

百草枯对细胞凋亡的影响及药物干预

张志坚 (综述), 周从阳* (审校)

(南昌大学第一附属医院急诊科, 江西 南昌 330066)

摘要: 百草枯是农业生产中广泛使用的一种除草剂, 有较强的毒性, 主要通过一系列的氧化还原反应产生多种自由基造成对机体严重的损害, 尤其是肺脏的损害最重。目前的研究认为百草枯直接或间接损伤 DNA, 细胞凋亡也是其损伤机制的重要组成部分。

关键词: 百草枯; 细胞凋亡; 药物干预

中图分类号: R139.3 Q255 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)03-0205-03

Effect of Paraquat on apoptosis and its intervention with medicine

ZHANG Zhi-jian ZHOU Cong-yang*

(Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330066, China)

Abstract: Paraquat is a herbicide with strong toxicity and widely used in the agricultural production in our country. Paraquat may produce severe damage to human body through the free radicals via a series of oxidation-reduction reactions, especially the lung. Current studies suggested that paraquat could also induce DNA damage and apoptosis by direct or indirect way, which might be an important component of its pathogenesis.

Key words: Paraquat; apoptosis; intervention with medicine

百草枯 (Paraquat, PQ) 又名克芜踪、对草快等, 化学名 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物, 是一种快速灭生性除草剂, 农业生产应用甚广, 急性中毒屡有发生。较大剂量百草枯中毒常由于肺、心、肝、肾等多脏器功能衰竭而迅速致死; 而较小剂量的中毒则可引起迟发性肺纤维化, 病程相对较长。近年发现, 长期接触百草枯, 还能引起中枢神经系统病变, 如帕金森综合征 (Parkinson disease, PD)、阿尔茨海默病 (Alzheimer disease)、小脑萎缩症 (Spinocerebellar atrophy)^[1] 等。目前对百草枯引起一系列病变的机制研究中, 发现氧自由基产生, 细胞因子及趋化因子的作用, 细胞内及线粒体内钙稳态的失衡, DNA直接损伤及诱导细胞凋亡起了重要作用。现将百草枯对细胞凋亡的影响及药物对其干预做一综述。

1 百草枯与细胞凋亡

Takeyama等^[2]将野生型 P53 表达的人肺上皮样细胞系 L132 及 P53 基因缺乏的人早幼粒白血病细胞系 U937 分别置于低浓度的 PQ 培养基中培养, 结果发现在 L132 细胞系, P53 大量表达, 而处于 S 期的细胞百分比明显减少, 用单细胞凝胶电泳显示 DNA 受损, 说明细胞由 G₁ 期进入 S 期受阻; 而 U937 细胞系中 DNA 虽然受损, 但处于 S 期的细胞百分比几乎无明显变化, 表现出对 PQ 的抵抗力。当把它们置于有细胞凋亡蛋白酶抑制剂 (环己酰亚胺) 的肿瘤坏死因子 (TNF) 中时, 它们的死亡动力学基本一致。该实验证实, PQ 可以导致 DNA 毁损; 阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期; 引起细胞凋亡。Conzalez-Pop 等^[3]将小脑颗粒细胞置于低浓度 PQ 中培养, 结果发现线粒体上 Cyt C 含量明显减少, 而水解蛋白酶和

casPase3 活性增加, DNA 裂解片段增加, 细胞凋亡增强。Heather Klinworth 等^[4]研究表明, PQ 诱导的多巴胺能神经元和 PC12 细胞的凋亡是通过激活 NK 和 B8 途径实现的, 而这两条道路中 NK 道路的激活扮演了更重要的角色。Dinis-Oliveira 等^[5]有实验对大鼠百草枯中毒 24、46、96 h 后的凋亡情况进行了研究。结果发现, 随着时间的推移, 肺纤维化程度逐渐加重, 凋亡细胞比例逐渐增多, 以 DNA 电泳呈阶梯状的变化和免疫组化呈脱氧核糖核苷转移酶介导的 TUNEL 染色阳性细胞为特征。而且百草枯中毒大鼠肺脏内 casPase-3 和 casPase-8 含量随着时间的推移而增加, casPase-1 的活性则降低。同时 PQ 会引起线粒体功能紊乱, 细胞色素 C 释放及转录因子 P53 和 AP-1 的激活随着时间的推移明显增强。这项研究表明百草枯可以对凋亡道路产生多种影响。Fe 等^[6]将 SK-N-SH 细胞系置于低浓度的 PQ 中培养 18 h 后发现, PQ 显著增加凋亡细胞的百分比。进一步研究发现, 细胞凋亡蛋白酶抑制剂 (环己酰亚胺) 和 casPase 抑制剂 (zVAD-fmk) 均能阻止细胞核的形态学改变。同时, 对 Bcl-2 蛋白家族进行的分析表明百草枯可以诱导产生高水平的 Bak, Bid, Bnip3 和 Noxa, 而 Bnip3, Noxa 和 Bak 基因沉默则可以保护细胞免受百草枯的毒性作用, 但 Bax 基因沉默不具有这种保护作用。最后, 以 Bax 缺如的 C57BL/6 小鼠为研究对象, 发现这些小鼠对 PQ 具有抗药性, 黑质致密部的酪氨酸羟化酶阳性神经元衰竭现象明显减轻。该试验从体内体外均证实了百草枯可以通过 Bak 介导对细胞凋亡起作用。

