

六种重金属离子胁迫诱导鱼类细胞凋亡的研究

项黎新 邵健忠* 孟 真

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要 以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) ZC7901 细胞为研究模型, 选用六种重金属离子进行胁迫诱导鱼类细胞凋亡试验. 结果显示, 在 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 As^{5+} 、 Pb^{2+} 的胁迫作用下, ZC7901 细胞均出现了明显的染色质凝集、趋边化、形成凋亡小体等凋亡形态特征, 核酸电泳显示 DNA 发生特异降解而呈现电泳阶梯, 用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 法, 检测到 DNA 的 3'-OH 断端均被原位特异标记, 表明六种重金属离子均能诱导鱼类细胞发生典型的凋亡.

关键词 重金属离子, 鱼类细胞, 体外诱导, 细胞凋亡

学科分类号 Q28

由于重金属离子是严重的水体污染物, 它们与水生动物如鱼类的关系一直倍受关注. 已报道重金属离子对鱼类细胞的结构和功能会产生明显影响^[1], 但有关其诱导鱼类细胞凋亡尚未见报道. 细胞凋亡 (apoptosis) 又称程序性细胞死亡 (programmed cell death), 是细胞受内、外因子刺激后发生的由自身基因调控的生理性死亡行为, 是一种区别于细胞坏死 (necrosis) 的主动死亡过程, 目前在部分动物和植物中已有较深入探讨^[2~5]. 近年来, 作者在开展重金属离子对鱼类毒理机制的研究中, 发现 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 As^{5+} 和 Pb^{2+} 等均能诱导鱼类细胞产生典型的凋亡现象, 这不仅为开展鱼类细胞凋亡研究打下了基础, 而且为重金属毒理机制研究提供了新的思路.

1 材料与方法

1.1 试验细胞

草鱼吻端组织 ZC7901 细胞株, 系上皮样和纤维样混合型二倍体细胞, 染色体 $2n = 48$. 用含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 TC-199 培养液, 27℃ 常规方法培养^[6].

1.2 重金属离子的细胞毒性试验

将 CdCl_2 、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、 HgCl_2 、 CuSO_4 、 Na_3AsO_4 、 PbSO_4 六种重金属盐 (均为分析纯) 配成不同浓度, 加入培养液, 处理细胞 24 h, 用噻唑蓝 (MTT) 法测定活性^[7], 确定各种重金属离子对细胞的毒性剂量.

1.3 细胞凋亡的诱导

在 ZC7901 细胞中分别加入终浓度为 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Cd^{2+} 、 $4.1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Cr^{6+} 、 $6.1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Hg^{2+} 、 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Cu^{2+} 、 $1.2 \times$

10^{-3} mol/L As^{5+} 和 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Pb^{2+} , 27℃ 诱导 24 h, 同时设不加重金属离子处理的对照.

1.4 细胞凋亡的检测

1.4.1 吖啶橙荧光染色: 经重金属离子处理的细胞, 用 0.01% 吖啶橙 (PBS, pH 7.0 配制) 染色 5 min, 常规封片后, 置 Nikon 荧光显微镜下观察^[8].

1.4.2 DNA 提取与电泳分析: 细胞经重金属离子处理后用 PBS 洗 2 次, 加 TE (50 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, pH 7.2) 缓冲液悬浮, 再加 10% SDS 至终浓度为 1%, 适当保温后, 加 0.2 g/L 蛋白酶 K, 37℃ 作用 2 h, 等体积饱和酚-氯仿抽提, 除尽蛋白质后, 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 混匀, 无水乙醇沉淀. DNA 用 TE 溶解, 50 mg/L RNaseA 37℃ 处理 0.5 h, 1.5% 琼脂糖 50 V 电泳, EB 染色观察.

1.4.3 末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记检测 (TUNEL): 应用 Sigma 公司的试剂盒进行. 细胞用 10% 中性福尔马林固定 25 min, PBS 洗 3 次, 0.2% Triton X-100 处理 5 min, PBS 清洗. 然后用标记缓冲液处理 15 min, 加末端脱氧核糖核酸转移酶和生物素 (biotin) 标记的 dUTP 37℃ 温育 1 h, 再用 $2 \times \text{SSC}$ 和 0.3% H_2O_2 甲醇分别作用 15 min, PBS 清洗, 加封闭液处理 30 min, 再加亲和素-辣根过氧化物酶 (avidin-HRP) 液, 37℃ 反应 1 h 后加二氨基联苯胺 (DAB) 显色观察.

1.4.4 电镜观察: 经诱导的细胞用 PBS 清洗, 离

* 通讯联系人.

