

Akt/HIF-1 α 信号通路在二氧化硒诱导PC12细胞损伤中的作用

李永金* 谢简明 张 谊 杨开勇 陈月芳 黄晓佳
(江苏大学医学院药理学教研室, 镇江 212013)

摘要 该文主要探讨Akt/HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α)信号通路在二氧化硒(SeO_2)诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞损伤中的作用。将PC12细胞暴露于不同浓度的 SeO_2 (40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 24 h以诱导细胞发生损伤。采用噻唑蓝还原法和乳酸脱氢酶漏出率检测法测定细胞损伤程度, 倒置显微镜观察细胞形态的变化, 用丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒检测细胞内活性氧类活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平, Hoechst 33342单荧光染色法观察细胞凋亡, 免疫印迹法检测细胞HIF-1 α 、磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、PI3k、p53和Caspase-3(cysteinyI aspartate specific proteinase-3)的表达。结果显示, 二氧化硒可呈剂量依赖性地诱导PC12细胞损伤, 导致细胞内ROS增多和细胞凋亡, 引起细胞皱缩, 轴突变短。p-Akt、HIF-1 α 、p53、Caspase-3表达上调, Bax/Bcl-2表达比例显著增加。由此说明, 二氧化硒诱导PC12细胞损伤, 导致细胞凋亡, 与其激活细胞Akt/HIF-1 α 信号通路, 进而促进p53、Bax/Bcl-2、Caspase-3的表达及胞内ROS增加有关。

关键词 二氧化硒; PC12细胞; 细胞凋亡; HIF-1 α ; 信号通路

Role of Akt/HIF-1 α Signaling Pathway in PC12 Cell Injury Induced by Selenium Dioxide

Li Yongjin*, Xie Jianming, Zhang Yi, Yang Kaiyong, Chen Yuefang, Huang Xiaojia
(Department of Pharmacology, Jiangsu University School of Medicine, Zhenjiang 212013, China)

Abstract This article was to investigate the role of Akt/HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) signaling pathway in the injury of PC12 cells induced by selenium dioxide (SeO_2) in rat adrenal pheochromocytoma. PC12 cells were exposed to different concentrations of SeO_2 (40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h to induce cell injury. The cell viability was measured by MTT assay. Morphological changes of cells were observed by inverted microscope. The degree of cell injury was measured by lactate dehydrogenase leakage detection. The intracellular production of reactive oxygen species (ROS) was measured by assessing superoxide dismutase (SOD) and malonic dialdehyde (MDA) levels, cell apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining, and the levels of HIF-1 α , p-Akt, Bcl-2, Bax, PI3k, p53 and Caspase-3 were determined by Western blot. Selenium dioxide could induce the damage of PC12 cells in a dose-dependent manner, and potentiated oxygen radical production and cell apoptosis, causing

收稿日期: 2017-07-17 接收日期: 2017-09-07

国家自然科学基金项目(批准号: 81300059)和江苏大学高级人才基金项目(批准号: 11JDG092)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0511-88791201, E-mail: lyj3600@163.com

Received: July 17, 2017 Accepted: September 7, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81300059) and Senior Talent Foundation of Jiangsu University (Grant No.11JDG092)

*Corresponding author. Tel: +86-511-88791201, E-mail: lyj3600@163.com

网络出版时间: 2017-10-30 11:57:43 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171030.1157.008.html>

cell shrinkage and axonal shortening. The levels of p-Akt, HIF-1 α , p53, Caspase-3 (cysteiny aspartate specific proteinase-3) were up-regulated and the ratio of Bax/Bcl-2 expression was significantly increased by selenium dioxide in PC12 cells. These results indicated that the damage of PC12 cells causing cell apoptosis was induced by selenium dioxide, which was related to the activation of Akt/HIF-1 α signaling pathway and the expression of p53, Bax/Bcl-2, Caspase-3 and intracellular free radicals.

Keywords selenium dioxide; PC12 cells; cell apoptosis; HIF-1 α ; signaling pathway

1817年, Berzelius首次发现了新未知元素并命名为硒(selenium, Se)。1957年, Schwarz等^[1]证实了硒为人体新陈代谢所必需的营养素, 随着研究的深入, 人们渐渐认识到硒的特性及其特点。但硒的生理剂量与中毒剂量范围较窄, 一旦摄入超出一定剂量, 易引起中毒^[2-3]。硒的毒性因类别的不同差异很大, 不同行业有着不同的标准, 有的相差几倍甚至几十倍^[4]。目前对硒的研究多集中在与抗氧化、提高免疫力以及降低心血管疾病、抗肿瘤等方面^[5-6], 而对硒的毒性的系统研究报道较少^[7]。

