

葡萄糖氧化酶诱导肝细胞氧化应激模型的建立*

赵曙光 李 强 王旭霞 刘震雄 闻勤生[△]

(第四军医大学唐都医院消化内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究不同浓度葡萄糖氧化酶(GO)对人肝细胞 L02 氧化应激水平的影响,以确定建立肝细胞氧化应激模型的合适浓度。方法:用不同浓度 GO 干预 L02 肝细胞 2 h,MTT 法检测细胞的存活率,流式细胞术检测细胞内活性氧簇(ROS),荧光强度(FI)来表示 ROS 水平。分光光度法检测细胞 MDA、GSH,速率法检测细胞培养液 LDH、AST 和 ALT 的水平。结果:①随 GO 浓度增加,肝细胞的存活率逐渐降低,其中 75 U/L、100U/L 和 125 U/L 组存活率显著低于对照组($P<0.05$)。②随 GO 浓度增加,MDA 含量逐渐增高,其中 50 U/L、75 U/L、100 U/L、125 U/L 组 MDA 水平较对照组显著增高($P<0.05$)。GSH 水平随 GO 浓度增高而逐渐减低,各干预组较对照组均显著降低($P<0.05$)。GO 各干预组 FI 均较对照组显著降低($P<0.05$)。③各干预组 LDH 活性均显著高于对照组($P<0.05$),50 U/L、75 U/L、100 U/L、125 U/L 干预组 AST 与 ALT 水平均较对照组显著增高($P<0.05$)。结论:GO 能引起的肝细胞氧化应激损伤有剂量依赖性,100 U/L 是建立肝细胞氧化应激的合适浓度。

关键词:肝细胞系 L02;氧化应激;ROS;葡萄糖氧化酶

中图分类号:R575 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-243-03

Establishment of Model for Oxidative Stress in Human Hepatocyte by Glucose Oxidase*

ZHAO Shu-guang, LI Qiang, WANG Xu-xia, LIU Zhen-xiong, WEN Qin-sheng[△]

(Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of glucose oxidase(GO) on oxidative stress to establish a model for oxidative stress in cultured human LO2 hepatocytes. **Methods:** LO2 hepatocytes were treated with different concentrations of GO. The viability of LO2 hepatocyte was evaluated by MTT assay. The intercellular ROS level was analyzed on a flow cytometer by dihydroethidium and was indicated with fluorescence intensity (FI). The levels of MDA and GSH were measured by spectrophotometric method. The levels of LDH, AST and ALT were measured by kinetic rate method using commercially available reagent kits. **Results:** ①The viability of LO2 hepatocytes decreased along with the increase in concentration of GO. The viabilities of hepatocytes in GO group 75 U/L, 100U/L and 125 U/L were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). ②The levels of MDA increased along with the increase in concentration of GO, MDA levels in GO group 75 U/L, 100U/L and 125 U/L significantly were higher than those in control group ($P<0.05$). Compared with control group, the levels of GSH decreased significantly in different concentrations of GO groups ($P<0.05$). The levels of FI increased significantly in different concentrations of GO groups compared with those in the control group ($P<0.05$). ③The LDH levels increased significantly in model groups treated with different concentrations of GO compared with those in control group ($P<0.05$). The levels of AST and ALT increased with the increase in concentration of GO, the levels in different concentration of GO groups were significantly higher in comparison with control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Oxidative stress induced by GO is dose-dependent in cultured hepatocyte LO2, and 100 U/L maybe the ideal concentration to establish the hepacytoe model with oxidative stress.

Key words: LO2 hepatocyte; Oxidative stress; Glucose oxidase

Chinese Library Classification: R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-243-03

前言

氧化应激是肝脏疾病包括病毒性肝炎、酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝病等导致肝损害的重要机制之一。氧化应激通常由活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起,ROS 由肝脏内炎症细胞的 NAD(P)H 的氧化酶、外源物质及线粒体代谢产

