

代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡的影响

张劲松¹, 栾春业², 王强³, 徐艳³, 张晶¹, 环飞³, 程洁³, 肖杭³

(1. 南京医科大学第一附属医院急诊中心, 江苏南京 210029; 2. 滨州医学院附属医院急诊科, 山东滨州 256603; 3. 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** 探讨代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 采用体外细胞培养方法, PC-12 细胞加入代森锰锌 0, 1, 10, 30, 60 和 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 24 h 后, 应用 WST-8 法检测 PC-12 细胞增殖; PC-12 细胞中加入代森锰锌 0, 1, 30 和 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 24 h 后, 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观察细胞形态学改变; Western 印迹法检测 Bcl-2 和 Bax 的表达以及 ERK 蛋白磷酸化水平。**结果** 与正常对照组相比, 随着代森锰锌浓度增加, 代森锰锌组晚期凋亡率升高, 呈浓度依赖关系, IC_{50} 为 49.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。代森锰锌 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞晚期凋亡率为 $(90 \pm 4)\%$ ($P < 0.05$); Hoechst33258 染色可见细胞核膨大、染色质边集浓染等凋亡特征; 与正常对照组相比, Bcl-2 逐渐降低, Bax 和 p-ERK1/2 表达增高 ($P < 0.05$), 代森锰锌 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 p-ERK1/2 积分吸光度分别为 128.0 ± 2.5 和 178.4 ± 4.0 。**结论** 代森锰锌能够诱导 PC-12 细胞凋亡, ERK 信号通路可能在此过程中发挥作用。

关键词: 内分泌干扰物; 代森锰锌; 细胞凋亡

中图分类号: R994.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2011)04-0349-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.04.004

代森锰锌(mancozeb)属含锰的乙烯基二硫代氨基甲酸盐类杀菌剂, 主要成分为代森锰, 属于环境内分泌干扰物^[1], 通过干扰体内正常激素的作用, 影响诸多系统和器官的功能。研究显示, 长期暴露于代森锰锌可能与帕金森等神经退化性疾病相关^[2], 体外培养中脑脑片暴露于代森锰锌 10~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能浓度依赖性地降低多巴胺能神经元以及 GABA 神经元的活力^[3], 动物实验也观察到代森锰锌染毒大鼠多巴胺能神经元凋亡^[4], 但具体机制尚不清楚。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, 探讨代森锰锌诱发神经元凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

PC-12 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞所; 代森锰锌购自美国 Sigma 公司; 各种规格培养皿为 Corning Costar 产品; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自日本同仁公司; 流式细胞术

FITC-Annexin V/PI 试剂盒购自南京联科公司; DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清为杭州四季青产品; 兔抗鼠 p-ERK1/2 一抗为 CST 产品; Bcl-2 和 Bax 购自南京凯基公司; 其余试剂为国产分析纯。BX50-FLA 荧光显微镜为日本 Tokyo 公司产品。

1.2 细胞培养及 WST-8 法检测细胞增殖和毒性分析

PC-12 细胞 1×10^5 接种于 96 孔培养板, 5% CO_2 , 37°C 恒温条件下, 培养于含 10% 灭活胎牛血清和青霉素 100 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ 及链霉素 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 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。代森锰锌用 DMSO 溶解, 初浓度为 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 使用时用不含血清的 DMEM 培养基稀释到终浓度为 1, 10, 30, 60, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入含有 PC-12 细胞的培养板中并标记, 设立对照组(二甲亚砜)和只含培养基的空白组, 每组设 3 组复孔, 继续培养 24 h 后, 按照 CCK-8 试剂盒说明书的步骤加入试剂, 37°C 孵育 1 h, 多功能酶标仪 (TECON) 检测吸光度值 (absorbance, A), 细胞抑制率 = $1 - [(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$, 重复实验 3 次。

1.3 Hoechst33258 染色观察细胞形态学

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 PC12 细胞, 加入代森锰锌 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 再培养 24 h 后, PBS 洗 2 次, 加入

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072329)

作者简介: 张劲松 (1962 -) 男, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事急诊危重病研究。

通讯作者: 张劲松, E-mail: zhangjso@sina.com; 肖杭, E-mail: hxiao@njmu.edu.cn

固定液, 然后加入 Hoechst33258 (终浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 37°C 避光染色 15 min, PBS 洗 3 次, 用荧光显微镜观察, 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 PC-12 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, 沉淀并加结合缓冲液后再加入 FITC-Annexin V/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 细胞早期凋亡率和晚期凋亡率, 每一时相点重复检测 3 次, 重复实验 3 次。

