硫化氢对化学性缺氧诱导 PC12 细胞凋亡的影响

孟金兰[1,2]，兰爱平[2]，郭瑞鲜[2]，杨春涛[2]，杨战利[2]，黄 雪[3]，冯鉴强[2*]
(1. 广东药学院生理教研室，广东 广州 510006；2. 中山大学中山医学院生理教研室，广东 广州 510080；
3. 中山大学附属第一医院心血管内科，广东 广州 510080)

摘 要：【目的】探讨硫化氢(H_2S)对抗二氯化钴($CoCl_2$)诱导 PC12 细胞凋亡的作用及其初步机制。【方法】应用化学性缺氧模拟剂 $CoCl_2$ 在 PC12 细胞建立化学性缺氧损伤模型；以硫氢化钠(NaHS)作为 H_2S 的供体；应用 CCK-8 比色法检测细胞存活率；碘化丙啶(PI)染色流式细胞技术(FCM)检测细胞凋亡率；Hoechst33258 染色检测细胞凋亡的形态学变化；罗丹明 123(Rh123)染色荧光显微镜照相检测细胞线粒体膜电位(MMP)；2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)染色荧光显微镜照相检测细胞内的活性氧 (ROS)水平。【结果】$CoCl_2$ 引起 PC12 细胞的存活率显著降低及凋亡率明显增加，同时引起 PC12 细胞的 MMP 明显降低及 ROS 生成显著增加。在 600 μmol/L $CoCl_2$ 处理 PC12 细胞前，应用 100 ~ 400 μmol/L NaHS 预处理 30 min，呈浓度依赖性地阻断 $CoCl_2$ 引起 PC12 细胞的存活率降低；200 μmol/L、400 μmol/L NaHS 预处理能显著地降低 600 μmol/L $CoCl_2$ 引起 PC12 细胞的凋亡率增加并阻断 $CoCl_2$ 引起的 MMP 降低及 ROS 升高。【结论】H_2S 具有神经细胞保护作用，能明显地对抗 $CoCl_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡，此作用可能与其减少 ROS 生成，提高 MMP 有关。

关键词：硫化氢；二氯化钴；缺氧；PC12 细胞；凋亡
中图分类号：R329.25 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2010)01-0079-06

Effects of Hydrogen Sulfide on Apoptosis of PC12 Cells Induced by Chemical Hypoxia

MENG Jin-lan[1,2], LAN Ai-ping[2], GUO Rui-xian[2], YANG Chun-tao[2], YANG Zhan-li[2],
HUANG xue[3], FENG Jian-qiang[2*]
(1. Department of Physiology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
3. Department of Cardiovasology, The First Afilliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the cytoprotection of hydrogen sulfide (H_2S) against cobalt chloride ($CoCl_2$)-induced apoptosis in PC12 cells and the underlying mechanisms. 【Methods】 $CoCl_2$ (a chemical hypoxia-mimetic agent) was used to establish the chemical hypoxia-induced PC12 cell injuries model. Sodium hydrosulfide (NaHS) was used as a H_2S donor. The viability of PC12 cells was measured by CCK-8 assay. The percentage of apoptotic cells was assessed by propidium iodide stain flow cytometry (FCM). The morphological change of apoptotic cells was tested by using the chromatin dye Hoechst 33258. The mitochondrial membrane potential (MMP) was analyzed by rhodamine 123 staining and photofluorography. The level of reactive oxygen species (ROS) in PC12 cells was measured by DCFH-DA staining and photofluorography. 【Results】 $CoCl_2$ induced a decrease in cell viability and an increase in percentage of apoptosis in PC12 cells along with dissipation of MMP as well as overproduction of ROS. When PC12 cells were treated with NaHS 30 min before $CoCl_2$ treatment a decrease in viability of PC12 cells induced by 600 μmol /L $CoCl_2$ was concentration-dependently blocked by NaHS (100, 200, and 400 μmol/L). Pretreatment with NaHS at 200 and 400 μmol /L obviously reduced the apopototic percentage of PC12 cells induced by 600 μmol /L $CoCl_2$ and inhibited the dissipation of MMP and overproduction of ROS. 【Conclusion】 H_2S protected PC12 cells against $CoCl_2$-induced apoptosis, which may be associated with the inhibition of H_2S on the dissipation of MMP and overproduction of ROS induced by $CoCl_2$.

