

百草枯对人肝 HepG2 细胞生长和周期的影响

唐超智, 张玉玲, 王文晟

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:为全面理解百草枯(PQ)对人肝的毒性效应,寻找新的方法增强肝对PQ的解毒能力,本文采用显微观察和流式细胞术分析了PQ处理24 h对人肝 HepG2 细胞生长和周期的影响.结果显示,7.21 mg/L 的PQ处理即可抑制部分 HepG2 细胞的生长,23.36 mg/L 的PQ可导致 HepG2 细胞周期停滞,S期细胞明显减少,G1和G2期细胞明显增多,且细胞生长抑制和周期受阻程度与PQ处理浓度呈正相关.该结果表明,PQ对 HepG2 细胞的生长和周期具有明显阻滞作用,生长因子类或促增殖类药物可能有助于增强人肝对PQ的解毒能力.

关键词:百草枯; HepG2; 细胞生长; 细胞周期

中图分类号:R994.6

文献标志码:A

百草枯(paraquat, PQ)是一种水溶型快速灭生性除草剂,因其易于被土壤吸附、在环境中残留量相对较低和具有良好的除草效果,PQ先后在全球120多个国家60多种作物中被广泛使用^[1].但自1962年注册生产以来,PQ已经引起了严重的公共健康问题,由PQ导致的自杀、谋杀、误服以及生产和使用接触的死亡事件时有发生报道,而目前仍没有良好的治疗策略和高效的解毒剂^[2-4].

通过对大量PQ中毒病人、死者和实验处理动物进行研究,人们发现体内蓄积的PQ主要存在于肺^[5-8],而肾作为水溶物质的排泄器官,其在PQ中毒之后发生的变化也备受关注^[9-10].此外,近年来的慢性毒性实验发现,PQ引起的部分病理特征与一些衰老疾病症状相似,随之PQ的神经毒性也被广泛探讨^[11-12].但PQ中毒对肝的影响尚未受到足够的关注.肝是机体最重要的解毒器官,在降解外源毒物的过程中发挥着举足轻重的作用,解析人肝细胞在PQ处理后发生的变化,不仅有助于更全面理解PQ对人体的毒性,也对寻求新的方法增强肝对PQ的解毒能力具有重要意义.为此,本研究以人肝 HepG2 细胞为实验材料,采用显微观察和双色流式细胞术分别检测了PQ对 HepG2 细胞生长和周期的影响.

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

所用人肝 HepG2 细胞株获赠于郑州大学第五附属医院.细胞培养用15和50 mL离心管、100×20 mm单孔培养板均购自美国 Corning 公司(430790、430828、430167).

PQ购自美国 Chem Service 公司(1910-42-5),以去离子水溶解备用.胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青公司(2104).DMEM(dulbecco's modified eagle medium)细胞培养液购自美国 Hyclone 公司(30022.01B),本研究常规培养细胞用的培养液为90% DMEM+10% FBS的混合液.0.25%胰酶购自美国 Life Technologies 公司(15050-057).二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Amresco 公司(D8370).溴脱氧尿苷(bromode-oxyuridine, BrdU)购自武汉博士德生物工程有限公司(ED1100).FITC标记的抗BrdU荧光抗体购自美国 eBioscience 公司(11-5071).碘化丙啶(propidium iodide PI)购自成都贝斯特试剂有限公司(BRS011008).RNase 购自北京康为世纪生物科技有限公司(CW0612).其他常规耗材和

收稿日期:2015-07-20;修回日期:2015-10-12.

基金项目:国家自然科学基金(31170733);河南师范大学博士科研启动基金.

第1作者简介(通信作者):唐超智(1980-),男,河南潢川人,河南师范大学副教授,博士,主要从事病理学和毒理学研究,
E-mail:041128@htu.cn.

