文章编号:1000-5404(2007)24-2343-04

论著

MnTDM阻断百草枯诱导的N27细胞生长抑制的作用

陈 平[1],汪世龙[1],陈 震[2],李 昂[1],吴晓康[2],赵春军[1],梁立平[1] ([1]同济大学生命科学与技术学院,上海 200092;[2]同济大学附属上海市第十人民医院脑外科,上海 200072)

提 要:目的 探讨在离体培养的细胞中,SOD类似物[manganese(Ⅲ) meso-tetrakis (N,N′-diethylimidazolium-2-yl) porphyrin, MnTDM]阻断百草枯诱导的N27细胞生长抑制作用。**方法** 以N27细胞为多巴胺能神经元的细胞模型,检测不同浓度的MnTDM对百草枯诱导的N27细胞损伤的阻断作用,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞活性及代谢状态,免疫细胞化学及Western blot检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达,丙二醛(malondialdehyde, MDA)由硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid,TBA)法测定。**结果** 经百草枯作用后N27细胞活性下降,且其下降程度与百草枯浓度的升高呈线性关系。百草枯明显抑制N27细胞TH表达和明显升高MDA的浓度。MnTDM明显阻断百草枯诱导的细胞活性下降($P<0.05$)、TH表达抑制和MDA含量升高($P<0.05$),且该阻断作用与MnTDM的浓度有关。**结论** 氧化应激在百草枯介导的多巴胺能神经元损伤中起了重要作用,MnTDM对百草枯介导的氧化应激损害有一定的防治作用。提示其可能对帕金森病患者的临床防治有一定作用。

关键词: 帕金森病;百草枯;氧化应激;抗氧化剂
中图法分类号: R338.1;R595.405;R977.3 **文献标识码:** A

Protective effects of SOD mimetic on N27 cell injury induced by Paraquat

CHEN Ping[1], WANG Shi-long[1], CHEN Zhen[2], LI Ang[1], WU Xiao-kang[2], ZHAO Chun-jun[1], LIANG Li-ping[1] ([1]School of Life Science and Technology, Shanghai 200092, [2]Department of Cerebral Surgery, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract: Objective To determine if manganese (Ⅲ) meso-tetrakis (N, N′-diethylimidazolium-2-yl) porphyrin (MnTDM), a SOD mimetic, prevents the neurotoxicity of Paraquat in the dopa'minergic neurons. **Methods** N27 cell, a dopaminergic neuron cell line, was used as cell model of Parkinson's disease (PD) after Paraquat induction. After MnTDM intervention, the cell viability and metabolic state of Paraquat induced N27 cells were measured by MTT assay. Their protein expression of tyrosine hydroxylase (TH) was examined by immunocytochemistry and Western blot, and malondialdehyde (MDA) was detected with thiobarbituric acid (TBA) method. **Results** MnTDM significantly inhibited Paraquat-induced decreased cell viability and dopaminergic cell density depletion in N27 cell line in a dose-dependent manner. MnTDM also prevented the changes of TH expression and the increasing of MDA that were both caused by Paraquat. **Conclusion** Oxidative stress may play a role in the pathogenesis of Paraquat-induced dopaminergic cell damage. MnTDM prevents the neurotoxicity of Paraquat to some extent, suggesting the potential clinical therapy for PD.

Key words: Parkinson's disease; Paraquat; oxidative stress; antioxidant

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是较常见的神经退行性疾病之一,病变主要累及黑质和黑质纹状体通路,以中脑黑质多巴胺(dopamine,DA)能神经元变性、缺失为主要特征,其发病机制虽未明确,但某些导致该病的病因现已得到基本确认,其中环境因素一直是人们关注的焦点。百草枯(Paraquat,PQ)是广泛应用的除草剂之一。1966年首次报道百草枯中毒致死病例,但其有关中毒机制尚未完全阐明。目前认为,其毒性作用在于氧化产生的毒性物质引起。百草枯对多巴胺能神经元氧化损伤国内外已有报道[1,2]。近几年来,百草枯越来越多地被采用来制作PD的动物和细胞模型[2]。许多研究表明氧自由基在PD发病过程中起重要作用,黑质-纹状体氧化应激反应增强和局部抗氧化保护机制减弱是导致PD发病的重要因素[3]。自由基生成过多可以通过氧化应激(oxidative stress,OS)

作者简介:陈 平(1972-),男,安徽省安庆市人,博士研究生,讲师,主要从事神经退行性疾病方面的研究。电话:(021)28132992,E-mail:chenping@mail.tongji.edu.cn
通讯作者:梁立平,电话:(021)65986852
收稿日期:2007-03-09;修回日期:2007-09-23

