

## 铁过载氧化应激模型的构建、检测与分析\*

吕颖慧<sup>1</sup>, 王启钊<sup>1</sup>, 李招发<sup>1</sup>, 江楠<sup>2</sup>, 刁勇<sup>1</sup>, 许瑞安<sup>1\*\*</sup>

(1. 华侨大学分子药理学研究所, 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021;

2. 嘉兴市妇幼保健院生殖医学中心, 嘉兴 314000)

**摘要** 目的: 建立正确的铁过载氧化应激模型及检测手段。方法: 通过显微镜镜检、MTT 法、结晶紫染色等方法测定 Fe - NTA 对肝星状细胞系 LX - 2 及肝细胞系 Chang liver 增殖状态的影响; 利用紫外可见全波长扫描方法分析 Fe 与酚红、MTT 试剂及显色产物、结晶紫之间的颜色反应。结果: MTT 试剂及显色产物与 Fe 之间存在颜色反应, 不能用于检测铁过载氧化应激模型; 结晶紫不与 Fe 发生颜色反应, 结晶紫染色可作为铁过载氧化应激模型的检测手段; 酚红与 Fe 之间存在一定的颜色反应, 在铁过载氧化应激模型中应使用无酚红培养基。结论: 构建铁过载氧化应激模型应使用无酚红培养基, 并采用结晶紫染色方法检测细胞毒性。

**关键词:** 铁; 过载; 氧化; 应激; 肝星状细胞; MTT 检验; 结晶紫染色

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011)06 - 1153 - 05

## Construction, detection and analysis of the oxidative stress model induced by iron - overload\*

LÜ Ying - hui<sup>1</sup>, WANG Qi - zhao<sup>1</sup>, LI Zhao - fa<sup>1</sup>, JIANG Nan<sup>2</sup>, DIAO Yong<sup>1</sup>, XU Rui - an<sup>1\*\*</sup>

(1. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University; Molecular Medicine Engineering Research Center, Ministry of Education,

Quanzhou 362021, China; 2. Reproductive Medicine Centre, Jiaxing Maternal and Child Health Hospital, Jiaxing 314000, China)

**Abstract Objective:** To develop a correct model of oxidative stress induced by iron - overload and find out the right testing methods. **Methods:** Measuring the cytotoxicity of Fe - NTA on LX - 2 and Chang liver cells via microscope examination, the MTT assay and the crystal violet staining; analyzing the possible color reaction among phenol, Fe, the MTT reagents and the chromogenic products, and the crystal violet using the UV - vis full - length scanning. **Results:** MTT assay can not be used in the oxidative stress model induced by iron - overload for the color reaction existing between Fe and the MTT reagents and the chromogenic products, while crystal violet staining could be the right detecting mean in this model since there is no color reaction between Fe and the crystal violet. Then, as phenol can also react with Fe to generate colored products, medium without phenol should be used in the iron - overload model. **Conclusions:** In order to obtain the correct and valid experimental data, the Crystal Violet staining method and the phenol - free medium should be used in the oxidative stress model induced by iron - overload.

**Key words:** ferrum(Fe); overload; oxidation; stress; hepatic stellate cells; MTT assay; crystal violet staining

铁是人体所必需的微量元素之一,然而越来越多的研究表明,体内铁过多与多种脏器(如肝、肾、心、肺、脑、血液等)疾病相关<sup>[1,2]</sup>。肝脏是铁代谢的主要场所,也是铁过载的最主要靶器官。病毒感染、肝炎、肝纤维化、肝癌等疾病都与铁过载存在密切的联系<sup>[3]</sup>。铁被认为主要是通过影响氧化应激而影响机体的健康。作为体内氧化反应的催化剂,铁不

