

INFLUENCE OF POTASSIUM CHLORIDE OR GLUTAMATE ON CALCIUM ION PERMEABILITY OF HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELL LINE

CHEN Wen Dong LI Ya Li LI Lin

(Department of Pharmacology, Xuan-Wu Hospital of Capital University of Medical
Sciences, Beijing Key Laboratory for Brain Aging, Beijing 100053)

ABSTRACT

The present study investigated the injury of cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cell line induced by potassium chloride(KCl) or glutamate, using the methods of MTT and TBA assays which measured the cell viability and malondialdehyde (MDA), respectively. The results showed that, when the cultured SH-SY5Y cells were incubated with KCl (40 – 80mmol/L) or glutamate (50 – 100mmol/L) for 4 hours in Hank's buffer containing Ca^{2+} , the cell viability was significantly decreased and the MDA content standing for the degree of lipid peroxidation increased; but the incubation of KCl or glutamate with SH-SY5Y cells in Hank's buffer without Ca^{2+} did not induce the obvious changes in cell viability and lipid peroxidation. The morphological changes observed through the phase-contrast microscope were in accord with above results. The experiments indicate that the cultured human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be injured by KCl or glutamate, and their injur effects are related to the inflow of extracellular Ca^{2+} and lipid peroxidation. This cell model may provide a quick and simple means for screening the neuro-protective drugs.

Key Words: Neuroblastoma cell lines SH-SY5Y Potassium chloride Glutamate Cellular injury Lipid peroxidation Calciumion

还原型谷胱甘肽对亚砷酸钠诱导的内皮细胞凋亡的保护作用

肖南 刘初 田昆仑 刁有芳 汪志文

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所 重庆 400042)

内皮细胞(endothelial cells, ECs)由于其分布的特殊性,在结构和功能上均很重要。ECs的凋亡可能导致血管内皮屏障功能的丧失,使血管易于渗漏及组织器官水肿。研究表明 ECs的凋亡与细胞内氧化应激反应有关^[1],而还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)及其相关氧化—还原循环在维持细胞还原状态,抗氧化损伤中具有重要意义^[2]。本研究采用亚砷酸钠(sodium arsenite, Ars)诱导 ECs 发生凋亡,观察 GSH对 ECs 的保护作用,并初步探讨其保护作用的机理。

材料和方法

1. 主要试剂和仪器

GSH(Sigma), DMEM 培养基(Gibco), Ars(Merck, Germany), 胰蛋白酶(Sigma), Dihydrorhodamine 123(Sigma), mouse anti human CD54: FITC (Serotec), 7-amino-actinomycin D(7-AAD), 流式细胞仪(Coulter), CO₂ 培养箱(Shel-Lab), 恒温水浴(Cole-Parmer), 其他有关试剂均为国产分析纯。

2. 人内皮细胞的培养

本文 1999 年 9 月 7 日收到, 2000 年 2 月 14 日接受。

人内皮细胞株 ECV-304 来源于人脐静脉内皮细胞,从 ATCC 细胞库引进。培养液用 DMEM(含 10% FCS,100U/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养,0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA 消化传代。

3. 实验分组

ECV-304 消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度 4×10^5 /ml,接种至无菌培养管(2ml/管)。分为 7 个组别:对照, 4×10^{-5} mol/LArs, 8×10^{-5} mol/LArs, 1.6×10^{-4} mol/LArs, 4×10^{-5} mol/LArs + 5×10^{-5} mol/LGSH, 8×10^{-5} mol/LArs + 5×10^{-5} mol/LGSH, 1.6×10^{-4} mol/LArs + 5×10^{-5} mol/LGSH。培养 24h 后测定相关指标。

4. 凋亡细胞的定量^[3]

上述各组 ECV-304,培养 24h 后离心,0.01mol/L PBS 洗涤两次,加入 20 μ g/ml 7-AAD 于 4 $^{\circ}$ C 放置 20min,在流式细胞仪上测定凋亡细胞数,激发波长 488nm,发射波长 650nm,收集 5000 个细胞。

