

线粒体钙超载激活线粒体凋亡途径 在甲基汞致神经元凋亡中的作用

刘巍, 魏兴龙, 杨天瑶, 邓宇, 徐斌, 徐兆发

中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110122

摘要: **目的** 探讨线粒体钙超载并诱导线粒体凋亡途径活化在甲基汞致神经元凋亡过程中的作用及其机制。 **方法** 取出生 24 h 内的新生昆明小鼠, 解剖取脑皮质, 进行原代神经元培养。细胞发育成熟后, 应用含不同浓度甲基汞 (methylmercury, MeHg, 0、0.25、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液分别处理神经元 1、3、6 h, 测定神经元细胞活力, 确定适宜暴露时间后, 测定神经元线粒体内钙离子水平, 线粒体膜电位, 细胞色素 c (cytochrome c, Cyt c)、凋亡诱导因子 (apoptosis induce factor, AIF)、天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase 3, caspase 3) 蛋白表达水平及细胞凋亡率。 **结果** 神经元经不同浓度 MeHg 处理后, 细胞活力降低。在 0.25、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组, 神经元线粒体内钙离子水平升高, 线粒体膜电位下降, Cyt c、AIF、caspase3 蛋白表达水平升高, 细胞早期凋亡率升高, 且都呈现剂量效应关系。在 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组, 上述指标与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。 **结论** 甲基汞暴露会诱发神经元线粒体钙超载并激活线粒体凋亡途径进而导致细胞凋亡。

关键词: 甲基汞; 神经元; 线粒体钙超载; 线粒体凋亡途径; 细胞凋亡

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1409-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.001

Effect of mitochondrial calcium overload mediating mitochondrial apoptosis pathway activation on methylmercury-induced neuronal apoptosis

LIU Wei, WEI Xing-long, YANG Tian-yao, DENG Yu, XU Bin, XU Zhao-fa

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

Abstract: **Objective** To explore the role and mechanism of mitochondrial calcium overload and mitochondrial apoptosis pathway activation in the process of neuron apoptosis induced by methylmercury (MeHg) poisoning. **Methods** The brains of newborn mice were anatomized within 24 hours after birth for primary culture of mouse cortical neurons. The cells were incubated with different concentration of MeHg (0 $\mu\text{mol/L}$, 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$) in the culture medium for 1, 3 and 6 h respectively, and then cell viability was measured. After suitable exposure time was determined, mitochondrial calcium level, mitochondrial membrane potential, cytochrome c (Cyt c), apoptosis induce factor (AIF), cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (caspase 3) protein expression level and apoptosis rate were detected. **Results** Cell viability was decreased after exposure to different concentration of MeHg. For the 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg treatment groups, mitochondrial calcium levels, Cyt c, AIF and caspase 3 protein expression levels and cell early apoptosis rates were elevated, while mitochondrial membrane potential was declined, all in a dose-dependent manner. There were statistically significant differences in the above-mentioned indicators between 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg treatment group and the control group (all $P < 0.01$). **Conclusions** MeHg exposure can induce mitochondrial calcium overload, activate mitochondrial apoptosis pathway, and then lead to neuronal apoptosis.

Key words: methylmercury; neuron; mitochondria calcium overload; mitochondrial apoptosis pathway; apoptosis

甲基汞 (methylmercury, MeHg) 是具有神经毒性的环境蓄积性重金属污染物, 具有脂溶性, 与巯基有较强的亲和力, 易通过血脑屏障^[1]。目前, 关于 MeHg 神经毒性机制的研究主要包括谷氨酸释放及代谢异常, 谷

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81502779)

作者简介: 刘巍 (1986-), 男, 辽宁盘锦人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 重金属毒理学。

氨酸受体活性及功能紊乱^[2], 细胞氧化应激^[3-4], 细胞内钙稳态失衡^[5], 线粒体功能障碍^[6]等。线粒体是细胞进行生物氧化和能量交换的主要场所, 也是诱导细胞凋亡发生最主要的细胞器之一。线粒体钙超载所致线粒体外膜通透性增加可能是线粒体凋亡途径活化的关键因素之一^[7]。基于以上认识, 本研究建立小鼠原代神经元 MeHg 中毒模型, 观察不同浓度 MeHg 暴露是否会诱发神经元线粒体钙超载并诱导线粒体内凋亡