但可以诱导羟基自由基的产生,还可以启动脂质过氧化反应,从而加强对肝内各种细胞的损伤或激活,导致疾病的发生<sup>[2,4]</sup>。

铁过载细胞氧化应激损伤模型是在体外检验肝癌、肝炎、肝纤维化治疗药物有效性的重要工具<sup>[5-8]</sup>。目前国际上已有多篇关于肝内细胞铁过载模型的研究报道<sup>[5,6]</sup>;国内也有数篇文献利用目前

\* 福建科技厅重点项目(2010Y0036);厦门市科技计划项目(3502Z20053046);嘉兴市科技研究项目(2009BY7011)

\*\* 通讯作者 Tel: (0595) 22690952; E - mail: ruiyanxu@hqu.edu.cn

应用较为广泛且便捷的 MTT 比色法对 Fe - NTA 作用后的肝星状细胞系或肝细胞系的增殖特性进行研究<sup>[7,8]</sup>。其中应用 1 种肝星状细胞系 HSC - T6 的实验发现 Fe - NTA 处理能促进其增殖,且这种增殖作用随 Fe - NTA 浓度的提高而增大,甚至在 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度下作用 48 h 吸光值达到未处理组的 7 倍之多<sup>[7]</sup>。这一现象与我们的研究结果存在较大差别。为建立正确的铁过载氧化应激模型及检测手段,本文对 Fe - NTA 铁过载模型进行了系统研究。文中研究内容作者尚未见诸文献报道

### 1 仪器、药品、耗材

荧光倒置显微镜(Eclipse TE2000 - U, Nikon); 酶标仪(DNM - 9602, 北京普朗); 高速台式离心机(3K15, Sigma); 紫外可见分光光度计(752pc 型, 上海光谱仪器)。

人肝星状细胞系 LX - 2, 人肝细胞系 Chang Liver 购自天呈医流。

DMEM 高糖培养基(有酚红)购自 Invitrogen 公司; DMEM 高糖培养基(无酚红)、胎牛血清(FBS)、双抗(青\链)购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶购自 Amresco 公司; MTT 试剂、次氨基三乙酸(Nitilotriacetic acid, NTA) 购自 Sigma 公司。一次性细胞培养板、培养瓶购自 Corning 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 2 实验方法

**2.1 Fe - NTA 溶液配制** 取 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Fe ( $\text{NO}_3$ )<sub>3</sub> 溶液 5 mL 与 150  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NTA 溶液 5 mL 混合,用 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸氢钠溶液调节 pH 至 7.4,定容至 20 mL,得 25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Fe - NTA 母液。

**2.2 Fe - NTA 作用** 细胞以  $1.0 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  接种于 96 孔板,100  $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$  培养过夜后,分别加入终浓度为 1000,500,100,50,25,0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Fe - NTA,作用不同时间后行 MTT 检测及结晶紫检测。

**2.3 MTT 检测** 达到既定时间后,每孔中加入 10  $\mu\text{L}$ (96 孔板) 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT 试剂,继续培养 4 h,终止培养,吸弃培养基,每孔加入 100  $\mu\text{L}$ (96 孔板) DMSO,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 492 nm 处测 OD 值,以 630 nm 做参比波长。实验中设置 6 个平行样,重复 3 次。相对增殖率(Relative Growth rate, RGR) 用以下公式计算:

$$\text{相对增殖率}\% = \frac{\text{样品组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100\%$$

**2.4 结晶紫检测** 达到既定时间后,去除细胞培养

基,  $1 \times \text{PBS}$  漂洗细胞两次后用 10% 甲醛固定 30 s,  $1 \times \text{PBS}$  漂洗 2 次; 加入结晶紫染液孵育 10 min,  $1 \times \text{PBS}$  漂洗 5 遍,加入 33% 乙酸水溶液溶解,570 nm 读数。实验中设置 6 个平行样,重复 3 次。

