

• 实验研究 •

溴氰菊酯对 γ -GCS 活力和谷胱甘肽含量影响*

李煌元^{1,2} 吴思英³ 石年¹

摘要:目的 探讨溴氰菊酯(DM)对 PC12 细胞 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)活力和谷胱甘肽(GSH)含量的影响。方法 用 0、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理 PC12 细胞 6 或 12 h 后用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞毒性;用 0、10、100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理 PC12 细胞 6 或 12 h 后,超速离心分离细胞胞质碎片,邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生高效液相色谱(HPLC)荧光法检测组织中 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量。结果 100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理细胞 6、12 h 的细胞存活率为(0.862 ± 0.053)、(0.746 ± 0.101),均低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);与对照组 γ -GCS 酶活力(1.78 ± 0.26) pmol/10⁶ 细胞·min 比较,10、100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理细胞 6 h 组 γ -GCS 酶活力为(1.66 ± 0.20)、(1.73 ± 0.09) pmol/10⁶ 细胞·min,差异均无统计学意义;与对照组 GSH 含量(10.18 ± 0.23) pmol/10⁶ 细胞比较,10、100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理细胞 6 h GSH 含量为(10.19 ± 1.18)、(10.26 ± 0.29) pmol/10⁶ 细胞,差异均无统计学意义;与对照组 γ -GCS 酶活力(1.94 ± 0.19) pmol/10⁶ 细胞·min 和 GSH 含量(9.57 ± 0.39) pmol/10⁶ 细胞比较,10 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理细胞 12 h 组 γ -GCS 酶活力(1.73 ± 0.21) pmol/10⁶ 细胞·min 和 GSH 含量(9.72 ± 0.41) pmol/10⁶ 细胞差异均无统计学意义,100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理细胞 12 h 组 γ -GCS 酶活力(1.62 ± 0.09) pmol/10⁶ 细胞·min 差异有统计学意义($P = 0.006$)。结论 较高浓度的 DM 处理细胞较长时间才抑制 γ -GCS 酶活力,可能与 DM 的细胞毒性作用有关。

关键词: 溴氰菊酯(DM); γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS); 谷胱甘肽(GSH); 邻苯二甲醛柱前衍生高效液相色谱荧光法

中图分类号: R 994

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)12-1587-03

Effect of deltamethrin on gamma-glutamylcysteine synthetase activity and reduced glutathione content

LI Huang-yuan*, WU Si-ying, SHI Nian* (Department of Occupational and Environmental Health, Institution of Environmental and Health School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province 350004, China)

Abstract: Objective To explore the effect of deltamethrin (DM) on gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) activity and reduced glutathione (GSH) content in PC12 cells. **Methods** PC12 cells were treated with 0, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ DM for 6 hours or 12 hours, respectively. Cytotoxicity of DM on PC12 cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The cytosolic fraction of PC12 cells was used to determine reduced glutathione (GSH) content and γ -GCS activity by reversed-phase high performance liquid chromatographic assay with o-phthalaldehyde pre-column derivatization. **Results** The survival rate of PC12 cells treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ DM for 6 hours or 12 hours was lower than that of control group ($P < 0.01$, $P < 0.001$). In PC12 cells treated for 6 hours, there was no effect on γ -GCS activity and GSH content. In PC12 cells treated for 12 hours, there was no difference in γ -GCS activity and GSH content between low concentration and control group. The γ -GCS activity of the high concentration group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** These findings demonstrate that γ -GCS activity in PC12 cells could be inhibited by high concentration of DM treatment for a long time.

