

1-甲基-4-苯基-吡啶盐致多巴胺能细胞系 MES23.5 的死亡机制

傅求真^{1,2} 徐胜利¹ 左晓虹¹ 徐燕玲¹ 陈彪^{1*}

(¹首都医科大学宣武医院北京老年病医疗研究中心, 北京 100053;

²第四军医大学唐都医院神经内科, 西安 710038)

摘要 通过测定环境毒素 1-甲基-4-苯基-吡啶盐(MPP⁺)作用于多巴胺能细胞系 MES23.5 后细胞存活率的变化及细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_M$)、活性氧(ROS)、羟自由基、超氧化物歧化酶(SOD)的变化, 发现 MPP⁺ 作用于多巴胺能细胞系 MES23.5, 可导致细胞存活率显著性减少, 浓度达到 200 $\mu\text{mol/L}$ 以上后, 细胞存活率的下降呈时间与 MPP⁺ 浓度依赖; 以 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用细胞 6-48 h 后, $\Delta\Psi_M$ 逐渐下降、ROS、羟自由基逐渐增加, 48 h 后 SOD 开始显著性减少。结果表明早期线粒体能量代谢障碍和膜电位变化导致 ROS(尤其是羟自由基)含量增加是 MPP⁺ 导致多巴胺能细胞氧化应激的原因, 而细胞内自由基的清除机制受损, 则最终导致细胞变性死亡。

关键词 帕金森病; 1-甲基-4-苯基-吡啶盐; 氧化应激

帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)是常见的老年神经系统变性病, 其病理特征是黑质的多巴胺能神经元的选择性减少以及 Lewy 氏小体形成。至今其发病原因仍不十分清楚, 尤其是多巴胺能神经元死亡的机制不清楚。大量的流行病学研究提示, 许多环境毒素与 PD 病人的黑质多巴胺神经元的丢失有关。Langston 等^[1]发现神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)能对多巴胺能神经元造成选择性损害, 产生与 PD 类似的临床特点及病理改变, 而成为人们研究 PD 中神经元死亡的经典模型。许多研究显示, MPTP 可通过血脑屏障, 在单胺氧化酶 B 的作用下, 转化为毒性代谢产物 1-甲基-4-苯基-吡啶盐(MPP⁺)。由于 MPP⁺ 与多巴胺转运体的高度亲和性, MPP⁺ 主要在动物体内多巴胺神经元内积累, 表现为对多巴胺能神经元的高度选择性。MPP⁺ 在细胞内可抑制线粒体复合物 I, 产生超氧阴离子而导致细胞处于氧化应激的状态, 引起选择性黑质多巴胺能神经元死亡。然而, 以往的大多数研究是采用非多巴胺神经元模型, 同时没有在同一实验条件下系统观察神经毒素对能量代谢、细胞氧化应激状态以及细胞毒性作用。本研究应用多巴胺神经细胞系, 在同一体系内观察在 MPP⁺ 作用下, 细胞的存活率、线粒体膜电位以及氧化应激

指标的改变, 以期能了解 MPP⁺ 对多巴胺能细胞的毒性作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 多巴胺能细胞系 MES23.5 由美国帕金森病研究所友情馈赠。MES23.5 细胞系是由大鼠胚胎中脑细胞及小鼠神经母细胞瘤细胞系 N18TG2 融合而成的多巴胺能的神经母细胞瘤, 经鉴定, 该细胞系具有黑质神经元的主要特点, 如含有酪氨酸羟化酶(TH)、多巴胺转运载体及能合成多巴胺等^[2]。

1.1.2 试剂 MTT 检测试剂盒(Cell Proliferation Kit)购自宝灵曼公司; MPP⁺ 为 RBI 公司产品; DMEM/F12 培养基及特优级胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程公司。罗丹明 123 (Rh123)、2,7-二氯二氢荧光素(DCFH₂-DA)为 Sigma 公司产品。

收稿日期: 2003-07-29 接受日期: 2004-04-28

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No. G2000057005)和
国家自然科学基金(No.30371574)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-83161294, Fax: 010-83161294, E-mail:
pbchan@bjssap.org

1.1.3 仪器 倒置相差显微镜(Olympus BH-2), LP400型全自动酶标仪(法国巴斯德公司), 激光共聚焦显微镜(Bio-Rad公司, MRC-1024型), 紫外分光光度计(惠普8453型)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MES23.5细胞以含5%FBS及2%Sato's的DMEM/F12培养基培养, 然后分别按不同的实验需要接种于预先涂有多聚-L-赖氨酸的培养板、培养瓶、培养皿中, 在37℃, 5%CO₂的培养箱内培养。

