

PC12 细胞对急性缺氧耐受的体积调节*

马子敏¹ 谢印芝² 丁爱石¹ 吴丽颖¹ 赵彤¹
杨曦明² 王福庄¹ 范明^{1**}

1. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050

摘要 采用大鼠嗜铬细胞瘤克隆株 PC12 细胞研究了高渗(450 mOsm)诱导对 PC12 细胞缺氧耐受的影响及其相关机制。在诱导培养 3 d 后, PC12 细胞的醛糖还原酶基因表达水平显著升高。急性缺氧 24 h 后其乳酸脱氢酶(LDH)漏出率为(20.4±6.0)%, 与正常对照组(17.5±7.0)%接近, 而未诱导细胞的 LDH 漏出率为(49.6±13.8)%。经过诱导的 PC12 细胞其细胞体积的变化幅度相对较小, 急性缺氧 24 h 后, 细胞体积增加为正常对照的 3.6 倍。而未诱导细胞的体积增大至正常对照的 6.6 倍。加入 0.5 mmol/L 的奎尼丁阻断醛糖还原酶-山梨醇系统对效应分子山梨醇的释放后, 急性缺氧 24 h 其乳酸脱氢酶(LDH)漏出率达(83±2)%。以上结果提示高渗诱导后 PC12 细胞缺氧耐受能力提高, 其保护作用可能与细胞体积调节机制有关。推测醛糖还原酶-山梨醇系统可能通过维持细胞体积的稳定, 保护细胞结构的完整从而阻断了进一步细胞死亡发生的启动。

关键词 PC12 细胞 缺氧耐受 体积调节 醛糖还原酶

细胞的死亡主要有坏死、凋亡等形式。从 20 世纪 70 年代起 Kerr 等开始研究细胞凋亡以来, 大量的工作集中在对细胞凋亡的形态学、生理、生化、细胞信号传导等方面的深入研究, 产生了广泛的科学意义。而目前关于细胞坏死发生机制的认识却明显落后于对凋亡的理解^[1]。在急性缺氧损伤引起的神经细胞死亡中, 几乎全部为细胞坏死方式, 并且缺氧适应似乎可以改变细胞坏死与凋亡发生的转归^[2]。

Gulbins 等^[3]认为细胞坏死与凋亡这两种不同的病理表现可能是损伤因素或细胞自身对细胞体积稳态的不同调节所造成。因为高渗体条件下的细胞皱缩对肿瘤细胞的凋亡有显著的抑制作用, 提示在干涉了应激反应早期的细胞体积变化后, 可能会通过影响 P38 激酶、JNK 等通路抑制细胞凋亡的发生。

本研究采用国内外广泛使用的大鼠嗜铬细胞瘤(Phaeochromocytoma)克隆株 PC12 细胞^[4]建立急性缺氧性细胞坏死模型, 研究了高渗条件对 PC12 细

胞缺氧耐受的影响及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及缺氧模型

PC12 细胞采用 RPMI 1640 培养基(Hyclone)培养, 在 37°C 培养 48 h 后换半液, 每 3 天传代一次。在急性缺氧实验(AH)的前 1 天换为 DMEM 低糖培养基(含葡萄糖 1 g/L), 在 5% CO₂, 95% N₂条件下缺氧培养 24 h。用 2 mol/L 的 NaCl 溶液调节培养基渗透压, 并用渗透压计(NIKKISO OSA-21, Japan)标定, 使高渗培养 PC12 细胞使用的 DMEM 低糖培养基渗透压为 450 mOsm。使用 PI/Hoechst 33258 (Sigma)复染后分别在可见光、360 nm 激发光下观察细胞坏死、凋亡的情况。按常规电镜方法观察急性缺氧后细胞形态学变化。

1.2 乳酸脱氢酶(LDH)漏出率的测定

采用乳酸脱氢酶活性测定试剂盒(中生公司, 北京)测定丙酮酸在 340 nm 处的吸光值, 求出样品

2001-12-10 收稿, 2002-03-07 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39730190)

** 联系人, E-mail: Fanming@nic.bmi.ac.cn

LDH活力. 实验分别测定培养基上清及下层 PC12 细胞的 LDH 活力, 计算漏出到培养基的 LDH 占总的 LDH 活力的比值.

1.3 细胞体积测定

在培养基中用细口巴氏管轻柔吹打, 使之分散成接近单个球状, 然后铺于 25 mL 玻璃培养瓶培养, 连续通以 5% CO₂, 95% N₂ 气体, 固定所选择的视野后, 采用显微图像采集/分析系统(北京航空航天大学, 北京)在 400 倍下采集所测目标细胞的直径大小变化, 转换为细胞体积值以及相对体积值^[5].