1.5 Western 印迹法检测蛋白表达

收集经代森锰锌 $0, 1, 30$ 和 $120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染毒处理 24 h 后细胞沉淀, PBS 洗 2 遍, 加入裂解液, 4°C 摇床反应 30 min, $10\ 625 \times g$ 离心 15 min 后取上清, BCA 法测定总蛋白含量。Western 印迹检测凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 以及 p-ERK1/2 蛋白表达, 每孔上样 $50 \text{ } \mu\text{g}$, 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 $5 \text{ min} \times 3$ 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吸光度 (integrated absorbance, IA) 值分析。

1.6 统计学分析

实验结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据经 SPSS 13.0 软件统计分析, 组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 代森锰锌对 PC-12 细胞增殖和凋亡的影响

图 1 结果显示, 代森锰锌对 PC-12 细胞具有毒性作用, 且具有浓度依赖性, 随着代森锰锌浓度增加, PC12 细胞的抑制率升高, 其中代森锰锌 $120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞抑制率为高达 $(90 \pm 4)\%$ 。经 Hill 方程曲线拟合, IC_{50} 为 $49.95 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *h* 系数为 5.57。

2.2 代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡率的影响

表 1 结果显示, 代森锰锌作用 24 h 能够浓度依赖性地诱导 PC-12 细胞凋亡。与正常对照组比较, 代森锰锌 $30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 PC-12 细胞的早期凋亡率升高到 $(9.5 \pm 1.0)\%$ ($P < 0.05$), 代森锰锌 1, 30 和 $120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 PC-12 细胞晚期凋亡率均明显

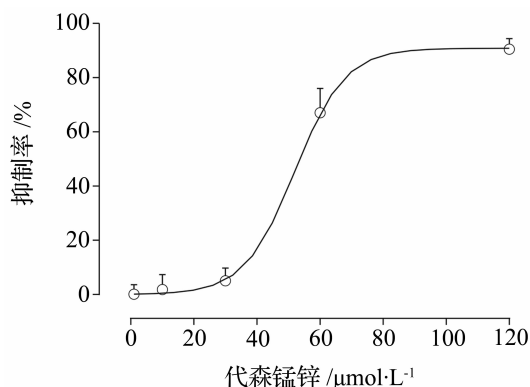


图 1 代森锰锌对 PC-12 细胞增殖和凋亡的影响, 对数生长期 PC-12 细胞, 用代森锰锌 $0, 1, 10, 30, 60$ 和 $120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养 24 h, 按说明书要求加入 CCK-8 试剂, 多功能酶标仪检测吸光度 *A* 值. 细胞抑制率 = $1 - [(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$. $\bar{x} \pm s, n = 3$.

Fig. 1 Effect of mancozeb on PC-12 cells proliferation.

升高 ($P < 0.05$)。代森锰锌 $120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 晚期凋亡率最高达 $(94.2 \pm 3.9)\%$, 与细胞增殖和毒性实验结果相符。

表 1 代森锰锌对 PC-12 细胞凋亡率的影响

Tab. 1 Effect of mancozeb on apoptosis of PC-12 cells

代森锰锌/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%
0 (正常对照)	3.04 ± 0.28	7.8 ± 0.9
1	2.96 ± 0.91	$14.0 \pm 1.2^*$
30	$9.38 \pm 1.01^*$	$24.3 \pm 2.2^*$
120	1.06 ± 0.90	$94.2 \pm 3.9^*$

代森锰锌处理细胞 24 h, 培养细胞经消化处理, 离心收集细胞, 沉淀并加结合缓冲液后再加入 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 细胞早期凋亡率和晚期凋亡率. $\bar{x} \pm s, n = 3$. * $P < 0.05$, 与正常对照组相比。

2.3 代森锰锌对 PC-12 细胞形态学的影响

正常对照组 PC-12 细胞表现为弥漫均匀的低强度荧光 (图 2A 和 C), 代森锰锌 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组细胞数量减少, 荧光显微镜下可见细胞核浓染的凋亡细胞, 呈致密固缩或颗粒状荧光高倍镜下可见细胞核变形、膨大及核固缩、核小体形成 (图 2B 和 D)。

