

ROS在镉诱导HK-2细胞氧化损伤和凋亡中的作用研究

董峰 吴琼 李向阳 张少英 王兰*

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要 该文研究了活性氧(reactive oxygen species, ROS)在镉(Cadmium, Cd)诱导HK-2细胞氧化损伤和凋亡中的作用。不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞不同时间后,通过MTT法、DCFH-DA标记、JC-1染色、彗星实验和流式细胞术分别检测细胞活性、ROS、线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 、DNA损伤及细胞凋亡情况。结果显示, CdCl₂处理引起HK-2细胞形态皱缩、变圆,活性下降,且呈时间和剂量依赖性; CdCl₂处理导致ROS水平升高、线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降、DNA损伤和caspase-3活化,最终导致细胞凋亡,且60 $\mu\text{mol/L}$ 处理组及高浓度组与对照组相比差异极显著($P<0.01$)。采用ROS清除剂NAC与CdCl₂共处理细胞24 h,发现细胞形态明显恢复、ROS水平显著降低、线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 显著升高、彗星尾部长度和DNA百分比显著下降、凋亡细胞减少($P<0.01$)。综上所述,ROS介导了Cd诱导的HK-2细胞氧化损伤和凋亡。

关键词 镉; HK-2细胞; ROS; DNA损伤; 线粒体膜电位; 细胞凋亡

Role of ROS in Cadmium-Induced Oxidative Damage and Apoptosis in HK-2 Cells

Dong Feng, Wu Qiong, Li Xiangyang, Zhang Shaoying, Wang Lan*

(College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract In this study, the role of ROS in Cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in HK-2 cells was studied. The oxidative damage of CdCl₂ on HK-2 cells was detected and evaluated by MTT assay, DCFH-DA labelling, JC-1 staining, comet assay and flow cytometry analysis. The results showed that CdCl₂ treatment significantly suppressed viability of HK-2 cells and induced morphological changes in a time- and concentration-dependent manner. CdCl₂ treatment increased ROS levels, reduced mitochondrial membrane potential $\Delta\psi_m$, induced DNA damage and triggered caspase-3 activation, resulting in HK-2 cell apoptosis. In addition, combination of CdCl₂ and ROS scavenger NAC, obviously improved the cell morphology, significantly reduced ROS levels, increased the mitochondrial membrane potential $\Delta\psi_m$, decreased DNA damage and apoptosis ($P<0.01$). Taken together, these data suggested that ROS mediated Cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in HK-2 cells.

Keywords Cadmium; HK-2 cells; ROS; DNA damage; mitochondrial membrane potential; apoptosis

镉(Cadmium, Cd)是环境中毒性最强的重金属元素之一,具有蓄积性强和毒性作用持久的特点。

自上世纪五十年代日本暴发“痛痛病”事件以来, Cd污染问题在世界范围内受到广泛关注^[1]。环境中Cd

收稿日期: 2018-06-21 接受日期: 2018-08-16

国家自然科学基金(批准号: 31602026)和山西大学提升综合实力专项经费(批准号: 113545044)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-7018796, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

Received: June 21, 2018 Accepted: August 16, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31602026) and the Special Foundation for Improving Comprehensive Strength of Shanxi University (Grant No.113545044)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7018796, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2018-09-27 16:39:17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180927.1639.010.html>

主要来源于采矿、冶金和电镀行业“三废”的排放,以及化肥、农药的滥用和电子垃圾的违规处理等。环境中Cd主要通过呼吸和食物链进入人体,不仅造成直接的组织器官损伤,还具有潜在的致癌、致畸和致突变作用,严重影响人类的健康^[2]。因此,早在1972年,联合国粮食及农业组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)就已将Cd列为仅次于黄曲霉毒素和砷的食品污染物。随后,Cd又被国际癌症研究机构(IARC)列为一类致癌物^[3]。改革开放以来,随着我国工业的发展,环境污染问题日益严重。特别是在2014年,《Science》杂志刊文报道中国的土壤和水源存在十分严重的Cd污染问题,涉及多个省、市和自治区,这一报道引起了政府和社会的广泛关注^[4]。

近年来,大量研究发现,Cd能够对动物肾脏、肝脏、睾丸、卵巢和胎盘等多个组织器官产生持久性的毒性损伤,其中,肾脏的蓄积量最大,损伤也最为严重^[5]。通过动物实验发现,Cd暴露造成大鼠肾小管肿胀、管腔狭窄,上皮细胞坏死、脱落形成管型,肾间质充血,炎性细胞浸润;超微结构观察显示,肾小管上皮细胞出现线粒体肿胀、变形和空泡样变性;肾组织中ROS含量和抗氧化酶表达增加^[6]。Cd进入肾脏后主要在近曲小管被重吸收^[7]。有研究发现,Cd暴露引起人肾近曲小管上皮HK-2细胞凋亡^[8]。但Cd导致HK-2细胞氧化损伤的具体机制还缺乏系统全面的研究。因此,本研究通过Cd处理体外培养的HK-2细胞,采用MTT试验、形态学观察、荧光标记、彗星试验、细胞流式术和Western blot等研究方法,检测Cd处理后HK-2细胞内ROS生成、线粒体膜电位变化 $\Delta\psi_m$ 、DNA损伤以及细胞凋亡的情况,从细胞水平初步探索Cd引起HK-2细胞氧化损伤的机理。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肾近曲小管上皮HK-2细胞购于ATCC; RPMI 1640培养基购于Gibco公司;胎牛血清购于Biological Industries公司;氯化镉(CdCl_2)购于Sigma公司;MTT、Hoechst 33342购于索莱宝公司;活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自于上海碧云天生物技术有限公司;H2AX抗体、caspase-3抗体购于CST公司, β -actin抗体购于Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购于中杉金桥;PVDF膜、超敏化学

