

锰作用下 PC12 细胞的氧化应激机制研究 *

徐 强¹ 董大海¹ 徐 文²

(1 兰州市中医医院 甘肃 兰州 730020; 2 兰州军区疾病预防控制中心 甘肃 兰州 730020)

摘要 目的:以鼠嗜铬神经瘤细胞(PC12)为模型,筛选锰对神经细胞增殖抑制作用的时间及剂量,观察锰作用下 PC12 细胞的氧化应激反应与细胞形态学、生化指标改变和丝裂原活化蛋白激酶 pp38(p38MAPKs)的活化表达。**方法:**用 200,400,600,800 μ mol/L MnCl₂ 的培养液,分别作用对数生长期 PC12 细胞 1,2,3,4d 后,用 MTT 筛选锰的细胞毒性剂量;测定 200-600 μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 后,PC12 细胞还原型谷胱甘肽和丙二醛含量;透射电镜观察细胞形态学变化;琼脂糖凝胶电泳检测 MnCl₂ 对 PC12 细胞基因组 DNA 的影响。western-blot 法检测 p-p38。**结果:**MTT 实验显示 200~800 μ mol/L MnCl₂ 作用 1,2,3,4d 对 PC12 有显著的抑制作用,呈剂量和时间依赖趋势,600 μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 对 PC12 的抑制率可达 50%以上。200-600 μ mol/L MnCl₂ 作用于细胞 4d 后,随着浓度的升高,还原型 GSH 逐渐降低,MDA 的含量逐渐升高;600 μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 电镜可见细胞凋亡,同样条件下细胞 DNA 碎片化。Western-blot 实验显示 600 μ mol/L MnCl₂ 作用 1,2,3,4d p-p38 逐渐升高,3d 时较对照组增加 6.6 倍 ($n=3, p<0.05$),200,400,600 μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 时,磷酸化蛋白 38(p-p38)也逐渐升高,400 μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 时较对照组升高了 4.7 倍($n=3, p<0.05$)。**结论:**PC12 细胞在锰作用下发生氧化应激反应,上调 p-p38,诱导细胞凋亡,细胞增殖抑制。

关键词:锰;鼠嗜铬神经瘤细胞(PC12);氧化应激;凋亡;丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)磷酸化蛋白 38(p-p38);

中图分类号:R595.2 ;R135.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-435-06

Oxidative stress mechanism of manganese-treated PC12 cell line*

XU Qiang¹, DONG Da-hai¹, XU Wen²

(1 Chinese Medicine Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730020. China;

2 The Centre of Disease Prevention and Control of Lanzhou Military Command of Chinese PLA. Lanzhou 730020. China.)

ABSTRACT Objective: To observe oxidative stress reaction of Mn-treated PC12 cell, cell morphology, biochemical changes and mitogen activated protein kinases (MAPKs) phosphorylated protein-38 (p-p38). **Methods:** PC12 cells in logarithm period incubated in culture media of 200, 400, 600, 800 μ mol/L manganese (MnCl₂) for 1day,2 days, 3 days,4days respectively; The cell viability was examd by MTT [3- (4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasoliumBromide]; Reduced glutathion and malonaldehyde (MDA) of PC12 cell were tested in 4days of Mn-treatment under 200-600 μ mol/L; morphological changes of PC12 cells was investigated by transmission electron microscope; Agarose gel electrophoresis tested the genomic DNA of Mn-treated PC12 cells. Western-blot was used to test p-p38 of manganese-treated PC12 cell in different time courses and concentrations. **Results:** The results of MTT revealed that manganese of different Concentrations (MnCl₂ 200,400,600,800 μ mol/L) could suppress the proliferation of PC12 cells in dose and time-dependent manner during 1d,2d,3d,4d respectively. The cell inhibited ratio on the fourthday in 600 μ mol/L MnCl₂ culture medium approached 50% or or more. Reduced glutathion was decreased and MDA increased under the treatment of 200-600 μ mol/L MnCl₂. In the same condition apoptosis was observed in transmission electron microscope as well as biochemical hallmark of DNA fragments. Western-blot tests show The phosphorylation of p38 of PC12 cells incubated in 600 μ mol/L MnCl₂ culture medium was increasing gradually on the 1st,2nd,3rd and 4th day respectively. The activation of p38 of PC12 cells on the 3rd day is 6.6 times higher than that of control group ($n=3, p<0.05$). The phosphorylation of p38 enhanced by degrees with 200, 400, 600 μ mol/L MnCl₂ treated PC12 cells in 4days. The activation of p38 of 400 μ mol/L MnCl₂ treated group on the 4th day is 4.7times higher than that of control group ($n=3, p<0.05$). **Conclusions:** Mn-treatment has generated oxidative stress of PC12 cell, up-regulated p-p38, induced apoptosis and proliferation arrested.

