

# 线粒体 DNA 减少在 氦及其子体致人支气管上皮细胞凋亡中的作用

王伟鹏 孙静 陈玉之 李冰燕 童建

(苏州大学医学部 放射医学与公共卫生学院卫生毒理教研室 苏州 215123)

**摘要** 使用溴化乙锭(Ethidium bromide, EtBr)诱导方法构建线粒体数目减少支气管上皮细胞(Human bronchia epithelia with mitochondrial DNA knock-down,  $\rho^-$ HBE)模型并进行长期氦照射,用克隆形成法测定氦照射后 HBE 细胞的增殖能力,用流式细胞仪进行细胞凋亡和线粒体膜电位的检测。结果发现,氦照射后,与线粒体 DNA 数量正常的 HBE 细胞( $\rho^+$ HBE)相比较, $\rho^-$ HBE 细胞存活分数明显增高,虽然早期凋亡率明显低于正常细胞,但是总凋亡率增加,同时线粒体膜电位也显著降低。结果提示,氦照射后引起的线粒体减少 HBE 细胞增殖能力提高与总凋亡率的减少有关,并且与线粒体膜电位的变化相关。

**关键词** 线粒体 DNA, 氦及其子体, 人支气管上皮细胞, 凋亡, 细胞增殖

**中图分类号** R146

近年来的研究显示,核外遗传在辐射致癌过程中起着重要的作用。线粒体是真核细胞内唯一具有 DNA 的细胞器,线粒体功能不全是肿瘤细胞最重要的特征之一。与核基因组相比,线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA)缺乏组蛋白保护,而且没有有效的损伤修复系统,因此极易受到自由基攻击,是致癌物作用的重要靶点<sup>[1]</sup>。流行病学调查和实验研究证实支气管上皮细胞是氦及其子体直接作用的靶细胞<sup>[2-3]</sup>,线粒体在辐射旁效应的调节中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。早在 1930 年,Warburg<sup>[6]</sup>就提出线粒体功能不全可能导致细胞去分化,进而参与细胞癌变过程。但到目前为止,仍未肯定 mtDNA 突变与致癌作用间的因果关系。

本研究使用线粒体 DNA 部分敲除人支气管上皮细胞(Human bronchia epithelia with mtDNA knock-down,  $\rho^-$ HBE)的细胞模型<sup>[7]</sup>,观察氦及其子体体外照射对  $\rho^-$ HBE 细胞增殖和凋亡的影响,为揭示线粒体 DNA 在氦致支气管上皮细胞恶性转化中的作用机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

母代人支气管上皮细胞(Human bronchia

epithelia,  $\rho^+$ HBE)由中山医科大学公共卫生学院陈雯教授赠送,使用高糖 DMEM 培养基常规培养。将 HBE 细胞培养于含  $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  EtBr 的诱导型高糖 DMEM 培养基(含  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  丙酮酸钠、 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  尿嘧啶及  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  溴化乙锭)中,连续培养 60 d 后,采用有限稀释法挑取一个单克隆细胞株扩增培养。扩增后使用 DNAzol 试剂盒提取细胞总 DNA,用 Real-time PCR 法检测其线粒体 DNA 含量,把对照组 HBE 细胞的线粒体拷贝数(mtDNA / nDNA 比值)定义为 1,计算 EB 处理后 HBE 细胞的相对线粒体拷贝数(即  $\rho^-$ HBE 细胞的线粒体拷贝数与  $\rho^+$ HBE 细胞线粒体拷贝数的比值),分析处理组与对照组 mtDNA 缺失的变化率。将 EB 处理后 mtDNA 含量降低了(76±4)%的细胞定义为  $\rho^-$ HBE 细胞<sup>[7]</sup>。

丙酮酸钠、二甲基亚砷和溴化乙锭等购自 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基、胰酶等为 Hyclone 公司产品;细胞凋亡测定试剂盒和 JC-1 探针为 Invitrogen 公司产品。

恒温培养箱(Cell 150, Thermo Forma),倒置显微镜(IX51, Olympus),酶标仪(XS, Olympus),流式细胞仪(FC500, BIO-TEK),细胞照射装置(CSED-C, Beckman Coulter)。

