

富勒烯对人胚肝细胞的氧化损伤

张静姝^{1,*}, 李大鸣², 李云蕊², 王春花¹, 何宁¹, 刘英华¹, 张静¹

1. 天津市疾病预防控制中心毒理室, 天津 300011
2. 天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070

摘要: 为初步探讨富勒烯 (C₆₀)对人体细胞的潜在危害, 以人胚肝细胞 (L-02)为研究对象, 研究富勒烯暴露对人胚肝细胞的氧化损伤。人胚肝细胞暴露于 0.1, 2.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0和 400.0 μg mL⁻¹富勒烯悬液 24 h后, 检测细胞内 CAT活性和MDA与 ROS含量。采用免疫组化法检测 SOD蛋白在富勒烯暴露后细胞内的分布情况; Western blotting法观察富勒烯对人胚肝细胞内 SOD, GSH-Px和 CAT蛋白表达的影响。结果表明, 各实验组中细胞内 CAT活性均有不同程度的降低, 与对照组相比, 差异均具有统计学意义 (P<0.05); 100.0, 200.0和 400.0 μg mL⁻¹富勒烯暴露组细胞内 MDA含量以及 100.0 μg mL⁻¹组细胞内 ROS的含量明显增加, 差异均具有统计学意义 (P<0.05)。随着富勒烯含量的增加, 细胞内 SOD蛋白表达减少且分布不均。同时, 富勒烯降低细胞内 GSH-Px和 CAT蛋白的表达。综合实验结果推测富勒烯引起人胚肝细胞发生氧化损伤可能是通过降低细胞内 SOD, GSH-Px和 CAT蛋白表达水平来实现的。

关键词: 富勒烯 (C₆₀); 人胚肝细胞 (L-02); 氧化损伤

文章编号: 1673-5897(2011) 6-149-05 中图分类号: R994.6 文献标识码: A

Oxidative Damages of Fullerenes on Human Embryo Liver Cells

Zhang Jingshu^{1,*}, Li Daming², Li Yunrui², Wang Chunhua¹, He Ning¹, Liu Yinghua¹, Zhang Jing¹
1. Department of Toxicology, Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China
2. School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Received 20 September 2010 accepted 20 November 2010

Abstract: This study is to determine the potential effects of fullerenes on human body. Treated with 0.1, 2.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 μg mL⁻¹ fullerenes, the oxidative damages of human embryo liver cells were studied. After treated with fullerenes 24 h, the activity of the CAT and the concentration of MDA and ROS were measured. Cellular protein expression of SOD, GSH-Px and CAT were observed by Western blotting and the protein distribution of SOD was detected by immunohistochemistry. The results indicate that CAT decreased in all groups (P<0.05) compared to the control group. Both MDA of 100.0, 200.0, 400.0 μg mL⁻¹ groups and ROS of 100.0 μg mL⁻¹ group increased (P<0.05). With increasing the concentration of fullerenes, the expression of SOD, GSH-Px and CAT protein were inhibited. Considering the above results, a conclusion can be drawn that fullerenes inducing oxidative damages on human embryo liver cells may be through bring down the expression of SOD, GSH-Px and CAT protein.

Keywords: fullerenes; human embryo liver cells; oxidative damages

1 引言 (Introduction) 广泛。而纳米材料的大规模生产和应用对人体健康
随着纳米技术的飞速发展, 纳米材料应用日趋 与生态环境可能产生的安全风险也引起了人们的普

收稿日期: 2010-09-20 录用日期: 2010-11-20
基金项目: 天津市卫生局面上项目 (No. 05KYZ45), 天津市自然科学基金面上项目 (No. N0506)
作者简介: 张静姝 (1975-), 女, 博士, 副研究员; *通讯作者 (Corresponding author, E-mail: rainbow7546@163.com)

遍关注。2003年4月,《Science》首先发表文章讨论纳米材料与生物环境相互作用可能产生的生物效应问题。随后越来越多的研究者开始研究这一亟待解决的热点问题。在众多的纳米材料中,富勒烯作为一种具有多项优异性能的新型纳米材料显示出了极为广阔的应用前景。相应地,人群暴露于富勒烯的危险性就会急剧上升。目前,尽管人们已经开始研究其潜在的危害,但迄今为止还只是起步阶段,且研究结论尚未明了。笔者在前期研究^[1-2]的基础上,进一步研究了富勒烯对人胚肝细胞所造成的氧化损伤。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 主要仪器与试剂

