

[35]杨冬梅,金月婷等. 12种常见蔬菜抗氧化活性的比较研究[J]. 中国食品学报,2007,7(5):24-29.

[36]陆广念,宋晓敏等. 扬州常见蔬菜的抗氧化活性[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2009,30(5):35-38.

氧化应激对 Met 负载后大鼠肝细胞 Hcy 代谢的影响

高蔚娜 吴健全 韦京豫 蒲玲玲 杨继军 孟斌 郭长江

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所,天津 300050)

摘要:目的 研究氧化应激对 Met 负载后大鼠肝细胞 Hcy 及相关氨基酸代谢的影响。方法 体外培养 BRL 大鼠肝细胞,选用 100 μ mol/L H₂O₂ 诱导氧化应激,选用 50 mmol/L Met 诱导蛋氨酸负载。将大鼠肝细胞分为对照组、氧化应激组(100 μ mol/L H₂O₂ 作用 2h)、Met 负载组(50 mmol/L Met 作用 1h)、氧化应激 + Met 负载组(100 μ mol/L H₂O₂ 作用 2h + 50 mmol/L Met 作用 1h),实验结束收集各组培养液上清。采用高效液相法测定 Hcy、Cys 和 GSH 的含量,采用全自动氨基酸分析仪测定相关氨基酸的含量。结果 与对照组比较, Met 负载组 Hcy、Cys、GSH 的含量显著增加($P < 0.05$),氧化应激 + Met 负载组 Hcy、Cys 的含量显著增加($P < 0.05$)。与氧化应激组比较, Met 负载组和氧化应激 + Met 组的 Hcy、Cys、GSH 含量均显著增加($P < 0.05$)。与对照组比较, Ser、Tau、Glu 和 Gly 的含量在氧化应激组、Met 负载组和氧化应激 + Met 组均显著减少($P < 0.05$)。氧化应激组的 Ser 和 Gly 含量显著低于 Met 负载组($P < 0.05$),而 Tau 含量显著高于 Met 负载组($P < 0.05$);氧化应激组的 Tau 含量显著高于氧化应激 + Met 负载组($P < 0.05$),而 Gly 含量显著低于氧化应激 + Met 负载组($P < 0.05$)。Met 负载组的 Ser、Glu、Gly 显著高于氧化应激 + Met 负载组($P < 0.05$),而 Tau 显著低于氧化应激 + Met 负载组($P < 0.05$)。结论 氧化应激对 Met 负载后大鼠肝细胞的 Hcy 代谢可能具有一定的促进作用。

关键词:蛋氨酸负载;同型半胱氨酸;氧化应激

Effects of oxidative stress on Hcy metabolism in Met loading rat hepatocytes

Abstract: Objective To investigate effects of oxidative stress on Hcy and related amino acids metabolism. **Methods** 100 μ mol/L H₂O₂ was selected to induce oxidative stress, and 50 mmol/L Met was selected to induce Met loading. Cultured BRL rat hepatocytes was divided into control, oxidatively stressed, Met loading, and oxidatively stressed + Met loading groups. At the end of the experiment, culture fluid was collected. Hcy, Cys and GSH were measured by HPLC, amino acids were assayed by Amino Acids Analyzer. **Results** Compared to control, the contents of Hcy, Cys and GSH significantly increased in Met loading group ($P < 0.05$), and the contents of Hcy and Cys also increased in oxidatively stressed + Met loading group ($P < 0.05$). Compared to oxidatively stressed group, the concentrations of Hcy, Cys and GSH distinctively increased in Met loading and oxidatively stressed + Met loading groups ($P < 0.05$). The contents of Ser, Tau, Glu and Gly decreased in oxidatively stressed, Met loading and oxidatively stressed + Met loading groups ($P < 0.05$) compared to control. The concentrations of Ser and Gly in oxidatively stressed group were significantly lower, while Tau was higher than in Met loading group ($P < 0.05$). The content of Tau in oxidatively stressed group was higher while Gly was lower than in oxidatively stressed + Met loading group ($P < 0.05$). The concentrations of Ser, Glu, and Gly in Met loading group were higher, while Tau was lower than in oxida-

tively stressed + Met loading group ($P < 0.05$). **Conclusion** Oxidative stress might promote Hcy production in Met loading rat hepatocytes.

