

虾夷扇贝毒素对 Hela 细胞凋亡的诱导及胞内钙离子浓度的影响

庞敏^{1*}, 屈佩^{1,2}, 高春蕾¹, 王宗灵¹, 张镜³

(1. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;

2. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100;

3. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 通过 MTT 分析、光学显微镜观察、Hoechst33342 染色质荧光染色、DNA 琼脂糖凝胶电泳、罗丹明 123 染色及钙离子激光扫描显微镜检测等手段, 分析了虾夷扇贝毒素 (yessotoxin, YTX) 对 Hela 细胞的毒性作用。通过实验发现, 正常 Hela 细胞与不同浓度 YTX 共孵育 24 h 后, 一定浓度的 YTX 能对 Hela 细胞产生毒性作用, 使其发生明显凋亡特征, 如形态变化、染色质凝缩、DNA 片段化以及线粒体膜电位降低。此外, YTX 还能造成 Hela 细胞内胞质钙离子升高。这种毒性作用可能是 YTX 通过对胞内钙离子浓度的影响进而诱导发生的。

关键词: 虾夷扇贝毒素; Hela 细胞; 细胞凋亡; 线粒体膜电位; 钙离子水平

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

近年来, 随着我国沿海经济发展, 海洋富营养化加剧, 赤潮灾害频发, 不仅破坏了海洋生态系统, 而且有些赤潮产生的毒素在海产品中累积, 随着人类的食用而对人类生命和健康构成威胁。全球约 260 多种主要赤潮藻类, 我国沿海发现 148 种, 38 种有毒^[1]。随着对赤潮的研究, 有毒藻类的数目可能继续增加。近两年, 在我国沿海城市贝类样品中检测出虾夷扇贝毒素 (yessotoxins, YTXs)^[2], 并多次从底质泥样中分离产 YTXs 毒素的甲藻孢囊。

虾夷扇贝毒素主要包括 YTX 及其衍生物, 其结构类似于神经性贝毒的短裸甲藻毒素, 分子量在 955~1 551 ku^[3]。YTX 最早是从日本虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 中被分离出来^[4], 因此被命名为虾夷扇贝毒素, 后来陆续在新西兰、意大利和智利等^[5-6] 国家被检出。YTXs 主要由 3 种有毒甲藻: 网状原角藻 (*Protoceratium reticulatum*), 多边舌甲藻 (*Lingulodinium polyedrum*), 具刺膝沟藻 (*Gonyaulax spinifera*)^[7] 产生, 常和大田软海绵酸 (okadaic acid, OA)、鳍藻毒素 (dinophysistoxins, DTXs) 等脂溶性腹泻性

贝毒 (diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 一起被检出, 过去很长一段时期内都将其归到 DSP 中。然而与 DSP 不同的是, YTXs 并不会造成实验动物的腹泻^[4,8], 而且也不会使蛋白磷酸酶 2A 失活^[9], 2002 年欧盟委员会正式将此类毒素单独列为一类^[10]。

由于 YTXs 的作用机制与 OA 明显不同, 研究 YTXs 作用的靶器官、毒性作用机制以及对人类健康的影响就显得至关重要, 国内外学者为此也展开了相关的研究。腹腔注射实验表明, YTXs 对心肌、肝脏和胰脏都有损伤^[11-14], 而近年来的一些研究发现, YTXs 对脑神经细胞也有一定的毒性作用^[15-16], 因此, YTXs 的生物毒性作用不容小觑。然而迄今为止, YTXs 对人类健康的危害程度以及作用机理仍未完全阐明。研究表明, YTX 能诱导不同的细胞发生凋亡, 如人的成神经瘤细胞系 BE(2)-M17^[17]、原代培养的大鼠脑干神经元细胞^[18] 以及大鼠与小鼠的成肌细胞系 L6 和 BC3H1^[19-20] 等, 但是其具体的诱导机理尚未完全清楚。本研究将 YTX 作用于 Hela 细胞, 通过多种分析方法, 研究了 YTX 对 Hela 细胞凋亡

