DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.012
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
142 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0142-04

过氧化氢对肠上皮细胞线粒体的损伤作用

李建明,蔡 黔,周 红,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察过氧化氢对体外培养肠上皮细胞系SW-480线粒体的损伤作用。方法 以不同浓度的过氧化氢处理人肠上皮细胞株(SW-480),观察细胞形态学和线粒体超微结构的改变。以MTT法测定线粒体整体功能的变化。应用DNA凝胶电泳和Annexin-V及PI双标流式细胞术观察细胞凋亡的发生。应用免疫组织化学法检测细胞色素c的释放。结果 400 μmol/L过氧化氢在3 h可引起线粒体整体功能的明显改变,但以后逐渐恢复。4 mmol/L过氧化氢可引起线粒体整体功能不可逆的进行性下降;可引起线粒体空化,嵴肿胀。随着过氧化氢浓度的增加,线粒体的空化更加明显;可引起细胞发生凋亡。过氧化氢处理早期即出现细胞色素c的释放。结论 过氧化氢可引起肠上皮细胞线粒体明显损伤,线粒体的结构和功能改变与细胞凋亡的发生密切相关。

关键词:细胞凋亡;过氧化氢;线粒体;细胞色素c
中图法分类号:R322.45;R329.24;R914.4 文献标识码:A

Injury effect of hydrogen peroxide on mitochondria of intestinal epithelial cells *in vitro*

LI Jian-ming, CAI Qian, ZHOU Hong, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the role of hydrogen peroxide in the pathogenesis of the mitochondria in cultured intestinal epithelial cell line SW-480. Methods Cultured intestinal epithelial cells were treated with hydrogen peroxide at different concentrations. The cell morphology and the mitochondial ultrastructure were observed with invert and transmission electron microscopy respectively. MTT assay was used to measure mitochondrial function. The apoptosis of SW-480 cells was determined with DNA gel electrophoresis and Annexin-V and PI double-stained flow cytometry. The Release of cytochrome c from the mitochondria was detected with immunohistochemistry. Results Hydrogen peroxide of 400 μmol/L gradually caused reversible changes on mitochodial functions of the cells, but for the cells treated with 4 mmol/L hydrogen peroxide, the changes were irreversible and became more serious with the increase of agent dose. The mitochondria were vacuolated and their cristae were swollen in a dose-dependent manner under microscope. Hydrogen peroxide led to the apoptosis of SW-480 cells and the release of cytochrome c in the early stage of treatment. Conclusion Hydrogen peroxide causes distinct injuries on the intestinal epithelial cell mitochondria, whose structure and functions are closely correlated with cell apoptosis.

Key words: apoptosis; hydrogen peroxide; mitochondria; cytochrome c

严重烧伤早期甚至在复苏后易存在肠道的隐匿性损伤,其中中性粒细胞-血管内皮细胞粘附活化后活性氧的释放在其中起重要作用。活性氧的释放可以通过诱导肠上皮细胞的死亡,参与肠粘膜结构屏障的损伤。近年对线粒体在细胞死亡中的作用已越来越受到关注。我们应用过氧化氢处理体外培养肠上皮细胞系模拟中性粒细胞-血管内皮细胞活化后释放活性氧损伤肠上皮细胞的体内状况,以观察它对肠上皮细胞线粒体的损伤作用。

1 材料和方法

1.1 人肠上皮细胞细胞株(SW-480)

购自美国ATCC,以含10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI1640(Hyclone)37 ℃ 5% CO_2 条件下培养。将细胞转至培养板培养,待细胞接近融合进行实验。

