

· 实验研究 ·

铜对大鼠肝细胞凋亡的影响以及姜黄素的保护作用

万小华, 罗小平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

[摘 要] 目的 探讨铜对大鼠肝细胞(BRL 细胞)凋亡的诱导作用及其机制,研究姜黄素对 BRL 细胞铜损伤时的影响。方法 对硫酸铜(CuSO₄)和姜黄素干预培养的 BRL 细胞,采用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧(ROS)测定,MTT 法检测细胞活力,Hoechst 染色和 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡。Western blot 法检测磷酸化应激激活的蛋白激酶(JNK/SAPK)蛋白水平。结果 铜处理后 6 h BRL 细胞 ROS 和凋亡率达到高峰,分别为 711.70 ± 68.33, (45.08 ± 1.87)%,铜处理后 24 h JNK 磷酸化率上升至 (63.36 ± 2.24)%,与正常对照组相比差异有显著性($P < 0.01$);姜黄素组 ROS、凋亡百分率和 JNK 磷酸化率均较相应对照组下降($P < 0.01$)。结论 一定浓度的铜可以诱导 BRL 细胞的凋亡且与活性氧的产生有关;姜黄素对铜损伤 BRL 的保护作用与抗氧化和抑制磷酸化 JNK 的表达有关。

[中国当代儿科杂志,2007,9(6):567-570]

[关键词] 铜;BRL 细胞;姜黄素;凋亡;活性氧;JNK/SAPK
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)06-0567-04

Relationship between copper injury and apoptosis and the effect of curcumin on copper-injured BRL cells

WAN Xiao-Hua, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the relationship between copper-induced apoptosis and reactive oxygen species (ROS) in BRL cells and the effect of curcumin, a plant-derived polyphenol, on copper-injured BRL cells. **Methods** BRL cells were treated with CuSO₄ (100 μmol/L) or curcumin + CuSO₄. The BRL cells without any treatment were used as controls. Flow cytometry was applied to detect the production of ROS with fluorescent probe DCFH-DA. MTT colorimetry was used to evaluate cell activity. Apoptosis was measured using Hoechst 33258 staining and Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining. JNK/SAPK protein level was detected using Western blot. **Results** ROS levels (711.70 ± 68.33 vs 87.22 ± 7.58) and apoptosis rate (45.08 ± 1.87% vs 8.23 ± 2.56%) of BRL cells reached to a peak after 6 hrs of CuSO₄ treatment, which were significantly higher than controls ($P < 0.01$). JNK/SAPK levels increased significantly after 6 hrs of CuSO₄ treatment and peaked at 24 hrs of CuSO₄ treatment compared with controls ($P < 0.01$). Curcumin pretreatment decreased significantly ROS and JNK/SAPK levels as well as the apoptosis rate when compared with the CuSO₄-treated alone group ($P < 0.01$). **Conclusions** Copper may induce apoptosis of BRL cells. ROS participated in apoptosis induced by copper. Curcumin produced protections on copper-injured BRL cells possibly by anti-oxidation and inhibition of p-JNK expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (6):567-570]

Key words: Copper; BRL cell; Curcumin; Apoptosis; Reactive oxygen species; JNK/SAPK

肝豆状核变性又称 Wilson' disease (WD), 是一种较常见的以铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传病,WD 的治疗至今还仅限于对症治疗而无法进行病因治疗。目前一个重要的新领域是铜-细胞因子的相互作用^[1,2]。但在肝豆状核变性疾病中铜的过度沉积与肝脏损伤和凋亡以及相关细胞因子及其凋亡信号途径的研究不多。本实验采用一定浓度的铜离子损伤 BRL 细胞为模型,观察铜诱导损伤 BRL 细胞时活性氧和细胞凋亡的变化规律和相互关系,同时观察 JNK 磷酸化水平的变化;探讨姜黄素对铜损伤肝细胞的作用,为 WD 的治疗提供新的方向和依据。

