

## 过氧化氢与细胞生长状态的剂量反应关系研究

杨瑞华 海春旭 李瑞珍 吴端宗

第四军医大学军队卫生学教研室 西安 710032

**摘要** 正常生物体内的自由基产生和清除是处在平衡状态的,另一方面,外界环境中存在着多种形式的自由基,其性质活泼,易与体内多种物质发生化学反应,与内源性自由基一起影响着细胞的生长、分化及死亡过程,在肿瘤的发生发展中起一定作用。本实验结果表明,过氧化氢与细胞生长状态之间存在剂量—反应关系,低浓度的过氧化氢( $15\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液)作用可刺激细胞增殖,在 $50\text{--}100\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液浓度范围内引起细胞凋亡样改变,而当浓度大于 $100\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液时,则可直接导致细胞坏死。本研究结果为进一步探讨人为施加干预,定向诱导细胞生长状态发生变化提供了有意义的资料,为肿瘤的防治研究提供了一个新的思路。

**关键词** 过氧化氢; 凋亡; 剂量—反应关系

简便、快速、重复性好的优点<sup>(6)</sup>。在已知的致癌物中,95%在该试验中呈阳性<sup>(7-9)</sup>。此外,选用人肝细胞培养物还可避免所涉及的前致癌物新陈代谢路径的种间差别<sup>(10)</sup>,利用人肝细胞进行UDS试验被国外许多学者采用。

从本研究结果看,糖水浓缩物浓度为 $0.05\text{mg}/\text{ml}$ 时,与对照组相比无显著差异,但当浓度达到 $0.10\text{mg}/\text{ml}\text{--}1.00\text{mg}/\text{ml}$ 时则可诱导人肝细胞UDS反应,即显示出对DNA的损伤,且表现出一定的剂量—效应关系。这提示塘水中存在有基因毒性物质,其达到一定浓度时,即对人肝细胞DNA造成损伤。综合本研究结果与作者近年来的研究结果提示:肝癌高发区的居民很可能因塘水中的基因毒性物质而使肝脏受到潜在的损伤,而长期饮用污染的塘水则可能使损伤积累而使肝癌发生机率大为提高。本研究的结果为饮水污染与肝癌成因理论提供了进一步的实验室佐证。

### 参考文献

1. 张丽生,杨克政,侯家龙,等.肝癌高发区水体污染的微核效应及其致癌危险性研究.癌症,1988,7(1):1.

2. 梁干旺,梁任祥,黄飞文,等.饮水类型与肝癌关系的流行病学调查.癌症,1987,6(3):177.
3. Yu SC. Drinking water and primary liver cancer in Tang ZY (ed). Primary liver cancer. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 30-37.
4. 张力图,黄少珍,郭建霞,等.肝癌高发区不同饮食类型人群的外周血淋巴细胞染色体畸变分析.广西医学院学报,1993,10(1):33.
5. 黄少珍,张丽生,张力图,等.饮水类型及主食粮结构不同对肝癌高发区人群外周血淋巴细胞SCE的影响.广西医学院学报,1992,9(1):24.
6. Althaus FR, Lawrence SD, Sattler GL, et al. Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogens. *Cancer Res*, 1982; 42: 3031.
7. Williams GM. Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat primary cell cultures. *Cancer Res*, 1977; 37: 1845.
8. Williams GM, Laspia MF, Dunkel VC. Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of code carcinogens and noncarcinogens. *Mutat Res*, 1982; 97: 359.
9. Lonati GM, Lohman PHM, Berends F. The validity of the autoradiographic method for detecting DNA repair synthesis in rat hepatocyte in primary culture. *Mutat Res*, 1983; 113: 145.
10. Curtis CH. Human tissues and cells in carcinogenesis research. *Cancer Res*, 1987; 47: 1.