基金资助:国家自然科学基金重大国际合作项目(NO.81020108028)资助

第一作者:王伟鹏,男,1989年6月出生,苏州大学医学部2011级在读本科生, E-mail: 1872545444@qq.com

通讯作者:李冰燕,博士,副研究员, E-mail: bingyanli@suda.edu.cn

收稿日期:初稿 2013-09-12, 修回 2013-11-22

## 1.2 细胞照射和分组

制备单细胞悬液,接种于 Transwell 膜培养皿贴壁过夜后,将 Transwell 培养皿置于氡及子体细胞照射装置(中国军事医学科学院,北京)照射。膜上方氡持续泵入直接对细胞染毒,膜下方通过培养基保持细胞湿润。氧气浓度 21%,流量  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,暴露箱氡及子体浓度为  $20\,000 \text{ Bq} \cdot \text{m}^{-3}$ ,照射 20 min,3 d 后重复照射 1 次,连续 2 次作为照射第一代(记为 Rn1),用 0.25%胰酶消化收集细胞,并进行常规培养,一瓶传 6 瓶,进行下一代照射。对照组细胞置于氡浓度为本底值的装置中,其余条件同照射组。细胞根据处理方法分为 6 组: HBE 细胞假照射对照组 ( $\rho^+$  HBE 组); HBE 细胞染氡 10 代的低剂量氡照射组 ( $\rho^+$  HBE Rn10 组); HBE 细胞染氡 30 代的高剂量氡照射组 ( $\rho^+$  HBE Rn30 组); 线粒体减少 HBE 细胞假照射对照组 ( $\rho^-$  HBE 组); 线粒体减少 HBE 细胞染氡 10 代的低剂量氡照射组 ( $\rho^-$  HBERn10 组); 线粒体减少 HBE 细胞染氡 30 代的高剂量氡照射组 ( $\rho^-$  HBERn30 组)。

## 1.3 存活分数检测

体外氡及子体照射后第二天消化细胞做存活分数检测。用 0.25%胰酶消化位于 Transwell 膜上的细胞,离心收集并重悬细胞,接种于 60 mm 培养皿,接种细胞数以每个皿有 50–60 个细胞存活并形成克隆为准。每组接种 3 个培养皿,培养 14 d 左右结晶紫染色细胞并计克隆数。接种效率(Plating efficiency,  $R_{PE}$ , %) = 克隆形成数/接种细胞数  $\times 100\%$ ; 相对存活分数(Survival fraction,  $f_s$ ) = 照射组  $R_{PE}$  / 对照组  $R_{PE}$ 。

## 1.4 细胞凋亡检测

收集包括培养基中悬浮的全部细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化并获取对照组和处理组细胞,按照 Annexin V - FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。将细胞数调整到  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ,加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 4  $^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min 后,加入 10  $\mu\text{L}$  PI 避光孵育 15 min,转移至流式管内。每组设 3 个平行样,使用流式细胞仪(FC5000, Beckman 公司,美国)分析,以早期和晚期凋亡百分比之和代表细胞总凋亡率。

## 1.5 线粒体膜电位测定

待细胞生长至对数生长期时,用 0.25%胰酶消

化吹匀成单细胞悬液,500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬两次。每份样品加入 400  $\mu\text{L}$  的 JC-1 探针染色,室温避光孵育 30 min 后,使用流式细胞仪分析。在 FL1、FL2 和 FL3 三个通道中,取 FL2/FL1 线粒体膜电位水平进行比较。

## 1.6 统计与分析

采用 SPSS 统计软件,以  $p < 0.05$  为检验水准。用 EXCEL 对实验结果进行图表编辑。

## 2 结果

### 2.1 氡及子体照射对 HBE 细胞增殖能力的影响

表 1 的数据显示,与假照射对照组相比较,高剂量和低剂量组  $\rho^+$  HBE 细胞的存活分数均降低,而  $\rho^-$  HBE 细胞的存活分数随着氡照射剂量的增加而升高( $p < 0.05$ , 表 1)。在相同的照射剂量下, $\rho^-$  HBE 细胞的存活分数显著高于  $\rho^+$  HBE 细胞。说明氡及子体照射提高了  $\rho^-$  HBE 细胞的增殖能力。

表 1 氡及子体照射对 HBE 细胞增殖能力的影响  
Table 1 Effects of radon and its progeny on the HBE cell proliferation ( $\bar{x} \pm s$ , %)

Groups	$f_s / \%$	
	$\rho^+$ HBE	$\rho^-$ HBE
Control	1	1
Rn10	$0.87 \pm 0.05^*$	$1.08 \pm 0.03^{\Delta}$
Rn30	$0.65 \pm 0.02^*$	$1.23 \pm 0.02^{\Delta}$

注:  $\Delta$ ,  $\rho^-$  HBE 与  $\rho^+$  HBE 相比  $p < 0.05$ ; \*, 与对照组相比  $p < 0.05$ 。