5. 细胞间粘附分子-1 (Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达测定

ECV-304 离心洗涤后,加 10 μ l mouse anti human CD54:FITC,4 $^{\circ}$ C 放置 30min,在流式细胞仪上测定平均通道荧光(mean channel fluorescence, MCF),激发波长 488nm,发射波长 525nm,收集 5000 个细胞。

6. ECs 氧化状态(oxidative state)分析^[4]

ECV-304 离心洗涤后,加 10 μ l Dihydrorhodamine 123(终浓度 10^{-6} mol/L),37 $^{\circ}$ C 水浴 10min,在流式细胞仪上测定 MCF,激发波长 488nm,发射波长 525nm,收集 5000 个细胞。

7. 统计学处理

结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验进行统计分析。

结 果

1. Ars 诱导 ECs 凋亡及 GSH 的保护作用 (图 1)

Ars 可明显诱导 ECs 凋亡,与对照相比相差显著($P < 0.01$),并且在一定范围内呈剂量依赖关系。 4×10^{-5} mol/LArs 时应用 GSH 不能使 ECs 凋亡降低,且略有升高,但二者无统计学差异。 8×10^{-5} mol/LArs 及 1.6×10^{-4} mol/LArs 时应用 GSH 可显著降低 ECs 凋亡,使凋亡细胞百分率分别从 $25.67 \pm 1.98\%$ 、

$54.43 \pm 11.06\%$ 降低至 $17.93 \pm 0.76\%$ 、 $26.07 \pm 0.75\%$ ($P < 0.01, P < 0.05$)。

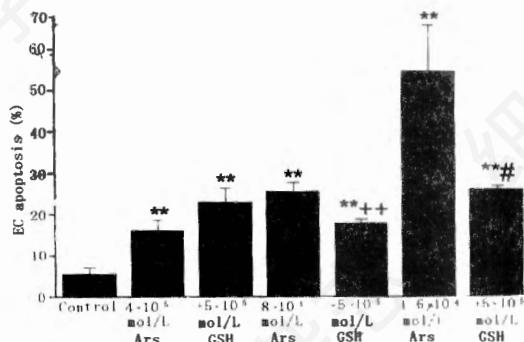


图 1 Ars 诱导 ECs 凋亡及 GSH(50 μ M)的保护作用

$\bar{x} \pm s, n=6, *P < 0.01$ vs control;
+ $P < 0.01$ vs 8×10^{-5} mol/L Ars;
$P < 0.05$ vs 1.6×10^{-4} mol/L Ars

2. ECs 的 ICAM-1 表达(图 2)

三种剂量的 Ars 均可以使 ECs 表达 ICAM-1 升高,其中 4×10^{-5} mol/LArs 组与对照相比无显著差异, 8×10^{-5} mol/LArs 及 1.6×10^{-4} mol/LArs 组与对照相比有显著差异($P < 0.05$)。GSH 处理后 4×10^{-5} mol/LArs + 5×10^{-5} mol/LGSH 组 ICAM-1 表达略有升高,但与对照及 4×10^{-5} mol/LArs 组相比无显著差异; 8×10^{-5} mol/LArs 及 1.6×10^{-4} mol/LArs 浓度时应用 GSH 可以使 ICAM-1 表达减少($P < 0.05$),但仍未恢复到对照水平。

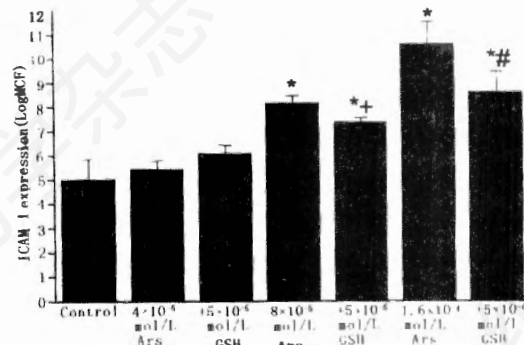


图 2 Ars 及 GSH(5×10^{-5} mol/L)

对 ECs ICAM-1 表达的作用

$\bar{x} \pm s, n=6, *P < 0.05$ vs control; + $P < 0.05$ vs 8×10^{-5} mol/L Ars; # $P < 0.05$ vs 1.6×10^{-4} mol/L Ars