试剂均由河南师范大学生命科学学院实验办公室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养和传代人肝 HepG2 细胞以 100 mm×20 mm 单孔培养板培养,CO₂ 培养箱内(Heal Force, HF90)温度为 37 ℃,CO₂ 含量为 5%,箱底层存 300 mL 灭菌去离子水保持湿度.细胞传代主要操作为:CO₂ 培养箱内取出培养板,PBS 洗 3 次;胰酶 37 ℃消化 5 min,PBS 终止;细胞悬液移入离心管,1 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清,收集细胞;新鲜培养液悬浮细胞,吸取细胞悬液转移入新的培养板;轻轻晃动培养板数次使 HepG2 细胞均匀铺布板底面,做好标记后置于 CO₂ 培养箱内继续培养。

1.2.2 PQ 对 HepG2 细胞生长的影响

细胞传代培养 6 h 后,可全部贴壁良好.选取平行传代的细胞分成 6 组,按终浓度 0(正常组)、7.21、10.67、15.78、23.36 和 34.57 mg/L 加入 PQ 处理 24 h,每个质量浓度组设 3 个重复.数码倒置显微镜(Leica, DMIL LED fluo)下观察细胞生长状况、照相。

1.2.3 PQ 对 HepG2 细胞周期的影响

采用 BrdU 和 PI 双色流式细胞术^[13]检测,操作如下:将 HepG2 细胞分成 0(双阴性对照组)、0(FITC 单阳性对照组)、0(PI 单阳性对照组)、0(正常组)、7.21、10.67、15.78、23.36、34.57 mg/L 的 PQ 处理组,以 PQ 处理 24 h;加入 BrdU(终浓度为 30 μM),5% CO₂、37 ℃培养箱内孵育 45 min;消化、收集细胞后,以 300 μL PBS 悬浮;滴加-20 ℃预冷的无水乙醇 700 μL;离心弃上清,PBS 洗 1 遍,以 1 mL 2M 盐酸轻轻悬浮细胞,静置 30 min;加入 1 mL 0.1 M pH 8.5 的硼酸钠室温反应 2 min,离心弃上清;1 mL PBS 洗 1 遍,加入 10 μL 以 PBS 稀释 10 倍的 FITC 标记的抗 BrdU 荧光抗体(双阴性和 PI 单阳性对照组以 PBS 代替 FITC 标记抗体),37 ℃孵育 60 min;加入 20 μg/mL 的 PI 染液(双阴性和 FITC 单阳性对照组以 PBS 代替 PI)和 10 μg/mL 的 RNase 混合液 1 mL,室温孵育 30 min;转移细胞混合液至流式检测专用样品管,流式细胞仪(BD, FACS Verse™)检测,BD FACSuite 软件分析、记录数据并生成散点图,所得数据以 Excel 2007 作图。

2 结果

2.1 PQ 对 HepG2 细胞生长的影响

各实验组细胞生长状况如图 1 所示,细胞的形态特征描述如下:

(1) 正常组(图 1-a),全部细胞贴壁牢固,细胞排列十分紧密,胞间距较小且均匀,细胞形状饱满,以三角形或楔形为主,细胞及培养介质的透明度均很好.表明全部细胞生长状况良好。

