

# 胶原蛋白多肽铬对四氧嘧啶损伤肝细胞的保护作用

刘安军, 陈影, 张国蓉

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:**研究了胶原蛋白多肽铬(CPCC)对四氧嘧啶损伤肝细胞 HL-7702 的保护作用,并探讨其作用机理。方法是将肝细胞 HL-7702 分为正常对照组、四氧嘧啶组、胶原蛋白多肽铬组及四氧嘧啶+胶原蛋白多肽铬组,分别检测细胞存活率、细胞内活性氧(ROS)、胞外超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量,并检测胶原蛋白多肽铬在过氧化氢( $H_2O_2$ )模型组中的作用。结果表明胶原蛋白多肽铬处理使四氧嘧啶损伤肝细胞存活率增加,胞内 ROS 生成减少, $O_2^{\cdot-}$ 含量、SOD 与 GSH-Px 低偿性升高及 MDA 含量降低。结论是胶原蛋白多肽铬处理对四氧嘧啶损伤肝细胞具有一定的保护作用,其作用机制可能与三价铬抗氧化性能有关。

**关键词:**胶原蛋白多肽铬; HL-7702 人肝细胞; 四氧嘧啶; 抗氧化

中图分类号: TQ936.22; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0101-04

## Protective Effect of Collagen Polypeptide-chromium Chelate in Alloxan-treated HL 7702 Hepatocytes

LIU An-jun, CHEN Ying, ZHANG Guo-rong

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To study the protective effect of collagen polypeptide-chromium chelate (CPCC) in HL 7702 hepatocytes treated by alloxan and the possible mechanism. Cells were divided into control group, alloxan-treated group, CPCC group and alloxan+CPCC group. Cell viability, contents of reactive oxygen species (ROS) and superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), activities of SOD and GSH-Px and MDA content were analyzed. The protective effect of CPCC in  $H_2O_2$ -treated hepatocytes was also determined. Results shows that Cell viability was significantly increased by CPCC, while the contents of ROS,  $O_2^{\cdot-}$  and MDA and the activities of SOD and GSH-Px in alloxan-treated hepatocyte were decreased. CPCC had a protective effect in alloxan-treated HL 7702 hepatocytes, acting as an antioxidant.

**Key words:** collagen polypeptide-chromium chelate; HL 7702 hepatocytes; alloxan; antioxidative effect

四氧嘧啶(Alloxan)在其代谢过程中产生大量自由基<sup>[1]</sup>。机体内过剩的自由基可作用于生物大分子如蛋白质、脂类、核酸等,使大分子受损,造成机体在分子水平、细胞水平及器官水平的各种氧化损伤<sup>[2]</sup>。而肝细胞极易遭受自由基的攻击<sup>[3]</sup>。

铬(III)是人和动物必需的微量元素,目前普遍认为铬(III)通过协助胰岛素发挥作用,进而影响糖类、脂类、蛋白质和核酸代谢<sup>[4]</sup>。而其抗氧化性能只在近年来才越来越引起人们的关注<sup>[5]</sup>,国内在此方面的系统研究报道比较缺乏。前期动物实验基本结果表明四氧嘧啶对小鼠肝脏造成了一定的氧化损伤,而胶原蛋白多肽铬(CPCC)能较有效地缓解小鼠肝脏的氧化

损伤,具有一定的抗氧化保护作用。由于动物体内铬的生物学功能受吸收、转运等较多因素的影响,本实验选用正常人胚肝细胞株 HL-7702 为实验对象,以四氧嘧啶处理后,考察胶原蛋白多肽铬的保护作用,并对其抗氧化性能加以进一步研究探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂与细胞株

正常人胚肝细胞株 HL-7702 购自中科院上海生命科学研究院细胞库;四氧嘧啶购自 Sigma 公司;胶原蛋白多肽铬(CPCC),实验室自制,产品铬(III)含量为 3.9%。

#### 1.2 细胞培养与传代

HL7702 肝细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液于 37  $^{\circ}$ C, 5%  $CO_2$  的培养箱中培养,定期换液传代。实验所用细

收稿日期: 2007-09-05

项目基金: 天津市自然科学基金 (No. 013617111)

作者简介: 刘安军, (1963-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向: 生物资源开发利用

