文章编号:1000-5404(2007)08-0711-03

论著

线粒体DNA缺失肝癌细胞内活性氧、线粒体膜电位变化实验研究

张国桥[1],凌贤龙[2],陈正堂[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,[2]消化内科,重庆 400037)

提 要:目的 比较活性氧、线粒体膜电位在线粒体DNA缺失肝癌细胞株SK-Hep1(ρ⁰SK-Hep1)与亲本细胞中的差别。**方法** 采用溴化乙锭诱导制备ρ⁰SK-Hep1细胞株;荧光探针标记、流式细胞计数及激光共聚焦显微镜方法检测细胞内活性氧和线粒体膜电位。**结果** ρ⁰SK-Hep1细胞内活性氧荧光强度显著高于其亲本SK-Hep1细胞株($P<0.01$),ρ⁰SK-Hep1肝癌细胞平均计数35.5,而SK-Hep1肝癌细胞平均计数15.9。ρ⁰SK-Hep1细胞线粒体膜电位显著低于亲本细胞($P<0.01$),ρ⁰SK-Hep1细胞平均计数55.0,而SK-Hep1细胞平均计数65.9。**结论** 线粒体DNA缺失后细胞内活性氧水平增加,而线粒体膜电位有所减低。

关键词:线粒体DNA;活性氧;膜电位;肿瘤
中图法分类号:R329.25;R73-3;R735.7 **文献标识码**:A

Changes of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in mitochondrial DNA-depleted SK-Hep1 cells

ZHANG Guo-qiao[1], LING Xian-long[2], CHEN Zheng-tang[1] ([1]Cancer Research Center, [2]Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the differences of the reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$) in mitochondrial DNA-depleted SK-Hep1 and its parent cells. Methods ρ⁰SK-Hep1 cell line was generated by treating SK-Hep1 with ethidium bromide. Flow cytometry (FCM) and laser scanning confocal microscopy were used to detect ROS and $\Delta\Psi m$. Results Fluorescence intensity of ROS in ρ⁰SK-Hep1 cells was significantly higher than that of the parent cells (35.5 *vs* 15.6), and the $\Delta\Psi m$ was lower in ρ⁰SK-Hep1 cells (55.0 *vs* 65.9). Conclusion ρ⁰SK-Hep1 cells showed elevated ROS and lower $\Delta\Psi m$. These changes might contribute to the variation of phenotypes.

Key words: mitochondrial DNA; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential; neoplasm

研究证实,线粒体DNA突变参与了多种疾病的发病过程,如线粒体脑肌病、退行性疾病、肥厚性心肌病、糖尿病以及肿瘤等[1]。然其发病机制尚不明确,研究线粒体基因表达的调控以及核质相互作用有助于了解这些疾病的病因、发病机制,为其治疗提供理论依据。我们采用溴化乙锭诱导成功建立线粒体DNA缺失肝癌细胞(ρ⁰SK-Hep1)模型,并通过流式细胞计数、激光共聚焦显微镜比较活性氧、膜电位在ρ⁰SK-Hep1肝癌细胞及其亲本细胞中的差异,以探讨活性氧(ROS)及线粒体跨膜电位在ρ⁰SK-Hep1肝癌细胞中的改变。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株SK-Hep1购自中国科学院上海生命科学研究院生化与细胞研究所。高糖培养基(DMEM)、胎牛血清为Gibco公司产品。溴化乙锭(EB)、5'-氧溴脱氧尿嘧啶(BrdU)、丙酮酸钠为Sigma产品。DCFDA、Mitotracker-Red荧光探针为Invitrogen产品。Coulter Epics XL流式细胞仪(Beckman公司)、Leica TCS-NT激光扫描共聚焦显微镜(Beckman公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及ρ⁰SK-Hep1肝癌细胞株制备 参照文献[2]的方法,将SK-Hep1细胞在含溴化乙锭(EB)100 μg/L、丙酮酸钠100 mg/L、尿嘧啶50 mg/L、10%胎牛血清的培养基中培养。2 d传代1次,传至21代后,行细胞计数。将细胞接种到

基金项目:国家自然科学基金(30470865)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470865)
作者简介:张国桥(1970-),男,四川省广元市人,博士研究生,主要从事线粒体损伤影响肿瘤细胞表型的机制方面的研究。电话:(023)68774701
通讯作者:凌贤龙,电话:(023)68774204,E-mail:lingxlong@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-01-05;修回日期:2007-03-22

24孔培养板,换用不含EB的培养液(含丙酮酸钠100 mg/L、尿嘧啶50 mg/L、10%胎牛血清),Southern杂交、PCR等方法进行鉴定。采用有限稀释法进行克隆,挑选其中1个克隆扩增培养。

