

阿维菌素对体外培养王鸽脑神经细胞凋亡和一氧化氮水平的影响

李 术^{1*}, 崔雅莉¹, 王 敏^{1,2}, 徐世文¹, 王俊杰¹

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江畜牧兽医职业学院, 双城 150100)

摘 要: 本试验以阿维菌素染毒原代培养的王鸽脑神经细胞为模型, 观察阿维菌素对神经细胞凋亡的毒性作用和一氧化氮产生量的影响。采用原位末端标记法观察细胞凋亡, 四唑盐比色法检测神经细胞相对存活率, 流式细胞术检测凋亡细胞百分比, 分光光度法测定细胞一氧化氮的产生量。结果显示, 阿维菌素可诱导神经细胞凋亡和细胞坏死, 并具有随着阿维菌素剂量递增而增加的趋势, 同时阿维菌素也能引起一氧化氮产生量降低, 但是未发现存在剂量效应关系。

关键词: 阿维菌素; 神经细胞; 凋亡; 一氧化氮

中图分类号: S859.79, Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0347-06

Effects of Apoptosis and NO Level of AVM on King Pigeon Brain Cells *in Vitro* Culture

LI Shu^{1*}, CUI Ya-li¹, WANG Min^{1,2}, XU Shi-wen¹, WANG Jun-jie¹

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Heilongjiang Vocational College of Animal Husbandry and

Veterinary Science, Shuangcheng 150100, China)

Abstract: The effects of apoptosis and NO level were explored with model of AVM on king pigeon brain neurocytes *in vitro* culture. Apoptosis was observed by TUNEL, the relative survival rate of neurocytes was detected by MTT, the percentage of apoptotic cells was detected by Flow cytometry, and the production of NO in cells was acquired by absorption spectrometry. The results showed that AVM can induce apoptosis and cytonecrosis of neurocyte, and has increased with the dose of AVM. AVM can reduced the production of NO, too, but no dose-response relationship.

Key words: AVM; neurocyte; apoptosis; NO

阿维菌素(AVM)具有优异的驱虫活性和安全性,是目前广泛使用的畜禽体内外抗寄生虫药物,也是种植业上广泛使用的高效杀虫剂。AVM作为农药,直接喷洒在人类食用的各种作物、蔬菜和果树上,残余的药液将危及人体健康;AVM作为防治动物寄生虫病的兽药,不论通过何种途径给药,大部分药物通过粪便以原型排除。由于该种药物导致了粪便中能降解药物的寄生虫数量减少,所以药物在用药物粪便中的降解速率较在未用药物粪便中的

降解速率要慢,由此造成了对环境的潜在负面影响^[1]。AVM在环境中的残留已经影响到环境的生态系统,AVM可以通过食物链进行生物富集,最终会影响处于食物链顶端的人类。因鸟类对环境中各种化学物质变化的敏感性,通常把鸟类作为大气生态环境检测的首选生物,程广东通过体内研究发现鸽子AVM亚急性中毒时脑组织存在细胞凋亡现象,随着染毒剂量的升高,凋亡细胞的数量亦增加^[2]。本试验选用了王鸽作为试验动物,旨在以原代培养的王鸽脑神经细胞为试验对象,排除机体其

收稿日期: 2009-11-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30471278); 黑龙江省教育厅科研项目(10541029)

作者简介: 李 术(1970-), 女, 黑龙江通河人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物营养生理学与神经生理学研究

* 通讯作者: 李 术, Tel: 0451-55190083, E-mail: lishu101@yahoo.com.cn

他因素的调控,研究 AVM 对体外培养的神经细胞的损伤作用,同时检测细胞凋亡以及一氧化氮(NO)的变化,以此探讨 AVM 毒性作用机制,评价环境中的 AVM 对鸟类的毒性、毒理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

