

· 基础研究 ·

虾青素对成骨细胞羟自由基氧化损伤的影响

裴凌鹏¹,董福慧¹,惠伯棣²

(1.中国中医科学院骨伤科研究所,北京 100700;2.北京联合大学应用文理学院)

【摘要】目的:在 H₂O₂ 胁迫下,研究虾青素增强成骨细胞抗自由基损伤的作用。方法:用 H₂O₂ 作用 MC3T3-E1 成骨细胞,建立自由基损伤细胞模型。培养的成骨细胞分为对照组、模型组、虾青素低剂量组(1×10⁻⁷ mol/L)、虾青素中剂量组(1×10⁻⁶ mol/L)和虾青素高剂量组(1×10⁻⁵ mol/L)。测定不同处理组细胞活力、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量、脂质过氧化物(lipid oxygen, LPO)含量,同时利用荧光偏振法测定细胞膜流动性。**结果:**模型组细胞活力、SOD 活性、细胞膜流动性均比各剂量虾青素组显著降低(P<0.01),而 ROS、LPO 含量均比各剂量虾青素组显著升高(P<0.01)。**结论:**H₂O₂ 摄入会导致大鼠成骨细胞的氧化损伤,而虾青素可以预防或降低此类损伤对细胞的影响。

【关键词】 成骨细胞; 超氧化物歧化酶; 虾青素

Effects of Astaxanthin on the damage of osteoblast induced by H₂O₂ PEI Ling-peng*, DONG Fu-hui, HUI Bo-di. *Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Astaxanthin on enhancing the function of anti-oxidative damage in osteoblast. **Methods:** MC3T3-E1 osteoblasts were randomly divided into five groups, including control group, model group, Astaxanthin group [low-dose (1×10⁻⁷ mol/L), middle-dose (1×10⁻⁶ mol/L), high-dose (1×10⁻⁵ mol/L)], in which the activity of cells, activity of superoxide dismutase (SOD), the content of reactive oxygen species (ROS), lipid oxygen (LPO) and membrane fluidity were tested and compared. **Results:** Compared with Astaxanthin groups, the activity of cells, SOD activity and membrane fluidity in the model group were significantly decreased (P<0.01). However, the contents of ROS and LPO were significantly raised (P<0.01). **Conclusion:** H₂O₂ can cause oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblasts, but Astaxanthin can prevent or decrease its influence.

Key words Osteoblasts; Superoxide dismutase; Astaxanthin

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(3): 187-189 www.zgsgzz.com

虾青素是一种非维生素 A 原的羟酮式类胡萝卜素,其中文习惯命名为虾青素,英文习惯命名为 Astaxanthin,中文系统命名为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β,β'-胡萝卜素。虾青素广泛存在于海洋动物体、藻体及少数陆生植物体内并具有多种生物学功能,尤以抗氧化、防止心血管疾病、提高免疫力和抗癌作用突出^[1]。本实验通过虾青素对 H₂O₂ 氧化损伤鼠成骨细胞模型的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量、脂质过氧化物(lipid oxygen, LPO)含量以及细胞膜流动性的测定,进而研究此类化合物对增强成骨细胞对抗 H₂O₂ 氧化能力的影响。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器和试剂 Labconco 冰冻真空干燥仪,752 分光光度计,AE100 电子天平,电热三用水箱,960 型荧光分光光度计,J2-SH 高速冰冻离心机,KA-1000 型台式离心机,C30 柱(YMC Carotenoid S-5, Waters),HPLC(Waters 600E 溶剂输送系统,PDA-2996 二极管阵列检测器 Waters),CO₂ 细胞培养

箱(Precision Scientific 公司),倒置相差显微镜(OLYMPUS),MDA、SOD 测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所),虾青素乳化剂(红帆公司),乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)(迪马公司),无水乙醇(北京化学试剂公司),大孔吸附树脂(天津农业股份公司),α-MEM、胰蛋白酶、胎牛血清为 Gibco 公司产品,8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、二氯荧光素(DCF)、四氢呋喃(THF)购自 Sigma 公司。

1.2 乳化剂破乳制备虾青素

1.2.1 有机试剂萃取 称取 10 g 乳化颗粒加入 10 ml 水,超声波促溶后,加入 300 丙酮-正己烷萃取。静置 2 h 后,将脂溶性相收集(反复萃取直至水相无色),再利用减压旋转蒸发器进行提取液浓缩处理。

1.2.2 虾青素提取液柱色谱纯化

1.2.2.1 装柱 将活化好的氧化铝装填于玻璃层析柱中,装填高度为 12 cm,用正己烷润湿。

1.2.2.2 洗脱 分别取 2 ml 虾青素提取液上柱,用 50 ml 正己烷-丙酮淋洗,收集洗脱液。将洗脱液用氮气吹干制粉,装入充满氮气的玻璃瓶内,-70℃储存备用。

