

# 醋酸铅对 PC12 细胞凋亡和 caspase-3 活性的影响

赵南<sup>1</sup>, 唐旭东<sup>2</sup>, 周克元<sup>2</sup>

(1. 湛江市卫生监督所, 广东 湛江 524003; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

**摘要:** 目的 探讨醋酸铅对 PC12 细胞凋亡和 caspase-3 活性的影响。方法 采用四唑盐 (MTT) 法检测 IC<sub>50</sub> 值, 用流式细胞仪、Hoechst 33258/PI 荧光染色分析细胞凋亡, 比色法测定 caspase-3 活性。结果 用不同浓度的醋酸铅处理细胞 48 h, 其 IC<sub>50</sub> 值为 (0.445±0.080) mmol/L; 用 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理细胞 48 h, 可见凋亡峰和典型的凋亡形态学改变, 两铅处理组经流式细胞仪和荧光染色检测出的细胞凋亡率均明显高于对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), caspase-3 活性也明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。结论 醋酸铅可诱导 PC12 细胞凋亡, 其机制可能与 caspase-3 的活化有关。

**关键词:** 铅; PC12 细胞; 凋亡; caspase-3 活性

中图分类号: R135.11 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)05-0286-03

## Effects of lead acetate on apoptosis and caspase-3 activity in PC12 cells

ZHAO Nan<sup>1</sup>, TANG Xu-dong<sup>2</sup>, ZHOU Ke-yuan<sup>2</sup>

(1. Zhanjiang Institute of Health Inspection and Supervision, Zhanjiang 524003, China; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of lead acetate on apoptosis and activity of caspase-3 in PC12 cells. **Method** IC<sub>50</sub> value was measured by MTT assay. Apoptosis was analyzed by flow cytometry and Hoechst 33258/PI fluorescence staining. Activity of caspase-3 was determined by colorimetric assay. **Result** The PC12 cells were exposed to lead acetate at varied concentrations for 48h. Its IC<sub>50</sub> value averaged (0.445±0.080) mmol/L. Apoptotic peak and typical morphological changes in apoptosis could be observed in cells exposed to 0.25 mmol/L and 0.5 mmol/L of lead acetate for 48 h. Apoptotic rate by both flow cytometry and fluorescence staining in cells exposed to 0.25 mmol/L and 0.5 mmol/L of lead acetate was significantly higher than that in control groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Activity of caspase-3 in cells exposed to 0.25 mmol/L and 0.5 mmol/L of lead acetate was much higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Lead acetate could induce apoptosis in PC12 cells with a possible mechanism which may be related to the activation of caspase-3.

**Key words:** Lead; PC12 cells; Apoptosis; Caspase-3 activity

近年的研究发现, 铅的神经毒性可能与细胞凋亡有关<sup>[1,2]</sup>。PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞, 已被广泛应用于神经细胞死亡方式及毒性损害的研究<sup>[3]</sup>, 迄今国内外还未见铅对 PC12 细胞凋亡影响的报道。Caspase (半胱天冬酶) 家族是与细胞凋亡密切相关的蛋白酶, 其中 caspase-3 最为关键, 目前 caspase-3 与铅神经毒性的关系尚不清楚。因此, 本文通过检测 PC12 细胞经铅处理后细胞凋亡的发生情况和 caspase-3 活性的改变, 探讨铅的神经毒性与细胞凋亡及 caspase-3 的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与细胞培养

PC12 细胞由军事医学科学院三所马子敏博士惠

赠, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10% 马血清和 5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司) 培养。隔日换液, 待单层细胞生长至 80% 融合后传代培养。实验用细胞均处于指数生长期。

### 1.2 试剂和仪器

醋酸铅 (分析纯) 为广州化学试剂厂产品, Hoechst 33258 为 CNI 公司产品, PI 为 Sigma 公司产品, MTT 和 DMSO 均为 Amresco 公司产品, caspase-3 抑制剂 DEVD-fmk 为 Clontech 公司产品, caspase-3 底物 AC-DEVD-pNA 为 Alexis 公司产品。流式细胞仪 (Epics-XL 型) 由 Coulter 公司生产, 酶标免疫测定仪 (450 型) 由 BIO-RAD 公司生产。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞增殖抑制实验 采用四唑盐 (MTT) 法。取指数生长期的细胞, 按  $0.5 \times 10^4$  / 孔于 200 μl 培养液中接种于 96 孔板, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下过夜后, 加入不同浓度的醋酸铅使其终浓度分别为 0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4 mmol/L, 对照组加入相应体积

