·论 著·

二氯乙腈诱导 HepG2 细胞凋亡及机制研究

翟璐, 梁海荣, 罗皓

广东医科大学公共卫生学院,东莞市环境医学重点实验室,广东 东莞 523808

摘要: 目的 研究二氯乙腈(DCAN)对人肝肿瘤 HepG2 细胞凋亡的作用及其机制。 **方法** 用二甲基亚砜(DMSO)溶解 DCAN,以 DMSO 处理的 HepG2 细胞作为对照组, 50 和 800 μmol/L 的 DCAN 处理的 HepG2 细胞作为处理组,采用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测细胞活力,流式细胞术(FCM)检测细胞周期分布情况,Annexin V-FITC/PI 双标记法测定细胞凋亡率;荧光测定法检测 HepG2 细胞内天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活性。 **结果** DCAN 处理浓度和处理时间存在交互效应($P<0.001$),与对照组比较,DCAN 可明显抑制 HepG2 增殖,呈现时间和剂量效应($P<0.05$);与对照组比较,800 μmol/L DCAN 处理组 G_0/G_1 期比例明显减少,G_2/M 期细胞比例明显增加;DCAN 诱导的 HepG2 细胞凋亡随着浓度的增加而增加,呈剂量-效应关系,回归方程为 $\hat{y}=0.031x+5$[决定系数(R^2)= 0.915, $F=64.782$, $P<0.001$];DCAN 诱导的 HepG2 细胞内 caspase-3 酶活性随着处理浓度的增加而增加,呈剂量-效应关系,回归方程为 $\hat{y}=0.001\ 6x+1$($R^2=1.000$, $F=21\ 266.064$, $P<0.001$)。 **结论** DCAN 可抑制 HepG2 细胞增殖并诱导细胞凋亡,其机制可能与 G_2/M 期细胞阻滞、抑制 RNA 和蛋白质的合成并激活细胞内 caspase-3 凋亡途径有关。

关键词: 二氯乙腈; 人肝肿瘤 HepG2 细胞; caspase-3; 细胞凋亡

中图分类号:R114 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-3110(2018)10-1153-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.10.001

Apoptosis of human hepatoma HepG2 cells induced by dichloroacetonitrile and its mechanism

ZHAI Lu, LIANG Hai-rong, LUO Hao

Dongguan Key Laboratory of Environmental Medicine, School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, *China*

Corresponding author: LUO Hao, E-mail: zhlh426@163.com

Abstract: Objective To study the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells induced by dichloroacetonitrile (DCAN) and its related mechanism. **Methods** Dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated HepG2 cells were selected as the control group, while 50 μmol/L and 800 μmol/L DCAN-treated HepG2 cells served as the DCAN-treated groups. The cell proliferation was detected with Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Cell cycle and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry with annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (FITC/PI) double staining. The relative activity of caspase-3 in HepG2 cells was examined with fluorospectrophotometer assay. **Results** The interaction effect existed between DCAN concentration and treatment time ($P<0.001$). DCAN could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner compared with the control group ($P<0.05$). The proportion of HepG2 cells in G_0/G_1 phase was decreased in the 800 μmol/L DCAN-treated group compared with the control group, while the proportion of HepG2 cells in G_2/M phase was increased. Under the DCAN concentrations, the apoptosis rate of HepG2 cells were increased in a dose-dependent manner, with the regression equation $\hat{y}=0.031x+5$ ($R^2=0.915$, $F=64.782$, $P<0.001$), while the caspase 3 activity was also increased in a dose-dependent manner, with regression equation $\hat{y}=0.0016x+1$ ($R^2=1.000$, $F=21,266.064$, $P<0.001$). **Conclusions** DCAN can inhibit the proliferation of HepG2 cells and induce their apoptosis, and the mechanism may be related to the arrest of G_2/M phase, inhibition of RNA and protein synthesis and activation of caspase-3 pathway.

