表没食子儿茶素没食子酸酯对硫酸镍诱导 Beas-2B 细胞氧化损伤的保护作用

Protective effect of EGCG on oxidative injury of Beas-2B cells induced by nickel sulfate

周艾佳, 安学军, 杨越, 王玥, 辛芮, 高然, 吴永会

(哈尔滨医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 为确定表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对支气管上皮 Beas-2B 细胞的抗氧化作用, 本实验采用 500 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸镍诱导建立细胞氧化损伤模型, 通过测定细胞存活率、ROS 生成量、谷胱甘肽水平及丙二醛含量, 探讨不同剂量 (2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) EGCG 对硫酸镍诱导氧化损伤 Beas-2B 细胞的保护作用。结果表明, EGCG 可以提高 Beas-2B 细胞的存活率, 降低 ROS 生成量, 提高 GSH 含量, 降低 MDA 水平 ($P < 0.05$)。提示 EGCG 对 Beas-2B 细胞具有保护作用, 其机制可能与减少细胞氧化损伤有关。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); 硫酸镍; Beas-2B 细胞; 氧化损伤

中图分类号: R994 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2016)06-0433-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggyx.2016.06.012

研究表明, 氧化应激是镍化合物引起细胞损伤和凋亡的重要毒理学机制^[1]。为此, 国内外学者应用维生素 E、L-抗坏血酸和类胡萝卜素等抗氧化物质来拮抗镍化合物的脂质过氧化反应。表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 是绿茶中含量最高的一种儿茶素, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎等多种药理作用^[2-4]。本研究旨在探讨 EGCG 对硫酸镍 (NiSO_4) 诱导 Beas-2B 细胞氧化损伤的保护作用及初步作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

表没食子儿茶素没食子酸酯 (大连美仑生物公司), 硫酸镍 (上海勤工化工厂)。DMEM 培养基、胎牛血清及胰蛋白酶 (Gibco 公司), CCK8、活性氧检测试剂盒 (碧云天生物技术研究所), 谷胱甘肽、丙二醛检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。生物安全柜 (苏净集团安泰公司), CO_2 培养箱、离心机及酶标仪 (Thermo Fisher), 倒置显微镜 (Nikon) 等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 支气管上皮 Beas-2B 细胞由首都医科大学劳动卫生学教研室提供, 常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中贴壁生长。实验分为 (1) 正常对照组: 仅添加完全培养基;

(2) NiSO_4 组: 加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 NiSO_4 作用 24 h; (3) EGCG+ NiSO_4 组: 预先在培养基中加入终浓度为 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 作用 24 h, 再加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 NiSO_4 处理 24 h。

1.2.2 指标测定 CCK8 法检测细胞活力, 取对数生长期 Beas-2B 细胞接种于 96 孔板内, 按照实验设计的剂量给予不同处理后, 用酶标仪读取各孔 450 nm 波长处的吸光度值。利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧 (ROS) 水平检测。实验前期处理完毕后, 按照试剂盒说明书步骤测定 ROS 和谷胱甘肽 (GSH) 的含量。采用 BCA 蛋白测定法进行细胞内总蛋白的检测, 用以校准。用硫代巴比妥酸 (TBA 法) 检测丙二醛 (MDA) 含量。

1.3 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析和最小显著差法 (LSD) 进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 对 NiSO_4 诱导 Beas-2B 细胞存活率的影响

表 1 可见, 与正常对照组相比, NiSO_4 组 Beas-2B 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$)。与 NiSO_4 组相比, EGCG 各剂量组细胞存活率分别提高 12.96%、24.06%、29.69% ($P < 0.05$)。

表 1 EGCG 对 NiSO_4 诱导 Beas-2B 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	NiSO_4 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	吸光度值	相对存活率 (%)
正常对照组	0	0.22±0.01	100.00
NiSO_4 组	500	0.15±0.01	60.67*
EGCG + NiSO_4	2.5+500	0.17±0.02	73.63 Δ
	5.0+500	0.18±0.03	84.73 Δ
	10.0+500	0.21±0.02	90.36 Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 NiSO_4 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 EGCG 对 NiSO_4 诱导 Beas-2B 细胞 ROS、GSH、MDA 含量的影响

与正常对照组相比, NiSO_4 组 ROS 显著升高 ($P < 0.05$)。EGCG 对 ROS 生成量的抑制作用与 EGCG 的浓度呈正相关关系, 随着 EGCG 剂量的增加, ROS 荧光强度逐渐降低 ($P < 0.05$)。 NiSO_4 组与正常对照组相比, GSH 含量显著下降, 为正常组的 60.78% ($P < 0.05$)。随着 EGCG 剂量的增加, 抗氧化物 GSH 的含量逐渐升高 ($P < 0.05$)。 NiSO_4 组 MDA 浓度显

收稿日期: 2016-04-18; 修回日期: 2016-07-01

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81372965)

作者简介: 周艾佳 (1990—), 女, 硕士研究生。

通信作者: 吴永会, 教授, 研究方向: 工业致癌物致癌机制的研究, E-mail: wuyonghui777@163.com。

著升高,是正常对照组的1.97倍($P<0.05$)。EGCG预处理24 h的Beas-2B细胞,MDA的浓度随着EGCG剂量的增加逐渐降低($P<0.05$)。见表2。