收稿日期: 2011-05-08 修回日期: 2011-08-12

资助项目: 海洋一所基本科研业务费专项资金资助项目(2011T07); 科技部国际合作项目(2007DFA30710)

通讯作者: 庞敏, E-mail: pangmin@fio.org.cn

的诱导作用。细胞凋亡是细胞在一定的生理、病理条件下,遵循自身的程序,自我消亡的一个过程,是多细胞生物生命活动中必不可少的组成内容,贯穿于整个生命活动中,因此具有特殊的生物学意义,细胞凋亡的发生是多种原因的诱导。本实验借助激光扫描共聚焦显微镜分析了 YTX 的加入对 HeLa 细胞内钙离子浓度所造成的影响,进而分析 YTX 诱导细胞凋亡的可能机制,对进一步探讨 YTX 的毒性作用途径及赤潮毒素物质的活性利用提供了研究思路和线索。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

YTX 标准物质 购自加拿大国家科学研究委员会(National Research Council, Canada),使用前用 Hanks 缓冲液稀释成 2 ng/ μ L 的工作液,0.22 μ m 滤膜过滤除菌用于后步细胞实验。

其他试剂 优质胎牛血清(TBD,天津灏洋); RPMI1640 (Gibco, USA); 1:250 胰酶(sigma, USA); D-Hanks 缓冲液配制,0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 避光保存; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, sigma, USA),用 pH 7.3 的 D-Hanks 配制成 5 mg/mL 贮存液,0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 避光保存; 二甲基亚砷(DMSO, sigma, USA),105 kPa 高压灭菌; RNaseA (sigma, USA), pH 为 7.5 的 10 mmol/L 的 Tris 缓冲液配制,终浓度为 50 mg/mL; 蛋白酶 K (sigma, USA),配制成 20 mg/mL 的贮存液, -20 $^{\circ}$ C 保存; 200 bp DNA Ladder Marker (BestBio, 上海贝博); Hoechst33342/PI——细胞凋亡与坏死检测试剂盒(100T, 上海碧云天), -20 $^{\circ}$ C 避光保存; Capase 3 活性检测试剂盒(100T, 上海碧云天), -20 $^{\circ}$ C 避光保存; Fluo-3 AM(5 mmol/L, 上海碧云天),母液溶于 DMSO, -20 $^{\circ}$ C 避光保存,使用时用缓冲液稀释至所需浓度;其他化学试剂均使用分析纯配制,细胞培养试剂用三蒸水配制。

细胞及细胞培养 HeLa 细胞购自中科院上海细胞研究所细胞库。细胞用 25 cm² 的细胞培养瓶(Corning, USA),在 37 $^{\circ}$ C 恒温的 CO₂ 培养箱中培养,培养液为 RPMI1640,含 300 mg/L L-谷胱酰胺,100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素,添加 15% 的胎牛血清。细胞汇合后,用

0.25% 胰酶消化,1:2 传代。

1.2 实验方法

YTX 毒素对 HeLa 细胞增殖能力的影响

贴壁生长的细胞经 0.25% 胰酶消化后,用完全培养液重悬,调整密度为 1×10^4 /mL,每孔 200 μ L 接入 96 孔细胞培养板,于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后更换培养基,并加入等体积不同浓度的 YTX 毒素,使其终浓度为 50、100、150、200、250、300 ng/mL,同时以等体积 Hanks 缓冲液作为空白对照,每个样品物质设置 3 个重复。

37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 20 h 后,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL),37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h,吸弃旧培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,室温避光震荡 30 min,酶标仪(Rayto RT-2100C,深圳雷杜)490 nm 测定下的光密度(A)值,根据下列公式计算毒素各浓度组的细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100$$

毒素对 HeLa 细胞形态的影响 (1) 光学显微镜观察:将消化后的细胞悬液以 1×10^4 /mL 密度接入 1 mL 至 24 孔培养板,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后更换新鲜培养基,并加入 YTX 标准物质,使其终浓度为 50 ng/mL,用 Hanks 缓冲液作为同等体积空白对照,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后,倒置显微镜(Nikon TE 2000-U, Japan)观察。(2) Hoechst44432/PI 双染色:收集 50 ng/mL YTX 孵育 24 h 后的细胞于 1.5 mL 离心管中,离心弃上清;细胞沉淀用 0.8~1 mL 细胞染色缓冲液重悬;加入 5 μ L 的 Hoechst 染色液,轻弹离心管混匀;再加入 5 μ L 的 PI 染色液,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min;离心, Hanks 缓冲液洗涤一次,荧光显微镜观察。