Note:  $\Delta$ ,  $\rho^-$  HBE vs.  $\rho^+$  HBE,  $p < 0.05$ ; \*,  $\rho^-$  HBE vs. control group,  $p < 0.05$ 。

### 2.2 氡及其子体照射对 HBE 细胞凋亡的影响

从图 1 可见,与假照射对照组相比较,氡照射组  $\rho^+$  和  $\rho^-$  HBE 细胞的总凋亡率均显著升高。而与同剂量的  $\rho^+$  HBE 细胞相比,  $\rho^-$  HBE 细胞的总凋亡率明显减少。说明经氡及子体照射后线粒体减少 HBE 细胞的凋亡相对同剂量的  $\rho^+$  HBE 细胞有显著性的减少,这与氡及子体照射提高  $\rho^-$  HBE 细胞增殖能力的结果一致。

### 2.3 氡及子体照射对 HBE 细胞线粒体膜电位的影响

从图 2 可见,与假照射对照组相比较,氡照射组  $\rho^-$  HBE 细胞的膜电位均显著性下降。在  $\rho^+$  HBE 细胞中,低剂量染氡组与对照组相比膜电位无明显

改变，但高剂量染氡组膜电位显著性下降。与相同剂量的  $\rho^+$ HBE 细胞相比， $\rho^-$ HBE 细胞的膜电位均明显减少。说明氡及其子体照射使线粒体减少 HBE 细胞的线粒体膜电位下降。

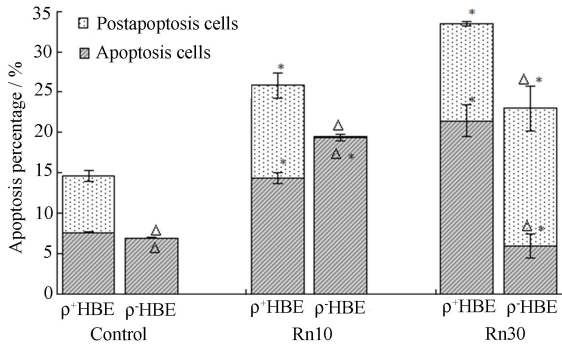


图1 氡及其子体照射对 HBE 细胞凋亡的影响  
 $\Delta$ ,  $\rho^-$ HBE 与  $\rho^+$ HBE 相比  $p < 0.05$ ; \*, 与对照组相比  $p < 0.05$   
**Fig.1** Effects of radon and its progeny on the apoptosis of  $\rho^+$ HBE and  $\rho^-$ HBE cells:  $\Delta$ ,  $\rho^-$ HBE vs.  $\rho^+$ HBE,  $p < 0.05$ ; \*,  $\rho^-$ HBE vs. control group,  $p < 0.05$

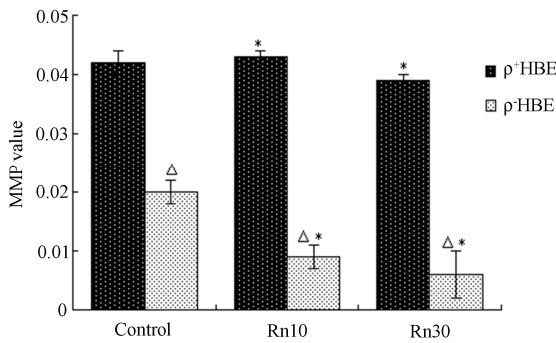


图2 氡及其子体照射对 HBE 细胞线粒体膜电位的影响  
 $\Delta$ ,  $\rho^-$ HBE 与  $\rho^+$ HBE 相比  $p < 0.05$ ; \*, 与对照组相比  $p < 0.05$   
**Fig.2** Effects of radon and its progeny on the membrane potential of mitochondria in  $\rho^+$ HBE and  $\rho^-$ HBE cells  
 $\Delta$ ,  $\rho^-$ HBE vs.  $\rho^+$ HBE,  $p < 0.05$ ; \*, vs. control group,  $p < 0.05$

### 3 讨论

氡的半衰期仅为 3.824 d，衰变后可产生一系列的氡子体，氡及其子体对健康的主要危害在于其发射的高能量  $\alpha$  粒子，吸入体内后可对支气管和肺细胞形成高 LET 照射，诱发支气管上皮细胞恶性转化，从而导致肺癌的发生<sup>[8]</sup>。最近有实验表明，线粒体在  $\alpha$  粒子辐射旁效应的调节中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。线粒体 DNA (mtDNA) 是细胞内唯一的核外遗传物质，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的作用<sup>[9]</sup>。而且线粒体的基因结构全部是外显子，无内含子，故 mtDNA 较细

