

## 亚硒酸钠诱导 SW480 细胞凋亡过程中活性氧的作用

王海涛<sup>1</sup>, 杨祥良<sup>1</sup>, 张智红<sup>2</sup>, 陆锦玲<sup>2</sup>, 徐辉碧<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学化学系; 2. 生物医学光子学研究所, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 为探讨亚硒酸钠诱导人结肠癌 SW480 细胞凋亡的机理。将荧光探针 2',7'-二氯荧光黄乙二脂(2',7'-DCFH-DA) 罗丹明 123(rhodamine123) 负载人结肠癌细胞, 利用多光子成像系统测定胞内活性氧(ROS) 线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ ) 的变化。结果发现(1)  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用 SW480 细胞, 可导致细胞凋亡和胞内的 ROS 增加, SOD、过氧化氢酶可降低凋亡率并抑制 ROS 的增加。(2) 线粒体电子传递链抑制剂鱼藤酮及氰化钠可抑制 ROS 增加。(3)  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可导致线粒体的跨膜电位的下降。表明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用细胞可导致来源于线粒体的 ROS 增加, ROS 介导亚硒酸钠诱导细胞凋亡。

**关键词:** 亚硒酸钠; 活性氧; 细胞凋亡; 信号转导

**中图分类号:** Q256 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2002)01-0104-05

大量的体内和体外研究表明, 硒具有明显的抗癌作用。多种硒化合物对一系列的肿瘤细胞和受试动物的肿瘤生长起到抑制作用, 同时可诱导一系列肿瘤细胞凋亡<sup>[1-4]</sup>。

越来越多的研究证明 ROS 为一种新的第二信使, 可介导众多细胞凋亡<sup>[5-8]</sup>。

目前, 硒的抑癌作用研究较多, 但对硒抑癌过程中信号转导机制了解甚少, 硒诱导细胞凋亡过程中胞内 ROS 变化、来源及作用未见报道。为了阐明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导 SW480 细胞凋亡的信号机制, 我们以结肠癌 SW480 细胞为模型, 研究  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用该细胞时胞内 ROS 变化、来源及作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

二甲亚砜(DMSO), 2',7'-二氯荧光黄乙二脂(2',7'-DCFH-DA), rhodamine123, SOD, 过氧化氢酶购于 Sigma 公司, RPMI1640 培养基, 新生小牛血清购于 GBICO 公司, 其余试剂均为国产分析纯。人结肠癌 SW480 细胞株来自武汉大学典型培养物保藏中心。

#### 1.2 细胞培养

将对数生长的 SW480 细胞接种于培养瓶内, 用含 10% 新生小牛血清, 100u/ml 青霉素及 100u/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基于 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  培养。

#### 1.3 细胞凋亡检测<sup>[9]</sup>

一定浓度的亚硒酸钠作用 SW480 细胞, 光镜下

观察细胞形态变化并用 CCD 系统照相。同时将亚硒酸钠作用一定时间的细胞用冷 70% 乙醇处理, 用流式细胞仪(Becton Dickinson) 定量测定细胞凋亡程度。

#### 1.4 细胞内 ROS 的检测<sup>[10-11]</sup>

将对数生长的细胞, 按  $1 \times 10^5/\text{ml}$  接种于 24 孔培养板内, 24 小时后换上含  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的新鲜培养基作用一定时间, 用 DCFH-DA ( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 37°C 孵育 15min, DCFH-DA 进入胞内, 水解生成非荧光的 DCFH, 在 ROS 氧化下生成发荧光的 DCF, 胞内 ROS 变化通过 DCFH-DA 的荧光强度的变化反映。将孵育后的细胞 Hank's 液洗涤 2 次, 将其置于多光子成像系统(BIO-RAD USA) 的倒置显微镜上, 以氩离子激光为光源, 激发波长 488nm, 发射波长为 510nm, 对细胞成像, 胞内荧光强度用 Win-View 32 软件分析。