因子释放,活化线粒体凋亡途径,进而导致神经元凋亡。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 主要试剂 氯化甲基汞(纯度 $\geq 98\%$,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);胎牛血清,HBSS,DMEM 高糖培养基,B-27,抗生素,胰蛋白酶,Neurobasal-A 培养基(Invitrogen 公司);山羊来源 Cyt c、AIF、Caspase3 多克隆抗体和大鼠来源 β -actin 单克隆抗体(上海优宁维生物技术有限公司);线粒体抽提试剂盒(南京建成生物工程研究所);Fura2-AM 荧光探针(美国 Sigma 公司);JC-1 荧光探针、线粒体膜电位测试盒、细胞凋亡测试盒、Western blotting 相关试剂(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.1.2 主要仪器 SW-CJ-1F 超净工作台(苏州净化设备有限公司);HERA Cell 150 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);KS-150 型超声波细胞粉碎机(宁波科生仪器厂);2-16K 低温超速离心机(美国 Sigma 公司);FACSCAN 流式细胞仪(美国 Becton Dickison 公司);iMark 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);VE-180 垂直电泳槽,VE-186 转印系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代神经元培养 由中国医科大学实验动物部提供的健康清洁级昆明小鼠(实验动物生产许可证号 SCXK(辽)2013-0001),雌雄若干,合笼饲养(动物使用许可证号 SYXK(辽)2013-0007,实验期间实验环境条件:温度 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度 $50\%\sim 60\%$,12 h 明暗交替),繁殖新生鼠进行细胞培养。取出生 24 h 内的新生鼠,解剖取脑,分离大脑皮质。将大脑皮质切碎,并转移至含 0.25% 胰蛋白酶的 DMEM 中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,再用与消化液等体积的含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,用吸管上下吹打,将所得细胞悬液分别过 80 目及 200 目筛网,800 rpm 离心 5 min。弃上清,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞,接种于包被多聚赖氨酸的培养皿中,置于细胞培养箱中培养 24 h。之后弃掉培养液,更换为含 2% B-27,1% 抗生素,0.25% 谷氨酰胺的 Neurobasal-A 培养基继续培养 7~8 d 至神经元发育成熟。

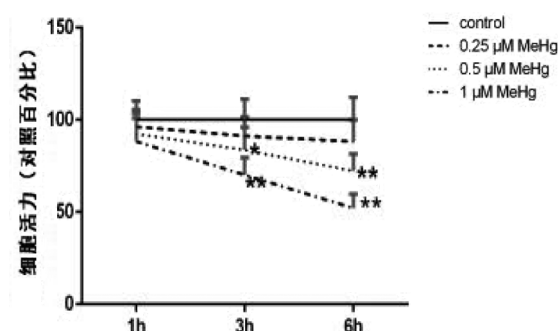
1.2.2 细胞染毒 分别用含不同浓度 MeHg (0、0.25、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液处理神经元 1、3、6 h,分别测定各组神经元细胞活力。选择适宜的 MeHg 暴露时间进行其他指标测定。

1.2.3 指标测定 神经元细胞活力测定应用 MTT 比色法^[8]。线粒体钙离子水平应用荧光分光光度法测定^[9]。线粒体膜电位测定依据 JC-1 荧光探针法^[10]。Cyt c、AIF、caspase3 蛋白表达水平测定应用 Western blotting 法^[11]。细胞凋亡率应用 Annexin V-FITC/PI 双染测试盒进行测定。

1.3 统计分析 实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析进行组间差异的比较,两组间比较用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

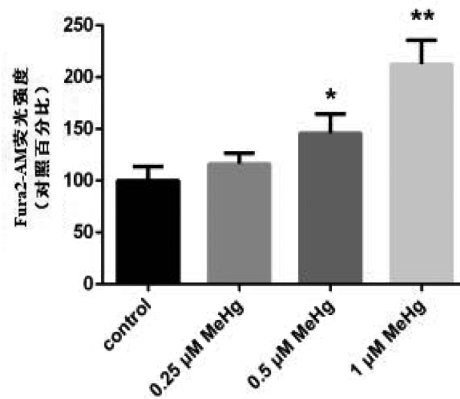
2.1 细胞活力 见图 1。随着 MeHg 处理剂量及染毒时间的增加,神经元细胞活力逐渐降低。与对照组相比,0.5 及 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理 3 或 6 h 细胞活力均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=10$ 。

