

亚硝基化在锰致蛋白二巯基异构酶活性改变中的作用

王璨, 关露超, 邓宇, 宋奇繁, 刘巍, 徐兆发, 徐斌*

中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110131

摘要: **目的** 观察亚硝基化在锰致蛋白二巯基异构酶活性改变中的作用。**方法** 以胎大鼠脑片为模型, 实验分 4 组分别为对照组, 正常 DMEM 培养液; 锰处理组, 含 400 μM 锰的 DMEM 培养液; 低剂量 L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Can) 预处理组, 用 0.5mM L-刀豆氨酸硫酸盐预处理脑片 12h 后, 再用含 400 μM 锰的 DMEM 培养液; 高剂量 L-刀豆氨酸硫酸盐预处理组, 用 2 mM L-刀豆氨酸硫酸盐预处理脑片 12h 后, 再用含 400 μM 锰的 DMEM 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24h。检测下列指标: 蛋白二巯基异构酶 (PDI) 蛋白活性, PDI 的基因和蛋白表达, 以及 PDI 亚硝基化情况, NO 生成量、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活性。**结果** 锰可活化 iNOS, 使细胞内 PDI 亚硝基化水平升高, 降低 PDI 正常活性。L-刀豆氨酸硫酸盐可抑制神经细胞损伤后 iNOS 的活性、降低 NO 的生成量, 降低 PDI 蛋白亚硝基化水平。**结论** 锰诱导 iNOS 活化, 造成神经细胞内 PDI 蛋白亚硝基化, 影响其正常功能; L-Can 可以减轻锰所致的 PDI 蛋白亚硝基化水平, 对锰致神经细胞损伤起到保护作用。

关键词 锰; 蛋白二巯基异构酶; 亚硝基化; 脑片培养

中图分类号: R994.6 文献标识码: A

Effect of nitrosylation on manganese-induced protein-disulphide isomerase activity disorder

WANG Can, GUAN Lu-chao, DENG Yu, SONG Qi-fan, LIU Wei, XU Zhao-fa, XU Bin.

Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China.

Abstract: Objective To observe the role of nitrosylation in manganese-induced protein-disulphide isomerase activity change. **Methods** Wistar rat brain slices as a model, experiments were divided into four groups: control group, normal DMEM medium; manganese treatment group, DMEM medium containing 400 μM manganese; brain slices were treated with 400 μM Mn 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24h after pretreated with low-dose (0.5 mM) L-canavanine sulfate for 12h; brain slices were treated with 400 μM Mn 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24h after pretreated with high-dose (2 mM) L-canavanine sulfate for 12h. Detection of the following indicators: PDI protein activity, the gene and protein expression of PDI and PDI-nitrosylated, NO generation level, inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity. **Results** Manganese could induced nerve cell damage and activated iNOS. So, there was an increase in intracellular PDI-nitrosylated levels and decrease in PDI activity. L-Canavanine could inhibited iNOS activity and reduced the level of NO generation and PDI nitrosylated after nerve cell damage. **Conclusions** The findings reveal that Mn induce nitrosative stress via activation of iNOS and subsequent S-nitrosylation of PDI in cultured slices. **Key Words:** Manganese; Protein-disulphide isomerase; Nitrosylation; Brain slice cultures

Corresponding author: Xu-bin, E-mail: xubin@mail.cmu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助 (编号: 81102098)

作者简介: 王璨 (1990—), 女, 汉族, 辽宁葫芦岛人, 硕士研究生, 主要从事环境神经毒理学研究。

通讯作者: 徐斌, 副教授, 硕士生导师。E-mail: xubin@mail.cmu.edu.cn

Additionally, there is a significant recovery in PDI activity in L-Canavanine-pretreated slices.

锰 (Manganese, Mn) 作为机体必需的微量元素之一, 在体内可以参与构成许多酶的活力基团或辅助因子, 同时又是某些酶的激活剂, 参与许多生物化学反应, 但是过量的锰进入体内则会引起锰中毒^[1]。蛋白二巯基异构酶 (Protein-disulphide isomerase, PDI) 是一种折叠酶, 在内质网腔中的含量最高, 可以达到 mM 的水平, 其催化作用与蛋白质折叠直接有关, 形成功能构象所必需的共价键变化^[2]。PDI 作为巯基-二硫键交换反应的催化剂, 能够催化多肽链折叠成有利于形成天然二硫键所需的构象, 促进蛋白二硫键的生成和错配二硫键的重排; 同时它具有分子伴侣活性, 能抑制错误折叠蛋白的聚集。但是 PDI 能被过量的一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 亚硝基化, 导致其蛋白质构象改变和功能障碍^[3]。本研究用诱导型一氧化氮合成酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS) 抑制剂 L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Canavanine, L-Can) 预处理脑片后染锰, 观察不同剂量 L-Can 抑制锰诱导 PDI 蛋白的亚硝基化作用, 探讨亚硝基化在锰致神经细胞内 PDI 活性改变中的作用, 为锰致神经毒性机制的研究提供实验依据。

