锰对HUVEC-304细胞生长及p53、$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达的影响

黄国香，吴青，郭晓鹏，宋世震*

（武汉科技大学医学院，湖北 武汉 430065）

摘要：目的 探讨锰对人脐静脉内皮细胞系HUVEC-304细胞生长及p53、$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达的影响。方法 取指数生长期HUVEC-304细胞，以100、200、400、800 μmol/L $MnCl_2$，分别作用24、48、72 h后，以四甲基偶氮唑蓝（MTT）比色实验检测细胞的存活力，筛选锰对细胞的毒性剂量。流式细胞仪（FCM）检测细胞凋亡，Western blot方法检测p53、$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白的表达。结果 100、200、400、800 μmol/L $MnCl_2$作用24、48、72 h均对HUVEC-304细胞有显著的抑制作用（$P<0.05$），且呈剂量-时间效应关系。流式细胞仪检测结果表明锰能诱导HUVEC-304细胞凋亡（$P<0.01$），Western blot结果显示，随锰浓度的增高，p53蛋白的表达下降（$P<0.05$）；而$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达上升，差异有统计学意义（$P<0.05$），且呈剂量依赖性。结论 锰可抑制HUVEC-304细胞的增殖，诱导其发生凋亡，p53蛋白的表达减少及$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白的表达增加是其发生凋亡的机制之一。

关键词：锰；HUVEC-304细胞；p53蛋白；$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白

中图分类号：R994.1 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2006)06－0328－04

Effects of manganese on the growth of HUVEC-304 cells and the expressions of p53, $p21^{WAF1/CIP1}$ proteins

HUANG Guo-xiang, WU Qing, GUO Xiao-peng, SONG Shi-zhen*

(*School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan* 430065, *China*)

Abstract: Objective To study the effects of manganese on the growth of HUVEC-304 cells and the expressions of p53 and $p21^{WAF1/CIP1}$ proteins. **Method** HUVEC-304 cells in exponential phase of growth were incubated in culture media with 100, 200, 400, 800 μmol/L manganese ($MnCl_2$) for 24, 48 and 72 h respectively; MTT colorimetry test was performed to examine the growth and survival of HUVEC-304 cells, flow cytometry (FCM) was used to monitor cell apoptosis, and Western blot was used to measured the expression of p53 and $p21^{WAF1/CIP1}$ proteins. **Result** MTT measuring results revealed that manganese chloride (from 100 to 800 μmol/L) might suppress the proliferation of HUVEC-304 cells in dose and time-dependent manner ($P<0.05$); FCM results showed that manganese might induce the HUVEC-304 cells apoptosis. Western blot test found that manganese might down-regulate the expression of p53 proteins and up-regulate the express the $p21^{WAF1/CIP1}$ proteins, which were dose-dependent ($P<0.05$). **Conclusion** It was shown that manganese has obvious inhibition effect on the proliferation of HUVEC-304 cells and induce their apoptosis by down-regulate the expression of p53 proteins and up-regulate the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ proteins, which probably is one of the important mechanisms of manganese toxicity on HUVEC-304 cells.

Key words: Manganese; HUVEC-304 cells; p53 proteins; $p21^{WAF1/CIP1}$ proteins

本研究通过体外实验，观察锰对人脐静脉内皮细胞系HUVEC-304细胞生长及p53、$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达的影响，了解锰对该细胞的凋亡作用，探讨锰的分子水平的毒作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

氯化锰（$MnCl_2$，相对分子质量126）购自武汉洁洋盛生物试剂有限公司，纯度约99.56%，用DMSO配成5 mmol/L储备液，4℃保存，临用时用RPMI1640培养液稀释至所需浓度。鼠抗人单抗p53、$p21^{WAF1/CIP1}$抗体购自晶美生物有限公司；RPMI1640培养基（Gibco，USA）、胎牛血清均购自中山凌飞公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞和细胞培养 HUVEC-304细胞株购自武汉大学细胞保藏中心。在含有10%的胎牛血清、青霉素100 U/ml及链霉素100 μg/ml的RPMI1640培养液中37℃、5%CO_2条件下传代培养。取指数生长期、生长良好、细胞活性大于98%的细胞进行实验。

1.2.2 细胞生长活性检测 采用溴化二甲噻唑二苯四氮唑蓝(MTT)比色法，取指数生长期的HUVEC-304细胞进行实验，将不同浓度的氯化锰（100～800 μmol/L）加入10%FCS的RPMI1640的培养基中，调细胞密度为5×10^5/ml，接种于96孔，每种浓度为一组，每个浓度设3个平行孔，置37℃、5%CO_2培养箱培养