Tel: 0571-88273287, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2001-02-08, 接受日期: 2001-04-05

心收集, 2.5% 戊二醛固定 2 h, 1% OsO_4 固定 1 h, 丙酮系列脱水, Epon 812 包埋. 超薄切片厚度为 30~40 nm, 醋酸双氧铀染色 15 min, 柠檬酸铅染色 5 min, HITACHI-600 电镜观察.

2 结 果

2.1 六种重金属离子的细胞毒性试验

结果显示, 六种重金属离子对 ZC7901 细胞均呈现较强的毒性, 其中 Cd^{2+} 浓度达到 $6.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时, 细胞活性开始下降, 而达到 $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 细胞全部死亡, 表明 Cd^{2+} 的毒性剂量范围为 $6.6 \times 10^{-6} \sim 1.1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; 其他五种离子 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 As^{5+} 和 Pb^{2+} 的毒性剂量依次为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 4.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $3.7 \times 10^{-6} \sim 1.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $6.6 \times 10^{-6} \sim 7.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $3.2 \times 10^{-5} \sim 4.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 和 $3.0 \times 10^{-6} \sim 8.3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. 根据该结果, 实验选择约产生 60% 细

胞毒性的离子浓度作为细胞凋亡的诱导剂量.

2.2 细胞凋亡的检测

2.2.1 细胞凋亡形态的荧光显微镜观察: 在荧光显微镜下, 经吖啶橙染色的正常对照细胞形态是, 细胞核和细胞质染色均匀, 分别呈黄绿色和桔红色荧光 (图 1a); 而经六种重金属离子诱导的细胞, 均出现了一系列典型的凋亡细胞形态特征, 如在诱导早期, 核内染色质发生不规则凝集、固缩和周边化, 有些呈月牙形, 分布在核膜一侧 (图 1b), 有些呈致密的颗粒或团块状 (图 1c). 诱导后期, 核内凝集的染色质突出到核外, 形成凋亡小体, 最终在细胞质内出现大量凋亡小体 (图 1d).

2.2.2 TUNEL 标记的 DNA 末端断裂: 结果显示, 经六种重金属离子诱导的细胞, 其核 DNA 经 TUNEL 反应后, 均出现大量棕黑色阳性标记斑点, 表明其 DNA 发生了特异降解, 出现大量 3'-OH 断端而被原位标记. 正常对照细胞未见标记 (图 1e, f).

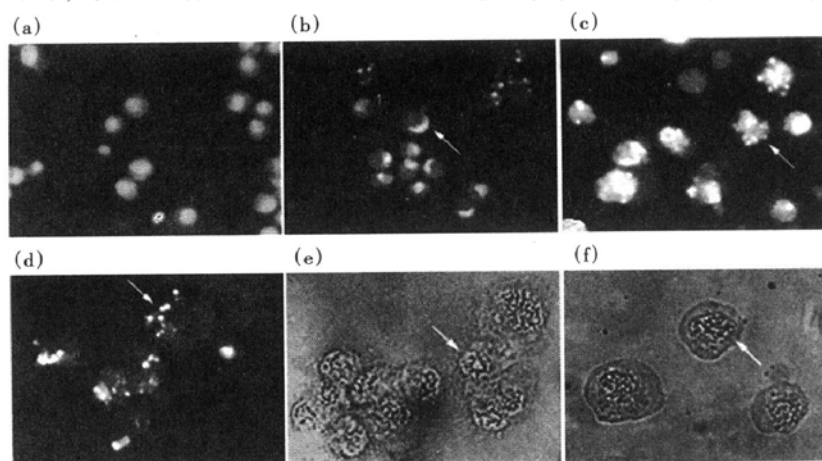


Fig. 1 Fluorescence and TUNEL detection for the apoptosis of ZC7901 cell line of grass carp exposed to heavy metal ions

(a) control, cells uninduced by heavy metal ions (200 $\times$); (b) ~ (c) cells induced by heavy metal ions showing irregular chromatin condensation into crescentiform ($\uparrow$ indicated, 200 $\times$) and granules ($\uparrow$ indicated, 400 $\times$); (d) apoptotic bodies in cytoplasm ($\uparrow$ indicated, 400 $\times$); (e) ~ (f) TUNEL labeling of cells induced by heavy metal ions ($\uparrow$ indicated, 400 $\times$).

