

探索·发现

3-硝基酪氨酸对HepG2细胞氧化还原状态的影响

余 静¹ 徐圆媛¹ 陈立立¹ 李竹青¹ 乐国伟^{1,2} 施用晖^{1,2*}¹江南大学食品学院食品营养与功能因子研究中心, 无锡 214122;²江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要 为了确定3-硝基酪氨酸是否能促进细胞内产生氧化应激, 该文研究了不同浓度3-硝基酪氨酸对HepG2细胞作用不同时间(6~48 h)后, 其对细胞活力、细胞内ROS(H₂O₂、O₂⁻)、细胞内总抗氧化能力、细胞内抗氧化酶活力和脂质氧化的影响。结果表明, 在高浓度(300 μmol/L) 3-硝基酪氨酸作用48 h后, 细胞活力下降至48.5%。同时, 3-硝基酪氨酸能显著提升细胞内ROS并降低细胞内抗氧化酶活力, 同时造成细胞内脂质过氧化物大量积累, 最终使细胞线粒体膜电位去极化, 并导致SirT3表达下调。损伤随着3-硝基酪氨酸含量的增加和反应时间的延长而加重。结果发现, 3-硝基酪氨酸不仅作为蛋白质氧化产物, 还能进一步通过降低机体内抗氧化能力而导致细胞内氧化应激加剧, 最终导致细胞凋亡。

关键词 3-硝基酪氨酸; HepG2; 抗氧化能力; 细胞凋亡

The influence of 3-Nitrotyrosine to Oxidative Stress in HepG2 Cell

Yu Jing¹, Xu Yuanyuan¹, Chen Lili¹, Li Zhuqing¹, Le Guowei^{1,2}, Shi Yonghui^{1,2*}¹Institute of Food Nutrition and Functional Factor, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;²The State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract In order to determine whether 3-nitrotyrosine can promote oxidative stress in cells, HepG2 cells were treated with 3-nitrotyrosine at different time and concentrations. And the cell viability, intracellular ROS (H₂O₂, O₂⁻), total antioxidant capacity of cells, intracellular antioxidant enzymes and lipid oxidation were tested. The results showed that, with high concentration (300 μmol/L) of 3-nitrotyrosine, the cell viability decreased to 48.5% when incubated for 48 h. Meanwhile, 3-nitrotyrosine greatly affected intracellular ROS, intracellular antioxidant enzyme activity, and intracellular lipid oxidation of the cells. And it was proportional to 3-nitrotyrosine content and reaction time. In addition, 3-nitrotyrosine reduced mitochondrial membrane potential, and the expression of SirT3. In conclusion, 3-nitrotyrosine acted not only as protein oxidation products, but also could exacerbate oxidative stress of the cells by reducing the antioxidant capacity of the body and eventually lead to apoptosis.

Key words 3-nitrotyrosine; HepG2; antioxidant capacity; apoptosis

收稿日期: 2013-11-24 接受日期: 2013-12-24

十二五国家科技支撑项目(批准号: 2012BAD33B05)和江苏高校优势学科建设工程资助项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 0510-85917789, E-mail: yhshi2009@126.com

Received: November 24, 2013 Accepted: December 24, 2013

This work was supported by the Twelfth Five-Year National Science and Technology Support Project (Grant No.2012BAD33B05) and the Funded Project of Dominant Disciplines of University in Jiangsu Province

*Corresponding author. Tel: +86-510-85917789, E-mail: yhshi2009@126.com

网络出版时间: 2014-03-20 14:40 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0388.html>

3-硝基酪氨酸(3-NT)是酪氨酸氧化产物之一,其分子结构如图1所示。由于3-NT的结构比较稳定,一直都被作为过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)生成的生物学标志物^[1-2],也被作为蛋白质损伤的标志性产物。有研究证实,蛋白质氧化后生成3-NT,会对蛋白质的结构和功能都造成破坏,还会影响细胞和组织的内环境平衡^[3]。锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD)中的Tyr-34硝基化将使Mn-SOD酶活力显著下降。线粒体中三磷酸腺苷(ATP)酶和琥珀酰辅酶A硝基化则使得呼吸链传递受到抑制,ATP合成减少,细胞活性受到抑制。目前研究表明,3-NT与多类神经退行性疾病呈正相关^[4];更有文献表明,3-NT能导致pheochromocytoma(PC12)细胞凋亡,并使细胞内出现不可逆转的微管结构^[5]。

