

# SOD 对肿瘤细胞凋亡影响和抗氧化损伤的研究：

## 1. SOD 与 DDP、ADM、VP16 合用对肿瘤细胞凋亡的影响

刘永彪<sup>1,2</sup> 刘颖<sup>2</sup> 赵杰<sup>2</sup> 郝兴芝<sup>2</sup> 王绪<sup>2</sup> 姚思德<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (中国科学院上海应用物理研究所辐射技术应用中心 上海 201800)

<sup>2</sup> (徐州医学院肿瘤研究所 徐州 221002)

**摘要** 将顺铂 (DDP)、阿霉素 (ADM) 和足叶乙甙 (VP16) 以不同时间作用于实验小鼠宫颈癌 HeLa 细胞, 测定细胞内活性氧 (ROS) 水平和细胞凋亡率, 研究抗肿瘤药物诱导 HeLa 细胞凋亡与细胞内 ROS 水平的关系。研究表明, 在抗肿瘤药物作用前加入超氧化物歧化酶 (SOD), 会减少 HeLa 细胞的凋亡, 在抗肿瘤药物作用 24h 后加入 SOD, 对 HeLa 细胞的凋亡无影响, 而且对 HeLa 细胞 p53、c-fos 基因产物表达也无影响。荷瘤小鼠机体整体水平研究表明, 在给予化疗药物 4h 后连续 5d 注入 SOD, 与单纯化疗药物组相比, 可显著减少荷瘤小鼠骨髓细胞, 肝脏和脾脏组织匀浆中 ROS 水平。表明后注入 SOD 可直接清除重要脏器细胞内因化疗药物产生的过量 ROS, 还可提高其它抗氧化酶活性而协同清除化疗药物产生的过量 ROS, 从而避免正常器官的氧化性损伤。本研究结果为肿瘤化疗中适时施用 SOD, 减少化疗的毒副作用具有一定指导意义。

**关键词** 超氧化物歧化酶, 肿瘤化疗药物, 细胞凋亡, 宫颈癌 HeLa 细胞

中图分类号 R811.5

恶性肿瘤的发病率日趋升高, 是当前危害人类健康的主要疾病之一。大多数恶性肿瘤采取综合治疗, 除手术外, 化学治疗和放射治疗是疗效肯定的治疗方法, 大多数抗肿瘤药物和电离辐射产生大量的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS), 杀伤肿瘤细胞。目前的研究表明, 恶性肿瘤细胞不需要细胞因子的刺激, 即能自发地产生及释放高浓度的 ROS<sup>[1]</sup>, 而且肿瘤组织中超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活性偏低。化学药物治疗的主要机制之一是诱导肿瘤细胞凋亡, 是目前肿瘤治疗研究的重要课题。

据国外报道, 抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡与活性氧浓度增高有密切关系, 抗癌药物可使某些肿瘤细胞株活性氧产生增强<sup>[2,3]</sup>。SOD 是生物体内最重要的抗氧化剂, 生物体的抗氧化作用, 就在于能否高效清除  $O_2^-$ , 能否有效地降低对机体毒性更强的  $\cdot OH$  的生成。因此, SOD 被称作一线抗氧化剂。目前, 从细胞、组织与器官, 乃至整体动物水平, 都观察到了 SOD 对辐射损伤的防护作用。有关抗辐

射损伤的机理和应用研究报道较多, 但对于化疗药物引起氧化损伤的防治作用研究报道极少。更引人关注的是, 在机体整体水平上应用 SOD、防治正常器官氧化损伤的同时, 是否会影响肿瘤治疗效果。这在很大程度上限制了其在肿瘤治疗上的临床应用。

本实验以体外培养的宫颈癌 HeLa 细胞为实验对象, 就外源性 SOD 于不同给药时间对 HeLa 细胞经化疗药物作用后凋亡的影响、对荷瘤小鼠全身化疗后机体肿瘤细胞凋亡的影响进行了相应探索。将顺铂 (DDP)、阿霉素 (ADM) 和足叶乙甙 (VP16) 作用于 HeLa 细胞 0、6、12、24、48 h 后, 测定细胞内 ROS 水平和细胞凋亡率, 研究抗肿瘤药物诱导 HeLa 细胞凋亡与细胞内 ROS 水平的关系。在抗肿瘤化疗药物作用于 HeLa 细胞后的不同时刻, 施加外源性 SOD, 研究其对 HeLa 细胞凋亡的影响。并以免疫组织化学染色法检测 HeLa 细胞癌基因表达的变化, 从分子生物学水平探讨其相应机理。

江苏省教委自然科学基金 (98KJD320014) 部分资助

第一作者: 刘永彪, 男, 1963 年 8 月出生, 1999 年在苏州大学获硕士学位, 副教授, 副主任医师, 放射医学肿瘤学专业, 现为中国科学院上海应用物理研究所读博士

收稿日期: 初稿 2003-10-13, 修回 2003-12-23

## 1 材料和方法

### 1.1 Helal 细胞培养

Helal 细胞由中国科学院上海细胞生物研究所细胞库提供。培养液为含 10% 胎牛血清 (FBS)、100U/mL 青霉素、0.1mg/mL 链霉素的 RPMI1640 (GIBCO, USA), 置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的恒温箱中培养, 细胞达 80%—90% 融合状态用 0.25% 胰蛋白酶 (上海华美生物工程公司) 消化后传代。全部实验均用指数生长期的 Helal 细胞。

### 1.2 顺铂 (DDP)、阿霉素 (ADM)、足叶乙甙 (VP16) 处理 Helal 细胞

0.25%胰酶消化后, 用 RPMI1640 培养液调节细胞浓度为  $1 \times 10^8$ /L, 每培养瓶中各加 1mL, 再各加入培养液 6mL, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃恒温培养箱中培养。细胞生长达 70% 融合时更换培养液, 同时加入药物, DDP、ADM 和 VP16 终浓度分别为 3、0.4、2mg/L。加入等量生理盐水组为对照, 然后继续培养, 作用时间分别为 6、12、24、48h, 每组 6 瓶, 重复实验 3 次。

