

染料木素对铅诱导的 PC12 细胞毒性的抑制效应研究 *

郭 喆¹ 李 丹² 张文斌² 姚 婷² 王四旺³ 蔡同建^{2Δ} 陈耀明^{2Δ}

(1 海军总医院药剂科 北京 100048 2 第四军医大学军事预防医学院军队劳动与环境卫生学教研室 陕西 西安 710032 ;

3 第四军医大学药学院药物研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨染料木素对铅诱导的细胞毒性的影响。方法 PC12 细胞分为对照组、染铅组、染料木素组以及铅加染料木素组; MTT 实验检测细胞活力的改变,流式细胞仪检测细胞凋亡水平的变化,荧光探针检测线粒体形态的改变,Western blot 方法检测线粒体融合分裂相关蛋白表达水平的变化。结果 铅可诱导 PC12 细胞活力的下降以及细胞凋亡率的显著增高,染料木素可抑制铅的这些毒性效应。与此同时,铅可诱导线粒体形态的损伤性改变,线粒体融合减少,分裂增多,而加入染料木素之后,线粒体损伤程度显著下降,线粒体分裂减少,融合增多。此外,线粒体融合相关蛋白 Mfn2 的水平在铅暴露后显著下降,而线粒体分裂相关蛋白 Drp1 的水平在铅暴露后显著升高,染料木素干预后均有所恢复。结论 染料木素可抑制铅诱导的 PC12 细胞毒性,其作用可能与其对线粒体融合分裂过程的干预有关。

关键词 铅 PC12 细胞 线粒体融合分裂

中图分类号: R595.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)12-2207-04

The Inhibitory Effect of Genistein on Lead-induced Cytotoxicity in PC12 Cells*

GUO Zhe¹, LI Dan², ZHANG Wen-bin², YAO Ting², WANG Si-wang³, CAI Tong-jian^{2Δ}, CHEN Yao-ming^{2Δ}

(1 Department of pharmacy, Navy General Hospital, Beijing 100048, China; 2 Department of Occupational and Environmental Health,

School of Public Health, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3 Institute of Materia Medica,

School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of genistein on lead-induced cytotoxicity in vitro. **Methods:** PC12 cells were divided into four groups: control, lead, genistein, and genistein + lead. MTT method was used to detect the cell viability; Flow cytometry method was used to detect the apoptosis; A fluorescent probe was used to determine mitochondrial morphological changes; Western blot was used to detect the expression of mitochondrial fusion and fission-related proteins. **Results:** The exposure to lead caused the decrease of cell viability and the increase of apoptosis, both of which can be inhibited by genistein. And lead exposure induced the morphological changes of mitochondria, which is characterized by the decrease of mitochondrial fusion and the increase of mitochondrial fission, which also can be reversed by the supplement of genistein. Furthermore, the lead exposure resulted in the decreasing expression of mitochondrial fusion-related protein Mfn2 and the increasing expression of mitochondrial fission-related protein Drp1, both of which can be relieved with the supplement of genistein. **Conclusion:** Genistein can inhibit lead-induced cytotoxicity in PC12 cells, which can be relevant to its effects on mitochondrial fusion and fission.

Key words: Lead; PC12 cells; Mitochondrial fusion and fission.

Chinese Library Classification (CLC): R595.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2207-04

前言

铅是环境中普遍存在的污染物,在体内可以长期蓄积,对人体可以产生全身性多系统的损伤。近年来由于经济生活的发展和工业环境的变化,环境中铅的含量逐渐升高,铅的毒性危害也日益受到人们的重视。虽然许多国家采取了一系列降低环境铅污染的措施,但慢性铅中毒依然是威胁人类健康的一个重要公共卫生问题。铅在人体内几乎没有生理功能。铅对机体是

全身性多系统的影响,其主要蓄积在血液、肝、肾、骨骼和脑等器官^[1]。神经系统是铅毒性的敏感器官。铅对多个中枢和外周神经系统中的特定神经结构有直接的毒害作用。在动物发育早期(人类可能是在出生前)暴露于铅主要表现为记忆和注意力的变化,而成年期铅暴露则表现为外周神经毒性。在中枢神经系统中,大脑皮层、海马和小脑是铅毒性作用的主要靶组织,而在周围神经系统中,运动神经轴突则是铅毒害的主要靶组织^[2]。尽管开展了多年的研究,但是目前仍然缺乏有效的铅神经毒性的

