DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.001

缺氧和梭曼单一或复合作用对 PC12细胞的细胞毒效应*

论著

余争平 程天民 伊规须英辉** (第三军医大学预防医学系复合伤研究室) 重庆, 630038

提 要 目的: 缺氧与梭曼中毒能引起不可逆性脑损伤认识已久,然而,缺氧与梭曼中毒复合对脑的作用所知甚少。本研究应用 PC12细胞损伤模型,探讨缺氧和梭曼单一或复合作用对神经瘤细胞的损伤。方法: 培养的 PC12细胞暴露于含不同氧百分比的空气及含不同浓度梭曼的培养液,测定细胞乳酸脱氢酶(LDH)的释放及细胞存活率的变化,用以指示细胞毒效应的量效、时效关系,用 t 检验及双因素方差分析判别统计差别显著性及缺氧、梭曼双因素的交互作用。结果:① 缺氧与梭曼中毒均显示剂量依赖性细胞毒效应,两致伤因素交互作用显著;② 两因素复合效应为单一效应之和,即两因素复合以叠加方式(1+ 1= 2)致伤;③ 与单一因素作用相比,复合时细胞存活率变化更能灵敏地反映细胞毒效应。结论: 本研究首次观察到缺氧与梭曼复合作用的细胞毒效应。缺氧与梭曼单一与复合作用的细胞毒作用表现为导致量效依赖型细胞内 LDH释放及细胞存活率下降。两因素复合效应方式为简单叠加,这一现象可能提示两致伤因素致 LDH释放的机理是不同的。

关键词 缺氧;梭曼;细胞毒作用;复合效应; LDH;细胞活度; PC12细胞
中图法分类号 R827.171

缺氧对神经系统的损伤认识已久,缺血 缺氧性脑损伤的研究,是目前神经科学领域最活跃的课题之一[1],已有的研究在整体 器官及离体细胞培养等多层次上涉及功能、形态代谢变化的多个方面。神经系统、尤其是中枢胆碱能神经系统是梭曼毒理作用的主要效应器官[2],梭曼中毒乙酰胆碱酯酶活性抑制后出现的胆碱能危象(Cholinergic crisis)是致死的主要原因,因而研究梭曼的毒理作用,主要集中于胆碱能神经系统的效应,虽然缺氧和梭曼中毒均以脑损伤为突出变化,但文献中尚未见两者复合作用对神经细胞效应的报道。鉴于高原地区可能发生梭曼中毒的特殊伤害,本实验旨在研究缺氧和梭曼中毒单一和复合作用对神经细胞的细胞毒效应,以探讨这类特殊伤害的特点。

PC12细胞具有神经细胞的一般生物学特性,已在近年神经科学实验研究中广泛应用。本实验以此细胞为对象,研究多种不同程度缺氧和梭曼中毒单一和复合作用对"神经细胞"的细胞毒效应。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

梭曼纯度 96.2%,由丙二醛—— 生理盐水稀释后备用;用于 PC12细胞培养的 RP1640培养液及乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒等试剂均购于 Sigma公司(圣路易斯,美国)。

1.2 PC12细胞培养

PC12细胞株由松冈雅人博士馈赠。常规 RP1640培养基培养。细胞接种于含 10%小牛血清的 RP1640培养液,置于 37℃恒温培养箱,在含 5% CO_2/95%空气的环境中培养,每 3 d置换培养液 1/3,培养 7 d即可见附壁细胞层,此时置换全部培养液,台盼蓝排斥试验检测细胞活性,存活率大于 95%的培养细胞供实验用。

1.3 致伤条件及细胞毒检测[3]

