DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.002
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
940 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-0940-03

硫芥对大鼠淋巴细胞谷胱甘肽含量的影响

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

提 要:目的 探讨硫芥中毒后淋巴细胞谷胱甘肽含量变化。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法测定细胞活力。以荧光分光光度计法测定细胞还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)含量变化,结果 淋巴细胞活力在硫芥中毒后降低水平与细胞内GSH含量呈直线相关关系。硫芥中毒8 h GSH含量开始下降,8~12 h维持在低水平,24~48 h GSH进一步下降;GSSG含量24~48 h显著低于对照水平;GSH/GSSG比值在8 h后显著降低。结论 硫芥中毒淋巴细胞活力与谷胱甘肽含量的变化存在显著相关性。

关键词:硫芥;还原性谷胱甘肽;抗氧化型谷胱甘肽;淋巴细胞
中图法分类号:R331.144;R329.26;R996 文献标识码:A

Effects of sulfur mustard on glutathione content in rat lymphocytes

ZENG Hui[1], LIU Yong[1], ZHU Ming-xue[2], ZHANG Li-ming[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of 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 effects of sulfur mustard on reduced glutathione (GSH) content in rat lymphocytes *in vitro*. **Methods** Rat spleen lymphocytes were isolated by density gradient centrifugation and co-cultured with sulfur mustard *in vitro*. The cell viability was detected by MTT method and the contents of GSH and oxidized glutathione (GSSG) in lymphocytes were determined using a fluorometric assay. **Results** There was a linear correlation between the viability of lymphocytes and the level of GSH after sulfur mustard intoxication. The level of GSH in rat lymphocytes treated with sulfur mustard decreased significantly at 8 h, and this lower level of GSH was maintained until 12 h. A further decline was observed at 24 h. The level of GSSG decreased significantly at 24 h after sulfur mustard treatment. The ratio of GSH/GSSG markedly decreased at 8 h. **Conclusion** There exits a signi-ficant correlation between the viability of lymphocyte and the content of GSH after sulfur mustard intoxication.

Key words: sulfur mustard; glutathione; oxidized glutathione; lymphocyte

硫芥(sulfur mustard)是一种重要的军用毒剂,具有强烈的烷化作用,能直接与细胞内还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)结合,引起细胞GSH含量减少。而GSH是机体主要的抗氧化系统。生理条件下,细胞内氧化还原反应处在一个动态平衡。GSH的减少,必然会破坏这个平衡,细胞功能将受到影响甚至细胞死亡。淋巴细胞是硫芥的主要靶细胞,本研究通过测定淋巴细胞GSH和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)含量以及细胞活力,研究硫芥中毒与细胞谷胱甘肽水平和细胞活力变化的关系。

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六所提供,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),溴化乙锭(Sigma),GSSG,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4只,雌雄各半,体质量(200±50)g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脾淋巴细胞分离培养 取Wistar大鼠无菌剖腹

基金项目:全军医学科研"十五"计划重点课题(01L054)
Supported by the Key Research Projects of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01L054)
作者简介:曾 惠(1978-),女,四川省隆昌县人,硕士研究生,主要从事烷化物的毒作用机制方面的研究。电话:(023)68752356
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-10-14;修回日期:2004-01-05

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

取脾剪碎, 加适量 RPMI1640 培养液, 100 目尼龙网过渡, 等量培养液洗 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入适量培养液制成脾细胞悬液, 后用淋巴细胞分离液分离, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中层云雾状液面层, 适量培养液洗 2 次, 1 500 r/min 离心 10 min, 用台盼蓝测细胞活性> 95%, 调整细胞计数至 10^6/ml, 5% CO_2, 37 ℃孵箱培养 24 h 备用。

1.2.2　中毒模型的制作　　按照文献[1]方法, 取培养瓶按终浓度为 100^{-5} μmol/L 加入硫芥。取 24 孔培养板, 在培养瓶中加入硫芥后, 再加到 24 孔培养板, 继续培养至所需时间, 分别于 0、4、8、12、24、48 h 取样做后续检测(根据实验要求每个时相点设立 4 组平行对照)。

1.2.3　细胞活力检测　　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, 3 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 用约 180 μl D-Hanks 洗涤 1 次, 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加入 160 μl 无血清 1640, 20 μl MTT, 孵育 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 150 μl DMSO 显色, 震荡 10 min, 在酶标仪上读取数值。

1.2.4　细胞内 GSH、GSSG 含量变化[2]　　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 H_3PO_3, 混匀, 4 ℃ 12 000 g× 10 min 离心去蛋白。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 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。)取 50 μl 上清用于 GSSG 检测(加入 20 μl 0.04 mol/L NEM, 室温孵育 20~30 min 后, 取 50 μl 加入 0.1 mol/l 氢氧化钠, 100 μl 新鲜配制的 1 mg/ml OPT 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)。查标准曲线并换算成 μg/10^6 细胞。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件包中单因素方差分析及均数间多重组较(One-Way ANOVA), 线性相关分析(Bivarite)和直线回归分析(Linear Regression)进行数据统计。图像结果用凝胶成像系统扫描后用图像分析计算机软件处理。

