

· 基础研究 ·

## 香烟烟雾提取物致大鼠膈肌细胞氧化损伤

杨士芳, 高兴林\*, 吴 健

(广东省人民医院, 广东省医学科学院, 呼吸内科, 广东省老年医学研究所, 广州 510080)

**【摘要】目的** 研究经香烟烟雾提取物(CSE)刺激后大鼠膈肌细胞8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量的变化以及细胞内活性氧(ROS)水平和8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1(OGG1)表达对8-OHdG含量变化的影响。**方法** 用不同浓度CSE分别刺激大鼠膈肌细胞24、48和72h后,采用高效液相色谱-电化学法(HPLC-ECD)检测大鼠膈肌细胞8-OHdG的含量,流式细胞术检测大鼠膈肌细胞ROS水平,采用实时定量PCR检测OGG1 mRNA水平,用Western印迹法检测OGG1蛋白水平。**结果** 经相同CSE浓度分别刺激大鼠膈肌细胞24、48和72h后,大鼠膈肌细胞中8-OHdG含量、ROS水平及OGG1 mRNA和蛋白水平均无明显差异。但经不同浓度CSE刺激相同时间后,10.00% CSE和20.00% CSE刺激组大鼠膈肌细胞8-OHdG含量明显高于对照组和5.00% CSE刺激组( $P < 0.05$ );大鼠膈肌细胞内ROS水平、OGG1 mRNA和蛋白水平较对照组均明显升高( $P < 0.05$ );大鼠膈肌细胞8-OHdG含量与其ROS水平呈明显正相关( $r = 0.826, P = 0.000$ );经CSE刺激后,大鼠膈肌细胞OGG1 mRNA和蛋白水平均高于对照组( $P < 0.05$ ),但大鼠膈肌细胞8-OHdG含量与其OGG1 mRNA和蛋白水平无明显相关( $r = 0.373, P = 0.254; r = 0.329, P = 0.296$ )。**结论** CSE刺激可引起大鼠膈肌细胞8-OHdG升高,8-OHdG含量与ROS水平有关,但与其修复酶OGG1表达水平无明显相关。

**【关键词】** 肺疾病, 慢性阻塞性; 膈肌细胞; 8-羟基脱氧鸟苷; 8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1

**【中图分类号】** R563.3

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00197

## Oxidative damage of diaphragm cells in rats induced by cigarette smoke extract

YANG Shi-Fang, GAO Xing-Lin\*, WU Jian

(Department of Respiratory Diseases, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong Institute of Geriatrics, Guangzhou 510080, China)

**【Abstract】 Objective** To study the effect of cigarette smoke extract(CSE) on the diaphragm cells of rats in 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG) content and the relationship between 8-OHdG content and level of reactive oxygen species(ROS) and 8-oxoguanine DNA glycosylase-1(OGG1). **Methods** The diaphragm cells of rats were cultured and stimulated by CSE for different time periods and at different concentrations. 8-OHdG was detected by high performance liquid chromatography with electrochemical detection(HPLC-ECD). The level of ROS was determined by fluorescent probe of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). The expression of OGG1 mRNA was tested by real-time PCR. The expression of OGG1 protein was tested by Western blot. **Results** There was no significant difference in the 8-OHdG, ROS, OGG1 mRNA and protein levels after CSE treatment for different time periods. However, the 8-OHdG content of the diaphragm cells induced by 10.00% CSE and 20.00% CSE was significantly increased compared with the diaphragm cells induced by 5.00% CSE and control groups( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in 8-OHdG content between 5.00% CSE and control groups( $P > 0.05$ ). Compared with control, the intracellular ROS level was dramatically increased in CSE-treated groups( $P < 0.05$ ), and the 8-OHdG content was increased according to the level of ROS( $r = 0.826, P = 0.000$ ). Compared with control, the expression of OGG1 mRNA and protein were dramatically increased in CSE-treated groups( $P < 0.05$ ), however, the 8-OHdG content has but not with the expression of OGG1 mRNA and protein( $r = 0.373, P = 0.254; r = 0.329, P = 0.296$ ). **Conclusions** CSE could increase the level of 8-OHdG in the diaphragm cells of rats. The 8-OHdG content has correlation with ROS level, but not with the expression of OGG1.

