

- 力测定 [J]. 中华神经精神科杂志, 1993 26(5): 262-264.
- [5] 张均田. 现代药理学实验方法 (下册) [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 2000: 1228-1229.
- [6] 万伯健. 卫生毒理学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991: 216-217.
- [7] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 36.
- [8] Watjen W, Beyersmann D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress [J]. Biometals 2004 17: 65-78.
- [9] Formanek-andree P, Emster L, Dähler G, et al. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain en-

- zymes of submitochondrial particles [J]. Free Radic Biol Med 1997 22 (3): 391-400.
- [10] Sørensen M, Skov H, Autrup H, et al. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolic genes [J]. Sci Total Environ 2003 9(30): 69-80.
- [11] 王叨, 刘玉峰. 细胞色素 C与细胞凋亡的研究进展 [J]. 中国小儿血液, 2004 9 (4): 181-183.
- [12] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science 1998 281 (5381): 1309-1312.
- [13] 李毅敏, 赵树仪. N-乙酰半胱氨酸的研究进展 [J]. 天津药学, 2003 15 (2): 50-53.

无机砷的肝细胞毒性和氧化应激

Cytotoxicity and oxidative stress induced by inorganic arsenite on Chang liver cells

李冰, 张新玉, 李昕, 朱博

LIBING, ZHANG Xinyu, LIXIN, ZHU BO

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为研究亚砷酸钠 (NaAsO_2) 的肝细胞毒性和氧化应激作用。 NaAsO_2 (5, 10, 20, 40, 80, 100 和 $200 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 用 AlamarBlue 法检测细胞活力; NaAsO_2 (2.5, 5, 10 和 $25 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 或 NaAsO_2 ($10 \mu\text{mol/L}$) 染毒 2 h, 6 h, 12 h 和 24 h 用流式细胞术检测细胞内 $2', 7'$ -二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA) 的荧光强度, 间接反应细胞内氧化应激水平。结果 NaAsO_2 (5~ $200 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 能够显著降低 Chang 肝细胞的细胞活力, 且具有剂量效应关系 ($P < 0.01$); 不同剂量 NaAsO_2 (2.5, 5 和 $10 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 细胞内荧光强度明显增高, 分别是对照组的 1.67、1.96 和 2.30 倍 ($P < 0.01$); 而浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 NaAsO_2 染毒组, 细胞内荧光强度在 12 h 和 24 h 均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。提示无机砷能够产生肝细胞毒性, 增强细胞内的氧化应激水平, 并且具有剂量和时间反应关系。

关键词: 亚砷酸钠; 氧化应激; Chang 肝细胞

中图分类号: R995 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)03-0209-02

砷是一种具有类金属特性的原生质毒物, 具有广泛的生物学效应, 已被美国疾病控制中心和国际防癌研究机构确定为致癌物^[1]。人类砷暴露主要来自于职业环境、自然环境以及含砷药物的医疗应用等三个方面。慢性砷中毒具有皮肤角化、色素沉着和脱发等典型的皮肤损伤以及远期潜在的致癌效应^[2]。关于慢性砷中毒的发病机制, 目前得到广泛认同的是无机砷能够诱发机体处于氧化应激状态, 产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 并造成机体多组织和器官的氧化性损伤。人群流行病学调查表明, 慢性砷暴露引起人群氧

化应激反应增强和 ROS 产生增多, 从而造成人体脂质和 DNA 等大分子氧化损伤。本实验用亚砷酸钠 (sodium arsenite, NaAsO_2) 对培养的正常人肝细胞株 Chang 肝细胞进行染毒, 观察 NaAsO_2 对 Chang 肝细胞的毒性和氧化应激作用, 为进一步的深入实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Chang 肝细胞株购自中国科学院细胞库, 亚砷酸钠 (NaAsO_2 , Fluka 美国), RPMI1640 培养基 (Gibco 美国), $2', 7'$ -二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA), AlamarBlue (Sigma 美国), CO_2 恒温培养箱 (Heraeus 荷兰), FACSCalibur 流式细胞仪 (BD 美国), 酶标仪 (Lab systems)。

