文章编号：1000-5404(2008)03-0257-03

论著

卷烟烟气对细胞线粒体氧化损伤的研究

米　娜，杨陟华，潘秀颉，曹珍山，陈忠民，刘　刚，魏　菡，李慧颖，朱茂祥　（中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所，北京 100850）

摘　要：目的　研究卷烟烟气凝集物（cigarette smoke condensate，CSC）对人乳头状病毒永生化的人支气管上皮细胞（human papillomavirus-immortalized human bronchial epithelial cell line，BEP2D）线粒体的氧化损伤。**方法**　采用分子探针 2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐（2′,7′-dichlorofluorescein diacetate，DCFH-DA）和氢化乙啶（hydroethidine，HE）检测细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平；用荧光标记物 MCB（Monochlorobimane）、壬基吖啶橙（nonyl acridine orange，NAO）、四氯四乙基苯并咪唑基羰花青碘化物（5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetrethyl benzimidalyl carbocyanine iodide，JC-1）检测细胞内还原型谷胱甘肽（glutathione，GSH）及线粒体内膜心磷脂（cardiolipin，CL）、膜电位（mitochondrial membrane potential，$\Delta\psi m$）。**结果**　CSC 作用 BEP2D 细胞后，细胞内 ROS 显著增加，GSH 及线粒体 CL、$\Delta\psi m$ 水平明显下降，并呈现较好的剂量效应关系。**结论**　CSC 可造成细胞线粒体氧化损伤。

关键词：卷烟烟气；BEP2D 细胞；线粒体；氧化损伤
中图法分类号：R163；R322.34；R329.25　　**文献标识码：**A

Oxidative damage of cellular mitochondria by cigarette smoke

MI Na, YANG Zhi-hua, PAN Xiu-jie, CAO Zhen-shan, CHEN Zhong-min, LIU Gang, WEI Han, LI Hui-ying, ZHU Mao-xiang (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective　To investigate oxidative damage of mitochondria by cigarette smoke condensate (CSC) in immortalized human bronchial epithelial cells (BEP2D). **Methods**　BEP2D cells were treated with 0, 5, 10, 15, 20 μg/ml CSC respectively. 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF) and ehidium bromide (EB), the fluorescent products of the membrane-permeable dyes [2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and Hydroethidine (HE)] were used to monitor the intracellular production of reactive oxygen species (ROS) by Fluroskan Ascent FL. The cells were labeled by fluorescent dyes (Monochlorobimane, nonyl acridine orange or 5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetrethyl benzimidalyl carbocyanine iodide respectively) and then intracellular reduced glutathione (GSH) and mitochondrial cardiolipin, mitochondrial membrane potential were determined by monitoring the fluorescence intensity. **Results**　The ROS production in CSC treated BEP2D cells increased remarkably, and the level of GSH, cardiolipin and membrane potential decreased obviously, both in a good dose-effect relation. **Conclusion**　CSC causes oxidative damage to mitochondria.

Key words: cigarette smoke; BEP2D cell; mitochondria; oxidative damage

在原发性支气管肺癌及其他相关肺部疾病的病因学中，吸烟是一个很重要的因素。流行病学和临床研究显示，吸烟者和不吸烟者相比更易患上此类疾病，而且此类疾病的严重程度与吸烟数量直接相关[1,2]。卷烟烟气中含有大量活性氧和活性氧诱导物，其中一些可以进入细胞甚至细胞核，导致 DNA 氧化损伤和细胞死亡[3]。

线粒体是细胞能量生成的重要细胞器，也是细胞调节氧化应激的中枢。近年的研究表明，线粒体是细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）产生的主要场所，又是 ROS 作用的重要靶部位。线粒体产生的 ROS 对细胞的信号调节起着重要的作用，一旦 ROS 产生过多，或细胞抗氧化能力下降，线粒体就会受到 ROS 的氧化攻击，并伴随线粒体内膜心磷脂（cardiolipin，CL）含量及膜电位水平的下降等，进而启动细胞凋亡[4,5]。在 ROS 升高的同时，细胞内的氧化还原状态也发生了改变，如巯基氧化、细胞谷胱甘肽（glutathi-

