

Preventive effect and mechanisms of 3,3'-diindolylmethane on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in HaCaT cells

YIN Hua^{1,2}, LI Wenxue², LI Mengcheng³,
DENG Yuting¹, LI Jinhui^{1,2}, LI Juntao², WU Jinyin²,
YANG Guangyu², LIN Zhongning⁴, ZHU Wei^{2,*}

(1. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong; 2. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, Guangdong; 3. Southern Medical University, School of Public Health and Tropical Medicine, Guangzhou 510515, Guangdong; 4. College of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China)

3,3'-二吲哚甲烷对过氧化氢诱导人角质形成细胞氧化应激的预防作用及其机制

殷花^{1,2}, 李文学², 李梦承³, 邓宇婷¹,
李金慧^{1,2}, 李军涛², 吴锦银², 杨光宇²,
林忠宁⁴, 朱伟^{2,*}

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440; 3. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院, 广东 广州 510515; 4. 厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361102)

【摘要】目的: 探究3,3'-二吲哚甲烷(DIM)对过氧化氢(H₂O₂)诱导人角质形成细胞(HaCaT)氧化应激作用的预防效应及可能机制。**方法:** 体外培养HaCaT细胞,用H₂O₂建立氧化应激模型。采用CCK-8法检测不同浓度(1~20 μmol/L)DIM对HaCaT细胞生长的抑制作用;流式细胞术检测DIM作用前后细胞内活性氧自由基(ROS)含量的变化;Western blot检测不同浓度DIM(0、5、10 μmol/L)对HaCaT氧化应激相关蛋白核因子(NF-κB)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)磷酸化表达水平的影响。**结果:** 成功建立了HaCaT氧化应激模型。CCK-8法研究结果显示1~10 μmol/L DIM对HaCaT细胞无明显毒性作用($P>0.05$);流式细胞术检测结果表明10 μmol/L DIM预处理可有效预防由H₂O₂诱导的HaCaT内ROS产生($P<0.05$);Western blot检测结果显示,随着DIM浓度的增加,HaCaT中p38-MAPK、JNK和NF-κB磷酸化蛋白表达水平均逐渐降低($P<0.05$)。**结论:** DIM预处理可减弱HaCaT中由H₂O₂引起的氧化应激,其机制可能是通过抑制ROS的产生及对NF-κB、MAPK家族等氧化应激相关蛋白表达的调控作用来实现的,提示DIM可作为预防或改善氧化应激型皮肤细胞损伤的一种有效药物。

【关键词】 3,3'-二吲哚甲烷; HaCaT细胞; 过氧化氢; 氧化应激

中图分类号: R730.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-616X(2015)02-0081-06 doi:10.3969/j.issn.1004-616x.2015.02.001

【ABSTRACT】OBJECTIVE: To observe the effects of 3,3'-diindolylmethane (DIM) on oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in HaCaT cells. **METHODS:** HaCaT cells were treated with different concentrations of H₂O₂ to establish the models of oxidative stress. CCK-8 assay was performed to evaluate the inhibitive effects of DIM (1-20 μmol/L) on cells proliferation. The intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured with flow cytometry. Furthermore, the effects of DIM (0, 5 and 10 μmol/L) on H₂O₂-induced the phosphorylation level of nuclear factor κB (p-NF-κB), the expression of mitogen activated protein kinase (MAPKs) were detected with Western blot. **RESULTS:** The cell model of oxidative stress was successfully established. The results of CCK-8 assay showed that in the doses of 1-10 μmol/L, DIM did not have obvious influence on cell viability ($P>0.05$). Flow cytometry results indicated that pre-treatment with DIM (10 μmol/L) could inhibit the level of intracellular ROS ($P<0.05$). With increasing concentration of DIM, the levels of p-p38-MAPK, p-JNK and p-NF-κB were significantly depressed. **CONCLUSION:** DIM could protect HaCaT cells from H₂O₂-induced oxidative stress via suppressing production of ROS levels and down-regulating the expression of NF-κB and members of MAPKs. DIM might be used as an effective drug to treat or reduce oxidative stress-

收稿日期: 2014-12-10; 修订日期: 2015-01-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81101562); 广东省科技计划项目(2012B060300005); 广东省自然科学基金(S2012010009633)

作者信息: 殷花, E-mail: yinhua1989@126.com。*通信作者, 朱伟, Tel: 13710083695; E-mail: 13710083695@126.com

mediated injury in skin cells.