# DOSE - RESPONSE RELATIONSHIP BETWEEN CELL PROLIFERATION AND HYDROGEN PEROXIDE

Yang Ruihua, Hai Chunxu, Li Ruizhen, Wu Duanzong

Department of Military Hygiene, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

**Abstract** Production and scavage of free radicals keep balance in normal living cells, on the other hand, free radicals in environment reacted with a lot of substances of body because of their active character, they can affect on the process of cell division, differentiation and death. Both endogenous and exogenous free radicals relate to division, differentiation and death of tumor cells. This experimental result demonstrated that apoptosis related to hydrogen peroxide and dose-response relationship was found. At lower concentration of hydrogen peroxide (15 μmol/10ml medium), it can be effective to stimulate the grow of cells. Apoptotic cell was took place in range of 50- 100 μmol/10ml medium. At the higher level of hydrogen peroxide (> 100 μmol/10ml medium), necroses of cells occurred. Study on dose-response relationship supplied materials for perform active interference to induce the living state of cells and gave a new way to prevent and treat of tumor.

**Key words** hydrogen peroxide; apoptosis; dose-response relationship

细胞的死亡有两种不同的方式,即细胞坏死和细胞凋亡<sup>(1)</sup>,细胞坏死可看作是细胞的意外死亡,在细胞受到急性损伤时,线粒体的形态和功能首先发生改变,继而细胞膜受损,失去调节渗透压的能力,细胞自身稳定失衡,发生肿胀、破裂,内容物漏出,导致周围组织发生炎症。细胞凋亡则是一种特殊类型的受基因调控的细胞死亡过程,又称为程序性细胞死亡(programmed cell death PCD)或生理性细胞死亡(physiological cell death PCD),是一种细胞“自杀”现象,凋亡细胞体积迅速减少,细胞表面卷曲,起泡,DNA在内源性核酸内切酶作用下裂解为180—200bp及其整倍数的片段,核膜高度皱折,染色质分散到核膜皱折中,并排出到胞浆形成微核,细胞膜表面形成泡状并分离出内含物形成凋亡小体,凋亡过程中细胞膜仍保持完整,具有排斥台盼蓝的能力,并不引起炎症反应<sup>(1-5)</sup>。

凋亡可使体内失去生物活性的细胞或生理上不需要的细胞,如一些陈旧的,衰老的,受损伤的或癌前变的细胞,以有序的方式被清除,从而维持组织中的细胞生成(有丝分裂)与细胞死亡(凋亡)之间的平衡。近年对肿

瘤的研究表明,肿瘤发生与细胞凋亡有着密切的关系,应该说,肿瘤不仅是细胞增殖和分化异常的疾病,同时也是凋亡异常的疾病。细胞生物学研究表明,肿瘤的发生、发展与自由基及其清除剂有关,一般的说,肿瘤细胞膜的多不饱和脂肪酸含量低于正常细胞,某些抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD),特别是含锰SOD及过氧化氢酶(CAT)活性很低;正常细胞经活性氧作用后,c-fos,c-myc等原癌基因表达增强,导致细胞恶性分裂<sup>(6)</sup>,同时,活性氧也影响细胞的凋亡过程,Burdon等<sup>(7)</sup>研究证明SOD和CAT可诱导中国仓鼠和大鼠成纤维细胞及Hela细胞发生凋亡,但也有实验表明活性氧诱导细胞凋亡,并可受到抗氧化剂的抑制<sup>(8,9)</sup>。

## 材料和方法

### 1. 细胞培养及处理方法

1.1 选用CEM白血病细胞,RPMI1640培养液,含10%小牛血清,37 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养。

1.2 细胞分组:共分五组:一组为对照组,二—五组为实验组,各组加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量如下:

- 一组加  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0\mu\text{mol}/10\text{ml}$  全培养液;
- 二组加  $\text{H}_2\text{O}_2$   $15\mu\text{mol}/10\text{ml}$  全培养液;
- 三组加  $\text{H}_2\text{O}_2$   $50\mu\text{mol}/10\text{ml}$  全培养液;
- 四组加  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100\mu\text{mol}/10\text{ml}$  全培养液;
- 五组加  $\text{H}_2\text{O}_2$   $200\mu\text{mol}/10\text{ml}$  全培养液。

1.3 细胞离心, 洗涤, 以相同细胞数  $2 \times 10^5$  接种于各培养皿中,  $37^\circ\text{C}$  培养 30min 后取出加入过氧化氢, 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  继续培养 72h, 收集细胞进行指标测定。

