

氯化锰致 PC12细胞凋亡作用及其机制

王萍, 宋世震*

(武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: 目的 探讨氯化锰诱导 PC12细胞凋亡的作用机制。方法 以 PC12细胞为多巴胺能神经元的细胞模型, 采用 MTT比色法检测细胞生长情况, 流式细胞术 (FCM) 及 DNA琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 检测 PC12细胞的凋亡情况, 免疫组化法检测 PC12细胞 HSP70、Survivin、Bcl2和 Bax表达情况。结果 锰能抑制 PC12细胞的增殖, 呈时间-剂量效应关系; 并能诱导其凋亡, 呈浓度依赖性; 凋亡过程中 Bax的表达呈浓度依赖性增强, 且与凋亡之间呈正相关关系 ($R_1=0.972$, $P<0.01$), 而 HSP70、Survivin和 Bcl2的表达呈浓度依赖性下调, 且与凋亡之间呈负相关关系 ($R_2=-0.990$, $R_3=-0.976$, $R_4=-0.980$, P 均 <0.01)。结论 锰对 PC12细胞的凋亡具有诱导作用, 而上调 Bax的表达和下调 HSP70、Survivin及 Bcl2的表达可能是其诱导 PC12细胞凋亡的作用机制之一。

关键词: 锰; PC12细胞; 凋亡

中图分类号: R993.0612.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)04-0225-04

Study on apoptosis of PC12 cell by manganese chloride and its mechanism

WANG Ping, SONG Shi-zhen*

(School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

Abstract: Objective To explore the possible mechanism of manganese induced apoptosis in PC12 cells. Methods Using PC12 cells as the model of dopaminergic neuron, MTT colorimetry test was used to detect the growth and survival state of PC12 cells in various doses of manganese chloride; apoptosis was detected by flow cytometry (FCM) and agarose gel electrophoresis (AGE); and immunocytochemistry was used to measure the expression and location of HSP70, Survivin, Bcl2 and Bax. Results The results shown that manganese might suppress the proliferation of PC12 cells in dose and time dependent manner, and might dose dependently induce PC12 cells apoptosis; manganese chloride might also promote the expression of Bax in dose dependent manners, which had a positive correlation to PC12 cells apoptosis ($R_1=0.972$, $P<0.01$); additionally, manganese chloride might dose dependently inhibited the expression of HSP70, Survivin and Bcl2 in PC12 cells as well, which had a negative correlation to PC12 cell apoptosis ($R_2=-0.990$, $R_3=-0.976$, $R_4=-0.980$, $P<0.01$). Conclusions Manganese can induce PC12 cells apoptosis; the enhanced expressions of Bax and the prohibited expressions of HSP70, Survivin, Bcl2 may be the concrete pathway involved the mechanism of manganese induced apoptosis of PC12 cells.

Key words: Manganese; PC12 cell; Apoptosis

锰 (manganese) 是人体必需的微量元素之一, 但长期暴露于低浓度的锰环境可导致慢性锰中毒, 其中毒主要表现为锥体外系神经元损伤, 类似帕金森综合征^[1]。研究表明, 神经细胞凋亡在锰的多巴胺能神经毒性中起着重要作用^[2], 而锰可通过降低过氧化物酶的活性, 干扰细胞 DNA代谢诱导神经细胞凋亡^[3], 但锰诱导神经细胞凋亡的机制还有待于进一步探讨。本文以多巴胺能神经元 PC12细胞为研究对象, 通过观察锰对细胞凋亡的影响及与凋亡相关基因 HSP70、Survivin、Bcl2和 Bax表达之间的关系, 探讨其诱导 PC12细胞的凋亡作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

氯化锰 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), DMEM (Gibco USA)、胎牛血清 (杭州四季青)、MTT (Sigma USA)、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒 (武汉博士德生物有限公司)、兔多抗 HSP70和 Survivin鼠单抗、Bcl2和 Bax均购自北京中杉金桥生物技术有限公司)、SP免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)、倒置显微镜 (日本 OLYMPUS)、CO₂ 培养箱 (日本 SONYON)、流式细胞仪 (美国 BD公司)。