1.3 虾青素鉴定 根据其 HPLC 中保留时间和紫外可见吸收光谱的特征峰进行鉴定, 得到的虾青素提取液经过滤后用高效液相色谱分离。色谱条件: 色谱柱, Waters YMC Carotenoid S-5 (4.6×250 mm); 流动相 A, 乙腈-水 (90:10); 流动相 B, 乙酸乙酯; 流动相 A 与 B 中分别加入 0.05% 三乙胺作为改性剂防止虾青素降解; 线性梯度洗脱, B 在 10 min 内由 0% 增加至 80%; 10~20 min B 维持 80%; 20~30 min B 由 80% 减至 0%; 流速, 1.0 ml/min; 检测波长, 480 nm; 波长范围 260~700 nm; 进样量, 20 μ l。

有机试剂反复提取后, 通过柱层析可以得到高纯度的虾青素提取物, 经 HPLC 及其光谱特征峰进行定性。从色谱图 (图 1) 可以看出, 提取物除在 14.0 min 处出现 1 个特征峰外没有其他峰, 结合特征峰的光谱特征图 (图 2) 推测为反式 (E-) 虾青素。

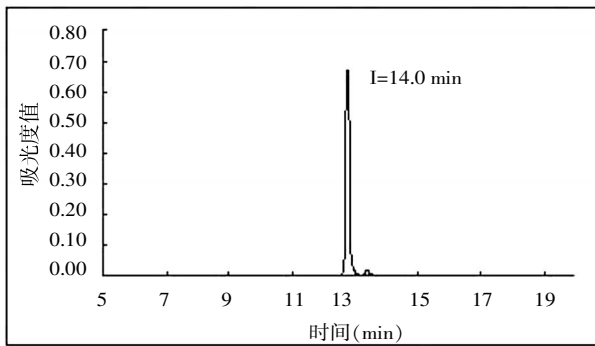


图 1 虾青素提取液 HPLC 检测 (色谱条件见 1.3 部分) 图中组分鉴定: I=全反式虾青素

Fig.1 HPLC detection of Astaxanthin extraction. I=all-E-Astaxanthin

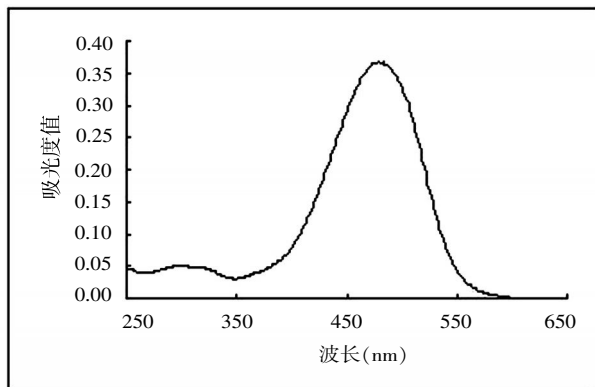


图 2 全反式虾青素光谱特征峰检测图

Fig.2 UV-VIS of all-E-Astaxanthin

1.4 成骨细胞实验

1.4.1 成骨细胞培养 将 MC3T3-E1 成骨细胞 (购自美国 ATCC 细胞库) 复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液重悬吹打均匀后, 以每孔 1×10^5 个/ml 细胞的密度接种于培养瓶中在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 条件下培养, 隔日换液, 以后每隔 2 d 换液 1 次。细胞融合后, 用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化、传代, 相差显微镜下观察成骨细胞形态。

1.4.2 成骨细胞分组处理 将细胞计数后分成 5 个处理组, 其中对照组和损伤模型组用正常培养液进行培养, 高、中、低剂量虾青素组分别用含 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L 的虾青素

培养液培养。48 h 后除对照组外其余各组均用 1×10^{-5} mol/L 的 H_2O_2 进行损伤处理 5 min, 离心去掉上清液备用。

1.5 观测指标与方法

1.5.1 细胞活力测定 以 α -MEM 为培养液, 细胞浓度 1×10^5 个/ml。收集处理后的细胞, 台盼蓝染色观察细胞存活率。 α -MEM 洗涤 2 次后重悬细胞, 加入 10% Alamar Blue。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 4 h。用酶标仪分别于 540 nm 和 620 nm 测定吸光度, 并计算还原率。

还原率 = $(A_{540} - A_{620} \times R) \times 100\%$ 。 $R = (A_{A540} - A_{R540}) / (A_{A620} - A_{R620})$ 。 A_{A540} : 波长 540 nm 时 Alamar Blue 对照的吸光度。 A_{R540} : 波长 540 nm 时 α -MEM 对照的吸光度。 A_{A620} : 波长 620 nm 时 Alamar Blue 对照的吸光度。 A_{R620} : 波长 620 nm 时 α -MEM 对照的吸光度。 A_{540} : 波长 540 nm 时样品的吸光度。 A_{620} : 波长 620 nm 时样品的吸光度。

