

细胞色素 c 的释放是多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的重要环节*

朱元贵 陈晓春** 陈丽敏 方芳 周宜灿 赵朝辉

(福建医科大学附属协和医院, 福建省老年医学研究所, 福州 350001)

摘要 通过末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口翻译法和 DNA 凝胶电泳观察多巴胺 (DA) 对 PC12 细胞凋亡的诱导作用, 并经蛋白质印迹法检测胞浆细胞色素 c、Bcl-2 和 Bax 蛋白以及活化型半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 水平. 结果表明, 在 DA 诱导 PC12 细胞凋亡的过程中, 可见 PC12 细胞中活化型 caspase-3 蛋白表达, 胞浆中细胞色素 c 水平明显增高, 同时 Bcl-2 蛋白水平下降, 而 Bax 蛋白水平明显增加. 环孢菌素 A 预处理对细胞色素 c 释放和 caspase-3 激活有明显的抑制作用, 而对 Bcl-2 和 Bax 蛋白影响不明显. 结果提示, Bcl-2 和 Bax 蛋白、细胞色素 c 以及 caspase-3 可能参与 DA 诱导 PC12 细胞凋亡, 线粒体细胞色素 c 向胞浆释放可能是其中的中心环节.

关键词 多巴胺, 凋亡, 细胞色素 c, Bcl-2, Bax, 半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3), PC12 细胞

学科分类号 Q26

线粒体是参与细胞凋亡过程最重要的细胞器, 它通过向胞浆释放细胞色素 c 和凋亡诱导相关因子等途径参与各种凋亡的过程, 特别是细胞色素 c 从线粒体向胞浆的重新分布, 与各因素诱导凋亡的产生有着密切的联系^[1]. 在去除神经生长因子诱导的交感神经元凋亡中, 细胞色素 c 的释放被认为是必要的过程, 阻止细胞色素 c 释放, 可以明显抑制神经元凋亡发生^[2].

多巴胺 (dopamine, DA) 是一种重要的神经递质, 也是治疗帕金森病的主要药物之一, 但研究揭示 DA 本身具有神经毒性作用, 体外可诱导多巴胺能神经元凋亡^[3,4]. 但是, DA 如何诱导神经元凋亡以及凋亡的调控机制, 目前仍不明确. 因此, 本研究观察 DA 诱导 PC12 细胞凋亡过程中, 胞浆内细胞色素 c 水平的变化, 结合 Bcl-2 和 Bax 蛋白以及半胱氨酸蛋白酶 3 (cysteine-specific aspartate-specific proteinase 3, caspase-3), 进一步探讨其可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料

PC12 细胞由中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所提供, DA 和环孢菌素 A (cyclosporine A, CsA), 苯甲磺酰氟和抑肽酶购自 Sigma 公司, 细胞色素 c、Bcl-2、Bax 抗体和 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 购自 PharMingen 公司, 活化型 caspase-3 抗体即 caspase-3 P₂₀ 购自 Cell Signaling 公司, β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体购自 Neuromarker 公司, LumiGLO 蛋白质

印迹试剂盒购自 KPL 公司, 末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口翻译法 (TdT-mediated dUTP nick end labelling method, TUNEL) 标记凋亡细胞试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, 蛋白质分子质量标准购自 Promega 公司, 胎牛血清、马血清和 Dulbecco 最低必需培养液 (Dulbecco minimum essential medium, DMEM) 购自 Gibco BRL 公司, DNA 分子质量标准, 核糖核酸酶 A 和胰蛋白酶及溴化乙锭购自北京华美生物工程公司, 其余试剂均为分析纯.

1.2 细胞培养

PC12 细胞用 DMEM 培养, 内含 10% 胎牛血清, 10% 马血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 mg/L 链霉素和 100 U/ml 青霉素, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养. 隔天传代细胞, 当细胞进入对数生长期即可加药.

