论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0130-03

鱼藤酮对PC12细胞线粒体膜电位及细胞周期的影响

李云鹏[1],杨和平[2],董兆君[1],乐卫东[3] (第三军医大学:[1]预防医学院军事毒理学教研室,[2]西南医院呼吸内科,重庆 400038;[3]Department of Neurology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA)

提 要:目的 观察鱼藤酮对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(pheochromocytoma, PC12细胞)线粒体膜电位及细胞周期的影响,探讨鱼藤酮对多巴胺神经元的损伤机制。**方法** 用流式细胞仪检测PC12细胞线粒体膜电位及细胞周期。**结果** 5.0 μmol/L鱼藤酮作用于PC12细胞12 h及24 h后,G_0/G_1期及S期细胞所占比例逐渐下降($P<0.01$),而G_2/M期细胞比例逐渐升高($P<0.01$)。单纯鱼藤酮中毒12 h线粒体膜电位即降低。**结论** 大剂量(5.0 μmol/L)鱼藤酮引起线粒体膜电位降低及细胞周期改变,可能导致PC12细胞生长障碍。

关键词:鱼藤酮;PC12细胞;线粒体膜电位;细胞周期;帕金森病

中图法分类号:R329.2; R73-354; R979.8 **文献标识码**:A

Effects of rotenone on mitochondrial potential and cell cycles in PC12 cells

LI Yun-peng[1], YANG He-ping[2], DONG Zhao-jun[1], LE Wei-dong[3] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, [2]Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military medical university chongqing 400038, China; [3]Department of Neurology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA)

Abstract: Objective To observe the effects of rotenone on the mitochondrial membrane potential and cell cycles in pheochromocytoma (PC12) cells and to explore the injury mechanism of rotenone on dopaminergic neuron. **Methods** The mitochondrial membrane potential and cell cycles were determined by flow cytometry. **Results** After treatment with 5.0 μmol/L rotenone for 12 and 24 h, the percentage of G_0/G_1 phase and S phase in cultured PC12 cells decreased gradually ($P<0.01$), but at the same time, the percentage of G_2/M phase increased. The mitochondrial membrane potential decreased markedly after administration of rotenone alone for 12 h. **Conclusion** Rotenone at the dose of 5.0 μmol/L can induce the decrease of mitochondrial membrane potential and the changes of cell cycles, resulting in the inhibition of PC12 cell growth.

Key words: rotenone; PC12 cell; mitochondrial potential; cell cycle; Parkinson disease

鱼藤酮是早期人们从鱼藤属植物中提取分离出来的一种有杀虫活性的物质,是三大传统植物性杀虫剂之一。它主要存在于豆科植物中,特别是在鱼藤属和灰叶属等植物中[1],自20世纪40年代以来一直被视为最安全有效的杀虫剂而广泛应用于农业除害。鱼藤酮杀虫制剂在我国果树、蔬菜中已有大量使用。鱼藤酮细胞毒性主要表现为不可逆的与线粒体电子传递链的NADH脱氢酶(即复合物I)结合而使之失活[2],导致细胞对氧的利用障碍和能量产生不足。Betarbet等[3]的研究采用鱼藤酮大鼠颈静脉插管输注,成功复制出类似帕金森病(Parkinson disease, PD)的动物模型,出现黑质多巴胺(dopamine, DA)神经退行性变、路易小体形成、震颤、步态不稳等症状,表现出类似帕金森病的症状,而其机制尚不清楚。由于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(pheochromocytoma, PC12)具有神经分泌细胞和神经元的性质,已广泛应用于神经毒理、神经生化等方面的研究,且PC12细胞在含有的酶类、膜受体及合成的递质等方面很接近中脑多巴胺神经元[4],现已成为国外研究PD的常见细胞模型。因此,为研究鱼藤酮中毒所致的多巴胺神经元损伤机制,本研究选用PC12细胞作为多巴胺神经元的细胞模型,以流式细胞术检测线粒体膜电位及细胞周期的变化,研究大剂量鱼藤酮(5.0 μmol/L)对PC12细胞毒性作用,进一步探讨帕金森病发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 PC12细胞株购自中国科学院上海细胞生物