收稿日期: 2004-01-08; 修回日期: 2004-03-01

基金项目: 广东医学院青年基金资助项目 (2001121); 湛江市科学技术局科技攻关项目 (200418)

作者简介: 赵南 (1966-), 男, 副主任医师, 从事职业病防治工作。

的 PBS, 每组设 8 个平行孔。染毒后继续培养 48 h, 然后每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml) 后再培养 4 h, 倾去培养液, 每孔加入 100 μl DMSO 溶剂, 待完全溶解后, 于酶标免疫测定仪上以测定波长 570 nm, 参考波长为 450 nm 测定其吸光度。按公式细胞增殖抑制率 % = (1 - 处理组吸光度 / 对照组吸光度) × 100% 计算出抑制率, 绘制浓度-抑制率曲线, 并计算出 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.3.2 凋亡的检测

1.3.2.1 流式细胞仪测定法 分别收集用 0 (对照)、0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理 48 h 的细胞, 用 D-hank's 液洗涤后, 再加预冷的 70% 乙醇固定过夜。次日完全去除乙醇后, 将细胞重悬于 40 μl 磷酸-柠檬酸缓冲液 (192 份 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 份 0.1 mol/L 柠檬酸, pH 7.8) 中, 用 0.5 ml 50 mg/L PI (含 100 mg/L RNase A, 无 DNase) 4 °C 避光染色 30 min, 于流式细胞仪观察亚 G<sub>1</sub> 峰 (凋亡峰) 和凋亡率。

1.3.2.2 荧光染色 分别收集用 0 (对照)、0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理 48 h 的细胞, 加入 Hoechst 33258 和 PI, 使其终浓度分别为 10 mg/L、20 mg/L, 37 °C 避光染色 30 min 后, 在荧光显微镜下随机计数 200 个细胞, 区分出坏死细胞、凋亡细胞和活细胞, 并计算出凋亡率和坏死率。

1.3.3 caspase-3 活性测定 采用比色法。分别收集用 0 (对照)、0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理 48 h 的细胞及用 100 μmol/L DEVD-fmk 预处理 2 h 后, 再用 0.5 mmol/L 醋酸铅处理 48 h 的细胞, 按文献 [4] 处理后加入 caspase-3 底物 AC-DEVD-pNA, 使其终浓度为 50 μmol/L, 37 °C 孵育 1 h 后, 于酶标免疫测定仪上测定 405 nm 波长下的吸光度值 (A<sub>405nm</sub>), 用 A<sub>405nm</sub> 来表示其相对活性。以上测定均重复 3 次。

### 1.4 统计学处理

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 10.0 for Win-

dows 软件包中的 ANOVA 进行统计学处理, 各组与对照组两两比较方差齐时用 Dunnett 双侧检验, 不齐时用 Tamhane's T<sub>2</sub> 检验。

## 2 结果

### 2.1 铅对 PC12 细胞的生长增殖抑制作用

用不同浓度的醋酸铅处理 PC12 细胞 48 h, 细胞的生长增殖受抑 (图 1), 细胞生长增殖抑制率随醋酸铅浓度的增加而增高 (F = 60.273, P < 0.01), 具有剂量依赖性, 其 IC<sub>50</sub> 值为 (0.445 ± 0.080) mmol/L。

