

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0012 - 03

H₂O₂ 对 HL - 60 细胞 DNA 中 8 - 羟基鸟嘌呤含量影响的研究

张海涛¹, 祝其锋¹, 莫丽儿², 庄海旗², 蔡 春³

(1. 广东医学院医用生化研究所; 2. 广东医学院化学教研室; 3. 广东医学院中心实验室分析中心, 广东湛江 524023)

摘要:目的与方法:本文采用气相色谱/氢火焰离子检测器(GC/FID)和气相色谱-质谱仪选择性离子检测器(CG/MS-SIM)探讨 H₂O₂ 致 HL - 60 细胞氧化损伤时 DNA 中氧化修饰碱基 8 - 羟基鸟嘌呤(8 - oh - G)含量的变化,观察 HL - 60 细胞脂质过氧化程度和细胞内还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)比值的变化。结果:结果显示 H₂O₂ 可使 HL - 60 细胞丙二醛(MDA)含量增高($P < 0.01$),GSH/GSSG 比值显著下降($P < 0.01$)。细胞经 H₂O₂ 持续作用 8h 可检测到 DNA 中有 8 - 羟基鸟嘌呤的存在, H₂O₂ 的浓度影响 8 - 羟基鸟嘌呤的生成量。结论:结果提示,HL - 60 细胞脂质化水平的升高、GSH/GSSG 比值下降、细胞 DNA 中 8 - 羟基鸟嘌呤含量变化和 H₂O₂ 浓度及作用时间有关。

关键词:HL - 60 细胞; 8 - 羟基鸟嘌呤; 还原型谷胱甘肽; 氧化型谷胱甘肽; 丙二醛

中图分类号:Q27

文献标识码:A

STUDY OF EFFECT OF H₂O₂ ON CONTENT OF 8 - HYDROXY GUANINES IN HL - 60 CELLULAR DNA

ZHANG Hai-tao, ZHU Qi-feng, MO Li-er, ZHUANG Hai-qi, Cai Chun

(Institute of Medical Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Purpose and Methods: The 8 - hydroxyguanine is one of oxidized productions in DNA. In this report, the HL - 60 cells were treated with varying concentration H₂O₂ and different time. Content of 8 - hydroxyguanines in DNA was detected by GC/FID, CGC/MS - SIM, yields of MDA and ratio of GSH/GSSG were measured in HL - 60 cells. **Results:** The results showed that yields of MDA was increased ($P < 0.01$), ratio of GSH/GSSG was decreased ($P < 0.01$) in HL - 60 cells damaged by H₂O₂. Detection of GC/FID and GC/MS - SIM indicated the 8 - hydroxyguanines be produced in HL - 60 cellular DNA. **Conclusion:** The experiments suggested yields of MDA, ratio of GSH/GSSG and content of 8 - hydroxyguanines depend on the concentration of H₂O₂ and treatment time.

Key words: HL - 60 cells; 8 - hydroxyguanine; H₂O₂; GSH; GSSG; MDA

细胞在呼吸代谢过程中不断产生一些活性氧,如 O₂、H₂O₂ 等,细胞内存在着一个微小的动态平衡环境,可以减轻活性氧的影响,但一旦这些平衡遭到破坏,活性氧就可以对细胞造成一定的危害,对细胞的遗传物质 DNA 造成不同程度的损伤^{1,2},如 DNA

的断裂、碱基的缺失、碱基的氧化修饰等。这些损伤影响了细胞遗传物质的稳定性,是细胞突变和癌变的物质基础。许多研究都已证实 DNA 的氧化损伤同衰老、肿瘤的发生和恶变有着密切关系。

收稿日期:1999 - 07 - 03;修订日期:1999 - 09 - 29

基金项目:广东省重点学科资助课题(9608)

作者简介:张海涛(1970 -),男,广西浦北县人,助教,硕士,从事自由生化研究。

材料与amp;方法

1 实验材料

1.1 仪器 日立冷冻高速离心机(日本日立公司);超声破碎仪(上海仪器厂);Perkin Elmer 荧光分析仪(美国 Perkin Elmer 公司);CO₂ 孵箱(美国公司);YJ -1300A 医用净化工作台(苏州净化设备公司);衍生瓶:本课题组设计,进口隔垫封口;美国 Varian SP- 3400 型气相色谱仪,3m ×0.25mm ×0.3μm 交联 SE- 54 覆盖开管熔融石英毛细管柱,载气为高纯氮气,FID 检测器,台式自动平衡记录仪;日本岛津 GC- 17A/QP- 5000 型气质联用仪,美国 J & W 公司 DB- 5 毛细管柱(25m ×0.32mm ×0.3μm),载气为高纯氮气,电离方式为 EI,NISI 谱库;LG 型真空冷冻干燥机(军事医学科学院制);PE. Lambda 2S 型紫外/可见光谱仪(PE 公司);Mettler Toledo 十万分之一天平。