Key words: hydrogen sulfide; cobalt chloride; hypoxia; PC12 cells; apoptosis
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(1):79-84]

收稿日期：2009-07-22
基金项目：广东省科技计划项目(2008B080703053).
作者简介：孟金兰，博士生，讲师，研究方向：神经生理，E-mail：lanzigd@163.com；* 通信作者：冯鉴强，教授，博士生导师，研究方向：神经生理，E-mail：fengjq-sums@163.com

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是一种无色,高度水溶性并带有臭鸡蛋气味的有毒气体。近年的研究却发现,H_2S 可能是一种新颖的神经调质(neuromodulator)参与调制中枢神经系统的生理及病理功能。例如,H_2S 可促进海马长时程增强(LTP)[1] 并可能参与阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)的发病过程[2]。Lu 等人报道,H_2S 具有神经保护作用[3],能保护星形胶质细胞对抗氧化应激引起的损伤[4]。另方面,H_2S 能抑制机体的代谢活动。吸入 H_2S 的小鼠其体内代谢可降低约 90%,进入假死(suspended animation)状态[5],从而保护小鼠对抗致命缺氧,延长生存时间[6]。H_2S 也能保护血管平滑肌对抗低氧引起的细胞死亡[7]。然而,H_2S 能否保护神经元对抗化学性缺氧诱导的损伤作用尚未明了。

二氯化钴(cobalt chloride,$CoCl_2$)是一种化学性缺氧模拟物,能模拟低氧或缺血情况[8-9]。PC12 细胞来源于大鼠嗜铬细胞瘤细胞株,从形态结构及功能方面均具有神经元的特征,常被用来研究神经细胞死亡机制[10]和神经细胞对缺氧的反应[11]。因此,本文应用 $CoCl_2$ 在 PC12 细胞建立化学性缺氧损伤神经元的模型,旨在探讨 H_2S 对抗 $CoCl_2$ 诱导 PC12 细胞损伤的作用及其机制,以便为深入阐明 H_2S 的神经保护作用提供新颖的实验资料。

1 材料与方法

1.1 试 剂

碘化丙啶(PI)、Rnase A、罗丹明 123(Rh 123)、NaHS 与 $CoCl_2$ 购自 Sigma 公司; CCK-8、DCFH-DA 购自壁云天生物公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibico BRL 公司(NY USA)。

1.2 细胞培养

PC12 细胞由中山大学实验动物中心提供,培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基中。于 37 ℃、5%体积分数 CO_2 条件下培养,选取对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验分组

按实验要求分为 4 组:正常对照组、$CoCl_2$ 损伤组、NaHS 预处理组(NaHS + $CoCl_2$)、NaHS 对照组。

1.4 细胞存活率的检测

取对数生长期细胞,以 1×10^4/孔接种于 96 孔板,在 37 ℃、5%体积分数 CO_2 条件下培养过夜后,各组细胞分别与 CCK-8(每孔 100 μL 加 10 μL CCK-8)孵育 4 h,随后在酶联免疫检测仪测定每孔的吸收值(570 nm 波长),按公式:存活率(%) = 实验组 OD/正常对照组 OD × 100%,求出实验组的存活率,重复 3 次。

1.5 PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡

收集各组细胞,用 PBS 洗 2 遍,用 700 mL/L 乙醇4 ℃固定过夜,取 10^6 已固定的细胞,用 PBS 洗两遍,去上清后加入 300 μL DNA 染液(内含 PI 100 μg/mL 和 Rnase A 20 单位/mL),与 4 ℃冰箱中放置 45 min,300 目尼龙网过滤,上流式细胞仪(美国 Benkman-Coulter 公司出品)检测(激发波长 488 nm;发射波长 610 nm)细胞 DNA 的含量。以 DNA 组方图中低于 G1 期 DNA 含量的亚 G1 峰的大小代表凋亡细胞数的多少。

