

铅暴露对神经元和脉络丛上皮细胞的损伤机制研究

刘杨, 宋晗, 官瑞丽, 刘新秦, 沈学锋, 陈景元, 郑刚

中国人民解放军第四军医大学劳动与环境卫生学教研室, 陕西 西安 710032

摘要: **目的** 研究铅暴露对神经元和脉络丛上皮细胞的损伤作用及分子机制。 **方法** 大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞和脉络丛上皮 Z310 细胞体外培养。采用噻唑蓝法 (MTT), 通过暴露于 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅 24 h 和 48 h 筛选适合剂量。两种细胞分别以醋酸铅 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理, 于 48 h 时间点用 TUNEL 法检测细胞凋亡水平, 于 24 h 和 48 h 时间点用 Western blot 法检测 bcl-2、bax 及 caspase-3 蛋白水平。 **结果** 醋酸铅浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时, PC12 和 Z310 细胞活力均受到显著抑制, 故选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 为铅暴露剂量。与正常对照组相比, 铅暴露后 PC12 细胞凋亡 (TUNEL 阳性) 细胞数显著增多 ($P<0.05$), Z310 细胞凋亡细胞数无显著变化 ($P>0.05$)。与正常对照组相比, 醋酸铅 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理 PC12 细胞 24 h 和 48 h 后, PC12 细胞 bax/bcl-2 比值显著上升, cleaved caspase-3 蛋白表达水平也显著增高 ($P<0.05$), 而 Z310 细胞 bax/bcl-2 比值及 cleaved caspase-3 蛋白水平均无显著改变 ($P>0.05$)。 **结论** 铅暴露诱导不同类型大脑细胞损伤的方式和途径存在差异, 通过线粒体途径诱导细胞凋亡参与了铅损伤 PC12 细胞的机制, 但可能并不是铅诱导 Z310 细胞损伤的主要方式。

关键词: 铅; PC12 细胞; 脉络丛上皮细胞; 细胞凋亡; caspase-3

中图分类号: R741.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)06-0641-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.06.001

Mechanisms of lead exposure-induced damages in neuron and choroidal epithelial cells

LIU Yang, SONG Han, GUAN Rui-li, LIU Xin-qin, SHEN Xue-feng, CHEN Jing-yuan, ZHENG Gang

Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health,

the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China

Corresponding author: ZHENG Gang, E-mail: zhenggang@fmmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effects of lead (Pb) exposure on neurons and choroid plexus epithelial cells and its molecular mechanisms. **Methods** Rat pheochromocytoma PC12 cells and choroidal epithelial Z310 cells were cultured *in vitro*. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was performed to determine the proper Pb exposure dose (the lowest dose affecting the cell viability) by treating the cells with 0~50 $\mu\text{mol/L}$ lead acetate for 24 and 48 hours. Cell apoptosis was determined by TUNEL assay following Pb exposure for 48 hours. Western blot was used to detect the protein levels of bcl-2, bax and caspase-3 at the 24th and 48th hours. **Results** The viability of both PC12 and Z310 cell lines was significantly decreased when they were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Pb and higher doses, so 10 $\mu\text{mol/L}$ was chosen as the working concentration of Pb exposure. Compared with the normal controls, the number of TUNEL positive cells was significantly increased in PC12 cells following Pb exposure ($P<0.05$), while no obvious cell apoptosis was observed in Pb-treated Z310 cells ($P>0.05$). Western blot showed that 10 $\mu\text{mol/L}$ Pb exposure resulted in increased ratio of bax/bcl-2 and elevated expression of cleaved caspase-3 protein in PC12 cells at both the 24th and 48th hours ($P<0.05$); however, the bax/bcl-2 ratio and cleaved caspase-3 protein level were not significantly changed following the Pb exposure ($P>0.05$). **Conclusions** Lead-induced damage in various brain cells may involve different pathways and mechanisms. It induces apoptosis in PC12 cells through mitochondrial pathway, but can not activate apoptosis signal in Z310 cells.