### 1.3 SOD 处理 Helal 细胞

SOD 由猪血纯化而得, 比活性为  $5 \times 10^6$ U/g, 实验前采用黄嘌呤氧化法测定比活性, 由苏州大学核放射与环卫学院江家贵教授惠赠。每次实验用一种抗肿瘤药物。将细胞分为 4 组。(1) 对照组: 培养液中不加药物继续培养; (2) SOD 组: 在培养液中加入 SOD, 终浓度为 316  $\mu$ g/mL; (3) 单纯化疗药物组; (4) 药物+SOD 组: 加入 DDP、ADM、VP-16 同时或加入 24h 后再加入终浓度为 316mg/L SOD, 继续培养 24h。

### 1.4 肿瘤动物模型的建立

1.4.1 实验动物 健康 BALB/c 小鼠 18 只, 6—8 周龄, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 由上海实验动物中心提供。种鼠为 U14 宫颈癌腹水型, 由上海医药工业研究院实验动物中心提供。小鼠皮下接种肿瘤细胞后 10—14d 肿瘤约 1cm 大小时间开始进行分组实验。

1.4.2 动物分组 将荷瘤小鼠随机分为 4 组。(1) 对照组: 不给予任何治疗继续饲养至实验结束; (2) 单纯化疗组: 单次腹腔注射 DDP 或 ADM; (3) 化疗前+SOD 组: 单次腹腔注射 DDP 或 ADM, 给化疗药物前 2h 腹腔注射 SOD; (4) 化疗后+SOD 组: 给化疗药物后 4h 腹腔注射 SOD。每组动物为 6 只。

1.4.3 给药剂量和方法 抗肿瘤药物腹腔注射给药: 用药剂量 DDP= $2.5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 1.88 \cdot \text{鼠重 (kg)}$ , ADM= $1.25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 1.88 \cdot \text{鼠重 (kg)}$ 。SOD 给药: 应用化疗药物 DDP 或 ADM 24h 后腹腔注射, 剂量 250U/mg/d, 连续 5d, 用前用生理盐水稀释至  $1 \times 10^7$ U/L。

1.4.4 荷瘤小鼠肿瘤细胞悬液制备 小鼠处死后立即取出其左腋下皮下肿瘤组织, 取一块约 0.5 $\times$ 0.5 大小固定于 10%甲醛中做病理, 剩余肿块放入盛有 PBS 的小烧杯中, 用眼科剪反复剪碎组织, 再用 160 目尼龙网过滤即可制备成单细胞悬液。

### 1.5 流式细胞仪 (Flow Cytometric, FCM) 测定 Helal 细胞凋亡

收集上述不同药物、不同作用时间处理后的包括贴壁和悬浮的 Helal 细胞, 用 PBS 调细胞浓度为  $1 \times 10^9$ /L, 取 1mL 单细胞悬液, 1500r/min 离心 10min, 去上清, 加入 PBS 1mL 漂洗, 重复离心 1 次, 去上清。加入预冷的 70%乙醇 1mL 固定细胞, 置 4℃冰箱过夜。次日将固定的细胞悬液离心 5min (1500r/min), 去上清, 用 PBS 漂洗 1 次, 在单细胞样本中加入核糖核酸酶 (RNase) (上海华美生物工程公司) 37℃作用 30min, 再加入终浓度为 50  $\mu$ g/mL 的碘化丙啶 (PI) (上海华美生物工程公司) 1mL, 4℃避光染色 20min, 过滤后用 FCM 测定。光源为 488nm 的氩离子激光器, PI 受激发后发出红色荧光。凋亡细胞在流式细胞仪 DNA 直方图上呈特征性的亚二倍体 (亚 G<sub>1</sub>) 峰。以荷瘤小鼠的外周血淋巴细胞为正常二倍体标准, 根据测定的 DNA 组方图, 用 CELLQUEST 分析软件分析 Helal 细胞的凋亡指数 (Apoptosis Index, AI) 和细胞增殖指数 (Proliferation Index, PI)。

### 1.6 化学比色法测定 Helal 细胞 ROS 产生状态

1.6.1 样本制备 收集上述不同药物、不同作用时间处理后的包括贴壁和悬浮的 Helal 细胞, 用生理盐水调细胞浓度为  $1 \times 10^{10}$ /L, 取细胞悬液 1mL, 4℃下离心 10min (1500r/min), 去上清, 再加入 1mL 匀浆介质 (pH7.4, 0.01mol/L 蔗糖, 0.01mol/L tris-HCL) 离心 10min (4000r/min), 在冰水中用电匀浆器低速匀浆使细胞破碎, 将细胞裂解液以 4000r/min 离心 10min, 取适量上清液进行 ROS 测定。试剂严格按 ROS 测定盒 (南京建成生物有限公司) 说明书配制, 现用现配。配制好的应用液先在 37℃水浴中预热 3min, 在 37℃水浴中加入试剂, 按试剂加入操作步骤进行, 同时设标准空白管、标

准管,在室温下加入显色剂,混匀,反应 20 min 后用 752 紫外分光光度计测定 550nm 处吸光度 (OD 值)。

$ROS = [(\text{测定管 OD 值} - \text{对照管 OD 值}) / (\text{标准管 OD 值} - \text{标准空白管 OD 值})] \times \text{标准管浓度} \times (1\text{mL} / \text{取样量})$ 。

## 1.7 细胞形态学改变

以 0.25%胰酶消化后细胞用培养液调细胞浓度为  $1.5 \times 10^7/\text{L}$ ,各取 1mL 细胞悬液接种于放有小玻璃盖片的培养皿中,待细胞呈 70%融合状态时加入药物,浓度及作用时间同上,分别取出载有不同条件下培养的 HeLa 细胞的玻片,用 95%乙醇固定细胞 30min,常规 HE 染色,风干后封片,显微镜下观察并拍照。