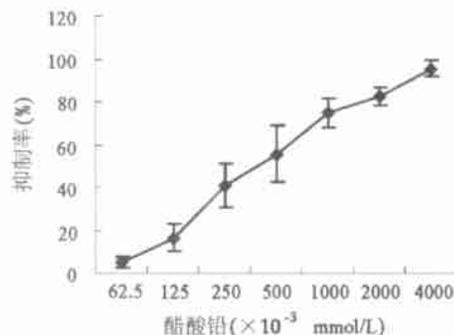


图 1 浓度-抑制率曲线图

### 2.2 醋酸铅对 PC12 细胞凋亡的影响

用 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理 PC12 细胞 48 h, 用流式细胞仪检测到凋亡峰 (图 2), 其凋亡率 (n = 3) 分别为 (13.6 ± 2.7) mmol/L、(29.0 ± 4.8) mmol/L, 与对照组的凋亡率 (2.6 ± 0.7) mmol/L 比较均 P < 0.01。用 Hoechst 33258/PI 荧光染色, 观察到 PC12 细胞胞体缩小、胞浆浓缩、核染色质聚集、核固缩、核碎裂等典型的凋亡形态学改变, 各处理组的凋亡率和坏死率的结果见表 1。从表 1 可见, 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理组的凋亡率均明显高于对照组, 但 0.5 mmol/L 醋酸铅处理组的坏死率与对照组比较也具有统计学意义 (P < 0.01)。

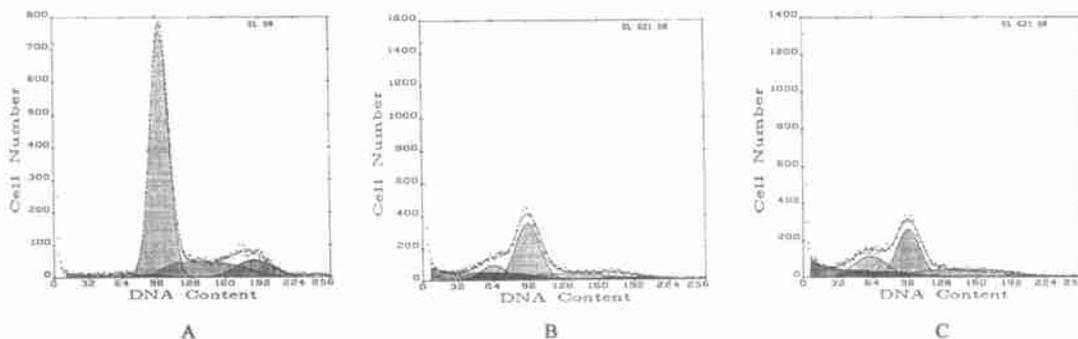


图 2 PC12 细胞经铅处理 48 h 的流式细胞仪检测结果

表 1 Hoechst 33258/PI 荧光染色检测凋亡率和坏死率%  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

醋酸铅浓度 (mmol/L)	凋亡率 (%)	坏死率 (%)
0 (对照组)	3.1 ± 1.1	3.0 ± 0.5
0.25	13.4 ± 3.3 *	3.9 ± 0.3
0.50	26.6 ± 6.3 **	7.2 ± 1.7 **

与对照组比较, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

### 2.3 醋酸铅对 caspase-3 活性的影响

对照组、DEVD-fmk 预处理组及 0.25 mmol/L、0.5 mmol/L 醋酸铅处理组的 caspase-3 相对活性 ( $A_{405nm}$ ) 分别为 0.058 ± 0.005、0.061 ± 0.004、0.309 ± 0.023、0.547 ± 0.045。DEVD-fmk 预处理组的 caspase-3 活性与对照组比较无统计学意义, 但 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理组的 caspase-3 活性均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

铅可对中枢和周围神经系统产生毒性作用, 引起神经系统的功能改变。研究发现, 铅对神经系统的毒性作用机制可能与铅诱导神经元过度凋亡有关<sup>[1,2]</sup>。国内安兰敏等<sup>[1]</sup>报道醋酸铅染毒成年 SD 大鼠后, 大鼠海马、皮层组织凋亡细胞明显增多, 显著高于对照组, 并与铅染毒剂量有较好的剂量-反应关系, 其凋亡机制可能与 fos、jun 的参与有关。Sharifi 等<sup>[2]</sup>通过在 2~4 周和 12~14 周大鼠腹膜内注射醋酸铅 7 周, 发现海马区细胞的死亡部分是通过凋亡途径。