1.2 细胞培养

PC12细胞购自中科院细胞库上海细胞生物研究所, 悬浮培养于含 10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/m青霉素和 100 μ g/m链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。选取对数

收稿日期: 2008-01-24 修回日期: 2008-04-30

基金项目: 湖北省卫生厅医药卫生科研计划 (X1B127)

作者简介: 王萍 (1978-), 女, 硕士研究生。

* 通讯作者, 硕士研究生导师, 教授, 从事分子毒理学研究。

生长期、生长良好、细胞活性大于 98% 的 PC12 细胞用于实验。

1.3 细胞生长活性检测

采用溴化二甲噻唑二苯四氮唑蓝 (MTT) 比色法。将不同浓度的 $MnCl_2$ 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 使其终浓度为 0、200、400、800、1 600 $\mu\text{mol/L}$, 调整细胞浓度为 1×10^5 个 / ml 接种于 96 孔培养板, 每种剂量为一组, 每个浓度 6 个平行孔, 置 37°C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h、48 h、72 h 后, 弃上清, 每孔加 20 μl MTT 培养 4 h 弃 MTT 加二甲基亚砷 (DMSO) 150 μl 充分溶解, 选择 490 nm 波长, 酶联免疫检测仪上测定各孔 A 值。PC12 细胞生长抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

用 Annexin-V-FITC 及 PI 双标流式细胞术检测细胞凋亡。收集 0、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 氯化锰处理 24 h 的 PC12 细胞 (每组约 5×10^6 个), 用 PBS 缓冲液洗 1 次, 去上清, 用 70% 乙醇 4°C 固定 2 h, PBS 缓冲液洗去固定液, 离心弃上清。用结合缓冲液 37°C 孵育 60 min, 195 μl 细胞悬液加 5 μl Annexin-V-FITC 混匀, 室温 10 min, 用缓冲液洗涤细胞一次, 在 190 μl 缓冲液中重悬, 然后再加入 10 μl 碘化丙啶 (PI), 流式细胞仪检测。

1.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测凋亡 (DNA Ladder)

收集 200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ 处理 24 h 和 48 h 的 PC12 细胞 (每组约 5×10^6 个), 用 PBS 缓冲液洗 2 次, 去上清, 各加裂解缓冲液 (1% NP-40 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 50 μl 振荡 10 s, 1 600 离心 5 min, 收集上清液再加入等体积的裂解缓冲液重复上述步骤一次, 收集上清于 Eppendorf 管中加 SDS (终浓度为 1%) 和 $RnaseA$ (终质量浓度为 5 g/L) 56°C 作用 2 h 加蛋白酶 K (终质量浓度为 2.5 g/L) 37°C 消化 2 h 再加入 1/2 体积的 10 mol/L 醋酸铵和 2.5 倍体积的无水乙醇后可见 DNA 有沉淀析出, 将沉淀溶解于 20 μl 1 \times DNA 上样缓冲液, 取全部 20 μl 上清上样 1% 琼脂糖凝胶电泳 (60 V, 40 min), 凝胶成像系统分析。

1.6 免疫组化法检测 PC12 细胞 HSP70、Survivin、Bcl2 和 Bax 表达及定位

采用酶标抗体染色法 (间接法)。取对数生长期的 PC12 细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 个 / ml 接种到 12 孔培养板中 (2 ml/孔), 加 $MnCl_2$ 使其终浓度为 0、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$, 置 CO_2 孵箱培养 24 h 后收集

