

丝素肽对过氧化氢致 A549 细胞损伤的修复作用

朱震^a, 王小娟^a, 邓晗依^a, 李春春^a, 银华^b, 安艳^a

摘要: [目的] 探究丝素肽(SF)对过氧化氢(H₂O₂)致人肺癌(A549)细胞损伤的修复作用。[方法] 将细胞分为空白对照组, H₂O₂组(600 μmol/L), SF前处理组(10、20、30、50 mg/mL SF预孵育24 h再加600 μmol/L H₂O₂损伤24 h), SF后处理组(600 μmol/L H₂O₂损伤24 h再加10、20、30、50 mg/mL SF孵育24 h)及阳性对照前、后处理组[抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)]。用MTT法测定细胞活力, 生物化学法测定细胞中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的含量和总抗氧化能力(T-AOC)。[结果] H₂O₂组细胞活力为(46.67 ± 2.19)%, MDA含量为(64.31 ± 3.22) nmol/mg(以蛋白计)。与H₂O₂组相比, 前处理组和后处理组中细胞活力增加, 而MDA含量降低($P < 0.05$); SF后处理组细胞活力的增加和MDA含量的降低更明显($P < 0.05$); 尤其50 mg/mL SF后处理组比前处理组细胞活力增加值高2.33%, 而MDA含量降低值少44.51 nmol/mg(以蛋白计)。H₂O₂组中SOD、CAT活性和T-AOC都明显降低($P < 0.05$), SF后处理明显提高SOD、CAT活性和T-AOC水平($P < 0.05$)。[结论] SF对H₂O₂致A549细胞损伤有修复作用, 部分原因可能是由于其可增加细胞活力和提高细胞中抗氧化酶活性。

关键词: 丝素肽; 过氧化氢; 抗氧化; 细胞活力; 脂质过氧化; 抗氧化酶

Restoration Effect of Silk Fibroin Peptide on Hydrogen Dioxide Induced Human Lung Cancer Cell Injury ZHU Zhen^a, WANG Xiao-juan^a, DENG Han-yi^a, LI Chun-chun^a, YIN Hua^b, AN Yan^a (a.School of Public Health b.College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China). Address correspondence to AN Yan, E-mail: dranyan@126.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To assess the restoration effect of silk fibroin peptide (SF) on hydrogen dioxide (H₂O₂) induced human lung cancer cell (A549) injury. [Methods] The A549 cells were divided into blank (without drug treatment), H₂O₂ (600 μmol/L), pretreatment (10, 20, 30, and 50 mg/mL SF pretreatment for 24 h plus 600 μmol/L H₂O₂ treatment for another 24 h), post-treatment (600 μmol/L H₂O₂ treatment for 24 h and 10, 20, 30, and 50 mg/mL SF treatment for another 24 h), and positive control pretreatment and post-treatment groups [antioxidant, N-acetylcysteine (NAC)]. Cell viability was measured by MTT assay, and levels of malondialdehyde (MDA), super oxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and total antioxidant capacity (T-AOC) by biochemical methods. [Results] The cell viability was (46.67 ± 2.19)% and the content of MDA was (64.31 ± 3.22) nmol/mg (protein) after H₂O₂ treatment. Compared with the H₂O₂ group, the cell viability increased and the content of MDA decreased ($P < 0.05$) in the pretreatment groups and the post-treatment groups, and the post-treatment groups showed greater effects ($P < 0.05$). Especially when comparing the 50 mg/mL SF treatment effects, post-treatment increased cell viability by 2.33% and decreased MDA content by 44.51 nmol/mg (protein) than the pretreatment did. The activities of SOD, CAT, and T-AOC were all decreased in the H₂O₂ group ($P < 0.05$), but the activities were increased after post-treatment with SF ($P < 0.05$). [Conclusion] The study demonstrates that SF could promote cell viability and intracellular antioxidant activity to ameliorate A549 cell injury induced by H₂O₂.