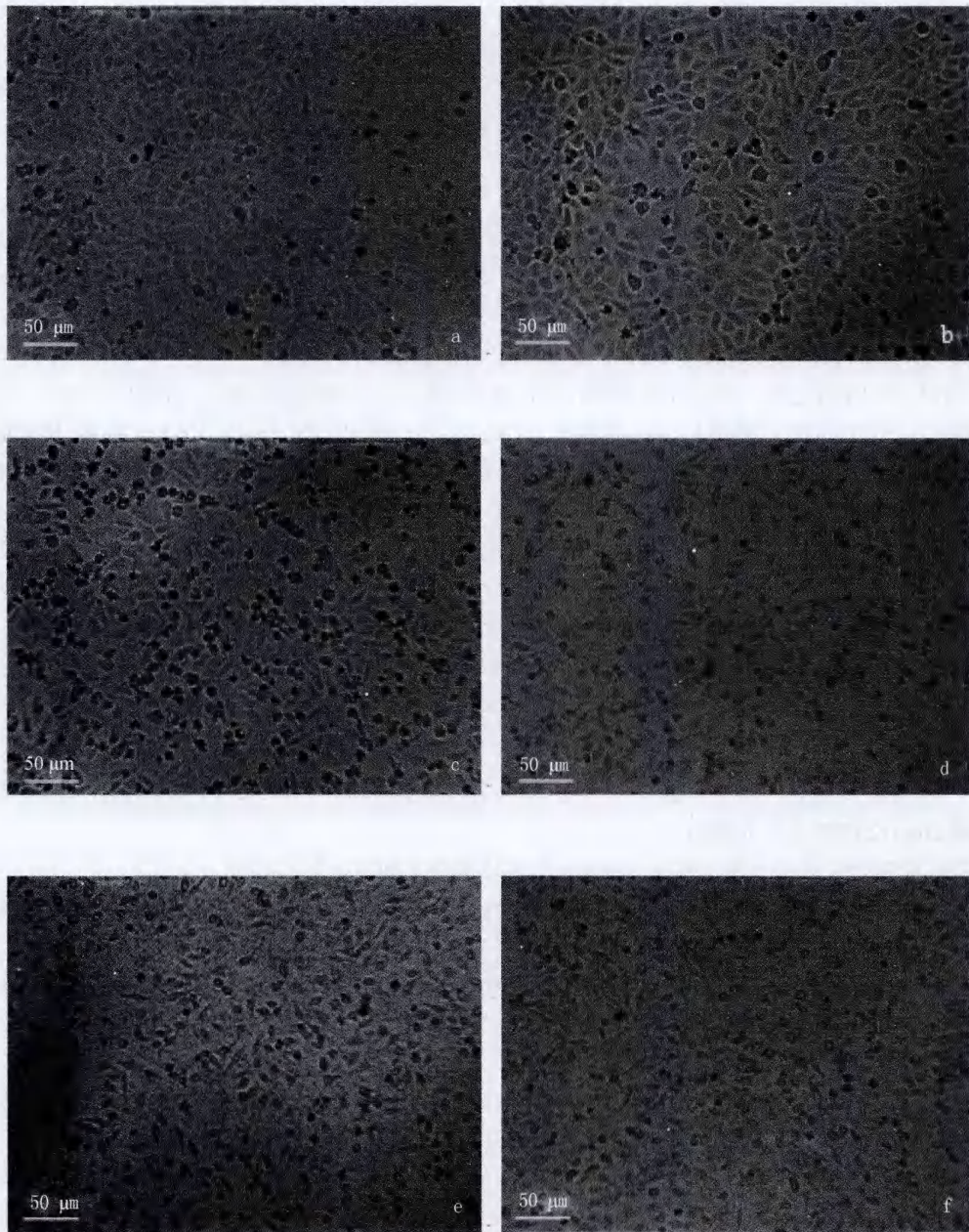
(2) 7.21 mg/L PQ 处理组(图 1-b),全部细胞贴壁牢固,细胞排列相对紧密,局部细胞的胞间距略大,细胞形状基本饱满,仍以楔形和三角形居多,但个别演变为梭形,细胞及培养介质透明.表明细胞生长状况整体良好,但个别细胞生长状况开始下降。

(3) 10.67 mg/L PQ 处理组(图 1-c),绝大部分细胞贴壁牢固,细胞排列略显松散但基本整齐有序,胞间距普遍变大,细胞形状多样,楔形、三角形、梭形、圆形及各种过渡形态杂居,细胞及培养介质的透明度略有下降.表明绝大部分细胞生长状况基本正常,但少数细胞生长状况已明显转差。

(4) 15.78 mg/L PQ 处理组(图 1-d),相当多的细胞贴壁不牢固,细胞排列基本保持有序但明显的呈现散乱发展迹象,胞间距普遍较大,细胞形状普遍萎缩变小,大部分呈梭形,少部分为圆形,细胞及培养介质半透明.表明大部分细胞生长基本正常,但相当多的细胞生长状况已明显较差。

(5) 23.36 mg/L PQ 处理组(图 1-e),仅少部分细胞贴壁牢固,细胞排列规律性较差、相对比较散乱,胞间距无规律性,细胞形状萎缩明显,大部分呈圆形,少部分为梭形,细胞及培养介质透明度较差.表明大部分细胞生长状况明显较差。

(6) 34.57 mg/L PQ 处理组(图 1-f),仅少数细胞贴壁牢固,细胞排列整体散乱无规律,胞间距无规律性,绝大部分细胞形状明显成圆形,仅少数细胞为梭形,细胞及培养介质浑浊.表明绝大部分细胞生长状况较差。



a 正常组;b~f 7.21、10.67、15.78、23.36和34.57 mg/L的PQ处理组

图1 PQ对HepG2细胞生长的影响

2.2 PQ对HepG2细胞周期的影响

结果记录于图2和3.图2为双阴性对照组、FITC单阳性对照组、PI单阳性对照组以及0(正常组)、7.21、10.67、15.78、23.36和34.57 mg/L的PQ处理组共9组HepG2细胞的双色流式散点图,图3为6个PQ实验组不同亚群细胞平均数量比率的统计分析.