Keywords: Met loading; homocysteine; oxidative stress

血浆总同型半胱氨酸 (total homocysteine, tHcy) 水平升高, 即高同型半胱氨酸血症是心脑血管疾病的独立危险因素, 与肝硬化、痴呆等疾病^[1-5] 也密切相关, 因此研究高同型半胱氨酸血症发生及其影响因素意义重大。

蛋氨酸负载试验 (methionine loading test, MLT) 的基本原理是给予蛋氨酸 (Methionine, Met) 后, 血浆 Hcy 水平升高, 根据 Hcy 升高的程度来评价 Hcy 代谢能力, 评估哪些人易患高同型半胱氨酸血症, 预测高同型半胱氨酸血症患者的预后^[6,7]。蛋氨酸负载试验也可用于动物^[8]。在培养细胞上进行 Met 负载的研究较少, 但有不同培养细胞对 Met、Hcy 代谢影响的实验可供参考^[9-11]。

研究发现, 氧化应激常见于心血管疾病、阻塞性睡眠障碍等疾病^[12,13] 中, 而且氧化应激可能使机体 Hcy 生成增加^[13]。但迄今尚未见到体外氧化应激对 Met 负载肝细胞 Hcy 生成影响的报道。本实验利用 H_2O_2 诱导体外培养的大鼠肝细胞发生氧化应激, 探讨对 Met 负载后大鼠肝细胞 Hcy 及相关代谢物生成的影响, 以期为高同型半胱氨酸血症的联合干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

蛋氨酸 (methionine, Met)、DL-同型半胱氨酸 (DL-Hcy)、4-氯-7-磺基苯并咪唑 (4-choloro-7-sulfobenzo-furazan ammonium salt, SBD-F)、谷胱甘肽 (GSH) (美国 Sigma 公司), 半胱氨酸 (L-Cysteine, Cys) (BDH 公司), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), DMEM 培养基 (Gibco 公司), 茚三酮 (日本和光纯药工业株式会社), 氨基酸标准 (日本 Ajinomoto-Takara 公司), 2,4,6-三(2-吡啶)-s-三嗪 (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ, Sigma 公司)。过氧化氢酶 (catalase, CAT) 测定试剂盒 (碧云天生物技术研究所), 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为国产优级纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 BRL 细胞培养

BRL 细胞株为小鼠正常肝细胞株 (来自 Buffalo Rat Liver), 购自中国科学院上海生命科学研究院。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 接种密度

为 $5 \times 10^5 / \text{ml}$, 于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养用于后续实验。

1.2.2 H_2O_2 对 Hcy 及氧化-抗氧化指标的影响

采用 MTT 法观察大鼠细胞存活率的变化。所选择的 H_2O_2 浓度分别为 6.25、12.5、25、50 和 $100 \mu\text{mol/L}$, 作用时间分别为 1、2、3h。

用 0、50、 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用于 BRL 细胞, 时间为 2h, 实验结束收集培养液和细胞, 测定细胞匀浆 CAT 活性、总抗氧化力 (FRAP 法), 高效液相法检测培养液和细胞匀浆中 Hcy 含量^[14-16]。

1.2.3 Met 负载的建立

采用 MTT 法观察 Met 对大鼠肝细胞存活率的影响。所选择的 Met 浓度分别为 10、20、50、100、200 mmol/L , 作用时间分别为 1、2、3、4h。

分别以 0、20、50 mmol/L Met 作为负载浓度, 测定培养液及细胞匀浆中 Hcy 的含量。

1.2.4 Hcy、Cys、GSH 水平及代谢相关氨基酸的测定

BRL 细胞随机分为对照组、氧化应激组 ($100 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 2h)、Met 组 (50 mmol/L Met 作用 1h 组)、 H_2O_2 + Met 组 ($100 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 2h + 50 mmol/L Met 作用 1h 组), 实验结束收集各组培养液上清。

采用高效液相法^[14-16] 测定培养液及细胞悬液中 Hcy、谷胱甘肽 (GSH) 和半胱氨酸 (cysteine, Cys) 的含量, 采用全自动氨基酸分析仪测定培养液中谷氨酸 (glutamate, Glu)、甘氨酸 (glycine, Gly)、丝氨酸 (serine, Ser) 和牛磺酸 (taurine, Tau) 的含量。

1.2.5 统计学处理: 数据以均数 \pm 标准差表示。利用统计软件 SPSS 11.5 对各组数据进行方差分析检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 H_2O_2 对细胞存活率、氧化-抗氧化指标的影响