1.3 细胞处理

在倒置显微镜下, 观察 PC12 细胞均匀贴壁生长时加入 DA, 使其浓度为 0.15、0.30 和 0.45 mmol/L, CsA 预处理和 caspase-3 抑制剂处理时, 预先加入浓度分别为 1 μ mol/L 的 CsA 或 0.10 mmol/L 的 Ac-DEVD-CHO 作用 24 h, 再加入 0.30 mmol/L DA. 细胞继续培养 24 h 后作各种检测.

* 福建省自然科学基金重点课题资助项目 (C982004) 和福建省科技厅重点课题资助项目 (2001Z037).

** 通讯联系人.

Tel: 0591-3357896-8357, E-mail: ZJXCXCH@Public5.FJ.FJ.cn

收稿日期: 2002-01-04, 接受日期: 2002-03-28

1.4 原位细胞凋亡检测

细胞接种在盖玻片上, 药物处理 24 h 后, 使用 TUNEL 试剂盒进行检测凋亡细胞, 操作参考文献 [5] 进行。

1.5 DNA 提取及电泳分析

以每孔 5×10^6 个细胞加入到 6 孔板中, 当细胞均匀贴壁生长后处理细胞, 24 h 后参考文献 [6] 进行 DNA 的提取及电泳分析。具体如下: 处理后的 PC12 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后用 0.01 mol/L PBS 制成单细胞悬液, 离心沉淀后, 加入细胞提取缓冲液 50 μ l (1% NP-40 溶于 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 作用 10 s, 1 600 g 离心 5 min, 上清液中加入 1% SDS 和 1 g/L 核糖核酸酶 A, 56 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 再加入 2.5 g/L 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h 后加入 0.1 体积的 10 mol/L 乙酸铵和 2.5 体积的无水乙醇沉淀 DNA, -20 $^{\circ}$ C 过夜, 12 000 g 离心 5 min, 去上清液, 75% 乙醇洗涤沉淀后, 于含 0.1% 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶以 2 V/cm 电泳 3 h, 紫外灯下观察, 拍照。

1.6 蛋白质印迹法

参考文献 [7] 略加改进。将每孔 2×10^6 个的细胞加到 6 孔板中, 当细胞均匀贴壁生长后处理细胞, 24 h 后去培养液, 用 75 μ l 细胞裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 200 mg/L 叠氮钠, 100 mg/L 苯甲磺酰氟, 1 mg/L 抑肽酶, 1% NP-40) 裂解细胞, 将细胞轻轻刮下混匀, 12 000 g 离心 5 min, 吸上清液, 蛋白质定量后加入等体积的上样缓冲液 (62.5 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝), 煮沸 5 min, 冷却后取样品 50 μ g 以 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 分离的蛋白质用半干电转移法转移到硝酸纤维素膜, 室温下用封闭液封闭 1 h 后, 分别加入用封闭液 1:1 000 稀释的兔抗鼠细胞色素 c, Bcl-2 和 Bax 以及 caspase-3 P_{20} 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 用 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 第二抗体反应 2 h, 用化学发光法显色, X 射线底片曝光。同时把 β -actin 作为内参照, 实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 DA 对 PC12 细胞凋亡的诱导作用

0.15, 0.30 和 0.45 mmol/L DA 作用于体外培养的 PC12 细胞 24 h 后, 细胞的 DNA 琼脂糖凝胶电泳出现凋亡特征性的“梯状”条带, 表明 DNA

链在核小体间发生断裂 (图 1); 预先加入 0.1 mmol/L caspase-3 抑制剂或 1 μ mol/L CsA 作用

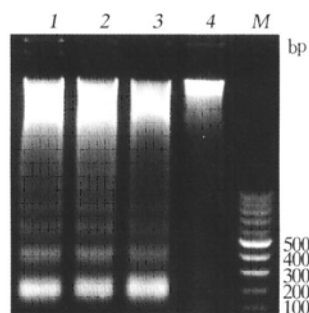


Fig. 1 DNA gel electrophoresis after treatment of PC12 cells with dopamine for 24 h

M: molecular mass marker; 1~3: dopamine (DA) 0.45, 0.30 and 0.15 mmol/L, respectively; 4: control.

