

微囊藻毒素-LR 对活性氧产生及细胞色素 P450 各亚型表达的影响

农清清¹, 小松正治², 张志勇¹, 何敏¹

摘要: [目的] 探讨低剂量微囊藻毒素-LR (MCLR) 诱导细胞内活性氧 (ROS) 产生的潜在来源。[方法] 采用转染有机阴离子转运多肽 OATP1B3 的人胚肾细胞株 HEK293-OATP1B3, 设 3 个浓度的 MCLR 处理组 (10、20、50 nmol/L) 和未处理对照组 (0.1% 二甲基亚砜)。染毒 4、24 h 后, 测定乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率, 用荧光探针法检测细胞内 ROS 水平, 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测细胞色素 P4501A1 (CYP1A1)、1A2、2E1 mRNA 的表达水平。[结果] 低浓度 (10~50 nmol/L) 的 MCLR 作用 HEK293-OATP1B3 细胞 4 h 未产生明显细胞毒性; 24 h 后, LDH 漏出率随着处理浓度的增加而增加。50 nmol/L MCLR 处理细胞 4 h 后引起 ROS 水平明显升高 ($P < 0.01$)。同时, MCLR 还上调了 CYP2E1 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$); 但未影响 CYP1A1 mRNA 的表达; 对照组和 MCLR 处理组的 CYP1A2 mRNA 表达水平均非常低。[结论] 低剂量 MCLR 可诱导细胞内 ROS 产生和上调 CYP2E1 mRNA 表达, 提示 CYP2E1 可能是 MCLR 诱导 ROS 产生的一个潜在来源。

关键词: 微囊藻毒素-LR; 活性氧; 细胞色素 P4502E1

Effects of Microcystin-LR on Intracellular Reactive Oxygen Species Generation and mRNA Expression of Cytochrome P450 Isoforms NONG Qing-qing¹, KOMATSU Masaharu², ZHANG Zhi-yong¹, HE Min¹ (1. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima 890-8544, Japan)

Abstract: [Objective] To study the sources responsible for the generation of reactive oxygen species (ROS) induced by low doses of microcystin-LR (MCLR). [Methods] Human embryonic kidney cells HEK293 stably expressing the organic anion transporting polypeptides 1B3 (HEK293-OATP1B3 cells) were treated with the solvent (0.1% dimethyl sulfoxide) and MCLR (10-50 nmol/L) for 4 or 24 h. The lactate dehydrogenase (LDH) release was measured and the levels of ROS were determined using fluorescent probes. The mRNA expressions of cytochrome P450 isoforms CYP1A1, 1A2 and 2E1 were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR). [Results] MCLR did not increase LDH release in HEK293-OATP1B3 cells at low concentrations (10-50 nmol/L) when incubated for 4 h. However, significant LDH releases were observed when the cells were incubated with MCLR at 20 nmol/L and higher concentrations for 24 h ($P < 0.05$). Exposure to MCLR (50 nmol/L) for 4 h significantly increased intracellular ROS level ($P < 0.01$). MCLR did not affect the expression of CYP1A1. In contrast, the expression level of CYP2E1 mRNA was significantly upregulated in MCLR-treated cells ($P < 0.01$). The expression level of CYP1A2 was extremely low in both control and MCLR-treated cells. [Conclusion] Low doses of MCLR induce the generation of ROS, and upregulate the expression of CYP2E1 mRNA, suggesting that CYP2E1 may be a potential source responsible for ROS generation by MCLR.

Key Words: microcystin-LR; reactive oxygen species; cytochrome P4502E1

微囊藻毒素 (microcystins) 是由生长于富营养化湖泊、池塘或江河的铜绿微囊藻、水华鱼腥藻等产生的一组具有肝脏毒性的单环多肽毒素, 其主要代表物微囊藻毒素-LR (MCLR)

毒作用较明显。长期低剂量接触该毒素可引起肝脏损伤、过敏反应以及胃肠炎等。据报道, MCLR 可迅速诱导细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生^[1], 但其诱导 ROS 产生的来源及其作用机制仍不十分清楚。很多研究表明, 除线粒体外, 细胞色素 P450 酶是细胞内 ROS 产生的重要来源^[2]。故本研究拟选取对低浓度 (纳摩尔水平) MCLR 敏感度较高的稳定转染有机阴离子转运多肽 (OATP) 的人胚肾细胞株 HEK293-OATP1B3^[3], 观察低浓度 MCLR 对细胞内 ROS 产生以及细胞色素 P450 同工酶 1A1 (CYP1A1)、1A2、2E1 mRNA 表达水平的影响, 以进一步探讨 MCLR 诱导 ROS 产生的来源及其可能的机制。

