

扇贝多肽对 H_2O_2 损伤 HaCaT 细胞的保护作用

党转宁, 王春波, 韩彦波* (青岛大学医学院, 山东青岛 266071)

摘要 [目的]建立 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞氧化应激损伤的体外模型,探讨扇贝多肽(PCF)对 H_2O_2 损伤 HaCaT 细胞的保护作用及其作用机制。[方法]采用不同浓度的 H_2O_2 (50、100、200、300、500 $\mu\text{mol/L}$) 作用 HaCaT 细胞 12 h 后,采用 CCK-8 法检测细胞存活率;用不同浓度(1.42、2.84、5.68 mmol/L)的 PCF 分别处理细胞 12 h 后,加入 H_2O_2 (300 $\mu\text{mol/L}$) 继续作用 12 h,采用 CCK-8 法检测细胞活力,采用酶生化法测定细胞上清液中 LDH 活性以及细胞质中 GSH-Px、T-AOC 和 CAT 水平。[结果]与正常组相比,50~500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 H_2O_2 依赖性引起 HaCaT 细胞氧化损伤,300 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 使存活率降低到 56% ($P < 0.01$);与模型组相比,不同浓度的 PCF 均可保护 H_2O_2 诱导的氧化损伤,增加细胞存活率,降低细胞 LDH 的释放量,提高 GSH-Px、T-AOC 和 CAT 含量,增强细胞抗氧化作用。[结论]扇贝多肽能对抗 H_2O_2 诱导的氧化应激,对细胞受损具有保护作用,其机制可能与提高抗氧化酶活力有关。

关键词 扇贝多肽; H_2O_2 ; HaCaT 细胞; 氧化应激

中图分类号 S965.3¹⁹ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)20-06618-03

Protective Effect of PCF on H_2O_2 -induced HaCaT Cell Injury

DANG Zhuan-ning, HAN Yan-tao et al (Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071)

Abstract [Objective] To establish *in vitro* model of H_2O_2 -induced oxidative stress damage of HaCaT cells, and investigate the polypeptide from *Chlamys farreri*'s protective effect and its possible mechanism on H_2O_2 -induced damage to HaCaT cells. [Method] Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to test the cell survival rate of different concentrations (50, 100, 200, 300, 500 $\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 for 12 h on HaCaT cells; different concentrations (1.42, 2.84, 5.68 mmol/L) PCF treated cell for 12 h, and then the appropriate H_2O_2 concentration (300 $\mu\text{mol/L}$) were adopted to treat, CCK-8 was used to detect the cell viability. Enzyme biochemical method was applied to detect the activity of LDH in culture supernatants, GSH-Px, T-AOC and CAT levels in cell lysis solution. [Result] Compared with control group, at 50-500 $\mu\text{mol/L}$, H_2O_2 caused concentration-dependent oxidative damage in the HaCaT cell, at 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 decreased the cell survival rate to 56% ($P < 0.01$); Compared with model group, all different concentration PCF protected HaCaT cells from oxidative damage induced by H_2O_2 , significantly increased the cell survival rate, decreased the release of LDH and increase GSH-Px, T-AOC and CAT level, enhanced antioxidation effect of HaCaT cell. [Conclusion] PCF has the significant protective effects on HaCaT cells injured by H_2O_2 , which may be associated with the increased of antioxidase activity.

Key words Polypeptide from *Chlamys farreri*; H_2O_2 ; HaCaT cell; Oxidative stress

人皮肤长期暴露在外界理化环境中会受到各种损害,角质形成细胞(HaCaT 细胞)是构成人最外层皮肤的主要细胞,为机体和外界提供了一个天然的屏障。机体在短期的氧化环境中暴露,能产生活性氧(ROS),可以依靠自身的抗氧化机制清除,维持氧化与抗氧的平衡状态。研究发现,经过长期的紫外线(UV)照射,机体会产生过量的 ROS,氧化和损伤细胞内脂质、蛋白和 DNA,并对皮肤产生有害影响,包括致癌、炎症、日光性红斑和早衰^[1-2]。例如, Park 等发现过量的 UVB 照射小鼠背部皮肤后引发小鼠表型的改变^[3]。ROS 通常包括 1O_2 、 $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 等,有研究表明,在 HaCaT 细胞内 1O_2 可以氧化损伤细胞结构,改变线粒体电位和溶酶体稳定性^[4-5]。笔者通过使用 H_2O_2 这种重要的活性氧为诱导剂,建立 H_2O_2 对 HaCaT 细胞氧化损伤的模型,旨在为抗氧化药物对 UV 造成的氧化应激损伤提供新的可能的治疗。