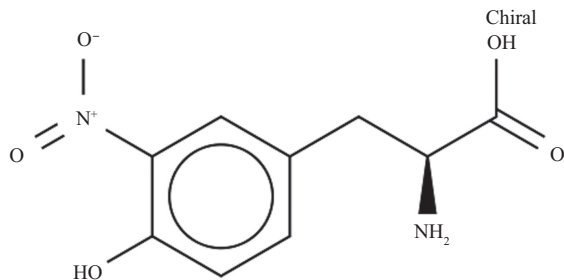


图1 3-硝基酪氨酸分子结构
Fig.1 Structure of 3-nitrotyrosine

3-NT在细胞内一般由以下几种途径生成:(1)ONOO⁻依赖的途径;(2)非ONOO⁻依赖的途径。而非ONOO⁻依赖的途径又包括:(1)过氧化物酶(heme peroxidase)依赖途径;(2)铜/锌-超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)催化途径;(3)过氧化氢酶(CAT)依赖途径;(4)血红蛋白催化途径。

由于与3-NT相关的疾病多由于氧化应激所导致,3-NT作为在机体内残留氧化产物之一,是否具有进一步加剧氧化应激反应的功能还有待研究。本研究使用不同浓度的3-NT对肝癌细胞(HepG2)进行不同反应时间后细胞存活率的检测、细胞中活性氧(ROS)产生量的检测、细胞内抗氧化酶活性和脂质氧化程度的检测,以探索3-NT是否导致细胞内氧化应激。

1 材料与方法

1.1 材料

3-NT用二甲基亚砜(DMSO)配制成10 mmol/L的母液,再用培养液稀释成不同浓度,于4 °C保存待

用。人肝癌细胞株HepG2购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 试剂及仪器

3-NT、链霉素、青霉素、谷氨酰胺、胰蛋白酶(美国Sigma公司); dulbecco's modified eagle medium(DMEM)培养液、胎牛血清(美国Gibco公司); 二甲基亚砜、EDTA(国药化学试剂有限公司); CAT试剂盒、MDA试剂盒、T-SOD试剂盒、GSH-Px活力试剂盒(南京建成生物工程研究所)、JC-1线粒体膜电位测定试剂盒(江苏碧云天公司); 测定与分析用水均为超纯水。

数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); 电热鼓风干燥箱(上海安亭科学仪器有限公司); CO₂培养箱(美国Thermo公司); 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 液氮罐(美国Thermo公司); 冷冻离心机(美国Ependoff公司); 倒置显微镜(上海光学仪器五厂); BIO-RAD 680酶标仪(美国Bio-Rad公司); 实时荧光定量PCR仪7900(美国应用系统公司)。

1.3 细胞培养

细胞形态为多边形,贴壁生长,每2~3 d传代1次,取对数生长期细胞用于实验^[6-7]。

1.4 噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率

3-NT作用6, 12, 24, 48 h后,每孔加入10 μL 5g/L的MTT,温育4 h,去除培养液及MTT,每孔加入150 μL DMSO,震动1 min后测定各孔在波长570 nm处的D值。对照组和实验组均设6个复孔^[8]。

1.5 DCFH-DA法测定细胞内H₂O₂

作用完成后,吸出培养液并用PBS清洗1遍,换上终浓度为10 μmol/L的2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)于培养箱孵育30 min。DCFH-DA孵育结束后,用PBS清洗2遍。并换上DMEM培养液,每孔100 μL。分别于488 nm激发波长、525 nm发射波长检测荧光吸光度。

1.6 DHE法测定细胞内超氧化物阴离子

作用完成后,吸出培养液并用PBS清洗1遍,换上终浓度10 μmol/L的Dihydroethidium(DHE)于培养箱孵育30 min。DHE孵育结束后,用PBS清洗2遍。并换上DMEM培养液,每孔100 μL。分别于300 nm激发波长、610 nm发射波长检测荧光吸光度。

1.7 MDA、T-SOD、GSH-Px、CAT的测定

取作用后的细胞,用PBS清洗2遍,加入0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA消化3~5 min,制成细胞悬

液, 4 000 r/min离心5 min后收集细胞, 再用PBS清洗1遍, 加入细胞裂解液^[9-10] 4 000 r/min离心1 min, 取上清液, 采用相应试剂盒测定细胞内MDA含量及T-SOD、GSH-Px、CAT活性。

1.8 细胞线粒体膜电位的测定

分别用0 $\mu\text{mol/L}$ 、 1×10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 、 1×100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的3-NT处理细胞, 采用碧云天JC-1试剂盒测试。实验独立重复3次。

1.9 RT-PCR

按照Biozol提供的说明提取总RNA, 甲醛变性电泳, 紫外分光光度计鉴定器质量和浓度, 反转录成cDNA。*Sirt3*正负链引物为: 5'-TCC CAT TCT TCT TTC ACA AC-3'、5'-ATG AGC TTC AAC CAG CTT T-3'。*Nrf2*正负链引物为: 5'-ACC CTT GTC ACC ATC TCA GG-3'、5'-TTG CCA TCT CTT TGC TG-3'。

扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 62 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 40个循环; 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min。以 β -actin作为内参基因进行荧光定量PCR。

1.10 数据统计

实验数据以mean \pm S.D.形式表示, 使用Graphpad prism统计软件对数据进行方差分析, 两组间的数据比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 3-NT对HepG2细胞存活率的影响

用不同浓度的3-NT对HepG2进行6, 12, 24, 48 h的处理, 细胞存活率如图2所示。在用3-NT孵育6 h后, 300 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞存活率相比对照组出现显著下降($P < 0.05$), 且时间越长, 下降越显著。随着孵育时间的增加, 较低浓度的3-NT也使细胞存活率显著降低, 孵育12 h后, 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下存活率下降达到显著($P < 0.01$)。孵育24 h后, 1×10^{-4} $\mu\text{mol/L}$ 浓度下存活率下降达到显著($P < 0.05$); 而48 h时, 1×10^{-4} $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的存活率也出现显著下降($P < 0.01$)。说明高浓度3-NT能使细胞在短时间出现较大死亡, 处理48 h时半数致死剂量为300 $\mu\text{mol/L}$ 。而低浓度在长时间孵育下也能使细胞出现一定程度的死亡。

2.2 3-NT对HepG2细胞内 H_2O_2 、 O_2^- 的影响

细胞内过氧化氢(H_2O_2)、超氧化物阴离子(O_2^-)均为细胞内标志性ROS产物, 作为最灵敏的指标反映细胞内氧化还原状态。由于细胞中ROS主要产生于线粒体, 当线粒体内ROS过多而无法得到清除时,

ROS则会透过线粒体膜到达细胞质, 产生较强的氧化应激。而当ROS进入细胞质, 就可以采用荧光探针进行检测。

用不同浓度3-NT对HepG2细胞进行24 h、48 h的孵育后装载 O_2^- 探针测定其荧光值强度。结果如图3所示, 使用3-NT处理过的细胞内荧光值出现了显著上升。处理12 h后, 细胞内荧光强度随着3-NT浓度的升高而升高, 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下达到最高点。用3-NT处理细胞24 h后, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组和1 $\mu\text{mol/L}$ 组的荧光强度出现了少许下降, 而较低浓度组中荧光强度出现了上升, 而荧光强度仍然与3-NT的浓度成正比。当处理时间达到48 h时, 使用低浓度3-NT进行处理的细胞出现了荧光值的高峰, 而原来荧光值最高的100 $\mu\text{mol/L}$ 组则相较12 h出现了显著下降, 这是由于在细胞在48 h的处理后, 该浓度组细胞存活率出现了大幅度下降(图2), 而细胞活力的丧失直接导致了荧光值的下降^[11]。低浓度组荧光值随着时间的增加而升高可能由于细胞内T-SOD活力随着时间降低而下降, 细胞内 O_2^- 无法清除并且逐渐积累加剧, 在相应细胞存活率的条件下3-NT浓度为 1×10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 组达到最高点。

H_2O_2 是 O_2^- 的产物之一, 能够在细胞内转化为更具危害性的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)。对 H_2O_2 含量的检测结果如图4所示。与 O_2^- 的检测结果相似, H_2O_2 的含量同样在12 h、100 $\mu\text{mol/L}$ 组达到高峰, 并且荧光值与3-NT浓度成正比。但随着处理时间的增加, 低浓度处理的细胞内荧光强度随之升高, 并在48 h时, 1×10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 组荧光值强度再次达到高峰。其原因可能在于, 较高浓度3-NT能在短时间内对线粒体造成一定破坏, 从而造成ROS大量泄露, 进而导致