作者简介：米　娜，女，河北省保定市人，硕士，技师，主要从事环境毒理学方面的研究，现在解放军 66069 部队医院检验科。电话：（010）66932209，E-mail：mina_36@163.com
通信作者：朱茂祥，E-mail：zhumx@nic.bmi.ac.cn
收稿日期：2007-05-29；修回日期：2007-07-26

one,GSH)减少,而 GSH 的降低又会导致凋亡早期细胞线粒体膜电位的降低[6]。

业已证实,卷烟烟气中的有害物质可导致多种细胞的线粒体损伤[7,8]。本研究中,我们将人乳头状病毒永生化的人支气管上皮细胞(human papillomavirus-immortalized human bronchial epithelial cell line,BEP2D)作为靶细胞,研究卷烟烟气凝集物(cigarette smoke condensate,CSC)诱发其产生的 ROS 及其对细胞线粒体的氧化损伤。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

分子探针 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate,DCFH-DA)(Sigma)用无水乙醇配成 20 mmol/L 储备液,氢化乙啶(hydroethidine,HE)(Sigma)用 DMSO 配成 10 mmol/L 储备液,MCB(monochlorobimane)(Sigma)用 DMSO 配成 10 mmol/L 储备液,壬基吖啶橙(nonyl acridine orange,NAO)(Sigma)用 DMSO 配成 7 mmol/L 的储备液,四氯四乙基苯并咪唑基羰花青碘化物(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetrethyl benzimidalyl carbocyanine iodide,JC-1)(Sigma)用 DMSO 配成 10 mmol/L 储备液。Fluoroskan Ascent FL 荧光化学分光仪购自芬兰 Thermo Labsystem 公司。

1.2 CSC 的制备

按行业标准吸烟方法,将卷烟烟气导入收集管(气泡吸收管,市售)中,管内盛有 5 ml 95% 乙醇和 5 ml LHC-8 完全培养液,连续收集 10 支卷烟。将收集液用 95% 乙醇定容至 10 ml(1 支/ml)。准确量取一定体积的 CSC 溶液,冷冻干燥后称量,测定 CSC 含量,实验时溶于 LHC-8 培养液中。

1.3 细胞培养及分组

BEP2D 细胞(美国国立癌症研究所 Harris 教授提供,美国哥伦比亚大学放射生物研究中心 Dr. Hei TK 处引进)用 LHC-8 培养液(美国 Biofluid 公司)在 5% CO_2、37 ℃和 95% 湿度条件下培养,5~6 d 传代,收集细胞时用含 0.1% 胰酶(Gibco 分装)和 0.02% EDTA-Na_2 的 D-Hank's 消化,并计数细胞。实验前将指数生长期的 BEP2D 细胞以 1.2×10^4/孔接种于 96 孔板内,按 CSC 染毒剂量分为 5 组:0、5、10、15、20 μg/ml CSC 组,其中以0 μg/ml 剂量组作为正常对照组。

1.4 细胞内 ROS 的检测

DCFH-DA 和 HE 在细胞内分别被 H_2O_2 及 O_2^- 氧化为二氯荧光黄(2',7'-dichlorofluorescin,DCF)及溴乙锭(ehidium bromide,EB),在激发光激发下分别产生绿色和红色荧光,DCFH-DA 激发波长为 485 nm,发射波长为 538 nm;HE 激发波长为 355 nm,发射波长为 460 nm。测定细胞内 DCF 和 EB 的荧光强度,即可相对定量细胞内 H_2O_2 和 O_2^- 水平。细胞培养 24 h 后,倒掉培养液,加入分子探针 DCFH-DA(终浓度为 20 μmol/L)及 HE(终浓度为 10 μmol/L),37 ℃保温 5 min。加入不同浓度 CSC 染毒 BEP2D 细胞,继续保温 2 h 后,弃上清,用 D-Hank's 洗 1~2 遍,立即用荧光化学分光仪测定荧光强度。

1.5 细胞内 GSH 的检测

用荧光染料 MCB(monochlorobimane)体外标记细胞质中 GSH,通过测定 MCB 的荧光强度,来定量细胞中的 GSH 水平。细胞培养 24 h,染毒同 ROS,清洗,加入 MCB 染色工作液(终浓度 40 μmol/L)37 ℃孵育 15 min,小心抽去上清,清洗,加入预冷的保存液,即刻放入荧光化学分光仪检测。激发波长为 390 nm,发射波长为 460 nm。

