

研究简报

一种检测微囊藻毒素 LR 诱导大鼠肾细胞凋亡的方法

傅文字¹ 李敏伟² 陈加平¹ 徐立红¹

(浙江大学 1. 劳动卫生与环境健康研究所 310027; 2. 医学院附属第一医院传染病研究所, 杭州 310031)

DETECTION OF APOPTOSIS OF RENAL CELLS OF MICE INDUCED BY MICROCYSTIN-LR

FU Wen Yu¹, LI Min Wei², CHEN Jia Ping¹ and XU Li Hong¹

(1. Institute of Occupational and Environmental Health 310027; 2. Institute of Infectious Diseases, The
First Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

关键词: 微囊藻毒素; NRK 细胞; PI (propidium iodide); Annexin V; 细胞凋亡

Key words: Microcystin-LR; NRK cells; PI; Annexin V; Apoptosis

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)01-0101-02

微囊藻毒素(Microcystins)是一种具有生物活性的单环七肽毒素,主要由微囊藻产生。其中5个氨基酸为固定组成成分,另外2种氨基酸是可变的,由此衍生出众多的同类物,微囊藻毒素 LR(Microcystin LR, MCLR)是其中具有代表性的一种^[1]。同位素示踪显示,静脉注射、腹腔注射和口服3种不同途径进入小鼠体内的¹²⁵I-MCLR 70%以上分布在肝脏和肾脏,揭示这两个脏器是它的靶器官^[2]。本实验中采用正常大鼠的肾细胞来研究 MCLR 对细胞的影响,利用流式细胞仪 PI/Annexin V 双染色法检测 MCLR 能否引起细胞凋亡的改变,为进一步探讨 MCLR 对细胞的损伤及作用机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂 RPMI 1640 培养基购自 Gibco, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 荧光染料 PI 购自 Calbiochem(德国), 荧光素 FITC 标记的 Annexin V (Annexin V-FITC) 购自 Santa Cruz Biotechnology, 胰蛋白酶购自 Serva。

1.2 细胞培养及处理 正常大鼠肾细胞——NRK 细胞购自中国科学院细胞库。NRK 细胞以含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃ 及 5% CO₂ 的湿化培养箱中进行培养, 隔天传代一次。实验所用的细胞均处于对数生长期。根据实验要求, 细胞按 5×10^5 cell/mL 的密度接种于六孔板上, 在培养体系中分别加入 MCLR 至终浓度为 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 nmol/L, 作用 24h。

1.3 PI/Annexin V 法 参考 Vemes 等的方法^[3], 各染毒组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化制成单细胞悬液。100 μL 细胞悬液(密度为 1×10^6 cell/mL)用结合缓冲液(10 mmol/L Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl₂)清洗一次。然后将细胞重悬于 200 μL 结合缓冲液, 加入 5 μL Annexin V-FITC (20 μg/mL) 和 10 μL PI (50 μg/mL), 避光于室温下温育 15 min。用流式细胞仪对样品进行检测。

1.4 结果分析 得到的结果用 SPSS 统计软件作统计分析。

2 结果与讨论

Annexin V 是一种 Ca²⁺ 依赖性磷脂结合蛋白, 对磷脂酰丝氨酸有特殊的亲和力。在正常的活细胞中, 磷脂酰丝氨酸位于细胞膜内侧, 在凋亡早期, 磷脂酰丝氨酸从膜内侧转到膜外侧, 可以与荧光素标记的 Annexin V 结合, 但此时细胞膜仍具有完整性, 使变性染色质着色的荧光染料 PI 不能进入细胞, 借助流式细胞仪可以将细胞分为四个亚群, 如图 1 所示, 第 1 象限表示机械性损伤细胞(Annexin V⁻/PI⁺), 第 2 象限表示晚期凋亡或继发性死亡细胞(Annexin V⁺/PI⁺), 第 3 象限表示正常活细胞(Annexin V⁻/PI⁻), 第 4 象限表示早期凋亡细胞(Annexin V⁺/PI⁻)^[4]。其中 Annexin V⁺ 表示细胞结合荧光素 FITC, Annexin V⁻ 表示未结合, PI⁺ 表示 PI 透过细胞膜使变性染色质着色, PI⁻ 表示 PI 未着色。该方法可以区分

收稿日期: 2002-11-05; 修改日期: 2002-12-03

基金项目: 国家自然科学基金(20137010), 863 项目(2001AA641030)

