文章编号:1000-5404(2007)05-0425-03

论著

三氧化二砷诱导人卵巢癌细胞凋亡及对线粒体的影响

宁 燕,米 粲 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 研究三氧化二砷(As_2O_3)诱导人卵巢癌细胞凋亡中是否发生线粒体系统和Bcl-2蛋白表达的改变,探讨As_2O_3诱导凋亡的可能引发机制。**方法** 采用光镜、电镜和流式细胞术等技术,观察细胞凋亡、线粒体超微结构改变及检测线粒体跨膜电位($\Delta\psi m$)。**结果** As_2O_3可诱导卵巢癌细胞凋亡,具有剂量依赖性和细胞株类型差异性;不同浓度As_2O_3均可诱导$SKOV_3$、3AO细胞$\Delta\psi m$的降低,且随浓度升高,下降愈明显;电镜观察到As_2O_3作用$SKOV_3$、3AO 72 h后,线粒体明显肿胀,内嵴消失,基质电子密度降低。免疫荧光染色显示As_2O_3能抑制$SKOV_3$、3AO细胞的Bcl-2蛋白表达。**结论** 线粒体$\Delta\psi m$的下降和Bcl-2蛋白表达的抑制,是As_2O_3诱导细胞凋亡的重要环节。

关键词:三氧化二砷;人卵巢癌细胞;细胞凋亡;线粒体;Bcl-2
中图法分类号:R73-361;R737.31;R914.4 **文献标识码**:A

Morphological changes of mitochondria in apoptosis of human ovarian cancer cells induced by arsenic trioxide *in vitro*

NING Yan, MI Can (Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the morphological changes of mitochondria and the expression of bcl-2 in the apoptotic $SKOV_3$ and 3AO cells induced by arsenic trioxide (As_2O_3). Methods Light and electron microscopy, flow cytometry analysis, immunofluorescence flow cytometry analysis were used to detect the apoptotic cells, ultrastructural alteration of mitochondria, and the changes of mitochondrial transmembrane potentials ($\Delta\psi m$). Results As_2O_3induced apoptosis of ovarian cancer cell lines was in a dose dependent manner and various in different cell lines. As_2O_3 also made a decrease of $\Delta\psi m$ in $SKOV_3$ and 3AO cells in a dose independent fashion. Electron microscopy indicated that the mitochondria showed swollen, balloon-like appearance and outer membrane disrupted 72 h after As_2O_3 treatment. Expression of bcl-2 was down-regulated in $SKOV_3$ and 3AO cells after As_2O_3treatment. Conclusion The reduce of $\Delta\psi m$ and down-regulation of bcl-2 may play the key roles in the process of As_2O_3-induced apoptosis.

Key words: arsenic trioxide; human ovarian cancer cell line; apoptosis; mitochondria; bcl-2

细胞凋亡作为细胞死亡的一种特殊形式,它在维持生物机体细胞增殖与死亡的平衡过程中起重要作用。线粒体是动物细胞内主要的ATP生产中心;在产生能量的同时,细胞内也持续产生需氧代谢的副产品——活性氧(reactive oxygen species, ROS),其在细胞凋亡中起诱导作用,因此线粒体作为凋亡诱导物活性氧的主要产生部位及凋亡抑制基因bcl-2表达产物主要定位点的逐步揭示,使其在细胞凋亡中的作用受到格外关注,并正成为当前的研究热点之一。本实验旨在研究三氧化二砷(As_2O_3)诱导人卵巢癌细胞凋亡中是否发生线粒体系统和Bcl-2蛋白表达的改变,以探讨As_2O_3诱导凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

As_2O_3(Sigma公司):10 mg溶于生理盐水配成1 mmol/L母液,-20 ℃储存,临用前用完全培养基稀释成所需浓度。

1.2 细胞培养与实验分组

人卵巢浆液性乳头状囊腺癌$SKOV_3$,人卵巢黏液性囊腺癌3AO购自中科院上海细胞生物学研究所。$SKVO_3$、3AO细胞常规培养在含10%新生小牛血清的RPMI1640培养基中,0.1%胰酶消化传代。

实验分组包括:$SKOV_3$细胞对照组及As_2O_3处理组,3AO细胞对照组及处理组。

作者简介:宁 燕(1972-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事妇产科肿瘤方面的研究,现在复旦大学附属妇产科医院病理科。电话:(021)63455050-227
通讯作者:米 粲,电话:(023)68485789
收稿日期:2006-01-05;修回日期:2006-11-07