1.6 线粒体心磷脂的测定

NAO 是一种可自由通过细胞膜的染色剂,可特异性地结合线粒体 CL,在激发波长为 495 nm,散发波长为 519 nm 时发出绿色荧光。细胞处理及染毒同 ROS,清洗后加入 NAO 染色工作液(终浓度 20 μmol/L)37 ℃孵育 20 min,小心抽去上清,清洗,加入预冷的保存液,置入荧光化学分光仪检测。

1.7 线粒体膜电位的检测

阳离子荧光染色剂 JC-1 对膜电位高度敏感,可特异性的进入线粒体。线粒体膜电位的高低变化决定了 JC-1 的分布浓度。电位高,JC-1 形成聚集体,浓度高,荧光显色为红色或橘红色;反之,则为绿色,膜电位的去极化体现为由红光到绿光的转变。细胞处理及染毒同 ROS,清洗后加入染色工作液(终浓度 10 μmol/L)37 ℃孵育 20 min,清洗,加入预冷的保存液,即刻放入荧光化学分光仪检测。激发波长为 490 nm,散发波长为 590 nm,获得红色荧光单位;激发波长为 490 nm,散发波长为 530 nm,获得绿色荧光单位;红色荧光单位/绿色荧光单位最终获得荧光比值,比值高表明线粒体膜电位正常。

1.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件,对细胞内 ROS、GSH 水平及线粒体 CL、$\Delta\psi m$ 行单因素方差分析。

2 结果

2.1 CSC 对细胞内 ROS 水平的影响

以未用 CSC 处理的 BEP2D 细胞内荧光强度为基准,荧光强度增加值代表细胞内 ROS 增高水平。从表 1 可以看出,CSC 可诱发细胞内 H_2O_2 和 O_2^- 水平显著增高,并呈现良好的剂量效应关系。

表1 CSC 诱导 BEP2D 细胞内 ROS 水平的变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	H_2O_2水平(DCF 荧光值)	O_2^- 水平(EB 荧光值)
正常对照组	16.00±5.31	8.54±0.58
CSC 组 5 μg/ml	31.67±4.80[a]	11.67±1.34[a]
10 μg/ml	52.78±7.23[a]	16.28±1.56[a]
15 μg/ml	68.34±5.33[a]	18.32±1.28[a]
20 μg/ml	82.26±6.14[a]	19.47±1.76[a]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较

2.2 CSC 对细胞内 GSH 水平的影响

测定结果显示,随着 CSC 剂量的不断加大,细胞内 GSH 水平逐渐降低:CSC 浓度在 5 μg/ml 时 GSH 水平略高于正常对照组;在 10、15、20 μg/ml 时 GSH 水平明显低于正常对照组($P<0.05$)。由此可见低剂量 CSC 可使细胞内 GSH 产生应激性增高,而高剂量 CSC 对细胞内 GSH 有明显的抑制作用。

2.3 CSC 对线粒体功能的影响

以未用 CSC 处理的 BEP2D 细胞内荧光强度为基准,荧光

强度下降值代表 CL 及膜电位的下降水平,结果见表 2。我们可以看出,CSC 可导致线粒体 CL 及膜电位水平显著下降,并呈现良好的剂量效应关系,表明 CSC 对细胞线粒体有一定的损伤。

表 2　CSC 对 BEP2D 细胞线粒体功能的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	线粒体心磷脂水平(NAO 荧光值)	线粒体膜电位水平(JC-1 荧光值)
正常对照组	0.86 ± 0.08	0.48 ± 0.02
CSC 组 5 μg/ml	0.73 ± 0.05[a]	0.41 ± 0.03[a]
10 μg/ml	0.68 ± 0.07[a]	0.39 ± 0.02[a]
15 μg/ml	0.56 ± 0.06[a]	0.32 ± 0.02[a]
20 μg/ml	0.26 ± 0.07[a]	0.22 ± 0.01[a]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较

3　讨论

线粒体呼吸链是细胞内活性氧产生的主要来源。正常生理条件下,线粒体内含有丰富的抗氧化成分,可防止活性氧的产生及其带来的氧化损伤。然而,一旦线粒体内 ROS 产生过多和(或)抗氧化物含量下降,线粒体就会受到 ROS 的氧化攻击。