由于非特异性吸附现象难免存在,若对 P1 细胞群直接分析,假阳性现象可能严重干扰结果.此外,PQ 处理可能导致少数细胞发生病理学变化,这些病变细胞的着色也可能偏离理论结果.为减小这些误差,在 P1 细胞群中精选集群较好、分界明显的 P2 区域的细胞进行分析,P2 细胞亚群范围的界定主要依据 FITC 和 PI 与不同周期时相细胞结合的原理进行.

在 P2 亚群细胞的散点图中,UL 和 UR 区域细胞为 FITC 和 PI 均结合的细胞,所以是新合成 DNA 的细胞,即 S 期细胞;LL 区域为不结合 FITC 但结合相对少量 PI 的细胞,所以是约含 2n DNA 且不合成 DNA 的细胞,即 G1/G0 期细胞;LR 区域为不结合 FITC 但结合相对多量 PI 的细胞,所以是约含 4n DNA 且不合成 DNA 的细胞,即 G2/M 期细胞.

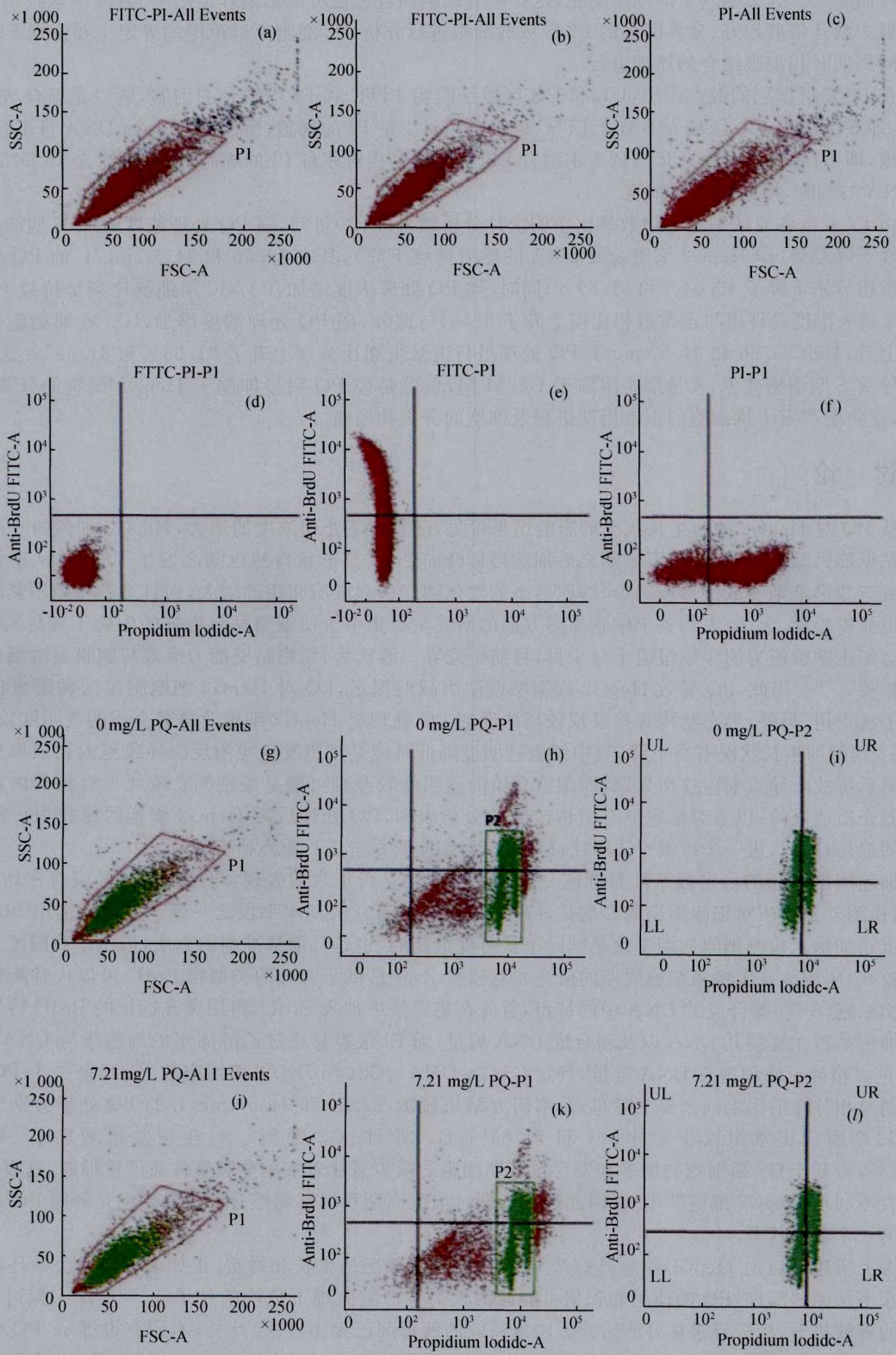
由 P2 亚群各亚区细胞平均数量比率的统计分析结果(图 3)可知,随 PQ 处理浓度增加,S 期细胞比率呈现持续下降趋势(即 HepG2 细胞合成 DNA 的能力持续下降),其中 23.36 和 34.57 mg/L 的 PQ 处理组相对正常组分别下降了 49.04% 和 51.89%;同时,随 PQ 处理浓度增加,G1/G0 期细胞比率呈持续上升趋势,但 PQ 最大浓度处理组与正常组相比仅上升了 9.53%;此外,随 PQ 处理浓度增加,G2/M 期细胞比率明显持续上升,其中 23.36 和 34.57 mg/L PQ 处理组与正常组相比分别上升了 91.56% 和 81.62%.这表明 PQ 处理导致 S 期细胞减少,大量细胞阻滞于 G2/M 期,也就是说 PQ 明显抑制了 HepG2 细胞的分裂和 DNA 合成,这将会严重干扰细胞的正常周期进程及细胞的分裂和增殖.

