

大田软海绵酸对 FL 细胞 DNA 的损伤及凋亡相关蛋白表达的影响

邢鸣鸾¹ 楼建林² 徐立红¹

(1. 浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院环境医学系, 杭州 310058)

摘要: 本文旨在探讨大田软海绵酸对人羊膜细胞 DNA 的损伤及凋亡相关蛋白表达的影响。实验用 0、20、40、60、80、100 nmol/L OA 诱导 FL 细胞 4h 后, 检测 DNA 损伤程度的彗星实验表明, OA 对 FL 细胞 DNA 的损伤随染毒浓度的升高而增加。蛋白免疫印迹法显示凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 和 p53 的表达与染毒浓度呈负相关; 用 100 nmol/L OA 分别诱导 2h、4h、8h 后发现, 三种蛋白的表达与染毒时间也呈负相关。由此可知在 OA 诱导的 FL 细胞凋亡中, 损伤 DNA, 降低 Bcl-2 蛋白的表达可能参与了凋亡的部分作用, 而 Bax 和 p53 蛋白则可能与 OA 诱导的细胞增殖有关。

关键词: 大田软海绵酸; DNA 损伤; Bcl-2; Bax; p53

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0661-05

大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)是腹泻性贝毒(Diarrhetic shellfish poisoning, DSP)的主要成分之一, 主要由利马原甲藻(Prorocentrum lima)所产生^[1]。由于海洋生物对该毒素的滤食作用, OA 会在食物链的传递过程中蓄积, 人食用被 OA 污染的海产品后会发生急性中毒^[2]。另外, 在随血液的循环转运和代谢过程中 OA 还会对体内多种脏器造成损伤。目前, 对该毒素的肠道、肝脏、神经毒性研究较为透彻, 而对 OA 通过胎盘屏障引起生殖毒性的关注还相对不足^[3,4]。尽管大田软海绵酸作为多种细胞的凋亡诱导剂, 以及潜在的肿瘤促进剂甚至是原始致癌剂^[2]已得到普遍公认, 但由于其毒作用机制错综复杂, 至今尚未完全阐明, 因此, 非常有必要对此进行深入探讨。本实验采用人羊膜细胞 FL(Human amniotic cells)来研究 OA 对 DNA 的损伤及凋亡相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人羊膜细胞 FL 购于 ATCC 公司。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; Bcl-2 一抗(兔抗人多克隆抗体), Bax 一抗(小鼠抗人单克隆抗体), p53 一抗(山羊抗

人多克隆抗体)均购自 Santa Cruz 公司; 二抗(辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L), 辣根酶标记兔抗山羊 IgG(H+L))均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 内参照选用 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-磷酸甘油醛脱氢酶), 其一抗(小鼠抗人单克隆抗体)、二抗(辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L))均购自上海康成生物技术公司; ECL 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 公司; 硝酸纤维素膜购自 Bio-Rad 公司; 电泳装置为 Bio-Rad Mini PROTEAN[®] 3 cell。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

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。细胞按 1 × 10⁵ cell/mL 的密度接种于细胞培养瓶或六孔板中, 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。

细胞全蛋白的提取 OA 染毒终止后, 收集所有细胞(贴壁+脱壁)重悬于 150 μL 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 15 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, pH 值为 8.0)中, 冰上放置 30min 后, 离心(21000 r/min, 4℃) 30min, Bradford 法测定上

