

1,4-二氢吡啶类化合物对 CHO-K1 细胞的辐射防护作用

张宇睿 薛虚慧 李园园 徐文清

(北京协和医学院&中国医学科学院放射医学研究所 天津市放射医学与分子核医学重点实验室 天津 300192)

摘要 为探究 1,4-二氢吡啶类化合物对于 CHO-K1 细胞的体外防护活性,实验分为 DHP (2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶) 给药照射组(DHP)、单纯照射组(Rad)和对照组(Con)。采用中性红法测定 DHP 对 CHO-K1 细胞的细胞毒性和照射后细胞的存活率;DCFH-DA 法检测活性氧(Radical oxidative spices, ROS)水平;彗星实验测定 DNA 损伤情况。通过以上指标来评价 DHP 的辐射防护活性。结果显示,与 Con 相比,Rad 的 ROS 水平、DNA 百分含量和尾距等指标均上升,并且 ROS 探针荧光强度达到 1 800,尾部 DNA 含量和尾距分别达到 3.5%和 1.7%,其差异具有统计学意义($p<0.05$),提示照射后 CHO-K1 细胞中产生了过多的 ROS 和 DNA 链断裂损伤。与 Rad 相比,DHP 的 ROS 探针荧光强度降为 945、尾部 DNA 含量和尾距分别降为 0.83%和 0.7%,3 个指标均明显降低,其差异均具有统计学意义($p<0.05$),提示 DHP 给药能显著降低照射引起的 CHO-K1 细胞 ROS 水平升高,通过清除照射产生的过多 ROS,减轻照射所致的 DNA 损伤,发挥细胞保护作用。这说明 DHP 具有良好的辐射防护作用。

关键词 1,4-二氢吡啶类化合物,辐射防护剂,活性氧自由基,CHO-K1 细胞

中图分类号 R96, TL7

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2016.rj.34.040601

Radioprotective effect of 1,4- dihydropyridine in CHO-K1 cell

ZHANG Yurui XUE Xuhui LI Yuanyuan XU Wenqing

(Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine,
Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT The aim is to study the radiation protection effect of 1,4-dihydropyridine in CHO-K1 cell. There were three groups which were DHP treated group, radiation group and control group, respectively. Diethyl 2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (DHP) cell viability and cell cytotoxicity were measured by neutral red assay, DCFH-DA was used to test the level of reactive oxygen species (ROS) and comet assay was adopted to measure DNA damages. Radioprotective activity was evaluated by these three indices. The fluorescence intensity of DCF was 1 800, tail DNA and tail moment were 3.5% and 1.7% in radiation group, which significantly increased ($p<0.05$) compared with control group. The results indicated that radiation could produce more ROS to cause DNA

基金资助: 国家自然科学基金(81273005)、天津市应用基础与前沿技术研究重点项目(14JCZDJC36400)、中国医学科学院放射医学研究所发展基金项目(SF1528)资助

第一作者: 张宇睿, 男, 1991 年 11 月出生, 2014 年毕业于河北医科大学, 现为中国医学科学院放射医学研究所药物化学专业硕士研究生

通讯作者: 徐文清, 研究员, E-mail: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

收稿日期: 初稿 2016-03-18; 修回 2016-04-28

Supported by National Natural Science Foundation of China (81273005), Tianjin Municipal Science and Technology Commission (14JCZDJC36400) and the IRM-CAMS Research Fund (SF1528)

First author: ZHANG Yurui (male) was born in November 1991, and graduated from Hebei Medical University in 2014. Now he is a master candidate in the Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences

Corresponding author: XU Wenqing, professor, E-mail: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

Received 18 March 2016; accepted 28 April 2016

damage. The fluorescence intensity of DCF was 945, tail DNA and tail moment were 0.83% and 0.7% in DHP treated group, which significantly decreased ($p<0.05$) compared with radiation group. The results indicated that radiation could induce DNA damage and DHP could relief this injury to DNA. It can be concluded that DHP could protect cell against radiation-induced damage in CHO-K1 cell.