2.4 代森锰锌对 PC12 细胞 Bcl-2, Bax 和 p-ERK1/2 表达的影响

图 3 结果显示, 代森锰锌使 PC-12 细胞 Bcl-2 表达下降, Bax 表达升高 (图 3A); 代森锰锌诱导 PC-12 细胞凋亡过程中 p-ERK1/2 表达增高, 代森锰锌 $120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 IA 分别为 128.0 ± 2.5 和 178.4 ± 4.0 (图 3B)。

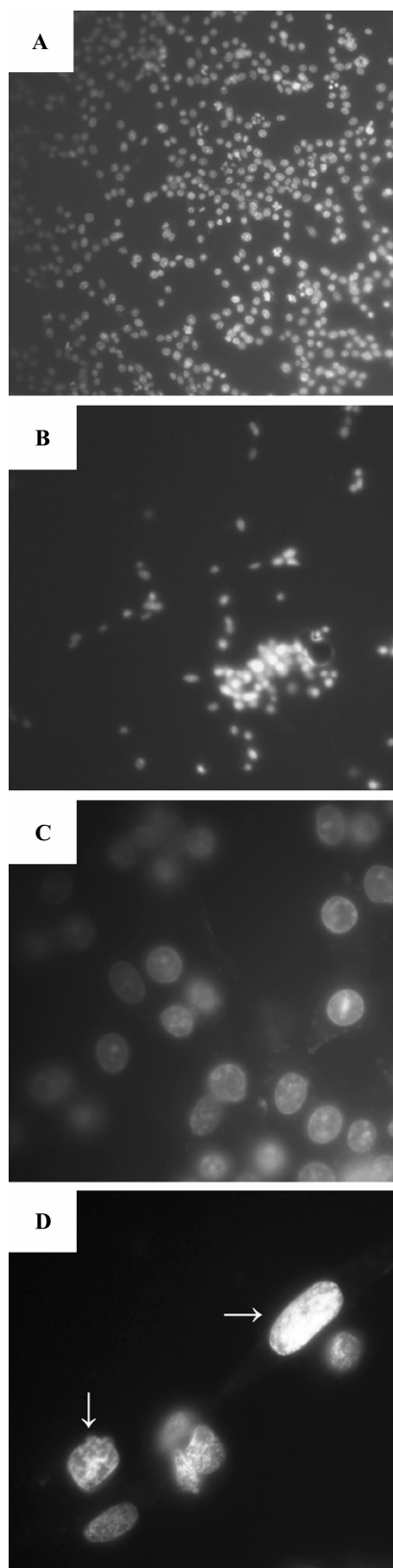


图 2 代森锰锌对 PC-12 细胞核形态的影响 (Hoechst33258). A, C: 正常对照组; B, D: 代森锰锌 $50\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组. A, B: $\times 100$; C, D: $\times 1000$. 对数生长期 PC-12 细胞代森锰锌处理 24 h 后, 采用 Hoechst33258 染色后, 倒置荧光显微镜随机选取视野摄片, 正常细胞核表现为弥漫均匀的低强度荧光, 凋亡细胞核呈浓染致密固缩状态或颗粒状荧光. 箭头示胞核变形、膨大及核固缩、核小体形成.
Fig. 2 Effect of mancozeb on morphological changes of nucleus of PC-12 cells.