作者简介:李云鹏(1971-),男,陕西省安康市人,博士研究生,实验师,主要从事神经毒理学方面的研究。电话:(023)68752356

通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285

收稿日期:2004-07-23;修回日期:2004-11-25

工程研究所。细胞放于含有 10% 小牛血清的 RMPI 1640 培养基，37 ℃，5% CO_2 培养箱内培养。

1.1.2　试剂与仪器　　鱼藤酮、罗丹明 123 及 L-NAME 均购自 Sigma 公司。碘化丙啶、RNase 由重庆医科大学儿童医院儿科研究所生化分析室提供。其余试剂均为分析纯。流式细胞仪 FACSCalibur(Becton Dickinson 公司，美国)。

1.2　方法

1.2.1　细胞周期分析　　PC12 细胞 1×10^5 个传代培养于 50 ml细胞培养瓶，培养至第 5 天，再按以下方法进行实验分组及处理：①正常对照组($n = 3$)：加入 0.1 ml 无菌生理盐水。②L-NAME对照组($n = 3$)：L-NAME 以生理盐水配制，过滤除菌。加入 0.1 ml L-NAME 溶液至细胞培养瓶中，使 L-NAME 终浓度为 100 μmol/L。③单纯鱼藤酮中毒组($n = 3$)。加入鱼藤酮溶液 0.1 ml，使终浓度为 5 μmol/L。④L-NAME + 鱼藤酮组($n = 3$)：预先加入 L-NAME 0.1 ml，使L-NAME终浓度为 100 μmol/L，24 h 后再加入鱼藤酮。以上各组均继续培养 24 h。各组均以 0.25% 胰酶消化细胞，1 000 r/min 离心收集细胞，无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液漂洗 2 遍，80% 乙醇固定过夜，上机前 1 000 r/min 离心 5 min，PBS 漂洗 3 遍，20 mg/ml 碘化丙啶及 10 g/L RNase 37 ℃避光孵育 30 min 后上机检测，每个样本检测 10 000 个细胞。

1.2.2　线粒体膜电位分析　　PC12 细胞的培养、分组及处理同细胞周期分析。0.25% 胰酶消化细胞，1 000 r/min 离心收集细胞。加入无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液漂洗 2 遍，沉淀加入1 ml PBS 缓冲液，再将储存于 − 20 ℃的溶于 DMSO 的罗丹明 123 加入，使之终浓度为 8 μg/ml，37 ℃负载 45 min，1 000 r/min 离心 5 min 后去除罗丹明 123，PBS 洗 3 遍后上机检测，激发波长为 488 nm，每个样本检测 10 000 个细胞，测定门控内相对荧光强度。

1.3　统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以 SPSS11.0 统计软件作 t 检验。

2　结果

2.1　鱼藤酮对 PC12 细胞周期的影响

单纯鱼藤酮作用 24 h 后，G_0/G_1 期细胞所占百分比例明显低于正常对照($P < 0.05$)，G_2/M 期细胞明显增多($P < 0.05$)，S 期细胞百分比有降低的趋势，见表 1。提示鱼藤酮可明显影响细胞增殖，并使细胞增殖阻滞于 G_2/M 期。鱼藤酮对细胞周期的影响见图 1，无凋亡峰出现。

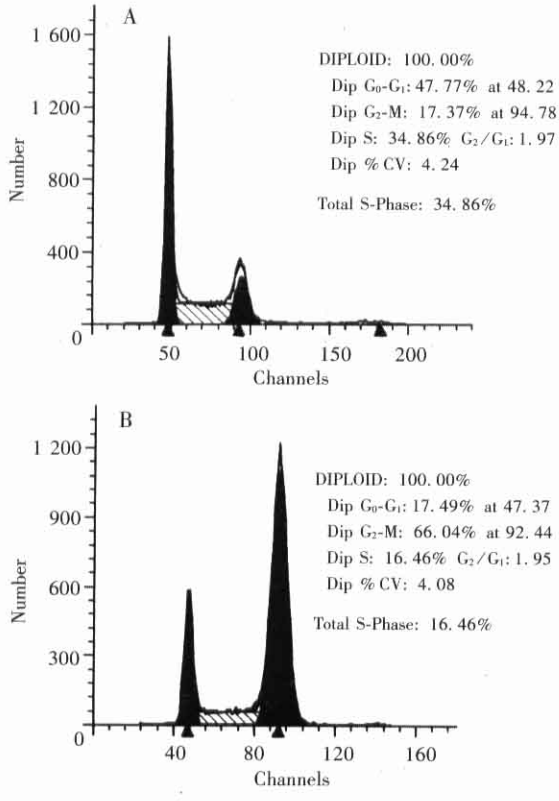
表 1　鱼藤酮对 PC12 细胞周期的影响(%，$\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effects of rotenone on the cell cycles of PC12 cells (%, $\bar{x} \pm s$)