在神经细胞损伤过程中, 有多种因子参与了细胞的凋亡过程, 其中低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)受到了广泛的关注。HIF-1是细胞在缺氧条件下活化的重要转录因子, 由 α 和 β 两个亚基组成, 其中HIF-1 α 是决定其活性的功能性亚基。在缺氧诱导脊髓神经细胞凋亡过程中, HIF-1 α 表达上调, 提示HIF-1 α 参与了细胞的损伤过程^[8]。目前, 重金属铅诱导的PC12细胞损伤中证实HIF-1 α 出现明显上调^[9]。但HIF-1 α 是否参与调节硒诱导的神经细胞凋亡, 是否经由经典的PI3k/Akt通路, 仍不明确。关于HIF-1 α 是否参与二氧化硒(SeO₂)诱导的细胞凋亡及硒中毒引发的细胞凋亡鲜有提及。

p53基因具有促进细胞凋亡的作用。p53基因可以通过Bax/Bcl-2等蛋白调控细胞凋亡。有学者认为, p53还可以直接刺激线粒体释放高毒性的活性氧类(reactive oxygen species, ROS)引发凋亡^[10]。细胞凋亡是一种复杂的生化过程, 有许多蛋白质参与了这一过程, 包括凋亡前体蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2, Bax/Bcl-2比值成为凋亡的重要生化指标^[11]。Caspase-3(cysteiny aspartate specific proteinase-3)在Caspase家族中有着重要的地位, 是最重要的效应蛋白裂解酶。可以说Caspase-3是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。被激活的Caspase-3使细胞、胞核及细胞骨架等的重要蛋白酶失活, 关闭DNA复制和

修复, 破坏DNA和细胞核结构, 诱导凋亡小体的形成, 执行细胞凋亡的功能^[12-14]。

本研究选用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞作为实验对象以模拟神经细胞, 用不同浓度的SeO₂诱导损伤, 测定生化指标的差异。探讨HIF-1 α 及其通路和p53、Caspase-3等在SeO₂诱导PC12细胞损伤中的作用, 为硒的毒理学安全性评价和合理应用, 特别是硒对神经毒性损伤提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞株购自中国科学院上海细胞库; DMEM培养基和胰蛋白酶购自美国Gibco公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; SeO₂购自上海迈瑞尔化学有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)检测试剂盒购自海门市碧云天生物技术研究; 噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]购自美国Amresco公司; Hoechst 33342购自美国Gibco公司; 兔抗B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma /leukemia-2, Bcl-2)单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 兔抗HIF-1 α 、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)多克隆抗体购自美国ImmunoWay公司; 兔抗Akt、PI3K、p53、Caspase-3多克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司; 鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体购自上海康城生物有限公司; 辣根过氧化物酶或荧光基团标记的二抗购自北京康为世纪公司; 底物化学发光试剂购自美国Millipore公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

电泳和蛋白质转膜设备及凝胶成像系统、

Model 680酶标仪购自美国Bio-Rad公司; CO₂培养箱购自Thermo公司; 台式冷冻离心机购自美国Thermo Fisher公司; 超净台购自苏州净化设备总厂; CKX41倒置显微镜购自日本Olympus公司; 倒置荧光显微镜购自德国Carl Zeiss公司。

1.3 细胞培养及药物处理

将PC12细胞用含10%新生牛血清、 1×10^5 U/L青霉素、100 mg/L链霉素的高糖DMEM培养基培养, 置于含5% CO₂和95%空气的37 °C培养箱中培养, 每2 d换液1次, 待单层细胞生长至80%后传代培养。SeO₂用双蒸水配置成100 mmol/L储存液, 临用时用DMEM稀释至所需浓度。实验用细胞均处于指数生长期。将细胞按 5×10^7 /L密度接种于96孔板和24孔板中, 培养24 h后加入不同浓度的SeO₂, 使其终浓度分别为0、40、80、160 μmol/L, 其中0 μmol/L为对照组(Control), 继续培养24 h, 对照组加入相应体积的DMEM。

1.4 细胞存活率检测

采用MTT还原法检测细胞存活率。药物处理结束后, 培养板每孔中加入MTT(终浓度为0.5 g/L), 37 °C反应4 h, 倾去培养液, 每孔加入100 μL DMSO, 待完全溶解后, 于490 nm处测定各孔吸光度。按公式: 细胞增殖抑制率(%)=(1-处理组吸光度/对照组吸光度)×100%, 计算抑制率。采用LDH漏出率检测法检测细胞死亡率, 按照LDH试剂盒说明书进行操作, 并计算各组细胞内LDH的含量。

1.5 细胞内SOD、MDA含量检测

实验分组同上, 采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定细胞内SOD和MDA的含量, 检测按试剂盒说明书操作。

1.6 细胞形态学检测

用不同浓度SeO₂处理PC12细胞后, 于普通光学倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.7 细胞凋亡检测