1.2 细胞处理及分组

细胞以4 mmol/L、400、200、100及50 μmol/L不同浓度的过氧化氢处理1、3、6、12及24 h等不同的时间。倒置显微镜下观察细胞形态学改变。

1.3 电镜观察

常规固定、包埋及切片,透射电镜下观察细胞线粒体超微结构的改变。

1.4 细胞染色体DNA断裂的测定

按郑德先等[1]的方法进行。

1.5 流式细胞术检测

应用Annexin-V及PI双标试剂盒(Roche)流式细胞术检测。按说明书要求操作。检测10 000个细胞,记数位于凋亡区内的细胞数量,得到凋亡细胞百分率。

1.6 细胞色素c的免疫化学检测

将细胞以盖片培养。过氧化氢处理后,以PBS洗涤,10%中性福尔马林固定30 min,滴加按1∶100稀释的兔抗人细胞色素c的多克隆抗体(Genzyme)4 ℃过夜孵育,PBS洗涤,滴加生物

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054202)
作者简介:李建明(1970-),男,江西省余江县人,博士研究生,讲师,主要从事严重创(烧)伤早期全身性损害的机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754148-8026
通信作者:周 红,电话:(023)68752266;E-mail:zhouh64@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2001-04-06;修回日期:2001-11-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

素化的山羊抗兔 IgG 标记, 洗涤, 然后以辣根过氧化物酶标记卵白素标记, 洗涤, 显色剂显色, 充分冲洗, 复染, 封片, 照相。

1.7　MTT 测定

将细胞以每孔 5 000 个细胞的浓度种植于 96 孔板中培养, 37 ℃5% CO_2 培养, 待细胞接近融合进行实验。以不同浓度过氧化氢处理, 然后以 PBS 洗涤, 以无血清 RPMI1640 培养液配制的 2 μg/ml MTT(Sigma)37 ℃孵育 1 h, 以二甲基亚砜溶解, 在 570 nm 读取吸光度。

1.8　线粒体膜电位的变化

将细胞以盖片培养。细胞以不同浓度过氧化氢处理后, 将细胞以无血清 RPMI1640 配制的 1 μmol/L Rhodamine 123 (Molecular probe) 中 37 ℃孵育 30 min, Rhodamine 123 的荧光强度应用激光扫描共聚焦显微镜(Leica)扫描, 确定统一的参数后, 对各组细胞随机选取 3 个视野进行扫描并分析结果。

1.9　统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个样本均数比较应用 student's t 检验。多个样本均数比较应用方差分析。率的比较应用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　倒置显微镜下观察

用过氧化氢处理细胞后, 细胞早期即出现胞体皱缩变小颗粒感明显增强。随着过氧化氢浓度的增加其变化更加明显。

2.2　线粒体整体功能的变化

400 μmol/L 过氧化氢在 3 h 可引起线粒体整体功能的明显改变, 但以后线粒体功能逐渐恢复。4 mmol/L 过氧化氢可引起线粒体整体功能不可逆的进行性下降。其他浓度过氧化氢对线粒体整体功能影响不大, 见表 1。

表 **1**　不同浓度过氧化氢处理的 **SW-480** 细胞株 **MTT** 吸光度的变化(D_{570}, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Absorbance dose of the cells treated with hydrogen peroxide at different concentrations by using MTT at a wavelength of 570 nm (D_{570}, $\bar{x} \pm s$)

Group	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
Control	1.971 ±0.101	1.996 ±0.013	1.867±0.008	2.087±0.126	2.189±0.178
4 mmol/L	0.864 ±0.116 *	0.756 ±0.023 *	0.612±0.006 *	0.518±0.035 *	0.373±0.043 *
400 μmol/L	1.588 ±0.005	1.277 ±0.300 *	1.778±0.098	1.599±0.214	1.899±0.031
200 μmol/L	1.626 ±0.262	1.914 ±0.046	1.941±0.032	1.787±0.033	1.962±0.149
100 μmol/L	1.683 ±0.070	1.973 ±0.048	1.933±0.094	1.901±0.097	2.079±0.081
50 μmol/L	1.865 ±0.122	1.974 ±0.080	2.077±0.077	1.876±0.053	1.922±0.048

