

## 乐果诱导大鼠肝细胞凋亡的分析

刘学忠, 袁 燕, 袁 楷, 卞建春, 刘宗平\*

(扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

**摘要:** 为研究乐果对大鼠肝细胞凋亡的影响, 将 24 只 SD 大鼠分成对照组和 3 个染毒组, 分别按体质量以 0、1、6 和 30 mg · kg<sup>-1</sup> 的剂量灌服乐果, 连续灌服 30 d 后, 观察肝脏组织学和超微结构变化。同时, 通过给大鼠肝细胞培养液中加入乐果(染毒终浓度分别为 0、3、10、30、100 和 300 μmol · L<sup>-1</sup>), 染毒 12、24 h 后, Annexin V/PI 双染法检测肝细胞凋亡率; 分别用 Fluo-2/AM、双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(DCFH-DA)和罗丹明 123 检测细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度、活性氧(ROS)和线粒体膜电位(Δψ<sub>m</sub>)变化。结果表明, 组织学和超微结构检查显示肝细胞脂肪变性、凋亡等。肝细胞染毒 12 和 24 h 后, 细胞凋亡率明显升高, 除 3 μmol · L<sup>-1</sup> 组外, 与对照组相比差异显著(P < 0.05 或 P < 0.01), 且呈时间-剂量效应; 3 μmol · L<sup>-1</sup> 组细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度极显著高于对照组(P < 0.01), 之后随染毒剂量的增加, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度逐渐下降; 细胞内 ROS 水平在 3~100 μmol · L<sup>-1</sup> 范围内随染毒剂量的增大和染毒时间的延长而升高, 而在 300 μmol · L<sup>-1</sup> 组略有下降, 除 3 μmol · L<sup>-1</sup> 组外, 与对照组相比均差异极显著(P < 0.01); Δψ<sub>m</sub> 除 24 h 高剂量染毒组(300 μmol · L<sup>-1</sup>)外均出现持续下降, 30~300 μmol · L<sup>-1</sup> 组均小于对照组(P < 0.01)。本研究表明低剂量乐果染毒可诱导肝细胞发生凋亡, 细胞内 Ca<sup>2+</sup>、ROS 和 Δψ<sub>m</sub> 可能参与了这一过程。

**关键词:** 大鼠; 肝脏; 乐果; 细胞凋亡

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)06-0928-06

### Studies on Hepatic Cell Apoptosis Induced by Dimethoate in Rats

LIU Xue-zhong, YUAN Yan, YUAN Kai, BIAN Jian-chun, LIU Zong-ping\*

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** In order to study the histopathological and ultra-structure changes in hepatic cells, twenty-four SD rats were divided into four groups with one control and three experimental groups; Dimethoate was administrated daily intragastrically to SD rats in four groups with concentration of 0, 1, 6 and 30 mg · kg<sup>-1</sup> body weight respectively. Meanwhile, Dimethoate was added to hepatocyte culture fluid of rats with final concentration of 0, 3, 10, 30, 100 and 300 μmol · L<sup>-1</sup> in each *in vitro* treatment. After 12 and 24 h, apoptosis rate was analyzed by Annexin V/PI method; intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, reactive oxygen species (ROS) and mitochondria membrane potential (Δψ<sub>m</sub>) changes were analyzed by Fluo-2/AM, Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and rhodamine 123 method respectively to study the effects of Dimethoate on liver cell apoptosis. The results showed that adipose degeneration and apoptosis were observed by histopathological and ultra-structure examination. After 12 and 24 h exposure, cell apoptosis rate increased significantly; experimental groups (apart from the group with 3 mmol · L<sup>-1</sup>) had significant (P < 0.05 or P < 0.01) differences with control group and followed dose proportionality. Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in group with 3 mmol · L<sup>-1</sup> was significantly (P < 0.01) higher than that of control group, and then the concentration decreased with increasing dosage. Intracel-

收稿日期: 2008-07-28

基金项目: 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象资助项目(2006); 扬州大学科技创新培育基金

