

# 多聚 ADP-核糖聚合酶抑制剂对高浓度锌损伤 PC12 细胞的保护作用

史明 郑春霞 赵湘辉 游思维\*

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

**摘要** 探讨多聚 ADP-核糖聚合酶(PARP)抑制剂 3-氨基苯甲酰胺 (3-AB) 对 400  $\mu\text{mol/L}$  氯化锌损伤 PC12 细胞的保护作用及其对锌造成的细胞死亡类型的影响。应用 MTT 法, 免疫细胞化学和 Western 印迹分别测定 PC12 细胞的存活率和 PARP 活性; 用 Hoechst 33342 / PI 荧光双染色、膜联蛋白 V 结合实验及 DNA 断裂分析等方法检测细胞死亡类型。结果表明: 在 400  $\mu\text{mol/L}$  氯化锌的作用下, 细胞存活率降至  $(22.7 \pm 4.6)\%$ , PARP 活性增强, 坏死、凋亡和正常细胞百分比分别为  $(58.4 \pm 6.3)\%$ 、 $(18.0 \pm 5.6)\%$  及  $(23.6 \pm 4.2)\%$ ; 3-AB 使细胞存活率提高至  $(76.9 \pm 4.7)\%$ , PARP 活性减弱, 坏死细胞百分数降至  $(19.2 \pm 5.2)\%$ , 而正常和凋亡细胞百分数增加到  $(43.3 \pm 1.9)\%$  和  $(37.5 \pm 6.5)\%$ 。实验证明, PARP 参与了高浓度锌诱导的 PC12 细胞损伤, 抑制 PARP 活性可提高细胞的存活率, 而这种保护作用在于减少细胞的坏死而非凋亡。

**关键词** 多聚 ADP-核糖聚合酶; 3-氨基苯甲酰胺; 锌; 坏死和凋亡; PC12 细胞

锌是生物体内不可缺少的微量元素, 适宜浓度的锌离子可降低核酸内切酶活性<sup>[1]</sup>、抑制 NMDA 受体功能<sup>[2]</sup>并阻止钙离子内流<sup>[3]</sup>, 因而具有神经保护作用。而浓度高于 30  $\mu\text{mol/L}$  的锌离子却对皮层细胞<sup>[4,5]</sup>和星形胶质细胞<sup>[6]</sup>等产生毒性作用, 因为过多的锌离子诱导神经元产生大量反应性氧化物, 其中超氧化阴离子又可和一氧化氮结合生成过氧亚硝基阴离子<sup>[7,8]</sup>。这些氧自由基使细胞 DNA 损伤、断裂, 从而过度激活多聚 ADP-核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase; PARP], 造成 ATP 生成障碍和细胞功能异常<sup>[9,10]</sup>, 使细胞发生坏死性<sup>[7]</sup>或凋亡性死亡<sup>[4,5]</sup>。我们最近发现<sup>[11]</sup>, 应用肌昔可显著降低高浓度锌离子导致的 PC12 细胞死亡率, 为探讨肌昔的神经保护作用, 须首先搞清高浓度锌离子致死 PC12 细胞的机制。本实验通过检测高浓度锌损伤 PC12 细胞内的 PARP 活性, 并采用 PARP 抑制剂 3-氨基苯甲酰胺(3-AB)作用于高浓度锌损伤的 PC12 细胞, 研究 PARP 是否参与了锌诱导的 PC12 细胞的死亡, 并进一步探讨 3-AB 对锌造成的细胞死亡类型的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

将 PC12 细胞(日本 Health Science Research Resources Bank)种于内含 DMEM 培养液(pH 7.4, Gibco BRL 公司)、10% 热灭活的胎牛血清(Gibco BRL 公司)、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素(Sigma 公司)及 50 ng/ml NGF(Alomone 公司)的 25  $\text{cm}^2$  组织培养瓶(Nunc 公司)中, 于 5%  $\text{CO}_2$  的 37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养, 3 天后传代培养。实验时将细胞种到事先以左旋多聚赖氨酸(Sigma 公司)包被的玻片和 96 孔板培养皿内, 换用内含 1% N-2 Supplement(Gibco BRL 公司)的 DMEM / F12 培养液进行培养。