Key words: dichloroacetonitrile; human hepatoma HepG2 cell; caspase-3; cell apoptosis

近年来,由于替代消毒剂的单独或联合使用,使得饮水中不断检出高致癌和致突变特性的二甲基亚硝胺、卤代腈(氰)等含氮消毒副产物,此类消毒副产物成为该领域关注的热点。二氯乙腈(dichloroacetonitrile, DCAN)是饮水氯化消毒过程中产生的一种含量最高的卤乙腈,具有极强的细胞毒性和遗传毒性[1]。但迄今为止,关于 DCAN 的毒性试验资料仍较有限。现有的研究表明,DCAN 能引起细胞 DNA 损伤、促进

基金项目:广东省医学科研基金项目(A2017100)

作者简介:翟璐(1982-),女,黑龙江哈尔滨市人,实验师,主要从事环境卫生学工作。

通信作者:罗皓,E-mail:zhlh426@163.com。

细胞凋亡[2-4],但相关作用机制仍未阐明。DCAN 能否通过改变细胞周期的分布情况,进而促进细胞凋亡目前尚不清楚。本研究以体外培养的人肝肿瘤细胞(HepG2 细胞)为研究对象,以 DCAN 为受试物,主要应用 DCAN 染毒、流式细胞术、荧光测定技术等,检测 DCAN 对细胞凋亡的影响并探讨其的可能机制,旨在为阐明 DCAN 的细胞毒性提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与仪器 细胞株:人肝肿瘤 HepG2 细胞株由广东医科大学中美肿瘤研究所惠赠。试剂:DCAN(纯度>98%)和二甲基亚砜(DMSO)(Sigma,美国),1640 培养基(Gibco,美国),胎牛血清(Hyclone,美国),碘化丙啶和 RNaseA(Solarbio,上海),CCK-8 细胞计数试剂盒和 Annexin V, FITC 凋亡检测试剂盒(DOJINDO,日本),caspase-3 酶检测试剂盒(Abcam,美国)。仪器:CO_2 培养箱(Thermo,德国),多功能酶标仪(Synergy™ HT Mu lt-iModeM icroplate Reader, BioTek Instrum ents,美国),流式细胞仪(BD,美国)。配制 DCAN 染毒溶液:用 DMSO 溶解 DCAN,含有 10%胎牛血清的高糖 1640 培养基稀释到所需的浓度,现配现用。

1.2 细胞培养 HepG2 细胞接种于高糖 1640 培养基(含 10%的胎牛血清、100 μg/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素),置于 37 ℃,5%CO_2 和 100%湿度的恒温培养箱中培养,每 2~3 d 传代 1 次,待细胞长到对数生长期时进行实验。

1.3 细胞活力及细胞增殖实验 根据预实验结果,选择细胞染毒后存活力高、低的 DCAN 浓度进行实验,即 50 和 800 μmol/L DCAN,同时以 1 ml/L DMSO 为溶剂对照组。使用 CCK-8 法进行试验,调整 HepG2 细胞密度为 5×10^3 个/孔接种在 96 孔板中,培养 24 h 后倒掉培养基,用 PBS 洗 2 次,分别加入 DMSO(1 ml/L,溶剂对照)、50、800 μmol/L DCAN 染毒,200 μl/孔,每个剂量同时设 5 个复孔,分别培养 24、48、72 h 后,弃去培养液,每孔加 100 μl 新鲜的 1640 培养基和 10 μl CCK-8 试剂,37 ℃内孵育 1 h,采用全自动酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。细胞活力(%)= $A_{实验组}/A_{DMSO组}\times100\%$,实验重复 3 次。

1.4 细胞周期测定 参照文献[5]测定细胞周期。调整 HepG2 细胞密度以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,吸去原培养基,每孔加入 2 ml 不含血清的 1640 培养基进行饥饿培养 24 h 后,分别给予 DMSO(1 ml/L,溶剂对照)、50、800 μmol/L DCAN 进行染毒 24 h,胰酶消化,1 000 rpm/min 离心 5 min,弃上清;4 ℃预冷的 PBS 1 ml 洗两次。加入-20 ℃预冷的 70%的乙醇 1 ml,打匀细胞,4 ℃固定过夜。4 ℃,1 000 rpm/min离心 5 min,弃上清,加入预冷的 0.1% Triton X-100 溶液 1 ml,混匀,4 ℃,1 000 rpm/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次。加入 RNaseA(终浓度 200 μg/ml)于 37 ℃孵育 30 mim,冰浴终止酶作用;再加入 1 ml 用 PBS 配置的 PI(终浓度 50 μg/ml),37 ℃避光孵育 30 mim,上流式细胞仪检测,实验重复 3 次,采用细胞周期分析软件分析数据。