#### 1.5 细胞线粒体膜电位的检测<sup>[10]</sup>

将对数生长的细胞  $1 \times 10^5/\text{ml}$  接种于 24 孔板内 24 小时后, 用 Hank's 液洗涤 2 次, 与  $5\mu\text{mol}/\text{L}$  的 rhodamine123 于 37°C 孵育细胞 30min, 再用 Hank's 液洗涤 2 次, 置于多光子成像系统的倒置显

收稿日期: 2001-06-09

基金项目: 生物医学光子学教育部重点实验室开放课题资(01)

作者简介: 王海涛, 1965 年生, 博士生, 电话: (027)87543532

通讯作者: 杨祥良, 1967 年生, 博士, 教授, 电话: (027)

87543532, E-mail: y810810@21cn.com.

显微镜上,加入含  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  的 Hank's 液,以氩离子激光为光源,激发波长 488nm,发射波长为 510nm,对细胞进行荧光动态扫描。

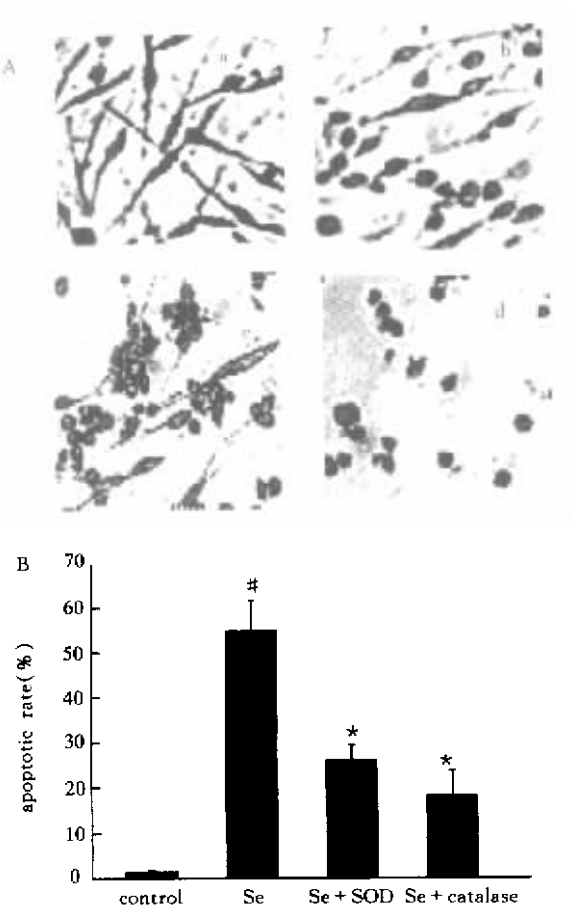
### 1.6 统计与分析

数据以  $\bar{X} \pm \text{SD}$  表示,样本均数比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结 果

### 2.1 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 对细胞的影响

将  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用 SW 480 细胞,相差显微镜下观察到细胞的形态发生明显的变化。如图 1A 所示 (a) 为对照,处理 24 小时 (b),少数细胞变圆,48 小时细胞变圆的数目增多 (c),作用 72 小时,多数细胞悬浮于培养基,出现凋亡特征 (d)。流式细胞仪检测  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用 SW 480 细胞 72



**Fig.1** Morphological changes in SW 480 cells and detection of apoptosis after exposure to  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . A: morphological of SW 480 under phase contrast microscope ( $\times 200$ ). B: apoptotic rate of cells treated with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  in the absence or presence of SOD, catalase., <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs control, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs Se alone. Values are the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ )

小时凋亡率约为 54.8%。如用 SOD ( $250 \text{U/ml}$ ) 过氧化氢酶 ( $500 \text{U/ml}$ ) 预处理 6 小时,再与  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  共孵育 72 小时,凋亡率分别下降到 26.1% 和 18.2% (图 1B)。