收稿日期: 2006-01-20; 修订日期: 2006-09-19

基金项目: 国家自然科学基金(20137010)资助

作者简介: 邢鸣鸾(1979—), 女, 汉族, 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

清液蛋白浓度，并按 $50 \mu\text{g}/\text{管}$ 将其分装， -80°C 保存备用。

Western Blot 检测 Bcl-2 、 Bax 和 p53 的表达

(1) 蛋白电泳及转移：蛋白样品与 $2\times$ 电泳加样缓冲液等体积混合，沸水中变性 5min 后上样电泳，积层胶 (5% SDS-PAGE) 50V, 30min, 分离胶 (12% SDS-PAGE) 90V, 110min。电泳结束后，100V 转膜 100min，将转移上蛋白的硝酸纤维素膜用 TBST 缓冲液 (50 mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% TWEEN-20, pH 值为 7.6) 短暂漂洗，于封闭液中(含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液) 室温温和振荡 3h。将膜放入一定稀释比的相应一抗中 (Bcl-2 为 1: 400, Bax 为 1: 150, p53 为 1: 200)，冰上温和震荡过夜。回收一抗后用 TBST 缓冲液洗膜 10min \times 3 次，再将膜放入稀释后的相应二抗中 (Bcl-2 、 Bax 、 p53 均为 1: 2000) 室温温和震荡 2h，回收二抗再用 TBST 缓冲液洗膜 10min \times 3 次。内参 GAPDH 封闭 2h，一抗、二抗稀释比均为 1: 5000，分别室温孵育 2h 和 1h。(2) 曝光、显影及定影：取 ECL 试剂盒中 A, B 液各 0.7 mL，混合均匀后覆盖于膜上，反应 2min 将膜放入暗盒内，用 X 光胶片进行曝光、显影及定影。以上操作均在暗室中进行。(3) 图像分析及处理：胶片扫描后用 image-pro plus 图像分析系统对 X 光胶片上的条带

进行灰度测定，结果以目的条带与内参照的灰度比值表示。考虑到各次实验结果的可比性，统计数据为各浓度组蛋白与对照组蛋白的灰度比值。

彗星试验 参照 Singh 的方法并适当改动^[5]。制备 0.5% 的正常熔点琼脂糖和 0.5% 的低熔点琼脂糖，取细胞悬液与 0.5% 低熔点琼脂糖混匀后加到预处理过的磨砂玻片上，经细胞裂解和 DNA 解旋后于 4°C 、电压 25V、电流 300mA 条件下电泳 25min，经过中和、EB 染色，低温避光，在荧光显微镜下观察测定。每片观察 50 个细胞核，用 image-pro plus 分析软件分析，结果以尾长 (Tail length, TL) 和尾相 (Tail moment, TM) 表示。

结果分析 各剂量组分别与对照组相比，数据分析采用 SPSS 10.0 的 LSD-t 检验法。 $p < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 FL 细胞在不同浓度 OA 染毒 4h 后 DNA 的损伤情况

由图 1 可知，OA 对 FL 细胞的 DNA 具有明显损伤效应，并存在一定的剂量依赖性。DNA 的损伤程度随 OA 染毒浓度的升高显著增加，各浓度组的尾长和尾相与对照相比，差异均具有统计学意义 $p < 0.01$ 。

