

锰对 PC12 细胞的增殖抑制与凋亡研究 *

徐 强¹ 董大海¹ 缪 珊³ 李金翠⁴ 高 琨² 高丽莉² 侯顺利²
左 晶² 刘 红² 闫 文² 杨银书² 卢 娟² 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 ;

3 中国人民解放军第四军医大学药物研究所 陕西 西安 710032; 4 兰州军区第一医院 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的:研究锰作用下 PC12 细胞的增殖抑制作用与凋亡相关的形态学、生化指标改变。方法:用 200,400,600,800 μ mol/L $MnCl_2$ 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,透射电镜观察细胞形态学变化,琼脂糖凝胶电泳检测 $MnCl_2$ 对 PC12 细胞基因组 DNA 的影响。结果:MTT 实验显示 200-800 μ mol/L $MnCl_2$ 作用 4 天对 PC12 有显著的抑制作用,呈剂量和时间依赖趋势,600 μ mol/L $MnCl_2$ 作用 4d 对 PC12 的抑制率可达 50%以上。600 μ mol/L $MnCl_2$ 作用 4d 电镜可见细胞凋亡,同样条件下细胞 DNA 碎片化。结论:PC12 细胞在锰作用下发生增殖抑制,原因是锰诱导 PC12 细胞凋亡。

关键词 锰;鼠嗜铬神经瘤细胞(PC12);氧化应激;凋亡

中图分类号 Q95-3, Q593.1, R135 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)05-836-04

Oxidative Stress Mechanism of Manganese-treated PC12 Cell Line*

XU Qiang¹, DONG Da-hai¹, MIAO Shan³, LI Jin-cui⁴, GAO Kun², GAO Li-li², HOU Shun-li²,
ZUI Jing², LIU Hong², YAN Wen², YANG Yin-shu², LU Juan², XU Wen^{2△}

(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;

3 Institute for Drug Research of the Fourth Military Medical University. ShanXi, XiAn 710032, China;

4 The first hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA. Lanzhou, 730050)

ABSTRACT Objective: To investigate the apoptosis effect of Mn on the PC 12 cell line by detecting the cell morphology and biochemical changes. **Methods:** PC12 cells in logarithm period incubated in medium with 200, 400, 600, 800 μ mol/L manganese($MnCl_2$) for 1 day, 2 days, 3 days, 4 days respectively; The cell viability was detected by MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium Bromide]; Morphological changes of PC12 cells was investigated by transmission electron microscope; Agarose gel electrophoresis was used to detect the genomic DNA of Mn-treated PC12 transmission electron microscope as well as biochemical hallmark of DNA fragments. **Results:** The results of MTT revealed that manganese of different Concentrations ($MnCl_2$ 200, 400, 600, 800 μ mol/L) could suppress the proliferation of PC12 cells in dose and time-dependent manner. The cell inhibited ratio at the fourth day in 600 μ mol/L $MnCl_2$ culture medium approached 50% or more. In the same condition apoptosis was observed in cells. **Conclusion:** Mn has generated apoptosis which induced proliferation arrested of PC12 cells.

Key words: Manganese; Pheochromocytoma(PC12); Oxidative Stress; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q593.1, R135 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)05-836-04

前言

慢性锰中毒常见于锰矿工人或电焊工人,由于长期吸入锰(二氧化锰)微尘,锰沉积于小脑和基底节锥体外系而致病^[1]。临床表现为震颤性麻痹(肌强直及行走困难)和神经精神症状^[2],如强迫行为、痴笑、前冲或后冲步态、记忆缺损等^[3]。目前锰中毒机理尚未完全阐明。慢性锰中毒产生的功能性损伤与自发性 PD 锥体外系的表征和症状紧密相关^[4],其主要病理进程是选择性的黑质纹状体多巴胺能细胞的退行性变性^[5],多项研究表明凋亡在锰及 MPP^+ 引起的多巴胺能神经毒性作用中起着重要

作用^[6]。

鉴于中枢神经系统的不可介入性,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,进行细胞凋亡的形态学观察,琼脂糖凝胶电泳检测 $MnCl_2$ 对 PC12 细胞基因组 DNA 的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及实验分组^[7]

将 RPMI 1640 培养干粉倒入烧杯中,加 2g $NaHCO_3$, 980 ml 三蒸水,磁力搅拌器充分混匀,调整 pH 在 7.2-7.4,定容至

* 基金项目:甘肃省自然科学基金课题(1010RJZA058)

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。手机 13321336997, Email xuwen1166@sohu.com。

△通讯作者:徐文,博士,副研究员, Email jhewh@gsssc.gov.cn 电话:0931-8972071, 手机 13919760596, 传真 0931-8972014

(收稿日期:2011-08-09 接受日期:2011-09-03)