1.6 Hoechst 33258 核染色检测细胞凋亡

把 PC12 细胞接种于 24 孔板内,按实验分组要求给以下不同的处理因素作用一定时间,PBS 洗两次,加入新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛,4 ℃固定细胞 10 min,加入 5 mg/L Hoechst 33258 染色液作用 10 min,PBS 冲洗,荧光显微镜下观察、摄片。正常细胞核表现为弥漫均匀的低强度荧光,凋亡细胞核呈浓染致密固缩状态或颗粒状荧光。

1.7 线粒体膜电位的检测

Rh 123 是一种为线粒体所吸收的荧光染色,其吸收值随细胞线粒体膜电位(mitochondria membrane potential,MMP)的改变而呈相应的变化,从而改变细胞的荧光强度。因此,可通过检测细胞 Rh123 的荧光强度反映细胞的 MMP。把 PC12 细胞接种于 24 孔板内,按实验分组要求给予不同的处理因素作用一定时间,用 PBS 洗两次。取储存于-20 ℃溶于 DMSO 的 1 g/L Rh123,用不含小牛血清的 DMEM 稀释至 100 μg/L,每孔加入 200 μL,避光于 37 ℃孵育 45 min 后荧光显微镜下观察、摄片。选取 5 个不同的视野用 ImageJ1.41° 图片分析软件中的 color histogram 对各视野平均荧光强度进行分析统计。

1.8 细胞内活性氧含量的检测

DCFH-DA 本身没有荧光但可穿过细胞膜进入细胞,在胞内转化生成 DCFH。在活性氧(reactive oxygen species, ROS)存在的条件下,

DCFH被氧化生成绿色荧光物质 DCF,绿色荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。因此，可通过检测细胞 DCF 的荧光强度反映细胞内的 ROS 含量。把 PC12 细胞接种于 24 孔板内，按实验分组要求给予不同的处理因素作用一定时间，用无血清的 DMEM培养基洗 2 次，加入用无血清的 DMEM 稀释为终浓度为 1 μmol/L 的 DFCH-DA，避光于 37 ℃孵育 30 min 后，荧光显微镜下观察、摄片。选取 5 个不同的视野用 ImageJ1.41 图片分析软件中的 color histogram 对各视野平均荧光强度进行分析统计。

1.9　统计学处理

实验数据经 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析，数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较用 one-way ANOVA 方法,以 $P < 0.05$ 代表有统计学意义。

2　结　果

2.1　NaHS 抑制 $CoCl_2$ 诱导的细胞毒性

200 μmol/L ~ 2 mmol/L 的 $CoCl_2$ 处理 24 h，呈浓度依赖性地降低 PC12 细胞的存活率，其中 600 μmol/L $CoCl_2$ 处理 PC12 细胞 24 h 使细胞存活率降低到 51%(图 1A)；进一步的研究发现，25、50、100、200 和 400 μmol/L 的 NaHS 本身不影响 PC12 细胞的存活率， 但呈浓度依赖性地抑制 600 μmol/L $CoCl_2$ 诱导的细胞毒性,其中 100、200 和 400 μmol/L 的 NaHS 作用更加明显(图 1B)。