## 1.8 免疫组化实验步骤

(1) 0.01mol/L PBS (pH=7.2) 冲洗 5min×3 次;  
(2) 过氧化酶阻断剂阻断内源性过氧化物酶活性,室温下孵育 10min 后 PBS 冲洗 5min×3 次;(3) 组织抗原修复,将玻片放入经微波炉预先加热至 95℃ 的 0.01mol/L 柠檬酸 (pH=6.0) 中,再中火继续作用 10min,待柠檬酸完全冷却后取出玻片;(4) 非免疫动物血清室温孵育 5min, PBS 洗 1 次;(5) 加一抗一滴后置 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 冲洗 5min×3 次;(6) 加二抗室温孵育 10min 后 PBS 冲洗 5min×3 次;(7) 加链亲和素—过氧化物酶溶液,室温下孵育 10min 后 PBS 冲洗 5min×3 次;(8) 滴加新鲜配制的 DAB 显色剂,根据显微镜下观察染色深浅,染色 5—8 min;(9) 蒸馏水冲洗、风干,中性树脂胶封固。结果分析方法:每次实验均设不加一抗的阴性对照。p53、c-fos 表达均定位于细胞核,棕黄、黄褐色为阳性表达。结果应用 LEICA QWIN 计算机图像分析仪,随机选取 100 个细胞,测其细胞核灰阶度,以反应染色强度,比较各组染色强度差异。

## 1.9 统计学处理

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间显著性差异采用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 药物不同作用时间对 HeLa 细胞 ROS 产生状态和细胞凋亡的影响

2.1.1 DDP 不同作用时间对 HeLa 细胞 ROS 产生状态及细胞凋亡的影响 3mg/L 的 DDP 处理 HeLa 细

胞,随药物作用时间延长细胞凋亡增多,ROS 水平升高逐渐且于 24h 达高峰浓度,24h 后细胞凋亡率继续上升,但细胞 ROS 水平开始下降,结果见图 1—图 3 (凋亡细胞在流式细胞仪 DNA 直方图上呈特征性的亚二倍体峰)。

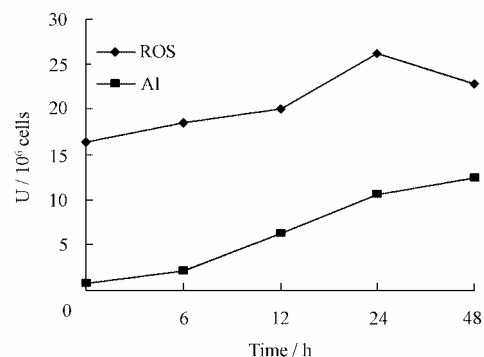


Fig.1 DDP effect of on content of ROS and AI of HeLa cell in different time

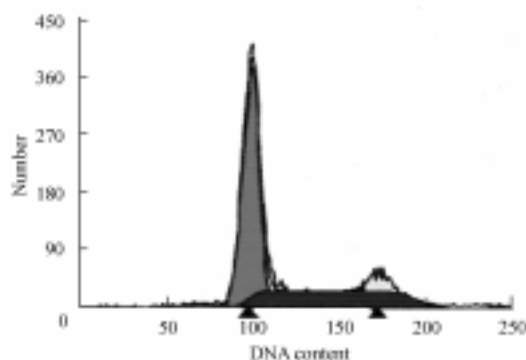


Fig.2 The histogram of DNA content of HeLa cells in control group

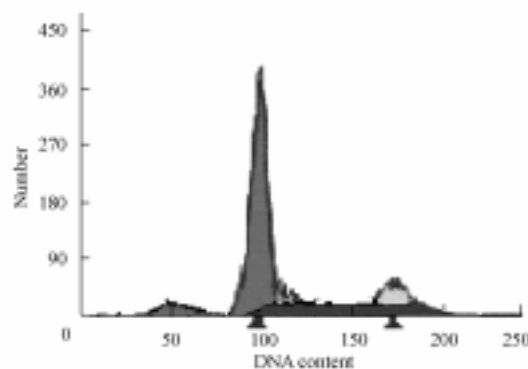


Fig.3 The histogram DNA of content of HeLa cells in DDP group

2.1.2 ADM 不同作用时间对 HeLa 细胞 ROS 产生状态和细胞凋亡的影响 0.4mg/L 浓度的 ADM 作用于 HeLa 细胞,ADM 作用后细胞 ROS 水平逐渐增高,24h 达高峰,与对照组差异显著 ( $p < 0.01$ ),细胞凋亡随作用时间延长而增多,但作用 24h 后细胞凋亡率继续升高而 ROS 水平下降,结果见图 4 (凋亡细胞在流式细胞仪 DNA 直方图上呈特征性的亚二倍体峰)和图 5。

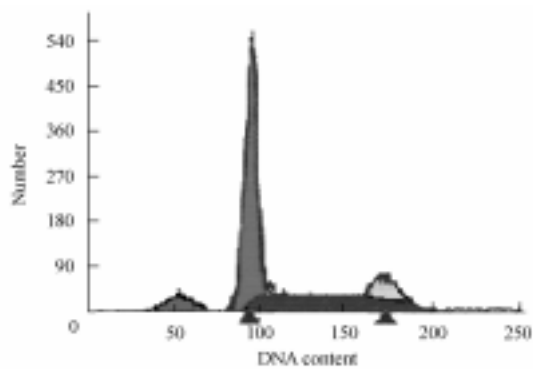


Fig.4 The histogram of DNA content of HeLa cells in ADM group

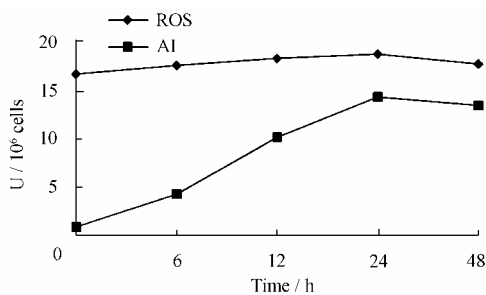


Fig.5 ADM effect on content of ROS and AI of HeLa cell in different time

2.1.3 VP16 不同作用时间对 HeLa 细胞 ROS 产生状态和细胞凋亡的影响 2mg/L 浓度的 VP16 作用于 HeLa 细胞，随药物作用时间延长细胞凋亡率逐渐升高，但细胞内 ROS 水平无明显变化，与对照组比较无显著差异 ( $p>0.05$ )，结果见图 6。