1.2.2 细胞存活率测试(MTT测试) 细胞按2000个/孔接种于96孔板中, 48h后外加不同浓度的MPP⁺于培养基中, 使MPP⁺各孔的终浓度分别为800、400、200、100 μmol/L, 每种浓度做4个复孔, 取平均值, 对照组不加毒素, 分别观察24 h、48 h、72 h的细胞存活能力。

按MTT试剂盒说明书操作, MTT是一种四甲基偶氮唑盐, 外观呈淡黄色, 只有活细胞才能将其摄入胞内, 经线粒体琥珀酸脱氢酶催化形成蓝色甲瓚颗粒, 其形成量反映为A值, 因此其测量值的高低有赖于线粒体功能是否完整, 可以反映细胞的存活状态。加MTT 10 μl/孔, 37℃, 5%CO₂ 4 h后, 加以0.01 mol/L HCl溶解的100 g/L SDS, 100 μl/孔, 37℃, 5%CO₂培养箱过夜, 使甲瓚颗粒溶解, 次日用酶标仪测定550 nm, 参考波长为620 nm的各孔A值, 取4个复孔的平均A值为该处理组的A值。实验重复5次。

细胞存活率=(MPP⁺组4个复孔的平均A值/同一时间点对照组平均A值)100%

1.2.3 激光共聚焦显微镜测定细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_M$) 细胞常规接种于35 mm培养皿, 外加终浓度为200 μmol/L MPP⁺, 收集6 h、12 h、24 h、48 h的细胞, 倾去培养基, 以无血清DMEM/F12培养基洗细胞2次, 换为含2 μg/ml罗丹明123(临用前新鲜配制)的无血清DMEM/F12培养液, 37℃, 5%CO₂避光负载30 min。以无血清DMEM/F12培养基洗两次。激发波长488 nm和568 nm, 发射波长527 nm和675 nm。采用timecourse程序, 采集细胞荧光图像、相差图象及 $\Delta\Psi_M$ 的荧光值的动态变化曲线。

1.2.4 激光共聚焦显微镜测定活性氧(ROS) 应用非荧光探针DCFH₂-DA进行ROS的测定, DCFH₂-DA可以稳定地进入细胞膜, 被细胞内的酯酶水解

为非荧光的2', 7'-二氯氢化荧光素(DCFH)。在ROS的存在下, DCFH可被氧化为强荧光物质2', 7'-二氯荧光素(DCF), 因此, 荧光强度的大小与ROS值成正比。

细胞接种于35 mm的培养皿中, 外加终浓度为200 μmol/L的MPP⁺, 分别观察6 h、12 h、24 h、48 h后, 倾去培养基, 以无血清DMEM/F12培养基洗细胞2次, 加入终浓度为10 μmol/L的DCFH₂-DA, 37℃, 5%CO₂避光负载20 min。以无血清DMEM/F12培养基洗两次, 以488 nm激光激发, 于530 nm荧光发射。倒置显微镜20×物镜动态观察单细胞ROS的荧光值变化。

1.2.5 羟自由基、SOD的测定 细胞以6000个/cm²接种于75 cm²的培养瓶中, 2天后外加MPP⁺于培养基内, 达到终浓度为200 μmol/L, 分别收集6 h、12 h、24 h、48 h的细胞。按试剂盒说明书要求以匀浆方法进行细胞裂解, 取上清液以比色法测定蛋白质含量及羟自由基、SOD的含量。

1.2.6 统计学分析 所有实验均重复4~5次, 根据不同实验分别以SPSS10.0软件进行各组间的t检验(数据为方差齐性者)、两因素析因设计分析以及LSD法两两比较及秩和检验(数据为方差不齐者), $P<0.05$ 认为差异有显著性。

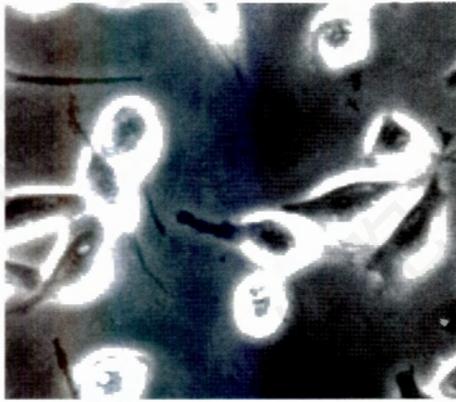
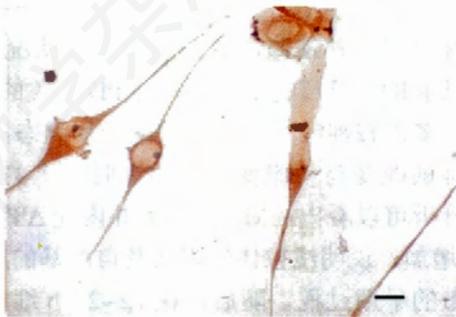
2 结果