作者简介: 刘学忠(1968-), 男, 江苏江都人, 博士生, 主要从事动物营养代谢病与中毒病学研究, Tel: 0514-87979042, E-mail: xmnkliu@yahoo.com.cn

com.cn

\* 通讯作者: 刘宗平, Tel: 0514-87991448, E-mail: Liuzongping@yzu.edu.cn

lular ROS level increased with increasing dosage and time of exposure in the range of 3—100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; however, ROS level decreased slightly in group with 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Apart from group with 3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the differences between control group and experimental groups were significant ( $P < 0.01$ ).  $\Delta\psi\text{m}$  decreased continuously apart from group with 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  after 24 h exposure. The  $\Delta\psi\text{m}$  of 30—300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  groups were significantly lower than that of control ( $P < 0.01$ ). It was concluded that low dosage of Dimethoate can induce liver cell apoptosis, and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS and  $\Delta\psi\text{m}$  may participate in this process.

**Key words:** rat; liver; Dimethoate; apoptosis

有机磷农药是农业上应用最广泛的杀虫剂之一,其毒性机制主要是通过抑制乙酰胆碱酯酶活性,导致体内乙酰胆碱的大量积聚,激活胆碱能受体(毒蕈碱或烟碱受体),从而对哺乳动物产生毒性。另外,有机磷农药的毒性还包括抑制 DNA 和 RNA 的合成<sup>[1]</sup>,阻断信号传导通路<sup>[2]</sup>,诱导机体氧化应激<sup>[3]</sup>,导致细胞凋亡和坏死<sup>[4]</sup>等。关于有机磷农药诱导产生氧化应激和细胞凋亡的研究正在逐渐深入,但关于其机制的研究仍然较少。本试验从体内、体外两方面,以肝脏组织学和超微结构变化及细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度、ROS、 $\Delta\psi\text{m}$  等为观测指标,研究了乐果对大鼠肝细胞凋亡的影响,同时探讨了以上因素在乐果诱导肝细胞凋亡中的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

乐果,德国 Witeg,纯度 99.9%;Fluo-2/AM、罗丹明 123, Sigma 公司;Annexin V/PI 细胞凋亡测定试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司;细胞内活性氧测定试剂盒,北京 SinoPCR 公司。MR23i 高速冷冻离心机,法国 JOUAN 公司;TE2000-U 倒置显微镜,日本 Nikon 公司;80i 荧光显微镜,日本 Nikon 公司;Tecnai 12 透射电子显微镜、XL30-ESEM 环境扫描电子显微镜,荷兰 Philips 公司;流式细胞仪,美国 BD 公司。

### 1.2 实验动物及其处理

健康 21 日龄 SD 大鼠 24 只(由扬州大学比较医学中心提供),试验前隔离饲养 1 周。乐果用生理盐水溶解,将大鼠随机分为对照组和 3 个染毒组,按 0、1、6 和 30  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重灌胃染毒。每 3 d 称重 1 次,以调整剂量。分别连续灌服 30 d 后,处死动物摘取肝脏,一部分用 13% 中性甲醛固定,按常规方法制作石蜡切片,HE 染色,光镜观察;另一部分用 2.5% 戊二醛固定,制作超微切片,透射电镜观察。

### 1.3 肝细胞的分离培养

参考任建新等<sup>[5]</sup>的方法进行操作。

### 1.4 Annexin V/PI 检测细胞凋亡

对数生长期细胞用乐果进行处理,染毒浓度分别为 0、3、10、30、100 和 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取染毒 12、24 h 的细胞,用 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  胰酶消化 5 min, 2 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,0.074 mm 网筛过滤,再次离心后收集细胞,用 100  $\mu\text{L}$  的标记溶液(20  $\mu\text{L}$  Annexin V 和 20  $\mu\text{L}$  PI 加入到 1 mL buffer 中)重悬细胞,室温下避光孵育 10~15 min,流式细胞仪检测(激发波长 488 nm,发射波长  $> 630$  nm)。每个染毒剂量设 3 个样品,每个样品测定  $1 \times 10^6$  个活细胞。

### 1.5 细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的测定

染毒后细胞用预冷的 PBS 洗 2 次,离心去上清,加入 0.5 mL Fluo-2/AM (终浓度为 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 40 min,用预冷的 PBS 洗 2 次,流式细胞仪检测(激发波长 506 nm,吸收波长 526 nm)10<sup>4</sup> 个细胞平均荧光强度,以此显示细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化情况<sup>[6]</sup>。