1.2.2 细胞内ROS检测

1.2.2.1 激光扫描共聚焦显微镜 以5×10^4/孔细胞接种于6孔培养板中,常氧条件下培养48 h。弃去培养基,加入1 ml预温至37 ℃的PBS+5 μl DCFDA(10 mmol/L)储存液,轻轻混匀。培养箱内37 ℃孵育30 min。弃去培养液,加入DMEM+10%胎牛血清,孵育20 min后,弃去液体。DMEM+10%胎牛血清清洗2次,激光共聚焦显微镜下观察结果。ROS特异性荧光探针DCFDA储存液(10 mmol/L, 0.1 ml)临用前按1∶1 000用无血清培养液稀释为工作浓度10 μmol/L。由蓝光激发,发绿色荧光。激发波长488 nm、发射波长525 nm。

1.2.2.2 流式细胞仪 以5×10^4/孔细胞的密度接种于6孔培养板中,常氧条件下培养48 h。以0.25%胰蛋白酶消化为单细胞悬液,移入离心管,500×g离心5 min,弃上清。加入1 ml PBS+5 μl DCFDA储存液,轻轻混匀。培养箱内37 ℃孵育30 min。弃去液体,加入DMEM+10%胎牛血清,孵育20 min。离心后弃上清,流式细胞仪于激发波长488 nm、发射波长525 nm条件下检测细胞内荧光特异性探针DCFDA平均荧光强度。

1.2.3 线粒体膜电位

1.2.3.1 激光扫描共聚焦显微镜 Mitotracker-Red储存液的配置:相对分子质量497.08。50 μg Mitotracker-Red溶解于1 ml DMSO中,浓度为100 μmol/L,工作浓度为1 μmol/L。

以1×10^5/孔细胞的密度接种于6孔培养板中,常氧条件下培养72 h。弃去培养液。加入1 ml PBS+10%胎牛血清,内含10 μl Mitotracker-Red储存液,37 ℃孵育30 min。弃去液体,DMEM+10%胎牛血清清洗2次。在激光共聚焦显微镜下观察结果。激光扫描共聚焦显微镜激发波长488 nm、发射波长525 nm,由蓝光激发,发绿色荧光。

1.2.3.2 流式细胞仪 流式细胞仪于激发波长488 nm、发射波长575 nm条件下检测细胞内荧光特异性探针Mitotracker-Red平均荧光强度。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件行χ^2检验。

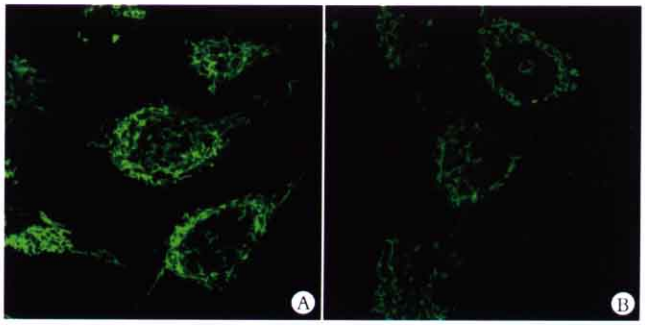
2 结果

2.1 细胞内活性氧检测

在激光扫描共聚焦显微镜下观察到ROS特异性荧光探针DCFDA发绿色荧光。ρ^0SK-Hep1细胞内ROS荧光强度明显高于SK-Hep1细胞($P<0.01$),见图1。FCM检测:ρ^0SK-Hep1细胞ROS荧光平均计数35.5,而SK-Hep1细胞平均计数15.9,两者有显著差别($P<0.01$)。

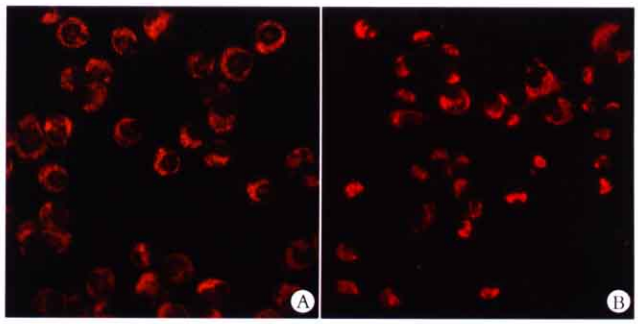
2.2 线粒体膜电位检测

激光扫描共聚焦显微镜下,线粒体膜电位荧光探针Mitotracker-Red显示为红色荧光,见图2。ρ^0SK-Hep1肝癌细胞平均计数55.0,而SK-Hep1肝癌细胞平均计数65.9,低于亲本细胞($P<0.05$)。



A:ρ^0SK-Hep1细胞; B: SK-Hep1细胞

图1 激光共聚焦显微镜显示2种细胞内ROS荧光强度 (×400)



A: ρ^0SK-Hep1细胞; B: SK-Hep1细胞

图2 激光扫描共聚焦显微镜观测2种细胞内线粒体膜电位的荧光强度 (×400)

3 讨论

氧在机体内氧化还原过程中产生的中间产物及其终产物统称为活性氧。mtDNA损伤可能导致细胞内ROS增加[3,4]。本研究显示,mtDNA缺失后,ρ^0SK-Hep1细胞较之于母本SK-Hep1细胞,细胞内ROS荧光强度明显增强。研究证明,ROS影响细胞增殖、分化、衰老和死亡以至于癌变等过程。有人把ROS看作细胞自分泌的分裂信号和生存信号,这种功能广泛存在于微生物和动植物细胞中。我们前期研究发现,mtDNA损伤后,人肺癌细胞95C和95D增殖和浸润能力显著增强,或许ROS增加部分介导了这种细胞表型的改变[5,6]。