8~9 日龄美国王鸽鸽胚。

1.2 细胞培养

神经细胞的原代培养和纯化参照王敏^[3]的方法稍加改进。

1.3 染 AVM 细胞爬片的制备

神经细胞在载玻片上贴壁培养 48 h 后,更换含 AVM 分别为 0 (I 组)、2.5 (II 组)、5 (III 组)和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (IV 组)的培养液,继续培养 24 h,将细胞爬片取出以 PBS(pH 7.4)漂洗去除残留的培养液,备用。

1.4 染 AVM 细胞悬液的制备

神经细胞培养 48 h 后,取培养板按终浓度为 2.5、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 AVM,同时设空白对照组。染毒培养时间 24 h,将对照组细胞和染毒后细胞分别用 0.25 % 胰蛋白酶消化,至细胞脱离时,加入含血清培养液摇晃使细胞完全脱落,分别收集细胞悬液,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用 PBS(pH 7.4)液漂洗 2 次以去除杂质,备用做后续检测。

1.5 苏木精—伊红(HE)和原位末端标记法(TUNEL)染色

取经过终浓度为 0、2.5、5 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AVM 试验处理的神经细胞爬片,室温下固定后染色。染色方法分别参照 HE 试剂盒和 TUNEL 试剂盒说明书进行。

凋亡细胞计数:光镜下在每张爬片上随机计数 10 个视野内的总细胞和凋亡细胞数量。

1.6 细胞存活率的测定

将细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板,培养 48 h 后按终浓度 2.5、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 加入 AVM,同时设空白对照组,再培养 24 h。每孔加入 20 μL 噻唑蓝(MTT)(终浓度 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h,小心吸弃每孔的培养上清液,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min,使结晶充分溶解。用酶标仪

在 570 nm 波长处测定 OD 值,通过计算相对细胞存活率(%)=(试验组 OD_{570 nm}-空白组 OD_{570 nm})/(对照组 OD_{570 nm}-空白组 OD_{570 nm})来观察 AVM 神经细胞的损伤程度。

1.7 流式细胞仪检测凋亡率

①收集各试验组细胞,调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$;②取 1 mL 细胞,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清;③加入 1 mL 冷的 PBS,轻轻振荡使细胞悬浮,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清;④重复③2 次;⑤将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer;⑥加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min;⑦加入 300 μL Binding Buffer,在 1 h 内上流式细胞仪检测。

1.8 细胞内 NO 含量和一氧化氮合酶(NOS)活性的测定

按试剂盒使用说明书进行检测。NO 含量的测定,硝酸还原酶法;NOS 活性的检测,比色法。

1.9 试验数据的分析与统计

应用 SAS6.12 软件对数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 神经细胞 HE 染色的观察

显微镜下可见凋亡的细胞突触逐渐消失,核染色质凝聚,嗜碱性增强,染成深蓝色,呈环状或新月状附在核膜周围,细胞膜皱褶、发泡以及形成膜包裹的凋亡小体。而正常细胞呈原有的形态,细胞核染成均一蓝色,胞膜完整连续。随着染 AVM 剂量的增加,神经细胞凋亡指数亦增加,试验组与对照组及各试验组间比较差异均极显著($P < 0.01$),见表 1 和图 1。

2.2 TUNEL 的检测结果

培养的细胞染色后于光镜下观察,细胞呈多角形或梭形、铺路石状排列。正常细胞被染成蓝色,凋亡阳性细胞胞核周围或大部分胞核呈棕褐色,且凋亡细胞的体积缩小,染色质致密凝集,核断裂成碎片,形成由完整细胞膜包裹的凋亡小体,本试验中,随着染 AVM 剂量的增加,神经细胞凋亡指数逐渐增加,试验组与对照组及各试验组间比较差异均极显著($P < 0.01$),见表 1 和图 2。