1.2 细胞培养

Chang 肝细胞株购自中国科学院细胞库。5% CO_2 , 37°C 下常规培养于 RPMI1640 培养基, 10% 胎牛血清 (FBS), 1×10^5 U/L 青链霉素。细胞进入对数生长期后用 0.25% 胰蛋白酶消化和常规传代, 细胞生长至 80% 融合后进行染毒和相关试验。

1.3 细胞活力检测

采用 AlamarBlue 法^[3]。Chang 肝细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 96 孔板, 加入 NaAsO_2 (0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 和 $200 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 将原培养液吸出, 换以含 10% AlamarBlue 的无血清 RPMI1640 培养基 $100 \mu\text{l}$ 孔, 继续培养 4 h 用酶标仪在波长 570 nm 和 640 nm 处测定各孔光密度值, 并分别计算各孔的 AlamarBlue 还原率。实验结果以细胞存活率表示, 即: 细胞存活率 (%) = (实验组 AlamarBlue 还原率 / 对照组 AlamarBlue 还原率) $\times 100\%$ 。每个剂量组设 4 个平行样。

1.4 细胞内 ROS 平均荧光强度检测

Chang 肝细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 24 孔板, 加入 NaAsO_2 (0, 2.5, 5, 10 和 $25 \mu\text{mol/L}$) 染毒 24 h 或者将

收稿日期: 2008-12-26 修回日期: 2009-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600510)

作者简介: 李冰 (1974-), 女, 副教授, 博士。

NaAsO₂ (10 μmol/L) 染毒 2 h、6 h、12 h 和 24 h 染毒终点, 弃去含砷培养液, 将含 DCFH-DA (终浓度为 20 μg/ml) 的无血清培养基加入, 孵育 30 min。0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞, 用流式细胞仪测量荧光强度, 每个样品收集 10 000 个细胞, 激发波长 488 nm, 发射波长为 525 nm。所有的步骤需要避光操作。以 2', 7'-二氯荧光素 (DCF) 的平均荧光强度代表 ROS 含量, 并用 Cell Quest 软件分析结果。最终实验数据用各实验组的平均荧光强度与对照组的平均荧光强度的相对比值表示。平行样 n=3。

1.5 统计分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析, 比较实验组和对照组之间的差异, 用 LSD 检验法进行两两比较, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaAsO₂ 暴露对 Chang 肝细胞活力的影响

5~200 μmol/L 的 NaAsO₂ 作用于细胞 24 h 后, 细胞活力显著下降且呈剂量-效应关系。见表 1。

表 1 NaAsO₂ 对 Chang 肝细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

NaAsO ₂ (μmol/L)	作用时间 (h)	细胞生存率 (%)
0	24	100.00±4.82
5	24	91.40±4.17
10	24	84.43±2.11
20	24	87.30±3.16
30	24	72.99±4.05
40	24	65.26±2.01
100	24	70.44±4.87
200	24	58.36±1.70

各组与对照组比较, P<0.01

2.2 不同剂量 NaAsO₂ 暴露 24 h 细胞内 ROS 平均荧光强度

NaAsO₂ 染毒 24 h, 浓度为 2.5、5 和 10 μmol/L 组的细胞内荧光强度随染毒剂量升高而明显上升 (P<0.01), 呈剂量-效应关系。25 μmol/L 组的细胞内荧光强度与对照组相比差异无统计学意义。见表 2。

表 2 不同剂量 NaAsO₂ 暴露 24 h 细胞内 ROS 平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

NaAsO ₂ (μmol/L)	平均荧光强度	相对比值
0	87.83±5.72	1.00±0.07
2.5	146.31±19.97	1.67±0.23**
5	172.20±8.68	1.96±0.10**
10	202.31±9.62	2.30±0.11**
25	84.62±6.10	0.96±0.07