H_2O_2 浓度 $\leq 100 \mu\text{mol/L}$, 作用时间为 1、2、3h, BRL 细胞的存活率均在 97.7% 以上 (图 1)。100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组 CAT 活性较对照组显著降低 ($P < 0.05$); 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组 FRAP 值较对照组显著增加 ($P < 0.05$) (表 1)。

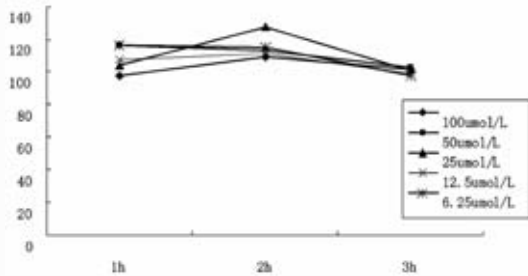


图1 H₂O₂ 对大鼠肝细胞存活率的影响 (n=6)

表1 H₂O₂ 对细胞匀浆 CAT 活性和总抗氧化力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

	CAT(U/g)	FRAP 值(μmol/g)
对照组	4893.92 ± 252.14	45.19 ± 3.48
50μmol/L	4197.29 ± 161.74	53.41 ± 2.00*
100μmol/L	3527.82 ± 752.65*	49.26 ± 2.32

* 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 H₂O₂ 对细胞 Hcy 生成的影响

H₂O₂ 组培养液中 Hcy 含量与对照组无差别, 而细胞匀浆中 Hcy 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$) (表2)。

表2 H₂O₂ 对大鼠肝细胞 Hcy 生成的影响 (μmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=3)

	培养液	细胞匀浆
对照组	2.00 ± 0.09	2.61 ± 0.56
50μmol/L	2.02 ± 0.11	3.93 ± 0.17*
100μmol/L	1.99 ± 0.25	3.97 ± 0.11*

* 与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 Met 负载对肝细胞存活率及 Hcy 生成的影响

Met 浓度 ≤ 100mmol/L, BRL 细胞的存活率均在 91.8% 以上 (图2)。Met 组培养液中 Hcy 含量较对照组显著增加 ($P < 0.05$), 50mmol/L 组细胞匀浆中的 Hcy 含量较对照组显著增加 (表3)。

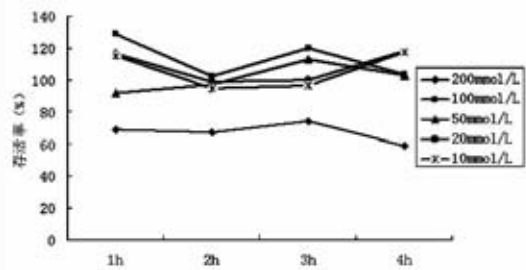


图2 不同浓度 Met 对大鼠肝细胞存活率的影响 (n=3)

表3 Met 负载对 Hcy 生成的影响 (μmol/L, $\bar{x} \pm s$, n=3)

	培养液	细胞匀浆
对照组	1.43 ± 0.09	0.47 ± 0.19
20mmol/L	2.39 ± 0.22*	0.62 ± 0.06
50mmol/L	5.96 ± 0.75*#	0.70 ± 0.10*

* 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与 20mmol/L 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 H₂O₂ 对 Met 负载肝细胞 Hcy、Cys、GSH 及相关氨基酸代谢的影响

与对照组比较, Met 组 Hcy、Cys、GSH 的含量显著增加 ($P < 0.05$), H₂O₂ + Met 组 Hcy、Cys 的含量显著增加 ($P < 0.05$)。与 H₂O₂ 组比较, Met 组和 H₂O₂ + Met 组的 Hcy、Cys、GSH 含量均显著增加 ($P < 0.05$)。H₂O₂ + Met 组 Hcy 含量较 Met 组稍有增加, 但无统计学差异 (表4)。

与对照组比较, Ser、Tau、Glu 和 Gly 的含量在 H₂O₂ 组、Met 组和 H₂O₂ + Met 组均显著减少 ($P < 0.05$)。H₂O₂ 组的 Ser 和 Gly 含量显著低于 Met 组 ($P < 0.05$), 而 Tau 含量显著高于 Met 组 ($P < 0.05$); H₂O₂ 组的 Tau 含量显著高于 H₂O₂ + Met 组 ($P < 0.05$), 而 Gly 含量显著低于 H₂O₂ + Met 组 ($P < 0.05$)。Met 组的 Ser、Glu、Gly 显著高于 H₂O₂ + Met 组 ($P < 0.05$), 而 Tau 显著低于 H₂O₂ + Met 组 ($P < 0.05$) (表5)。