DNA 琼脂糖电泳 收集与 50 ng/mL YTX 孵育 48 h 的脱落细胞,并用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞,将两部分合并,洗涤后向细胞沉淀中加入含 2 mg/mL RNaseA 的裂解缓冲液 40 μ L,37 $^{\circ}$ C 裂解细胞 1 h;再加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 10 μ L,55 $^{\circ}$ C 水浴 3 h;向 DNA 抽提液中加入 10 \times loading buffer,用 2% 琼脂糖凝胶 20 V 电泳 5 h, marker 采用 200 bp DNA Ladder Marker,EB 染色后紫外成像。

流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化 将 HeLa 细胞与 50 ng/mL YTX 分别孵育 2、4、6、8、10、12 h;同时用体积分数为 0.1% H₂O₂ 作用于细

胞作为阳性对照,比较线粒体膜电位的变化。Hanks 缓冲液洗涤后用重悬,荧光探针罗丹明 123 (Rh123, 10 mg/L) 37 °C 避光染色 30 min; 洗涤两次,将细胞重悬,流式细胞仪 (BD FACSCalibur, USA) 检测平均荧光值,激发波长 505 nm,发射波长 530 nm。

激光扫描共聚焦显微镜检测 HeLa 细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化 将消化后的细胞悬液以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接入 24 孔培养板,37 °C 培养 24 h 后去除旧液,用 Hanks 缓冲液洗涤 2 次,将细胞置于 $5 \mu\text{mol/L}$ Fluo-3/AM 负载液中 37 °C 避光孵育 1 h; 洗涤加入 $500 \mu\text{L}$ Hanks 缓冲液继续避光孵育 30 min,以确保 Fluo-3 AM 在细胞内完全转变为 Fluo-3。

(1) 激光扫描共聚焦显微镜扫描加载过探针的 HeLa 细胞,间隔时间为 2 s,扫描过程中向培养孔中加入 $50 \mu\text{L}$ YTX,观察毒素物质的加入对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。

(2) 向加载过探针的细胞培养孔里加入 100mmol/L 的钙离子螯合剂 EGTA,使其终浓度为 2mmol/L ,混匀静置 10 min 后加入 YTX,观察胞外无 Ca^{2+} 条件下细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

(3) 向加载过探针的细胞培养孔里加入 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 L-型钙离子通道阻断剂硝苯吡啶 (nifedipine),使其终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$,混匀静置一会儿加入 YTX,观察此时细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

2 结果

2.1 YTX 对细胞增殖的抑制作用

MTT 结果表明 (图 1), YTX 能够抑制 HeLa 细胞的增殖,随着 YTX 浓度的增加,抑制作用逐渐增强,当 YTX 浓度高于 200ng/mL 时, YTX 对细胞增殖的抑制率达到 50% 以上。

2.2 YTX 对 HeLa 细胞形态的影响

光学显微镜下观察 HeLa 细胞形态学变化发现,对照组细胞呈多边形,胞体丰满,细胞核大且明显可见,细胞间的边界清晰,折光性好 (图 2-a); 而加入 YTX 孵育的细胞,收缩变圆,从细胞瓶上脱落漂浮,细胞表面突起多个小泡,细胞核边缘化 (图 2-b 箭头所指)。Hoechst33342/PI 双染色结果显示,处理 24 h 后,对照组细胞细胞核染色较深且均匀 (图 2-c), YTX 孵育后的 HeLa 细胞细胞核明显变形,染色质凝集,因此发出较亮荧光,并且由于细胞核的片段化断裂,因

