

农药鱼藤酮对表达 α -突触核蛋白细胞的作用*

珠帕尔·木拉提² 杨慧^{1**} 蔡青¹ 赵春礼¹ 梁源¹ 赵焕英¹ 胡宇²

(1 首都医科大学北京神经科学研究所北京神经再生修复研究重点实验室 北京 100054)

(2 新疆医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生教研室 乌鲁木齐 830054)

摘要 本研究利用农药鱼藤酮作用于神经细胞,观察鱼藤酮对神经细胞的损伤作用以及线粒体功能障碍与 α -synuclein 积聚之间的关系。**方法:**本实验选用人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y,实验组为 α -synuclein GFP 基因转染的细胞,鱼藤酮处理的转基因细胞和非转基因细胞,对照组为未处理的 SH-SY5Y 细胞。通过 RT-PCR 检测 α -synuclein 基因转染细胞的基因表达情况。荧光显微镜观察细胞内 α -synuclein GFP 表达产物绿色荧光蛋白。MTT 法检测各组细胞活性。DCF 检测细胞氧应激。HE 染色、免疫组化检测 α -synuclein 在细胞中的状态。电镜观察细胞超微结构的改变。**结果:**RT-PCR 显示转基因细胞 α -synuclein 基因的表达。荧光显微镜观察显示细胞浆内可见绿色荧光蛋白,绿色荧光分布不均匀,可见蛋白积聚。MTT 检测结果显示,与对照组相比,鱼藤酮处理的细胞增殖速度明显减小 ($P < 0.01$)。鱼藤酮的浓度为 75nmol/L、100nmol/L 时,未转基因与转基因的细胞活性相比较,前者的细胞活性低于后者 ($P < 0.05$)。HE 染色,鱼藤酮处理的转基因细胞胞浆减少、转基因细胞胞浆内也可见自噬体。胞浆内有嗜酸性包涵体样结构。免疫组化可见鱼藤酮处理高表达 α -synuclein 细胞明显变成梭形并有很长的突起。电镜显示鱼藤酮处理的细胞线粒体肿胀,嵴断裂,胞浆内形成自噬体。DCF 检测转基因细胞内存在明显的氧化应激,并随鱼藤酮处理加重。**结论:**农药鱼藤酮对多巴胺能神经细胞有明显的损伤作用,转基因细胞显示对较高浓度的鱼藤酮损伤有一定的耐受作用。 α -synuclein 可引起神经细胞的氧化应激并随鱼藤酮处理加重。提示环境因素可能与 α -synuclein 表达相互作用使多巴胺能神经元氧化应激进行性加重,这可能是引起 PD 的主要原因。

关键词 鱼藤酮 线粒体 α -Synuclein 氧应激 PD

帕金森病(Parkinson's disease PD)是一种常见的神经系统退行性疾病,中脑黑质多巴胺神经元选择性变性缺失及纹状体多巴胺含量明显减少,尚存的黑质神经元胞浆内出现纤维样嗜酸性包涵体(Lewy body,路易体), α -突触核蛋白(α -synuclein)是其重要组成部分。有研究结果显示 α -synuclein 蛋白对神经系统有毒性作用^[1],转基因动物可引起类似 PD 样的病理变化。 α -synuclein 可能与多巴胺(dopamine DA)能神经元的变性缺失有关,对其机制认识仍不十分清楚。但也有关于 α -synuclein 转基因小鼠没有出现神经损伤^[2]的报道。多年来关

于 PD 的发病原因提出各种假设,但其真正发病原因迄今尚不十分明确。

已证实 PD 患者脑组织中存在线粒体缺陷及线粒体酶复合物 I 活性降低。流行病学调查显示,环境因素如农药可能是 PD 一个危险因子,农场、郊区,经常接触农药的人群,PD 患病率高于非暴露人群^[3,4]。大鼠长期慢性暴露于农药百草枯(herbicide paraquat)、杀虫剂鱼藤酮等,可出现类似 PD 样病理学及行为学改变,包括黑质纹状体多巴胺神经元减少,形成 α -synuclein 免疫阳性 Lewy 体样包涵体^[5]。但关于遗传因素与环境因素的相互作用致 PD 的研究较少。环境因素是通过何种机制引起 α -synuclein 积聚,最终导致 DA 细胞损伤,目前还不十分清楚。本研究选用农药鱼藤酮作为一种环境因素,SH-SY5Y 细胞及转 α -synuclein 的上述