1000 ml, 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(100 U/ml)、和 2 mmol/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 10 mol/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 1×10^5 – 2×10^5 /L), 接种于 96 孔培养板(200 μl/孔)中^[7]。待细胞铺满 70%后, 换以含 MnCl₂(用)分别为 10, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 μmol/L 培养液, 分别培养 1 天, 2 天, 3 天, 4 天, 再加入 MTT(50 mg MTT 溶于 10 ml PBS 中, 磁力搅拌器充分混匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜器过滤除菌, 4℃保存)15 μl/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 150 μl 的二甲基亚砜, 震荡摇匀, 在酶标仪上以波长 490 nm 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($\bar{x} \pm s$)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:

$$\text{细胞抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD}} \times 100\%$$

表 1 不同浓度 MnCl₂ 对 PC12 细胞的抑制率(%)

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

Mn (μmol/L)	1 d		2 d		3 d		4 d	
	吸光值 OD	抑制率 Inhibite Ratio(%)	吸光值 OD	抑制率(%) Inhibite Ratio(%)	吸光值 OD	抑制率(%) Inhibite Ratio(%)	吸光值 OD	抑制率 Inhibite Ratio(%)
Control	0.49± 0.09	0	0.60± 0.02	0	0.78± 0.03	0	1.29± 0.10	0
200	0.46± 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

Note: experimental group vs control group in same time(P<0.01)

2.2 台盼蓝拒染法绘制细胞生长曲线

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 h 的抑制率分别为 32.67%, 56.32%和 74.14%。

2.3 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

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 2×10^4 个接种于 24 孔板中, 于培养箱中培养 24 h^[7]。换以含 MnCl₂ 分别为 200, 400, 600, 800 μmol/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。

$$\text{细胞抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组细胞数} - \text{实验组细胞数}}{\text{对照组细胞数}} \times 100\%$$

1.4 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。

1.5 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^[8]。

2 结果

2.1 不同浓度 MnCl₂ 对 PC12 细胞增殖的抑制作用(表 1)

由表 1 可知, 200–800 μmol/L MnCl₂ 对 PC12 细胞有抑制作用, MnCl₂ 的浓度为 600、800 μmol/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。

见到线粒体、内质网和溶酶体等。200 μmol/L MnCl₂ 于细胞 4d 透射电镜下细胞形态学变化不明显。600 μmol/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。

2.4 MnCl₂ 对 PC12 细胞基因组 DNA 的影响

600 μmol/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)。

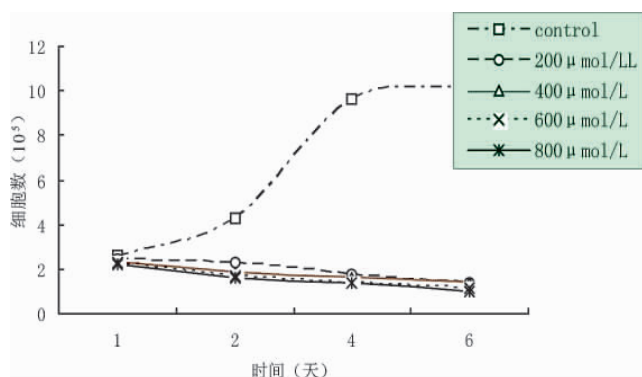


图 1 不同浓度的 $MnCl_2$ 作用下 PC12 细胞的生长曲线

Fig.1 Growth curve of PC12 cell treated by different concentrations of $MnCl_2$

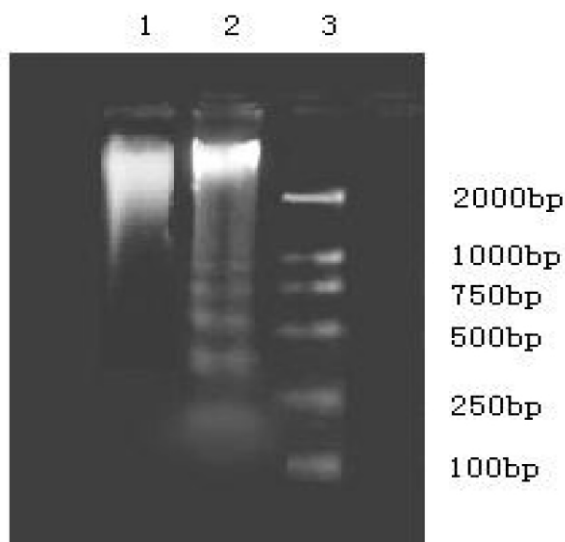


图 2-1 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ 作用于细胞 3d PC12 细胞基因组 DNA 凝胶

电泳: 1 对照 2 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ 作用于细胞 3d 3 DL-2000

Fig.2-1 Agarose gel electrophoresis tested the genomic DNA of 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ -treated PC12 cell on the 3th day. (1. control; 2. 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ on PC12 for 3 days; 3. DL-2000)

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^[11]。提示锰的神经毒作用机制与多巴胺能神经元的损伤有关。本研究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 $MnCl_2$ 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 $MnCl_2$ 作用下 PC12 细胞的生长曲线中得到了验证, $MnCl_2$ 抑制了 PC12 细胞的生长,显示出它的神经毒性作用特点。由于本研究关注锰的慢性蓄积毒性,所以筛选了 $MnCl_2$ 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 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ 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?

