

孙婧陶,李兆华,张宝修,等. 过氧化氢诱导延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):149-152.

过氧化氢诱导延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型的建立

孙婧陶¹, 李兆华², 张宝修¹, 茹李波¹, 李钟淑¹, 方南洙¹

(1. 延边大学农学院/动物遗传育种与繁殖实验室, 吉林延吉 133002; 2. 吉林省农业科学院, 吉林长春 130033)

摘要:为了建立过氧化氢诱导延边奶山羊乳腺上皮细胞(DGMECs)氧化损伤模型,用体外培养的延边奶山羊乳腺上皮细胞传代后进行试验,用 DMEM/F12 培养基将 H_2O_2 稀释为 5、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$,以 DMEM/F12 培养基作为空白对照组。以 H_2O_2 处理 4 h 后,用 MTT 法观察 H_2O_2 对乳腺上皮细胞活力的影响,用 Hoechst33342/PI 荧光染色法观察 H_2O_2 损伤对乳腺上皮细胞的促凋亡情况,DCFH-DA 检测细胞内活性氧(ROS)含量。MTT 活性检测结果表明,各处理组的细胞存活率与未处理组差异显著($P < 0.05$)。5、50、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 4 h 后,细胞存活率分别为 91.21%、77.50%、54.48%;而 200、500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 4 h 后,细胞存活率仅为 35.53%、27.79%,乳腺上皮细胞死亡过多。Hoechst33342/PI 染色结果表明, H_2O_2 通过诱导乳腺上皮细胞的凋亡及坏死来降低细胞的存活率。利用荧光探针 DCFH-DA 分析 DGMECs 的 ROS 水平,结果显示,细胞经 H_2O_2 处理后会明显增加细胞内 ROS 水平。 H_2O_2 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 4 h 后,约导致 50% 的细胞死亡,坏死比例小,ROS 含量也相对较少,在此浓度下,细胞还具有恢复其功能的可能性,因此选用 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理细胞 4 h 来建立延边奶山羊乳腺上皮细胞氧化损伤模型。

关键词:延边奶山羊; H_2O_2 ; 乳腺上皮细胞; 氧化损伤; 凋亡

中图分类号: S852.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0149-04

随着人们生活品质的提高,对于乳制品的需求量也越来越大,有研究人员对山羊奶、牛奶和人奶中蛋白质、脂肪、维生素、矿物质等主要营养成分进行比较后发现,山羊奶在总体营养成分方面优于牛奶,更接近人奶^[1]。但是乳房炎是影响羊奶品质的重要因素,而乳腺组织发生氧化应激又是造成乳房炎的原因之一。同时,乳腺组织可以作为乳腺生物反应器的

媒介,利用转基因技术能够在动物乳汁中生产一些具有重要价值的产品。由此可见,研究乳腺组织的抗氧化机制显得越来越重要。活性氧(reactive oxygen species,ROS)和其他自由基是机体正常代谢的产物,ROS 易与细胞内的生物大分子反应,可以直接损伤生物大分子或通过链反应使电子从一个生物大分子传递到另一个,从而最终导致细胞结构的损伤。有研究表明,许多疾病的发生,都是与 ROS 自由基有联系。Janisch 等研究发现,自由基代谢紊乱与肾小球肾炎的发病机理有一定的关联^[2]。肝炎以及肝硬化患者的过氧化脂产物和自由基的水平明显升高^[3]。氧化损伤主要是由 ROS 调节的,ROS 在胞溶作用后以及氧化爆发后大量产生^[4-5],正常细胞呼吸作用的副产物也会产生 ROS,主要与线粒体的电子运输有关^[6]。细胞抵制氧化损伤的机制包括通过 ROS 酶转化以减

收稿日期:2013-06-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:3136546);吉林省科技厅重点项目(编号:20100228)。