收稿日期:2004-04-28 修回日期:2004-08-21

* 国家自然科学基金资助(30240055),北京市自然科学基金资助(7022005)

** 通讯作者,电子信箱:huiyang@cpums.edu.cn

细胞为模型, 探讨鱼藤酮对神经细胞及高表达 α -synuclein 的神经细胞的影响及可能的机制。关于使用这种细胞模型的研究, 目前未见报道。

1 材料和方法

1.1 细胞

人多巴胺能神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y 细胞, 首都医科大学提供); 载体: α -synuclein EGFP 由本课题组构建^[6]。

1.2 方法

1.2.1 转染 SH-SY5Y 细胞在 35mm 培养皿中培养生长至 70%; 用 Lipofectamine 试剂和 α -synuclein pEGFP 质粒对其进行转染。转染 36h 后, 用荧光倒置显微镜 (Leica, German) 检测基因 α -synuclein pEGFP 表达产物。加入抗生素筛选, 待用。

1.2.2 RT-PCR 根据 GeneBank 已发表的 α -synuclein 序列, 用 Oligo 5.0 软件辅助设计特异引物, 由上海生物工程公司合成: 上游引物: 5' ATAAGAATGCGGCCGATGGATGTATTTCATGAAAG 3' 下游引物: 5' CCGCTCGAGGCCTCAGGTTCTAGTCTTGA 3'。将 SH-SY5Y 细胞, 转染 α -synuclein 基因细胞, 鱼藤酮作用 (100nmol/L) 72h 后的上述两种细胞分别按试剂盒要求提取 RNA。后按逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司) 所述步骤进行逆转录获取 cDNA 片段。按傻瓜 PCR 试剂盒 (赛百盛公司) 所述步骤进行 PCR 反应。在 1% 的琼脂糖凝胶上进行 DNA 电泳, 40min 后用凝胶成像照相。

1.2.3 MTT 细胞活性检测法 4×10^3 个/ml 细胞接种于 96 孔板中, 加入不同浓度的鱼藤酮 (0nmol/L、25nmol/L、50nmol/L、75nmol/L、100nmol/L), 5% CO₂、37℃ 培养箱, 培养 48h, 加入 MTT 2mg/ml 染色液 (Sigma), 20 μ l/孔, 5% CO₂、37℃, 4h, 不含血清的 DMEM 冲洗 2 次, 加 200 μ l DMSO, 振荡 5min, 酶标仪 (BIO-RAD) 测定 570nm 处的吸光值。

1.2.4 细胞内氧自由基检测——DCF-DA 法 细胞 2×10^5 个/ml 接种于 24 孔板中, 100nmol/L 鱼藤酮, 培养 24h, 加入 DCF (2 μ l/ml) 细胞标记液 1ml, 37℃避光作用 15min; 吸弃标记液, DMEM 充分洗涤, 倒置荧光显微镜观察、照相。

1.2.5 HE 染色 将各组细胞用苏木精-伊红染色后用倒置显微镜观察 (Leica) 照相。

1.2.6 细胞免疫化学 细胞 1.5×10^4 个/ml 接种

于 24 孔板中, 加 100nmol/L 鱼藤酮培养 72h, 4% 多聚甲醛-1% 戊二醛固定液, 固定细胞 1h, 4℃, PBS 洗 30min, 4℃。2% 山羊血清封闭非特异性抗体 30min, 室温, 加鼠抗人的 α -Synuclein 抗体 (宣武医院于顺博士惠赠, 1: 1000 溶于 PBS) 4℃, 过夜。鼠抗人二抗 (1: 1000 溶于 PBS), 室温 2h, 三抗 (1: 1000 溶于 PBS) 室温 2h, DAB 显色 10min。倒置显微镜观察、照相。