Key words: deltamethrin; gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS); GSH; o-phthalaldehyde pre-column derivatization

溴氰菊酯(deltamethrin, DM)是一种广泛使用的高效低毒的拟除虫菊酯类农药之一。本研究前期的研究结果表明氧化应激是 DM 神经毒性的机制之一^[1-2]。DM 处理能诱导大鼠海马组织自由基和 PC12 细胞活力氧生成^[3]。谷胱甘肽(glutathione,

GSH)是一种非蛋白巯基化合物,在细胞内保护中起重要作用。目前拟除虫菊酯对 GSH 合成和利用的生化酶影响的研究较少。本研究采用高效液相色谱检测方法同时测定 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcysteine synthetase, γ -GCS)活力和 GSH 含量,了解低剂量 DM 短期处理大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞对其 γ -GCS 活力和 GSH 含量的影响,进一步探讨 DM 致氧化应激的机制,为 DM 中毒防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 DM(法国罗素·优克福公

* 基金项目: 国家自然科学基金(30371225; 30800936)

作者单位: 1. 福建医科大学公共卫生学院环境与健康研究所职业与环境卫生学系, 福建 福州 350004; 2. 华中科技大学同济医学院卫生毒理学系, 教育部环境与健康重点实验室; 3. 福建医科大学公共卫生学院环境与健康研究所, 流行病学与卫生统计学系

作者简介: 李煌元(1973-), 男, 福建龙岩人, 副教授, 博士, 研究方向: 神经毒理学。

通讯作者: 石年, E-mail: snian@mails.tjmu.edu.cn

司 (纯度 98.5%) ; γ -谷氨酰半胱氨酸 (γ -polyglutamic acid γ -GC)、GSH 标准品 (色谱纯)、L-半胱氨酸和邻苯二甲醛 (美国 Sigma 公司); 谷氨酸 (Glu, 色谱纯, 美国 BDH 公司); 低糖型达尔伯克改良伊格尔 (Dulbocco's modified eagle's medium, DMEM) 培养基 (美国 Hyclone 公司); 小牛血清 (武汉三利生物公司)。VARIAN Prostar 高效液相色谱仪、荧光检测器、自动进样器 (美国 VARIAN 公司); ANASTAR 色谱工作站软件分析系统、反相色谱柱 (Hypersil ODS2 5 μ mol/L 4.6 mm \times 250 mm, 大连依利特分析仪器有限公司); 保护柱芯 (粒度 5 μ m, 4.6 mm \times 10 mm, 江苏汉邦科技有限公司); 高速离心机 (CR-21G) (CP-80MX) (日本日立公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 PC12 细胞培养 PC12 细胞生长于低糖型的 DMEM 细胞培养基 (添加 3.5 g/L 葡萄糖和 3.7 g/L 碳酸氢钠, 含 10% 体积分数的小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素) 中, 培养细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中, 隔天换液。接种细胞于 6 孔板中, 细胞密度约 3 ~ 5 \times 10⁵ 个/孔。用 D-Hanks 液洗涤细胞 2 遍, 换用无血清的 DMEM 培养基, 进行细胞处理。

1.2.2 细胞毒性检测 取对数生长期的 PC12 细胞以 5 \times 10⁴ 个/孔密度接种于 96 孔板中, 随机分为对照组、1、10 和 100 μ mol/L DM 组。DM 处理细胞 6 或 12 h 后参照文献 [4] 检测细胞毒性。DM 对细胞的毒性作用 (存活率) 以吸光度相对比 ($A_{\text{给药组}}/A_{\text{对照组}}$) 表示。

1.2.3 PC12 细胞分组及处理 细胞接种于 6 孔板培养板内 (密度为 5 \times 10⁵ /孔) 细胞随机分为对照组、10 和 100 μ mol/L DM 组。细胞处于对数生长期时用 D-Hank 液清洗 2 遍、换无血清的 DMEM 培养基, 各组分别给予相应的试剂作用 6 或 12 h 后用冰冷的 D-Hank 液清洗 2 遍、加入 0.5 mL 预冷的细胞裂解基质液, 吹打细胞转移至试管中, 再用 0.5 mL D-Hank 液清洗培养孔转移至试管中, 置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.2.4 PC12 细胞胞质碎片分离 测定时解冻后, 用细胞破膜仪在冰浴中破碎细胞 (每次 10 s, 间隔 5 min 连续 4 次) 4 $^{\circ}$ C 14 000 g 离心 20 min, 分离上清。

1.2.5 组织中 γ -GCS 活力和 GSH 含量 邻苯二甲醛柱前衍生高效液相色谱荧光法检测 参照 Yan 等 [5] 的方法, 适当改进。细胞质 γ -GCS 活力测定基于孵育体系 γ -GC 的形成。 γ -GC 的形成用邻苯二甲醛衍生定量, 并用来表示 γ -GCS 酶活力。细胞胞质上清碎片 200 μ L 加入含有 200 μ L 质量分数为