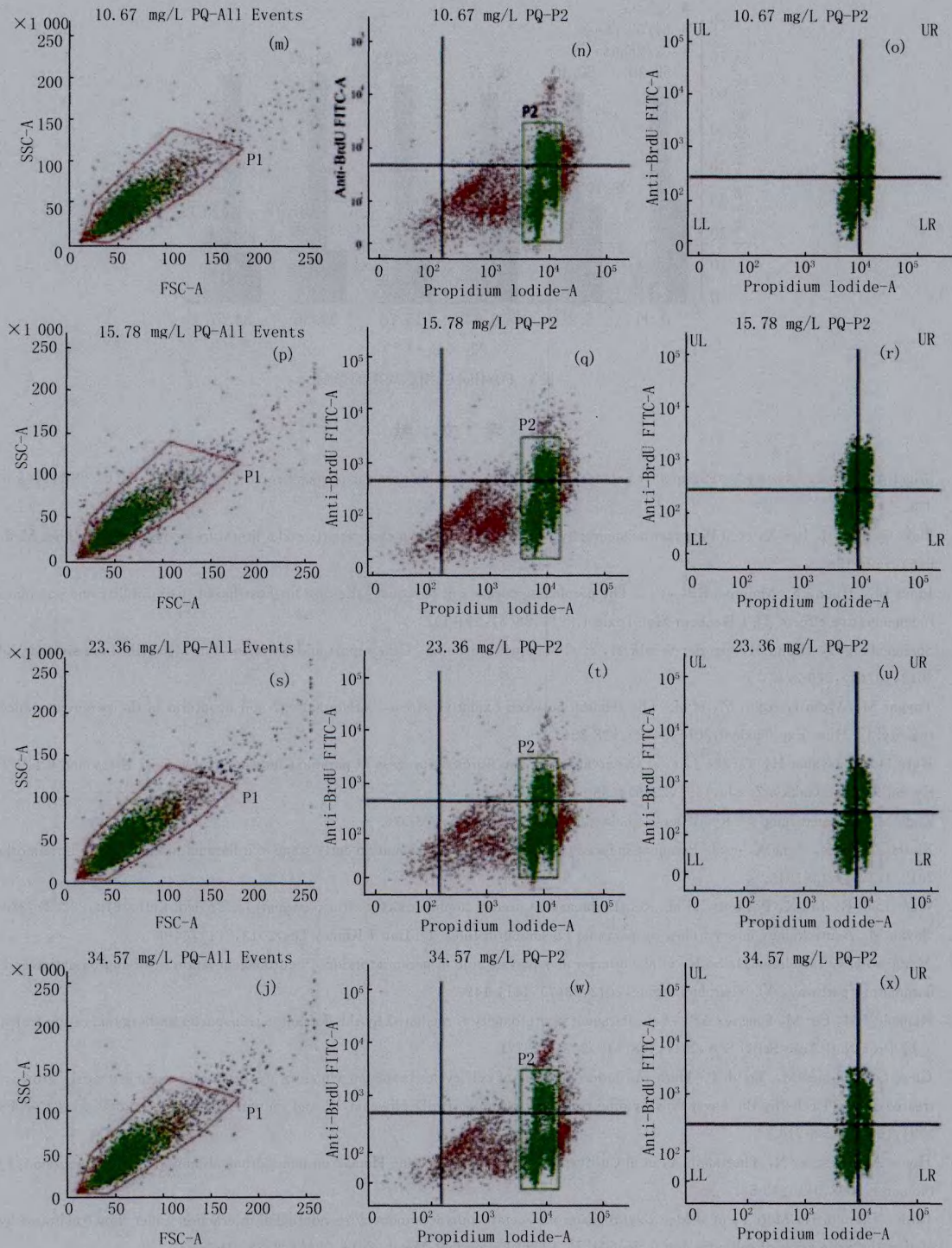
3 讨论

从 PQ 对 HepG2 细胞生长状况的影响结果可见,随着 PQ 处理浓度的增大,HepG2 细胞的一个重要变化是贴壁能力渐渐减弱,贴壁不牢固之后细胞慢慢转向悬浮,其形状自然也随之发生了变化,从正常细胞的楔形或三角形渐渐变成梭形或圆形,细胞形态的变化随之引起细胞间距的增大,而且细胞贴壁不紧时其排列自然也显得松散、无序.人们关于细胞黏附方面的研究主要集中于使细胞黏附增强的生物工程材料开发^[14],而针对细胞贴壁能力的详细报道十分少见,目前研究界一般认为,细胞贴壁能力应该与胞膜黏附蛋白的表达密切相关^[15-16].因此,PQ 导致 HepG2 细胞贴壁能力减弱提示,PQ 对 HepG2 细胞胞膜的黏附蛋白表达可能有干扰作用.另外,形态结构观察发现较高浓度的 PQ 处理组 HepG2 细胞及培养介质的透明度较差,表明 HepG2 细胞的生长状况有所下降,其中细胞透明度降低可能是细胞发生应激反应导致胞内物质聚集或者胞膜转运系统故障导致细胞排泄失调,而细胞介质的透明度较差则可能是细胞凋亡或死亡后将其内容物释放入培养介质造成的.以上对细胞形态结构改变的分析表明,PQ 处理后对 HepG2 细胞的胞膜很可能造成了一定的损伤,因此,进一步检测 PQ 毒性机理时应对细胞膜系统进行重点研究.