取对数生长期的PC12细胞, 以每孔 2×10^4 细胞接种于24孔培养板中, 染毒处理后弃去培养液, 用PBS洗涤, 然后用冰甲醇固定细胞10 min。吸去固定液, 加入Hoechst 33342染色液(终浓度为10 mg/L), 于室温下反应5 min, 经PBS洗涤后, 用荧光酶标仪在激发光波长350 nm, 发射光波长460 nm检测24孔培养板中荧光强度, 用倒置荧光显微镜观察培养板中细胞的核变化并计算凋亡小体的数量。

1.8 Western blot检测HIF-1α、p-Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3、p53、PI3k蛋白质水平

PC12细胞经不同浓度的SeO₂处理后, 收集细胞, 提取总蛋白并测定蛋白浓度。以30 μg总蛋白上样进行电泳, 转膜封闭后加入抗HIF-1α(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、PI3k(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、P53 (1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)和GAPDH(1:7 000)抗体于4 °C反应过夜。洗涤后, 将膜和相应二抗(1:5 000)在室温下反应1 h, 以底物化学发光试剂显色后, 以凝胶成像系统(Tanon 5200, 南京麦高德生物科技公司)进行扫描, 以Image J软件分析各条带灰度值。以GAPDH条带灰度值作参照, 进行半定量分析。

1.9 统计学处理

数据均以means±S.D.表示, 应用SPSS 16.0统计软件进行分析, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两组间比较用Bonferroni检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SeO₂对PC12细胞存活率和LDH的影响

实验结果表明, PC12细胞经不同浓度的SeO₂ (40、80、160 μmol/L)处理24 h细胞存活率逐渐降低, 具有剂量依赖性, 40 μmol/L SeO₂即可引起细胞出现损伤(图1A)。经计算, SeO₂引起PC12细胞损伤的IC₅₀为(194.00±16.78) μmol/L。此外, LDH漏出率实验结果也表明, SeO₂可剂量依赖性引起PC12细胞损伤(图1B)。

2.2 SeO₂损伤PC12细胞后SOD和MDA的水平变化

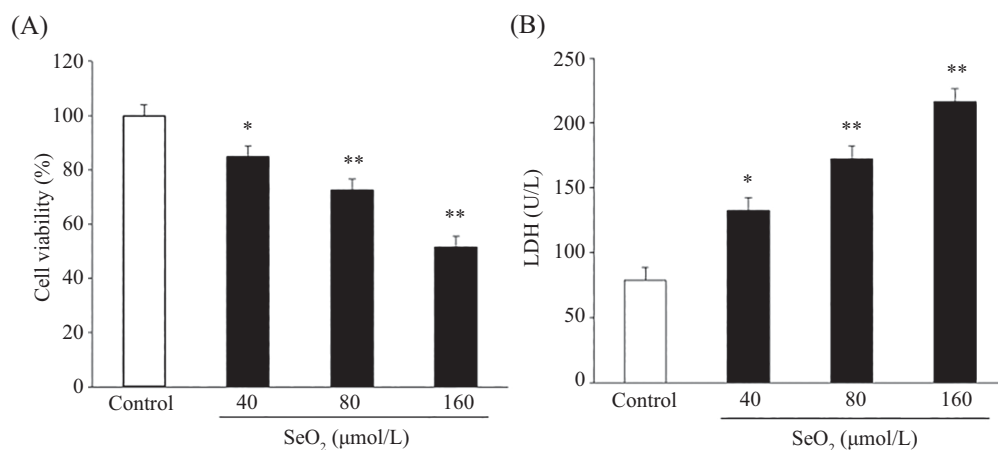
本实验采用比色法检测SeO₂诱导PC12细胞损伤后细胞内SOD、MDA含量的变化。结果如图2所示, PC12细胞经不同浓度SeO₂处理24 h后, 随着药物浓度的逐渐加大, 细胞内SOD含量明显下降, 而MDA的含量明显增加。这提示ROS水平增加。

2.3 SeO₂对PC12细胞形态的影响

如图3所示, 对照组PC12细胞形态完整且饱满, 并且轴突较长。经40 μmol/L SeO₂损伤24 h后, PC12细胞密度减少并开始出现死亡; 而160 μmol/L SeO₂则使细胞的胞体明显皱缩成圆形, 轴突变短变少, 导致大量细胞死亡。