**【Key words】** pulmonary disease, chronic obstructive; diaphragm cell; 8-hydroxydeoxyguanosine; 8-oxoguanine DNA glycosylase-1

This work was supported by Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2012B031800315).

Corresponding author: GAO Xing-Lin, E-mail: xinglinga@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-05-15; 修回日期: 2013-06-20

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2012B031800315)

通信作者: 高兴林, E-mail: xinglinga@yahoo.com.cn

膈肌是最主要的呼吸肌,膈肌疲劳被认为是导致呼吸衰竭的重要病理生理机制之一。由膈肌疲劳导致的呼吸衰竭是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)晚期患者死亡的最重要原因,因而延缓COPD患者的膈肌疲劳进而减少因呼吸衰竭造成的死亡在临床上显得尤为重要。已有研究发现氧化应激在COPD的膈肌疲劳中具有重要意义<sup>[1,2]</sup>,但其具体机制尚未阐明。吸烟是COPD重要发病因素,香烟烟雾中的大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以直接攻击DNA,使DNA上的鸟嘌呤(guanine, dG)氧化为8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine-1, 8-OHdG)<sup>[3]</sup>,而8-OHdG修复的关键酶8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1(8-oxoguanine DNA glycosylase-1, OGG1)<sup>[4]</sup>表达的变化可能影响其修复8-OHdG的能力。本研究通过观察香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)对大鼠膈肌细胞造成的氧化损伤,为进一步研究膈肌疲劳的发病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 CSE的制备

按文献[5]报道的方法,将一支去过滤嘴香烟(红金龙,武汉烟草公司,中国)连接于一注射器驱动装置收集300ml烟雾,溶于20ml无血清的DMEM培养基中制备CSE原液。原液用1mol/L NaOH调至pH7.4,经0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,在30min之内用于实验。在剂量反应实验后,分别取5.00%、10.00%和20.00%的CSE原液应用于本实验。

### 1.2 大鼠膈肌细胞培养

参考贾红轩等<sup>[6]</sup>报道的方法培养大鼠膈肌细胞。具体方法如下:取2~4周龄健康Wistar大鼠(中山大学实验动物中心提供),断颈法处死,取出横膈,用胰蛋白酶于37 $^{\circ}$ C消化3~4次,离心过滤,将过滤后的细胞悬液即膈肌细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基进行培养。待细胞生长至约60%融合时,用0.00%(对照组)、5.00%、10.00%和20.00%的CSE(5.00%、10.00%和20.00% CSE组)分别干预24、48和72h后收获细胞,取少量细胞悬浮液用锥虫蓝(台盼蓝)排除法检测细胞的活性>95%,其余收集用于下一步实验。

### 1.3 HPLC-ECD法检测8-OHdG

采用高效液相色谱-电化学法(HPLC-ECD)检测8-OHdG含量<sup>[7]</sup>。DNA的提取采用链霉菌蛋白酶/乙醇抽提的方法,提取的DNA重悬于300 $\mu$ l 20mmol/L的乙酸钠溶液中,98 $^{\circ}$ C变性5min,放入-20 $^{\circ}$ C冰箱中

阻止其复性,加入10U的核酸酶P1(6 $\mu$ l)和0.5U的酸性磷酸酶(5 $\mu$ l)37 $^{\circ}$ C孵育90min,水解产物离心10000r/min,15min $\times$ 2次,取上清,用Varian Prostar高效液相色谱仪(Varian, USA)检测8-OHdG含量,电化学检测进样量为每个样品50 $\mu$ l,紫外检测脱氧鸟苷(dG)的最大吸收波长为252nm,进样量为每个样品10 $\mu$ l。8-OHdG含量以8-OHdG/10<sup>5</sup>dG表示。