1.2.7 透射电子显微镜 将各组细胞制成电镜切片后用电子显微镜 (Philips EM208S) 观察、照相。

2 结果

2.1 基因表达检测

荧光显微镜观察下可见 α -synuclein GFP 在细胞内有表达, 可见明显的绿色荧光, 在核周明显增强, 绿色荧光在细胞内分布不均匀, 可见绿色荧光聚成点或形成圆形荧光亮区 (彩版图 1 A, B, C)。

RT-PCR 显示, 在转 α -synuclein 基因的 SH-SY5Y 细胞和鱼藤酮作用的该细胞中检测到了 α -synuclein 基因的存在, 在非转基因细胞中未检测到 α -synuclein 基因的存在 (图 2)。

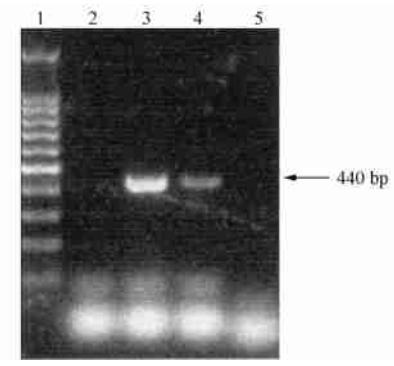


图 2 RT-PCR 结果

1: marker; 2: sy5y 细胞; 3: 转基因的 sy5y 细胞; 4: 鱼藤酮处理的转基因的 sy5y 细胞; 5: 鱼藤酮处理的 sy5y 细胞

2.2 细胞活性检测

MTT 细胞活性检测可见鱼藤酮明显抑制细胞生长, 有鱼藤酮存在的细胞活性明显降低 (** $P < 0.01$)。75nmol/L、100nmol/L 鱼藤酮作用时, 转染 synuclein 基因的细胞的活性高于未转染细胞活性 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 图 3)。

2.3 氧化应激检测

细胞内氧化应激程度通过绿色荧光的变化表示, SH-SY5Y 细胞在鱼藤酮存在的条件下显示较强

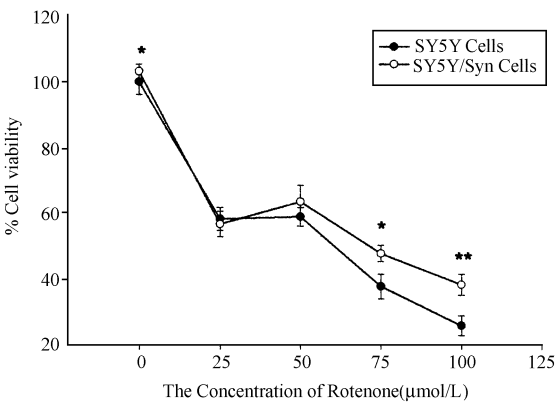


图 3 MTT 检测 SH-SY5Y 细胞和 SH-SY5Y/Syn 细胞活性结果

的绿色荧光 (** $P < 0.01$); SH-SY5Y 细胞转 α -synuclein 基因后显示较强的绿色荧光 (** $P < 0.01$); 鱼藤酮处理的转基因细胞与未转基因的细胞相比荧光强度无明显变化 ($P > 0.05$)。转基因细胞经鱼藤酮处理后绿色荧光增加 (* $P < 0.05$) (彩版图 4, 表 1)。但统计学表明鱼藤酮和高表达 α -synuclein 引起的氧化应激作用不能叠加。两者无协同作用。

表 1 DCF 检测细胞内氧化应激程度

鱼藤酮浓度 (nmol/L)	SH-SY5Y 细胞值 (OD)	转基因细胞值 (OD)
0	20.6679 ± 5.2365	40.5511 ± 3.9964
100	75.7226 ± 7.5645	62.76571 ± 4.6812

2.4 形态学检测

转基因细胞暴露于鱼藤酮中 72h 后, HE 染色可见细胞胞体变窄, 胞浆减少, 少数胞浆内有嗜酸性颗粒 (彩版图 5A, B)。免疫组化可见细胞胞浆 α -synuclein 免疫阳性, 着色重的细胞, 胞体梭形, 突起伸长 (彩版图 5C)。

2.5 电镜结果

超微结构可见, 鱼藤酮处理细胞 72h 后, 线粒体聚集形成空泡; 有些线粒体肿胀、嵴断裂、扭曲变形, 少数胞浆内可见自噬体, 自噬体内可见线粒体残骸 (彩版图 6A, B, C)。单纯转基因细胞少数也可见自噬体。

