

文章编号 :1003-8701(2013)05-0051-03

灭多威诱导 MDEC-07114 细胞凋亡的初探

贺莉芳,刘 晖,赵 丹,黄学贵,张 曦

(遵义医学院,贵州 遵义 563000)

摘要:目的:探讨灭多威对家蝇胚胎细胞系 MDEC-07114 细胞凋亡的影响。方法:1、实验分组:不同浓度灭多威组(1 mg/mL 组、2 mg/mL 组、4 mg/mL 组、8 mg/mL 组),同时设正常组、1%丙酮组;2、HE 染色法观察 MDEC-07114 细胞凋亡形态,并测定细胞凋亡指数;3、TUNEL 检测 MDEC-07114 细胞凋亡。结果:1、不同浓度灭多威作用于 MDEC-07114 后,从 2 mg/mL 组开始见典型凋亡细胞,细胞凋亡指数增加,且随浓度的递增而逐渐升高;2、TUNEL 检测:2 mg/mL 组出现明显的绿色荧光,4 mg/mL 组有所增加,8 mg/mL 组荧光最强。结论:灭多威可诱导 MDEC-07114 细胞凋亡。

关键词:灭多威;家蝇胚胎细胞系;凋亡

中图分类号:R965

文献标识码:A

Explore on the Apoptosis of Induced by Methomyl in MDEC-07114 Cell

HE Li-fang, LIU Hui, ZHAO Dan, HUANG Xue-gui, ZHANG Xi

(Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective of this study was to explore effect of Methomyl on apoptosis of *Musca domestica* embryonic cell line (MDEC-07114). Experimental groups were the different concentrations of Methomyl groups (1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml and 8mg/ml), normal group and 1% acetone group. The morphology of apoptosis cells was observed by hematoxylin-eosin staining, and the apoptosis index (AI) was measured. The apoptosis of MDEC-07114 cell was detected by TUNEL. Results showed that from the 2mg/ml groups of Methomyl, the typical apoptotic cell began to appear. Moreover, with the increase of the concentration, the apoptosis index (AI) gradually increased. TUNEL assay showed that at the 2mg/ml groups, MDEC-07114 cells appeared visible green fluorescence, the green fluorescence in cells enhanced at the 4mg/ml groups, and it was the strongest at the 8mg/ml groups. Conclusion of this experiment was methomyl could induce apoptosis of MDEC-07114 cells.

Keywords: Methomyl; *Musca domestica* embryonic cell; Apoptosis

随着细胞凋亡研究的不断深入,其研究范畴已广泛涉及到昆虫领域^[1]。灭多威为氨基甲酸酯类杀虫剂,主要通过抑制乙酰胆碱酯酶活性,而使昆虫中毒死亡。研究发现灭多威对 MDEC-07114 细胞有毒性作用,并引起细胞周期阻滞^[2]。细胞周期阻滞与细胞凋亡密切相关,灭多威是否通过诱导细胞凋亡来抑制其生长呢?本研究通过灭多威作用于 MDEC-07114 细胞,检测有无细胞凋亡发生。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料

家蝇胚胎细胞系(MDEC-07114)由寄生虫教研室提供。

1.1.2 主要试剂

M3 培养基(M3),Sigma 公司,S3652;胎牛血清(FBS),杭州四季青生物工程研究所制品;99.9%灭多威,北京恒元启天化工技术研究院;TUNEL 试剂盒,罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 MDEC-07114 细胞培养

收稿日期:2013-04-05

基金项目:国家自然科学基金(31240021);贵州省科学技术厅基金(黔科合 SY[2010]3077 号)

作者简介:贺莉芳(1970-),女,教授,硕士,从事昆虫资源开发利用研究。

取液氮冻存的 MDEC-07114, 复苏后按参考文献[3]进行培养。

1.2.2 实验分组

灭多威组设 4 个浓度, 依次为 1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL。同时设 1%丙酮组, 正常组为等量的培养基。

1.2.3 HE 染色法观察细胞凋亡

接种细胞于有盖片 (PLL 包埋) 的 24 孔板中 (细胞数为 2×10^6 个/mL), 24 h 后弃上清, 加入含不同浓度灭多威的培养基, 正常组为等量的培养基, 各组设 3 个平行孔。培养 24 h 后取出盖片, HE 染色, 光镜下观察凋亡细胞形态, 并计数每 10 个高倍镜视野中凋亡细胞数目, 重复 3 次, 代入公式计算细胞凋亡指数 (Apoptosis index, AI)^[4]: AI = (凋亡细胞数 / 总细胞数) \times 100%。