1 材料与方法

1.1 材料 人角质形成细胞(HaCaT 细胞,北京协和医院); H_2O_2 (Sigma 公司); RPMI-1640 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清(Hyclone); CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒(购自日本 Dojindo 公司); BCA 蛋白定量试剂盒(购自碧云天生物技术研究所);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、总

抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养。 HaCaT 细胞培养于含 10% 的胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置于含 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 恒温培养箱中培养,每 24 h 换液 1 次,待细胞长到 80%~90% 时,吸取瓶中培养液,用 PBS 冲洗 2 遍,用浓度 0.25% 的胰酶和 0.02% EDTA 消化细胞,于 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入适量培养液吹打成细胞悬液,1:2 传代。

1.2.2 H_2O_2 损伤模型的建立。 取对数生长期的细胞每孔 5 000 个接种于 96 孔培养板,每孔加入 100 μl 细胞悬液,分别设置空白组、正常对照组、不同浓度 H_2O_2 (50、100、200、300、500 $\mu\text{mol/L}$) 组,每组设 6 个复孔,待细胞长至 80% 时,用 H_2O_2 处理 12 h。然后,每孔加入 10 μl CCK-8,培养箱中孵育 3 h,使用酶标仪读取波长 450 nm 处 OD 值。按照以下公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = $(OD_{\text{试验组}} - OD_{\text{空白对照组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 药物对细胞存活率的影响。 取对数生长期的细胞每孔 5000 个接种于 96 孔板中,待细胞生长至 70%~80% 时,随机分为 6 组:空白组、正常对照组、模型组和药物组。正常组正常培养,药物组先分别加入含终浓度为 1.42、2.84 和 5.68 mmol/L PCF 的培养液,37 $^{\circ}C$ 培养 12 h 后,弃掉,再向模型组和药物组内分别加入含终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培

基金项目 山东省自然科学基金项目(ZR2011HM046)。

作者简介 党转宁(1988-),女,陕西渭南人,硕士研究生,研究方向:辐射药理学。*通讯作者,副教授,博士,从事抗衰老药理研究。

收稿日期 2014-06-11

养液,继续培养 12 h 后,每组加入 10 μl CCK-8,培养箱中孵育 3 h,使用酶标仪检测细胞存活率。

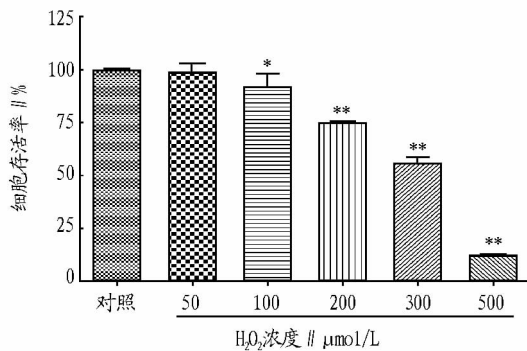
1.2.4 细胞上清液中 LDH 活力的检测。取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,分别设立正常对照组、模型组和不同浓度的药物组,按照“1.2.3”中方法处理后,收集各组细胞上清液,按照试剂盒说明书操作检测 LDH 活力。每组设 3 次重复。

1.2.5 细胞中 GSH-Px、T-AOC 和 CAT 水平的检测。取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,分别设正常对照组、模型组和不同浓度的药物组,按“1.2.3”方法处理后,收集各组细胞,按照试剂盒说明书操作检测 GSH-Px、T-AOC 和 CAT 水平。每组设 3 个重复。

1.2.6 数据统计与分析。使用 SPSS17.0 统计软件对试验数据进行统计与分析,结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验,各组之间多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞存活率的影响 从图 1 可以看出,不同浓度(50、100、200、300、500 μmol/L)的 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞的存活有一定的影响。与正常组相比,细胞存活率情况与 H₂O₂ 呈现浓度依赖性,表现出氧化损伤趋势。当 H₂O₂ 浓度为 300 μmol/L 时,细胞的存活率为正常组的