Key words: lead; PC12 cell; choroidal epithelial cell; apoptosis; caspase-3

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 课题 (2012CB525002); 国家自然科学基金重点项目 (81230063)

作者简介: 刘杨 (1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事环境毒理学基础研究。

通信作者: 郑刚, E-mail: zhenggang@fmmu.edu.cn。

铅 (lead, Pb) 是一种常见的环境污染物, 可在人体内蓄积并对各系统产生广泛的毒性。中枢神经系统是铅毒性的敏感靶器官, 即使较低剂量的铅暴露也可引起儿童脑功能的损害, 如认知功能障碍、注意力缺陷、

心理和行为异常等^[1-2];而且与阿尔茨海默症、帕金森病等神经退行性疾病的发生也密切相关^[3-4]。铅的神经毒性机制复杂,国内、外已有的研究发现:铅可以影响神经递质释放及其受体功能、诱导神经兴奋性毒性、促进细胞氧化应激损伤和凋亡等^[5-6]。虽然铅对神经细胞凋亡的诱导作用在体内和体外暴露实验中均已被证实,但其中多数研究提示铅诱导的大脑神经细胞凋亡主要发生于神经元,而其他类型神经细胞凋亡并不多见。大脑结构复杂,细胞类型多样,研究铅对不同类型神经细胞的损伤特点及其分子调控过程,对于系统阐明铅神经毒性的机制,寻找可能的干预措施具有重要意义。本研究分别以大鼠嗜铬瘤细胞系 PC12 和永生化的大鼠脉络丛上皮细胞系 Z310 为研究对象,分别建立铅暴露体外细胞模型,观察铅对两种细胞凋亡的诱导作用,并检测凋亡相关蛋白 bcl-2、bax 和 caspase-3 表达水平的变化,探讨铅暴露对不同类型大脑细胞所产生毒性效应及其分子机制的差异。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及仪器 DMEM 培养基、Trypsin-EDTA 和青-链霉素购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;醋酸铅、MTT 购自美国 Sigma 公司;组织细胞裂解液、Sample Buffer 购自碧云天公司;BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂购自美国 Pierce 公司;兔抗 caspase-3、bcl-2、bax、羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Abcam 公司; β -actin 抗体购自美国 Sigma 公司;Hoechst 33342 染色试剂购自碧云天生物公司。Forma Series II 型 CO₂ 细胞培养箱,美国 Thermo 公司;Infinite F200 型酶联免疫检测仪,瑞士 Tecan 公司;Mini Protean 蛋白电泳系统,美国 Bio-Rad 公司。FluorChem FC2 凝胶成像仪,美国 Alpha Innotech 公司;BX51 荧光显微镜,日本 Olympus 公司。

1.2 细胞及分组 永生化的大鼠脉络丛上皮细胞系 Z310 由美国普度大学郑伟教授构建^[7]并赠送;大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞系 PC12 购自中国科学院上海细胞资源中心。Z310 和 PC12 细胞均以 DMEM 培养基培养,内含 10%胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的,培养基置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的恒温孵箱中常规培养,每 2 d 全量更换一次培养液,细胞生长至 80%~90%进行传代。实验时将细胞分为正常对照组和铅暴露组,正常对照组以 DMEM 培养基培养,铅暴露组用含不同浓度醋酸铅的 DMEM 培养基处理 24 或 48 h。