[基金项目] 中国博士后科学基金特别资助 (编号: 200902355), 中国博士后科学基金面上资助 (编号: 20080440816), 广西教育厅科研立项项目 (编号: 200911LX38)

[作者简介] 农清清 (1971—), 女, 博士, 副教授; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: nnqq26@163.com

[作者单位] 1. 广西医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学教研室, 广西 南宁 530021; 2. 日本鹿儿岛大学医学综合研究科环境医学研究室, 日本 鹿儿岛 890-8544

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

HEK293-OATP1B3 细胞, 德国海德堡癌症研究中心惠赠。MCLR 购于瑞士 ALEXIS 公司, 纯度 >98%, 临用时用体积分数为 0.1% 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶解。伊格尔最低必需培养基 (MEM), 美国 Sigma 公司; 总 RNA 提取试剂 (Trizol reagent), 美国 Invitrogen 公司; 逆转录酶、寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸 (Oligo-dT), 日本 Toyobo 公司; SYBR 荧光染料定量 PCR (SYBR Green PCR Master Mix) 试剂盒, 德国 Roche Diagnostics GmbH 公司; 二氯荧光素双乙酸盐 (DCFH-DA), 美国 Molecular Probe 公司。

1.2 细胞培养和染毒

HEK293-OATP1B3 细胞在含 10% (体积分数) 加热失活小牛血清及 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、400 μ g/mL 抗生素 G418, 于 MEM 培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% (体积分数) CO_2 和 95% (体积分数) O_2 条件下培养。收集对数生长期细胞, 以 5×10^4 /mL 的密度分别接种于 96 孔板和 6 孔板, 培养 24 h 后, 加入 MCLR, 使其终浓度为 10, 20, 50 nmol/L, 并以 0.1% DMSO (体积分数) 作为对照组, 每个剂量组设 4 个平行样。

1.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率测定

使用 Cyto Tox96 非放射性细胞毒性测定试剂盒 (美国 Promega 公司), 操作按试剂盒说明。HEK293-OATP1B3 细胞经 MCLR 处理后, 取上清用于测定漏出细胞外的 LDH (eLDH); 剩余细胞用 1% Triton X-100 裂解, 离心后取上清 (总细胞裂解液) 用于测定总 LDH 活性 (tLDH)。LDH 漏出率 = (eLDH/tLDH) $\times$ 100%。

1.4 细胞内 ROS 水平的测定

细胞被接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 弃培养基, 换成 Hank's 平衡液 (pH7.3), 同时加入不同浓度的 MCLR, 继续培养 4 h, 然后加入 DCFH-DA (终浓度为 10 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 用 CytoFluor 4000 荧光酶标仪 (美国 Applied Biosystems 公司) 检测荧光强度, 激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 530 nm。

1.5 细胞色素 P450 同工酶 CYP1A1、1A2 和 2E1 mRNA 表达水平分析

细胞置 6 孔板培养并经 MCLR 处理后, Trizol 试剂提取总 RNA, 利用逆转录酶和 Oligo-dT 逆转录合成 cDNA。采用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒, 按照下述反应条件, 以 cDNA 为模板进行聚合酶链反应 (PCR) 扩增: 50 $^{\circ}$ C 孵育 2 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 10 min, 接着进行 40 个循环, 每个循环包括 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min。采用 ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 分析 (real-time PCR)。CYP1A1 上游引物为 5'-CTT GGA CCT CCT TGG AGC TG, 下游引物为 5'-CGA AGG AAG AGT GTC GGA AG, 212 bp^[4]; CYP1A2 上游引物为 5'-CAA TCA GGT GGT GGT GTC AG, 下游引物为 5'-GCT CCT GGA CTG TTT TCT GC, 245 bp^[4]; CYP2E1 上游引物为 5'-ACC CGA GAC ACC ATT TTC AG, 下游引物为 5'-TCC AGC ACA CAC TCG TTT TC, 201 bp^[4]; 内参照基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上游引物为 5'-TGG ACC TGA CCT GCC GTC TA, 下游引物为 5'-CCC TGT TGC TGT AGC CAA ATT C, 243 bp^[5]。用 GAPDH 进行校正, 计算待测样本的相对 ΔC_t 值, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算出各待测样本细胞色素 P450 同工酶 mRNA 的相对表达水平^[6]。