此在荧光显微镜下观察到花瓣状结构 (图 2-d 箭头所指)。

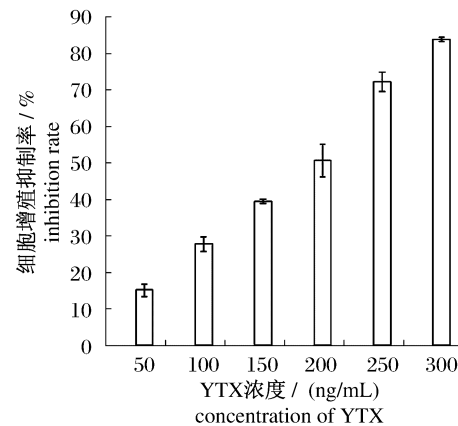


图 1 不同浓度 YTX 对 HeLa 细胞的增殖抑制率

Fig. 1 Inhibitory effect of YTX on the viability of HeLa cells

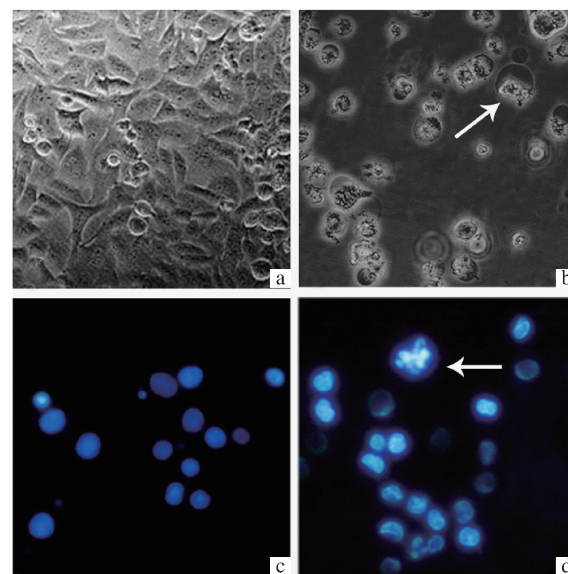


图 2 光学显微镜和荧光显微镜下 HeLa 细胞形态学变化 (200 ×)

a, c: 对照组; b, d: YTX 处理组。

Fig. 2 Morphological changes in HeLa cells under inverted light microscope and fluorescence microscope (200 ×)

a, c: control group; b, d: YTX-treated group.

2.3 DNA Ladder 琼脂糖电泳结果

YTX 孵育 48 h 后,大部分 HeLa 细胞变圆,并从瓶壁脱落,收集全部细胞 2% 琼脂糖凝胶电泳,发现明显的凋亡特征性“ladder”电泳条带 (图 3)。

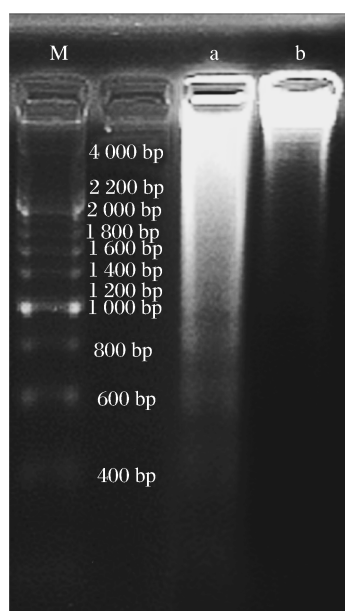


图3 不同处理组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

M:200 bp DNA Ladder Marker; a:YTX 处理组; b:对照组。

Fig.3 DNA fragment was measured by agarose gels electrophoresis

M:200 bp DNA Ladder Marker; a: YTX-treated cells; b: Control.