KEYWORDS 1,4-dihydropyridine, Radioprotector, Reactive oxygen species, CHO-K1 cell

CLC R96, TL7

随着电离辐射在核能、医疗诊断、工业探伤以及放射性同位素方面的应用与发展, 电离辐射与人类的关系越来越密切。人们接触到低剂量电离辐射是不可避免的, 低剂量射线可以使体内产生过多的活性氧(Radical oxidative species, ROS), 进一步损伤体内具有生物功能的蛋白质和核酸等大分子。高剂量电离辐射不仅可以产生过多 ROS, 而且还可以造成 DNA 分子断裂, 这些损伤会通过细胞内信号通路放大, 从而对细胞和组织造成不可逆的损伤^[1]。早在 20 世纪 60 年代科研人员就已经致力于开发有效的辐射防护药物, 在过去几十年里, 以氢磷汀为代表的巯基类化合物显示出了较强抗辐射活性且仅有氢磷汀上市, 但由于毒副作用大, 限制了其临床应用。

1,4-二氢吡啶类化合物(2,6-二甲基-3,5-二乙酯基-1,4-二氢吡啶, 简称 DHP)是一种传统的钙离子通道拮抗剂^[2], 该类化合物在治疗高血压方面发挥了不可替代的作用, 化学结构式见图 1。硝苯地平为 1971 年上市的第一代二氢吡啶类钙离子拮抗剂, 其在临床上主要作为冠脉舒张药。在这之后, 人们先后研制出了第二代钙离子拮抗剂如尼莫地平、尼索地平, 第三代钙离子拮抗剂拉西地平和氨氯地等二氢吡啶类药物。第二代和第三代因具有起效快、持续时间较长和选择性强等优点而得到了广泛的应用^[3-4]。二氢吡啶环为二氢吡啶类抗高血压药物的母核及活性药效团, 同时也是辅酶 NADH 的母环结构的一部分^[5]。而辅酶 NADH 是体内的还原性辅酶, 能够将氢负离子转移给具有氧化性的自由基, 达到清除自由基的作用。

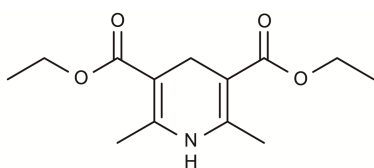


图 1 DHP 的化学结构
Fig.1 Structure of DHP

1 材料与方法

1.1 材料

DHP (批号: D3375, TCI 公司), CHO-K1 细胞(本实验室冻存), PBS (Hyclone 公司), 中性红 (Solarbio 公司), 双抗 (Solarbio 公司), 血清 (美国 Gibco 公司), DMEM 基础培养基 (Hyclone 公司), 胰酶 (美国 Gibco 公司), 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酯 (DCFH-DA, 美国 sigma 公司), 乙醇 (天津市江天化工有限责任公司), 分析天平 (Sartorius BS124s), 多功能酶标仪 (型号: Infinite F200, Tecan 公司), 荧光显微镜 (型号: Nikon 90i, 日本 Nikon 公司), ^{137}Cs 源 (加拿大 Gamma II 40 型)。

1.2 细胞毒性实验

实验分为 3 组, 分别为 DHP 给药照射组 (DHP), 单纯照射组 (Rad) 和对照组 (Con)。本实验用中性红法评价 DHP 对 CHO-K1 细胞的毒性^[6]。取对数生长期细胞, 以每孔 4000 个细胞接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养, 细胞贴壁过夜, 将原培养液换为分别含 0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L DHP 的新鲜培养基, 每组设置 5 个复孔, 分别培养 24 h 和 48 h。终止培养前, 移去含有药液的培养基, 加入 100 μL 饱和中性红培养液, 培养箱孵育 2 h 后弃去中性红培养液, 用 150 μL PBS 洗涤 2 次, 甩干 PBS, 加入 150 μL 中性红溶解液 (乙酸:乙醇:水的体积比=1:50:49), 震荡 3 min, 用酶标仪在 540 nm 波长处测定吸光度值(A), 实验重复 3 次。