2　结果

2.1　淋巴细胞内 GSH、GSSG 含量变化情况

硫芥中毒 4 h GSH 含量开始下降, 8~12 h 含量维持在一个水平, 24~48 h 含量显著降低; GSSG 含量 24 显著降低; (表 1) GSH/GSSG 24 h 显著降低, 4 h 显著增高。

表 1　硫芥(100 μmol/L)中毒细胞内 GSH、GSSG 含量(μg/10^6 细胞)变化($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

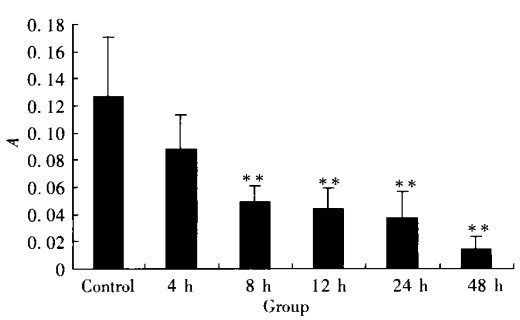
Tab 1　Changes of GSH and GSSG contents (μg /10^6 cells) in lymphocytes induced by sulfur mustard (100 μmol/L) ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

	Control	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
GSH (μg)	0.447±0.02	0.441±0.004	0.335±0.011 **	0.318±0.003 **	0.190±0.009 **##	0.093±0.008 **##
GSSG (μg)	0.259±0.035	0.207±0.009	0.221±0.012	0.228±0.015	0.167±0.022 **	0.094±0.015 **
GSH/GSSG	1.726	2.103 **	1.515 **	1.394 **	1.138 **	0.099 **

**: $P<0.01$, *vs* control; ##: $P<0.01$, *vs* 12 h

2.2　细胞活力检测

细胞活力在中毒 8 h 显著下降, 但 8、12、24 h 差异不显著(图 1)。



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

图 1　硫芥(100 μmol/L)中毒淋巴细胞细胞(10^6 细胞)活力变化($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig 1　Changes of cell viability in lymphocytes (10^6 cells) induced by sulfur mustard (100 μmol/L) ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

对细胞活力和细胞内 GSH 含量进行直线相关和回归分析, 相关系数 $r=0.884$, 双侧 $P=0.05$, 存在正相关关系。直线回归分析显示回归模型 $F=14.251$, $P=0.02$ 回归系数检验的 $t=3.775$, $P=0.02$, 见图 2。

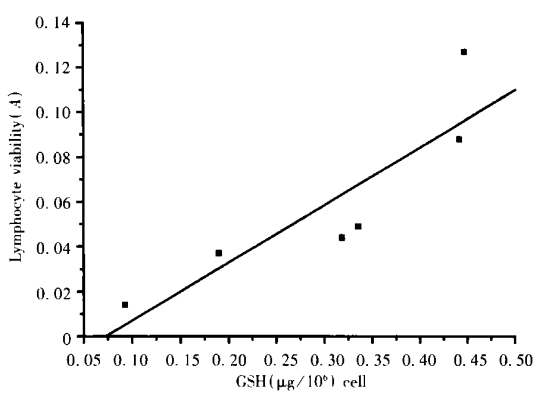


图 2　GSH 与细胞活力的相关分析

Fig 2　Correlation analysis of lymphocyte viability with GSH concentration

3　讨论

GSH 是细胞自我保护系统的重要物质之一, 也是

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

DNA 合成中不可缺少的小分子巯基化合物，具有清除自由基、维持细胞内正常的氧化还原环境和蛋白质的结构与功能等多方面的作用。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[3,4]。

业已证实，谷胱甘肽的巯基是硫芥烃化作用的主要功能基团。用标记硫芥（^{35}S）与酵母实验表明，有50%的 ^{35}S 与谷胱甘肽结合[5]。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[6~8]。相似的情况在整体动物实验中也有报道。硫芥中毒小鼠中，血、肝、肺中 GSH 含量显著减少，GSSG 含量急剧增加[9]。Husain[10] 在用亚致死剂量硫芥对小鼠染毒后发现，GSH-px 活性在白细胞脾脏肝脏中活性显著降低－硫芥在亚致死剂量下抑制白细胞和脾脏的抗氧化酶活性。本研究结果也提示，100 μmol/L 硫芥中毒后淋巴细胞内GSH 含量逐渐减低，细胞活力也在逐渐减低，其变化与 GSH 含量降低在时间上一致，经统计分析二者呈直线相关（$r=0.884$，双侧 $P<0.05$）。