1.5.2 ROS 测定 以 PBS 调节细胞浓度为 1×10^5 个/ml 左右, 加入 5 μ mol/L 二氯荧光素 (DCF) 预处理细胞 1 h。 H_2O_2 染毒后, 荧光分光光度计激发光 485 nm; 狭缝 5 nm; 发射光为 530 nm, 狭缝 10 nm。测定各组细胞悬液及无细胞对照组中 DCF 的荧光强度。

1.5.3 SOD 活性及 LPO 测定 收集处理后的细胞, PBS 洗涤 2 次, -70 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 4 $^{\circ}$ C、10 000 rpm 离心 20 min, 取上清。Nitrite 法测定 SOD 活性, TBA 荧光法测定 LPO 含量。考马斯亮兰 G250 测定蛋白质水平校正 SOD 及 LPO 值。

1.5.4 成骨细胞膜分离 成骨细胞溶于 pH 7.4 的 10 mM Tris-HCl 低渗缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 静置 3 h, 不停搅拌, 7 000 rpm/20 min, 将沉淀物再加入低渗缓冲液, 离心 10 000 rpm/15 min, 得到白色的细胞膜组织。封闭影泡制备: 白色细胞膜悬浮于少量等渗磷酸缓冲溶液中静置于冰箱中过夜。最后用 Lowry 法测定蛋白, 调整膜蛋白浓度为 500~800 μ g/ml。

1.5.5 细胞膜的流动性测定 (荧光偏振法) ANS 荧光探针标记: 溶于四氢呋喃, 用时取一定量溶液用 pH 7.4 的含盐等渗磷酸缓冲液稀释至终浓度 0.004 mmol/L, 激烈震荡 15 min, 吸收 ANS 应用液与等体积预先制备的细胞膜样品混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 10 min。

荧光测定条件: 室温测定荧光强度和加偏振片以后不同光路方向的荧光, ANS 激发波长 380 nm, 发射波长 475 nm, 荧光分光光度计测定荧光, 计算荧光偏振度、微黏度、各向异性 and 膜脂流动性。在测定中主要参考因子 A_{vh} 、 A_{vv} 、 A_{lh} 、 A_{lv} 。

A_{vv} : 起偏与测偏器的方向均平行于样品杯方向的荧光。
 A_{lh} : 起偏平行于样品杯的高度方向, 测偏器的方向垂直于样品杯的高度方向荧光。
 A_{lv} : 起偏与测偏器的方向均垂直于样品杯的高度方向荧光。
 A_{vv} : 起偏垂直于样品杯的高度方向, 测偏器的方向平行于样品杯的高度方向荧光。

在描述膜流动性过程参考的数值: ① 荧光偏振度 $P = (A_{vv} - B) / (A_{vv} + B)$, $B = A_{lv} / A_{lh}$ 。 ② 微黏度 $\eta = 2P / (0.46 - 0.92P)$ 。 ③ 各向异性 $\gamma = 2P / (3 - P)$ 。 ④ 膜脂流动性 $\text{LFU} = (P_{\text{max}} - P_r) - (P \times P_r)$ 。 P_{max} 为 0.5, P_r 为所测荧光偏振度。

1.6 统计学处理 实验数据用 SPSS 10.0 统计软件进行处理, 组间差异比较用单因素方差分析。

表 3 不同浓度虾青素对成骨细胞膜流动性的影响(ANS 标记)($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.3 Effects of different concentration of Astaxanthin on the membrane fluidity of osteoblast($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	偏振度	各向异性	微黏度	膜脂质流动性
模型组	0.502±0.011	0.351±0.010	7.011±0.901	2.014±0.067
对照组	0.451±0.012*	0.303±0.012*	6.901±0.872*	2.913±0.072**
低剂量虾青素组(1×10 ⁻⁷ mol/L)	0.479±0.018*	0.343±0.017*	6.990±0.880*	2.145±0.064**
中剂量虾青素组(1×10 ⁻⁶ mol/L)	0.462±0.013*	0.330±0.014*	6.924±0.877*	2.327±0.068**
高剂量虾青素组(1×10 ⁻⁵ mol/L)	0.455±0.011*	0.317±0.011*	6.908±0.870*	2.689±0.070**

2 结果

2.1 细胞活力测定 3 种不同浓度虾青素处理 1×10⁻⁵ mol/L H₂O₂ 染毒成骨细胞活力结果可看出: 虾青素组和对照组的细胞活力较模型组有显著增加(P<0.01), 且虾青素组处理的细胞活性随剂量升高而增强(表 1)。

表 1 不同浓度虾青素对 H₂O₂ 染毒细胞活力影响(n=6)