作者简介: 傅文字(1978—), 女, 浙江省永康市人; 博士生; 主要从事环境毒理学工作

通讯作者: 徐立红 E-mail: xulihong@zju.edu.cn

坏死细胞及早期凋亡细胞,对检测细胞群体中早期凋亡细胞的比例有一定价值。

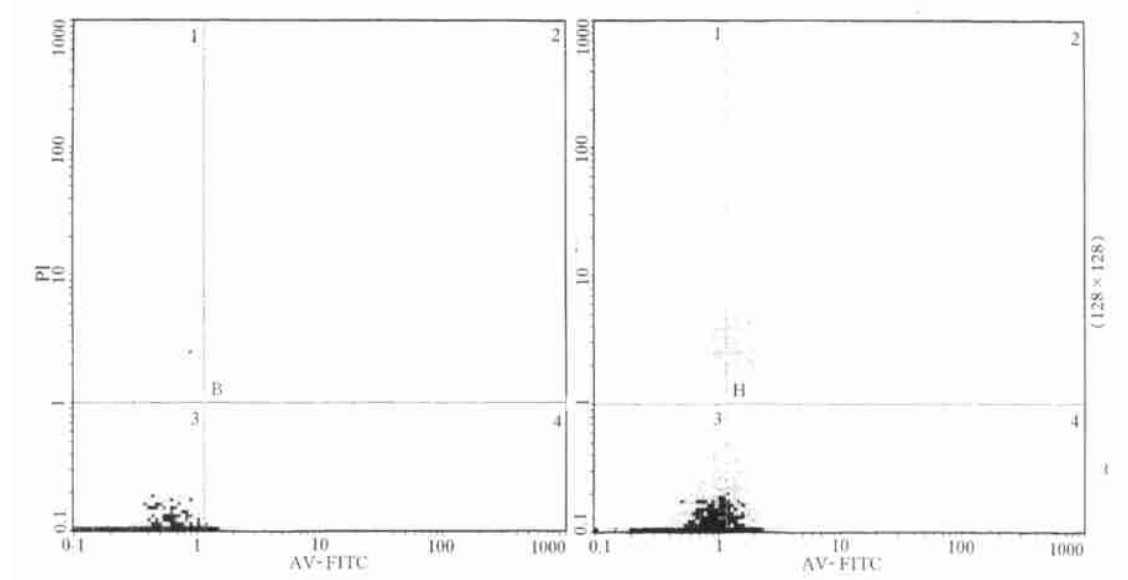


图 1 流式细胞仪 PI/Annexin V 双染色法检测细胞凋亡散点图

Fig. 1 Contour diagram of PI/Annexin V flow cytometric detection of apoptosis Two representative diagrams out of experiments are shown

不同浓度 MCLR 对 NRK 细胞凋亡的影响如图 2 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) 所示。实验中所获得的结果以细胞凋亡率表示,即以早期凋亡细胞(Annexin V⁺/PI⁻)占细胞总数的百分率来表示。当 MCLR 的浓度高于 100nmol/L 时,细胞凋亡率增加,达 5.77%,差异具有显著性。当 MCLR 的浓度为 1000nmol/L 时,凋亡率达 18.93%。

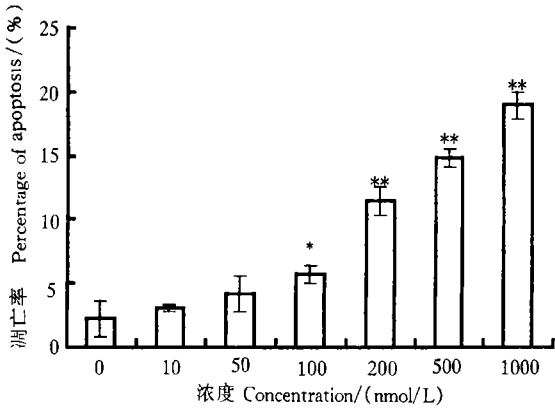


图 2 不同浓度 MCLR 对 NRK 细胞凋亡的影响

Fig. 2 The effects of various concentrations of MCLR on apoptosis of NRK cells

在研究中发现 MCLR 可以引起大鼠肾细胞凋亡,并呈现良好的剂量反应关系。在今后的研究中将进一步探讨 MCLR 引起细胞凋亡的机制并建立相关的生物标志物。

参考文献:

[1] Sui H X, Yan W X, Xu H B. Toxicity of microcystin and its bioaccumulation effect [J]. *J Hygiene Res*. 2002, **31**(3): 214—217. [隋海霞, 严卫星, 徐海滨. 微囊藻毒素的毒性以及水生生物的富集作用. 卫生研究, 2002, **31**(3): 214—217]

[2] Zhang Z Y, Yu S Z, Wei G R, et al. Study on the whole and cells level distribution of microcystin LR in mice [J]. *J Health Toxicol*. 2002, **16**(1): 5—8. [张占英, 俞顺章, 卫国荣, 等. 微囊藻毒素 LR 在动物体内整体水平及细胞水平的分布. 卫生毒理学杂志, 2002, **16**(1): 5—8]

[3] Vemes I, Hannen C, Steffens-Nakken H et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V [J]. *J Immunol Meth*. 1995, **184**: 39—51

[4] Schindl A, Klosner G. Flow cytometric quantification of UV induced cell death in a human aqueous cell carcinoma derived cell line: dose and kinetic studies [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1998, **44**: 97—106