

醋酸铅对 ST-8814细胞神经丝蛋白、微管结合蛋白 mRNA水平的影响

逯晓波¹, 李莉², 王宁³, 蔡静仪¹, 毕建蕾¹

(1 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110004; 2 中国医科大学生物物理教研室, 辽宁 沈阳 110004; 3 辽宁省人民医院骨外科, 辽宁 沈阳 110015)

摘要: 目的 初步探讨铅的周围神经毒性是否与其对神经细胞骨架蛋白表达的影响相关。方法 ST-8814细胞作为周围神经体外细胞模型, 100 μmol/L醋酸铅染毒 24 h后, 实时定量 PCR扩增仪分析神经丝各亚型 (NF-H, NF-M, NF-L) 及微管结合蛋白 MAPT基因 mRNA水平的改变。结果 100 μmol/L醋酸铅对 ST-8814细胞的抑制率约为 50%, 100 μmol/L醋酸铅处理 ST-8814细胞前后神经丝各亚型基因 NF-H, NF-M及 NF-L的 mRNA表达无明显差别; 微管结合蛋白 MAPT基因 mRNA水平升高。结论 铅的周围神经毒性可能与其影响微管结合蛋白 MAPT的表达, 导致神经细胞骨架某些成分的功能变化有关。

关键词: 铅; 神经丝; 微管结合蛋白; 周围神经毒性

中图分类号: O627.42 R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)01-0007-03

Effect of lead acetate on mRNA expression of neurofilament protein and microtubule associated protein in ST-8814 cell line

LU Xiaobo, LI Li, WANG Ning, CAI Jingyi, BI Jianlei

(1 School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2 Department of Biophysics, China Medical University, Shenyang 110004, China; 3 Liaoning People Hospital, Shenyang 110015, China)

Abstract: Objective To investigate whether the toxicity of lead on peripheral nerves is relative to its effect on the expression of cytoskeletal protein in neurocytes in vitro. Methods ST-8814 cell line separated from Schwannoma as a peripheral nervous system (PNS) model was used and exposed to 100 μmol/L of lead acetate for 24 hours. The mRNA levels of neurofilament composition (NF-H, NF-M, NF-L) and microtubule associated protein Tau (MAPT) were measured by real time PCR. Results Expression of MAPT mRNA was significantly increased in the cells exposed to 100 μmol/L of lead acetate as compared to the control; however there was no significant difference in expression of NF-H, NF-M and NF-L mRNA in lead exposed cells. Conclusions The results showed that the toxicity in peripheral nervous system seemed related to its effect on microtubule associated protein which could change the composition and function of cytoskeletal protein in nervous cells.

Key words: Lead toxicity; Neurofilament; Microtubule associated protein (MAP); Peripheral nervous system

铅是环境中广泛存在的重金属毒物, 能引起中枢及周围神经系统的损伤。铅对周围神经系统 (PNS) 的毒性效应与成年人神经行为改变相关。在职业性铅暴露人群中, 腕下垂是较早被发现的周围神经系统损伤表现; 临床和电生理研究也发现慢性铅暴露人群存在末梢局部感觉障碍, 痛, 针刺样感觉, 踝反射减弱或消失, 运动和感觉系统神经传导速度 (NCV) 显著降低等表现^[1]。铅对周围神经系统的毒性作用机制尚不完全清楚。神经丝 (neurofilament)、微管 (microtubule) 及微丝是构成神经细胞骨架的结构成分, 对于维持轴突完整性及其功能具有重要意义。有些神经毒物可以引起神经组织细胞骨架成分的明显变化, 成为可能的神经毒性机制之一^[2], 神经丝蛋白

(neurofilament, NF) 和微管结合蛋白 (microtubule associated protein, MAP) 成分及功能改变在近年来的研究中备受关注^[3]。本研究以源于 Schwannoma细胞系的 ST-8814细胞作为周围神经体外细胞模型, 应用实时定量 PCR技术探讨醋酸铅染毒所致神经丝蛋白组成成分 (NF-H, NF-M, NF-L) 及微管结合蛋白 -Tau (MAPT) 基因表达水平的变化, 以期对铅的周围神经毒性机制研究提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