发光试剂ECL均购于Millipore公司;其他各类试剂均为进口或国产分析纯试剂。

主要仪器有:超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司)、 CO_2 细胞培养箱(SANYO公司)、移液器、Centrifuge 5415R型离心机(Eppendorf公司)、荧光显微镜(Olympus公司)、全波长自动酶标仪(Bio-Tek公司)、DYY-7C型电泳仪(北京市六一仪器厂)、凝胶成像系统(Bio-Rad公司)、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱(SANYO公司)、蛋白电泳槽和转移电泳槽(Bio-Rad公司)以及流式细胞仪(Beckman公司)。

1.2 方法

1.2.1 CdCl_2 对HK-2细胞活性的影响 收集对数生长期HK-2细胞,培养基重悬后,以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板,过夜培养,弃去培养基,加入含不同浓度 CdCl_2 (0、30、60、90 $\mu\text{mol/L}$)的培养基孵育24 h,或加入含60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 的培养基处理细胞不同时间(0、12、24、36、48 h),每个处理设置3个重复孔。同时设置调零孔,不接种细胞只加培养基。细胞在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养。到处理时间后,加入10 μL (浓度为5 mg/mL)的MTT溶液,避光孵育4 h,弃上清,每孔加入150 μL DMSO溶解结晶,酶标仪上检测590 nm波长下的吸光度值,分析数据,计算细胞存活率。

1.2.2 CdCl_2 对HK-2细胞形态的影响 收集对数生长期HK-2细胞,培养基重悬后,以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板,过夜培养,弃去培养基,加入含不同浓度 CdCl_2 的培养基处理细胞,每个浓度梯度设置3个重复孔。24 h后,弃去培养基,PBS清洗细胞,加入新的培养基,光镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.3 CdCl_2 处理HK-2细胞后ROS水平检测 收集对数生长期HK-2细胞,培养基重悬后,以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板,过夜培养,弃去培养基,加入含不同浓度 CdCl_2 的培养基处理细胞,每个浓度梯度设置3个重复孔。24 h后,弃去培养基,PBS清洗细胞,每孔加入250 μL 含DCFH-DA的培养基,避光孵育30 min,PBS洗涤1次后每孔加入100 μL PBS,荧光显微镜下观察荧光强度并拍照。

分别收集 1×10^6 个不同浓度 CdCl_2 处理组HK-2细胞,PBS清洗细胞,每孔加入含DCFH-DA的培养基,避光孵育1 h,离心弃上清,PBS清洗细胞,300目细胞筛网过滤后用流式细胞仪检测ROS。

1.2.4 CdCl_2 处理HK-2细胞后DNA损伤检测 分别

收集不同浓度 CdCl_2 处理组HK-2细胞, PBS重悬, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 取500 μL 0.5%的常熔点琼脂糖加在载玻片上, 玻璃棒刮平, 4 $^\circ\text{C}$ 固化5 min, 将细胞悬液和低熔点琼脂糖按1:10混匀铺于底胶上, 4 $^\circ\text{C}$ 固化10 min, 裂解液中裂解过夜后置于解旋液中1 h, 琼脂糖凝胶电泳检测DNA损伤情况, 荧光显微镜下观察并拍照, CASP软件分析彗星尾部DNA百分比和彗星尾部长度的。

1.2.5 CdCl_2 处理HK-2细胞后线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 检测 收集对数生长期HK-2细胞, 培养基重悬后, 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板, 过夜培养, 弃去培养基, 加入含不同浓度 CdCl_2 的培养基处理细胞24 h, 每个浓度梯度设置3个重复孔。24 h后, 弃去培养基, PBS清洗细胞, 每孔加入100 μL JC-1染色工作液, 避光孵育30 min后, 弃去染色液, JC-1染色缓冲液清洗细胞, 荧光显微镜下观察细胞并拍照。

分别收集 5×10^6 个不同浓度 CdCl_2 处理组HK-2细胞, 1 mL PBS重悬细胞, 1 000 r/min离心3 min, 弃上清, 400 μL JC-1染色工作液重悬细胞, 颠倒数次混匀, 避光孵育20 min。用500 μL JC-1染色缓冲液清洗细胞后加入300 μL JC-1染色缓冲液重悬, 300目细胞筛网过滤, 流式细胞仪检测线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 。

1.2.6 CdCl_2 诱导HK-2细胞凋亡检测 收集对数生长期HK-2细胞, 培养基重悬后, 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板, 过夜培养, 弃去培养基, 加入含不同浓度 CdCl_2 的培养基处理细胞, 每个浓度梯度设置3个重复孔。24 h后, 弃去培养基, PBS清洗细胞, 每孔加入100 μL Hoechst 33342染色液, 避光孵育30 min,

弃去染色液, PBS清洗细胞, 荧光显微镜下观察细胞并拍照。

1.2.7 Western blot 分别收集 5×10^6 个不同浓度 CdCl_2 处理组HK-2细胞, 预冷的PBS洗涤细胞2次; 预冷的RIPA细胞裂解液冰上裂解细胞30 min, 12 000 r/min离心10 min, 上清即为提取的细胞总蛋白; BCA法测定蛋白浓度, 蛋白样品中加入1/5体积的5 \times 蛋白上样缓冲液, 煮沸10 min, 冷却到室温, -80 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