Key words: Mn; Mouse neuroblastoma cells pheochromocytoma (PC12); Oxidative stress; Apoptosis

Chinese Library Classification: R595.2 ;R135.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-435-06

慢性锰中毒见于锰矿工人或电焊工人,由于长期吸入锰床表现为震颤性麻痹(肌强直及行走困难)和神经精神症状,如(二氧化锰)微尘,锰沉积于小脑和基底节锥体外系而致病。临强迫行为、痴笑、前冲或后冲步态、记忆缺损等^[1]。至今锰中毒机

* 基金项目:甘肃省自然基金课题:(3ZS05-A25-093)

作者简介:徐强(1961-),男,副主任医师,主要从事临床医学和基础医学研究工作

△通讯作者:徐文,Email:hewh@gsstc.gov.cn 电话 1:0931-8972071,

手机:13919760596, 传真:0931-8972014

(收稿日期:2010-11-07 接受日期:2010-11-30)

理尚未完全阐明。

锰在机体内以 Mn²⁺、Mn³⁺、Mn⁴⁺ 三种状态存在，其氧化性的强弱依次为 Mn⁴⁺>Mn³⁺>Mn²⁺。锰中毒时，大量的 Mn²⁺ 被氧化成高价态，在这一转变过程中可发生单电子的转移，产生带有不配对的电子自由基^[2]。自由基可引发多巴胺自氧化，结果形成大量的过氧化物、超氧化物、醌类等细胞毒物^[3]，代表性的如脂质过氧化反应链的终产物 MDA，使脑内 GSH 浓度、GSH 过氧化物酶、过氧化氢酶、GSSG 还原酶活性降低，诱发氧化应激反应，引起神经细胞变性，导致一系列神经精神症状和体征。同时自由基可以作为信号分子介导细胞增殖、分化及凋亡等的反应。

丝裂原活化的蛋白激酶(MAPKs)通路参与细胞增殖、分化及凋亡等及其重要的生物学反应^[4]，其中 p38MAPK 多在应激条件下激活，可能与细胞凋亡及应激时的多种病理生理过程有关^[5]。鉴于中枢神经系统的不可介入性，一般还很难在无损伤条件下直接观测神经系统的生化变化，因此选择好的体外模型也是研究的关键。本实验以嗜铬神经瘤细胞 PC12 为模型，研究锰对神经细胞的毒性作用剂量及特点，观察氧化应激反应、凋亡和 p38MAPK 的活化表达的关系，探讨锰的神经毒性作用机制，为锰中毒及神经退行性疾病的临床诊断、治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养^[6]及实验分组

将 RPMI 1640 培养干粉倒入烧杯中，加 2 克 NaHCO₃，980ml 三蒸水，磁力搅拌器充分混匀，调整 PH 在 7.2-7.4，定容至

1000ml，正压过滤后分装，4℃ 保存。PC12(第四军医大学神经生物学教研室)细胞在含有 10%小牛血清(杭州四季青公司小牛血清，使用前经 56℃ 灭活 30 分钟，4℃ 保存备用)、青霉素(100U/ml)、和 2mmol/L L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱(英国 Forma Scientif 公司)中常规培养。MnCl₂(Sigma 公司)用去离子水将 MnCl₂ 配制成 10mol/L 的储存液，4℃ 保存，使用前将储备液用含小牛血清 10%的 RPMI 1640 培养液稀释成不同浓度的 MnCl₂ 实验用液。日立 180-80 型原子吸收光谱仪测定 MnCl₂ 浓度。实验分为对照组，不同氯化锰浓度作用的实验组，DEMSO 组，因为 DEMSO 是有机试剂，有细胞毒性，设立 DEMSO 组是为了排除其细胞毒性对氯化锰细胞毒性的影响程度。SPSS 统计分析软件进行统计分析，其中率的变化进行 X² 检验， $\bar{x} \pm S$ 采用 t 检验。

1.2 细胞毒试验(MTT 法)

取对数生长期的细胞(细胞密度为 1×10⁵-2×10⁵/L)，接种于 96 孔培养板(200μl/孔)中。待细胞铺满 70%后，换以含 MnCl₂(用)分别为 10, 100, 200, 400, 600, 800, 1000μmol/L 培养液，分别培养 1 天, 2 天, 3 天, 4 天，再加入 MTT(50mgMTT 溶于 10mlPBS 中，磁力搅拌器充分混匀，用 0.22μm 微孔滤膜器过滤除菌，4℃ 保存)15μl/孔(浓度为 75%)，37℃ 培养箱中放置 4 h，终止培养，吸弃培养孔内上清液，每孔加入 150μl 的二甲基亚砜，震荡摇匀，在酶标仪上以波长 490nm 测各孔吸光度，用空白组调零，结果以各组 5 孔 OD 均值±标准差(x±s)表示。MnCl₂ 对细胞增殖的毒性作用以抑制率来反映，其抑制率(IR)的计算公式：

