

扇贝多肽(PCF)对H₂O₂损伤胸腺细胞的保护作用*

车勇良^{1,2,3}, 孙 谧¹, 欧阳五庆², 姚如永⁴, 王跃军¹, 王春波⁵

(1 中国科学院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 福建省农科院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 4 青岛大学 医学院 附属医院, 山东 青岛 266003;

5 青岛大学 医学院, 山东 青岛 266021)

[摘 要] 将胸腺细胞分为正常对照组、H₂O₂ 模型组、0.1 g/L Vc 组、0.5 g/L PCF 组、0.25 g/L PCF 组和0.125 g/L PCF 组6组, 通过不同药物或不同浓度处理后, 采用生物化学方法分别检测细胞裂解液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)和活性氧(ROS)的含量, 采用流式细胞仪测定各组细胞胞浆中的Ca²⁺含量和线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的变化。结果显示, 扇贝多肽(PCF)能提高细胞中SOD、GSH-Px的含量, 增强细胞的T-AOC, 降低细胞中MDA和ROS的含量, 并能引起胞浆中Ca²⁺含量的下降和 $\Delta\Psi_m$ 的提升。表明PCF具有抑制H₂O₂对胸腺细胞氧化损伤的作用。

[关键词] 栉孔扇贝; 胸腺细胞; 过氧化氢; 抗氧化剂

[中图分类号] Q 516

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)08-0013-04

在有氧代谢过程中, 机体会产生少量的活性氧(ROS), 这些ROS可以被机体内存在的抗氧化酶和非酶抗氧化剂所清除。但在病理条件下机体内的抗氧化酶和非酶抗氧化剂受到破坏, 使其在细胞内的含量下降, 因而ROS大量聚集, 细胞被氧化损伤, 最终导致机体出现各种疾病。据报道^[1], 在细胞信号转导途径中, ROS可以引起线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)下降和胞浆中的Ca²⁺升高, 继而引起细胞代谢功能紊乱。但抗氧化剂能阻滞胞浆中Ca²⁺的升高。

外源性天然抗氧化剂能抑制细胞的氧化损伤。扇贝多肽(PCF)是从栉孔扇贝中分离出来的一种新的海洋生物活性多肽。研究证明^[2~4], PCF能保护无毛小鼠的皮肤和体外HeLa细胞免受紫外线A的损伤, 也能保护体外人成纤维细胞免受紫外线B的损伤。胸腺细胞作为一种来自胸腺的不成熟的T淋巴细胞, 可介导机体的细胞免疫应答反应。据报道^[5], ROS能引起胸腺细胞的氧化损伤。但有关PCF保护胸腺细胞免受H₂O₂损伤的研究尚未见报道。本研究建立了胸腺细胞的H₂O₂氧化损伤模型, 以探

讨PCF的保护作用及其机理。

1 材料与方法

1.1 材料

扇贝多肽由中国科学院黄海水产研究所提取、纯化, 由3~4个肽链组成, 每个肽链含8~10个氨基酸, 相对分子质量为800~1000; 3月龄昆明小鼠由青岛大学医学院提供; Fluo-3 AM ester 荧光染料购自美国加利福尼亚州的Biotium公司; 流式细胞仪购自Becton Dickinson公司; 罗丹明123荧光染料购自Sigma公司; RPMI-1640购自GBCO公司; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)和羟自由基(OH[·])的检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 磷酸盐缓冲液(PBS)和其他一些分析纯试剂均为武汉博士德公司产品。

1.2 方法

1.2.1 胸腺细胞培养 无菌条件下取小鼠胸腺, 按常规方法用RPMI-1640制成胸腺细胞悬液, 其浓度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 经台盼蓝染色检查细

* [收稿日期] 2004-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970638)

[作者简介] 车勇良(1976-), 男, 江西临川人, 在读硕士, 主要从事新药研究与开发。

[通讯作者] 孙 谧(1962-), 女, 山东青岛人, 研究员, 主要从事海洋活性物质的开发。

胞活性大于 95%。将胸腺细胞接种于 24 孔板, 每孔 2 mL, 每组 3 个复孔, 试验设正常对照组、H₂O₂ 模型组、0.1 g/L Vc 组和 PCF 终浓度分别为 0.5, 0.25 和 0.125 g/L 的 PCF 组, 共 6 组, 每组 3 个复孔。按分组处理分别加入 Vc 和 PCF, 置于 37℃, 体积分数 5% CO₂ 培养箱培养 2 h。然后分别在每孔中加入 12.5 μmol/L 的 H₂O₂ (正常对照组不加), 继续培养 2 h, 1 500 r/min 离心 10 min, 备用。