作者简介:孙婧陶(1990—),女,河北承德人,硕士研究生,研究方向为动物繁殖与生物技术。E-mail:sunj1990@126.com。

通信作者:方南洙(1960—),男,朝鲜族,博士,教授,研究方向为动物繁殖与生物技术。E-mail:nzfang@ybu.edu.cn。

3 结论

随着浓度的不断增加,多效唑对新梢生长抑制作用加强,其中 1 000 mg/L 浓度对新梢生长的抑制作用最强。

随着多效唑浓度的不断增加,果实的可溶性糖含量、糖酸比、平均单果重、干重 4 项指标都在一定程度上有所提高,但维生素 C、可滴定酸的含量无显著变化。

铺设反光膜与对照相比显著提高了设施内行间、株间的光照强度,铺设反光膜的果实平均单果重和果实的品质指标都有所增加,显著提高果实的着色指数。

参考文献:

[1] 邓西民. 果树生物学[M]. 北京:高等教育出版社,1999:133-

134.

[2] 陈海江,段红喜,徐继忠,等. 提高设施桃果实品质试验[J]. 山西果树,2003(1):4-5.

[3] 李宪利,高东升,夏 宁. 果树设施栽培的原理与技术研究[J]. 山东农业大学学报,1996,27(2):227-232.

[4] 邹 琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995:111-114.

[5] 西北农业大学. 基础生物化学实验指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1994:108-109.

[6] 赵世杰. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,1998:23-25.

[7] 李普越,戴兴龙,杨有占. 提高果实品质的技术措施[J]. 山西果树,2000,82(4):20-21.

少 ROS 的产生,过渡金属催化剂的螯合作用,以及通过抗氧化剂来降低 ROS 带来的毒性^[7]。ROS 产生和细胞保护机制间的不平衡,会导致细胞直接暴露于 ROS 环境下,受到自由基的损伤。因此,笔者建立一个模型来探讨乳腺上皮细胞的凋亡及死亡是否与氧化损伤有关。

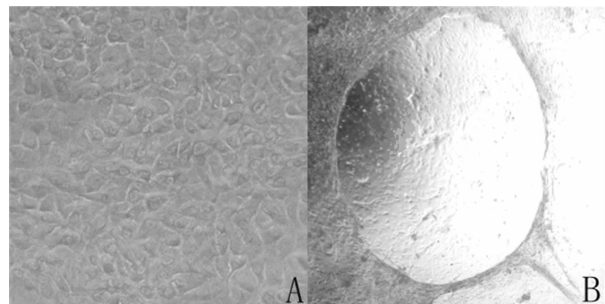
1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 本试验中所用药品均购自 Sigma 公司(除以下注明药品)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 GIBCO。

1.2 方法

1.2.1 延边奶山羊乳腺上皮细胞(DGMECs)的培养 乳腺上皮细胞用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养,同时加入 100 mg/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素、5 μg/mL 胰岛素。在 38 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,乳腺上皮细胞传代采用胰蛋白酶消化法。细胞达到 80% 融合状态时,用温水浴后的 PBS 洗涤 2 次,加入 0.15% Trypsin - 0.02% EDTA,置于培养箱中,消化 4~5 min,在倒置显微镜下观察消化情况,待细胞收缩变圆时,用含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化,吹打,使细胞脱离瓶壁形成单细胞悬液,离心,接种(图 1)。



A—纯化的乳腺上皮细胞(150×); B—具有拉网结构的典型上皮细胞(100×)

图1 倒置显微镜下延边奶山羊乳腺上皮细胞

1.2.2 试验分组 待细胞长至 60%~70% 融合状态时,换无 FBS 的 DMEM/F12 培养液继续培养 24 h,使细胞同步化后,随机分为 6 组:正常对照组,5、50、100、200、500 μmol/L H₂O₂ 损伤组。

