGT and interferes GSH metabolism, which may lead to an increase in intracellular ROS level of $HepG_2$ cell, resulting in apoptosis and enhanced CDDP cytotoxicity.

Key words: CDDP; ROS; apoptosis; $HepG_2$

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是自然界普遍存在的一种具有很高生物活性的氧分子。在活体细胞主要在有氧代谢过程中产生。在真核细胞线粒体中氧化磷酸化过程是 ROS 产生的主要位点。传统上,顺铂(cis-diaminedichloroplatinum, CDDP)和阿霉素均被列入 DNA 损伤剂而用于化疗,但有关 ROS 与顺铂毒性作用的关系知之甚少。目前认为 ROS 是致细胞凋亡中

作者简介:陈伟庆(1962-),男,江苏省无锡市人,博士,主治医师,主要从事慢性肝病的诊治方面的研究。电话:(023)63849075-2332

收稿日期:2002-06-17;修回日期:2004-03-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

最常见的生物活性因子。越来越多的研究表明,在阿霉素的细胞毒性中,ROS 的产生发挥了重要作用。有学者甚至认为 ROS 产生是许多化疗制剂发挥作用的重要模式[1]。但国内外有关顺铂的报道尚少,ROS 产物的增加可致氧化还原失衡,而这恰是细胞凋亡发生的共同中心环节。γ-谷氨酰转肽酶(GGT)是 GSH 合成、分解和转运不可缺少的酶之一。在细胞中 GSH 的耗竭和凋亡之间有直接的因果关系,GSH 耗竭引起的氧化还原失衡是细胞凋亡主要的触动点。因为 GSH 可有效阻止氧化应激和膜脂质过氧化等导致的细胞凋亡[2]。本研究通过 Acivicin (L-(alpha s,5s)-alpha-aimino-3-chloro-4, 5-dihyolro-5-isoxazole acetic acid, L-(αS, 5S)-α-氨基-3-氯-4,5-二氢异恶唑醋酸)具有的特异性阻断 GSH 合成,分解及转运 GSH 的功能,观察 $HepG_2$ 细胞内 ROS 的产生,并观察联用顺铂后 $HepG_2$ 细胞内 ROS 的产生及凋亡的变化。探讨 GGT、GSH、ROS 与肿瘤细胞凋亡的关系,以进一步探讨顺铂的细胞毒机制。

1 材料及方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 $HepG_2$ 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供,RPMI1640 常规传代培养。新生小牛血清:购自 Promega 公司。顺铂注射液:云南昆明第二制药厂(中国 10 mg/2 ml/瓶)。Acivicin 购自 sigma 公司(美国)。四甲基偶氮唑盐(MTT):购自上海华舜生物工程有限公司。细胞凋亡原位检测剂盒(Tunel POD)购自宝灵曼公司(德国)。ROS 探针:2′,7′-二氯荧光素(2′,7′-dichloro fluorescein-ciacctate, DCFH-DA) sigma 购自 sigma 公司(美国)。Hepes 缓冲液:145 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L $CaCl_2$, 0.5 mmol/L $MgSO_4$, 5 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L Hepes, pH 7.4。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒性测定 采用 MTT 法。体外常规培养 $HepG_2$,MTT 法测定 $HepG_2$ 细胞对 Acivicin 和顺铂的 IC_{50} 值。

1.2.2 测定 Acivicin 和顺铂对 $HepG_2$ 凋亡的影响 取对数生长期 $HepG_2$ 细胞制成 10^6/ml 的细胞悬液,接种至内铺小玻片的 12 孔培养板内。待细胞贴壁生长,加入 CDDP 和 Acivicin、CDDP+Acivicin 培养 24、48、72 h 后取出小玻片待测。TUNEL 检测按说明书进行。

1.2.3 流式细胞仪测定细胞内 ROS 的变化 参考文献[3],收集对数生长期 $HepG_2$ 细胞,制成 10^6/ml 的细胞悬液,接种至 100 ml 培养瓶内。待细胞贴壁生长 24 h 后,加入 CDDP 和 Acivicin、CDDP+Acivicin 分别培养 24 h 后取出待测。将前述已处理的 $HepG_2$ 细胞用 Hepes 缓冲液冲洗 5 次后,与含 DCFH-DA 5 mmol/L 的 Hepes 液 37 ℃共孵育 5 min 后,倾去 Hepes 液,确定激光发光波长为 488 nm,开始上机检测。并进行图像分析,测定总荧光强度并观察其变化。