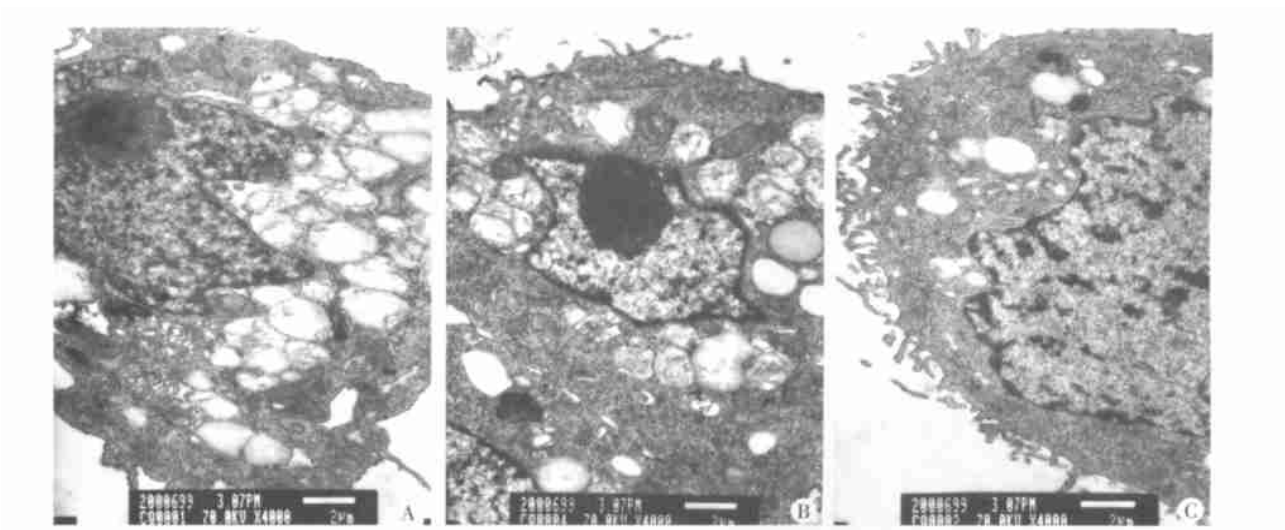
*: $P < 0.05$ *vs* control

2.3　线粒体超微结构的改变

400 μmol/L 过氧化氢在 3 h 可引起线粒体空化, 嵴肿胀。随着其浓度的增加, 线粒体的空化更加明显, 见图 1。

2.4　DNA 凝胶电泳结果

过氧化氢处理细胞可引起细胞发生细胞凋亡, 凝胶电泳出现明显的 DNA 梯状带见图 2。



A: 400 μmol/L H_2O_2-treated cells; B: 4 mmol/L H_2O_2-treated cells; C: Control cells

图 **1**　过氧化氢对 **SW-480** 细胞株超微结构的影响　(TEM× 4 000)

Fig 1　Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial ultrastructure of SW-480 cells　(TEM× 4 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: PBR322 /*Hinf* I (75, 154, 220, 221, 298, 344, 396, 504, 517, 1 632 bp); 2, 3: Control; 4, 5: 4 mmol/L H_2O_2-treated cells for 1, 3 h; 6, 7: 400 μmol/L H_2O_2-treated cells for 1, 3 h

图 2 过氧化氢诱导 SW-480 细胞株发生凋亡

Fig 2 Apoptosis of SW-480 cells induced by hydrogen peroxide

2.5 细胞凋亡的发生情况

400 μmol/L 过氧化氢在 1 h 即出现细胞凋亡增加, 3 h 更加明显。4 mmol/L 过氧化氢在 1 h 即有细胞凋亡明显增加, 3 h 后仍增加。4 mmol/L 过氧化氢处理其细胞凋亡的发生明显较 400 μmol/L 过氧化氢处理快且重, 见图 3。