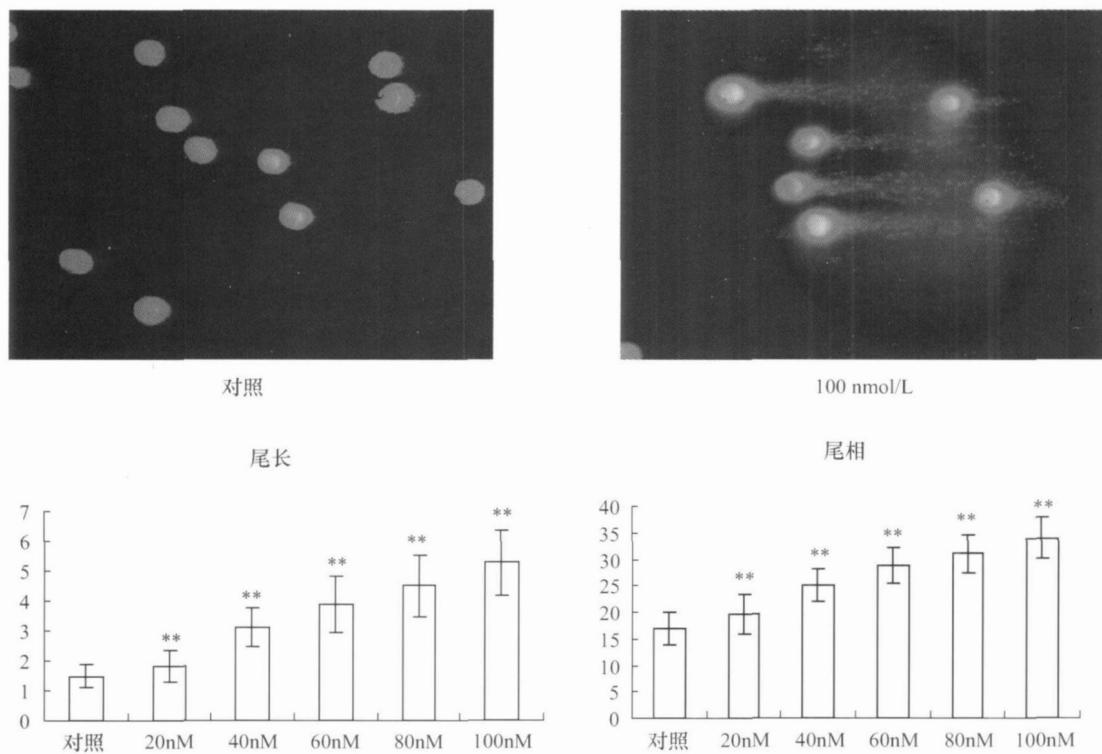


图 1 不同浓度 OA 染毒 4h 后 FL 细胞 DNA 的损伤 ($** p < 0.01$)

Fig. 1 The tail length and tail moment of FL cells treated by different dose of OA ($** p < 0.01$)

2.2 FL 细胞在不同浓度 OA 染毒 4h 后 Bcl-2、Bax 和 p53 蛋白的表达情况

图 2 显示, Bcl-2、Bax 和 p53 这三种蛋白的表达均随 OA 染毒剂量的增加而降低。其中 Bcl-2 在除 20nmol/L 浓度组外, 各处理组与对照组均存在统计学差异, Bax 则 80 nmol/L 及 100 nmol/L 两个浓度组与对照有统计学差异($p < 0.05$), 而 p53 的表达量则只在最高剂量组与对照组存在统计学差异($p < 0.05$)。

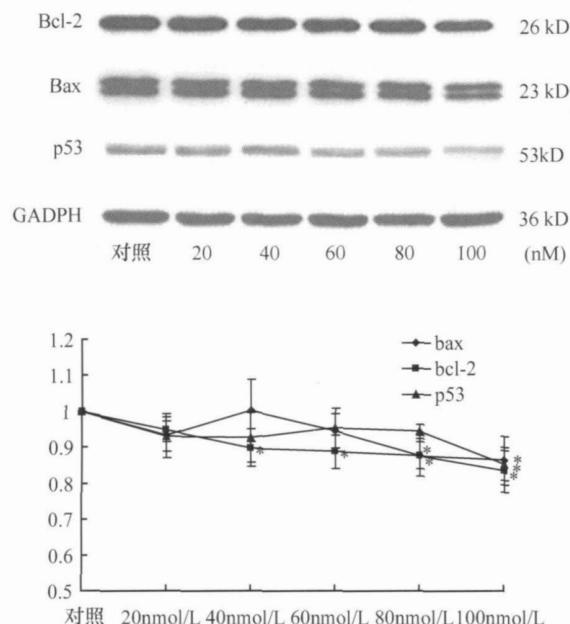


图 2 不同浓度 OA 作用 FL 细胞后 Bcl-2、Bax、p53 蛋白的表达 (* $p < 0.05$)

Fig.2 Protein expression of Bcl-2, Bax, p53 in FL cells treated by different dose of OA (* $p < 0.05$)

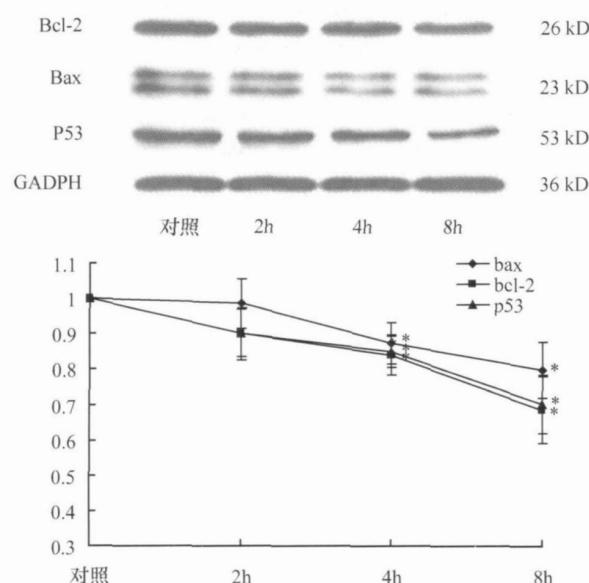


图 3 100nmol/L OA 染毒不同时间后 FL 细胞 Bcl-2、Bax、p53 蛋白的表达 (* $P < 0.05$)