细胞, PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 冲洗 2 遍, 调整细胞悬液密度为 1×10^6 个 / ml , 50 μl 片均匀涂于经多聚赖氨酸处理的载玻片上, 室温干燥, 冷丙酮固定 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 0.3% 过氧化氢-甲醇, 37°C 封闭 30 min, PBS 洗 3 次, 5 min, 滴加非免疫动物血清 (SP 免疫组化试剂盒蓝色试剂), 置湿盒中 37°C 封闭 30 min, 甩去血清; 分别滴加特异性抗体 HSP70、Survivin、Bcl2 和 Bax, 湿盒内 4°C 过夜; PBS 振洗 3 次, 每次 5 min, 滴加生物素标记二抗 (黄色试剂), 湿盒内 37°C 15 min, PBS 振洗 3 次, 每次 5 min, 滴加链霉素抗生物素标记三抗, 湿盒内 37°C 15 min, PBS 振洗 3 次; 浸入新鲜配置的浓度为 0.05% 的联苯二胺 (DAB), 室温下置暗处显色 3~5 min, PBS 终止显色; 浸入苏木精染液染色 5 min, 自来水洗, 迅速过盐酸乙醇溶液, 自来水洗, 过碳酸锂溶液反蓝, 自来水洗; 过 70%、80%、90% 乙醇 1 次, 无水乙醇 2 次, 每次 1 min, 逐级脱水; 过二甲苯溶液 2 次, 每次 1 min, 透明; 中性树脂封片。特异性对照采用 PBS 代替一抗, 其余步骤相同。采用高清晰彩色医学图文分析系统 HMAS2000 型, 对免疫细胞化学反应进行图像分析, 每张片取 3 个视野, 测定其平均吸光度。以平均吸光度值的变化, 表示 HSP70、Survivin、Bcl2 和 Bax 蛋白表达的变化。

1.7 统计学分析

所测数据均用 SPSS 1.5 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 不同浓度 $MnCl_2$ 对 PC12 细胞生长的抑制作用

表 1 可知 200~1 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ 对 PC12 细胞有抑制作用, 200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的 $MnCl_2$ 作用 48 h 对细胞的抑制率分别是 47.0%、58.4%, 不同剂量 $MnCl_2$ 对 PC12 细胞的抑制率随作用时间的延长和浓度的上升而增强, 呈现出时间和浓度依赖趋势。各实验组与对照组相比及实验组间两两比较差异有统计学意义。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化

不同浓度 $MnCl_2$ 作用 24 h 随着浓度的增大 PC12 细胞凋亡率逐渐增高, 对照组为 (0.63 \pm 0.03)%, 200 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (8.72 \pm 0.13)%, 400 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (14.97 \pm 0.26)%, 800 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (53.60 \pm 0.18)%, 各实验组与对照组相比及实验组间两两比较差异有统计学意义, 呈浓度依赖性。

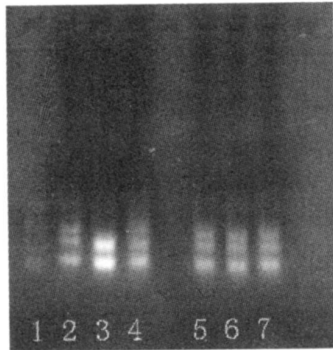
2.3 不同浓度 $MnCl_2$ 对 PC12 细胞凋亡的诱导作用

提取不同浓度 $MnCl_2$ 处理 24 h 及 48 h 的 PC12 细胞的 DNA, 在含有 EB 的 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 可见细胞 DNA 呈典型的梯状条带 (图 1), 说明氯化锰能诱导 PC12 细胞凋亡。