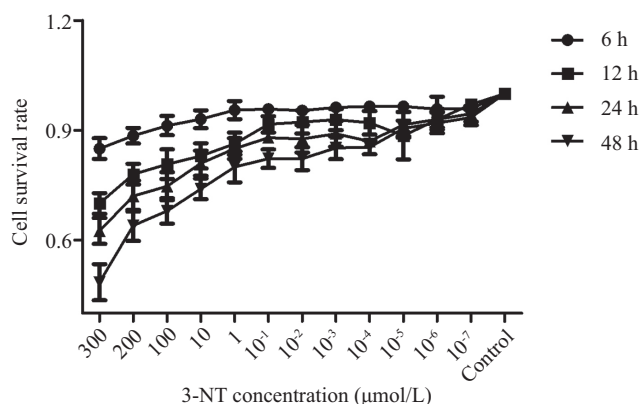
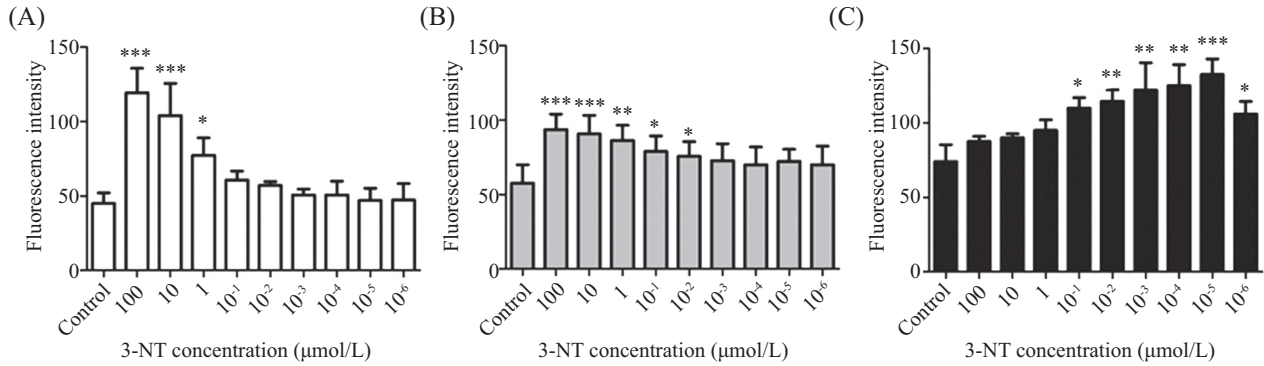


图2 3-NT对HepG2细胞存活率的影响

Fig.2 The influence of 3-NT to HepG2 cells viability

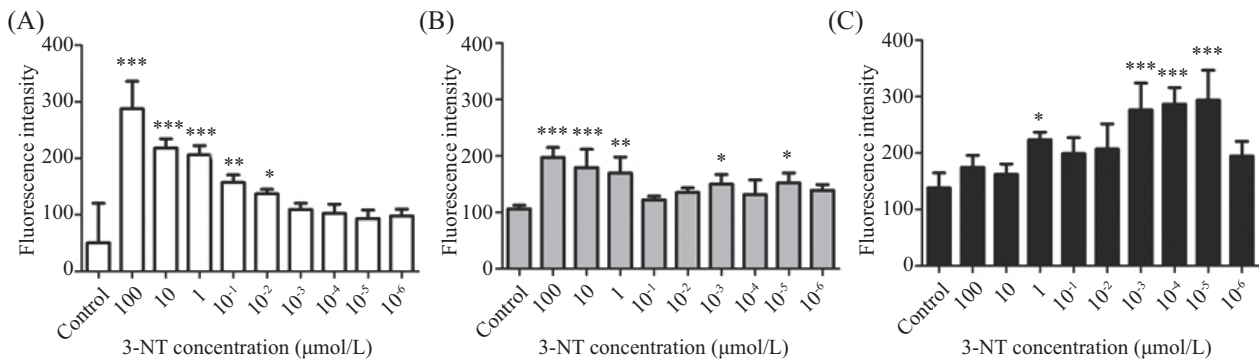


A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005, 与control组比较。

A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005 compared with control group.

图3 3-NT对HepG2细胞内O₂⁻的影响

Fig.3 The influence of 3-NT to the O₂⁻ of HepG2 cells



A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005, 与control组比较。

A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005 compared with control group.

图4 3-NT对HepG2细胞内H₂O₂的影响

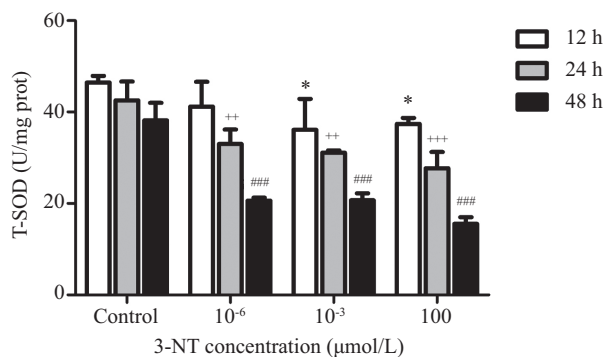
Fig.4 The influence of 3-NT to the H₂O₂ of HepG2 cells

细胞死亡, 并直接导致荧光值降低。有研究表明, 游离的3-NT能与H₂O₂介导, 导致DNA损伤、蛋白质合成受损, 影响细胞功能^[12]。而随着时间的增加, 在短时间未表现出毒性的浓度也能与细胞内H₂O₂介导产生更大的损伤, 导致线粒体破坏加剧, 细胞内ROS急剧升高, 造成氧化应激。