**2.5 数据统计** 所有数据用均值  $\pm$  标准偏差表示,并经 *student's t - test* 检验显著性差异(\* 代表与对照相比  $p < 0.05$ ; \*\* 代表与对照相比  $p < 0.01$ )。

### 3 结果

**3.1 MTT 方法检测 Fe - NTA 模型中肝星状细胞增殖** 由图 1 可见,Fe - NTA 浓度 25 ~ 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时对肝星状细胞系 LX - 2 增殖无显著影响,而浓度为 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  及 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时对 LX - 2 细胞却表现出显著促增殖作用,这与多篇国内文献报道是一致的<sup>[7,8]</sup>。然而在 MTT 检验前镜检却发现 Fe - NTA 浓度为 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  与 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组的细胞死伤严重,尤其是 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组的细胞质几乎全部回缩,丧失细胞正常形态,与 MTT 读数结果截然相反(图 2)。

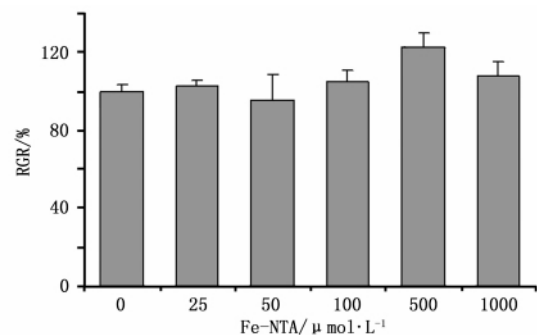


图 1 不同浓度 Fe - NTA 作用于 LX - 2 细胞对增殖率影响(1 d, 有酚红培养基, MTT 检验)。

Fig 1 Effect of different concentration of Fe - NTA on the relative growth rates of LX - 2 cells (1 d, medium with phenol red, MTT assay)

### 3.2 Fe 与培养基成分、MTT 反应产物之间的颜色反应

我们推测,以上看似矛盾的结果是因为 Fe 与培养基成分、MTT 反应产物之间发生了某种颜色反应。在铁过载模型中,培养过程发现加入高浓度 Fe - NTA 的孔(图 3 - A)内培养基颜色要明显比未加 Fe - NTA 的孔深(图 3 - C)。经 MTT 反应后加入 DMSO 显色发现,添加高浓度 Fe - NTA 组(图 3 - D)与不加 Fe - NTA 组颜色存在明显差异(图 3 - E)。进一步将 MTT 显色产物经全波长扫描发现,Fe - NTA 处理与否存在明显差别,提示显色产物发生了变化(图 4)。

由于通常使用的 DMEM 培养基中带有指示剂

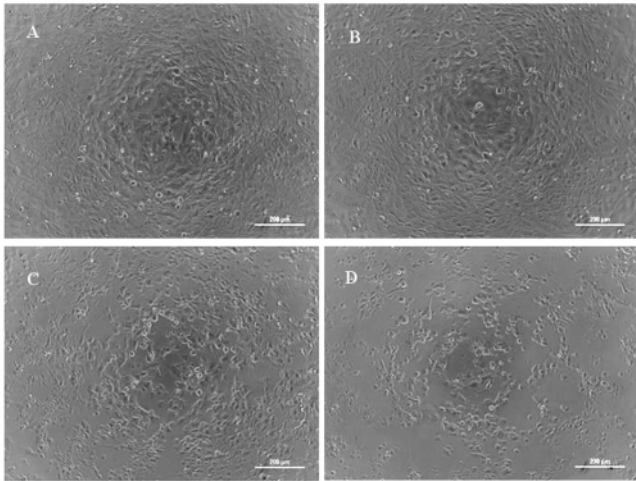


图2 Fe-NTA 作用于 LX-2 细胞 1 d(标尺为 200 μm)  
 Fig 2 Effect of Fe-NTA on LX-2 cells for 1 d( scale bar =200 μm)  
 A. 对照( control) B. 100 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 100 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated cells) C. 500 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 500 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated cells) D. 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated cells)