### 1.2 药物施加

我们在预实验中, 用了不同浓度的 3-AB (Biomol 公司)观察其对锌损伤细胞存活率的影响, 发现 2.5 mmol/L 的作用最为显著。因此, 向实验组细胞中加入以 DMEM 培养液溶解的 10  $\mu\text{l}$  2.5 mmol/L 3-AB, 对照组细胞中则加入等体积 DMEM 培养液。0.5 h 后加入 400  $\mu\text{mol/L}$  氯化锌(Sigma 公司), 并设立不经任何处理的细胞为空白对照组。

收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-02-21

国家自然科学基金项目(No.30371466)和国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.2003CB515031)资助

\* 通讯作者。Tel: 029-83376755; Fax: 029-83246270; E-mail: yousiwei@fmmu.edu.cn

氯化锌作用 1 h 的细胞用于 PARP 活性检测、免疫细胞化学染色和 Western 印迹等实验;作用 6 h 的用于存活率和死亡类型的检测。

### 1.3 细胞存活率测定

用 MTT 比色法测定细胞活性。96 孔板培养皿中的 PC12 细胞经氯化锌损伤后,进行 MTT 检测(每一处理组样品  $n=6$ )。测定和参考波长分别为 570 nm 和 650 nm,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值。

### 1.4 PARP 活性检测

PARP 活化后可裂解其底物  $\text{NAD}^+$  生成烟酰胺和 ADP-核糖,并继续催化后者形成 ADP-核糖均聚体 (PAR),因此可通过 PAR 抗体检测 PAR 的表达来反映 PARP 活性。

**1.4.1 免疫细胞化学染色** 氯化锌作用后,用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min,加入 1% BSA 稀释的第一抗体即小鼠抗 PAR 抗体(1:500, Biomol 公司),4 °C 下反应 48 h 后加入联有 Texas-red 的抗小鼠第二抗体(1:400, Sigma 公司),室温避光温育 2 h,在 Olympus BX-60 荧光显微镜下进行观察摄像,并从每一样品(每一处理组样品  $n=6$ )随机选取 4 个视野,对每组单位面积(0.05 mm<sup>2</sup>)内的 PAR 免疫阳性细胞进行计数。

**1.4.2 Western 印迹** 施加氯化锌后,每个培养皿内(直径 35 mm,  $1 \times 10^7$  个细胞)加入 50 ml 样品缓冲液,冰浴 30 min。40 mg/泳道的蛋白质样品在 8% SDS-PAGE 进行分离电泳,0 °C 转印至 PVDF 膜。免疫化学反应按照 Roche 公司的 Western 印迹试剂盒说明书进行:PVDF 膜浸入 0.5% 封闭液稀释的小鼠抗 PAR(1:500)室温温育 2 h,之后加入 POD 标记的抗小鼠 IgG 温育 1 h。暗室中加入发光液, X 线片曝光,保存结果。

### 1.5 细胞死亡类型的检测

**1.5.1 Hoechst 33342 / PI 双染色** 向 PC12 细胞内加入 10  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342(Molecular Probe 公司)和 10  $\mu\text{g/ml}$  PI(Molecular Probe 公司),用 3:1 甲醇醋酸固定细胞。荧光显微镜下对细胞进行分类:(1)正常细胞。核为圆形,呈淡蓝色荧光;(2)坏死细胞。呈高红色荧光;(3)凋亡细胞。核变小、碎裂及染色质浓集,呈高蓝色或浅红色荧光。另在 200 $\times$  视野下,从每一样品(每一处理组含样品  $n=6$ )随机选取 4 个视野,计数上述各类细胞。

**1.5.2 膜联蛋白 V 结合实验** PC12 细胞( $5 \times 10^5$

个/样品)中加入 5  $\mu\text{g/ml}$  的膜联蛋白 V-FITC 及 PI 后送流式细胞仪分析。检测膜联蛋白 V-FITC 的激发、观测波长分别为 488 nm 和 530 nm,PI 波长大于 600 nm。重复实验 4 次。细胞状态的评定标准:正常、坏死及凋亡细胞分别位于流式细胞仪测定结果的左下、右上及右下象限。