2 药物对百草枯所致细胞凋亡的影响

2.1 维生素 C 和维生素 E

刑晓明^[7]等复制小鼠百草枯中毒模型, 对其用 100 mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg 三种剂量的维生素 C 进行干预。

6 h 后观察中毒组和维生素 C 干预组肺组织细胞凋亡数及 Bcl

收稿日期: 2009-09-03 修回日期: 2010-01-14

作者简介: 张志坚 (1979-), 男, 急诊医学硕士研究生。

*: 通讯作者, 硕士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为急性中毒和危重病。

2. Bax蛋白的表达。结果发现维生素 C能促进百草枯中毒后肺组织 Bcl₂、Bax蛋白表达,且不同剂量作用时分别产生抑制细胞凋亡(100 mg/kg)和促进细胞凋亡(400 mg/kg)的作用。Czajka等^[14]也发现经自由基清除剂——维生素 E处理暴露于低浓度 PQ中的小鼠颗粒细胞后,其凋亡细胞数目明显减少。

2.2 水杨酸钠

Dinis-Oliveira等^[15]对大鼠百草枯中毒后 2 h给予水杨酸钠的疗效进行了研究。结果发现,大鼠百草枯中毒 24、46、96 h后细胞凋亡数目逐渐增加; caspase-3、caspase-8激活,细胞色素 C的释放及转录因子 P53和 AP-1的激活逐渐增加。而水杨酸钠处理组可以抑制 caspase-3、caspase-8激活,下调细胞色素 C的释放及减少转录因子 P53和 AP-1的激活来抑制凋亡信号通路,减轻肺脏细胞凋亡程度。

2.3 SOD类似物

陈平等^[8]以 N27细胞为多巴胺能神经元的细胞模型,观察 SOD类似物 MnTDM [manganese (III) meso-tetakis(N,N'-diethylimidazolium-2-yl)]对百草枯诱导的 N27细胞凋亡的保护作用。发现经不同浓度的百草枯(100、200、300、400 μmol/L)处理后,细胞活性下降,下降程度与百草枯浓度的增加呈线性关系,其中 400 μmol/L百草枯处理后细胞活性下降约 40%,与对照组比较差异有统计学意义(P<0.05)。在随后的实验中以 400 μmol/L百草枯进行作用,检测 MnTDM阻断百草枯诱导的 N27细胞损伤的作用。实验中以不同浓度的 MnTDM(0.5、1、2 μmol/L)与 400 μmol/L的 PQ联合作用后,观察到 MnTDM有明显阻断 PQ诱导的细胞活性下降,该阻断作用与 MnTDM的浓度成正相关。另外,随着 MnTDM浓度的升高,凋亡相关蛋白 Bcl₂表达逐渐升高(0.5、1、2 μmol/L组与 PQ组相比分别升高 20%、35%、50%),Bax表达率则逐渐降低, Bcl₂/Bax值升高。提示 MnTDM对百草枯介导的细胞凋亡有一定的保护作用。

2.4 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC)

核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB)是一种重要的核转录因子,是多个信号通路的交汇点,在细胞凋亡的调控中起关键的作用。刘建辉^[9]等以 PQ(25 mg/kg)腹腔注射作为大鼠急性肺损伤模型。以 PQ后 1、3、5 d为检测点,观察 PDTC(120 mg/kg)对中性粒细胞凋亡的影响。结果发现,大鼠腹腔注射 PQ可引起中性粒细胞(PMN)中的 NF-κB65亚基核易位,而 NF-κB抑制剂(PDTC)能通过抑制 NF-κB促进 PMN凋亡,这也是 PDTC对抗百草枯所致肺损伤的重要机制。

2.5 活化素 A

刘楠等^[10]将百草枯、重组活化素 A (rhAct,终浓度 10 μmol/L)加入体外培养的具有多巴胺神经元特性的 PC12细胞中。72 h后发现,经活化素 A预处理的细胞活力明显高于单纯百草枯组,而酪氨酸羟化酶和 Bcl₂蛋白 mRNA的表达也明显增强,细胞凋亡明显减少。提示活化素 A可能是通过上调 Bcl₂的表达,抑制细胞凋亡的发生。