### 1.6 细胞内 ROS 的测定

染毒后细胞用 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  胰酶 + 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 消化 5 min,2 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,收集细胞,PBS 洗涤,0.074 mm 网筛过滤,再次离心后用 950  $\mu\text{L}$  含 10  $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$  小牛血清的 PBS 悬浮细胞,加入 DCFH-DA 使其终浓度为 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次。流式细胞仪检测平均荧光强度(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm),每个染毒剂量设 3 个样品,每个样品测定  $1 \times 10^4$  个活细胞。

### 1.7 线粒体膜电位( $\Delta\psi\text{m}$ )的测定

染毒后细胞用 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  胰酶 + 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 消化 5 min,2 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,收集细胞,PBS 洗涤,0.074 mm 网筛过滤,细

胞重悬于培养液中;加入罗丹明 123 染液 ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  细胞培养箱孵育 30 min;离心,以 PBS 洗涤细胞 2 次;流式细胞仪检测(激发波长  $488 \sim 505 \text{ nm}$ ,发射波长  $530 \text{ nm}$ )。

### 1.8 数据处理

对数据采用 SPSS 13.0 应用软件进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 病理组织学变化

组织学变化表明(图 1~4),乐果染毒 30 d 后, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组肝脏结构无明显改变; $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组肝细胞索紊乱,细胞发生颗粒变性; $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组肝细胞索断裂,肝小叶发生弥漫性脂肪变性,肝细胞坏死增加;肝静脉窦狭窄甚至闭塞而不可见;汇管区周围大量炎性细胞浸润。

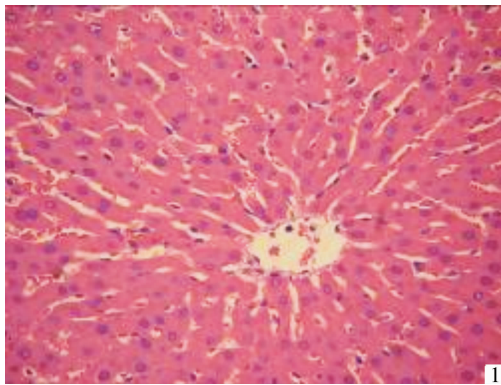


图 1 对照组正常肝细胞 HE 200×

Fig. 1 Liver cells were normal in control group HE 200×

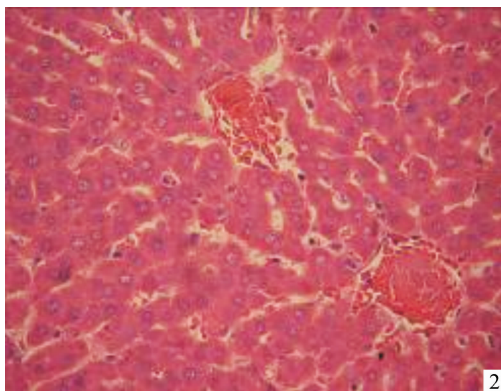


图 2  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组染毒 30 d, 静脉窦充血, 无其它明显变化 HE 200×

Fig. 2 Venous sinuses hyperaemia was observed in  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group after 30 days exposure HE 200×

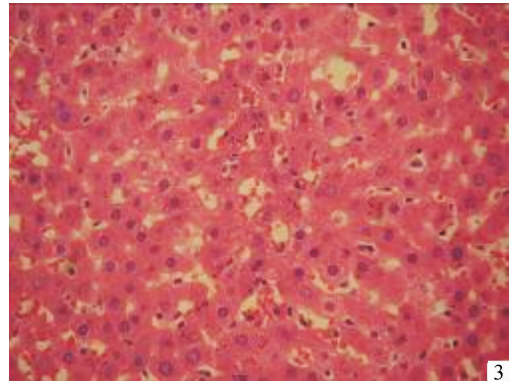


图 3  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组染毒 30 d, 肝细胞索肿胀、紊乱, 肝细胞发生颗粒变性 HE 200×

Fig. 3 Liver cell cord swelling and derangement, and liver cell granular degeneration were observed in  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group after 30 days exposure HE 200×