细胞抑制率(%)=	对照组 OD 值 - 实验组 OD 值	× 100%
	对照组 OD	

1.3 台盼蓝拒染法绘制细胞生长曲线

取对数生长期的细胞以每孔 2×10⁴ 个接种于 24 孔板中，于培养箱中培养 24h。换以含 MnCl₂ 分别为 200, 400, 600, 800μmol/L 的培养液，分别培养 1d、2d、3d、4d。每天换液一次，并将

空白组和实验组细胞各消化 5 孔，台盼蓝染色，置血球计数板内计数活细胞数。以每天活细胞数均值绘制生长曲线，及计算 MnCl₂ 对神经细胞生长的抑制率。

细胞抑制率(%)=	对照组细胞数 - 实验组细胞数	× 100%
	对照组细胞数	

1.4 细胞氧化应激水平

根据细胞毒性实验结果收集 600μmol/L MnCl₂ 作用 1, 2, 3, 4d 和 200, 400, 600μmol/L MnCl₂ 分别作用 4d 的 PC12 细胞，用冷的 PBS 洗两次(pH7.4)。

取样品 50μl (通常 50-100μl)，1/24M 的 H₂SO₄ 4.0ml，10% 磷钨酸 500μl 加入试管中，混匀稍放置 5min，2000rpm 离心 10min，弃上清。向试管中加入 1/24M 的 H₂SO₄ 2.0ml，10%磷钨酸 300μl，混匀稍放置，2000rpm 离心 5 分钟，弃上清。按下表向试管中加样。

1.4.1 丙二醛(MDA)的测定 八木国夫法

试剂	样品管	空白管	标准管
双蒸水	1.0ml	1.0ml	-
标准管	-	-	1.0ml
0.67%TBA	1.0ml	1.0ml	1.0ml
	混匀，100℃水浴 1h，准时取出流水冷却至室温		
正丁醇(水饱和)	4.0ml	4.0ml	4.0ml

震荡抽提 1min, 3000rpm 离心 10min, 取上清(正丁醇层) 3.0ml 测定荧光强度。样品管加入 1.0ml 三蒸水后需震荡 1 分钟; 测定荧光强度时激发光 EX515nm, 发射光 EM553nm, 以空白管调“零”。标准管的制备: 取 1 μ mol/L 的 MDA 标准品, 按倍比稀释的方法, 依次配制浓度为 0.5、0.25、0.125、0.0625、

0.03125、0.0156 μ mol/L 的标准液。

1.4.2 还原型谷胱甘肽

原理: 荧光剂邻苯二醛(O-phthalaldehyde, OPT) 在 pH=8.0 时可与 GSH 结合成 GSH-OPT, 用来测定样品中 GSH 的含量。

试剂	0	1	2	3	4	5	样品管
GSH 标准液	0	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	-
待测样品液	-	-	-	-	-	-	0.1
0.1M 磷酸钠 0.05M EDTA	2.0	1.9	1.5	1.0	0.5	0	1.9
OPT- 甲醇溶液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
GSH 含量(μ g)	0	0.05	0.25	0.5	0.75	1.0	-

将各管混匀, 室温下静置 30min。选择激发波长 337.8nm, 发射波长 421.6nm, 以标准曲线中的“0”管作对照, 测定各管荧光强度。以 GSH 标准液的浓度为坐标横轴(X), 以其对应的荧光强度值为坐标纵轴(Y), 绘制标准曲线, 求直线回归方程。将样品管的荧光测定值代入方程, 可直接求出待测样品中的 GSH 的含量。

1.4.3 蛋白含量测定 考马斯亮兰染色法

配制 1.0mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA) 标准液, 使用时以三蒸水倍比稀释成浓度分别为: 1000 μ g/mL、500 μ g/mL、250 μ g/mL、125 μ g/mL 和 62.5 μ g/mL 五个浓度梯度。取一定量生物样品, 稀释 100 倍(一般稀释 100-200 倍), 按下表加样:

加入物	本底管	5 个标准管	样品管
5 个梯度蛋白标准液	-	0.1 ml	-
样品稀释液	-	-	-
生理盐水(ml)	0.1 ml	-	-
染色液(ml)	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