富勒烯(浓度为99.9%,河南永新科技有限公司),1640培养液(美国Gibco公司),胎牛血清与0.25%胰蛋白酶(天津TBD灏洋生物技术有限公司),L-谷氨酰胺(美国Sigma公司),考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒与丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),ROS试剂盒和预染蛋白质分子量标准(江苏碧云天生物技术研究),免疫组化试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),PRO-PREPTM蛋白提取溶液(北京赛百盛基因技术有限公司),goat SOD-1、GPx-1和CAT多抗(美国Santa公司),goat anti-Acan IgG HRP标记兔抗山羊IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),Pro-light HRP化学发光检测试剂(北京天根生化科技有限公司),膜封闭液和PVDF膜(江苏碧云天生物技术研究)。实验中所用化学试剂(如无特别说明)均为分析纯(及以上)试剂。

K70荧光倒置显微镜(日本Olympus公司),TU-1201紫外分光光度计(北京通用仪器设备公司),NVERTER MRX-151高速低温离心机(离心半径 $r=8\text{ cm}$;日本TOMY公司),DYY-10C型转移电泳仪(北京六一仪器厂),FluoChem FQ2成像系统(美国Alpha Innotech公司)。

2.2 富勒烯粉体悬浊液的制备

取富勒烯粉剂0.05 g将其溶于100 mL的无菌生理盐水中,经过超声振荡溶解,制成浓度为 $0.50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 的悬浊液,高压灭菌后于超净台内分装,4℃冰箱保存,备用。

2.3 细胞培养

人胚肝细胞L02(购于中国科学院上海细胞生物学研究所)在含有1.0%谷氨酰胺(2 mmol L^{-1})、

1.0%双抗(100 U mL^{-1} 青霉素、 $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 链霉素)、15%胎牛血清的RPMI1640培养基中,于37℃、5% CO_2 及饱和湿度培养箱中常规培养,用0.25%的胰蛋白酶消化后进行传代。

2.4 细胞内CAT活性和MDA含量检测

将人胚肝细胞悬液接种于50 mL培养瓶中,37℃、5% CO_2 条件下培养24 h后,分为0.1、2.5、5.0、10.0、20.0和40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 富勒烯暴露组,每个浓度作6个平行样。37℃、5% CO_2 条件下培养24 h后,收集细胞。依据PRO-PREPTM蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒说明书测定细胞内蛋白含量;CAT和MDA测定试剂盒说明书测定细胞裂解上清液中的CAT和MDA。

2.5 细胞内活性氧(ROS)含量测定

将人胚肝细胞接种于96孔培养板中,每孔 2×10^4 个细胞,37℃、5% CO_2 培养箱中培养24 h换成含终浓度分别为0.1、2.5、5.0、10.0、20.0和40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 富勒烯的培养液,每组设6个平行孔。对照组中加入无菌生理盐水,继续培养24 h后,原位装载2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)探针。按照试剂盒说明书进行检测。根据以下公式计算活性氧水平:

$$\text{活性氧水平}(\%) = \frac{\text{暴露组活性氧含量}}{\text{对照组氧含量}} \times 100\%$$

2.6 免疫细胞化学法检测胞内SOD原位表达情况

将人胚肝细胞以每孔 1×10^5 个接种于24孔板中,每个剂量设4个平行样。24 h后更换含富勒烯终浓度分别为0.5、10.0和20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的培养液继续孵育24 h从孵箱中取出。弃去培养液,70%的乙醇固定,0.1 mol L^{-1} 的PBS冲洗3次,每次5 min。3% H_2O_2 室温孵育10 min。1% BSA室温封闭45 min。加一抗(用1% BSA稀释),湿盒内室温放置1.5 h。PBS冲洗3次,每次5 min。加HRP标记二抗室温孵育20 min。PBS冲洗3次,每次5 min。DAB显色10 min。PBS冲洗3次,每次5 min。倒置荧光显微镜下拍照,记录。

