

研究简报

荧光标记法检测不同毒物对细胞骨架的影响

邢鸣鸾 朱 欣 王晓峰 傅文宇 徐立红

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

STUDY OF CYTOSKELETAL CHANGES INDUCED BY DIFFERENT TOXICANTS BY MEANS OF FLUORESCENT LABEL

XING Ming-Luan, ZHU Xin, WANG Xiao-Feng, FU Wen-Yu and XU Li-Hong

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

关键词: 细胞骨架; 荧光标记; 大田软海绵酸; 微囊藻毒素; 三丁基锡; 六价铬

Key words: Cytoskeleton; Fluorescent label; Okadaic acid; Microcystin-RR; TBT; Cr (VI)

中图分类号: Q245 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)06-0912-03

细胞骨架 (Cytoskeleton) 主要由微管 (Microtubule, MT)、微丝 (Microfilament, MF) 以及中间丝 (Intermediate filament, IF) 这三种类型组成。它们在细胞的形态维持、物质运输、信号转导、能量转换及细胞的运动和分裂等多个过程中发挥着重要的作用。其中, 由肌动蛋白组成的微丝是真核细胞中含量最丰富的一种蛋白复合体, 以解聚时的球状肌动蛋白 G-actin (Globular actin) 或聚合时的纤维状肌动蛋白 F-actin (Filamentous actin) 形式存在。正常细胞中肌动蛋白两种形态的转换处于动态平衡, 共同行使细胞的变形运动、胞质分裂、基质附着和胞间连接等多项功能^[1,2]。因此, MF 是反映外源性毒物破坏细胞骨架的常用指标。

水体污染物种种类繁多, 危害严重。大田软海绵酸 (Okadaic acid, OA) 和微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 分别是赤潮和水华毒藻产生的生物毒素, 因其潜在的促癌及致癌特性而备受关注^[3,4]。目前已分离鉴定出 MCs 的异构体 80 多种, 毒性较大的主要是 LR、RR 和 YR。对 OA 和 MC 毒作用机制的探讨一直是国内外学者多年的研究热点。此外, 水体中的金属污染现状也不容乐观。国内有不少地方由于受到工业废水的污染, 生活饮用水中的 Cr (VI) 含量已严重超过 WHO 所规定的标准, 该价态重金属不但具有肝脏毒性, 还是一种致癌剂^[5], 对人类健康的威胁是不容忽视的。另外, 由于富含

TBT 等有机锡类化合物船体涂料的广泛使用, 海洋环境已受到多毒性效应物质 TBT 的严重污染^[6]。尽管这几种毒物的毒性特点各不相同, 但无一例外都具有很强的细胞毒性。本文通过特异性微丝荧光标记法来观察上述 4 种毒物对细胞骨架的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人羊膜细胞 HL 购于 ATCC 公司。大田软海绵酸 (OA, 纯度 95%) 和 FITC 标记的 Phalloidin 购自 Sigma 公司; MC-RR 由日本名城大学 Harada 教授赠送, TBT-Cl 购自 Acros 公司, $K_2Cr_2O_7$ 为基准试剂 (含量 99.95%—100.05%), 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; 其余试剂均为分析纯。荧光显微镜为 Olympus CX41。

1.2 方法

细胞培养及处理 HL 细胞以含 10% 新生牛血清的 MEM 培养基在 37℃ 及 5% CO_2 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。细胞按 1×10^5 cell/mL 的密度接种于培养皿内 (其中有事先放入的经无菌处理的 10 mm \times 10 mm 小玻片, 贴壁生长 24h 后, 在培养体系中分别加入 OA、MC-RR、TBT 和 Cr (VI) 至终浓度分别为 100 nmol/L、

收稿日期: 2006-03-29; 修订日期: 2007-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助 (20137010) 资助

作者简介: 邢鸣鸾 (1979—), 女, 汉族, 浙江人; 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。Tel: 0571-87217056, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

1 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 。作用 4h 后终止染毒。

细胞形态和骨架改变的观察 至染毒终点后,细胞立即于光镜下拍照。随后吸弃培养基,PBS 洗两次。细胞骨架的荧光染色具体步骤如下:(1) 3.7% 甲醛固定 10min (2) PBS 洗 3 次,每次 5min (3) 丙酮快速脱水后,0.1% Triton X-100 透化处理 15min (4) PBS 洗,步骤同 2 (5) FITC 标记的鬼笔环肽(phalloidin)室温避光反应 40min (6) PBS 洗去未结合的荧光染料,甘油封片镜检。