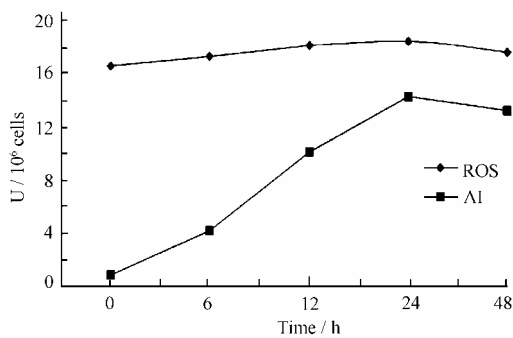


Fig.6 VP16 effect on content of ROS and AI of HeLa cells in different time

2.2 SOD 对 DDP、ADM 诱导 HeLa 细胞凋亡的影响

与单纯用药组相比，同时加 DDP、ADM 和 SOD 组 HeLa 细胞凋亡率明显降低，两组差异显著 ( $p<0.01$ )，而 DDP、ADM 作用 24h 后加 SOD 组即 SOD (24h) 组 HeLa 细胞凋亡率并不降低，两组间差异不显著 ( $p>0.05$ )，结果见表 1。

Table 1 Effect of SOD on apoptosis of HeLa cells induced by DDP and ADM ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group         | AI                       |
|---------------|--------------------------|
| Control       | 0.87±0.06                |
| SOD           | 1.04±0.13                |
| DDP           | 11.22±1.34               |
| SOD+DDP       | 7.56±0.84 <sup>(1)</sup> |
| SOD+DDP (24h) | 12.15±1.12               |
| ADM           | 12.45±1.02               |
| SOD+ADM       | 8.33±0.92 <sup>(2)</sup> |
| SOD+ADM(24h)  | 14.77±1.43               |

<sup>(1)</sup>  $p<0.01$  (vs DDP), <sup>(2)</sup>  $p<0.01$  (vs ADM)

2.3 SOD 对 DDP、ADM、VP16 处理 HeLa 细胞形态学的影响

2.3.1 DDP、ADM、VP16 作用后 HeLa 细胞形态学变化 光学显微镜 HE 染色结果。对照组 HeLa 细胞增殖活跃，分裂期细胞多见，细胞核呈类圆形，边界清，染色质均匀分布呈浅蓝色着色，核仁明显 2—3 个，细胞有伪足使细胞形态不规则，细胞密度高，见图 7。抗肿瘤药物作用 24h 后 HeLa 细胞形态发生明显变化，细胞密度降低，并出现凋亡细胞。凋亡细胞胞体小，细胞膜完整，细胞核固缩，染色质浓缩，呈大小不等、数量不等的小球形、半月型，核仁消失，核染色呈紫褐色见图 8—图 11。

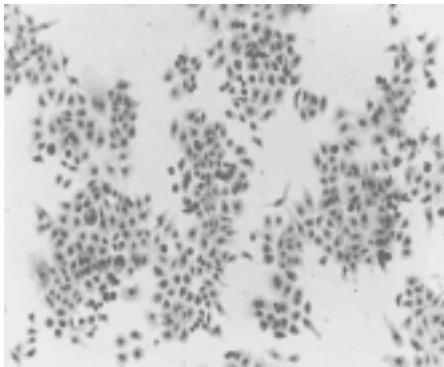


Fig.7 HE staining of HeLa cells in control group (x100)

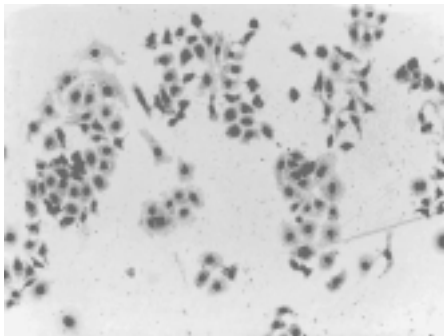


Fig.8 HE staining of HeLa cell in DDP group (x100)

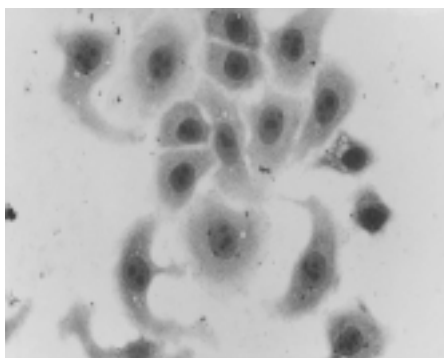


Fig.9 HE staining of HeLa cell in DDP group ( $\times 400$ )

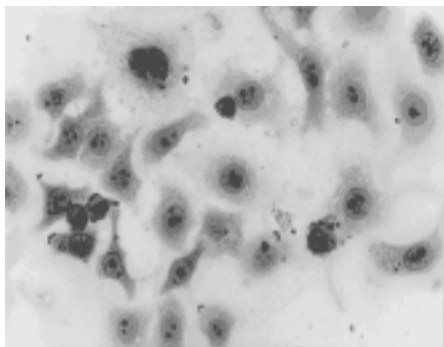


Fig.10 HE staining of HeLa cells in ADM group ( $\times 400$ )

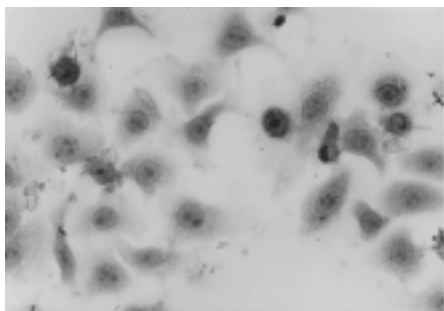


Fig.11 HE staining of HeLa cell in VP16 group ( $\times 400$ )