胞核 DNA 更易发生突变，其突变率高于核 DNA 的 10-20 倍<sup>[1]</sup>。mtDNA 序列微小的改变即可涉及重要结构基因的变化，导致线粒体功能障碍<sup>[10-11]</sup>。目前认为肿瘤的生物学特征与核外的线粒体 DNA 有密切的关系，mtDNA 在数量和序列上的变化，以及与核内 DNA 的整合可能是肿瘤发生的重要基础。

本实验发现， $\rho^+$ HBE 细胞随着氡暴露次数的增多，存活分数明显下降，而  $\rho^-$ HBE 细胞的存活分数随着氡照射剂量的增加而升高 ( $p < 0.05$ , 表 1)。在相同的照射剂量下， $\rho^-$ HBE 细胞的存活分数显著高于  $\rho^+$ HBE 细胞。结果提示，氡及其子体照射提高了  $\rho^-$ HBE 细胞的增殖能力。这可能由于  $\rho^-$ HBE 细胞的线粒体 DNA 减少后更易受到氡及其子体的照射，导致基因组不稳定性增加，并有可能进一步促进细胞发生恶性转化。

线粒体在诱导细胞凋亡中起着关键作用<sup>[12]</sup>。mtDNA 减少，一方面削弱有氧呼吸功能，使 ATP 合成减少；另一方面活性氧生成增加；另外，也影响线粒体的其他功能如膜电位变化等。以上三方面都与细胞凋亡相关。李红霞等<sup>[13]</sup>研究认为 mtDNA 突变时线粒体功能异常，释放的激活凋亡诱导因子 Caspase3 家族蛋白酶和细胞色素 C 等减少，细胞凋亡机制受阻，而且活性氧可引起 Bcl-2 的过表达发挥抗凋亡作用。Yoneda 等<sup>[14]</sup>发现线粒体缺乏细胞株对细胞凋亡具有显著的抵抗力。本实验也发现，各剂量组  $\rho^-$ HBE 细胞的凋亡率显著低于  $\rho^+$ HBE 细胞，与 Tang 等的报道相一致<sup>[15]</sup>。虽然  $\rho^-$ HBE 细胞在氡照射后，细胞早期的凋亡率有所升高，但是其总凋亡率仍然明显低于相同剂量的  $\rho^+$ HBE 细胞。结果提示，经氡及其子体照射后线粒体减少 HBE 细胞的凋亡相对同剂量的  $\rho^+$ HBE 细胞有显著性的减少，这与其增加  $\rho^-$ HBE 细胞增殖能力的结果一致，可能是由于  $\rho^-$ HBE 细胞的线粒体 DNA 减少和氡及其子体照射引起的。线粒体膜电位是线粒体电化学电势梯度的主要构成成分，反映线粒体内膜的结构状态，是维持线粒体内膜完整性的一个重要指标，也是反映细胞早期凋亡的标志之一<sup>[16]</sup>。线粒体膜电位降低可使线粒体内促凋亡蛋白细胞色素 C，凋亡诱导因子和核酸内切酶等从开放的膜孔释放到细胞质中，从而促进细胞凋亡。在肿瘤细胞中，线粒体膜电位一般处于较高的水平，这是由于线粒体基因表达增强所引起的细胞凋亡减少，从而促进细胞发生转化和过度增殖<sup>[17]</sup>，本实验结果显示，无论是假照射还是氡

照射组,  $\rho^-$ HBE 细胞的线粒体膜电位均显著低于  $\rho^+$ HBE 细胞, 而且  $\rho^-$ HBE 细胞的线粒体膜电位随着氦照射剂量的增加而有显著性降低, 这与氦及子体照射减少  $\rho^-$ HBE 细胞的凋亡结果一致。

大片的 DNA 缺失型线粒体相对野生型线粒体而言, 复制速度加快, 这可能是线粒体基因组不稳定的主要原因之一<sup>[18]</sup>。mtDNA 的片段缺失或拷贝数的减少, 均可能造成能量生成和线粒体膜内外分子运输的障碍, 甚至影响细胞的凋亡过程。但有关 mtDNA 与放射诱导的细胞凋亡直接关系的研究还很少, 本研究表明了 mtDNA 可能在氦及子体致人支气管上皮细胞发生恶性转化中起到重要作用, 为后续的研究起到良好的开端作用。