1.材料与方法

1.1 主要试剂与仪器:

氯化锰 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 纯度>98%), L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Canavanine), 美国 sigma 公司; Millicell-CM 微孔膜插件 (PICM03050), 法国 Millipore 公司; DMEM, 马血清, Gibico 公司; iNOS 活性和 NO 检测试剂盒, 南京建成生物技术有限公司; qRT-PCR 试剂盒, 大连宝生物技术有限公司; 小鼠来源 PDI 一抗, Abcam 公司; 小鼠来源 β -actin 一抗, Santa Cruz Biotechnology 公司, 其他试剂均为国产分析纯。超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 倒置显微镜 (日本尼康); 振动切片机 (德国 Leica 公司); 酶标仪 680, 垂直电泳系统, 半干转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 脑片培养及锰处理

用出生 4-7 d 的 Wistar 胎大鼠 (实验动物生产许可证号为: SCXK (2008 -0005)), 断头取脑后, 切取 300 μ m 厚度脑片体外培养^[4], 待第 15 天细胞生长状态最佳时, 将脑片分 4 组分别为对照组, 正常 DMEM 培养液; 锰处理组, 含 400 μ M 锰的 DMEM 培养液; 低剂量 L-刀豆氨酸硫酸盐预处理组, 用 0.5mM L-刀豆氨酸硫酸盐预处理脑片 12h 后, 再用含 400 μ M 锰的 DMEM 培养液 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h; 高剂量 L-刀豆氨酸硫酸盐预处理组, 用 2 mM L-刀豆氨酸硫酸盐预处理脑片 12h 后, 再用含 400 μ M 锰的 DMEM 培养液 37 $^{\circ}$ C 孵育 24h。

1.3 方法

按照 Bernardoni 等人的方法^[5], 测定 PDI 活性及其亚硝基化。脑片神经细胞中 PDI mRNA 表达用 qRT-PCR 方法测定^[6], 引物序列见表 1; 脑片神经细胞中 PDI 蛋白表达用 Western blotting 方法测定^[4], 培养液中总 NO 含量和脑片细胞中 iNOS 活性的检测按南京建成生物工程研究所提供 NO 和 NOS 检测试剂盒说明书进行操作, 组织蛋白测定用 Lowry 法^[7]。

表 1 目的基因 cDNA 引物

cDNA	引物
PDI	(F) 5'- CCAAGTACCAGCTGGACAAA -3'
	(R) 5'- TTGGTGATCTCACCCCTCAAA -3'
β -actin	(F) 5'- GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA -3'
	(R) 5'- GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG -3'

1.4 统计分析

实验所得数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK (Students-Newman-Keuls) 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.结果

2.1 脑片神经细胞中 PDI 活性

锰及L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Can) 预处理对神经细胞中PDI活性的影响见表2。从表2可见, 400 μM 锰处理组脑片神经细胞PDI活性与对照组比较, 显著降低 ($p < 0.01$), 降低了45.45%。与400 μM 锰处理组比较, 2mM L-Can预处理组神经细胞PDI活性显著升高 ($P < 0.01$), 升高了0.33倍。

2.2 脑片神经细胞中 PDI mRNA 表达

锰及L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Can) 预处理对脑片神经细胞PDI mRNA表达的影响见表2。从表2可见, 400 μM 锰处理组脑片神经细胞PDI mRNA表达与对照组比较, 显著升高升高了1.95倍 ($P < 0.01$), 升高了0.96倍。与400 μM 锰处理组比较, 不同浓度L-Can预处理组神经细胞PDI mRNA表达无明显改变($P > 0.05$)。

2.3 脑片神经细胞中 PDI 蛋白表达及其亚硝基化

锰及L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Can) 预处理对脑片神经细胞中亚硝基化PDI (SNO-PDI) 和总PDI蛋白表达的影响见表2和图1。从表2可见, 400 μM 锰处理组脑片神经细胞总PDI蛋白表达和亚硝基化PDI均明显升高 ($P < 0.01$), 分别是对照组的3.55倍和1.58倍。与400 μM 锰处理组比较, 不同浓度L-Can预处理组神经细胞亚硝基化PDI蛋白逐渐下降, 2mM L-Can预处理组神经细胞亚硝基化PDI蛋白显著降低, ($P < 0.05$) 下降了23.33%; 而总PDI蛋白表达无明显改变。