2.3.2 DDP、ADM 处理 HeLa 细胞同时加入 SOD 组 HE 染色 DDP 3mg/L 作用 24h 后 HeLa 细胞形态发生明显变化，细胞密度降低，并出现凋亡细胞。凋亡细胞胞体小，细胞膜完整，细胞核固缩，染色质浓缩，呈大小不等、数量不等的小球形、半月型，

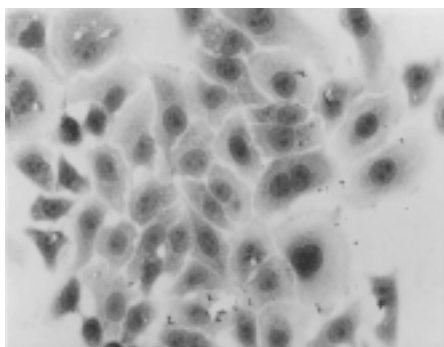


Fig.12 HE staining of HeLa cell in control group ( $\times 400$ )

核仁消失，核染色呈紫褐色，而同时加入 SOD 后细胞密度增加，分裂期细胞增多，凋亡细胞尤其晚期凋亡细胞减少。DDP、ADM 处理 HeLa 细胞 24h 加入 SOD 组 HE 染色结果 2 组均出现明显细胞形态变化，细胞密度降低，并出现凋亡细胞见图 12 和图 13。

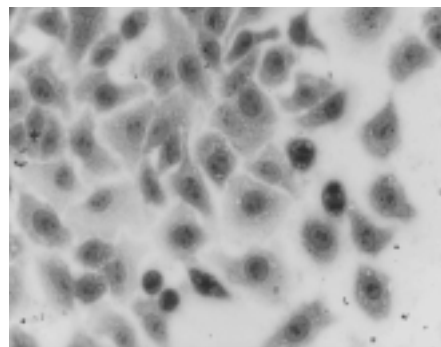


Fig.13 HE staining of HeLa cells in SOD group ( $\times 400$ )

## 2.4 SOD 对 DDP、ADM 处理 HeLa 细胞 p53、c-fos 基因产物表达的影响

2.4.1 P53 蛋白免疫组织化学染色强度 与单纯化疗药物组相比，同时加 SOD 组 P53 蛋白染色强度明显升高，2 组间差异显著 ( $p < 0.05$ )，而 DDP、ADM 处理 HeLa 细胞 24h 后加入 SOD 组 P53 蛋白染色强度无明显变化，两组间无显著差异 ( $p > 0.05$ )，结果见表 2 和图 14—图 20。

Table 2 Effect of SOD on p53 protein express of HeLa cell treated with DDP and ADM ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group          | Grey degree                     |                                 |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                | DDP                             | ADM                             |
| Drug           | 34.72 $\pm$ 4.25                | 32.55 $\pm$ 4.21                |
| Drug+ SOD      | 24.38 $\pm$ 3.63 <sup>(1)</sup> | 23.16 $\pm$ 3.53 <sup>(1)</sup> |
| Drug+SOD (24h) | 36.23 $\pm$ 3.97                | 34.75 $\pm$ 4.18                |

<sup>(1)</sup>  $p < 0.01$ , (vs Drug)

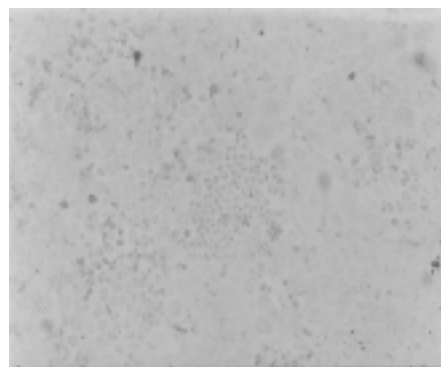


Fig.14 The negative expression of P53 protein of HeLa ( $\times 100$ )