1.2.3 细胞活力检测 将细胞密度调整为 0.1 亿个/L 接种于 96 孔板上,在含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中培养 24 h,然后用无 FBS 的 DMEM/F12 培养液继续培养 24 h,分别加入含 5、50、100、200、500 μmol/L H₂O₂ 的 DMEM/F12 培养液 200 μL,刺激细胞 4 h。加入 5 mg/mL 四甲基偶氮唑盐(MTT)20 μL/孔,置于培养箱中孵育 4 h,小心吸取上清液,加入 DMSO 150 μL/孔,在振荡器上振荡 10 min,使紫色结晶甲瓚充分溶解,用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度。以不添加 H₂O₂ 的对照组细胞存活率为 100%,各浓度组的细胞存活率 = 各浓度组的 $D_{490\text{ nm}}$ / 不添加 H₂O₂ 组的 $D_{490\text{ nm}}$ × 100%。

1.2.4 Hoechst33342/PI 双染色检测细胞凋亡 采用 Hoechst33342/PI 双染色检测 DGMECs 细胞凋亡。Hoechst33342/PI 双染中,PI 及 Hoechst33342 均可与细胞核

DNA(或 RNA)特异性结合,在紫外光激发下分别发出蓝色光和红色光。Hoechst33342 为膜通透性的荧光染料,但是 PI 不能通过正常的细胞膜,正常细胞和中早期凋亡细胞均可被 Hoechst33342 着色,其中正常细胞 Hoechst33342 着色后,核的形态呈圆形、淡蓝色,内有较深的蓝色颗粒;中早期凋亡细胞的核由于浓集, Hoechst33342 着色呈亮蓝色,或核呈分叶,碎片状,边集;坏死或晚期凋亡细胞的细胞膜被破坏,这时 PI 着红色, Hoechst33342 因细胞膜破裂而不能着色。

6 孔培养板内接种细胞 0.1 亿个/孔,待细胞长至 60%~80% 融合状态时,用 5、50、100、200、500 μmol/L H₂O₂ 的 DMEM/F12 培养液作用 4 h,弃去上清,小心用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 1 次;加入 10 μg/mL Hoechst33342 染液 1 mL/孔,置于培养箱中 37 ℃ 避光反应 20 min,弃上清,用 PBS 洗涤 3 次;再加入 20 μg/mL PI 染液 1 mL/孔,37 ℃ 避光反应 15 min, PBS 洗涤 3 次。染色完成后,置于荧光显微镜下,在波长为 365 nm 的紫外灯下观察细胞凋亡情况。

1.2.5 ROS 的测定 使用 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)测定活细胞内氧化水平的变化^[8-9], DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH,生成有荧光的 DCF,检测 DCF 的荧光可反映细胞内 ROS 的水平。DGMECs 接种于 6 孔培养板(0.1 亿个/孔),待细胞长至 60%~80% 融合状态时,用含 5、50、100、200、500 μmol/L H₂O₂ 的 DMEM/F12 培养液刺激细胞 4 h,弃去上清,小心用 PBS 洗涤 1 次;加入 10 μmol/L DCFH-DA 1 mL,37 ℃ 孵育 30 min,用 PBS 洗涤细胞 5 次,以充分洗去未进入细胞的 DCFH-DA。直接用荧光显微镜观察绿色荧光强度,应用 Image-pro plus 6.0 软件分析平均荧光强度。

1.2.6 数据分析 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,方差分析多重比较检验数据差异性,显著标准为 $\alpha = 0.05$ 。试验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

2 结果与分析

2.1 H₂O₂ 对 DGMECs 活力的影响

通过检测 H₂O₂ 对 DGMECs 的增殖抑制作用,确定 H₂O₂ 对 DGMECs 的损伤程度。由图 2 可知,乳腺上皮细胞在含不同浓度 H₂O₂ 的培养液中刺激 4 h 后,细胞存活率下降,且随着 H₂O₂ 浓度的增加,细胞存活率加剧下降,各处理组的细胞