1.2.4 采用固定区计数法并在生物医学图像分析系统(BM2000,北航)下记录平均灰度值。

1.3 统计学分析

SAS 统计包下行 χ^2 检验和方差分析,并进行均数间多重比较以及多个处理组与对照组的比较。

2 结果

2.1 MTT 测定

$HepG_2$ IC_{50}值 Acivicin 约 1.4 mmol/L, CDDP 约 67 μmol/L。

2.2 Acivicin、顺铂及两者联用后 $HepG_2$ 凋亡测定(TUNEL 法)

Acivicin(1.4 mmol/L)致 $HepG_2$ 凋亡随时间延长而增强,联用 CDDP 后 $HepG_2$ 的凋亡(24 h)明显增加。

表 1 **Acivicin**、顺铂及联合处理 **$HepG_2$** 凋亡阳性率(%, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab 1 Apoptosis positive rates of $HepG_2$ treated with acivicin, CDDP, and Acivicin+CDDP (%, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	Apoptosis-time		
	24 h	48 h	72 h
Control	1.3±0.33	15.2±2.5	19.4±0.5
Acivicin	16.3±3.5$^{\Delta}$	27.9±4.3$^{\Delta}$	47.2±3.0$^{\Delta}$
CDDP	73.4±1.5$^{\Delta *}$	—	—
Acivicin+CDDP	94.7±0.5$^{\Delta *}$	—	—

$^{\Delta}$: $P<0.05$, *vs* control; *: $P<0.01$, *vs* Acivicin

表 2 结果显示 Acivicin 与顺铂一样具有细胞毒性。Acivicin 诱导 $HepG_2$ 凋亡呈时间依赖型。Acivicin 与顺铂联用有增强顺铂致 $HepG_2$ 凋亡的作用。

表 2 **Acivicin**、顺铂及联合处理 **$HepG_2$** 凋亡的平均灰度值($\bar{x}\pm s$)(**BM2000** 北航)

Tab 2 Average value of $HepG_2$ cell apoptosis treated with Acivicin, CDDP, and Acivicin+CDDP ($\bar{x}\pm s$)

Control	Acivicin	CDDP	Acivicin+CDDP
0.009 088 4±0.020 5	0.055 704±0.036 67 *	0.064 054±0.055 98 *	0.088 444±0.017 25 *

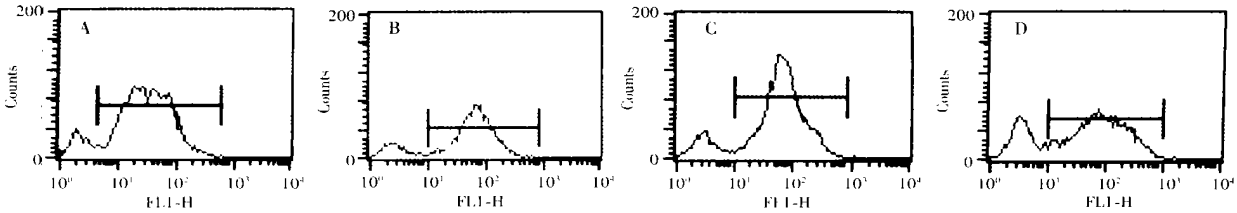
*: $P<0.01$, *vs* control

2.3 流式细胞仪测定 $HepG_2$ 细胞内 ROS 的变化

图 1A 为未经处理的 $HepG_2$ 细胞,正常时胞内 ROS 水平很低。所以 DCF 的荧光强度值很小。图 1B、C 是经 Acivicin 1.4 mmol/L 和顺铂 67 μmol/L 作用 24 h 后 $HepG_2$ 细胞内荧光强度的变化,其较正常时明显升高。而图 1D 为 Acivicin 1.4 mmol/L 和顺铂 67 μmol/L 合用作用 24 h 后 $HepG_2$ 细胞内的荧光强度的变化,可见其升高极其明显。Acivicin 和顺铂均能使 $HepG_2$ 细胞内的 ROS 升高,以二者联用时更加明显(图 1)。

以上结果显示通过减少 $HepG_2$ 细胞内 GSH 和使用顺铂均能导致凋亡。同时伴随有细胞内 ROS 的显著升高。提示 ROS 的产生是导致 $HepG_2$ 细胞凋亡的一个主要的早期事件。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Control; B: Acivicin; C: CDDP; D: Acivicin CDDP

图 1　流式细胞仪测定 $HepG_2$ 细胞内 ROS 的变化

Fig 1　Changes of ROS in $HepG_2$ cell measured by flow cytometry

3　讨论

不发荧光的 DCFH-DA (2′, 7′-二氯氢化荧光素二脂, 2′, 7′-dichlorofluorescin-diacetate,)进入胞内后, 经脂酶作用脱去二脂生成不发荧光的 2′, 7′-二氯氢化荧光素(2′, 7′-dichlorofluorescin, DCFH), 2′, 7′-二氯氢化荧光素被细胞内产生的 ROS 氧化生成发荧光的 2′, 7′-二氯荧光素(2′, 7′-dichlorofluorescin, DCF)[3]。利用流式细胞仪原位实时检测 DCF 的荧光强度, 从而反映 Acivicin 和顺铂作用于 $HepG_2$ 细胞后, 胞内 ROS 产生的水平。