表 1 不同浓度 $MnCl_2$ 对 PC12细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

$MnCl_2$ 剂量 ($\mu mol/L$)	24 h		48 h		72 h	
	光密度值	抑制率 (%)	光密度值	抑制率 (%)	光密度值	抑制率 (%)
对照 (A组)	0.805 ± 0.064		1.747 ± 0.030		1.665 ± 0.062	
200 (B组)	0.674 ± 0.059*	16.4	0.926 ± 0.076*	47.0	0.628 ± 0.045*	62.3
400 (C组)	0.514 ± 0.021*	36.2	0.726 ± 0.074*	58.4	0.429 ± 0.042*	74.3
800 (D组)	0.239 ± 0.025* ◆	70.3	0.268 ± 0.040* ◆	84.7	0.330 ± 0.017* ◆	80.2
1 600 (E组)	0.117 ± 0.018* ◆▲	85.5	0.136 ± 0.013* ◆▲	92.2	0.214 ± 0.016* ◆▲	87.2

B组、C组、D组、E组与 A组比较, * P<0.01; C组、D组、E组与 B组比较, P<0.05 D组、E组与 C组比较, ◆ P<0.05 E组与 D组比较, ▲ P<0.05



注: 1为 Marker 2、3、4分别为 200、400、800 $\mu mol/L$ $MnCl_2$ 作用 24 h结果; 5、6、7为 200、400、800 $\mu mol/L$ $MnCl_2$ 作用 48 h结果。

图 1 $MnCl_2$ 对 PC12细胞凋亡的诱导作用

表 2 $MnCl_2$ 处理 PC12细胞 24 h后 HSP70、Survivin、Bcl2和 Bax平均吸光值 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

$MnCl_2$ 剂量 ($\mu mol/L$)	HSP70	Survivin	Bcl2	Bax
对照 (A组)	2.466 ± 0.056	3.634 ± 0.055	3.704 ± 0.017	2.025 ± 0.079
200 (B组)	2.273 ± 0.026*	3.431 ± 0.032*	3.528 ± 0.047*	2.269 ± 0.022*
400 (C组)	2.098 ± 0.023*	3.217 ± 0.026*	3.353 ± 0.041*	2.493 ± 0.019*
800 (D组)	1.813 ± 0.028* ◆	2.983 ± 0.060* ◆	3.147 ± 0.027* ◆	2.725 ± 0.028* ◆

B组、C组、D组与 A组比较, * P<0.01; C组、D组与 B组比较, P<0.05 D组与 C组比较, ◆ P<0.05

3 讨论

细胞凋亡是由多种凋亡相关基因共同参与的细胞程序性死亡过程,是维持正常发育和生理功能所必需的,而分化成熟的神经细胞发生凋亡则会引发病理性损害,如阿尔茨海默病 (Alzheimer disease) 和帕金森病 (Parkinson's disease)^[4]。锰作为一种细胞毒性物质,可导致神经细胞凋亡。本次实验用流式细胞术及 DNA琼脂糖凝胶电泳对染锰的多巴胺能 PC12细胞的凋亡情况进行检测,证实了这一结论,且发现 PC12细胞凋亡呈浓度依赖性。运用免疫组化法对凋亡相关基因 HSP70、Survivin、Bcl2 和 Bax进行检测,发现以上基因的表达与氯化锰所致的 PC12细胞凋亡之间存在一定的相关关系,并在凋亡过程中发挥了重要作用。

热休克蛋白 70 (HSP70) 是热休克蛋白家族中的重要一员,作为“分子伴侣”能够参与细胞周期关键分子的调节,如 P53、Cdk4、cmyc等,调节细胞的生存和死亡。细胞内的 HSP70可抑制应激激活

2.4 不同浓度 $MnCl_2$ 对 PC12细胞 HSP70、Survivin、Bcl2和 Bax表达的影响

不同浓度氯化锰作用 24 h后 PC12细胞中 HSP70、Survivin、Bcl2和 Bax均有表达 (位于细胞膜和/或细胞质),其表达发生明显变化 (表 2), Bax表达随染毒剂量增加而增加,且与细胞凋亡之间呈正相关关系 ($R_1 = 0.972$ $P < 0.01$); HSP70、Survivin、Bcl2表达则随染毒剂量增加而减少,且与细胞凋亡之间呈负相关关系 ($R_2 = -0.990$ $R_3 = -0.976$ $R_4 = -0.980$ P 均<0.01)。

