

研究简报

微囊藻毒素 LR 对大鼠肝细胞 Caspase-3 酶活性的影响

傅文字 王咪咪 徐立红

(浙江大学医学院, 杭州 310031)

EFFECT OF MICROCYSTIN-LR ON CASPASE 3 IN RAT HEPATOCYTES

FU Wen-Yu, WANG Mi-Mi and XU Li-Hong

(Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

关键词: Caspase-3; 微囊藻毒素 LR; BRL-3A 细胞

Key words: Caspase-3; Microcystin LR; BRL-3A cells

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)04-0450-02

水体富营养化的加剧,导致藻类水华频频发生。在全球由于藻类水华所产生的毒素,对人和动物都产生了极为严重的影响,使之成为日益突出的环境问题。其中危害最严重的是微囊藻毒素(Microcystin, MCYST)^[1]。而微囊藻毒素 LR(LR)是微囊藻毒素中存在最为普遍且毒性作用最明显的一种,是 MCYST 的主要代表物^[2]。

Caspase 是一组天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,绝大部分细胞凋亡依赖于 Caspase 的存在。活化的 Caspase 是细胞凋亡的关键酶类,通过特异性的裂解底物而发挥其执行细胞凋亡的功能^[3]。Caspase-3 是目前研究最多的一种,它是细胞凋亡的主要执行者。荧光 FAM 标记的 DEVD-FMK 是特异性的 Caspase-3 抑制剂,可以与激活的 Caspase-3 酶活性中心共价结合,通过检测荧光强度可以反映细胞中 Caspase-3 是否被激活。

以往的研究,已经证实 LR 可诱导大鼠肾细胞凋亡并呈现良好的剂量反应关系^[4],并且证明 LR 可以激活 Caspase-3,说明 Caspase-3 在 LR 诱导的细胞凋亡中起重要作用^[5]。在此基础上,本文将着重于研究 LR 对大鼠肝细胞 Caspase-3 酶活性的影响,并比较肝、肾两种不同细胞对 LR 的敏感性,为进一步阐明 LR 的毒作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 正常大鼠肝细胞——BRL-3A 细胞购自中国科学院细胞库, RPMI 1640 培养基购自 Gibco, 新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 胰蛋白酶购自 Serva, Caspase-3

酶活检测试剂盒 CaspaTag™ Caspase-3 (DEVD) Activity Kit (S7301) 购自 intergen company。

1.2 细胞培养及处理 BRL-3A 细胞以含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃ 及 5% CO₂ 的湿化培养箱中进行培养,隔天传代一次。实验所用的细胞均处于对数生长期。根据实验要求,细胞按 5×10^5 cell/mL 的密度接种于六孔板上,在培养体系中分别加入 LR 至终浓度为 0, 10, 50, 100, 500, 1000 nmol/L, 根据不同的实验要求作用不同的时间。

1.3 Caspase-3 活性检测 根据试剂盒上提供的方法进行 Caspase-3 活性的检测。主要是在实验前用 DMSO 将 FAM-DEVD-FMK 配成 $150 \times$ Stock Solution, 临用前用 PBS 稀释 5 倍得到 $30 \times$ Working Dilution FAM-DEVD-FMK。细胞用不同浓度的 LR 作用不同的时间后,收集细胞,取 300 μ L 细胞悬液(细胞密度为 1×10^6 cell/mL)加入干净的离心管中,加入 10 μ L $30 \times$ Working Dilution FAM-DEVD-FMK, 轻击管壁使混合均匀,在 37℃, 5% CO₂ 的环境中避光温育 1h。然后用 2 mL $1 \times$ Working Dilution Wash Buffer 清洗细胞 3 次,最后用 PBS 将细胞重悬,加到黑色 96 孔板中,用酶标仪在 485/535 nm 处检测荧光强度。

1.4 结果分析 得到的结果用 SPSS 统计软件作统计分析。

2 结果与讨论

本研究采用荧光标记的特异性的 Caspase-3 的抑制剂 FAM-DEVD-FMK 来检测 Caspase-3 的酶活。FAM-DEVD-FMK 是一种不具有细胞毒性的特异性 Caspase-3 的抑制剂,能够透

收稿日期: 2003-09-25; 修订日期: 2003-11-17

基金项目: 国家自然科学基金(20137010); 863 项目(2001AA641030); 教育部博士点基金(20020335078) 资助

作者简介: 傅文字(1978—), 女, 浙江省永康市人; 博士; 主要从事环境毒理学工作

通讯作者: 徐立红, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

过活细胞的细胞膜,并以 1:1 的形式与 Caspase 3 的活性中心共价结合。FAM-DEVD-FMK 具有三个不同的功能域:(1) 荧光基团功能域;(2) 特异的识别底物 Caspase 上的 4 肽的功能域;(3) 与 Caspase 的酶活性中心共价结合的功能域^[6]。一旦 FAM-DEVD-FMK 与激活的 Caspase 的酶活性中心结合,荧光基团 FAM 就可以释放出来,通过酶标仪来检测荧光强度就可以定量的反映 Caspase 的酶活。