注: * 表示与对照差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与对照差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 1 不同浓度的 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞存活率的影响

表 1 不同浓度 PCF 对 HaCaT 细胞 GSH-Px、T-AOC、CAT 和 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH//U/L	GSH-Px//U/mg	CAT//U/mg	T-AOC//U/mg
对照组	384.15 ± 13.30	265.80 ± 13.21	4.17 ± 0.08	1.80 ± 0.17
模型对照组	578.30 ± 13.78**	152.19 ± 5.98**	2.70 ± 0.08**	0.91 ± 0.03**
1.42 mmol/L PCF 组	441.75 ± 9.75 $\Delta\Delta$	213.70 ± 13.34 $\Delta\Delta$	2.88 ± 0.10	1.20 ± 0.15 Δ
2.84 mmol/L PCF 组	411.28 ± 8.49 $\Delta\Delta$	284.73 ± 7.76 $\Delta\Delta$	3.30 ± 0.20 Δ	1.41 ± 0.07 $\Delta\Delta$
5.68 mmol/L PCF 组	359.12 ± 21.22 $\Delta\Delta$	255.91 ± 6.83 $\Delta\Delta$	3.59 ± 0.17 $\Delta\Delta$	1.48 ± 0.21 $\Delta\Delta$

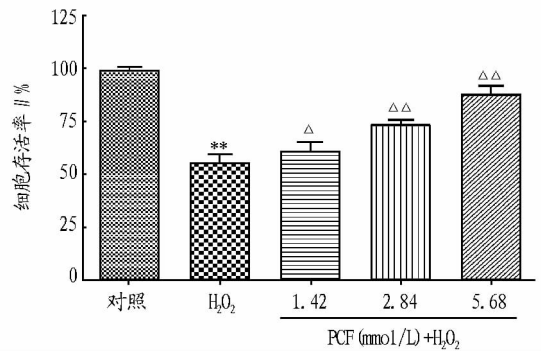
注: ** 表示与 Control 组相比差异极显著 ($P < 0.01$); Δ 表示与模型组差异显著 ($P < 0.05$); $\Delta\Delta$ 表示与模型组差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

笔者通过不同浓度的 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞进行氧化损伤,采用 CCK-8 法检测细胞存活率,因为 CCK-8 内水溶性四唑盐 WST-8 被细胞内脱氢酶氧化还原后生成橙黄色甲臞染料可溶解在培养液中,生成的甲臞量与活细胞数成正比,所以可根据染料颜色程度反映细胞的存活状态。研究发现,

56%,差异极显著 ($P < 0.01$)。因此,选择 300 μmol/L 的 H₂O₂ 作用 12 h,建立氧化损伤模型。

2.2 不同浓度 PCF 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞存活率的影响 从图 2 可以看出,不同浓度(1.42、2.84、5.68 mmol/L)的 PCF 对受损的 HaCaT 细胞存活率表现出一定的保护作用,且随着 PCF 浓度的升高,细胞存活率也呈梯度上升。与模型组相比,1.42、2.84 和 5.68 mmol/L 的 PCF 将 HaCaT 细胞存活率由模型组的 55.30% 分别提高到 60.70%、73.07% 和 87.52%,差异显著 ($P < 0.05$)。



注: ** 表示与对照差异极显著 ($P < 0.01$); Δ 表示与模型组差异显著 ($P < 0.05$); $\Delta\Delta$ 表示与模型组差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 2 不同浓度 PCF 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞存活率的影响

2.3 不同浓度 PCF 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞 LDH 释放量的影响 由表 1 可知,与对照组比较,模型组 LDH 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,不同浓度的 PCF 均可降低 LDH 释放量,5.68 mmol/L 的 PCF 可将 LDH 释放量降低到 37.9%,存在显著差异 ($P < 0.01$)。

2.4 不同浓度 PCF 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞 GSH-Px、T-AOC、CAT 和 LDH 水平的影响 由表 1 可知,与对照组相比,模型组 GSH-Px、CAT 和 T-AOC 水平显著降低,差异极显著 ($P < 0.01$)。2.84 mmol/L 的 PCF 可将 GSH-Px 提高到正常水平,差异显著 ($P < 0.01$);5.68 mmol/L 的 PCF 可将 CAT 和 T-AOC 水平分别提高 33% 和 62.6%,差异显著 ($P < 0.01$),1.42 mmol/L 的 PCF 对 CAT 水平无明显影响 ($P > 0.05$)。

