

六氯苯对 PC-12 细胞凋亡的影响 *

栾春业¹ 王 强² 张 晶¹ 徐 艳² 肖 杭^{2△} 张劲松^{1△}

(1 南京医科大学第一附属医院急诊中心 江苏南京, 210029;

2 南京医科大学公共卫生学院神经毒理研究室 江苏 南京 210029)

摘要 目的 探讨环境内分泌干扰物六氯苯对 PC-12 细胞凋亡的影响及其可能机制。方法 采用体外细胞培养方法, 5 % CO₂ 37 °C 恒温条件下, 将 PC-12 细胞培养于含 10 % 灭活胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中。0、1、10、20、100、200 μ mol.L⁻¹ 六氯苯处理组, 每组设 3 组复孔, 培养 24 h 后应用 Cell Counting Kit-8 试剂盒进行六氯苯对 PC-12 细胞增殖和毒性分析; 流式细胞术 FITC-Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡率; Hoechst33258 染色及倒置荧光显微镜拍摄细胞平片, 观察细胞形态学改变 免疫印记法 (Western blot) 检测相关蛋白 PLCγ 及 ERK 蛋白磷酸化表达变化。结果: 随着六氯苯浓度增加, 细胞凋亡率升高, 呈剂量依赖关系; Hoechst33258 染色可见细胞核膨大、染色质边集浓染等凋亡特征 与对照组相比 p-PLCγ 及 p-ERK1/2 表达均降低, 呈剂量依赖效应。结论 六氯苯能够诱导 PC-12 细胞凋亡, p-PLCγ 及 p-ERK1/2 信号通路可能在此过程中发挥作用。

关键词 环境内分泌干扰物 六氯苯 PC-12 细胞 凋亡 p-PLCγ p-ERK1/2

中图分类号 R595.4 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 07-1216-04

Effects of Hexachlorobenzene on the Apoptosis of PC-12 Cells*

LUAN Chun-ye¹, WANG Qiang², ZHANG Jing¹, XU Yan², XIAO Hang^{2△}, ZHANG Jin-song^{1△}

(1 Department of Emergency, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China;

2 Laboratory of Neurotoxicology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Hexachlorobenzene on the apoptosis of PC-12 cells. **Methods:** The PC-12 cells were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 μ g. ml⁻¹ penicillin, and 100 μ g. ml⁻¹ streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Treated with Hexachlorobenzene (0, 1, 10, 20, 100, 200 μ mol.L⁻¹) for 24 hours. Cell Counting Kit-8 was used to detect the proliferation and to do toxicity analysis. The morphological changes of PC-12 cells were observed by microscope, and cell apoptosis rates were detected by flow cytometry. The expression of p-PLCγ and p-ERK1/2 were determined by Western blot. **Results:** After treated with Hexachlorobenzene, PC-12 cells had morphological changes and higher apoptosis rates. The changes were evident with the increasing of the dose of Hexachlorobenzene. The 50% inhibiting concentration was 72 μ mol.L⁻¹. The apoptosis rate of 200 μ mol.L⁻¹ was 87.12 ± 3.21%. **Conclusions:** Hexachlorobenzene could induce apoptosis of PC-12 cells, and the expression of p-PLCγ and p-ERK1/2 proteins may play a role in the process of PC-12 cells apoptosis induced by Hexachlorobenzene.

Key words: EDCs; Hexachlorobenzene; PC-12 cells; Apoptosis; p-PLC; p-ERK1/2

Chinese Library Classification (CLC): R595.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1216-04

前言

六氯苯 (Hexachlorobenzene) 为有机氯杀菌剂, 属环境内分泌干扰物 (EDCs)^[1], 能干扰人体正常激素的生理作用, 曾广泛应用与农业生产以及化工原料。六氯苯具有神经毒性, 能影响大脑中甲状腺激素调节基因的表达^[2], 降低脑中甲状腺激素的摄取而影响大脑功能^[3]。在神经发育关键期暴露于六氯苯能引起中枢多巴胺含量增加^[4], 引起行为改变^[5]。其健康危害已越来越引起广泛的重视。本实验应用 PC-12 细胞作为多巴胺能神经元体外模型, 观察代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡的影响, 探讨六氯苯诱发神经元凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