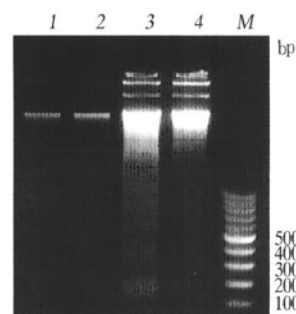


Fig. 2 DNA gel electrophoresis after treatment of PC12 cells for 24 h

M: molecular mass marker; 1: cyclosporine A (CSA) 1 μ mol/L and dopamine 0.30 mmol/L; 2: Ac-DEVD-CHO 0.10 mmol/L and dopamine 0.30 mmol/L; 3: dopamine 0.30 mmol/L; 4: control.

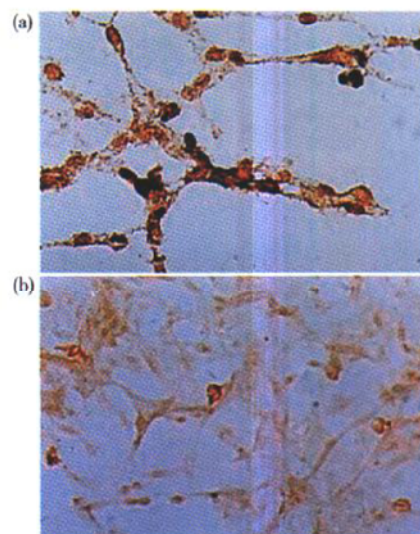


Fig. 3 TUNEL staining after treatment of PC12 cells for 24 h
(a) dopamine 0.30 mmol/L; (b) control. (400 $\times$)

24 h 后, DNA 琼脂糖凝胶电泳均未见“梯状”条带 (图 2); 以 0.30 mmol/L DA 作用 PC12 细胞 24 h 后, TUNEL 染色可见较多的细胞核呈棕色或棕黑色并固缩, 提示细胞凋亡. 对照组 PC12 细胞核未见明显着色 (图 3).

2.2 caspase-3 P₂₀, 细胞色素 c, Bcl-2 和 Bax 蛋白水平

0.15 mmol/L 和 0.30 mmol/L DA 作用于体外培养的 PC12 细胞 24 h 后, 蛋白质印迹检测明显可见 PC12 细胞 caspase-3 P₂₀ 表达, 同时 PC12 细胞胞浆细胞色素 c 和 Bax 蛋白水平明显增高, 而 Bcl-2 蛋白水平明显下降. 预先加入 0.1 mmol/L caspase-3 抑制剂或 1 μ mol/L CsA 作用 24 h 后, caspase-3 P₂₀ 的表达受到明显抑制. 而预先加入 1 μ mol/L CsA 作用 24 h 后, 细胞胞浆细胞色素 c 水平明显降低, 但 Bcl-2 和 Bax 蛋白变化不明显; 而预先加入 0.1 mmol/L caspase-3 抑制剂作用 24 h 后, 细胞胞浆细胞色素 c, Bcl-2 和 Bax 蛋白的变化均不明显 (图 4).

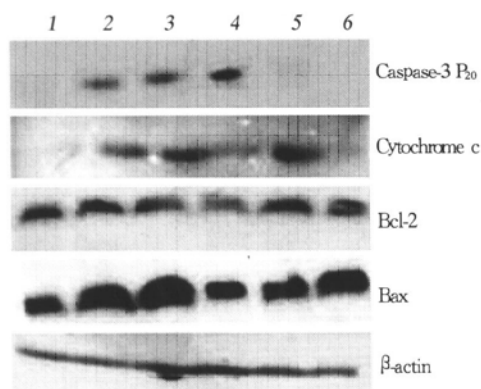


Fig 4 The protein levels of caspase-3 P₂₀, cytosolic cytochrome c, Bcl-2 and Bax after treatment of PC12 cells for 24 h

1: normal; 2~4: DA 0.15, 0.30, 0.45 mmol/L, respectively; 5: Ac-DEVD-CHO 0.10 mmol/L and DA 0.30 mmol/L; 6: CsA 1 μ mol/L and DA 0.30 mmol/L.