表4 H₂O₂ 对 Met 负载大鼠肝细胞培养液 Hcy、Cys、GSH 水平的影响 (μmol/L, n=3)

组别	Hcy	Cys	GSH
对照组	1.54 ± 0.05	99.11 ± 2.47	1.21 ± 0.11
H ₂ O ₂ 组	1.67 ± 0.13	82.64 ± 15.88	1.00 ± 0.11
Met 组	3.76 ± 0.22*#	199.80 ± 8.75*#	1.47 ± 0.14*#
H ₂ O ₂ + Met 组	3.84 ± 0.34*#	200.66 ± 8.60*#	1.40 ± 0.30#

* 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.05$

表5 H₂O₂ 对 Met 负载肝细胞代谢相关氨基酸水平的影响 (mg/L, n=3)

组别	Ser	Tau	Glu	Gly
对照组	24.00 ± 2.54	6.17 ± 0.15	43.10 ± 0.52	24.66 ± 10.87
H ₂ O ₂ 组	12.41 ± 1.51 *	7.99 ± 0.16 *	33.31 ± 0.17 *	6.23 ± 0.18 *
Met 组	16.98 ± 0.39 [#]	3.77 ± 0.16 [#]	35.44 ± 0.82 *	15.86 ± 0.76 [#]
H ₂ O ₂ + Met 组	12.59 ± 0.66 ^{*▲}	4.37 ± 0.12 ^{*#▲}	30.87 ± 0.60 ^{*▲}	7.40 ± 0.15 ^{*#▲}

* 与对照组比较, $P < 0.05$; [#] 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.05$; [▲] 与 Met 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

机体内的 Hcy 来源于饮食摄取的蛋氨酸, 正常人体含量很少, 它主要是由蛋氨酸在肝脏、肌肉及其他一些组织中脱甲基生成。Met 在细胞内有两条代谢途径: 转甲基途径和转硫化途径。在转甲基途径中, Met 首先在转甲基酶的作用下, 与 ATP 反应生成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM), 脱去甲基后生成 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosyl-homocysteine, SAH), SAH 在 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶 (S-adenosylhomocysteine hydrolase) 的作用下可裂解生成 Hcy^[17-19]。细胞内生成的 Hcy 有三种代谢途径: (1) 转硫化途径: Hcy 在胱硫醚 β-合成酶 (cystathionine β-synthetase, CBS) 的作用下与 Ser 缩合为胱硫醚, 胱硫醚在 γ-胱硫醚酶的作用下裂解生成 Cys, Cys 可进一步代谢生成 Tau。Cys 还可与 Glu、Gly 结合生成 GSH。(2) 再甲基化途径: 重新甲基化为 Met, 由蛋氨酸合成酶催化, 同时需要维生素 B₁₂、叶酸、N⁵, N¹⁰-亚甲基四氢叶酸还原酶的参与。肝脏中还存在着另外一条再甲基化途径, 该途径以甜菜碱为甲基供体, 在甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶 (betaine homocysteine S-methyltransferase, BHMT) 催化下合成 Met 和二甲基甘氨酸。肝脏中的 CBS 和 BHMT 的水平远高于其他组织和器官^[20]。(3) 直接释放到细胞外液。

100 μmol/LH₂O₂ 可引起 CAT 活性显著降低, 而总抗氧化力无显著变化, 说明该浓度的 H₂O₂ 在 BRL 细胞上可诱发处于代偿期的氧化应激。氧化应激后, Tau 的生成量, Ser、Glu 和 Gly 的消耗量显著增加。Cys 可以通过半胱亚磺酸途径代谢生成 Tau^[21], 本研究中 Tau 生成显著增加, 提示氧化应激可以活化该途径。细胞外 Cys 的含量稍有减少, 原因可能是氧化应激可活化 CBS, 经转硫化途径代谢的 Cys 增多^[22], 同时引起 Ser 消耗增加。由于 Glu 和 Gly 是 GSH 合成的原料, 所以这两种物质消耗增多可能与氧化应激情况下 GSH 的合成有关, 不过这需要进一步的实验加以证实。