胞均处于对数生长期。

### 1.3 四氧嘧啶、CPCC对正常肝细胞生长的影响

采用噻唑蓝 (MTT) 比色法<sup>[3]</sup>。将HL 7702肝细胞以 $1 \times 10^6$  个/mL细胞数接种于96孔培养板中, 每孔体积200  $\mu\text{L}$ 。细胞贴壁完全, 分别加入含不同浓度的四氧嘧啶 (0~40 mmol/L)、 $\text{Cr}^{3+}$  (0~500  $\mu\text{mol/L}$ )的CPCC无血清培养液培养。培养24 h后, 每孔加入MTT溶液 (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 于37  $^{\circ}\text{C}$ 继续培养4 h。1500 r/min离心15 min后, 小心吸去上清, 每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解。酶标仪测定570 nm处OD值。每组5复孔。细胞存活率 (%) = (试验组OD值/对照组OD值)  $\times 100\%$ 。

### 1.4 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞生长的影响

肝细胞以 $1 \times 10^6$  个/mL细胞数接种于96孔培养板中, 每孔体积200  $\mu\text{L}$ 。常规培养后, 分别加入四氧嘧啶、四氧嘧啶与CPCC, 使四氧嘧啶终浓度为15 mmol/L,  $\text{Cr(III)}$ 终浓度分别为10、100、200  $\mu\text{mol/L}$ 。采用MTT法检测细胞生长状况。

### 1.5 细胞胞内活性氧 (ROS) 的检测

二乙酰二氯化荧光素 (DCFH-DA) 临用前用无酚红 RPMI-1640 培养基稀释至1 mmol/L。肝细胞接种培养后, 分别加入四氧嘧啶、四氧嘧啶与CPCC, 培养一定时间后, PBS洗2次, 加入DCFH-DA使其终浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 负载30 min。PBS洗涤后立即于荧光分光光度计下测定荧光强度值, 激发波长485 nm, 发射波长538 nm。

### 1.6 超氧阴离子的检测

将肝细胞悬液接种于6孔板 (每孔5 mL), 加入细胞色素C (终浓度为12.5  $\mu\text{mol/L}$ ), 并分别加入四氧嘧啶、四氧嘧啶与CPCC, 每组设3个平行孔, 另设3个不加药的细胞孔作为阴性对照组。37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养一定时间后, 立即冰浴, 550 nm波长处测定培养上清液的OD值, 以无细胞孔为测定的参比, 计算每 $10^6$ 个细胞产生的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的量<sup>[4]</sup>。

### 1.7 SOD、GSH-Px活力及MDA含量的测定

HL 7702肝细胞相应处理培养后, 胰酶消化, PBS洗3次, 加入0.5 mL细胞裂解液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 裂解30 min。4  $^{\circ}\text{C}$ 离心取上清, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 南京建成生物工程研究所相应试剂盒测定SOD、GSH-Px活力及MDA含量, 按试剂盒规定程序操作。

## 2 结果与讨论

### 2.1 四氧嘧啶、CPCC对正常肝细胞生长的影响

噻唑蓝 (MTT) 比色法是实验室常用的一种检测

细胞存活与生长的方法。本实验采用MTT法首先考察了不同浓度四氧嘧啶对肝细胞生长的影响, 实验结果如图1所示。

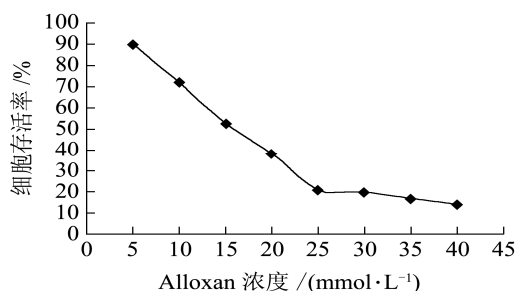


图1 四氧嘧啶对HL 7702肝细胞生长的影响

Fig.1 Effects of alloxan on HL 7702 cell viability

随着四氧嘧啶作用浓度 (5~25 mmol/L) 的增加, 肝细胞存活率随之下降, 呈较明显的剂量依赖性。其中15 mmol/L四氧嘧啶作用24 h后, 肝细胞存活率约为50%左右, 本实验选用该浓度用于后续实验。当四氧嘧啶浓度高于25 mmol/L时, 四氧嘧啶浓度的增加对细胞存活率的影响减弱, 细胞存活率随浓度的变化不明显。

低 $\text{Cr(III)}$ 浓度 (10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、200  $\mu\text{mol/L}$ ) CPCC处理对肝细胞生长基本没有影响, 而较高 $\text{Cr(III)}$ 浓度 (500  $\mu\text{mol/L}$ ) CPCC处理对肝细胞生长则产生了一定的影响。图2为各浓度CPCC处理24 h后肝细胞的存活率, 其中含500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cr(III)}$ 的CPCC处理使肝细胞存活率有所降低 ( $p < 0.05$ )。