3 讨 论

本研究进一步证实 DA 体外可诱导多巴胺能神经元细胞模型 PC12 细胞凋亡, 出现凋亡特征性的生化改变, 因此本研究进一步探讨其可能的机制.

线粒体细胞色素 c 释放是触发 caspase 激活, 进而导致细胞凋亡产生的中心事件^[8]. 在细胞浆中, 细胞色素 c 通过结合凋亡蛋白酶激活因子 APAF1 (apoptosis protease-activating factor-1) 和 caspase-9 后, 激活 caspase-3 是细胞凋亡的重要过程^[9]. 本

研究发现, 在 DA 诱导 PC12 细胞凋亡过程中, 胞浆细胞色素 c 水平明显增高, 而且与 DA 作用有明显的剂量关系, 同时可见 caspase-3 激活, 且 caspase-3 特异性抑制剂 Ac-DEVD-CHO 几乎可以完全阻断 PC12 细胞凋亡, 提示 DA 诱导 PC12 细胞凋亡可能最终是通过激活 caspase-3 介导的.

研究指出, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白过表达可阻止线粒体细胞色素 c 向胞浆释放^[10], 相反, Bax 蛋白的过度表达可触发线粒体细胞色素 c 向胞浆转运^[11], 提示细胞色素 c 的释放是严格受 Bcl-2 蛋白家族调控的. 本研究发现, PC12 细胞胞浆细胞色素 c 的水平与 Bcl-2 蛋白水平的降低, 以及 Bax 蛋白水平的增高是平行的, 尤其以 Bax 蛋白的增高更为显著. 但是, 线粒体细胞色素 c 释放的确切机制仍不清楚, 特别是 Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中的移位与细胞色素 c 释放的关系, 更是值得深入探讨. 本研究只观察 DA 诱导 PC12 细胞凋亡过程中 Bcl-2、Bax 蛋白的水平同胞浆细胞色素 c 之间量的关系, 并未涉及 Bcl-2 家族蛋白表达、移位等精确调节细胞色素 c 释放的问题, 因此需要更深入的研究.

一般认为, 线粒体细胞色素 c 的释放是由于线粒体膜通透性转变孔道开放的结果^[12], 但也有相当的研究指出, 线粒体上细胞色素 c 释放不一定依赖于线粒体膜通透性转变孔道的开放, 甚至可能在通透性转变孔道开放之前^[11]. 本研究发现, 在 DA 诱导 PC12 细胞凋亡过程中, 细胞胞浆细胞色素 c 的水平有明显增高, 且线粒体膜上通透性转变孔道开放抑制剂 CsA 使细胞胞浆细胞色素 c 水平明显降低, 并进一步抑制 caspase-3 活化, 提示 DA 诱导 PC12 细胞凋亡过程中细胞色素 c 释放跟线粒体膜上通透性转变孔道开放有关. 但是, CsA 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白没有明显的影响, 但对细胞凋亡进程却有明显的抑制作用, 提示 Bcl-2 家族参与凋亡调控跟 Bcl-2 家族蛋白的量和在细胞内分布位置的改变等因素均有重要的关系.

但是, 本研究发现当 0.45 mmol/L DA 作用 PC12 细胞时, 细胞色素 c 和 Bax 水平反而下降, 具体原因不明. 总之, 本研究发现, 在 DA 诱导多巴胺能神经元凋亡过程中, Bcl-2 蛋白家族和细胞色素 c 以及 caspase-3 间具有密切的联系, 线粒体细胞色素 c 向胞浆释放可能是其中的中心环节, 这在一定程度上揭示了细胞色素 c 释放同 DA 神经毒性之间的内在联系, 为帕金森病病因的研究和 DA 替代

疗法中同时考虑使用线粒体膜稳定剂提供了有益的探讨.