### 2.2 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 作用下胞内 ROS 的变化

如图 2A 所示,  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用细胞一定时间。细胞内的 DCF 的荧光强度明显增强,即胞内的 ROS 的产物增加,当  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  刺激达 2 小时,产生的 ROS 量达到最大值,随作用时间的延长,胞内 ROS 的浓度逐渐下降恢复到其本底值 (图 2B)。而细胞经 SOD ( $250 \text{U/ml}$ ) 或过氧化氢酶 ( $500 \text{U/ml}$ ) 预处理 6 小时后 (图 2C),可明显抑制  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导的胞内 ROS 增加。

### 2.3 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 作用下胞内 ROS 的来源

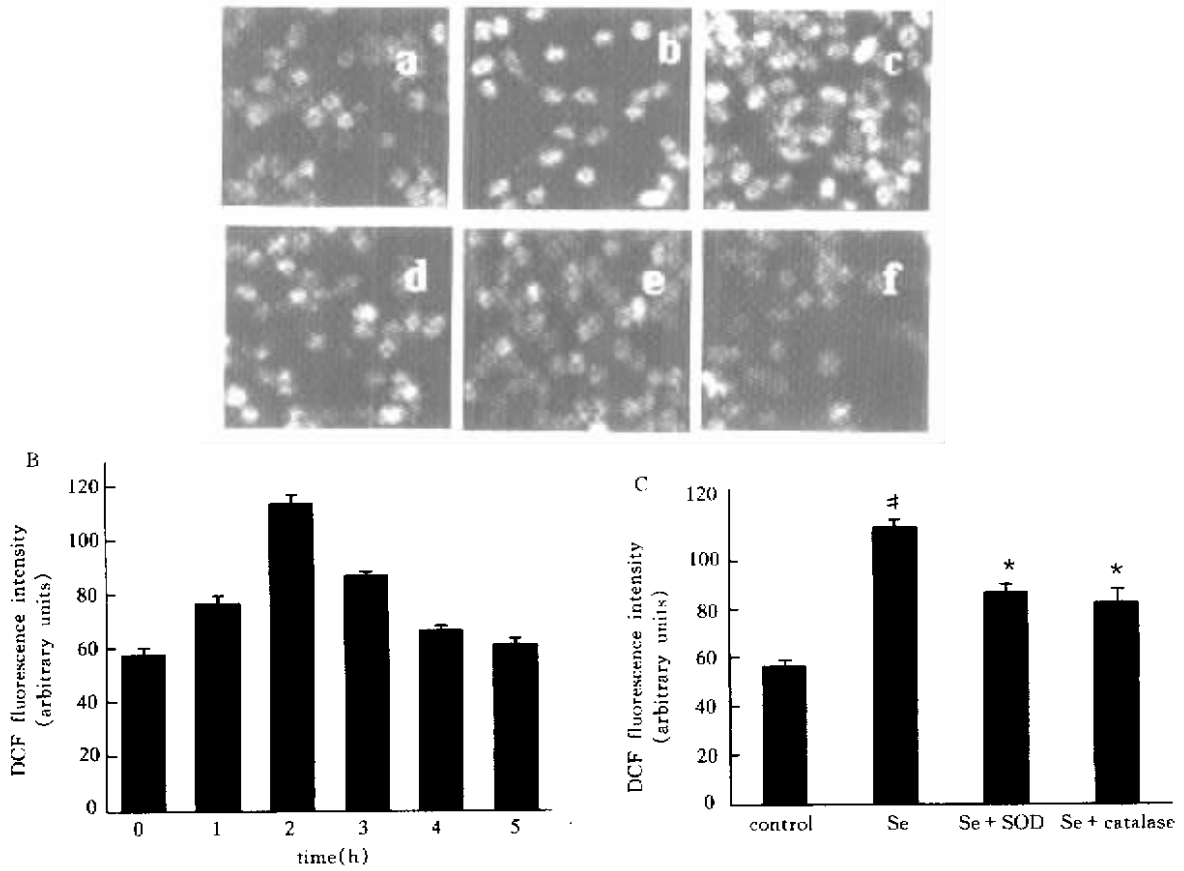
为了确定  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用下胞内 ROS 的来源,将线粒体电子传递链的抑制剂鱼藤酮  $10 \mu\text{mol/L}$  和氰化钠  $1 \text{mmol/L}$  与  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  共同作用细胞,图 3 显示,DCF 的荧光强度明显下降。说明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  作用 SW 480 细胞产生的 ROS 主要来源于线粒体。