【KEY WORDS】 3, 3'-diindolylmethane; HaCaT cells; hydrogen peroxide; oxidative stress

皮肤作为人体最大的外露器官,具有一定的屏障防护功能。但在生产和生活环境中,日光紫外线、洗涤剂理化因素的暴露能够直接对皮肤产生毒性效应,导致多种皮肤疾病的发生,如:衰老,皮炎和皮肤肿瘤等。近来研究发现外源因素诱导的氧化应激在致皮肤毒性过程中起着关键作用^[1]。氧化应激是指细胞内氧化和抗氧化的平衡被打破,导致大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)的生成,一方面,自由基与多种生物大分子直接发生反应,导致生物大分子变性、脂质过氧化、生物膜损伤及加速体细胞衰老和增加癌症发生的风险^[2];另一方面自由基能够激活多条炎症信号通路,如核因子(nuclear factor κ B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPKs)等,引起皮肤的炎症反应和基质的降解。研究发现ROS是导致氧化应激最重要的因素之一^[3],而具有稳定、无电荷、可自由弥散等特点的过氧化氢(H_2O_2)是ROS的主要成分^[4]。在体外实验中, H_2O_2 通常作为诱导细胞出现氧化应激的阳性对照^[5]。因此本研究在人角质形成细胞(HaCaT)中采用 H_2O_2 来诱导氧化应激反应,建立人皮肤细胞的氧化应激模型。

吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol, I3C)是一种确定的肿瘤化学预防物质,可从十字花科蔬菜如萝卜、芹菜、花椰菜等中提取得到。3, 3'-二吲哚甲烷(3, 3'-diindolylmethane, DIM)是I3C在胃酸等酸性条件下发生低聚而得到的二聚物,其抗癌和抗氧化能力已在多个细胞模型中得到证实^[6-7]。然而在HaCaT细胞中,DIM是否能够抑制 H_2O_2 诱导的氧化应激作用尚未见报道。因此本研究采用 H_2O_2 作为氧化应激因素,探究DIM对 H_2O_2 致HaCaT氧化应激的拮抗作用,并初步探讨其作用机制,以期预防和治疗氧化应激引起的皮肤损伤提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

永生化的人角质形成细胞株HaCaT购自于中国典型培养物保藏中心,DMEM培养基、新生牛血清(BSA)、青霉素、链霉素和胰蛋白酶均为美国Gibco公司产品。DIM、 H_2O_2 、2', 7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCFH-DA)及二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,

DMSO)均购自美国Sigma公司。兔抗Phospho-NF- κ B(P65)、Phospho-p38-MAPK(Thr180/Tyr182)、p38-MAPK(Thr180/Tyr182)、Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)、SAPK/JNK(Thr183/Tyr185),鼠抗 β -actin单克隆抗体均购自美国Cell Signaling Technology (CST)公司。细胞培养瓶、培养皿和培养板均购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养

将HaCaT细胞接种在含有10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素、0.1 mg/mL链霉素的DMEM培养基中,于37 °C、湿度95%及CO₂体积分数为5%的条件下培养。细胞每2 d换一次培养基,待细胞铺满80%~90%瓶底时进行试验或传代。

1.3 细胞增殖抑制试验

为得到DIM对HaCaT的最大无作用剂量,我们采用CCK-8试剂盒(碧云天)测定细胞存活率。将细胞浓度调整为 5×10^4 /mL后接种于96孔板中,在DMEM完全培养基中培养24 h后,分别加入不同浓度的DIM(1 ~ 20 μ mol/L)处理24、48和72 h。检测 H_2O_2 的抑制作用时,换为无血清培养基,加入不同浓度的 H_2O_2 (50~500 μ mol/L)处理2 h后,换为完全培养基继续培养24 h。处理完成后,每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37 °C孵育1 h,用全自动酶联免疫检测仪(美国Thermo公司)于450 nm波长处测定吸光度值,并计算细胞存活率。

细胞存活率(%)=[处理组D(450)值-空白对照组D(450)值]/[对照组D(450)值-空白对照组D(450)值] \times 100%

1.4 流式细胞术检测细胞内ROS含量

将 1×10^5 /mL的HaCaT细胞接种于6孔板培养24 h后,处理组先用DIM(10 μ mol/L)处理24 h,然后对照组和处理组分别用50~200 μ mol/L的 H_2O_2 (无血清培养基)处理2 h。处理完毕后,每孔加入10 μ L DCFH-DA,37 °C温箱孵育30 min后用流式细胞仪检测细胞内ROS含量。