PC-12 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞所; 六氯苯 (Hexachlorobenzene) 购于美国 sigma 公司; 各种规格培养皿为 Corning Costar 产品; Cell Counting Kit-8, 购于日本同仁公司; 流式细胞 FITC-Annexin V/PI 试剂盒购于南京联科公司。DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清为杭州四季青产品; 兔抗鼠 p-PLCγ 为 Santa Cruz 产品; p-ERK1/2 一抗为 CST 产品; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 PC-12 细胞培养及细胞增殖和毒性分析

PC-12 细胞以 1 × 10⁵ 接种于 96 孔培养板, 5 % CO₂ 37 °C 恒温条件下, 培养于含 10 % 灭活胎牛血清和青霉素 (100 u/ml) 及链霉素 (100 u/ml) 高糖 DMEM 培养基中, 显微镜下观察细胞达到对数生长期时用于实验。六氯苯用 DMSO 溶解, 初浓度为

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (81072329)

作者简介: 栾春业 (1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向 农药毒性机制研究。E-mail: zhunye82@126.com

△通讯作者 张劲松 E-mail: zhangjs@sjnu.edu.cn; 肖杭 E-mail: hxxiao@njmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-08 接受日期 2010-12-31)

2 mmol.L⁻¹,使用时用不含血清的 DMEM 培养基稀释到终浓度为 0.1、1、10、20、100、200 μ mol.L⁻¹,加入含有 PC12 细胞的培养板中并标记,设立对照组 (DMSO) 和只含培养基的空白组,继续培养 24 小时后,按照 CCK-8 试剂盒说明书的步骤加入试剂,37 度孵育 1 小时,多功能酶标仪 (TECON) 检测吸光度值 (A, ± S, n = 3),细胞抑制率 = 1 - [(A 实验 - A 空白) / (A 对照 - A 空白)] × 100%。

1.3 细胞形态学观察

应用 Hoechst33258 核染色结合荧光照相技术检测细胞核形态改变,取对数生长期 PC-12 细胞,按实验分组分别加入 0、72 μ mol.L⁻¹ 六氯苯 24 h 后, PBS 洗两次,加入固定液,然后加入 Hoechst33258 (终浓度为 10 mg.L⁻¹), 37 °C 避光染色 15 min, PBS 洗 3 次,用荧光显微镜 (BX50-FLA, Olympus) 观察,正常细胞核表现为弥漫均匀的低强度荧光,凋亡细胞核呈浓染致密固缩状态或颗粒状荧光,随机选取视野在荧光显微镜下摄片。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

按凋亡检测试剂盒说明操作,培养细胞经消化处理,离心收集细胞,沉淀加入结合缓冲液后加入 FITC-Annexin V 和 PI,避光孵育 30 min 后流式细胞仪检测 10 000 个细胞,凋亡分析软件计算 PC-12 细胞凋亡率,每一时相点重复检测 3 次。

1.5 Western blot 蛋白印迹法检测蛋白表达变化

培养 PC-12 细胞经不同浓度组 (0、1、50、100 μ mol.L⁻¹) 六氯苯染毒处理 24 h 后收集细胞沉淀, PBS 洗 2 遍,加入裂解液 (南京凯基), 4 °C 摇床反应 30 min, 12000 rpm/15 min 离心取上清, BCA 法测定总蛋白含量。Western blot 检测 p-PLCγ 和 p-ERK1/2 蛋白表达变化, 每孔上样 50 μ g, 15 % 体积分数 SDS-PAGE 分离样品。转膜、封闭,将 PVDF 膜与溶于 TBST 中的一抗 4 °C 过夜孵育,洗涤 5 min × 3 次,将膜浸入 1:1000 体积比的二抗稀释液,室温孵育 1 h,洗涤 30 min, ECL 法显影,拍摄图片,结果在 Gel-pro Analyzer 图像分析系统中进行积分灰度值分析。

1.6 统计分析

数据经 SPSS 11.0 软件统计分析,实验数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖和毒性分析

六氯苯对 PC-12 细胞具有毒性作用,且具有剂量依赖性,随着六氯苯浓度增加, PC-12 细胞的抑制率升高 (图 1)。200 μ mol.L⁻¹ 六氯苯细胞凋亡率最高为 87.12 %。数据录入 SigmaPlot 软件,经 Hill 方程曲线拟合, IC₅₀ 为 72 μ mol.L⁻¹, h 系数为 1.37。