5% 的磺基水杨酸的 Eppendorf 管, 振荡混合后立即放置冰上数分钟, 12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 8 min 沉淀蛋白。上清用于测定 GSH 含量。ODS2 C₁₈ 色谱柱, 分析柱前接保护柱。荧光检测器激发波长 340 nm、发射波长 430 nm 柱温维持在室温。流动相 (pH = 3.9) 为甲醇 (色谱纯): 体积分数为 0.25% 的冰醋酸 = 18:82。ANASTAR 色谱工作站记录并分析, 峰面积外标法定量。

1.3 统计分析 采用 SPSS 18.0 软件进行方差分析和最小显著差法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别 PC12 细胞存活率 (表 1) 与对照组比较, ≤ 10 μ mol/L 的 DM 处理细胞 6 或 12 h 后细胞存活率无明显变化, 差异均无统计学意义, 而 100 μ mol/L DM 处理 PC12 细胞 6 或 12 h 细胞存活率均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 不同时间各组 PC12 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	6 h	12 h
对照组	1.000 \pm 0.069	1.000 \pm 0.064
1 μ mol/L DM	0.972 \pm 0.104	0.952 \pm 0.124
10 μ mol/L DM	0.923 \pm 0.055	0.921 \pm 0.095
100 μ mol/L DM	0.862 \pm 0.053 ^a	0.746 \pm 0.101 ^b

注: 与对照组比较 ^a $P < 0.01$ ^b $P < 0.001$ 。

2.2 HPLC 方法的建立和标准曲线的制作 OPA 柱前衍生 HPLC 荧光法 γ -GC 和 GSH 出峰时间分别为 5.65、6.21 min 组织中 γ -GCS 活力和 GSH 含量的标准曲线方程为: γ -GC 浓度 (μ mol/L) = 0.220 + 8.859 \times 10⁻⁷ \times 峰面积 ($r = 0.998$); GSH 浓度 (μ mol/L) = 0.189 + 5.784 \times 10⁻⁷ \times 峰面积 ($r = 0.999$)。

2.3 作用 6 h 后各组 PC12 细胞 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量 (表 2) 10、100 μ mol/L DM 处理细胞 6 h 后 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量与对照组比较, 差异均无统计学意义, 提示 10、100 μ mol/L DM 处理 PC12 细胞 6 h 尚未影响 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量。

表 2 作用 6 h 后各组 PC12 细胞 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	γ -GCS 活力 (pmol/10 ⁶ 细胞 \cdot min)	GSH 含量 (pmol/10 ⁶ 细胞)
对照组	1.78 \pm 0.26	10.18 \pm 0.23
10 μ mol/L DM	1.66 \pm 0.20	10.19 \pm 1.18
100 μ mol/L DM	1.73 \pm 0.09	10.26 \pm 0.29

2.4 作用 12 h 后各组 PC12 细胞 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量 (表 3) 10 μ mol/L DM 处理细胞 12 h 后

γ -GCS 酶活力和 GSH 含量与对照组比较, 差异均无统计学意义, 100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理细胞 12 h 组 γ -GCS 酶活力与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P=0.006$), 表明需要较大剂量的 DM 处理细胞较长时间才抑制 γ -GCS 酶活力, 但此时的 GSH 含量仍未见明显的变化。

表 3 作用 12 h 后各组 PC12 细胞 γ -GCS 酶活力和 GSH 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	γ -GCS 活力 ($\text{pmol}/10^6$ 细胞 \cdot min)	GSH 含量 ($\text{pmol}/10^6$ 细胞)
对照组	1.94 \pm 0.19	9.57 \pm 0.39
10 $\mu\text{mol/L}$ DM	1.73 \pm 0.21	9.72 \pm 0.41
100 $\mu\text{mol/L}$ DM	1.62 \pm 0.09 ^a	9.67 \pm 0.37