收稿日期：2006－03－27；修回日期：2006－07－10

基金项目：湖北省卫生厅医药卫生科研计划（JX1B127）

作者简介：黄国香（1979—），女，硕士研究生。

*通讯作者，E-mail：songshizhen@wust.edu.cn

?1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不同时间(24、48、72 h)后,每孔加 20 μl MTT,培养 4 h,弃 MTT,每孔加二甲基亚砜(DMSO)150 μl,充分溶解。选择 490 nm 波长,酶联免疫检测仪上测定各孔 *A* 值。HUVEC-304 细胞的生长抑制率=(1－实验组平均 *A* 值/对照组平均 *A* 值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 用 Annexin-V-FITC 及 PI 双标流式细胞仪检测细胞凋亡,分为不同浓度实验组及阴性对照组。分别加入终浓度为 100～800 μmol/L 的 $MnCl_2$ 作用 24 h,用 70%乙醇 4 ℃固定 2 h,PBS 缓冲液去固定液,离心去上清。用缓冲液 37 ℃孵育 60 min,195 μl 细胞悬液加 5 μl Annexin-V-FITC,混匀,室温放置 10 min。用缓冲液洗涤细胞 1 次,在 190 μl 缓冲液中重悬,然后再加 10 μl 碘化丙啶(PI),流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blot 测定 p53、$p21^{WAF1/CIP1}$ 的表达 参考文献[1]报道的 Western blot 方法检测 p53、$p21^{WAF1/CIP1}$。其中一抗为鼠抗,二抗用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,经化学发光法,X 线曝光显影,软件进行扫描定量,每个浓度组重复 3 次,取均值代表测定结果。

1.2.5 统计学分析 所有数据通过 Excel 2000 建表,应用 SPSS12.0 进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 HUVEC-304 细胞生长抑制率的测定

不同浓度 $MnCl_2$ 以时间剂量依赖性方式抑制 HUVEC-304 细胞的增殖,其 24 h IC_{50} 约等于 400 μmol/L,24、48、72 h 后,细胞抑制率见表 1。

表 1 不同浓度锰对 HUVEC-304 细胞的抑制率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)%

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.03±0.01	0.14±0.12	0.25±0.01
染毒组			
100 μmol/L(A 组)	22.34±8.22*	27.47±8.51*☆	38.07±9.86*☆
200 μmol/L(B 组)	33.62±9.69*	42.56±0.95*☆	59.35±2.36*☆
400 μmol/L(C 组)	55.03±6.20*▲△	62.12±1.95*▲△☆	69.60±3.77*▲△☆
800 μmol/L(D 组)	76.06±1.51*▲△◆	81.29±1.54*▲△◆☆	90.96±1.28*▲△◆☆

与对照组比较 * $P<0.05$,与 A 组比较▲$P<0.05$,与 B 组比较△$P<0.05$,与 C 组比较◆$P<0.05$,与 24 h 比较☆$P<0.05$

2.2 24 h HUVEC-304 细胞凋亡率的变化

随锰浓度的增高凋亡率逐渐增高,其凋亡率为 8.63%～96.82%,见图 1。与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 $MnCl_2$ 对 HUVEC-304 细胞 p53 蛋白表达的影响

不同浓度 $MnCl_2$ 处理 HUVEC-304 细胞 24 h 后,HUVEC-304 细胞的野生型 p53 蛋白条带明显变淡,HUVEC-304细胞的野生型p53蛋白条带灰度扫描值