2.2 流式细胞术细胞凋亡率检测

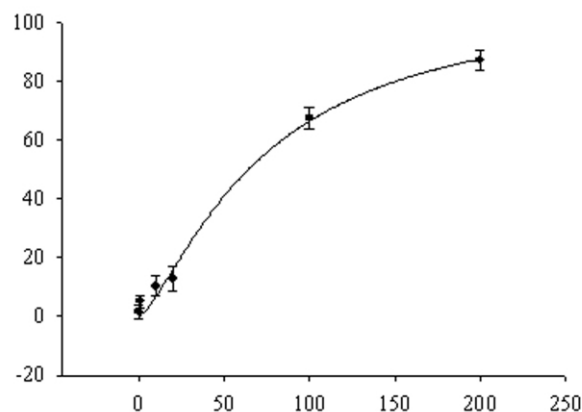


图 1 六氯苯对 PC-12 细胞的剂量 - 反应曲线 (Hill 方程拟合)。

Fig 1 Dose response curve of Hexachlorobenzene on PC-12 cells (Hill equation)

六氯苯作用 24 h 能够浓度依赖性的诱导 PC-12 细胞凋亡 (表 1), 与对照组比较, 各组细胞凋亡率 (早期调亡 + 晚期调亡, UR+LR) 逐渐升高, 具有统计学差异 (* P < 0.05)。

表 1 流式细胞术 FITC-AnnexinV/PI 双染检测六氯苯对 PC-12 细胞凋亡率 (%) 的影响

Tab 1 Effect of Hexachlorobenzene on apoptosis of PC-12 cells detected by flow cytometry

Group (μ mol/L)	UR+LR (% ± S)
Control	1.48 ± 0.47
1	3.70 ± 0.462*
50	19.71 ± 5.78*
100	87.89 ± 9.35*

Note: Compared with control group (* P < 0.05)

2.3 Hoechst33258 染色观察细胞形态学形态改变

与对照组相比, 72 μ mol.L⁻¹ 六氯苯处理组细胞数量减少 (图 2B), 荧光显微镜下可见细胞核浓染的调亡细胞, 高倍镜下可见胞核变形、膨大及核固缩、核小体形成 (图 2D)。

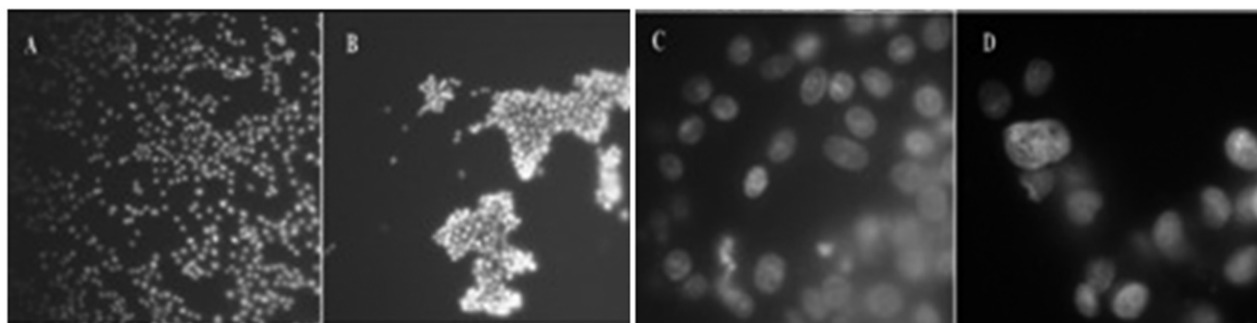


图 2 Hoechst33258 染色分析 PC12 细胞核形态学改变: A、C 对照组 B、D 72 μ mol.L⁻¹ 六氯苯处理组。A、B: × 100 C、D: × 1000。

Fig 2 Morphological change of nucleus of PC-12 cells: Figure A and C is control group; Figure B and D is treated with Hexachlorobenzene of 72 μ mol.L⁻¹. A, B: × 100 C, D: × 1000

2.4 六氯苯对 PC-12 细胞相关蛋白表达的影响

Western blot 蛋白印迹发现六氯苯处理 PC-12 细胞 24 小时以后, p-PLC γ 和 p-ERK1/2 表达均逐渐下降, 具有剂量反应关系 ($P < 0.05$)。