图 1 MeHg 对细胞活力的影响

2.2 线粒体钙离子水平 见图 2。随着 MeHg 浓度的增加,神经元线粒体钙离子水平逐渐增加,与对照组比较,0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组神经元线粒体钙离子水平显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

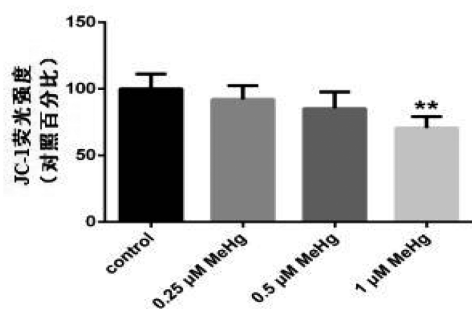


注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=4$ 。

图 2 MeHg 对神经元线粒体钙离子水平的影响

2.3 线粒体膜电位 见图 3。随着 MeHg 浓度的逐

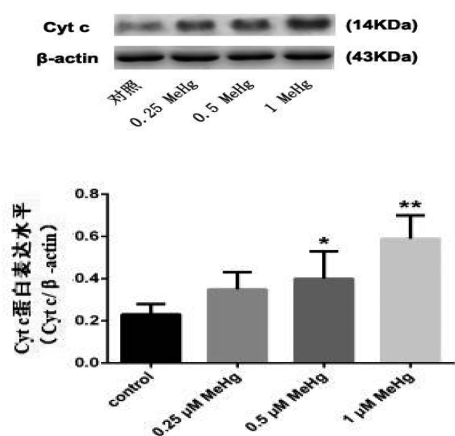
渐增加,神经元线粒体膜电位逐渐降低。与对照组比较,1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组线粒体膜电位显著降低 ($P<0.01$)。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$, $n=4$ 。

图3 MeHg 对神经元线粒体膜电位的影响

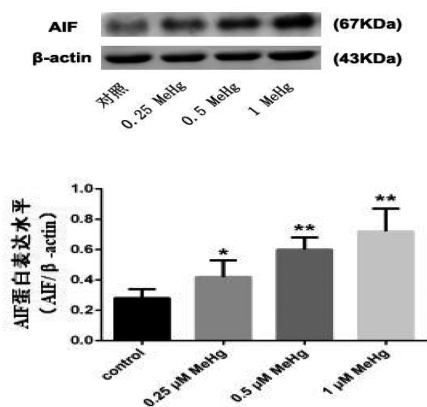
2.4 Cyt c 蛋白表达水平 见图4。随着 MeHg 浓度的逐渐增加,胞质内 Cyt c 蛋白表达水平逐渐增高。与对照组相比,0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组中 Cyt c 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=4$ 。

图4 MeHg 对 Cyt c 蛋白表达水平的影响

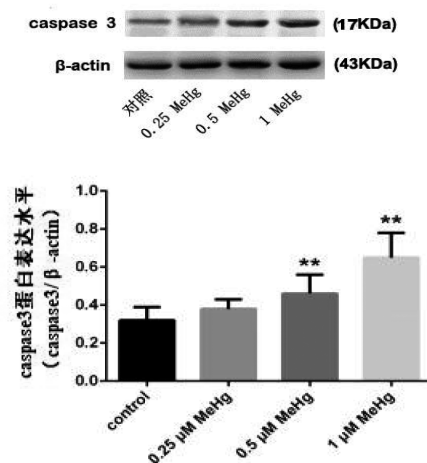
2.5 AIF 蛋白表达水平 见图5。随着 MeHg 浓度的逐渐增加,胞质内 AIF 蛋白表达水平逐渐增高,且在所有处理组中 AIF 蛋白表达水平与对照组相比均显著增高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=4$ 。