1.3 MTT 法检测细胞活力 采用 MTT 法通过测定

铅对细胞活力的影响,筛选合适的铅暴露浓度。取对数生长期的细胞制成单细胞悬液,按照 5×10^3 /孔的浓度接种于 96 孔培养板(每孔 100 μ l)。待细胞贴壁生长融合至 50%时分为 6 组,每组设 3 个复孔,醋酸铅作用浓度分别为 0、2.5、5、10、25 和 50 μ mol/L,以不含醋酸铅的 DMEM 培养基作为空白对照。细胞培养 24 或 48 h 后,每孔加入 20 μ l MTT 溶液,37℃下继续孵育 4 h 后,弃去上清;在各孔中加入 150 μ l 二甲基甲砒(DMSO),迅速震荡 10 min,使结合物充分溶解,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其吸光度值(OD),以 OD 值反映细胞活力。细胞活力 = $\frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白调零组}}}{OD_{\text{空白调零组}}}$ 。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 将 Z310 和 PC12 细胞分别接种于预置玻片的六孔板,对照组以正常 DMEM 培养基培养,铅暴露组用含 10 μ mol/L 醋酸铅的 DMEM 培养基处理 48 h。吸去培养液,采用 TUNEL 法检测铅暴露后细胞的凋亡情况。细胞用 4%多聚甲醛室温固定 30 min;PBS 洗片 3 次,用 0.01%牛血清白蛋白封闭液室温封闭 1 h;弃去封闭液,加入 TUNEL 反应液(A:B=1:9)后室温避光孵育 2 h;PBS 洗片 3 次,加入 Hoechst 室温避光孵育 15 min;PBS 洗片 3 次,用 50%甘油封片,置于荧光显微镜下观察凋亡细胞并计数。

1.5 蛋白印迹法(Western blot)检测细胞凋亡相关蛋白表达水平 将 Z310 和 PC12 细胞分别接种于培养皿,对照组以正常 DMEM 培养基培养,铅暴露组用含 10 μ mol/L 醋酸铅的 DMEM 培养基分别处理 24 和 48 h。收集细胞至离心管中,各加入 100 μ l 细胞裂解液,冰上超声裂解 30 s,静置 10 min,4℃、12 000 g 离心 10 min;BCA 法蛋白定量后,加入 6 \times SDS Sample Buffer,煮沸 5 min;SDS-PAGE 蛋白电泳并转移至 PVDF 膜;5%牛奶-TBST 封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜(兔抗 caspase-3,1:500、兔抗 bcl-2,1:500、兔抗 bax,1:500、鼠抗 β -actin,1:2 000);洗膜,加相应二抗,室温孵育 2 h;ECL 法显影,用凝胶成像仪观察和拍照,以目标蛋白与内标蛋白(β -actin)积分吸光度(IA)的比值表示蛋白的相对表达量。

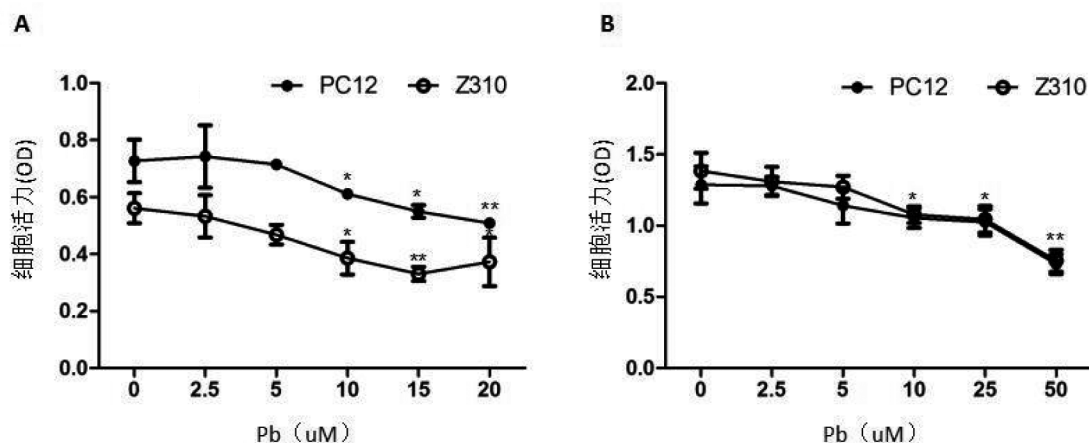
1.6 统计学分析 数据采用 SPSS16.0 统计学软件进行分析处理,数据用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 铅对 Z310 和 PC12 细胞存活率的影响 见图 1。

MTT 法结果显示,醋酸铅 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 暴露 24 h 或 48 h 后,两种细胞的存活率均随铅浓度的增加而显著下降($P<0.01$),表明 10 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度的铅暴露对两种细胞的存活均可产生显著的抑制作用;2.5 和 5