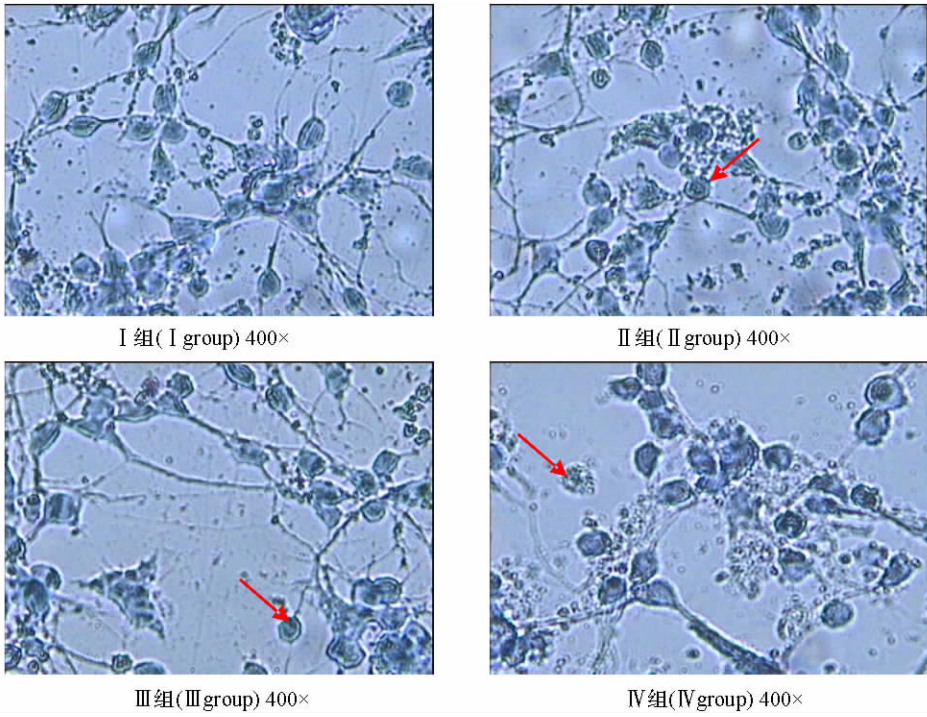


图 1 凋亡神经细胞的形态学观察(HE 染色,400×)
Fig.1 Morphology of neurocytes apoptosis (stained by HE,400×)

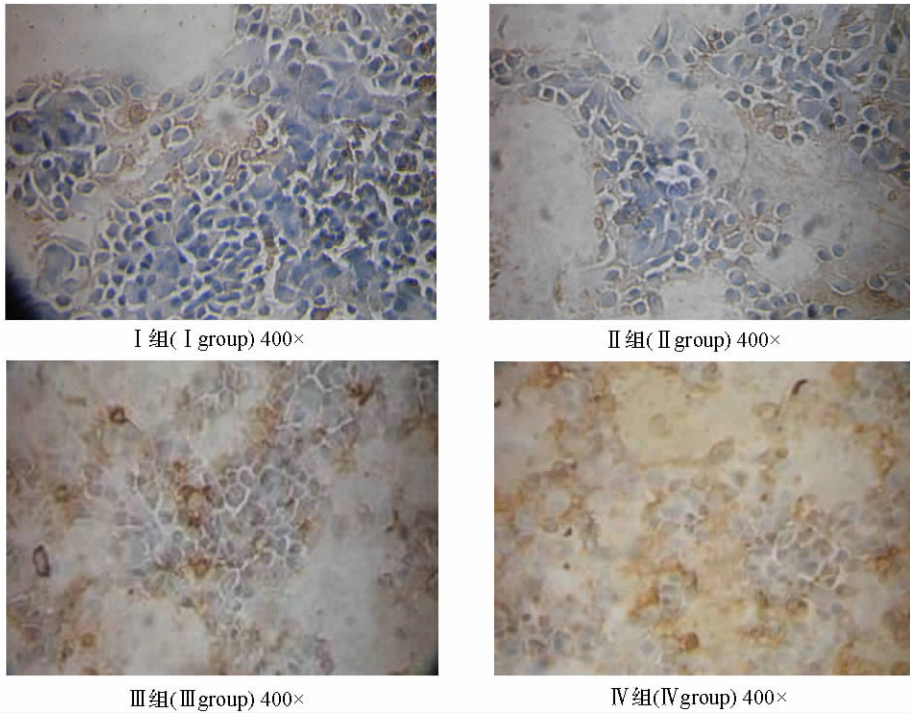


图 2 TUNEL 法检测神经细胞凋亡的结果 (400×)
Fig.2 The result of neurocytes apoptosis by TUNEL (400×)