2.4 SeO₂对PC12细胞凋亡的影响

荧光染料Hoechst 33342能少许透过正常细胞

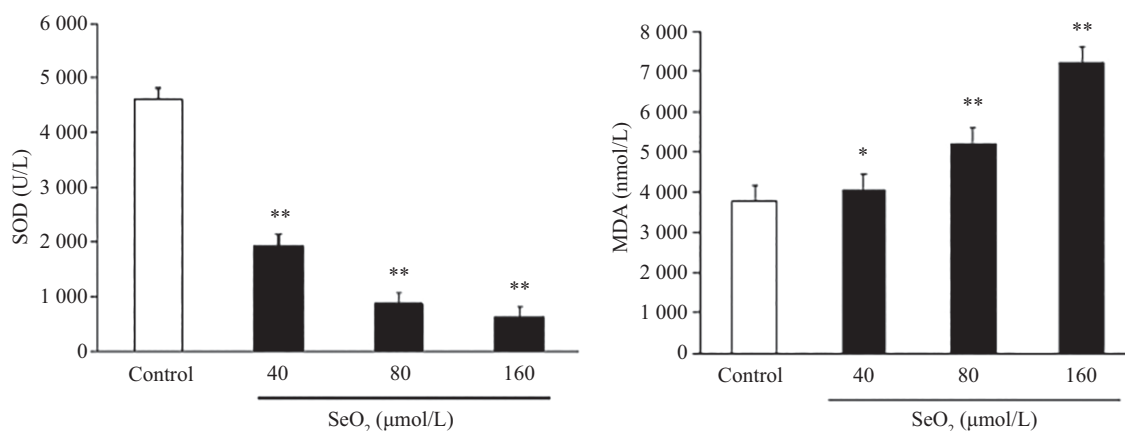


A: 不同浓度的SeO₂处理PC12细胞24 h后细胞的存活率; B: 不同浓度的SeO₂处理PC12细胞24 h后, 乳酸脱氢酶漏出率变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: the viability of PC12 cells after the treatment with SeO₂ for 24 h; B: the LDH of PC12 cells after the treatment with SeO₂ for 24 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图1 SeO₂对PC12细胞存活率和LDH含量的影响

Fig.1 Effect of SeO₂ on the viability and LDH content in PC12 cells



A: SeO₂处理PC12细胞24 h后, 细胞内SOD含量; B: SeO₂处理PC12细胞24 h后, MDA水平变化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: SOD levels of PC12 cells after the treatment with SeO₂ for 24 h; B: the MDA levels of PC12 cells after the treatment with SeO₂ for 24 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图2 SeO₂降低细胞SOD活力和升高MDA水平

Fig.2 SeO₂ decreases SOD activity and decreases MDA level in PC12 cells

的细胞膜, 产生的蓝色荧光也较弱; 而凋亡细胞由于膜通透性增强, 从而进入细胞膜内的染料比正常细胞多, 故荧光强度加强。如图4A所示, 经不同浓度的SeO₂处理细胞24 h后, 对照组细胞核呈现均匀弥散荧光, 80 μmol/L的SeO₂可导致细胞的细胞核浓缩碎裂, 出现凋亡小体, 蓝色荧光增强; 而160 μmol/L的SeO₂则可导致大量细胞出现凋亡, 蓝色荧光进一步增强, 荧光强度和Hoechst阳性细胞数目经统计学分析与对照组相比差异有统计学意义(图4)。

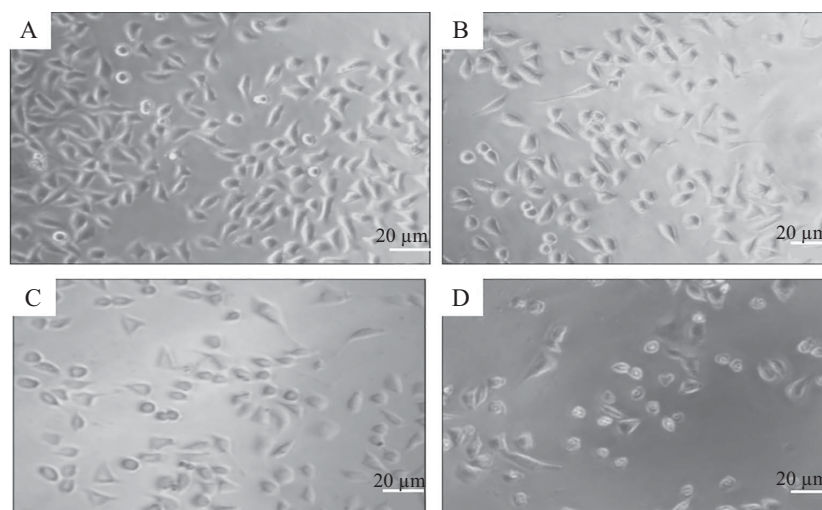
2.5 SeO₂对HIF-1 α 、PI3k、p-Akt、Bax、Bcl-2、p53、Caspase-3蛋白质水平影响

Bcl-2家族基因与细胞凋亡关系密切, 其中Bcl-2

和Bax是一对正负凋亡的调节基因, 通过表达的蛋白质发挥促进或抑制细胞凋亡的作用^[15], 细胞出现损伤的过程中, 可造成Bax/Bcl-2表达比例增高, 进而导致细胞凋亡。本实验通过Western blot的方法检测了HIF-1 α 、PI3k、p-Akt、Bax、Bcl-2、p53、Caspase-3的蛋白质水平变化。如图5所示, 细胞经不同浓度SeO₂处理24 h后, 与对照组相比, HIF-1 α 、p-Akt、p53和Caspase-3表达明显上调, Bax/Bcl-2表达比例明显升高, PI3k变化不明显。