总之, 氦及子体照射后引起线粒体减少 HBE 细胞的增殖能力提高, 而细胞凋亡减少, 这与线粒体膜电位的变化有关。

#### 参考文献

- Heddi A, Stepien G, Benke P J, *et al.* Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial diseases patients [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(33): 22968-22976.
- Hofmann W, Crawford-Brown D J, Fakir H, *et al.* Modeling lung cancer incidence in rats following exposure to radon progeny [J]. *Radiation Protection Dosimetry*, 2006, **122**(1-4): 345-348.
- Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal M J, *et al.* Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1997, **20**(5): 674-680.
- Zhou H, Ivanov V N, Lien Y C, *et al.* Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects [J]. *Cancer Research*, 2008, **68**(7): 2233-2240.
- Hei T K, Zhou H, Ivanov V N, *et al.* Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model [J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008, **60**(8): 943-950.
- Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. *Science*, 1956, **123**(3191): 309-314.
- 尉红, 薛莲, 李冰燕, 等. 线粒体 DNA 拷贝量降低诱发人支气管上皮细胞钙信号失调 [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012, **34**(12): 1220-1225.
- WEI Hong, XUE Lian, LI Bingyan, *et al.* The effects of mitochondrial DNA depletion in human bronchial epithelial line on calcium homeostasis [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012, **34**(12): 1220-1225.
- IPCS. Environmental Health Criteria 211. Health Effects of Interactions Between Tobacco Use and Exposure to Other Agents [M]. World Health Organization. 1999: 57.
- Taylor R W, Turnbull D M. Mitochondrial DNA mutation in human disease [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, **6**(5): 389-402.
- King M P, Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA [J]. *Cell*, 1988, **52**(6): 811-819.
- Bartnik E, Lorenc A, Mroczek K. Human mitochondrial in health, disease, ageing and cancer [J]. *Journal Applied Genetics*, 2001, **42**(1): 65-71.
- 蔡黔, 肖光夏, 于晟. 线粒体在细胞凋亡中的作用研究进展 [J]. *西北国防医学杂志*, 2002, **23**(5): 367-369.
- CAI Qian, XIAO Guangxia, YU Sheng. Role of mitochondria in apoptosis [J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*, 2002, **23**(5): 367-369.
- 李红霞, 李春海. 妇科肿瘤组织中细胞凋亡相关基因表达及其与 mtDNA 突变相关性的研究 [J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2003, **11**(01): 34-36.
- LI Hongxia, LI Chunhai. Apoptosis gene expression and their relationship to mtDNA mutation in tumor tissues of gynecologic oncology patients [J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2003, **11**(01): 34-36.
- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, *et al.* Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome [J]. *Biochemical, and Biophysical Research Communications*, 1995, **209**(2): 723-729.
- Simone F. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer [J]. *International Journal of Cell Biology*, 2010, **10**(1155): 1-6.
- Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, **281**(5381): 1309-1312.
- Wang J, Silva J P, Gustafsson C M, *et al.* Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**(7): 4038-4043.
- Bianchi N O, Bianchi M S, Richard S M. Mitochondrial genome instability in human cancers [J]. *Mutation Research*, 2001, **488**(1): 9-23.

## **Role of mitochondrial DNA decrease in apoptosis of human bronchial epithelial cells induced by radon and its progeny**

WANG Weipeng SUN Jing CHEN Yuzhi LI Bingyan TONG Jian

*(Department of Health Toxicology, School of Radiation Medicine and Public Health,  
Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)*

**ABSTRACT** Human bronchia epithelia with mtDNA decrease ( $\rho^-$  HBE) cells generated by treatment of ethidium bromide (EB) were exposed to radon gas in a special inhalation chamber. Cell proliferation was determined by cell survival assay. Cell apoptosis and membrane potential of mitochondria were analyzed by flow cytometry. The results showed that the survival fraction of  $\rho^-$  HBE cells significantly increased compared with that of  $\rho^+$  HBE cells after irradiation with radon and its progeny. Although the apoptosis rate of  $\rho^-$  HBE cells was lower than that of the  $\rho^+$  HBE cells at early period, the total apoptosis rate was increased, along with the membrane potential decrease of mitochondria in  $\rho^-$  HBE cells. The results indicate that the increased potential of  $\rho^-$  HBE proliferation correlates with the total apoptotic rate and mitochondrial membrane potential.

**KEYWORDS** Mitochondrial DNA, Radon and its progeny, Human bronchial epithelial cells, Apoptosis, Cell proliferation

**CLC** R146