7500/7300 Taqman实时定量 PCR扩增仪 (Applied Biosystem公司, 瑞典), Nanodrop核酸测定仪 (Eppendorf公司, 德国)。

1.2 主要试剂

醋酸铅 (分析纯), PCR工作缓冲液, SYBR green实时定量 PCR工作液 (SYBR green Real time

收稿日期: 2008-09-05

作者简介: 逯晓波 (1969-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 遗传毒理学及神经毒理学。

PCR Master Mix), RNA提取试剂盒 (RNAase mini kit), cDNA合成试剂盒 (Advantage™ RT-for-PCR), PBS (NaCl 145 mmol/L, 磷酸盐 1.4 mmol/L, pH 7.5)。

1.3 细胞系及细胞培养

ST-8814细胞用含 L-谷氨酰胺 0.3 g/L, 抗坏血酸 0.05 g/L, 碳酸氢钠 3.7 g/L, 青霉素钾 10万单位/L, 硫酸链霉素 0.1 g/L, 10% FCS的 MDM (Isco's Modified Dulbecco's Media) 培养基, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养备用。

1.4 实验方法

1.4.1 醋酸铅的细胞抑制率测定 (SRB法) 将 ST-8814细胞种植于 96孔细胞培养板, MEM培养液调细胞浓度为 8 000个/ml, 每孔接种 150 μl, 将培养板置于 CO₂ 细胞培养箱培养 24 h, MEM细胞培养液将醋酸铅稀释成以下不同浓度: 40 000, 4 000, 400, 40, 4及 0 μmol/L, 每个浓度设立 3个平行样, 每孔加入醋酸铅稀释液 50 μl, 培养板置于 CO₂ 细胞培养箱培养 24 h, 弃培养液, 每孔加新鲜培养液 200 μl, 继续培养 72 h, 弃培养液, 每孔加入冷的 50%三氯醋酸, 4°C固定 1 h, 弃 TCA, 0.4% SRB染色细胞 15 min以上, 0.1%醋酸清洗, 微量震荡器震荡 5 min, 在 570 nm波长处自动酶标仪进行比色, 测定每孔吸光度值, 取平均值。计算不同浓度醋酸铅的细胞抑制率应用以下公式: 细胞抑制率 (%) = (1 - 该浓度醋酸铅平均吸光度值 / 0浓度对照平均吸光度值) × 100%

以醋酸铅浓度为横轴, 细胞抑制率为纵轴, 绘制工作曲线并估算 IC₅₀。

1.4.2 总 RNA提取 根据醋酸铅的细胞抑制率测定, 选择 100 μmol/L浓度作为实验组醋酸铅浓度。将 ST-8814细胞种植于 T₂₅细胞培养板中, 待细胞生长密度达 50%时, 醋酸铅处理实验组细胞 24 h, 更换培养液, 另培养 24 h, PBS清洗细胞, β-Mercaptoethanol (β-ME) 溶解细胞后, 根据 QIAGEN RNA EasyMin操作手册, 提取总 RNA, 用 Nanodrop核酸定量分析仪测定 RNA的浓度及纯度。

1.4.3 cDNA合成 根据各细胞系总 RNA浓度, 使 20 μl 总反应体系中 RNA含量为 1 μg, 5×逆转录缓冲液 4 μl, 四种 dNTP混合液 2 μl, 随机引物 2 μl, RNase inhibitor 0.25 μl, 反转录酶 AMV 0.5 μl, 70°C解旋 10 min, 37°C, 1 h水浴后, -20°C保存备用。

1.4.4 实时定量 PCR技术测定目的基因 mRNA水平 用 7500 Taqman Real Time PCR扩增仪进行 NF-H, NF-M, NF-L及 MAPT mRNA水平分析。

采用 SYBR Green为荧光报告剂 (QPCR扩增后, 启用 Dissociation Curve程序以确保 PCR产物的特异性), QPCR 16 μl 反应体系中 10 pmol引物各 1 μl, cDNA 500 ng及 2× SYBR green qPCR Master Mix 8 μl, 体积不足时, 可以用灭菌水补齐。反应程序: 95°C 1 min, 95°C 15 min, 95°C 1 min, 64°C 1 min, 72°C 2 min, 40 cycle, 72°C 5 min。

