

大田软海绵酸对人胚胎羊膜细胞 FL凋亡的影响

邢鸣鸾 陈加平 王晓峰 徐进 徐立红

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

EFFECT OF OKADAIC ACID ON APOPTOSIS IN HUMAN AMNION CELLS

XING Ming-Luan, CHEN Jia-Ping, WANG Xiao-Feng, XU Jin and XU Li-Hong

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

关键词: 大田软海绵酸; 细胞凋亡; MTT; PI/ Annexin V; Caspase-3

Key words: Okadaic acid; Apoptosis; MTT; PI/Annexin V; Caspase-3

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)04-0607-03

大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)是一种C38的长链脂肪酸, 属聚醚类海洋毒素, 是腹泻性贝毒(Diarrhetic shellfish poisoning, DSP)的主要成分, 化学结构见下图。最初从大田软海绵(*Halichondria Okadai*)和隐瓜海绵(*H. melanodoxia*)中分离得到, 后发现实际上是由共生在上述两种海绵的利马原甲藻(*Prorocentrum lima*)所产生^[1]。由于海绵和贝类的滤食作用, OA常被富集于多种海洋软体动物的消化腺内, 不但造成水产养殖业的巨大经济损失, 更严重威胁人类的健康。目前为止, 该毒素已在多个二阶段致瘤模型中被证实具有促癌活性; 但另外又有很多文献报道仅以nmol/L浓度的OA单独处理, 就可引起多类细胞的凋亡^[2], 由于其凋亡机制错综复杂, 一直受到国内外研究的普遍关注。肿瘤促进和细胞凋亡本是一对矛盾的反映, 而OA却存在诱发这两种作用的功能, 因此深入探索其毒作用分子机制具有十分重要的意义。本实验采用突变检测试验常用的细胞株人胚胎羊膜细胞FL^[3]探讨OA对FL细胞的毒作用及其凋亡诱导机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人胚胎羊膜细胞FL购于ATCC。大田软海绵酸(OA, 纯度95%)和二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司; MEM培养基购自Gibco公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; 胰蛋白酶购自Serva公司; 3-(4,5-二甲基噻唑

2)-2,5-二苯基四氮唑盐(MTT), 购自深圳晶美公司; PI/ Annexin V双染色检测试剂盒 Annexin V-FITC Kit 购自 Bender公司; caspase-3 酶活性检测试剂盒 CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit 购自 BioVision公司; 其余试剂均为分析纯。Microfuge R 高速离心机, Bio-TEK Synergy HT 酶标仪, 尼康TE-2000荧光显微镜, BDLSR 流式细胞仪。

1.2 细胞培养及处理 FL细胞以含10%新生牛血清的MEM培养基在37℃及5%CO₂的湿化培养箱中培养, 隔天传代1次。实验所用的细胞均处于对数生长期。六孔板的细胞接种密度为1×10⁵cell/mL, 96孔板的接种密度为5×10⁴cell/mL, 贴壁生长24h后, 在培养体系中分别加入OA至终浓度为0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/L, 作用时间4h。

1.3 细胞贴壁状态观察 染毒4h后直接置于尼康TE-2000荧光显微镜下拍摄细胞贴壁形态。

1.4 MTT比色法测细胞增殖力 染毒4h后, 每孔换成MTT溶液(5 mg/mL的MTT 20μL+培养基180μL), 37℃继续孵育4h后终止培养, 吸弃孔内培养上清, 每孔加入150μL DMSO, 震荡10 min, 用酶标仪在570 nm处测各孔吸光度值。

1.5 PI/ Annexin V双标法测细胞凋亡率 按照试剂盒说明书进行操作。收集不同浓度OA作用4h后的细胞, 取195μL细胞悬液(细胞密度为5×10⁵cell/mL)置于清洁离心管中, 加入5μL Annexin V-FITC, 轻击管壁使悬液混合均匀, 室温环境中避光温育10 min。后以2000 r/min 5 min离心, 去上清, 用

