

镍化合物细胞损伤中自由基、ATP 及 Ca^{2+} 变化的研究进展

闫铭锋¹, 程宁^{2*}

摘要: 镍化合物(nickel compounds)是人类在生产和生活中广泛接触的工业物质。镍化合物对细胞的损伤表现主要是以细胞自由基、磷酸三腺苷(ATP)和钙离子(Ca^{2+})及相关酶类和相关基因的变化。为进一步了解镍化合物对细胞自由基、ATP 和 Ca^{2+} 变化的影响,本文综述报道国内外对镍化合物细胞损伤中自由基、ATP 和 Ca^{2+} 方面变化的研究进展。

关键词: 镍化合物; 活性氧自由基; 活性氮自由基; 脂质过氧化; 磷酸三腺苷; 钙离子

Review on Research of the Change of Free Radicals, ATP and Ca^{2+} in Cell Damaged by Nickel Compounds
YAN Ming-feng¹, CHENG Ning^{2*} (1. Immunology Institutes, School of Basic Medicine of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Key Laboratory of Preclinical Study of New Drug of Gansu Province, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China). *Address correspondence to CHENG Ning; E-mail: chengn@lzu.edu.cn

Abstract: Nickel compounds are industrial materials with widely contact to human living and production. Nickel compounds mainly injury the cell in free radical, ATP and Ca^{2+} and genes associated with related enzyme changes. For research cell damaged by the nickel compounds, a review on free radical, ATP and Ca^{2+} in cell damaged by nickel compounds is presented.

Key Words: nickel compounds; reactive oxygen species; reactive nitrogen species; lipid peroxidation; adenosine-triphosphate(ATP); Ca^{2+}

镍化合物中的某些物质如氧化镍(NiO)、硫酸镍(NiSO_4)、亚硫酸镍(NiSO_3)等是一类多器官毒物,可累及机体多个重要器官导致各种毒效应^[1]。现今人们越来越多的关注其细胞毒性损伤及细胞凋亡等领域中自由基、磷酸三腺苷(ATP)和钙离子(Ca^{2+})的作用及其机制,以及三者对细胞的活性相互制约相互影响,本文将相关研究进展予以综述报道。

1 氧化应激在镍化合物毒性试验中的研究

氧化应激(oxidative stress)是指机体在遭受各种有害刺激时,体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen free radicals, RNS)产生过多,氧化程度超出机体氧化物的清除能力,致机体氧化系统和抗氧化系统失衡,而使组织损伤。在机体中,有一套有效的抗氧化防御系统来防止氧及其代谢物对机体的毒性效应。氧化防御系统包括一类预防性抗氧化剂,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、硫氧-蛋白等;另一类自由基链反应阻断剂,为维生素C(Vitamin C, VitC)、胡萝卜素等。

[作者简介] 闫铭锋(1980-),男,硕士生;研究方向:分子免疫;E-mail: guyanymf@163.com

[*通信作者] 程宁研究员;E-mail: chengn@lzu.edu.cn

[作者单位] 1. 兰州大学基础医学院免疫系,甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学甘肃省新药临床前研究重点实验室,甘肃 兰州 730000

1.1 ROS在镍化合物染毒实验中的研究

镍化合物引起氧化应激同时对DNA、蛋白质造成氧化损害。不少学者认为ROS可直接损伤DNA^[2-3],因为ROS中间产物自由基可直接作用于核酸,引起碱基修饰和DNA链断裂,导致聚二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)核酸转移酶的活化和抑癌蛋白P53积累,从而导致细胞凋亡。但是,实验中0.17 mmol的硫酸镍可以使人外周血白血病T细胞(Jurkat细胞)内的ROS水平在染毒后4h明显增加,证明硫酸镍对细胞内活性氧的产生有直接影响^[4]。

DAS研究左旋抗坏血酸(L-VitC)在 NiSO_4 染毒大鼠中保护作用的实验中,将大鼠分组后,在单独 NiSO_4 染毒(2 mg/100 g,腹腔注射)组大鼠血液中发现红细胞的SOD、GSH-Px及CAT的活性均比正常对照组升高^[5]。有关人Jurkat细胞防御机体氧化损伤的血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)研究^[6]显示,当人Jurkat细胞在80 mg/L的氯化镍染毒6h后和40 mg/L的氯化镍24h后,都可以观察到HO-1的mRNA表达上调,说明镍化合物可以使人Jurkat细胞产生ROS,加速细胞的凋亡^[7]。

1.2 RNS在镍化合物毒性试验中的研究

RNS中最活跃的明星分子就是一氧化氮(nitric oxide, NO),NO是一种自由基,既溶于水,又溶于脂,具有非常活泼的化学性质;另外也是影响多种生理病理过程的信号分子。NO可直接引起细胞毒性作用,与过氧化物一起导致过氧化,从而引起组织损伤^[8]。