作用损伤细胞内的脂质、蛋白质、核酸等主要物质，最终结果是通过坏死或凋亡的方式引起细胞死亡。金属卟啉属超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)类似物，是一族抗氧化剂，其分子较小，可通过血脑屏障，且抗氧化作用强，另外它还具有半衰期长等优点。MnTDM是一种锰卟啉类抗氧化剂，有较好的溶解性及更容易通过血脑屏障，因此有较好的生物利用可能[4]。

本实验采用N27细胞作元多巴胺能神经元的细胞模型，观察MnTDM对百草枯诱导的N27细胞损伤的保护作用，以阐明MnTDM阻断百草枯毒性作用的机制，探讨其防治PD的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

百草枯购自美国Sigma公司，N27细胞、MnTDM由我院兼职教授，美国Colorado大学医学中心梁立平提供，兔抗鼠TH多克隆抗体、生物素标记的山羊抗兔IgG二抗购自上海元像生物有限公司，丙二醛(malondialdehyde，MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞培养

N27细胞置于85% RPMI1640培养液中，内含体积分数为15%的胎牛血清，谷氨酰胺2 mmol/L，青霉素50 000 U/L，链霉素25 mg/L，在5% CO_2，37 ℃的培养箱内进行培养，隔天换液，当单层培养细胞汇合以后，接种传代培养。

1.3 实验分组及药物处理

实验共分为对照组、百草枯处理组、百草枯+不同浓度的MnTDM处理组。百草枯溶于培养液，终浓度为400 μmol/L，MnTDM用培养液配成终浓度为0.5、1、2 μmol/L，待细胞处于对数增生期时加入百草枯处理，百草枯处理前1 h加入MnTDM。

1.4 四甲基偶氮唑盐法(MTT法)

调节N27细胞密度约3×10^5 ml^{-1}，100 μl/孔接种于96孔板，观察细胞，待细胞处于对数增生期时加入不同浓度的MnTDM，不加MnTDM处理组加同样体积的培养液，1 h后加入百草枯处理，不加百草枯组加入同样体积的培养液。每一浓度设6个复孔，并设等量不含任何药物处理的空白对照组，待百草枯处理24 h后每孔加5 000 mg/L MTT 10 μl，培养4 h，Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)洗，每孔加二甲亚砜100 μl，37 ℃孵育30 min，DG-3022A型酶标仪测波长570 nm的吸光度值[$D(570)$]，作为反映N27细胞活性和代谢状况的参数。

1.5 免疫细胞化学检测N27细胞酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase，TH)的表达

细胞爬片(每组样本数为6)常规处理后用冷丙酮/甲醇固定；3% H_2O_2 孵育10 min；PBS洗3次×5 min；10%正常血清室温封闭(与二抗血清同源)30 min；加一抗(TH：1∶200)，阴性对照组加等量PBS，置4 ℃冰箱过夜；PBS清洗3次×5 min；加二抗(羊抗兔1∶100)，室温孵育30 min，PBS洗3次×5 min；加ABC复合物(1∶100，用前30 min配制)，室温孵育30 min，PBS洗，DAB显色；常规脱水、透明、封片。取染色标本，每组随机选择60～120个细胞，在MPV-Ⅲ显微分光光度计上，运用扫描法测量细胞的平均光密度(AOD)，用Tiger图像分析仪作图像分析，测定TH的相对含量。透射光源为氙灯，测量光栏为0.1 mm，测量波长490 nm，放大倍数为10×25。每组测定前以空白区为对照，记录全透图，调节暗电流为零，保持测量前后条件一致。

1.6 Western印迹法检测N27细胞TH表达

细胞经上述分组处理后，提取蛋白，样本(25 μg)经12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，通过半干转膜仪(Bio-Rad)将蛋白转印到PVDF膜，用5%脱脂奶粉洗脱液室温封闭2 h，加入抗TH或抗β-actin的大鼠单抗溶液，滴度均为1∶400，4 ℃孵育过夜，洗后加生物素标记的二抗(1∶1 000)，37 ℃孵育1 h，洗涤后ECL-PLUS发光检测，柯达图像仪扫描并处理，以β-actin作为内参照物调整后进行半定量分析。