表 2 各实验组脑片神经细胞 PDI 活性, PDI mRNA 和蛋白表达以及亚硝基化情况 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

[在此处键入]

组别	PDI 活性 (Δ OD)	mRNA 表达 (PDI/ β -actin)	蛋白表达 (PDI/ β -actin)	PDI 亚硝基化(SNO- PDI/total PDI)
对照组(0 μ M Mn)	0.11 \pm 0.02	0.50 \pm 0.08	0.22 \pm 0.03	0.38 \pm 0.06
400 μ M Mn	0.06 \pm 0.01**	0.98 \pm 0.13**	0.78 \pm 0.12**	0.60 \pm 0.08**
0.5mM L-Can+400 μ M Mn	0.06 \pm 0.01**	0.97 \pm 0.14**	0.73 \pm 0.09**	0.51 \pm 0.07*
2mM L-Can+400 μ M Mn	0.08 \pm 0.01##	0.99 \pm 0.12**	0.76 \pm 0.13**	0.46 \pm 0.09#

注：与对照组比较 ** P <0.01；与锰处理组比较 # P <0.05，## P <0.01

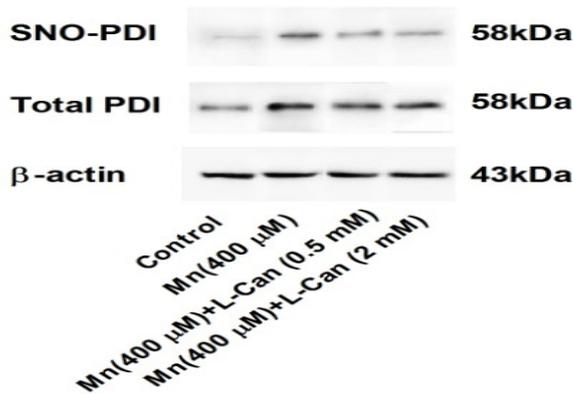


图 1 各实验组脑片神经细胞 PDI 蛋白表达及其亚硝基化 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

2.4 脑片培养液中总一氧化氮 (NO) 的含量

锰及L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Can) 预处理致脑片神经细胞NO生成量见表3。从表3可见，400 μ M 锰处理组脑片神经细胞NO生成量与对照组比较，显著升高 (P <0.01)，升高了3.02倍。与400 μ M 锰处理组比较，不同浓度L-Can预处理组神经细胞NO生成量逐渐下降，2mM L-Can预处理组神经细胞NO生成量显著降低 (P <0.01)，下降了46.53%。

2.5 脑片神经细胞中 iNOS 活性

锰及L-刀豆氨酸硫酸盐 (L-Can) 预处理致脑片神经细胞iNOS活性见表3。从表3可见，400 μ M 锰处理组脑片神经细胞iNOS活性与对照组比较，显著升高 (P <0.01)，升高了1.67倍。与400 μ M 锰处理组比较，不同浓度L-Can预处理组神经细胞iNOS活性逐渐下降，2mM L-Can预处理组神经细胞iNOS活性明显降低 (P <0.01)，降低了34.09%。

表 3 各实验组脑片神经细胞 NO 生成量和 iNOS 活性 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	NO 生成量 (μ M)	iNOS 活性 (U/mg protein)
对照组(0 μ M Mn)	3.45 \pm 0.44	0.33 \pm 0.08
400 μ M Mn	13.86 \pm 2.34**	0.88 \pm 0.16**
0.5mM L-Can+400 μ M Mn	12.21 \pm 2.05**	0.79 \pm 0.17**

[在此处键入]

注：与对照组比较 ** $P < 0.01$ ；与锰处理组比较 ^{##} $P < 0.01$

3.讨论

锰是一种神经毒物，过量的锰进入机体可引起广泛的病理损伤，透过血脑屏障沉积于脑部，产生相应的神经系统受损症状。长期以来，人们对锰的毒性作用进行了多途径、多方面的研究，但对其毒作用机制至今仍不十分清楚。目前，国内外对锰神经毒性的研究主要集中在以下几个方面：影响神经递质的释放和代谢^[8]，引起氧化损伤^[9]，破坏钙稳态平衡^[10]，损伤线粒体，导致能量代谢障碍^[11]。