细胞周期时相的稳定或紊乱是细胞分裂和增殖活动是否正常的表现,与细胞的生长发育密切相关^[17],因此,检测外源物质对细胞周期的影响是毒理学和药理学研究的基本手段之一^[18-19].本文选用 BrdU 和 PI 双色流式细胞术检测细胞周期变化是国际上认可度最高的、也是目前最准确的方法,但由于我国流式细胞术起步较晚,应用该技术检测细胞周期的研究相对较少.该法借助于胸苷的类似物 BrdU 可以代替胸苷掺入到复制期细胞(S 期)新合成的 DNA 中的特点,首先在培养液中加入 BrdU,再用荧光标记的 BrdU 特异性抗体检测细胞是否在复制其 DNA 以及新合成 DNA 的量,而 PI 很容易透过乙醇固定的细胞膜与 DNA 结合,故 PI 染色可精确反映细胞总 DNA 含量,判定 G1(2n DNA)、G2(4n DNA)期细胞数^[20].目前关于 PQ 对人细胞周期时相分布的影响尚未见文献报道.本研究结果显示,23.36 和 34.57 mg/L 的 PQ 处理分别导致 S 期 HepG2 细胞比正常组减少了 49.04 和 51.89%,G2 期 HepG2 细胞(4n)比正常组增加了 91.56% 和 81.62%,阻断于 G2 期细胞的增多和发育至 S 期细胞的减少意味着细胞分裂事件被严重抑制,这表明 PQ 处理大大不利于 HepG2 细胞的增殖,因此进一步探讨细胞周期和增殖调控分子的变化将是解明 PQ 毒性分子机制的一个重要任务.