3 讨论

目前已知的关于硒益处的研究有很多, 如硒

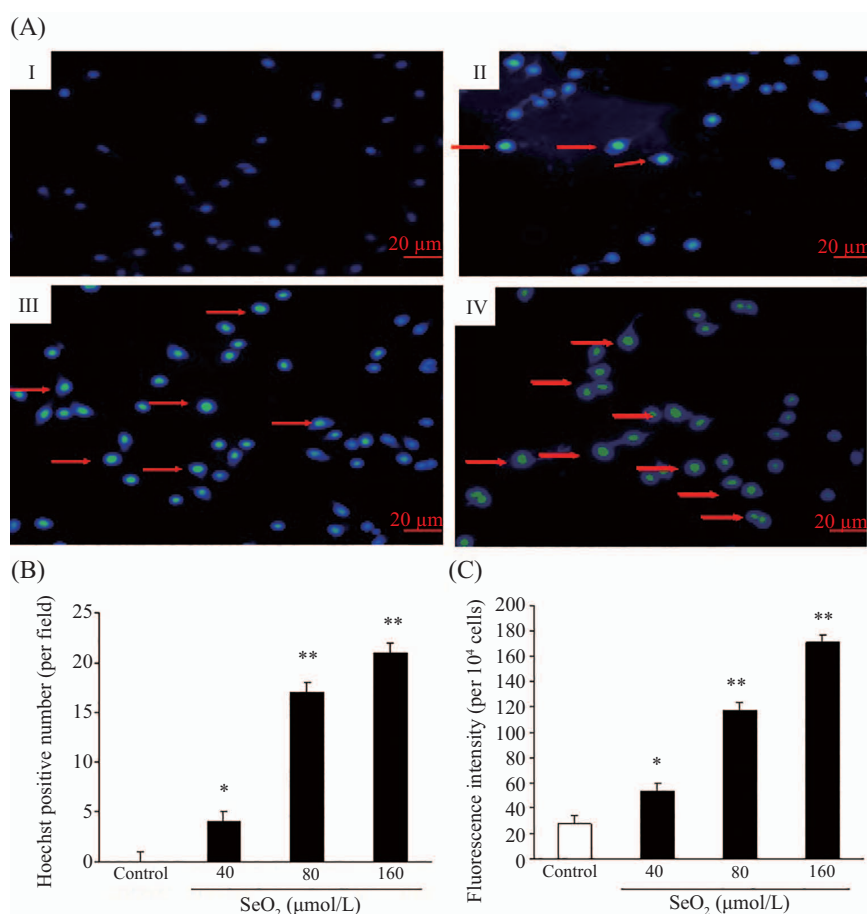


A: 对照组; B: 40 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 组; C: 80 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 组; D: 160 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 组。

A: control group; B: 40 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 group; C: 80 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 group; D: 160 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 group.