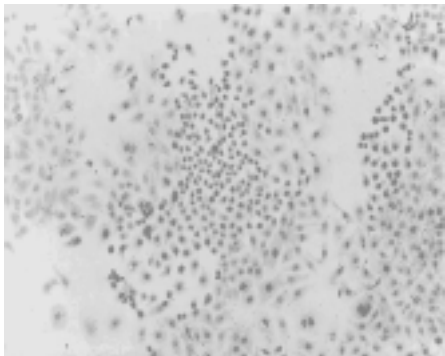


**Fig.15** The positive expression of P53 protein of HeLa cells (×100)

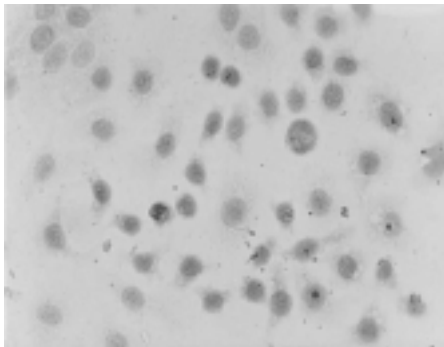


**Fig.19** P53 protein expression of HeLa cells in ADM+SOD (0h) (×400)

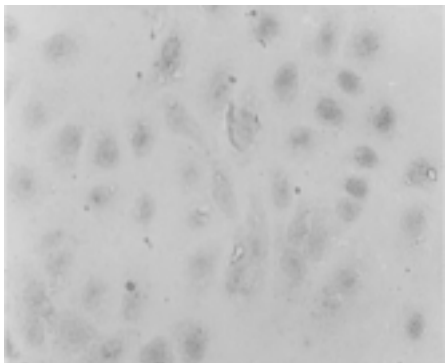


**Fig.16** The P53 protein expression of HeLa cells in DDP group (×400)

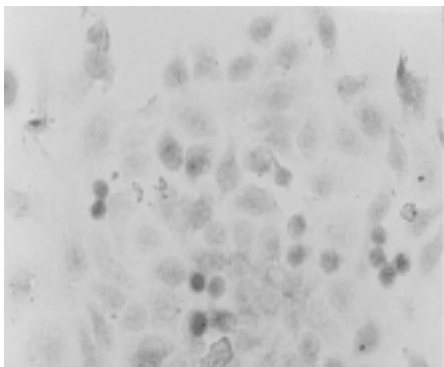


**Fig.20** P53 protein expression of HeLa cells in ADM+SOD (24h) group (×400)

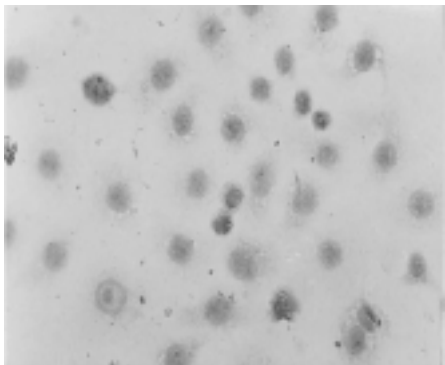


**Fig.17** P53 protein expression of HeLa cells in DDP+SOD (0h) group (×400)

2.4.2 c-fos 蛋白吸光度 与单纯化疗药物组相比，同时加入 SOD 组 c-fos 吸光度明显升高，差异显著 ( $p<0.05$ )，而 DDP、ADM 处理 HeLa 细胞 24h 加入 SOD 组 c-fos 蛋白吸光度无明显变化，组间无显著差异 ( $p>0.05$ ) 见表 3 和图 21—图 24。

**Table 3** Effect of SOD on c-fos protein expression of HeLa cell treated with DDP and ADM ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group          | Grey degree               |                           |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
|                | DDP                       | ADM                       |
| Drug           | 40.58±5.26                | 38.46±4.25                |
| Drug+ SOD      | 32.47±4.68 <sup>(1)</sup> | 27.55±3.33 <sup>(1)</sup> |
| Drug+ SOD(24h) | 43.54±5.14                | 37.24±4.47                |

<sup>(1)</sup>  $p < 0.01$ , (vs Drug)

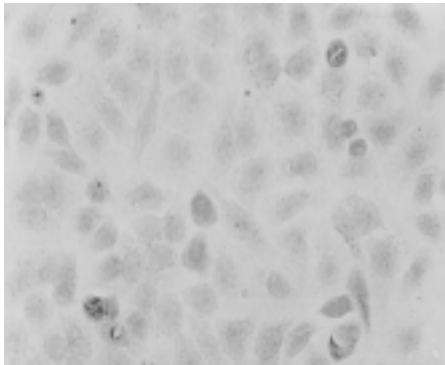


**Fig.18** P53 protein expression of HeLa cells in DDP+SOD (24h) group (×400)

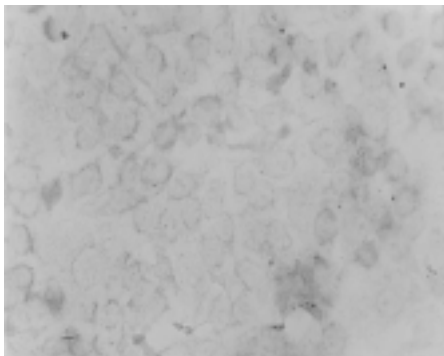


**Fig.21** c-fos protein negative expression of HeLa cells (×400)

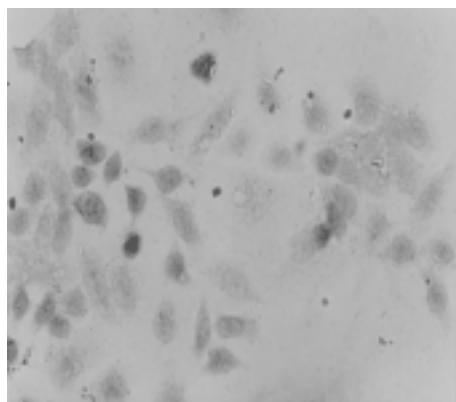


Fig.22 c-fos protein expression of cells in DDP group ( $\times 400$ )

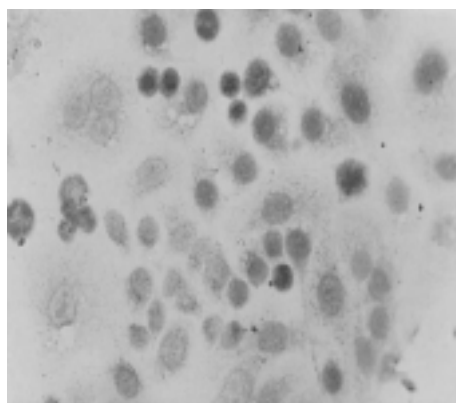


Fig.23 c-fos protein expression of HeLa cells in DDP+SOD (0h) group ( $\times 400$ )

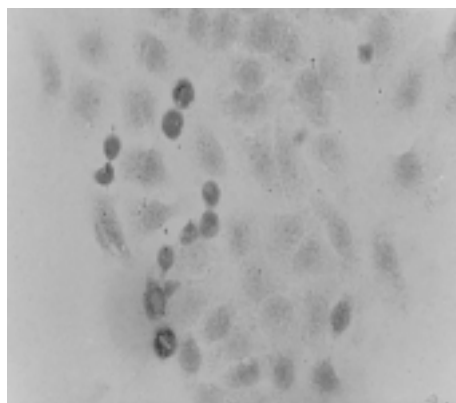


Fig.24 c-fos protein expression of HeLa cells in DDP+SOD (24h) group ( $\times 400$ )

## 2.5 SOD 对抗肿瘤药物诱导荷瘤小鼠宫颈癌细胞凋亡影响

抗肿瘤药物 DDP、ADM 腹腔注射荷瘤小鼠后可明显诱导肿瘤细胞凋亡,与未治疗组比较差异显著 ( $p < 0.01$ )。化疗药物后+SOD 组荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡率较单纯药物治疗无明显变化 ( $p > 0.05$ ),而化疗药物前注射 SOD 抑制肿瘤细胞凋亡 ( $p < 0.05$ ) 结果见表 4。