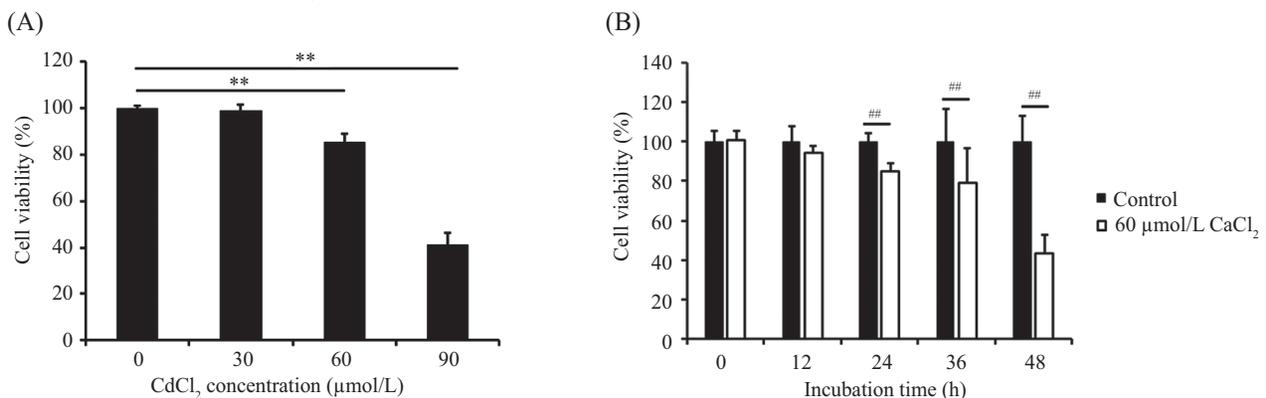
取20 μg 细胞蛋白样品进行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后将蛋白转印至PVDF膜上; 5%脱脂奶粉室温封闭PVDF膜2 h; 将PVDF膜置于一抗工作液中, 在摇床上4 $^\circ\text{C}$ 摇晃过夜, PBST洗膜4次, 每次5 min; 将PVDF膜置于一抗对应的二抗工作液中, 摇床上室温孵育1.5 h; PBST洗膜4次, 每次5 min。洗涤结束后, 用PBS漂洗PVDF膜1次, 稍微晾干, 将膜置于塑料自封袋内, 在暗室中将ECL发光液滴加至PVDF膜上, 作用1 min; 将X-Ray胶片放在自封袋上, 置于压片盒中, 曝光充分后, 取出胶片显影, 定影, 拍照, 分析图片。

1.2.8 统计分析 实验所得结果以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ 表示, 各组数据用Student's *t*检验或用统计学软件SPSS 10进行One-Way ANOVA分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 CdCl_2 对HK-2细胞活性的影响

MTT试验检测 CdCl_2 对HK-2细胞的毒性作用。如图1所示, HK-2细胞分别经0、30、60、90 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 处理24 h或经60 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 处理分别处



A: 不同浓度 CdCl_2 处理HK-2细胞24 h后的细胞活性变化; B: 60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理HK-2细胞不同时间后的细胞活性变化。** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。
A: viabilities of HK-2 cells after treatment with indicated concentrations of CdCl_2 for 24 h; B: viabilities of HK-2 cells after treatment with 60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 for indicated time. ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$.

图1 CdCl_2 对HK-2细胞活性的影响
Fig.1 CdCl_2 affected viability of HK-2 cells

理0、12、24、36、48 h, 细胞活性随着浓度的升高或处理时间的延长逐渐下降。由此可见, CdCl₂抑制HK-2细胞活性呈剂量和时间依赖性。并且, 当CdCl₂的浓度达到60 μmol/L, 处理时间为24 h时, 细胞活性显著下降($P < 0.01$)。

2.2 CdCl₂对HK-2细胞形态的影响

通过普通光学显微镜观察发现, HK-2细胞分别经60 μmol/L的CdCl₂处理0、12、24、36、48 h后(图2A)或0、30、60、90 μmol/L的CdCl₂处理24 h(图2B), 随着CdCl₂处理时间的延长或浓度的升高, 细胞逐渐皱缩、变圆, 甚至从培养皿底壁脱落, 而对照组细胞(0 μmol/L CdCl₂处理24 h或60 μmol/L CdCl₂处理0 h)形态呈典型的铺路石状, 说明CdCl₂引起的HK-2细胞形态变化呈剂量和时间依赖性。用ROS清除剂NAC与60 μmol/L CdCl₂共处理细胞24 h后, 与60 μmol/L CdCl₂处理组相比, 细胞生长较为旺盛, 皱缩的细胞数量减少(图2B), 说明ROS清除剂NAC能显著抑制CdCl₂引起的细胞形态损伤。