Key Words: silk fibroin peptide; hydrogen dioxide; antioxidant; cell viability; lipid peroxidation; antioxidant enzyme

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15513

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(编号: 20123201110012); 苏州大学国家自然科学基金预研项目(编号: Q3126982)

[作者简介] 朱震(1991—), 男, 硕士生; 研究方向: 材料毒理学; E-mail: 1205994852@qq.com

[通信作者] 安艳, E-mail: dranyan@126.com

[作者单位] 苏州大学 a. 公共卫生学院 b. 纺织与服装工程学院, 江苏苏州 215123

高氧可导致机体细胞的损伤, 引发急性肺损伤、肺炎、肺癌等疾病^[1]。如何减轻或治疗高氧引起的肺损伤已引起人们的关注。一些抗氧化剂如维生素E等^[2]虽然能够清除活性氧, 但对已造成的损伤修复效果较弱且会产生副作用, 所以人们把目光转向自然界存在抗氧化肽。

丝素肽(silk fibroin peptide, SF)由丝素蛋白水解

得到,氨基酸含量丰富,其中甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、缬氨酸五种氨基酸占氨基酸总数的97%^[3]。研究表明SF具有抑制血管紧张素分泌、抗氧化、降血糖、抑菌等生物活性^[4-5],也具有较好的清除活性氧自由基能力。研究发现丝素蛋白水解物SF对二苯代苦味酰基(DPPH·)的清除率为80.89%,对羟自由基(HO·)的清除率为71.23%^[6]。但目前尚无细胞实验证明SF能在细胞中发挥抗氧化作用。肺脏是活性氧作用的一个重要靶器官,肺Ⅱ型上皮细胞是氧化损伤的主要靶标,由于肺Ⅱ型上皮细胞分离获取较难,而且在体外不能传代,人肺癌(A549)细胞具有肺Ⅱ型上皮细胞特性,所以,本项目采用A549细胞进行实验研究,旨在探究SF对过氧化氢(H₂O₂)所致A549细胞损伤的修复作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

415R型低温高速离心机(Eppendorf,德国),-80℃低温冰箱(Thermo,美国),二氧化碳恒温培养箱(Thermo,美国),BioTek_Synergy2多功能酶标仪(BioTEK,美国)。MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(博士德生物科技公司,中国),细胞裂解液、蛋白浓度测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒和总抗氧化能力(T-AOC)测试盒(碧云天生物技术有限公司,中国)。丝素由苏州大学纺织学院提供。根据前期研究^[7],在反应时间160 min,酶浓度4%,底物质量浓度20 mg/mL,pH值8,温度38℃的条件下,用胰酶水解丝素蛋白制备相对分子质量10 000以下的抗氧化丝素肽。

1.2 细胞培养

A549细胞株(来自苏州大学公共卫生学院),复苏后培养于改良Eagle(DMEM)高糖培养液中,其中含小牛血清体积分数10%,青霉素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L),37℃下置于体积分数为5%的CO₂培养箱中无菌培养,消化传代用体积分数为0.25%的胰蛋白酶。

1.3 细胞分组

损伤细胞的H₂O₂浓度:依据参考文献^[8]和预实验结果,选择600 μmol/L的H₂O₂刺激细胞产生损伤。

将细胞分为空白对照组,H₂O₂组(600 μmol/L的H₂O₂损伤24 h),SF前处理组(10、20、30、50 mg/mL

SF孵育24 h,再加600 μmol/L H₂O₂损伤24 h)和SF后处理组(600 μmol/L H₂O₂损伤24 h,再加10、20、30、50 mg/mL SF孵育24 h)。阳性对照组用抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理细胞,即阳性对照前处理组用5 mmol/L NAC孵育24 h,再加600 μmol/L H₂O₂损伤24 h;阳性对照组后处理组用600 μmol/L H₂O₂损伤24 h,再加5 mmol/L NAC孵育24 h。

1.4 细胞收集和指标测定

用直径10 cm培养皿培养细胞,药物处理后收集细胞,用4℃磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤2遍。沉淀用细胞裂解液裂解,4℃1 600×g离心10 min,取上清作为待测样品。用MTT比色法测细胞活力,严格按照说明书测定MDA含量、SOD活性、CAT活性、T-AOC,使用蛋白浓度试剂盒测定不同组细胞蛋白浓度,校正细胞内MDA、SOD、CAT、T-AOC水平。

1.5 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,组间均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用Dunnett *t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞活力变化