1.2.2 SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA 和 ROS 的检测 将药物和 H₂O₂ 处理的胸腺细胞 1 500 r/min 离心 10 min, 然后用 0.1 mol/L PBS 清洗 2~3 次, 超声波裂解细胞成细胞裂解液, 按照试剂盒的使用说明书分别检测细胞内 SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA 和 ROS 的含量。

1.2.3 Ca²⁺ 含量的测定 将药物和 H₂O₂ 处理的胸腺细胞 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 0.1 mol/L PBS 漂洗细胞, 1 500 r/min 离心 2~3 次, 弃上清液。加入 5 μg/mL 的 Fluo-3 AM ester 荧光染料, 37℃ 孵育 30 min, 用 0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。然后加入 1 mL 0.1 mol/L PBS 重悬细胞, 再加入 2 mL 无水乙醇立即振荡混匀, 调整细胞浓度为 5.0 × 10⁵~1.0 × 10⁶ mL⁻¹, 流式细胞仪检测。

1.2.4 ΔΨ_m 的测定 将药物和 H₂O₂ 处理的胸腺细胞 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 0.1 mol/L PBS 漂洗细胞, 1 500 r/min 离心 2~3 次, 弃上清液。加入罗丹明 123 荧光染料, 避光冷藏 15 min。用 0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 1 mL 0.1 mol/L PBS 重悬细胞, 再加入 2 mL 无水乙醇立即振荡混匀, 调整细胞浓度为 5.0 × 10⁵~1.0 × 10⁶ mL⁻¹, 流式细胞仪检测。

1.2.5 统计学分析 所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 统计软件处理, ANOVA 分析数据。

2 结果与分析

2.1 SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA 和 ROS 含量的变化

由表 1 可知, H₂O₂ 模型组的胸腺细胞中抗氧化酶(SOD 和 GSH-Px)和非酶抗氧化剂(T-AOC)含量明显低于正常对照组; 而 PCF 处理的胸腺细胞中的抗氧化酶(SOD 和 GSH-Px)和非酶抗氧化剂(T-AOC)含量明显升高, 且呈剂量依赖性。表 1 还显示, H₂O₂ 模型组的胸腺细胞中 MDA 和 ROS 含量显著高于正常对照组; 而 PCF 处理的胸腺细胞中 MDA 和 ROS 含量显著降低, 且呈剂量依赖性。

表 1 不同处理组中 SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA 和 ROS 含量的变化

Table 1 The level of SOD, GSH-Px, T-AOC, MDA and ROS in different groups

组别 Groups	SOD	GSH-Px	T-AOC	MDA	ROS
正常对照组 Control group	59.354 ± 5.65 d	258.489 ± 24.38 ac	1.152 ± 0.18 a	8.402 ± 1.49 d	325.607 ± 30.15 a
H ₂ O ₂ 模型组 Model group	48.563 ± 5.14 a	146.903 ± 34.66 d	0.292 ± 0.19 d	20.029 ± 3.19 a	533.763 ± 44.82 d
0.5 g/L PCF	68.575 ± 3.59 c	375.728 ± 80.89 b	1.728 ± 0.44 b	3.002 ± 1.81 c	361.985 ± 18.95 a
0.25 g/L PCF	62.578 ± 5.56 cd	312.701 ± 62.86 ab	1.223 ± 0.31 a	5.282 ± 0.75 c d	424.098 ± 22.11 b
0.125 g/L PCF	61.008 ± 0.99 d	258.932 ± 35.42 ac	0.784 ± 0.09 ac	8.160 ± 1.80 d	472.222 ± 22.38 bc
0.1 g/L Vc	56.440 ± 2.31 bd	241.810 ± 54.28 ac	0.917 ± 0.28 ac	15.335 ± 1.38 bd	481.301 ± 20.63 c