蛋白激酶 SAPK/JNK_s 抑制细胞凋亡信号转导中 caspase和氧自由基生成,并抑制 P53介导的细胞凋亡和 Bax的表达,在热休克、氧化应激、电离射线等引起的细胞凋亡中起保护作用^[5]。已证实 HSP70表达的增加能减少乳胞素诱导的 PC12细胞凋亡^[6],而本研究结果显示氯化锰可下调 HSP70表达,提示此一途径可能是锰诱导 PC12细胞凋亡的机制之一。

Survivin是凋亡抑制蛋白基因家族的新成员,Survivin基因定位于染色体的 17q25^[7],在细胞增殖的组织中均有表达,且与 Bcl2的表达呈正相关关系,两者能协同作用发挥抗凋亡效应^[8]。此外,Survivin能直接抑制 caspase3、caspase7和 caspase9的活性^[9],或通过抑制细胞色素 C的释放在线粒体水平参与抗凋亡作用。有资料显示,三氧化二砷可以通过降低 Survivin的表达诱导体外培养的人肾癌 GRC-1细胞凋亡^[10]。本研究中,氯化锰可下调 Survivin表达,故此一途径也可能是锰诱导 PC12细胞凋亡的一种机制。

Bcl2和 Bax是一对作用相反的凋亡调节基因,

都是 Bcl2 家族中的重要成员, 它们表达的蛋白在结构上具有同源性, 都有两个保守区域 BH1 及 BH2, 并各自通过这两个保守区域形成有功能的同源二聚体。Bax 基因广泛表达于脑及其他组织中, 通过形成 Bax-Bax 同源二聚体发挥促凋亡的作用。Bax 蛋白可直接和线粒体膜结合, 形成线粒体跨膜通道, 促进细胞色素 C 和凋亡诱导因子 (AF) 的释放^[11], 同时使质子、钙离子内流而产生氧反应产物 (ROS) 导致线粒体跨膜电位降低, 并激活一系列蛋白水解酶使细胞发生凋亡。研究表明 Bax 基因敲除的鼠感觉神经元表现出明显的减少凋亡倾向^[12]。Bcl2 蛋白则是分布于线粒体、内质网及核膜的一种抗凋亡蛋白, 具有稳定线粒体膜的功能, 其抑制凋亡的机制恰好与 Bax 相反; 此外, Bcl2 还可同 Bax 结合形成无功能的异源二聚体来抑制细胞凋亡。已证实, 过量表达 Bcl2 蛋白的 PC12 细胞有明显拮抗 DA 毒性的作用^[13]。本研究表明, 氯化锰可下调 Bcl2, 上调 Bax 的表达, 提示此一途径也可能介入锰诱导 PC12 细胞凋亡的机制。

本实验从凋亡调节基因水平探讨锰的神经毒性作用机制, 发现氯化锰诱导 PC12 细胞发生凋亡, 并显示这可能是多个凋亡相关基因共同参与的结果, 即可能系通过上调促凋亡基因 Bax 表达和下调凋亡抑制基因 Bcl2、HSP70 和 Survivin 的表达而最终导致细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 胡存丽, 邵文. 我国锰毒性研究现状 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000 14 (3): 185-187
- [2] Wang R G, Zhu X Z. Subtoxic concentration of manganese synergisti-

cally potentiates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. Brain Res 2003 961 (1): 131-140