**1.5.3 DNA 断裂分析** 细胞总 DNA 的提取依据 Mazars 等<sup>[12]</sup>的方法,电泳时 DNA 溶液和 DNA 加样缓冲液 6:1 混合,在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳(45 V)3 h。

### 1.6 统计学分析

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差来表示,应用美国 OriginLab 公司的 Origin 7.0 软件对数据进行单因素方差分析(Tukey 检验)并绘图。

## 2 结果

### 2.1 锌对 PC12 细胞活性及 PAR 表达的影响

MTT 检测结果显示:施加氯化锌后,对照组 PC12 细胞存活率显著降低至(22.7 $\pm$ 4.6)% (图 1A)。空白对照组细胞的 PAR 免疫荧光染色为阴性;氯化锌作用后,对照组的 PAR 免疫染色阳性细胞的数量明显增加(图 1B),每 0.05 mm<sup>2</sup> 内的阳性细胞数为(24.2 $\pm$ 4.2)个;Western 印迹结果显示空白对照组的细胞内无 PAR 化蛋白质表达,而氯化锌可使 PAR 化蛋白质的表达明显增加(图 1C)。

### 2.2 3-AB 对锌损伤 PC12 细胞活性及 PAR 表达的影响

与对照组(22.7 $\pm$ 4.6)% 相比,实验组的 3-AB 使 PC12 细胞的存活率提高至(76.9 $\pm$ 4.7)% ( $P < 0.05$ , 图 1A),PAR 免疫染色阳性细胞数从单独氯化锌作用(对照组)时的(24.2 $\pm$ 4.2)个/0.05 mm<sup>2</sup> 减少至(15.8 $\pm$ 3.3)个/0.05 mm<sup>2</sup> ( $P < 0.05$ , 图 1B),亦可明显降低氯化锌诱导的 PAR 化蛋白质的表达(图 1C)。

### 2.3 锌诱导 PC12 细胞的死亡类型

空白对照组细胞为 Hoechst 33342 着色的淡蓝色,不为 PI 着色,极少见到坏死或凋亡细胞(图 2A, 图 2B);施加氯化锌损伤后,对照组中淡蓝色正常细胞明显减少,至细胞总数的(23.6 $\pm$ 4.2)%,而 PI 染色的坏死细胞明显增多[(58.4 $\pm$ 6.3)%],同时出现(18.0 $\pm$ 5.6)% 的呈高蓝色的凋亡细胞(图 2A, 图 2B)。流式细胞仪结果显示,空白对照组的细胞位于左下象限;对照组单独氯化锌作用后,

( $16.4 \pm 8.3$ )% 的细胞为左下象限的正常细胞, ( $65.1 \pm 4.7$ )% 的细胞是位于右上象限的坏死细胞, 另有 ( $18.5 \pm 2.8$ )% 的细胞为分布于右下象限的凋亡细胞 (图 2C)。单独氯化锌作用时的 DNA 琼脂糖凝胶电

泳图呈连续形条带(DNA smear)(图 2D, 泳道 3), 提示以细胞坏死为主。

#### 2.4 3-AB 对锌损伤 PC12 细胞死亡类型的影响

**Hoechst 33342/PI 荧光双染色:** 和对照组的单独氯化锌作用相比, 实验组的 3-AB 显著减少 PI 染色的坏死细胞数量[( $19.2 \pm 5.2$ )%,  $P < 0.01$ ], 明显增加淡蓝色正常细胞[( $43.3 \pm 1.9$ )%,  $P < 0.01$ ], 同时也伴随一定量的高蓝色凋亡细胞[( $37.5 \pm 6.5$ )%,  $P < 0.01$ ](图 2A, 图 2B)。流式细胞仪结果显示, 与对照组的单独氯化锌作用相比, 3-AB 使在右上象限的坏死细胞显著减少[( $28.3 \pm 5.6$ )%,  $P < 0.01$ ], 而使左下象限正常细胞[( $31.5 \pm 3.7$ )%,  $P < 0.05$ ]和右下象限凋亡细胞[( $40.2 \pm 7.2$ )%,  $P < 0.05$ ]的数量明显增加(图 2C)。施加 3-AB 后 DNA 琼脂糖凝胶电泳图出现比较明显的“DNA 梯(DNA ladder)”条带(图 2D, 泳道 4), 即有较多的凋亡细胞出现。