## 2 细胞计数<sup>(10)</sup>

### 2.1 细胞总数

取培养细胞液 1ml,  $4^\#$  针头过滤制备单细胞悬液, 血细胞计数板计数, 计算细胞浓度:  $4 \text{ 大格细胞数}/4 \times 10,000 \times \text{稀释倍数} = \text{细胞数}/\text{毫升原液}$

### 2.2 活细胞计数

取细胞悬液和 0.4% 台盼蓝染液 (9:1 V/V) 混合后 4min 计数, 计算活细胞率:  $\text{活细胞率} = \text{活细胞数}/(\text{活细胞数} + \text{死细胞数}) \times 100\%$

## 3 生化指标测定

细胞粉碎液制备:  $1 \times 10^6/\text{ml}$  细胞悬液超声粉碎 1min。

### 3.1 超氧化物歧化酶活性测定: NBT 羟胺法<sup>(11)</sup>

试剂:  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  缓冲液 (pH 10.2), 75mM (含 0.15mM EDTA); TritonX-100 (0.3% V/V); NBT (四硝基唑蓝) 0.98mM; 3mM 盐酸羟胺; 甲酸 (AR)。

步骤: 取细胞粉碎液  $100\mu\text{l}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  缓冲液 2.0ml, TritonX-100 0.2ml, NBT 0.1ml, 混匀, 加盐酸羟胺 0.2ml, 充分混匀, 置  $37^\circ\text{C}$  振荡水浴反应 15min, 并以双蒸水代替细胞粉碎液作为非酶反应对照, 加入甲酸 1.0ml 终止反应, 590nm 比色定量。以抑制 50% 为一个酶活性单位 ( $\text{U}/10^5$  个细胞)。

### 3.2 过氧化氢酶测定: 钼酸铵法<sup>(12)</sup>

试剂:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 7.6) 50mM; 0.5M  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 0.5M 硫酸;

6% 柠檬酸; 1% 钼酸铵。

步骤: 取细胞粉碎液  $100\mu\text{l}$ , 加  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液  $800\mu\text{l}$  (同时作非酶对照),  $5^\circ\text{C}$  水浴 5min, 加 0.5M  $\text{H}_2\text{O}_2$   $100\mu\text{l}$ , 摇匀, 反应 5min, 加 0.5M 硫酸 1.0ml, 终止反应。加柠檬酸 1.0ml, 1% 钼酸铵 1.0ml 显色, 摇匀, 365nm 比色。用标准过氧化氢酶作曲线, 查曲线图定量。

### 3.3 丙二醛 (MDA) 含量测定: 八木国夫荧光法<sup>(13)</sup>

试剂: 1/24M 硫酸; 10% 磷钨酸; 0.67% 硫代巴比妥酸 (TBA) (稀释液醋酸: 水 = 1:1); 正丁醇 (AR)。

步骤: 取细胞粉碎液  $100\mu\text{l}$  于 10ml 试管, 加 4.0ml 硫酸摇匀, 置 5min 后加 0.5ml 磷钨酸, 摇匀, 2000r/min 10min 离心, 弃上清, 试管倒置 3min, 吸尽管口残液, 加 2.0ml 硫酸摇匀, 置 5min 后加 0.3ml 磷钨酸, 摇匀, 2000r/min 10min 离心, 弃上清, 试管倒置 3min, 吸尽管口残液, 加 1.0ml 三蒸水, 1.0ml TBA。(设置空白和丙二醛标准管), 加盖,  $100^\circ\text{C}$  水浴 1h, 流水冷却, 加 3.5ml 正丁醇, 摇匀, 3000r/min 5min 离心, 取上层醇相 3.0ml, 515nm/552nm 荧光测定, 计算样品丙二醛含量。

### 4 细胞周期, DNA 含量及凋亡状态测定: 流式细胞技术

#### 4.1 碘化丙啶染液配制 (PI):

PI 5mg, RNAse 2mg, TritonX-100 0.1ml, 柠檬酸钠 100mg, 生理盐水 65ml, 加三蒸水至 100ml, 调 pH 7.6,  $4^\circ\text{C}$  避光保存。