- [3] 陈景元, 陈耀明, 骆文静, 等. 锰对多巴胺能神经细胞 PC12 的毒性及其机制研究 [J]. 卫生研究, 2002 31 (4): 223-225
- [4] 李凤有, 安中平. 细胞凋亡与神经系统疾病 [J]. 中国冶金工业医学杂志 2000 17 (2): 122-124
- [5] 黄晓兵. 热休克蛋白 70 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 四川肿瘤防治杂志, 2003 16 (1): 53-55
- [6] Tae B A, Beom S J. Protective role of heat shock and heat shock protein 70 in lactacystin-induced cell death both in the rat substantia nigra and PC12 cells [J]. Brain Research 2006 1087 (1): 159-167.
- [7] Ambrosini G, Adida C, Simeoni G, et al. Induction of apoptosis and inhibitor of cell proliferation by survivin gene targeting [J]. J Biol Chem 1998 273 (18): 11177-11182
- [8] Rchayem J, Diestelkoetter P, Wegle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients [J]. Cancer Res 2000 60 (7): 1815-1817.
- [9] Hauser H P. A glutathione-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors [J]. Mol Cell Biol 1998 141 (6): 1415-1422
- [10] 徐万海, 王晓民, 高琳, 等. 三氧化二砷对肾癌 GRC-1 细胞凋亡及 P53、Survivin 基因表达的影响 [J]. 中国地方病学杂志, 2006 25 (5): 520-522
- [11] Reed J C. Double identity for proteins of the bcl-2 family Nature 1997 387 (3): 773-776
- [12] White F A, Keller Peck C R, Kindson C M, et al. Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice [J]. Neurosci 1998 18 (2): 1428-1439
- [13] Offen D, Ziv, I, Panet H, et al. Dopamine-induced apoptosis is inhibited in PC12 cells expressing Bcl-2 [J]. Cell Mol Neurobiol 1997 17 (3): 289-304

中华预防医学会劳动卫生与职业病分会 30 周年暨第十次全国劳动卫生与职业病学术会议征文通知

经中华预防医学会批准, 中华预防医学会劳动卫生与职业病分会将于 2009 年 4 月 15 ~ 19 日在杭州召开成立 30 周年庆祝大会暨第十次全国劳动卫生与职业病学术会议。本次会议的主题是“防治职业病, 共享健康工作”。会议将为我国劳动卫生职业病学界的广大科技工作者和管理人员提供学术交流、分享信息和科技成果的讲坛。现将会议征文通知如下。

征文内容: (1) 职业危害防治的基础、临床及流行病学研究; (2) 基本职业卫生服务与健康促进; (3) 职业病危害风险评估、预防控制措施及效果评价; (4) 职业病防治立法、服务、监督、管理; (5) 职业卫生突发事件与应急响应; (6) 职业病危害因素对女性劳动者健康影响的研究; (7) 劳动生理、人机功效、职业紧张等方面的研究; (8) 劳动卫生与职业病领域的高新技术应用研究; (9) 检测仪器设备和防护用品研究; (10) 其他与劳动卫生职业病相关领域的研究与实践。

征文范围: 未公开发表的有关上述内容的科研、临床实践、职业卫生服务和监督检查论文。欢迎从事职业卫生和职业医学工作的科研、教学人员, 基层从事职业卫生服务和职业病防治工作的专业人员; 从事职业卫生管理的卫生行政人员, 企业从事职业卫生安全的管理和技术人员; 从事工程防护的工程技术人员; 从事检测分析仪器、设备、个人防护用具的企业和技术人员投稿并参加会议。

会议将设青年论坛, 安排年龄 35 周岁以下的优秀青年工作者专题交流, 投稿时请注明“青年论坛”。

征文要求: (1) 论文全文应在 5000 字之内, 必须附 400 ~ 800 字的论文摘要。摘要内容包括: 题目 (题目下注明作者及第一作者的单位和通信地址)、目的、方法、结果和结论。(2) 会议将进行优秀论文评选并推荐《中华劳动卫生职业病杂志》发表, 论文一律采用电子版, 请用 Word 文档编写, 电子邮件附件发送至 319@chz.com; (3) 来稿同时请交稿件审理费 20 元。稿件审理费请寄至: 杭州市天目山路 182 号浙江省医学科学院卫生学研究所, 朱丽瑾收。邮编 310013。征文截稿日期: 2008 年 11 月 30 日。