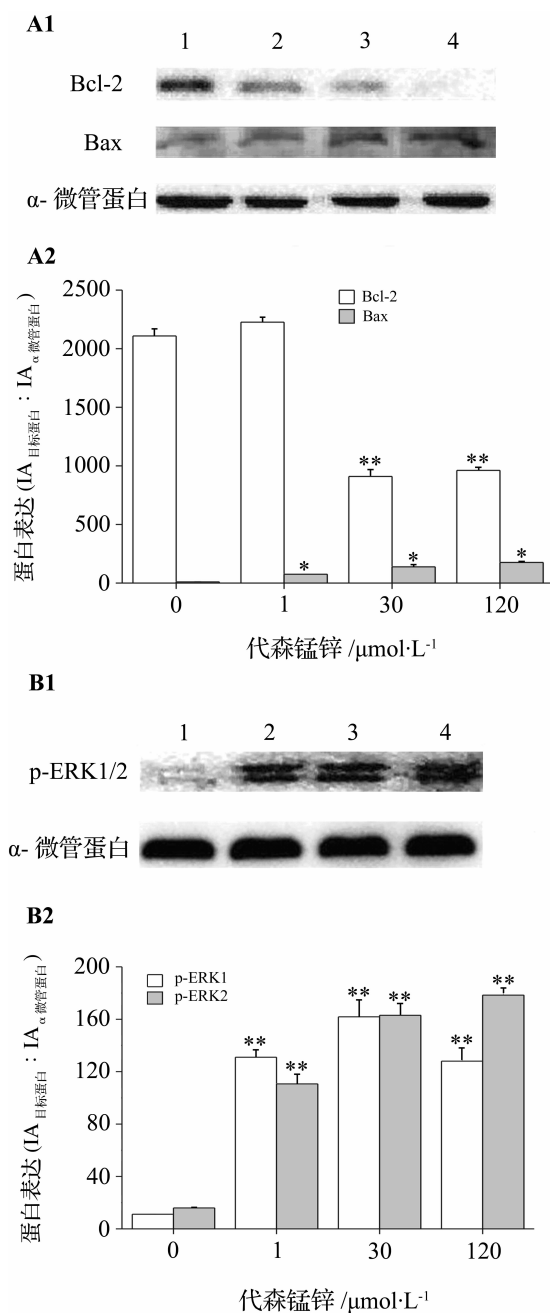


图 3 代森锰锌对 PC-12 细胞 Bcl-2, Bax (A) 和 p-ERK1/2 (B) 表达的影响. PC-12 细胞经代森锰锌处理 24 h 后, 条带 1~4 分别为正常对照组, 代森锰锌 1, 30 和 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与相应的对照组相比.

Fig. 3 Effect of mancozeb on the expression of Bcl-2, Bax, and p-ERK1/2 in PC-12 cells.

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. 形态学特点是细胞核染色质固缩, 细胞膜发泡, 细胞器紧缩, 凋亡小体形成与呈现“DNA 阶梯”电泳图谱. 常用的检测细胞凋亡的方法有很

多^[5],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。

Bcl-2 家族是研究最早的与凋亡有关的基因,也是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族。线粒体功能异常致凋亡途径与 Bcl-2 家族蛋白有着密切关系。Bcl-2 家族成员中的促凋亡蛋白 Bax 和抑凋亡蛋白 Bcl-2,以异二聚体的形式存在于线粒体内膜和内质网上,通过控制线粒体膜的通透性来调节凋亡激活物,如细胞色素 c 的释放来影响细胞的状态。Bcl-2 水平的升高和 Bax 的降低表明细胞对凋亡的抵抗性增强,反之则对凋亡的抵抗性减弱。本研究结果显示,代森锰锌诱导 PC-12 细胞凋亡过程中,可浓度依赖性地降低 Bcl-2 表达水平,增加 Bax 表达水平,Bcl-2 和 Bax 的比值降低,说明 Bcl-2 和 Bax 等蛋白参与了代森锰锌诱导的 PC-12 细胞凋亡。FITC-Annexin V/PI 双染结合流式细胞术结果显示,早期凋亡和晚期凋亡率均增高,代森锰锌 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时以晚期凋亡为主,早期凋亡细胞较对照组减少,可能与高剂量促使更多的早期凋亡细胞发展为晚期凋亡有关;Hoechst33258 染色观察 PC-12 细胞核形态学改变,可见核膨大、固缩,以及染色质边集浓染、核小体形成等凋亡形态学特征。

ERK 包括 ERK1 和 ERK2,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键。磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而介导转录活化,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。早期实验认为 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,ERK1/2 活化,抑制凋亡。但这种对凋亡前期的保护作用依赖细胞类型、药物种类以及其他信号转导途径的状态。最近的研究发现 ERK 也是一种凋亡因子,ERK1/2 激活伴随 Bax 的表达增加^[5],直接调控凋亡蛋白胱天蛋白酶 3 活化并诱发凋亡^[6]。在去甲斑蝥素诱导的细胞凋亡中 ERK 活化是其凋亡的下游信号^[7],同时 ERK 被认为参与了神经元的退化^[8],持续缓慢地激活 ERK 并在神经细胞凋亡中发挥作用^[9],与帕金森等慢性神经系统疾病相关。

代森锰锌诱导神经元凋亡中的作用机制具有复杂性和多样性。已发现金属锰能穿过血脑屏障发挥神经毒性作用,但含锰的乙烯基二硫代氨基甲酸盐类杀菌细胞毒性实验结果显示,起主要作用的是乙烯基二硫代氨基甲酸盐而不是锰^[3]。Calviello 等^[10]发现代森锰锌能引起细胞氧化应激导致 DNA 损伤,双向凝胶电泳发现各种氧化应激相关蛋白及转录因子的