当 H₂O₂ 浓度为 300 μmol/L 时,细胞存活率达到 56%,则选择 H₂O₂ 浓度为 300 μmol/L,作用 12 h 为氧化损伤模型。PCF 是从栉孔扇贝中提取,含有 8 个氨基酸的水溶性小分子多肽^[6-7]。该研究表明 1.42、2.84 和 5.68 mmol/L 的 PCF 分别将细胞存活率提高到 60.70%、73.07% 和 87.52%,说明 PCF 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 细胞氧化应激有一定的保护

作用。

LDH 是存在于细胞内的一种糖酵解酶,可以间接反映细胞氧化应激受损的程度。当细胞膜受到氧化攻击可使膜通透性变大或破坏时,LDH 可透过细胞膜渗出^[8]。笔者通过收集细胞上清液,通过检测 LDH 活力发现,模型组 LDH 水平明显高于正常组,表明 HaCaT 细胞在受到 H₂O₂ 的攻击后,细胞膜受损,通透性增大,上清中 LDH 释放增多,细胞活性下降。加入不同浓度的 PCF 后,LDH 释放减少,表明 PCF 可对抗 H₂O₂ 对 HaCaT 细胞的氧化损伤,保护细胞膜的完整性。

H₂O₂ 是一种强氧化剂,尤其可以氧化生物膜脂^[9],其作为活性氧家族的重要一员,对细胞的氧化应激作用已多有报道。GSH - Px、CAT 和 T - AOC 是细胞内重要的抗氧化防御系统,对细胞的氧化具有保护作用。CAT 对 H₂O₂ 具有特异性,可将 H₂O₂ 分解为水和氧,不需要辅助因子即可对进行 H₂O₂ 清除,并且随着 H₂O₂ 浓度的增大,其酶活性也将增大^[10]。该研究发现,300 μmol/L 的 H₂O₂ 可使细胞氧化受损后,胞内 CAT 水平降低,而加入 PCF 后各组细胞内 PCF 水平明显升高,且与 PCF 具有浓度依赖性。这表明 PCF 可提高胞内 CAT 活性,增强细胞抗氧化能力,对细胞氧化应激有一定的保护作用。GSH - Px 是机体内重要的氧化防御指标之一^[11],可特异地催化还原型 GSH 对 H₂O₂ 的还原反应,降低 H₂O₂ 水平,是一种胞内重要的分解 H₂O₂ 的酶;T - AOC 可以反映机体的总抗氧化能力。该研究结果表明,与模型组相比,药物组加入 PCF 后,胞内 GSH - Px 和 T - AOC 水平升高,说明 PCF 有提高酶活力的作用。