2.2.3 DNA 发生特异降解而形成梯状电泳 (DNA ladder): DNA 发生特异降解而形成梯状电泳是细胞凋亡的主要生化指标. 实验结果显示, 经六种重金属离子诱导的细胞, 其 DNA 均发生了特异降解而出现典型的梯状电泳, 梯状条带的间隔约 200 bp, 而对照细胞的 DNA 完好, 未见降解现象 (图 2). 对 Cd^{2+} 诱导规律的研究表明, DNA ladder 的形成与离子浓度和诱导时间有关, 离子浓度较低时, 出现 DNA ladder 所需的时间较长, 而随着离子浓度的增高, 出现 DNA ladder 所需的时间缩短, 且出现的梯状条带越明显. 如用 $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

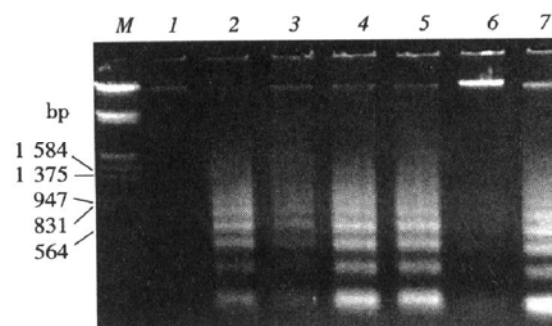


Fig. 2 DNA ladder induced by heavy metal ions in ZC7901 cell line of grass carp

M: molecular mass marker (λ DNA digested by *EcoRI* and *HindIII*); 1: DNA of control cells; 2~7: DNA ladders of cells induced by Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} and Pb^{2+} respectively.

Cd^{2+} 诱导, 只需 12 h 就出现明显的 DNA 梯带、而用 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 和 $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Cd^{2+} 诱导, 则需 24 h 以上才出现明显的 DNA 梯带、用 $6.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ Cd^{2+} 诱导, 需 36 h 出现梯带 (图 3)。

2.2.4 电镜超薄切片观察: 结果显示, 未经诱导的对照细胞, 形态规则, 核染色质分布均匀, 细胞质内各种细胞器清晰可辨, 超微结构未见异常变化。而经重金属离子诱导的细胞, 其形态结构出现了一系列凋亡细胞的特征, 如核内染色质凝聚, 呈颗粒或团块状, 染色质周边化, 核向细胞质突出、断裂, 细胞质出现大量空泡, 细胞向外突出, 形成凋亡小体 (图 4)。

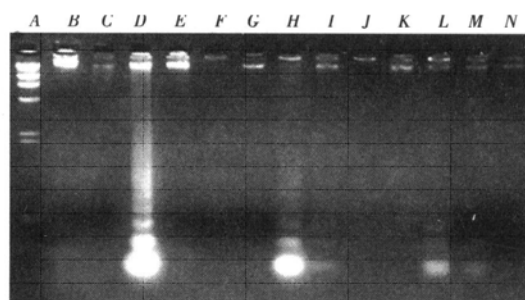


Fig. 3 DNA ladders induced by different concentrations of Cd^{2+} at different times in ZC7901 cell line of grass carp

A: molecular mass marker (λ DNA digested by *Hind* III); B, C, K and N: DNA of control cells; D~G: DNA of cells induced by Cd^{2+} for 12 h at different concentrations of $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ and $6.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; H~J: DNA of cells induced by Cd^{2+} for 24 h at different concentrations of $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ and $6.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; L~M: DNA of cells induced by Cd^{2+} for 36 h at different concentrations of $1.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ and $6.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

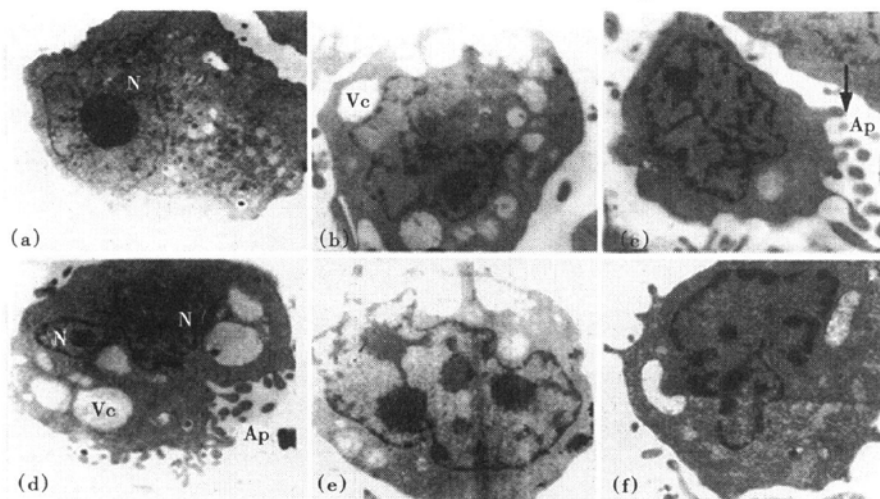


Fig. 4 Electron micrograph of apoptosis of ZC7901 cell line induced by heavy metal ions

(a) control normal cells; (b) ~ (f) changes in cell structure during cell apoptosis induced by heavy metal ions, (b) showing a lot of vacuoles (Vc) in cytoplasm; (c) showing condensation and shrinkage of chromatin, bubbling of cytoplasm on surface and appearance of apoptotic bodies ($\uparrow$ Ap); (d) showing blebbing of nucleus, chromatin condensing into granules, a lot of vacuoles (Vc) appeared in cytoplasm, bubbling of cytoplasm on surface and formation of apoptotic bodies (Ap); (e) showing nuclear chromatin condensing into granules; (f) showing chromatin condensed and abutted against nuclear membrane.