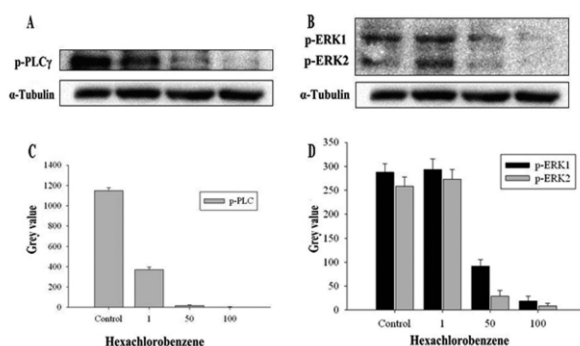


图3 六氯苯对 PC-12 细胞 p-PLC γ 和 p-ERK1/2 表达的影响。

Fig 3 Expression of p-PLC γ and p-ERK1/2 of PC-12 cells induced by Hexachlorobenzene.

3 讨论

细胞凋亡是机体在内外环境刺激下,启动自身机制,由基因调控的细胞死亡过程,伴随基因转录和蛋白质合成。常用的检测细胞凋亡的方法有很多^[6],主要包括形态学观察,荧光素标记结合流式细胞术,DNA 断裂检测法,凋亡相关蛋白的检测法以及线粒体内跨膜电位和膜渗透性变化的检测等。细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 包括 ERK1 和 ERK2,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键^[7]。介导转录活化,参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡等多种生物学反应。ERK 是一种存活因子,当生长因子丧失和应用细胞毒性物质时,ERK 通过磷酸化抗凋亡分子(如 Bad),同时激活转录因子(如 CREB)以刺激表达存活相关基因而产生抗凋亡作用^[8]。在锰诱导的神经细胞凋亡中这种凋亡前期的保护作用依赖细胞类型、药物种类和以及其他信号转导途径的状态^[9]。最近的研究发现 ERK 也是一种凋亡因子,ERK 激活伴随 Bax 的表达增加^[10],直接调控凋亡蛋白 Caspases 3 活化并诱发凋亡^[11],同时 ERK 被认为涉及参与神经元的退化^[12],持续缓慢的激活 ERK 在神经细胞凋亡中发挥作用^[13],与帕金森等慢性神经系统疾病相关。

磷脂酶 C γ (PLC γ) 是肌醇磷脂信号途径的一个关键酶和重要中介,是细胞生长,分化,凋亡的重要调控分子。研究发现磷脂酶 C γ 在双氧水诱导的 PC-12 细胞凋亡中发挥重要的保护作用^[14],阻断磷脂酶 C 信号通路能启动大肠癌细胞的凋亡^[15],在细胞信号转导过程中 PLC γ 水解细胞膜上磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (PIP₂) 产生三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰基甘油 (DAG) 两种重要的细胞内信使。三磷酸肌醇与内质网上的 IP₃ 配体门钙通道结合,影响胞内钙稳态,最终导致细胞凋亡^[16]。在 7 羟基胆固醇诱导主动脉平滑肌细胞凋亡过程的实验中,在出现高尔基体的裂解等超微结构改变之前,Ca²⁺ 和 ERK 信号通路已先发生了变化,两者均可导致细胞凋亡^[17]。

六氯苯具有高毒性,不易降解,生物累积性等特点,是重要的持久性有机污染物 (POPs) 之一^[18],已成为全球性的环境污染物质^[19],是联合国环境规划署 (UNEP) 国际公约中首批控制的 12 种 POPs 之一,也是我国 POPs 污染场地的主要污染物。六氯苯通过食物链富集到人体,对健康产生危害。目前,对六氯苯毒性的研究主要集中在肿瘤,甲状腺,生殖,卟啉和神经免疫系统等机理研究。本研究发现 ERK 信号通路及 PLC 通路可能共同参与六氯苯诱导 PC-12 细胞的凋亡过程,ERK 作为从胞膜到胞核间重要的信号蛋白,其表达下降引起下游信号蛋白的表达改变,破坏了细胞间促凋亡和促存活因素间的平衡,最终导致了细胞凋亡。PLC 除能影响钙稳态之外,还能通过激活 PKC/MEK,影响 ERK 通路,共同参与细胞凋亡过程^[20]。同时可能还有其他机制参与六氯苯诱导神经元凋亡过程,因此需要对相关信号通路介导细胞凋亡作用做更全面深入的研究,明确其作用的具体分子机制,才能更好地为临床预防和治疗长期暴露于六氯苯相关的神经退行性疾病提供依据。