2.6 线粒体膜电位的改变

400 μmol/L 过氧化氢在 3 h 可引起线粒体膜电位的明显下降。然而 4 mmol/L 过氧化氢可引起线粒体膜电位存在一定程度的增加, 见图 4。

2.7 细胞色素 c 的免疫组织化学检测

400 μmol/L 过氧化氢处理 30 min 后, 其细胞色素 c 释放明显增加, 1 h 及 3 h 也存在明显的增加。4 mmol/L 过氧化氢处理可以观察到类似的情况, 见图 5。

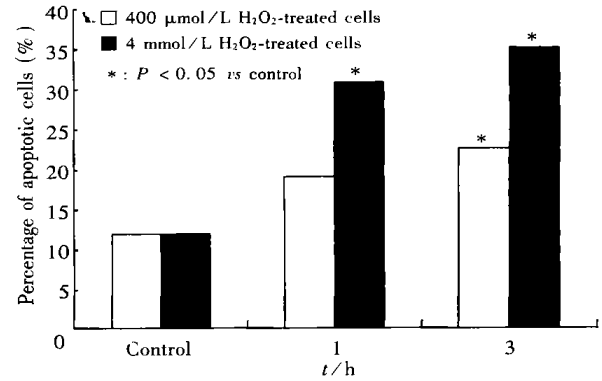


图 3 过氧化氢对 SW-480 细胞株细胞凋亡的影响

Fig 3 Percentage of apoptotic cells in SW-480 cells treated with hydrogen peroxide

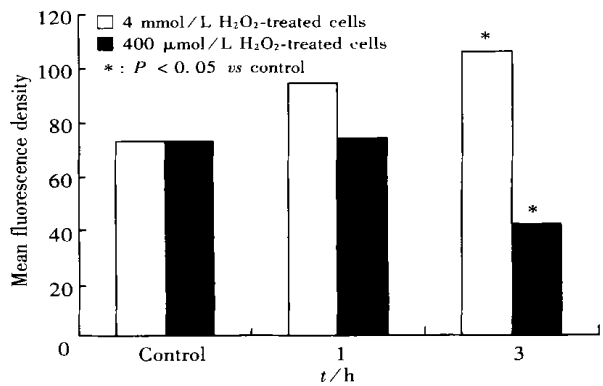
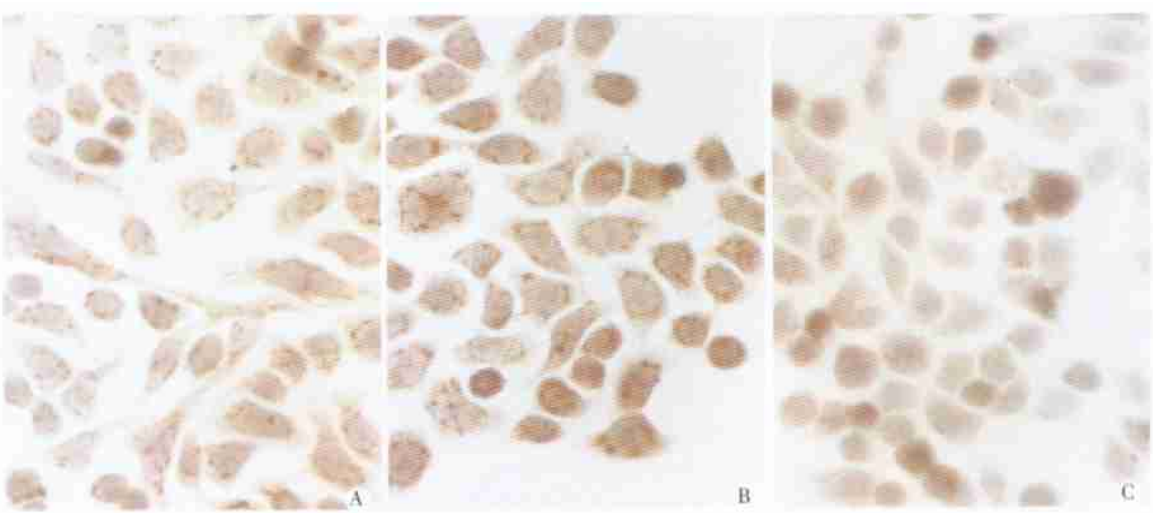