$\mu\text{mol/L}$ 铅暴露对细胞的存活无显著影响。因此在本研究中,采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为铅暴露诱导细胞凋亡的浓度。

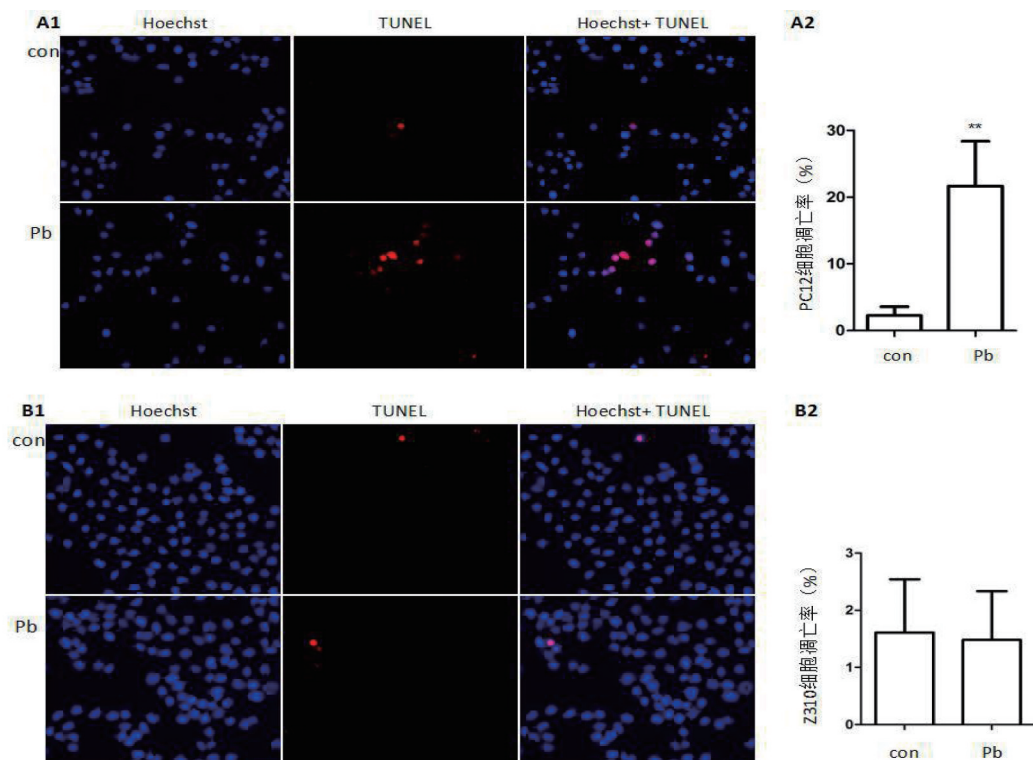


注:与正常对照相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图1 铅暴露对 PC12(A) 和 Z310(B) 细胞活力的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.2 铅对 Z310 和 PC12 细胞凋亡水平的影响 见图 2。TUNEL 染色结果显示,红色荧光标记 TUNEL 阳性(凋亡)细胞胞核。Z310 细胞对照组和铅暴露组均仅

有极少数凋亡细胞,且两组凋亡细胞数差异无统计学意义($P>0.05$);PC12 细胞对照组同样仅见个别凋亡细胞,而铅暴露组凋亡细胞数量显著增多($P<0.05$)。