* 基金项目 国家自然科学基金重点项目(30830087)

作者简介 郭喆 药剂师. Tel: (010)66958227 Email: handsome8750@sina.com.cn

Δ通讯作者:陈耀明 Tel (029)84774867 Email ymchen88@fmmu.edu.cn

蔡同建 Tel (029)84774862 Email xtjcs1@netease.com

(收稿日期 2011-03-15 接受日期 2011-04-10)

防护药物,本研究首次探讨植物提取物染料木素对铅诱导的PC12细胞毒性的防护作用,以期对铅神经毒性的防护提供新的理论依据以及可能的途径。

1 材料方法

1.1 材料

高分化型PC12细胞购于中国科学院上海细胞所,新生牛血清(四季青公司),DMEM培养基干粉(Gibco公司),铅、MTT(Sigma公司),6孔培养板(NUNC公司),NU22500E型CO₂孵箱(Forma Scientif公司);酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂);Drp1兔多克隆抗体(Santa Cruz公司),Mfn1羊多克隆抗体(Santa Cruz公司),Mfn2鼠单克隆抗体(Abnova公司);OPA1鼠单克隆抗体(BD公司), β -actin小鼠单克隆抗体(Sigma公司),HRP标记抗兔、抗鼠、抗羊二抗(北京中杉公司);BCA蛋白定量试剂盒(Pierce公司),ECL plus化学发光液(Pierce公司),MitoTracker Green FM线粒体荧光探针(Invitrogen公司),FluorChem FC2凝胶成像系统(美国Alpha Innotech公司)。染料木素由我校药物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 PC12细胞及其培养 高分化型PC12细胞在含10%新生牛血清、100 U/ml青霉素以及100 μ g/ml链霉素的DMEM高糖培养液中,37℃、50ml/L CO₂、湿化条件下常规培养。每3d更换培养液一次。待细胞长满至培养瓶底面积80%之后直接吹打传代。实验用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 MTT实验 取对数生长期的细胞按照 1×10^5 个/孔的密度接种于96孔板中,常规培养。24h后换以分别含有不同处理因素(对照、铅、染料木素、铅+染料木素)的培养液,继续培养24h。其中铅浓度为100 μ M,染料木素浓度为10 μ M。处理结束后,取出培养板,按照20 μ l/孔加入MTT,继续培养4h。终止培养,吸弃培养孔内上清液,每孔加入150 μ l的二甲基亚砜(DMSO),振荡摇匀10min,在酶标仪上以波长490nm测各孔的吸光度(A值)值。实验时,每个浓度组均设置6个复孔,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。分别计算各浓度组吸光度平均值与对照组相比的抑制程度,以百分数表示,并作图。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞,按照 2×10^6 个/皿的密度接种于60mm培养皿,常规培养。24h后将细胞培养液更换为含有不同处理因素(对照、铅、染料木素、铅+染料木素)的培养液继续培养24h。直接利用培养液吹打、悬浮细胞,PBS洗涤2遍(1000 rpm离心5分钟)。小心收集细胞,加485 μ l的结合缓冲液重悬细胞;加入5 μ l的Annexin V-FITC(20 μ g/ml)及10 μ l的PI(50 μ g/ml)染液,轻轻混悬,4℃孵育30min,流式细胞仪分析,激发波长488nm,发射波长530nm。实验重复三次,并进行统计分析。

1.2.4 线粒体形态的观察 取对数生长期的细胞,接种于预先放置玻璃爬片的35mm培养皿中,不同处理因素作用结束后,用100nmol MitoTracker Green FM线粒体荧光探针37℃孵育30min,3.7%多聚甲醛固定液固定15min,PBS漂洗3遍,风干,抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜观察,绿色荧光为线粒体。

1.2.5 Western blot 检测线粒体融合分裂相关蛋白 Drp1 Mfn2、Opa1、Mfn1的表达水平 对数生长期的PC12细胞按照 2×10^6

个/皿的密度接种于90mm培养皿,48h后分别更换为含有不同处理因素(对照、铅、染料木素、铅+染料木素)的培养液继续培养24h。实验结束后,常规提取细胞蛋白样品,滤膜用脱脂奶粉室温封闭60min,分别与一抗4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗37℃90min。ECL发光法显色, β -actin作为内参,使用AlphaInnotech FluorChem FC2型凝胶成像仪获取免疫印迹图像。