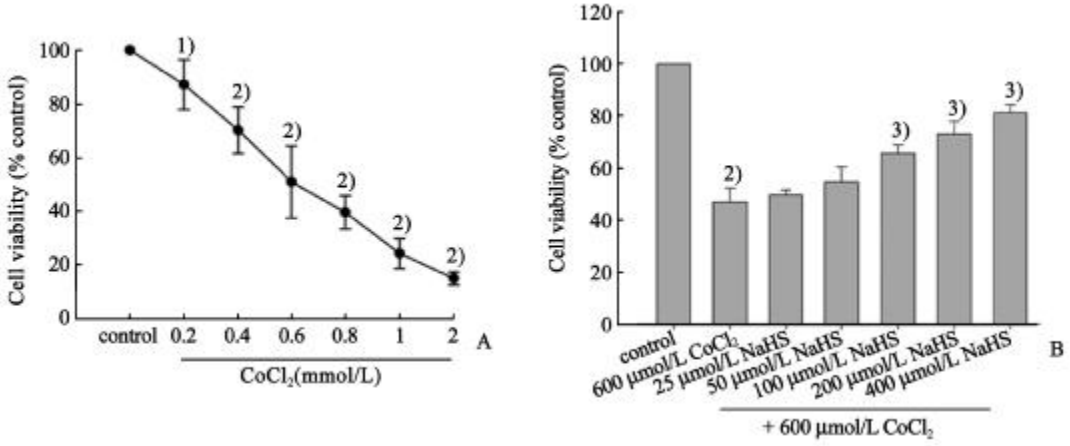


图 1　NaHS 抗 $CoCl_2$ 诱导的 PC12 细胞毒性

Fig. 1　Hydrogen sulphide protects PC12 cells against $CoCl_2$-induced cytotoxicity

A: PC12 cells were treated with indicated concentrations of $CoCl_2$; B: pretreatment with 100 ~ 400 μmol/L NaHS inhibited PC12 cells injures induced by 600 μmol/L $CoCl_2$ significantly. Cell viability was measured by the cell counter kit (CCK-8). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ *vs*. control group. 3) $P < 0.01$ *vs* 600 μmol/L $CoCl_2$-treated group.

2.2　NaHS 保护 PC12 细胞对抗 $CoCl_2$ 诱导的细胞凋亡

FCM检测的实验结果显示,200 和 400 μmol/L NaHS 均能显著地降低 600 μmol/L $CoCl_2$ 引起的 PC12 细胞凋亡率,可使细胞凋亡率从 600 μmol/L $CoCl_2$ 单纯损伤组的 (42 ± 2.8)%分别降低到(22.1 ± 3.5)%及(15.7 ± 2.6)%,(图 2B、C、D 和 G);200 和 400 μmol/L NaHS 本身不引起细胞凋亡 (图 2E、F、G)。

Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡的结果也显示，600 μmol/L $CoCl_2$ 处理 PC12 细胞 48 h 后，PC12 细胞呈现明显的凋亡特征，如细胞核浓缩、碎裂等 (图 3B)。400 μmol/L NaHS 自身不引起 PC12 细胞凋亡,细胞核呈弥漫均匀的低强度荧光(图 3D)，但其预处理 PC12 细胞 30 min 后再给 600 μmol/L $CoCl_2$ 处理，能使 $CoCl_2$ 引起的具有凋亡特征的细胞数目明显减少(图 3C)。

2.3　NaHS 抑制 $CoCl_2$ 引起的 MMP 降低

MMP 降低是细胞凋亡早期的一个重要特征。Rh123 荧光染色法可检测 MMP 的改变。图 4 显示， PC12 细胞经 600 μmol/L $CoCl_2$ 作用 24 h 后 MMP 明显降低,400 μmol/L NaHS 本身不影响 PC12 细胞的 MMP，但当其预处理 PC12 细胞 30 min 之后再给予 600 μmol/L $CoCl_2$ 作用细胞 24