表2 EGCG对硫酸镍诱导Beas-2B细胞氧化损伤的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	NiSO ₄ 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	ROS 荧光强度	GSH ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	MDA ($\text{nmol}/\text{mg prot}$)
正常对照组	0	730.52 $\pm$ 7.19	36.71 $\pm$ 1.21	0.72 $\pm$ 0.06
NiSO ₄ 组	500	882.30 $\pm$ 12.81*	22.39 $\pm$ 2.11*	1.41 $\pm$ 0.13*
EGCG + NiSO ₄	2.5+500	817.52 $\pm$ 6.50 Δ	27.33 $\pm$ 1.19 Δ	1.14 $\pm$ 0.08 Δ
	5.0+500	767.70 $\pm$ 7.62 Δ	31.04 $\pm$ 0.95 Δ	1.02 $\pm$ 0.05 Δ
	10.0+500	741.58 $\pm$ 8.35 Δ	33.61 $\pm$ 1.41 Δ	0.82 $\pm$ 0.01 Δ

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与NiSO₄组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3 讨论

EGCG是绿茶中最有效的抗氧化多酚,具有抗氧化、抗炎、抗癌等药理作用。有研究证明^[5],EGCG对于镍纳米离子(Ni NPs)诱导的细胞损伤具有明显的抑制作用,在鼠表皮JB16细胞模型中,EGCG可以通过降低镍纳米离子诱导的活性氧(ROS)来保护细胞,并通过调控MAPK信号通路相关蛋白水平显著保护细胞免受Ni NPs的毒性损伤($P<0.05$)。Kucera等人发现^[6],当EGCG的浓度大于10 $\mu\text{mol/L}$ 时,对细胞不具有抗氧化活性;相反,EGCG会诱导细胞产生大量的活性氧(ROS),并对细胞的活力水平具有显著的影响($P<0.05$)。另外,Ding等研究证实^[7],500 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化镍(NiCl₂)能够诱导Beas-2B细胞凋亡率显著增高($P<0.05$)。因此,本实验将NiSO₄的暴露浓度设为500 $\mu\text{mol/L}$,EGCG的干预浓度分别设为低浓度(2.5 $\mu\text{mol/L}$)、中浓度(5.0 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度(10.0 $\mu\text{mol/L}$),观察在不同剂量EGCG干预下,对NiSO₄暴露的人支气管上皮Beas-2B细胞在细胞活力、ROS生成量、谷胱甘肽(GSH)水平和丙二醛(MDA)含量的影响,为日后通过天然抗氧化物治疗镍化合物导致的生物损伤提供科学依据。

镍化合物是常见的工业原料及人类确定致癌物。有研究证实,镍化合物诱导细胞发生氧化应激,扰乱机体内的氧化平衡状态,导致细胞氧化损伤,甚至引起细胞突变、表观遗传学改变和肿瘤的发生^[8]。本实验研究结果显示,NiSO₄会引起Beas-2B细胞ROS产量增加,这些过量的ROS会氧化生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的生物分子,并产生有害的脂质过氧化终产物MDA^[9],使线粒体、微粒体脂质过氧化(LPO)的含量增加,DNA单链断裂造成损伤,导致细胞走向程序性死亡。因此,本实验中NiSO₄组Beas-2B细胞的存活率显著降低,细胞内ROS水平及MDA含量明显增加($P<0.05$)。

EGCG具有较强的抗氧化活性,可通过纠正氧化-抗氧化失衡状态发挥抗氧化应激作用。本实验结果显示,EGCG对提高Beas-2B细胞存活率有显著影响,随着EGCG浓度的升

高,细胞存活率也随之增高,当EGCG的浓度达到10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为正常组的90.36%,而且EGCG对Beas-2B细胞中ROS水平的抑制呈浓度依赖性,10.0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG作用后,ROS水平降至正常水平。相较正常对照组,NiSO₄组的GSH含量显著降低,而MDA浓度显著升高($P<0.05$)。但是随着EGCG剂量的增加,抗氧化物GSH的含量逐渐升高,而MDA相比NiSO₄组显著降低($P<0.05$)。以上实验结果表明,EGCG干预可以有效抑制NiSO₄引起的Beas-2B细胞氧化损伤,保护细胞的平衡状态。

综上,EGCG对由NiSO₄暴露诱导的Beas-2B细胞氧化应激损伤具有良好的抗氧化作用。本实验为进一步研究EGCG对NiSO₄损伤的保护作用及其机制提供了线索和依据。

参考文献:

- [1] M'Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti S K. Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in human lymphocyte death induced by nickel carbonate hydroxide in vitro [J]. Arch Toxicol, 2006, 80 (7): 405-420.
- [2] Fang M Z, Wang Y, Ai N, et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines [J]. Cancer Res, 2003, 63 (22): 7563-7570.
- [3] Feng B, Fang Y, Wei S M. Effect and mechanism of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against the hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human dermal fibroblasts [J]. J Cosmet Sci, 2013, 64 (1): 35-44.
- [4] Ahn H Y, Xu Y, Davidge S T. Epigallocatechin-3-o-gallate inhibits TNF alpha-induced monocyte chemotactic protein-1 production from vascular endothelial cells [J]. Life Sci, 2008, 82 (17-18): 964-968.
- [5] Gu Y, Wang Y, Zhou Q, et al. Inhibition of nickel nanoparticles-induced toxicity by epigallocatechin-3-gallate in JB6 cells may be through down-regulation of the MAPK signaling pathways [J]. PLoS One, 2016, 11 (3): e0150954.
- [6] Kucera O, Mezera V, Moravcova A. In vitro toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015 (6): 1-10.
- [7] Ding J, Zhang X, Li J, et al. Nickel compounds render anti-apoptotic effect to human bronchial epithelial Beas-2B cells by induction of cyclooxygenase-2 through an IKK beta/p65-dependent and IKK alpha and p50-independent pathway [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (51): 39022-39032.
- [8] Yoshihara D, Fujiwara N, Ookawara T, et al. Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47 (5): 559-567.
- [9] Das K K, Gupta A D, Dhundasi S A, et al. Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate [J]. Biometals, 2007, 20 (2): 177-184.