综上所述,H₂O₂ 能够成功诱导 HaCaT 细胞氧化损伤,而 PCF 可以降低细胞上清中 LDH 含量,增强 GSH - Px、T -

AOC、和 CAT 活性,抵抗细胞脂质和蛋白过氧化,保护细胞完整性。该研究为 PCF 的抗氧化效应提供了理论依据,其机制可能与提高抗氧化酶活力有关。

参考文献

- [1] SIME S, REEVE V E. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol [J]. Photochem Photobiol, 2004, 79(2):193 - 198.
- [2] KAROL M H. How environmental agents influence the aging process [J]. Biomed Ther (Seoul), 2009, 17:113 - 124.
- [3] PARK H M, KIM H J, JANG Y P, et al. Direct analysis in real time mass spectrometry (DART - MS) analysis of skin metabolome changes in the ultraviolet B - induced mice [J]. Biomed Ther (Seoul), 2013, 21(6):470 - 475.
- [4] SYED FAIZ MUJTABAA, ASHISH DWIVEDIA, NEERA YADAV, et al. Singlet oxygen mediated apoptosis by anthrone involving lysosomes and mitochondria at ambient UV exposure [J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 252/253:258 - 271.
- [5] REGENSBURGER J, LEHNER K, MAISCH T, et al. Tattoo inks contain polycyclic aromatic hydrocarbons that additionally generates deleterious singlet oxygen [J]. Exp Dermatol, 2010, 19 (8): 275 - 281.
- [6] LIU X J, ZHANG ZY, LI P, et al. Polypeptide from *Chlamys farreri* modulates UVB - induced activation of NF - κB signaling pathway and protection HaCaT cells from apoptosis [J]. Regulatory Peptides, 2009, 153(1/3):49 - 55.
- [7] LI J L, LIU N, CHEN X H, et al. Inhibition of UVA - induced apoptotic signaling pathway by polypeptide from *Chlamys farreri* in human HaCaT keratinocytes [J]. Radiat Environ Biophys, 2007, 46(3):263 - 268.
- [8] 张兰兰,曹琼,张鹏,等. 槲皮素对氧化应激大鼠星形胶质细胞的保护作用 [J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(1): 10 - 12.
- [9] MATSUMOTOI K, SUZUKI A, WASHIMI H, et al. Electron paramagnetic resonance decay constant and oxidative stresses in liver microsomes of the selenium - deficient rat [J]. J Nutr Biochem, 2006, 17(10):677 - 681.
- [10] SIES H, BÜCHER T, OSHINO N, et al. Heme occupancy of catalase in hemoglobin - free perfused rat liver and of isolated rat liver catalase [J]. Arch Biochem Biophys, 1973, 54(1):106 - 116.
- [11] 董卫华,赵长安,咎玉玺. 微量元素硒对宁夏枸杞抗氧化系统的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(4): 355 - 357.

(上接第 6617 页)

济性、实用性及便捷性,该试验最终采用该净化方法。

该试验在空白鸡组织中添加不同浓度的氨苄西林工作液,测得鸡组织中氨苄西林平均回收率均在 75.31% 以上,符合 AOAC 残留测定要求。在该试验条件下,测得氨苄西林的 LOD 和 LOQ 分别为 3.5 和 10 μg/kg,低于最高残留限量(50 μg/kg),表明该方法灵敏,可满足鸡组织中氨苄西林残留分析的要求。

参考文献

- [1] 张正芹. 注射氨苄西林舒巴坦钠引起过敏性休克 1 例的急救与护理 [J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(29):7426.
- [2] MACAROV C A, TONG L, MARTÍNEZ-HUÉLAMP M, et al. Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC - MS/MS [J]. Food Chem, 2012, 135(4):2612 - 2621.
- [3] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量 [农业部公告(附录 4)] [R]. 北京:农业部, 2002.
- [4] OJEU. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in food stuffs of animal origin [S]. 2010.
- [5] 李玮,艾连峰,郭春海,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定牛奶和奶粉中的青霉素类药物及其主要酶解代谢产物 [J]. 色谱, 2013, 31(10):946 - 953.
- [6] 陈锦凤. LC - ToF - MS 和 LC - QqQ - MS 测定动物肌肉组织中的青霉

素 [J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 2012, 46(3):300 - 303.

- [7] LIU W L, WU C Y, LI Y T, et al. Penicillin analyses by capillary electro chromatography-mass spectrometry with different charged poly monoliths stationary phases [J]. Talanta, 2012, 101:71 - 77.
- [8] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2002:40.
- [9] CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, PIOVESANA S, et al. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1268:84 - 90.
- [10] 陈瑞春,贾海涛,艾连峰,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定牛奶和奶粉中 9 种青霉素类药物残留量 [J]. 食品科学, 2011, 32(18):249 - 252.
- [11] 范莹莹,其鲁,杨树民. 高效液相色谱 - 质谱联用法检测猪肉中 5 种青霉素的残留量 [J]. 分析实验室, 2007, 26(12):76 - 78.
- [12] 黄百芬,任一平,蔡增轩,等. LC - MS/MS 测定牛奶中六种青霉素类抗生素残留 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(1):31 - 34.
- [13] LI H, XIA X, XUE Y, et al. Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra - high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2012, 900:59 - 63.
- [14] SZULTKA M, KRZEMINSKI R, SZELIGA J, et al. A new approach for antibiotic drugs determination in human plasma by liquid chromatography - mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1272:41 - 49.
- [15] 中华人民共和国农业部. 关于发布《兽药残留试验技术规范(试行)》的通知(农牧发[2003]1号) [R]. 北京:农业部, 2003.