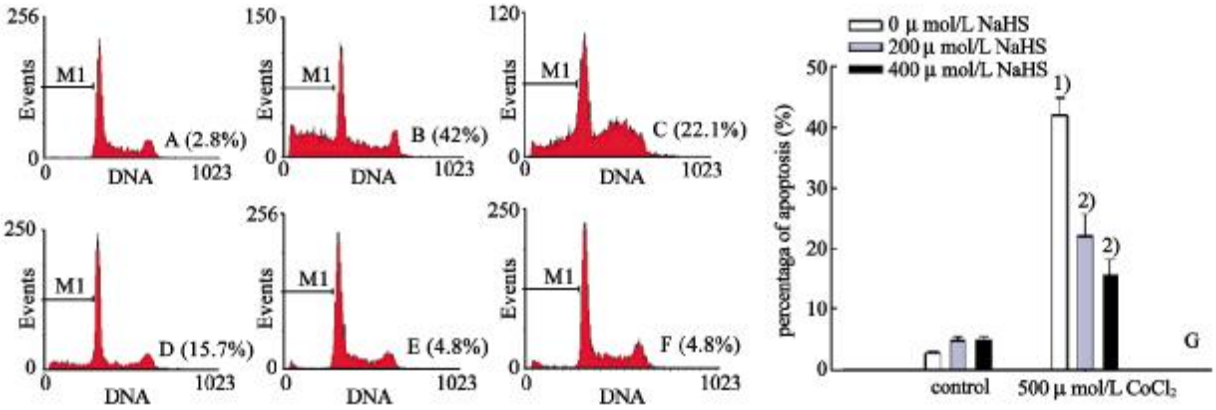


图 2 NaHS 对 $CoCl_2$ 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of NaHS on $CoCl_2$.-induced apoptosis in PC12 cells

A: control group; B: 600 μmol/L $CoCl_2$ treated alone; C: 200 μmol/L NaHS preconditioning for 30 min; D: 400 μmol/L NaHS preconditioning for 30 min; E: 200 μmol/L NaHS alone; F: 400 μmol/L NaHS alone; G: Quantitative analysis of apoptosis, Values are the mean ± SD (n = 3). 1) $P < 0.01$ *vs* the control group; 2) $P < 0.01$ *vs* the $CoCl_2$-treated group.

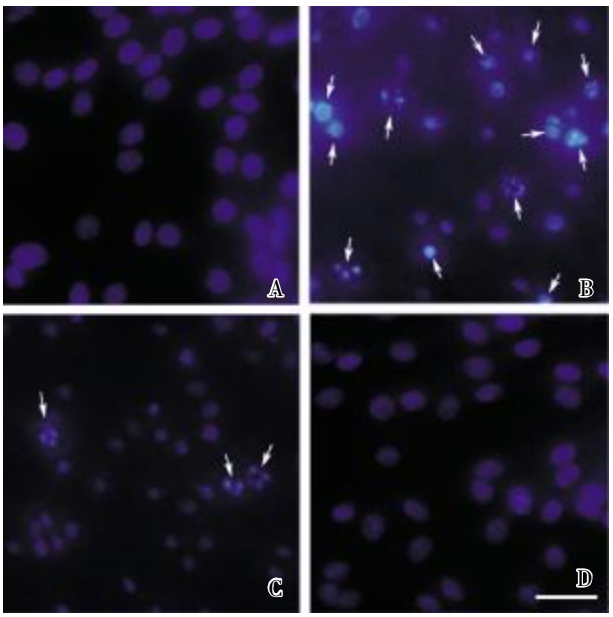


图 3 NaHS 对 $CoCl_2$ 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

Fig.3 Nuclear staining to evaluate the effect of hydrogen sulphide on apoptosis of PC12 cells induced by $CoCl_2$

The morphological changes in apoptosis of PC12 cells were dectected by Hoechst 33258 staining assay. Arrow indicated cells with apoptotic nuclear condensation and fragmentation. A: Control cells; B: PC12 cells exposed to 600 μmol/L $CoCl_2$ for 48 h; C: 400 μmol/L NaHS preconditioning group; D: 400 μmol/L NaHS alone. __: × 400.

h,能显著地抑制 600 μmol/L $CoCl_2$ 引起的 MMP 降低。

2.4 NaHS 抑制 $CoCl_2$ 引起的细胞内 ROS 生成增多

检测细胞内 DCF 的荧光强度能反映 ROS 的水平变化。荧光强度增大，表示 ROS 生成增多。图 5 显示 PC12 细胞被 600 μmol/L $CoCl_2$ 处理 3 h 后，其胞内的 DCF 荧光强度明显增多(与正常对照组比较,图 5B),表明 $CoCl_2$ 可引起胞内 ROS 生成增多。400 μmol/L NaHS 本身不影响 ROS 生成(图 5D)，但当其预处理 30 min 之后再加 600 μmol/L $CoCl_2$ 作用 PC12 细胞 3 h,胞内的 DCF 荧光强度显著减弱(图 5C),提示 NaHS 能抑制 $CoCl_2$ 引起的 PC12 细胞 ROS 生成的增加。