1.2.6 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,采用SPSS13.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 染料木素可抑制铅诱导的PC12细胞活力的下降

为了明确铅对PC12细胞的毒性作用以及染料木素的防护效果。本研究首先使用MTT实验检测了细胞活力的改变。结果显示:100 μ M的铅作用24小时可明显诱导细胞活力的下降,而10 μ M染料木素可显著抑制铅所诱导的细胞活力的下降($P < 0.05$)(图1)。

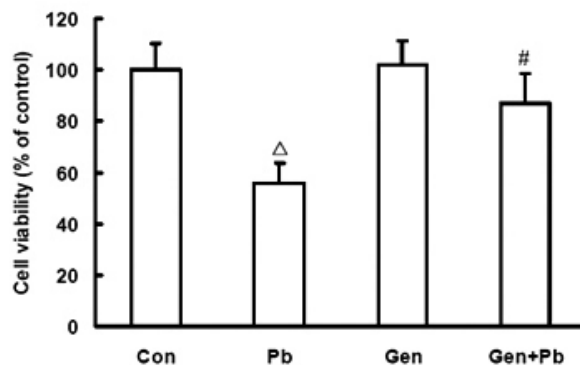


图1 染料木素对铅诱导的PC12细胞损伤的影响(MTT)($\triangle P < 0.05$ 与对照比较, $\# P < 0.05$ 与染铅组比较)

Fig.1 The effect of genistein on lead-induced cytotoxicity in PC12 cells (MTT)($\triangle P < 0.05$ vs. Control, $\# P < 0.05$ vs. Pb)

2.2 染料木素可抑制铅诱导的PC12细胞凋亡率的增高

通过Annexin V和PI双染,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,发现染料木素能够显著抑制铅所诱导的PC12细胞凋亡率的增加。100 μ M的铅作用后PC12细胞凋亡率显著增高,达到 $30.3 \pm 8.6\%$ 细胞凋亡率(对照组为 $5.2 \pm 2.1\%$)(图2)。而加入10 μ M的染料木素能够显著抑制铅所诱导的细胞凋亡,凋亡率由 $30.3 \pm 8.6\%$ 下降到 $16.5 \pm 5.8\%$ ($P < 0.05$)。

2.3 染料木素可抑制铅诱导的PC12细胞线粒体损伤

利用MitoTracker Green FM线粒体荧光探针染色细胞线粒体结果表明,铅作用24h后PC12细胞线粒体出现损伤的形态改变,线粒体出现断裂现象,线粒体融合减少,分裂增多。而加入染料木素之后,线粒体损伤程度显著下降,线粒体分裂减少,融合增多(图3)。

2.4 染料木素可抑制铅诱导的线粒体融合分裂相关蛋白的表达变化

Western blot结果显示:PC12细胞内线粒体融合相关蛋白

Mfn2 的水平在铅暴露 12h 后显著下降,染料木素干预后有所恢复,而 Mfn1、OPA1 的水平变化不明显。线粒体分裂相关蛋白 Drp1 的水平在铅暴露后显著升高,染料木素干预后有所恢复(图 4)。

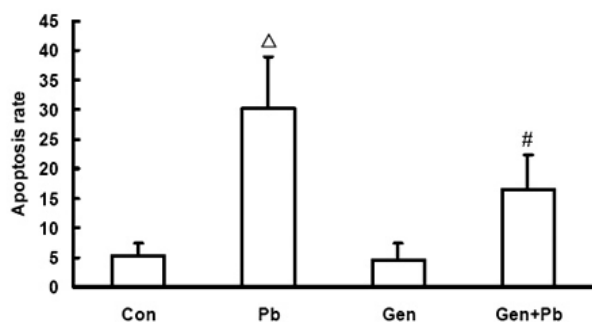


图 2 染料木素对铅诱导的 PC12 细胞凋亡的影响(ΔP<0.05 与对照比较 #P<0.05 与染铅组比较)

Fig.2 The effect of genistein on lead-induced apoptosis in PC12 cells (ΔP<0.05 vs. Control #P<0.05 vs. Pb)