注: 与对照组比较 $a P < 0.05$ 。

3 讨论

前期研究结果表明, DM 中毒大鼠海马 GSH 水平下降, 大脑皮层中 GSH 水平却升高^[1]; 10、100 $\mu\text{mol/L}$ DM 处理 PC12 细胞 6、12 h 均可增加活力氧生成^[3]。本研究结果表明, 较大剂量 (100 $\mu\text{mol/L}$) 的 DM 处理细胞较长时间 (12 h) 才同时出现细胞毒性和 γ -GCS 酶活力的下降; DM 处理细胞 12 h, DM 抑制 γ -GCS 活力可造成 GSH 合成降低, 但 GSH 含量尚未下降。 γ -GCS 活力抑制与文献 [1] 结果一致, 但 GSH 含量与文献 [1] 结果不一致。

根据前期研究结果^[2]推测, γ -GCS 酶活力抑制与 DM 对 Nrf2/ARE 通路的影响有关。有研究表明, GCS 活力的调节是细胞内 GSH 稳态的主要决定者^[6]。因此, 提示此条件下有其他适应性调节因素参与维持 GSH 尚处于稳态, 具体原因有待于进一步研究。综上所述, 较高浓度的 DM 处理细胞较长时间才抑制 γ -GCS 酶活力, 这可能与 DM 的神经细胞毒性作用有关。

参考文献

- [1] 李煌元, 石年, 陈丹, 等. 溴氰菊酯对大鼠神经系统的氧化应激作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23(2): 97-101.
- [2] 李煌元, 吴思英, 石年. 溴氰菊酯及 6-羟基多巴胺对 PC12 细胞 Nrf2/ARE 通路影响[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(7): 911-913.
- [3] Li HY, Wu SY, Ma Q, et al. The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain[J]. Toxicol Ind Health, 2011, 27(7): 579-590.
- [4] 李煌元, 吴思英, 林炜, 等. 叔丁基对苯二酚对百草枯神经细胞毒性和氧化应激的拮抗作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29(4): 270-274.
- [5] Yan CC, Huxtable RJ. Fluorimetric determination of monobromobimane and o-phthalaldehyde adducts of gamma-glutamylcysteine and glutathione: application to assay of gamma-glutamylcysteinyl synthetase activity and glutathione concentration in liver[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1995, 672(2): 217-224.
- [6] Giordano G, White CC, Costa LG. Assessment of glutathione homeostasis[J]. Methods Mol Biol, 2011, 758: 205-214.

收稿日期: 2011-12-12

(韩仰欢编辑 张翠校对)

• 实验研究 •

腰果主要过敏原 Anao2 基因克隆及原核表达*

刘飞燕, 贾梦阳, 刘志刚, 肖小军, 李建杰, 夏立新

摘要: 目的 克隆腰果主要过敏原 Anao2 基因, 并利用 pMAL-c 表达载体表达该蛋白。方法 提取腰果总 RNA, 设计特异性引物, 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 克隆腰果 Anao2 基因, 将其反转录基因连入 pMD18T simple vector, 提取质粒、双酶切、鉴定并测序; 将测序正确的片段连入原核表达载体 pMAL-c, 将重组质粒转入 BL21 宿主表达菌中, 丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷诱导表达目的蛋白 Anao2。结果 测序结果表明克隆腰果 Anao2 基因片段全长为 1 332 bp, 编码 443 个氨基酸, 与 GenBank 中蛋白序列完全相同; 对获得的重组蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 目的蛋白大小与理论值相符。结论 成功克隆并表达了腰果过敏原 Anao2。

关键词: 腰果; 过敏原; Anao2 基因; 克隆; 表达

中图分类号: R 392.8

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)12-1589-03

Cloning expression purification and characterization of cashew nut allergen Anao2

LIU Fei-yan, JIA Meng-yang, LIU Zhi-gang, et al (Institute of Allergy and Immunology, Medical College, Shenzhen

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30871752); 深圳出入境检验检疫局科技计划项目 (SZ2008105)

作者单位: 深圳大学医学院过敏反应与免疫研究所, 广东 深圳 518060

作者简介: 刘飞燕 (1986-), 女, 河南人, 硕士在读, 研究方向: 蛋白质组学。

通讯作者: 夏立新, E-mail: xialixin@126.com