3 讨 论

近年，越来越多的研究证实,H_2S 可作为一种重要的具有细胞保护作用的物质。H_2S 不仅能保护大鼠大脑神经元对抗氧化应激损伤[11],还能保护 PC12 细胞对抗 $A\beta_{25\text{-}35}$ 多肽诱导的损伤[12]。为了探讨 H_2S 对抗化学性缺氧诱导神经元损伤作用的影响，本文首先探讨化学性缺氧模拟物 $CoCl_2$ 对 PC12 细胞的损伤作用。本文观察到在 200 ~ 2 000 μmol/L 的浓度范围内，$CoCl_2$ 呈浓度依赖性地降低 PC12 细胞存活率，并使细胞凋亡率明显增加。同时,$CoCl_2$ 可显著地增加 ROS 生成及降低 MMP。过多的 ROS 可损伤核酸、蛋白质和膜磷脂等重要

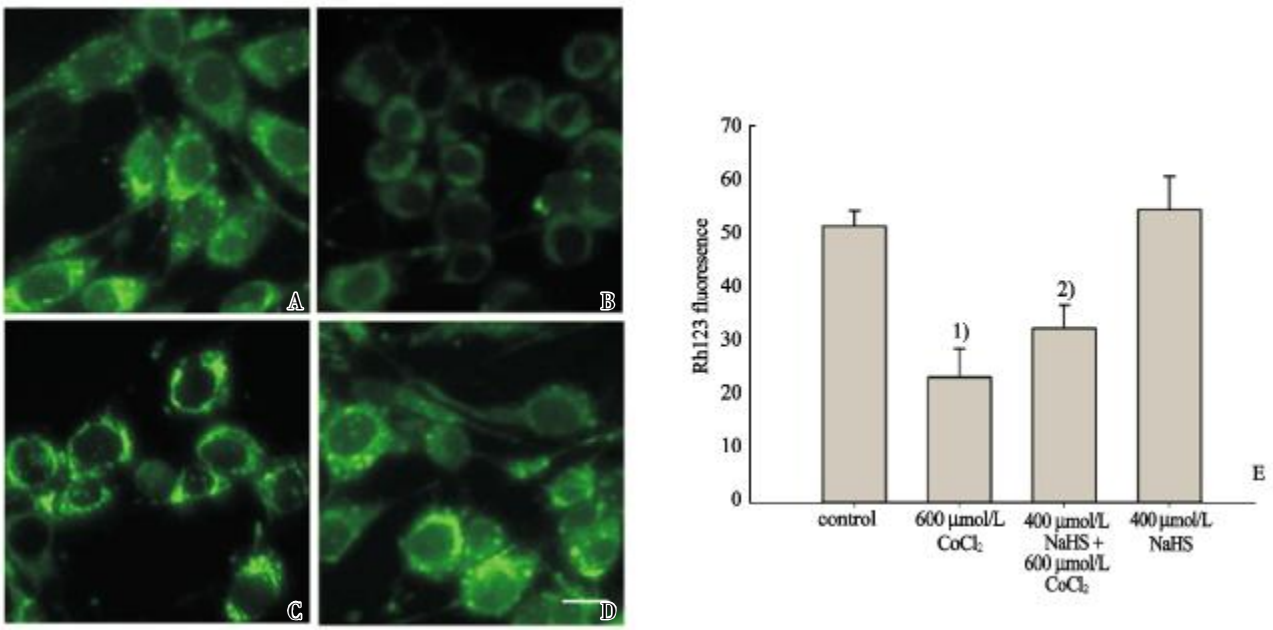


图 4　NaHS 对 $CoCl_2$ 降低细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 4　Effect of NaHS on inhibition of mitochondrial membrane potential (MMP) of PC12 cells by $CoCl_2$.