CL 位于线粒体内膜,为内膜各种镶嵌蛋白或酶提供牢固的结合场所。细胞色素 C(cytochrome c,Cyt c)就结合在心磷脂上。由于 CL 不饱和酰基链的特性,加上它接近线粒体 ROS 产生的部位,CL 极容易受到 ROS 的氧化攻击。CL 的过氧化作用可导致 Cyt c 从线粒体内膜解离,释放到细胞质,这是线粒体介导的细胞凋亡极其重要的早期事件[9]。

膜电位的维持是线粒体发挥功能的必要前提。膜电位的改变影响质子泵功能,进而影响 ATP 的生成。线粒体膜电位的降低发生在 DNA 断裂之前,导致细胞质中合成的线粒体蛋白质成熟的缺陷、翻译的停止、氧化磷酸化形成的解偶联,是细胞走向死亡的标志。当线粒体膜电位下降至低于阈值时,就会诱导细胞凋亡[10]。

卷烟烟气中存在的 ROS 及其对线粒体的氧化损伤目前已成为研究热点。本研究结果表明,CSC 可诱导 BEP2D 细胞产生 H_2O_2 和 O_2^-,且随着 CSC 剂量的加大,这些 ROS 的浓度也逐渐升高。进一步的研究结果显示,代表线粒体功能的 NAO 及膜电位水平随着 CSC 浓度的升高而急剧下降,而这种水平的下降恰恰和细胞内 ROS 的累积呈明显的相关性,提示 CSC 可能导致细胞线粒体氧化损伤,这可能与线粒体受到高浓度 ROS 的氧化攻击有关;另一方面,随着 CSC 浓度的不断加大,GSH 水平由 CSC 低浓度时的应激性升高变为 CSC 高浓度时的急剧下降(与 Rahman 等[11] 报道一致)。这一变化打破细胞内部氧化-抗氧化系统的平衡,使细胞的氧化能力下降。GSH 正常状态下是细胞的一种重要的氧化还原缓冲剂,细胞内有毒的氧化物通过被 GSH 还原而定期去除。这一反应在线粒体中尤为重要。当细胞内 GSH 的清除非常活跃时,细胞液就由还原环境转为氧化环境,这可能又导致了凋亡早期细胞线粒体膜电位的降低,从而使细胞色素 C 从线粒体内转移到细胞液中,启动凋亡效应。

相关研究证实,在卷烟烟气诱导的不同细胞的凋亡过程中均伴随着线粒体心磷脂的损伤及跨膜电位的耗散,而这些事件的发生与活性氧的产生及卷烟烟气的浓度有明显的剂量效应关系[7,12]。本研究中 CSC 诱导 BEP2D 细胞产生活性氧,造成线粒体的氧化损伤,这一过程是否最后导致细胞的凋亡,值得进一步的研究探讨。

参考文献:

[1] Schlesselman J J. The emerging case-control study:lung cancer in relation to tobacco smoking[J]. Prev Med, 2006, 43(4):251 – 255.

[2] Schollnberger H, Manuguerra M, Bijwaard H, *et al*. Analysis of epidemiological cohort data on smoking effects and lung cancer with a multistage cancer model[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(7):1432 – 1444.

[3] Rennard S I, Togo S, Holz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(8):703 – 708.

[4] 李梦侠,王　东,向德兵,等. 电离辐射诱导骨肉瘤细胞 DNA 损伤修复蛋白 APE1 线粒体定位研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15):1458 – 1461.

[5] Van-Houten B, Woshner V, Santos J H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress[J]. DNA Repair (Amst), 2006, 5(2):145 – 152.

[6] Curtin J F, Donovan M, Cotter T G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis[J]. J Immunol Methods, 2002, 265(1 – 2):49 – 72.

[7] Baglole C J, Bushinsky S M, Garcia T M, *et al*. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains:implications for emphysema[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291(1):L19 – L29.

[8] Jia L, Liu Z, Sun L, *et al*. Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(1):339 – 348.

[9] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. Science, 2004, 305(5684):626 – 629.

[10] Fariss M W, Chan C B, Patel M, *et al*. Role of mitochondria in toxic oxidative stress[J]. Mol Interv, 2005, 5(2):94 – 111.

[11] Rahman I, Smith C A, Lawson M F, *et al*. Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells[J]. FEBS Lett, 1996, 396(1):21 – 25.

[12] Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, *et al*. Effects of tobacco smoke and benzo[a] pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(3): H1293 – H1300.

(编辑　张大春)