综上所述,PQ 对 HepG2 细胞具有严重毒性,会抑制细胞的生长和增殖.正如多年以来公共环境卫生评估专家所预测的那样,PQ 的使用和积累可能已为人类生命健康埋下危险的种子^[2-4, 21],深入探讨 PQ 对人细胞的毒性机理、积极寻求良好的治疗方法或高效的解毒剂已刻不容缓.此外,本研究也提示,PQ 中毒难以治疗的原因可能与肝细胞的生长和增殖抑制有关,具肝细胞活化功能的生长因子或促细胞增殖类药物可能对 PQ 中毒有积极疗效.





a、b、c、g、j、m、p、s和v分别表示双阴性对照组、FITC单阳对照组、PI单阳对照组、正常组和7.21、10.67、15.78、23.36、34.57 mg/L的PQ处理组HepG2细胞的FSC和SSC分布，P1为主要细胞群；d、e和f分别表示双阴性对照组、FITC单阳对照组和PI单阳对照组P1细胞群结合FITC或PI的情况，用于划出双阴、双阳和单阳的十字门分界线；h、k、n、q、t和w分别表示正常组和7.21、10.67、15.78、23.36、34.57 mg/L的PQ处理组细胞P1细胞群与FITC和PI的结合情况，选取S、G1/G0、G2/M各期细胞密集且分界明显的区域作为P2细胞群；i、l、o、r、u和x分别表示正常组和7.21、10.67、15.78、23.36、34.57 mg/L的PQ处理组细胞P2细胞群与FITC和PI的结合情况，用于统计P2细胞群中S、G1/G0、G2/M各期细胞的数量。

图2 PQ对HepG2细胞周期的影响(流式细胞仪检测图)