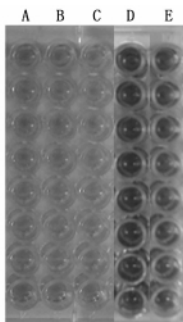


图3 Fe与培养基成分、MTT 反应产物间的颜色反应  
 Fig 3 The color reaction between Fe and the media component or the MTT chromogenic products  
 A ~ C 为培养基颜色( A ,B and C showing the color of culture media) : A. 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated) B. 100 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 100 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated) C. 未添加 Fe-NTA 对照( control without Fe-NTA) D ,E 为 MTT 显色产物颜色( D and E showing the color of MTT chromogenic products) : D. 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated) E. 未加 Fe-NTA 对照组( control without Fe-NTA)

酚红,为了排除酚红在颜色反应中的可能作用,本文采用无酚红培养基再次进行实验。结果证明 Fe-NTA 处理后的显色产物全波长扫描曲线仍旧明显不同于未加 Fe-NTA 组(图 4)。另外,比较有、无酚红培养基组可以发现,无论是加入 Fe-NTA 处理组,还是不加 Fe-NTA 组,MTT 检验显色产物全波长扫描后两条曲线具有几乎一致的形状与趋势,提示酚红并非影响实验结果的主要因素。不过,由图 4 可见应用相同剂量 Fe-NTA 处理( 500 μmol ·

L<sup>-1</sup>),有酚红培养基组的细胞吸光值要明显高于无酚红培养基组,表明加入等量 Fe-NTA 对有酚红培养基组的细胞毒性要小于无酚红培养基组,提示酚红添加与否会影响到 Fe-NTA 实际发挥作用的剂量(图 4)。

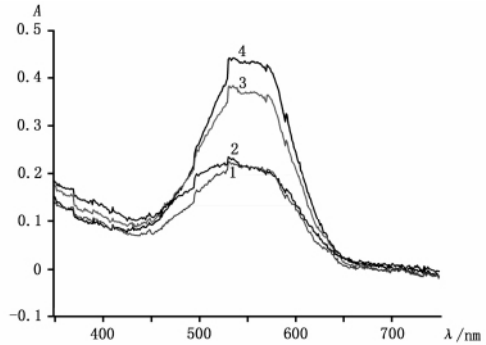


图4 MTT 显色产物全波长扫描  
 Fig 4 Full-length scanning of MTT chromogenic products  
 1. 酚红( phenol) 2. 无酚红( without phenol) 3. 酚红( phenol) + Fe-NTA 4. 无酚红( without phenol) + Fe-NTA

3.3 结晶紫染色检测 Fe-NTA 模型中肝星状细胞及肝细胞增殖 根据以上实验结果,我们推测 Fe-NTA 与 MTT 反应产物之间可能存在颜色反应。为了证实这一想法,本文又利用结晶紫染色方法进行检测。图 5 和图 6 显示,随着 Fe-NTA 浓度的增大,其对 LX-2 细胞的毒性作用随之增加。相同的现象也在 Chang liver 细胞上发现(图 5 和图 6),且 Fe-NTA 对 2 种细胞的毒性作用都随时间延长而增大(图 7)。

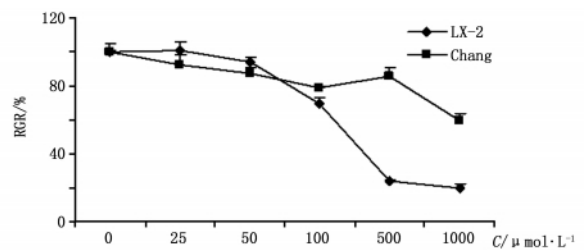


图5 不同浓度 Fe-NTA 作用 3 天对 LX-2 及 Chang liver 细胞毒性(结晶紫染色)  
 Fig 5 Effect of different concentrations of Fe-NTA on LX-2 and Chang liver cells proliferation ( Fe-NTA was added to the medium for 3 days before carrying out Crystal Violet staining)