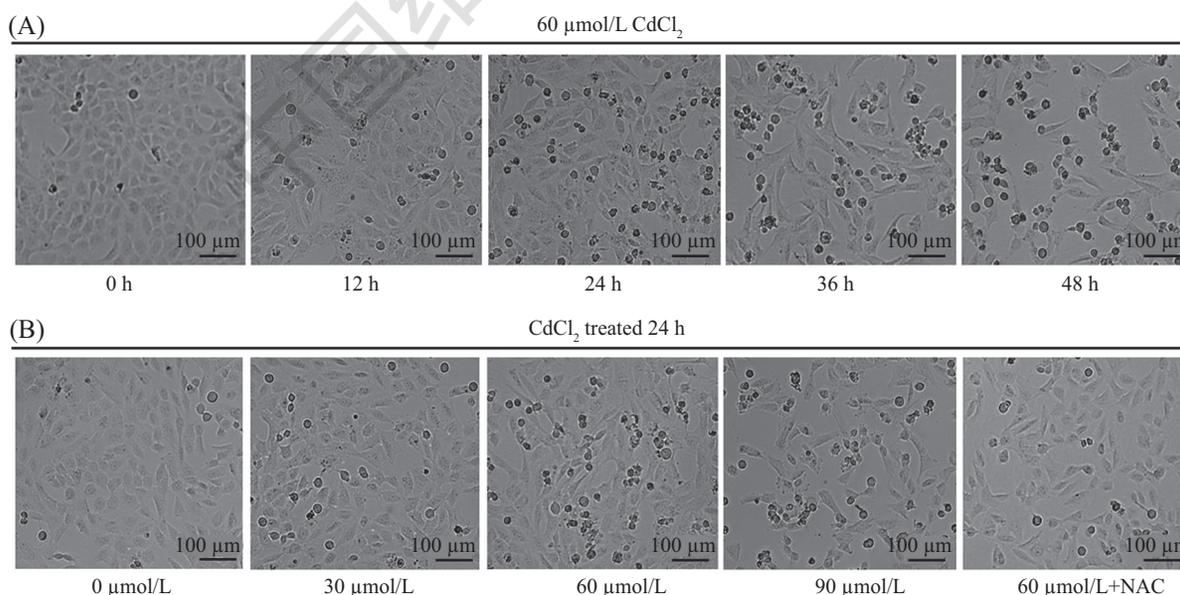
2.3 CdCl₂处理引起HK-2细胞内ROS升高

根据上文所述结果, NAC缓解了CdCl₂引起的细胞损伤。随后, 本研究检测了CdCl₂处理后HK-2细胞内ROS的变化情况。如图3A所示, 30 μmol/L的CdCl₂处理细胞24 h时, 荧光显微镜下便可观察到DCFH-DA标记的ROS阳性细胞(绿色荧光), 随着CdCl₂浓度

的升高, 荧光信号逐渐增强。同时, 用流式细胞术检测ROS的生成量。结果显示, 60 μmol/L CdCl₂作用于HK-2细胞24 h后, 细胞内的ROS显著增加($P < 0.01$), CdCl₂浓度达到90 μmol/L时, 升至最高点(图3B)。用NAC和60 μmol/L CdCl₂共处理细胞, 发现NAC能显著抑制CdCl₂引起的ROS升高(图3B, $P < 0.01$)。

2.4 CdCl₂对HK-2细胞线粒体膜电位的影响

JC-1是一种检测线粒体膜电位的荧光探针。在线粒体膜电位较高时, JC-1在线粒体的基质聚集形成聚合物(J-aggregates), 可以产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1不能聚集在线粒体的基质中, 此时JC-1为单体(monomer), 可以产生绿色荧光。通过JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到细胞膜电位的 $\Delta\psi_m$ 下降^[9]。本研究通过JC-1染色以及流式细胞术检测CdCl₂引起HK-2细胞线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 变化。如图4C所示, 经JC-1染色后, 对照组细胞呈现出红色荧光, 而在60 μmol/L CdCl₂处理组, 有些细胞中的JC-1从红色荧光转变为绿色荧光(白色箭头), 提示线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降。流式细胞术检测不同浓度CdCl₂处理的HK-2细胞线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 发现, 线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降的细胞比例随CdCl₂浓度的升高而升高, 60、90 μmol/L处理组细胞线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降的细胞比例与对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$); NAC与60 μmol/L CdCl₂共

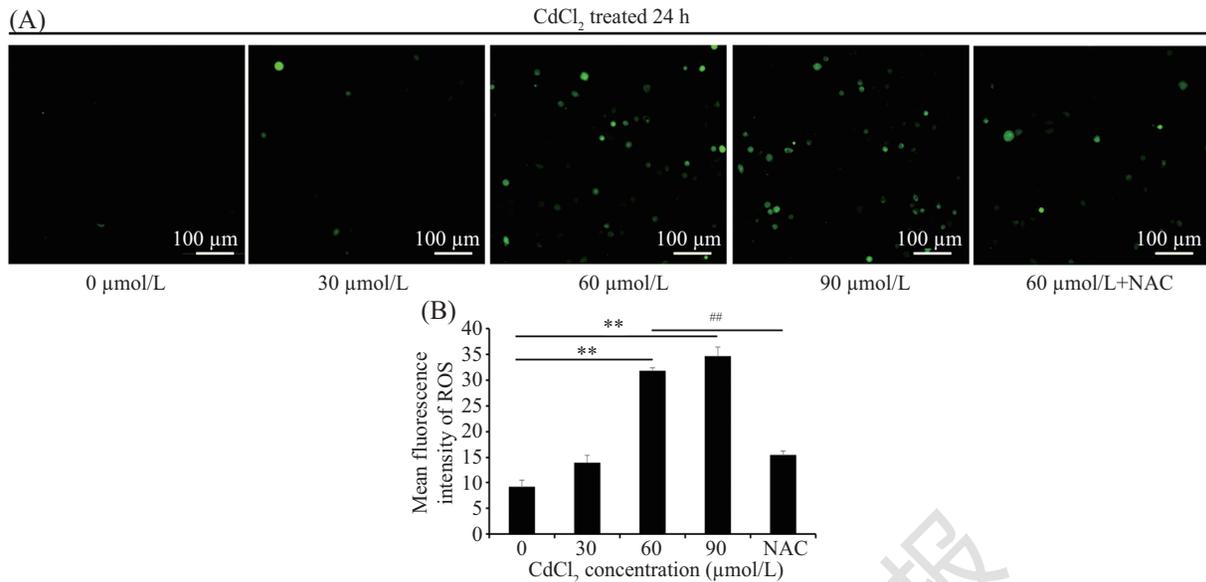


A: 60 μmol/L CdCl₂处理HK-2细胞不同时间后的形态变化; B: 不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞24 h后的形态变化。

A: morphological changes of HK-2 cells after treatment with 60 μmol/L CdCl₂ for indicated time; B: morphological changes of HK-2 cells after treatment with indicated concentrations of CdCl₂ for 24 h.