2.3 3-NT对HepG2细胞内抗氧化能力的影响

上述结果表明, 3-NT能造成细胞液内ROS急剧升高。而细胞内的ROS可以被抗氧化机制所清除, 故3-NT是否对细胞内抗氧化机制造成影响也值得进一步探究。

正常生理状况下, 细胞内ROS生成和清除处于动态平衡, 但是, 一旦抗氧化功能降低或者ROS过多都能引起细胞氧化应激使细胞受到损伤。细胞内总超氧化物歧化酶(T-SOD)能清除O₂⁻, 保护细胞抵御氧化应激。3-NT对细胞内T-SOD的影响如图5所示,



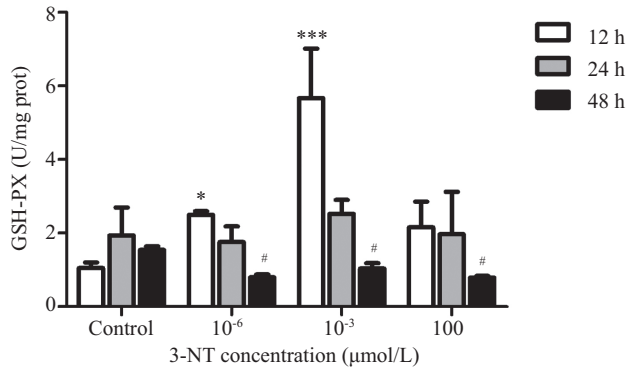
P*<0.05, *P*<0.01, ###/###+*P*<0.005, 与control组比较。

P*<0.05, *P*<0.01, ###/###+*P*<0.005 compared with control group.

图5 3-NT对HepG2细胞内T-SOD活力的影响

Fig.5 The influence of 3-NT to the T-SOD of HepG2 cells

细胞内T-SOD活力随着3-NT处理时间的增加而减弱。随着3-NT浓度的增加细胞内T-SOD的活力也随之降低。



*# $P < 0.05$, *** $P < 0.005$, 与control组比较。

*# $P < 0.05$, *** $P < 0.005$ compared with control group.

图6 3-NT对HepG2细胞内GSH-PX含量的影响

Fig.6 The influence of 3-NT to the GSH-PX of HepG2 cells

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和CAT是细胞内抗氧化酶类, 主要分解细胞内过氧化物。当用3-NT处理细胞12 h后, 1×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 组的GSH-Px和CAT活力均出现了升高(图6和图7)。而在3-NT浓度处于 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ 条件下, 细胞内GSH-Px和CAT活力出现了急剧升高。而100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下却相对对照组变化不显著。这说明, 使用 1×10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 的浓度处理细胞, 在12 h后, 细胞内ROS已经从线粒体内泄露进入细胞质, 但此时细胞质内GSH-Px和CAT足以清除细胞内ROS。但当3-NT浓度上升, 线粒体ROS泄露加剧, 细胞内GSH-Px和CAT合成相应加剧, 而此时ROS还未完全失控。当浓度进一步升高为100 $\mu\text{mol/L}$, 细胞内ROS已经处于失调状态(图4), GSH-Px和CAT酶活相较 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ 受到强烈的抑制。随着孵育时间的延长, 细胞内GSH-Px和CAT酶活也随之下降。

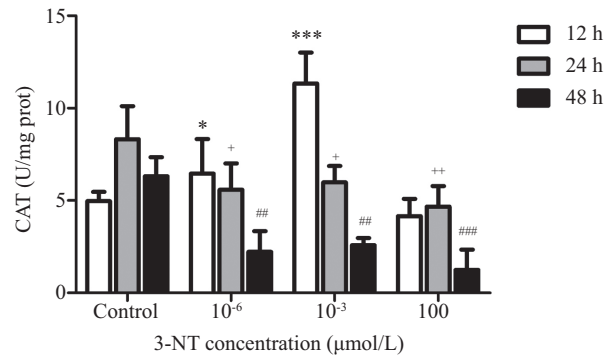
2.4 3-NT对HepG2细胞内脂质过氧化物含量的影响

反映细胞内氧化应激的一个重要标志即为细胞内多不饱和脂肪酸的过氧化反应, 其中丙二醛(MDA)是其中重要的反应产物, 它能与细胞内蛋白质反应造成蛋白质的交联。

3-NT对细胞内MDA的影响如图8所示。总体来看, 细胞内MDA含量随着3-NT浓度的升高而升高, 并与孵育时间成正比。这说明, 3-NT浓度的升高和加入3-NT后孵育时间的增长均造成了细胞内脂肪氧化加剧, 这也进一步说明了细胞内抗氧化机制已经不能清除ROS, 细胞内形成了氧化应激。

2.5 3-NT对HepG2细胞线粒体膜电位的影响

线粒体是细胞进行氧化磷酸化、有氧呼吸、电

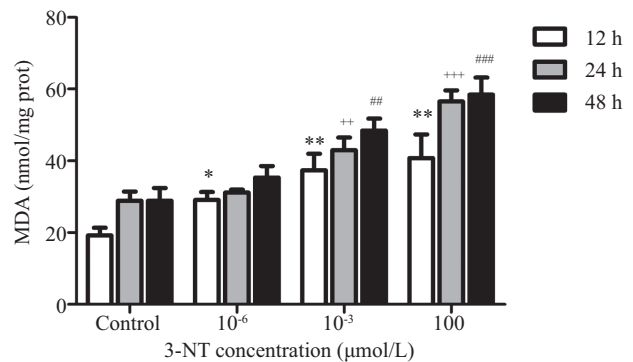


*/+ $P < 0.05$, ###/+ $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, 与control组比较。

*/+ $P < 0.05$, ###/+ $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ compared with control group.

