

线粒体部分敲除对氡染毒人支气管上皮细胞损伤效应的影响

陈玉之, 李冰燕, 孙静, 陈丽莉, 韦晔, 童建

摘要: [目的] 观察线粒体部分敲除对氡染毒人支气管上皮细胞损伤效应的影响。[方法] 分别对线粒体 DNA 部分敲除的人支气管上皮细胞(ρ -HBE 细胞)和未经敲除的 ρ +HBE 细胞暴露 20000 Bq/m³ 的氡及氡子体, 观察两种受试细胞第 10 代(低剂量组, ρ +HBE-Rn10 和 ρ -HBE-Rn10)及第 30 代(高剂量组, ρ +HBE-Rn30 和 ρ -HBE-Rn30)细胞的增殖能力、细胞周期以及活性氧(ROS)水平的变化。[结果] 氡染毒后, 线粒体部分敲除后高、低剂量组(ρ -HBE-Rn30, ρ -HBE-Rn10)的细胞克隆形成率(PE)和细胞相对存活分数(SF)均高于敲除前($P < 0.05$); 敲除前高剂量组(ρ +HBE-Rn30)的 PE 和 SF 均低于低剂量组(ρ +HBE-Rn10)($P < 0.05$), 敲除后则高于低剂量组($P < 0.05$)。低剂量组 ρ +HBE 细胞中的 S 期细胞减少, G2/M 期细胞增加, 高剂量组的 S 期细胞增加, G1 期细胞减少; 各染毒剂量的 ρ +HBE 细胞和 ρ -HBE 细胞, ROS 水平均升高($P < 0.05$)。[结论] 经氡染毒后, ρ -HBE 细胞在生长速度、细胞周期、ROS 产生量等生物学指标上与 ρ +HBE 细胞有明显改变, 表明氡所产生的细胞损伤效应与线粒体的结构和功能障碍密切相关。

关键词: 氡; 线粒体; 肺癌; 细胞增殖; 细胞周期

Effects of Mitochondrial DNA Partial Knockout on Injury of Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Radon Exposure CHEN Yu-zhi, LI Bing-yan, SUN Jing, CHEN Li-li, WEI Ye, TONG Jian (School of Public Health, Soochow University, Jiangsu 215123, China). Address correspondence to TONG Jian, E-mail: tongjian@suda.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the impact of mitochondrial DNA partial knockout on the injury of human bronchial epithelial cells exposed to radon gas. [Methods] Bronchial epithelial cells with (ρ -HBE cells) or without (ρ +HBE cells) mitochondrial DNA partial knockout were exposed to 20000 Bq/m³ radon and radon daughters to observe the changes in cell proliferation, cell cycle, and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels of cells at 10 passages (low-dose groups: ρ +HBE-Rn10 and ρ -HBE-Rn10) and 30 passages (high-dose groups: ρ +HBE-Rn30 and ρ -HBE-Rn30). [Results] After radon exposure, the plating efficiency (PE) and the survival fraction (SF) of the ρ -HBE-Rn10 and ρ -HBE-Rn30 cells were higher than those of the ρ +HBE cells ($P < 0.05$). PE and SF were lower in the ρ +HBE-Rn30 cells than the ρ +HBE-Rn10 cells ($P < 0.05$), while higher in the ρ -HBE-Rn30 cells than the ρ -HBE-Rn10 cells ($P < 0.05$). S phase decreased and G2/M phase of the ρ +HBE-Rn10 cells increased, while the ρ +HBE-Rn30 cells showed the opposite effects. The ROS levels were increased in all exposure groups. [Conclusion] Compared to the ρ +HBE cells, the ρ -HBE cells have a significant change in cell proliferation, cell cycle, and intracellular ROS generation after radon exposure, indicating that the radon induced cell injury is associated with mitochondrial structure and impairment.

