

硫酸铟对 V79 细胞内活性氧和线粒体膜电位的影响

赵静琚¹, 肖卫²

摘要: [目的] 观察硫酸铟对中国仓鼠肺纤维细胞(V79细胞)内活性氧(ROS)和线粒体膜电位的影响。[方法] 不同浓度硫酸铟(0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L)染毒体外培养的V79细胞, MTT法检测细胞存活率; 以2', 7'-荧光素乙二酯和碘化四氯代四乙基苯咪唑羧花青为探针, 采用流式细胞术, 检测经不同浓度硫酸铟染毒12 h后V79细胞内ROS和线粒体膜电位的水平。[结果] 硫酸铟能明显降低V79细胞的存活率; 不同浓度硫酸铟作用于V79细胞12 h后, 细胞内的平均荧光强度从21.60增加到31.10, 线粒体膜电位从0.191 3降低到0.109 0, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。[结论] 硫酸铟能增加V79细胞内ROS的释放、降低线粒体膜电位, 影响细胞的正常代谢功能, 对细胞造成损伤。

关键词: 硫酸铟; V79细胞; 活性氧; 线粒体膜电位

Effects of Indium Sulfate on Intracellular Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential in V79 Cells ZHAO Jing-jun¹, XIAO Wei² (1. Shaanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Xi'an, Shaanxi 710054, China; 2. Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China). Address correspondence to XIAO Wei, E-mail: hemingxy@yahoo.com.cn

Abstract: [Objective] To observe the changes of intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in Chinese hamster V79 cells induced by indium sulfate *in vitro*. [Methods] The cultured V79 cells were exposed to indium sulfate at various dosages (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 mmol/L). The cell survival rate was checked with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The changes of intracellular ROS and $\Delta\psi_m$ in V79 cells were analyzed by flow cytometry with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and 5, 5', 6, 6'-tetrachloro -1, 1', 3, 3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1) probe after being interfered for 12 h. [Results] Indium sulfate significantly reduced the survival rate of V79 cells. After exposed to indium sulfate at various dosages for 12 h, the mean intracellular fluorescence intensity obviously increased from 21.60 to 31.10 while the $\Delta\psi_m$ significantly decreased from 0.191 3 to 0.109 0. The statistical differences were significant between the control group and the exposure groups ($P < 0.05$). [Conclusion] Indium sulfate can increase the release of intracellular ROS and reduce the $\Delta\psi_m$ significantly. The damage of indium sulfate to V79 cells might be associated with the change of normal cellular metabolism.

Key Words: indium sulfate; V79 cell; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential

铟(In)是一种稀散金属元素,在元素周期表中位于第三族,原子序数49,相对原子质量为114.82,主要富集在硫化物中。随着铟在信息、宇航、医药等领域的应用日益广泛^[1],其接触人群也逐渐增多,铟化合物的毒性已有报道^[2]。因此,如何更好地保护铟从业者和日常接触人群的健康成为不得不重视的问题。目前关于铟及其化合物的毒性研究方向主要有急性、亚急性、慢性毒性,生殖毒性和致突变性等,但涉及其毒性机制的研究还较少,本实验拟通过观察硫酸铟对V79细胞存活率的影响,同时检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)和线粒体膜电位水平,探讨其细胞损伤的机制。

[作者简介] 赵静琚(1985—),女,硕士,医师;研究方向:金属的毒性和防护;E-mail: zjj0619@sina.cn

[通信作者] 肖卫教授, E-mail: hemingxy@yahoo.com.cn

[作者单位] 1. 陕西省疾病预防控制中心, 陕西 西安 710054; 2. 苏州大学, 江苏 苏州 215123

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 中国仓鼠肺成纤维细胞株(V79),由苏州大学放射医学与公共卫生学院劳动卫生教研室提供。

1.1.2 主要仪器 HF151UV型CO₂培养箱(美国Heraeus公司), CK40型倒置显微镜(日本OLYMPUS公司), CytomicsFC500型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司), Power WaveXS型酶标分析仪(德国Eppendorf公司)。

1.1.3 主要试剂 硫酸铟[纯度>99%(质量分数)],购自张家港市华昌药业有限公司; 噻唑蓝[溴化-3-(4,5-二甲基噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑,MTT],购自上海前尘生物科技有限公司; 荧光探针2',7'-荧光素乙二酯(DCFH-DA)和荧光探针碘化四氯代四乙基苯咪唑羧花青(JC-1)购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT法及实验分组 取对数生长期的细胞经胰酶消化后用完全培养基重悬,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种于96