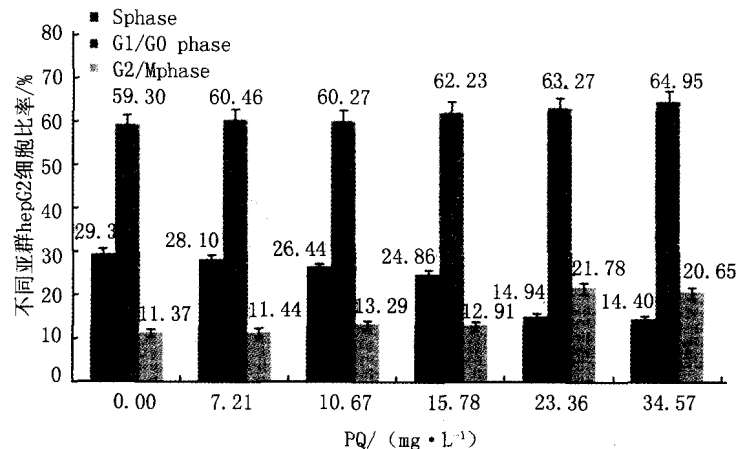


图3 PQ对HepG2细胞周期的影响

参 考 文 献

- [1] Szigeti Z, Rácz I, Lásztity D. Paraquat resistance of weeds-the case of *Conyza canadensis* Cronq[J]. *Z Naturforsch C*,2001,56(5-6):319-328.
- [2] Zhou Q, Kan B, Jian X, et al Paraquat poisoning by skin absorption; Two case reports and a literature review[J]. *Exp Ther Med*,2013,6(6):1504-1506.
- [3] Jones BC, Huang X, Mailman RB, et al. The perplexing paradox of paraquat; the case for host-based susceptibility and postulated neurodegenerative effects[J]. *J Biochem Mol Toxicol*,2014,28(5):191-197.
- [4] Spangenberg T, Grahn H, van der Schalk H, et al paraquat poisoning; Case report and overview[J]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*,2012,107(4):270-274.
- [5] Toygar M, Aydin I, Agilli M, et al. The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity[J]. *Hum Exp Toxicol*,2015,34(2):198-204.
- [6] Hara H, Yoneyama H, Tanabe J, et al Observations of the fibrosing process in paraquat lung injury by chest X-ray and CT[J]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*,1991,29(5):638-643.
- [7] Kado M. Paraquat lung[J]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*,1994(3):573-576.
- [8] Xie H, Wang R, Tang X, et al. Paraquat-induced pulmonary fibrosis starts at an early stage of inflammation in rats[J]. *Immunotherapy*,2012,4(12):1809-1815.
- [9] Wunnakup K, Liu X, Peake P, et al. Renal biomarkers predict nephrotoxicity after paraquat[J]. *Toxicol Lett*,2013,222(3):280-288.
- [10] Pavan M. Acute kidney injury following paraquat poisoning in India[J]. *Iran J Kidney Dis*,2013,7(1):64-66
- [11] Mangano EN, Littelljohn D, So R, et al. Interferon- γ plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways[J]. *Neurobiol Aging*,2012,33(7):1411-1426.
- [12] Rappold PM, Cui M, Chesser AS, et al. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(51):20766-20771.
- [13] Giese G, Kubbies M, Traub P. High resolution analysis of cell cycle-correlated vimentin expression in asynchronously grown, TPA-treated MPC-11 cells by the novel flow cytometric multiparameter BrdU-Hoechst/PI and immunolabeling technique[J]. *J Cell Physiol*,1994,161(2):209-216.
- [14] Hoess A, Teuscher N, Thormann A, et al Cultivation of hepatoma cell line HepG2 on nanoporous aluminum oxide membranes[J]. *Acta Biomater*,2007,3(1):43-50.
- [15] Ito F, Tatsumi H, Mori T, et al Medroxyprogesterone acetate enhances monocyte-endothelial interaction under flow conditions by stimulating the expression of cell adhesion molecules[J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2014,99(6):2188-2197.
- [16] Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. In vitro cell migration and invasion assays[J]. *Mutat Res*,2013,752(1):10-24.
- [17] Sablowski R, Carnier Dornelas M. Interplay between cell growth and cell cycle in plants[J]. *J Exp Bot*,2014,65(10):2703-2714.
- [18] Pena L B, Barcia R A, Azpilicueta C E, et al. Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings[J]. *Plant Sci*,2012,196(22):1-7.
- [19] Jarzab A, Grabarska A, Kiełbus M, et al Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells [J]. *Anticancer Res*,2014,34(11):6473-6480.
- [20] Cappella P, Gasparri F, Pulici M, et al A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by

classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining[J]. *Cytometry A*, 2008, 73(7): 626-636.

- [21] Kang C, Kim S C, Lee S H, et al Absolute lymphocyte count as a predictor of mortality in emergency department patients with paraquat poisoning[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78160.

Effects of Paraquat on Growth and Cycle in Human Liver HepG2 Cells

TANG Chaozhi, ZHANG Yuling, WANG Wensheng

(College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: In order to understand comprehensively toxic effect of paraquat (PQ) on human liver and seek a novel therapy for strengthening the detoxification capacity of liver on PQ, this paper analyzed the changes of growth and cycle in human liver HepG2 cells after 24 h-PQ treatment by microscopic observation and flow cytometry. The experimental results showed that the growth of partial HepG2 cells was inhibited after the treatment of 7.21 mg/L PQ. The cycle of HepG2 cells is blocked, the cells in S phrase reduced, while the cells in G1 or G2 phrase increased with the treatment of 23.36 mg/L PQ. And also, there was a positive correlation between the dose of PQ and the inhibition of cell growth and cycle. This results indicated that PQ has evident retardation on the growth and cycle of human liver HepG2 cells, and the drugs of growth or proliferation promoting factor were likely to strengthen the detoxification capacity of liver on PQ.

Keywords: paraquat; HepG2; cell growth; cell cycle