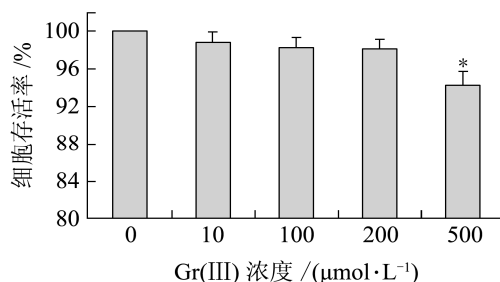


图2 不同 $\text{Cr(III)}$ 浓度CPCC对HL 7702肝细胞生长的影响

Fig.2 Effects of CPCC with different  $\text{Cr(III)}$  concentrations on HL 7702 cell viability.\* $p < 0.05$  vs. control group.

### 2.2 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞生长的影响

实验考察了不同胶原蛋白多肽铬浓度 ( $\text{Cr(III)}$ 浓度分别为10  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$ 、200  $\mu\text{mol/L}$ ) 对15 mmol/L四氧嘧啶处理肝细胞生长的影响。实验结果如图3所示,  $\text{Cr(III)}$ 浓度为100、200  $\mu\text{mol/L}$ 的CPCC在一定程度上能减轻四氧嘧啶所致肝细胞毒性, 12 h后肝细胞存活率有较为明显的增加 ( $p < 0.05$ ), 24 h后更为明显 ( $p < 0.01$ )。但100  $\mu\text{mol/L}$ 与200  $\mu\text{mol/L}$  CPCC对细胞存活率的影响无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。

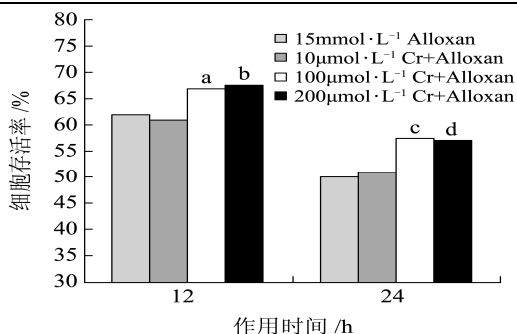


图3 不同Cr(III)浓度PCCC对四氧嘧啶处理肝细胞生长的影响

Fig.3 Effects of CPCC with different Cr(III) concentrations on alloxan-treated cell viability.

<sup>a</sup>p, <sup>c</sup>p < 0.01 vs. control group; <sup>b</sup>p, <sup>d</sup>p < 0.05 vs. alloxan group

此外,各相应浓度胶原蛋白多肽MTT实验结果表明,在本实验条件下,胶原蛋白多肽对正常肝细胞生长、四氧嘧啶所致肝细胞毒性作用均无明显影响。

结合以上MTT实验结果,表明在一定浓度范围内,胶原蛋白多肽铬对四氧嘧啶所致肝细胞毒性具有一定的保护作用,其中起主要作用的可能是螯合物中的三价铬离子。

2.3 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞胞内ROS生成的影响

四氧嘧啶在其代谢过程中产生大量自由基(ROS),本实验采用二乙酰二氯化荧光素(DCFH-DA)方法考察了CPCC处理对四氧嘧啶损伤肝细胞胞内ROS生成的影响,所得结果如图4所示。

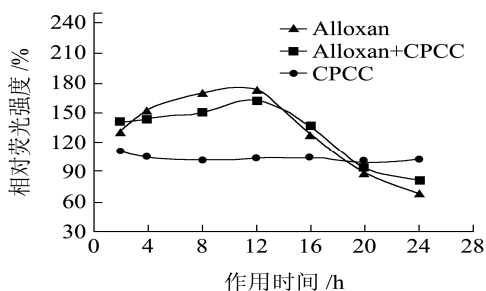


图4 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞胞内活性氧(ROS)生成的影响

Fig.4 Effect of CPCC on ROS in alloxan-treated hepatocytes

正常肝细胞经四氧嘧啶处理后,胞内ROS大量生成,细胞荧光强度随作用时间延长而升高(0~12h),其后可能由于细胞受损程度逐渐增加,细胞膜完整性破坏加剧,同时酯酶活性降低,DCFH-DA氧化反应减弱,致使细胞荧光强度逐渐下降。

200 μmol/L CPCC处理于正常肝细胞时,可引起细胞荧光强度短暂性升高,但其差异无显著性(p>0.05),且随即恢复正常。本实验条件下,基本可认为CPCC对正常肝细胞胞内ROS含量无明显作用。而此浓度CPCC作用于四氧嘧啶损伤肝细胞时,