3. ECs 氧化状态的变化(图 3)

与对照相比, $4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 、 $8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 、 $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Ars 均可以使 ECs 氧化状态明显降低 ($P < 0.05-0.01$); GSH 能使氧化状态升高, 其中 $4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Ars + $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ GSH 组可恢复到对照水平, 其余两组与对照相比仍有显著差异 ($P < 0.05$)。

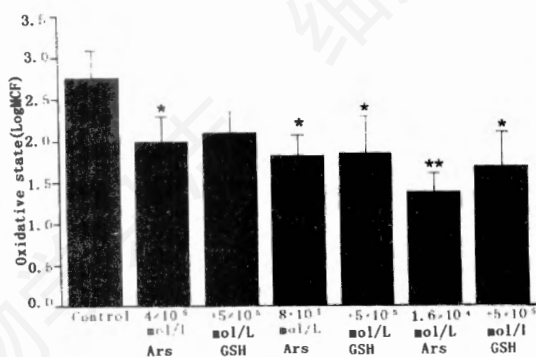


图3 Ars及GSH($5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)对ECs氧化状态的作用

$\bar{x} \pm s, n=6, *P < 0.05, **P < 0.01$ vs control

讨 论

亚砷酸钠(Ars)诱导 ECs 凋亡是文献中常见的在体外研究细胞凋亡的模型, 效果明显而且稳定。用 7-AAD 染色在流式细胞仪上可区分正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞, 保证了凋亡细胞检测的准确性。由于我们采用悬浮式细胞培养, ECs 的增殖被大大抑制, 因此可以探讨对一定数量的细胞而言 GSH 抗凋亡的作用。

本研究发现, Ars 可明显诱导 ECs 凋亡, 并具有剂量依赖性。Ars 还使 ECs 粘附分子 ICAM-1 产生增加, 细胞内氧化状态降低。GSH 是细胞内主要的抗氧化剂, 细胞内 GSH 水平升高可以使细胞对砷剂诱导的凋亡不敏感, 我们观察到给予 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ GSH 可明显降低高剂量 Ars 诱导的 ECs 凋亡, 最高可达 50% 以上; 同时, 抑制 ICAM-1 的产生, 升高细胞内氧化状态, 提示给予外源性 GSH 确能防止 Ars 诱导的 ECs 凋亡。Pollman 等人研究表明, 血管平滑肌细胞凋亡与细胞内 GSH 水平降低有关^[5], 抑制细胞内 GSH 合成还可促进眼镜蛇毒

诱导的内皮细胞凋亡^[6], 进一步说明 GSH 有保护细胞、防止凋亡的作用。GSH 防止凋亡与其改变细胞内氧化还原状态有关^[1,2]。ECs 氧化状态反映了细胞内还原物质的水平, 氧化状态越高表明还原物质水平越高。本研究发现 Ars 可降低氧化状态, 使凋亡增加, 而 GSH 则可升高氧化状态, 降低凋亡, 提示 GSH 可能通过改变细胞内氧化状态而防止凋亡。Wang 等已证实 Ars 可使 ECs 氧化状态降低, 牛磺酸能升高氧化状态, 降低凋亡比例^[7]。还有研究显示, 血细胞内 GSH 水平决定其对三氧化二砷诱导凋亡的敏感性^[8], 并且细胞内氧化还原状态在细胞凋亡中起决定性作用^[9]。

本研究还发现, 在低浓度 Ars ($4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 情况下, GSH 虽可升高氧化状态, 但并未明显降低凋亡比例和 ICAM-1 产生, 其原因尚不清楚。可能与 Ars 浓度有一定关系。另外, 近来认为细胞内氧化还原状态对凋亡有双重作用^[1,10]。在低浓度 Ars 时是否与此有关尚有待进一步研究。