图2 CdCl₂对HK-2细胞形态的影响

Fig.2 Morphological changes of HK-2 cells after CdCl₂ treatment

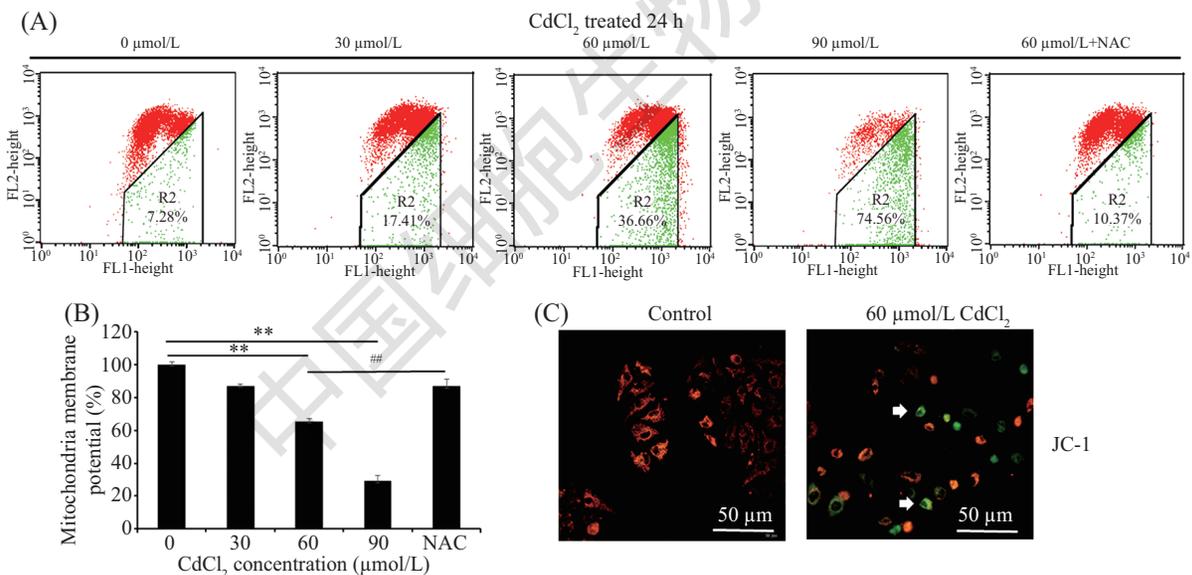


A: 荧光显微镜观察不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞24 h后的ROS变化; B: 流式细胞术检测不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞24 h后的ROS生成量。 ***P*<0.01, ##*P*<0.01。

A: ROS variation of HK-2 cells after different concentrations of CdCl₂ treatment for 24 h observed by fluorescence microscope; B: ROS level of HK-2 cells after different concentrations of CdCl₂ treatment for 24 h detected by flow cytometry. ***P*<0.01, ##*P*<0.01.

图3 CdCl₂对HK-2细胞ROS的影响

Fig.3 The level of ROS in HK-2 cells after CdCl₂ treatment



A、B: 流式细胞术检测不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞24 h后的线粒体膜电位Δψ_m变化, ***P*<0.01, ##*P*<0.01; C: 荧光显微镜观察CdCl₂处理后HK-2细胞膜电位下降(JC-1由红色荧光变成绿色荧光, 白色箭头)。

A,B: changes of mitochondrial membrane potential after different concentrations of CdCl₂ treatment for 24 h; ***P*<0.01, ##*P*<0.01; C: decrease of mitochondrial membrane potential Δψ_m after 60 μmol/L CdCl₂ treatment (transition of JC-1 from red fluorescence to green fluorescence, white arrows).

图4 CdCl₂对HK-2细胞线粒体膜电位的影响

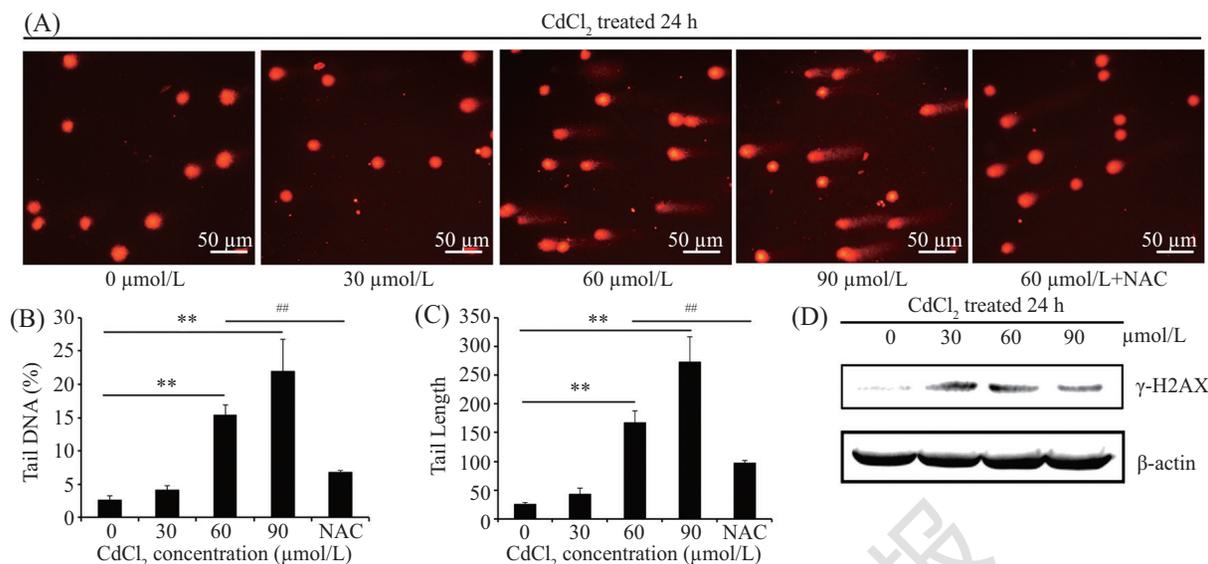
Fig.4 Mitochondrial membrane potential changed in HK-2 cells after CdCl₂ treatment