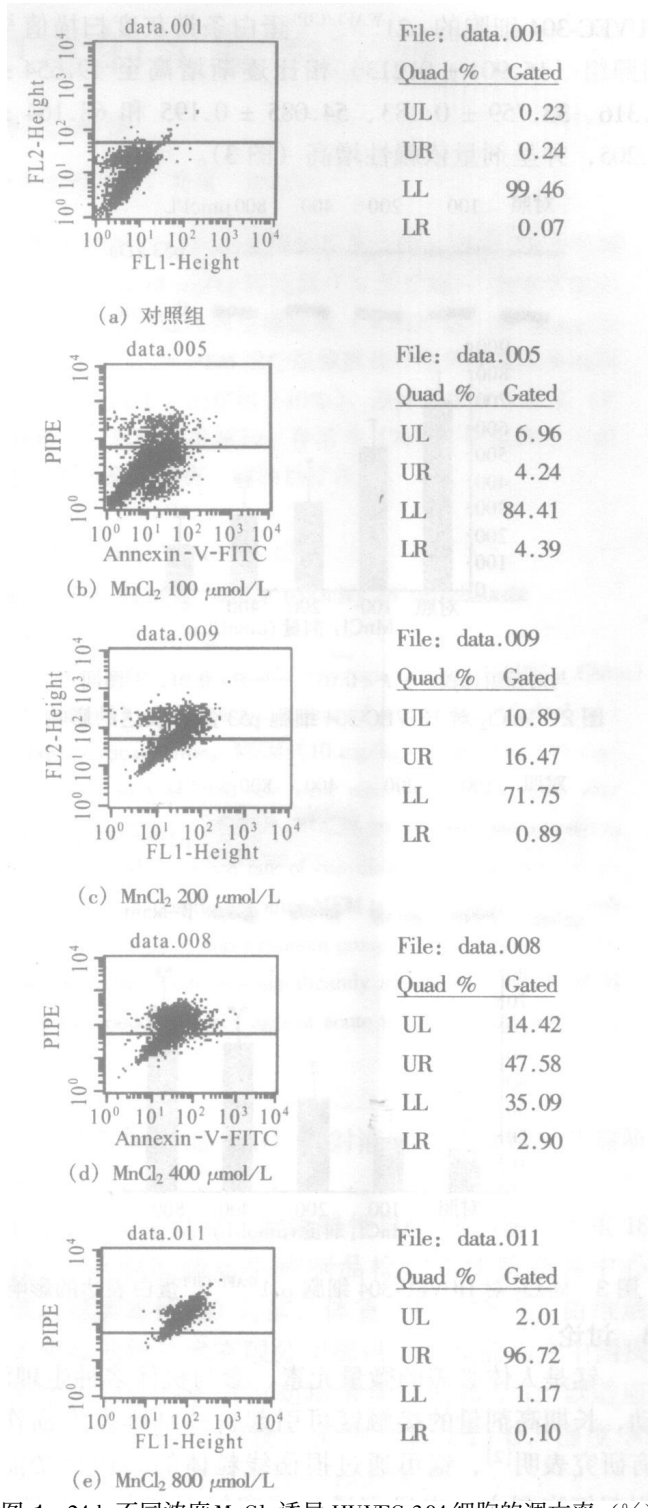


图 1 24 h 不同浓度 $MnCl_2$ 诱导 HUVEC-304 细胞的凋亡率(%)

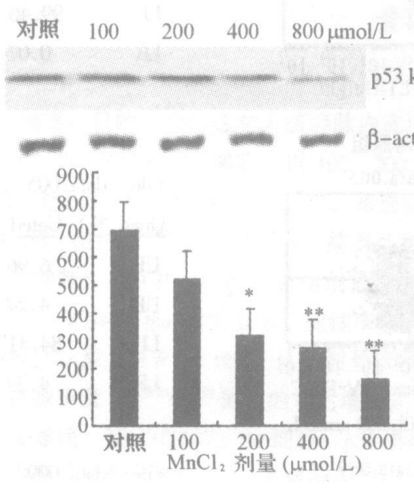
与对照组(693.37±2.13)相比逐渐降低至 521.25±3.16、315.76±1.83、273.02±1.95 和 163.42±2.05,并呈剂量依赖性降低(图 2)。

2.4 $MnCl_2$ 对 HUVEC-304 细胞 $p21^{WAF1/CIP1}$ 蛋白表达的影响

不同浓度 $MnCl_2$ 处理 HUVEC-304 细胞 24 h 后,HUVEC-304 细胞的 $p21^{WAF1/CIP1}$ 蛋白条带明显变粗,

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HUVEC-304细胞的$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白条带灰度扫描值与对照组（15.901±0.213）相比逐渐增高至19.654±0.316、33.759±0.183、54.085±0.195和68.164±0.205，并呈剂量依赖性增高（图3）。



与对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$，下图同。

图2 $MnCl_2$对HUVEC-304细胞p53蛋白表达的影响

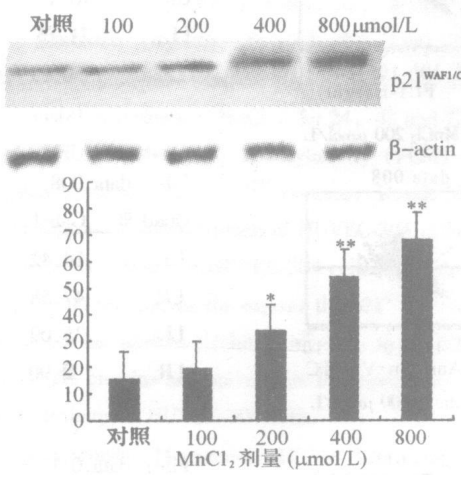


图3 $MnCl_2$对HUVEC-304细胞$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达的影响