1.3 照射后细胞存活率

将培养至对数期的 CHO-K1 细胞以每孔 4000 个细胞接种于 96 孔板内, 按照上述方法分组, 分别置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养, 培养贴壁过夜, 照射前 30 min, 分别给含 0、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、

10^{-4} mol/L DHP 的新鲜培养基每孔 100 μ L, 置于培养箱中培养 30 min, 分别给予 γ 射线照射 (吸收剂量 4 Gy, 剂量率 0.98 Gy/min), 于培养箱中继续培养 24 h, 每组设置 5 个复孔, 移去培养液, 然后每孔加入 100 μ L 饱和的中性红培养液于培养箱中培养 2 h, 使细胞充分摄取中性红, 吸出中性红培养液, 用 150 μ L PBS 洗涤 2 次, 洗去未吸收的残留中性红, 甩干 PBS, 加入 150 μ L 中性红溶解液 (乙酸:乙醇:水的体积比=1:50:49), 震荡 3 min, 用酶标仪在 540 nm 波长处测定吸光度(A)值, 实验重复 3 次。

1.4 活性氧清除能力测定

将培养至对数期的 CHO-K1 细胞以每孔 10 000 个细胞接种在 6 孔板内, 按照上述方法分组, 分别置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养, 照射前 30 min 加入含 10^{-4} mol/L DHP 的新鲜培养液, 每孔 1 mL, 于培养箱中培养 30 min。采用 γ 射线照射 (吸收剂量 4 Gy, 剂量率 0.98 Gy/min), 并于培养箱中继续培养 24 h, 移去含有药液的培养液, 加入浓度为 5 μ mol/L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酯(DCFH-DA)培养液 1 mL, 避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 移去 DCFH-DA 培养液, 用 PBS 洗涤 3 次, 一部分用胰酶消化收集细胞, 吹打均匀后取 200 μ L, 用酶标仪在 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长条件下测定荧光强度^[7]; 另一部分直接在倒置荧光显微镜实验下拍摄图片, 实验重复 3 次。

1.5 彗星实验

取对数期生长的 CHO-K1 细胞, 按照上述方法分组, 分别加入不含 DHP 的新鲜培养基和含有 10^{-4} mol/L DHP 新鲜 DHP 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 30 min, 采用 γ 射线照射 (吸收剂量 4 Gy, 剂量率 0.98 Gy/min)。制作正常熔点凝胶; 取 5×10^5 个/mL 细胞悬液体 20 μ L 与 60 μ L 低熔点凝胶 (7.5%)混匀后滴于第一层上; 碱性裂解液中 4 $^{\circ}$ C 裂解 2.5 h; 电泳液中 4 $^{\circ}$ C 解旋 20 min; 4 $^{\circ}$ C 条件下电泳 20 min (30 V, 40 mA); 4 $^{\circ}$ C 下用中和液中和 20 min。溴化乙锭(EB, 2 μ g/mL)染色 1 min, 去离子水漂洗, 去掉多余染液, 于荧光显微镜 (40 倍物镜) 下观察彗星, 用图像传感器对每份样品随机拍摄 100 个彗星图像。采用波兰弗罗茨瓦夫大学提供的 CASP 彗星分析软件系统对所得彗星图像进行分析, 观察彗星尾部 DNA 百分比和 Olive 尾矩指标^[8]。