### 2.4 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 作用下线粒体膜电位的变化

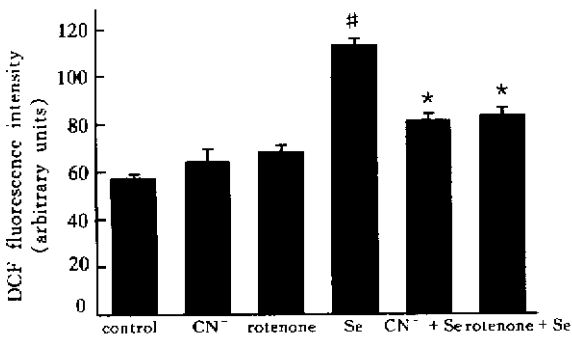
如图 4 所示,随  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  刺激时间增加 rhodamine 123 的荧光强度下降,说明线粒体的膜电位下降,通透性增加。

## 3 讨 论

活性氧 (ROS) 包括过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、超氧阴离子 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 等。由于高活性,过量的活性氧可引起细胞大分子的氧化损伤。但是,最近的研究发现生理水平的 ROS 在某些生理现象的调控中发挥重要的作用,特别是在细胞内信号转导方面。酶及转录因子的激活,基因的表达,凋亡等过程的发生均与活性氧有一定关系<sup>[3]</sup>。因此,ROS 被认为是一种新的第二信使。众多的研究表明胞内 ROS 增加是某些细胞因子如  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$  及化学药物诱导细胞凋亡时的一种共同途径,因此 ROS 在细胞凋亡中的作用越来越引起人们的关注。 $\text{As}_2\text{O}_3$  作为抗白血病的一种有效药物,可诱导胞内 CAT 活性较低的  $\text{NB}_4$  细胞的凋亡,但对胞内含高活性 CAT 的 U 937 白血病细胞作用却不明显<sup>[12]</sup>,证实 ROS 与细胞凋亡密切相关。亚硒酸钠可诱导 A 172 glioma 细胞凋亡<sup>[4]</sup>,该过程被过氧化氢酶抑制。本研究结果表明  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可诱发 SW 480 细胞凋亡及胞内的 ROS 增加, SOD 和过氧化氢酶能抑制凋亡及 ROS 产物增加,说明该凋亡过程为 ROS 所调控。但