1.7 硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA

细胞经上述处理后，收集并经含维生素C(0.2 mmol/L)和$FeCl_2$(0.25 mmol/L，维生素C溶液配制，以防$FeCl_2$氧化)的Tris-HCl buffer(50 mmol/L，pH 7.4)37 ℃处理1 h后，采用TBA法比色法测定MDA，四乙氧基丙烷为标准品，试剂盒由南京建成生物工程制品研究所提供。全部操作按说明书进行，DU-80分光光度计比色。细胞中MDA含量(nmol/mg)=[(测定管吸光度－测定空白管吸光度)/(标准管吸光度－标准空白管吸光度)]×标准品浓度(1×10^{-2} mmol/L)/蛋白含量(mg/ml)。

1.8 统计学处理

结果用$\bar{x}\pm s$表示，应用SAS 6.12统计软件进行多组间比较先行方差齐性检验，方差齐者进行方差分析；方差不齐者行成组秩和检验，组间比较用Newman-Keuls检验。

2 结果

2.1 MnTDM对百草枯处理后细胞生长的影响

实验结果表明，百草枯处理后细胞活性下降。400 μmol/L百草枯处理后细胞活性下降40%左右，与对照组比较有统计学意义($P<0.05$)。在随后的实验中我们选择400 μmol/L百草枯进行作用，检测不同浓度的MnTDM对百草枯诱导的N27细胞损伤的保护作用。0.5、1、2 μmol/L的MnTDM与400 μmol/L的百草枯联合作用后，与百草枯处理组比较其吸光度升高，且吸光度随MnTDM浓度的升高而升高(表1)，表明MnTDM能阻断百草枯对N27细胞生长的抑制作用，且这种阻断与其浓度有关。而仅用以上浓度的MnTDM处理时，与对照组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。

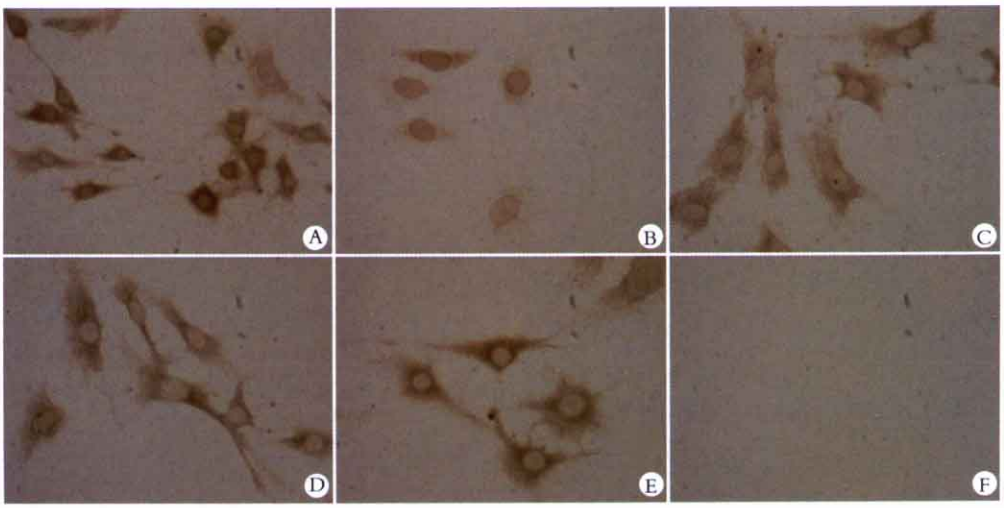
表1 MnTDD对百草枯处理的N27细胞的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	$D(570)$	TH平均光密度	MDA含量(nmol/mg)
对照组	0.61±0.08	0.60±0.07	3.10±0.72
百草枯组	0.39±0.01[a]	0.30±0.01[a]	10.77±1.10[a]
0.5 μmol/L MnTDM+百草枯	0.49±0.07[b]	0.51±0.07[b]	8.66±0.93[b]
1 μmol/L MnTDM+百草枯	0.51±0.05[b]	0.51±0.04[b]	7.38±0.92[b]
2 μmol/L MnTDM+百草枯	0.56±0.01[b]	0.54±0.04[b]	6.36±0.83[b]

a：$P<0.05$，与对照组比较，b：$P<0.05$，与百草枯组比较

2.2　MnTDM 对百草枯处理后 TH 平均光密度的影响

免疫细胞化学染色结果显示 TH 阳性的对照组 N27 细胞,细胞质着色,棕褐色细颗粒状(图 1);细胞核空泡状,大而圆,不着色,细胞核饱满,有的细胞还长出了神经轴突;百草枯处理后,TH 染色变浅,平均光密度下降了 50%,显示多巴胺能神经元严重损伤。用不同浓度的 MnTDM 预处理再用百草枯作用,其染色又有不同程度的加深,平均光密度几乎回到了正常水平,而且与 MnTDM 浓度相关。显示多巴胺能神经元损伤程度明显好转,实验结果证明 MnTDM 具有浓度相关性防止百草枯损伤多巴胺能神经元的作用。其动态变化见表 1。