图3 SeO_2 诱导PC12细胞形态学的变化

Fig.3 Morphological changes in PC12 cells induced by SeO_2

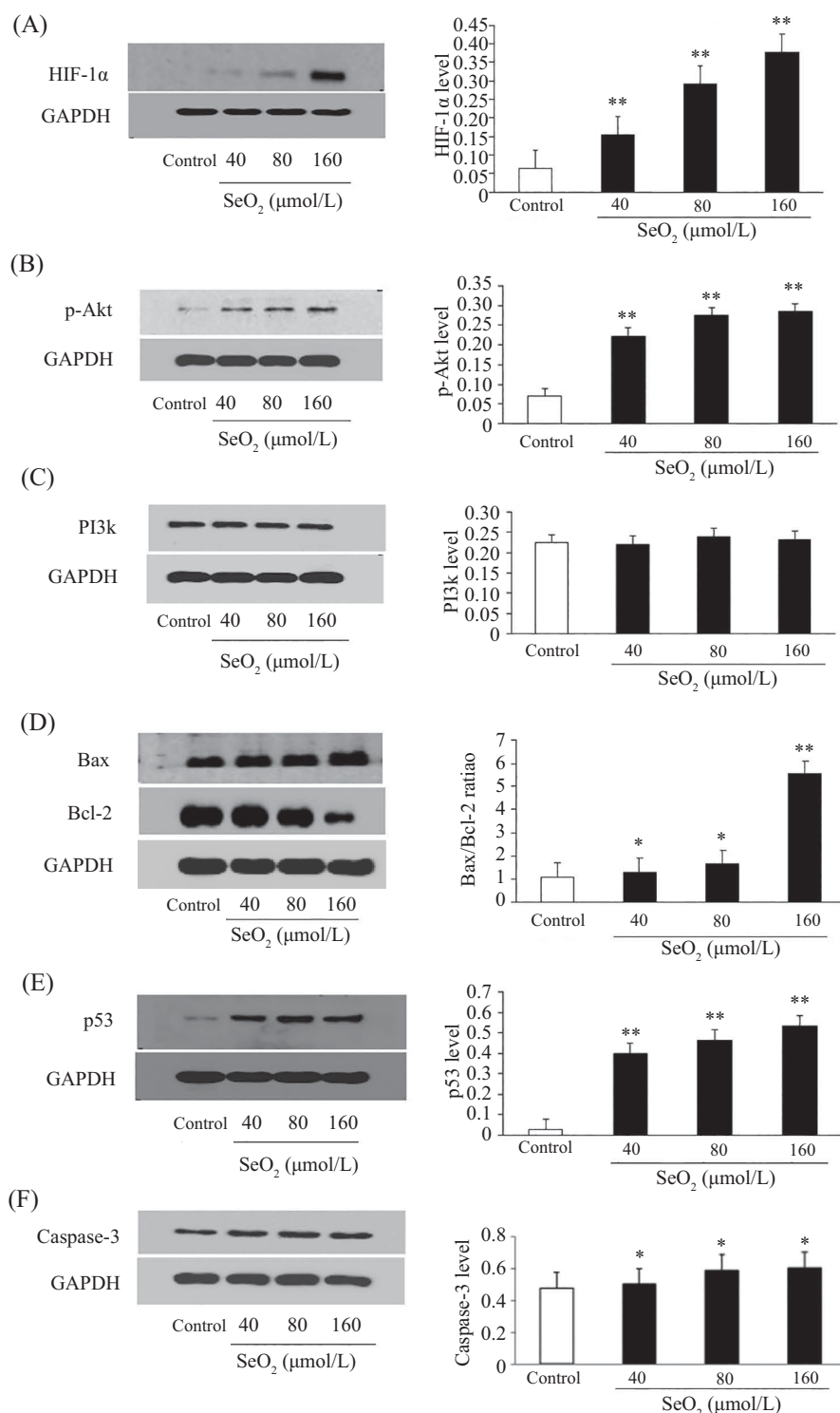


A: PC12细胞经 SeO_2 的处理24 h后, 细胞出现明显凋亡; I: 对照组; II: 40 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 组; III: 80 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 组; IV: 400 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 组, 箭头表示凋亡阳性细胞核。B: 统计分析Hoechst阳性细胞数量。C: 统计分析荧光强度。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

A: PC12 cells underwent cell apoptosis after treatment with SeO_2 for 24 h; I: control group; II: 40 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 group; III: 80 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 group; IV: 400 $\mu\text{mol/L}$ SeO_2 group; the arrows indicated apoptotic nucleus. B: statistical analysis of Hoechst positive cells number. C: statistical analysis of fluorescence intensity. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图4 SeO_2 诱导了PC12细胞凋亡

Fig.4 SeO_2 induces the cell apoptosis in PC12 cells



SeO₂处理PC12细胞24 h后, 免疫印迹法分析HIF-1 α (A)、p-Akt(B)、PI3k(C)、Bax/Bcl-2(D)、p53(E)、Caspase-3(F)的表达变化。* P <0.05, ** P <0.01, 与对照组比较。

After the challenge with SeO₂ in PC12 cells for 24 h, the expression levels of HIF-1 α (A), p-Akt (B), PI3k (C), Bax/Bcl-2 (D), p53 (E), Caspase-3 (F) were analyzed by immunoblotting. * P <0.05, ** P <0.01 compared with control group.

图5 SeO₂增加PC12细胞中p-Akt、HIF-1 α 、Bax/Bcl-2、p53、Caspase-3水平

Fig.5 SeO₂ increases levels of p-Akt, HIF-1 α , Bax/Bcl-2, p53 and Caspase-3 in PC12 cells

可以抗氧化作用、诱导癌细胞凋亡作用、机体免疫调节作用、抑制肿瘤血管生成、保护遗传物质

结构和功能等, 而硒的毒性尤其是神经毒性研究甚少, 其机理至今模糊不清^[16]。本研究结果显示,

SeO₂(40~160 μmol/L)可剂量依赖性地引起大鼠PC12细胞损伤,诱导细胞出现凋亡。此外,SeO₂诱导了PC12细胞p-Akt、HIF-1α、p53、Bax/Bcl-2、Caspase-3的水平上调。以上结果提示,SeO₂可通过激活p-Akt、HIF-1α、p53和Caspase-3进而启动细胞凋亡程序,导致PC12细胞发生凋亡。