2.7 Western blotting方法

将对数生长期细胞分为0.1、0.0和20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 富勒烯暴露组,每组设3个平行样。经相应处理24 h后,每个样品收集 1×10^7 个细胞于离心管内。蛋白提取及含量测定同前,调整蛋白含量为 $5\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ 。经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜,封闭液37℃摇动封闭1 h。山羊抗人多克隆抗

体 SOD-1、GPx1 和 CAT 抗体 4℃ 孵育过夜。HRP 标记的二抗杂交, 37℃ 1 h Pro-light HRP 化学发光检测, 经过显影、定影, 数字成像分析蛋白的光密度。

2.8 统计学处理

结果以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 15.0 for Windows 统计软件包对数据进行单因素方差分析, 若差别有统计学意义, 再进行两两比较的 Dunnett 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果 (Results)

3.1 富勒烯对人胚肝细胞 CAT 活性和 MDA、ROS 含量的影响

由表 1 可见: 富勒烯暴露 24 h 后, 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 和 40.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 组细胞内 CAT 活性均不同程度降低, 与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。细胞内 MDA 含量随暴露剂量的增加呈上升趋势, 但 1.25、2.50 和 5.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 剂量组细胞内 MDA 含量与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 当浓度上升至 10.00、20.00 和 40.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时, MDA 含量明显增加, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

同时, 对照组细胞内 ROS 含量为 101.420 ± 7.95 。富勒烯暴露 24 h 后, 细胞内 ROS 含量均有不同程度的升高。但只有 10.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 剂量组细胞内 ROS 含量与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 富勒烯对人胚肝细胞中 CAT 活性、MDA 和 ROS 含量的影响 ($n=6$ $\bar{X} \pm s$)
Table 1 Effects of fullerenes on CAT activity, MDA and ROS contents in human embryo liver cells after treated with fullerenes for 24 h ($n=6$ $\bar{Mena} \pm SE$)

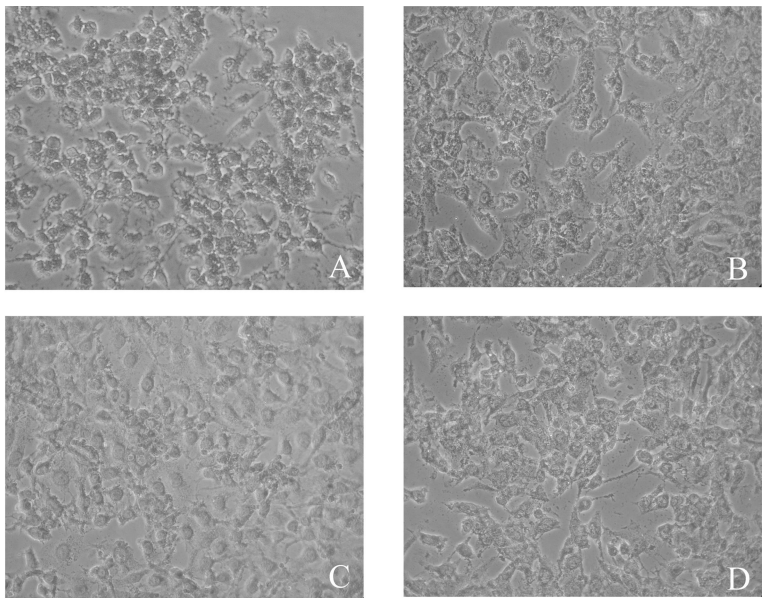
剂量 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CAT 活性 (units $\text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$)	MDA 含量 ($\text{nmol mg}_{\text{prot}}^{-1}$)	ROS 含量 / %
control	2290 ± 190	430 ± 0.040	1.420 ± 7.95
1.25	1043 ± 0.005	653 ± 0.162	6.746 ± 19.75
2.50	937 ± 0.143	753 ± 0.072	5.893 ± 33.69
5.00	756 ± 0.008	613 ± 0.152	8.941 ± 16.63
10.00	912 ± 0.023	808 ± 0.336	$9.841 \pm 75.79^*$
20.00	996 ± 0.057	646 ± 0.192	30.308 ± 47.21
40.00	638 ± 0.072	684 ± 0.211	26.786 ± 57.49