充分摇匀后室温静置 3min, 空白调“零”, 于分光光度计上 595nm 比色, 测 OD。根据梯度蛋白标准液的 OD 值, 绘标准曲线或采用统计软件求蛋白直线回归方程。据标准曲线或方程换算出稀释样品中的蛋白浓度(μ g/ml)。未知样品中的实际蛋白浓度(μ g/ml) = 稀释样品蛋白浓度 \times 样品稀释倍数。

1.5 细胞形态学观察

分别收集实验组和对照组细胞按透射电镜要求制样并观察。

1.6 凋亡细胞的基因组 DNA 电泳

分别取对照组及实验组细胞提取 DNA, 在加有溴化乙锭(EB)的 1%琼脂糖凝胶上电泳过夜, DL-2000 用作分子标志^[7]。

1.7 免疫印迹法(Western-blot)测定蛋白磷酸化水平

1.7.1 样品处理 裂解细胞, 分离提取蛋白^[8] 根据细胞毒性实验结果收集 600 μ mol/L MnCl₂ 作用 1, 2, 3, 4d 和 200, 400, 600 μ mol/L MnCl₂ 分别作用 4d 的 PC12 细胞, 用冷的 PBS 洗两次(pH7.4), 加入适量预冷的细胞裂解液(50mMTris-HCl pH7.4, 1%NP-40, 1mMEDTA, 1mMNa₃VO₃, 1mMNaF, 100 μ g/mlPMSF, 40 μ l/ml 蛋白酶抑制剂), 置于冰上温浴 15min, 用细胞刮刀将

细胞集中与培养瓶一侧, 用吸管将细胞碎片连同细胞裂解缓冲液一起转移至经冷却的 Eppendorf 离心管中; 4 $^{\circ}$ C 以 15 000g 将裂解物离心 10min, 收集上清液, 加入 SDS 加样缓冲液(100mmol/LTris-HCl PH6.8, 200mmol/L DTT, 4%SDS, 0.2%溴酚蓝, 20%甘油), 沸水浴煮 5min, 将样品进行分装, 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.7.2 蛋白质定量分析 用改进的 Folin- 酚法定量蛋白。取待测蛋白样品液适量, 补去离子水至 3.0ml, 加 2%脱氧胆酸钠 0.025ml, 于旋涡回旋器上激烈振荡 3min 后加入三氯乙酸 1ml, 充分混合, 5500g 离心 10min 后弃上清, 沉淀加入试剂甲(NaCO₃ 2g, NaOH 0.4g, 酒石酸钾钠 0.05g 共溶于 100ml 水中, 与 0.5%CuSO₄ 5H₂O 溶液 20ml 于用前混合)1.5ml, 混合至蛋白溶解, 再加入试剂乙(Folin- 酚试剂)0.15ml, 迅速摇匀, 30min 后于 660nm 测定光吸收值。

1.7.3 免疫印迹法(Western-blot)测定蛋白磷酸化水平 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳: 根据蛋白质定量分析实验将样品中的蛋白浓度调整一致, 选用 12%的分离胶、5%积层胶和 Tris- 甘氨酸电泳缓冲液(3g Tris 碱, 2g SDS, 14.4g 甘氨酸, 去离子水定

容至 1L)电泳,室温稳流 25mA 电泳 20min,调整稳流 35mA,再电泳 50min 结束。转膜:用电缓冲液(4.3g Tris 碱,20.5g 甘氨酸,0.375g SDS,300ml 甲醇,去离子水定容至 1.5L)将聚丙烯酰胺凝胶上分出的蛋白转移至 NC 膜(promega 公司)上,实验条件为稳流 250mA,90 分钟。封闭与杂交:将 NC 膜用 Tris 缓冲液(TBS)漂洗三次,每次 10min,放入封闭液 TBS-T(25mmol/L Tris 缓冲盐溶液,5%脱脂奶粉,0.1%吐温-20)中室温封闭 1h。将一抗 Erk1/2(兔多抗,美国 Santa Cruz 公司)用封闭液按 1:2000 稀释成工作液,4℃ 过夜,用封闭液漂洗 3×10min,加入二抗(Erk1/2 二抗,辣根过氧化物酶标记,羊抗兔,美国 Santa Cruz 公司),用封闭液按 1:4000 稀释成工作液,室温 1.5h, p-Erk 一抗(鼠单抗,美国 Santa Cruz 公司)按 1:1000 稀释,二抗(辣根过氧化物酶标记,羊抗鼠,美国 Santa Cruz 公司)按 1:2000 稀释;p38 一抗(鼠单抗,美国 Santa Cruz 公司)按 1:1000 稀释,二抗(P38MAPK 二抗,辣根过氧化物酶标记,羊抗鼠,美国 Santa Cruz 公司)按 1:2000 稀释,p-p38 一抗按 1:1000 稀释,二抗按 1:2000 稀释)TBS 漂洗 3×10min。压片成像:待 NC 膜稍干后,将滤膜上滴加 1ml 化学荧光显迹液化学荧光发光剂(美国 Pierce 公司),待反应 1min 时用保鲜膜覆盖,与 X 光胶片压片,根据荧光强弱选择不同曝光时间显影、定影,以凝胶成像系统测定免疫印迹区带的光密度,预染标准分子量蛋白