对数模式图显示 PCR全过程, 在指数期内, 根据仪器使用指南及实际情况, 设定参数值, 得到每个 PCR反应的循环域 (Cycle Threshold, CT) 值, 即模板 cDNA 经 PCR扩增达到某一荧光强度的循环次数。本实验采用统一的参数 (基线值: 3~15和域值 0.20)。目标基因域值循环数 CT标准化定量分析可以根据内参考基因 β-2-Microglobulin及相应 Relative Quantification Std程序得出靶基因的 Log₁₀ΔCT, 同时进行 3个平行样分析。见表 1。

表 1 NF-H, NF-M, NF-L及 MAPT引物设计序列

	序列
NF-H Sense	5'-GCCGAATGCCACAGTAAACACTT-3'
NF-H Anti_sense	5'-AAAGTGGCCCTGGCATAATTTCAG-3'
NF-M Sense	5'-AGAATATGCACCAGCCGAAGAGT-3'
NF-M Anti_sense	5'-GCAAATGACGAGCCATTTCCTACT-3'
NF-L Sense	5'-AAGCATAACCAGTGGCTACTTCCCA-3'
NF-L Anti_sense	5'-TCTTGGCAGCTTCTTCTCTTCA-3'
MAPT Sense	5'-TCACCTTTACAGCAACAGTCAGTG-3'
MAPT Anti_sense	5'-TGCCATGTGAGCAGGACTA-3'
β-2-Microglobulin Sense	5'-GATGCTGCTTACATGTCTCTG-3'
β-2-Microglobulin Anti_sense	5'-CCAGCAGAGAATGAAAGTC-3'

1.4.5 资料分析 采用 Excel数据库录入数据, SPSS11.5统计软件进行统计分析。数据统计描述主要以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。根据数据的正态性, 选择 检验比较两组间差别, 选择 Pearson相关分析两变量间关联。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 醋酸铅对 ST-8814细胞生长的影响

不同浓度醋酸铅处理 ST-8814细胞 24 h后, 细胞生长发生明显改变, 随着醋酸铅浓度增加, 细胞抑制率增加, 以剂量和细胞抑制率均值的 Pearson相关分析表明, 细胞抑制率与醋酸铅浓度呈正相关, 并具有统计学意义 ($r = 0.879$, $P = 0.021$)。见表 2。

2.2 醋酸铅对 ST-8814细胞神经丝蛋白各组成的影响

如图 1所示, 100 μmol/L醋酸铅处理 ST-8814细胞 24 h后, 更换培养液继续培养 24 h, 测定神经丝各组成蛋白 mRNA水平的改变。结果表明三种神经丝组成蛋白 NF-H, NF-M及 NF-L的 mRNA水平变化不明显 ($P > 0.05$)。

表 2 不同浓度醋酸铅处理 SF-8814后细胞抑制率的改变 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	n	细胞抑制率 (%)
0	3	0
0.1	3	3±4
1	3	16±5
10	3	33±16
100	3	52±13
1 000	3	94±19

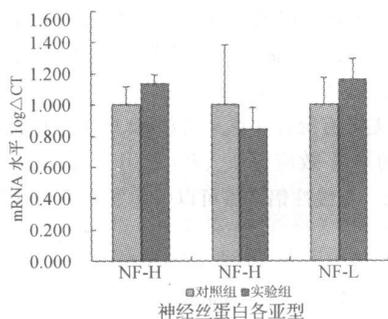


图 1 100 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅对 SF-8814细胞神经丝各组成蛋白 mRNA水平的影响

2.3 醋酸铅对 SF-8814细胞微管结合蛋白 MAPT的影响

由图 2可见, 100 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅处理 SF-8814细胞 24 h后, 更换培养液继续培养 24 h 测定 MAPT mRNA水平的改变情况。结果表明与对照组相比, MAPT mRNA水平发生变化, 经两样本 t 检验分析, 差别具有统计学意义 ($t=4.414$ $P=0.012$)。

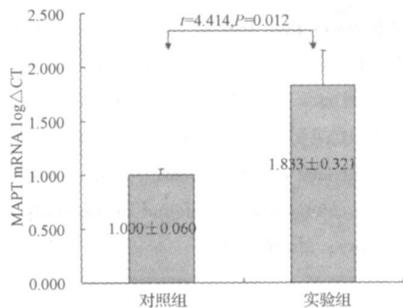


图 2 100 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅对 SF-8814细胞微管相关蛋白 MAPT mRNA水平的影响