1.4 RT-PCR 分析

用液氮冻融 PC12 细胞 10 min, 12000 r/min 离心 10 min 得上清, 用 Trizol 法抽提细胞质 RNA, 常规方法反转录单链 cDNA 模板, 用 GAPDH 引物(博亚公司, 上海)与 AR 引物(上游: 5' TGG ATC-CACTCTTGCGGGTCGTTGT; 下游: 5' TGAATT-CGCTTCAGACTTCTGCGTG)同时作单管反应, 在 95°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min、72°C 延伸 2 min, 扩增 30 个循环. 1% 琼脂糖电泳分离鉴定扩增产物.

2 结果和讨论

急性缺氧损伤引起的神经细胞死亡中, 几乎全部为细胞坏死. 我们在 PC12 细胞上获得的结果也一样. 图版 I 显示了急性缺氧下 PC12 细胞的形态学变化. 可见在正常培养的 PC12 细胞中也有一定数量的凋亡细胞或坏死细胞. 加入 PI/Hoechst 33258 复染正常培养的 PC12 细胞 1 min 后在可见光与 360 nm 激发光下观察, 可以同时观察到活细胞(无荧光), 坏死细胞(PI 阳性, 红色), 凋亡细胞(Hoechst 33258 阳性, 蓝色)图版 I (a). 急性缺氧 24 h 后的 PC12 细胞主要为 PI 阳性的红色坏死细胞图版 I (c).

鉴于 PC12 细胞醛糖还原酶(AR)及其产物山梨醇(sorbitol)等组成的 AR-sorbitol 系统是细胞体积调节的重要功能分子^[6], AR 表达的增加可能会通过增强细胞的体积稳态来发挥细胞保护作用, 并进一步在上游阻断细胞死亡通路的启动, 以及胞外高渗信号可通过渗透压反应元件结合蛋白参与的通路来调控 AR 转录^[7,8], 我们观察了高渗条件下 PC12 细胞 AR 的表达. 结果表明 PC12 细胞的 AR 表达水

平通常很低, 高渗(450 mOsm)诱导 3 d 后, PC12 细胞 AR 表达得到显著上调(图 1). 对诱导的 PC12 细胞进一步急性缺氧培养 24 h 后 LDH 的漏出率为 (20.4 ± 6.0)%, 未诱导细胞的 LDH 漏出率为 (49.6 ± 13.8)% (正常对照组为 (19.8 ± 4.2)%). 与正常对照相比, 急性缺氧处理的 PC12 细胞 LDH 漏出率显著增高 ($P < 0.05$). 与急性缺氧处理的 PC12 细胞相比, 高渗诱导后的 PC12 细胞在急性缺氧处理后 LDH 漏出率显著降低 ($P < 0.05$), 并与正常对照几乎没有差别. 说明高渗诱导后 PC12 细胞的缺氧耐受能力有显著的提高, 而未被诱导的细胞损伤相对较重.

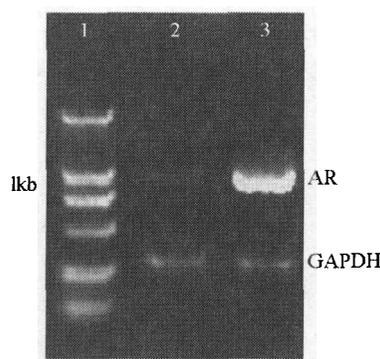


图 1 高渗培养对 PC12 细胞 AR 表达的诱导

1. 分子量标志; 2. 正常培养 PC12 细胞;
3. 高渗诱导 3 d 的 PC12 细胞

在高渗诱导的 PC12 细胞培养基中加入 0.5 mmol/L 的奎尼丁再急性缺氧 24 h 后细胞 LDH 漏出率为 (83 ± 2)%, 镜下见细胞几乎全部死亡. 未加入奎尼丁的诱导细胞生长良好, 同样高渗诱导神经生长因子(NGF)分化后的 PC12 神经元, 再急性缺氧 24 h 也生长良好, 加入奎尼丁后缺氧 24 h 细胞全部死亡. 说明使用奎尼丁特异性阻断细胞膜上的 sorbitol 通透酶(sorbitol permease)^[9], 抑制细胞的山梨醇释放过程后大大增加了细胞对缺氧的敏感程度, 提示其释放障碍可能会对细胞造成很大的损伤, 阻断胞内山梨醇的释放后即阻断了 AR-sorbitol 系统的胞内外循环, 同时也阻断了其细胞保护作用. 证明高渗诱导后的细胞保护作用与 AR 相关的细胞体积调节机制可能有关, 并且该系统的保护机制在缺氧的细胞防御机制中具有非常重要的作用.