Fig.3 Protein expression of Bcl-2, Bax, p53 in FL cells treated by 100nmol/L OA for different time (* $P < 0.05$)

2.3 FL 细胞在 100nmol/L OA 染毒不同时间后 Bcl-2、Bax 和 p53 蛋白的表达情况

Bcl-2、Bax 和 p53 蛋白的表达除了在特定染毒时间下随 OA 剂量的增加而下降外, 图 3 显示在 100nmol/L 浓度的 OA 染毒时, 以上三种蛋白还随染毒时间的延长而降低表达。处理 4h、8h 后 Bcl-2、Bax 和 p53 的表达与对照组相比差异都有统计学意义($p < 0.05$)。

3 讨 论

癌变和凋亡是一对矛盾的生命取向, 而 OA 却同时具有诱发和促进这两大作用的特点。从一定程度上讲细胞是否发生癌变或凋亡, 蛋白质的磷酸化平衡起到了极其重要的作用。这一平衡的维持主要由蛋白激酶(Protein kinases, PK)和磷酸酶(Protein phosphatases, PP)调控, 其中蛋白磷酸酶 1(Protein phosphatase 1, PP1)和蛋白磷酸酶 2A(Protein phosphatase 2A, PP2A)是最重要的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)类蛋白磷酸酶^[6], 而 OA 是蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的有效抑制剂已得到了普遍证实, 所以它具有诱导癌变和促进凋亡的双重效应。本实验中一些看似矛盾的变化也体现了这一点。

在 OA 的毒作用机制研究过程中, 对其 DNA 损伤效应的报道相对较少, 而且存在矛盾之处^[7]。彗星实验是一种快速、灵敏检测 DNA 断裂的方法, 常采用尾长和尾相来表示 DNA 的损伤程度。本实验通过该方法发现 OA 能明显损伤 FL 细胞的 DNA, 各剂量组的尾长和尾相与对照相比差异都非常显著($p < 0.05$)。前阶段的实验已阐明本实验采用的系列浓度染毒 4h 后, 细胞的凋亡率和增殖力都呈上升趋势^[8]。因此 OA 对 FL 细胞 DNA 的损伤与凋亡率上升的这种正相关趋势提示 DNA 的损伤在 OA 诱导 FL 细胞凋亡的机制中可能起到部分作用。尽管 OA 对 FL 细胞和 Caco-2 人结肠细胞^[9]都有明显的 DNA 损伤效应, 但本实验发现 p53 蛋白的表达并没有随 DNA 损伤程度的加剧而增高, 反而呈相反的下降趋势, 因此, 两者间的具体关联和损伤机制仍需进一步研究。另外, Matias 等人已研究表明大田软海绵酸能通过胎盘屏障蓄积于胚胎组织^[4], 结合本实验中肿瘤抑制基因 p53 蛋白表达的降低, 不排除 OA 严重危害胚胎的生长发育甚至致癌的可能。

与 p53 蛋白的表达情况类似, Bcl-2 和 Bax 的表达也随染毒浓度的升高而下降。另外, 在 100 nmol/L 浓度的 OA 染毒情况下, 三种蛋白的表达还随时间

的延长而降低。Bcl-2 蛋白家族成员众多且功能各异。如 Bcl-2 增高, 抑制细胞凋亡; 而 Bax 或 Bad 增高则促进细胞凋亡。单从 Bcl-2 蛋白表达的减少而言与以前的凋亡结果是非常相符的, 并且 Bcl-2 蛋白的减少可能是通过降低 mRNA 的稳定性而达到的^[10], 但本实验中 Bax 和 p53 表达的降低与上升的凋亡率显然是矛盾的。该结果一方面间接提示 Bax 和 p53 在 OA 诱导 FL 细胞凋亡的途径中调控作用不明显, 另一方面则暗示这两种蛋白表达的改变有影响其他细胞生物学过程的可能。联系 OA 的促癌甚至致癌特性及本实验室前阶段的 OA 诱导 FL 细胞增殖力上升的结果^[8], 推测: 与 OA 降低 p53 mRNA 水平, 减少 Bad 蛋白表达的结果^[11, 12]类似, 降低促凋亡蛋白的表达, 维持细胞的存活甚至增殖也许是 OA 抗衡凋亡诱导的一种特殊方式, 甚至可能是一种癌变的机制。