2.1 MPP⁺对细胞存活率的影响

在常规培养条件, MES23.5细胞生长形态见图1, 细胞贴壁生长, 胞体为椭圆形或梭形, 大多数细胞有两个较长的突起, 核居中或略偏一侧, 核仁1~2个, 胞浆内表达酪氨酸羟化酶(TH)(图2)。

以MTT方法检测不同浓度MPP⁺(100~800 μmol/L)作用不同时间(24~72 h)对细胞存活能力的影响, 结果见表1。

由表1可见, 从MPP⁺作用24 h开始, 细胞的存活率已开始下降, 但各浓度组间无显著性差异, 在浓度为100 μmol/L时, 作用48 h后, 存活率下降至71.61%, 有趣的是, 作用72 h后, 其存活率不仅没有继续下降, 反而略有上升, 达到75.76%, 两者间存活率的差异有统计学意义($P<0.01$)。而MPP⁺浓度为200~800 μmol/L间时, 细胞的存活率随MPP⁺浓度的增加而下降, 随作用时间的延长而下降。以两因素析因设计分析及LSD法两两比较, 发现MPP⁺的浓度及作用时间均分别对细胞的存活率

图1 相差显微镜下的 MES23.5 细胞(标尺 = 25 μm)图2 MES23.5细胞胞浆内的TH免疫组化染色(标尺= 50 μm)表1 不同浓度 MPP⁺ 作用细胞不同时间对细胞存活率的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

MPP ⁺ ($\mu\text{mol/L}$)	作用时间(h)		
	24	48	72
100	89.58 \pm 11.33	71.61 \pm 18.40	75.76 \pm 9.69
200	89.99 \pm 16.88	61.68 \pm 13.98	56.26 \pm 6.09 ^a
400	79.03 \pm 11.31	55.22 \pm 11.50 ^a	47.55 \pm 13.28 ^a
800	82.27 \pm 7.20	52.00 \pm 10.58 ^a	40.90 \pm 2.80 ^a

^a $P < 0.01$, 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 比较。

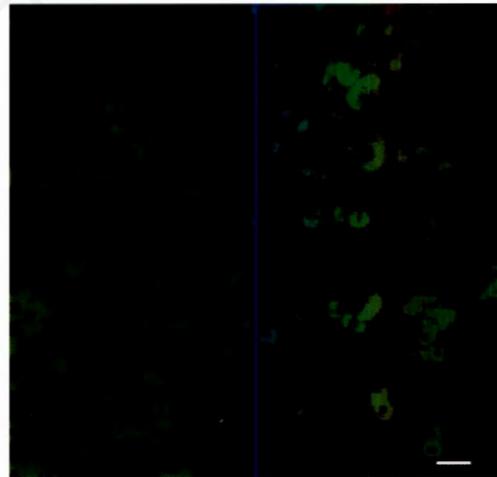
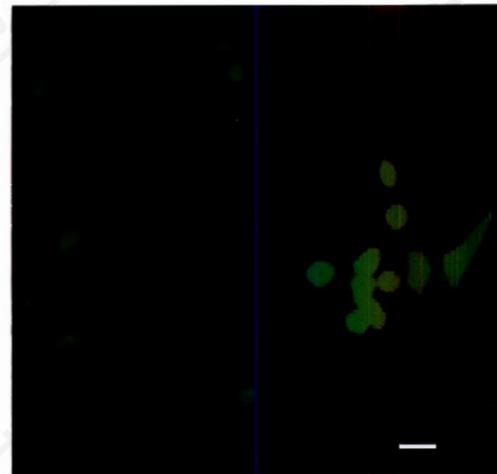
有影响, 各组间变化趋势差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 MPP⁺ 对细胞 $\Delta\Psi_M$ 及 ROS 的影响(表 2)

激光共聚焦显微镜下荧光探针罗丹明 123 及 DCF 标记的细胞形态见图 3、图 4。

细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_M$)能反映线粒体能量代谢的状况。200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用 6 h 后, $\Delta\Psi_M$ 已开始下降, 随时间延长, 下降明显, 至 12 h, 下降至该时间点正常对照组的 47.05%。在 48 h 比 24 h 有轻度上升, 但仍明显低于对照组, 差异有统计学意义。