3 讨论

锰是人体必需的微量元素，参与机体多种生理活动，长期高剂量的接触锰可引起机体细胞发生损伤。有研究表明[2]，锰可通过损伤线粒体的结构和功能，引起细胞凋亡。本研究通过观察锰对指数生长期的HUVEC-304细胞的毒性作用，发现锰能有效地抑制HUVEC-304细胞的增殖，诱导其发生凋亡，且呈明显的量效关系和时间依赖性，与Malecki报道一致[3]。

野生型p53基因是一种重要的抑癌基因，其主要生物学作用是参与DNA修复、诱导细胞凋亡、抑制血管生成以及应答细胞胁迫等[4,5]。它介导的信息传导途径是一个复杂的网络系统。p53基因所表达的p53蛋白是一类同源四聚体，在正常细胞内含量很低，并且半衰期非常短。当细胞受到损伤或刺激时，p53蛋白半衰期显著增加造成积累，引起细胞凋亡。$p21^{WAF1/CIP1}$（细胞周期抑制因子）是p53的下游基因，是细胞周期负性调控因子，其作用是通过结合并抑制细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）和Cyclins的活性[6,7]。当DNA受损伤时正常的p53基因能上调$p21^{WAF1/CIP1}$基因的表达，进行DNA的修复，若修复失败则诱导细胞凋亡[8,9]。El-Deiry等发现[10]，WAF1蛋白是一个细胞周期依赖性激酶抑制因子CIP1，它参与细胞的生长、分化、衰老及死亡；周彦明等[11]发现在胆囊癌标本中p53过度表达，而$p21^{WAF1/CIP1}$表达下降，两者呈负相关。本实验以锰作为一种刺激损伤因素，作用于HUVEC-304细胞后，可能损伤DNA，抑制p53蛋白的表达，同时$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达增加，DNA修复失败则诱导细胞凋亡。此次Western blot结果发现p53与$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达呈负相关，与文献的结果正好相反[12]，这是因为脑内p53蛋白表达增强是指未经处理的突变型p53蛋白，一般而言，突变型的p53在肿瘤、炎症损伤中都存在高表达，而我们的结果是锰作为一种刺激损伤因素作用于HUVEC-304细胞后，野生型p53基因的表达情况，两者不相冲突。

总之，本次实验发现锰能降低HUVEC-304细胞的p53蛋白表达并上调$p21^{WAF1/CIP1}$蛋白表达，而且呈剂量依赖性，说明锰可以通过多种基因调控途径抑制人脐静脉血管内皮细胞增殖，诱导其分化和凋亡。这将为锰的毒性机制研究和中毒防治工作提供实验依据。

参考文献：

[1] Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 4350-4354.

[2] Chen J K, Tsao G C, Zhao Q Q, et al. Differential cytotoxicity of Mn (III) and Mn (II): Special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes[J]. Toxicol Applied Pharmacol, 2001, 17(5): 160-168.

[3] Malecki E A. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons[J]. Brain Res Bull, 2001, 55(2): 225-228.

[4] Bargonetti J, Manfredi J J. Multiple roles of the tumor suppressor p53[J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(1): 68-91.

[5] Takashi T, Yusuke N. The role of p53-target genes in human cancer[J]. Oncology and Hematology, 2000, 33: 1-6.

[6] Polyak K, Hamilton S R, Vogelstein B, et al. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia[J]. Am J Pathol, 1996, 149: 381-386.

[7] Gomvo Y, Ikeda M, Osaki M, et al. Expression of p21 WAF1/CIP1/SDI1, but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma[J]. Cancer, 1997, 79: 2067-2072.

（下转第358页）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

icals with rat liver fatty acid-binding protein [J]. Toxicology, 2002, 176 (3): 175-185.

[23] 刘冰, 于麒麟, 金一和, 等. 全氟辛烷磺酸对大鼠海马神经细胞内钙离子浓度的影响 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19 (3): 225.

[24] 李莹, 金一和. 全氟辛磺酸对大鼠中枢神经系统谷氨酸含量的影响 [J]. 毒理学杂志, 2004, 18 (4): 232-233.

[25] Harada K, Xu F, Ono K, et al. Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca^{2+} currents in guinea-pig ventricular myocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329 (2): 487-494.

[26] Iau C, Thibodeaux J R, Hanson R G, et al. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse [J]. Toxicol Sci, 2006, 90 (2): 510-518.

[27] Thibodeaux J R, Hanson R G, Rogers J M, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pergnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations [J]. Toxicol Sci, 2003, 74 (2): 369-381.

[28] Iau C, Thibodeaux J R, Hanson R G, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation [J]. Toxicol Sci, 2003, 74 (2): 382-392.