PC12 cells were exposed to different treatments for 24 h and the MMP was measured using Rh123 staining. A: the control group; B: PC12 cells exposed to 600 μmol/L $CoCl_2$ for 24 h; C: the cells were pretreated with 400 μmol/L NaHS for 30 min before $CoCl_2$ treatment; D: 400 μmol/L NaHS alone; E: Quantitative analysis of the mean fluorescence intensity (MFI) of Rh123 from 5 random fields was performed using Image J 1.41° software. Values are the mean ± SD. 1) $P < 0.01$ *vs* control; 2) $P < 0.01$ *vs* 600 μmol/L $CoCl_2$-treated group. __ : × 640

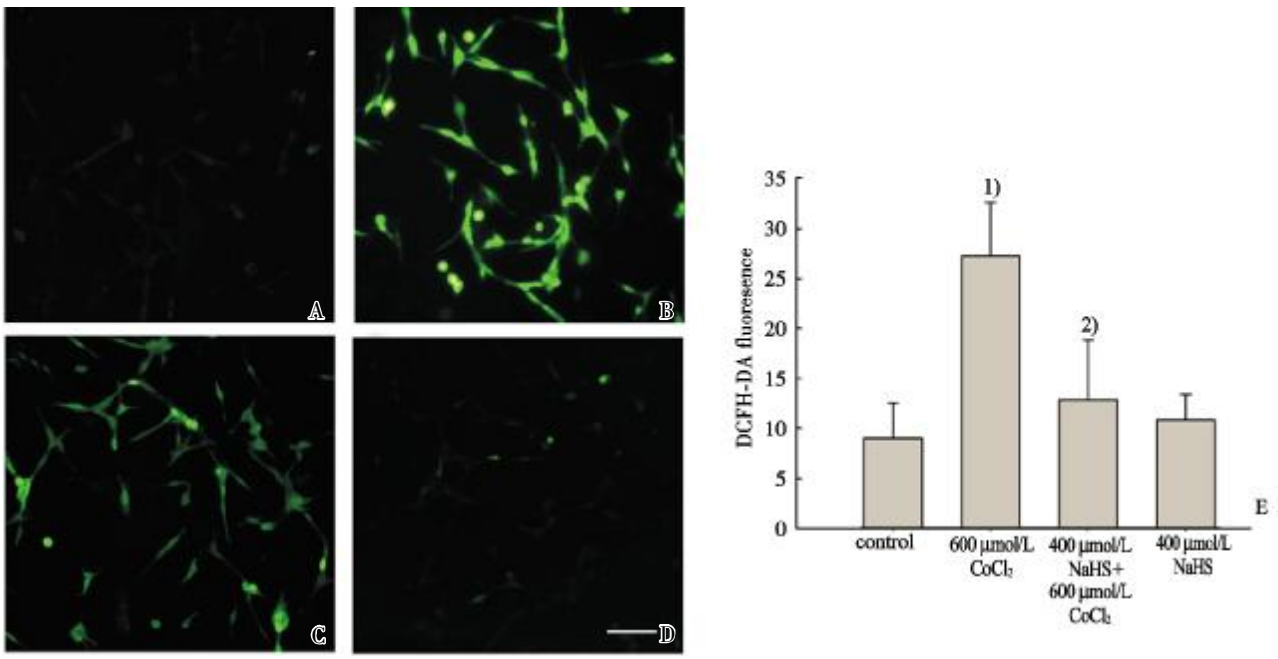


图 5　不同处理对 PC12 细胞内产生 ROS 的影响

Fig. 5　Effect of different treatments on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in PC12 cells.

PC12 cells were exposed to different treatments for 3 h and ROS were measured using DCFH-DA staining. A: control; B: 600 μmol/L $CoCl_2$ for 3 h; C: the cells were pretreated with 400 μmol/L NaHS before $CoCl_2$ treatment; D: 400 μmol/L NaHS alone; E: Quantitative analysis of the mean fluorescence intensity (MFI) of DCF from 5 random fields was performed by using Image J 1.41° software. Values are the mean ± SD. 1) $P < 0.01$ *vs* control; 2) $P < 0.01$ *vs* 600 μmol/L $CoCl_2$ alone. __: × 200

细胞成分,也可降低 MMP,从而损伤细胞。Jung 等[13]报道,$CoCl_2$ 能诱导 PC12 细胞凋亡,并引起 ROS 水平升高及 MMP 降低,这与本文的实验结果相一致。Zou 等[7]也证实,$CoCl_2$ 诱导 PC12 细胞损伤可作为一种研究与低氧相关的神经疾病发病机制的离体细胞实验模型。