细胞内 ROS 量能反应出其氧化应激状态。200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用细胞 6 h 后, ROS 产生仅轻度升

图3 激光共聚焦显微镜下罗丹明 123 标记的细胞形态
罗丹明 123 标记于胞质的线粒体膜中, 荧光强度的大小反映线粒体膜电位的大小(标尺=50 μm)。图4 激光共聚焦显微镜下 DCF 标记的细胞形态
DCF 均匀标记于胞质中, 荧光强度的大小反映 ROS 产生量的大小(标尺=50 μm)。

高(约为对照组的 1.7 倍), 至 12 h, ROS 产生量明显增加, 此后随时间延长, ROS 量逐渐增加, 48 h 已达到对照组的 12.8 倍, 差异均有统计学意义。

2.3 MPP⁺ 对细胞羟自由基及 SOD 的影响(表 3)

我们特别对培养细胞的毒性较强的羟自由基进行检测。200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用细胞 6 h 后, 细胞内羟自由基开始增加, 但未见显著性差异, 从 12 h 开始羟自由基显著增加, 至 48 h, 增加到接近对照组的 2 倍。

SOD 在清除自由基中起重要作用。200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用细胞 6 h 至 24 h 后, 细胞内的 SOD 无明显改变, 直至 48 h, SOD 才出现显著性减少, 为

表2 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用不同时间后细胞内 $\Delta\Psi_M$ 及 ROS 含量 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

作用时间(h)		6	12	24	48
对照	$\Delta\Psi_M$	94.12 \pm 9.58	97.40 \pm 4.82	103.49 \pm 29.52	108.97 \pm 30.08
	ROS	2.26 \pm 2.33	5.30 \pm 1.85	9.74 \pm 3.07	9.62 \pm 1.48
MPP ⁺	$\Delta\Psi_M$	83.20 \pm 13.39 ^a	45.83 \pm 12.97 ^a	37.31 \pm 15.73 ^a	55.20 \pm 11.31 ^a
	ROS	5.71 \pm 0.26 ^a	36.32 \pm 6.46 ^a	41.69 \pm 3.86 ^a	128.80 \pm 3.42 ^a

^a $P < 0.01$, 与对照比较。

表3 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用不同时间后细胞内羟自由基及 SOD 含量 ($n=4, \bar{x} \pm s, \text{IU/mgprot}$)

作用时间(h)		6	12	24	48
对照	$\cdot\text{OH}$	154.15 \pm 21.31	184.63 \pm 13.34	155.01 \pm 39.05	198.78 \pm 75.24
	SOD	124.89 \pm 36.60	160.77 \pm 32.88	146.50 \pm 33.37	135.44 \pm 26.23
MPP ⁺	$\cdot\text{OH}$	176.13 \pm 9.99	234.93 \pm 34.19 ^a	291.38 \pm 78.86 ^b	316.65 \pm 34.65 ^b
	SOD	130.10 \pm 67.53	144.25 \pm 56.13	155.44 \pm 54.92	64.48 \pm 13.13 ^b

^a $P < 0.05$, 与对照比较; ^b $P < 0.01$, 与对照比较。

对照组的 50.92%。

3 讨论

本研究结果表明 MPP⁺ 对多巴胺能的 MES23.5 细胞产生毒性作用, 在一定的浓度范围内其毒性作用呈浓度和时间依赖。应用 MTT 的方法证实在较高浓度的 MPP⁺ (200~800 $\mu\text{mol/L}$ 之间) 对细胞的毒性作用随浓度的增加而增加, 随作用时间的延长而增加, 呈时间依赖和浓度依赖, 这与其他学者的研究结果相似^[3-5]。在此浓度范围内的 MPP⁺ 可以用来观察其毒性作用机制。而低浓度的 MPP⁺ (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h, 细胞的存活率无改变, 48 h 轻度下降, 而 72 h 后则有所上升。这一现象可能是 MPP⁺ 浓度较低, 而细胞尚有一定的代偿能力, 而且由于有部分细胞的死亡, 残余细胞的生长空间有所增加而使其增殖速度加快的缘故。根据实验结果, 我们选择了 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作为研究细胞的死亡机制所用的浓度, 因为该浓度使细胞受到损伤而又没有大部分死亡(细胞死亡 60% 左右)。同时, 也选择了较早的时间点 6、12、24 和 48 h。

