

· 论 著 ·

N-乙酰半胱氨酸和 caspase-3 抑制剂对镉诱导 293 细胞凋亡的拮抗作用

王雨, 徐兆发*, 喻道军

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 研究 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl cysteine, NAC) 和 caspase-3 抑制剂 (Z-DEVD-fmk) 对镉致 293 细胞凋亡的影响, 探讨氧化损伤和 caspase 途径在镉致细胞凋亡中的作用。方法 体外培养的转化人胚肾 293 细胞分别以 0、20、40、80、120、200 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化镉 (CdCl_2) 处理 0、3、6、12、24 h, NAC 和 Z-DEVD-fmk 预处理组分别在镉处理前以 2.5、5.0、10.0 mmol/L 的 NAC 和 0.1、1.0、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Z-DEVD-fmk 预处理 24 h 和 1 h, 然后再以 40 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 24 h, MTT 法测细胞相对存活率, 流式细胞术 Annexin-V-PI 双染法检测细胞凋亡百分率。结果 随着镉处理浓度的增加, CdCl_2 对细胞活力的抑制作用增强, 细胞的相对存活率明显降低, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理组比较, 40、80、120、200 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理组 293 细胞的凋亡百分率显著升高 ($P < 0.01$); 200 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理组与 120 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 组比较 293 细胞的凋亡百分率显著下降 ($P < 0.01$)。与 40 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理组比较, 5.0 mmol/L 和 10 mmol/L NAC 预处理组细胞凋亡百分率显著降低, 0.1、1.0、10 $\mu\text{mol/L}$ Z-DEVD-fmk 预处理可使镉致 293 细胞凋亡百分率显著降低。结论 NAC 和 Z-DEVD-fmk 对镉诱导 293 细胞凋亡有明显的抑制作用, 镉诱导细胞凋亡与氧化损伤和 caspase 途径密切相关。

关键词: Caspase-3 抑制剂; *N*-乙酰半胱氨酸; 镉; 凋亡

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)06-0321-04

Antagonistic effect of *N*-acetyl cysteine and caspase-3 inhibitor on apoptosis of 293 cells induced by cadmium

WANG Yu, XU Zhao-fa*, YU Dao-jun

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To study the effects of *N*-acetyl cysteine and caspase-3 inhibitor on apoptosis of transformed human embryonic kidney 293 cells induced by cadmium for exploring the role of oxidative damage and caspase pathway played in the apoptosis. **Method** Transformed human embryonic kidney 293 cells were incubated with 0, 20, 40, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 respectively for 0, 3, 6, 12 and 24 h. The cells in groups of NAC and caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-fmk) were pre-treated with 2.5, 5.0, 10.0 mmol/L NAC and 0.1, 1.0, 10 $\mu\text{mol/L}$ Z-DEVD-fmk for 24 h and 1 h respectively before 24 h incubation with 40 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 . Using MTT method for measuring the relative survival rate and flow cytometry annexin-V/PI double stain method for measuring the apoptosis percentage of test cells. **Result** The results showed that the cellular relative survival rate was time and dose dependent upon the dose of cadmium. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ cadmium, the apoptosis rate increased obviously in the incubating cells with 40, 80, 120, 200 $\mu\text{mol/L}$ cadmium ($P < 0.01$). Both NAC (an antioxidant agent) and Z-DEVD-fmk (a selective inhibitors of caspase-3), might significantly suppress cadmium-induced cell apoptosis ($P < 0.01$). **Conclusion** Antioxidant agent and selective inhibitor of caspase-3 may suppress the apoptosis induced by Cd and oxidative stress and caspase-3 might be involved in Cd-induced apoptosis.