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

3.2 富勒烯对人胚肝细胞内 SOD 蛋白分布的影响

SOD 标记定位于细胞核和 或 浆内, 呈棕黄色颗粒或均匀黄色, 胞核着色以棕黄色颗粒为主。阳性判定标准按着色深度和范围分: 阴性 (—), 整张切片未见细胞着色; 弱阳性 (+/—), 阳性细胞数 $< 5\%$, 着色较弱, 胞浆着色而胞核未着色; 轻度阳性 (+), 阳性细胞数占 $5\% - 25\%$; 中度阳性 (++) , 阳性细胞数占 $26\% - 50\%$; 强阳性 (+++) , 阳性细胞数 $> 50\%$ 。

免疫组化方法检测 SOD 在各实验组中的表达情况, SOD 表达阳性的细胞质染成棕褐色。由图 1



A: control; B: 5.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C: 10.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$; D: 20.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$

图 1 富勒烯染毒后细胞内 SOD 蛋白分布 (20×10)

Fig 1 Protein distribution of SOD in human embryo liver cells under exposure to fullerenes (20×10)

可见,对照组中阳性细胞数较多,大多呈 SOD 中度阳性反应,染色较深,棕黄色颗粒较为均匀地分布于胞浆及细胞核中;染毒组细胞中 SOD 阳性产物分布不均匀,部分细胞呈阴性反应,其余呈弱阳性反应,极少数呈强阳性反应,胞浆内 SOD 分布普遍减少。

3.3 Western blotting 方法分析富勒烯对 SOD、GSH-Px 和 CAT 蛋白表达的影响

富勒烯暴露 24 h 后对人胚肝细胞中 SOD、GSH-Px 和 CAT 蛋白表达水平的影响见图 2 和图 3。可见,富勒烯降低 SOD、GSH-Px 和 CAT 蛋白表达水平,并随着剂量的增加,富勒烯的抑制作用增强。20.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 富勒烯作用 24 h 后,对 SOD、GSH-Px 和 CAT 蛋白表达的抑制率分别为:40.4%、23.7% 和 42.7%。

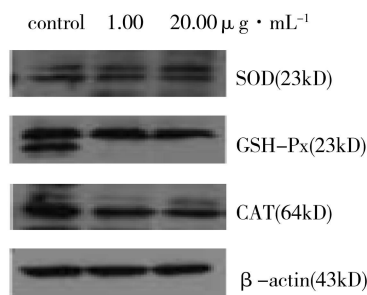


图 2 富勒烯对 SOD、GSH-Px 和 CAT 蛋白表达的影响
Fig. 2 Human embryo liver cells induced by fullerenes

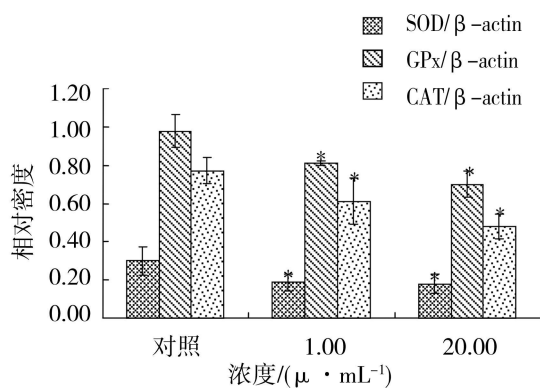


图 3 Western blotting 法分析蛋白的光密度扫描结果
(注: * : 与对照组比较, $P < 0.05$)

Fig. 3 Relative density of SOD、GSH-Px and CAT
(*: compared with the control group, $P < 0.05$)

4 讨论 (Discussion)

迄今为止,人类对于纳米材料的认识才刚刚起步,学术界更多的侧重于发展纳米材料的制备科学、工程研究及注重发现其新功能,而关于纳米材料能否对机体产生潜在危害的研究较少。纳米材料由于粒