MPP⁺ 被多巴胺转运体移入和积聚在多巴胺能神经元内, 依浓度梯度进入线粒体抑制线粒体的电子传递链(ETC), 因而导致 ATP 产生的减少和自由基的增加, $\Delta\Psi_M$ 改变可反映线粒体能量代谢的变化所导致其功能的改变。氧化应激主要是活性氧的产生大量增加, 而线粒体是体内氧自由基产生的主要来源之一, 抑制线粒体的电子传递可导致氧自由基的产生增加, 可用激光共聚焦这一较为直观的方法观察总 ROS 产生的量。羟自由基是细胞内毒性作用较强的自由基, 而 SOD 是主要的自由基清除物质,

以上指标可以反映细胞内总的氧化应激状况。

本实验的主要目的是检测在与 PD 有关的 MPP⁺ 作用下, 多巴胺神经元线粒体功能受损状态和氧化应激指标的改变与细胞变性之间在时间上的关系。从结果分析可以看出, MPP⁺ 在 6 h 内使 $\Delta\Psi_M$ 下降和 ROS 增加, 说明线粒体受损伤及自由基的产生是氧化应激的早期过程。随后, 在 12~24 h 细胞内羟自由基和 ROS 含量大量增加。而细胞本身的抗氧化酶 SOD 的减少则发生于 48 h 左右, 伴随细胞存活率显著的下降, 说明在毒素作用的早期, 细胞尚有自由基的清除能力, 至后期 SOD 可能受到氧化而使其含量减少, 逐渐丧失抗氧化及自由基清除能力, 细胞发生不可逆变化而变性死亡。结果与多数研究者的类似实验的结果相一致^[6,7], 但有部分学者持不同的观点, 如有学者发现 MPP⁺ 并不引起多巴胺能细胞系 SH-SY5Y 的 $\Delta\Psi_M$ 下降及 ROS 的增加^[8], 其原因可能是由于所用 MPP⁺ 的浓度较我们所用的为低(5 $\mu\text{mol/L}$)。

总之, 我们的结果表明, 早期线粒体能量代谢障碍和膜电位变化导致 ROS 含量(尤其是羟自由基)增加是 MPP⁺ 导致细胞氧化应激的原因。而细胞内自由基的清除机制受损, 最终导致细胞变性死亡。这一结论可以为 PD 发病机制的环境毒素学说及氧化应激理论提供一个细胞水平的依据。

参考文献 (References)

- [1] Langston JW *et al. Neurosci Lett*, 1984, **48**: 87
- [2] Crawford GD *et al. J Neurosci*, 1992, **12**: 3392
- [3] Desole MS *et al. Neurochem Int*, 1997, **31**: 169
- [4] Fall CP *et al. J Neurosci Res*, 1999, **55**: 620
- [5] Storch A *et al. J Neural Transm*, 2000, **107**: 281

- [6] Cassarino DS *et al. Biochim Biophys Acta*, 1997, **1362**: 77 [8] Nakamura K *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 34402
[7] Wong SS *et al. Brain Res*, 1999, **836**: 237

The Mechanism of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium Resulting in the Death of Dopaminergic Cell Line MES23.5

Qiu-Zhen Fu^{1,2}, Sheng-Li Xu¹, Xiao-Hong Zuo¹, Yan-Ling Xu¹, Biao Chen^{1*}

(¹Beijing Geriatric Clinical & Research Center, Xuanwu Hospital of the Capital University of the Medical Sciences, Beijing 100053, China; ²Department of Neurology, Tangdu Hospital of the Forth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract Through the measurement of the cellular viability, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_M$), reactive oxidant species (ROS) content, $\cdot\text{OH}$ and superoxide dismutase (SOD) content after the exposure of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺), the environment toxin, on dopaminergic cell line MES23.5, it was found that the cellular viability was significantly decreased after the exposure of MPP⁺ and the decrease was concentration and time dependent under more than 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺. Significantly, the $\Delta\Psi_M$ began to reduce and the ROS, the $\cdot\text{OH}$ content began to increase gradually since 6 to 48 hours exposure of 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺. The SOD content was not significantly reduced until 48 hours exposure. The results suggest that the increased ROS, especially $\cdot\text{OH}$, caused by disturbance of mitochondrial energy metabolism and the $\Delta\Psi_M$ changes in early stage may result in MPP⁺-induced oxidative stress in dopaminergic cells and the damage of cellular free radical cleaning system may induce the dopaminergic cells degeneration and finally death.

Key words Parkinson's disease; 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺); oxidative stress

Received: July 29, 2003 Accepted: April 28, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.G2000057005) and the National Natural Science Foundation of China (No.30371574)

*Corresponding author. Tel: 86-10-83161294, Fax: 86-10-83161294, E-mail: pbchan@bjsap.org