处理细胞24 h, 线粒体膜电位Δψ_m下降的细胞比例下降, 与60 μmol/L CdCl₂处理组相比差异极显著(图4A和图4B, *P*<0.01)。

2.5 CdCl₂处理引起HK-2细胞DNA损伤

通过彗星试验检测CdCl₂引起HK-2细胞DNA损

伤。彗星试验是一种敏感的检测DNA损伤的分析手段, 其中, 碱性彗星电泳可以同时检测DNA单链断裂(single-strand breaks, SSB)和DNA双链断裂(double-strand breaks, DSB)。断裂的DNA在电场作用下从细胞核迁移, 呈现出“扫帚”样的彗星图案^[10]。通过



A: 彗星电泳检测不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞24 h后的DNA损伤; B: 彗星尾部DNA百分比; C: 彗星尾部长度; D: Western blot检测CdCl₂处理HK-2细胞24 h后γ-H2AX表达的变化。 ***P*<0.01, #*P*<0.01。

A: DNA damage of HK-2 cells were detected by comet assay after treatment with different concentrations of CdCl₂ for 24 h; B: percentage of tail DNA; C: tail length; D: γ-H2AX protein expression detected by Western blot. ***P*<0.01, #*P*<0.01.

图5 CdCl₂引起HK-2细胞DNA损伤

Fig.5 CdCl₂ induced DNA damage in HK-2 cells

碱性彗星电泳, 我们发现, 对照组HK-2细胞的彗星头部呈亮红色, 细胞核完整、边缘光滑; 经CdCl₂处理后, HK-2细胞的细胞核边缘变得不光滑, 呈现出了“扫帚”样的拖尾(图5A), 并且, 随着CdCl₂浓度的升高, 彗星尾部DNA含量(tail DNA%)和尾部长度的(tail length)均呈现上升趋势(图5B和图5C), 当CdCl₂浓度达到60 μmol/L时, 差异极显著(*P*<0.01)。同时, 用NAC和60 μmol/L CdCl₂共处理细胞, 发现NAC能显著抑制CdCl₂引起的DNA损伤(图5A)。接下来, 我们通过Western blot检测了DNA双链断裂的标志蛋白γ-H2AX的表达。如图5D所示, CdCl₂处理后, 细胞内γ-H2AX的表达量明显上调。这些结果表明, CdCl₂处理导致HK-2细胞出现了严重的DNA损伤, 并且DNA损伤与ROS生成有紧密联系。