Key words: Caspase-3 inhibitor; *N*-acetyl cysteine; Cadmium; Apoptosis

镉是重要的工业和环境污染物, 由于镉在工业上应用广泛, 镉在土壤、植物中都有一定的蓄积, 在人体的半减期又长达 30 年, 镉接触与生殖损害、肿瘤和衰老等也有一定的关系。近几年关于镉致凋亡的研究成为各国学者对镉分子毒理学研究的一个热点。镉能引起多种组织和细胞发生凋亡^[1,2], 镉致细胞凋亡

是镉毒性损伤的重要机制之一。细胞凋亡受到多种因素的调节, 有文献表明自由基损伤能诱导细胞凋亡, 抗氧化剂能通过抑制对细胞的氧化性损伤降低或阻断多种因素诱导的凋亡^[3,4]。巯基供给剂在抗凋亡的药物中占有重要的地位, 通过清除自由基, 巯基供给剂可以保护细胞免于发生 DNA 损伤引起的死亡。*N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl cysteine, NAC) 是抗氧化剂、巯基保护剂, 也是一种自由基清除剂, 我们前期的研究也显示, NAC 对急性、亚慢性镉染毒大鼠肝、肾损伤具有明显的拮抗和保护作用^[5,6]。Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-fmk 是根据 caspase 底物的识别部位而人工

收稿日期: 2006-05-15; 修回日期: 2006-07-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371200)

作者简介: 王雨 (1973-), 女, 医学博士, 副教授, 主要从事重金属中毒机制及防治研究。

*. 通讯作者, 教授, 博士生导师。

合成的特异性 caspase 四聚体衍生物抑制剂, 其具有较好的细胞膜渗透性, 易于进入细胞, 对 caspase-3 活性的抑制具有较高的特异性和不可逆性。基于以上资料, 本研究探讨 NAC 和 Z-DEVD-fmk 对镉诱导转化人胚肾 293 细胞凋亡的影响, 为研究氧化损伤与 caspase-3 在细胞凋亡中的作用及镉致细胞凋亡的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胎牛血清购于 GIBCO; NAC、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品; Z-DEVD-fmk 为 BioVision 公司产品; Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒购于北京宝赛生物技术有限公司。BB15 型 CO₂ 恒温培养箱 (Heraeus 公司); SW-CJ-CA 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); ck40 型倒置显微镜 (Olympus 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); SUNRISE 酶标仪 (Tecar 公司)。

1.2 细胞培养

转化人胚肾 293 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。将 293 细胞接种于培养瓶中, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液进行培养, 待细胞贴壁生长约 90% 进行传代, 大约 2~3 d 传代一次。培养条件: 5% CO₂, 37℃。

1.3 细胞活力的测定

细胞活力的测定用四甲基偶氮唑蓝比色法 (MTT), 将处于指数生长期的 293 细胞弃去原培养液, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^5 个/ml, 于 96 孔板每孔加入 200 μ l, 置于 5% CO₂、37℃ 饱和湿度培养 24h。弃去原培养液, 分别加入含 0、20、40、80、120、200 μ mol/L 氯化镉 (CdCl₂) 的 DMEM 培养液, 37℃ 孵育 3、6、12 和 24 h 后, 每孔加入 15 μ l MTT (5 mg/ml) 继续培养 4 h 后吸弃全部培养液, 每孔加入 150 μ l 二甲亚砜 (DMSO) 振荡 10 min, 终止反应, 在酶标仪 570 nm 吸收光波长处检测吸光度 A 值, 分析各组细胞生长的情况。各剂量组取平均值, 根据公式: 细胞相对存活率 (%) = (实验组 A / 对照组 A) \times 100%, 计算细胞的相对存活率。

1.4 细胞凋亡百分率的检测

细胞凋亡百分率的检测用流式细胞术 (flow cytometry, FCM), 将细胞接种在培养瓶中, 传代生长约 70% 细胞后, 经无血清培养液培养 24 h, 分别以 0、20、40、80、120、200 μ mol/L 的 CdCl₂ 处理, 每

个剂量设 4 个培养瓶, 37℃ 孵育 24 h。弃去培养液, 加入适量的 PBS, 制成单细胞悬液; 收集细胞, 分别加入两种染料, 采用流式细胞仪进行检测, Cell Quest3.0 采集软件进行数据处理。