2 结果和讨论

鬼笔环肽(Phalloidin)是一种从有毒菌 *Amanita phalloides* 中所提取出来的真菌毒素。它能与细胞中的 actin 亚单位一比一结合,并且这种特异性结合只限于多聚体—纤维形 F-actin,而不针对单体—球形 G-actin,因此可专一性反应 actin 的聚合状态。荧光标记的鬼笔环肽对 F-actin 的检测限可达到纳克水平,为 F-actin 的定位和定量提供了非常方便的标记方法。另外,它在不同种类的生物中与 F-actin 的结合性质不变,非特异性信号可忽略,图像反差效果好,比 actin 的抗体标记更具优越性^[2]。

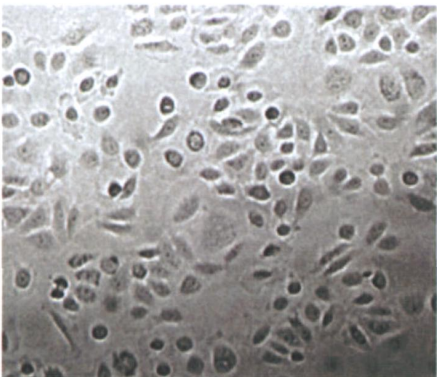
本实验中各毒物的染毒剂量系参考相应文献并结合实验室前期研究所得。经相同时间处理,光镜下就可明显观察到不同毒物对细胞形态的不同影响。如对照组中细胞均匀舒展,呈不规则状紧贴于生长环境;而 OA 和 TBT 染毒后,前者细胞明显回缩,变圆,黏附性显著降低,后者细胞则明显细长拉伸,呈梭状,黏附性的降低程度则相对较轻。虽同为藻毒素或金属毒物,MC-RR 和 Cr(VI)对细胞形态的影响无论用光镜还是荧光标记观察都不甚明显。而 OA 和 TBT 染毒后的细胞用荧光标记后则可明显观察到胞内 F-actin 瓦解、边聚,

不似对照组中 F-actin 如细丝状均匀密布于胞内。

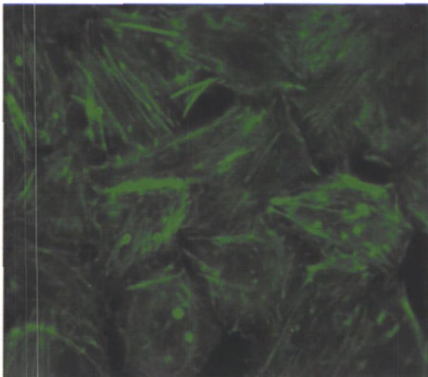
本实验所观察到的现象与各毒物破坏细胞骨架的相关报道有同有异^[3-6],一方面可能是细胞类型的差异所致,另一方面也可能与染毒剂量和处理时间的不同密切相关。因此从某种角度而言,更加表明荧光标记法客观反映了本实验条件下各毒物对细胞骨架的影响,是一种检测细胞骨架的简便直观、灵敏快速的好方法。

参考文献:

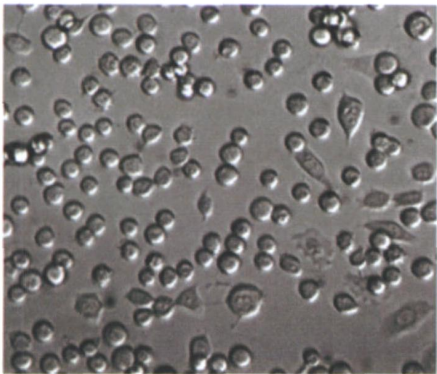
- [1] Bausen M, Fuhrmann J C, Betz H, *et al*. The state of the actin cytoskeleton determines its association with gephyrin:role of ena/ VASP family members [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, **31**(2):376—386
- [2] Liu J H, Cai X Y, He Q H. Application of confocal laser scanning microscopy in sytoskeleton research [J]. *China Medical Equipment*, 2005, **2**(6):49—51 [刘继红,蔡学泳,何其华. 细胞骨架的激光共焦研究技术. 中国医学装备, 2005, **2**(6):49—51]
- [3] Macias-Silva M, Garcia-Sainz J A. Inhibition of hormone-stimulated inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin [J]. *Toxicon*, 1994, **32**(1):105—112
- [4] Cabado A G, Leira F, Vieytes M R, *et al*. Cytoskeletal disruption is the key factor that triggers apoptosis in okadaic acid-treated neuroblastoma cells [J]. *Arch Toxicol*, 2004, **78**(2):74—85
- [5] Gunaratnam M, Grant M H. Chromium (VI)-induced damage to the cytoskeleton and cell death in isolated hepatocytes [J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(4):748—750
- [6] Cima F, Ballarin L, Bressa G, *et al*. Cytoskeleton Alterations by Tributyltin (TBT) in Tunicate Phagocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1998, **40**:160—165