3 讨论

细胞骨架在维持神经细胞的形态、运动功能、轴突的空间构型及正常的神经细胞传导速度中发挥重要作用。神经纤维丝 (NF) 是含量丰富的神经细胞骨架成分, NF共有三种亚型蛋白, 分别为 NF-L, NF-M和 NF-H型, 形成多聚体结构而发挥作用。研究认为微丝蛋白的基因表达通过影响轴突的直径而调控电信号的传导速度。有研究表明神经毒物砷可以引起 NF各组成改变, NF-L亚型蛋白表达随砷暴露呈剂量反应关系的变化, 可能成为砷的神经毒性机制之一^[4]。微管是另外一种细胞骨架的重要成分, 与细胞发生、运动、维持细胞形态及轴浆转运有关。在细

胞内, 微管除含有微管蛋白外, 还含有一些同微管相结合的辅助蛋白, 参与微管的装配, 称为微管结合蛋白 (MAP)。MAP在细胞中起稳定微管结构、促进微管聚合和调节微管装配的作用。MAP的磷酸化在控制微管蛋白活性和细胞定位中起到重要作用。一类微管结合蛋白质称为 Tau蛋白即 MAP1蛋白, 其过表达会产生极短的突出区域, 使微管在成束时紧密。转基因动物研究显示, 神经丝蛋白表达减少不仅能上调微管蛋白基因的表达, 而且会加快微管的组装^[5]。

本研究中, 以源于 Schwannoma神经纤维瘤细胞系 SF-8814细胞作为周围神经体外细胞模型, 探讨 100 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅对 SF-8814细胞神经丝蛋白各组成成分及微管结合蛋白 MAPT mRNA的影响, 虽然并未发现神经丝三种亚型基因 mRNA在醋酸铅处理前后发生明显改变, 但 MAPT基因 mRNA表达升高。神经微管蛋白表达升高在糖尿病神经退行性病变中也有报道^[6]。轴索截断研究中也观察到 NF表达下降, 微管蛋白升高现象^[7]。我们推测, 由于细胞骨架存在由亚单位到骨架蛋白的聚合、解聚、降解的动态平衡过程, 这对于维持神经系统的正常结构和功能至关重要。染铅使 SF-8814细胞微管结合蛋白 MAPT表达发生变化, 从而使微管、微丝含量变化, 提示铅干扰了细胞骨架蛋白的生物合成过程, 使其代谢平衡出现紊乱, 这可能与铅致周围神经系统损害的机制有关。

参考文献:

- [1] Tassler P L, Schwartz B S, Coresh J et al. Associations of tibial lead, DMSA-chelatable lead, and blood lead with measures of peripheral nervous system function in former organolead manufacturing workers [J]. *Am J Ind Med* 2006; 39 (3): 254-261.
- [2] Shea T B, Jung C, Pant H C. Does neurofilament phosphorylation regulate axonal transport? [J]. *Trends Neurosci* 2003; 26 (8): 397-400.
- [3] Jones L G, Prins J, Park S et al. Lead exposure during development results in increased neurofilament phosphorylation, neuritic beading, and temporal processing deficits within the murine auditory brainstem [J]. *J Comp Neurol* 2008; 506 (6): 1003-1017.
- [4] Vahidnia A, Romijn F, Tiller M et al. Arsenic induced toxicity effect on protein composition in sciatic nerve [J]. *Hum Exp Toxicol* 2006; 25 (11): 667-674.
- [5] Garcia M L, Cleveland DW. Going new places using an old MAP: tau, microtubules, and human neurodegenerative disease [J]. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13 (1): 41-48.
- [6] Liuzzi F J, Bufton SM, Vitek A J. Streptozotocin induced diabetes mellitus causes changes in primary sensory neuronal cytoskeletal mRNA levels that mimic those caused by axotomy [J]. *Exp Neurol* 1998; 154 (2): 381-388.
- [7] Zhu Q, Lindenbaum M, Levavasseur F et al. Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta-microglobulin [J]. *J Cell Biol* 1998; 143 (1): 183-193.