物、细胞色素 P450 氧化酶家族 2 诱导产生^[1-6]。病理情况下,ROS 产生增多,超过抗氧化系统的清除能力时,ROS 攻击邻近组织、细胞,引起 DNA、蛋白质和脂质等的氧化或再氧化损害,破坏细胞结构和功能的完整性,引起细胞凋亡或坏死、组织的损伤、癌症和衰老^[4-6]。氧化应激既是肝功能障碍的一部分,也是肝脏损伤的病理生理基础。体外可以利用 H₂O₂ 建立细胞氧

* 基金项目:陕西省中医药管理局中医药科研课题(项目编号:2009jc53)

作者简介:赵曙光(1971-),男,博士,主治医师,主要研究方向:非酒精性脂肪性肝病的基础及临床研究。

E-mail: zsg1203@yahoo.com.cn

[△]通讯作者:闻勤生,电话:029-84777721, E-mail: qswen421@126.com

(收稿日期:2010-10-16 接受日期:2010-11-10)

化应激损伤实验模型,但其方法有一定的缺点。葡萄糖氧化酶(glucose oxidase,GO)能够模拟氧化环境,具有稳定生成的 H_2O_2 的特点。本研究观察不同浓度的GO对肝细胞氧化应激的诱导作用,以确定建立肝细胞氧化应激模型的合适浓度。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人肝细胞系LO2购自中国典型培养物保藏中心(武汉);GO购自美国Sigma公司;MTT细胞增殖-毒性检测试剂盒购自西安瑞德生物公司,谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)检测试剂盒均购自南京建成公司。超氧化物阴离子荧光探针购自江苏碧云天公司。RPMI1640培养基购自美国GIBCO公司,胎牛血清购自浙江四季青公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 MTT法检测细胞的存活率 取对数生长期细胞,以 1×10^4 孔接种于96孔板,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养过夜后,分别加入含有25U/L、50U/L、75U/L、100U/L和125U/L的GO的细胞培养液干预2h,正常培养未加GO的孔为对照组,每组设置3个复孔。干预结束时每孔加入MTT溶液(5mg/mL)20 μ L,继续孵育4h,终止培养,弃去孔内培养上清液,每孔加入150 μ L DMSO,震荡10min,使蓝紫色结晶物甲瓚全部溶解,用酶联免疫检测仪在570nm波长下测定每孔的吸收值。按公式:存活率=实验组/对照组 $\times 100\%$,求出各组的存活率。

1.2.2 实验分组 将肝细胞LO2用含10%胎牛血清的RPMI1640培养48h后,分为对照组和干预组,干预组共设5个不同浓度的亚组,每组细胞数为 5×10^6 个。每组细胞均先用含10%胎牛血清的RPMI1640培养24小时,对照组继续用含10%胎牛血清的RPMI1640培养2h,干预组分别加入含有25U/L、50U/L、75U/L、100U/L和125U/L的GO的细胞培养

液干预2h,进行相关指标检测。

1.2.3 ALT、AST和LDH的检测 收集各组细胞培养液,用贝克曼CX-9全自动生化分析仪速率法检测。

1.2.4 MDA和GSH的检测 收集各组细胞,用硫代巴比妥酸(TBA)法进行MDA检测,在532nm处读取吸光度值,计算样本MDA水平。将各组细胞裂解后按说明书测定GSH,在412nm处读取吸光度值,计算样本GSH水平。

1.2.5 细胞内ROS水平的检测 各组细胞用4 μ M的ROS荧光探针—二氢乙啶(Dihydroethidium,DHE)标记30min后,加入4%多聚甲醛固定30min,用流式细胞仪检测。最大激发波长370nm,最大发射波长610nm。ROS水平用荧光强度(Fluorescence intensity,FI)表示,每10,000个细胞中阳性标记的细胞个数来表示。

1.3 统计学分析

各组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS14.0软件处理数据,用完全随机设计资料的方差分析,组间均数比较用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GO对LO2细胞存活率的影响

不同浓度的GO干预肝细胞2h,随着GO浓度增大,肝细胞的存活率逐渐降低。对照组的存活率为 $100 \pm 5.4\%$,25U/L、50U/L、75U/L、100U/L和125U/L干预组细胞存活率分别为 $100.2 \pm 6.5\%$ 、 $96.2 \pm 7.5\%$ 、 $92.5 \pm 3.5\%$ 、 $85.2 \pm 8.9\%$ 和 $70.4 \pm 8.1\%$ 。其中75U/L、100U/L和125U/L干预组细胞存活率显著低于对照组($P < 0.05$)。