### 1.4 流式细胞术检测ROS水平

将收集的细胞洗2次,加入10 $\mu$ mol分子探针DCFH-DA(Sigma, USA),37 $^{\circ}$ C温育30min后,立即用BD-LSR流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)测定荧光强度,每个样本测定约10 000个活细胞,计算平均荧光强度。

### 1.5 实时定量PCR检测OGG1 mRNA

用Trizol试剂盒(Invitrogen, USA)按说明书要求提取总RNA,并检测浓度。取2 $\mu$ g总RNA提取液进行反转录,用ABI Prime 7900HT型荧光定量PCR仪(ABI, USA)检测OGG1 mRNA相对含量,20 $\mu$ l PCR反应体系:SYBR Green real time PCR master mix(Toyobo, Japan)10 $\mu$ l;各引物(10 $\mu$ mol/L)0.8 $\mu$ l;cDNA模板2 $\mu$ l;双蒸水6.4 $\mu$ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性60s;95 $^{\circ}$ C变性15s,60 $^{\circ}$ C退火15s,72 $^{\circ}$ C延伸45s,进行40个循环。OGG1引物及内参照 $\beta$ -actin引物均由上海生物工程有限公司合成。OGG1:正义GCCACACACTGGGACTTGG,反义CCTCGGAATGGGACGTTTG; $\beta$ -actin:正义TGGCACCCAGCACAAATGAA,反义CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA,根据2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算OGG1 mRNA的相对拷贝数。

### 1.6 Western印迹法检测OGG1蛋白水平

按细胞裂解液说明书(Invitrogen, USA)提取细胞蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。分别以兔抗OGG1多克隆抗体(1:500, Invitrogen, USA)和兔抗 $\beta$ -actin多克隆抗体(1:200, Invitrogen, USA)作为第一抗体;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:2000, Invitrogen, USA)作为第二抗体。用Bandscan4.3软件进行总灰度分析,灰度值以累积吸光度值(A)表示,结果以目的蛋白与 $\beta$ -actin的累积吸光度值的比值表示。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS13.0软件进行数据分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组

间比较采用LSD检验, 线性相关关系采用直线相关分析。P < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 经CSE刺激后大鼠膈肌细胞 8-OHdG含量

经不同时间、相同浓度CSE刺激的大鼠膈肌细胞8-OHdG含量无明显差异 (P > 0.05); 但在相同干预时间时10.00% CSE和20.00% CSE刺激组大鼠膈肌细胞8-OHdG的含量均明显高于对照组和5.00% CSE组 (P < 0.05; 表1)。

表1 不同时间、不同浓度CSE对大鼠膈肌细胞8-OHdG含量的影响  
Table 1 Effect of CSE on 8-OHdG content of the diaphragm cells of rats in different treatment time and concentrations (n = 6, 8-OHdG/10<sup>5</sup>dG,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	24h	48h	72h
Control group	1.38 ± 0.21	1.42 ± 0.23	1.48 ± 0.26
5.00% CSE group	1.80 ± 0.26	1.74 ± 0.25	1.86 ± 0.25
10.00% CSE group	2.35 ± 0.22* <sup>#</sup>	2.44 ± 0.23* <sup>#</sup>	2.41 ± 0.24* <sup>#</sup>
20.00% CSE group	2.77 ± 0.37* <sup>#</sup>	2.83 ± 0.42* <sup>#</sup>	2.86 ± 0.40* <sup>#</sup>

CSE: cigarette smoke extract; 8-OHdG: 8-hydroxydeoxyguanosine. Compared with control group, \*P < 0.05; compared with 5.00% CSE group, <sup>#</sup>P < 0.05

### 2.2 经CSE刺激后大鼠膈肌细胞ROS水平

经不同时间、相同浓度CSE刺激的大鼠膈肌细胞ROS水平无明显差异 (P > 0.05); 但相同时间、不同浓度组间差异均有统计学意义 (P < 0.05), 各CSE刺激组大鼠膈肌细胞内ROS水平均明显高于对照组 (均P < 0.05), 且随CSE浓度升高, ROS水平呈上升趋势 (表2)。