孔培养板中,每孔 100 μ L 细胞悬液,培养 24 h 后,处理组分别加入含硫酸铜浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L 的新鲜培养基 100 μ L,阴性对照组加入等量的完全培养基。同时设立空白组对照调零,空白对照组除不加细胞悬液外其余条件与阴性对照组相同,每组均设 5 个平行孔。置于培养箱中分别培养 2 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h,再加入 100 μ L 10% 酸化十二烷基硫酸钠(SDS),待蓝紫色结晶物充分溶解(作用 12 h)后,在酶标仪上选择参考波长 630 nm,初始波长 570 nm,测定各孔光密度(D)。按公式计算各组细胞存活率,细胞存活率=[(各染毒组 D 值-空白组 D 值)/(阴性对照组 D 值-空白组 D 值)] $\times$ 100%。

1.2.2 V79 细胞内 ROS 的检测 取对数生长期的细胞于染毒前 24 h 接种于 6 孔培养板中,细胞浓度为 1×10^6 /孔,18~24 h 后细胞贴壁,此时向其中 4 孔分别加入含不同浓度硫酸铜(0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L)的培养基,剩余 2 孔加入等量培养基,其中 1 孔作为阴性对照。细胞处理 12 h 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,实验组和对照组各加入 500 μ L 的 PBS 染液(含 10 μ mol/L DCFH-DA),剩余 1 孔加入等量 PBS 溶液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测,激发光波长 488 nm。图像分析采用 Cell Quest 软件。每组设 3 个复孔,重复实验 3 次。

1.2.3 V79 细胞线粒体膜电位检测 实验分组,细胞培养和硫酸铜染毒方法同上。细胞处理 12 h 后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,实验组和对照组各加入 400 μ L 的 PBS 染液(含 10 μ g/mL JC-1)重

悬,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 000 r/min 离心 5 min($r=18$ cm),再次重悬细胞,用流式细胞仪分别在 485 nm 激发光和 527 nm、590 nm 发射光下测定红、绿色荧光强度,以红/绿荧光比值代表细胞线粒体膜电位。Cell Quest 软件分析图像。每组设 3 个复孔,重复实验 3 次。

1.3 统计处理

采用 SAS V8 统计软件包,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,趋势分析采用 Spearman 相关分析,进一步两两比较采用 SNK 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 硫酸铜对 V79 细胞存活率的影响

倒置显微镜下观察,随着硫酸铜染毒浓度的增加,从 12 h 1 mmol/L 组开始,V79 细胞发生形态学变化,折光性减弱,细胞质中颗粒物增多,细胞逐渐圆缩甚至脱落。

在相同染毒时间下,细胞的存活率随着硫酸铜染毒浓度(0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L)的增加而下降,呈剂量-效应关系($P<0.05$),当硫酸铜浓度 ≤ 4.0 mmol/L 时,细胞的存活率下降幅度不大;浓度为 8.0 mmol/L 时,细胞的存活率大幅度降低,存活率在 4% 以下。相同浓度硫酸铜作用 V79 细胞不同时间(2、6、12、24 h)后,细胞存活率经趋势检验也存在逐渐下降的趋势,除 8.0 mmol 浓度外,差异均有统计学意义,呈时间-效应关系($P<0.05$),见表 1。

表 1 硫酸铜作用不同浓度和时间下 V79 细胞的存活率($\bar{x} \pm s$, %, $n=3$)

硫酸铜浓度 (mmol/L)	染毒时间 (h)				r	P
	2	6	12	24		
0.0	100.00	100.00	100.00	100.00	—	—
0.5	98.33 $\pm$ 0.71	96.29 $\pm$ 1.45	93.49 $\pm$ 2.24 [*]	92.98 $\pm$ 1.91 [*]	-0.890 73	> 0.05
1.0	97.90 $\pm$ 1.09	95.81 $\pm$ 2.10	92.76 $\pm$ 2.36 [*]	87.72 $\pm$ 2.15 ^{**}	-0.998 49	< 0.05
2.0	97.09 $\pm$ 1.58	94.80 $\pm$ 1.57	89.92 $\pm$ 1.76 ^{**}	85.11 $\pm$ 1.78 ^{**}	-0.987 38	< 0.05
4.0	96.57 $\pm$ 1.30	91.57 $\pm$ 1.35 [*]	87.06 $\pm$ 2.06 ^{**}	74.57 $\pm$ 1.58 ^{**}	-0.998 00	< 0.05
8.0	3.84 $\pm$ 0.71 ^{**}	3.63 $\pm$ 0.89 ^{**}	2.83 $\pm$ 1.01 ^{**}	2.77 $\pm$ 1.07 ^{**}	-0.880 98	> 0.05
r	-0.894 73	-0.911 75	-0.925 54	-0.964 96	—	—
P	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	—	—