Key Words: radon; mitochondria; lung cancer; cell proliferation; cell cycle

氡(²²²Rn)普遍存在于房屋建筑材料、地下矿石、土壤和饮用水中^[1]。1988 年, 国际癌症研究机构(IARC)基于矿工高水平氡暴露的研究结果, 确定氡为 I 类致癌物质。随着建筑材料和天然气能源的广泛使用, 除

了铀矿工等职业接触人群外, 普通居民对氡的接触机会和暴露水平有明显的增加, 氡及其子体对人类的健康危害及其防护, 已经成为全球预防医学及公共卫生领域的研究热点。线粒体是具有双层膜结构的半自主性细胞器, 能够独立进行基因的转录、翻译和蛋白质的表达, 在细胞的能量代谢、自由基的产生和细胞凋亡等过程中都发挥着重要作用^[2]。有研究表明, 线粒体在细胞恶变和介导细胞凋亡过程中也起着重要作用^[3-4]。细胞增殖速度加快、转移和侵袭是癌细胞的重要生物学特征。线粒体部分敲除细胞性状的研究提

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0101

[基金项目] 国家自然科学基金国际重大合作项目(编号: 81020108028)

[作者简介] 陈玉之(1985—), 女, 硕士生; 研究方向: 放射毒理学;

E-mail: oliver7788@163.com

[通信作者] 童建, E-mail: tongjian@suda.edu.cn

[作者单位] 苏州大学公共卫生学院, 江苏 215123

示线粒体功能障碍细胞的存在可以为研究线粒体功能提供一个可靠模型^[5-6]。本实验拟采用线粒体 DNA 部分敲除的人支气管上皮细胞(ρ-HBE 细胞),经体外氦染毒后,观察细胞增殖能力、细胞周期及细胞内活性氧(ROS)的改变,为进一步研究线粒体在氦致肺癌过程中的作用提供基础数据

1 材料与方法

1.1 线粒体 DNA 部分敲除细胞模型的建立

永生化的人支气管上皮细胞(ρ+HBE)(广东中山大学公共卫生学院馈赠)在含 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素及 1.5 g/L 葡萄糖的改良杜氏伊格尔(DMEM)低糖培养基中,置于 5%CO₂, 37℃ 培养箱中恒温培养。为获得线粒体 DNA 部分敲除的人支气管上皮细胞(ρ-HBE 细胞),将细胞在含 50 μg/L 溴化乙锭(ethidium bromide, EB)的高糖培养基中培养。每周传代 1~2 次,第 9 天以后换用 20 μg/L EB 的培养液继续培养 30 d。用有限稀释法进行克隆化,扩增培养后得到 ρ-HBE 细胞。线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数使用荧光定量 PCR 测定,采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为参照^[7]。用 ρ+HBE 细胞作为参照,把它的线粒体 DNA 拷贝数作为 1,相比之下可计算 ρ-HBE 细胞的拷贝数。总 DNA 采用 E.Z.N.A. DNA 试剂盒(Omega 公司,美国)提取,并用分光光度法定量(Eppendorf 公司,德国)。用 50 ng DNA 作为扩增引物,采用 SYBR Green 标记,在 7500 实时 PCR 仪(Carlsbad 生物系统公司,美国)上进行检测。经测定敲除率为 75%。

1.2 细胞氦染毒

将 1×10^5 的 ρ-HBE 细胞或 ρ+HBE 细胞接种于 Transwell 小室(Corning 公司,美国),然后置于专用气体吸入装置(中国军事医学科学院,北京)中,并与多功能氦室相连接。Transwell 小室中的细胞直接暴露于浓度为 20 000 Bq/m³ 的氦及氦子体,每次染毒 20 min。3 d 后重复染毒 1 次,染毒 2 次后的 HBE 作为染毒 1 代细胞(Rn1),低剂量组为染毒 10 代细胞(Rn10),高剂量组为染毒 30 代细胞(Rn30)。每次染氦过程中都设置本次染氦细胞的对照组细胞置于本底值氦浓度装置中,其余条件同染毒组细胞。