2.4 毒素对细胞线粒体膜电位(MTP)的影响

与对照组及 0.1% H_2O_2 阳性组相比,随着孵育时间的增加,YTX 能使 HeLa 细胞线粒体膜电位逐渐下降,虽然各时间点膜电位降低程度不如阳性对照,但是与对照组相比仍是下降明显($P < 0.01$)。

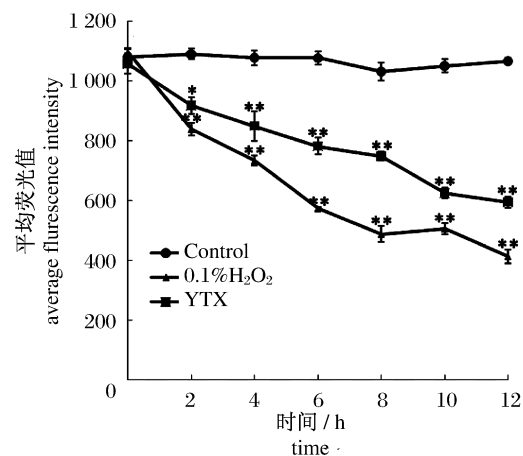


图4 YTX 孵育 12 h HeLa 细胞线粒体膜电位的变化

Fig.4 Mitochondrial membrane potential changes of treated HeLa cells in 12 h

2.5 YTX 对 HeLa 细胞内钙离子浓度的影响

YTX 加入的瞬间,细胞荧光有增强的现象(图5),分析荧光强度变化曲线(图6),细胞内 Ca^{2+} 荧光强度在 YTX 加入时瞬间增强,说明 YTX 的加入使得细胞内钙离子浓度有个瞬间升高的现象。

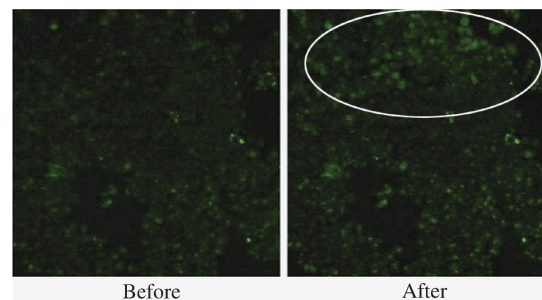


图5 荧光显微镜下 YTX 对 HeLa 细胞内荧光强度的影响(100 ×)

Fig.5 The fluorescence intensity affected by YTX in HeLa cells observed by fluorescence microscope (100 ×)

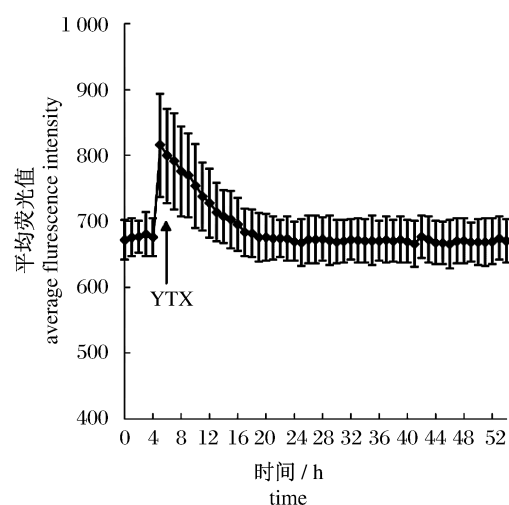


图6 YTX 的加入对 HeLa 胞内钙离子浓度的影响

Fig.6 The concentration change of intracellular Ca^{2+} affected by YTX

向缓冲液里加入 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA, HeLa 细胞内的荧光强度波动了一下。而随后加入 YTX, HeLa 细胞内的荧光强度变化不大,而再加入 $CaCl_2$ 胞内荧光强度微微上升,但上升幅度不明显(图7)。硝苯吡啶(Nifedipine)的加入能阻断 L-型钙离子通道,此后加入 YTX,平均荧光值基本保持稳定状态(图8)。

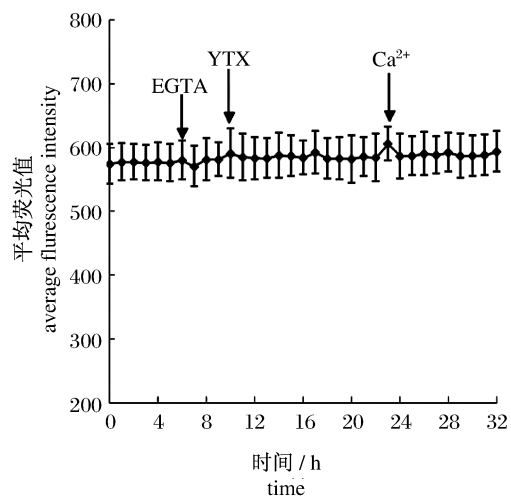


图7 无 Ca^{2+} 溶液中 YTX 对荧光强度的影响
Fig.7 Effect of YTX on fluorescence intensity in Ca^{2+} -free solution