在研究镍细胞毒性诱导人T细胞凋亡的实验中,在氯化镍(NiCl_2) 20~80 mg/L染毒Jurkat细胞6h后,可以检测到随着

NiCl_2 浓度的升高, NO 的量也随着升高, 80 mg/L NiCl_2 染毒组不仅 NO 的含量是正常对照组的 5 倍, 同时细胞凋亡率也明显升高接近 30%, 说明在镍细胞毒性中, NO 在细胞凋亡中起着一定的作用^[9]。另有研究表明, 巨噬细胞刺激因子和脂多糖存在的情况下镍可以使细胞产生 NO 的量明显升高^[10]。

最近的研究还显示 NO 通过核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)水平产生一个自动调整作用: 在低浓度 NO 时, NF- κ B 水平上升, 上调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达; 相反在高浓度 NO 时, NF- κ B 与 DNA 结合活性被抑制, 减少 iNOS 表达^[11]。而 NF- κ B 被认为是调节抑制细胞凋亡的重要调节因素, 间接反映 NO 是通过多途径引起细胞凋亡的。

在用 NiSO_4 染毒胎儿皮肤树突状细胞, 发现 NiSO_4 可以使胎儿皮肤树突状细胞分泌 NO, 同时在使用 Western blot 检测 NiSO_4 是否会调节 iNOS 相关蛋白的实验中发现, 在 50 mg/mL 和 100 mg/mL 两种浓度 NiSO_4 刺激下的胎儿树突状细胞的 iNOS 相关蛋白表达相对于正常对照都有明显升高, 而且升高的趋势随着 NiSO_4 浓度的升高而升高, 证明 NiSO_4 是胎儿树突状细胞中 iNOS 的相关蛋白升高的敏感因素^[12]。

1.3 脂质过氧化在镍化合物毒性中的研究

脂质过氧化是脂质中不饱和脂肪酸氧化降解的链反应过程, 由启动、延伸、终止三个阶段组成, 脂质过氧化过程的延伸阶段产生多种自由基, 如: 脂质过氧化自由基、脂氧自由基和脂自由基, 这是自由基直接攻击细胞膜的结果。终止阶段产生多种小分子产物如丙二醛(malondialdehyde, MDA)。研究表明, 脂质过氧化的产物和自由基一样都能够破坏生物膜的完整性, 使生物膜功能发生显著变化, 从而引起一系列病理过程的发生, 而导致机体出现相应的病理改变^[13]。

DAS 研究 L-VitC 在大鼠 NiSO_4 毒性保护作用的实验中, 用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)测定 MDA, 发现 NiSO_4 染毒大鼠血液中红细胞 MDA 的含量明显增加, 表明 NiSO_4 可以引起大鼠明显的脂质过氧化^[5]。同时在给予大鼠腹腔部分注射 0、100、150、500、750 $\mu\text{mol/kg}$ 氯化镍, 24 h 后测定 MDA, 结果显示血清中 MDA 随着氯化镍剂量的增加而呈现上升趋势^[14]。DORESWAMY 等^[15]研究发现, Ni^{2+} 能引起睾丸组织中线粒体、微粒体脂质过氧化物含量增加, 使 DNA 单链断裂造成损伤, 导致细胞走向程序性死亡。

2 ATP 在镍化合物毒性试验中的研究

细胞内 ATP 是维持细胞生命的重要能量物质, 细胞内 ATP 缺失将导致细胞死亡。细胞内 ATP 水平是决定细胞凋亡还是坏死的主要因素。只有细胞内维持一定的 ATP 水平时, 细胞才能保持正常的生存状态。细胞内过高的 ATP 对神经系统、免疫系统以及上皮细胞和肿瘤细胞在内的多种细胞具有细胞毒作用^[16], 该作用主要是通过诱导细胞凋亡而实现。研究显示 ADP 和 ATP 含量的变化, 也与细胞的活性状态有密切关系, 细胞内的 ATP/ADP 值在 0.2 时, 是决定细胞活性的关键比值。当此比值高于 0.2 时, 可以诱导细胞凋亡。在 JIA 等^[17]研究 NiSO_4 引起小鼠嗅上皮细胞(olfactory epithelium, OE 细胞)萎缩的试验中,

在小鼠鼻腔里直接滴注 NiSO_4 , 最后观察到在 NiSO_4 可以引起 OE 细胞在凋亡的过程中释放 ATP, 使得 OE 细胞内 ATP/ADP 值降低, 从而减轻 NiSO_4 对 OE 细胞的损伤。