1.3 凋亡细胞的形态学观察

1.3.1 光镜观察 每瓶接种 1×10^5/ml 细胞悬液，培养 24 h 后加入 As_2O_3 液，使 $SKVO_3$ 细胞终浓度为 2 μmol/L，3AO 10 μmol/L，用倒置显微镜观察记录 As_2O_3 处理组和对照组细胞的形态变化，并接种细胞于盖玻片上，经瑞氏染色后观察。

1.3.2 电镜观察 取对数生长期细胞，以 1×10^6/ml 细胞悬液接种于 100 ml 培养瓶中，孵育 24 h 后，弃培养液，加含 As_2O_3 的完全培养液，使 $SKOV_3$ 细胞终浓度为 2 μmol/L，3AO 为 10 μmol/L；48 h 后收集细胞，按常规电镜样品制备程序切片，透射电镜观察。

1.4 线粒体荧光探针流式术

1×10^6 ml 细胞经 PBS 洗 2 次，离心后加入 1 g/L Rhodamine 123（Rh123，Sigma，终浓度为 10 mg/L），37 ℃避光孵育 45 min，PBS 洗 2 次，加入 PI（终浓度 10 μg/ml），37 ℃孵育 15 min。流式细胞术测定其荧光强度。

1.5 免疫荧光染色检测 Bcl-2 蛋白表达

收集细胞，0.3% 多聚甲醛室温固定 15 min；PBS 洗涤，加入 1 ml 70% 甲醇，4 ℃，1 h；PBS 洗涤，加鼠抗人 Bcl-2 一抗（1∶10稀释）20 μl，冰浴 1 h；PBS 洗涤 2 次，离心加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG 二抗 20 μl（稀释 1∶20），于避光冰浴 30 min；流式细胞仪检测其荧光强度。鼠抗人单克隆抗体 Bcl-2 购自晶美公司，FITC 标记羊抗鼠 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。设阴性和阳性对照。结果判定：以荧光强度指数（fluorescence intensity index，FI）反映蛋白表达的强弱，公式如下：

$$FI=\frac{(\text{实验样品的平均荧光强度}-\text{阴性对照样品的平均荧光强度})}{\text{阴性对照样品的平均荧光强度}}$$

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 10.0 进行 t 检验。

2 结果

2.1 凋亡细胞的形态改变

As_2O_3 处理 $SKOV_3$、3AO 细胞 72 h 后，镜下观察细胞呈圆形，均可见凋亡细胞（图 1）。

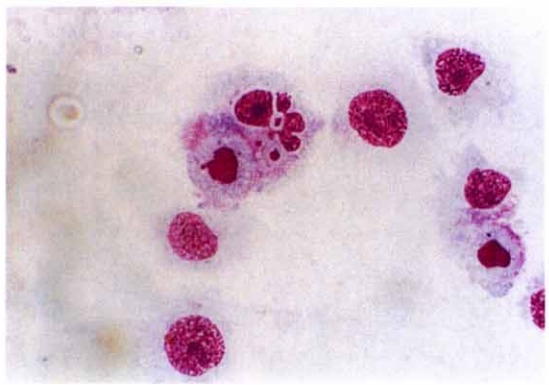
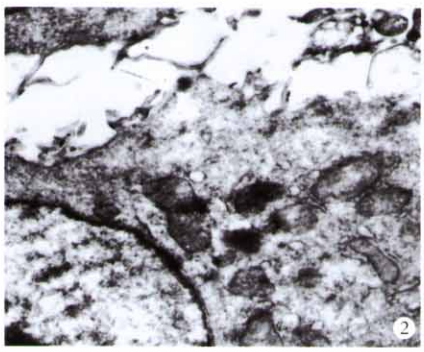
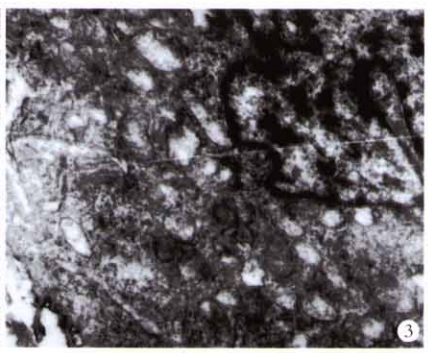


图 1 As_2O_3 处理组 72 h $SKOV_3$ 细胞的形态观察 （瑞氏染色 ×400）

2.2 细胞超微结构改变

2、10 μmol/L As_2O_3 分别作用 $SKOV_3$、3AO 细胞 12 h，部分线粒体外室、嵴内间隙肿胀，内嵴缩短减少，核染色质开始凝集；至作用 72 h，线粒体肿大，内嵴消失，有的剩单层膜，基质透明呈气球样变，核染色质凝集成块，靠边，出现凋亡改变（图 2～4）。