3.4 Fe 与结晶紫间的颜色反应 Fe-NTA 处理后的细胞行结晶紫检验显色产物全波长扫描曲线与未加药物处理组呈现出一致的趋势和形状,提示显色产物未发生变化(图 8 - A)。有酚红培养基及无酚红培养基培养条件下 Fe-NTA 处理后,显色产物全波长扫描后 2 条曲线同样具有一致的形状与趋势

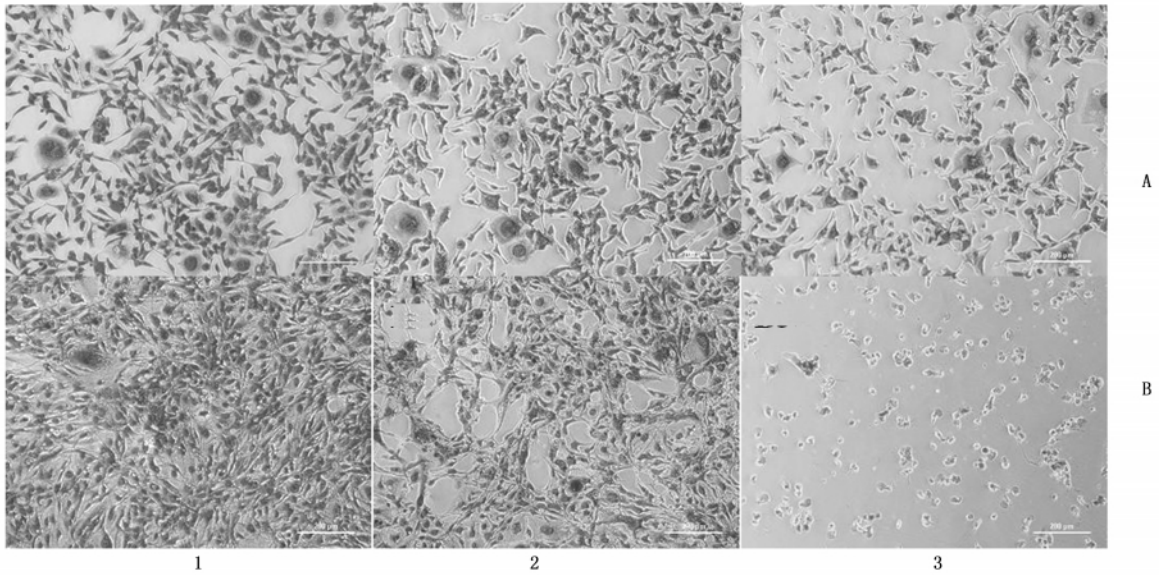


图6 Fe-NTA 作用于 LX-2 及 Chang liver 细胞 3 d( 结晶紫染色 标尺为 200 μm)

Fig 6 Effects of Fe-NTA on LX-2&Chang liver cells for 3 days( Crystal violet staining scale bar = 200 μm)

A. Chang liver 细胞( Chang liver cells) B. LX-2 细胞( LX-2 cells)

1. 对照( control) 2. 100 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 100 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated cells) 3. 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA 处理( 1000 μmol · L<sup>-1</sup> Fe-NTA treated cells)