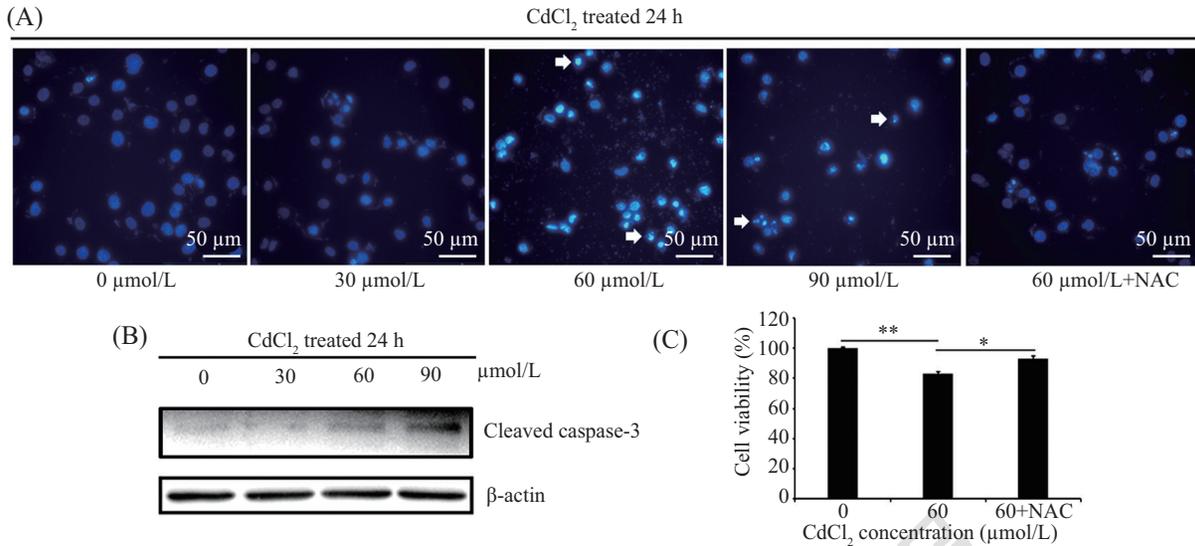
2.6 CdCl₂诱导HK-2细胞凋亡

上文所述的线粒体膜电位降低和DNA损伤均有可能导致细胞凋亡, 因此, 本研究进一步通过Hoechst 33342染色检测CdCl₂诱导HK-2细胞凋亡的发生。Hoechst 33342染色后, 通过荧光显微镜观察发现, HK-2细胞经60 μmol/L和更高浓度的CdCl₂处理24 h后, 细胞发生染色质凝聚和核固缩等典型的细胞凋亡表征, 细胞核内呈现明亮的蓝色斑点(图6A, 白色箭头), 随着CdCl₂浓度的升高, 细胞核明显

裂解, 晚期凋亡细胞增多, 而对照组细胞核没有发生明显的形态变化, 被染成均一的蓝色(图6A)。用NAC和60 μmol/L CdCl₂共处理细胞, 发现染色质凝聚、核固缩和细胞核裂解的表征减少, 说明NAC能显著抑制CdCl₂引起的细胞凋亡(图6A)。细胞凋亡过程中, caspase-3是细胞凋亡的执行分子^[11]。通过Western blot检测发现, CdCl₂处理组出现了活化状态的cleaved caspase-3(图6B), 说明CdCl₂能诱导HK-2细胞发生凋亡。本研究通过MTT实验发现, CdCl₂能够引起HK-2细胞活性下降, 而NAC能够显著抑制CdCl₂引起的细胞活性下降, 说明CdCl₂诱导的氧化应激损伤和细胞凋亡可能是导致HK-2细胞活性下降的重要原因。

3 讨论

Cd通过呼吸和食物链进入动物机体后, 能对肾脏产生严重的毒性损伤。有研究显示, 肾脏近曲小管是Cd被重吸收和沉积的主要部位^[7]。因此, 大多数体外实验主要选择肾脏近曲小管上皮细胞作为研究对象。通过动物实验发现, Cd暴露造成大鼠肾小管上皮细胞坏死、脱落形成管型, 肾组织ROS水平升高; 超微结构观察发现, 大鼠肾小管上皮细胞线粒体发生肿胀、嵴消失和空泡样变性等氧化损伤^[6]。此外,



A: Hoechst 33342染色检测不同浓度CdCl₂处理HK-2细胞24 h后的凋亡表征(染色质凝聚、核固缩, 白色箭头); B: Western blot检测caspase-3的活化; C: NAC缓解了CdCl₂对HK-2细胞活性的抑制。**P*<0.05, ***P*<0.01。

A: Hoechst 33342 nuclear staining showed the apoptotic HK-2 cells with the appearance of chromatin condensation and karyopyknosis (white arrow) after treatment with different concentrations of CdCl₂ for 24 h; B: cleaved caspase-3 were detected by western blot in CdCl₂ treated cells; C: NAC alleviated inhibition effect of CdCl₂ on HK-2 cell activity. **P*<0.05, ***P*<0.01.

图6 CdCl₂处理导致HK-2细胞凋亡

Fig.6 Apoptosis occurred in HK-2 cells after CdCl₂ treatment

体外实验发现, Cd暴露能够引起人肾近曲小管HK-2细胞发生凋亡^[8]。但到目前为止, Cd导致HK-2细胞氧化损伤和凋亡的具体机制还缺乏系统和全面的研究。因此, 本研究以HK-2细胞为研究对象, 通过检测Cd处理后HK-2细胞内ROS生成、线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 变化、DNA损伤和细胞凋亡, 初步阐明了Cd通过ROS介导的氧化损伤诱导HK-2细胞凋亡的机制。

多项研究指出, 重金属暴露所产生的ROS是细胞发生氧化损伤的主要原因^[12]。现已证实, 线粒体是重金属的主要靶点^[13]。ROS主要在线粒体生成, 参与细胞正常增殖、细胞凋亡和细胞衰老等重要的生物学进程。正常情况下, ROS的产生和清除处于动态平衡状态, 在重金属等不利因素刺激下, 细胞内ROS过量产生, 累积的ROS能够直接攻击线粒体膜, 造成线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降、细胞色素C等凋亡因子释放, 继而激活caspases, 最终导致细胞凋亡^[14]。线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件, 可以用JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的一个检测指标^[9]。本研究结果发现, CdCl₂暴露导致HK-2细胞内ROS水平呈剂量依赖性升高。通过JC-1染色和流式细胞术检测, 发现线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降的细胞比例随CdCl₂浓度的升高而升高, 并且CdCl₂浓度达到60 μmol/L时差异极

显著; 经JC-1染色后发现, 60 μmol/L处理组中从红色荧光转变为绿色荧光的细胞数量明显增多。另外, ROS清除剂NAC显著地抑制了Cd引起的ROS积累和线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降, 说明Cd处理后细胞内积累的ROS能够攻击线粒体膜, 线粒体膜的损伤造成了线粒体膜电位的 $\Delta\psi_m$ 下降。