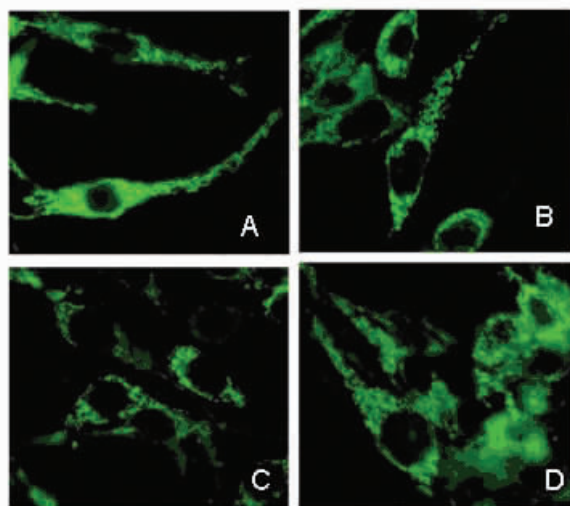


图 3 染料木素对铅诱导的线粒体形态改变的影响:A:Con; B:Pb; C:Gen; D:Gen+Pb

Fig.3 The effect of genistein on lead-induced mitochondrial morphology changes in PC12 cells:A:Con; B:Pb; C:Gen; D:Gen+Pb

3 讨论

铅是环境中一种主要的神经毒物,在人体内几乎没有生理功能,但它可以对机体产生一系列严重的损害作用,能影响神经系统的多种功能,尤其对婴幼儿和儿童发育中的中枢神经系统造成不可逆的损害,从而严重影响儿童智力发育和学习记忆^[3]。慢性铅暴露可导致儿童神经行为和智商改变。研究表明,低于“安全值”的微量铅仍对脑发育有影响^[4]。铅具有很强的神经亲和性,可在神经组织中蓄积,引起神经系统功能长期不可逆的损害。早期低剂量暴露即可导致脑功能的不可逆损伤,引起儿童学习障碍、运动失调、头痛、惊厥和昏迷等明显的急性脑病症状^[5-6]。近年来,国内外在慢性铅中毒神经毒性的防护措施方面开展了一系列研究,但是很多基础性问题仍然没有解决,

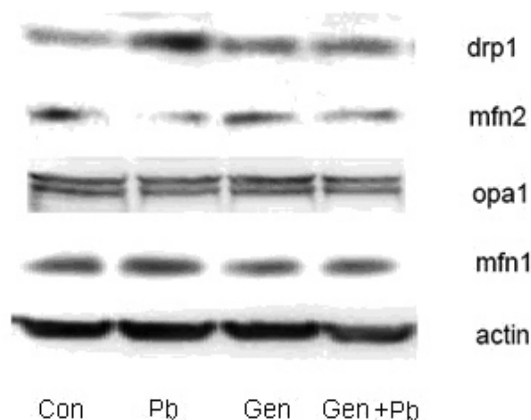


图 4 铅及染料木素对 PC12 细胞线粒体融合分裂相关蛋白表达水平的影响

Fig.4 The effect of lead and genistein on the expression of mitochondrial fusion and fission-related proteins in PC12 cells

限制了对铅神经毒性的有效防护。同时,传统的以排铅为主的药物治疗手段存在着种种的不足,限制了其在临床的应用。染料木素(genistein)也称金雀异黄酮,是一种大豆异黄酮类化合物,具有雌激素样作用,广泛存在于金雀花、皂荚、槐角等传统药用植物中,在大豆胚轴中含量也较为丰富。近年的研究发现,染料木素作为一植物雌激素,能改善去卵巢大鼠的学习记忆能力^[7]。染料木素具有多酚羟基结构,其上的氢原子易于在外来物质的作用下与氧原子解离形成氢离子并发挥还原效应,对抗超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$),阻断自由基的链锁反应从而发挥抗氧化作用。而海马 DG 区神经元随着年龄增长或者受损前后的再生障碍可以看成一种氧化损伤的累积过程,因此染料木素可通过抗氧化作用促进神经再生^[8]。本研究结果显示,染料木素能够抑制铅诱导的 PC12 细胞活力的下降以及凋亡率的增高,提示我们染料木素具有一定的抗铅毒性效应,有望成为铅毒性防治的候选药物。