摘 要

本文主要观察还原型谷胱甘肽(GSH)对亚砷酸钠(Ars)诱导的培养内皮细胞凋亡的保护作用。体外培养人内皮细胞株 ECV-304, 用 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} 、 $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Ars 及 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ GSH 作用, 24 小时后用流式细胞仪进行凋亡细胞定量、ICAM-1 表达及氧化状态的测定。结果 Ars 以剂量依赖方式引起 ECs 的凋亡, 增加 ICAM-1 表达, 降低氧化状态; GSH 可使 8×10^{-5} 和 $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Ars 引起的凋亡分别降低 30.2% 和 52.1% ($P < 0.01, P < 0.05$); GSH 还明显降低 Ars 引起的 ECs ICAM-1 的表达, 但对 $4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Ars 引起者作用不明显, GSH 可升高 ECs 的氧化状态, 而且对 $4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Ars 引起者最为明显。结果表明 GSH 对 Ars 引起的 ECs 凋亡有保护作用, 且可能与调节 ICAM-1 表达有关。

关键词: 内皮细胞 凋亡 谷胱甘肽

参 考 文 献

- [1] Hampton MB, Orrenius S, 1998, *Biofactors*, **8**:1-5.
- [2] Hall AG, 1999, *Eur J Clin Invest*, **29**:238-245.
- [3] Schmid I, Uiffenbogaart CH, Keld B, et al., 1994, *J Immunol Methods*, **170**:145-157.
- [4] Smith JA, Weidemann MJ, 1993, *J Immunol Methods*, **162**:261-268.
- [5] Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH, 1999, *Circ Res*, **84**:113-121.
- [6] Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, et al., 1997, *J Biochem*, **122**:1260-1264.
- [7] Wang JH, Redmond HP, Watson RWG, et al., 1996, *Shock*, **6**:331-338.
- [8] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y, 1999, *Blood*, **93**:268-277.
- [9] Garland JM, Sdergaard KL, Jolly J, 1997, *Br J Haematol*, **99**:756-765.
- [10] Hentze H, Kstle G, Volbracht C, et al., 1999, *Hepatology*, **30**:177-85.

PROTECTION OF GLUTATHIONE AGAINST ENDOTHELIAL APOPTOSIS INDUCED BY SODIUM ARSENITE

XIAO Nan LIU Ren TIAN Kun Lun DIAO You Fang WANG Zhi Wen

(Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University Chong qing 400042)

ABSTRACT

In order to study the protective effect of glutathione(GSH)on endothelial apoptosis, the endothelial cells strain ECV-304 was cocultured in vitro with 40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ sodium arsenite(Ars)alone and with 50 $\mu\text{mol/L}$ GSH respectively. Twentyfour hours after culture, endothelial apoptosis, ICAM-1 expression and oxidative state were determined by flow cytometry. The results showed that Ars increased endothelial apoptosis with dose-dependent manner, upregulated ICAM-1 expression and suppressed the oxidative state. GSH decreased the endothelial apoptosis induced by 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ Ars by 30.2% and 52.1%, respectively, and down-regulated ICAM-1 expression. As for apoptosis and ICAM-1 expression at 40 $\mu\text{mol/L}$ Ars, GSH did not show significant effects. GSH could also preserve the oxidative state, which was more potent in that induced by 40 μM Ars. We concluded that GSH could protect the endothelial apoptosis induced by Ars, and this may associate with down-regulation of ICAM-1 expression.

Key words: Endothelial cells Apoptosis Glutathione

多色荧光原位杂交对昆明山海棠和丙烯酰胺 诱发微核染色体组成的研究

杨明杰 曹佳

(第三军医大学预防医学系分子毒理实验室 重庆 400038)

前期我室报道了使用小鼠次要卫星 DNA 探针荧光原位杂交和 CREST 染色对昆明山海棠和丙烯酰胺诱发微核的着丝粒组成比例的研究^[1,2],这两种方法虽然可以较好地了解微核(micronuclei)的组成情况,但却无法提供微核染色体断片组成的信息,为此,我们采用更为精确的着丝粒和端粒 DNA 探针多色荧光原位杂交(Multicolor fluorescent in situ hybridization, 多色 FISH)技术,深入研究了昆明山海棠和丙

烯酰胺诱发小鼠 NIH 3T3 细胞微核的着丝粒和端粒组成比例,以了解微核的染色体组成,进而了解这两种化合物的遗传毒性。

材 料 和 方 法

1. 受试化合物

昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucum* (Level)

本文 1999 年 1 月 28 日收到,6 月 29 日接受。

本课题由国家自然科学基金资助(基金编号 39400114)。