1.3 细胞增殖能力的检测

染毒结束后第 2 天消化细胞做存活分数检测。0.25% 胰酶消化 transwell 膜上的细胞,1 000 r/min 离心

5 min(半径 12 cm),收集并重悬细胞,接种于 φ 60 mm 培养皿,接种细胞数以每皿有 50~60 个细胞存活并形成克隆为准。每组接种 3 个培养皿作平行对照,培养 14 d 左右结晶紫染色细胞并计数克隆数。克隆形成率(PE)=(克隆形成数/接种细胞数)×100%;细胞相对存活分数(SF)=PE_{某剂量组}/PE_{对照组},对照组为对应 ρ+HBE 细胞或 ρ-HBE 细胞。

1.4 细胞周期分析

细胞培养 2~3 d 生长至对数生长期后,0.25% 胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min(半径 12 cm),收集细胞(10^6 /mL),加入 70% 的冰乙醇 1 mL,4℃ 固定过夜后弃乙醇,PBS 冲洗 1 次,加 500 μL 碘化丙啶(PI)工作液重悬,300 目尼龙网筛过滤,室温避光染色 30 min,每组实验设置 3 个平行样上流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,美国)检测。细胞周期结果以 Modifit 2.0 软件分析。

1.5 ROS 水平检测

细胞内活性氧(ROS)水平的测定采用 CM-H2DCFDA 细胞渗透探针法(Invitrogen 公司,美国)。细胞生长至对数生长期后,消化,1 000 r/min 离心 5 min(半径 12 cm),PBS 重悬。每份样品加入 200 μL 的 ROS 探针染色,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。激发波长设定为 488 nm,发射波长用 FL1 监测器(525 nm)记录。每组设置 3 个平行样,结果用平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示,以 CXP 软件进行分析。

1.6 统计学分析

数据表示均采用 $\bar{x} \pm s$ 。采用 SPSS 17.0 软件进行分析,均数间比较采用 *t* 检验,多样本均数的两两比较采用方差分析的 SNK-*q* 检验进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氦染毒对细胞增殖的影响

表 1 显示,与线粒体部分敲除前(ρ+HBE 组)比较,敲除后高、低剂量组(ρ-HBE-Rn30, ρ-HBE-Rn10)的 PE 和 SF 均升高($P<0.05$);与低剂量组(Rn10)比较,敲除前高剂量组(ρ+HBE-Rn30)的 PE 和 SF 均较低($P<0.05$),而敲除后高剂量组(ρ-HBE-Rn30)则均较高($P<0.05$)。

2.2 氦染毒对细胞周期的影响

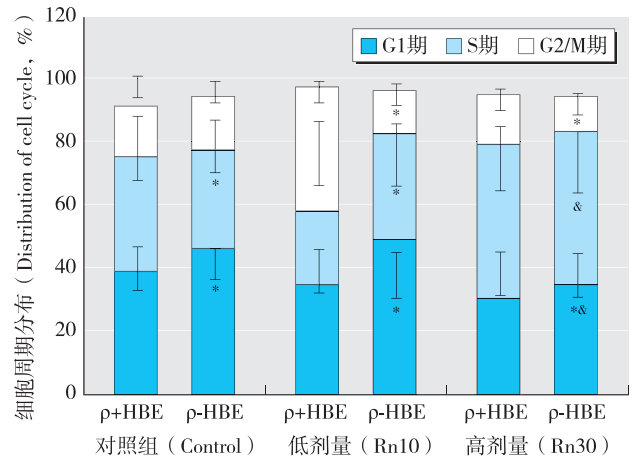
从图 1 可见,与 ρ+HBE 细胞相比,对照组 ρ-HBE

细胞的 G1 期延长, S 期缩短。氡染毒后, 低剂量组中, 与 ρ+HBE 细胞相比, ρ-HBE 细胞 S 期增加, G2 期减少; 高剂量组中, 与 ρ+HBE 细胞相比, ρ-HBE 细胞 G2/M 期减少, G1 期增加。与对照组 ρ-HBE 细胞相比, 低剂量染氡组 ρ-HBE 细胞周期无显著改变; 高剂量组 ρ-HBE 细胞中 S 期细胞增加, G1 期细胞减少。