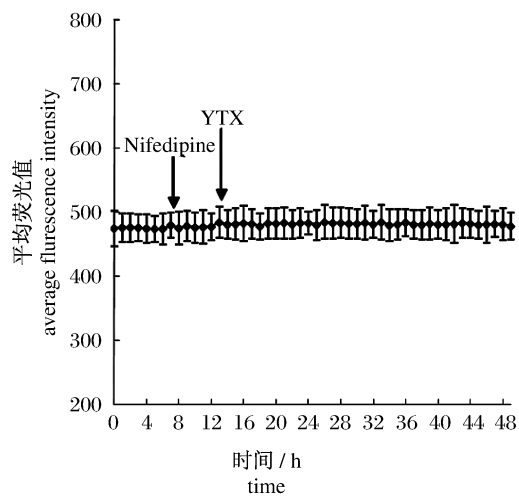


图8 硝苯吡啶对 YTX 作用的影响
Fig.8 Effect of nifedipine on YTX's function in HeLa cells

3 讨论

细胞凋亡与其他细胞事件一样,受来自细胞内外诸多信号的调控。另外,细胞内存在多种信号传递途径,每条途径也不是相对独立的,同一信号可以激活多条信号传递途径,这些途径间存在互通交叉。

细胞内的游离 Ca^{2+} 是细胞内信号传递的重要成员之一,与细胞凋亡的早期信号有关。有研究表明,细胞凋亡的过程中通常会伴随 Ca^{2+} 浓度的升高。 Ca^{2+} 浓度的升高可以激活细胞内的一

些蛋白酶、磷脂酶和一些内源性的核酸酶,这些酶对 Ca^{2+} 敏感,是细胞内高浓度 Ca^{2+} 的直接靶分子。如细胞内源性核酸内切酶是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性的,当细胞内 Ca^{2+} 浓度上升时,该核酸内切酶被激活,进而在核小体联结处剪切,产生核小体或者寡聚核小体^[21],因此发生凋亡的细胞在琼脂糖凝胶电泳时会出现特征性梯形条带;此外, NICOTERA 等^[22] 的研究结果表明,正常状态下细胞核内 pH 较低,有利于染色质折叠,而 Ca^{2+} 可以和 ATP 一起作用,使得胞内 pH 升高,不仅使得染色质结构变松散,暴露出水解部位,而且利于核酸内切酶活性,表现出 DNA 断裂症状。细胞内 pH 的变化也破坏细胞内环境平衡,促进细胞凋亡。

本研究中 MTT 的结果表明, YTX 的加入可以抑制 HeLa 细胞增殖,通过形态学观察、琼脂糖凝胶电泳以及线粒体膜电位分析发现,与 YTX 孵育一段时间后 HeLa 细胞产生典型凋亡症状,如形成凋亡小体、DNA 断裂片段化以及线粒体膜电位崩坏。进一步通过加载 Fluo-3 荧光探针研究 YTX 对细胞内 Ca^{2+} 的作用,发现 YTX 的加入能使细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,这也许是 YTX 可以诱导 HeLa 细胞发生凋亡的原因。使用 EGTA 螯合掉缓冲液中的 Ca^{2+} ,可以抑制 YTX 加入所造成的细胞内 Ca^{2+} 浓度升高现象,而继续在培养环境中加入 Ca^{2+} ,则细胞内 Fluo-3 的荧光强度有增强的趋势, YTX 可能通过使细胞外 Ca^{2+} 内流而造成胞内 Ca^{2+} 浓度升高。细胞表面存在多种亚型的电压依赖性钙离子通道,针对不同的亚型,存在不同的选择性阻断剂,硝苯吡啶就是其中一种选择性作用于 L-型钙离子通道的二氢吡啶类阻断剂。在本研究加入了硝苯吡啶阻断 HeLa 细胞表面的 L-型钙离子通道,然后加入 YTX,结果发现硝苯吡啶能完全阻断 YTX 所造成的 HeLa 细胞内荧光强度的变化,即细胞内的 Ca^{2+} 浓度没有上升, YTX 的靶目标可能是细胞膜表面的 L-型钙离子通道蛋白。推测 YTX 作用的机制可能如下:首先 YTX 作用于细胞表面的钙离子通道,使得胞外 Ca^{2+} 内流而细胞质 Ca^{2+} 浓度升高;细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高使得一些相关蛋白质及酶类如内源性核酸内切酶、蛋白酶被活化,激发细胞凋亡;此外, Ca^{2+} 作为第二信使参与信号传导并且与其他的信号传导途径相交叉,可以影响其他信号分子