[29] Case M T, York R G, Christian M S. Rat and rabbit oral developmental toxicology studies with two perfluorinated compounds [J]. Int J Toxicol, 2001, 20 (2): 101-109.

[30] 范轶欧, 金一和, 麻懿馨, 等. 全氟辛烷磺酸对雄性大鼠生精功能的影响 [J]. 卫生研究, 2005, 34 (1): 37-39.

[31] Guruge K S, Yeung L W, Yamanaka N, et al. Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA) [J]. Toxicol Sci, 2006, 89 (1): 93-107.

[32] 姚晓峰, 仲来福. 全氟辛酸对HepG2细胞的遗传毒性及氧化性DNA损伤 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19 (3): 216-217.

[33] Dzhekova S S, Bogdanska J, Stojkova Z. Peroxisome proliferators: their biological and toxicological effects [J]. Clin Chem Lab med, 2001, 39 (6): 468-474.

[34] Panaretakis T, Shabalina I G, Grander D, et al. Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis im human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 173 (1): 56-64.

[35] Abdellatif A G, Preat V. The modulation of rat liver carcinogenesis by perfluorooctanoic acid, a peroxisome proliferator [J], Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 111 (3): 530-537.

[36] Abdellatif A G, Preat V. Peroxisome proliferation and modulation of rat liver carcinogenesis by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid, perfluorooctanoic acid and nafenopin [J]. Carcinogenesis, 1990, 11 (11): 1899-1902.

[37] Gilliland F D, Mandel J S. Mortality among employees of a perfluorooctanoic acid production plant [J]. Occup Med, 1993, 35 (9): 950-954.

[38] Yang Q, Abedi-Valugerdi M, Xie Y, et al. Potent suppression of the adaptive immune response in mice upon dietary exposure to the potent peroxisome proliferator, perfluorooctanoic acid [J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2 (2-3): 389-397.

[39] Yang Q, XieY, Eriksson A M, et al. Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice [J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62 (8): 1133-1140.

[40] Yang Q, Xie Y, Depierre J W. Effects of peroxisome proliferators on the thymus and spleen of mice [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 122 (2): 219-226.

[41] Seacat A M, Thomford P J, Hansen K J, et al. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctane sulfonate in rats [J]. Toxicology, 2003, 183: 117-131.

[42] 张颖花, 范轶欧, 麻懿馨, 等. 全氟辛烷磺酸对大鼠血清T_3, T_4和TSH的影响 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21 (6): 707.

[43] Inoue K, Okada F, Ito R, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy [J]. Environ Health Perspect, 2004, 112 (11): 1204-1207.

[44] Olsen G W, Burris J M, Burlew M M, et al. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations [J]. Occup Environ Med, 2003, 45 (3): 260-270.

[45] Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, et al. Perfluorooctane sulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38 (17): 4489-4495.

[46] Harada K, Saito N, Inoue K, et al. The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years [J]. Occup Health, 2004, 46 (2): 141-147.

[47] 金一和, 刘晓, 张迅, 等. 人血清中全氟辛烷磺酰基化合物污染现状 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19 (10): 1200-1201.

[48] 金一和, 舒为群, 丁梅, 等. 两地区一般人群血清中PFOS和PFOA污染特征比较 [J]. 毒理学杂志, 2005, 9 (3): 318-319.

[49] Olsen G W, Burris J M, Mandel J H, et al. Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees [J]. J Occup Environ Med, 1999, 41 (9): 799-806.

[50] Olsen G W, Burris J M, Burlew M M, et al. Plasma cholecystokinin and hepatic enzymes, cholesterol and lipoproteins in ammonium perfluorooctanoate production workers [J]. Drug Chem Toxicol, 2000, 23 (4): 603-620.

(上接第330页)

[8] Schmider A, Gee G, Friedmann AW, et al. $p21^{WAF1/CIP1}$ protein expression is associated with prolonged survial but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma [J]. Gynecol oncol, 2000, 77 (2): 237.

[9] Anttila MA, Kosma V M, Hongxiu J, et al. $p21^{WAF1}$ expression as related to p53, cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian cancer [J]. Br J cancer, 1999, 79 (11-12): 1870.

[10] El-Deiry WS, Tokino T, Velculescv VE, et al. WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression [J]. Cell, 1993, 75: 817-825.

[11] 周彦明, 李玉民. 胆囊癌中$p21^{WAF1/CIP1}$和p53的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21 (2): 239.

[12] Elbendary A A, Cirisano F D, Evans A C, et al. Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant cells [J]. Clin Cancer Res, 1996, 2 (9): 1571.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net