人类第1例线粒体DNA缺失细胞株是King和Attardi[7]于1989年在骨肉瘤细胞143B.TK中制备成功的,随后又有很多种细胞被陆续培养成ρ^0细胞株,包括143B、GM701、Hela、A549、Namala等,为人类研究线粒体的功能提供了大量的实验平台。在氧化组织中,任何导致细胞内氧化磷酸化降低的事件都为转化

或者肿瘤细胞提供增生优势[8]，其机制尚不明了。细胞内钙信号可能在细胞增生过程中起中心作用[9]。

线粒体呼吸链的电子传递如受到抑制将会导致线粒体ROS的增加以及ATP能量的亏耗，自由基的不断攻击和能量亏耗将引起线粒体结构和功能的损伤，而线粒体 $\Delta\Psi m$ 是线粒体电化学梯度的主要构成部分，反映线粒体内膜的结构情况，线粒体 $\Delta\Psi m$ 下降表明细胞内膜结构改变，通透性增加[10]。本实验结果显示，线粒体DNA缺失细胞较之亲本细胞膜电位下降，与其线粒体内膜损伤，通透性增加有关，而ROS增加进一步加重线粒体膜的损伤，与此结论吻合。

参考文献：

[1] 戴纪刚，闵家新，张国强，等. 线粒体DNA缺失细胞系的建立[J]. 第三军医大学学报，2005，27(6)：570－571.

[2] Armand R, Channon J Y, Kintner J, *et al*. The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells) [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 196(1): 68－79.

[3] Thompson L V. Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice [J]. Exp Gerontol, 2006, 41(12): 1220－1222.

[4] Chen X, Stern D, Yan S D. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(5): 515－520.

[5] 李云鹏，杨和平，董兆君，等. 鱼藤酮对PC12细胞线粒体膜电位及细胞周期的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(2)：130－132.

[6] 凌贤龙，陆应麟，杜芝燕. 线粒体DNA缺失对人肺癌细胞生长和侵袭能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，17(14)：1453－1455.

[7] King M P, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA[J]. Methods Enzymol, 1996, 264: 304－313.

[8] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, *et al*. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(5): 759－768.

[9] Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, *et al*. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting[J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1010－1016.

[10] Cortopassi G A, Wong A. Mitochondria in organismal aging and degeneration[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1410(2): 183－193.

（编辑 栗 嘉）

文章编号：1000-5404(2007)08-0713-01

个案与短篇

种植机辅助拔除下颌阻生第3磨牙的效果

赵文峰[1]，赵艳华[2]，陈增力[1]，刘继延[1]，张传军[1]，王丽英[1]（[1]北京军区总医院口腔科，北京 100700；[2]中国人民公安大学医院口腔科，北京 100038）

采用传统方法拔除下颌第3磨牙阻生牙难度较大，且位置越深，创伤越大。患者术前常出现紧张和焦虑，术后可能出现肿胀、疼痛、出血、干槽症和颞下颌关节疼痛等并发症。本科采用种植机拔除下颌第3磨牙阻生牙，并对其临床效果进行了分析，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取本科32例下颌第3磨牙阻生牙患者，其中男性11例，女性21例。年龄18～32岁，平均25.6岁。

1.2 方法

1.2.1 分组 下颌第3磨牙阻生牙拔除术分为2组，每组16例：实验组采用种植机（法国安多健公司生产），直机头（转速12 000 r/min；扭距30 N）和长柄球钻（直径3 mm和4 mm）拔除下颌第3磨牙阻生牙；对照组采用传统拔除法拔除下颌第3磨牙阻生牙。

作者简介：赵文峰（1960－），男，河南省安阳市人，硕士，主任医师，主要从事口腔正畸、口腔修复和口腔颌面外科方面的研究，发表论文30余篇。电话：(010)66721957

收稿日期：2006-11-20；修回日期：2007-01-24

1.2.2 手术操作 术前30 min口服头孢拉定0.5 g，替硝唑0.5 g，芬必得0.3 g。下齿槽神经阻滞麻醉。采用常规角形切口、切开、翻瓣，使用种植机手机和长柄球钻去骨，必要时分牙拔除阻生下颌第3磨牙。使用可吸收线缝合伤口。

1.2.3 评定指标 牙科焦虑症状的评定采用改良牙科焦虑量表（MDAS），4分为无焦虑，20分为极度焦虑；观察术后并发症（肿胀、疼痛、出血、干槽症和颞下颌关节疼痛）。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 术后并发症

术后实验组出现肿胀3例，疼痛2例，无出血、干槽症和颞下颌关节疼痛。对照组出现肿胀4例，疼痛5例，出血4例，干槽症6例，颞下颌关节疼痛8例。

2.2 牙科焦虑症状改良牙科焦虑量表（MDAS）分析

MDAS实验组（7.36±1.70），对照组（11.871±1.56），2组间差异显著（$P<0.05$）

（下转716页）