3 讨论

鱼藤酮是一种杀虫剂, 广泛应用于农业。鱼藤酮主要抑制线粒体复合物 I, 复合物 I 活性降低引起机体 ATP 合成障碍。短期鱼藤酮作用可诱导线

粒体膜电位降低。Vladimir 等证明, 农药可以通过改变 α -synuclein 蛋白的结构, 形成稳定的 α -Synuclein 蛋白纤维, 最后蛋白部分折叠形成蛋白积聚^[7]。短期农药暴露对细胞活性的影响不大, 但是长期暴露, 可明显降低细胞活性^[8]。大鼠暴露于农药如鱼藤酮 (Rotenone)^[9, 10]、百草枯 (Herbicide paraquat)^[5]等线粒体复合酶 I 抑制剂, 可出现类似 PD 样病理学及行为学改变, 包括黑质纹状体多巴胺神经元减少, 形成 α -synuclein 免疫阳性 Lewy 体样包涵体。

本研究显示鱼藤酮处理的多巴胺能神经细胞活性明显降低 ($P < 0.01$)。鱼藤酮处理细胞 72h, HE 染色发现嗜酸性包涵体, 类似于 Lewy 体。免疫细胞化学结果显示核周 α -synuclein 抗体阳性, 这些提示鱼藤酮可能促进 α -synuclein 蛋白的积聚。电镜结果也显示鱼藤酮处理之后, 胞浆里线粒体聚集, 有些线粒体肿胀、扭曲变形、线粒体嵴断裂。形成自噬体, 自噬体内可见受损的线粒体。我们的前期工作也证实单纯过表达 α -synuclein 可见线粒体结构的轻微损伤^[11], 由于线粒体是细胞内产生自由基的重要场所, 线粒体结构和膜电位的改变可能会引致自由基产生^[12, 13]。本研究中, 我们用氧化应激敏感的荧光素探针 DCF-DA 对细胞内氧化应激情况进行了检测, 结果发现鱼藤酮处理的细胞 DCF 荧光信号明显高于未处理的细胞; α -synuclein 过表达细胞 DCF 荧光信号明显高于未转染细胞, 这一结果与 Junn 等^[14]的结果相吻合, 说明鱼藤酮处理和 α -synuclein 在细胞内蓄积过程都可能导致氧化应激, 但统计学表明两者之间无协同性。并且非基因转染细胞对鱼藤酮作用引起的氧化应激更敏感。Sherer 等^[15]的研究显示, 鱼藤酮能引起脑内神经细胞氧化损伤, 尤以中脑和嗅球的多巴胺能神经元最为明显。Comier 等^[16]证明鱼藤酮处理后的脑细胞线粒体内的超氧化物明显增多。鱼藤酮抑制线粒体后引起的氧化应激^[17], 而线粒体是细胞对氧化应激最敏感的细胞器, 自由基可造成线粒体损伤; 而线粒体损伤反过来进一步加剧氧化应激。但也有研究表明^[18]氧化应激促进 α -synuclein 蛋白的积聚, 细胞内异常蛋白的处理、降解过程在一定程度上依赖于泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin proteasome system, UPS) 和分子伴侣参与, 该过程具有能量依赖性。线粒体功能障碍无疑可造成生物能量不足, 进而导致细胞内异常蛋白的进一步积聚。本研究结

果证明, α synuclein 的过表达能引起细胞的氧化应激, 这一结果与 Junn 的报道相同^[17]。多巴胺的代谢本身是高度氧化的过程, 生理状态下, 代谢产生的氧化产物不足以引起组织的损伤。细胞线粒体复合酶 I 被抑制, 如鱼藤酮作用可使细胞 ROS 增加。已证实 PD 患者脑组织中 ROS 增加。这些 ROS 与 DNA、脂质和蛋白反应, 引起氧化损伤, 产生大量的超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基和单线态氧等, 加重呼吸链的损伤, 形成一个恶性循环。这可能是导致细胞死亡的重要原因。