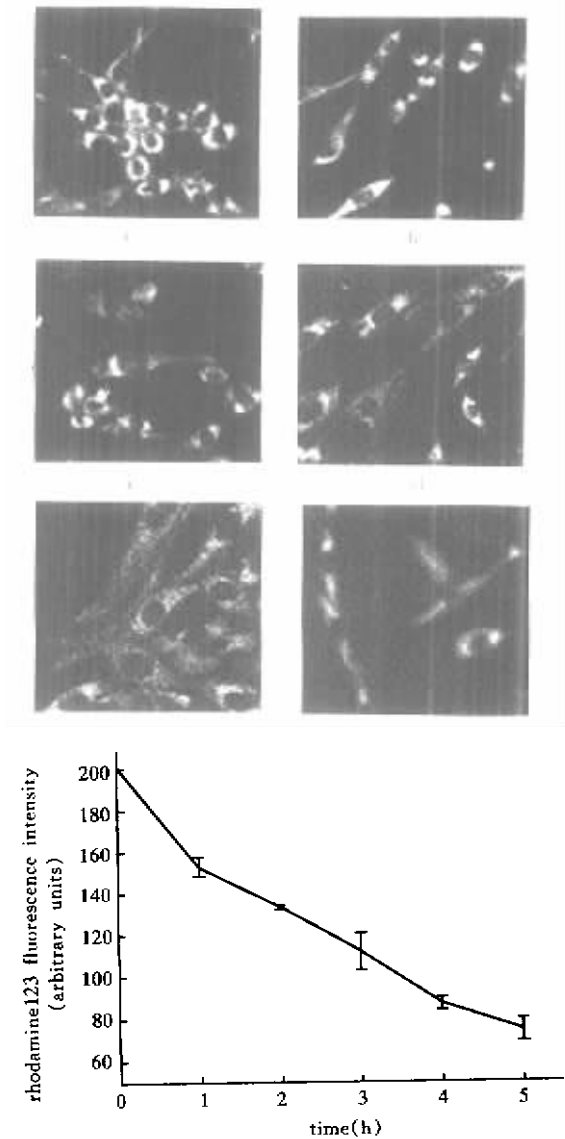


**Fig.2** Time course of ROS production and effect of SOD, catalase on ROS production in  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  -stimulated SW480 cells. A: Cells were exposed to  $50\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  for indicated time and loaded with DCFH - DA, images were collected after cells were exposed to  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  for 0(a), 1(b), 2(c), 3(d), 4(e), 5hr(f). B: relative levels of intracellular DCF fluorescence were determined over time exposed to  $50\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . C treated with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  in the absence or presence of SOD, catalase. Values are the mean  $\pm$  SD of determinations made in three cultures (30~40 cells per culture). <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs control, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs Se alone



**Fig.3** The effect of mitochondrial electron transport inhibitors on  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  -induced DCF fluorescence. Cells were incubated with either  $\text{NaCN}$  or rotenone in the absence or presence of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  for 2h. <sup>\*</sup> $P < 0.01$  vs  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  alone, <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs control. Values are the mean  $\pm$  SD of determinations made in three cultures (30~40 cells per culture)

胞内 ROS 来源于何处?最近研究发现 线粒体在细胞凋亡过程中起到重要的作用,首先线粒体是胞内活性氧的主要来源之一,由于线粒体消耗 90%的生物利用的氧,其中的 2%由于呼吸链电子漏被单电子还原成 ROS;再者线粒体作为胞内重要细胞器,当其膜通透性增加,跨膜电位的下降,造成 ROS 的增加和细胞色素 c 的释放,从而导致凋亡的发生。在我们的实验中,使用电子传递链的抑制剂鱼藤酮(rotenone)及氰化钠( $\text{NaCN}$ )与  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  共同作用细胞时,可抑制 ROS 增加,这表明 ROS 主要来源于线粒体,同时使用  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  导致线粒体  $\Delta\psi_m$  下降也佐证  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导 ROS 产物来源于线粒体。为何  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导 ROS 产物来源于线粒体?我们用胞内钙的荧光探针 fluo - 3/AM 检测到  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  可诱导胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  瞬时上升(结果另文发表),而线粒体的  $\text{Ca}^{2+}$  过载可导致线粒体的去极化,使胞内的 ROS 量



**Fig. 4** Time course of the effects of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  on  $\Delta\Psi_m$  disruption in SW480 cells. Left: Cells were exposed to  $50\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  for indicated time and loaded with rhodamine123, images were collected after cells were exposed to  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  for 0(a), 1(b), 2(c), 3(d), 4(e), 5hr(f). Right: relative levels of intracellular rhodamine123 fluorescence were determined over time exposed to  $50\mu\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Values are the mean  $\pm$ SD of determinations made in three culture (20 cells per culture)