[收稿日期]2007-03-20;[修回日期]2007-05-10
[基金项目]国家重点基础发展计划 973 项目(2005CB522507);卫生部临床学科重点建设项目。
[作者简介]万小华,女,博士研究生,主治医师。主攻方向:遗传代谢内分泌疾病。
[通讯作者]罗小平,教授,华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,邮编:430030。

1 材料和方法

1.1 材料

BRL 细胞(中科院上海细胞生物所细胞库)、DMEM、新生牛血清(GIBCO 公司)、姜黄素和噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司,美国)、Hoechst33258 染色试剂盒和活性氧检测试剂盒(碧云天公司)、Annexin-v-FITC 试剂盒(深圳晶美公司)、酶标仪(Bio-tek ELX800)、流式细胞分析仪(FACSC 型,Becton Dickinson 美国产)。

1.2 方法

1.2.1 姜黄素贮存液的配制 以少量 DMSO 助溶,加入 DMEM 配制成 10 mM 的贮存液,0.22 μm 微孔滤过除菌,分装,避光-20℃保存,2 周内有效。使用时用含 10% 血清的 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

1.2.2 细胞培养、传代和分组 以含有 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基培养 BRL 细胞,细胞置 5% CO₂ 的孵育箱内 37℃ 培养,待细胞生长至 80%~90% 密度时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:2 传代。分为正常组和 100 μmol/L CuSO₄ 处理不同时间组(2,6,12,24 h)、姜黄素组[在给予不同浓度(20 μmol/L、40 μmol/L、60 μmol/L、80 μmol/L)的姜黄素预处理后再用 100 μmol/L CuSO₄ 处理 6 h]。

1.2.3 药物细胞毒性实验 分别用 LDH 比色法和 Hoechst 荧光染色检测姜黄素对 BRL 细胞的毒性和凋亡的影响。传一代培养的 BRL 细胞以 10% 新生牛血清的 DMEM 制备为 1×10⁵/mL 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 200 μL,至细胞生长单层后,分组更换含不同终浓度的姜黄素的 DMEM 培养液,每组设 8 复孔,继续培养 24 h,收集培养上清,按乳酸脱氢酶(LDH)测试盒说明,测定培养上清中 LDH 活力。Hoechst 荧光染色方法见后。

1.2.4 MTT 法细胞活力检测 将 BRL 细胞接种于 96 孔板,每孔含 10³~10⁴ 个细胞,常规培养 24 h,加入 100 μmol/L 的 CuSO₄ 孵育不同时间(2,6,12,24 h)后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,37℃ 继续孵育 4 h,吸去上清,每孔加入 DMSO150 μL,振荡混匀后,于 490 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。

1.2.5 Hoechst33258 荧光染色 六孔板内接种 BRL 细胞于盖玻片上,正常组、对照组以及给药组给予不同处理后,0.5 mL 固定液 4℃ 固定过夜,预冷 PBS 洗 2 次,0.5 mL Hoechst33258 染色 5 min,于荧

光显微镜下观察(激发光波长 340 nm)。在视野中随机数 100 个细胞计算凋亡细胞的比例。

1.2.6 Annexi V-FITC/PI 染色法流式细胞仪分析

收集各组贴壁和培养上清液中漂浮的细胞,调整细胞浓度为 10⁶/mL,按试剂盒的说明染色,上流式细胞仪分析。

1.2.7 细胞活性氧(ROS)水平测定 参照文献[3]方法进行,DCFH-DA 自由扩散进入细胞被酯酶催化为 DCFH,在活性氧存在下被氧化成 DCF,DCF 荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。DCF 的激发波长为 488 nm,吸收波长为 525 nm。收集细胞,加入终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA,37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min,上流式细胞仪获取分析。

1.2.8 SPAK/JNK 磷酸化水平测定 BRL 细胞经铜处理不同时间或不同浓度的姜黄素干预后,加入细胞裂解缓冲液提取总蛋白,经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳、转移、室温下封闭 2 h,鼠抗 Phospholus SAPK/JNK 或兔抗 SAPK/JNK 单抗 4℃ 孵育过夜,羊抗鼠或抗兔抗体室温下孵育 1 h,化学发光法进行检测,再用 IBAS 图像处理系统扫描进行分析。