1.2 试剂 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA),乙腈(Fluka 公司产品);菲(BDH 公司产品);蛋白酶 K, RNA 酶 A, 8- 羟基鸟嘌呤,甲酸,四乙氧基丙烷,邻苯二醛,还原型谷胱甘肽,氧化型谷胱甘肽,N- 乙基马来酰亚胺,苯酚, H₂O₂ (Sigma 公司产品);RPMI1640 完全培养基(GIBCO 公司产品);小牛血清(杭州四季清公司);牛胰核糖核酸酶(上海东风生化技术公司)。

1.3 方法

HL - 60 细胞株用含 10% 小牛血清、100 000U · L⁻¹青霉素、100mg L⁻¹的 RPMI1640 完全培养基于 37 ℃,5%CO₂ 培养。

1.3.1 HL - 60 细胞内 MDA 含量的测定³

取对数生长期的 HL - 60 细胞,细胞浓度为 4.7 ×10⁵/ml,每瓶 5ml,加入 H₂O₂,使之终浓度分别为 0mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L,37 ℃,5%CO₂ 孵箱中培养 8h。收集细胞,参照翁玉椿等人的方法处理样,激发光波长 515nm,发射光波长 553nm,以四乙氧基丙烷标准溶液为对照,测定丙二醛含量。细胞培养条件同上,H₂O₂ 终浓度为 0.4mmol/L,分别培养至 0h、2h、4h、6h、8h、10h 取样,其中以 0 h 为对照组(下同),测定 MDA 含量。

1.3.2 HL - 60 细胞内 GSH/GSSG 比值的测定⁴

细胞浓度为 4.0 ×10⁵/ml,每瓶 5ml,处理同 1.3.1,收集细胞,参照陈勤编写的《抗衰老研究实验方法》处理样品,激发波长 350nm,发射波长 420nm 测荧光强度。以 GSH、GSSG 标准溶液为对照计算细胞

内 GSH、GSSG 含量。

1.3.3 HL - 60 细胞内 8- 羟基鸟嘌呤含量的检测及鉴定^{5~7}

将生长状况良好的 HL - 60 细胞调整至 5.0 × 10⁵/ml,培养液体积为 40ml。处理同 1.3.1,收集细胞。DNA 的提取、鉴定、水解,衍生、气相色谱检测、气质联用仪鉴定参照 Dizdaroghlu 的方法并有修改。

结果

1 H₂O₂ 对 HL - 60 细胞内 MDA 含量的影响

不同浓度的 H₂O₂ 作用 HL - 60 细胞结果显示, H₂O₂ 在 0.1~0.6 mmol/L 时 MDA 生成量处于一较稳定的平稳值,但均较对照组高($P < 0.01$),当 H₂O₂ 浓度高于 0.8mmol/L 时,MDA 含量明显上升(见表 1)。MDA 含量在 H₂O₂ 作用 2~6 h 时变化不大,8h 后升高(见表 2)。

表 1 HL - 60 细胞内 MDA 含量变化

H ₂ O ₂ (mmol/L)	n	MDA(nmol/L) $\bar{x} \pm s$
0	4	108.37 ±21.70
0.2	4	190.84 ±25.93 **
0.4	4	191.23 ±25.61 **
0.6	4	190.63 ±22.03 **
0.8	4	235.04 ±31.74 **

与对照组比较, ** $P < 0.01$

表 2 H₂O₂ 作用不同时间对 HL - 60 细胞 MDA 生成的影响

时间(h)	n	MDA(nmol/L) $\bar{x} \pm s$
0	4	109.23 ±14.23
2	4	206.10 ±33.31 **
4	4	197.71 ±30.32 **
6	4	200.75 ±34.01 **
8	4	264.58 ±48.72 **
10	4	301.79 ±43.04 **

与对照组比较, ** $P < 0.01$

2 H₂O₂ 对 HL - 60 细胞内 GSH 和 GSSG 含量变化的影响

结果见表 3、表 4,从表 3 可见,当 H₂O₂ 浓度达到 0.4mmol/L 时,GSH/GSSG 比值显著下降($P < 0.01$)。从表 4 可看出,当 0.4mmol/L H₂O₂ 作用 2~8h 时 GSH/GSSG 比值明显下降($P < 0.01$)。