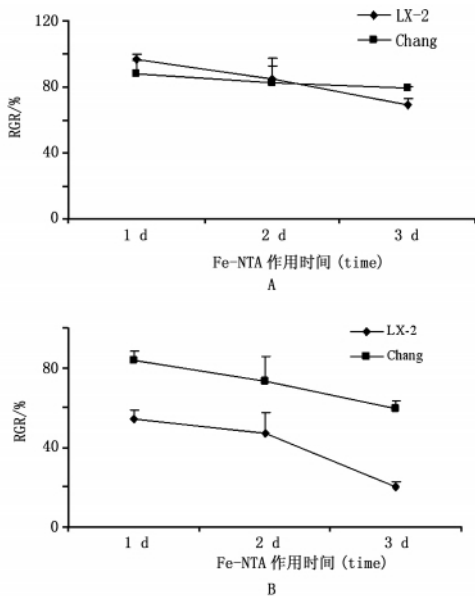


图7 Fe-NTA 作用 1~3 d 对 LX-2 及 Chang liver 细胞毒性

Fig 7 Effect of Fe-NTA on LX-2 and Chang liver cells for 1~3 d

A. 100 μmol · L<sup>-1</sup> B. 1000 μmol · L<sup>-1</sup>

( 图 8 - B ) , 提示无论培养基中是否添加酚红 , Fe 处理细胞组结晶紫检验显色产物是相同的。另外 , 由图 8 - B 可见应用相同剂量 Fe - NTA 处理 , 有酚红培养基组的细胞吸光值要明显高于无酚红培养基组 , 表明加入等量 Fe - NTA 对有酚红培养基组的细胞毒性要小于无酚红培养基组 , 提示酚红添加与否会影响到 Fe - NTA 实际发挥作用的剂量。

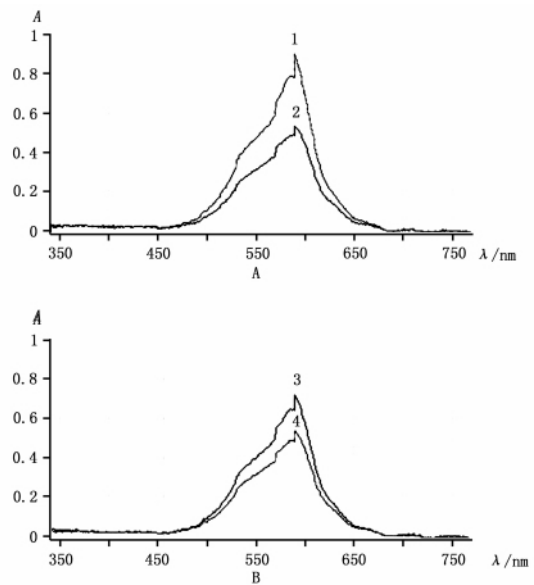


图8 结晶紫显色全波长扫描

Fig 8 Full-length scanning of crystal violet chromogenic products

A. 无酚红培养基( cells were treated with phenol free medium) B. 细胞经 500 μmol · L<sup>-1</sup> Fe - NTA 处理( cells were treated with 500 μmol · L<sup>-1</sup> Fe - NTA)

1. 未经 Fe - NTA 处理( not treated with Fe - NTA) 2. Fe - NTA 处理( treated with Fe - NTA) 3. 酚红( phenol) 4. 无酚红( without phenol)