A:对照组;B:百草枯组;C ~ E 分别为 0.5、1、2 μmol/L MnTDM + 百草枯组;F:阴性对照

图 1　MnTDM 对百草枯处理后细胞 TH 表达　(ABC × 200)

2.3　MnTDM 对百草枯诱导的 TH 蛋白表达抑制的影响

为了进一步检测 MnTDM 防止百草枯损伤多巴胺能神经元的作用,TH 蛋白表达被用来作为多巴胺能神经元损伤的另一个指标。百草枯处理后 TH 表达明显降低,表明百草枯对 TH 的表达有抑制作用,而加入 MnTDM 后,TH 表达又有明显的升高,证明 MnTDM 有阻断百草枯抑制 TH 表达的作用,且这种阻断作用随 MnTDM 浓度升高而增强(图 2),结果显示,对照组、百草枯组、0.5、1、2 μmol/L MnTDM + 百草枯组平均光密度分别为(55.75 ± 2.36)、(27.86 ± 4.28)、(43.20 ± 2.17)、(45.34 ± 1.08)、(49.39 ± 2.87)。图 2 为代表性的 Western blot 检测结果。同样的实验重复 3 次,每次结果都类似。



1:对照组;2:百草枯组;3 - 5 分别为 0.5、1、2 μmol/L MnTDM + 百草枯

图 2　MnTDM 对百草枯诱导的 TH 蛋白表达抑制的影响

2.4　MnTDM 对百草枯诱导 MDA 含量升高的作用

经百草枯处理后,细胞内 MDA 的含量升高,与对照组相比升高了 2 倍多,有显著统计学意义($P < 0.05$),该结果与国外报道的百草枯诱导产生氧化应激,使脂质过氧化产物增加的结果一致[5]。不同浓度 MnTDM + 百草枯处理各组与百草枯处理组相比细胞内 MDA 的含量又有不同程度地降低,表明 MnTDM 可阻断百草枯脂质过氧化作用,对 N27 细胞的氧化损伤有一定的保护作用(表 1),然而仅用 MnTDM 处理,MDA 的含量与对照组相比虽也有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3　讨论

本实验结果表明,不同浓度的 MnTDM 可阻断百草枯对 N27 细胞生长的抑制作用;阻断百草枯抑制 TH 表达的作用;抑制百草枯产生氧化应激,使细胞内 MDA 升高的作用。其机制可能是 MnTDM 通过清除自由基、降低细胞内 MDA 的含量,减轻氧化压力,提高细胞的生长、提高 TH 的表达,从而有效地保护多巴胺能神经元。

N27 细胞源于大鼠中脑多巴胺能神经细胞与人的肿瘤细胞杂合的细胞株,因其细胞质中含有大量嗜铬颗粒,富含合成及分解多巴胺所需要的酶类(如酪氨酸羟化酶、单胺氧化酶及儿茶酚胺氧位甲基转移酶),具有神经分泌细胞和神经元的性质,其膜受体及合成的递质具有中脑多巴胺能神经元的特点,又具有人源性特点,另外由于与肿瘤细胞杂合建株,具有永生化可传代的特点,因而被用于神经退行性疾病细胞的研究,尤其是 PD 的研究[6]。

已有研究表明,黑质多巴胺能神经元的减少是 PD 的病理基础,目前对 PD 的相关治疗也只能起到改善症状的效果,均不能延缓疾病的进程,究其原因是因为中脑多巴胺能神经元已经减少,药物治疗可提高纹状体多巴胺的含量,维持其神经递质的功能。因此,如果

有药物能防止多巴胺能神经元的减少，又能促进多巴胺的释放，将对帕金森病的防治有重要作用。我们实验中发现百草枯处理后，N27 细胞的生长及生物活性降低，表明百草枯有抑制多巴胺能神经细胞生长的作用，此结果与 Zhou 等[6]报道的百草枯诱导产生氧化应激抑制多巴胺能神经元生长的结果一致。不同浓度的 MnTDM + 百草枯联合作用后，百草枯的这种抑制细胞生长作用能被有效地阻断，且 MnTDM 阻断百草枯抑制 N27 细胞生长的作用与其浓度成正相关。

