论著

文章编号:1000-5404(2005)18-1820-03

硫芥对大鼠脾脏淋巴细胞线粒体的损伤作用

曾 惠[1],刘 勇[1],朱明学[2],张黎明[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系,上海 200433)

提 要:目的 观察硫芥对大鼠脾脏淋巴细胞线粒体的损伤作用。**方法** 用密度梯度离心法分离大鼠脾淋巴细胞,与硫芥共同进行体外培养。用琼脂糖DNA凝胶电泳观察细胞凋亡的发生;用Western blot观察Cyt-c释放。用MTT法检测线粒体功能状态,以罗丹明123标记的荧光探针检测线粒体跨膜电位。**结果** 100 μmol/L硫芥作用4 h线粒体功能就有降低,线粒体跨膜电位降低,二者间呈直线相关。硫芥中毒早期即可引起淋巴细胞线粒体细胞色素C释放和细胞凋亡(DNA ladder)。**结论** 硫芥可引起大鼠脾淋巴细胞线粒体明显损伤,线粒体参与了硫芥的细胞毒性作用过程。

关键词:硫芥;淋巴细胞;Cyt-c;线粒体功能;跨膜电位;DNA ladder
中图法分类号:R322.21;R392.12;R827.174 **文献标识码**:A

The damaging effect of sulfur mustard on the mitochondria in rat lymphocytes *in vitro*

ZENG Hui[1], LIU Yong[1], ZHU Ming-xue[2], ZHANG Li-ming[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To investigate the damaging effect of sulfur mustard on the mitochondria in rat lymphocytes *in vitro*. Methods Rat spleen lymphocytes were isolated by density gradient centrifugation and cultured with 100 μmol/L sulfur mustard *in vitro*. DNA ladderring was used to detect the cell apoptosis. Cyt-c release was measured by Western blotting. The mitochondria function was detected by MTT method. Fluorescent probe labeled with Rhodamine 123 was used to study mitochondria potential. Results The mitochondria potential and cell viability decreased at 4 h after treated with 100 μmol/L sulfur mustard. There was a liner correlation between the mitochondria potential and cell viability in lymphocytes. The content of Cyt-c increased significantly at 4 h as compared with control group in Western blotting. Conclusion Sulfur mustard could damage the rat lymphocyte mitochondria significantly, and mitochondria participates in cytotoxic effect induced by the sulfur mustard.

Key words: sulfur mustard; lymphocyte; Cyt-c; mitochondria function; patmitochondria potential; DNA ladder

线粒体是控制真核细胞生长繁殖、死亡的重要细胞器,硫芥诱导细胞内出现的钙离子超载、GSH含量下降、以及NAD^+的消耗,均可直接或间接影响线粒体结构和功能。由于低剂量硫芥可诱导细胞凋亡[1],且线粒体在细胞凋亡的中心作用已被确定[2],本研究应用硫芥对离体淋巴细胞毒性作用模型,通过检测线粒体功能状态、细胞损伤的染色体DNA断裂情况,以观察硫芥所致线粒体损伤与淋巴细胞毒性作用的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备 离心机(上海TGL-16),低温冷冻离心机(Sigma 3-16K),细胞培养箱(美国Shel-LAB),电泳仪,酶标仪、电泳凝胶成像系统。

1.1.2 重要试剂 如无特指均为国产分析纯;硫芥为军事医学科学院六所提供,纯度为97.5%,先用1,3丙醇配成1%母液,临用时用生理盐水稀释至所需浓度;RPMI1640培养液(Hyclone产品),溴化乙锭(Sigma),淋巴细胞分离液(上海),MTT、小牛血清、Cyt-c抗体(晶美)。

1.1.3 实验动物 Wistar大鼠,40只,雌雄各半,体质量

基金项目:全军"十五"计划指令性课题医学科学技术研究重点项目(01L054)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01L054)

作者简介:曾 惠(1978-),女,四川省隆昌县人,硕士研究生,主要从事烷化物的毒作用机制方面的研究。电话:(023)68775174
通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285