图5 MeHg 对凋亡因子 AIF 蛋白表达水平的影响

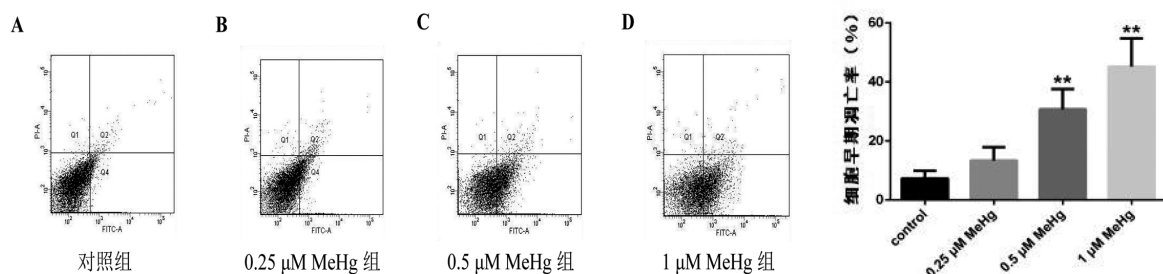
2.6 caspase3 蛋白表达水平 见图6。随着 MeHg 浓度的逐渐增加,caspase3 蛋白表达水平逐渐增高,与对照组相比,0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组 caspase3 蛋白表达水平均显著增高 ($P<0.01$)。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$, $n=4$ 。

图6 MeHg 对 caspase3 蛋白表达水平的影响

2.7 细胞凋亡率 见图7。随着 MeHg 剂量的升高,Q4 象限的散点逐渐增多,说明早期细胞凋亡数目逐渐增多,0.5 和 1 $\mu\text{mol/L}$ MeHg 处理组中细胞早期凋亡率与对照组相比均显著增高 ($P<0.01$)。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$, $n=4$ 。

图7 MeHg 对神经元凋亡的影响

3 讨论

线粒体是细胞进行生物氧化和能量交换的主要场所,是 MeHg 毒作用的靶部位之一,也是诱导细胞凋亡发生最主要的细胞器之一^[12]。MTT 比色法测定神经元细胞活力能够较为直接地反映线粒体功能损伤。试验结果显示随着 MeHg 染毒剂量升高,时间增长,神经元细胞活力逐渐降低,呈现时间-剂量-效应关系。在 1 μ M MeHg 处理 6 h 的组别中,细胞活力最接近半数抑制浓度,因此选择 6 h 作为 MeHg 暴露时间进行其他指标测定分析。

Ca^{2+} 作为细胞内重要的信号分子其浓度和细胞凋亡密切相关。关于 Ca^{2+} 在细胞凋亡中的精确作用还存在很多争议,但目前的一致结论是 Ca^{2+} 浓度的增加在内源性细胞凋亡途径中发挥重要的作用^[13]。先前的研究发现 MeHg 染毒大鼠脑神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平显著升高,并且细胞凋亡率显著升高,提示细胞内 Ca^{2+} 超载可能是诱导细胞凋亡的关键因素之一^[14]。本研究应用 Ca^{2+} 特异性荧光探针 Fura-2 对细胞进行标记后,发现 MeHg 导致神经元线粒体内 Ca^{2+} 水平增加,推测 MeHg 暴露导致线粒体 Ca^{2+} 超载从而激活了线粒体凋亡途径。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡的早期事件。线粒体膜通透性的变化被认为是线粒体功能损伤导致细胞死亡的众多途径中的关键因素之一^[15]。本实验中 MeHg 暴露导致神经元线粒体膜电位逐渐降低,表明 MeHg 可以通过诱导线粒体膜电位下降,进而导致线粒体膜的通透性增加。Cyt c 位于线粒体内膜的外侧,是哺乳动物细胞凋亡信号转导过程中的关键因子。凋亡诱导因子 AIF 由一个氨基末端跨膜束固定在线粒体内膜,线粒体膜通透性改变后,激活易位酶从而使磷脂酰丝氨酸暴露,传导凋亡信号。caspase 家族基因表达产物是促进细胞凋亡的主要酶类,经过一系列酶激活级联反应导致细胞凋亡^[16]。Ji 和 Yu^[17] 的研究提示了当线粒体膜电位下降时,会促进线粒体膜通透转换孔的开放,加速线粒体内 Cyt c 等凋亡相关因子的释放,激活 caspase 凋亡途径。正常情况下,绝大多数线粒体膜通道转换孔处于关闭状态,当线粒体钙超载,线粒体膜电位下降时,膜转换孔大量开放,导致线粒体膜通透性增加,加速线粒体内凋亡相关因子的释放,从而诱导非 caspase 依赖及 caspase 依赖的细胞凋亡^[18]。本研究中,Cyt c、AIF、caspase3 蛋白表达水平在染 MeHg 后均显著升高,表明 MeHg 通过诱导神经元线粒体钙超载,降低线粒体膜电位,开放线粒体膜通道转换孔,从而加速线粒体内凋亡因子的释放,活化线粒体凋亡途径并诱导细胞凋亡。