本研究的结果显示, 用 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理 PC12 细胞 48 h, 用流式细胞仪检测到凋亡峰, 荧光染色观察到典型的凋亡形态学改变, 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理组的凋亡率均明显高于对照组。因此, 醋酸铅可诱导 PC12 细胞凋亡, 进一步证明铅的神经毒性与细胞凋亡有关。荧光染色结果发现, 0.5 mmol/L 醋酸铅处理组的坏死率也明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 说明铅浓度过高可使 PC12 细胞以坏死方式死亡。

Caspase 家族存在于哺乳动物细胞中, 是与线虫细胞死亡蛋白 CED-3 相似的一类蛋白酶, 其中 caspase-3 是最关键的一员。近年发现一些物质诱导 PC12 细胞凋亡中有 caspase-3 的活化<sup>[5~7]</sup>。Jiang 等发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 PC12 细胞凋亡有 caspase-3 的参与<sup>[3]</sup>, Boccellino 等报道苯乙烯-7, 8-氧化物诱导 PC12 细胞凋亡与 caspase-3 的活化有关<sup>[4]</sup>, Kitazawa 等用 100~300 μmol/L 狄氏剂 (一种杀虫剂) 处理 PC12 细胞, 发现 caspase-3 以剂量和时间依赖性的方式活化<sup>[7]</sup>。本研究用 0.25、0.5 mmol/L 醋酸铅处理 PC12 细胞 48 h, 也发现 caspase-3 活性明显升高。因此醋酸铅诱导 PC12 细胞凋亡可能有 caspase-3 的参与, 铅的神经毒性可能与 caspase-3 的活化有关。对于 caspase-3 抑制剂能否用于缓解铅所致的神经毒性将值得深入探讨。

### 参考文献:

- [1] 安兰敏, 牛玉杰, 秋震宇, 等. 铅对大鼠细胞凋亡及癌基因表达的影响 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19 (10): 1216-1218.
- [2] Sharifi AM, Baniasadi S, Jorjani M, et al Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo [J]. Neurosci Lett, 2002, 329 (1): 45-48.
- [3] 李立宏, 高国栋, 王学廉, 等. 多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的免疫组织化学及超微结构分析 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22 (4): 326-329.
- [4] Grub S, Persohn E, Trommer WE, et al Mechanisms of cyclosporine A-induced apoptosis in rat hepatocyte primary cultures [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 163 (3): 209-220.
- [5] Jiang B, Liu JH, Bao YM, et al Hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells and the protective effect of puerarin [J]. Cell Biol Int, 2003, 27 (12): 1025-1031.
- [6] Boccellino M, Cuccovillo F, Napolitano M, et al Styrene-7, 8-oxide activates a complex apoptotic response in neuronal PC12 cell line [J]. Carcinogenesis, 2003, 24 (3): 535-540.
- [7] Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Diehrin induces apoptosis by promoting caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cδ in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress and dopaminergic degeneration [J]. Neuroscience, 2003, 119 (4): 945-964.

(上接第 285 页)

HSP70 抗体可能参与了噪声导致作业工人心理功能异常的发生过程。随着研究工作的深入, HSP70 有望成为心脏功能异常的检测指标。但心电图异常者 HSP70 抗体产生的机制及 HSP70 抗体参与心脏生物电流改变的过程尚有待进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] 张国高, 贺涵珍, 邹春春. 热应激蛋白及其在职业医学中应用研究的展望 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1998, 16: 67-69.

- [2] 刘文魁, 蔡荣泰. 物理因素职业卫生 [M]. 北京: 科学出版社, 1995, 49-59.
- [3] 赵一鸣. 累积噪声暴露量与高血压患病率的剂量-反应关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1993, 11: 325-327.
- [4] Wu T, Jimiang Ma, Sheng Chen, et al. Association of plasma antibodies against the inducible HSP70 with hypertension and harsh working conditions [J]. Cell Stress & Chaperones, 2001, 6 (4): 394-401.
- [5] Burlon RH. Heat shock proteins in relation to medicine [J]. Mol Aspects Med, 1993, 14: 83-165.
- [6] 何凤生. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 1025-1028.