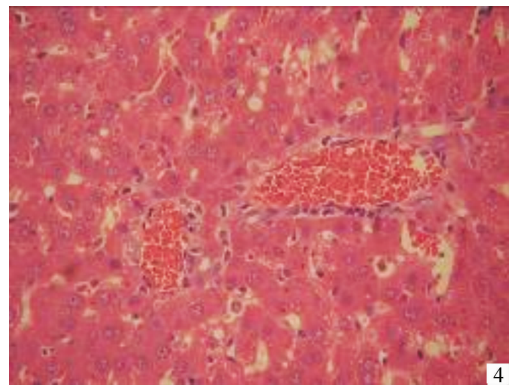


图 4  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组染毒 30 d, 肝细胞索肿胀、断裂, 肝细胞脂肪变性, 静脉窦狭窄 HE 200×

Fig. 4 Liver cell cord swelling and fragmentation, adipose degeneration and venous sinuses hyperaemia were observed in  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group after 30 days exposure HE 200×

### 2.2 超微结构变化

透射电镜下观察,对照组正常肝细胞细胞膜和核膜完整,染色质分布均匀,核大,核膜清晰,线粒体丰富。

乐果染毒 30 d 后, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组细胞无明显变化; $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组肝细胞核皱缩,染色体凝聚,核膜间隙扩大,核膜上核孔消失; $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组可见到大量凋亡细胞,核内染色质与基质均有凝聚,细胞核裂解,形成凋亡小体,细胞内有大量脂滴(图 5~8)。

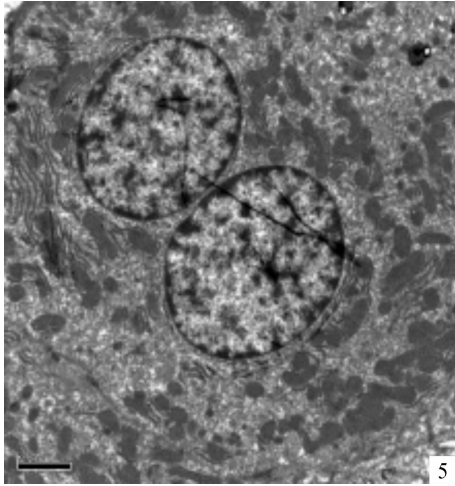


图 5 对照组正常肝细胞,细胞膜和核膜完整,染色质分布均匀,核大,核膜清晰,线粒体丰富  $\times 5\ 800$

Fig. 5 Liver cells were normal, cellular membrane and nuclear envelope were complete and clear, chromatin was distributed evenly and mitochondria was clear in control group  $\times 5\ 800$

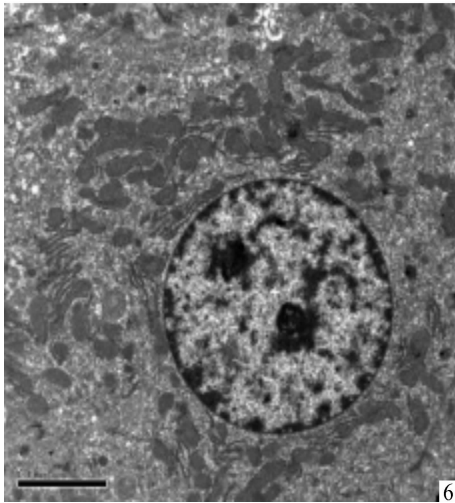


图 6  $1\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  染毒组肝细胞,细胞无明显变化  $\times 5\ 800$

Fig. 6 No significant change of liver cells was observed in  $1\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group  $\times 5\ 800$

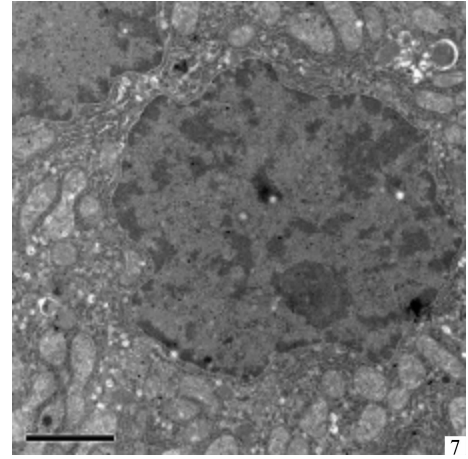


图 7  $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  染毒组肝细胞,细胞核形状不规则,核膜开始皱缩,染色体凝聚,核膜间隙扩大  $\times 9\ 700$