### 2.3 经CSE刺激后大鼠膈肌细胞OGG1 mRNA水平

各CSE刺激组大鼠膈肌细胞OGG1 mRNA水平均高于对照组 (P < 0.05), 各CSE刺激组之间差异无统计学意义 (P > 0.05; 表3)。

### 2.4 经CSE刺激后大鼠膈肌细胞OGG1蛋白水平

各CSE刺激组大鼠膈肌细胞OGG1蛋白水平均高于对照组 (P < 0.05), 各CSE刺激组之间差异无统计学意义 (P > 0.05; 表4)。

### 2.5 大鼠膈肌细胞内8-OHdG含量与ROS水平、OGG1 mRNA和蛋白水平的关系

大鼠膈肌细胞内8-OHdG含量与ROS水平存在明显正相关 (r = 0.826, P = 0.000), 而8-OHdG含量与OGG1 mRNA水平和蛋白水平无明显相关 (r = 0.373, P = 0.254; r = 0.329, P = 0.296)。

## 3 讨论

研究表明, 吸烟可以直接或间接产生大量的ROS, ROS不仅作用于呼吸系统, 而且可以随着血液循环分布于全身多器官, 当ROS到达骨骼肌时, 引起骨骼肌氧化应激增加, 导致骨骼肌功能障碍<sup>[8]</sup>。ROS可以直接攻击DNA, 使DNA上的鸟嘌呤氧化为8-OHdG, 它可导致基因发生G→T突变、碱基脱落和DNA链断裂, 进而对机体造成严重损伤<sup>[3]</sup>。

本研究发现, 大鼠膈肌细胞经不同浓度CSE刺激后, 其8-OHdG含量和ROS水平均逐渐升高, 且两者呈明显正相关, 这说明CSE可能通过ROS对大鼠膈肌细胞DNA造成氧化损伤。OGG1是DNA氧化损伤修复的关键酶<sup>[4]</sup>, 能特异性地切除和修复ROS所致的8-OHdG, 其表达的变化可能影响其修复8-OHdG的能力。本实验发现, 经5.00% CSE刺激的大鼠膈肌细胞8-OHdG含量与对照组之间无明显差异, 而其ROS水平及OGG1 mRNA和蛋白水平均明显升高, 可能是因为用5.00% CSE刺激大鼠膈肌细胞时, OGG1表达迅速达到高峰, 此时ROS对DNA造成的损伤与OGG1对此损伤的修复是平衡的, 故此时8-OHdG含量与无CSE刺激时无明显差异, 但随着CSE刺激浓度升高, ROS水平升高, 其对大鼠膈肌细胞的损伤程度亦相应增加, 而OGG1的表达却未随之升高, 使其修复能力不能对抗ROS对DNA的损伤, 最终导致细胞内8-OHdG含量升高。

有关OGG1表达水平与8-OHdG含量的关系的研究结果不尽一致, 有研究显示外来化合物诱导DNA氧化损伤时, OGG1表达降低, 组织中8-OHdG增加<sup>[4]</sup>; 而有的报道结果则相反<sup>[9]</sup>。本研究发现, 经CSE刺激后大鼠膈肌细胞 8-OHdG含量与其OGG1水平无明

表2 不同时间、不同浓度CSE对大鼠膈肌细胞ROS水平的影响  
Table 2 Effect of CSE on ROS level of the diaphragm cells of rats in different treatment time and concentrations (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	24h	48h	72h
Control group	1 296.74 ± 198.66	1 364.21 ± 206.37	1 338.67 ± 217.28
5.00% CSE group	3 554.66 ± 298.54*	3 429.35 ± 306.88*	3 606.67 ± 315.60*
10.00% CSE group	5 072.46 ± 527.47* <sup>#</sup>	5 193.76 ± 549.27* <sup>#</sup>	5 225.67 ± 578.70* <sup>#</sup>
20.00% CSE group	6 501.19 ± 532.92* <sup>#</sup>	6 356.82 ± 492.78* <sup>#</sup>	6 443.00 ± 513.05* <sup>#</sup>