利用荧光探针 DCFH-DA 和流式细胞仪可检测到细胞内 ROS 的总体水平。由于是对活细胞作原位实时检测, 细胞经荧光探针标记后即上机测试, 弥补了化学发光法等生化方法不能检测到细胞内新生成的部分 ROS 的不足, 是实时观察测定细胞内 ROS 产生变化的一理想方法[4]。

ROS 能通过多种途径导致细胞凋亡。传统理论认为顺铂是致 DNA 损伤的烷化剂, 此外顺铂进入细胞后还可被胞内 GSH 结合成为一生物大分子, 从而耗竭胞内的 GSH, 破坏胞内的氧化还原平衡[5]。本研究表明在 Acivicin 和顺铂及二者联用处理 $HepG_2$ 细胞 24 h 后, 细胞内 DCF 的荧光强度显著增强, 显示细胞内 ROS 的水平明显升高。证明顺铂作用能迅速导致 $HepG_2$ 细胞内的 ROS 升高。从而导致细胞凋亡。同时 Acivicin 通过抑制 GGT 的活性破坏了 GSH 的合成、转运以及代谢, 破坏了细胞内的氧化还原氧化, 进而引起内源性的 ROS 升高。尤其是在当与顺铂联用时 $HepG_2$ 细胞内的 ROS 升高就更加明显。

GSH 是存在于生物细胞内最重要的非蛋白化合物。近年国外许多研究证实缺乏 GSH 将导致细胞凋亡, 但多限于血液细胞、胸腺细胞和神经元中, 而 GGT 是 GSH 合成、分解和转运不可缺少的酶。抑制 GGT 将导致细胞内 GSH 显著下降。

在产期鼠肝造血细胞凋亡中, 肝非造血细胞即靠 GGT 活性升高来使其免遭损害。许多肿瘤细胞中(如肝、肺、乳腺和皮肤等)有 GGT 的异常表达, 而且 GGT mRNA 的增加与细胞内 GSH 包括 GSH 合成酶的水平增加是相一致的。GGT 调节恶性组织利用半胱酸和 GSH。Acivicin 结构与乙酰氨相似, 对 GGT 具有强大的抑制作用, 且对 GGT 的灭活是迅速和不可逆的。Acivicin 抑制肿瘤细胞 GGT 后导致细胞外 GSH 堆积而细胞内 GSH 缺乏。本实验证实在 $HepG_2$ 使用 Acivicin 可诱导其凋亡, 并具有时间/剂量依赖性的特点。而联用顺铂后 $HepG_2$ 的凋亡显著增加可能与细胞内 GSH 下降, GSH 与顺铂合成无毒化合物的能力下降, 从而增强了顺铂的细胞毒作用。本研究结果还提示, 通过抑制 GGT, 干扰 GSH 代谢减弱肿瘤细胞尤其是依赖 GSH 的耐药的抗氧化应激能力, 可能是化疗增效的又一有效途径。

参考文献:

[1] Wantenberg M, Ling F C, Schallenberg M, *et al*. Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in Down-regula- tion of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species[J]. J Biol Chem, 2001, 276(20): 17420—17428.

[2] Nicole A, Santiard-Baron D, Caballos-Pical I. Direct evidence for glutathione as mediator of apoptosis in neuronal cells[J]. Biomed Pharmacother, 1998, 52(9): 349—355.

[3] Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2′, 7′-dichlorofluorescin[J]. J Leukoc Biol, 1990, 47(5): 440—448.

[4] Wan X S, Zhou Z, Kennedy A R. Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells[J]. Radiat Res, 2003, 160(6): 622—630.

[5] Miyajima A, Nakachima J, Yoshioka K, *et al*. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiamineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells[J]. Br J Cancer, 1997, 76(2): 206—210.

[6] Hampton M B, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death[J]. Biofactors, 1998, 8(1—2): 1—5.

[7] del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, *et al*. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyltranspeptidase activity is involved in prevention of apop-tosis and maintainance of proliferation in U_{937} cells[J]. FASEB-J, 1999, 13(1): 67—79.

[8] Donnerstag B, Ohlenschlager G, Cinatl J, *et al*. Reduced glutathione and S-acetylglutathione as selective apoptosis-inducing agents in cancer therapy [J]. Cancer Lett, 1996, 110(1—2): 63—70.

[9] Hanigan M H, Ricketts W A. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express γ-glutamyl transpeptidase[J]. Biochemistry, 1993, 32(24): 6302—6306.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net