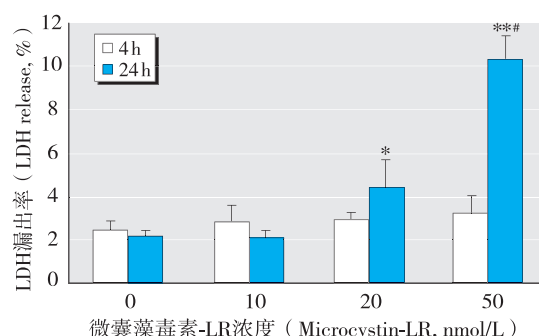
1.6 统计分析

所有实验重复做 4 次, 数据表达为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 多组间比较采用单因素方差分析, 用 q 检验 (S-N-K 法) 比较两组间差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MCLR 对 HEK293-OATP1B3 细胞的毒性作用

用 LDH 漏出法检测细胞毒性时发现, 处理细胞 4 h 后, MCLR 在各浓度点上均未引起 HEK293-OATP1B3 细胞 LDH 漏出增加。但是, 20 nmol/L 和 50 nmol/L 的 MCLR 处理细胞 24 h 后, LDH 漏出率均明显高于未处理对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 50 nmol/L 组的 LDH 漏出率明显高于 20 nmol/L 组 ($P<0.05$); LDH 漏出率随着处理剂量的增加而增加, 见图 1。



[注]*: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。
#: 与 20 nmol/L 组比较 (Compared with the 20 nmol/L MCLR-treated group), $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度 MCLR 对 HEK293-OATP1B3 细胞的毒性作用

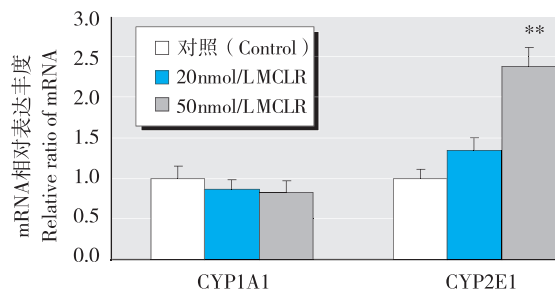
Figure 1 Cytotoxicity induced by microcystin-LR in HEK293-OATP1B3 cells

2.2 MCLR 对 HEK293-OATP1B3 细胞内 ROS 水平的影响

MCLR 处理细胞 4 h 后, 对照组及 10、20、50 nmol/L 浓度组的 DCF 荧光强度值分别为 (118.83 $\pm$ 9.15) %、(139.20 $\pm$ 11.90) %、(143.43 $\pm$ 12.25) % 和 (401.67 $\pm$ 10.69) %, 其中 50 nmol/L 的荧光强度值明显高于未处理对照组 ($P<0.01$)。

2.3 MCLR 对细胞色素 P450 同工酶 mRNA 表达水平的影响

对照组细胞 CYP1A1 mRNA 表达水平较低, MCLR 不影响 CYP1A1 mRNA 表达水平。与之相反, 对照组细胞 CYP2E1 mRNA 有相对高水平的稳定表达, 经 50 nmol/L MCLR 处理 4 h 后, CYP2E1 mRNA 表达水平明显上调 ($P<0.01$), 见图 2。未处理对照组和 MCLR 处理组细胞的 CYP1A2 mRNA 表达水平均非常低, 无法定量检测。



[注]**: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P<0.01$ 。

图 2 MCLR 作用 4 h 后对 CYP1A1 和 CYP2E1 mRNA 表达水平的影响

Figure 2 Effects of MCLR on the expression of CYP1A1 and CYP2E1 mRNA

3 讨论

MCLR 是一种毒性很强的肝毒素,能强烈抑制真核细胞丝氨酸(苏氨酸)蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的活性^[7]。课题组前期研究证实,稳定转染人肝细胞转运蛋白 OATP1B3 的人胚肾细胞株 HEK293 (HEK293-OATP1B3) 对 MCLR 的敏感性增加,72 h 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 6.5 nmol/L,而 200 nmol/L 的 MCLR 对未转染 OATP1B3 的 HEK 细胞无细胞毒性。OATP1B3 抑制剂可降低 HEK293-OATP1B3 细胞对 MCLR 的敏感性,表明有机阴离子转运多肽 OATP1B3 对 MCLR 的肝内转运及发挥肝细胞毒性非常重要,HEK293-OATP1B3 细胞是研究 MCLR 体外毒性的一种较理想的细胞株^[3]。另一方面,课题组发现 MCLR 可通过抑制 PP2A 的活性,激活促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPKs) 信号通路,引起细胞凋亡,ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸可明显抑制 MCLR 诱导的细胞凋亡,提示 ROS 亦有助于 MCLR 诱导细胞毒性^[3]。