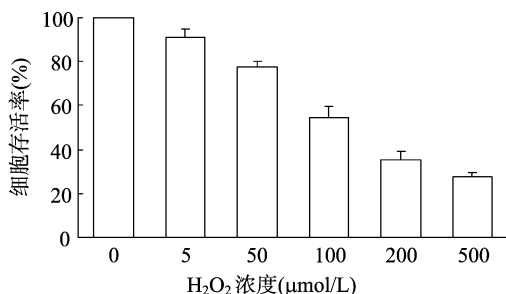


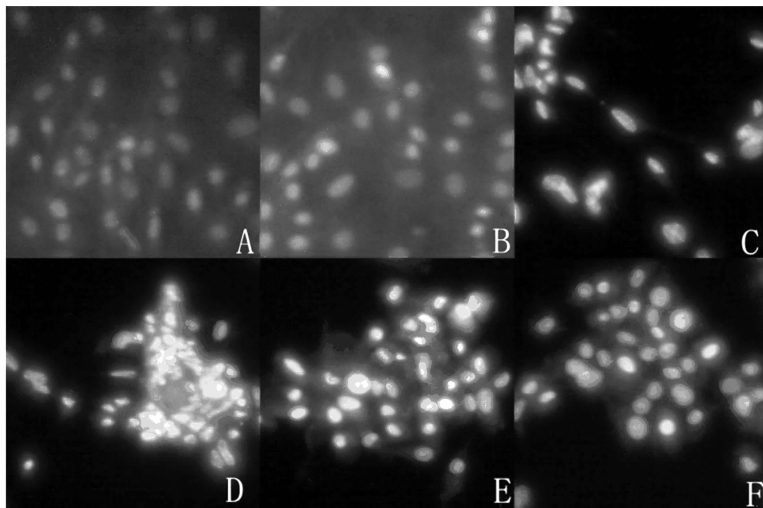
图2 不同 H₂O₂ 处理对延边奶山羊乳腺上皮细胞活力的影响

存活率与未处理组差异显著 ($P < 0.05$)。5、50、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 4 h 后,细胞存活率分别为 91.21%、77.50%、54.48%;而 200、500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 4 h 后,细胞存活率仅为 35.53%、27.79%,乳腺上皮细胞死亡过多。

2.2 H_2O_2 对 DGMECs 的损伤效应

荧光显微镜观察结果(图 3)显示,随着 H_2O_2 浓度的增加,乳腺上皮细胞核出现固缩、浓集比例逐渐上升的现象,且

在高浓度 H_2O_2 处理下,细胞被 PI 着色比例也上升。5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理时,乳腺上皮细胞仅有少量出现固缩现象;50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后,固缩比例上升;在 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理下,细胞不仅出现了大面积固缩现象,且已经有少量的细胞出现了坏死现象;而在 200、500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后,坏死细胞的比例也明显上升。说明 H_2O_2 通过诱导乳腺上皮细胞的凋亡及坏死来降低细胞的存活率。



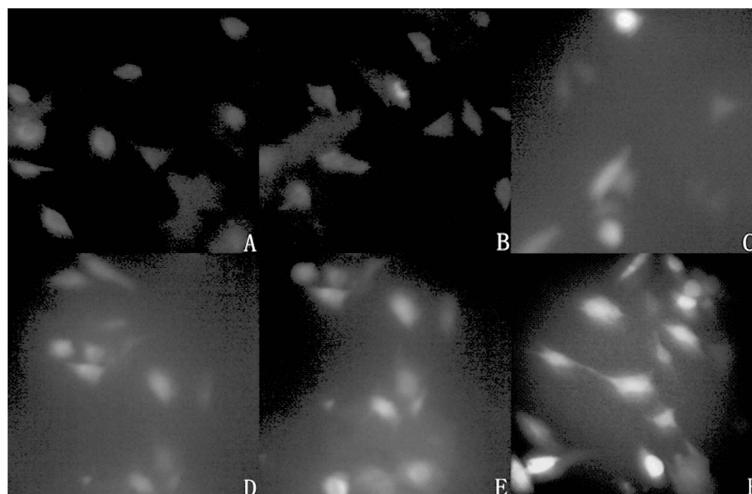
A—对照组; B—5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; C—50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; D—100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; E—200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; F—500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2