参考文献 (References)

- [1] Alvarez L, Hernandez S, Martinez-de-Mena R et al. The role of type I and type II 5' deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status[J]. Toxicology, 2005,207(3):349-362
- [2] Roelens SA, Beck V, Aerts G et al. Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) by disturbance of thyroid hormone-regulated genes [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005,1040:454-456
- [3] van Raaij JA, Frijters CM, Kong LW, et al. Reduction of thyroxine uptake into cerebrospinal fluid and rat brain by hexachlorobenzene and pentachlorophenol[J]. Toxicology, 1994,94(1-3):197-208
- [4] Seegal RF, Brosch KO, Okoniewski RJ. Coplanar PCB congeners increase uterine weight and frontal cortical dopamine in the developing rat: implications for developmental neurotoxicity [J]. Toxicol Sci, 2005,86(1):125-31
- [5] Schantz SL, Widholm JJ, Rice DC. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children [J]. Environ Health Perspect, 2003,111(3):357-576
- [6] 王嘉宁,郭宁. 细胞凋亡的检测技术与方法[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005,19(6):466-470
Wang Jia-ning, Guo Ning. The detection technique and method of apoptosis [J]. Chinese journal of pharmacology and toxicology, 2005,19(6):466-470(in chinese)
- [7] Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, et al. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993,90(18):8319-8323
- [8] Bonni A, Brunet A, West AE et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms[J]. Science, 1999,286(5443):1358-1362
- [9] Fan M, Chambers TC. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy [J]. Drug Resist Updat, 2001,4(4):253-267
- [10] Kim YK, Kim HJ, Kwon CH et al. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells [J]. J Appl Toxicol, 2005,25(5):374-382
- [11] Nowak G. Protein kinase C- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced

- apoptosis in renal cells [J]. The Journal of biological chemistry, 2002,277(45):43377-43388
- [12] Medina MG, Ledesma MD, Dominguez JE, et al. Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation[J]. EMBO J, 2005,24(9):1706-1716
- [13] Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases [J]. Bioessays, 2003,25(11):1085-1095
- [14] 袁文丽,陆地,罗深秋. PLC- γ 1 信号通路在 H2O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡中的作用[J].南方医科大学学报, 2008,28(11):1939-1946
Yuan Wen-li, Lu Di, Luo Shen-qi, et al. Effect of PLC- γ 1 in the apoptosis of PC12 cells revulsified by H₂O₂ [J].Journal of Southern Medical University, 2008,28(11):1939-1946(In chinese)
- [15] 刘俊,李明,罗深秋. 阻断磷脂酶 C- γ 1 信号通路对大肠癌细胞凋亡的影响[J]. 第一军医大学学报, 2005,25(2):177-180
Liu Jun, Li Ming, Luo Shen-qi, et al. Effect of block PLC- γ 1 on the apoptosis of carcinoma of large intestine cells [J]. Journal of First Military Medical University, 2005,25(2):177-180(In chinese)
- [16] Wong R, Fabian L, Forer A et al. Phospholipase C and myosin light chain kinase inhibition define a common step in actin regulation during cytokinesis[J]. BMC Cell Biol, 2007,8:15
- [17] Ares MP, Porn-Ares MI, Moses S et al. 7 β -hydroxycholesterol induces Ca²⁺ oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Atherosclerosis, 2000,153(1): 23-35
- [18] 赵兵,刘征涛,黄民生. 持久性有机污染物的研究进展[J]. 净水技术, 2005,24(2):30-34
Zhao Bing, Liu Zheng, Huang Min-sheng. The study progression of persistent organic pollutants [J]. Water purification technology, 2005,24(2):30-34(In chinese)
- [19] 吴荣芳,陆晓华,解清杰. 六氯苯的环境危害及其污染控制[J]. 化学与生物工程, 2006,23(8):7-10.
Wu Rong-fang, Lu Xiao-hua, Xie Qing-jie et al. The environmental hazard and pollution control of Hexachlorobenzene[J]. Chemistry and bioengineering, 2006,23(8):7-10(In chinese)
- [20] Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, et al. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway[J]. Chem Biol Interact, 2008,173(2):122-128

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法 and 应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。