不同浓度 LR 作用不同时间后对 BRL-3A 细胞的 Caspase 3 酶活性的影响见图 1(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。由图可知,10nmol/L LR 作用 1h 后, Caspase 3 酶活性比对照升高了 71.1%,差异具有显著性,表明 LR 在短时间、低浓度即可诱导 Caspase 3 活性升高。随着 LR 浓度的增大,酶活性随之升高,当 LR 的浓度为 500nmol/L 时酶活性达到了最高峰,并且在浓度低于 500nmol/L 时呈现剂量反应关系,当 LR 的浓度为 1000nmol/L 时,酶活性较 500nmol/L 浓度组有所降低,但差异不具有显著性。而在 LR 作用 4h 和 8h 时 Caspase 3 的酶活性的变化与 LR 作用 1h 时的变化相似,但是酶活性峰值分别出现在 1000nmol/L 和 100nmol/L 处。这说明在 LR 作用较短时间时,毒素对 Caspase 3 的激活作用有随着浓度增大而增强的趋势,而随着 LR 作用时间延长,高浓度毒素可以抑制 Caspase 3 的酶活。

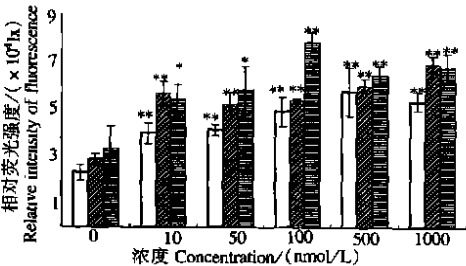


图 1 LR 对 BRL-3A 细胞 Caspase-3 酶活性的影响

Fig.1 Changes in the activity of Caspase-3 in BRL-3A cells after exposure to LR

□ 1h ▨ 4h ■ 8h

结合以前的实验结果^[4,5],可以看出 NRK 和 BRL-3A 两种细胞在不同 LR 浓度和不同作用时间下, Caspase 3 均可以被激活,且激活作用在一定浓度和一定时间出现峰值。但两

种细胞的 LR 浓度—Caspase 3 活性曲线不尽相同,10nmol/L LR 作用 1h 后,肝细胞中 Caspase 3 的活性比对照组升高 71.1%,而肾细胞中相应值为 56%;当 LR 分别作用 1h、4h 和 8h 时,肝细胞的 Caspase 3 酶活性的峰值分别出现在 500nmol/L、1000nmol/L 和 100nmol/L 处,在相同的情况下,肾细胞的 Caspase 3 酶活性的峰值则分别出现在 10nmol/L、50nmol/L 和 100nmol/L 处。出现两种不同的细胞对 LR 的反应不一致的原因可能是:(1)细胞内可能存在多种不同的 Caspase 激活和失活的途径,Caspase 的活性和活化受多种因素和多种途径的共同调节,LR 可能对细胞内存在的不同的 Caspase 3 激活和失活途径产生了影响。(2)不同来源的细胞对 LR 的敏感性存在差异。

本研究表明 LR 可以诱导 BRL-3A 细胞中 Caspase 3 酶活性的升高,Caspase 3 可能在 LR 诱导的细胞凋亡中起了重要作用。同时表明肝、肾这两种不同来源的细胞对 LR 的敏感性不一样。

参考文献:

[1] Ding W X, Shen H M, Zhu H G *et al.* Studies on Oxidative Damage Induced by Cyanobacteria Extract in Primary Cultured Rat Hepatocytes [J]. *J. Environ Res*, 1998, **78**: 12—18

[2] Ding W X, Ong C N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria induced apoptosis and hepatotoxicity [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2003, **220**(1): 1—7

[3] Yuan C Q, Ding Z H. The structure and function of caspase [J]. *Foreign med sci (molecular biology section)* 2002, **24**(3): 146—151. [袁长青,丁振华, Caspase 的结构与功能,国外医学分子生物学分册,2002, **24**(3): 146—151]

[4] Fu W Y, Li M W, Xu L H *et al.* Detecetion of apoptosis of renal cells of mice induced by microcystin LR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2004, **28**(1): 101—102. [傅文宇,李敏伟,徐立红,等,一种检测微囊藻毒素 LR 诱导大鼠肾细胞凋亡的方法.水生生物学报 2004, **28**(1): 101—102]

[5] Fu W Y, Chen J P, Xu L H. The role of Caspase 3 in the apoptosis o induced by microcystin [J]. *China Environ Sci*. 2004, 1. (in press) [傅文宇,陈加平,徐立红. Caspase 3 在微囊藻毒素诱导的细胞凋亡中的作用,中国环境科学,2004, **24**(1): 6—8]