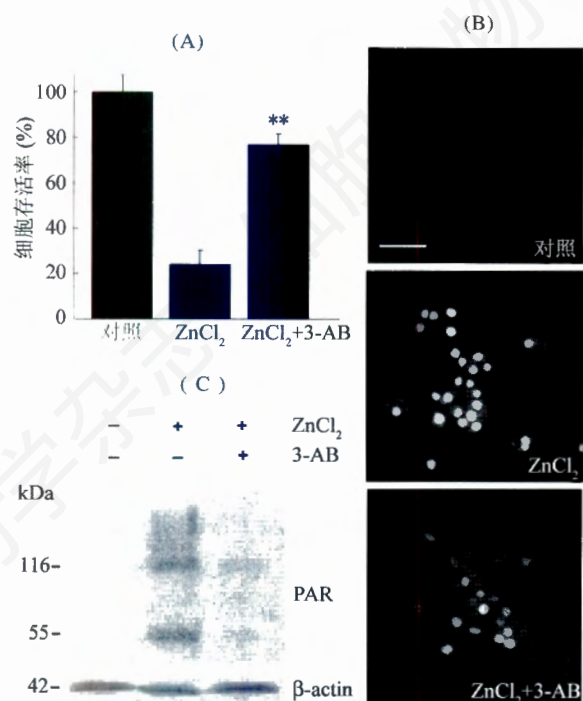


图 1 锌、3-AB 对 PC12 细胞存活率(A)及 PARP 活性(B、C)的影响

\*\* :  $P < 0.01$ ; 标尺为 50 μm; 116 kDa 代表 PARP, β 肌动蛋白(β-actin)为内对照。

### 3 讨论

PARP 是普遍存在于真核细胞核内的一种蛋白酶, 可为断裂的 DNA 链所激活<sup>[13]</sup>。活化的 PARP 裂解底物 NAD<sup>+</sup> 生成烟酰胺和 ADP-核糖, ADP-核糖可继续被 PARP 催化形成线形或分枝状的 PAR, 并将 PAR 转移到多种核蛋白(如组蛋白)及 PARP 自身等, 最终有助于修复断裂的 DNA<sup>[14]</sup>。当 DNA 损伤严重时, 过度激活的 PARP 使胞内 NAD<sup>+</sup> 大量消耗,