Met 负载情况下, Hcy、Cys 生成增多, Ser 消耗增加。细胞外 Met 浓度增加使大鼠肝细胞的转甲基作用大大增强, Hcy 生成显著增加。同时, 在高浓度 Met 情况下, 肝脏或肝细胞中的转硫化途径活化, Met 主要通过该途径代谢^[23-26]。Tau 的含量不及对照组可能是因为 Met 负载情况下, 通过半胱亚磺酸途径代谢的 Cys 减少所致。GSH 的合成受其底物 Cys 含量的调节, 而在肝脏, 用于合成 GSH 的 Cys 中, 50% 都是 Hcy 通过转硫化途径合成而来的^[27-28]。本研究发现, Met 负载情况下, GSH 生成量增加, 同时合成 GSH 所需的氨基酸 Glu、Gly 均减少, 提示 GSH 合成途径的活化。

H₂O₂ + Met 组 Hcy 含量比 Met 组稍有增加, 但无统计学差异。该结果提示氧化应激后进行 Met 负载可能对细胞的 Hcy 生成有一定促进作用。因此对于那些存在氧化应激的疾病, 如糖尿病, 阿尔兹海默症^[29-31]等, 高蛋白饮食可能会增加患者机体 Hcy 的生成而加重病情, 因此要减少 Met 含量丰富的食物, 如肉类的摄入量。H₂O₂ + Met 组 Cys、GSH 的含量与 Met 组无差别, 主要体现的是 Met 的作用; 其他物质含量变化主要体现的是 H₂O₂ 和 Met 的联合作用效果。

综上所述, 高浓度的 Met 使大鼠肝细胞的转甲基作用大大增强, 引起 Hcy 生成显著增加; H₂O₂ 对 Met 负载肝细胞的 Hcy 生成可能有一定的促进作用; H₂O₂ 和 Met 都有可能激活细胞的转硫化途径, 影响 GSH 的合成途径、Cys 到 Tau 的转化, 引起相关代谢物发生相应的变化。

参考文献

- [1] Makris M. Hyperhomocysteinemia and thrombosis [J]. Clin Lab Haematol, 2000; 22 (3): 133 - 143.
- [2] Cao Y, Chai JG, Chen YC, Zhao J, Zhou J, Shao JP, Ma C, Liu XD, Liu XQ. Beneficial effects of danshensu, an active component of Salvia milt-

iorrhiza, on homocysteine metabolism via the trans-sulfuration pathway in rats. *Br J Pharmacol*, 2009, 157 (3): 482 - 490.

[3] Finch JM, Joseph J. Homocysteine, cardiovascular inflammation, and myocardial remodeling. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010, 10 (4): 241 - 245.

[4] Liu WH, Zhao YS, Gao SY, Li SD, Cao J, Zhang KQ, Zou CG. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Am J Pathol*, 2010, 177 (5): 2357 - 2365.

[5] Hirashima Y, Seshimo S, Fujiki Y, Okabe M, Nishiyama K, Matsumoto M, Kanouchi H, Oka T. Homocysteine and copper induce cellular apoptosis via caspase activation and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neuronal cell line SH-SY5Y. *Neurosci Res*, 2010, 67 (4): 300 - 306.

[6] Cheng CH, Huang YC, Chen FP, Chou MC, Tsai TP. B-vitamins, homocysteine and gene polymorphism in adults with fasting or post-methionine loading hyperhomocysteinemia. *Eur J Nutr*, 2008, 47 (8): 491 - 498.

[7] Pettigrew LC, Bang H, Chambless LE, Howard VJ, Toole JF. Vitamin Intervention for Stroke Prevention Investigators. Assessment of pre- and post-methionine load homocysteine for prediction of recurrent stroke and coronary artery disease in the Vitamin Intervention for Stroke Prevention Trial. *Atherosclerosis*, 2008, 200 (2): 345 - 349.

[8] Chen Y, Cao Y, Zhou J, Liu X. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of bidirectional effect of danshensu on plasma homocysteine in rats. *Pharm Res*, 2009, 26 (8): 1863 - 1873.

[9] Schreiner CL, Jones EE. Metabolism of methionine and methionine hydroxy analogue by porcine kidney fibroblasts. *J Nutr*, 1987, 117 (9): 1541 - 1549.

[10] Joseph J. Dever, Adnan A Elfarrar. L-Methionine toxicity in freshly-isolated mouse hepatocytes is gender-dependent and mediated in part by transamination. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 326 (3): 809 - 817.

[11] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Metabolism of homocysteine, its relation to the other cellu-

lar thiols and its mechanism of cell damage in a cell culture line (human histiocytic cell line U - 937). *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1269 (1): 6 - 12.