收稿日期: 2005-05-05; 修订日期: 2006-08-08

基金项目: 国家自然科学基金(20137010)资助

作者简介: 邢鸣鸾(1979—), 女, 浙江省嵊州市人; 博士研究生; 研究方向为环境毒理学。E-mail: mingluan_xing@126.com

通讯作者: 徐立红, 教授, 博士生导师; E-mail: xulihong@zju.edu.cn, Tel: 0571-88208265

200 μ L 缓冲液清洗细胞一次。最后将细胞重悬于 190 μ L 缓冲液中, 再加入 10 μ L PI, 随后送流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 caspase-3 酶活性检测 按照试剂盒说明书进行操作。

收集不同浓度 OA 作用 4 h 后的细胞, 取 300 μ L 细胞悬液(细胞密度为 1×10^6 cell/mL) 置于清洁离心管中, 加入 1 μ L 的 FITC DEVD-FMK 工作液, 轻击管壁使悬液混合均匀, 在 37°C, 5%CO₂ 的环境中避光温育 1 h。后以 3000 r/min 5 min 离心, 去上清, 再用 0.5 mL 洗液清洗细胞两次。最后用 150 μ L PBS 将细胞重悬, 加入 96 孔黑板中, 用酶标仪在 $E_{\lambda}485/E_m535$ nm 处检测荧光强度。

1.7 结果分析 将各剂量组的结果分别与对照组相比, 数据分析采用 SPSS 10.0 的 Dunnett-t 检验法。

2 结 果

2.1 OA 对细胞贴壁状态的影响

由图 1 可见, OA 对 FL 细胞的贴壁有很大的影响, 在毒素处理 4h 后 100 nmol/L 浓度组的细胞基本回缩变圆, 胞膜

边界清晰; 与对照组相比, 细胞形态明显不佳, 说明 OA 对 FL 细胞的胞膜有一定损伤, 从而降低了其贴壁能力。

2.2 OA 对细胞活力的影响

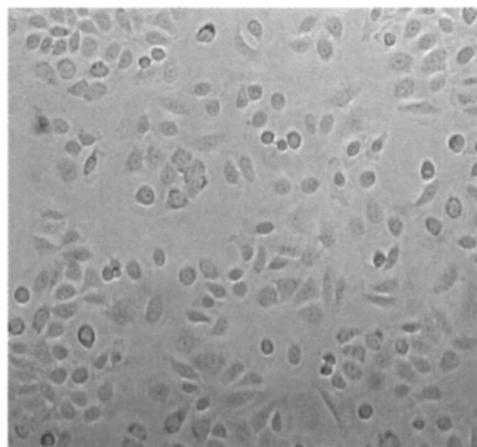
图 2 提示 OA 对 FL 细胞增殖力的影响存在随染毒剂量升高而增强的趋势。其中 100 nmol/L OA 浓度组的 MTT 吸光度值与对照组相比, 其差异具有统计学意义($p < 0.01$)。

2.3 OA 诱导细胞凋亡的情况

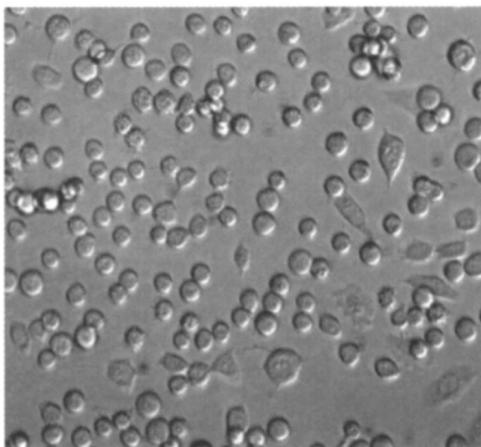
由图 3 可知, 不同浓度的 OA 对 FL 细胞凋亡的诱导呈现明显的剂量效应关系, 并且各剂量组的凋亡率与对照组相比, 其差异都具有统计学意义($p < 0.01$ 或 $p < 0.001$)。其中 100 nmol/L OA 浓度组的凋亡率高达 21%。