径小并且化学活性强,使得它更易于进入机体或体内各种生物膜,并可能与生物大分子发生结合或催化化学反应,改变其正常立体结构,从而造成对机体的损伤。研究表明,纳米材料硫化镉可引起小鼠肾脏和脑组织中 SOD 活力降低及 MDA 含量的下降^[3];纳米材料多壁碳纳米管引起小鼠肺脏和肝组织中 SOD 活力和 GSH 含量下降^[4]。纳米材料能否对机体产生潜在性危害成为目前亟待解决的问题。

富勒烯是应用最广泛的纳米材料之一,人们对其的研究正日渐深入。Kama 等^[5]发现 C_{60} 和 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{18}$ 的光敏感性可以引发脂质过氧化。Oberdorster^[6]报道与 C_{60} 水溶悬胶体接触的大嘴鲈鱼出现大脑脂质过氧化损伤,同时,鳃中还还原型谷胱甘肽含量降低,作者推测这一现象与 C_{60} 具有氧化活性有关,但其机理尚不清楚。Saves 等^[78]经过一系列研究表明,分别在体外培养的人皮肤成纤维细胞和肝癌细胞 HepG2 中, C_{60} 水悬液通过诱导 ROS 生成,导致细胞膜脂质过氧化,进而产生细胞损伤。

陈霖等^[9]研究表明,水溶性富勒烯衍生物 (DMA- C_{60}) 能产生活性氧,使细胞内钙离子浓度升高,造成细胞膜损伤,加速细胞死亡。朱小山等^[10]研究证实,鲫鱼长期暴露于低剂量富勒烯 (C_{60}) 时,其肝脏中 SOD 和 CAT 活性降低, GSH 含量和 ATP 酶活性受抑。 C_{60} 还具有高度亲电活性,诱导生成 ROS (如超氧阴离子、单线态氧和过氧化物等)^[11],与体内存在的其他自由基共同加重了抗氧化防御系统的负担。生物体既有自由基的生成体系 (氧化系统),又有自由基的消除系统 (抗氧化系统)。目前,已知哺乳动物体内有两类消除自由基的系统,一类为酶促系统,另一类为非酶促系统。细胞内抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-Px)。在正常生理条件下,体内氧自由基的产生和清除是平衡的。而富勒烯可诱导 ROS 生成,引起 ROS 的增多与聚集。过多的 ROS 与体内 DNA、蛋白质、脂类和碳水化合物等发生反应,使氧自由基代谢失衡,导致自由基损伤引起疾病的发生。

一般情况下,需氧生物体 ROS 可被机体内源性的抗氧化防御体系所抑制或淬灭,从而不会对机体产生有害影响。但是笔者前期的结果表明^[1],人胚肝细胞在富勒烯的作用下产生细胞毒作用,且与细胞内的氧化损伤有关。这证实体内的抗氧化酶系统出现异常。本研究中证实超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-Px)

蛋白表达下降。同时,免疫组化结果表明,富勒烯染毒后引起细胞内 SOD 蛋白分布不均,免疫组化阳性表达较对照组减少。而肝脏是含过氧化体较多的组织,人胚肝细胞胞浆内 SOD 含量较高。根据以上研究,提示富勒烯损伤了抗氧化防御系统。

MDA 是脂质过氧化的中间产物,测定 MDA 的量常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞的损伤程度。自由基的增多,抗氧化能力的下降,直接导致脂质过氧化增强,进而引发 MDA 增多。亦证实富勒烯可分别使人胚肝细胞^[1]及血管内皮细胞^[12] IDH 的释放增加。据此推测人胚肝细胞经历了“富勒烯刺激—自由基增多—细胞抗氧化能力下降—生物膜的过氧化损伤—生物膜结构和功能的改变—富勒烯刺激进一步加重”,最终细胞内 ROS 失衡,影响线粒体膜完整性和能量代谢等途径,最终导致细胞凋亡或死亡。

笔者前期的研究结果显示,富勒烯作用人胚肝细胞 24 h 后,细胞内 SOD 活性及 GSH 含量降低, IDH 释放量增加。且富勒烯可使胞内 CAT、GSH 和 SOD mRNA 表达水平降低。本次研究结果表明,富勒烯还可以使抗氧化酶系中的 CAT 活性降低,同时使 MDA 含量增加。而胞内的 ROS 含量亦有所增加。胞内的抗氧化酶系 (CAT、GSH-Px 和 SOD) 蛋白表达水平下降。这些结果表明富勒烯是通过引起人胚肝细胞内的氧化损伤产生其肝毒性作用的。