[12] Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, De Franceschi M, Bellardinelli R, Guazzi MD. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem*, 2001, 47 (5): 887 - 892.

[13] Wang L, Li J, Xie Y, Zhang XG. Association between serum homocysteine and oxidative stress in elderly patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Biomed Environ Sci*, 2010, 23 (1): 42 - 47.

[14] 任大林, 黄国伟, 刘欢, 刘莉. 高效液相色谱法测定血浆中同型半胱氨酸. *营养学报*, 2006, 28 (5): 444 - 445.

[15] 范新萍, 刘德敏, 石建党, 汤新之. rH-PLC 定量分析血浆 Hey 方法的比较研究. *天津医药*, 2003, 31 (9): 589 - 592.

[16] Krijt J, Vacková M, Kožich V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris (2-carboxyethyl) phosphine as reductant compared with Tri-n-butylphosphine. *Clinical Chemistry*, 2001, 47 (10): 1821 - 1828.

[17] [Finkelstein JD. Methionine metabolism in liver diseases [J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77 (5), 1094 - 1095.

[18] Mudd SH, Levy H, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease [J]*. McGraw-Hill, New York, 2002: 2007 - 2056.

[19] Kery V, Bukovska G, Kraus JP. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5' - phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (41), 25283 - 25288.]

[20] Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr*, 2004, 24: 539 - 577.

[21] Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr*. 1986, 6: 179 - 209.

[22] Panayiotidis MI, Stabler SP, Allen RH, Pappa A, White CW. Oxidative stress-induced regula-

tion of the methionine metabolic pathway in human lung epithelial-like (A549) cells. *Mutat Res*, 2009, 674 (1-2): 23-30.

[23] Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem*, 1986, 261 (4): 1582-1587.

[24] Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism*, 1980, 29 (8): 707-720.

[25] Rao AM, Drake MR, Stipanuk MH. Role of the transsulfuration pathway and of gamma-cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *J Nutr*, 1990, 120 (8): 837-845.

[26] Korendyaseva TK, Kuvatov DN, Volkov VA, Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataullakhanov FI. An allosteric mechanism for switching between parallel tracks in mammalian sulfur metabolism. *PLoS Comput Biol*, 2008, 4 (5): e1000076.

[27] Beatty PW, Reed DJ. Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1980, 204: 80-87.

[28] Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*, 2000, 39: 13005-13011.

[29] Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Pu-
leo E, Calafato S, Cornelius C, Finocchiaro M,
Mangiameli A, Di Mauro M, Stella AM, Castellino P.
Oxidative stress and cellular stress response in diabetic
nephropathy. *Cell Stress Chaperones*, 2007, 12 (4):
299-306.

[30] Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, 2006, 187 (2): 363-371.

[31] Sultana R, Mecocci P, Mangialasche F, Cecchetti R, Baglioni M, Butterfield DA. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *J Alzheimers Dis*, 2011, 24 (1): 77-84.

褐藻糖胶抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的机制

李小婷 殷辰俞 孟徐莲 段 颀 孔秋月 冯 晴

(南京医科大学公共卫生学院营养与食品卫生系, 江苏南京 210029)

摘要:目的 探讨调节褐藻糖胶对人肝癌细胞株 HepG2 体外增殖的相关机制。方法 采用 MTT 法测定不同浓度褐藻糖胶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的抑制作用, 计算细胞生长抑制率; 将 0 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/ml 和 500 μ g/ml 的褐藻糖胶作用于 HepG2 细胞, 48h 后光镜观察细胞形态改变, 用 Hoechst 染色法和琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡; Western blot 检测 cyclinD1 和 TopoII α 表达的改变。结果 褐藻糖胶具有抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的作用, 呈剂量依赖性。不同浓度褐藻糖胶作用 HepG2 细胞后, 500 μ g/ml 组较其他浓度组光镜下和 Hoechst 33258 染色均呈现较明显细胞形态改变, 100 μ g/ml 和 500 μ g/ml 组均检测出 DNA 梯形条带。褐藻糖胶也能降低细胞增殖生物标志蛋白 cyclinD1 和 TopoII α 的蛋白表达。结论 褐藻糖胶抑制人肝癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与褐藻糖胶抑制细胞增殖的生物标志蛋白 cyclinD1 和 TopoII α 表达有关。

关键词: 褐藻糖胶; 人肝癌细胞 HepG2; 凋亡; cyclinD1; TopoII α