本研究显示鱼藤酮处理的神经细胞活性明显降低。然而, 不同浓度的鱼藤酮处理细胞时, 转染 α synuclein 基因细胞活性高于未转染细胞的活性, 在高浓度鱼藤酮时尤其明显。 α synuclein 蛋白是否通过聚集抵抗鱼藤酮对细胞的损伤, 假设野生型 α synuclein 可能在某种程度上对细胞有保护作用。有人在研究中也发现, α synuclein 可延迟由撤除血清和过氧化氢诱导的人 NT-2 细胞株死亡^[19]; Seo 等^[20]也发现, α synuclein 可延缓原代培养大鼠皮质神经元、SH-SY5Y 细胞、GT1 细胞和 PC12 细胞因撤除血清、过氧化氢和谷氨酸(盐)诱导所致的细胞死亡。 α synuclein 的这种细胞保护性作用, 也见于 Alves da Costa 等^[21]的研究。他们认为, 野生型 α synuclein 可保护 TSM1 细胞和 HEK293 细胞免于 staurosporine 诱导的细胞死亡。前面我们提出 α synuclein 蛋白可能通过积聚来抵抗外界的损伤, 随着 α synuclein 蛋白不断积聚, 氧化应激, 线粒体损伤, 超出了细胞所能承受的能力, 异常蛋白不能被及时清除, 反而对细胞有了毒性作用, 加速了细胞的死亡。同时, 关于环境因素与细胞内在的遗传因素相互作用, 是非常复杂的调控机制, 不是由单一因素决定的。由于各种研究的模型不同, 条件不同因此文献报道不一, 但目前越来越多的证据表明, α synuclein 在细胞内量的积累可能是决定细胞存活还是死亡的关键^[22]。可能由生理状态的代偿作用逐渐累积成病理状态的失代偿作用, 导致神经细胞损伤而致病。

参考文献

[1] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopamine loss and inclusion body formation in α synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000, 287: 1265~ 1269

[2] Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, et al. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human α synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis*, 2001, 8: 535~ 539

[3] Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*, 2001, 86: 122~ 127

[4] Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, et al. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*, 2000, 21: 435~ 440

[5] Amy B, Manning Bog, Alison L, et al. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of α synuclein in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 1641~ 1644

[6] 张宇新, 赵焕英, 苏月, 等. α synuclein_pEGFP 真核表达载体的构建及其在 SH-SY5Y 细胞中的表达. *神经解剖学杂志*, 2003, 19(2): 124~ 128

[7] Vladimir N Uversky, Jie Li, Anthony L Fink. Pesticides directly accelerate the rate of α synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 2001, 500: 105~ 108

[8] Lehmsiek V, Tan E M, Schwarz J, et al. Expression of mutant α synuclein enhances dopamine transporter-mediated MPP⁺ toxicity *in vitro*. *Neuro Report*, 2002, 13: 1279~ 1283

[9] Todd B Sherer, Jin-Ho Kim, Ranjita Betarbet, et al. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α synuclein aggregation. *Experimental Neurology*, 2003, 179: 9~ 16

[10] Todd B Sherer, Ranjita Betarbet, Amy K Stout, et al. An *in vitro* model of parkinson's disease: Linking mitochondrial impairment to altered α synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*, 2002, 22(16): 7006~ 7015

[11] 张宇新, 杨慧, 蔡青, 等. α synuclein_EGFP 在体外培养 SH-SY5Y 细胞中过表达对包涵体形成及线粒体结构改变的影响. *神经解剖学杂志*, 2003, 19(3) 251~ 256

[12] Jellinger KA, Stadelmann C. Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2001, 3(1): 31~ 40

[13] Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 4904~ 4911

[14] Junn E, Mouradian MM. Human α synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci Lett*, 2002, 320(3): 146~ 150