Fig. 7 Cell nucleus structure irregularity, nuclear envelope shrinkage, intermembrane space increase and chromosome clumping were observed in  $6\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group  $\times 9\ 700$

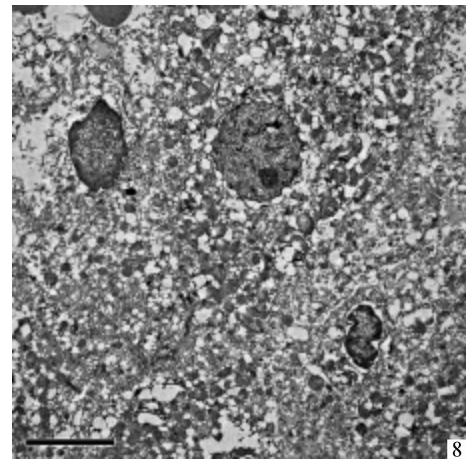


图 8  $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  染毒组肝细胞,细胞核裂解,形成凋亡小体,胞内有大量脂肪滴  $\times 5\ 800$

Fig. 8 Cell nucleus spallation, apoptotic body and large quantity of fat drop were observed in  $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  group  $\times 5\ 800$

### 2.3 乐果对肝细胞凋亡率、细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度、ROS 及 $\Delta\psi\text{m}$ 的影响

如表 1 所示,各染毒组肝细胞随染毒剂量的增大和染毒时间延长,细胞凋亡率均明显增加。与对照组比较, $3\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组染毒 12 和 24 h 差异不显

著( $P > 0.05$ ),  $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组差异显著( $P < 0.05$ ),其余染毒剂量组差异均极显著( $P < 0.01$ ),并且呈剂量-时间效应。 $300\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组染毒 12 和 24 h 凋亡率达到最高,分别为 14.0% 和 16.9%。

经乐果诱导 12 和 24 h 后,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度急

剧升高,在浓度为  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到最高。之后随染毒剂量的增加,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度又逐渐下降,提示低剂量染毒即可诱导肝细胞凋亡,而  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下降可能是细胞坏死增加,同时也证明了细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化主要发生于凋亡的早期。

与对照组相比,在  $3 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内,随染毒剂量的增大和染毒时间的延长,细胞内 ROS

水平逐渐升高,而在  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组又略有下降,除  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组染毒 12 h 外,其它各组 ROS 水平与对照组相比差异均极显著 ( $P < 0.01$ )。

细胞在乐果暴露 12 和 24 h 后,除 24 h 高剂量染毒组 ( $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 外,细胞内线粒体膜电位 ( $\Delta\psi\text{m}$ ) 出现持续下降,与对照组相比,30、100、300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组差异均极显著 ( $P < 0.01$ )。

表 1 乐果对肝细胞凋亡率、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度、ROS 及  $\Delta\psi\text{m}$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effects of Dimethoate on hepatocyte apoptosis rate, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, ROS and  $\Delta\psi\text{m}$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

染毒剂量 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Exposure doses	细胞凋亡率/% Apoptosis rate		Fluo-2/AM 荧光强度/% Fluo-2/AM fluorescence intensity		细胞内 ROS 水平/% Content of intracellular ROS		线粒体膜电位荧光强度/% Mitochondrial membrane potential (Fluorescence intensity)	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
	0	3.1±0.33	3.3±0.47	27.1±2.44	38.8±4.15	9.53±1.65	10.01±1.07	67.9±0.98
3	3.1±0.74	7.1±0.66	65.1±6.21**	66.0±5.32**	10.04±1.11	12.13±1.26**	66.2±1.45	66.8±1.64
10	5.1±0.44*	7.6±0.41*	45.1±3.13**	56.8±4.78**	12.33±1.72**	21.17±1.29**	65.2±1.85	60.0±1.95*
30	6.4±0.65**	9.7±0.25**	43.4±5.56**	40.9±5.02	19.68±1.58**	25.33±1.93**	53.8±1.88**	53.8±1.94**
100	8.3±0.19**	11.8±0.39**	44.6±3.89**	35.4±1.76	24.48±1.92**	25.47±1.90**	51.8±1.79**	47.8±1.86**
300	14.0±0.53**	16.9±0.47**	31.4±3.07	35.6±2.41	21.53±1.68**	24.53±1.43**	41.0±1.55**	56.0±1.57**