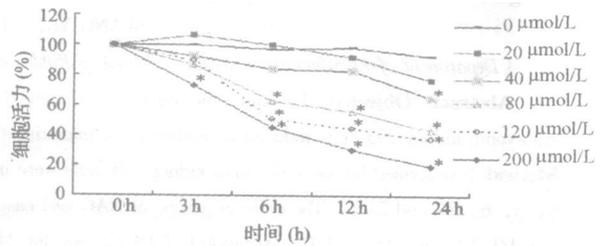
1.5 统计分析

实验所得数据以平均值 \pm 标准差表示, 用 SPSS 10.0 软件单因素方差分析方法进行组间差异的显著性检验, 两两比较用 q 检验 (SNK)。

2 结果

2.1 不同浓度 CdCl₂ 对 293 细胞相对存活力的影响

由图 1 可见, 随着镉处理浓度的增加, CdCl₂ 对细胞活力的抑制作用增强。染镉 3 h, 只有 200 μ mol/L 镉处理组细胞存活率显著降低; 染镉 6 h 和 12 h, 80 μ mol/L 及以上浓度镉处理组细胞的相对存活率均明显降低; 染镉 24 h, 40 μ mol/L CdCl₂ 已呈现明显的毒性效应, 细胞的相对存活率明显降低, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着镉处理浓度的增加, 显微镜下可见细胞皱缩、变圆, 伪足消失, 间隙变大, 贴壁细胞减少而悬浮细胞增多。



与 0 μ mol/L 镉处理组比较, * $P < 0.01$

图 1 镉处理对 293 细胞相对存活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

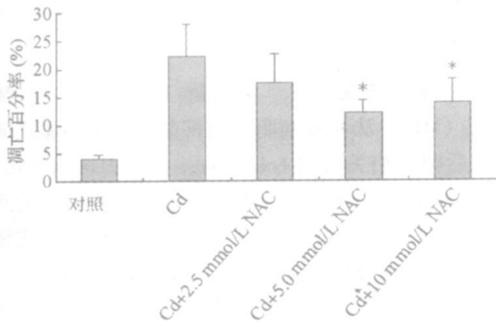
2.2 流式细胞仪 Annexin-V-PI 双染法检测细胞凋亡百分率

不同浓度的 CdCl₂ 诱导 293 细胞的凋亡呈现浓度依赖性。0、20、40、80、120、200 μ mol/L 镉处理 293 细胞的凋亡百分率分别为 4.01%、7.81%、22.34%、38.92%、57.02%、39.04%。与 0 μ mol/L 镉处理组比较, 40、80、120、200 μ mol/L 镉处理组 293 细胞的凋亡百分率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 20 μ mol/L 镉处理组的细胞凋亡百分率略有升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 200 μ mol/L 镉处理组与 120 μ mol/L CdCl₂ 组比较 293 细胞的凋亡百分率显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 不同浓度 NAC 对镉诱导 293 细胞凋亡的影响

由图 2 可见, 与 40 μ mol/L 镉处理组比较, 5.0 和 10.0 mmol/L NAC 预处理组细胞凋亡百分率显著降

低 ($P < 0.01$), 2.5 mmol/L NAC 预处理组细胞凋亡百分率比 40 μ mol/L 镉处理组略有下低, 但差异无统计学意义。



与 40 μ mol/L 镉处理组比较, * $P < 0.01$, 下图同。

图2 不同浓度NAC预处理对镉诱导293细胞凋亡的影响

2.4 不同浓度Z-DEVD-fmk对镉诱导293细胞凋亡的影响

由图3可见, 0.1、1、10 μ mol/L Z-DEVD-fmk 预处理可使镉致293细胞凋亡百分率显著下降, 与单纯镉处理组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