2.2 GO对肝细胞MDA、GSH及FI的影响

随GO浓度增加,MDA含量逐渐增高,25U/L干预组MDA水平较对照组升高,但差异无显著性($P > 0.05$),其余各干预组MDA水平较对照组均显著增高($P < 0.05$)。GSH水平随GO浓度增加而逐渐减低,各浓度组GSH水平较对照组均显著降低($P < 0.05$)。FI随GO浓度增加而逐渐升高,各干预组FI较对照组均显著增高($P < 0.05$),见表1。

表1 不同浓度GO对LO2细胞MDA、GSH及FI的影响

Tab 1 Effects of different concentrations of glucose oxidase on MDA、GSH and FI level of LO2 hepatocytes in different groups

Groups	N	MDA (nmol/mL)	GSH (μ M)	FI
Control group	6	0.70 $\pm$ 0.12	21.02 $\pm$ 0.84	107.44 $\pm$ 5.37
Group 25U/L	6	0.95 $\pm$ 0.08	18.25 $\pm$ 0.72	130.23 $\pm$ 3.68*
Group 50U/L	6	1.67 $\pm$ 0.22*	15.94 $\pm$ 0.64*	175.31 $\pm$ 6.37*
Group 75U/L	6	2.43 $\pm$ 0.16*	10.65 $\pm$ 0.53*	239.56 $\pm$ 4.34*
Group 100U/L	6	3.11 $\pm$ 0.26*	8.90 $\pm$ 1.42*	280.29 $\pm$ 7.86*
Group 125U/L	6	3.32 $\pm$ 0.28*	7.98 $\pm$ 0.57*	301.02 $\pm$ 4.12*

* 与对照组比较, $P < 0.05$

*Compared with control group, $P < 0.05$

2.3 GO对LO2细胞培养液LDH、ALT和AST水平的影响

随GO浓度增加,LDH活性逐渐增高,各干预组活性均显著高于对照组($P < 0.05$)。AST、ALT水平随GO浓度增加而逐

渐增高,25U/L组较对照组增加,但差异无显著性($P > 0.05$),其余各干预组AST与ALT水平较对照组均显著增高($P < 0.05$),见表2。

表 2 不同浓度葡萄糖氧化酶对 LO2 细胞 LDH、ALT、AST 水平的影响

Tab 2 Effects of different concentrations of glucose oxidase on LDH, ALT, AST level of LO2 hepatocytes in different groups

Groups	N	LDH (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
Control group	6	10.85± 0.75	1.53± 0.13	2.19± 0.12
Group 25U/L	6	14.44± 1.13*	2.22± 0.19	2.67± 0.20
Group 50U/L	6	14.85± 1.06*	2.72± 0.27*	3.34± 0.35*
Group 75U/L	6	15.76± 0.86*	3.48± 0.26*	4.84± 0.29*
Group 100U/L	6	16.53± 1.32*	4.56± 0.38*	5.37± 0.25*
Group 125U/L	6	16.57± 1.09*	5.62± 0.24*	5.93± 0.34*

* 与对照组比较, P<0.05

*Compared with control group, P<0.05

3 讨论

氧化应激反映了肝细胞中 ROS 的生成和细胞清除的不平衡状态,不仅是肝功能障碍的一部分,也是肝脏损伤的病理生理基础。肝实质细胞的线粒体、微粒体和过氧化物酶体均可产生 ROS,其中线粒体是主要产生部位。同时,细胞通过抗氧化酶、小分子抗氧化物质和具有抗氧化作用的 II 相代谢酶组成的抗氧化系统维持氧化还原的平衡状态。病理情况下,ROS 产生增多,超过抗氧化系统清除能力时,出现肝功受损,肝细胞死亡,干扰肝脏再生^[4,8]。