注: 同列数据后标有相同字母者表示方差分析(DMRT)在 5% 水平上无显著差异。下表同。

Note: Among those labeled with the same letter in a alignment showed that they were no significant difference by the method of DMRT. This is the same for follow ing table

2.2 Ca²⁺ 和 ΔΨ_m 在细胞中的变化

不同处理组中 Ca²⁺ 和 ΔΨ_m 的含量见表 2。

表 2 不同处理组中 Ca²⁺ 和 ΔΨ_m 含量的变化

Table 2 The level of Ca²⁺ and m in different groups

组别 Groups	Ca ²⁺ /mg	ΔΨ _m /mV
正常对照组 Control group	9.590 ± 1.20 a	1.516.25 ± 160.75 a
模型组 Model group	15.867 ± 2.10 c	791.220 ± 183.79 d
0.5 g/L PCF	10.083 ± 0.95 a	1.471.403 ± 178.29 a
0.25 g/L PCF	11.157 ± 1.03 ab	1.357.833 ± 93.35 ab
0.125 g/L PCF	13.253 ± 1.41 b	1.225.343 ± 110.85 bc
0.1 g/L Vc	13.333 ± 1.38 b	1.065.910 ± 41.92 c

表2表明,胞浆中的Ca²⁺经H₂O₂处理后明显升高,而PCF能维持胞浆中的Ca²⁺含量;H₂O₂处理后胸腺细胞中的 $\Delta\Psi_m$ 显著下降,而PCF能维持胸腺细胞中的 $\Delta\Psi_m$ 。

3 讨论

天然抗氧化剂通常分为两类,即抗氧化酶类和小分子抗氧化物质。抗氧化酶类包括SOD, CAT, GSH-Px和一些辅助酶类。小分子抗氧化物质包括Vc、脂肪酸、多酚类和胡萝卜素等,在防止机体的氧化应激方面起到了重要作用。在正常生理条件下,细胞内的氧化还原地位主要由ROS与细胞抗氧化防御体系之间的平衡来决定。因此,一旦遭受氧化应激,细胞的这种平衡将被破坏,ROS含量上升,抗氧化酶和非酶抗氧化剂的含量随之下降。在本研究中, H₂O₂模型组的胸腺细胞中SOD, GSH-Px和代表小分子抗氧化物质的T-AOC含量明显低于正常对照组,而ROS含量高于正常对照组。这表明ROS能降低SOD和GSH-Px的活性或抑制其表达,也能降低细胞的总抗氧化能力。

脂质过氧化通常作为细胞膜被自由基氧化损伤的一种表征^[6]。MDA是一种自由基所致脂质过氧化的产物。ROS能引起内源性花生四烯酸及其代谢产物的释放,同时细胞内MDA含量也增加。在本研究中, H₂O₂模型组胸腺细胞中MDA的增加,证明H₂O₂导致了细胞膜的脂质过氧化。总之,MDA引起了细胞的各种变化,破坏了细胞结构和功能的完整性,最终将使细胞走向死亡。

$\Delta\Psi_m$ 含量下降会导致线粒体中Ca²⁺外流,从

而引起胞浆中Ca²⁺含量增加。其可能机制是ROS引起线粒体中Ca²⁺与胞浆中Na⁺和H⁺的交换^[7],或线粒体膜蛋白质通道孔开放^[8](如线粒体膜通透性转移孔开放),最终导致线粒体中Ca²⁺外流。在本研究中, H₂O₂引起 $\Delta\Psi_m$ 下降的同时,也导致了胞浆中Ca²⁺的升高,这与前人的研究^[8]是一致的。

有大量文献报道^[9,10], Ca²⁺是一种重要的细胞内信号。胞浆中Ca²⁺的持续升高导致细胞中大量蛋白酶和磷酸酶失活,而且分解Ca²⁺的依赖性蛋白酶和磷酸酶可能被激活,引起细胞骨架的破坏和细胞膜的损伤,最终使细胞失去正常功能。继而,细胞内的抗氧化酶活性也将下降。本研究证明, H₂O₂引起Ca²⁺升高的同时也导致了细胞内SOD和GSH-Px含量的降低。