综上所述,本研究证实了 MeHg 暴露可导致神经元线粒体钙超载,降低线粒体膜电位,促进凋亡相关因子的线粒体释放,从而激活下游线粒体凋亡途径。

参考文献

- [1] Hong YS, Kim YM, Lee KE. Methylmercury exposure and health effects [J]. J Prev Med Public Health, 2012, 45(6):353-363.
- [2] Yin Z, Lee E, Ni M, et al. Methylmercury-induced alterations in astrocyte functions are attenuated by ebselen [J]. Neurotoxicology, 2011, 32(3):291-299.
- [3] Farina M, Aschner M, Rocha JB. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 256(3):405-417.
- [4] Branco V, Canario J, Holmgren A, et al. Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 251(2):95-103.
- [5] Ceccatelli S, Dare E, Moors M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis [J]. Chem Biol Interact, 2010, 188(2):301-308.
- [6] Mori N, Yasutake A, Marumoto M, et al. Methylmercury inhibits electron transport chain activity and induces cytochrome c release in cerebellum mitochondria [J]. J Toxicol Sci, 2011, 36(3):253-259.
- [7] 李爱, 陈雷, 胡新武, 等. 甲基汞诱导海马神经细胞凋亡及其机制研究 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(1):18-20.
- [8] Gold M, Koczulla AR, Mengel D, et al. Reduction of glutamate-induced excitotoxicity in murine primary neurons involving calpain inhibition [J]. J Neurol Sci, 2015, 359(1-2):356-362.
- [9] 刘晓婷, 王延让, 张明. 线粒体介导细胞凋亡的研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(2):182-185.
- [10] Sun X, Xu H, Shen J, et al. Real-time detection of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in THP-1 macrophages during ultrasonic irradiation for optimal sonodynamic therapy [J]. Ultrason Sonochem, 2015, 22(1):7-14.
- [11] Guerguerian AM, Brambrink AM, Traystman RJ, et al. Altered expression and phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors in piglet striatum after hypoxia-ischemia [J]. Brain Res, 2002, 104(1):66-80.
- [12] Deng Y, Xu Z, Xu B, et al. Exploring cross-talk between oxidative damage and excitotoxicity and the effects of riluzole in the rat cortex after exposure to methylmercury [J]. Neurotox Res, 2014, 26(1):40-51.
- [13] Yang Y, Yang D, Yang D, et al. Role of reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress in contrast-induced renal tubular cell apoptosis [J]. Nephron Exp Nephrol, 2014, 128(1):30-36.
- [14] Liu W, Xu Z, Deng Y, et al. Protective effects of memantine against methylmercury-induced glutamate dyshomeostasis and oxidative stress in rat cerebral cortex [J]. Neurotox Res, 2013, 24(3):320-337.
- [15] 刘洪亮, 崔玉山. Caspase-12 在内质网应激中的激活途径及与疾病关系研究进展 [J]. 环境卫生学杂志, 2011, 4(1):41-45.
- [16] Kong GM, Tao WH, Diao YL, et al. Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(11):3186-3195.
- [17] Ji YB, Yu L. N-butanol extract of *Capparis spinosa* L. induces apoptosis primarily through a mitochondrial pathway involving mPTP open, cytochrome C release and caspase activation [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(21):9153-9157.
- [18] Yang X, Wang H, Ni HM, et al. Inhibition of Drp1 protects against secenionine-induced mitochondria-mediated apoptosis in primary hepatocytes and in mice [J]. Redox Biol, 2017, 12:264-273.

收稿日期:2018-05-14