1.6 数据处理

采用 SPSS19.0 统计学软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 细胞毒性实验

CHO-K1 细胞经 γ 射线照射后 24 h、48 h, 中性红法测得结果 (图 2) 可知, 不同浓度的 DHP 处理后细胞活力值均在 90% 以上, 提示 DHP 对于 CHO-K1 细胞的毒性较低。 γ 射线照射至吸收剂量为 4 Gy 后 48 h 的 CHO-K1 细胞活力值均高于 24 h 的 CHO-K1 细胞活力值, 且照射后 48 h 的细胞活力值均在 100% 以上, 提示在 48 h 内 DHP 可能促进了 CHO-K1 细胞的损伤恢复, 从而发挥促细胞生长作用。由于 10^{-4} mol/L 的 DHP 处理时, 其细胞活力值较其他浓度好, 我们选取 10^{-4} mol/L 作为下一步实验的给药浓度。

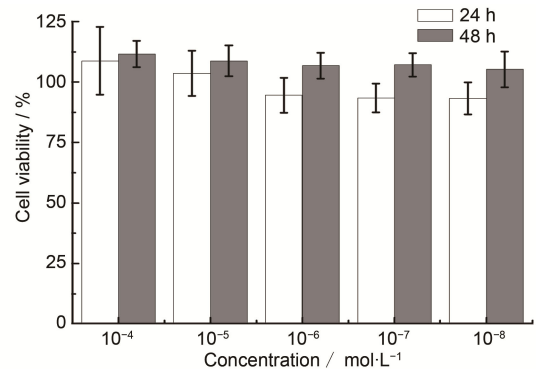


图 2 不同浓度的 DHP 处理时 CHO-K1 细胞的生存率
Fig.2 Cell viability in CHO-K1 cell treated with varying DHP concentrations

DHP 作为一种低毒的化合物, 它能够有效地清除细胞内的活性氧, 防止细胞的氧化应激, 且二氢吡啶环是体内 NADH 酶的活性基团, 能够在生理环境下还原氧化性的大分子物质, 保持体内诸如谷胱甘肽、类脂和蛋白的生物活性, 因此, 它能在正常条件下促进细胞的生长。而本实验结果中出现的 γ 射线照射后 48 h 的 CHO-K1 细胞活力值均高于 100%, DHP 可能促进了 CHO-K1 细胞的损伤恢复, 其发挥的促细胞生长作用很可能是通过清除细胞内的活性氧实现的。为进一步验证此猜测, 我们进行了活性氧清除能力测定实验。

此外, DHP 能促进动物生长发育, 提高生产性能和繁殖性能, 增强免疫功能; 而且饲喂安全, 已

被广泛用于饲料的添加剂。DHP 虽然属于二氢吡啶钙离子通道阻滞剂,但由于 4 位上没有取代基,从该类化合物的构效关系可以看出^[9],与传统的 4 位芳基取代二氢吡啶化合物相比,DHP 与钙离子通道结合能力减弱,降压的活性也非常弱,因此,可以作为一种高效安全的辐射防护药物。

2.2 照射后细胞存活率

照射前 30 min 给药,CHO-K1 细胞经 γ 射线照射后 24 h 结果显示, 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L 的 DHP 与 Rad 的细胞存活率相比均有所提高,且差异均具有统计学意义($p<0.05$),且在 10^{-4} mol/L 浓度时,CHO-K1 细胞的存活率最高(图 3)。

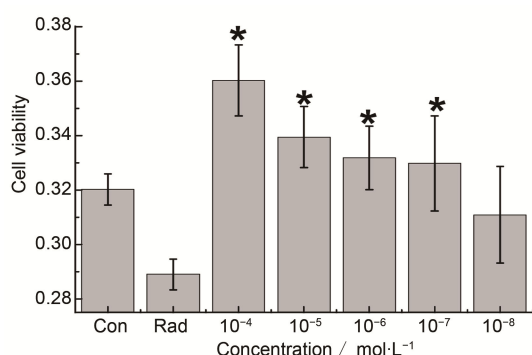


图 3 不同浓度的 DHP 对照射后 CHO-K1 细胞存活率的影响, * $p<0.05$

Fig.3 Cell viability of CHO-K1 at different DHP concentrations after radiation, * $p<0.05$