Table 4 Effect of SOD on apoptosis of cervical carcinoma cell of tumor-bearing mice after DDP and ADM ( $\%, \bar{x} \pm s$ )

| Group           | AI                              |                                 |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                 | DDP                             | ADM                             |
| Control         | 6.25 $\pm$ 1.42                 | 5.33 $\pm$ 1.18                 |
| Drug            | 25.44 $\pm$ 3.08 <sup>(1)</sup> | 18.54 $\pm$ 2.61 <sup>(1)</sup> |
| Pro- Drug +SOD  | 20.05 $\pm$ 2.87 <sup>(2)</sup> | 13.96 $\pm$ 2.42 <sup>(2)</sup> |
| Post- Drug +SOD | 23.86 $\pm$ 3.47 <sup>(1)</sup> | 16.72 $\pm$ 3.05 <sup>(1)</sup> |

<sup>(1)</sup>  $p < 0.01$  (vs control), <sup>(2)</sup>  $p < 0.05$  (vs chemotherapy)

## 3 讨论

ROS 是以自由基和非自由基形式存在的具有高度活性的活性氧,前者有  $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ ,后者有  $H_2O_2$ 、 $NO$ 、脂质过氧化产物  $ROOH$  等。作为代谢产物的活性氧普遍存在于生物界,对细胞的分化、增殖、基因表达等进行自身调控<sup>[1]</sup>,细胞内的内源性抗氧化剂在基因的调控下,清除一部分多余的活性氧,并使其保持在一定的平衡浓度下,但当生物体受环境或化学物质的影响,使得活性氧的生成与清除失去平衡,就会产生一种氧胁迫环境。如果这种氧胁迫环境持续存在,一些关键的生物大分子如 DNA、蛋白、细胞膜等的氧化损伤累积到一定程度,就导致一些严重的生物效应,促进细胞发生有丝分裂、突变及死亡<sup>[4]</sup>;另一方面,当细胞受到环境、化学及生物因素等刺激时,可使细胞生物膜上的 NADPH 氧化酶系统产生大量的 ROS,测定细胞的 ROS 水平可以估计这一生物应急效果和氧化损伤程度,目前的研究认为巨噬细胞以外的细胞也可产生活性氧<sup>[5]</sup>。Ubezio 等通过流式细胞仪测定肿瘤细胞内过氧化氢证明了阿霉素诱导肿瘤细胞凋亡与活性氧的产生和浓度有关<sup>[2]</sup>。本实验结果提示血浆峰浓度的 DDP 和 ADM 作用于 HeLa 细胞,随着 DDP、ADM 作用时间的延长,HeLa 细胞凋亡率逐渐升高,ROS 产生增多。结果表明 DDP、ADM 均可通过激发 HeLa 细胞产生 ROS 诱导其凋亡,在一定作用时间内 ROS 水平与细胞凋亡率有密切关系。而 VP16 以血浆峰浓度作用于 HeLa 细胞后,可诱导细胞凋亡也存在时间相关性,但 HeLa 细胞产生 ROS 的状态并无明显改变,表明 VP16 可能并不通过激发 HeLa 细胞产生 ROS 来诱导细胞凋亡,至于提高 VP16 作用浓度是否可刺激 HeLa 细胞产生高浓度的 ROS 有待进一步研究。

目前研究表明 ROS 诱导 HeLa 细胞凋亡的机制可通过以下途径:(1) ROS 可直接作用于细胞 DNA 使之受损伤或键断裂<sup>[6]</sup>,同时在 ROS 作用下细胞修复系统对氧化损伤 DNA 的修复速度明显减慢<sup>[7]</sup>;(2) ROS 损伤蛋白质,导致许多具有修复作用酶

的蛋白质功能丧失,而且有些酶被 ROS 氧化后还可能影响表达基因的转录,激活凋亡途径;(3)调节细胞相关基因表达而诱导凋亡,如:p53、bcl-2、c-fos 等;(4)由 ROS 可直接引发细胞膜的脂质过氧化,降低生物膜的流动性,影响位于膜或膜周围的对细胞增殖、凋亡有重要调节作用的酶,主要包括蛋白激酶 C 和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATP 酶等<sup>[8]</sup>。抗肿瘤药物通过 ROS 介导细胞凋亡可能因种类不同而不同,作为第二信使的 ROS 其信号传导途径具有细胞种类和刺激因子特异性,不同的细胞生理调节过程所激发的与 ROS 相关的信号分子也不同。

当向培养基中加入血浆峰浓度 DDP 或 ADM 同时加入 SOD 共同孵育,HeLa 细胞凋亡明显减少,表明 SOD 迅速清除由 DDP、ADM 诱导产生的  $\text{O}_2^-$ ,使 HeLa 细胞不能产生更高浓度的 ROS 以诱导细胞凋亡。而在 DDP 或 ADM 处理 HeLa 细胞 24h 后再加入 SOD,细胞凋亡并不减少,表明 DDP 或 ADM 有可能已经刺激 HeLa 细胞产生介导细胞凋亡的信使,即在一定高浓度的 ROS 导致细胞凋亡的过程中存在一个 ROS 介导信使。24h 后再加入 SOD 虽然能促进 ROS 的清除,但却不能终止 ROS 介导信使的功能,最终能维持 HeLa 细胞的凋亡。这从另一个侧面证明了 DDP、ADM 诱导 HeLa 细胞凋亡与细胞内 ROS 水平增高有关,并将为抗氧化剂在临床肿瘤化疗中的应用提供有益的启示。就细胞形态学而言,加入 SOD 后细胞密度增加,分裂期细胞增多,凋亡细胞尤其晚期凋亡细胞减少;经 DDP、ADM 处理 HeLa 细胞 24h 加入 SOD 组 HE 的染色结果与未添加 SOD 的实验组一样,均出现了细胞密度降低,细胞凋亡等明显细胞形态变化,验证了 ROS 测定结果。低浓度外源性超氧或过氧化物能刺激体外培养细胞的增殖或对增殖的反应,而高浓度的超氧或过氧化物可导致多数类型细胞死亡,相反地,当用 SOD 或 CAT 去除培养细胞的超氧或过氧化物时,可抑制细胞增殖而促进细胞凋亡<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞由于其新陈代谢的旺盛,大多产生的 ROS 浓度较正常细胞高,使得极大部分肿瘤细胞 DNA 端粒酶的活性异常,并使肿瘤细胞永生。同时有些研究表明,在一些类型的肿瘤组织中抗氧化酶活性如 Mn-SOD 缺乏,而且肿瘤表现型丢失与 Mn-SOD 活性增高密切相关。另有实验结果表明,Mn-SOD 基因转染黑色素瘤细胞可大大减少其肿瘤恶性显性<sup>[1]</sup>。