1.2.9 统计学分析 所有数据处理均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 有统计意义。

2 结果

2.1 姜黄素的细胞毒性作用

不同剂量姜黄素组的培养上清液中 LDH 活力和凋亡百分率与正常对照组相比差异未见显著性($P > 0.05$),表明姜黄素无细胞毒性,见表 1。

表 1 姜黄素对 BRL 细胞代谢活性和凋亡的影响				($\bar{x} \pm s$)
组别	例数(n)	LDH(U/L)	凋亡百分率(%)	
正常对照组	8	346.60 ± 33.27	8.32 ± 2.89	
姜黄素 10 μmol/L 组	8	393.20 ± 50.41	8.58 ± 1.36	
姜黄素 20 μmol/L 组	8	400.00 ± 91.38	8.86 ± 3.06	
姜黄素 40 μmol/L 组	8	372.00 ± 42.07	8.73 ± 1.53	
姜黄素 80 μmol/L 组	8	357.00 ± 62.21	8.89 ± 2.76	

2.2 铜孵育 BRL 细胞的凋亡和活性氧的检测结果

随着铜孵育的时间延长,BRL 细胞的凋亡率和活性氧水平逐渐升高,6 h 组最明显($P < 0.01$),见表 2,3。

表 2 铜对 BRL 细胞凋亡的影响

组别	A 值(MTT)	凋亡百分率(Hoechst, %)	早期凋亡率(%)	坏死率(%)	活细胞比率(%)
正常对照组	0. 803 ±0. 04	8. 23 ±2. 56	2. 43 ±0. 31	0. 02 ±0. 01	97. 49 ±6. 35
铜孵育 2 h 组	0. 752 ±0. 07	18. 65 ±1. 48 ^a	3. 98 ±0. 56	2. 80 ±0. 01 ^b	89. 35 ±7. 56
铜孵育 6 h 组	0. 565 ±0. 05 ^b	45. 08 ±1. 87 ^b	26. 6 ±1. 10 ^b	1. 28 ±0. 03 ^b	52. 60 ±4. 69 ^b
铜孵育 12 h 组	0. 505 ±0. 03 ^b	36. 42 ±4. 66 ^b	6. 39 ±0. 22 ^b	10. 06 ±0. 11 ^b	46. 09 ±4. 11 ^a
铜孵育 24 h 组	0. 391 ±0. 06 ^b	34. 07 ±2. 69 ^b	7. 21 ±0. 43 ^b	23. 52 ±0. 22 ^b	45. 54 ±3. 78 ^a

与正常对照组比较, a $P<0.05$; b $P<0.01$

表 3 铜对 BRL 细胞活性氧的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	活性氧平均荧光强度值
正常对照组	8	87. 22 ±7. 58
铜孵育 2 h 组	8	149. 04 ±18. 33 ^a
铜孵育 6 h 组	8	711. 70 ±68. 33 ^a
铜孵育 12 h 组	8	647. 01 ±54. 15 ^a
铜孵育 24 h 组	8	296. 88 ±23. 23 ^a

a 与正常对照组比较, $P<0.01$

2.3 不同浓度姜黄素预处理后铜孵育 BRL 细胞的凋亡和活性氧的检测结果

姜黄素组 BRL 细胞的凋亡率和活性氧水平呈下降趋势,和对照组相比差异有显著性($P<0.01$),见表 4,5。

表 4 姜黄素对铜孵育 BRL 细胞凋亡的影响 (%)