Tab.1 Effects of different concentration of Astaxanthin on osteoblast activity(n=6)

组别	Alamar Blue 还原率
模型组	46%
对照组	66%**
低剂量虾青素组(1×10 ⁻⁷ mol/L)	48%**
中剂量虾青素组(1×10 ⁻⁶ mol/L)	56%**
高剂量虾青素组(1×10 ⁻⁵ mol/L)	61%**

注:与模型组比较, *P<0.05, **P<0.01, 下同

Note: Compared with control group, *P<0.05, **P<0.01, follows the same

2.2 ROS、LPO 含量和 SOD 活性测定 3 种不同浓度虾青素预处理后, 再由 1×10⁻⁵ mol/L H₂O₂ 处理的成骨细胞 ROS、LPO 含量和 SOD 活性结果表明: 虾青素组和对照组的 ROS 和 LPO 含量较模型组减少(P<0.01), 而 SOD 活性则较模型组增强(P<0.01), 且呈现一定量效关系(表 2)。

表 2 不同浓度虾青素对细胞 ROS、LPO 含量和 SOD 活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.2 Effects of different concentration of Astaxanthin on the contents of ROS, LPO and activity of SOD($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	ROS 含量	LPO 含量 (nmol/mgpro)	SOD 活性 (NU/mgpro)
模型组	430	0.46±0.08	6.1±0.6
对照组	320**	0.20±0.02**	10.5±1.2**
低剂量虾青素组(1×10 ⁻⁷ mol/L)	426**	0.44±0.06**	6.6±0.6**
中剂量虾青素组(1×10 ⁻⁶ mol/L)	397**	0.40±0.06**	7.4±0.7**
高剂量虾青素组(1×10 ⁻⁵ mol/L)	333**	0.29±0.05**	8.2±0.7**

2.3 细胞膜的流动性测定 3 种不同浓度虾青素预处理后, 1×10⁻⁵ mol/L H₂O₂ 处理成骨细胞膜流动性结果表明: 虾青素组和对照组的各流动性参数与模型组差异有统计学意义(P<0.05), 虾青素处理的细胞流动性随剂量升高而增强(表 3)。

3 讨论

活性氧对成骨细胞的影响可能是由于活性氧(特别是 OH⁻) 攻击细胞增殖期的 DNA 及合成 DNA 所需的酶, 导致 DNA 发生链的断裂, 并损害碱基, 影响 DNA-DNA、DNA-蛋白质交联, 使细胞分裂繁殖障碍, 则成骨细胞数量减少^[2]。

本实验中对对照组的 DNA 自发性损伤较低, 而在 H₂O₂ 胁迫下, DNA 氧化损伤有所加重。这主要是由于 H₂O₂ 是 DNA 诱导剂, 能很容易穿透细胞膜进入细胞, 如不被酶解可直接进入细胞核。在细胞核内, 其可能在有结合与 DNA 上的金属离子如铁、铜等的催化下转变成具有高活性的或由 H₂O₂ 诱发的氧化反应引起细胞内 DNA 储藏位点的释放, 造成 DNA 链的断裂^[3]。实验结果表明在 H₂O₂ 的胁迫下, 其诱导的成骨细胞 DNA 损伤逐渐增大, SOD 抗氧化酶活性降低, LPO 含量和细胞体内的总 ROS 含量增加, 导致细胞增殖活力受到抑制。相比之下, 虾青素组对 H₂O₂ 诱导的成骨细胞氧化损伤有明显的保护作用, 说明虾青素可以有效降低 H₂O₂ 对成骨细胞造成的伤害。

通过荧光偏振法研究细胞膜流动性表明: 在体系中, 随着成骨细胞膜被氧化, 细胞膜影泡的流动性呈现下降趋势。细胞在 H₂O₂ 作用下发生的自由基损伤导致了膜的物理改变, 流动性的下降便是一个重要指标。而由于虾青素分子结构中 β-紫罗酮环带有酮基, 具有一定的极性易与膜亲水区结合, 发挥其抗氧化作用, 抵抗了羟自由基对脂膜的损伤影响, 进而使受到氧化损伤后表征膜的流动性的几个参考量均发生变化, 逐步得到恢复, 达到维系生物膜行使正常生物学功能的目的。

综上所述, 虾青素可以有效地防御与降低 H₂O₂ 对成骨细胞的氧化损伤, 进而通过淬灭自由基保护成骨细胞增殖, 促进骨形成过程。

参考文献

- 1 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学. 北京: 中国轻工业出版社, 2005. 150-168.
- 2 Kim L, Rao AV, Rao LG. Lycopene II - effect on osteoblasts; the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. J Med Food, 2003, 6(2): 79-86.
- 3 Jacobson A, Johansson S, Branting M, et al. Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(1): 162-167.

(收稿日期: 2007-07-31 本文编辑: 连智华)