1.5 Western blot检测氧化应激相关蛋白NF- κ B、p38-MAPK、SAPK/JNK磷酸化水平的表达

收集细胞,用细胞裂解液裂解细胞后提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白含量,每孔总蛋白上样量为40 μ g。样品经过4%~12% NuPAGE预制胶(Invitrogen公司)分离后转移至经甲醇浸泡过的聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h后,一抗(兔抗Phospho-NF- κ B、Phospho-p38-

MAPK、p38-MAPK、Phospho-SAPK/JNK、SAPK/JNK均1:2 000稀释,鼠抗 β -actin 1:1 000稀释4℃孵育过夜。PBST缓冲液(0.05% Tween20的PBS缓冲液)洗涤10 min×3次,山羊抗兔二抗(1:1 000)和山羊抗小鼠二抗(1:1 000)室温孵育2 h, PBST洗涤5 min×3次。化学发光试剂显色,胶片显影、定影。Quantity One软件对Western blot结果进行灰度扫描,测定各条带相对吸光度,再进行比较和半定量分析。

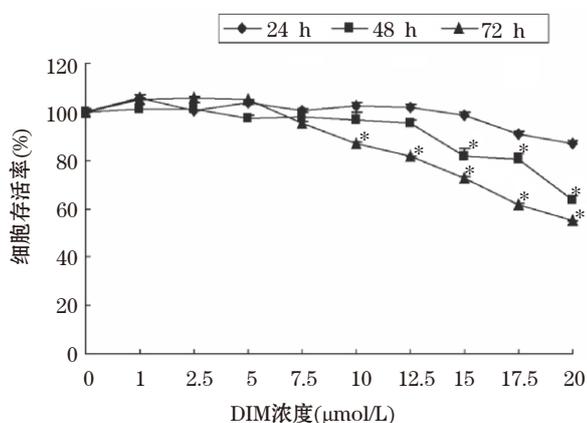
1.6 统计学分析

使用SPSS 13.0软件进行统计学处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组样本均数的比较用单因素方差分析(ANOVA),各试验组均数与对照组均数的比较用Dunnett-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$,对蛋白表达水平进行Pearson相关分析。

2 结果

2.1 DIM对HaCaT细胞增殖的抑制作用

与对照组比较,采用不同浓度的DIM(1~20 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞后,结果显示DIM浓度和细胞存活率之间存在剂量-效应趋势。处理时间在48 h之内,浓度小于10 $\mu\text{mol/L}$ 的DIM对HaCaT无明显毒性作用(24 h: $F=1.434, P>0.05$; 48 h: $F=2.948, P>0.05$),见图1。因此本研究选取5和10 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度进行后续实验。



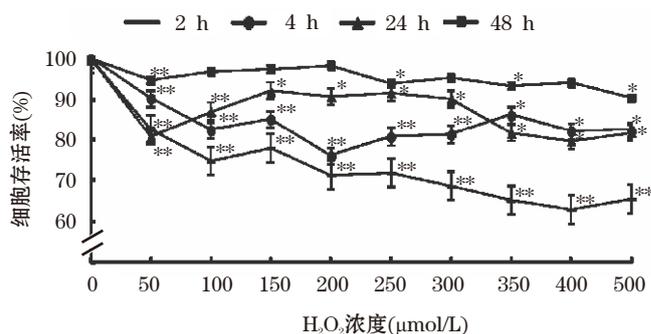
与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图1 1~20 $\mu\text{mol/L}$ DIM处理不同时间对HaCaT存活率的影响

2.2 H_2O_2 对HaCaT细胞增殖的抑制作用

如图2所示,与对照组(处理前)比较,50 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理2 h后对细胞有明显的抑制作用,细胞的存活率下降到82.25%,随着 H_2O_2 浓度的增加,对HaCaT生长抑制的作用明显增强,200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理2 h后细胞存活率为71.93%;且各不同浓度 H_2O_2 处理2 h后的差别具有统计学意义($F=104.836, P<0.05$)。因此,后续