收稿日期:2004-06-22;修回日期:2005-04-21

(180 ± 20)g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2　方法

1.2.1　大鼠脾淋巴细胞分离培养　　取 Wistar 大鼠无菌剖腹取脾剪碎,加适量 RPMI1640 培养液,100 目尼龙网过滤,等量培养液洗 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入适量培养液制成脾细胞悬液,后用淋巴细胞分离液分离,2 000 r/min 离心 20 min,吸取中层云雾状液面层,适量培养液洗 2 次,1 500 r/min 离心 10 min,用苔盼蓝测细胞活性 > 95%,调整细胞计数 10^6 个/ml,5% CO_2,37 ℃孵箱培养 24 h 备用。

1.2.2　中毒模型的建立　　取培养瓶按终浓度为 10^{-5} mol/L 加入硫芥。取 24 孔培养板,在培养瓶中加入硫芥后,再加到 24 孔培养板,继续培养至所需时间,分别于 0、4、8、12、24、48 h 取样做后续检测。

1.2.3　细胞染色体 DNA 断裂的测定　　离心收集 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞,PBS 洗 2 次,加 50 μl 的细胞裂解液,混匀,37℃孵育保温至混合物变得清亮,在台式高速离心机中,以室温12 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至另一洁净的微量离心管中,以等体积的苯酚/氯仿(1∶1)、苯酚/氯仿/异丙醇(25∶24∶1)和氯仿各提取 1 次,取上清,加入 1/10 体积醋酸钠和 2 倍体积的冷乙醇,于 -20 ℃沉淀过夜,在台式高速冷冻离心机中 -10 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀溶于 20 μl TE 缓冲液中,加入 1 μl RNA 酶,37 ℃保温 1 h;取 10 μl 反应产物和 5 μl 上样缓冲液于 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,电泳完毕,将电泳凝胶置于 Gel Doc2000 凝胶图像扫描分析系统,扫描图像。

1.2.4　细胞色素 c 的检测　　收集培养的淋巴细胞,PBS 洗涤,按细胞(10^7/ml)加入细胞裂解缓冲液。冰浴 3 min,转速 2 000 r/min,匀浆 3 min;将裂解液移至 EP 管中 16 000 r/min 40 ℃离心 25 min,上清液为胞浆成分。Bradford 法定蛋白含量。每组取 50 μg 蛋白。用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色标记 Marker,然后转移至 PVDF 膜上,于封闭液中进行封闭,经封闭洗涤后加入小鼠抗大鼠 Cyt-c 抗体(1∶600),4 ℃孵育过夜。洗涤,然后与过氧化物酶标记的大鼠抗小鼠 IgG,浓度是 1∶500 常温孵育,DAB 显色液中显色,蒸馏水清洗终止反应,图像扫描。

1.2.5　线粒体跨膜电位检测　　收集前述中毒淋巴细胞,PBS 漂洗 2 次,细胞为(1 ~ 2) × 10^6/ml,罗丹明 123(Rh123)加入到单细胞悬液中,使其终浓度为 10 μg/ml(避光),室温放置 30 min。PBS 缓冲液漂洗 3 次,洗去没有结合的染料,流式细胞仪检测细胞 Rh123 荧光强度度,以处理组细胞的荧光强度与正常细胞的比值为相对跨膜电位。

1.2.6　线粒体功能的检测　　将前述中毒细胞按 10^6 接种于 96 孔板上,孵育至相应时相点取出,3 000 r/min,离心 5 min,弃上清。用约 180 μl D-Hanks 洗涤 1 次,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清,加入 160 μl 无血清 1640,20 μl MTT,孵育 4 h,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 150 μl DMSO 显色,震荡 10 min,在酶标仪上读取数值。

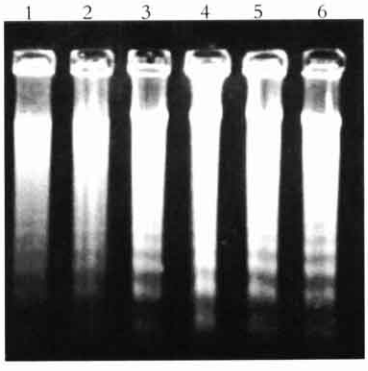
1.3　统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包行单因素方差分析、线性相关分析(Bivarite)和直线回归分析(Linear Regression)。图像结果用凝胶成像系统扫描后用图像分析计算机软件处理。