参 考 文 献

- Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5381): 1309~ 1312
- Neame S J, Rubin L L, Philipott K L. Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibit apoptosis. *J Cell Biol*, 1998, **142** (6): 1583~ 1593
- 陈晓春, 朱元贵, 朱理安, 等. Bcl-2 和 Bax 在多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡中的作用. *中华老年医学杂志*, 2001, **20** (2): 124~ 127
Chen X C, Zhu Y G, Zhu L A, *et al.* *Chin J Geriatrics*, 2001, **20** (2): 124~ 127
- 韩 燕, 陈俊抛, 田时雨, 等. 左旋多巴诱导 PC12 细胞凋亡的实验研究. *中华神经科杂志*. 1999, **32** (5): 284~ 286
Han Y, Chen J P, Tian S Y, *et al.* *Chin J Neurol*, 1999, **32** (5): 284~ 286
- 陈晓春, 朱元贵, 王小众, 等. NO 和 caspase-3 在多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡中的作用. *中国病理生理学杂志*, 2001, **17** (10): 971~ 975
Chen X C, Zhu Y G, Wang X Z, *et al.* *Chin J Pathophysiol*, 2001, **17** (10): 971~ 975
- Herrman M, Corenz H M, Vou R, *et al.* A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragment. *Nucleic Acid Res*, 1994, **22** (21): 5506~ 5507
- Bal-Price A, Brown G C. Nitric oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem*, 2000, **75** (4): 1455~ 1464
- Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, *et al.* Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase-3 p21 complex formation to resist Fas mediated cell death. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (9): 3842~ 3847
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaf/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, **91** (4): 479~ 489
- Yang J, Liu X, Bhalla K, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, **275** (5303): 1129~ 1132
- Eskes R, Antonsson B, Oser-Sand A, *et al.* Bax induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transmission pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol*, 1998, **143** (1): 217~ 224
- Martinou I, Desagher S, Eskes R, *et al.* The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is reversible event. *J Cell Biol*, 1999, **144** (5): 883~ 889

The Release of Cytochrome c Could Be an Essential Event During Dopamine-induced Apoptosis in PC12 Cells*

ZHU Yuan-Gui, CHEN Xiao-Chun**, CHEN Li-Min, FANG Fang, ZHOU Yi-Can, ZHAO Chao-Hui

(Union Hospital of Fujian Medical University, Fujian Institute of Geriatrics, Fuzhou 350001, China)

Abstract After treatment of PC12 cells with various doses of dopamine (DA), the apoptotic cells were observed with TdT-mediated dUTP nick end labelling method (TUNEL) and DNA gel electrophoresis. Meanwhile, Bcl-2, Bax and cytosolic cytochrome c as well as cleaved caspase-3 P₂₀ were detected with Western blotting assay. The results showed that during the process of DA-induced apoptosis, the cleaved caspase-3 P₂₀ and the release of cytochrome c into cytosol were elevated markedly compared with the controls. The protein levels of Bcl-2 were decreased, however, Bax protein was increased significantly. After pretreatment of PC12 cells with cyclosporine A at 1 μmol/L for 24 h, the release of cytochrome c and caspase-3 activation were blocked almost. But it didn't show effect on protein levels of Bcl-2 and Bax. The results suggested that Bcl-2 family and cytochrome c and caspase-3 might be involved in the progression to apoptosis induced by DA, furthermore, the release of cytochrome c from mitochondria might be an essential event.

Key words dopamine, apoptosis, cytochrome c, Bcl-2, Bax, caspase-3, PC12 cells

* This work was supported by a key grant from The Nature Science Foundation of Fujian Province (C982004) and a Key Program of Fujian Science and Technology Bureau (2001Z037).

** Corresponding author. Tel: 86-591-3357896-8357, E-mail: ZJCXCH@Public5.FZ.FJ.cn

Received: January 4, 2002 Accepted: March 28, 2002