2.6 辅酶 Q₁₀

McCarthy等^[11]用分化型人神经母细胞瘤 (SHSY-5Y)作为体外模型,置于低浓度 PQ的培养基中进行培养。48 h后发现,经过辅酶 Q₁₀(30 μmol/L)预处理后的分化型人神经母细胞瘤 (SHSY-5Y)的 DNA碎裂及细胞凋亡明显减少。这可能是通过抑制活性氧 ROS的产生及恢复线粒体的功能而起作用。

2.7 红景天苷

CHEN Hong等^[12]用百草枯诱导的具有多巴胺神经元特性的 PC12细胞凋亡作为帕金森病的体外模型,观察不同浓度红景天苷(终浓度 10、20、30 μmol/L)预处理对 PC12细胞凋亡的抑制作用。结果发现经 PQ(800 μmol/L)作用于 PC12细胞 24 h后,与正常对照组比较,细胞存活率降低,细胞凋亡率升高, caspase3活性增强, Cyt c的释放增加, Bcl₂的表达代偿性升高。红景天苷 3个浓度预处理后,细胞存活率明显增加,细胞凋亡率降低,且具有量效关系。而且 PC12细胞增高的 caspase-3活性和 Cyt c的释放明显降低, Bcl₂的表达进一步升高。表明红景天苷对 PQ诱导的细胞凋亡具有浓度依赖性的抑制作用。

2.8 人参皂苷 Rg₁

陈宏等^[13]采用体外培养的 PC12细胞研究人参皂苷 Rg₁对百草枯所致 PC12细胞凋亡的保护作用及机制。实验分正常对照组、PQ模型组和人参皂苷 Rg₁低、中、高浓度(5、10、20 μmol/L)组,分别进行细胞活力和凋亡情况、caspase-3酶活性、细胞色素 C和 Bcl₂的免疫活性测定。结果发现 PQ模型组 PC12细胞活力较空白组显著下降,凋亡率显著增加。而人参皂苷 Rg₁低、中、高浓度组的细胞活力较 PQ组显著增加,凋亡率则显著下降。同时 caspase-3活力和细胞色素 C的释放均明显降低, Bcl₂的活性则明显升高。说明人参皂苷 Rg₁可能通过促进 Bcl₂的表达,抑制细胞色素 C的释放,使 caspase-3激活减弱,减少百草枯诱导的细胞凋亡的发生。

2.9 绿茶多酚

厚荣荣等^[14]建立 PQ损伤的 PC12细胞体外模型,经不同浓度表没食子儿茶素没食子酸酯(绿茶多酚主要成分) [(-) epigallocatechin-3-gallate, EGCG] 预处理后,分别用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测细胞活性, Hoechst 33258 染色观察凋亡情况,流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡比例,免疫细胞化学染色法观察细胞色素 C蛋白表达水平。结果发现,1、5、10 μmol/L EGCG对 PQ诱导的 PC12细胞损伤具有一定的保护作用,且具有量效关系。其机制可能与下调细胞色素 C在胞浆内的过表达有关。

2.10 银杏叶提取物

Kang^[15]等建立 PQ损伤的 PC12细胞体外模型,观察银杏叶提取物 (EGb761)对百草枯诱导的 N27细胞凋亡的保护作用。发现经不同浓度的百草枯(50、100、200、300、400、500、600 μmol/L)孵育细胞 24 h,随着浓度增加,细胞生存率逐渐下降,与对照组相比分别降至 75.5%、69.6%、60.7%、52.3%、43.9%、25%、17% (P<0.05),说明 PQ对 PC12细胞的损伤具有浓度依赖性,浓度越大,对细胞的毒

性越强。据此, 将 FQ300 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h作为后续实验的干预点。以不同浓度的 EGB761 (20 40 60 80 100 mg/L) 预处理, 结果发现, EGB761可以有效保护百草枯诱导的 PC12 细胞的凋亡, 可以拮抗 FQ对 PC12细胞的毒性作用, 抑制 FQ诱导的 PC12细胞的凋亡, 与浓度呈正相关。该作用主要是激活酪氨酸羟化酶, 促进 Bcl2的表达, 减弱 caspase-3激活, 表达减少, 从而减少蛋白质分解和 DNA断裂, 减少细胞凋亡的发生。