培养的 PC12细胞分别置于 96孔培养板,暴露于含不同比例氧浓度的氧环境以模拟不同程度的缺氧;在培养液中加入不同浓度的梭曼,以复制不同程度的梭曼中毒。测定加入膜表面活性剂 0.1% Triton X 100前后培养液中 LDH活性,按 LDH释放(%)= [Triton X 100加入前 LDH活性/Triton X 100加入后 LDH活性]计算 K 10^6细胞在致伤后 24 h细胞释放量,同时以台盼蓝排斥试验在光镜下检测细胞存活率,以此作为细胞毒作用指征。

1.4 统计分析

用 Student's t 检验作组内及组间差别显著性检验;用 Two way ANOVA作方差分析及交互作用显著性检验。统计分析在 NEC 486计算机(日本)上完成,统计软件为 Minitab 4.0,作图软件为 Microrigin 3.0,均为美国 Microsoft公司产品。

2 结果

2.1 PC12细胞 LDH释放的量效反应

结果详见表 1。对照条件下,培养液中自然衰老死亡细胞 24 h释放的 LDH平均仅占全部细胞内 LDH的 4.3%; 5% O_2的

* 全军"八五"、"九五"攻关项目,并获日本 川奖学金资助
** 日本产业医科大学环境毒理研究室

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缺氧条件下致伤6 h,伤后24 h即有占19.5%的细胞内LDH释放,非常显著地高于对照值;在2% O_2的致伤条件下24 h释放率在34.3%,缺氧致LDH释放在相同中毒剂量条件下呈明显的量效关系。常氧(21% O_2)培养条件下,梭曼浓度低于1 μmol/L时,LDH释放未见有意义的改变;而梭曼浓度增加10倍至10 μmol时,即引起29.6%的LDH释放,非常显著地高于对照值;同样,梭曼引起的LDH释放,在相同缺氧条件下,也有明显的量效反应。双因素方差分析结果表明,梭曼中毒及缺氧两者改变任一因素的强度,均可改变两因素复合效应的程度。但进一步分析两因素复合效应的结果,有趣的发现是,两因素复合致伤呈叠加效应(1+1=2),其间未发生递减(1+1<2)抑或协同(1+1>2)效应。例如,在单纯2% O_2缺氧及10 μmol/L梭曼中毒条件下,LDH释放率分别为34.3%和29.6%,而复合作用时,LDH释放率为64.1%,其复合效应为两单一效应之和。

表1 缺氧与梭曼单一或复合作用对PC12细胞LDH释放(%)的影响(n=9, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of hypoxia, soman and their combination on intracellular LDH release (% of total intracellular LDH activity) in cultured PC12 cells (n=9, $\bar{x}\pm s$)

Soman (μmol/L)	Hypoxia (% O_2 in an atmosphere of air)			
	21	10	5	2
0	4.3± 1.4	7.2± 4.7	19.5± 8.0●▲	34.3± 2.8●▲
10^{-1}	5.7± 3.1	13.6± 4.1△	25.8± 4.8●▲	41.4± 5.5●☆▲
10^{0}	6.8± 4.2	15.1± 3.9○☆	26.4± 7.5●☆▲	42.3± 3.8●☆▲
10^{1}	29.6± 8.3★	36.4± 4.4★▲	51.2± 3.7○☆▲	64.1± 3.8●★▲
10^{2}	42.3± 6.7★	51.4± 6.7★▲	62.4± 7.6○☆▲	77.1± 8.8●★▲

Values were determined at 24 h after a single 6 h exposure. ○: $P<0.05$, ●: $P<0.01$ *vs* 21% O_2; ☆: $P<0.05$, ★: $P<0.01$ *vs* soman 0 μmol/L; △: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$ *vs* 21% O_2 plus soman 0 μmol/L treatment

2.2 不同致伤条件下24 h细胞存活率

结果见表2不同程度的缺氧、梭曼中毒单一与复合致伤6 h,伤后24 h细胞存活率测定结果同样显示了两因素单一与复合致伤的量效反应关系及交互作用,所不同之处是,细胞存活率有意义的显著变化出现较之LDH释放率的变化灵敏度低,例如10 μmol/L梭曼中毒,24 h LDH释放已非常显著地增高,而细胞存活率仅开始显著低于对照值,此现象可能提示细胞死亡之前即有大量LDH释放,LDH释放测定能更灵敏地反映损伤效应。