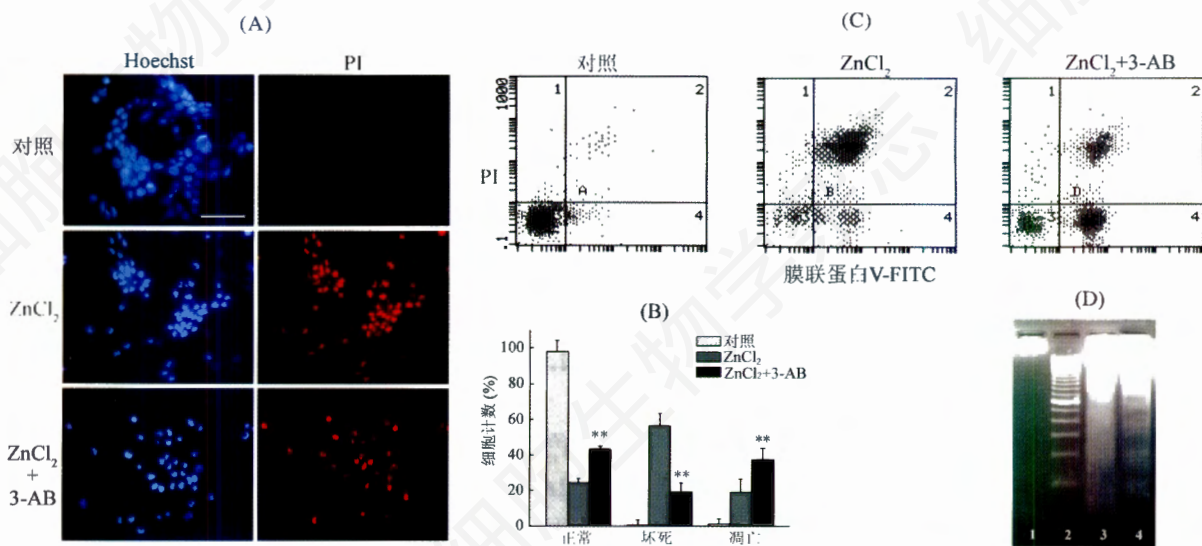


图 2 锌、3-AB 对 PC12 细胞死亡类型的影响

(A)Hoechst 33342 和 PI 荧光双染色的显微图片, 标尺为 50 μm; (B)锌、3-AB 作用后的正常、坏死和凋亡细胞百分比。\*\*:  $P < 0.01$ , 与单独锌作用相比; (C)膜联蛋白 V 结合实验; (D)DNA 琼脂糖凝胶电泳。1: 正常对照组; 2: DNA marker; 3: ZnCl<sub>2</sub>; 4: ZnCl<sub>2</sub> + 3-AB。

进而使需要NAD<sup>+</sup>参与的糖酵解、线粒体呼吸链传递等重要代谢途径受到破坏,导致ATP生成障碍和细胞功能异常<sup>[9,10]</sup>。细胞在试图重新合成NAD<sup>+</sup>过程中也要消耗大量ATP,加剧了胞内能量的短缺<sup>[15]</sup>,最终导致细胞死亡。已有研究证明,PARP抑制剂或剔除PARP基因可保护由实验性脑缺血再灌注<sup>[16]</sup>、多巴胺能神经毒素1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶<sup>[17]</sup>、实验性脊髓损伤<sup>[18]</sup>、实验性糖尿病<sup>[19]</sup>或低血糖<sup>[20]</sup>等造成的细胞死亡,而提高PARP活性可加剧细胞的死亡<sup>[21,22]</sup>。

有研究证明,在高浓度锌诱导含神经元和星形胶质细胞的混合性皮层细胞的损伤过程中,也有PARP的参与<sup>[10]</sup>。锌过载时诱导细胞产生大量反应性氧化物,其中超氧化阴离子又可和一氧化氮结合生成过氧亚硝基阴离子<sup>[7,8]</sup>,造成DNA严重损伤断裂,从而过度激活PARP,最终导致细胞因能量耗竭而死亡<sup>[10]</sup>。本实验中PC12细胞存活率在氯化锌作用下显著降低的同时,PAR免疫染色阳性细胞的数量明显增加,细胞内PAR化蛋白质表达也显著增强;以3-AB抑制PARP活性后明显提高了锌致伤细胞的存活率,这些证据足以证明PARP无例外地参与了锌诱导PC12细胞损伤的过程。

锌既可造成细胞的坏死也可导致凋亡,这取决于锌作用的强度。30 μmol/L的低浓度锌多引起离体鼠皮层神经细胞<sup>[4,5]</sup>、急性人T淋巴细胞白血病细胞系Molt-4细胞<sup>[23]</sup>的凋亡,而浓度大于50 μmol/L的锌则造成这类细胞的坏死<sup>[4,5,7]</sup>。本实验中,我们利用Hoechst 33342/PI荧光双染色、膜联蛋白V结合实验及DNA琼脂糖凝胶电泳等方法也证明,400 μmol/L氯化锌可造成约60%的PC12细胞坏死,而作为PARP抑制剂的3-AB则将PC12细胞的坏死率降低约至20%,同时也使正常细胞的百分数从23%增

高为43%,表明3-AB对锌损伤的PC12细胞具有显著保护作用。然而,在3-AB的作用下,凋亡细胞的百分数非但没有下降反而上升,似乎3-AB的作用是导致更多的细胞凋亡。实际上,决定细胞坏死或凋亡的关键因素是细胞内ATP的水平<sup>[24]</sup>,如果细胞内有一定的ATP储备,那么受伤的细胞就趋向于凋亡;若细胞内的能量耗尽,细胞就会走向坏死。3-AB抑制了损伤细胞的PARP活性,从而降低胞内ATP的耗竭,这样就使本来走向坏死的细胞向凋亡甚至正常细胞转化,从另一方面体现了3-AB对PC12细胞的保护作用。