表3 HL - 60 细胞内 GSH/ GSSG 比值含量变化的影响

H ₂ O ₂ (mmol/L)	n	GSH/ GSSG $\bar{x} \pm s$
0	4	9.72 ±1.20
0.2	4	9.14 ±1.13
0.4	4	1.22 ±0.16 **
0.6	4	0.97 ±0.08 **
0.8	4	0.86 ±0.09 **

与对照组比较, ** P<0.01

表4 作用不同时间对细胞内 GSH/ GSSG 比值变化的影响

时间(h)	n	GSH/ GSSG $\bar{x} \pm s$
0	4	9.71 ±0.75
2	4	9.00 ±0.68
4	4	5.38 ±0.32 **
6	4	2.64 ±0.17 **
8	4	1.22 ±0.10 **
10	4	0.73 ±0.05 **

与对照组比较, ** P<0.01

3 H₂O₂ 对 HL - 60 细胞 8 - 羟基鸟嘌呤生成量的影响

HL - 60 细胞经 H₂O₂ 持续作用 8 ~ 10h , DNA 中 8 - 羟基鸟嘌呤生成量增加(图 1)。不同浓度的 H₂O₂ 作用细胞的结果显示,在 H₂O₂ 浓度在 0.4 ~ 0.8mmol/L 时 8 - 羟基鸟嘌呤含量明显升高(图 2)。

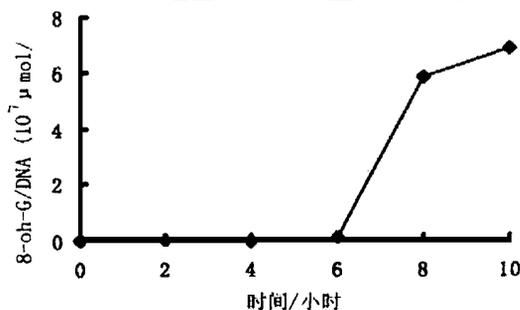


图1 H₂O₂ 作用不同时间 8 - 羟基鸟嘌呤含量变化

讨论

本文结果表明 HL - 60 细胞经外源性 H₂O₂ 作用后,细胞脂质过氧化生成的 MDA 随 H₂O₂ 浓度增高及其作用时间延长而增加(表 1、表 2)。从 H₂O₂ 浓度影响 8 - 羟基鸟嘌呤含量(图 2)可以看出,当 H₂O₂ 浓度达到 0.4mmol/L 以上时,8 - 羟基鸟嘌呤产生量开始显著上升,而 0.1 ~ 0.6mmol/L H₂O₂ 作用时

MDA 的含量变化相对平稳。可见两者的突跃点是不一致的,8 - 羟基鸟嘌呤的产生是滞后于 MDA 的产生,因为细胞核才是最后受影响的部位。也就是说在 0.1 ~ 0.6mmol/L H₂O₂ 浓度作用 8 h,MDA 变化不大,此时对 8 - 羟基鸟嘌呤的产生影响较小。而 8 - 羟基鸟嘌呤的产生可能是 H₂O₂ 直接穿膜达核,并和核酸中某些特异位点上的金属离子作用下形成·OH 的作用结果⁸。从图 1 也可以看出 H₂O₂ 作用 2 ~ 6h 时 MDA 含量变化不大,8 ~ 10 h MDA 含量明显上升可能是 H₂O₂ 持续作用的结果。提示 H₂O₂ 的作用有浓度和时间依赖性。这种浓度时间依赖性可能与自由基的链式反应扩增有关。因而我们推测 H₂O₂ 造成的脂质过氧化是影响 8 - 羟基鸟嘌呤含量变化的原因之一。