本实验还通过免疫组织化学方法检测了不同作用条件下 HeLa 细胞突变型 p53 和 c-fos 蛋白表达水平,并通过图像分析仪半定量分析了各蛋白表达强度。结果表明,ROS 可调节 HeLa 细胞癌基因和抑

癌基因的表达。HeLa 细胞突变型 P53 蛋白表达呈阳性,这与 Powell 等研究结果相一致<sup>[7]</sup>。抗肿瘤药物 DDP、ADM 处理 HeLa 细胞可产生更高浓度 ROS 下调突变型 p53 基因和 c-fos 基因的表达,与化疗药物同时加入 SOD 的情况下 HeLa 细胞 p53 和 c-fos 蛋白的表达增高,而在化疗药物处理 24h 后加入 SOD 上述表达无明显变化,这与 HeLa 细胞体外凋亡变化规律一致。p53 基因是公认的肿瘤抑制基因,大约一半以上的肿瘤细胞中 p53 发生突变或丢失<sup>[9]</sup>,这有可能与肿瘤细胞的永生密切相关。p53 对细胞凋亡的调控是通过抑制细胞的生长来进行的,而高浓度 ROS 有可能影响细胞内 p53 基因氧化状态实现调节<sup>[10]</sup>。此外,MnSOD 基因已经被认为是一种新型的肿瘤抑制因子<sup>[11]</sup>,且 MnSOD 基因有可能是 P53 蛋白的作用靶位点<sup>[12]</sup>,肿瘤抑制因子 P53 蛋白对锰超氧化物歧化酶(MnSOD)有负调控作用。ROS 可引起正常细胞恶性转化过程中细胞的一些癌基因如 c-jun 和 C-fos 表达增高<sup>[13]</sup>,另外野生型 p53 可抑制 c-fos 基因的转录,因此认为 DDP、ADM 诱导 HeLa 细胞凋亡很重要的一方面是通过 ROS 调节 p53 和 c-fos 基因表达水平来实现的。

由上述的研究结果可以得出以下结论,在肿瘤化疗药物作用前加入 SOD,会减少 HeLa 细胞的凋亡,在肿瘤化疗药物作用 24h 后加入 SOD,对 HeLa 细胞的凋亡无影响,对 HeLa 细胞 p53、c-fos 基因产物表达也无影响。抗肿瘤药物 DDP、ADM 腹腔注射荷瘤小鼠后可明显诱导肿瘤细胞凋亡,用化疗药物一定时间后加注 SOD 基本上不影响荷瘤小鼠肿瘤细胞的凋亡。这些研究结果为肿瘤临床化疗应用外源抗氧化剂提供新的启示。

## 参考文献

- 1 Burdon R H. Free Radic Biol Med, 1995, **189**(4): 775-794
- 2 Ubezio P, Civoli F. Free Radical Biol Med, 1994, **16**(3): 509-516
- 3 Sinha B K, Mimnaugh E G, Rajagopalan S *et al.* Cancer Res, 1989, **49**(14): 3844-3848
- 4 Hunt C R, Sim J E, Sullivan S J *et al.* Cancer Res, 1998, **58**(14): 3986-3992
- 5 Morel F, Cohen Tanugi Cholley L, Brandolin G *et al.* Biochim Biophys Acta, 1993, **1182**(1): 101-109
- 6 Prise K M, Davies S, Stratford M R L. Int J Radiat Biol, 1992, **62**(3): 297-306
- 7 Powell S N, Defrank J S, Connell P *et al.* Cancer Res, 1995, **92**(5): 1643-1648
- 8 Huang K P. Biofactors, 1990, **2**(2): 171-178

- 9 Bruce N, Ames. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**: 5258-5265
- 10 Stem A, Monteiro H. Free Radic Biol Med, 1995, **3**(1): 1-9
- 11 Lam E W, Hammad H M, Zwacka R *et al.* J Dent Res, 2000, **79**(6): 1410-1417
- 12 Pani G, Bedogni B, Anzevino R *et al.* Cancer Res, 2000, **60**(14): 3927-3939
- 13 Wel H. Hypotheses, 1992, **38**(3): 267-270

## Studies on tumor cell apoptosis with SOD and its anti-oxidation effect

### I. The effect of SOD on apoptosis of tumor cell in DDP, ADM and VP16

LIU Yongbiao<sup>1,2</sup> LIU Ying<sup>2</sup> ZHAO Jie<sup>2</sup> HAO Xingzhi WANG Xu<sup>2</sup> YAO Side<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

<sup>2</sup> (The Xu Zhou Medical Univesit, Xuzhou 221002)

**ABSTRACT** By determination of ROS and apoptosis of Hela cells in mice at different hours after treatment with DDP, ADM or VP-16, the relations between apoptosis of Hela cell induced by chemotherapeutic Drug and concentration of ROS has been investigated. It has been found that there is no effect on apoptosis, and the P53 and c-fos expressions, of the Hela cells when SOD was applied 24 hours after the chemotherapy, whereas apoptosis of the Hela cells reduced when SOD was applied before the chemotherapy. Comparing with the control group, to which just ADM and DDP were given, ROS levels reduced markedly in bone marrow, liver and spleen of the tumor-bearing mice, which had been treated with SOD for five consecutive days 4 hours after the chemotherapy. It can be inferred that the oxidation damage of normal tissue can be avoided with scavenge of excessive ROS and increase of anti-oxidative enzymes by SOD in the chemotherapy. The results suggest that injecting SOD at suitable time in clinic chemotherapy may be useful for reducing the side effects.

**KEYWORDS** Superoxide dismutase, Chemotherapeutic medicine, Apoptosis of tumor cell, Hela cell

**CLC** R811.5