本研究中,将PC12细胞暴露于不同浓度的SeO₂ 24 h,存活率明显降低,LDH漏出率增加,细胞轴突缩短减少,胞体变圆。此外,SeO₂还能引起细胞内SOD和MDA含量水平的变化。SOD是一种蛋白酶,可清除ROS,发挥抗氧化作用,保护细胞免受损伤。当机体抗氧化体系能力降低时,过量ROS攻击生物膜而引发脂质过氧化反应,导致过氧化产物如MDA大量产生。因而SOD活性降低和MDA含量增加均提示ROS水平的增加,可间接反映细胞氧化应激的程度,说明细胞损伤可能与细胞内ROS水平的增加有关。此结果与当前所认识的含硒化合物是一种极好的自由基清除剂相左,其中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含有硒元素,是一种极好的ROS清除剂,对于硒导致的ROS上升这一机制鲜见报道。主要原因可能与剂量有关,大剂量40~160 μmol/L作用24 h导致的ROS上升,并引起后续的HIF-1α上调促进细胞凋亡。

大量研究显示,缺氧以及非缺氧性刺激下,PI3k/Akt信号通路在HIF-1α表达和活性调控过程中可能起重要作用^[17]。p-Akt是PI3k激活Akt发生磷酸化的活化产物,Akt只有磷酸化后被活化成为p-Akt时才具有生物学功能,直接或间接影响多种转录因子表达和促凋亡蛋白活性,从而实现整个信号通路的生物活性^[18-19]。但在SeO₂诱导PC12细胞损伤中p-Akt和HIF-1α之间是直接相互调控还是通过其他相关蛋白间接调控尚不清楚,本研究显示HIF-1α的上调与p-Akt的上调具有正相关性,说明SeO₂影响了p-Akt的表达而进一步上调HIF-1α的表达。观察p-Akt上游通路PI3k是否受到影响,结果表明,p-Akt的上游基因PI3k未受到SeO₂的影响。

HIF-1α是机体缺氧适应性反应过程中的一种极其重要的核转录因子,HIF-1α及其介导的信号通路在神经细胞损伤过程中发挥了重要作用。一些化学物质,尤其是氯化钴能诱导HIF-1α表达明显上调并集中于核内,最终因HIF-1α过表达导致细胞损伤^[20]。2-甲氧雌甾二醇作为HIF-1α的抑制剂可发挥保护作用

用^[22],表明HIF-1α可能参与了神经细胞损伤。在本实验中,40~160 μmol/L SeO₂作用PC12细胞24 h后,发现细胞内ROS水平升高,进而导致HIF-1α表达明显增加,并且呈现出剂量依赖性,表明HIF-1α信号通路可能参与了PC12细胞损伤过程。

荧光染色实验结果证实,PC12细胞损伤后表现出体积缩小、细胞核皱缩等典型凋亡表现,表明SeO₂可诱导细胞出现凋亡性死亡。细胞凋亡是一种复杂的生化过程,有许多蛋白质参与了这一过程,包括Bax和Bcl-2。Bax是一种凋亡前体蛋白,可刺激细胞色素c释放和Caspase-3的激活,诱导细胞发生凋亡;而Bcl-2可抑制细胞色素c的释放,是一种抗凋亡蛋白^[22-23]。细胞Bax表达增加或Bcl-2表达减低均提示细胞进入凋亡状态,Bax/Bcl-2比值是一种重要的凋亡生化指标^[24]。

经典凋亡通路中,Caspase-3是Caspase家族中的最重要的凋亡执行者,是细胞凋亡过程中的主要效应因子。Caspase-3的活化是凋亡进入不可逆阶段。无论是死亡受体途径中,活化的Caspase-8或Caspase-10激活下游的Caspase-3最终导致细胞的凋亡;还是线粒体途径中,线粒体释放细胞色素c至细胞质中,激活因子Apaf1,Apaf1和Caspase-9酶原结合,使Caspase-9酶原活化,激活Caspase-3从而启动细胞凋亡,Caspase-3都是必由通路。因此,Caspase-3的上调表明SeO₂诱导的PC12细胞发生了不可逆转的凋亡。但SeO₂对PC12细胞的凋亡诱导是通过死亡受体通路还是通过线粒体凋亡通路或者兼有,还有待于进一步的研究。

已有研究表明,HIF-1α的上调也可引起Bax/Bcl-2比值上升,进而发生细胞凋亡^[25];抑制HIF-1α的表达则可减少Bax/Bcl-2比值^[26]。p53基因也可通过Bax/Bcl-2蛋白调控细胞凋亡;本实验中PC12细胞经SeO₂处理后HIF-1α表达上调,p53表达增加,Bax/Bcl-2表达比值增加,确认SeO₂可通过增加HIF-1α、p53表达,继而上调Bax/Bcl-2表达比例,促进Caspase-3的激活,诱导细胞凋亡。

综上所述,SeO₂诱导PC12细胞损伤,导致细胞凋亡,其与激活细胞Akt/HIF-1α信号通路,进而促进p53、Bax/Bcl-2、Caspase-3的表达及胞内ROS增加有关。鉴于不同硒化合物在细胞内的代谢途径具有相似性^[27],提示高剂量硒元素可能通过上调HIF-1α导致神经细胞凋亡。

参考文献 (References)