由于GSH 广泛存在于真核细胞中，并在胞浆中合成，仅 10%~15%移至线粒体。线粒体 GSH 在清除活性氧时起着关键作用。ATP 依耐的线粒体转运体将 GSH 由胞浆转运到线粒体基质。这个转运体在胞浆 GSH 低浓度时有高亲和力，目的是维持线粒体 GSH 水平。在胞质 GSH 消耗时，线粒体 GSH 池缓慢丢失 GSH。因此GSSG 的产生在线粒体 GSH 维持稳定的情况下是一定的。在硫芥中毒淋巴细胞模型中，可能主要是胞浆GSH 直接与硫芥反应。虽然细胞内 GSSG 含量在中毒后 24 h 没有显著性变化，但 GSH/GSSG 除在中毒 4 h 有一个高峰外，随中毒时间的延长GSH/GSSG 比值是显著降低的。这就提示随中毒时间的延长，细胞内出现了氧化应激状态的变化，细胞中毒产生的活性氧参与了硫芥的细胞毒性，而 GSH/GSSG 是在整体水平上衡量超氧自由基引起的氧化应激的指标[10]。在本实验中，GSH/GSSG 在中毒4 h 出现高峰的原因可能是：硫芥烃化线粒体内 GSH，使生成的 GSSG 减少，而正常细胞内GSSG 含量远远低于GSH，因此，GSSG 含量变化在一定时间段内相对大于GSH，致使比值增加。这就提示细胞内活性氧参与了细胞毒性作用，细胞的氧化应激状态由此而变化，如果能及时清除活性氧，细胞存活，如果不能及时清除，细胞必然走向死亡。但是，GSH、GSSG 并不是硫芥细胞毒作用的唯一途径，还存在其它参与因素，如 PARP 等[11,12]。

总之，研究硫芥中毒后细胞内 GSH、GSSG 含量变化对于明确硫芥的毒性作用机制有着重要意义，测定细胞内 GSH/GSSG 水平，有助于中毒诊断和评估预后。当然，硫芥的毒性作用是多方面的，GSH、GSSG 含量变化只是其中的一条途径的早期变化和早期反应。

参考文献：

[1] 赛 燕，刘 勇，朱明学，等. 硫芥淋巴细胞毒性作用与 Caspase-2 表达[J]. 第三军医大学学报，2003，25(3)：1127－1130.

[2] Hissin P J，Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues[J]. Analytical Biochemistry，1976，74(1)：214－226.

[3] Wilde P E，Upshall D G. Cysteine esters protect cultured rodent lung slices from sulphur mustard[J]. Hum Exp Toxicol，1994，13(11)：743－748.

[4] Cowan F M，Broomfield C A，Smith W J. Inhibition of sulfur mustard increased protease activity by niacinamide，N-acetyl L cysteine or dexamethasone[J]. Cell Biol Toxicol，1992，8(2)：129－138.

[5] 罗成基，欧阳子倩. 核化学武器损伤防治学[M]. 北京：人民军医出版社，1994. 138－140.

[6] Gross C L，Inmace J K，Hovatter R C，*et al*. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard[J]. Cell Biol Toxicol，1993，9(3)：259－267.

[7] Gross C L，Giles K C，Smith W J. L-oxothiazolidine 4-carboxylate pretreatment of isolated human peripheral blood lymphocytes reduces sulfur mustard cytotoxicity[J]. Cell Biol Toxicol，1997，13(3)：167－173.

[8] Amir A，Chapman S，Gozes Y，*et al*. Protection by extracellular glutathione against sulfur mustard induced toxicity *in vitro*[J]. Hum Exp Toxicol，1998，17(12)：652－660.

[9] 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.

[10] Husain K，Dube S N，Sugendran K，*et al*. Effect of topically applied sulfur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats[J]. J Appl Toxicol，1996，16(3)：245－248.

[11] Harvey P R，Ilson R G，Strasberg S M. The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector[J]. Clin Chim Acta，1989，180(3)：203－212.

[12] Meier H L，Millard C，Moser J. Poly（ADP-nbose）Polymerase inhibitors regulate the mechanism of sulfur mustard-initiated cell death in human lymphocytes[J]. J Appl Toxicol，2000，20(Suppl 1)：S93－100.

[13] Meier H L. The time-dependent effect of 2，2′-dichlorodiethyl sulfide（sulfur mustard，HD，1，1′-thiobis[2-chloroethane]）on the lymphocyte viability and the kinetics of protection by poly（ADP-Ribose）polymerase inhibitors[J]. Cell Biol Toxicol，1996，12(3)：147－153.

（编辑 汪勤俭）

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