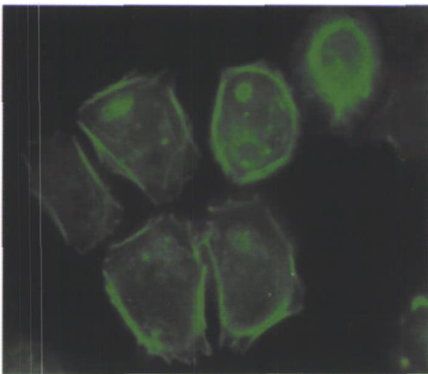
A. 对照 (光镜, ×100)



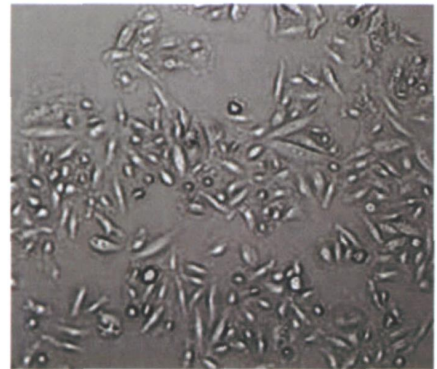
B. 对照 (荧光显微镜, ×1000)



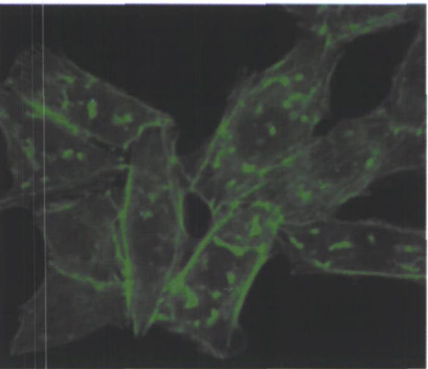
C. 100 nmol/L OA (光镜, ×100)



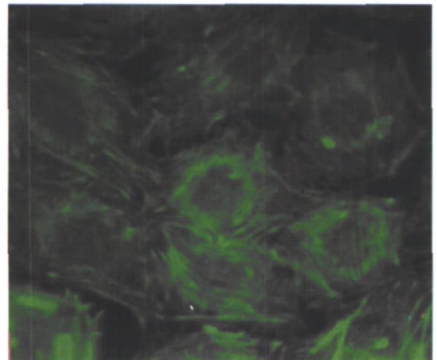
D. 100 nmol/L OA (荧光显微镜, ×1000)



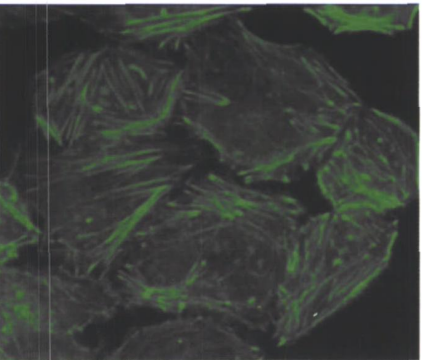
E. 4 μmol/L TBT (光镜, ×100)



F. 4 μmol/L TBT (荧光显微镜, ×1000)



G. 1 μmol/L MC-RR (荧光显微镜, ×1000)



H. 5 μmol/L Cr(VI) (荧光显微镜, ×1000)

图 1 各染毒组与对照组细胞的光镜形态及荧光骨架

Fig. 1 Changes of Morphology and F-actin depolymerization in HL cells induced by different toxicants