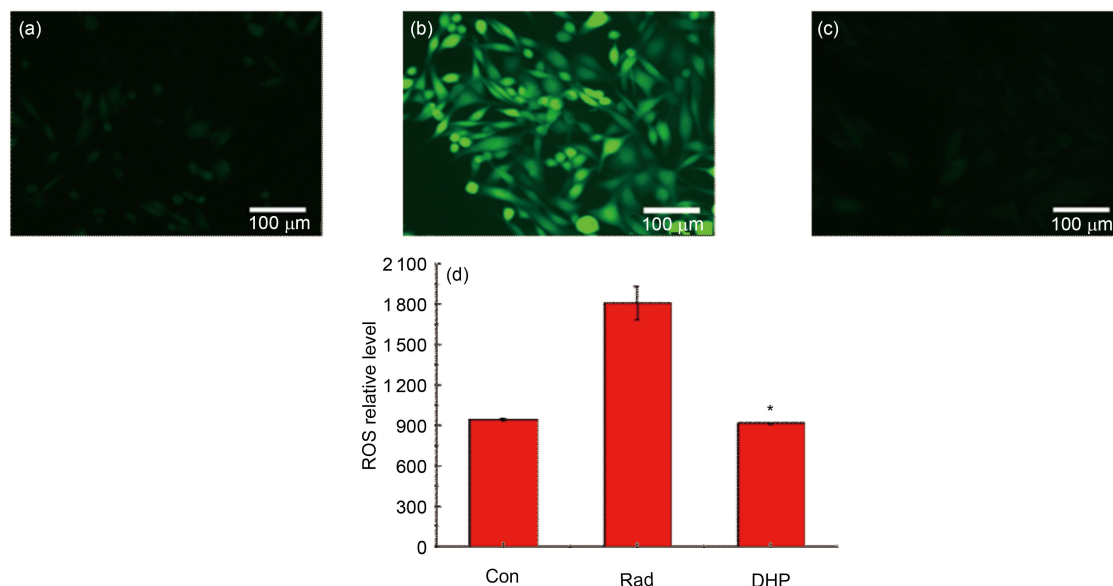


图 4 细胞内 ROS 图像和数据统计图, * $p<0.05$: (a)对照组, (b)照射组, (c) DHP 给药组, (d) ROS 相对含量

Fig.4 Statistics and images of ROS in cell, * $p<0.05$

(a) control group, (b) radiation group, (c) DHP group, (d) ROS relative level

2.3 活性氧清除能力测定

DCFH-DA 是一种不具有荧光性能,但能透过细胞膜装载在细胞内的活性氧探针,该化合物进入细胞中初步代谢成为 2',7'-二氯二氢荧光素,当 ROS 与其相遇时就会将其氧化为 2',7'-二氯荧光素呈现绿色荧光。我们将给药组、照射组和对照组同时用探针处理后,一部分用荧光显微镜拍照,另一部分通过酶标仪测定荧光强度。

细胞照射后 24 h 后,ROS 探针荧光强度显示为 1800,与 Rad 相比,CHO-K1 细胞照射前 30 min 给予 10^{-4} mol/L DHP 并经 γ 射线照射后 24 h 结果显示,ROS 含量降低为 Rad 的二分之一,差异具有统计学意义($p<0.05$),提示照射后 CHO-K1 细胞中产生了过多 ROS。与 DHP 的 ROS 含量相比,Rad 的 ROS 水平的差异具有统计学意义($p<0.05$),提示 DHP 给药能显著降低照射引起 CHO-K1 细胞 ROS 水平升高,通过清除照射产生过多 ROS,发挥细胞保护作用(图 4)。

DHP 的核心结构是二氢吡啶环,二氢吡啶是体内还原型辅酶 NADH 的药效团,NADH 是体内重要的递氢体,参与氧化呼吸和合成代谢过程中的电子传递,且能够保持体内谷胱甘肽的还原态,在细胞生命活动中有着不可替代的作用。