促氧化剂 H₂O₂ 除了自身具有氧化作用外,也可以导致 OH⁻ 大量形成而加剧蛋白质及脂质的氧化损伤,经常用于建立细胞氧化应激模型,但 H₂O₂ 在细胞培养液中代谢较快,浓度不稳定,造模效果可控性较差。GO 主要用于检测血糖浓度,在基础实验中主要用作模拟氧化环境。GO 与过氧化氢酶组成一个氧化还原酶系统,能够氧化 β-D-葡萄糖生成过氧化氢和 D-葡萄糖酸内酯,在这个过程中 GO 的特点是能够消耗氧气催化葡萄糖氧化,生成的 H₂O₂ 浓度较稳定。

随 GO 浓度增加,细胞存活率逐渐下降,GO 浓度为 125U/L 时,存活率仅为 65%。DHE 被肝细胞摄入后,在细胞内产生溴化乙锭,溴化乙锭与 RNA 或 DNA 结合产生红色荧光,荧光强度反映了细胞内 ROS 水平。脂质过氧化是氧化应激的主要损伤,脂质过氧化过程通过链式效应放大自由基的作用,并且产生一系列醛类、酮类等毒性产物,进一步损伤 DNA 等其他生物大分子。MDA 作为脂质过氧化产物之一,反映脂质过氧化损伤情况,间接反映细胞氧化损伤程度。还原型谷胱甘肽 GSH 是网络抗氧化剂中含量最丰富的一种,其含量多少是衡量机体抗氧化能力的重要指标,其下降程度反映了细胞氧化损伤程度。细胞培养液中 AST、ALT 和 LDH 能敏感反应肝细胞的受损情况。本研究观察到,随 GO 浓度的增加,MDA、FI、AST、ALT 和 LDH 增高、GSH 降低,提示氧化应激程度及损伤程度随 GO 浓度增加而加剧。当 GO 的浓度大于 100 U/L 时,氧化应激程度增加幅度减小,而细胞存活率显著减低。因此,100 U/L 诱导肝细胞氧化应激时,既能引起细胞内 ROS 水平显著增高,造成肝细胞明显损害而细胞又有较高的存活率,是造模的理想浓度。本实验室已采用此浓度 GO 制备的肝细胞氧化应激模型,检测了姜黄素对肝细胞氧化应激的影响^[9,10],证实该

模型稳定可靠。

本研究结果显示,GO 能引起肝细胞氧化应激,其具有剂量依赖性。利用 GO 诱导肝细胞建立的氧化应激模型,能够应用于肝细胞氧化应激相关的实验研究。

参考文献(References)

- [1] Bhardwaj P, Madan K, Thareja S, et al. Comparative redox status in alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatol. Int, 2008, 2(2): 202-208
- [2] Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity[J]. Metabolism, 2008, 57(8): 1071-1077
- [3] Wortham M, He L, Gymfi M, et al. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMe depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet [J]. Diet. Dig. Dis Sci, 2008 53(10): 2761-2774
- [4] Lai MM. Hepatitis C virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more [J]. Gastroenterology, 2002, 122(2): 568-571
- [5] Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury [J]. Arch Toxicol. 2009, 83(6): 519-548
- [6] Beyer TA, Xu W, Teupser D, et al. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance [J]. EMBO J, 2008, 27(1): 212-223
- [7] Roberts RA, Smith RA, Safe S, et al. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species [J]. Toxicology, 2010, 276(2): 85-94
- [8] Klaunig JE, Kamendulis LM, Hoyer BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis[J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(1): 96-109
- [9] 李强, 赵曙光, 王旭霞, 等. 姜黄素激活转录因子 Nrf2 对肝细胞氧化应激的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19(2): 154-156
- [10] Li Qiang, Zhao Shu-guang, Wang Xu-xia, et al. Effect of curcumin on intracellular ROS in cultured human hepatocyte by upregulating the activity of Nrf2 [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2010, 19(2): 154-156 (In Chinese)
- [10] 李强, 赵曙光, 王旭霞, 等. 姜黄素对肝细胞氧化应激及胰岛素抵抗的影响[J]. 山西医科大学学报, 2010, 42(4): 300-303, 382
- [10] Li Qiang, Zhao Shu-guang, Wang Xu-xia, et al. Effect of curcumin on intracellular reactive oxygen species and insulin resistance in cultured human hepatocytes [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2010, 42(4): 300-303, 382 (In Chinese)