与对照组 ( $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Dimethoate) 比较, \* .  $P < 0.05$ , \* \* .  $P < 0.01$

Compared with the control ( $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Dimethoate) within the same column, \* .  $P < 0.05$ , \* \* .  $P < 0.01$

### 3 讨论

随着杀虫剂类物质的广泛使用和人类对自身生存环境的日益关注,杀虫剂类物质的凋亡毒理学研究已逐渐被人们所重视,尤其是一些比较常用的如有机磷类和拟除虫菊酯类杀虫剂等,其诱导细胞凋亡的机制研究正在逐渐深入。但总体而言,关于杀虫剂类化合物诱导细胞凋亡的机制研究开展得较少。作者观察了乐果灌胃染毒后大鼠肝脏的组织病变,发现除  $1 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组无明显变化外,  $6 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组和  $30 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组均呈现不同程度的损伤,肝细胞索肿胀、肝小叶脂肪变性,局部炎症,细胞坏死增加,并且随着染毒剂量的增加,肝细胞损伤增加。透射电镜观察显示肝细胞具有核形状不规则,染色质浓缩积聚等特征,提示乐果可诱导肝细胞凋亡。体外试验中,用乐果对培养肝细胞染毒 12 和 24 h,同样可诱导肝细胞凋亡,且存在剂量-时间效应,证明低浓度的乐果即可诱导肝细胞凋亡。

已有研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$  作为细胞内信号传递途径

的重要成员之一,可能是细胞凋亡的早期信号。大量试验观察到细胞在凋亡前都有细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度持续升高的现象<sup>[7-9]</sup>,而  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高产生了一系列的效应:(1)微管的不稳定,导致了细胞骨架的不稳定,使膜出现起泡现象,这是凋亡重要的形态特征<sup>[10]</sup>;(2)活化磷脂酶 A2 和磷脂酶 C,前者能使不饱和脂肪酸分解,导致膜流动性降低,通透性增大,从而使膜功能受损,同时产生 ROS,促进细胞分裂;(3)活化依赖  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  的核酸内切酶,从而使核小体断裂,出现特征性的凋亡梯带<sup>[11]</sup>。因此,  $\text{Ca}^{2+}$  被认为是参与细胞凋亡的重要信号。本试验结果显示,在乐果作用下,细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度普遍升高,  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组达到了最高,之后随染毒剂量的增加  $\text{Ca}^{2+}$  浓度呈下降趋势。该结果提示了在乐果诱导的细胞凋亡过程中,  $\text{Ca}^{2+}$  作为早期的一个信号,参与了细胞凋亡的启动。

大量证据显示,内源或外源性因素引起的细胞凋亡过程中,由于氧化应激造成大量的活性氧产生。细胞内 ROS 升高,一方面可以直接导致 DNA 损

伤,同时还可以启动线粒体相关的凋亡信号通路,如通过激活 p53 引发 Bax 和 Noxa 的表达,这两种凋亡蛋白可以使线粒体膜电位降低,导致线粒体内细胞色素 C 释放进入细胞质,与 Apaf1 结合,其结果是 caspase-9 被激活。损伤的线粒体能产生更多活性氧,从而加速细胞凋亡<sup>[12]</sup>。另外,ROS 也可能通过 MAP 蛋白激酶增强非固有的凋亡途径,促进细胞凋亡的发生<sup>[13]</sup>。本试验结果显示,细胞经乐果处理后,细胞内 ROS 含量上升,这种上升趋势在 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组达到最高,随后略有下降,并维持在一定的水平。这种细胞内 ROS 的上升,意味着细胞的氧化应激方式可能参与了乐果诱导的细胞凋亡过程。