DHP 能够有效地模仿 NADH 辅酶在体内的活性。首先,二氢吡啶环作为一种高效低毒的递氢体,能够有效地中和体内的 ROS;其次,作为一种参与体内各种代谢活动的电子传递体,能够协助参与细胞的各种信号通路,使细胞各种代谢维持在正常水平;最后,它能够帮助维持体内某些分子的正常还原态,如谷胱甘肽、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的还原性,从而确保体内清除氧化应激系统的正常活性^[10]。

2.4 彗星实验

彗星实验是用来检测有核细胞 DNA 损伤的技术,可在单个细胞水平上检测 DNA 损伤程度。与 Con 相比,CHO-K1 细胞照前 30 min 给予 10^{-4} mol/L DHP 并经 γ 射线照射后 24 h,尾部 DNA 百分含量由原来的 3.5%降低到 0.83%,尾距由 1.7%降低到 0.7%,差异具有统计学意义($p<0.05$),提示照射后 CHO-K1 细胞中 DNA 链被射线损伤, DNA 损伤显著增多, DHP 给药能显著减轻照射引起的 CHO-K1 细胞 DNA 损伤,发挥细胞保护作用(图 5)。

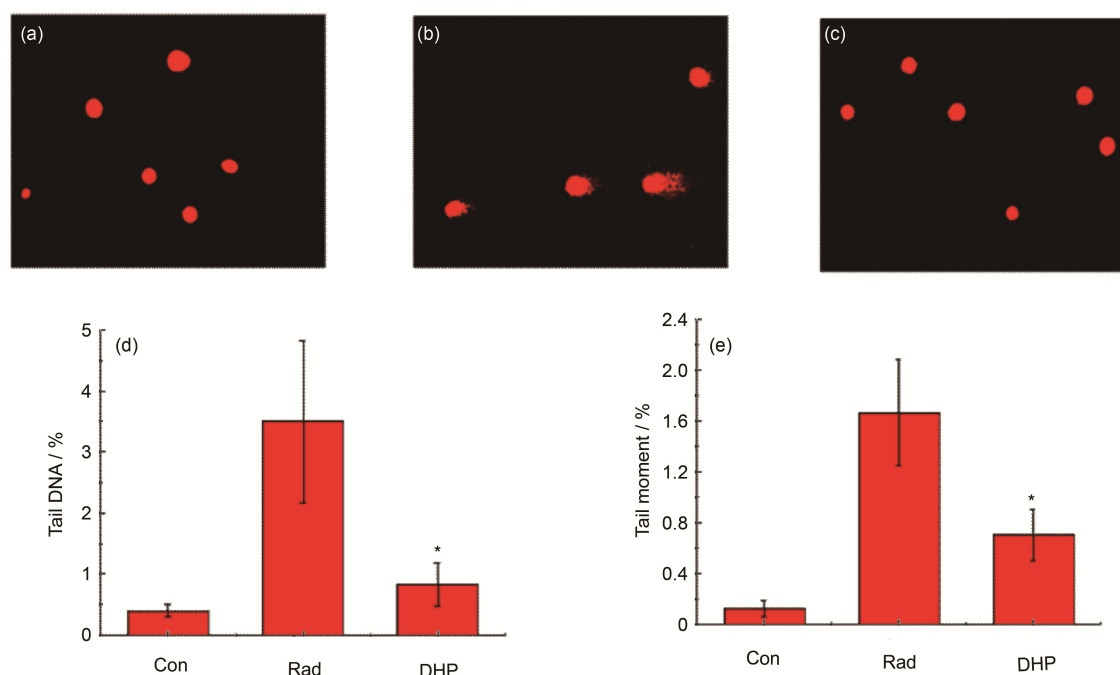


图 5 彗星图像、细胞尾部 DNA 含量和尾距统计图, * $p<0.05$: (a)对照组, (b)照射组, (c)DHP 给药组, (d)尾部 DNA 含量统计, (e)尾距分析