3 讨 论

研究结果表明, Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 As^{5+} 和 Pb^{2+} 六种重金属离子胁迫诱导草鱼细胞所发生的变化, 均符合凋亡细胞的特征^[9], 表明它们都能诱导鱼类细胞发生凋亡, 因此可以认为, 重金属具有普遍的诱导鱼类细胞凋亡的作用, 这为深入探讨重金属的细胞毒理学机制提供了新的思路。

近年来, 有关重金属诱导细胞凋亡及其机制的研究已开始受到重视, 国际上已有 Cd^{2+} 等少数几种重金属离子诱导人和小鼠细胞凋亡的报

道^[10~12], 但从环境污染角度开展重金属与细胞凋亡关系的研究还很少。鱼类是重要的水生动物, 重金属则是主要的水体污染物之一, 因此探讨重金属与鱼类细胞凋亡的关系, 不仅可以丰富环境毒理学等研究内容, 而且对揭示细胞与环境的关系具有一定的理论意义。

参 考 文 献

- 1 甘居利, 吴光权. 鱼体内锌、镉和核酸的变化及其相互关系研究. 水生生物学报, 1998, 22 (1): 98~100
Gan J L, Wu G Q. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22 (1): 98~100

- 2 Peter M E, Heufelder A E, Hengartner M O. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (24): 12736~ 12737
- 3 Greenberg J T. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (22): 12094~ 12097
- 4 Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1997, **9** (7): 1157~ 1168
- 5 Newmeyer D D, Farschon D M, Reed J C. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: Inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, 1994, **79** (2): 353~ 364
- 6 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC7901s 的建立. *实验生物学报*, 1981, **14** (1): 101~ 105
Zhang N C, Yang G Z. *Acta Exp Biol*, 1981, **14** (1): 101~ 105
- 7 Ferrari M, Chiara M, Isetta A M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity. *J Immunol Methods*, 1990, **131** (2): 165~ 172
- 8 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996. 170~ 183
Jiang P, Zhang Y L, Zhou D Y. *Common Experimental Methods for Molecular Biology*. Beijing: People's Surgeon Press, 1996. 170 ~ 183
- 9 Thompson E B. Special topic: apoptosis. *Ann Rev Physiol*, 1998, **60** (3): 525~ 532
- 10 Habbeebu S S, Liu J, Klaassen C D. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, **149** (2): 203~ 209
- 11 Ishido M, Homma T, Takeda S, Tohyama C, *et al.* Apoptosis in rat renal proximal tubular cells induced by cadmium. *J Toxicol Environ Health*, 1998, **55** (1): 1~ 12
- 12 翟琦巍, 季红斌, 郑仲承等. 镉离子诱导 BA/F3B 细胞发生奇特的细胞凋亡. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (1): 77~ 80
Zhai Q W, Ji H B, Zheng Z C, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2000, **32** (1): 77~ 80

Apoptosis Induction in Fish Cells under Stress of Six Heavy Metal Ions

XIANG Li-Xin, SHAO Jian-Zhong^{*}, MENG Zhen

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract A grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell culture ZC7901 was used as an *in vitro* model system to study the effect of heavy metal ions on fish cells. The results showed that the cell culture chemically stressed by six heavy metal ions, Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} and Pb^{2+} , exhibited cell death accompanied by various morphological alterations such as nuclear condensation, chromatin abutted sharply against nuclear membrane and developed into distinct apoptotic-like bodies, which were characteristic features seen in apoptosis. By agarose gel electrophoresis, DNA ladder were clearly visualized, which indicated the specific degradation of DNA. Also terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis of the cells demonstrated DNA fragmentation localized in the dying cells as well as in the additional apoptotic-like bodies. All the results indicated that six heavy metal ions, Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , As^{5+} and Pb^{2+} , were all able to induce apoptosis in fish cells.

Key words heavy metal ions, fish cells, *in vitro* induction, apoptosis

^{*} Corresponding author. Tel: 86-571-88273287, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn

Received: February 8, 2001 Accepted: April 5, 2001