重要的是本文首次证实了 NaHS 能对抗 $CoCl_2$ 引起的细胞毒性及致细胞凋亡的作用。NaHS 是硫化氢(H_2S)的供体,它在溶液中可分离出 Na^+和 HS^-, 随后 HS^- 和 H^- 生成 H_2S。本文观察到,在 100 ~ 400 μmol/L 范围内,NaHS 呈浓度依赖性的抑制 600 μmol/L $CoCl_2$ 引起的细胞毒性作用,明显提高 PC12 细胞的存活率,显著降低 $CoCl_2$ 诱导的细胞凋亡率的增加,抑制 MMP 的降低和 ROS 产生的增加,提示外源性 H_2S 具有神经细胞保护作用,能对抗 $CoCl_2$ 引起的 PC12 细胞凋亡,此作用可能与其抑制 ROS 生成增多和改善 MMP 有关。已有研究指出,H_2S 可以抑制过氧化亚硝酸盐介导的蛋白质硝化,清除 SH-SY5Y 细胞的过氧化亚硝酸盐而发挥神经保护作用[14];也可以清除过氧化氢保护多种细胞,如心肌细胞[15]及星型胶质细胞[4]。H_2S 还可以保护血管平滑肌细胞对抗缺氧引起的损伤[7]。本文在 $CoCl_2$ 诱导 PC12 细胞凋亡的实验模型上,进一步揭示了外源性 H_2S 具有抗化学性缺氧引起的氧化应激损伤和抗凋亡作用,这为深入阐明 H_2S 的抗缺氧损伤作用提供了新颖的实验依据。其进一步的作用机制还有待阐明。

本文的实验结果提示,$CoCl_2$ 模拟缺氧导致 PC12 细胞损伤的实验模型简单、易操作,可模拟在体的缺氧缺血状态,为研究缺氧缺血性神经疾病提供有效的细胞模型。

参考文献:

[1] Hideo K. Hydrogen Sulfide as a Neuromodulator [J]. Mol Neuro, 2002,26(1):13-19.

[2] Beyer K, Lao JI, Carrato C, et al. Cystathionine beta synthase as a risk factor for Alzheimer disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2004,1(2):127-133.

[3] 廖新学,唐小卿,郭瑞鲜,等. ATP 敏感钾通道在硫化氢钠对抗 β-淀粉样肽诱导细胞损伤中的作用 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2008,29(3):258-263.

[4] Ming Lu, Li-Fang Hu, Gang Hu, et al. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H_2O_2-induced neural injury via enhancing glutamate uptake [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2008,45(12):1705-1713.

[5] Blackstone E, Morrison M, Roth M. H_2S induces a suspended animation-like state in mice [J]. Science, 2005,308(5721):518-526.

[6] Blackstone E, Roth MB. Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia [J]. Shock, 2007,27(4):370-372.

[7] Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats [J]. J Appl Physiol, 2007,102(1):261-268.

[8] Zou W, Yan M, Xu W, et al. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation[J]. J Neuro Res, 2001,64(6):646-653.

[9] Jung JY, Kim WJ. Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in $CoCl_2$-induced apoptosis of rat PC12 cells [J]. Neuro Letters, 2004,371(2-3):85-90.

[10] Rukenstein A, Rydel RE, Greene LA. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation-and transcription-independent mechanisms [J]. J Neurosci, 1991,11(8):2552-2563.

[11] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress [J]. FASEB J, 2004,18(10):1165-1167.

[12] Xiao-Qing Tang, Chun-Tao Yang, Jing Chen, et al. Effect of hydrogen sulphide on β-amyloid-induces damage in PC12 cells [J]. Clin and Exp Pharmac Phys, 2008,35(2):180-186.

[13] Jung JY, Mo HC, Yang KH, et al. Inhibition by epigallocatechin gallate of $CoCl_2$-induced apoptosis in rat PC12 cells [J]. Life Sci, 2007,80(15):1355-1363.

[14] Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? [J]. J Neurochem, 2004,90(3):765-768.

[15] Geng, B, Chang, L, Pan, C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,318(3):756-763.

(编辑 孙慧兰)