4.2 步骤: 细胞悬液加 4 $^\#$  预冷的 70% 酒精 (3:1 V/V) 4 $^\#$  固定 30min, 磷酸盐缓冲液 (PBS pH 7.6) 漂洗两次 (1500r/min 5min 离心), 调细胞数  $3 \times 10^6/\text{ml}$ , 加 PI 染液 1.0ml,  $4^\circ\text{C}$  30min。

## 结 果

### 1. 细胞生长情况 (表 1)

表 1. 细胞计数及台盼蓝染色结果

组别	1	2	3	4	5
细胞总数( $\times 10^3$ )	2.6 $\pm$ 3.51	13.9 $\pm$ 2.45*	2.7 $\pm$ 8.23	1.9 $\pm$ 7.07*	1.5 $\pm$ 4.58*
活细胞率(%)	93.1	81.1	71.4	64.1	55.7

\* 表示  $t$  检验  $P < 0.01$ , 下表同。

与对照组相比, 二组细胞生长迅速, 三组细胞数与对照组无明显差别, 但是死细胞增多, 四组、五组细胞比对照组细胞数减少, 且

活细胞率很低。

2 生化指标测定结果(表 2)

表 2 各组细胞生化指标测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1	2	3	4	5
SOD(U/10 <sup>3</sup> )	0.26 $\pm$ 0.0	21.08 $\pm$ 0.06*	0.99 $\pm$ 0.01*	1.29 $\pm$ 0.17*	1.75 $\pm$ 0.03*
CAT(ng/10 <sup>3</sup> )	44.91 $\pm$ 2.26	44.53 $\pm$ 1.85	45.09 $\pm$ 2.52	48.38 $\pm$ 0.53	48.94 $\pm$ 0.53
MDA(nM/10 <sup>3</sup> )	15.68 $\pm$ 0.08	73.29 $\pm$ 0.76*	79.08 $\pm$ 0.93*	111.68 $\pm$ 0.67*	145.60 $\pm$ 0.75*

由表 2 看出, 各组细胞 SOD 含量和 MDA 含量与对照组相比均有显著差异, 尤其在四组、五组即过氧化氢剂量较大时升高

十分明显。

3 细胞周期, DNA 含量及凋亡状态测定(图 1—5)