图3 Hoechst33342/PI 荧光染色的延边奶山羊乳腺上皮细胞 (200 \times)

2.3 H_2O_2 对 DGMECs 的 ROS 水平影响

由图 4、图 5 可知,50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组细胞内荧光强度(3.93、4.30、4.80、6.27)均显著高于对照组(2.23),而 5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组(2.47)与对照组(2.23)差

异不显著。50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组虽然差异不显著,但是随着浓度的增加,细胞内荧光强度也逐渐增加。由此可知,细胞经 H_2O_2 处理后,会明显增加细胞内的 ROS 水平。



A—对照组; B—5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; C—50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; D—100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; E—200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; F—500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2

图4 DCFH-DA 荧光染色的延边奶山羊乳腺上皮细胞 (200 \times)

3 结论与讨论

乳腺组织是哺乳动物最重要的器官之一,其整体抵抗能力较脆弱,长期受到不同激素类型和水平的调控,也使其极易受到体内不断产生积累的 ROS 的攻击,从而容易受到氧化损

伤,从而导致乳腺疾病。通过细胞培养在体外建立氧化应激模型,目前应用最广泛的方法是过氧化氢损伤模型^[10]。 H_2O_2 是一种重要的 ROS,极易透过细胞膜与细胞内的 Fe^{3+} 通过 ENTON 反应形成高活性的自由基,攻击细胞内的脂质、蛋白质及 DNA,导致一系列反应,且其易获得,性质相对稳定,所

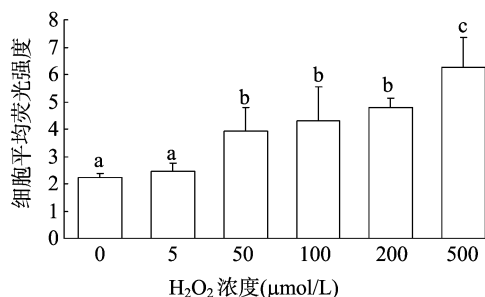


图5 DCFH-DA 染色后细胞平均荧光强度

以已经成为研究各类细胞氧化损伤的重要工具^[11]。H₂O₂ 诱导氧化损伤时,细胞活力下降,其中最重要原因是 H₂O₂ 会导致细胞膜脂质过氧化反应,且蛋白质氨基酸残基的氧化损伤会促使羟基衍生物的生成^[12]。本研究之所以选择 4 h 作为 H₂O₂ 处理观察时间,是因为有研究表明 4 h 是检测相关基因产生表达变化的最小共有间隔^[13],同时考虑到使细胞过长时间暴露于 H₂O₂ 环境下会对细胞造成不可逆的损伤及死亡。本研究发现,当 100 μmol/L H₂O₂ 在延边奶山羊乳腺上皮细胞作用 4 h 后,H₂O₂ 造成细胞内蛋白质、脂质、DNA 等损伤,但是这种损伤并没有造成 DGMECs 的大量死亡,细胞还有进行自我修复的可能性。而高浓度的 H₂O₂ 刺激细胞后会造成细胞不可逆的损伤,出现细胞大量死亡。这些研究表明,H₂O₂ 对 DGMECs 的氧化应激是一个渐进的过程,在一定的限度内,细胞损伤是可逆的,超过这一限度后,会对细胞造成不可逆的伤害。

细胞凋亡是细胞在一系列基因的激活、表达、调控等作用下而采取的主动死亡过程^[14]。H₂O₂ 会诱导细胞脂质产生过氧化反应,使细胞膜的结构和功能发生较大改变,甚至渗入细胞内部,破坏线粒体和 DNA 结构,引起细胞凋亡和坏死^[15-16]。本研究结果显示,随着 H₂O₂ 浓度的上升,延边奶山羊乳腺上皮细胞的超微结构发生了变化,即细胞核固缩,形成凋亡小体;抑制乳腺上皮细胞的增殖,诱导细胞死亡。