图7 3-NT对HepG2细胞内CAT含量的影响

Fig.7 The influence of 3-NT to the CAT of HepG2 cells



* $P < 0.05$, **/### $P < 0.01$, +++### $P < 0.005$, 与control组比较。

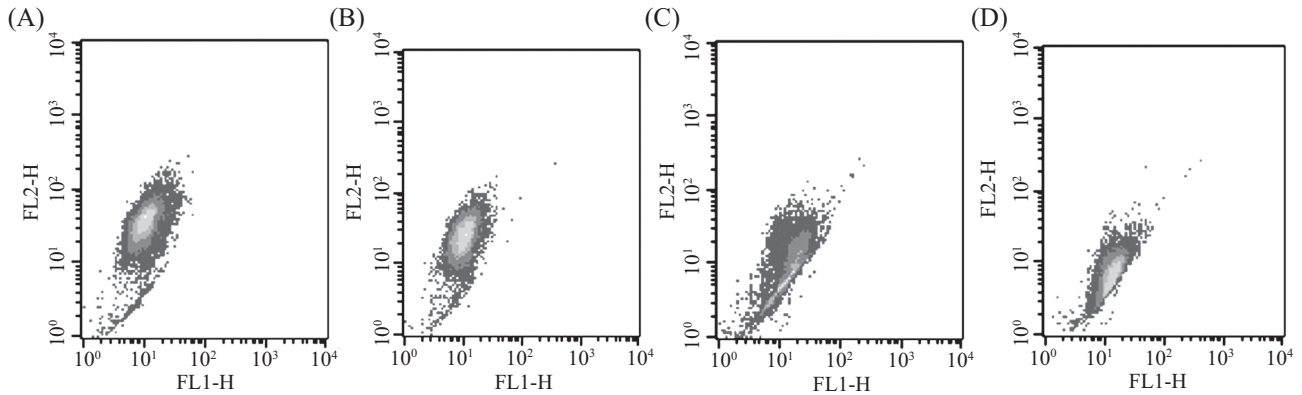
* $P < 0.05$, **/### $P < 0.01$, +++### $P < 0.005$ compared with control group.

图8 3-NT对HepG2细胞内脂质氧化的影响

Fig.8 The influence of 3-NT to the lipid oxidation of HepG2 cells

子传递、三羧酸循环并产生能量的重要场所, 其功能性的变化影响细胞各个成分的协调运作并危及细胞的生命活动。线粒体的损伤决定了细胞的损伤程度^[13]。在细胞凋亡的过程中往往伴随着线粒体跨膜电位的破坏, 这被广泛认为是细胞凋亡过程中最早发生的事件之一。

3-NT对细胞线粒体膜电位的影响如图9所示。其中FL1-H表示绿色荧光强度, FL2-H表示红色荧光强度。图9中A、B、C、D分别对应对照组、3-NT浓度 1×10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 组、3-NT浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 组和阳性对照组(均采用HepG2细胞)。正常细胞, 膜电位正常时, JC-1通过线粒体膜极性进入线粒体内, 并因浓度升高而形成发射红色荧光的多聚体(图9A), 而凋亡细胞, 线粒体跨膜电位去极化, JC-1从线粒体内释放, 浓度降低, 逆转为发射绿色荧光的单体形式(图9D)。图10表示红色荧光和绿色荧光的比值, 由图可知, 随着3-NT浓度的增加, 细胞中绿色荧光逐渐增

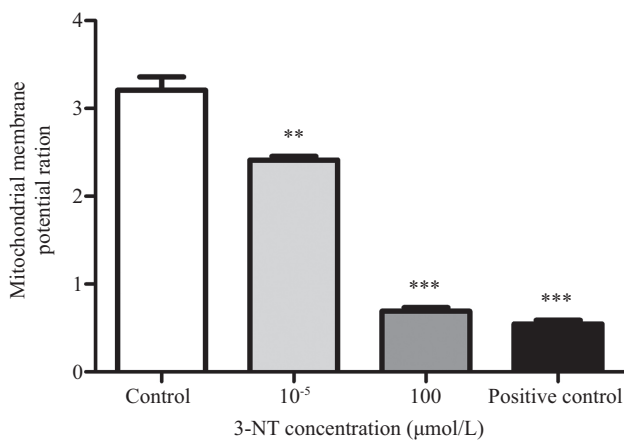


A: 空白对照; B: 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 3-硝基酪氨酸; C: $100 \mu\text{mol/L}$ 3-硝基酪氨酸; D: 阳性对照。

A: control; B: 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ 3-nitrotyrosine; C: $100 \mu\text{mol/L}$ 3-nitrotyrosine; D: positive control.