2.2 硫酸铜对细胞内 ROS 的影响

结果表明,不同浓度硫酸铜作用于 V79 细胞 12 h 后,细胞内 ROS 和对照组比较明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。随着硫酸铜浓度(0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L)增加,与阴性对照组相比,各染毒组细胞内 ROS 平均荧光强度增强,ROS 产生增多,见表 2。

表 2 硫酸铜作用 V79 细胞 12 h 后各浓度组 ROS 水平($\bar{x} \pm s$)

硫酸铜浓度 (mmol/L)	ROS (平均荧光强度)
0.0	21.60 $\pm$ 1.70 ^a
0.5	24.70 $\pm$ 0.28 ^b
1.0	26.60 $\pm$ 1.13 ^b
2.0	30.05 $\pm$ 0.35 ^c
4.0	31.10 $\pm$ 1.41 ^c

[注]各染毒时间组内经 SNK 检验,字母不同表示每两组间差别有统计学意义,字母相同表示每两组间的差异无统计学意义。

2.3 硫酸铜对细胞线粒体膜电位的影响

结果表明,不同浓度硫酸铜作用于 V79 细胞 12 h 后,各染毒组和对照组比较,线粒体膜电位下降,差异有统计学意义($P<0.05$),且线粒体膜电位下降程度随硫酸铜浓度增加而增加,当硫酸铜浓度为 4.0 mmol/L 时,线粒体膜电位水平仅为对照组的 50%,见表 3。

表 3 硫酸铜作用 V79 细胞 12 h 后各浓度组线粒体膜电位水平($\bar{x} \pm s$)

硫酸铜浓度 (mmol/L)	线粒体膜电位
0.0	0.191 3 $\pm$ 0.001 8 ^a
0.5	0.181 0 $\pm$ 0.003 3 ^a
1.0	0.165 5 $\pm$ 0.004 7 ^b
2.0	0.155 2 $\pm$ 0.006 2 ^c
4.0	0.109 0 $\pm$ 0.001 9 ^d

[注]各染毒时间组内经 SNK 检验,字母不同表示每两组间差别有统计学意义,字母相同表示每两组间的差异无统计学意义。

3 讨论

钢及其化合物通过皮肤接触或呼吸道进入体内, 吸收入血的钢可与血浆蛋白结合, 迅速转运到软组织及骨骼, 排泄时间可达数月或数年^[2]。目前国内外关于钢的毒性研究主要集中在心、肝、肾等脏器毒性和生殖毒性方面^[2-5]。另有学者, 如 NAKAJIMA 等^[6]证实钢和汞钢合金有明显的细胞毒性; 曲波等^[7]发现硫酸钢可能具有致细胞突变作用。目前关于钢及其化合物的体外研究还较少, 本实验从体外对 V79 细胞进行硫酸钢染毒, 观察硫酸钢的细胞毒性作用, 并通过检测细胞内 ROS 和线粒体膜电位的变化情况进一步探讨硫酸钢致 V79 细胞损伤的机制。