实验 H_2O_2 处理时间为2 h,浓度范围为50~200 $\mu\text{mol/L}$ 作为染毒条件。

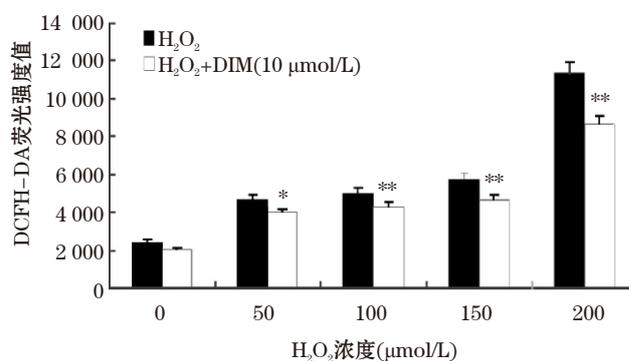


与对照组(处理前)相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

图2 50~500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对HaCaT存活率的影响

2.3 DIM抑制 H_2O_2 诱导ROS的生成

如图3所示,随着 H_2O_2 浓度增加,处理组细胞内ROS含量也逐步提高。 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$)处理HaCaT 2 h之后,细胞内ROS水平约为对照的3.1倍。而DIM(10 $\mu\text{mol/L}$)预处理24 h后,细胞内ROS水平与相应 H_2O_2 单独处理组相比均有较明显的下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此结果表明DIM可有效抑制HaCaT内由 H_2O_2 诱导产生的ROS。



与相应浓度的 H_2O_2 单独处理组相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

图3 DIM预处理对 H_2O_2 诱导ROS生成的影响

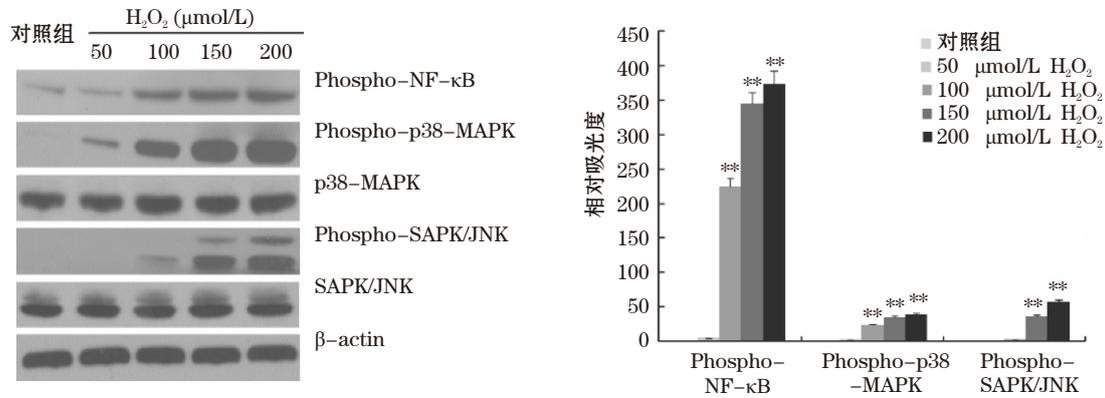
2.4 DIM抑制 H_2O_2 诱导的MAPK和NF- κB 信号通路的激活

50~200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理HaCaT细胞2 h后,检测磷酸化NF- κB 、磷酸化p38-MAPK、p38-MAPK、磷酸化SAPK/JNK、SAPK/JNK的表达水平。结果显示(见图4和图5),随着 H_2O_2 浓度的增加,磷酸化的NF- κB 、p38-MAPK、SAPK/JNK的灰度值比值呈现上升趋势(r 均 $>0.946, P$ 均 <0.01),表明 H_2O_2 可诱导磷酸化的NF- κB 、p38-MAPK、SAPK/JNK蛋白表达水平的升高。图5中,用5或10 $\mu\text{mol/L}$ 的DIM预处理24 h后,再用200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 进行染毒。结果显示随着DIM浓度的增加



及H₂O₂处理时间的延长(>30 min),各蛋白的条带相对吸光度比值呈下降趋势(*r*分别小于-0.742和-0.936,*P*均<0.05)。因此,DIM(5、10 μmol/L)能显著抑制由