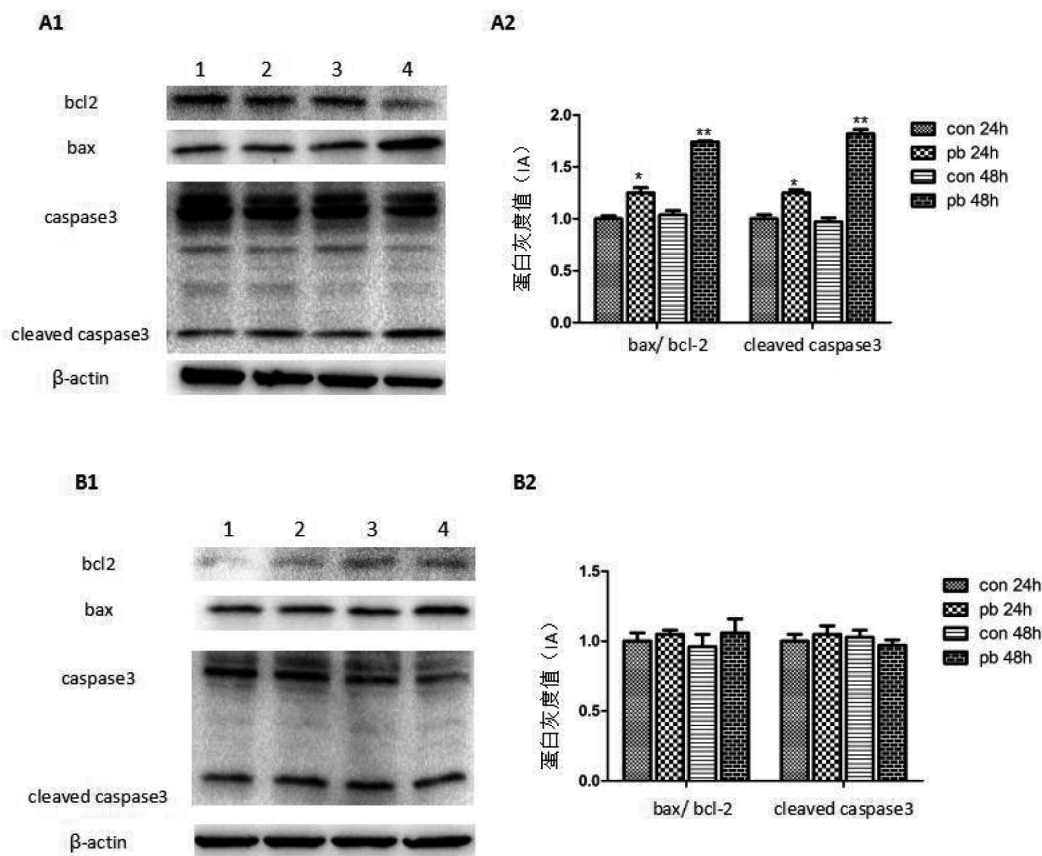


注:A2 和 B2 为 A1 和 B1 量化结果。与正常对照相比, ** $P<0.01$ 。

图2 铅暴露对 PC12(A) 和 Z310(B) 细胞凋亡率的影响

2.3 铅对 Z310 和 PC12 细胞凋亡相关蛋白水平的影响 见图 3。Western blot 结果显示:PC12 细胞铅暴露后,各时间点 bax/bcl-2 蛋白水平比值显著升高,且

cleaved caspase-3 蛋白水平也显著升高($P<0.05$);而 Z310 细胞铅暴露后,bax/bcl-2 及 cleaved caspase-3 蛋白水平无显著变化($P>0.05$)。



注:图 B1 中标记 1:24h 正常对照组;标记 2:24h 铅暴露组;标记 3:48h 正常对照组;标记 4:48h 铅暴露组。A2 和 B2 是 A1 和 B1 的量化结果。 $\bar{x} \pm s, n=3$ 。与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 铅暴露对 PC12 和 Z310 细胞 bcl-2、bax 及 caspase-3 蛋白水平的影响

3 讨论

铅暴露可导致大脑功能不可逆性的损伤,但其机制目前尚未完全阐明。以往研究发现铅暴露可以诱导实验动物大脑海马、皮质等部位的神经元发生凋亡^[8-9];而在体外培养的神经元铅暴露模型中也发现了细胞凋亡率增高的现象^[10-11]。诱导神经元凋亡可能是铅损伤脑功能的重要病理学基础之一,其机制涉及促进细胞氧化应激反应、破坏细胞线粒体功能、影响凋亡相关基因表达水平、扰乱细胞信号转导通路等^[9, 11-12]。但是,以往关于铅诱导大脑神经细胞凋亡的研究大多数集中于神经元,而铅暴露对其他类型大脑细胞凋亡的影响则缺乏深入探讨。

PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株,常被作为体外培养的神经元模型,用于环境毒物诱导的神经毒性机制研究。本研究结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 铅暴露后,PC12 细胞活力受到显著抑制,TUNEL 染色阳性细胞数显著增加,表明 PC12 细胞发生凋亡,提示诱导细胞凋亡是铅对神经元的主要损伤方式之一,与以往报道相一致。细胞的凋亡过程受到众多基因的调

控,其中 bcl-2 家族具有重要作用^[13]。在接受上游的细胞凋亡信号后,bax 表达增高并结合于线粒体膜,进而导致线粒体膜电位改变、细胞色素 c 释放和 caspase 的级联激活。本研究中蛋白印迹实验结果显示铅暴露后 PC12 细胞 bax 蛋白水平增高,而 bcl-2 水平下降,bcl-2/bax 的比值显著上升;另外,cleaved caspase-3 蛋白表达水平也显著增高,表明铅暴露可能通过影响 PC12 细胞 bcl-2 和 bax 的蛋白水平,进而诱导 caspase-3 的激活,从而通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

脉络丛位于大脑脑室内,分隔血液和脑脊液。脉络丛上皮细胞及细胞间的紧密连接构成血-脑脊液屏障(blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB),是大脑屏障的重要组成部分,对于限制血液中有毒物质进入脑内,维持脑内环境的稳定具有重要作用^[14]。之前的研究发现,脉络丛是铅神经毒性作用的重要靶点之一,铅进入体内后可大量蓄积于脉络丛^[15]。另外,铅暴露还可以导致脉络丛上皮细胞对微量元素转运功能的紊乱及细胞间紧密连接的破坏^[16-17]。本研究采用大鼠脉络丛上皮细胞系 Z310 建立体外铅暴露模型,观察铅

暴露是否通过诱导凋亡的方式引起络丛上皮细胞损伤。MTT 结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 铅暴露可以显著抑制 Z310 细胞的活力。但与 PC12 细胞实验结果不同,10 $\mu\text{mol/L}$ 铅暴露 48 h 后,Z310 细胞 TUNEL 染色阳性细胞数与对照组相比差异无统计学意义;而蛋白印迹实验结果表明铅暴露后 Z310 细胞 bcl-2/bax 比值、cleaved caspase-3 蛋白表达水平均未出现增高的趋势,提示铅暴露后 Z310 细胞并未能诱导细胞凋亡现象。以往研究发现急性高剂量铅暴露可以引起实验动物络丛细胞损伤,在形态学上呈现出细胞坏死性改变^[18]。所以,铅对络丛上皮细胞的毒性作用可能主要通过细胞凋亡以外的方式,在较低剂量时可以影响其屏障结构和转运功能,而高剂量暴露时可能诱导细胞发生坏死。

大脑结构复杂,不同类型细胞的结构和功能也各具特点,使得各类脑细胞在暴露于环境毒物时可表现出不同的应答过程。如络丛上皮细胞直接与血液接触,铅暴露浓度高于大脑实质细胞和脑脊液;且由于富含可作为配位体与铅结合的巯基,对铅具有一定的蓄积和屏障效果,而这种作用也使得脑内铅水平远低于血液和络丛,从而起到保护作用^[19]。另外,较低剂量铅暴露时主要影响络丛上皮细胞的功能,在高浓度暴露时可发生坏死性改变,提示络丛上皮细胞对铅毒性可能具有较强的耐受性。星形胶质细胞作为神经元的支持和保护细胞,对于重金属离子同样具有蓄积作用,研究表明铅暴露后大脑星形胶质细胞内铅浓度远高于神经元^[20],这种蓄积效应同样与星形胶质细胞富含巯基相关,也提示其对铅毒性具有较高的耐受性。由于大脑屏障和星形胶质细胞的保护作用,机体在铅暴露时,神经元铅暴露的浓度相对较低。然而,铅暴露达到一定水平时,大脑神经元可发生凋亡,提示神经元对于铅毒性的敏感性较高。总之,本研究结果表明神经元和络丛上皮细胞在铅暴露时损伤方式存在较大差异。铅可通过线粒体途径诱导神经元发生凋亡,从而导致脑功能的损伤;而在同样的暴露条件下,铅对络丛上皮细胞的毒性作用可能并不是通过诱导细胞凋亡的方式产生的,其损伤的分子机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Braun JM, Hoffman E, Schwartz J, et al. Assessing windows of susceptibility to lead-induced cognitive deficits in Mexican children[J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33(5):1040-1047.
- [2] Baranowska-Bosiacka I. Perinatal exposure to lead induces morphologi-