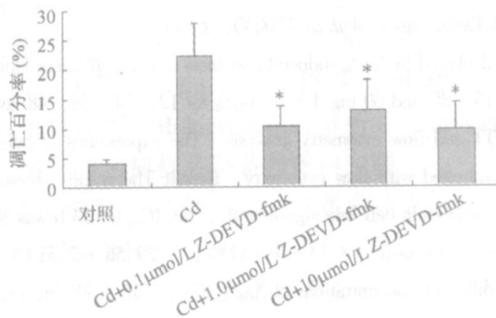


图3 Z-DEVD-fmk预处理对镉诱导293细胞凋亡的影响

3 讨论

肾脏是镉毒作用的主要靶器官, Hamada 等^[7]体外培养转化人类肾脏细胞 (293 细胞), 在培养液中加入 CdCl₂, 凋亡细胞明显增多并呈剂量-反应关系。本实验同样采用 293 细胞观察离体实验中镉对肾细胞的毒作用, 发现镉处理可致 293 细胞活力降低, 染毒浓度越大, 细胞活力的改变出现越早。在一定范围内, 镉可剂量依赖性的诱导 293 细胞凋亡, 随着镉处理剂量的增加, 凋亡细胞和死亡细胞增多而正常细胞减少。

细胞凋亡有多种诱因, 有研究显示, 镉致凋亡的机制与细胞氧化损伤密切相关, ROS 可通过死亡受体途径导致细胞凋亡^[8]。Jin 等^[9]的研究结果显示, 用 BSO 使肝细胞谷胱甘肽耗竭, 细胞脂质过氧化、ROS 产生增加, 同时诱发细胞凋亡和 caspase-3 酶活性增加。NAC 是谷胱甘肽的前体, 是一种含巯基的抗氧化

剂, 可能通过改善细胞内氧化应激状态抑制细胞凋亡的发生。有研究发现, NAC 能够抑制镉诱导的 JNK 和 c-Jun 的磷酸化并显著抑制细胞凋亡^[10]。本研究结果显示, NAC 使镉诱导细胞凋亡百分率下降 45.0% (22.34%、12.29%, $P < 0.01$), 提示镉诱导 293 细胞凋亡与细胞氧化损伤密切相关, NAC 的抗氧化作用能部分地拮抗细胞的氧化损伤, 从而在一定程度上抑制了镉致 293 细胞凋亡。

Caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶, 是细胞凋亡的主要效应因子。在诱导细胞凋亡因素的作用下, caspase-3 从线粒体释放并激活。活化后的 caspase-3 具有在天冬氨酸残基后切断肽键的能力, 最终导致细胞内重要蛋白质降解失活及 DNA 断裂, 细胞发生凋亡。有研究显示, 镉诱导细胞凋亡过程中有 caspase-3 活性的增加^[11]。而 Shih 等^[12]的研究发现, 镉诱导骨肉瘤细胞凋亡过程中没有 caspase-3 活性的改变, caspase 的广谱抑制剂 Z-VAD-fmk 也不能抑制镉所致的细胞凋亡, 因而镉可能诱导不依赖于 caspase 途径的细胞凋亡。本研究选用 caspase-3 选择性四肽抑制剂 Z-DEVD-fmk 进行 caspase-3 的阻断和抑制实验, 发现 Z-DEVD-fmk 可显著降低镉诱导的细胞凋亡, 说明镉诱导的 293 细胞凋亡依赖于半胱天冬酶的级联反应; 但加大 caspase-3 抑制剂的剂量不能相应地阻断细胞凋亡的发生, 提示镉诱导 293 细胞凋亡可能还有其他机制。

综上所述, 镉可以通过氧化损伤途径导致细胞凋亡, 镉致凋亡又与 caspase 密切相关, 同时镉诱导细胞凋亡可能还有其他机制的参与。

参考文献:

- [1] Sokolova M, Evans S, Hughes EM. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition [J]. *J Exp Biol*, 2004, 207(19): 3369-3380.
- [2] Thompson J, Hipwell E, Loo H V, et al. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos [J]. *Reprod Toxicol*, 2005, 20 (4): 539-548.
- [3] Hart BA, Lee C H, Shukla G S, et al. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress [J]. *Toxicology*, 1999, 133 (1): 43-58.
- [4] Pathak N, Khandelwal S. Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium [J]. *Toxicology*, 2006, 220(1): 26-36.
- [5] 王雨, 徐兆发, 喻道军 等. N-乙酰半胱氨酸和硒对镉急性毒性的影响 [J]. *中国公共卫生*, 2005, 21 (4): 411-412.
- [6] 王雨, 徐兆发, 喻道军 等. N-乙酰半胱氨酸和亚硒酸钠对镉亚慢性毒性的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2005, 19 (4): 251-253.
- [7] Hamada T, Sasaguri T, Tanimoto A, et al. Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219 (3): 829-834.

(下转第 361 页)

剂量不超过 $200 \mu\text{W} \cdot \text{h} / \text{cm}^2$ 。据国内有关微波作业现场流行病学调查研究表明,微波作业工人接触微波功率比较小,绝大部分作业的微波漏能为几十至几百 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$ [4]。本调查所涉及的脉冲微波辐射强度 $0.4 \sim 554.0 \mu\text{W} / \text{cm}^2$, 中位数 $68.9 \mu\text{W} / \text{cm}^2$, 亦属于小功率脉冲微波辐射接触范围,但所有检测数据中大于 $25 \mu\text{W} / \text{cm}^2$ 者占 61.7% , 大于上述安全阈强度的数据占 8.6% , 大于上述有害阈强度的占 2.5% , 其中大于安全阈及有害阈强度的数据分布于高功率组。提示该研究所某些微波作业环境辐射强度已略超过国家职业卫生标准。

微波辐射的损伤机制,尤其是致突变效应是目前非电离辐射研究十分关注的问题。国内外学者自20世纪70年代至今进行了大量体外细胞实验(原核细胞和真核细胞)和整体动物实验,结果发现,在人外周血淋巴细胞微波暴露实验中GMSK(Gaussian minimum shift keying)调制波可明显增加微核率[5],且其增加状况与微波辐射的功率密度和照射时间有关[6]。但由于实验条件和研究指标不统一,研究结果尚不够一致。职业接触人群的调查亦发现外周血淋巴细胞染色体畸变率及SCE平均值增高[7,8],但也有微波暴露对人体不产生遗传损伤的报道。本调查研究两接触组外周血淋巴细胞微核率异常者检出率及高功率组的微核率、染色体畸变率异常者检出率、畸变细胞率、染色体型畸变率均显著高于对照组($P < 0.01$),提示接触一定强度的小功率脉冲微波辐射可以引起人体遗传物质的损伤,这可能与小功率脉冲微波辐射的非致热效应有关。高功率组的染色体型畸变率及畸变细胞率均高于元件组($P < 0.01$),说明微波辐射引起的遗传物质损伤与接触辐射的强度有关。目前有学者认为,当DNA、蛋白质和类脂分子吸收了微波能量后,引起转动能量的增加,这可能导致它们的畸变能增加,从而使其构象或结构发生变化[9],造成遗传物质及修复机制损伤,导致受辐射细胞的微核率及染色体畸变率增高。

本调查显示微波所致的染色体畸变类型包括染色体型畸变和单体型畸变,但以染色体型畸变为重。染色体的畸变类型与细胞周期有关,处于G₁或G₀期的细胞受到诱变剂的作用,因这时染色体尚未复制,培养后可产生染色体型畸变。电离辐射主要诱发此畸变。而处于S期或G₂期的染色体已经复制成为两条染色单体,此时受到损伤后可导致染色单体型畸变。大部分化学诱变剂及病毒感染可诱发此畸变。本文高功率组染色体型畸变率高于对照组($P < 0.01$),而染色单体型畸变率与对照组差别无统计学意义($P > 0.05$),主要由于外周血淋巴细胞基本