Cell cycle	n	Time after rotenone intoxication (h)		
		0	12	24
G_0/G_1 phase	3	40.83 ± 3.27	35.61 ± 4.01	17.40 ± 4.68*
G_2/M phase	3	20.98 ± 5.13	38.73 ± 0.34*	66.45 ± 7.68*
S phase	3	34.85 ± 8.06	25.66 ± 4.08	16.15 ± 3.00

*：$P < 0.05$，*vs* 0 h

100 μmol/L L-NAME 预先作用 24 h，再加入 5.0 μmol/L 鱼藤酮作用 24 h，G_0/G_1 期及 S 期细胞百分率在鱼藤酮加入后 12 h 即明显降低($P < 0.01$)，至 24 h 降低更为明显。而 G_2/M 期细胞百分率在鱼藤酮加入后明显升高，并随时间延长而升高(表 2)。提示 L-NAME 不能改善鱼藤酮(5.0 μmol/L)所致的细胞增殖抑制作用。



A: Normal cell cycle of the PC12 cell; B: Rotenone-induced cell cycle of the PC12 cell

图 1　鱼藤酮对 PC12 细胞周期的改变

Fig 1　Changes of cell cycles of PC12 cells induced by rotenone

表 2　100 μmol/L L-NAME 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞周期的影响(%，$\bar{x} \pm s$)

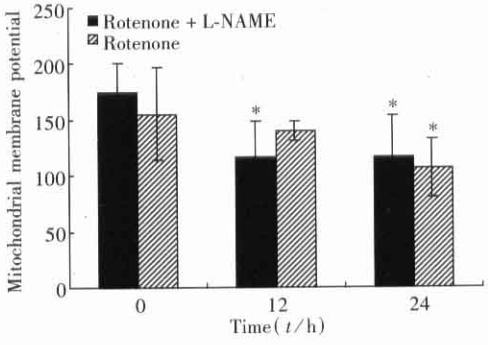
Tab 2　Changes of cell cycles in PC12 cell induced by rotenone after administration of 100 μmol/L L-NAME (%, $\bar{x} \pm s$)

Cell cycle	n	Time after rotenone administration (h)		
		0	12	24
G_0/G_1 phase	3	48.88 ± 1.18	31.13 ± 1.23*	17.10 ± 1.68*
G_2/M phase	3	17.32 ± 0.07	48.42 ± 1.01*	66.02 ± 1.88*
S phase	3	33.80 ± 1.19	20.45 ± 1.68*	16.88 ± 0.44*

*：$P < 0.01$，*vs* 0 h

2.2　鱼藤酮对 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位结果显示，单纯鱼藤酮(5.0 μmol/L)加入后 24 h，与对照组(0 h)相比，PC12 细胞线粒体膜电位持续降低，至 24 h 差异显著($P < 0.05$)。100 μmol/L L-NAME 预先作用 24 h 再加入 5.0 μmol/L 鱼藤酮作用 24 h，线粒体膜电位在鱼藤酮加入 12、24 h 后均低于单纯 L-NAME 对照组($P < 0.05$)，见图 2，提示鱼藤酮作为线粒体抑制剂可通过降低线粒体膜电位，而引起细胞功能障碍。



*：$P<0.05$，*vs* 0 h

图 2 5.0 μmol/L 鱼藤酮对 PC12 细胞线粒体膜电位的改变

Fig 2 Effects of 5.0 μmol/L rotenone on mitochondrial membrane potential of PC12 cells

3 讨论

帕金森病是最常见的神经退行性疾病之一，大约有 1%的 65 岁以上老年人罹患此病，黑质多巴胺途径的进行性退化是 PD 的病理学标志[5]。然而，目前黑质 DA 神经元特异性变性的确切原因仍然不明。但研究资料[6]已提示自由基生成、氧化反应增强、线粒体功能异常、内源性和外源性毒物等因素共同导致 DA 神经元特异性变性，在这一系列变化中线粒体功能异常起着主导作用。线粒体作为细胞内的能量产生工厂，经过氧化磷酸化产生能量及电子，最终在电子传递链的作用下经 ATP 合成酶生成 ATP。线粒体功能障碍与 PD 有着密切关系。