- cal, ultrastructural and molecular alterations in the hippocampus[J]. *Toxicology*, 2013,303:187-200.
- [3] Gu H, Wei X, Monnot AD, et al. Lead exposure increases levels of beta-amyloid in the brain and CSF and inhibits LRP1 expression in APP transgenic mice[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 490(1):16-20.
- [4] Alimonti A, Bocca B, Pino A, et al. Elemental profile of cerebrospinal fluid in patients with Parkinson's disease[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2007, 21(4):234-241.
- [5] 张洁琼,于海波,宋晗,等. 铅暴露对神经胶质瘤细胞铜代谢的影响及其机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 4(28-2):182-187.
- [6] Marchetti C. Molecular targets of lead in brain neurotoxicity[J]. *Neurotox Res*, 2003, 5(3):221-236.
- [7] Zheng W, Zhao Q. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus[J]. *Brain Res*, 2002, 958(2):371-380.
- [8] Kumawat KL, Kaushik DK, Goswami P, et al. Acute exposure to lead acetate activates microglia and induces subsequent bystander neuronal death via caspase-3 activation[J]. *Neurotoxicology*, 2014, 41:143-153.
- [9] Wang Q, Luo W, Zhang W, et al. Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex[J]. *Neurotoxicology*, 2007,28(4):850-859.
- [10] Ye F, Li X, Li L, et al. The role of Nrf2 in protection against Pb-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 86:191-201.
- [11] 荣静,常薇,吕玲,等. 核因子- κB 、p53 及 Bcl-2 在铅诱导 PC12 细胞凋亡中的作用[J]. *卫生研究*, 2008, 37(3):262-268.
- [12] Hossain S, Bhowmick S, Jahan S, et al. Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in the offspring rats[J]. *Neurotoxicology*, 2016, 56:150-158.
- [13] Babu PP, Suzuki G, Ono Y, et al. Attenuation of ischemia and/or reperfusion injury during myocardial infarction using mild hypothermia in rats;an immunohistochemical study of Bcl-2, Bax, Bak and TUNEL[J]. *Pathol Int*, 2004, 54(12):896-903.
- [14] Zheng W, Monnot AD. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133:177-188.
- [15] Song H, Zheng G, Liu Y, et al. Cellular uptake of lead in the blood-cerebrospinal fluid barrier: Novel roles of Connexin 43 hemichannel and its down-regulations via Erk phosphorylation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 297(1):1-11.
- [16] Zheng G, Zhang J, Xu Y, et al. Involvement of CTR1 and ATP7A in lead(Pb)-induced copper(Cu) accumulation in choroidal epithelial cells[J]. *Toxicol Lett*, 2014,225(1):110-118.
- [17] Shi LZ, Zheng W. Early lead exposure increases the leakage of the blood-cerebrospinal fluid barrier *in vitro*[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2007, 26(3):159-167.
- [18] 徐兆发,李雪飞,李北利,等. 络丛对铅的屏障作用及其病理形态学观察[J]. *卫生毒理学杂志*, 2002,16(1):84-87.
- [19] 李雪飞,徐兆发,李北利,等. 络丛对铅屏障作用的实验研究[J]. *中国公共卫生*, 2001,17(5):418.
- [20] Tiffany-Castiglioni E. Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells[J]. *Neurotoxicology*, 1993,14(4):513-536.

收稿日期:2016-12-23