表2 缺氧与梭曼单一或复合作用对PC12细胞存活率(%)的影响(n=9, $\bar{x}\pm s$)

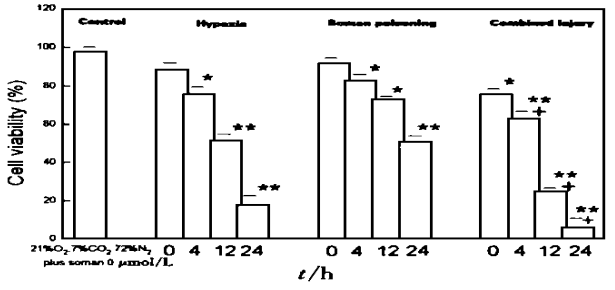
Tab 2 Effects of hypoxia, soman and their combination on cell viability (%) in cultured PC12 cells (n=9, $\bar{x}\pm s$)

Soman (μmol/L)	Hypoxia (% O_2 in an atmosphere of air)			
	21	10	5	2
0	96.2± 3.5	92.3± 2.6	81.4± 3.7○△	64.3± 10.2●▲
10^{-1}	92.4± 2.5	88.4± 7.3	76.5± 7.8●▲	58.2± 7.5●▲
10^{0}	92.5± 3.5	81.5± 11.5△	68.5± 12.5●▲	42.0± 11.5●▲
10^{1}	80.6± 10.5☆	56.6± 13.0●▲	50.3± 8.5●▲	16.3± 9.4●▲
10^{2}	44.2± 9.6★	28.5± 9.5★○▲	20.4± 7.2●▲	9.2± 6.3●▲

Values were determined at 24 h after a single 6 h exposure. ○: $P<0.05$, ●: $P<0.01$ *vs* 21% O_2; ☆: $P<0.05$, ★: $P<0.01$ *vs* soman 0 μmol/L; △: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$ *vs* 21% O_2 plus soman 0 μmol/L treatment

2.3 细胞毒作用的时效变化

结果见附图。PC12细胞在5% O_2抑或5 μmol/L梭曼单一致伤条件下。伤后4 h出现明显的细胞损伤,细胞存活率从对照值97.6%分别降至74.6%和82.1%,有显著下降。致伤后12 h,单纯缺氧损伤效应较之梭曼中毒更重;两因素复合作用,复合效应对细胞存活率影响表现为加重损伤的协同效应,即细胞存活率下降较之单一伤出现早而重,伤后0 h细胞存活率较之对照值即有显著降低,并在观察的24 h内呈进行性下降,自伤后4 h开始,各时间点值均显著低于单一伤。



附图 缺氧与梭曼中毒单一或复合作用对PC12细胞存活率影响的时效关系

Fig Time-course changes of cell viability in PC12 cells after a single 6 h exposure to hypoxia (5% O_2: 7% CO_2: 88% N_2), soman and their combination poisoning (5 μmol/L in medium)

Bars represent $\bar{x}\pm s$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; +: $P<0.05$, ++: $P<0.01$ *vs* hypoxia or soman poisoning respectively

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

PC12细胞株源于肾上腺髓质瘤细胞,由于其易于培养,具有神经细胞的一般生物学特性,已在神经科学多个领域研究中广泛应用[4]。

本研究以 PC12细胞 LDH释放为细胞毒指标,我们发现,缺氧、梭曼中毒对细胞损伤作用具有典型的量效反应关系,且在复合作用时效应为两单一因素效应的简单叠加(1+ 1= 2),这与我们在其它观察指征上的效应方式有所不同(如对细胞能量代谢的影响、胞浆游离钙变化及兴奋氨基酸释放等),可能提示缺氧和梭曼中毒两者对 LDH释放效应机理不同,因而未显示出协同作用。以细胞存活率为指标,观察单一与复合作用后的时相动态变化过程,发现出现大量细胞死亡需要一定时间,提示致伤效应需要启动某些病理机理参与,而不是快速发生的溶解性坏死。