与对照组比较, ** P<0.01

2.3 不同时间 NaAsO₂ 染毒细胞内 ROS 平均荧光强度

10 μmol/L 的 NaAsO₂ 染毒, 6 h 开始出现 ROS 诱导产生, 是对照组的 (1.12±0.26) 倍; 12 h 和 24 h 的 ROS 平均荧光强度分别是对照组的 (1.62±0.04) 倍和 (2.30±0.11) 倍 (P<0.01), 见图 1。

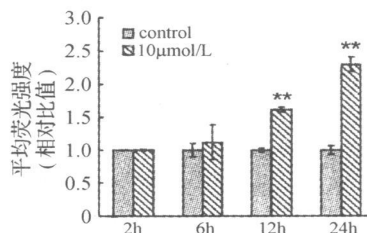


图 1 不同时间 NaAsO₂ 染毒细胞内 ROS 平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3 讨论

Akamar Blue 是近年用于定量检测细胞活力的一种物质, 由于它对活细胞几乎没有毒性, 而且比传统应用的 MTT 更加敏感, 得到越来越广泛的应用。其主要原理是 Akamar Blue 能被生长良好的细胞摄入, 细胞内的还原环境将其变为红色; 而生长抑制的细胞维持的氧化环境则使其保持原有的蓝色。检测两个颜色波长吸光度则可计算出 Akamar Blue 的还原率, 从而定量检测细胞活力。本研究结果发现, NaAsO₂ 作用于 Chang 肝细胞 24 h 能够使 Akamar Blue 还原率显著降低, 且具有良好的剂量-效应关系, 表明无机砷能够明显诱导 Chang 肝细胞损伤。另外, 本实验结果与应用 MTT 法进行的细胞活力测定结果基本一致, 且标准差很小, 提示 Akamar Blue 法可以为多种化学物质的细胞毒性检测提供一种新的敏感和可靠的实验手段。

ROS 是细胞氧代谢的产物, 其产量增多提示细胞处于氧化应激状态, 并可能进而导致机体氧化和抗氧化水平失衡和机体的氧化损伤。2', 7'-二乙酰二氯荧光素是一种常用的荧光标记探针, 能够被细胞内产生的 H₂O₂ 等 ROS 氧化而产生绿色荧光。通过流式细胞仪检测细胞内荧光强度, 可间接反映细胞内氧化应激水平。有实验表明, 砷可诱导多种细胞产生 H₂O₂ 和 O₂⁻ 等 ROS 产物^[4]; 低浓度 NaAsO₂ 即可引起猪内皮细胞中 ROS 产生增加, 并降低其细胞活力^[5]。本研究发现, NaAsO₂ 染毒 24 h, 细胞内荧光强度随染毒剂量升高而明显上升; 而浓度 10 μmol/L 的 NaAsO₂ 染毒时, 细胞内 6 h 即开始出现 ROS 水平增高, 12 h 和 24 h 则持续大量产生。提示无机砷能够在一定剂量和时间内诱导 Chang 肝细胞内 ROS 产生, 从而导致 Chang 肝细胞处于氧化应激状态。

参考文献:

- [1] Tondel M, Rahman M, Magnuson M, A et al. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh [J]. Environ Health Perspect 1999; 107 (9): 727-729
- [2] Sun G, Li X, Pi J, et al. Current research problems of chronic arsenicosis in China [J]. J Health Popul Nutr 2006; 24 (2): 176-181.
- [3] Scott N, Hatfield K M, Mackenzie N E, et al. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione [J]. Chem Res Toxicol 1993; 6 (1): 102-106.
- [4] Lynn S, Gurr J R, Lai H T, et al. NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res 2000; 86 (5): 514-519
- [5] Yeha J Y, Cheng L C, Ou B R, et al. Differential influences of various arsenic compounds on glutathione redox status and antioxidative enzymes in porcine endothelial cells [J]. Cell Mol Life Sci 2002; 59 (11): 1972-1982