图9 3-NT对HepG2细胞线粒体膜电位的影响

Fig.9 The influence of 3-NT to the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells



** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, 与control组比较。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ compared with control group.

图10 3-NT对HepG2细胞线粒体膜电位的影响

Fig.10 The influence of 3-NT to the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells

多, 而红色荧光减弱。可以确认高浓度的3-NT可以造成膜电位的破坏, 进而可能造成细胞的凋亡。

由于3-NT能够造成细胞内ROS的增加, 并且降低抗氧化酶类活性, 可以推测, 3-NT能够造成细胞内氧化应激并最终导致细胞凋亡。

2.6 3-NT对HepG2细胞SirT3、Nrf2的影响

依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化酶Sirtuin-3(SirT3)能使线粒体内相关的乙酰化蛋白脱乙酰基, 还能增加ROS清除酶活性来维持线粒体的稳定性。转录调节因子核细胞因子2相关因子(Nrf2), 是一种对氧化还原反应敏感的转录因子, 可以通过促进基因表达, 来转录翻译产生一些抗氧化物, 如 γ -谷氨半胱氨酸合成酶(γ -GCS)、SOD、血红素氧合酶(HO-1)、谷胱甘肽S转移酶(GSTs)等^[14]。

表1 3-NT对HepG2细胞内SirT3、Nrf2表达的影响

Table 1 The influence of 3-NT to the expression of

SirT3/Nrf2 in HepG2 cells

组别 Group	线粒体乙酰化酶3 SirT3	核转录因子E2相关因子2 Nrf2
Control	1.00±0.13	1.00±0.05
3-NT 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$	0.85±0.07	0.83±0.06*
3-NT 10^{-5} $\mu\text{mol/L}$	0.79±0.06**	0.81±0.05*
3-NT 10^{-3} $\mu\text{mol/L}$	0.73±0.10**	0.73±0.08**
3-NT 10^{-1} $\mu\text{mol/L}$	0.44±0.10***	0.61±0.07***
3-NT $100 \mu\text{mol/L}$	0.14±0.02***	0.25±0.05***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, 与control组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ compared with control group.

3-NT对细胞作用48 h后细胞内SirT3、Nrf2表达的影响如表1所示。3-NT能使细胞内SirT3、Nrf2表达均下调, 并与3-NT的浓度呈正比。推测, 细胞内抗氧化酶类合成受到抑制同时线粒体功能出现障碍与SirT3与Nrf2表达下调有关。

3 讨论

本研究使用较大范围浓度的3-NT对HepG2细胞进行处理。结果显示高浓度的3-NT具有一定的细胞毒性, 在处理48 h时, 其半数致死剂量为 $300 \mu\text{mol/L}$ 。在保证细胞处于一定活力的浓度下, 测量了3-NT对细胞内 O_2^- 和 H_2O_2 含量的影响。结果显示, 3-NT均能造成细胞内两种ROS显著增高, 并且低浓度3-NT在与细胞共同孵育48 h以后也能造成细胞内两种ROS的显著升高。Krainev等^[15]也证实, 3-NT能导致 O_2^- 大量生成。由此可以推测, 3-NT在细胞内不能被代谢分解, 或者分解能力极弱, 而使得3-NT在细胞内存在慢性毒性作用。

细胞内酶活的结果显示,在长期作用效果下,3-NT对细胞内抗氧化酶类均产生了抑制作用。其原因可能是由于3-NT能与酶类结合而使得细胞内酶活降低,另一方面可能是由于3-NT使细胞内抗氧化酶类基因表达下调。同时,3-NT能造成细胞内MDA含量升高。由于脂质过氧化物MDA可以与巯基、亚氨基结合,使依赖这两种基团的酶类酶活受到抑制。而此时抗氧化酶类酶活也显著降低,酶活性降低的原因可能是综合的。但是利用低浓度3-NT处理48 h后未对细胞造成大量死亡。可以推测,在低浓度下这种损伤不会造成细胞大量不可修复的损伤,而这种条件可能被抗氧化剂所修复。