组别	凋亡百分率(Hoechst)	早期凋亡率	坏死率	活细胞比率
姜黄素对照组 0 $\mu\text{mol/L}$	45. 08 ±1. 87	26. 60 ±3. 98	1. 28 ±0. 03	52. 60 ±4. 69
姜黄素 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	44. 87 ±2. 01	24. 36 ±2. 17	1. 21 ±0. 07	52. 78 ±5. 01
姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	44. 20 ±1. 88	22. 98 ±1. 65	1. 21 ±0. 09	52. 90 ±4. 21
姜黄素 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	42. 71 ±1. 16 ^a	12. 76 ±1. 84 ^a	1. 17 ±0. 11	55. 63 ±4. 11
姜黄素 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	38. 84 ±2. 21 ^a	11. 70 ±1. 56 ^a	1. 27 ±0. 08	59. 96 ±6. 37

a 与姜黄素对照组比较, $P<0.01$

表 5 姜黄素对铜孵育 BRL 细胞活性氧的影响

组别	例数(<i>n</i>)	活性氧平均荧光强度值
姜黄素对照组	8	711. 70 ±68. 33
姜黄素 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	8	607. 87 ±32. 44
姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	8	586. 42 ±28. 61
姜黄素 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	8	362. 03 ±34. 15 ^a
姜黄素 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	8	368. 92 ±31. 58 ^a

a 与姜黄素对照组比较, $P<0.01$

表 7 姜黄素对铜孵育 BRL 细胞 JNK 磷酸化水平的影响

	JNK1/2	P-JNK1/2	JNK 活化率(%)
对照组	0. 596 ±0. 045	0. 316 ±0. 028	53. 16 ±3. 20
姜黄素 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0. 571 ±0. 038	0. 291 ±0. 049	51. 68 ±1. 55
姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	0. 543 ±0. 023 ^a	0. 249 ±0. 038 ^b	45. 77 ±3. 26 ^b
姜黄素 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	0. 502 ±0. 032 ^b	0. 212 ±0. 045 ^b	42. 34 ±2. 62 ^b
姜黄素 80 $\mu\text{mol/L}$ 组	0. 495 ±0. 024 ^a	0. 198 ±0. 026 ^a	40. 12 ±1. 73 ^a

与姜黄素对照组比较, a $P<0.05$; b $P<0.01$

2.4 JNK/SAPK 表达水平

随着铜孵育的时间延长,JNK 磷酸化率从 29. 35 ±0. 18 上升到 63. 36 ±2. 24,而姜黄素组 JNK 磷酸化率从 53. 16 ±3. 20 下降到 40. 12 ±1. 73,与相应的对照组比较差异有显著性($P<0.05$),见表 6,7。

表 6 铜孵育不同时间 JNK 磷酸化水平的比较

	JNK1/2	P-JNK1/2	JNK 活化率(%)
正常对照组	0. 436 ±0. 028	0. 128 ±0. 017	29. 35 ±0. 18
铜孵育 2 h	0. 458 ±0. 032	0. 133 ±0. 026	29. 56 ±1. 12
铜孵育 6 h	0. 585 ±0. 037 ^b	0. 325 ±0. 059 ^a	55. 62 ±2. 81 ^a
铜孵育 12 h	0. 763 ±0. 052 ^a	0. 349 ±0. 038 ^a	60. 27 ±3. 72 ^b
铜孵育 24 h	0. 824 ±0. 035 ^b	0. 519 ±0. 026 ^a	63. 36 ±2. 24 ^b

与正常对照组比较, a $P<0.05$; b $P<0.01$

3 讨论

铜是人体必需的微量元素,但过多的铜对机体会产生毒性作用,金属催化生成的羟自由基是细胞氧化损伤的有效介质。新近研究发现 ROS 可能介导了细胞对外界刺激或自身病理状态下的生死调控^[4]。细胞接受促凋亡信号后,ROS 可作为第二信使,促进线粒体 Ca^{2+} 内流、MPTP 的开放、caspase 的激活,导致细胞凋亡。本实验通过建立铜损伤肝细胞模型,研究铜损伤肝细胞中活性氧和凋亡的关系,探讨姜黄素对铜损伤肝细胞的作用。

国外研究表明,铜浓度在 0. 5 mM 以下对肝细胞不会产生任何损伤,当铜浓度超过 100 mM 时对肝细胞将造成病理改变。我们的实验结果表明,用 100 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理 BRL 细胞 0 ~ 24 h,通过