在细胞凋亡过程中,另一个重要变化是线粒体膜电位的持续下降。线粒体跨膜电位的耗散主要是由于线粒体内膜的通透性转变,这是由于生成了动态的由多个蛋白质组成的位于线粒体内膜与外膜接触位点的通透性转变孔道(PTP 孔道)。PTP 孔道由线粒体各部分的蛋白质与细胞质中蛋白质联合构成,包括细胞质蛋白己糖激酶,线粒体外膜蛋白外周苯并二嗪(benzodiazepine)受体与电压依赖阴离子通道,线粒体膜间隙蛋白肌酸激酶,线粒体内膜蛋白 ADP-ATP 载体,线粒体基质蛋白亲环蛋白 D(cyclophilin D)等。凡是能够专一作用于线粒体诱导 PTP 孔道生成的物质,都能引起细胞凋亡<sup>[14]</sup>。目前已经证实,包括 ROS 在内的许多理化因素都能直接或间接诱导 PTP 孔道生成,从而导致细胞内 ATP 无法正常合成,线粒体呼吸作用受阻,细胞色素 C 等凋亡诱导因子从线粒体中释放出来,最终导致凋亡的发生<sup>[15]</sup>。本试验结果显示,肝细胞经不同剂量乐果处理后,细胞内线粒体膜电位均出现下降,这说明肝细胞经乐果作用后,细胞内线粒体呼吸链受到影响,呼吸作用下降,线粒体通透性转变孔道生成,从而使线粒体上的细胞色素 C 释放,引起一系列级联反应,细胞发生凋亡。

综上所述,在乐果诱导肝细胞凋亡的过程中,  $\text{Ca}^{2+}$  作为早期凋亡信号,参与了细胞凋亡。并且在这个过程中,细胞内的线粒体发生了一系列与细胞凋亡相关的变化,包括细胞内 ROS 增多,线粒体膜电位下降,线粒体通透性升高,线粒体膜上的 PTP 孔道开放。由于这一系列的变化的产生,使受到毒害后的肝细胞发生不可逆转的程序性死亡。

## 参考文献:

- [1] GARCIA S J, SEIDLER F J, CRUMPTON T L, et al. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involves glial targets: C6 glioma cell model[J]. *Toxicol*, 2001, 60(Suppl, 1): 240.
- [2] EHRICH M, INTROPIDO L, COSTA L G. Interaction of organophosphorus compounds with muscarinic receptors in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *Toxicol Environ Health*, 1994, 43: 51-63.
- [3] CRUMPTON T L, SEIDLER F J, SLOTKIN T A. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos[J]. *Dev Brain Res*, 2000a (121): 189-195.
- [4] CARLSON K, JORTNER B S, EHRICH M. Organophosphorus compound induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 168(2): 102-113.
- [5] 任建新, 刘学忠, 李慧敏, 等. 辛硫磷对大鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(4): 350-354.
- [6] MERRITT J E, MCCARTHY S A, DAVIES MPA, et al. Use of Fluo-2 to measure  $\text{Ca}^{2+}$  in platelet and neutrophils[J]. *Biochem J*, 1990, 269: 513-519.
- [7] MCCONKEY D J. The role of calcium in the regulation of apoptosis[J]. *Scanning Microsc*, 1996, 10(3): 777-793.
- [8] HAJN CZKY G, CSORD S G, DAS S, et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in apoptosis[J]. *Cell Calcium*, 2006, 40(5-6): 553-560.
- [9] ZHU W H, LOH T T. Roles of calcium in the regulation of apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells[J]. *Life Sci*, 1995, 57(23): 2091-2099.
- [10] ICHAS F, MAZAT J P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondria permeability transition pore. Switching from low-to high-conductance state[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1366: 33-50.
- [11] TATTON W G, OLANOW C W. Apoptosis in neurodegenerative disease: the role of mitochondria[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1410: 195-213.
- [12] TRRENS J F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species[J]. *J physiol*, 2003, 552: 335-344.
- [13] CHEN F, SHI X L. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2002, 42: 105-121.
- [14] SUSIN S A, LORENZO H K, ZAMZANI N, et al. Molecular characterization of mitochondria apoptosis-inducing factor[J]. *Nature*, 1999, 397: 441-446.
- [15] KROEMER G, ZAMZANI N, SUSIN S A. Mitochondria control of apoptosis[J]. *Immunology Today*, 1997, 18(1): 44-51.