CSE: cigarette smoke extract; ROS: reactive oxygen species. Compared with control group, \*P < 0.05; compared with 5.00% CSE group, <sup>#</sup>P < 0.05

**表3 不同时间、不同浓度CSE对大鼠膈肌细胞OGG1 mRNA的影响**

Table 3 Effect of CSE on OGG1 mRNA of the diaphragm cells of rats in different treatment time and concentrations (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	24h	48h	72h
Control group	0.82 ± 0.09	0.87 ± 0.12	0.90 ± 0.15
5.00% CSE group	4.99 ± 0.47*	5.14 ± 0.62*	5.06 ± 0.54*
10.00% CSE group	4.52 ± 0.48*	4.59 ± 0.56*	4.55 ± 0.54*
20.00% CSE group	4.31 ± 0.53*	4.41 ± 0.54*	4.46 ± 0.57*

CSE: cigarette smoke extract; OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase-1. Compared with control group, \*P < 0.05

**表4 不同时间、不同浓度CSE对大鼠膈肌细胞OGG1蛋白的影响**

Table 4 Effect of CSE on OGG1 protein of the diaphragm cells of rats in different treatment time and concentrations (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	24h	48h	72h
Control group	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
5.00% CSE group	0.92 ± 0.09*	0.94 ± 0.11*	0.99 ± 0.12*
10.00% CSE group	0.78 ± 0.11*	0.86 ± 0.12*	0.84 ± 0.14*
20.00% CSE group	0.73 ± 0.15*	0.77 ± 0.14*	0.79 ± 0.17*

CSE: cigarette smoke extract; OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase-1. Compared with control group, \*P < 0.05

显相关,究其原因可能是OGG1的修复能力除与其定量有关外,还与其功能有关,如有研究发现OGG1第326密码子丝氨酸(Ser)转换为半胱氨酸(Cys)会使其修复能力降低<sup>[10]</sup>,而且笔者既往的研究也发现hOGG1 326Cys可以明显升高现在吸烟者和轻度吸烟者患COPD的危险度<sup>[11]</sup>。

综上所述,CSE刺激可引起大鼠膈肌细胞8-OHdG含量升高,提示香烟烟雾可能通过氧化应激途径对大鼠膈肌细胞DNA造成氧化损伤,进而导致膈肌疲劳,但其具体机制仍有待进一步研究。

**【参考文献】**

[1] Jammes Y, Steinberg JG, By Y, et al. Fatiguing stimulation of one skeletal muscle triggers heat shock protein activation in several rat organs: the role of muscle innervation[J]. J Exp Biol, 2012, 215(22): 4041-4048.  
 [2] Klimathianaki M, Vaporidi K, Georgopoulos D. Respiratory muscle dysfunction in COPD: from muscles

to cell[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(4): 478-488.  
 [3] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2009, 27(2): 120-139.  
 [4] Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, et al. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(2): 167-172.  
 [5] Lee SD, Lee DS, Chun YG, et al. Cigarette smoke extract induces endothelin-1 via protein kinase C in pulmonary artery endothelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): 403-411.  
 [6] 贾红轩,熊盛道,牛汝楫,等.大鼠膈肌细胞的体外培养[J].郑州大学学报(医学版),2003,38(4):527-530.  
 [7] Pouget JP, Douki T, Richard MJ, et al. DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay[J]. Chem Res Toxicol, 2000, 13(7):541-549.  
 [8] Remels AH, Gosker HR, van der Velden J, et al. Systemic inflammation and skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art and novel insights in regulation of muscle plasticity[J]. Clin Chest Med, 2009, 28(3): 537-552.  
 [9] Kondo S, Toyokuni S, Tanaka T, et al. Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(4): 1394-1400.  
 [10] Thameem F, Puppala S, Lehman DM, et al. The Ser(326)Cys polymorphism of 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans[J]. Hum Hered, 2010, 70(2): 97-101.  
 [11] Yang SF, Xu YJ, Xie JG, et al. hOGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms associated with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin Med J, 2009, 122(8): 960-966.

(编辑:张青山)