表1显示,染毒24 h,10、20、30、50 mg/mL SF对A549细胞的活力未见影响。而染毒48 h,30、50 mg/mL SF组细胞活力增加($P<0.05$)。表2显示,与H₂O₂组比较,前处理组和后处理组细胞的活力大都增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。50 mg/mL SF前处理组和后处理组细胞活力增加至(61.94±7.14)%和(64.27±0.79)%,前处理组比后处理组多增加了2.33%。与前处理组比较,后处理组中30、50 mg/mL SF对细胞活力的增加效果更好,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 不同浓度SF对A549细胞的活力影响($\bar{x} \pm s$,%)

Table 1 Effects of different concentrations of SF on the viability of normal A549 cells

分组(Group)	<i>n</i>	染毒24 h	染毒48 h
空白(Control)	5	100.00	
SF 10 mg/mL	5	99.88±1.87	99.13±3.89
20 mg/mL	5	97.84±4.63	101.85±1.52
30 mg/mL	5	105.90±3.38	104.41±1.96*
50 mg/mL	5	108.34±4.31	105.08±1.18*
NAC 5 mmol/L	5	121.49±1.31*	121.09±3.07*

[注]*:与空白组相比, $P<0.05$ 。

[Note]*: Compared with the blank group, $P<0.05$.

表2 SF前处理和后处理对A549细胞活力影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Effects of pretreatment and post-treatment with SF on H₂O₂ induced A549 cell viability

分组(Group)	n	前处理(Pretreatment)	后处理(Post-treatment)
空白(Control)	5	100.00	
H ₂ O ₂ 600 μmol/L	5	46.67 ± 2.19	
SF 10 mg/mL+H ₂ O ₂	5	45.49 ± 4.09	46.99 ± 1.36*
20 mg/mL+H ₂ O ₂	5	49.74 ± 4.36*	51.55 ± 1.49*
30 mg/mL+H ₂ O ₂	5	55.14 ± 3.61*	59.78 ± 2.30**
50 mg/mL+H ₂ O ₂	5	61.94 ± 7.14*	64.27 ± 0.79**
NAC 5 mmol/L+H ₂ O ₂	5	68.00 ± 3.06*	71.23 ± 0.71**

[注]*: 与H₂O₂组相比, $P < 0.05$ 。#: 与前处理组相比, $P < 0.05$ 。
[Note]*: Compared with the H₂O₂ group, $P < 0.05$. #: Compared with the pretreatment group, $P < 0.05$.

2.2 MDA含量变化

表3显示, H₂O₂组中MDA含量(以蛋白计)高于空白组, 由(22.99 ± 2.03) nmol/mg升高至(64.31 ± 3.22) nmol/mg, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与H₂O₂组比较, 前处理组和后处理组中MDA含量下降($P < 0.05$)。SF后处理组中MDA含量下降的趋势比前处理组明显($P < 0.05$), 50 mg/mL SF后处理组中MDA下降至(6.56 ± 1.87) nmol/mg, 而50 mg/mL SF前处理组中MDA只下降至(51.07 ± 1.00) nmol/mg, 前者较后者多降低44.51 nmol/mg。

表3 SF前处理和后处理对A549细胞中MDA含量(以蛋白计)影响($\bar{x} \pm s, \text{nmol/mg}$)

Table 3 Effects of pretreatment and post-treatment with SF on H₂O₂ induced MAD

分组(Group)	n	前处理(Pretreatment)	后处理(Post-treatment)
空白(Control)	5	22.99 ± 2.03	
H ₂ O ₂ 600 μmol/L	5	64.31 ± 3.22	
SF 10 mg/mL+H ₂ O ₂	5	63.03 ± 4.62	44.21 ± 3.07**
20 mg/mL+H ₂ O ₂	5	60.03 ± 1.86*	20.23 ± 1.72**
30 mg/mL+H ₂ O ₂	5	58.78 ± 2.87*	7.72 ± 0.38**
50 mg/mL+H ₂ O ₂	5	51.07 ± 1.00*	6.56 ± 1.87**
NAC 5 mmol/L+H ₂ O ₂	5	44.42 ± 1.12*	46.27 ± 6.16**

[注]*: 与H₂O₂组相比, $P < 0.05$ 。#: 与前处理组相比, $P < 0.05$ 。
[Note]*: Compared with the H₂O₂ group, $P < 0.05$. #: Compared with the pretreatment group, $P < 0.05$.