1.2.4 TUNEL 检测

同上方法接种细胞于 24 孔板中, 24 h 后弃上清, 加入含不同浓度灭多威的培养基, 正常组为等量的培养基, 同时设阳性对照组 (加入 100 μ L DNase 消化处理的细胞) 培养 24 h 后参考 TUNEL 试剂

盒说明进行检测, 荧光显微镜下观察, 并拍照。

1.3 统计学处理

所有数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS 软件包处理, 单因素方差分析, t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色法观察 MDEC-07114 细胞凋亡

1 mg/mL 组、1%丙酮组形态与正常组无差异, 从 2 mg/mL 组开始见典型凋亡细胞形态, 细胞变圆, 核固缩、深染, 可见凋亡小体 (图 1~3)。表 1 显示: 1 mg/mL 组、1%丙酮组细胞凋亡指数与正常组无差异 ($P > 0.05$), 从 2 mg/mL 组开始凋亡指数增加, 明显高于对照组 ($P < 0.01$), 且随浓度的递增而逐渐升高。

2.2 TUNEL 法检测 MDEC-07114 细胞凋亡

正常组、1%丙酮组以及 1 mg/mL 组中几乎无绿色荧光, 从 2 mg/mL 组开始, 明显可见被绿色荧光标记的细胞, 4 mg/mL 组明显增加, 8 mg/mL 组绿色荧光强度最强 (图 4~9)。

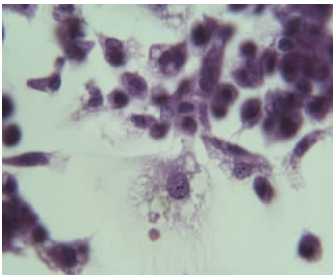


图 1 正常细胞 HE \times 100

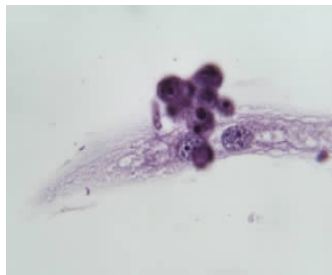


图 2 凋亡细胞 HE \times 100

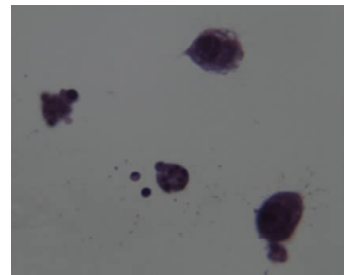


图 3 凋亡小体 HE \times 100

表 1 灭多威作用后 MDEC-07114 细胞凋亡指数

组别	细胞凋亡指数	P 值
正常组	3.003 \pm 0.671	
1%丙酮组	3.023 \pm 0.630	$P > 0.05$
灭多威		
1 mg/mL	2.977 \pm 0.299	$P > 0.05$
2 mg/mL	6.287 \pm 1.371**	$P < 0.01$
4 mg/mL	11.697 \pm 0.715**	$P < 0.01$
8 mg/mL	21.037 \pm 1.607**	$P < 0.01$

注: ** $P < 0.01$, 与正常组相比较。

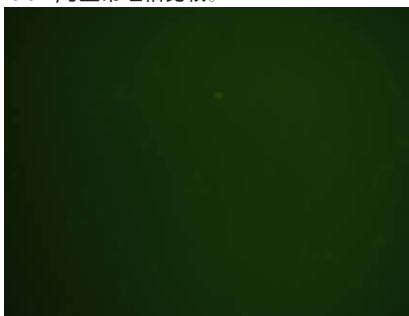


图 4 正常组细胞 (\times 40)

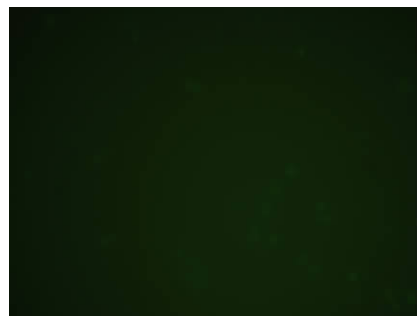
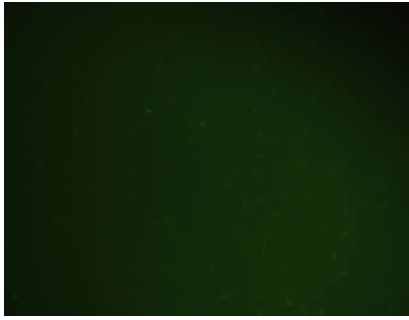
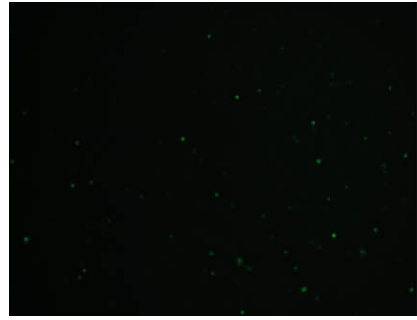
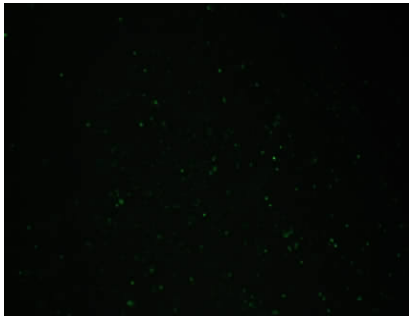
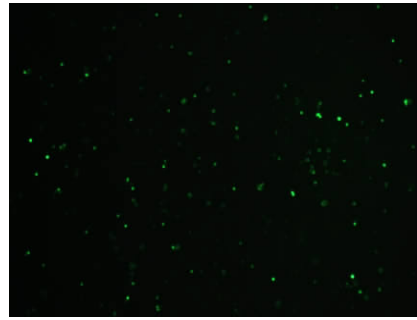