H₂O₂诱导的NF-κB、p38-MAPK和SAPK/JNK磷酸化蛋白的表达,且H₂O₂处理时间越长,抑制效果越明显(见表1和表2)。



与对照组(未用H₂O₂处理)比较, ***P*<0.01。

图4 H₂O₂对NF-κB、p38-MAPK、SAPK/JNK及其磷酸化蛋白表达水平的影响

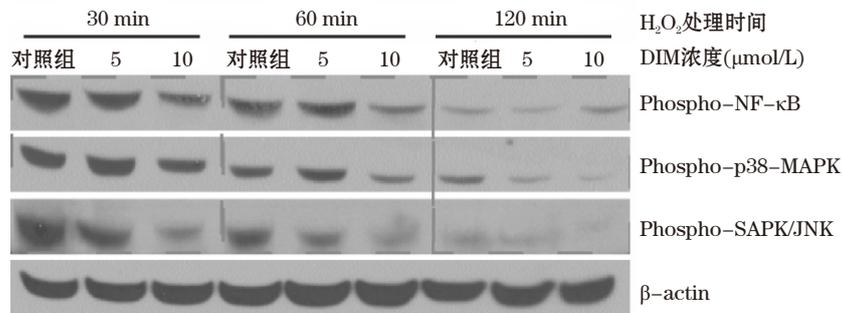


图5 DIM对H₂O₂诱导NF-κB、p38-MAPK、SAPK/JNK磷酸化激活的抑制作用

表1 不同浓度DIM对200 μmol/L H₂O₂诱导NF-κB、p38-MAPK、SAPK/JNK磷酸化激活的抑制作用

DIM剂量	NF-κB蛋白(H ₂ O ₂ 处理)			p38-MAPK蛋白(H ₂ O ₂ 处理)			SAPK/JNK蛋白(H ₂ O ₂ 处理)		
	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5 μmol/L	0.71±0.02	0.91±0.02	0.51±0.03	1.04±0.09	1.30±0.04	0.33±0.06	0.69±0.06	0.60±0.04	0.51±0.02
10 μmol/L	0.48±0.04	0.50±0.03	1.08±0.09	0.76±0.03	0.53±0.02	0.07±0.01	0.26±0.02	0.53±0.02	0.26±0.03
<i>r</i> 值	-0.966	-0.981	-0.088	-0.832	-0.742	-0.907	-0.99	-0.838	-0.93
<i>P</i> 值	0	0	0.821	0.005	0.022	0.001	0	0	0

表2 200 μmol/L H₂O₂处理不同时间对NF-κB、p38-MAPK、SAPK/JNK磷酸化表达水平的影响

H ₂ O ₂ 作用时间	NF-κB蛋白			p38-MAPK蛋白			SAPK/JNK蛋白		
	对照组	5 μmol/L DIM	10 μmol/L DIM	对照组	5 μmol/L DIM	10 μmol/L DIM	对照组	5 μmol/L DIM	10 μmol/L DIM
30 min	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
60 min	0.70±0.02	0.84±0.03	0.60±0.02	0.57±0.01	0.67±0.02	0.38±0.02	0.69±0.06	0.46±0.03	0.45±0.02
120 min	0.12±0.02	0.11±0.03	0.23±0.02	0.33±0.01	0.10±0.02	0.04±0.00	0.26±0.02	0.21±0.02	0.15±0.02
<i>r</i> 值	-0.982	-0.936	-0.999	-0.986	-0.988	-0.986	-0.978	-0.985	-0.968
<i>P</i> 值	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3 讨论

大量研究已经证实,细胞损伤是由ROS引起的氧化应激造成的^[8]。ROS可破坏细胞核DNA和线粒体

DNA,同时ROS在HaCaT细胞可激活金属基质蛋白酶,对细胞外基质进行破坏,使真皮胶原和弹性蛋白降解,从而造成皮肤损伤^[9]。

H₂O₂是一种体内广泛存在的ROS,越来越多的证据表明H₂O₂是导致氧化应激恶性放大的重要因素之一^[10]。本研究用H₂O₂成功建立了HaCaT氧化应激模型,在HaCaT细胞中,外源性H₂O₂能显著提高细胞内ROS含量,并使氧化应激蛋白NF-κB、p38-MAPK、SAPK/JNK的磷酸化水平升高。