2.3 SOD、CAT、T-AOC变化

表4显示, 与空白组比较, H₂O₂组SOD、CAT的活性和T-AOC能力都降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与H₂O₂组比较, SF后处理组在50 mg/mL SF后处理时对SOD活性和T-AOC均达到空白组水平以上。50 mg/mL SF组修复SOD、CAT活性均比NAC组好。

表4 SF后处理对A549细胞中SOD、CAT和T-AOC的影响($\bar{x} \pm s$, 以蛋白计)

Table 4 Effects of post-treatment with SF on H₂O₂ induced SOD, CAT, and T-AOC

分组(Group)	n	SOD(U/mg)	CAT(U/mg)	T-AOC(mmol/g)
空白(Control)	5	16.37 ± 0.54	66.65 ± 3.06	7.60 ± 0.12
H ₂ O ₂ 600 μmol/L	5	11.73 ± 0.64*	15.81 ± 4.15*	2.54 ± 0.21*
SF 10 mg/mL+H ₂ O ₂	5	19.53 ± 0.54**	23.92 ± 1.17**	4.85 ± 0.21**
20 mg/mL+H ₂ O ₂	5	20.72 ± 0.61**	47.65 ± 1.53**	5.76 ± 0.02**
30 mg/mL+H ₂ O ₂	5	25.45 ± 1.35**	53.15 ± 2.07**	8.69 ± 0.24**
50 mg/mL+H ₂ O ₂	5	27.40 ± 1.78**	55.04 ± 1.15**	8.43 ± 0.09**
NAC 5 mmol/L+H ₂ O ₂	5	21.43 ± 2.92**	25.76 ± 3.22**	13.05 ± 0.77**

[注]#: 与空白组相比, $P < 0.05$ 。*: 与H₂O₂组相比, $P < 0.05$ 。
[Note]#: Compared with the blank group, $P < 0.05$. *: Compared with the H₂O₂ group, $P < 0.05$.

3 讨论

活性氧和H₂O₂均为强氧化活性物质, 活性氧诱导细胞氧化损伤使细胞膜脂质过氧化、DNA链断裂和蛋白质氧化, 破坏细胞完整性使细胞功能丧失甚至死亡^[9]。H₂O₂是一种重要的导致氧化损伤的活性氧, 有报道用H₂O₂诱导细胞建立氧化损伤模型, 包括人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞^[10]等。

研究证实, 在肺细胞中H₂O₂诱导HO·和O₂·⁻的产生导致细胞活力降低, 抗氧化剂能恢复抗氧化酶活性, 清除自由基, 恢复细胞活力^[11]。本实验用600 μmol/L H₂O₂建立一个高氧的环境使细胞发生氧化损伤, 结果发现细胞活力降低至(46.67 ± 2.19)%, 加入SF处理大大增加了细胞活力, 这有助于保持细胞正常生理功能。本研究使用SF前处理细胞观察其对细胞保护作用, 用SF后处理观察其对损伤修复作用, 结果显示前处理和后处理组中细胞活力都增加, 表明SF对H₂O₂致细胞损伤既有保护作用也有修复作用。但是后处理组中细胞活力增加幅度较前处理组高, 表明SF保护作用效果不及修复作用。Park等^[12]用高糖诱导细胞损伤, SF后处理能降低细胞中活性氧水平和增加细胞活力, 说明SF具有较好的损伤修复能力, 这与我们实验结果一致。氧化应激的生物标志中, MDA是一个敏感指标^[13], MDA含量可反映细胞中脂质过氧化程度, H₂O₂损伤细胞后MDA含量增高($P < 0.05$)。SF前处理组和后处理组中MDA含量降低, 而且后处理组降低MDA能力远远大于前处理组。抗氧化剂NAC是一种小分子含硫醇基, 是一种自由基清除剂和谷胱甘肽的前体^[14], 结果发现NAC前处理组降低MDA更明显。