一系列的研究表明线粒体在细胞内并不是一成不变的,而是一直处于线粒体分裂和融合的动态平衡之中,若平衡破坏则造成线粒体形态和功能的异常^[9-10]。线粒体融合是由线粒体融合蛋白 1、2 (Mitofusin1、2, Mfn1、Mfn2)、视神经萎缩蛋白 1 (Optic atrophy 1, OPA1) 介导的,发动蛋白相关蛋白 1 (Dynamin-related protein 1, Drp1) 和分裂蛋白 1 (Fission 1, Fis1) 则执行线粒体分裂过程。线粒体融合、分裂与维持线粒体功能及能量代谢关系密切。线粒体结构的破坏可导致线粒体膜电位异常^[11]。Mfn2 缺失导致丙酮酸盐、葡萄糖、脂肪酸氧化代谢和线粒体膜电位丧失,而在 Mfn2 功能恢复后可以增加葡萄糖代谢和恢复线粒体膜电位^[12]。研究表明线粒体分裂在细胞凋亡的发生中起重要作用,在凋亡细胞中发现内源性 Mfn2 与凋亡相关蛋白 Bax 共定位^[13,14],提示 Mfn2 与 Bax 结合调节细胞凋亡。现有证据显示,线粒体融合蛋白 Opa1 和 Mfn2 突变可导致显性视神经萎缩和进行性神经性肌萎缩的发生^[15,16],说明线粒体融合过程缺陷可导致列神经系统疾病,因此对线粒体融合分裂过程

的研究有利于开发针对性的新药,通过纠正线粒体融合缺陷而达到治疗疾病的目的。本研究结果显示,铅暴露后线粒体损伤显著增多,而加入染料木素之后,线粒体损伤程度显著下降,显示为线粒体分裂的减少、融合增多,提示染料木素抑制铅诱导的神经毒性可能与其对线粒体融合分裂的影响有关。此外,我们的研究还发现,线粒体融合分裂相关蛋白 Mfn2 和 Drp1 在染铅前后以及染料木素作用后的水平变化较为显著,而 Mfn1 与 OPA1 的水平变化不明显,提示我们线粒体融合分裂相关蛋白在铅诱导的神经毒性过程中的作用并不一致,有必要在后续研究中深入探讨这种差异的生理学意义。

因此,综合本研究的结果,铅暴露可以诱导线粒体的损伤性改变,其特征是融合的减少和分裂的增多,而染料木素可抑制线粒体的损伤,促进线粒体的融合,并同时抑制铅所诱导的细胞损伤效应。因此,加强对染料木素的铅毒性防护研究,有望为促进铅毒性的早期预防提供新的途径和思路。

参考文献(References)

- [1] Hackley B, Katz-Jacobson A. Lead poisoning in pregnancy: a case study with implications for midwives [J]. J Midwifery Womens Health, 2003,48(1):30-38
- [2] Toscano CD, Guilarte TR. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005,49(3):529-554
- [3] White LD, Cory-Slechta DA, Gilbert ME, et al. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 225(1):1-27
- [4] Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs [J]. Environ Health Perspect, 2005,113(12):1669-1674
- [5] Finkelstein Y, Markowitz ME, Rosen JF. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects [J]. Brain Res Brain Res Rev, 1998,27(2):168-176
- [6] Toscano CD, Guilarte TR. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 49(3):529-554
- [7] Huang YH, Zhang QH. Genistein reduced the neural apoptosis in the brain of ovariectomised rats by modulating mitochondrial oxidative stress [J]. Br J Nutr, 2010,104(9):1297-1303
- [8] Persichini T, Maio N, di Patti MC, et al. Genistein up-regulates the iron efflux system in glial cells [J]. Neurosci Lett, 2010, 470(2): 145-149
- [9] Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(R2):R169-176
- [10] Benard G, Karbowski M. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability [J]. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20(3):365-374
- [11] Ishihara N, Fujita Y, Oka T, et al. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1 [J]. Embo J, 2006, 25:2966-2977
- [12] Pich S, Bach D, Briones P, et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system [J]. Hum Mol Genet, 2005,14:1405-1415
- [13] Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death [J]. EMBO Rep, 2007, 8(10): 939-944
- [14] Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis [J]. J Cell Biol, 2002,159(6):931-938
- [15] Olichon A, Guillou E, Delettre C, et al. Mitochondrial dynamics and disease, OPA1 [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1763(5-6):500-509
- [16] Frank S. Dysregulation of mitochondrial fusion and fission: an emerging concept in neurodegeneration [J]. Acta Neuropathol, 2006, 111(2):93-100