由于 OA 具有导致蛋白过度磷酸化的特征, 而本实验因未检测蛋白质的磷酸化情况, 故不排除 p53 和 Bax 的磷酸化蛋白总量也呈上升趋势的可能, 所以 p53 和 Bax 在 OA 诱导的 FL 细胞凋亡中的作用和确切的凋亡机制仍有待下一步实验的探讨。

4 结 论

大田软海绵酸能损伤 FL 细胞的 DNA, 其严重程度与染毒浓度正相关。Bcl-2, Bax 和 p53 三种蛋白的表达与大田软海绵酸的染毒剂量和染毒时间则负相关。综合本实验室前阶段的凋亡诱导结果^[8], 发现 OA 对 FL 细胞 DNA 的损伤和凋亡相关蛋白表达的影响都与凋亡率的升高存在关联。

参考文献:

- [1] Ferrández 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] Lago J, Santacilla F, Vieites J M, et al. Collapse of mitochondrial membrane potential and caspases activation are early events in okadaic acid-treated Ca²⁺-2 cell [J]. *Toxicon*, 2005, **46**(5): 579—586
- [3] Fujiki H, Sueoka E, Komori A, et al. Tumor promotion and TNF- α gene expression by the okadaic acid class tumor promoters [J]. *Environ Carcinog Ecolotoxicol Rev*, 1997, **15**: 1—40
- [4] Matias W G, Creppy E E. Transplacental passage of [³H]-okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and high-performance liquid chromatography [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1996, **15**(3): 226—230
- [5] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res*, 1988, **175**(1): 184—191
- [6] Moncada A, Cendán C M, Baeyens J M, et al. Effects of serine/threonine protein phosphatase inhibitors on morphine induced antinociception in the tail flick test in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, **465**: 53—60
- [7] Le Hégarat L, Puech L, Fessard V, et al. Aneugenic potential of okadaic acid revealed by the micronucleus assay combined with the FISH technique in CHO-K1 cells [J]. *Mutagenesis*, 2003, **18**(3): 293—298
- [8] Xing M L, Chen J P, Wang X F, et al. Effect of okadaic acid on apoptosis in human amnion cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 606—608 [邢鸣鸾, 陈加平, 王晓峰, 等. 大田软海绵酸对 FL 细胞凋亡的影响. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 606—608]
- [9] Traore A, Baudrimont I, Ambalipu S, et al. DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line [J]. *Arch Toxicol*, 2001, **75**(2): 110—117
- [10] Bandyopadhyay S, Sengupta T K, Fernandes D J, et al. Taxol- and okadaic acid-induced destabilization of bcl-2 mRNA is associated with decreased binding of proteins to a bcl-2 instability element [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, **66**(7): 1151—1162
- [11] Milczarek G J, Chen W, Gupta A, et al. Okadaic acid mediates p53 hyperphosphorylation and growth arrest in cells with wild-type p53 but increases aberrant mitoses in cells with non-functional p53 [J]. *Carcinogenesis*, 1999, **20**(6): 1043—1048
- [12] Yoon S Y, Choi J E, Yoon J, et al. Okadaic acid induces JNK activation, bim overexpression and mitochondrial dysfunction in cultured rat cortical neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2006, **394**(3): 190—195

DNA DAMAGE AND ALTERATION OF EXPRESSION IN APOPTOSIS RELATED PROTEINS INDUCED BY OKADAIC ACID IN FL CELLS

XING Ming-Luan¹, LOU Jian-Lin² and XU Li-Hong¹

(1. Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058;

2. Institute of Environmental Medicine, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract: The objective of this work was to evaluate deoxyribonucleic acid (DNA) damage and expression of Bcl-2, Bax, p53 proteins in okadaic acid-treated human amniotic FL cells. Cells were cultured for 4 h with 0, 20, 40, 60, 80 and 100 nmol okadaic acid (OA), or 100 nmol OA for periods of 2, 4 and 8 h. Comet assay results indicated that DNA damage was a dose-dependent increase and western blot analysis showed that the expression of Bcl-2, Bax, p53 proteins was time- and dose-dependent decrease. Therefore, it suggested that DNA damage and Bcl-2 might play a partial role in OA-induced FL cell apoptosis, and on the contrary, Bax and p53 were related to the proliferation of FL cell.

Key words: Okadaic acid; DNA damage; Bcl-2; Bax; p53