ROS积累不仅会导致线粒体损伤和功能紊乱, 还会造成DNA损伤和细胞凋亡。细胞内ROS升高能直接攻击DNA等生物大分子, 并造成DNA断裂、DNA交联和DNA加合物形成等细胞病变^[15]。碱性彗星电泳是在碱性条件下, 通过裂解、解旋, 断裂的DNA片段在电场作用下从细胞核迁出, 形成明显的“扫帚样”彗星的过程^[10]。本研究结果显示, 60 μmol/L及更高浓度的CdCl₂处理HK-2细胞24 h后, 细胞核出现了明显的拖尾, 并且彗星尾部DNA百分比(tail DNA%)和彗星尾部长度的(tail length)与对照组相比显著升高, 呈剂量依赖性。此外, γ -H2AX是检测DNA双链断裂的重要指标。组蛋白H2AX是参与DNA修复的关键因子, 在DNA双链断裂的位点被迅速磷酸化形成 γ -H2AX^[16]。Western blot结果显示, CdCl₂处理HK-2细胞24 h后, γ -H2AX的表达量显著上调。另外, NAC有效地阻止了Cd引起的氧化应激, 缓解了DNA损伤。这些结果证实, CdCl₂处理HK-2细胞后, 细胞

内累积ROS攻击DNA分子并造成了DNA损伤。

面对DNA或基因组的损伤,机体会激活复杂的损伤反应途径,其中包括细胞凋亡通路^[17]。现已证实,铅(Pb)能够引起动物细胞DNA损伤进而使细胞发生凋亡^[18]。因此,推测Cd有可能通过诱导细胞生成过量的ROS而继发线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降和DNA损伤,最终导致细胞凋亡。通过Hoechst 33342染色,我们发现,不同浓度的CdCl₂处理24 h后, HK-2细胞呈现出了染色质凝聚、细胞核裂解等典型的细胞凋亡表征;同时, NAC显著地抑制了Cd诱导的HK-2细胞中染色质凝聚和细胞核裂解等细胞凋亡表征;进一步通过Western blot检测发现, CdCl₂处理组出现了活化的cleaved caspase-3。上述结果说明, Cd在引起DNA损伤的同时,也启动了细胞凋亡通路导致HK-2细胞发生凋亡。

综上,本研究的实验结果显示, Cd激发的HK-2细胞内ROS积累,能够引起细胞内线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 下降和DNA损伤等氧化应激反应,并最终导致细胞凋亡,初步阐明了Cd通过ROS介导的氧化损伤诱导HK-2细胞凋亡的机制。这些发现对于寻找切实有效的治疗Cd中毒的药物提供了思路,在指导中毒干预的临床实践中有着一定的现实意义。

参考文献 (References)

- 1 Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharm* 2009; 238(3): 192-200.
- 2 Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutat Res* 1981; 86(1): 115-35.
- 3 Baldantoni D, Morra L, Zaccardelli L, Alfani A. Cadmium accumulation in leaves of leafy vegetables. *Ecotox Environ Safe* 2016; 123: 89-94.
- 4 Larson C. China gets serious about its pollutant-laden soil. *Science* 2014; 343(6178): 1415-6.
- 5 Thévenod F, Lee WK. Toxicology of cadmium and its damage to mammalian organs. *Met Ions Life Sci* 2013; 11: 415-90.
- 6 王乐乐, 刘江正, 刘萌萌, 孔德钦, 张涛, 于卫华, 等. 镉暴露致

大鼠肾损伤的量效关系及其机制. *癌变·畸变·突变(Wang Lele, Liu Jiangzheng, Liu Mengmeng, Kong Deqin, Zhang Tao, Yu Weihua, et al. Dose-dependent induction of renal injury by cadmium in rats. Carcinog Teratogenesis Mutagen)* 2016; 28(6): 446-52.

- 7 Järup L, Persson B, Elinder CG. Decreased glomerular filtration rate in solderers exposed to cadmium. *J Occup Environ Med* 1996; 52(12): 818-22.
- 8 Lee JY, Tokumoto M, Hwang GW, Lee MY, Satoh M. Identification of ARNT-regulated BIRC3 as the target factor in cadmium renal toxicity. *Sci Rep* 2017; 7: 17287.
- 9 王珊, 李宁, 于力方, 廖杰. 流式细胞术检测细胞凋亡比较研究. 标记免疫分析与临床(Wang Shan, Li Ning, Yu Lifang, Liao Jie. Study on comparison of methods for detection of cell apoptosis by flow cytometry. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*) 2005; 12(3): 168-70.
- 10 Yang Q, He XY, Li XH, Xu WT, Luo YB, Yang X, et al. DNA damage and S phase arrest induced by Ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK 293). *Mutat Res* 2014; 765(2): 22-31.
- 11 Shang N, Bank T, Ding X, Breslin P, Li J, Shi B, et al. Caspase-3 suppresses diethylnitrosamine-induced hepatocyte death, compensatory proliferation and hepatocarcinogenesis through inhibiting p38 activation. *Cell Death Dis* 2018; 9(5): 558.
- 12 Phatak VM, Muller PA. Metal toxicity and the p53 protein: An intimate relationship. *Toxicol Res* 2015; 4(3): 576-91.
- 13 Blajszczak C, Bonini MG. Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling. *Toxicology* 2017; 391: 84-9.
- 14 Soo KH, Jin KY, Rok SY. An overview of carcinogenic heavy metal: Molecular toxicity mechanism and prevention. *Eur J Cancer Prev* 2015; 20(4): 232-40.
- 15 Davalli P, Marverti G, Lauriola A, D'Arca D. Targeting oxidatively induced DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 2389523.
- 16 Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Solier S, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, et al. H2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12): 957-67.
- 17 Zhou BBS, Elledge SJ. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408(6811): 433-9.
- 18 Yedjou CG, Tchounwou HM, Tchounwou PB. DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis induction caused by lead in human leukemia cells. *Int J Env Res Pub He* 2015; 13(1): 56-68.