Fig.5 Cell comet images, tail DNA and tail moment, * $p<0.05$
(a) control group, (b) radiation group, (c) DHP group, (d) tail DNA, (e) tail moment

3 结论

通过上述实验可以发现, CHO-K1 细胞在各种浓度的 DHP 中生存率基本接近 100%, 说明 DHP 对于正常的 CHO-K1 细胞的生长基本没有毒副作用; ROS 实验结果表明, 给药组的 ROS 水平相比照射组降低了一半, 并且基本达到了照射前细胞中的 ROS 水平, 说明 DHP 能够有效地清除照射后细胞中过多的 ROS; 彗星实验指标中, 给药后细胞核尾部 DNA 含量较照射组降低了约 4 倍, 尾距较照射组降低了 2 倍, 结果表明, DHP 发挥了良好的细胞辐射防护作用。

电离辐射会导致有机生物体内产生过多自由基, 通过直接或者间接作用攻击生物体内的生物大分子, 如蛋白质、DNA 和类脂膜, 活化相关的激酶和信号分子, 进一步激活相关信号通路, 破坏机体氧化还原平衡, 引起放射性损伤。

外源性给予抗氧化剂能够有效地帮助细胞清除产生的 ROS, 减轻细胞受到的射线损伤, 从而及时维持细胞的正常状态。DHP 的低毒性又能够给予大剂量给药并作为外源性的抗氧化剂, 对于 ROS 的清除有着至关重要的作用。本研究采用的 DHP 作为一种高效低毒的抗氧化剂, 能够有效地抑制照射后细胞产生的活性氧自由基, 降低活性氧对于 DNA 的损

伤并提高细胞的存活率。

参考文献

- 1 Riley P A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation[J]. International Journal of Radiation Biology, 1994, **65**(1): 27-33.
- 2 Xu L, Li D, Tao L, *et al.* Binding mechanisms of 1,4-dihydropyridine derivatives to L-type calcium channel Cav1.2: a molecular modeling study[J]. Molecular Biosystems, 2016, **12**(2): 379-390. DOI: 10.1039/C5MB00781J.
- 3 Adibi H, Hajipour A R. A convenient and efficient protocol for oxidative aromatization of Hantzsch 1,4-dihydropyridines using benzyltriphenylphosphonium peroxymonosulfate under almost neutral reaction conditions[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, **17**(4): 1008-1012. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.11.033.
- 4 Kantam M L, Ramani T, Chakrapani L, *et al.* Synthesis of 1,4-dihydropyridine derivatives using nanocrystalline copper(II) oxide catalyst[J]. Catalysis Communications, 2009, **10**(4): 370-372.
- 5 ZHANG H H, LIU Q, FENG K, *et al.* Facile photoreduction of graphene oxide by an NAD(P)H model: Hantzsch 1,4-dihydropyridine[J]. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2012, **28**(21): 8224-8229.
- 6 Repetto G, Del Peso A, Zurita J L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity[J]. Nature Protocols, 2008, **3**(7): 1125-1131.
- 7 Fetisova E K, Antoschina M M, Cherepanynets V D, *et al.* Radioprotective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQR1[J]. Radiation Research, 2015, **183**(1): 64-71.
- 8 邢晓萌, 王彦, 杜利清, 等. 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的放射增敏作用及其机制研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2014, **32**(6): 060203. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.060203.
- 9 XING Xiaomeng, WANG Yan, DU Liqing, *et al.* Study on radiosensitization effect and mechanism of resveratrol on lung A549 cells[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2014, **32**(6): 060203. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.060203.
- 10 Miyashita K, Nishimoto M, Ishino T, *et al.* Studies on novel and chiral 1,4-dihydropyridines. V. Hantzsch-type 1,4-dihydropyridines having a chiral sulfinyl group: syntheses, structures, and biological activity as a calcium channel antagonist[J]. Tetrahedron, 1997, **53**(12): 4279-4290.
- 10 Godfraind T. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2005, **360**(1464): 2259-2272.