图 4 过氧化氢对 SW-480 细胞株线粒体膜电位的影响

Fig 4 Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial membrane potentials of SW-480 cells



A: 400 μmol/L H_2O_2-treated cells (30 min); B: 4 mmol/L H_2O_2-treated cells (30 min); C: Control cells

图 5 过氧化氢对 SW-480 细胞株细胞色素 c 释放的影响 (S-P× 400)

Fig 5 Effects of hydrogen peroxide on cytochrome c released from SW-480 cells (S-P× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

正常情况下, 肠道粘膜上皮的更新代谢十分迅速, 它对于能量供应的变化十分敏感。但在严重烧伤中肠道的损伤往往十分隐匿。严重烧伤后肠道为极易受损的敏感器官之一。严重烧伤后中性粒细胞可在全身很多血管床包括肠粘膜血管内粘附聚集, 中性粒细胞-血管内皮细胞的粘附活化可释放活性氧、细胞因子及蛋白酶类, 它们可引起肠上皮细胞的损伤, 从而参与肠粘膜结构屏障的损伤。这是肠道细菌、内毒素移位的重要因素之一。

线粒体作为细胞能量代谢的场所很早就被认识到。但是直到近年来对其重要性才有更深的了解。线粒体是控制真核细胞生长繁殖、死亡的重要细胞器, 其突出的功能表现在以下几个方面: ①产生 ATP 供应细胞能量; ②活性氧的主要产生地; ③活性氧有调节胞核基因表达的功能; ④线粒体与胞浆和胞核存在联系; ⑤线粒体自身对胞外的应激或者刺激信号有较敏感的反应能力; ⑥线粒体有启动死亡的能力[2,3]。大量的研究表明线粒体在细胞凋亡发生中起中心作用。多种因素如活性氧、Ca^{2+}、细胞因子等可以通过刺激线粒体释放细胞色素 c 引起 Caspases 类的活化, 从而触发细胞凋亡发生的级联反应[4]。

我们在体外应用过氧化氢处理肠上皮细胞株 SW-480的模型, 以探讨线粒体在活性氧损伤肠上皮细胞的可能机制, 这将有助于进一步阐明肠上皮细胞的损伤环节, 为临床治疗提供线索。

我们的结果表明应用过氧化氢处理肠上皮细胞株在 400 μmol/L 及 4 mmol/L 两个浓度均可引起肠上皮细胞明显的损伤, 这种损伤即包括细胞凋亡也包含细胞坏死, 从 DNA 凝胶电泳以及流式细胞术的结果看, 以细胞凋亡更为突出。这表明这种模型可以用于在体外研究活性氧损伤肠上皮细胞的机制研究。

我们的结果发现, 过氧化氢处理肠上皮细胞后, 细胞线粒体的功能和超微结构也发生了一系列相应的变化, 超微结构的变化很显著, 似乎比功能更为明显, 说明细胞具有巨大的代偿机制。这些变化与细胞凋亡的发生发展相一致。线粒体膜电位早期也出现明显的降低, 提示线粒体膜电位的降低是细胞发生死亡的重要征象。其中细胞色素 c 的释放是个比较早期的事件。线粒体是个十分敏感的细胞器, 它对损伤的反应十分迅速。很有意义的是线粒体本身具有相对独立的基因组, 相对于核基因, 其更容易受到损伤, 既然线粒体对氧化应激十分敏感, 那么线粒体自身编码基因对氧化应激的反应如何是我们下一步需要重点研究的内容。

参考文献:

[1] 郑德先, 刘彦信. 细胞凋亡的研究方法[A]. 见: 卢圣栋 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 660－661.