增多<sup>[14]</sup>。因此  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  诱导胞内 ROS 的升高可能途径是  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高导致线粒体钙过载,使  $\Delta\Psi_m$  下降,导致 ROS 增加,但此过程须进一步被验证。

综上所述,细胞内 ROS 在  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  抗肿瘤过程中可能发挥重要的第二信使作用,调控细胞凋亡。

### 参考文献:

- [1] Ronai Z, Tillotson JK, Traganos F, et al. Effects of organic and inorganic selenium compounds on rat mammary tumor cells[J]. *Int Cancer*, 1995,63(3): 428 - 434.
- [2] 陈道胜, 邓一平, 卢贤瑜. 补硒对小鼠移植瘤生长及淋巴细胞功能的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2000, 25(1): 41 - 43.
- [3] Marjory SS, Randall LD, Lance PW, et al. Induction of differentiation and apoptosis by sodium selenite in human colonic carcinoma cells(HT 29)[J]. *Cancer letters*, 1997, 117:35 - 40.
- [4] Zong JZ, Misko K, Yoshinori I, et al. Apoptosis induced by selenium in human glioma cell lines[J]. *Biol Trace Elem Res*, 1996,54(2):123 - 134.
- [5] 王海涛, 杨祥良, 徐辉碧. 活性氧的信号分子作用[J]. *生命的化学*, 2001, 21(1): 39 - 41.
- [6] Joya C, Afshin S, Sten O. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000,29:323 - 333.
- [7] Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  as common signals for apoptosis induced by gallic acid[J]. *Biochem Pharmacol*, 1998,55(12): 1973 - 1981.
- [8] Clement MV, Pervaiz S. Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis[J]. *Free Radic Res*, 1999,30(4):247 - 252
- [9] Nicoletti G, Migliorati MC, Paglincci F, et al. Rapid and simple methods for increasing thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. *J Immunol Methods*, 1991,139:271 - 279.
- [10] Qing G, Sylvia C, Nic R. Calbindin D28 blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,95(6):3227 - 3232
- [11] Cathart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichloro fluorescein assay[J]. *Anal Biochem*, 1983,134(1): 111 - 116.
- [12] Jing YK, Dai J, Chalmers - Redman RM, et al. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide - dependent pathway[J]. *Blood*, 1999,94(6):2102 - 2111.
- [13] Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging[J]. *Proc Natl Acad USA*, 1994,91(23):10771 - 10778.
- [14] Carriedo SG, Yin HZ, Sensi SL, et al. Rapid  $\text{Ca}^{2+}$  entry through  $\text{Ca}^{2+}$  - permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  rises and consequent oxygen radical production[J]. *J Neurosci*, 1998,18(19): 7727 - 7738.

**EFFECT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON APOPTOSIS  
INDUCED BY  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  IN SW480 CELLS**

WANG Hai-tao<sup>1</sup>, YANG Xiang-liang<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-hong<sup>2</sup>, LU Jing-ling<sup>2</sup>, XU Hui-bi<sup>1</sup>  
(1. Department of Chemistry, 2. Institute of Biomedical Photonics, University of Science & Technology,  
Hubei, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** To investigate the mechanism of apoptosis induced by sodium selenite in a human colonic cancer cell line SW480. SW480 cells were loaded with fluorescent probes 2', 7' - DCFH - DA, and rhodamine123, respectively. The changes of intracellular ROS, and mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was detected by using multiphoton imaging system. The results showed that (1)  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  elevated SW480 cells apoptotic rate and intracellular ROS; SOD, catalase evidently suppressed ROS increase and reduced apoptotic rate, (2) Inhibition of mitochondrial electron transport with NaCN or rotenone almost blocked selenite - induced ROS production, (3)  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  induced disruption of the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). The data suggest that  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  results in the increase intracellular ROS which originates from mitochondria and mediates  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  - induced apoptosis.

**Key Words :** Sodium selenite; ROS; Apoptosis; Signal transduction