1.5 细胞凋亡测定 参照文献[6]进行细胞凋亡测定。调整 HepG2 细胞密度以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,吸去原培养基,分别加入 DMSO、50、800 μmol/L DCAN 进行染毒 24 h 后吸去培养基,用 PBS 洗两次,胰酶消化,1 000 rpm/min 离心 5 min,弃上清;PBS 洗涤细胞 2 次;加入预先配好的 1×Annexin V Binding Solution 500 μl 制成细胞悬液;取上述细胞悬液 100 μl,加入新的离心管,向细胞悬液加入 5 μl Annexin V, FITC 结合物,再加入 5 μl 的 PI Solution,室温下避光培养 15 min,加入 400 μl 1×Annexin V Binding Solution,1 h 内上流式细胞仪检测(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm),实验重复 3 次。

1.6 Caspase-3 酶活性检测 参照文献[6]检测 caspase-3 酶活性。DCAN 作用于 HepG2 细胞 24 h 后,胰酶消化后收集 2×10^6 个细胞,加入 50 μl 的细胞裂解液重悬并混匀细胞,冰上孵育 10 min,转入黑色 96 孔酶标板,设 3 个复孔,每孔加入 2×反应缓冲液 50 μl 和 DEVD-AFC 5 μl,37 ℃培养箱中孵育 1~2 h,采用多功能酶标仪,以 400 nm 作为激发光波长,505 nm作为发射光波长,检测荧光发光值,实验重复 3 次。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示,DCAN 对 HepG2 细胞增殖能力影响采用两因素析因设计资料方差分析;多组间比较用单因素方差分析,总体比较有差异后,各实验组与溶剂对照组间比较用 Dunnett-t 检验,采用一元线性回归分析 DCAN 对细胞凋亡及 caspase-3 酶活性指标的剂量-效应关系,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DCAN 对 HepG2 细胞增殖能力的影响 分别使用 DMSO、50、800 μmol/L DCAN 处理 HepG2 细胞,作用 24、48 及 72 h 后,方差分析结果显示,不同 DCAN 处理组的细胞增殖能力差异有统计学意义($F=672.073$,$P<0.001$);不同处理时间细胞增殖能力比

较,差异有统计学意义($F=18.954$,$P<0.001$);处理浓度和处理时间存在交互效应($F=16.012$,$P<0.001$)。与对照组比较,各剂量 DCAN 组 HepG2 细胞活力明显受到抑制,呈剂量、时间-效应关系($P<0.05$),见表 1。因 DCAN 处理 HepG2 细胞 48 及 72 h 时,高剂量组的细胞活性过低,本研究最终选择 DCAN 处理 HepG2 细胞 24 h 作为后续研究。

表 1　DCAN 对 HepG2 细胞增殖能力的影响(%,$\bar{x}\pm s$,$n=3$)

组别	DCAN 剂量(μmol/L)	处理时间(h)		
		24	48	72
DMSO 对照组	0	100.00±0.25	100.15±0.91	100.40±0.36
DCAN 处理组 1	50	90.64±1.34 *	90.73±3.72 *	88.49±2.55 *
DCAN 处理组 2	800	48.63±2.41 *#	32.56±3.17 *#	25.67±0.89 *#

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 50 μmol/L DCAN 处理组比较,# $P<0.05$。

2.2　DCAN 对 HepG2 细胞周期的影响　染毒 24 h 后,与 DMSO 对照组相比,50 μmol/L DCAN 处理 HepG2 细胞后,细胞周期未显示变化,而 800 μmol/L DCAN 组 HepG2 细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显减少,G_2/M 期细胞明显增加($P<0.05$),提示 HepG2 细胞发生 G_2/M 期阻滞,见表 2。

表 2　DCAN 对 HepG2 细胞周期的影响(%,$\bar{x}\pm s$,$n=3$)

组别	DCAN 剂量(μmol/L)	细胞周期		
		G_1 期	S 期	G_2 期
DMSO 对照组	0	54.67±0.29	27.2±0.17	18.13±0.46
DCAN 处理组 1	50	55.20±4.65	28.37±2.72	16.47±1.96
DCAN 处理组 2	800	19.17±2.40 *	28.47±2.55	52.37±2.55 *