本研究发现 20 nmol/L 以上浓度的 MCLR 作用细胞 24 h 后可产生细胞毒性,引起 LDH 漏出量增多,表明低浓度的 MCLR 可损伤 HEK293-OATP1B3 的细胞膜,产生明显的细胞毒性,这与 MONKS 等^[8]采用表达 OATP1B3 的 HeLa 转染细胞检测 MCLR 毒性的结果一致。利用这一敏感细胞株,课题组继续研究低浓度 MCLR 是否诱导细胞内 ROS 产生及其潜在的来源。采用 DCFH-DA 作为荧光探针检测细胞内 ROS 的含量。结果表明,50 nmol/L MCLR 作用细胞 4 h 虽未产生明显的细胞毒性,但细胞内 ROS 水平明显高于未处理对照组。

据报道,细胞色素 P450 同工酶 CYP1A1、1A2 和 2E1 的过度表达可使淋巴细胞和人肝癌细胞株 HepG2 细胞内的 ROS 形成增多^[9]。本研究发现 MCLR 在诱导 ROS 产生的同时,还上调了 CYP2E1 mRNA 表达水平,但 CYP1A1 mRNA 表达水平没有明显改变。对照组和 MCLR 处理组细胞的 CYP1A2 mRNA 表达水平均非常低,无法进一步定量分析。很多研究表明,CYP2E1 具有很高的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶活性,是能够产生 ROS 的最活跃的细胞色素 P450 同工酶。甚至在缺乏底物的情况下,仍然能够产生超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和过氧化氢 (H_2O_2)。在铁催化剂存在下,CYP2E1 能生成氧化能力更强的氧化物如羟自由基 ($\cdot OH$)^[10]。因此推测 CYP2E1 的上调有助于 MCLR 进一步诱导 ROS 产生,继而对细胞产生氧化损伤和细胞毒性,CYP2E1 可能是 MCLR 诱导 ROS 形成的一个潜在来源。另外,NADPH 氧化酶也是细胞内 ROS 形成的一个可能来源^[11]。由于 MCLR 能广泛抑制蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的活性,引起许多蛋白磷酸化增加,MCLR 是否通过影响 NADPH 氧化酶的磷酸化状态而诱导 ROS 产生? 仍有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] DING WX, SHEN HM, ONG CN. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes[J]. Hepatology, 2000, 32(3): 547-555.
- [2] NIETO N, FRIEDMAN SL, CEDERBAUM AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species[J]. Hepatology, 2002, 35(1): 62-73.
- [3] KOMATSU M, FURUKAWA T, IKEDA R, et al. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3[J]. Toxicol Sci, 2007, 97(2): 407-416.
- [4] SHERVINGTON A, MOHANMED K, PATEL R, et al. Identification of a novel co-transcription of P450/1A1 with telomerase in A549[J]. Gene, 2007, 388(1-2): 110-106.
- [5] ZHANG XZ, DING L, SANDFORD AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR[J]. BMC Mol Biol, 2005, 6(1): 4-10.
- [6] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [7] 尹建勋, 帅怡, 仲伟鉴, 等. 微囊藻毒素诱导细胞凋亡和促进肿瘤发生的双重作用研究进展[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(12): 756-759.
- [8] MONKS NR, LIU S, XU Y, et al. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 587-598.
- [9] GONZALEZ FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1[J]. Mutat Res, 2005, 569(1/2): 101-110.
- [10] DEY A, CEDERBAUM AI. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90 increases cytochrome P450 2E1 mediated toxicity in HepG2 cells through sustained activation of the p38MAPK pathway[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 461(2): 275-286.
- [11] LEE YS, KANG YS, LEE JS, et al. Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells[J]. Free Radic Res, 2004, 38(4): 405-412.

(收稿日期: 2011-04-18)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)