细胞荧光强度的升高得到了较为明显的抑制(4~12h),12h后荧光强度高于四氧嘧啶组,可能由于CPCC处理对于细胞具有一定的保护作用,降低了细胞受损程度,胞内ROS向胞外的泄露减少所致。

2.4 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞产生O<sub>2</sub><sup>-</sup>的影响

四氧嘧啶在其代谢过程中产生大量自由基,如超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等<sup>[1]</sup>。其中超氧阴离子在四氧嘧啶抑制葡萄糖代谢中具有重要作用。本实验考察了CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞胞外O<sub>2</sub><sup>-</sup>含量的影响,实验结果如图5所示。

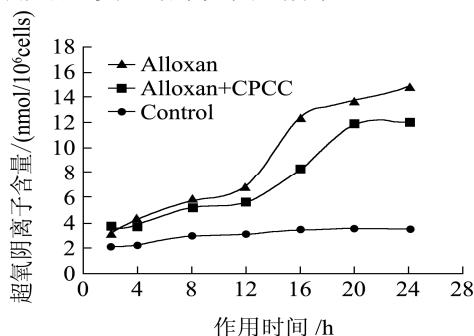


图5 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞胞外超氧阴离子含量的影响

Fig.5 Effect of CPCC on extracellular O<sub>2</sub><sup>-</sup> produced by alloxan-treated hepatocytes

正常肝细胞经四氧嘧啶处理后,随四氧嘧啶处理时间的增加,胞外超氧阴离子含量随之增加。CPCC作用降低了四氧嘧啶组细胞胞外超氧阴离子含量,且随作用时间的增加,该作用更为明显。

O<sub>2</sub><sup>-</sup>与ROS实验结果基本表明,四氧嘧啶处理可导致肝细胞内ROS大量生成,对细胞造成了一定的氧化损伤,使细胞完整性受到破坏,致使胞外超氧阴离子含量显著上升。CPCC处理可通过减少胞内ROS的生成,减轻细胞氧化受损程度,对四氧嘧啶损伤肝细胞起一定的保护作用,胞外氧自由基含量降低。

2.5 CPCC对四氧嘧啶处理肝细胞SOD、GSH-Px活力的影响

细胞通常处于氧化和抗氧化的动态平衡状态,一旦失去平衡,将影响细胞的正常功能,引起细胞损伤,甚至细胞死亡。细胞内重要的抗氧化酶类SOD对机体的抗氧化平衡具有至关重要的作用,可清除O<sub>2</sub><sup>-</sup>保护细胞免受损伤;GSH-Px能特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的还原反应,具有保护细胞膜结构与功能完整的作用。本实验通过细胞内SOD及GSH-Px活力的测定,考察CPCC处理对四氧嘧啶处理肝细胞抗氧化系统方面的影响。实验结果如图6所示。

肝细胞经四氧嘧啶处理后,可能由于胞内ROS

的大量生成, 细胞抗氧化酶类 SOD、GSH-Px 活力均呈代偿性升高, 与正常对照组相比其差异均具有显著性( $p<0.01$ )。而 CPCC+四氧嘧啶组细胞 SOD、GSH-Px 活力虽高于正常对照组, 但与四氧嘧啶处理组相比, 活力均已明显降低 ( $p<0.05$ )。

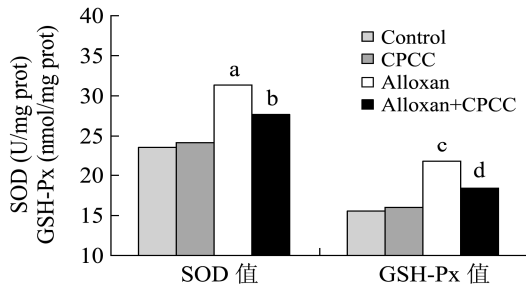


图 6 CPCC 对四氧嘧啶处理肝细胞 SOD 及 GSH-Px 活力的影响

Fig.6 Effect of CPCC on activities of SOD and GSH-Px in alloxan-treated hepatocytes. <sup>a</sup> $p<0.01$ , <sup>c</sup> $p<0.01$  vs. control group; <sup>b</sup> $p<0.05$ , <sup>d</sup> $p<0.05$  vs. alloxan-treated group