#### 4 讨论

本文利用不同浓度的 Fe - NTA 处理人肝星状细胞系 LX - 2 后行 MTT 检测 , 仅从吸光值上看结论

与其他文献是一致的,然而镜检的结果却与读数结果截然相反,即高浓度 Fe-NTA 反而会具有明显的细胞毒性作用。

从显色产物全波长扫描结果可以推测出,Fe-NTA 可能与 MTT 反应产物存在颜色反应。经查阅相关文献可知,Fe 与偶氮类化合物能够络合形成 Fe 偶氮类染料,染料的最大吸收波长和 Fe 与母体分子的络合比例及 pH 有关。MTT——四甲基偶氮唑盐即为 1 种偶氮类化合物,其细胞内反应产物甲臆也可与 Fe 络合发生颜色反应<sup>[9,10]</sup>。母体物质与金属络合后,其紫外-可见光谱吸收曲线会发生很大变化,主要表现在最大吸收波长会发生红移,即向长波方向移动<sup>[11]</sup>。这与图 4 的结果相一致。因此,当用 Fe-NTA 作用于细胞后,其会与 MTT 试剂及产物发生颜色反应,对 MTT 的结果产生影响,导致直接用比色法测定吸光值所得到的结果是不科学的。另外,Fe 离子可与溴连苯三酚红及罗丹明 B 发生协同显色反应,在 pH 3.0~5.5 范围内,可形成红紫色配合物,最大吸收峰为 590 nm<sup>[12]</sup>,由此可知,溶液中的 Fe 离子极有可能与指示剂酚红产生一定反应,这点也可由图 3 中看出。由图 4 可知,无论培养基中是否含有酚红,不会影响到最终颜色反应产物的光学性质,这也容易理解,毕竟在显色前培养基是尽数吸除的。然而,由图 4 及图 8-B 可知,酚红添加与否却可影响到同样浓度的 Fe-NTA 对细胞的作用效果,表明酚红与 Fe 离子的反应会使实际起作用的 Fe 离子浓度下降。综上所述,当细胞培养中用重金属离子处理的过程,就不能简单地应用 MTT 比色法来检测细胞增殖,否则得出的结果将是不可信的。

为解决这个问题,本实验应用了能够反映细胞总数的结晶紫染色作为替代。结晶紫染色是在去除原有培养基之后进行,这时培养基中的 Fe 已经被洗掉,因此不会与后来加入的结晶紫起反应;我们的实验结果也表明 Fe 不会与结晶紫染料产生颜色反应,比色得到的结果是合理的。因此,在铁过载氧化应激模型中可用结晶紫染色方法检测细胞毒性,并且为保证 Fe 离子作用浓度准确,培养细胞的液体要

用无酚红培养基。

#### 参考文献

- 1 Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, et al. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010, 142(1):24
- 2 Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med* 2005, 26(4-5):299
- 3 HUANG Cong-wu(黄聪武), BAI Lan(白岚). Iron overload and liver diseases(铁过载和肝脏疾病). *J South Med Univ(第一军医大学学报)* 2002, 22(4):370
- 4 Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009, 286(1):38
- 5 Kessova IG, Cederbaum AI. The effect of CYP2E1-dependent oxidant stress on activity of proteasomes in HepG2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 315(1):304
- 6 Sakurai K, Cederbaum AI. Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrosyltriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol Pharmacol* 1998, 54(6):1024
- 7 LIU Mei(刘梅), LU Lun-gen(陆伦根), CHEN Wei-hua(陈尉华), et al. Effects of oxidative stress on proliferation of rat hepatic stellate cells and antioxidation of reduced glutathione(氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用). *World Chin J Digestol(世界华人消化杂志)* 2006, 14(26):2596
- 8 ZHANG Yi(张奕), LIU Yong-gang(刘永刚). Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells(红景天苷抗大鼠肝星状细胞氧应激脂质过氧化作用的研究). *J Chin Med Mater(中药材)* 2005, 28(9):794
- 9 Freeman HS, Hao Z, Sokolowaka-Gajda J, et al. Matrix selection for the analysis of hydrophilic dyes by fast atom bombardment mass spectrometry. *Dyes Pigments* 1991, 16(16):317
- 10 Szymczyk M, Czajowski W, Stalarski R. Iron complexed dyes based on 1,5-diaryl-3-cyanoformazanes. *Dyes Pigments* 1999, 42(2):227
- 11 Skolowaka-Gajda J, Freeman HS, Abraham R. Synthetic dyes based on environmental considerations, Part I: Iron complexes for protein and polyamide fibers. *Textile Res* 1994, 64(7):388
- 12 JIN Jia-ying(金家英), CHEN Yan(陈艳), WU Jia-liang(吴家良). Study of the synergistic chromogenic reaction of iron(II) with bromopyrogallol red and rhodamine B and its analytical application [Fe(II)与溴连苯三酚红和罗丹明 B 协同显色反应的研究及其应用]. *Phys Tes Chem Anal Part B Chem Anal(理化检验:化学分册)* 1996, 3:160

(本文于 2010 年 8 月 8 日收到)