众所周知,很多植物化学物都具有抗氧化功能。十字花科植物活性成分I3C已被证实是ROS有效的清除剂^[11],DIM作为I3C在胃酸等酸性条件下重要的衍生物,是I3C发挥抗氧化作用的主要生物活性成分。本研究发现低剂量(5、10 μmol/L)DIM对HaCaT的增殖无抑制作用,并能有效减少由H₂O₂诱导产生的ROS。DIM可通过多种机制抑制ROS生成^[12-13]。现在已知的DIM抗氧化机制有:通过抑制ROS的累积抑制NF-κB信号通路的激活^[14-15];通过乳腺癌因子1(breast cancer 1, BRCA1)依赖的抗氧化信号通路抑制氧化应激^[16]。丝裂原蛋白活化激酶家族(MAPKs)包括MAPK、ERK和JNK^[17],是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,此家族成员能将细胞外刺激信号转导至胞内从而在众多细胞生物学反应过程中具有至关重要的作用。其中p38 MAPK作为MAPK家族的重要成员,不仅参与了细胞的生长发育过程,还可调控细胞增殖,被认为是众多信号转导通路的中转站^[18]。目前已有很多研究表明MAPK信号通路和氧化应激有关,并且发生氧化应激时,MAPKs中某些蛋白的磷酸化水平也会提高。但关于DIM是否能通过抑制MAPK信号通路起抗氧化作用的机制尚未见报道。

NF-κB信号通路与细胞氧化应激密切相关。NF-κB是一种诱导转化因子,其对氧化产生的ROS非常敏感,ROS可直接激活某些细胞的NF-κB^[9],激活的NF-κB可以使细胞表达一氧化氮合酶(NOS)、各种黏附分子、其他细胞因子等。这些成分互相促进,共同加重了氧化应激的损害作用。目前已知DIM可通过抑制ROS的累积来抑制NF-κB信号通路的激活,从而起到抗氧化的作用。同样的,MAPK信号通路也与氧化应激密切相关,且DIM是否能通过抑制MAPK信号通路来抑制氧化应激尚不可知。本研究在建立的HaCaT氧化应激模型的基础上发现随DIM(0~10 μmol/L)浓度的增加,由H₂O₂激活的氧化应激相关蛋白的表达水平也明显下降,且这种抑制作用会随着H₂O₂作用时间的增加而逐渐明显。结合本研究的结果,可得到如下提示:在HaCaT中,DIM可通过抑制ROS产生及NF-κB、MAPKs信号通路激活来发挥抗氧化应激的作用,进而减少细胞损伤。

综上所述,我们推测DIM在抑制皮肤细胞氧化应激中可发挥一定的作用,提示DIM可作为治疗或延缓氧化应激型皮肤损伤的一种有效药物。

参考文献

- [1] Abida O, Gargouri B, Ben Mansour R, et al. Biomarkers of oxidative stress in epidermis of Tunisian pemphigus foliaceus patients[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2013, 27(3): 271-275.
- [2] Verma AK, Prasad SB. Changes in glutathione, oxidative stress and mitochondrial membrane potential in apoptosis involving the anticancer activity of cantharidin isolated from redheaded blister beetles, *epicauta hirticornis*[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(7): 1096-1114.
- [3] Ines D, Sonia B, Fatma BA, et al. Date seed oil inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human epidermal keratinocytes[J]. *Int J Dermatol*, 2010, 49(3): 262-268.
- [4] Liu L, Xie H, Chen X, et al. Differential response of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2012, 37(7): 772-780.
- [5] Shim JH, Kim KH, Cho YS, et al. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene [J]. *Amino Acids*, 2008, 34(1): 135-141.
- [6] Banerjee S, Kong D, Wang Z, et al. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3, 3'-diindolylmethane(DIM): from bench to clinic[J]. *Mutat Res*, 2011, 728(1/2): 47-66.
- [7] Beaver LM, Yu TW, Sokolowski EI, et al. 3, 3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 263(3): 345-351.
- [8] Luo H, Wang L, Schulte BA, et al. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(6): 1999-2006.
- [9] Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, et al. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin[J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(6): 1480-1487.
- [10] Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, et al. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(11): 1872-1891.
- [11] Shimamoto K, Hayashi H, Taniai E, et al. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine(NAC) supplementation reduces reactive oxygen species (ROS)-mediated hepatocellular tumor promotion of indole-3-carbinol (I3C) in rats[J]. *J Toxicol Sci*, 2011, 36(6): 775-786.
- [12] Benabadi SH, Wen R, Zheng JB, et al. Anticarcinogenic and

(下转第90页)