为了进一步证明 H₂O₂ 会通过增加细胞内 ROS 含量的途径使延边奶山羊乳腺上皮凋亡,笔者使用 DCFH-DA 来检测细胞内 ROS 含量。众所周知,H₂O₂ 本身并不是一种具有高活性的物质,具有毒性作用的主要机理是在过渡金属离子存在时使具有羟基自由基的 ROS 形成^[17]。羟基自由基及其他 ROS 的形成,启动了脂质过氧化作用,引起 DNA 损伤。H₂O₂ 浓度的上升,会增加羟基自由基的生成,因此会提高氧化损伤带来的毒性作用。

综上所述,H₂O₂ 的加入导致细胞活力下降,细胞出现凋亡甚至坏死,且细胞内 ROS 含量上升,说明 H₂O₂ 可以模拟体内环境,作为乳腺上皮细胞氧化损伤模型的诱导物质。100 μmol/L H₂O₂ 作用于细胞 4 h,导致细胞 50% 左右死亡,坏死比例小,ROS 含量也相对较少,在此浓度下,细胞还具有恢复功能的可能性,因此选择 100 μmol/L H₂O₂ 作用于延边奶山羊乳腺上皮细胞处理 4 h,以建立氧化损伤模型。在以后的研究中,可以在此氧化损伤模型的基础上,选择适当的抗氧化药物处理 DGMECs,探讨抗氧化剂对延边奶山羊乳腺上皮细胞的保护作用。

参考文献:

- [1] 顾浩峰,张富新,梁 蕾,等. 山羊奶与牛奶和人奶营养成分的比较[J]. 食品工业科技,2012,33(8):369-373.
- [2] Janisch K M, Milde J, Schempp H, et al. Vitamin C, vitamin E and flavonoids[J]. Dev Ophthalmol,2005,38:59-69.
- [3] Karageuzyan K G. Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment[J]. Current Drug Targets Inflammation and Allergy, 2005,4(1):85-98.
- [4] Bellavite P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes[J]. Free Radical Biology and Medicine,1988,4(4):225-261.
- [5] Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival[J]. The Journal of Neuroscience; the Official Journal of the Society for Neuroscience,1993,13(1):29-37.
- [6] Richter C, Kass G E. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation[J]. Chemico-biological Interactions,1991,77(1):1-23.
- [7] Yu B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species[J]. Physiological Reviews,1994,74(1):139-162.
- [8] Sun L K, Yoshii Y, Miyagi K. Cytotoxic effect through fas/APO-1 expression due to vitamin K in human glioma cells[J]. Journal of Neuro-oncology,2000,47(1):31-38.
- [9] Gao F, Yi J, Yuan J Q, et al. The cell cycle related apoptotic susceptibility to Arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species[J]. Cell Research,2004,14(1):81-85.
- [10] Farombi E O, Möller P, Dragsted L O. Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells[J]. Cell Biology and Toxicology,2004,20(2):71-82.
- [11] 张 斌,夏作理,赵晓民,等. 氧化应激模型的建立及其评价[J]. 中国临床康复,2006,10(44):112-114.
- [12] Stadtman E R, Berlett B S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease[J]. Drug Metabolism Reviews,1998,30(2):225-243.
- [13] Weigel A L, Handa J T, Hjelmeland L M. Microarray analysis of H₂O₂-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells[J]. Free Radical Biology and Medicine,2002,33(10):1419-1432.
- [14] Vaskivuo T E, Ottander U, Oduwale O, et al. Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17β-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression[J]. Molecular and Cellular Endocrinology,2002,194(1):191-200.
- [15] Kemp T J, Causton H C, Clerk A. Changes in gene expression induced by H₂O₂ in cardiac myocytes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2003,307(2):416-421.
- [16] Li C Y, Deng Y L, Sun B H. Taurine protected kidney from oxidative injury through mitochondrial-linked pathway in a rat model of nephrolithiasis[J]. Urological Research,2009,37(4):211-220.
- [17] Halliwell B, Gutteridge J M, Cross C E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? [J]. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine,1992,119(6):598-620.