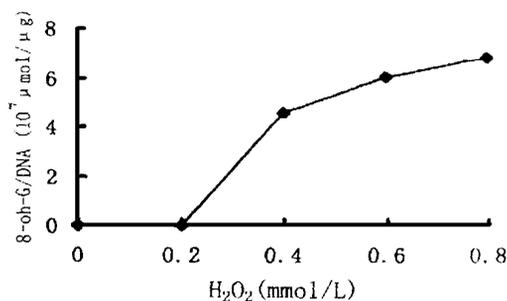


图2 不同浓度 H₂O₂ 对 8 - 羟基鸟嘌呤含量的影响

实验结果表明,随着 H₂O₂ 浓度升高和作用时间延长,HL - 60 细胞内 GSH/ GSSG 比值逐渐下降(表 3,表 4)。当 H₂O₂ 浓度达到 0.4mmol/L 时,GSH/ GSSG 比值为 1.22 ±0.16,与对照组相差近 8 倍(表 3),此时 8 - 羟基鸟嘌呤含量开始显著上升,提示 GSH/ GSSG 的动态平衡完全破坏。从表 4 和图 1 也可看出,在 H₂O₂ 作用 8h 时 GSH/ GSSG 比值为 1.22 ±0.10,此时也是 8 - 羟基鸟嘌呤含量开始出现显著变化的时间。表明 8 - 羟基鸟嘌呤的产生与 HL - 60 细胞内抗氧化能力下降有关。

细胞衰老和细胞氧化损伤有着密切关系,氧化造成的细胞膜的脂质过氧化、抗氧化能力的下降及细胞内 DNA 氧化损伤的积累是造成细胞衰老的原因之一,尤其是氧化修饰碱基 8 - 羟基鸟嘌呤的生成和积累对细胞的突变、癌变及衰老有着直接和间接的联系。

参考文献:

1 Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion J. Science,

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0015 - 03

丙烯酰胺对人白血病细胞 HPRT 位点的影响

刘胜学,曹佳,安辉,周紫垣,孙华明

(第三军医大学预防医学系分子毒理实验室,重庆 400038)

摘要:目的:为了研究丙烯酰胺(AA)对人白血病 HL - 60 细胞 HPRT 位点的影响作用。方法:本研究采用 AA 水溶液对 HL - 60 细胞进行浓度梯度染毒,不同时间点进行单细胞微孔接种,在含 6 - TG 培养基中筛选突变细胞,计数阳性克隆,测定接种存活率、克隆效率和突变频率。结果:AA 染毒细胞的突变频率在处理剂量范围内具有明显的剂量 - 反应关系,在最高剂量组 (700 μ g/ml) 才有明确的致 HPRT 基因突变作用,同时发现 AA 染毒细胞的克隆效率随着剂量增加有轻度升高,这一现象可能与 AA 较强的细胞毒性有关。结论:AA 具有较弱的基因损害能力。

关键词:丙烯酰胺;HPRT 基因;致突变作用;HL - 60 细胞

中图分类号:TK730.2; 0357.5

文献标识码:A

EFFECTS OF ACRYLAMIDE ON HPRT GENE OF HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS

LIU Sheng-xue, CAO Jia, AN Hui, ZHOU Zi-yuan, SHUN Hua-min

(Department of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Purpose:** To investigate the effects of Acrylamide(AA) on the HPRT gene of human promyelocytic leukemia cells. **Methods:** HL - 60 cells were infected with AA with different concentrations and put into single - cell wells at different time phases. Then the numbers of positive wells were counted and the cell plating efficiency, cloning efficiency and mutation frequency were determined. **Results:** the cell mutation frequency was positively correlated to the concentration. When the dose of AA rose up to the top (700 μ g/ml), there was clear

- 1985,227(4685):375 - 381.
- 2 Sagripanti JL, Kraemer KH. Site - specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1989,264(3):1729 - 1734.
- 3 翁玉椿,王秀平,卢泳才,等. 细胞和细胞膜内过氧脂质的微量定量. *细胞生物学杂志*,1985,7(3):142 - 144.
- 4 陈勤. 抗衰老研究实验方法 M. 第1版. 北京:中国医药科技出版社,1996. 476 - 483.
- 5 Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B, et al. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *J Arch Biochem Biophys*,1991,285(2):317 - 324.
- 6 Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao Bingchun, et al. Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide - treated mammalian cells. *J Arch Biochem Biophys*, 1991,285(2):388 - 390.
- 7 张海涛,祝其锋,莫丽儿,等. GC/FID 检测 HL - 60 细胞 DNA 中氧化损伤产物 8 - 羟基鸟嘌呤的研究. *色谱*,1999,17(3):262 - 264.
- 8 Michaels ML, Tchou J, Grollman AP, et al. A repair system for 8 - oxo - 7,8 - dihydrodeoxyguanine. *J Biochemistry*, 1992,31(45):10964 - 10968.

收稿日期:1999 - 04 - 04;修订日期:1999 - 07 - 04

基金项目:重庆市应用基础研究项目

作者简介:刘胜学(1969 -),男,山东省沂水县人,讲师,硕士,毕业后一直从事突变研究。