有研究采用克隆黑质多巴胺能细胞系 SN4741 细胞为实验模型^[12],对 MPP^+ 、 H_2O_2 、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^+ 、 H_2O_2 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^[13-14]。

本实验 600 $\mu\text{mol/L}$ $MnCl_2$ 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^[15],从而进一步证实 $MnCl_2$ 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。

参考文献(References)

- [1] Crossgrove JS, Allen DD, Bukaveckas BL, et al. Manganese distribution across the blood-brain barrier: Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin-g[J]. Neurotoxicology, 2003,24(1):3-13
- [2] Ehringer H, Dudczak E, Lechner K, et al. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems [J]. Klin. Wochenschr, 1960, 17: 1236-1240
- [3] Williams BB, Kwakye GF, Wegrzynowicz M, et al. Altered manganese homeostasis and manganese toxicity in a Huntington's disease striatal cell model are not explained by defects in the iron transport system [J]. Toxicol Sci, 2010, 117(1):169-179
- [4] Chtourou Y, Trabelsi K, Fetoui H, et al. Manganese Induces Oxidative Stress, Redox State Unbalance and Disrupts Membrane Bound ATPases on Murine Neuroblastoma Cells In Vitro: Protective Role of Silymarin [J]. Neurochem Res, 2011,24(12):4989-5002
- [5] Kawajiri S, Machida Y, Sakai S. Zonisamide reduces cell death in SH-SY5Y cells via an anti-apoptotic effect and by upregulating MnSO-D[J]. Neurosci Lett, 2010, 481(2):88-91
- [6] Sarkar S, Greenleaf JE, Gupta A, Ghosh D, et al. Evolution of community-based arsenic removal systems in remote villages in West Bengal, India: assessment of decade-long operation[J]. Res, 2010,44(19):5813-5822
- [7] 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[M]. Publishers of World Books, 1996,127-143
- [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
Sambrook. Experiment Manual of molecular cloning[M]. The 2nd Edition, PeKing: Science Publishers, 1999, 898-900
- [9] Pohl HR, Roney N, Abadin HG. Metal ions affecting the neurological system [J]. Met Ions Life Sci, 2011,8:247-262
- [10] Ingersoll RT, Montgomery EB Jr, Aposhian HV, 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] 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]. Journal of pharmacology and toxicology of China, 1987,1:161-165

- [12] Shimizu, Eguchi Y, Kamiike W, et al. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: Possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions[J]. Oncogene, 1996,12:2045-2050
- [13] Molina RM, Phattanasaradee S, Kim J, et al. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior

in offspring[J]. Neurotoxicology, 2011, 32(4):413-422

- [14] Li H, Wu S, Shi N, et al. J Nrf2/HO-1 pathway activation by manganese is associated with reactive oxygen species and ubiquitin-proteasome pathway, not MAPKs signaling [J]. Appl Toxicol, 2011, 7. doi: 10.1002/jat
- [15] Negga R, Rudd DA, Davis NS, et al. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurotoxicology, 2011, 32(3):331-341

(上接第 851 页)

- [16] Lim BK, Mahendran R, Lee YK, et al. Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse[J]. Japanese J Cancer Res, 2002, 93(1):36-41
- [17] Korshunov VM, Kafarskaia LI, Bagirova MS, et al. The effect of solco Trichovac on the vaginal microflora of patients with a papilloma-virus infection associated with a cervical intraepithelial neoplasm[J]. Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii, 1994 (5) : 13-17
- [18] 逯彩虹,程建新,周艾琳等.乳酸菌抗肿瘤作用的概况与应用进展[J].实用肿瘤杂志,2009,24(1):90-94
- Lu Cai-hong, Cheng Jian-xin, Zhou Ai-lin [J]. General situation and application progress of *Lactobacillus* antitumor effect [J]. Journal of

practical oncology, 2009, 24(1) :90-94

- [19] 陈晋安,刘蓉,郑忠辉,等.菊芋低聚果糖促进双歧杆菌生长的研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2001,40(4):968-972
- Chen Jin-an, Liu Rong, Zheng Zhong-hui, et al. The growth-promoting effect of Jerusalem artichoke fructo-oligosaccharides on *Bifidobacteria* [J]. Journal of Xiamen University (Natural Sciences), 2001, 40(4):968-972
- [20] Roberfrid MB, Van Loo JAE, Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products[J]. The Journal of Nutrition, 1998, 128(1) :11-19
- [21] 杜昱光,蒋寒青.双歧杆菌促进生长因子的研究[J].中国微生态学杂志,1996,8(6):50-51
- Du Yu-guang, Jiang Han-qing. Study on bifidus factors of *Bifidobacteria* [J]. Chinese Journal of Microecology, 1996, 8(6) :50-51