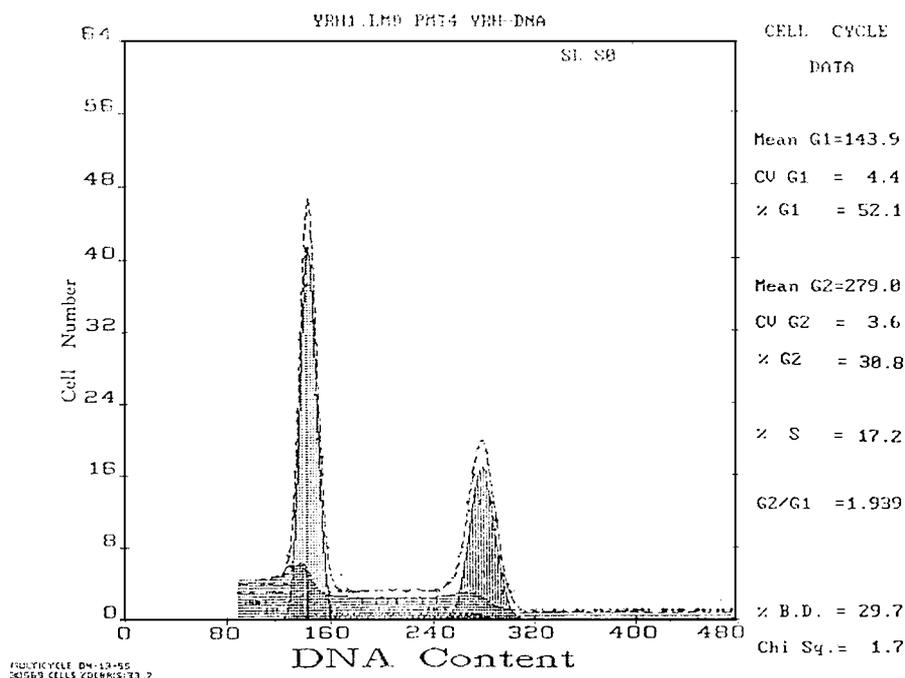


图 1. 一组流式细胞测定结果

流式细胞技术测定结果表明: 二组细胞 DNA 合成旺盛, S 期细胞比例增加, 三组细胞增殖也较旺盛, 同时出现了凋亡峰, 剂量增

大到  $100\mu\text{mol}/10\text{ml}$  培养液时, 细胞分裂无明显影响, 凋亡增强, 五组细胞则出现了大量的细胞碎片。

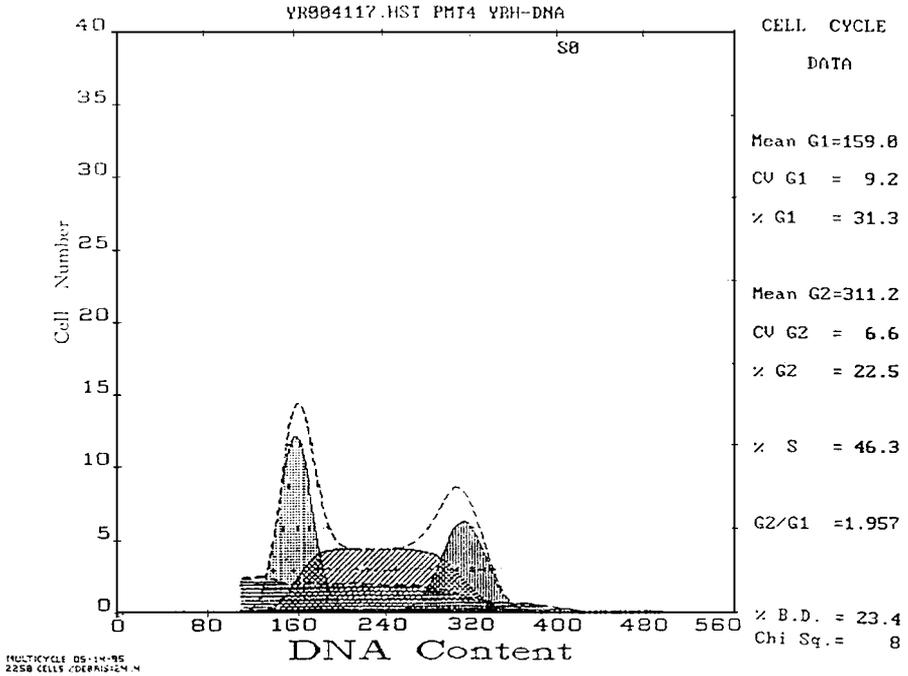


图 2. 二组流式细胞测定结果, DNA 合成旺盛, S 期细胞比例增加, 说明低浓度过氧化氢可以强烈刺激细胞增殖

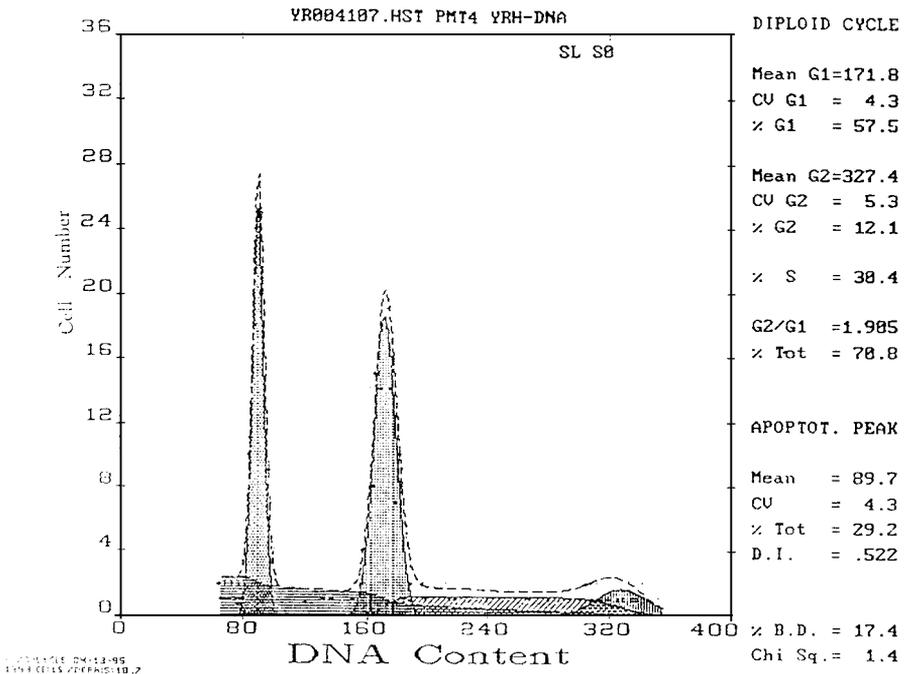


图 3 三组流式细胞测定结果, DNA 合成也较旺盛, 同时出现了凋亡峰

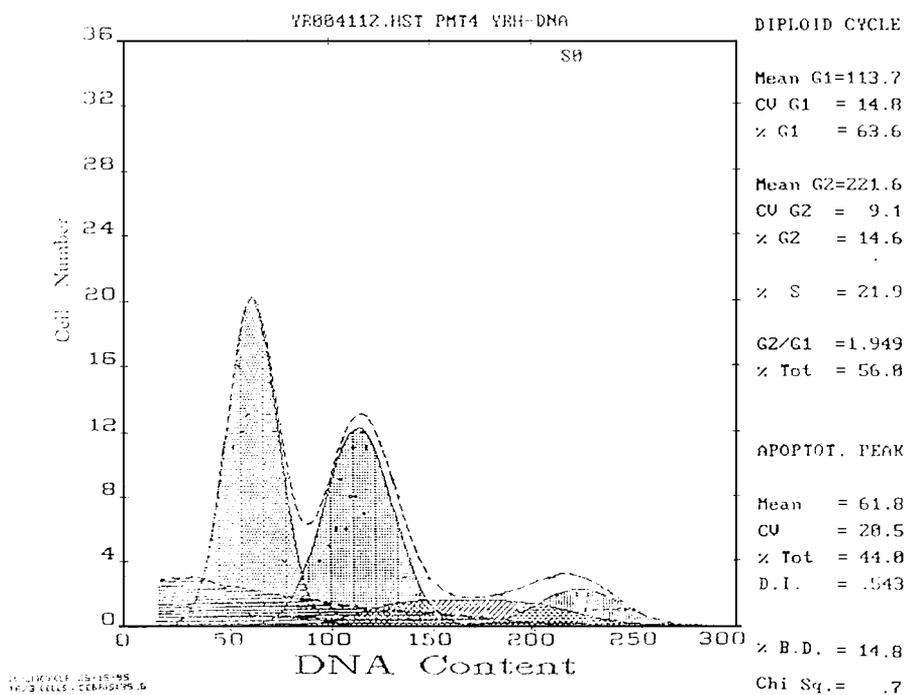


图 4. 四组流式细胞测定结果,S期细胞比例与对照组大致相同,凋亡峰增高

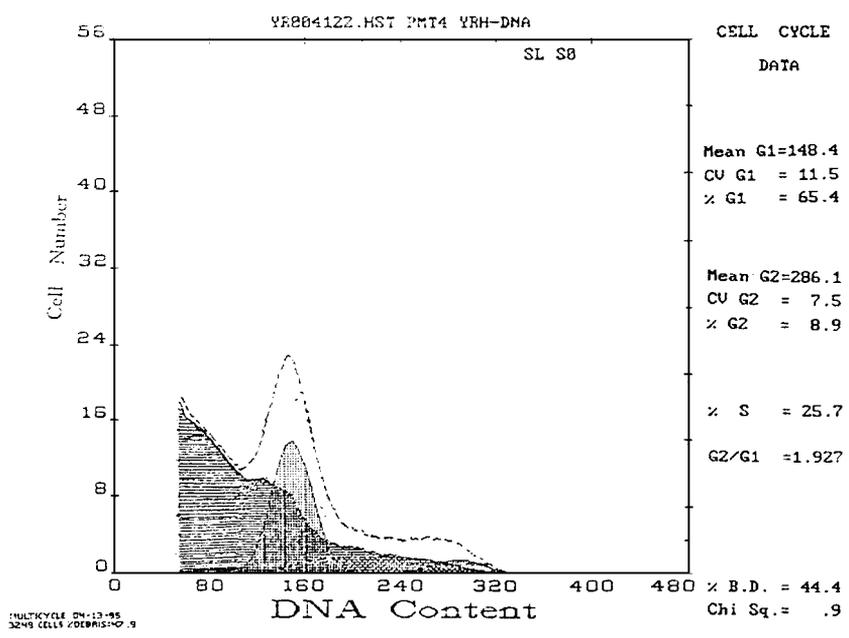


图 5 五组流式细胞技术测定结果,细胞分裂无明显影响,细胞碎片大量增加

## 讨论

### 1. 低浓度过氧化氢具有细胞丝裂原的作用

Burdon<sup>(7)</sup>的研究表明过氧化氢同超氧阴离子一起在细胞间起着“信息联络”的作用,从而保持细胞的正常生命状态,过氧化氢是细胞维持生存的必需物质之一。本实验表明,低浓度(15 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液)过氧化氢作用可以强烈刺激细胞增殖,作用72h后收集细胞计数,二组细胞数远远大于对照组,流式细胞仪测定结果表明二组细胞DNA合成增强,S期细胞比例增加,说明低剂量过氧化氢具有丝裂原的作用,可刺激细胞增殖。