- [15] Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, et al. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*, 2003, 179: 9~ 16
- [16] Cormier A, Morin C, Zini R, et al. Lagrue G Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharmacology*, 2003, 44: 642~ 652
- [17] Todd B Sherer, Ranjita Betarbet, Claudia M Testa, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23 (34): 10756~ 10764
- [18] Makoto Hashimoto, Leigh J Hsu, Edward Rockenstein, et al. α synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem*, 2002, 277 (13): 11465~ 11472
- [19] Lee M, Hyun DH, Halliwell B, et al. Effect of the overexpression of wild-type or mutant α synuclein on cell susceptibility to insult. *J Neurochem*, 2001, 76: 998~ 1009
- [20] Seo JH, Rah JC, Choi SH, et al. α Synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1826~ 1828
- [21] Alves da Costa C, Ancolio K, Checler F. Wild-type but not Parkinson's disease-related Ala53Thr-synuclein protect neuronal cells from apoptotic stimuli. *J Biol Chem*, 2000, 275: 24065~ 24069
- [22] Ted M Dawson, Valina L Dawson. Pathways of neurodegeneration in parkinson's Disease. *Sciences*, 2003, 302 (31): 819~ 822

The Effect of Rotenone on over Expression α -synuclein SH-SY5Y Cells

Zhu Paer^{*} Mu Lati² YANG Hui¹ CAI Qing¹ ZHAO Chur li¹ LIANG Yuan¹
ZHAO Huar ying¹ HU Yu²

(1 Beijing Institute for Neuroscience, Capital University of Medical Science, The Beijing Center of Neural Regeneration
& Repairing, Beijing 100054, China

2 The School of Public Health, The Xinjiang Medical University, Uukumuqi 830054, China)

Abstract To investigate the influence of rotenone on SH-SY5Y cells of α synuclein expression. The α synuclein-GFP was transfected into SH-SY5Y cells with lipofectamine and selected by antibiotics. α synuclein gene expression in cells were determined by GFP fluorescence and RT-PCR. The viability and oxidative stress of cells was detected by MTT assay and DCF assay. The aggregates of α -synuclein protein in cells were identified with HE staining and GFP fluorescence. It was used electron microscopy to observe the ultrastructural alterations of cells. The results showed that α synuclein expressed in transfected cells by RT-PCR and rotenone significantly inhibited the growth rate of cells ($P < 0.01$), but there were some resistant in transfected cells from high concentration rotenone. Acidophilia inclusions were formed in cells treated with rotenone. Electronic microscopy demonstrated the mitochondria disrupted cristae distorted morphology, and formed autophagosomes in cells with rotenone. DCF assay showed oxidative stress in transfected cells and more oxidative stress with rotenone. Rotenone induced the aggregation of α synuclein, mitochondrial dysfunction, Reactive oxygen species (ROS) production. It is suggest that α synuclein and environmental factor may interact to make progressive oxidative stress, which may cause dopamine neuron death.

Key words Rotenone Mitochondria α -Synuclein Oxidative stress Parkinson's disease

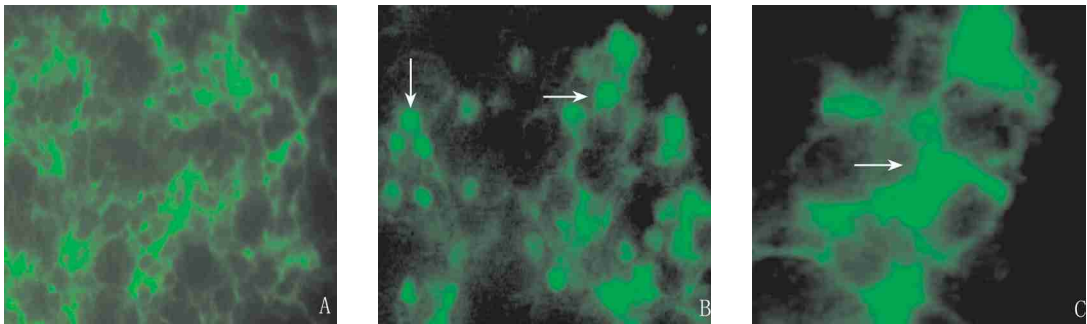


图 1 转 GFP- α - Synuclein 基因的 SH- SY5Y 细胞
筛选后的转基因细胞, 细胞内有明亮的绿色荧光(A)、高倍显微镜可见绿色荧光不均一, 呈团块状(箭头所示 B、C)