如环-磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、三磷酸肌醇(inositol 1,4,5-trisphosphate, IP₃)等的浓度。YTXs 能使细胞内的 cAMP 水平发生变化^[23-25]有可能也是因为这个原因,cAMP 在细胞凋亡过程中起了非常重要的调节作用,与导致细胞凋亡的蛋白质磷酸化相关。细胞内大量的 Ca²⁺能与钙调素(Calmodulin, CaM)结合,形成有活性的形式,进而激活腺苷酸环化酶,引起胞内 cAMP 浓度的上升。不仅如此, Ca²⁺浓度的变化还对线粒体膜电位造成影响,将凋亡信号不断放大,促进凋亡进程。

总之,细胞凋亡的分子机制本身就不是一个单一的过程,而是一系列的生化反应作用的结果,因此 YTX 诱发凋亡的机制可能不仅仅是影响钙离子通道,还有可能通过影响细胞内其他物质的存在状态、破坏细胞内环境稳定等途径实现,这些都将在进一步的研究中进行探讨。

参考文献:

- [1] 黄美珍,许翠娅.有害有毒赤潮的研究与防治对策[J].福建水产,2007,115:71-74.
- [2] 高春蕾,刘仁沿,梁玉波,等.虾夷扇贝毒素 Yessotoxins(YTXs),中国沿海贝类中首次发现的一组贝类生物毒素[J].海洋学报,2010,32(3):129-137.
- [3] PAZ B, DARANAS A H, NORTE M, *et al.* Yessotoxins, a group of marine polyether toxins; an overview[J]. Marine Drugs, 2008, 6(2): 73-102.
- [4] MURATA M, KUMAGAI M, LEE J S, *et al.* Isolation and structure of yessotoxin. a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning[J]. Tetrahedron Letters, 1987, 28(47): 5869-5872.
- [5] YASUMOTO T, TAKIZAWA A. Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by highpressure liquid chromatography[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(10): 1775-1777.
- [6] SATAKE M, MACKENZIE L, YASUMOTO T. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin[J]. Natural Toxins, 1997, 5(4): 164-167.
- [7] HOWARD M D A, MARY S, KUDELA R M. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the U. S. west coast [J]. Harmful Algae, 2008, 7(5): 646-652.
- [8] OGINO H, KUMAGAI M, YASUMOTO T. Toxicologic evaluation of yessotoxin [J]. Natural Toxins, 1997, 5(6): 255-259.
- [9] DE LA ROSA L A, ALFONSO A, VILARINO N, *et al.* Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin[J]. Biochemical Pharmacology, 2001, 61(7): 827-833.
- [10] TOYOFUKU H. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report) [J]. Marine Pollution Bulletin, 2006, 52(12): 1735-1745.
- [11] AUNE T, SØRBY R, YASUMOTO T, *et al.* Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice[J]. Toxicon, 2002, 40(1): 77-82.
- [12] TUBARO A, GIANGASPER A, ARDIZZONE M, *et al.* Ultrastructural damage to heart tissue from repeated oral exposure to yessotoxin resolves in three months[J]. Toxicon, 2008, 51(7): 1225-1235.
- [13] TUBARO A, SOSA S, CARBONATTO M, *et al.* Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice [J]. Toxicon, 2003, 41(7): 783-792.
- [14] TUBARO A, SOSA S, ALTINIER G, *et al.* Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice [J]. Toxicon, 2004, 43(4): 439-445.
- [15] FRANCHINI A, MARCHESINI E, POLETTI R, *et al.* Acute toxic effect of the algal yessotoxin on Purkinje cells from the cerebellum of Swiss CD1 mice[J]. Toxicon, 2004, 43(3): 347-352.
- [16] FRANCHINI A, MARCHESINI E, POLETTI R, *et al.* Lethal and sub-lethal yessotoxin dose induced morpho-functional alterations in intraperitoneal injected Swiss CD1 mice[J]. Toxicon, 2004, 44(1): 83-90.
- [17] MALAGUTI C, CIMINIELLO P, FATTORUSSO E, *et al.* Caspase activation and death induced by yessotoxin in Hela cells [J]. Toxicology in Vitro, 2002, 16(4): 357-363.
- [18] PÉREZ-GÓMEZ A, FERERRO-GUTIERREZ A, NOVELLI A, *et al.* Potent neurotoxic action of the shellfish biotoxin yessotoxin on cultured cerebellar neurons [J]. Toxicological Sciences, 2006, 90(1): 168-177.
- [19] KORSNES M S, HETLAND D L, ESPENES A, *et al.* Induction of apoptosis by YTX in myoblast cell