表 1 氡染毒对细胞克隆形成率及存活分数的影响

分组 Group	细胞克隆形成率(%) Plating efficiency (PE)		细胞相对存活分数 Survival fraction (SF)	
	ρ+HBE	ρ-HBE	ρ+HBE	ρ-HBE
对照 (Control)	7.92 ± 0.15	7.88 ± 0.28*	1	1
低剂量 (Rn10)	6.87 ± 0.30	8.53 ± 0.18*	0.87 ± 0.05	1.08 ± 0.03*
高剂量 (Rn30)	5.13 ± 0.21 [△]	9.69 ± 0.31* [△]	0.65 ± 0.02 ^{#△}	1.23 ± 0.02* ^{#△}

[注]与对应剂量组 ρ+HBE 细胞比较, *: $P < 0.05$ 。与对照组比较, #: $P < 0.05$ 。与低剂量组比较, Δ : $P < 0.05$ 。
[Note] Compared with the corresponding ρ+HBE cells, *: $P < 0.05$. Compared with the corresponding control cells, #: $P < 0.05$. Compared with the Rn10 cells, Δ : $P < 0.05$.



[注]与对应剂量组 ρ+HBE 细胞比较, *: $P < 0.05$ 。与对照组 ρ-HBE 细胞比较, #: $P < 0.05$ 。
[Note] Compared with the corresponding ρ+HBE cells, *: $P < 0.05$. Compared with the control group ρ-HBE cells, #: $P < 0.05$.

图 1 氡染毒后细胞周期的改变

Figure 1 Distribution of cell cycle after radon exposure

2.3 氡染毒对 ROS 水平的影响

从表 2 中可见, 对照组 ρ-HBE 细胞中 ROS 水平较 ρ+HBE 细胞低。氡染毒后, 不管是 ρ+HBE 还是 ρ-HBE 细胞, ROS 水平均显著升高。染氡后, ρ-HBE/ρ+HBE 的 ROS 值随着染氡次数的上升而呈上升趋势。

表 2 氡染毒对细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Group)	ρ+HBE	ρ-HBE	ρ-HBE/ρ+HBE
对照 (Control)	4.63 ± 0.06	3.33 ± 0.24*	71.9%
低剂量 (Rn10)	6.87 ± 0.09	5.06 ± 0.12#	73.7%
高剂量 (Rn30)	8.46 ± 0.29 [△]	7.73 ± 0.75 ^{#△}	91.4%

[注]与对应剂量组 ρ+HBE 细胞比较, *: $P < 0.05$ 。与对照组比较, #: $P < 0.05$ 。与低剂量组比较, Δ : $P < 0.05$ 。
[Note] Compared with the corresponding dose ρ+HBE cells, *: $P < 0.05$. Compared with the control cells, #: $P < 0.05$. Compared with the Rn10 cells, Δ : $P < 0.05$.

3 讨论

关于氡致肺癌的遗传损伤机制, 目前一般认为是 α 粒子通过 DNA 双链断裂而导致细胞突变^[8]。但近期有实验表明, 线粒体在 α 粒子辐射旁效应的调节中起重要作用^[9-10]。

线粒体还作为内源性活性氧的重要来源在氧化磷酸化过程中参与电子传递链的逃逸^[11-12]。本实验采用线粒体 DNA 部分敲除的 ρ-HBE 细胞, 观察氡染毒对细胞生长特性的影响。结果发现, 在 ρ+HBE 细胞中, 随着氡染毒次数的增多, 克隆形成率和存活分数均明显下降, 但 ρ-HBE 细胞的增殖能力随着氡染毒次数的增多而增强, 表现为克隆形成率和存活分数均明显增高。提示线粒体 DNA 敲除后, ρ-HBE 细胞更易受到氡照射的损伤, 导致基因组不稳定性增加, 并促进细胞发生恶性转化。