表 1 HE 和 TUNEL 检测神经细胞凋亡结果

Table 1 The results of neurocytes apoptosis detected by HE and TUNEL($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	样本数 Sample	凋亡细胞指数/% Apoptotic index	
		HE 染色法 HE	TUNEL 法 TUNEL
I 组	5	12.61±1.05 ^{Dd}	18.84±1.32 ^{Dd}
II 组	5	23.48±2.13 ^{Cc}	27.52±0.96 ^{Cc}
III 组	5	30.39±1.97 ^{Bb}	36.25±3.79 ^{Bb}
IV 组	5	58.10±3.01 ^{Aa}	59.03±4.77 ^{Aa}

表中同一列数据进行比较,标有大写字母不相同者表示两组数据比较差异极显著($P<0.01$),标有小写字母不同者表示两组数据比较差异显著($P<0.05$),标有相同小写字母者表示两组数据比较差异不显著($P>0.05$),下表同

In the same column, means with different capital letter superscripts differ significantly ($P<0.01$), with different small letter superscripts differ significantly ($P<0.05$), with the same letter superscript shows no difference ($P>0.05$). The same as below

2.3 AVM 对神经细胞相对存活率的影响

由表 2 可以看出,随着染 AVM 剂量的增加,细胞相对存活率下降,试验组与对照组比较差异极显著($P<0.01$);各试验组之间比较,除低剂量组与中剂量组之间比较差异不显著($P>0.05$)外,其他各试验组间比较差异均极显著。

2.4 AVM 对神经细胞凋亡百分比的检测

神经细胞凋亡发生率(Annexin V+/PI-)随

染 AVM 剂量的增加而明显增高,试验组与空白对照组相比差异极显著($P<0.01$),各试验组之间比较差异也极显著($P<0.01$);由凋亡率和坏死率(Annexin V+/PI+)相比较可知,AVM 对神经细胞的损伤以凋亡为主,见图 3 和表 2。

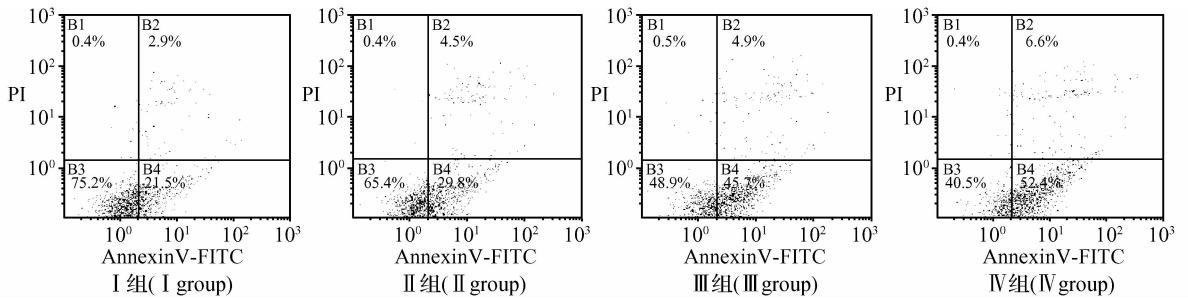


图 3 AVM 对神经细胞凋亡发生率的影响

Fig. 3 The incidence rate of neurocytes on AVM

表 2 AVM 对神经细胞凋亡发生率和相对细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$)Table 2 The incidence rate and the relative survival rate of neurocytes on AVM($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	样本数 Sample	细胞凋亡率/% Apoptotic percentage	细胞坏死率/% Necrosis rate	相对细胞存活率/% Relative survival rate
I 组	5	22.12±0.71 ^{Dd}	2.9±0.25 ^{Cc}	99.93±8.52 ^{Aa}
II 组	5	30.34±1.53 ^{Cc}	4.5±0.63 ^{Bb}	82.02±4.99 ^{Bb}
III 组	5	45.25±0.51 ^{Bb}	4.6±0.16 ^{Bb}	78.23±5.67 ^{Bb}
IV 组	5	52.30±2.50 ^{Aa}	6.6±0.39 ^{Aa}	56.36±2.17 ^{Cc}