进一步观察急性缺氧后 PC12 细胞的细胞体积变化可见, 在急性缺氧 24 h 后, PC12 细胞的体积增大至正常对照的 6.6 倍(图 2), 而经过高渗诱导的 PC12

细胞的体积变化幅度相对较小, 细胞体积增加小于对照的 3.6 倍. 证明在高渗透诱导上调 AR 转录水平后, PC12 细胞确实显著增强了其细胞体积稳定能力, 并赋予 PC12 细胞强大的缺氧耐受能力.

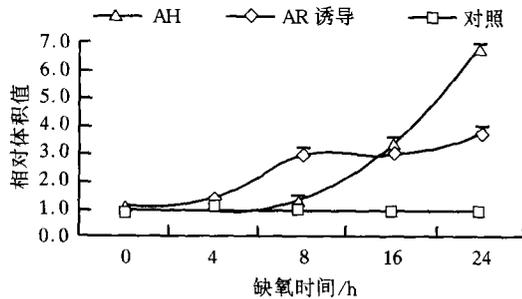


图2 急性缺氧后 PC12 细胞体积变化曲线

对照, 正常培养的 PC12 细胞; AH: 急性缺氧培养的 PC12 细胞;
AR: 诱导高渗透诱导 3 d 后再急性缺氧培养的 PC12 细胞

过去的离体与在体实验结果均表明, 在急重缺氧损伤引起的细胞损伤、死亡中, 几乎全部为细胞坏死, 复氧 24 h 后细胞凋亡开始发生^[1,10]. 在细胞缺氧时线粒体膜电位的变化对缺氧刺激比较敏感, 接着发生线粒体及其他细胞器的肿胀或结构破坏, 然后是整个细胞的体积增大. 不同种类的细胞体积增大的时相以及增大的程度不同, 细胞体积一定程度的变化又进一步通过未知的复杂机制分别启动细胞的反应性体积缩减反应(RVD)或反应性体积增加反应(RVI). 当细胞的体积偏离稳态一定范围后, 可发展为不可逆的细胞坏死或凋亡. 通常凋亡发生细胞表现为细胞皱缩、体积减小, 通常在复氧后的 24 h 及数天后发生^[11]; 过度的细胞肿胀使正常细胞膜电位无法维持, 胞外水分子又大量进入, 当细胞膜内外静水压差超过 2 kPa 体积进一步增大后发生膜的破坏, 最终启动细胞坏死^[4]. 推测 AR-Sorbitol 系统可能通过细胞膜上的通透酶适时释放山梨醇, 同时带走大量水分子, 这对于包括线粒体在内的细胞器的结构稳定与完整都应该有直接的保护作用.

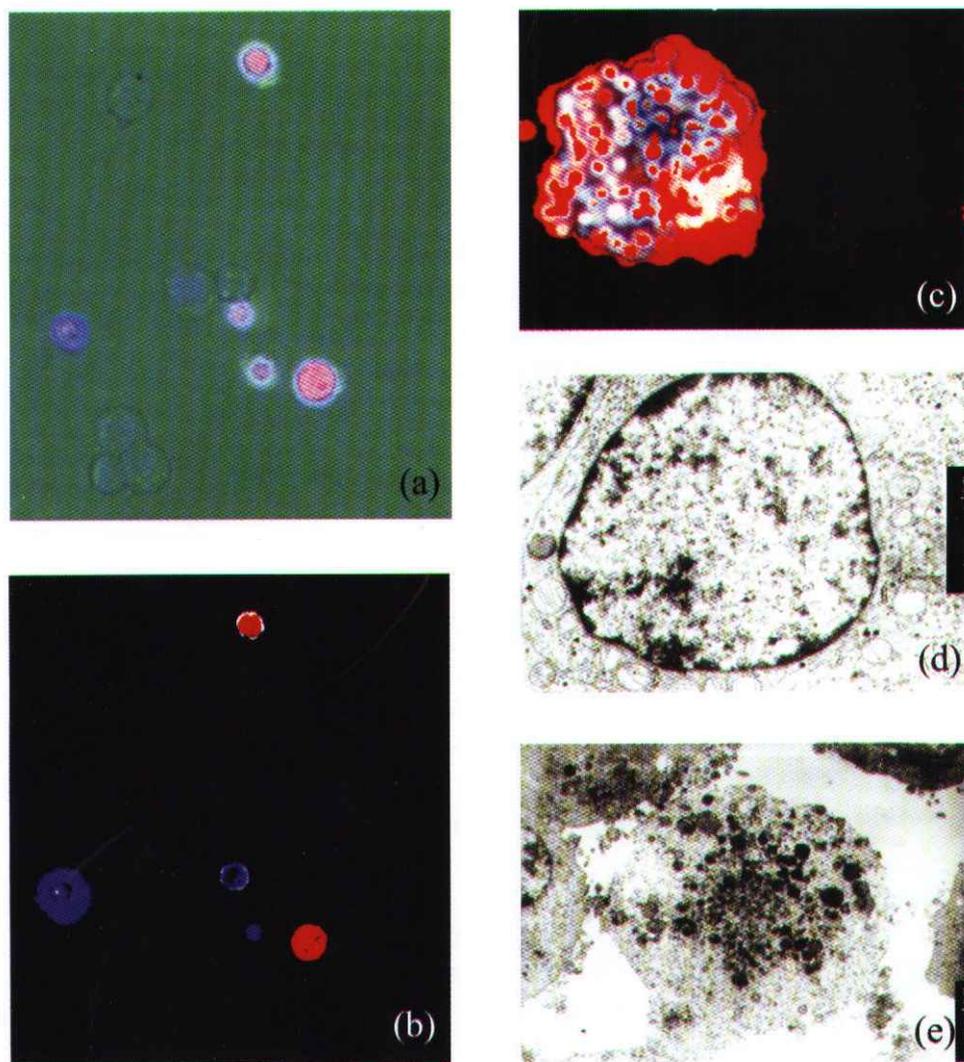
AR 是多种细胞执行体积调节的重要分子, 在胞浆合成山梨醇后通过囊泡的包装将其贮存在质膜内, 在合适的时候通过细胞膜上山梨醇通透酶迅速