细胞周期是指处于增殖期的细胞从一个有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个连续过程。有研究表明, 细胞周期检查点可由于线粒体的紊乱而被激活, 从而阻止细胞周期的进程, 直到线粒体功能的恢复。本实验中, 与 ρ+HBE 细胞相比, ρ-HBE 细胞在 G1 期和 S 期细胞的比例发生了变化, S 期细胞比例减少而 G1 期比例上升, 出现 G1-S 期阻滞现象。在高剂量染氡后, ρ+HBE 细胞与 ρ-HBE 细胞均出现 S 期细胞比例增加而 G1 期比例显著下降, 提示细胞的复制增加, 有可能发生转化。ρ-HBE 细胞除了 S 期比例增加外, G1 和 G2/M 期比例减少, 提示发生了 G1 期和 G2/M 期阻滞, 延缓细胞进入 S 期和 M 期的速度, 从而导致细胞周期的延长。这与上述 ρ-HBE 细胞生长速度减慢的结果相一致。

活性氧 (ROS) 可以作为致突变剂和有丝分裂原, 在肿瘤细胞的转化、进展和转移中扮演重要角色^[13]。线粒体是细胞产生能量和 ROS 的主要场所, 也是细胞

调节氧化应激的中枢。吸入氡及其子体可使体内活性氧水平明显升高^[14]。线粒体损伤后,异常增多的 ROS 不能被机体自身的防御系统及时清除,可致线粒体 DNA 和核 DNA 的突变。本实验中,ρ-HBE 细胞中 ROS 水平低于 ρ+HBE 细胞,但经氡染毒后,两种细胞中 ROS 水平都显著升高,而 ρ-HBE 细胞内 ROS 水平仅为 ρ+HBE 细胞的 70%~90%。提示除线粒体外,细胞内 ROS 的产生还有其他的来源。

综上所述,经氡染毒后,ρ-HBE 细胞生长速度、ROS 产生量、细胞周期等生物学指标与 ρ+HBE 细胞相比均出现了明显改变,表明氡所产生的细胞损伤效应与线粒体的结构和功能障碍密切相关。结果提示,ρ-HBE 细胞与 ρ+HBE 细胞经过氡照射,细胞增殖能力发生了显著改变,而增殖能力又与细胞恶性增殖密切相关,即线粒体在氡致肺癌的过程中可能具有重要作用。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] APPLETON JD. Radon in air and water[M]. Amsterdam: Essentials of Medical Geology, 2005: 227-262
- [2] TAYLOR RW, TURNBULL DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(5): 389-402.
- [3] JONES RG, THOMPSON CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth[J]. Genes Dev, 2009, 23(5): 537-548.
- [4] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- [5] KING MP, ATTARDI G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA[J]. Methods Enzymol, 1996, 264: 304-313.
- [6] DIAZ F, BAYONA-BAFALUY MP, RANA M, et al. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(21): 4626-4633.
- [7] EDWARD V, EVDOKIMOYSKY, TATJANA E, et al. Alteration of mtDNA copy number, mitochondrial gene expression and extracellular DNA content in mice after irradiation at lethal dose[J]. Radiat Environ Biophys, 2011, 50(1): 181-188.
- [8] PRISE KM, PINTO M, MICHAEL BD. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering[J]. Radiat Res, 2001, 156(5): 572-576.
- [9] ZHOU H, IYANOV VN, HEI TK. Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects[J]. Cancer Res, 2008, 68(38): 2233-2240.
- [10] HEI TK, ZHOU H, GEARD CR. Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(8): 943-950.
- [11] MURPHY MP. How mitochondria produce reactive oxygen species[J]. Biochem J, 2009, 417(1): 113.
- [12] STOWE DF, CAMARA AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(6): 1373-1414.
- [13] ZAGER RA, JOHNSON AC, HANSON SY. Acute nephrotoxic and obstructive injury primes the kidney to endotoxin-driven cytokine/chemokine production[J]. Kidney Int, 2006, 69(7): 1181-1188.
- [14] 仲恒高, 苗超, 臧黎慧, 等. 氡及其子体吸入对大鼠肺与血细胞的氧化应激损伤[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2005, 25(5): 765-767.

(收稿日期: 2013-08-16)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)