[2] Kluck R M, Bossy Wetzel E, Green D R, *et al*. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis[J]. Science, 1997, 275(5 303): 1 132－1 134.

[3] Susin S A, Zamzami N, Castedo M, *et al*. Bcl－2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease[J]. J Exp Med, 1996, 184(4): 1 331－1 335.

[4] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(28): 1 309－1 312.

(编辑　谢义霞)

(上接 141 页)

3　讨论

3.1　胎儿脐动脉血流 S/D 值测定的意义

了解胎盘－胎儿的循环状态及其血流阻力状况[1]。孕晚期正常脐动脉血流速度峰谷比值 S/D< 3.0。同时 S/D 值随孕周的增加而逐渐减小。因为正常妊娠时, 随着胎盘绒毛的发育增长, 胎盘体积逐渐增大。绒毛动脉分支逐渐增多, 胎盘血管不断发育完善, 血管管腔总面积增大, 胎盘循环阻力降低, 血流量增加, S/D 值随之下降, 有利于胎儿生长发育。

3.2　脐动脉血流检测的临床价值

3.2.1　对脐带绕颈的诊断及胎儿预后的判断　　本组通过脐动脉血流图诊断为脐带绕颈 45 例。分娩时脐带绕颈 39 例, 准确率 86.6%。由于脐带本身具有补偿性伸展[2], 当脐带缠绕较松时, 多数不发生临床症状, 可以从阴道分娩, 对母婴危害不大, 当脐带严重缠绕, 以致脐动脉血流受阻时, 将导致胎儿急性或慢性宫内缺氧, 危及生命。B 超能诊断脐带绕颈, 但无法评价其预后情况。脐血流图的 S/D 值可显示脐动脉血流阻抗升高, 表现为 S/D 值上升。本研究 39 例脐带绕颈中, 当 S/D 值小于 3.0 时, 胎儿出生时情况良好, 当 S/D 值大于 3.0, 10 例中有 8 例发生胎儿宫内窘迫, 发生率明显高于 S/D 值小于 3.0 组, 因此, 当诊断为脐带绕颈, 并伴 S/D 值升高。特别是出现舒张末期断流(AEDV)时, 提示胎儿胎盘循环已受到影响, 应选择分娩方式及时终止妊娠, 以防发生胎儿宫内窘迫及不良预后。

3.2.2　脐动脉血流波形对 IuGR 的判断　　目前, 病理学家研究发现, 在 IuGR 中, 特别是无明确遗传、营养、慢性病及胎儿畸形等因素影响而发生的 IuGR 中, 胎盘病理上有较大改变。表现为子宫胎盘血流量相对不足导致绒毛受损, 绒毛血管数量减少, 胎盘功能下降, 甚至衰竭[3]。本研究 B 超提示的 IuGR 中, S/D 值大于 3.0 的 6 例中, 5 例出生时体重小于 2 500 g; S/D 值小于 3.0 的 11 例中, 仅 1 例出生时体重小于 2 500 g。因此, 当 IuGR 伴 S/D 值升高时预后较差。

关键词: 胎儿; 脐动脉; 宫内发育迟缓; 胎儿窘迫; 脐带绕颈
中图法分类号: R714.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 吴　静, 王　萍, 李海玲. 胎儿脐动脉及大脑中动脉血流检测对胎儿预后的作用[J]. 中国医学影像技术, 2000, 16(5): 393－394.

[2] 成　娅. 脐血流 S/D 值在脐带绕颈分娩方式选择上的应用价值[J]. 实用妇产科杂志, 1997, 13(3): 139－140.

[3] 麦秀云, 庄依亮, 陆惠娟, 等. 脐动脉波形异常伴胎儿宫内生长迟缓患者胎盘血管内皮生长因子的表达[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(10): 606－609.

(编辑　谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net