同时, ATP 酶(adenosine triphosphatase, ATPase)作为水解 ATP, 并利用 ATP 解释放出能量驱动物质跨膜运输的运输蛋白(如: Na^+ - K^+ ATPase, Ca^{2+} -ATPase), 在分别给大鼠腹腔连续注射不同浓度 NiSO_4 10 d 后, 检测 Na^+ - K^+ ATPase, Ca^{2+} -ATPase 活性, 结果显示: NiSO_4 可以明显抑制心肌、肝、肾小管细胞膜 Na^+ - K^+ ATPase, Ca^{2+} -ATPase 活性^[18], 从而影响细胞对 ATP 的利用, 使得细胞内 ATP 升高诱导凋亡。

3 细胞内 Ca^{2+} 浓度在镍化合物毒性试验中的研究

Ca^{2+} 是细胞生命活动的一个重要的调节因子, 在细胞对外界刺激产生反应以及细胞死亡过程中, Ca^{2+} 均起重要作用。细胞质中的 Ca^{2+} 浓度必须处于严格的调控之中, 钙稳态失调将导致细胞严重损伤或死亡(凋亡或坏死)^[19]。

细胞膜脂质过氧化, 通透性异常增加, 影响细胞膜对离子的选择性通透, 引起肝细胞内 Ca^{2+} , Ni^{2+} , H^+ 及 Na^+ 升高, 在 Ni^{2+} 进入细胞内时, 可以抑制 Ca^{2+} -ATPase、 Na^+ - K^+ -ATPase 和钙调素(calmodulin, CaM)活性^[20], 钙库中 Ca^{2+} 释放增多, 钠泵向细胞外转运 Na^+ 的能力减弱, 细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 增高, 高 Na^+ 或高 Ca^{2+} 激活 Na^+ - Ca^{2+} 交换蛋白, 使细胞内高 Na^+ 和高 Ca^{2+} 相互影响, 导致细胞内钙超载, 渗透压上升, 细胞外水分流入造成细胞损伤。 Ni^{2+} 进入细胞核引起 DNA-蛋白质交联和 DNA 单链断裂、线粒体数目减少, 使细胞周期延长^[21]。

在 0~4 mol/L NiSO_4 诱导离体人淋巴细胞凋亡实验中发现, 在使用钙通道抑制剂和细胞内钙拮抗剂来阻止细胞内钙离子的调节, 可以明显抑制 NiSO_4 所诱导的淋巴细胞凋亡。说明 NiSO_4 诱导淋巴细胞凋亡信号通路的激活不仅涉及氧化应激, 而且 NiSO_4 诱导的线粒体膜电位及细胞钙的稳态出现紊乱, 通过细胞内 Ca^{2+} 浓度变化来诱导淋巴细胞死亡^[22]。

WEAVER 等^[23]研究发现许多金属二价阳离子(如 Ni^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+})可与 Ca^{2+} 竞争性的结合 CaM, 同时还能给予 L-精氨酸提供超氧阴离子(O_2^-), 通过氧化 L-精氨酸的胍基而产生 NO 和氧化亚氮, NO, O_2 和氧化亚氮三者相互作用引起氧化损伤并产生细胞毒性作用, 致使细胞严重受损。VERMA 等^[24]研究镍致癌分子机制时发现, 不可溶性镍盐染毒的大鼠胚胎细胞中的钙结合蛋白(calnexin)的基因表达上调, 说明镍盐可以引起 Ca^{2+} 细胞内浓度升高。

4 结论

综上所述, 镍化合物通过刺激细胞产生的自由基来损伤细胞的活性, 同时自由基的增加不仅本身对细胞进行氧化损伤, 还使 ATP 含量减少, 使细胞处于缺氧状态, 而 ATP 的减少可以使 ATPase 抑制, 进一步引发细胞内 Ca^{2+} 蓄积, 使细胞处于钙超载状态, 进一步加剧细胞发生功能性改变, 最终引起细胞凋亡, 进而引起机体器官的病理生理变化。镍可以通过影响细胞表观基因如碱基甲基化而影响细胞活性, 研究表明镍可与组蛋白 H2A^[25] 特定氨基酸序列结合形成 Ni^{2+} -肽复合物, 这种复合

物具有氧化活性,可直接或间接引起 DNA 氧化损伤和特定序列组蛋白的水解,从而降低 DNA 复制转录的保真度,易导致基因表达异常利于肿瘤的发生。不同的镍化合物引起的细胞毒性也是有所区别,可溶性和不可溶性镍盐在损伤细胞活性方面的致病机制还有待探讨。

参考文献:

- [1] SEET RC, JOHAN A, TEO CE, et al. Inhalational nickel carbonyl poisoning in waste processing workers[J]. Chest, 2005, 128(1): 424-429.
- [2] ANGKEOW P, DESHPANDE SS, QI B, et al. Redox factor-1: an extra-nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(7): 717-725.
- [3] TRINE IM, GIORGIO M, CICALESE A, et al. A p53-p66Shc signaling Pathway Controls Intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2002, 21(24): 3872-3878.
- [4] CAVALLO D, URSINI CL, SETINI A, et al. Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure[J]. Toxicol In Vitro, 2003, 17(5/6): 603-607.
- [5] DAS KK, GUPTA AD, DHUNDASI SA, et al. Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate[J]. Bio Metals, 2007, 20(2): 177-184.
- [6] LIN HY, SHEN SC, LIN CW, et al. Baicalein inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis via ROS-dependent heme oxygenase 1 gene expression[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(7): 1073-1086.
- [7] ZHANG D, SHEN J, WANG C, et al. GSH-dependent iNOS and HO-1 mediated apoptosis of human Jurkat cells induced by nickel(II) [J]. Environ Toxicol, 2009, 24(4): 404-414.
- [8] CHOE W, KIM S, HWANG TS, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in thyroid neoplasms: immunohistochemical and molecular analysis[J]. Pathol Int, 2003, 53(7): 434-439.
- [9] GUAN F, ZHANG D, WANG X, et al. Nitric oxide and bcl-2 mediated the apoptosis induced by nickel(II) in human T hybridoma cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 221(1): 86-94.
- [10] KAWANISHI S, INOUE S, OIKAWA S, et al. Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(1): 108-116.
- [11] VO PA, LAD B, TOMLINSON JA, et al. Autoregulatory Role of Endothelium - derived Nitric Oxide(NO) on Lipopolysaccharide - induced Vascular Inducible NO Synthase Expression and Function[J]. J Biol Chem, 2005, 280(8): 7236-7243.
- [12] CRUZ MT, GONCALO M, FIGUEIREDO A, et al. Contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF- κ B and AP-1 and increases the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line[J]. Exp Dermatol, 2004, 13(1): 18-26.
- [13] DAS KK, GUPTA AD, DHUNDASI SA, et al. Effect of L-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology in rats[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2006, 17(1): 29-44.
- [14] CHEN CY, HUANG YL, LIN TH. Association Between Oxidative Stress and Cytokine Production in Nickel-Treated Rats[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 356(2): 127-132.
- [15] DORESWAMY K, SHRILATHA B, RAJESHKUMAR T, et al. Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects[J]. J Androl, 2004, 25(6): 996-1003.
- [16] PAO W, MILLER VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future direction[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(11): 2556-2568.
- [17] JIA C, ROMAN C, HEGG CC. Nickel sulfate induces location-dependent atrophy of mouse olfactory epithelium: protective and proliferative role of purinergic receptor activation[J]. Toxicol Sci, 2010, 115(2): 547-556.
- [18] 孙应彪, 朱玉真. 硫酸镍对大鼠心肝肾 ATPase 毒性的实验研究[J]. 中国职业医学, 2001, 28(3): 27-28.
- [19] BEDARD K, MACDONALD N, COLLINS J, et al. Cytoprotection following endoplasmic reticulum stress protein induction in continuous cell lines[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004, 94(3): 124-131.
- [20] 朱玉真, 赵健雄, 王学习, 等. 中药防治硫酸镍对 Ca^{2+} -ATP 酶及钙调素活性抑制的实验研究[J]. 中国职业医学, 2001, 28(5): 21-22.
- [21] 任泽舫, 庄志雄, 杨杏芬, 等. 镍致 DNA 链断裂及对聚腺苷二磷酸核糖聚合酶活性的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(3): 129-131.
- [22] M'BEMBA-MEKA P, LEMIEUX N, CHAKRABARTI SK. Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in nickel sulfate-induced human lymphocyte death invitro [J]. Chem Biol Interact, 2005, 156(1): 69-80.
- [23] WEAVER J, PORASUPHATANA S, TSAI P, et al. The effect of divalent cations on neuronal nitric synthase activity[J]. Toxicol Sci, 2004, 81(2): 325-331.
- [24] VERMA R, RAMANATH J, CLEMENS F. Molecular biology of nickel carcinogenesis: identification of differentially expressed genes in morphologically transformed C3H10T1/2Cl8 mouse embryo fibroblast cell lines induced by specific insoluble nickel compounds [J]. Mol Cell Biochem, 2004, 255(1/2): 203-216.
- [25] KARACZY A, BAL W, NORTH SL, et al. The octapeptidic end of the C-terminal tail of histone H2A is cleaved off in cells exposed to carcinogenic nickel(II) [J]. Chem Res Toxicol, 2003, 16(12): 1555-1559.

(收稿日期: 2009-10-10)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 郭薇薇; 校对: 徐新春)