处于G₁或G₀期,微波辐射的损伤作用于染色体复制之前,此结果与电离辐射引起的染色体损伤相类似。

本文对接触组的微核率、染色体型畸变率、年龄和工龄进行了相关性分析,发现微核率与工龄、年龄有相关性。在偏相关分析中,在控制年龄因素后,接触组微核率、染色体型畸变率与工龄无相关性($P = 0.451$, $P = 0.270$)。说明长期慢性接触小功率脉冲微波辐射所致损伤未表现出累积效应。这可能与脉冲微波对细胞作用的特性有关。另外职业接触微波辐射是长期过程,机体在不断地损伤与修复,因而可能不表现明确的累积效应关系。

本调查研究提示,长期接触小功率脉冲微波对人体可能存在远期影响。为了切实保障微波接触人群的身心健康,应注意工作中加强个体防护,并建议把外周血淋巴细胞微核检查作为微波作业人员定期职业健康检查的参考项目。

参考文献:

- [1] 白玉书. 细胞遗传学指标在慢性放射损伤诊断中的意义 [Z]. 放射防护讲义. 北京:北京市放射卫生防护所, 1999: 12.
- [2] 曹晓哲, 王德文, 赵梅兰, 等. $98.55 \text{W} / \text{cm}^2$ 脉冲微波照射对大鼠血清生化指标影响的研究 [J]. 生命科学研究, 2002, 6 (1): 79-83.
- [3] 徐培基, 赵亚丽, 马洪波. 微波、超短波、短波对人体影响的研究及国军标的制定 [C]. 2003年全国电磁辐射生物学学术会议论文集. 杭州:浙江医科大学出版社, 2003: 103.
- [4] 夏玉静. 小功率微波对人体健康影响的国内研究进展 [J]. 中国职业医学, 2001, 28 (2): 49-51.
- [5] d'Ambrosio G, Massa R, Scarfi M R. Cytogenetic damage in human lymphocytes following GMSK phase modulated microwave exposure [J]. Bioelectromagnetics, 2002, 23 (1): 7-13.
- [6] Zotti-Martelli L, Peccatori M, Maggini V, et al. Individual responsiveness to induction of micronuclei in human lymphocytes after exposure in vitro to 1800 MHz microwave radiation [J]. Mutat Res, 2005, 582 (1-2): 42-52.
- [7] 郑巧玲, 陈润涛, 唐国汉, 等. 7例微波超标接触者的外周血淋巴细胞染色体畸变分析 [J]. 职业医学, 1994, 21 (2): 49-51.
- [8] 王泰清, 陶松贞, 王利兵, 等. 微波辐射对雷达作业者淋巴细胞姊妹染色单体互换的影响 [J]. 第四军医大学学报, 1990, (2): 109-111.
- [9] 庞小峰. 毫米波的非热生物效应的机理及特性 [C]. 2003年全国电磁辐射生物学学术会议论文集. 杭州:浙江医科大学出版社, 2003: 97-98.

(上接第323页)

- [8] Poliandri A H, Machiavelli L I, Quintens A F, et al. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40 (4): 679-688.
- [9] Jim M, Yarrig J, Kannan R, et al. Hepatocyte growth factor protects RPE cells from apoptosis induced by glutathione depletion [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46 (11): 4311-4319.
- [10] Kim SD, Moon CK, Eun SY, et al. Identification of ASK1, MKK4,

JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328 (1): 326-334.

- [11] Poliandri A H, Velardez M O, Cabilla J P, et al. Nitric oxide protects anterior pituitary cells from cadmium-induced apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37 (9): 1463-1471.
- [12] Shih Y L, Lin C J, Hsu S W, et al. Cadmium toxicity toward caspase-independent apoptosis through the mitochondria-calcium pathway in mtDNA-depleted cells [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1042: 497-505.