### 参考文献 (References)

- [1] Matsushita K *et al.* *Brain Res*, 1996, **743**: 362
- [2] Kikuchi M *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, **36**: 2048
- [3] Harrison NL *et al.* *Neuropharmacology*, 1994, **33**: 935
- [4] Lobner D *et al.* *Cell Mol Biol*, 2000, **46**: 797
- [5] Kim YH *et al.* *Neuroscience*, 1999, **89**: 175
- [6] Swanson RA *et al.* *Glia*, 1992, **6**: 198
- [7] Kim EY *et al.* *Eur J Neurosci*, 1999, **11**: 327
- [8] Noh KM *et al.* *J Neurochem*, 1999, **72**: 1609
- [9] Kim YH *et al.* *Exp Neurol*, 2002, **177**: 407
- [10] Zhang Y *et al.* *Eur J Neurosci*, 2004, **20**: 1727
- [11] Shi M *et al.* *Neuroreport*, 2002, **13**: 477
- [12] Mazars A *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 36797
- [13] de Murcia G *et al.* *Mol Cell Biochem*, 1994, **138**: 15
- [14] Satoh MS *et al.* *Nature*, 1992, **356**: 356
- [15] Szabo C *et al.* *Trends Pharmacol Sci*, 1998, **19**: 287
- [16] Kamanaka Y *et al.* *Life Sci*, 2004, **76**: 151
- [17] Mandir AS *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 5774
- [18] Genovese T *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, **312**: 449
- [19] Pieper AA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 3059
- [20] Suh SW *et al.* *J Neurosci*, 2003, **23**: 10681
- [21] Weise J *et al.* *Cell Death Differ*, 2001, **8**: 801
- [22] Ha HC *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 13978
- [23] Hamatake M *et al.* *J Biochem(Tokyo)*, 2000, **128**: 933
- [24] Eguchi Y *et al.* *Cancer Res*, 1997, **57**: 1835

## Protective Effects of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor on Zinc-injured PC12 Cells

Ming Shi, Chun-Xia Zheng, Xiang-Hui Zhao, Si-Wei You\*

(*Institute of Neurosciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*)

**Abstract** This study examined the effects of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, 3-aminobenzamide (3-AB), on PC12 cells injured by 400  $\mu\text{mol/L}$  zinc chloride and on the types of zinc-induced cell death. MTT assay, immunocytochemistry and Western blot were used to assess the viability and PARP activity of PC12 cells. Hoechst 33342 / PI dual staining, Annexin V binding assay and DNA agarose gel electrophoresis were employed to investigate the types of the cell death. Our results revealed that 400  $\mu\text{mol/L}$  zinc chloride promoted PARP activation and reduced the cell viability to  $(22.7 \pm 4.6)\%$ .  $(58.4 \pm 6.35)\%$  and  $(18.0 \pm 5.6)\%$  of PC12 cells underwent necrosis and apoptosis, respectively, and the percentage of normal cells was  $(23.6 \pm 4.2)\%$ . However, pre-treatment of the cells with 3-AB attenuated zinc-induced PARP activity markedly, and increased the cell viability to  $(76.9 \pm 4.7)\%$ . The percentages of necrotic, apoptotic or normal cells were  $(19.2 \pm 5.2)\%$ ,  $(37.5 \pm 6.5)\%$  and  $(43.3 \pm 1.9)\%$ , respectively. The present study demonstrated that PARP participated in the zinc-induced injury of PC12 cells. Inhibition of PARP promoted the viability of zinc-injured PC12 cells significantly and this protective effect was due to a decrease in numbers of necrotic, but not apoptotic cells.

**Key words** poly(ADP-ribose) polymerase; 3-aminobenzamide; zinc; necrosis and apoptosis; PC12 cells

Received: December 27, 2004 Accepted: February 21, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371466) and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2003CB515031)

\*Corresponding author. Tel: 86-29-83376755, Fax: 86-29-83246270, E-mail: yousiwei@fmmu.edu.cn