- lines via mitochondrial signalling transduction pathway [J]. *Toxicology in Vitro*, 2006, 20 (8) : 1419 – 1426.
- [20] KORSNES M S, HETLAND D L, ESPENES A, *et al.* Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse [J]. *Toxicology in Vitro*, 2006, 20 (7) : 1077 – 1087.
- [21] WYLLIE A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation [J]. *Nature*, 1980, 284 : 555 – 556.
- [22] NICOTERA P, BELLOMO G, ORRENIUS S. The Role of Ca^{2+} in Cell Killing [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1990, 3 (6) : 484 – 494.
- [23] ALFONSO A, DE LA ROSA L A, VIEYTES M R, *et al.* Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 65 (2) : 193 – 208.
- [24] PAZOS M J, ALFONSO A, VIEYTES M R, *et al.* Kinetic analysis of the interaction between yessotoxin and analogues and immobilized phosphodiesterases using a resonant mirror optical biosensor [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, 18 (7) : 1155 – 1160.
- [25] PAZOS M J, ALFONSO A, VIEYTES M R, *et al.* Study of the interaction between different phosphodiesterases and yessotoxin using a resonant mirror biosensor [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, 19 (6) : 794 – 800.

Apoptosis and intracellular calcium level change induced by yessotoxin in HeLa cells

PANG Min^{1*}, QU Pei^{1,2}, GAO Chun-lei¹, WANG Zong-ling¹, ZHANG Yi³

(1. *The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China;*

2. *College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;*

3. *College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)*

Abstract: The marine toxin yessotoxin (YTX) and its analogues have been detected in shellfish samples in Chinese coastal areas and they pose a potential threat to public health. Many YTXs toxicity studies have been carried out worldwide, but the process is still indeterminate. In order to study the toxicity of yessotoxin on HeLa cells and analyze the possible action mechanism, MTT assay, optical microscope observation, Hoechst 33342 chromatin staining, DNA gel electrophoresis, rhodamine 123 staining, and calcium-sensitive laser scanning confocal microscopy were conducted in this paper. The results demonstrated that YTX could induce a significant reduction of HeLa cell viability and the cytotoxicity of the toxin was dose-dependent. Meanwhile, the usual hallmarks of apoptosis could be detected, including chromatin condensation, DNA laddering, and loss of mitochondrial membrane potential. Furthermore, YTX caused cytosolic calcium levels to increase in HeLa cells. The change of intracellular calcium concentration may be the main cause of cell apoptosis induced by YTX.

Key words: yessotoxin; HeLa cells; apoptosis; mitochondria transmembrane potential; calcium level

Corresponding author: PANG Min. E-mail: pangmin@fio.org.cn