图 5 1%丙酮组细胞 (\times 40)

图 6 1 mg/mL 组细胞($\times 10$)图 7 2 mg/mL 组细胞($\times 10$)图 8 4 mg/mL 组细胞($\times 10$)图 9 8 mg/mL 组细胞($\times 10$)

3 讨 论

研究表明,诱导昆虫细胞凋亡的因素很多,包括紫外线辐射、病毒感染、植物源农药、昆虫体内激素、蛋白质合成抑制剂、荧光增白剂、氨基酸饥饿、损伤 DNA 的试剂、脂类信号小分子、重金属离子等^[5-7]。

形态学是鉴定细胞凋亡最可靠的方法,常用的有 HE 染色法,吖啶橙、PI、DAPI 荧光染色法等。本实验利用 HE 染色法,通过光学显微镜观察,可见典型凋亡细胞形态改变,还可见凋亡小体。从 2 mg/mL 组开始凋亡指数增加,且随浓度的递增而逐渐升高。

TUNEL 是分子生物学与形态学相结合的研究方法,能准确地反应细胞凋亡的生物化学和形态学特征^[8]。有学者利用 TUNEL 法检测经印楝素和喜树碱诱导处理的 SL-1,结果显示:阴性对照组未见荧光染色,阳性对照组可见细胞被标记为小圆形或环形黄绿色或绿色荧光。0.75 μ g/mL 印楝素处理后 12 h,可见阳性反应细胞^[9]。本实验 TUNEL 检测显示:2 mg/mL 组开始出现明显的黄绿色荧光,随药物浓度的增加荧光强度增强。根据 HE 染色及 TUNEL 结果,从形态学及分子生物学角度提示:从 2 mg/mL 组开始,灭多威可以诱导 MDEC-07114 细胞凋亡。研究发现灭多威对体外

培养的 MDEC-07114 细胞有抑杀作用^[10],由此推测:灭多威可能通过诱导 MDEC-07114 细胞凋亡而抑制其生长。

参考文献:

- [1] 吕鸿声,张志芳,吴金美. 细胞凋亡:昆虫抗病毒感染的重要机制[J]. 中国蚕业, 2008, 24(3): 4-14.
- [2] King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis [J]. Annu. Res Physiol, 1998(60): 601-605.
- [3] 贺莉芳,万启惠,刘 晖,等. 家蝇细胞系建立及其生物学特性[J]. 昆虫知识, 2009, 46(5): 788-790.
- [4] Means JC, Muro I, Clem RJ. Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a Drosophila cell free system[J]. Cell Death Differ, 2006(13): 1222-1234.
- [5] Lee C, Baehrecke EH. Genetic regulation of programmed cell death in Drosophila [J]. Cell Res, 2000, 10(3): 193-204.
- [6] Xia Q, Sun H, Hu X, et al. Apoptosis of Spodoptera litura larval hemocytes induced by heavy metal zinc. Chin [J]. Sci. Bull, 2005, 50(24): 2856-2860.
- [7] Xiu M, Peng J, Hong H. Mitochondrial response and calcium ion change in apoptotic insect cells induced by SfaMNPV. Chin[J]. Sci. Bull, 2005, 50(12): 1191-1198.
- [8] 刘伍梅,汪铭书,程安春. 细胞凋亡检测技术的研究进展[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(11): 45-48.
- [9] 钟国华,水克娟,吕朝军,等. 印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用[N]. 昆虫学报, 2008, 51(6): 618-627.
- [10] 谢 偲,贺莉芳,刘 晖,等. 灭多威对离体培养 MDEC-07114 细胞的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(7): 3346, 3349.