MTT法观察细胞活力,发现随着铜孵育时间的延长,BRL细胞的增殖受到抑制,尤其在6 h以后细胞活力比正常对照组明显降低,说明100 $\mu\text{mol/L}$ 铜对BRL细胞有损伤性作用,选择100 $\mu\text{mol/L}$ 铜孵育BRL细胞6 h可以作为铜诱导损伤肝细胞的模型。

应用流式细胞术测定ROS是近年新发展起来的测定细胞内ROS水平的方法,其特点是快速、方便且重复性好^[5]。本实验结果显示,DCFH-DA标记正常BRL细胞后,存在着一定的荧光强度,这反映BRL细胞存在基线水平的ROS;铜处理后细胞内ROS水平随时间延长逐渐上升,6 h组细胞内的ROS达高峰,以后不再有明显的上升趋势,这表明机体在不断受到外在氧化剂的刺激时,体内的抗氧化系统被动员,是一个动态过程。而姜黄素组细胞内的ROS水平较其对照组下降。流式细胞仪结果出现双峰的原因可能是,细胞受到氧化后,在级联反应还没有完全开始时,荧光强度较弱的细胞处于M1区,而随着细胞的呼吸氧爆发,许多细胞的ROS明显增加,产生了大量的DCF荧光,因此这部分细胞进入M2区。铜孵育组M1和M2区都有峰出现,并且产生荧光的细胞数量都比较多,而姜黄素组M1区有峰,M2的峰较小,说明有细胞氧化,但氧化程度不高,即姜黄素能够较好地抑制活性氧的进一步产生。

实验显示,随着铜处理BRL细胞的时间延长,细胞凋亡的百分率不断升高,以6 h的凋亡率最高,接近50%。但12 h以后坏死细胞出现增多,凋亡率反而下降,这可能是凋亡细胞在体外积累到一定程度后,由于体外不存在邻近组织的吞饮作用,故细胞膜很容易受损而发生继发性坏死。姜黄素组在一定剂量范围内,细胞凋亡呈现浓度依赖性下降的趋势,而且细胞坏死也减少,以上提示姜黄素对铜诱导损伤的BRL细胞有保护作用,这可能和其抑制活性氧的爆发有关。

目前很多研究表明JNK通路的激活与细胞凋亡有密切关系^[6]。JNK通路可以介导紫外线照射、

氧化应激、细胞因子等引起的细胞凋亡。对于铜损伤肝细胞的过程中是否诱导肝细胞凋亡及其信号通路研究很少。我们的实验发现,随着铜孵育的时间延长,细胞内ROS水平不断升高的同时,JNK的磷酸化水平也逐渐增高,磷酸化JNK占总JNK的百分比明显增高,而姜黄素用药组磷酸化JNK的表达比铜孵育组明显降低。以上的实验结果表明JNK通路的激活参与了铜诱导BRL细胞的凋亡过程,ROS参与激活JNK通路,姜黄素可能通过抑制磷酸化JNK的表达而对铜诱导BRL的凋亡起保护作用。

姜黄素是具有脂溶性抗氧化作用的酚类化合物,分子结构中同时具有酚和 β 二酮基团,使它具有优越的抗氧化性。对于细胞凋亡的影响,国外研究表明,姜黄素既有促凋亡又有抑制凋亡的作用。但过多的铜作为氧化应激因素通过激活JNK上游的何种激酶以及具体机制尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Brewer GJ. Copper in medicine[J]. *Cur Opin Chem Biol*, 2003, 7(2):207-212.
- [2] Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, et al. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17):4854-4859.
- [3] Shen HM, Shi CY, Shen Y. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1[J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21(2):139-146.
- [4] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival[J]. *Cell Physiol*, 2002, 192(1):1-15.
- [5] 史桂英, 高飞, 石学耕, 汤雪明. 流式细胞术检测细胞内活性氧的方法[J]. *上海第二医科大学学报*, 2001, 21(2):122-124.
- [6] Chen YR, Tan TH. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(4):651-662.
- [7] Moragoda L, Jaszwski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A):873-878.

(本文编辑:吉耕中)