本研究发现, 以硫酸钢按不同倍数稀释后的浓度 (0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mmol/L) 染毒体外培养的 V79 细胞, 细胞的存活率逐渐下降, 并呈现浓度依赖性, 说明硫酸钢具有明显的细胞毒性作用。当硫酸钢浓度为 8.0 mmol/L 时, 细胞的存活率已降到 4% 以下, 此时大部分的细胞已经死亡, 推测硫酸钢对 V79 细胞的半数致死浓度在 4~8 mmol/L 之间, 实验可以继续细化分组找出阈值, 为后续的实验研究和相关行业评估硫酸钢的毒性提供依据。同时, 随着染毒时间的增加 (2、6、12、24 h), 相同浓度硫酸钢染毒组, 细胞的存活率也存在逐渐下降的趋势, 其中以 12 h 组最明显, 说明硫酸钢对 V79 细胞的毒性作用不仅呈剂量相关, 还呈时间相关, 时间越长, 细胞存活率越低。为保证一定的细胞存活率, 选择硫酸钢浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L, 染毒 12 h, 进一步评估硫酸钢染毒后, V79 细胞内 ROS 和线粒体膜电位的变化。ROS 是评价细胞正常生理功能的常用指标。ROS 是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物, 主要包括超氧阴离子 (O_2^-)、羟自由基 ($\cdot HO$)、过氧化氢 (H_2O_2)、一氧化氮自由基 (NO) 等。在硫酸钢干预后, V79 细胞内 ROS 水平明显升高, 提示硫酸钢能通过增加细胞内 ROS 影响细胞正常的生理功能。同时硫酸钢也可能通过间接损伤线粒体功能进而影响细胞内 ROS 水平和能量代谢, 线粒体功能受损时可导致线粒体内 ROS 的释放, 线粒体因为其 DNA 不受组蛋白保护、膜脂质和基质中脂肪酸易被 ROS 氧化, 释放的 ROS 靠近线粒体内膜, 能进一步加剧线粒体的损伤, 形成恶性循环^[8-9]。为了证实硫酸钢也能同时对细胞线粒体造成损伤, 间接对细胞生理功能产生影响, 我们检测了线粒体膜电位, 对线粒体功能进行评价, 线粒体膜电位是线粒体内膜两侧质子及其他离子水平不对称而产生的跨膜电位差, 其在维持线粒体正常生理功能中发挥重要作用, 影响细胞的存活。线粒体膜电位降低可抑制线粒体融合、破坏线粒体扁平网状结构、诱导线粒体破碎和分裂, 引起线粒体形态和功能改变^[10-12], 导致细胞损伤。研究发现硫酸钢可明显降低 V79 细胞内的线粒体膜电位水平, 且硫酸钢浓度越高, 线粒体膜电位下降水平越明显, 证实了线粒体功能的损伤也参与了硫酸钢的细胞损伤机制。

迄今, 钢及其化合物的毒性机制尚不清楚, 如: 王文敬等^[13]发现硫酸钢能引起 V79 细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活力降低, 丙二醛 (MDA) 含量增加; JORGE 等^[14]通过建立模型, 发现钢的硝酸盐对细胞有氧化应激和还原型辅酶 II (NADPH) 依

赖的脂质过氧化作用。本实验结果表明, 硫酸钢能直接和间接引起细胞内 ROS 的释放, 影响细胞正常的生理功能, 造成细胞损伤, 该结果不仅丰富了钢及其化合物的毒性机制, 也为其后续深入研究、毒性评估和预防提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 朱协彬, 段学臣. 钢的应用现状及发展前景[J]. 稀有金属与硬质合金, 2008, 36(1): 51-55.
- [2] 何凤生, 王世俊, 任引津. 中华职业医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 327-328.
- [3] ODA K. Toxicity of a low level of indium phosphide (Inp) in rats after intratracheal instillation[J]. Ind Health, 1997, 35(1): 61-68.
- [4] AOKI Y, LIPSKY MM, FOWLER BA. Alteration in protein synthesis in primary cultures of rat kidney proximal tubule epithelial cells by exposure to gallium, indium, and arsenite[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1990, 106(3): 462-468.
- [5] GILANI SH, ALIBHAI Y. Teratogenicity of metals to chick embryos[J]. Toxicol Environ Health, 1990, 30(1): 23-31.
- [6] NAKAJIMA H, WATAHA JC, ROCKWELL LC, et al. *In vitro* cytotoxicity of amalgams made with binary Hg-In liquid alloys[J]. Dent Mater, 1997, 13(3): 168-173.
- [7] 曲波, 李雪飞, 王帆, 等. 硫酸钢急性毒性和致突变作用研究[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 273-275.
- [8] CHOKSI KB, BOYLSTON WH, RABEK JP, et al. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1688(2): 95-101.
- [9] SCHRAUWEN P, HESSELINK MK. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(6): 1412-1417.
- [10] MISRA MK, SARWAT M, BHAKUNI P, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(10): RA209-RA219.
- [11] BONNARD C, DURAND A, PEYROL S, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice[J]. J Clin Invest, 2008, 118(2): 789-800.
- [12] AON MA, CORTASSA S, O'ROURKE B. Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 641: 98-117.
- [13] 王文敬, 肖卫. 硫酸钢对 V79 细胞氧化损伤及 VitC 拮抗作用体外研究[J]. 工业卫生与职业病, 2010, 36(3): 136-138.
- [14] ZURITA JL, JOS A, DEL PESO A, et al. Toxicological assessment of indium nitrate on aquatic organisms and investigation of the effects on the PLHC-1 fish cell line[J]. Sci Total Environ, 2007, 387(1/2/3): 155-165.

(收稿日期: 2011-05-23)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 王晓宇; 校对: 张晶)