结果提示,过氧化氢在体内生理状况下存在并发挥其作用,当受到外界环境影响而增高时,即有可能是引起细胞的大量增殖而导致肿瘤发生的重要机理之一。

### 2. 适量过氧化氢可诱导细胞凋亡

实验第三、第四组均表明,一定剂量(50—100 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液)过氧化氢可诱导细胞发生凋亡,三组显示细胞DNA合成增加,细胞分裂增强,同时凋亡峰出现,说明过氧化氢诱导细胞增殖同时可诱导凋亡。继续增加作用剂量,即四组则表明过氧化氢有诱导细胞发生凋亡的作用,其分裂增殖情况与对照组大致相同,凋亡峰较三组增高,培养72h后,细胞数较对照组略有减少,且活细胞率降低,细胞碎片增加,说明在较大剂量时已有细胞毒性的表现,即在100 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液作用剂量下,已有部分细胞呈现坏死。

### 3. 大剂量过氧化氢对细胞的毒性作用

当作用剂量增大至200 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液时,细胞发生坏死,细胞数减少,死细胞大量增加,碎片占据了细胞总数的一半,同时,脂质过氧化指标丙二醛含量远远超过对照组,说明过氧化氢攻击细胞脂质从而使膜结构遭到破坏,通透性增强可能是活性氧细胞毒性作用的机制之一。同时,实验各组SOD含量均较对照组增高,说明SOD是一种诱导酶,在过氧化氢刺激时,SOD水平增高清除超氧阴离子自由基,是细胞的一种保护反应。