细胞线粒体是细胞能量的生成器,对于生物体而言是非常重要的细胞器,线粒体的功能和许多疾病的发生密切相关,包括糖尿病和肥胖等代谢综合征。上述实验显示,3-NT能使HepG2细胞内膜电位出现显著的去极化作用,并且随着浓度升高作用越显著,说明3-NT破坏了线粒体功能,并可能与一系列能量代谢类疾病有关。另一方面,线粒体膜电位的变化是细胞凋亡的一个重要早期事件,说明3-NT在一定程度上导致了细胞凋亡的发生。Montalto de Mecca等^[16]研究表明,当肝脏细胞内硝基酪氨酸积聚过多会导致细胞DNA损伤进而导致凋亡。

细胞内SirT3的表达降低一方面是细胞内抗氧化酶类活性降低的一个重要原因,另一方面,SirT3起到保护线粒体的重要作用,而3-NT导致细胞内SirT3表达显著降低,并随着3-NT浓度升高,表达的抑制作用越显著。可以推测,3-NT导致细胞内线粒体膜电位降低是通过抑制SirT3的表达而产生。Someya等^[17]研究表明,SirT3基因敲除后的小鼠抗氧化能力减弱,DNA损伤加剧。

综上所述,3-NT能造成HepG2细胞出现氧化应激,同时,3-NT的浓度与反应时间呈正比,并且在长期作用效果下3-NT能造成细胞内抗氧化酶类酶活力受到抑制,从而使细胞内MDA积累加剧,最终导致细胞凋亡。

参考文献 (References)

- 1 Tsikas D, Duncan MW. Mass spectrometry and 3-nitrotyrosine: Strategies, controversies, and our current perspective. *Mass Spectrom Rev* 2013; doi: 10.1002/mas.21396.

- 2 Muijsers RB, Folkerts C, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: A two-faces metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 1997; 60(21): 1833-45.
- 3 Rafael R. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 2013; 46(2): 550-9.
- 4 Mihm MJ, Schanbacher BL, Wallace BL, Wallace LJ, Uretsky NJ, Bauer JA. Free 3-nitrotyrosine causes striatal neurodegeneration *in vivo*. *J Neurosci* 2001; 21(11): RC149.
- 5 Blanchard-Fillion B, Prou D, Polydoro M, Spielberg D, Tsika E, Wang Z, Hazen SL, *et al*. Metabolism of 3-nitrotyrosine induces apoptotic death in dopaminergic cells. *J Neurosci* 2006; 26(23): 6124-30.
- 6 唐孟萱, 周万军, 胡元佳. HepG2细胞培养方法与条件的探讨. 实用预防医学(Tang Mengxuan, Zhou Wanjun, Hu Yuanjia. The discussion on HepG2 cell culture method an condition. *Practical Preventive Medicine*) 2005; 12(1): 71-3.
- 7 甘起霓, 鲁文清, 张悦. 人肝肿瘤细胞HepG2最佳培养条件探讨. 同济医科大学学报(Gan Qini, Lu Wenqing, Zhang Yue. Investigation on the optimal conditions of HepG2 cells. *Acta Univ Med Tongji*) 2001; 30(4): 319-20.
- 8 Mooradian AD, Haas MJ, Wadud K, Ascorbic acid and α -tocopherol down-regulate apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 and Caco-2 cell lines. *Metabolism* 2006; 55(2): 159-67.
- 9 王璇, 黄波, 李东阳. 锌对人肝癌细胞氧化应激水平的影响. 南华大学学报(Wang Xuan, Huang Bo, Li Dongyang. The effect of Zinc on oxidative stress in hepatoma carcinoma cell. *Journal of Nanhua University, Medical Edition*) 2007; 35(3): 338-40.
- 10 张明, 何卫红, 何平. 多溴联苯醚对SH-SY5Y细胞氧化应激及凋亡的影响. 中华劳动卫生职业病杂志(Zhang Ming, He Weidong, He Ping. Effects of PBDE-47 on oxidative stress an apoptosis in SH-SY5Y cell. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*) 2007; 25(3): 145-7.
- 11 Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D. Use of H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol* 2011; 85(11): 1463-73.
- 12 Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316(1): 123-8.
- 13 Zhou L, Aon MA, Almas T, Cortassa S, Winslow RL, O'Rourke B. A reaction-diffusion model of ROS-induced ROS release in a mitochondrial network. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(1): 102-9.
- 14 Kobayashi A, Otha T, Yamamoto M. Unique function of the Nrf2-Keap1 path-way in the inducible wxpression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods Enzymol* 2004; 378: 273-84.
- 15 Krainev AG, Williams TD, Bigelow DJ. Enzymatic reduction of 3-nitrotyrosine generates superoxide. *Chem Res Toxicol* 1998;11(5): 495-502.
- 16 Montalto de Mecca M, Diaz EG, Castro JA, Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. *Toxicol Lett* 2002; 136(1): 1-8.
- 17 Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, *et al*. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 2010; 143(5): 802-12.