2.11 何首乌提取物

张颖等^[16]等用 C57BL/6小鼠腹腔注射 FQ制备帕金森病模型, 分别用不同剂量 (160 80 40 mg/kg) 何首乌提取物二苯乙炔 (2,3,5,4-tetrahydroxy stilbene-2-O- β -D-glucoside TSG) 口服干预。6周后检测酪氨酸羟化酶 (TH) 活性、多巴胺能神经元的凋亡及黑质多巴胺能神经元 caspase-3活化情况。结果发现, TSG高、中剂量组的尼氏阳性神经元及 TH阳性神经元脱失明显减少, caspase-3活化率明显降低。说明一定剂量的 TSG对 FQ诱导的小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡有保护作用。

3 展望

凋亡的调控发生在细胞信号转导的各个水平上, 并且有许多不同的信号和胞内信号分子调控着凋亡或抑制的起始, 其复杂程度因细胞种类而异。目前, 关于 FQ对细胞凋亡的影响还没有一个统一的简单答案。未来对百草枯所致的细胞凋亡的研究应着眼于凋亡传导的各个途径和每条途径上的不同物质, 以及不同途径的相互关系和不同传导物质间的相互联系。相信 FQ在细胞凋亡问题上的确切作用也终将被揭示出来。随着研究的不断深入, 人们一定会开发出更多新的、有效的对抗百草枯所致细胞凋亡的新药并应用于临床。

参考文献:

[1] Nakamura S, Lipson SA. Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases [J]. Cell Mol Life Sci 2007, 64: 1609-1620

[2] Takeyama N, Tanaka T, Yabuki T, et al. The involvement of p53 in paraquat induced apoptosis in human lung epithelial like cells [J]. Int J Toxicol 2004, 23 (1): 33-40

[3] Gonzalez-Polo R A, Rodriguez-Martin A, Moran JM, et al. Paraquat induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells [J]. Brain Res 2004, 1011 (2): 170

[4] Heather Klinworth, Kathleen Newhouse, Tingting Li, et al. Activa-

tion of c-Jun N-Terminal Protein kinase is a common mechanism underlying Paraquat and rotenone induced dopaminergic cell apoptosis [J]. Toxicol Sci 2007, 97 (1): 149-162

[5] Dinis-Oliveira R J, Sousa C, Ramalho F, et al. Effects of sodium selenite in the paraquat induced apoptotic events in rat lungs [J]. Free Radical Biol Med 2007, 43: 48-61.

[6] Qing F, Alison LM, Monte D, et al. Paraquat neurotoxicity mediated by a Bax-dependent mechanism [J]. Biochem J 2008, 283 (6): 3357-3364

[7] 刑晓明, 杨红, 等. 维生素 C对百草枯中毒小鼠肺组织细胞凋亡及 Bcl-2 Bax蛋白表达的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12 (10): 676-678

[8] 陈平, 陈震, 李昂, 等. SOD类似物阻断百草枯诱导的 N27细胞凋亡的作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29 (5): 315-319.

[9] 刘建辉, 孙志平, 马玉腾, 等. 百草枯中毒致大鼠急性肺损伤时 NF- κ B抑制剂对中性粒细胞凋亡的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2009, 38 (3): 282-284.

[10] 刘楠, 蒋雨平, 王坚, 等. 活化素 A对百草枯所诱导的 PC12细胞损伤的保护作用 [J]. 中国临床神经科学, 2006, 14 (1): 25-32

[11] McCarthya S, Somayajula M, Sikorskab M, et al. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death: neuroprotection by water soluble Coenzyme Q₁₀ [J]. Toxicol and Appl Pharmacol 2004, 201: 21-31.

[12] CHEN Hong, CHEN Jian-Zong, HOU Ren-Rong, et al. Inhibition of selenite on apoptosis of PC12 cells induced by paraquat and its related mechanisms [J]. Chin J Pharmacol Toxicol 2007, 21 (3): 190-196

[13] 陈宏, 陈建宗, 厚荣荣, 等. 人参皂苷 Rg₃对百草枯所致 PC12细胞凋亡保护作用及机制 [J]. 中国新药杂志, 2007, 19 (9): 692-696

[14] 厚荣荣, 陈建宗, 陈宏, 等. 绿茶多酚主要成分对百草枯诱导 PC12细胞损伤的保护作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23 (1): 83-87.

[15] Xiao gang K, Jiang zong C, Zhen X, et al. Protective effects of Ginkgo biloba extract on paraquat induced apoptosis of PC12 cells [J]. Toxicology in Vitro 2007, 21: 1003-1009

[16] 张颖, 陈建宗, 厚荣荣, 等. 何首乌提取物二苯乙炔苷对 FQ-MB诱导小鼠黑质多巴胺神经元的保护作用 [J]. 成都中医药大学学报, 2008, 31 (1): 35-38.

欢迎订阅、投稿、刊登广告