## 小结

本实验通过对过氧化氢与细胞状态的剂量—反应关系的研究证明了以往文献报道中有关活性氧研究的部分结论,过氧化氢对细胞的作用的确有剂量—反应关系,且剂量的变化会导致细胞生命状态的较大差异,这种现象与外源化学物质作用于机体的毒性表现十分相似,在一定剂量范围内,外源毒性物质作用于细胞并不直接杀死细胞,而只是引起细胞损伤,使这些细胞获得了激活内在程序性自杀机制的能力,最终导致细胞凋亡,以保护整个机体的正常状态,较高剂量的外源毒物作用可直接引起细胞坏死,引起周围组织炎症反应。细胞凋亡可看作是细胞在遭受毒物侵害时维持“正常”的负荷状态,而当毒物作用超过细胞负荷能力时,它便会像机体发病那样表现出“病态”——坏死,从而引起一系列的继发损害。本研究表明,过氧化氢对细胞有明显的影响,在15 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液时刺激细胞生长,50—100 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液范围内可诱导细胞凋亡,大于100 $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ 培养液则可直接引起细胞坏死,这种剂量—反应关系进一步证实可以利用过氧化剂或抗氧化剂定向引导细胞发生变化,尤其是在肿瘤发生、发展及肿瘤的防治中,许多抗肿瘤药物作用的缺点在于肿瘤耐药性增加和杀死肿瘤细胞的同时也大量地损伤了正常的组织细胞,而这些缺点也与自由基种类和含量变化相关<sup>(14)</sup>。剂量—反应关系的研究则为通过采用一定剂量的药物作用于肿瘤细胞从而有效的控制药物杀伤细胞的能力,避免肿瘤细胞坏死的继发反应损伤正常细胞,提高药物的抗肿瘤特异性提供了一个新的思路。