2　结果

2.1　DNA 凝胶电泳结果

对细胞凋亡的生化标志指标 DNA 片段化(DNA fragmentation)的检测结果表明:在琼脂糖凝胶电泳图上,正常脾淋巴细胞 DNA 完整,未见 DNA 片段;硫芥处理淋巴细胞 4 h,出现由 DNA 断裂造成的 DNA 片段的梯带现象(DNA ladder)(图 1)。



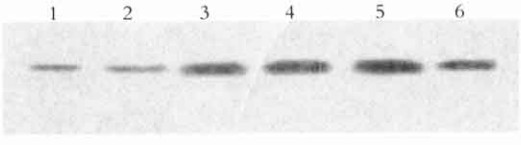
1: Control; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h

图 1　100 μmol/L 硫芥诱导淋巴细胞的 DNA 梯带图谱

Fig 1　DNA ladder in lymphocytes induced by 100 μmol/L sulfur mustard

2.2　线粒体 Cyt-c 的释放

Cyt-c 的释放是线粒体途径细胞凋亡的早期事件。Western Blot 结果显示 100 μmol/L 硫芥作用后 4 h,Cyt-c 条带浓度明显比正常增加,一直持续至中毒后 8 h(图 2)。



1: 48 h; 2: 24 h; 3: 12 h; 4: 8 h; 5: 4 h; 6: Control

图 2　100 μmol/L 硫芥诱导淋巴细胞释放 Cyt-c

Fig 2　Cyt-c release in lymphocytes induced by 100 μmol/L sulfur mustard

2.3　线粒体整体功能的变化

硫芥处理淋巴细胞后,其线粒体功能在中毒 4 h 就有降低,但统计学无明显差异,在中毒 8 h 显著下降($P < 0.01$)(表 1)。

2.4　线粒体跨膜电位($\Delta\Psi m$)的变化

Rh123 是由线粒体吸收的一种阳离子亲脂性染料,对膜具有通透性。正常活细胞线粒体内外膜间存在跨膜电位,细胞内摄取 Rh123 量与线粒体跨膜电位呈正相关。因此计算膜电位的增减,可反映线粒体膜的通透性,是研究线粒体形态的良好指标。

100 μmol/L 硫芥处理淋巴细胞后 4 h 线粒体 $\Delta\Psi m$ 即发生明显下降,实验组与对照组有显著性($P < 0.05$)或非常显著性差异($P < 0.01$)(表 1)。

表1 100 μmol/L 硫芥处理后淋巴细胞(10^6个)线粒体整体功能和跨膜电位改变($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Changes of mitochondria function of 10^6 lymphocytes induced by 100 μmol/L sulfur mustard ($n=5, \bar{x} \pm s$)

	Control	Time (h)				
		4	8	12	24	48
MTT(OD)	0.127 ± 0.044	0.088 ± 0.025	0.049 ± 0.012 **	0.044 ± 0.015 **	0.037 ± 0.043 **	0.014 ± 0.01 **
MMP	155.36 ± 13.07	141.08 ± 9.01 *	136.12 ± 9.00 *	132.29 ± 9.15 **	123.85 ± 8.82 **#	—

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, *vs* 4 h group

2.5 硫芥中毒淋巴细胞线粒体结构与线粒体功能的关系

对线粒体结构(跨膜电位)与线粒体功能(MTT)进行直线相关和回归分析,相关系数 $r=0.968$,双侧 $P<0.05$,存在正相关关系。直线回归分析显示回归模型 $F=44.691$, $P=0.007$,回归系数检验的 $t=6.685$, $P=0.007$。提示硫芥中毒淋巴细胞线粒体结构改变和线粒体功能变化趋势具有一致性,线粒体功能变化滞后于跨膜电位变化。