Marker(美国 Bio-Rad 实验室);标准分子量蛋白 Marker(美国 Santa Cruz 公司);Erk1/2 特异性阻断剂 PD98059(promega);P38 特异性阻断剂 SB203580(promega);IMAGINGQUANT 数据处理系统分析结果。

2 结果

2.1 不同浓度 MnCl₂ 对 PC12 细胞增殖的抑制作用(表 1-1)

由表 1-1 可知,200-800μ mol/L MnCl₂ 对 PC12 细胞有抑制作用,程度不同,其中 MTT 实验中,MnCl₂ 的浓度为 600、800μ mol/L 作用 4d 时对细胞的抑制率分别是 54.3%、60.5%,三个剂量组 MnCl₂ 对神经细胞的抑制率随作用时间的延长和浓度的上升而增强,分别呈现出时间依赖效应和浓度依赖效应,表现为一种慢性毒作用。各实验组与对照组之间相比有显著性差异(P 均 <0.01)。DEMSO 对 PC12 细胞生存活力的抑制作用与对照组相比差异无显著性。

2.2 台盼蓝拒染法绘制细胞生长曲线(图 1-1)

由图 1-1 可见,对照组细胞接种后迅速生长,在 24 hr 的细胞数量已明显高于各实验组。各实验组细胞均受到不同程度的抑制,并随锰剂量的增加,这种抑制作用越明显。各剂量组在 24 hr 的抑制率分别为 32.67%,56.32%和 74.14%,变化趋势与 MTT 结果相符。

表 1-1 不同浓度 MnCl₂ 对 PC12 细胞的抑制率(%)

Table1-1 Proliferation arrested ratio of MnCl₂-treated PC12 cell in different concentrations (MTT)

Mn(μ mol/L)	1 d		2d		3d		4d	
	吸光值	抑制率(%)	吸光值	抑制率(%)	吸光值	抑制率(%)	吸光值	抑制率(%)
Control	0.49± 0.09	0	0.60± 0.02	0	0.78± 0.03	0	1.29± 0.10	0
200	0.49± 0.09	6.4	0.46± 0.02	22.6	0.52± 0.03	33.3	0.74± 0.08	42.6
400	0.44± 0.07	10.8	0.43± 0.03	28.3	0.49± 0.02	37.2	0.67± 0.09	48.1
600	0.43± 0.07	11.3	0.39± 0.02	35.1	0.43± 0.02	44.9	0.59± 0.04	54.3
800	0.41± 0.09	15.8	0.36± 0.03	39.6	0.40± 0.04	46.8	0.51± 0.06	60.5

注:在同一时间范围内,各实验组与对照组之间相差显著(experimental group vs control group in same time)(P<0.01)

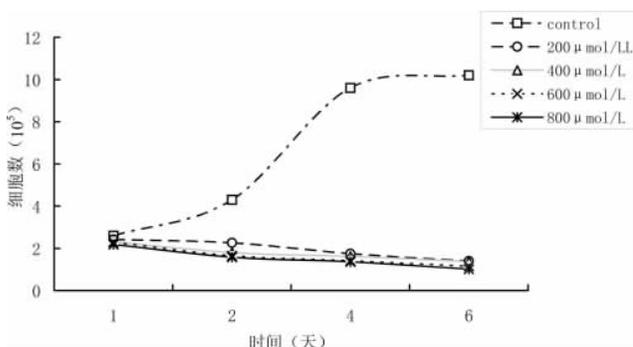


图 1-1 不同浓度 MnCl₂ 对 PC12 细胞的抑制率(%)

Figure 1-1 Growth curve of MnCl₂-treated PC12 cell in different concentrations

注:在同一时间范围内,各实验组与对照组之间相差显著(experimental group vs control group in same time)(P<0.01)