为了防止氧化损伤,哺乳动物细胞已经进化出抗氧化防御系统,包括抗氧化酶SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和非酶抗氧化剂来阻止活性氧的产生或者清除活性氧^[15]。SOD能清除超氧化物阴离子自由基,阻止由O₂^{·-}启动的自由基连锁反应^[16]。CAT能清除过氧化氢。T-AOC是一个体系内的各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶的总称。结果发现用H₂O₂损伤24h后,细胞内SOD、CAT活性和T-AOC能力均明显降低,与高氧诱导的细胞损伤模型中抗氧化酶活性大幅降低的研究结果相符^[17]。由于SF后处理增加细胞活力和降低MDA含量效果更好,因此测定后处理组中细胞内SOD、CAT活性和T-AOC能力。结果显示SF能提高SOD的活性,其中50mg/mL SF使SOD活性恢复较明显。黄慧明^[18]用氧化损伤老鼠模型研究SF抗氧化作用,SF治疗后老鼠体内SOD和GSH-Px活性提高,这与本实验结果一致。SF恢复SOD、CAT活性的能力优于NAC。但由于NAC是谷胱甘肽的前体,促进谷胱甘肽的生成,所以SF恢复T-AOC能力尚不及NAC。

总之,本实验结果表明,H₂O₂损伤A549细胞,可引起细胞活力降低,细胞中MDA水平增加。外源性抗氧化剂SF可以通过激活内源性抗氧化酶活性修复损伤,提高细胞活力并且减少脂质过氧化。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Naura A, Kapoor K, Singal E, et al. PARP inhibitor, olaparib ameliorates acute lung injury by modulating oxidative stress and NF- κ B mediated inflammatory response in mice[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400(1/2): 153-162.
- [2] 刘成梅,冯妹元,刘伟,等.天然维生素E及其抗氧化机理[J].食品研究与开发,2005,26(6): 205-208.
- [3] Mori H, Tsukada M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials[J]. Mol Biotechnol, 2000, 74: 95-103.
- [4] 吴晖,罗美琪,唐语谦,等.酶解丝素蛋白制备ACE抑制肽的研究[J].现代食品科技,2011,27(12): 1461-1465.
- [5] 孔繁东,谭晓慧,祖国仁,等.丝素酶解工艺条件优化及抗氧化活性肽的研究[J].食品工业科技,2010,7: 265-268.
- [6] 罗美琪.丝素肽的酶法制备及其生物活性的研究[D].广州:华南理工大学,2012.
- [7] Zhu Z, Yin H, An Y. Antioxidant activity of silk fibroin peptide hydrolyzed by pancreatin[J]. AMR, 2014, 1081: 110-114.
- [8] Cho B O, Ryu H W, Lee C W, et al. Protective effects of new blackberry cultivar MNU-32 extracts against H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells[J]. Food Sci Biotechnol, 2015, 24(2): 643-650.
- [9] We A, Mc P A, Sowers J R. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome[J]. J Cardiovasc Med, 2010, 12(1): 21-29.
- [10] Kim Y J, Kim J Y, Kang S W, et al. Protective effect of geranylgeranylacetone against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human neuroblastoma cells[J]. Life Sci, 2015, 131: 51-56.
- [11] Li G, Kang J, Yao X, et al. The component of green tea, L-theanine protects human hepatic L02 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. Eur Food Res Technol, 2011, 233(3): 427-435.
- [12] Park J H, Nam Y Y, Park S Y, et al. Silk fibroin has a protective effect against high glucose induced apoptosis in HIT-T15 cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2011, 25(4): 238-243.
- [13] Kropp S, Kern V, Lange K, et al. Oxidative stress during treatment with first-and second-generation antipsychotics[J]. J Neuropsych Clin N, 2014.
- [14] Cuzzocrea S, Mazzon E, Castantino G, et al. Effects of n-acetylcysteine in rat model of ischemia and reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res, 2000, 7: 537.
- [15] Alía M, Mateos R, Ramos S, et al. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line(HepG2) [J]. Eur J Nutr, 2006, 45(1): 19-28.
- [16] Murapa P, Dai J, Chung M, et al. Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes[J]. Phytother Res, 2012, 26(1): 106-112.
- [17] Yang J, Dong S, Jiang Q, et al. Characterization and expression of cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) gene under temperature and hydrogen peroxide (H₂O₂) in rotifer Brachionus calyciflorus [J]. Gene, 2013, 518(2): 388-396.
- [18] 黄慧明.蚕丝蛋白肽抗肿瘤与抗氧化作用研究[D].泰安:山东农业大学,2012.

(收稿日期: 2015-07-17)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)