通讯作者简介:张静姝 (1975—),女,天津市疾病预防控制中心毒理室主任,副研究员,主要从事环境毒理和食品毒理学研究,在国内外期刊发表论文近 20 篇。

参考文献:

- [1] 张静姝, 柏杉山, 乔珊珊, 等. 富勒烯对人胚肝细胞 L-02 的损伤作用 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25 (11): 952—954
Zhang J S, Bai S S, Qiao S S, et al. Human embryo liver L-02 cells damage induced by fullerene [J]. Journal of Environment and Health, 2008, 25 (11): 952—954 (in Chinese)
- [2] 张静姝, 邱金茹, 张静, 等. 富勒烯对人胚肝细胞内过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶 mRNA 的表达的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(7): 584—586
Zhang J S, Di J R, Zhang J, et al. Effects of fullerene on mRNA expression of CAT, GSH-Px and SOD in L-02 cells [J]. Journal of Environment and Health, 2010, 27(7): 584—586 (in Chinese)
- [3] 项晓玲, 李岩, 田熙科, 等. 纳米硫化镉对小鼠肾脏和脑组织 SOD 活力和 MDA 含量的影响 [J]. 生态毒理学报, 2008, 3(2): 168—173
Xiang X L, Li Y, Tian X K, et al. Effects of CdSeS nanocrystal on SOD activities and MDA contents in mouse kidney and brain tissue [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(2): 168—173 (in Chinese)
- [4] 崔萌萌, 黄俊, 王江伟, 等. 多壁碳纳米管对小鼠肺脏和肝脏组织 SOD 活力和 GSH 含量的影响 [J]. 生态毒理学报, 2008, 3(2): 162—167
Cui M M, Huang J, Wang J W, et al. Effects of multi-walled carbon nanotubes on SOD activities and GSH contents in mouse lung and liver tissue [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(2): 162—167 (in Chinese)
- [5] Kamat J P, Devasagayam T P, Priyadarshini K J, et al. Oxidative damage induced by the fullerene C₆₀ on photosensitization in rat liver microsomes [J]. Chemical Biological Interactions, 1998, 114(3): 145—159
- [6] Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass [J]. Environmental Health Perspectives, 2004, 112(10): 1058—1062
- [7] Sayes C M, Forner J, Guo W, et al. The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes [J]. Nano Letters, 2004, 4(10): 1881—1887
- [8] Sayes C M, Gobin A M, Ausman K D, et al. Nano-C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation [J]. Biomaterials, 2005, 26(36): 7587—7595
- [9] 陈霖, 杨新林, 彭鲲鹏, 等. 水溶性 C₆₀ 衍生物的光致细胞膜毒性的动态研究 [J]. 高技术通讯, 2001, 11(2): 17—20
Chen L, Yang X L, Peng K P, et al. Dynamic research of photo-induced toxicity against cell membrane by a water soluble C₆₀ derivative [J]. Chinese High Technology Letters, 2001, 11(2): 17—20 (in Chinese)
- [10] 朱小山, 朱琳, 郎宇鹏, 等. 人工纳米材料富勒烯 (C₆₀) 低剂量长期暴露对鲫鱼的氧化伤害 [J]. 环境科学, 2008, 29(4): 855—861
Zhu X S, Zhu L, Lang Y P, et al. Oxidative damages of long-term exposure to low level fullerenes (C₆₀) in carassius auratus [J]. Environmental Science, 2008, 29(4): 855—861 (in Chinese)
- [11] Bottero J Y, Rose J, Wesner M R. Nanotechnologies: tools for sustainability in a new wave of water treatment processes [J]. Integrated Environmental Assessment and Management, 2006, 2(4): 391—395
- [12] Yanawaki H, Iwai N. Cytotoxicity of water soluble fullerene in vascular endothelial cells [J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2006, 290(6): C1495—C1502