Figure 1-1 Growth curve of MnCl₂-treated PC12 cell in different concentrations

2.3 PC12 细胞氧化应激水平观察

2.3.1 还原型谷胱甘肽、丙二醛(MDA) 600μ mol/L MnCl₂ 作用 1,2,3,4d 和 200,400,600μ mol/L MnCl₂ 分别作用 4d PC12 细胞中 GSH 和 MDA 结果如表 2-1、表 2-2,随 MnCl₂ 作用时间延长、作用浓度的增加,细胞中 MDA 逐渐增多。

2.4 透射电镜下 PC12 细胞观察

正常 PC12 细胞表面可见许多小的突起,细胞核为椭圆形,位于细胞中部,细胞核膜双层结构清晰可见,细胞质内可见到线粒体、内质网和溶酶体等。200μ mol/L MnCl₂ 于细胞 4d 透射电镜下细胞形态学变化不明显。600μ mol/L MnCl₂ 作用于细胞 4d 透射电镜下可见细胞体积明显缩小,细胞膜表面突起消失,细胞质中有空泡形成,核膜完整但皱缩,核体积缩小,染色质致密且边集于细胞核周边,是细胞凋亡的形态学改变。

2.5 MnCl₂ 对 PC12 细胞基因组 DNA 的影响

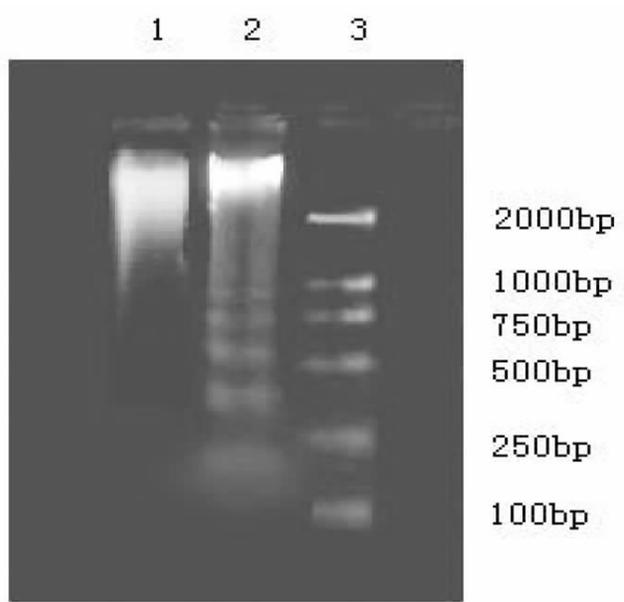
表 2-1 600μ mol/L MnCl₂ 作用不同时间 PC12 细胞中 GSH、MDA ($\bar{x} \pm s$)
Table2-1 GSH, MDA in different time of 600μ mol/L MnCl₂-treated PC12 cell ($\bar{x} \pm s$)

	Control	1 d	2d	3d	4d
GSH(μ g. g-1)	88.87± 17.56	41.12± 9.13	30.64± 5.37	20.78± 2.34	12.49± 3.91
MDA(μ mol.g-1)	10.46± 1.09	29.34± 3.15	42.47± 5.26	58.52± 7.13	70.52± 8.37

表 2-2 不同浓度 MnCl₂ 作用 4d PC12 细胞中 GSH、MDA($\bar{x} \pm s$)
Table2-1 GSH, MDA in the 4th d of different concentrations of MnCl₂-treated PC12 cell ($\bar{x} \pm s$)

	Control	200μ mol/L	400μ mol/L	600μ mol/L
GSH(μ g. g-1)	88.87± 17.56	59.76± 12.23	24.78± 7.73	12.49± 3.91
MDA(μ mol.g-1)	10.46± 1.09	15.88± 1.69	34.46± 4.02	70.52± 8.37

600μ mol/L MnCl₂ 作用于细胞 3d 时提取细胞基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 出现明显梯状条带(图 2-1)。



1 对照;2:600μ mol/L MnCl₂ 作用于细胞 3d;3:DL-2000
图 2-1 600μ mol/L MnCl₂ 作用于细胞 3d PC12 细胞基因组 DNA 凝胶电泳

Fig.2-1 Agarose gel electrophoresis tested the genomic DNA of 600μ mol/L MnCl₂-treated PC12 cell on the 3th day.