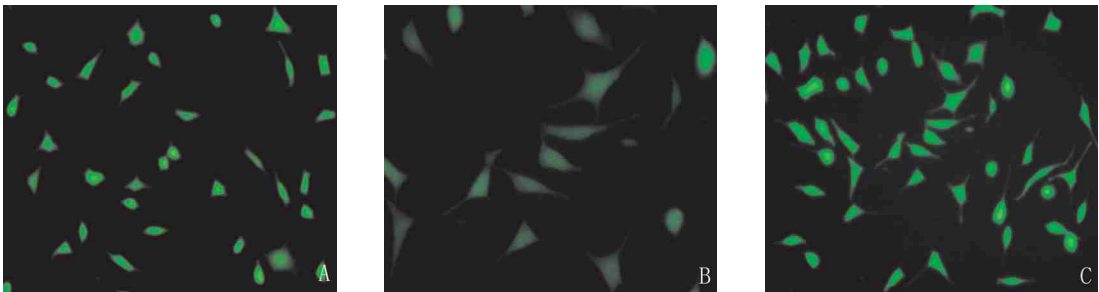


图 4 鱼藤酮处理的细胞及转基因细胞的 DCF 检测结果
鱼藤酮处理(100nmol/L, 12h) 的 SY5Y 细胞(A), 转 α - Synuclein 基因的 SY5Y 细胞(B) 鱼藤酮处理
(100nmol/L, 12h) 的转基因 SY5Y 细胞(C)

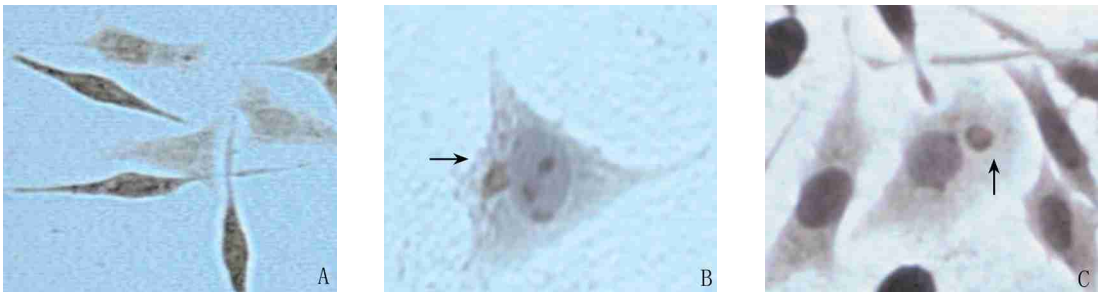


图 5 鱼藤酮处理的转基因细胞免疫组化及 HE 染色结果
 α - synuclein 免疫组化可见着色深的细胞明显变成梭形, 有长的突起(A)、HE 染色可见细胞内有明显的嗜酸性颗粒(如箭头所示 B、C)

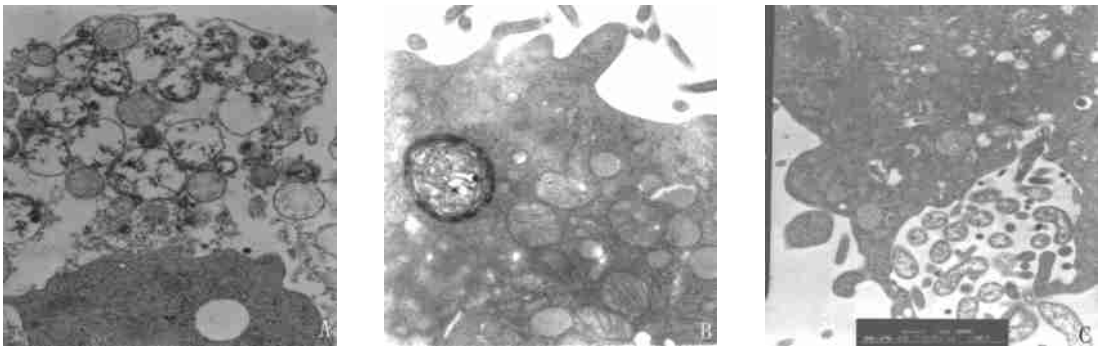


图 6 鱼藤酮处理的细胞电镜结果
鱼藤酮处理的细胞线粒体可见空泡化(A)、线粒体肿胀、形成自噬体并可见自噬体内线粒体残骸(B、C)