### 2.6 CPCC 对四氧嘧啶处理肝细胞 MDA 含量的影响

四氧嘧啶代谢过程中产生的大量自由基, 可对细胞组分如蛋白质、脂肪及核酸等产生氧化损伤作用。丙二醛 (MDA) 是具有代表性的细胞脂质过氧化反应产物。

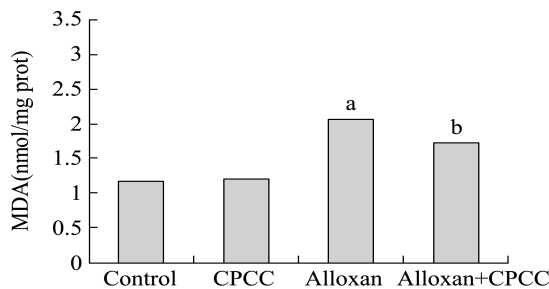


图 7 CPCC 对四氧嘧啶处理肝细胞 MDA 含量的影响

Fig.7 Effect of CPCC on MDA in alloxan-treated hepatocytes.

<sup>a</sup> $p<0.01$  vs. control group; <sup>b</sup> $p<0.05$  vs. alloxan-treated group

四氧嘧啶处理后, 肝细胞上清中 MDA 含量显著增加 ( $p<0.01$ ), 表明四氧嘧啶对肝细胞氧化平衡系统的影响已对细胞产生了明显的氧化损伤作用。而 CPCC+四氧嘧啶处理组细胞 MDA 含量虽高于正常对照组, 但与四氧嘧啶组相比, 其 MDA 含量已明显降低 ( $p<0.05$ )。实验结果表明, CPCC 减轻了肝细胞受自由基攻击受损的程度, 对肝细胞具有一定的抗氧化保护作用。

### 2.7 CPCC 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤肝细胞 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响

为进一步对 CPCC 抗氧化性能加以考察, 实验以 0.1 mmol/L 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 取代四氧嘧啶处理肝细胞, 其余操作均相同。各组细胞经培养处理后, 分别

检测 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量。实验所得结果与四氧嘧啶模型组中所得结果一致, CPCC 处理明显降低了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组肝细胞 SOD、GSH-Px 活力的代偿性升高 ( $p<0.01$ ) 及细胞脂质过氧化程度 ( $p<0.01$ )。

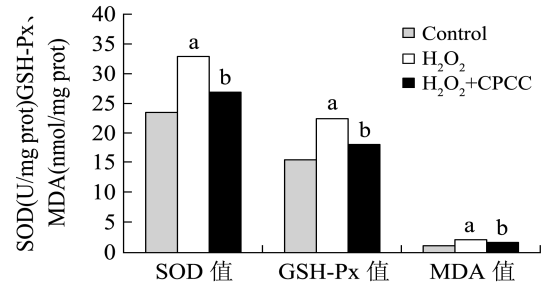


图 8 CPCC 对过氧化氢处理肝细胞 SOD 及 GSH-Px 活力的影响

Fig.8 Effect of CPCC on SOD, GSH-Px and MDA in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated hepatocytes.

<sup>a</sup> $p<0.01$  vs. control group; <sup>b</sup> $p<0.05$  vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group

以上实验结果基本表明, 四氧嘧啶处理对肝细胞氧化平衡状态产生了一定的影响, 肝细胞内 ROS 大量生成, 细胞抗氧化酶类 SOD、GSH-Px 活力呈代偿性升高, 同时对细胞造成了一定的氧化损伤。而胶原蛋白多肽铬 (CPCC) 在一定程度上增强了肝细胞清除自由基的能力, 改善了四氧嘧啶所致细胞氧化应激状态, 减轻了细胞受自由基攻击损伤的程度, 具有一定的抗氧化能力, 对肝细胞起到了一定的保护作用, 但其在肝细胞内具体作用途径有待于进一步研究探讨。

### 参考文献

- [1] Lenzen S, Munday R. Thiol group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin[J]. Biochemical Pharmacology, 1991, 42:1385-1391
- [2] Sheu Shey-Shing, Nauduri Dhananjaya, Anders MW. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1762:256-265
- [3] Usha R, Acharya, Monalisa Mishra, et al. Status of antioxidant defense system in chromium-induced Swiss mice tissues[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2004, 17:117-123
- [4] Matt Brown. Harnessing chromium in the fight against diabetes[J]. Drug Discover Today, 2003, 8:962-963
- [5] Cheng Hsing-Hsien, Lai Ming-Hoang, Hou Wen-Chi, et al. Antioxidant Effects of Chromium Supplementation with Type 2 Diabetes Mellitus and Euglycemic Subjects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52:1385-1389