2.6 MnCl₂ 作用下 PC12 细胞 p38 的活化表达

结果表明 600μ mol/L MnCl₂ 作用 1,2,3,4 天可见 p-p38 逐渐升高, 其中作用 3 天时较对照增加了 6.6 倍(n=3,p<0.05)(图 2-2), 200,400,600μ mol/L MnCl₂ 分别作用 4 天时, p-p38 也是逐渐升高的, 当 400μ mol/L MnCl₂ 作用 4 天时较对照组升高了 4.7 倍(n=3,p<0.05)(图 2-3), 这种 MnCl₂ 对 p38 开放激活的逐渐增强呈浓度和时间依赖效应。使用 p38 通路的特异性阻断剂 SB203580 实验结果表明锰是通过 MEK3/6 磷酸化下游的 p38, 上调 p-p38, 可能诱导细胞凋亡(图 2-4)。

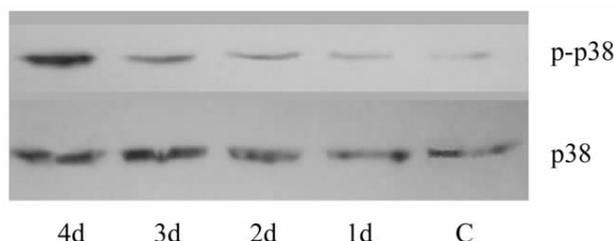


Fig.2-2 Western-blot tested the p38 phosphorylations of 600μ mol/L MnCl₂-treated PC12 cell in different time courses

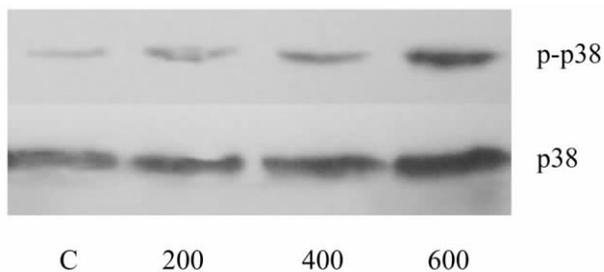


Fig.2-3 Western-blot tested the p38 phosphorylations of MnCl₂-treated PC12 cell in different concentrations on the 4th day

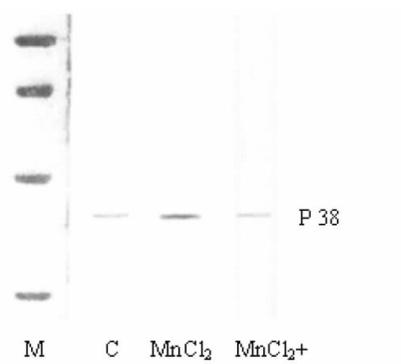


Fig.2-4 p38 of 600μ mol/L MnCl₂-treated PC12 cell on the 4th day before and after adding SB203580

3 讨论

对锰神经毒作用机理的探讨一直与帕金森氏病的研究相

关^[9-10],临床应用发现左旋多巴可缓解部分锰中毒患者的精神改变、动作失调、肌张力增高和震颤等症状^[11]。这提示锰的神经毒作用机制与多巴胺能神经元的损伤有一定关系。因此我们以多巴胺能的鼠嗜铬神经瘤细胞 PC12 为模型,筛选锰对神经细胞增殖抑制作用的时间及剂量效应关系。结果表明: MnCl₂ 对 PC12 细胞的增殖抑制作用在 1-4 天的时间段中呈剂量和时间依赖效应,这在不同浓度 MnCl₂ 作用下 PC12 细胞的生长曲线中得到了映证, MnCl₂ 抑制了 PC12 细胞的生长,显示出它的神经毒性作用特点。由于我们关注锰的慢性蓄积毒性,所以筛选了 MnCl₂ 对 PC12 细胞的增殖抑制作用在低剂量、较长时间段中所表现出的剂量和时间效应关系,基本可以看出 600μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 时对 PC12 细胞的增殖抑制率在 50%左右,为进一步研究其作用机理提出有效作用浓度。那么锰对神经细胞增殖抑制作用的机理是什么呢?

在生物体内,适量的锰是机体对抗自由基氧化的一部分。但是,过多的锰能激活细胞色素氧化酶 P450 的活性,继之产生的自由基可使巯基耗竭,并降低细胞的抗氧化能力。同时自由基可以作为信号分子介导细胞增殖、分化及凋亡等的反应^[12]。基于此我们观察了锰作用下 PC12 细胞的氧化应激水平,凋亡和凋亡相关信号分子 p38 的活化表达。200-600μ mol/L MnCl₂ 作用于细胞 4d 后,随着浓度的升高,还原型 GSH 逐渐降低,MDA 的含量逐渐升高,表明锰作用下 PC12 细胞发生了氧化应激损伤;600μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 电镜可见细胞体积明显缩小,细胞膜表面突起消失,细胞核膜完整但皱缩,细胞核体积缩小,染色质致密,并边集于细胞核周边,细胞质中有空泡形成,这是细胞凋亡的形态学改变。同样条件下细胞 DNA 碎片化,是重要的细胞凋亡的生化特征,从而进一步证实 MnCl₂ 能够诱导 PC12 细胞凋亡。此结果提示我们锰对神经细胞细胞的增殖抑制作用产生的原因可能是诱导细胞凋亡;Western-blot 实验显示 600μ mol/L MnCl₂ 作用 1,2,3,4d p-p38 逐渐升高,3d 时较对照组增加 6.6 倍(n=3,p<0.05),200,400,600μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 时,磷酸化蛋白 38(p-p38)也逐渐升高,400μ mol/L MnCl₂ 作用 4d 时较对照组升高了 4.7 倍(n=3,p<0.05)。