PDI在内质网腔中的含量最高，是机体内不可缺少一种折叠酶，其主要生理功能是催化多肽链折叠成有利于形成天然二硫键所需的构象，并促进蛋白二硫键的生成和错配二硫键的重排。此外，PDI还具有分子伴侣的活性，能抑制错误折叠蛋白的聚集，对机体起到一定的保护作用。但是PDI被过量的一氧化氮亚硝基化后，其原有的蛋白质结构遭到破坏、丧失了原有生理功能。本实验中锰处理脑片后，神经细胞内PDI mRNA和蛋白表达量明显增加，PDI亚硝基化水平明显增高，PDI活性明显降低。根据结果可以推断：锰可以促使PDI mRNA和蛋白表达明显增加；此外，PDI亚硝基化水平明显增加、PDI活性明显降低，考虑与锰诱导神经细胞损伤、激活iNOS产生过量NO有关。

用一氧化氮合成酶的抑制剂L-刀豆氨酸硫酸盐预处理脑片后，锰处理脑片发现：L-刀豆氨酸硫酸盐并不能影响PDI mRNA和蛋白的表达，但是随着L-刀豆氨酸硫酸盐的浓度增加，PDI活性逐渐增加、PDI亚硝基化水平逐渐降低。推测这可能与L-刀豆氨酸硫酸盐抑制iNOS活性有关。本研究中锰处理可以明显增加神经细胞中iNOS活性和NO生成量；而L-刀豆氨酸硫酸盐是一种NOS的抑制剂，用它预处理脑片后发现：神经细胞中iNOS活性和NO生成量明显降低，且随着L-刀豆氨酸硫酸盐预处理浓度的增加，iNOS活性和NO生成量逐渐降低，具有明显的剂量-效应关系。可以说明L-刀豆氨酸硫酸盐抑制了iNOS的活性，间接降低了NO在脑片神经细胞内的含量，进而使PDI亚硝基化水平降低，对锰致脑片神经细胞损伤起到了保护作用。

综上所述，锰致使神经细胞内PDI mRNA和蛋白表达明显增高、又激活神经细胞iNOS产生大量NO，过量的NO使神经细胞内PDI被亚硝基化，失去原有生物活性和折叠酶功能，进而造成细胞损伤。如若使用L-刀豆氨酸硫酸盐预处理脑片，L-刀豆氨酸硫酸盐可以通过抑制神经细胞内iNOS活性，间接减少NO的生成量，降低PDI亚硝基化水平，对锰造成的神经细胞损伤起到保护作用。

参考文献

[1] Bouabid S, Delaville C, De Deurwaerdère P, et al. Manganese-induced atypical parkinsonism is associated with altered Basal Ganglia activity and changes in tissue levels of monoamines in the rat [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98952.

[在此处键入]

- [2] 王志珍. 蛋白质二硫键异构酶既是酶又是分子伴侣[J]. 科学通报, 2001, 43(13): 1345-1353.
- [3] 钱健,郭军. 二硫键异构酶在神经变性疾病中的调控机制[J]. 国际病理科学与临床杂志 2009, 29(3): 216-219.
- [4] 徐斌, 李乐慧, 杨天瑶, 等. 锰对神经细胞内质网应激信号分子的影响[J]. 实用预防医学, 2013, 20(10): 1153-1155.
- [5] Bernardoni P, Fazi B, Costanzi A, et al. Reticulon1-C modulates protein disulphide isomerase function [J]. Cell Death Dis. 2013, 4: e581.
- [6] Jin YC, Lee HG, Xu CX, et al. Proteomic analysis of endogenous conjugated linoleic acid biosynthesis in lactating rats and mouse mammary gland epithelia cells (HC11) [J]. Biochim Biophys Acta. 2010, 1804(4):745-751.
- [7] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193 (1): 265-275.
- [8] Fitsanakis VA, Au C, Erikson KM, et al. The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation [J]. Neurochem Int, 2006, 48(6-7): 426-433.
- [9] Cai T, Yao T, Li Y, et al. Proteasome inhibition is associated with manganese-induced oxidative injury in PC12 cells [J]. Brain Res, 2007, 1185: 359-365.
- [10] Yazbeck C, Moreau T, Sahuquillo J, et al. Effect of maternal manganese blood levels on erythrocyte calcium-pump activity in newborns [J]. Sci Total Environ, 2006, 354(1): 28-34.
- [11] Zhang F, Xu Z, Gao J, et al. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain [J]. Environmental Toxicol and Pharmacol, 2008, 26(2): 232-236.