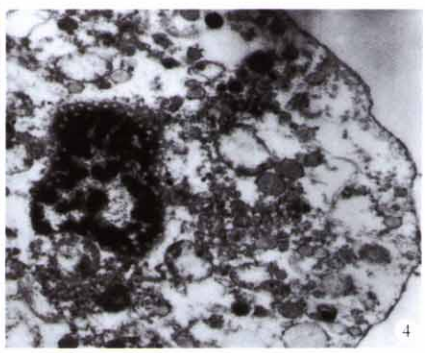


图 2 对照组 3AO 细胞结构观察 （TEM ×17 000）

图 3 As_2O_3 处理组 12 h 3AO 细胞结构观察 （TEM ×20 000）

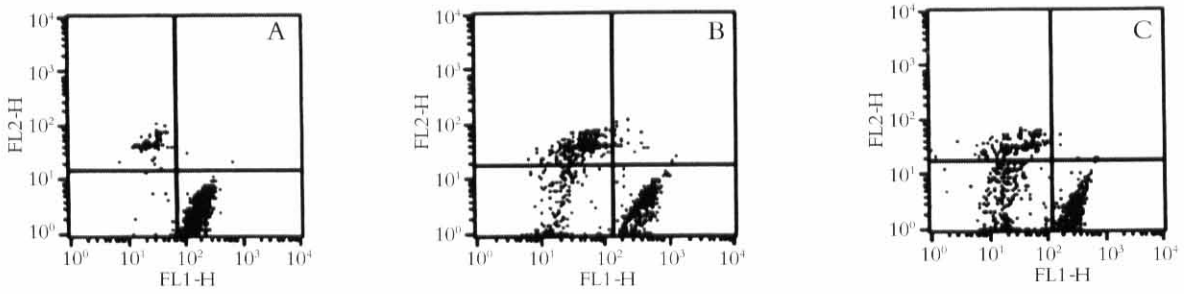
图 4 As_2O_3 处理组 72 h 3AO 细胞结构观察 （TEM ×15 000）

2.3 流式细胞术检测细胞线粒体跨膜电位改变

细胞以 Rho123 和 PI 双重荧光染色。其中 PI 为膜非通透性 DNA 结合染料，Rho123 是亲脂性阳离子染料，由线粒体特异性吸收，其摄取量与线粒体跨膜电位（mitochondrial transmembrance potential，$\Delta\psi m$）呈正相关，经流式细胞术分析，可见 3 群细胞：即呈现完整细胞膜和稳态 $\Delta\psi m$ 的活细胞（PI^-Rh123^+）、细胞膜完整但线粒体 $\Delta\psi m$ 下降的凋亡细胞（PI^-Rh123^-）和细胞膜与线粒体 $\Delta\psi m$ 均受损的坏死细胞（PI^+Rh123^-）。1、2 μmol/L As_2O_3 作用于 $SKOV_3$ 细胞 72 h，均可诱导 $\Delta\psi m$ 下降，即 PI^-Rh123^- 细胞明显增加，分别为 31.09%、42.15%，随浓度升高，下降愈明显（图 5）。5、10 μmol/L As_2O_3 作用于 3AO 细胞 72 h，$\Delta\psi m$ 均有下降，PI^-Rh123 细胞分别为 14.56%、20.46%。

2.4 Bcl-2 蛋白表达变化

免疫荧光流式检测结果显示，2 μmol/L As_2O_3 作用 $SKOV_3$ 72 h，Bcl-2 蛋白表达，其 FI 由对照的（13.45 ± 0.67）降至（1.79 ± 0.18）；10 μmol/L As_2O_3 作用 3AO 细胞 72 h，Bcl-2 蛋白 FI 由对照的（6.63 ± 0.21）降至（3.75 ± 0.16），均具有显著性差异（$P<0.05$）。



A：对照组；B：1 μmol/L As_2O_3组；C：2 μmol/L As_2O_3组

图5　不同浓度 As_2O_3作用 $SKOV_3$细胞 72 h Δψm 的变化

3　讨论

线粒体是真核细胞内的一种重要和独特的细胞器,是细胞进行呼吸链、电子传递、三羧酸循环和氧化磷酸化的场地,也是产生能量的场所,其病变影响细胞各成分的协调并危及细胞生命活动[1]。日益增加的资料表明,无论诱导因素和细胞类型,线粒体 Δψm 的降低是细胞发生凋亡早期的一个不可逆改变,许多学者认为 Δψm 降低是细胞凋亡的特异性标志[2,3]。砷剂作用最敏感的细胞器是线粒体[4-6]。