PC12细胞损伤实验所获得的上述结果,表明应用该模型研究复合效应能客观地反映出细胞毒作用的量效和时效反应特点,该细胞损伤模型是评价单一与复合效应的理想途径之一。

既往文献中研究缺氧、梭曼中毒复合损伤效应仍是空白,因而对本实验结果难以进行文献对照。新近 Deshpande等[5]在胎豚鼠小脑皮质及海马细胞培养模型上观察了 0.1μmol/L梭曼对 LDH释放的影响,未能发现有意义的改变,本研究用此浓度梭曼对 PC12细胞也未引致意义的变化,而浓度增至 10μmol/L时,LDH释放则显著增多。Deshpande等人的研究由于仅用一个剂量浓度的梭曼,故未能观察到 LDH释放的量效反应,而且未直接测定细胞存活率,因而得出"梭曼对海马神经元无直接细胞毒作用"的结论,似欠成熟。至于缺氧、梭曼中毒单一与复合作用通过何种机理引起细胞损伤,尚待进一步研究。

(致谢:感谢日本产业医科大学松冈雅人博士提供 PC12细胞株、吉田统子小姐提供技术帮助。)

参考文献

1 Choi D W. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. J Neurosci, 1990; 10(7): 2493

2 Yu Z P, Chen T M, Igisu H. Molecular Mechanisms of Excitotosic brain injury. In: Tanaka T ed. Lecture Note on occupational health: 1995. Tokyo: Egakusuen, 1995: 176~186

3 Sombati S, Coulter D A, Delorenzo R J *et al*. Neurotoxic activation of glutamate receptors induces an extended neuronal depolarization in cultured hippocampal neurons. Brain Res, 1991; 566(2): 316

4 Shafer T J, Atchigon W D. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: A model for neurotoxicological studies. Neurotoxicology, 1991; 12(3): 473

5 Deshpande S S, Smith C D, Filbert M G. Assessment of primary neuronal culture as a model for soman-induced neurotoxicity and effectiveness of memantine as a neuroprotective drug. Arch Toxicol, 1995; 69(3): 384

(收稿: 1996-09-17;修回: 1997-01-03)

(编辑　张大春)

Cytotoxic effects of hypoxia, soman and their combination on PC12 cells

Yu Zhengping, Cheng Tianmin, H. Igisu (Department of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To investigate the effects of hypoxia, soman and their combination on the neurons with a model of injured PC12 cells. Methods: After the cultured PC12 cells were exposed to air with different concentrations of oxygen and culture solution with different concentrations of soman, the volume of lactic dehydrogenase (LDH) released by the cells and their survival rate were determined to observe the dose-effect and time-effect relationships of cytotoxic effects. Student's *t* test and two-way ANOVA were employed to determine the statistical differences and interaction between hypoxia and soman exposure. Results: (1) Both hypoxia and soman exposure exerted dose-dependent cytotoxic effects on PC12 cells and the interaction between the two injurious factors was significant; (2) The combined effects of the two factors were equal to the sum of those exerted by each one separately; (3) Application of the two factors in combination resulted in a more severe cytotoxicity than that caused by either agent used singly; (4) The volume of LDH released from PC12 cells could serve as a more sensitive indicator of cytotoxicity than the survival rate of the cells. Conclusion: This study is the first to demonstrate the cytotoxic effects of hypoxia and soman exposure in combination and the two agent acted in a summative manner, which suggests that the two factors might induce intracellular release of LDH through different mechanisms.

Key words hypoxia; soman; cytotoxicity; combined effect; lactic dehydrogenase; PC12 cell

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net