PCF是一种来源于海洋扇贝的生物活性多肽,能保护细胞内SOD和GSH-Px免受H₂O₂的损伤。本研究结果表明,PCF能提高细胞内总抗氧化能力(T-AOC),维持细胞内SOD和GSH-Px的含量,并能降低细胞内ROS和脂质过氧化产物MDA的水平。线粒体膜通透性的改变引起了 $\Delta\Psi_m$ 降低,进一步使Ca²⁺外流,继而导致胞浆中Ca²⁺升高。但PCF维持了 $\Delta\Psi_m$ 的正常,胞浆中的Ca²⁺含量也随之下降。

综上所述,PCF能够维持或提升细胞中抗氧化酶和非酶抗氧化剂水平,PCF通过降低细胞内MDA水平而抑制了细胞膜的脂质过氧化。在细胞信号转导中,PCF通过维持胞浆中Ca²⁺的稳定而保护了胸腺细胞免受氧化损伤。

[参考文献]

- [1] Bauer V, Oike M, Tanaka H, et al Hydrogen peroxide induced responses of cat tracheal smooth muscle cells[J]. Br J Pharmacol, 1997, 121: 867- 874
- [2] Wang C B, Yao R Y, Liu Z T, et al Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet A [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23: 813- 818
- [3] Yao R Y, Wang C B. Protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* on HeLa cells damaged by ultraviolet A [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23: 1018- 1022
- [4] Wang C B, Ding B X, Guo S B, et al Protective effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on mitochondria in human dermal fibroblasts irradiated by ultraviolet B [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 692- 696
- [5] Dobmeyer T S, Findhammer S, Dobmeyer J M, et al Ex vivo induction of apoptosis in lymphocyte is mediated by oxidative stress: role for lymphocyte loss in HIV infection[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22: 775- 785
- [6] Halliwell B, Gutteridge J M. Lipid peroxidation, A radical chain reaction[A]. Free Radicals in Biology and Medicine[C]. 2 ed Oxford: Clarendon Press, 1989. 188- 276
- [7] Gunter T E, Gunter K K, Sheu S S, et al Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance[J]. Am J Physiol, 1994, 267: 313- 339

- [8] Haworth R A, Hunter D R. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria II: nature of the Ca^{2+} trigger site[J]. Arch Biochem Biophys, 1979, 195: 460- 467.
- [9] Volk T, Hensel M, Kox W J. Transient Ca^{2+} changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide[J]. Mol Cell Biochem, 1997, 171: 11- 21.
- [10] Suzuki Y J, Foman H J, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction[J]. Free Rad Biol Med, 1997, 22: 269- 285.

Protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* on thymocytes damaged by hydrogen peroxide

CHE Yong-liang^{1, 2, 3}, SUN M i¹, OUYANG Wu-qing²,
YAO Ru-yong⁴, WANG Yue-jun¹, WANG Chun-bo⁵

(1 Yellow Sea Fishery Research Institute, Academy of Chinese Science, Qingdao, Shandong 266071, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Animal Sciences and Veterinary Medicine Research Institute, Fujian Academy of Agriculture Science, Fuzhou, Fujian 350013, China;

4 Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China;

5 Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China)

Abstract: To study the protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* (PCF) on thymocytes damaged by H_2O_2 and antioxidative mechanisms of PCF, we made a thymocytes damaged- H_2O_2 model. In this study, thymocytes were divided into six groups including control group, model group, 0.1 g/L VC group, 0.5 g/L PCF group, 0.25 g/L PCF group and 0.125 g/L PCF group. Thymocytes in different groups were exposed to PCF at various concentrations and 12.5 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidases (GSH-Px), Total Antioxidative Capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in cell lysates were estimated by biochemical methods. Cytosolic Ca^{2+} levels and mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were determined by flow cytometry. Results showed PCF could enhance the activities of SOD and GSH-Px, promote antioxidative capacity and reduce the amount of MDA and ROS. Moreover, PCF caused an elevation of $\Delta\Psi_m$ and a decrease of cytosolic Ca^{2+} . It is concluded that PCF can inhibit the damaging effect of H_2O_2 .

Key words: *Chlamys farreri*; thymocyte; hydrogen peroxide; antioxidant