3 讨论

硫芥是一种双功能烃化剂,能烃化体内生物大分子造成各种损伤,它的细胞毒性效应的结果主要是细胞凋亡和坏死。近年来,低剂量硫芥所致的细胞凋亡较受关注。解释细胞凋亡的理论也很多,其中线粒体的作用已被确定:线粒体不仅是细胞的能量工厂,也是细胞的兵工厂[3]。分离的线粒体或线粒体成分可诱导细胞核出现凋亡特征性变化[4]。线粒体通过以下几种方式调控细胞凋亡:一是电子传递、氧化磷酸化和ATP产生功能的解体;二是触发胱冬肽酶家族活化蛋白的释放;三是改变细胞的氧化还原状态[3]。已有的研究认为细胞凋亡过程中存在线粒体改变:线粒体肿胀、巨线粒体的形成、线粒体固缩以及线粒体基质肿胀及外膜破溃等[5]。我们的结果表明,在100 μmol/L硫芥作用下,淋巴细胞染色体DNA断裂呈凋亡特征样ladder状,这与文献报道一致。在研究中我们还发现,在硫芥诱导淋巴细胞凋亡过程中,线粒体结构和功能均有损伤:线粒体通透性升高(跨膜电位下降)和线粒体功能(MTT)下降趋势具有一致性,线粒体功能变化滞后于跨膜电位变化。

正常情况下Cyt-c位于线粒体内膜外侧,在受凋亡信号刺激后,进入胞浆内,激活某些凋亡蛋白酶,是细胞凋亡的重要环节。我们观察到在硫芥中毒4 h,Cyt-c的释放明显增加,这与线粒体整体功能下降的时间基本一致。已有的研究资料提示,在100 μmol/L硫芥中毒剂量下,淋巴细胞caspase-3的表达、活化及活性均增加,用caspase-3抑制剂能抑制细胞凋亡的发生[6]。我们的实验结果也显示,在该染毒剂量下淋巴细胞出现凋亡征象。这就提示,线粒体功能下降。释放的Cyt-c通过快速凋亡机制包括Apat-1(凋亡促进因子-1)介导的凋亡过程参与了硫芥诱导的淋巴细胞凋亡。此外,我们还观察到硫芥作用8 h后,Cyt-c浓度发生了明显降低,其原因有待于进一步研究。

我们已经在实验中观察到硫芥中毒大鼠脾脏线粒体呼吸链成分丢失,硫芥中毒后细胞氧化应激状态的改变,和本实验中Cyt-c的释放及线粒体结构功能的下降,充分说明在硫芥作用过程中产生的各种信号作用于线粒体,引起线粒体结构和功能的损伤,释放出效应分子,从而参与了硫芥的淋巴细胞毒作用过程。

线粒体是敏感的细胞器,自身具有相对独立的基因组,硫芥对DNA的损伤包括对核与线粒体DNA的损伤(具体表现为核、线粒体DNA均有交联和加合物形成)[7],对核DNA的损伤程度明显高于对线粒体DNA的损伤程度,而且细胞的死亡不依赖于线粒体DNA的损伤。线粒体所有与凋亡相关的功能都是核基因的产物[8]。那么,线粒体基因的损伤在硫芥的毒性效应中发挥了什么作用则是我们下一步需要研究的内容。

参考文献:

[1] Meier H L, Millard C B. Alterations in human lymphocyte DNA caused by sulfur mustard can be mitigated by selective inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1404 (3): 367-376.

[2] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.

[3] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281 (5381): 1309-1312.

[4] Weijun L. Mitochondria, Bcl-2s and apoptosis[J]. Foreign Medical Science Section of Pathophysiology and Clinical Medicine, 1999, 19 (2): 113-115.

[5] Wakabayashi T, Karbowski M. Structural changes of mitochondria related to apoptosis[J]. Biol Signals Recept, 2001, 10(1-2): 26-56.

[6] 赛 燕, 刘 勇, 朱明学, 等. 四肽AC-DEVD-CHO对硫芥诱导淋巴细胞凋亡的干预作用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(14): 1223-1226.

[7] Shahin S, Cullinane C, Gray P J. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by sulfur mustard in keratinocytes[J]. Chem Biol Interact, 2001, 138(3): 231-245.

[8] Marchetti P, Susin S A, Decaudin D, *et al*. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA [J]. Cancer Res, 1996, 56(9): 2033-2038.

(编辑 张大春)