有学者采用克隆黑质多巴胺能细胞系 SN4741 细胞为实验模型,对 MPP⁺、H₂O₂、杀虫剂、除草剂、多巴胺源内生神经毒素猪毛菜酚以及锰等被认为是 PD 相关的神经毒物进行研究实验,表明 PD 相关的神经毒物 MPP⁺、H₂O₂ 诱导产生的细胞凋亡是它们损伤神经细胞的共同的分子机制:即在外源神经毒物作用下细胞大量产生 ROS(活性氧介质),作为信号分子,激活 p38MAPK 和 JNK/SAPK 信号转导系统的级联瀑布式反应,最终激活 Caspase-1 和 Caspase-3, PITS/LRE kinase, p110 裂解,染色质固缩, DNA 发生碎片化,诱导细胞凋亡^[16-17]。我们实验结果表明 600μ mol/L MnCl₂ 作用 1,2,3,4 天可见 p38 磷酸化水平逐渐升高,其中作用 3 天时较对照明显增加了 6.6 倍(n=3,p<0.01),200,400,600μ mol/L MnCl₂ 分别作用 4 天时,p38 磷酸化水平也是逐渐升高的,当 400μ mol/L MnCl₂ 作用 4 天时较对照组升高了 4.7 倍(n=3,p<0.05),这种 MnCl₂ 对 p38 逐渐增强的开放激活呈浓度和时间依赖效应。使用 p38 通路的特异性阻断剂 SB203580 实验结果表明锰是通过 MEK3/6 磷酸化下游的

p38,上调 p38 的磷酸化,诱导细胞凋亡,与流式、电镜及细胞基因组 DNA 凝胶电泳结果一致。

因此我们的实验结果推论 PC12 细胞在锰作用下发生氧化应激反应,上调 p-p38,诱导细胞凋亡,细胞发生增殖抑制。

参考文献(References)

- [1] Crossgrove, et al. Manganese distribution across the blood-brain barrier: Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin [J]. Neurotoxicology, 2003,24(1):3-13
- [2] Nagatomo S, et al. Manganese intoxication during total parenteral nutrition :report of two cases and review of the literature[J]. J Neurol Sci, 1999, 162:102-105
- [3] Calabresi, et al. A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication [J]. Neurobiol Dis, 2001,8(3):419-32
- [4] Wang DX, et al. Occupational exposure to manganese in welders and associated neurodegenerative diseases in China [J]. Toxicol Sci, 1998, 42(Suppl):24
- [5] Pal PK, et al. Manganese neurotoxicity:a review of clinical features, imaging and pathology[J]. Neurotoxicology, 1999,20:227-238
- [6] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].北京:世界图书出版公司,1996;127-143
SiTu Zheng-qiang, Wu Jun-zheng. Culture of Cell. Publishers of World Books, 1996:127-143
- [7] D. Hockenbery, G. Nunez, C. Milliman, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. Nature, 1990, 348:334-336
- [8] 萨姆布鲁克.分子克隆实验指南[M].第 2 版.北京:科学出版社,1999:898-900
Sumbruk. Experiment Manual of molecular cloning[M]. The 2nd Edition, PeKing: Science Publishers, 1999:98-900
- [9] Sengestock GJ, et al. Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra[J]. Exp Neuro, 1994,130(1):82-94
- [10] Ingersoll RT, et al. Central nervous system toxicity of manganese. Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal administration of manganese chloride [J]. Fundam Appl Toxicol, 1995,27: 106-113
- [11] M. Leist, et al. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis [J]. J Exp Med, 1997, 185:1481-1486
- [12] 丁训诚.锰对大鼠脑纹状体多巴胺受体的毒作用[J].中国药理学与毒理学杂志,1987,1:161-165
Ding Xun-cheng. Toxic action of manganese on dopaminergic receptor of striatum of rats[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 1987,1:161-165
- [13] A. Batistatou, et al. Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. J. Neurosci, 1993, 13:4422-4428
- [14] M.S. Desole, et al. Manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine induce apoptosis in PC12 cells. Neurosci. Lett, 1996, 209:193-196