- 1 Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, *et al.* Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(7): 1337-83.
- 2 Harvey LJ, Ashton K, Hooper L, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 2025S-39S.
- 3 Klein EA. Selenium and vitamin E: interesting biology and dashed hope. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(5): 283-5.
- 4 Vinceti M, Mandrioli J, Borella P, Michalke B, Tsatsakis A, Finkelstein Y. Selenium neurotoxicity in humans: Bridging laboratory and epidemiologic studies. *Toxicol Lett* 2014; 230(2): 295-303.
- 5 Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(4): 762-73.
- 6 Cao S, Durrani FA, Rustum YM. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7): 2561-9.
- 7 Yang G, Zhou R. Further observation on the human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area of China. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1994; 8(3/4): 159-65.
- 8 Kuzhandaivel A, Margaryan G, Nistri A, Mladinic M. Extensive glial apoptosis develops early after hypoxic-dysmetabolic insult to the neonatal rat spinal cord *in vitro*. *Neuroscience* 2010; 169(1): 325-38.
- 9 李永金, 张 谊, 杨开勇, 席 可, 李少邱, 朱春雪, 等. HIF-1 α 、ROCK-2、FoxM1在醋酸铅诱导PC12细胞损伤中的表达变化. 中国药理学通报(Li Yongjin, Zhang Yi, Yang Kaiyong, Xi Ke, Li Shaoqiu, Zhu Chunxue, *et al.* Expression changes of HIF-1 α , ROCK-2, FoxM1 in the leadacetate-induced injury in PC12 cells. *Chinese Pharmacol Bull* 2015; 31(11): 1562-8.
- 10 Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, *et al.* Nora, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288(5468): 1053-8.
- 11 Mei JM, Niu CS. Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation. *Neurol Sci* 2014; 35(8): 1275-80.
- 12 Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, *et al.* Caspase-mediated cleavage converts from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: mplications for drug-resistant melanoma. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6340-9.
- 13 Saradha B, Vaithinathan S, Mathur PP. Lindane induces testicular apoptosis in adult Wistar rats through the involvement of Fas-FasL and mitochondria-dependent pathways. *Toxicology* 2009; 255(3): 131-9.
- 14 Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 2000; 10(21): 1359-66.
- 15 李永金, 杨开勇, 张 谊, 陈月芳, 端礼荣, 黄晓佳. 低氧诱导因子-1 α 在喹啉酸诱导的PC12细胞损伤中的作用. 中国药理学通报(Li Yongjin, Yang Kaiyong, Zhang Yi, Chen Yuefang, Duan Lirong, Huang Xiaojia. Role of HIF-1 α in quinolinic acid-induced injury in PC12 cells. *Chinese Pharmacol Bull* 2015; 31(4): 493-9.
- 16 Ivory K, Nicoletti C. Selenium is a source of aliment and ailment: Do we need more? *Trends Food Sci Tech* 2017; 62: 190-3.
- 17 Agani F, Jiang BH. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of P13K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; 13(3): 245-51.
- 18 Takano R, Hisahara S, Namikawa K, Kiyama H, Okano H, Miura M. Nerve growth factor protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor- α -induced injury through Akt-mediated signaling mechanisms. *J Biol Chem* 2000; 275(21): 16360-5.
- 19 李永金, 杨开勇, 阚美佳, 黄 贺, 张 谊, 陈月芳, 等. 低氧诱导因子-1 α 对SH-SY5Y细胞兴奋性毒性损伤的调节作用. 中国细胞生物学学报(Li Yongjin, Yang Kaiyong, Kan Meijia, Huang He, Zhang Yi, Chen Yuefang, *et al.* Regulatory role of HIF-1 α in the SH-SY5Y cells excitotoxic injury. *Chinese Journal of Cell Biology* 2015; 37(5): 655-62.
- 20 Lan AP, Xiao LC, Yang ZL, Yang CT, Wang XY, Chen PX, *et al.* Interaction between ROS and p38MAPK contributes to chemical hypoxia-induced injuries in PC12 cells. *Mol Med Rep* 2012; 5(1): 250-5.
- 21 Schaible EV, Windschügl J, Bobkiewicz W, Kaburov Y, Dangel L, Krämer T, *et al.* 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice. *J Neurochem* 2014; 129(6): 940-54.
- 22 Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, *et al.* Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000; 19(3): 329-36.
- 23 Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* 2011; 21(1): 92-101.
- 24 Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res* 2010; 1352: 255-64.
- 25 Naldini A, Morena E, Pucci A, Miglietta D, Riboldi E, Sozzani S, *et al.* Hypoxia affects dendritic cell survival: Role of the hypoxia-inducible factor-1 α and lipopolysaccharide. *J Cell Physiol* 2012; 227(2): 587-95.
- 26 Menrad H, Werno C, Schmid T, Copanaki E, Deller T, Dehne N, *et al.* Roles of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) versus HIF-2 α in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology* 2010; 51(6): 2183-92.
- 27 Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 775-806.