2.4 OA 对细胞 caspase-3 酶活性的影响

在显示不同浓度 OA 对 FL 细胞 caspase-3 酶活影响的图 4 中, FL 细胞的 caspase-3 酶活对 OA 的诱导有一定反应, 其中 20, 40, 100 nmol/L 剂量组的荧光值与对照组相比差异具有统计学意义($p < 0.01$), 而 60, 80 nmol/L 剂量组的 caspase-3 酶活则变化不明显。



A 对照组



B 100 nmol/L

图 1 OA 作用 4h 对 FL 细胞形态的改变(100 \times)

Fig. 1 Morphology of human amnion cells exposed to 100 nmol/L OA for 4h

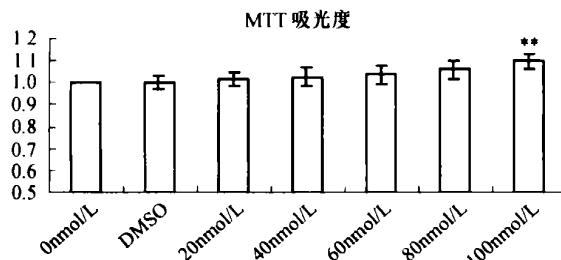


图 2 不同浓度 OA 对 FL 细胞活力的影响

Fig. 2 Effects of different doses of OA on proliferation of human amnion cells
(n= 3, ** $p < 0.01$)

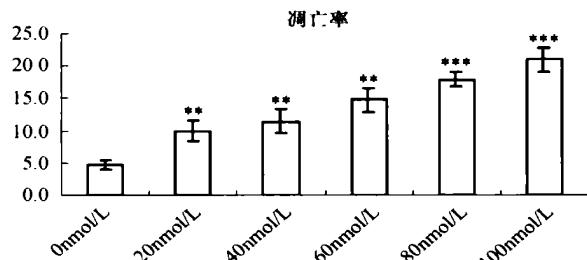


图 3 不同浓度 OA 对 FL 细胞凋亡的诱导

Fig. 3 Apoptotic effect induced by different doses of OA on human amnion cells
(n= 3, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

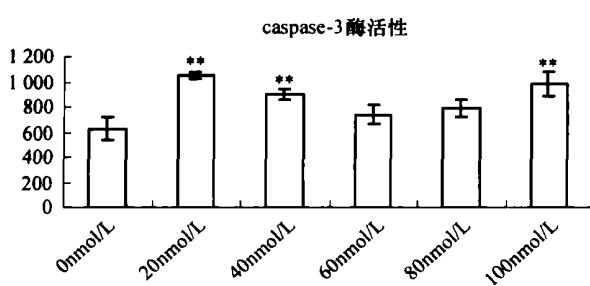


图 4 不同浓度 OA 对 FL 细胞 caspase 3 酶活性的影响

Fig. 4 Effect of different doses of OA on caspase-3 activity on human amnion cells

3 讨 论

长期以来, OA 就因其毒作用机制的复杂性受到众多学者的关注。本实验的结果再次证实了这一观点。在本次实验设定的染毒时间里, FL 细胞的贴壁状态随 OA 浓度的升高而逐渐减弱(对照组与最高浓度组的细胞形态如图 1 所示,其余浓度未列出),表明 OA 对胞膜骨架有一定影响。曾有学者报道,人肾近端小管表皮细胞(RPTE)在 100 nmol/L OA 诱导 24h 后, β -catenin, 一种涉及连接粘贴等多种功能的蛋白被水解, 其中在已呈漂浮状态的细胞中这一现象尤其明显^[4]。另外用 20 nmol/L OA 诱导鼠角化细胞 308^[5] 24h 后细胞明显变圆,失去连接和贴壁功能,与本实验非常类似;因此在本课题的后续研究中,电镜观察胞膜具体形态的改变,探索粘附蛋白对 OA 的反应情况,不但可以确凿验证 OA 对骨架蛋白的影响,更有助于阐明 OA 的胞膜毒作用机制。