表达发生变化^[10]。而 Dias 等^[11]在观察酵母菌对代森锰锌的耐受性实验时,发现代森锰锌并不是直接的氧化自由基或者氧化诱导物,可能是通过其他途径发挥作用。其他实验发现代森锰锌能干扰线粒体氧化呼吸,抑制线粒体的解偶联过程,降低 ATP 含量,对多巴胺能神经元以及 GABA 神经元都具有损伤作用^[12]。本研究发现 ERK 信号通路可能参与代森锰锌导致 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,其高表达会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,导致细胞最终不同的结局。另外可能还有其他机制参与代森锰锌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代森锰锌所导致的帕金森病等神经退行性疾病提供依据。

参考文献:

- [1] Cecconi S, Paro R, Rossi G, Macchiarelli G. The effects of the endocrine disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, **13**(29):2989-3004.
- [2] Debarh I, Rambelomanana S, Penouil F, Castaigne F, Poisot D, Moore N. Human neurotoxicity of ethylene-bis-dithiocarbamates (EBDC) [J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2002, **158**(12 Pt 1):1175-1180.
- [3] Soleo L, Defazio G, Scarselli R, Zefferino R, Livrea P, Foà V. Toxicity of fungicides containing ethylene-bis-dithiocarbamate in serumless dissociated mesencephalic-striatal primary coculture [J]. *Arch Toxicol*, 1996, **70**(10):678-682.
- [4] Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2000, **20**(24):9207-9214.
- [5] Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, et al. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2005, **25**(5):374-382.
- [6] Nowak G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na^+ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(45):43377-43388.
- [7] McGrew DM, Irwin I, Langston JW. Ethylenebisdithiocarbamate enhances MPTP-induced striatal dopamine depletion in mice [J]. *Neurotoxicology*, 2000, **21**(3):309-312.

- [8] Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, Lewén A, Omar G, Chan PH. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *J Neurosci*, 2002, **22**(18): 7923-7930.
- [9] Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases[J]. *Bioessays*, 2003, **25**(11):1085-1095.
- [10] Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, *et al.* DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, **211**(2):87-96.
- [11] Dias PJ, Teixeira MC, Telo JP, Sá-Correia I. Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach[J]. *OMICS*, 2010, **14**(2): 211-227.
- [12] Domico LM, Zeevalk GD, Bernard LP, Cooper KR. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction[J]. *Neurotoxicology*, 2006, **27**(5):816-825.

Effects of mancozeb on apoptosis of PC-12 cells

ZHANG Jin-song¹, LUAN Chun-ye², WANG Qiang³, XU Yan³, ZHANG Jing¹, HUAN Fei³, CHENG Jie³, XIAO Hang³

(1. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Department of Emergency, affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256603; 3. Laboratory of Neurotoxicology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect of mancozeb on the apoptosis of PC-12 cells. **METHODS** The PC-12 cells were cultured for 24 h after mancozeb 0, 1, 10, 30, 60 and 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were added. Cell Counting Kit-8 was used to assess the proliferation and toxicity induced by mancozeb. Twenty-four hours after mancozeb 0, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was added to PC-12 cells, the morphological changes of PC-12 cells were observed by a microscope, and cell apoptosis rates were detected by FITC-Annexin V/PI flow cytometry. The expression of Bcl-2, Bax and p-ERK1/2 was determined by Western blot. **RESULTS** Compared with normal control group, PC-12 cells in mancozeb groups showed higher apoptosis rates and evident morphological changes that became more evident with the dose of mancozeb. The IC_{50} was 49.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the apoptosis rate of PC-12 cells in mancozeb 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was $(90 \pm 4)\%$. The Bax protein levels increased and the Bcl-2 protein levels in mancozeb groups were decreased. Compared with normal control group, the p-ERK1/2 expression was significantly up-regulated. The grey value of p-ERK1/2 in mancozeb 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was 128.0 ± 2.5 and 178.4 ± 4.0 . **CONCLUSION** Mancozeb can induce apoptosis of PC-12 cells, in which the expression of p-ERK1/2 proteins may play a role in PC-12 apoptosis.

Key words: endocrine disruptors; mancozeb; apoptosis

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(81072329)

Corresponding author: ZHANG Jin-song, E-mail: zhangjs@sina.com; XIAO Hang, E-mail: hxiao@njmu.edu.cn

(收稿日期: 2010-11-10 接受日期: 2011-04-02)

(本文编辑: 付良青)