2.5 AVM 对神经细胞内 NO、NOS 和 iNOS 的影响

神经细胞中 NO 含量, NOS 和 iNOS 活性因细胞中加入 AVM 而降低,各试验组与对照组比较差

异均极显著($P<0.01$);各试验组间比较差异均不显著($P>0.05$),见表 3。

表 3 AVM 对神经细胞内 NO、NOS、iNOS 含量的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 The production of NO, NOS, iNOS on AVM ($\bar{x} \pm s$)

组 别 Group	样本数 Sample	NO 含量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ Level of NO	NOS 活性/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$ NOS Activity	iNOS 活性/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$ iNOS Activity
I 组	5	150.42 ± 6.88 ^{Aa}	17.67 ± 1.44 ^{Aa}	12.54 ± 0.76 ^{Aa}
II 组	5	98.75 ± 5.44 ^{Bb}	7.36 ± 0.30 ^{Bb}	7.59 ± 0.70 ^{Bb}
III 组	5	110.63 ± 9.46 ^{Bb}	9.63 ± 0.34 ^{Bb}	6.65 ± 0.85 ^{Bb}
IV 组	5	108.75 ± 2.17 ^{Bb}	8.04 ± 0.45 ^{Bb}	6.81 ± 0.68 ^{Bb}

3 讨 论

3.1 AVM 对体外培养的王鸽脑神经细胞凋亡的影响

AVM 类药物作为一种有潜在毒性作用的物质,能促进 γ -氨基丁酸(GABA)从神经末梢释放,导致由 GABA 介导的中枢神经及神经-肌肉间传导受阻,并通过激活氯通道引起突触小泡中氯离子(Cl^-)的释放,使进入细胞内的 Cl^- 增加,细胞膜超极化,导致神经信号传导阻滞^[4],使细胞功能丧失,最终扰乱了正常的神经传导,出现神经毒性症状^[5]。神经毒理学研究表明,AVM 可对动物的神经系统产生影响^[6],在以往的报道中也发现,牛、猫、犬、骡驹等 AVM 中毒临床均表现明显的神经症状和神经器官的损伤,AVM 同样能引起王鸽中毒,表现小脑实质出血、水肿以及脑神经细胞凋亡等现象^[7]。

本试验以原代培养神经细胞为试验对象,观察高、中、低 3 种不同剂量 AVM 对其的毒性作用。结果发现,AVM 可引起细胞损伤,使细胞的存活率降低。为判断这种损伤是发生了凋亡还是已经坏死,结合形态学观察,发现受 AVM 诱导的神经细胞核染色质浓聚、固缩、聚集在核膜周边,胞质内形成多个膜结构尚完整的“小泡”及“凋亡小体”,这与文献^[8]报道的细胞凋亡形态学特征相一致。进一步综合凋亡细胞百分比等数据发现,受 AVM 诱导的神经细胞相对存活率降低,细胞凋亡指数升高,并与 AVM 加入剂量呈正相关。由此我们推测,AVM 能引起神经细胞凋亡,其凋亡严重程度与剂量相关。

3.2 AVM 对体外培养的神经细胞 NO 产生量的影响

在本试验中发现,受 AVM 诱导的神经细胞 NO 产生量 NOS、iNOS 活性均降低,未发现存在剂量效应关系。NO 作为一种重要的信息传递分子在中枢神经系统中具有重要的生物学功能,执行着脑血流调节、学习、记忆和调控基因表达等多种重要生理功能。但 NO 又具有“双刃剑”效应,即在某些特定的病理条件下,还表现出细胞毒性,引起神经损