释放大量的山梨醇出胞, 同时带出水分子并平衡细胞内外渗透压的差别, 维持胞内外渗透压稳定以及细胞、细胞器体积的稳定^[12], 这可能对于防止细胞的坏死与凋亡发生的启动具有重要的意义.

采用高渗透诱导、上调 Bcl-2 水平等措施既可以防止细胞的坏死又可以阻止细胞凋亡的发生. 这提示在缺氧性细胞死亡发生以及多种应激性损伤之前可能存在与细胞体积调节或体积稳态维持有关的共同通路. 这种可能性是否存在以及有关详细的机制尚待进一步的工作来阐明.

参 考 文 献

- 1 Chautan M, et al. Intedigital cell death can occur through a necrotic and caspaseindependent pathway. *Current Biol*, 1999, 9(17): 967
- 2 孟凌新, 等. 缺氧适应对缺血缺氧损伤鼠脑细胞凋亡的影响. *中华麻醉学杂志*, 2001, 21(7): 426
- 3 Gulbins E, et al. Inhibition of Fas-induced apoptotic cell death by osmotic cell shrinkage. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236: 517
- 4 Abu Rayas, et al. A tissue culture ischemic device to study e-icosanoid release by PC12 cultures. *J Neurosci Methods*, 1993, 50(2): 197
- 5 Leung S, et al. Regulation by NGF and protein phosphorylation of Na/K/2Cl cotransport and cell volume in PC12 cells. *J Biol Chem*, 1994, 269(14): 10581
- 6 Burg M B. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol*, 1995, 268(Renal Fluid Electrolyte Physiol): F983
- 7 Miyakawa H, et al. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a Rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999, 96: 2538
- 8 Kracke G R, et al. Identification of a sorbitol permease in human erythrocytes. *Am J Physiol*, 1994, 266(Renal Fluid Electrolyte Physiol): C343
- 9 Garty H, et al. Sorbitol permease: An apical membrane transporter in cultured papillary epithelial cells. *Am J Physiol*, 1991, 260(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 29): F650
- 10 Northington F J. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis*, 2001, 8: 207
- 11 Lang F M, et al. The biological significance of cell volume. *Renal Physiol Biochem*, 1993, 16: 48
- 12 Bremer A M, et al. Ischemic cerebral edema in primates: Effects of acetazolamide, phenytoin, sorbitol, dexamethasone, and methylprednisolone on brain water and electrolytes. *Neurosurgery*, 1980, 6: 149



急性缺氧下PC12细胞的形态学特征

(a) 正常培养的PC12细胞加入 $10 \mu\text{mol PI}$ 、 $10 \mu\text{mol Hoechst 33258}$ 复染后在可见光与 360nm 激发光下观察; (b) 与(a)同视野细胞加入 $10 \mu\text{mol PI}$ 、 $10 \mu\text{mol Hoechst 33258}$ 复染后在 360nm 激发光下的荧光图像; (c) 急性缺氧24h后的PC12细胞加入 $10 \mu\text{mol PI}$ 、 $10 \mu\text{mol Hoechst 33258}$ 复染后在 360nm 激发光下的荧光图像; (d) 正常培养的PC12细胞电子显微镜照片; (e) 急性缺氧24h后的PC12细胞电子显微镜照片