发生^[4-5]。S期是从DNA合成开始到DNA合成结束的全过程,使DNA的含量由2C增加到4C。这一时期的主要特点是DNA进行复制,组蛋白、非组蛋白等染色质组成蛋白的合成。通过DNA复制,精确地将遗传信息传递给M期分裂的子细胞,保证遗传性状的稳定性。S期是整个细胞周期的最关键时期^[6]。BaP染毒细胞引起的S期阻滞提示BaP染毒细胞造成的DNA损伤诱导细胞进行修复,细胞周期发生阻滞。细胞周期阻滞在S期可能有3种后果:细胞完成修复,细胞周期恢复正常,继续进行增殖;细胞无法完成修复,而细胞周期恢复正常,将损伤继续向下传,导致有害损伤累积,增加了机体癌变的可能;细胞无法完成修复,或损伤过大,细胞直接死亡^[7]。此结果提示在恢复早期S期的阻滞可能与DNA损伤的修复有密切联系。

本实验室前期采用碱性单细胞凝胶电泳实验检测了BaP致DNA损伤的时间和剂量效应^[8],碱性单细胞凝胶电泳实验可以灵敏地在单个细胞中评价由遗传毒物所致的DNA损伤,该实验虽然有很强的灵敏度,但是不能反映细胞内BPDE-DNA加合物的形成情况。本次研究中采用了ELISA和荧光免疫组化的方法,从定量和定性两个角度检测了细胞内BPDE-DNA加合物的表达情况,结果提示随着染毒浓度增加和染毒时间延长,16HBE细胞内BPDE-DNA加合物含量逐渐增加,结合本次细胞周期检测结果可以发现,S期阻滞并不总是随着染毒浓度增大和时间延长而增加,提示细胞无法完成修复,将损伤继续向下传,导致有害损伤累积,增加了机体癌变的可能。在染毒后恢复时间内,BPDE-DNA加合物水平逐渐降低,恢复期S期细胞经过短暂上升后逐渐下降,恢复24 h达到正常细胞水平,

提示细胞完成修复,细胞周期恢复正常。

参考文献

- [1] Kerley-Hamilton JS, Trask HW, Ridley CJ, et al. Inherent and benzo[a]pyrene-induced differential aryl hydrocarbon receptor signaling greatly affects life span, atherosclerosis, cardiac gene expression, and body and heart growth in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2012, 126(2): 391-404.
- [2] Zhu L, Lu H, Chen S, et al. Pollution level, phase distribution and source analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in residential air in Hangzhou, China[J]. *J Hazard Mater*, 2009, 162(2/3): 1165-1170.
- [3] Ragin AD, Crawford KE, Etheredge AA, et al. A gas chromatography-isotope dilution high-resolution mass spectrometry method for quantification of isomeric benzo[a]pyrene diol epoxide hemoglobin adducts in humans[J]. *J Anal Toxicol*, 2008, 32(9): 728-736.
- [4] Hamouchene H, Arlt VM, Giddings I, et al. Influence of cell cycle on responses of MCF-7 cells to benzo[a]pyrene[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 333-348.
- [5] Sertic S, Pizzi S, Lazzaro F, et al. NER and DDR: classical music with new instruments[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(4): 668-674.
- [6] Bailis JM, Forsburg SL. It's all in the timing: linking S phase to chromatin structure and chromosome dynamics[J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(4): 303-306.
- [7] Cliby WA, Lewis KA, Lilly KK, et al. S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2): 1599-1606.
- [8] Yang J, Wang Z, Chen W, et al. Role of ubiquitin protein ligase Ring2 in DNA damage of human bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2013, 27(7): 357-363.
- [9] antioxidant activity of diindolylmethane derivatives[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(5): 666-671.
- [13] Nho CW, Jeffery E. Crambene, a bioactive nitrile derived from glucosinolate hydrolysis, acts via the antioxidant response element to upregulate quinone reductase alone or synergistically with indole-3-carbinol[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 198(1): 40-48.
- [14] Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1): 13-23.
- [15] Dudek EJ, Shang F, Taylor A. H₂O₂-mediated oxidative stress activates NF-kappa B in lens epithelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(5): 651-658.
- [16] Yao Z, Hu W, Yin S, et al. 3, 3'-Diindolylmethane ameliorates adriamycin-induced cardiac fibrosis via activation of a BRCA1-dependent anti-oxidant pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2013, 70(1): 139-146.
- [17] Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma[J]. *Curr Opin Oncol*, 2008, 20(2): 183-189.
- [18] Sakai N, Wada T, Furuichi K, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45(1): 54-65.
- [19] Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1072(1): 63-80.

(上接第85页)