注:与对照组比较,* $P<0.05$。

2.3　DCAN 对 HepG2 细胞凋亡的影响　DCAN 作用 HepG2 细胞 24 h 后,DMSO 对照组和 50、800 μmol/L 的 DCAN 组细胞凋亡率分别为(10.70±1.35)%、(13.93±0.81)%、(26.00±3.68)%,与对照组比较,当剂量增加到 800 μmol/L 时差异有统计学意义($P<0.05$),提示高剂量的 DCAN 可诱导 HepG2 细胞发生凋亡。以 DMSO 对照组和 2 个 DCAN 处理组的细胞凋亡率数据进行一元线性回归分析,结果显示:回归方程为 $\hat{y}=0.031x+5$($\hat{y}$ 为细胞凋亡率,x 为 DCAN 处理浓度),$R^2=0.915$,$F=64.782$,$P<0.001$,回归方程成立。对回归系统进行检验,结果显示:$t=8.049$,$P<0.001$,提示 DCAN 组细胞凋亡率随着剂量的增加而增加,呈剂量-反应关系。

2.4　DCAN 对 HepG2 细胞内 caspase-3 酶活性影响　染毒 24 h 后,与 DMSO 对照组比较,50、800 μmol/L DCAN 处理组的 HepG2 细胞内 caspase-3 酶活性明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。以 DMSO 对照组和 2 个 DCAN 处理组的细胞内 caspase-3 酶活性数据进行一元线性回归分析,结果显示:回归方程为 $\hat{y}=0.001\ 6x+1$($\hat{y}$ 为 HepG2 细胞内 caspase-3 酶活性,x 为 DCAN 处理浓度),$R^2=1.000$,$F=21\ 266.064$,$P<0.001$,回归方程成立。对回归系统进行检验,结果显示:$t=210.014$,$P<0.001$,提示 DCAN 组 HepG2 细胞内 caspase-3 酶活性随着 DCAN 浓度的增加而增加,呈剂量-反应关系。

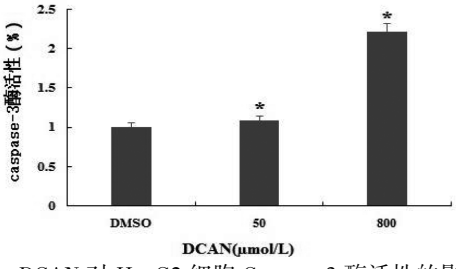


图 1　DCAN 对 HepG2 细胞 Caspase 3 酶活性的影响

3　讨　论

DCAN 是饮水氯化消毒过程中产生的一种含量最高的 HANs,环境中的 DCAN 可通过呼吸道、消化道和皮肤进入体内,对人及动物表现出极强的遗传毒性和致突变性。现有的研究表明,用含有余氯的水喂养大鼠后,其肠道能生成 DCAN,同时 DCAN 对大小鼠的肝脏和其他器官产生影响[2]。而细胞实验证实,DCAN 具有抑制细胞生长和促进细胞凋亡的作用[3-4]。本研究结果显示,DCAN 可诱导 HepG2 细胞 G_2/M 期阻滞。细胞周期的异常是肿瘤的重要特征,正常细胞在 DNA 损伤之后可以使细胞周期暂停以获得机会修复异常的 DNA,藉此维持基因组的完整性[5]。外源性化合物所致的 DNA 损伤可导致细胞周期发生 G_1 期或(和)G_2 期阻滞或延迟,以免损伤的 DNA 复制或传给子代细胞,而当 DNA 损伤超过细胞耐受极限时,可阻断细胞增殖周期甚至引起凋亡,最终导致死亡。本研究发现,DCAN 对 HepG2 细胞的生长抑制呈时间和剂量依赖关系,随着 DCAN 浓度升高,细胞凋亡率逐渐增加,G_0/G_1 期细胞比例不断减少,而 G_2/M 期细胞比例亦不断增加,提示 DCAN 可通过抑制 HepG2 细胞内 DNA 复制,阻断细胞分裂,从而起到抑制细胞增殖作用。

Caspase 家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统,在细胞凋亡机制网络中居中心地位[6-7]。Caspase 依赖的凋亡途径可通过激活外源性和内源性两条途径得以实现,其中外源性途径主要通过死亡受体激活 caspase-8 活性,而内源性途径则主要通过细胞色素 C 与凋亡酶激活因子形成的寡聚体激活 caspase-9 活性[8]。无论是 caspase-8 酶活性还是