细胞死亡分为细胞凋亡及细胞坏死。细胞凋亡是一个主动的细胞死亡过程，也是一个正常的过程。凋亡受细胞内、外多种因素或因子的诱导。物理因素如射线、高温，微生物因素如微生物抗原、毒素病毒等。而一氧化氮作为反应性氮中间物的代表，是各种因素导致 DNA 损伤、诱导细胞凋亡的重要调节因素[7]。有研究表明细胞凋亡介导了鱼藤酮的细胞毒性[8]。我们的研究[9]业已证实 1.0 μmol/L 鱼藤酮可引起 PC12 细胞培养上清一氧化氮含量升高、DNA 梯状带形成及 caspase-3 蛋白活性增高，表现出凋亡诱导作用，而大剂量鱼藤酮是否也具有此作用？本实验发现 5.0 μmol/L 鱼藤酮可导致 PC12 细胞线粒体膜电位明显降低（$P<0.05$），细胞增殖阻断于 G_2/M 期。无凋亡峰出现。一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 预先作用对大剂量（5.0 μmol/L）鱼藤酮引起的细胞周期改变及线粒体膜电位降低无明显影响。提示 5.0 μmol/L 鱼藤酮导致的 PC12 细胞线粒体膜电位降低及细胞周期阻断并不直接诱导细胞凋亡。在大多数情况下，线粒体膜电位的降低表明线粒体膜通透转运孔的开放，而后者的开放导致线粒体释放 caspase 活化物，如细胞色素 C 和凋亡诱导因子，活化 caspase 而引起细胞凋亡。大剂量鱼藤酮（5.0 μmol/L）有可能通过抑制线粒体复合物 I 的活性而导致电子传递链的阻断，影响线粒体的产能过程，细胞因缺少 ATP，膜电位不能维持，钙离子的内环境稳定性受到破坏，自由基生成增多，引发自由基链式反应，最终导致细胞死亡。

细胞周期分为 G_1 期、S 期、G_2 期及 M 期。真核生物细胞的增生被控制在细胞周期的一个特定阶段，特别是 G_1 期到 S 期，G_2 期到 M 期转化过程中，细胞周期的转化依赖于一系列的细胞周期蛋白和细胞周期依赖性激酶的表达和激活，如 G_1 到 S 期、G_2 到 M 期转化过程中均有 Cdks 参与调控[10]。而鱼藤酮诱导的 PC12 细胞 G_2/M 期阻滞的过程中，有哪些细胞周期蛋白和细胞周期蛋白激酶参与，有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 徐汉虹，黄继光. 鱼藤酮的研究进展[J]. 西南农业大学学报，2001，23(2)：140－143.

[2] Lindahl P E，Oberg K E. The effect of rotenone on respiration and its point of attack[J]. Exp Cell Res，1961，23：228－237.

[3] Betarbet R，Sherer T B，MacKenzie G，*et al*. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease[J]. Nat Neurosci，2000，3(12)：1301－1306.

[4] Shafer T J，Atchison W D. Transmitter，ion channel and receptor properties of pheochromocytoma(PC12) cells：a model for neurotoxicological studies[J]. Neurotoxicology，1991，12(3)：473－492.

[5] He Y，Imam S Z，Dong Z，*et al*. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury[J]. J Neurochem，2003，86(6)：1338－1345.

[6] 刘振国，陈生弟，余慧贞. 帕金森病发病机制中自由基和线粒体功能异常的研究进展[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册，1995，22(6)：309－312.

[7] 陈华东，丁克祥，董力先. 一氧化氮诱导细胞凋亡[J]. 中国老年学杂志，1997，17(5)：313－315.

[8] Armstrong J S，Hornung B，Lecane P，*et al*. Rotenone-induced G_2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW[J]. Biochem and Biophys Res Commun，2001，289(5)：973－978.

[9] 李云鹏，董兆君，曾　惠，等. 一氧化氮在鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(9)：759－762.

[10] Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways：molecular anatomy and interactions with repair[J]. Cell，1998，94(5)：555－558.

（编辑　陈聪连）