## 参考文献

1. Kerr JER, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer*, 1972; 26: 239.
2. 李正银, 赵法仁, 郭俊生. 细胞凋谢及其生物学作用与卫生学研究. 国外医学卫生学分册, 1995; 22(1): 1.
3. 李先根, 欧阳仁荣. 调控白血病细胞程序性死亡的相关基

## $\beta$ 胡萝卜素和叶绿酸对DMBA 诱发大鼠乳腺癌的影响

郑一凡 朱心强 黄幸纾

浙江医科大学毒理研究室 杭州 310006

**摘要** 50天龄雌性SD大鼠随机分为4组,每组25只。I组每只大鼠一次灌胃给予DMBA 10mg; II组给DMBA 前饮水中加CHL 1.5mmol/L,持续1wk; III组给DMBA 后饲料中加BC 90mg/kg 饲料,持续到实验结束; IV组给DMBA 前后分别给CHL 和BC。结果各组的肿瘤发生率分别为50.0%, 33.3%, 18.3%和17.4%。给BC组肿瘤发生率低于对照组( $P < 0.05$ ),而单给CHL组的肿瘤发生率与对照组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ),CHL与BC合用组肿瘤发生率与III组相似。说明BC确有抑制DMBA 诱发乳腺癌的作用,而CHL单用对DMBA 的致癌作用无明显抑制,CHL与BC合用也无协同或相加作用。

**关键词**  $\beta$ 胡萝卜素; 叶绿酸; 二甲苯蒽; 乳腺癌

## EFFECTS OF $\beta$ - CAROTENE AND CHLOROPHYLL IN ON INCIDENCE OF MAMMARY TUMOR INDUCED BY DIMETHYLBEN(A) ANTHRACENE IN RAT

Zheng Yifan, Zhu Xinqiang, HuangXingshu

Department of Toxicology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006

**Abstract** The effect of  $\beta$ Carotene (BC) and chlorophyllin (CHL) on incidence of mammary tumor induced by dimethylben(a)anthracene (DMBA) in rats were investigated, 50 days old female Sprague Dawley rats were randomly divided into 4 groups with 25 in each. Rats in group I were administered with DMBA 10mg/rat dissolved in corn oil by gavage. Rats in

因研究现状 国外医学输血及血液学分册, 1995; 18 (3): 151.

- 4 闫水忠, 赵晓航, 吴 . 细胞凋亡与癌基因 生物化学与生物物理进展, 1994; 21 (3): 222
- 5 John Cohen J. Apoptosis *Immunology Today*, 1993; 14 (3): 126
- 6 Cerutti P, Larsson R, Krupitza G, et al. Pathophysiological mechanisms of active oxygen. *Mutat Res*, 1989; 214 (1): 81.
- 7 Burdon RH, Gill V. Cellularly generated active oxygen species and HeLa proliferation. *Free Radic Res Commun*, 1993; 19: 203
- 8 Forrest VJ, Kang Y, Main DE, et al. Oxidative stress induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic Biol Med*, 1994; 16: 675
- 9 Lennon SV, Martin SJ, Cotter JG. Dose-dependent in-

duction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli *Cell Prolif*, 1991; 24: 203

- 10 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1990, 118—119
- 11 Kono Y, Takahashi MA, Asada K. Oxidation of manganous pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplasts *Arch Biochem Biophys*, 1976; 174: 454.
- 12 董泗建, 刘昌玲, 孙曼霁. 一种测定过氧化氢酶的新方法 军事科学院院刊, 1995; 19 (2): 130
- 13 Yagi K. Determination assay of lipid peroxide in serum and significances in clinics *Clinical Pathology* (in Japanese), 1981; 29: 221-224
- 14 竺扬文综述, 胡汛审校. 多耐药基因 国外医学分子生物学分册, 1992; 14 (5): 232