肿瘤发生的基础源自细胞的无限增生,而过度增殖和凋亡的存在以前一直被认为是一对矛盾的反应,但是 OA 却似乎具有使两者共存的能力。本实验中反映细胞增殖活力的经典 MTT 比色法和灵敏反映细胞早期凋亡的 PI/Annexin V 双标法显示,对 FL 染毒 4h, OA 既促进增殖,又诱导凋亡,其中凋亡效应更为灵敏和明显。此现象与 Lenga A^[6]等人的实验结论: OA 对细胞有丝分裂的抑制与凋亡诱导是通过不同途径而实现的,有较好一致性。他们发现在 15 nmol/L OA 诱导白血病细胞 K562 的前 24h 内,增殖率与凋亡率都呈上升趋势,24h 后前者显著下降,后者仍不断升高。因此,为能合理解释 OA 促肿瘤和促凋亡的内在联系,实验的染毒剂量,处理时间,细胞类型,生长阶段等限制因素的摸索和比较将是今后的又一个重要方向。

Caspase 是一个半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡中有着极其重要的作用。正常情况下, caspase 均以酶原形式存在于细胞内,受各种凋亡信号刺激后,经蛋白水解酶转换为具有切割底物能力的活性形式,活化的 caspase 再通过特异性地裂解底物而发挥其执行细胞凋亡的功能。所有 caspase 家族

成员里, caspase-3 是研究得最多的一种,被称为死亡蛋白酶。在各种凋亡诱导细胞中,被激活的 caspase-3 能特异性酶切许多维持细胞生命活动的重要功能蛋白,从而促进细胞凋亡^[7]。荧光 FITC 标记的 DEVD-FMK 是特异性的 caspase-3 抑制剂,可以与激活的 caspase-3 酶活性中心共价结合,通过 FITC 荧光强度的检测可以间接反映胞内 caspase-3 的活化情况。在本实验中, OA 染毒 4h, 各剂量组的 caspase-3 酶活变化不一,尽管 20, 40, 100 nmol/L 组中酶活都不同程度地增强,而且与对照组相比差异有统计学意义,但总体来讲,剂量效应关系并不明显。另外在 OA 染毒 2h, 6h 时, caspase-3 的酶活变化也都不明显(具体图表未列出)。综合 caspase-3 在凋亡细胞中早期激活,晚期逐渐失活并被分泌排出^[8]的生化特征以及三个时间段的实验结果,初步推断 caspase-3 在 OA 诱导的 FL 细胞凋亡中可能只起到了部分作用,与此前的报道^[2]: OA 的凋亡启动可能通过不同的 Caspase 进行,也可能通过非 Caspase 依赖的途径进行相符,具体结论还有待今后更全面的研究考证。

参考文献:

- [1] Fernández J J, Cárdenas M L, Souto M L, et al. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes [J]. *Curr Med Chem*, 2002, **9**: 229—262
- [2] Rossini G P, Sgarbi N, Malaguti C. The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms [J]. *Toxicology*, 2001, **159**: 763—770
- [3] Wu J M, Yu Y N, Chen X R. Stable expression of human cytochrome P4502B6 in mammalian cell lines [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1996, **10**(2): 131—135 [吴健敏, 余应年, 陈星若. 人细胞色素 P4502B6 在哺乳类细胞中的稳定表达. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, **10**(2): 131—135]
- [4] Wong V Y, Keller P M, Nuttall M E, et al. Role of caspases in human renal proximal tubular epithelial cell apoptosis [J]. *Europ J Pharmacol*, 2001, **433**: 135—140
- [5] Abiodun Elegbede J, Hayes K, Shell K, et al. Induction of apoptosis and inhibition of papilloma formation may signal a new role for okadaic acid [J]. *Life Scienc*, 2002, **71**: 421—436
- [6] Lenga A, Richard C, Delgado M D, et al. Apoptosis and mitotic arrest are two independent effects of the protein phosphatases inhibitor okadaic acid in k562 leukemia cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **260**: 256—264
- [7] Shiozaki E N, Yigong S. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, **29**(9): 486—494
- [8] Smolewski P, Grabarek J, Halička H D, et al. Assay of caspase in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis [J]. *J Immunol Meth*, 2002, **265**: 111—121