Shen 等[4]发现 As_2O_3可直接作用于食管癌细胞线粒体,2～4 h 内线粒体增生,基质出现高电子密度物质,作用 6 h 线粒体肿胀,12 h 出现气球样外观,甚至外膜破裂,而 As_2O_3诱导食管癌细胞凋亡其核改变晚于 12 h,提示 As_2O_3诱导的食管癌细胞凋亡,线粒体形态变化是早期改变。谭立军等[6]也证实 As_2O_3可直接作用于敏感性食管癌线粒体,使线粒体 Δψm 下降,还原型谷胱甘肽水平降低以及活性氧升高,支持线粒体启动细胞凋亡。我们的研究结果表明:As_2O_3诱导卵巢癌 $SKOV_3$、3AO 细胞凋亡的超微结构改变中,作用12 h 时部分线粒体外室、嵴内间隙肿胀,内嵴缩短减少,至 72 h 时线粒体明显肿胀,内嵴消失,有的剩单层膜,基层透明呈气球样变,核染色质凝集,靠边,出现凋亡结构改变,Δψm 检测揭示不同浓度 As_2O_3均可诱导卵巢癌细胞 Δψm 降低,且随浓度升高,下降愈明显,提示线粒体 Δψm 下降是 As_2O_3诱导细胞凋亡的重要环节。

在细胞凋亡的调控中,bcl-2 家族对线粒体内一些促凋亡因子的释放具有调控功能,因而在决定细胞生死中也具十分重要的作用[7,8]。近年来一些研究揭示,Bcl-2 作为活性氧消除剂在 ROS 诱发的细胞凋亡中起一定作用[9],而线粒体是细胞内 ROS 产生的主要部位,而且也是 As_2O_3的主要靶细胞器[6]。Wang 等[10]提出亚砷酸钠触发中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 凋亡的重要机制是诱导过氧化氢的生成和催化产生羧自由基。3 价砷可与还原型谷胱甘肽(GSH)结合,使之氧化成氧化型谷胱甘肽,从而降低了细胞的还原能力,导致细胞内氧化还原反应失调,氧化代谢产物堆集,表现为活性氧含量明显升高,从而促使细胞凋亡。谭立军等[6]也揭示 As_2O_3诱导食管癌细胞凋亡中,用线粒体氧化-还原系统流式检测可见活性氧含量明显升高。我们的实验通过免疫流式检测均表明 As_2O_3能抑制卵巢癌 $SKOV_3$、3AO 细胞的 Bcl-2 蛋白水平表达;结合上述研究结果,推测 Bcl-2 与活性氧关系密切,Bcl-2 对细胞凋亡的抑制可能是通过清除 ROS,从而防止线粒体 Δψm 降低而实现的;在 As_2O_3诱导细胞凋亡过程中,对 Bcl-2 蛋白的抑制解除了 Bcl-2 抗氧化能力,从而使 ROS 含量升高,直接损伤线粒体 Δψm,破坏线粒体膜的稳定性,最终导致凋亡的发生。

参考文献:

[1] Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al*. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303): 1129－1132.

[2] Marchetti P, Castedo M, Susin S A, *et al*. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis[J]. J Exp Med, 1996, 184(3): 1155－1160.

[3] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, *et al*. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*[J]. J Exp Med, 1995, 181(5): 1661－1672.

[4] Shen Z Y, Shen J, Cai W J, *et al*. The alteration of mitochondria is an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells[J]. Int J Mol Med, 2000, 5(2): 155－158.

[5] Zhu X H, Shen Y L, Jing Y K, *et al*. Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(9): 772－778.

[6] 谭立军,石熠慧,史桂英,等. 三氧化二砷启动人食管癌细胞凋亡机制研究[J]. 上海第二医科大学学报, 2000,20(1): 12－17.

[7] Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch[J]. FEBS Lett, 2000, 466(1): 6－10.

[8] Pratesi G, Perego P, Zunino F. Role of Bcl-2 and its post-transcriptional modification in response to antitumor therapy[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(4): 381－386.

[9] Hildeman D A, Mitchell T, Aronow B, *et al*. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 15035－15040.

[10] Wang T S, Kuo C F, Jan K Y, *et al*. Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species [J]. J Cell Physiol, 1996, 169(2): 256－268.

(编辑　王　红)