伤^[9]。过量的 NO 可与 O_2 形成过氧化亚硝酸阴离子 ONOO^- , ONOO^- 被认为是促进细胞凋亡的介质之一。 ONOO^- 其主要机制是作用于线粒体,破坏线粒体结构的完整性,诱导线粒体膜通道开放,致使线粒体去极化和肿胀,释放内容物。 ONOO^- 还被证实可逆或不可逆地抑制一些线粒体呼吸链的中间反应,从而促使线粒体肿胀、去极化、钙释放和渗透性改变。而且 NO 还能损伤细胞 DNA,增强表达 P53,导致细胞凋亡。由此可见,过量的 NO 具有神经毒性,但近几年的研究又发现 NO 产生量低于正常水平同样会对神经细胞产生负面影响^[10]。有文献^[11]报道 NO 供体能抑制无营养素培养所致的 PC12 和交感神经细胞凋亡,张峰也曾报道 NO 供体能缓解缺氧导致的心肌细胞凋亡^[12],推断此 3 种细胞凋亡中存在着 NO 产生量不足,其低水平的 NO 可能介导了细胞凋亡。因此,本试验中 NO 产生量低于正常水平有可能与神经细胞凋亡有关。NO 供体硝普钠可诱导 3-氢- γ -氨基丁酸(3H-GABA)的释放^[13],NO 还可能参与 γ -氨基丁酸(GABA)对下丘脑促黄体激素释放激素的抑制作用^[14]。AVM 能够引起 GABA 释放量增加,那么是 NO 与 GABA 的这种相互作用关系导致了 AVM 诱导的神经细胞凋亡过程中出现了 NO 水平的降低,还是由于 GABA 释放量增加反馈抑制了 NO 的产生,还有待进一步研究。

4 结 论

4.1 AVM 能导致体外培养的王鸽脑神经细胞形态学发生改变,神经细胞相对存活率降低,细胞凋亡指数升高,并与 AVM 加入剂量具有相关性。

4.2 AVM 也能引起 NO 产生量降低,NOS 和 iNOS 活性降低,但是未发现存在剂量效应关系。

参考文献:

[1] 扈洪波,朱蓓蕾,李俊锁.阿维菌素类药物的研究进展

- [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 520-529.
- [2] 程广东. 阿维菌素致王鸽脑组织损伤机理的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005: 32-33.
- [3] 王 敏. AVM致体外培养王鸽脑神经细胞凋亡机理的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007: 8.
- [4] 伍一军, 冷欣夫. 杀虫药剂的神经毒理学研究进展[J]. 昆虫学报, 2003, 46(3): 382-389.
- [5] 吴强恩, 周志俊. 甲胺基阿维菌素的毒理学研究概况[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(9): 1129-1131.
- [6] 张晓峰, 任 锐, 吴沿萍, 等. 阿维菌素的急性毒性实验[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(8): 984.
- [7] 李 术, 沈建忠, 徐世文. 阿维菌素对鸽半数致死浓度的试验[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 48-50.
- [8] HÄCKER G. The morphology of apoptosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2000, 301(1): 5-17.
- [9] 周春艺, 李国君. 一氧化氮的神经毒性作用[J]. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(3): 124-126.
- [10] 梁立武, 张建荣, 杨长春. 高碘诱导脑细胞凋亡机制[J]. 武警医学院学报, 2005, 14(1): 31-34.
- [11] 朱成全, 李 锐, 周莉玲. 一氧化氮在神经元凋亡中的作用[J]. 人民军医, 2002, 45(2): 95-97.
- [12] 张 峰, 曹云新, 罗晓星, 等. 缺氧诱导的心肌细胞凋亡及一氧化氮的保护作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(3): 225-227.
- [13] SEILICOVICH A, DUVILANSKI B H, PISERA D, et al. Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8): 3421-3424.
- [14] 任银祥, 景玉宏. 一氧化氮在神经系统内功能的复杂性[J]. 兰州医学院学报, 2003, 29(3): 69-70.