PD 的病理特征是患者黑质多巴胺（dopamine，DA）能神经元坏死、凋亡，使黑质-纹状体 DA 合成和释放减少，导致黑质纹状体多巴胺能神经功能低下而胆碱能神经功能相对占优势，从而产生运动障碍。TH 是 DA 合成的限速酶，因此如能提高 TH 的表达，保证 DA 的合成及分泌对 PD 的防治有重要作用。本研究用 MnTDM 预处理 N27 细胞观察了它对百草枯处理的 TH 表达的作用，结果表明百草枯作用后，N27 细胞的 TH 表达明显降低，表明百草枯抑制 N27 细胞的 TH 表达。不同浓度的 MnTDM + 百草枯联合作用组，TH 的表达较百草枯处理组有不同程度地升高，提示 MnTDM 对 TH 的影响是首先表现在蛋白表达水平上。

氧化应激（OS）是导致 PD 致病的重要因素之一，国内外对 PD 氧化应激致病机制进行了大量研究，（OS）造成大量活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生及其继发性的细胞损伤在细胞凋亡过程中起重要作用[7,8]。OS 反应增强被认为是导致 PD 黑质多巴胺神经元死亡的主要因素之一，它可以单独也可同时与其他机制启动细胞凋亡[9]。黑质多巴胺能神经元特别容易受到 ROS 的伤害[10]，并且多巴胺能神经元的基础 ROS 水平较高。临床对 PD 死亡患者脑组织的分析表明，黑质-纹状体病变部位过氧化脂质明显增加、还原型谷胱甘肽（glutathion，GSH）含量降低、Fe^{2+} 含量增加[11]。研究表明百草枯的毒性机制与其介导的超氧化物及自由基增多有关[12]。金属卟啉家族中新一代抗氧化剂 MnTDM 比内源性 Cu-Zn 超氧化物歧化酶和维生素 E 活性高出几十倍，同时还具有过氧化氢酶活性及清除过氧化脂质的活性。在本实验中我们采用 MDA 作为脂质过氧化指标，检测 MnTDM 对其影响作用。MDA 能与蛋白、核酸、脑磷脂等含氨基化合物反应，使之发生交联，丧失其活性。MDA 水平的增高，反映了机体内脂质过氧化程度，间接地反映出细胞损伤的程度。本研究结果显示，百草枯作用后，N27 细胞 MDA 水平增加，表明百草枯可致 N27 细胞氧化损伤，用不同浓度的 MnTDM 预处理后，发现 MDA 水平又有不同程度地降低，提示 MnTDM 能有效地减轻氧化压力，保护 DA 能神经元。

本研究初步显示，MnTDM 对百草枯诱导的 N27 细胞具有保护作用。那么是否还有其他保护机制参与，是否对其他 PD 细胞模型也有保护作用，具体的氧化应激机制（如是否是通过细胞凋亡途径）等都需要深入研究，但不管怎样，MnTDM 可能为未来探索 PD 的治疗提供一个新的思路和途径。

参考文献：

[1] McCormack A L, Atienza J G, Langston J W, *et al*. Decreased susceptibility to oxidative stress underlies the resistance of specific dopaminergic cell populations to paraquat-induced degeneration [J]. Neuroscience, 2006, 141(2): 929 - 937.

[2] Li X, Yin J, Cheng C M, *et al*. Paraquat induces selective dopaminergic nigrostriatal degeneration in aging C57BL/6 mice[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(16): 1357 - 1361.

[4] Patel M, Day B J. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants[J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20(9): 359 - 364.

[5] McCormack A L, Atienza J G, Johnston L C, *et al*. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration [J]. J Neurochem, 2005, 93(4): 1030 - 1037.

[6] Zhou W, Hurlbert M S, Schaack J, *et al*. Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells[J]. Brain Res, 2000, 866(1 - 2): 33 - 43.

[7] Rego A C, Oliveira C R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases [J]. Neurochem Res, 2003, 28(10): 1563 - 1574.

[8] 陈 平，梁立平，杨 杰. 线粒体氧化应激及其在神经退行性疾病神经细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1726 - 1728.

[9] Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy A G. Dieldrin induces apoptosis by promoting caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress and dopaminergic degeneration[J]. Neuroscience, 2003, 119(4): 945 - 964.

[10] Anglade P, Vyas S, Hirsch E C, *et al*. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging[J]. Histol Histopathol, 1997, 12(3): 603 - 610.

[11] Gu M, Owen A D, Toffa S E, *et al*. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases [J]. J Neurol Sci, 1998, 158(1): 24 - 29.

[12] Day B J, Patel M, Calavetta L, *et al*. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(22): 12760 - 12765.

（编辑 张大春）