三苯基锡对神经细胞蛋白酶体活性与相关蛋白水平的影响

陈曦, 时国庆*, 钟广蓉, 陈娟, 林森, 孙清

北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083

* 联系人, E-mail: shiguqing@sas.ustb.edu.cn

2009-04-24 收稿, 2009-07-21 接受

国家自然科学基金(批准号: 20677068)和环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金(编号: KF2008-12)资助项目

摘要 为研究环境中广泛存在的污染物三苯基锡(TPT)的神经毒性及其机制, 以人神经瘤母细胞(SHSY-5Y)作为实验细胞, 考察了三苯基锡暴露对其蛋白酶体活性、I κ b 蛋白、Bax 及 α -共核蛋白水平的影响。研究表明, TPT 可抑制细胞蛋白酶体活性, 导致泛素化蛋白积累, 影响 NF κ B 途径, 激活细胞死亡过程, 并诱导 α -共核蛋白的异常聚集。TPT 暴露可以导致神经毒性。

关键词
三苯基锡
蛋白酶体
 α -共核蛋白
帕金森病

三苯基锡(TPT)是环境水体中广泛存在的有机锡污染物。由于具有较强的亲脂性和较高的稳定性, 它可以在动物体内富集^[1,2]。例如, 用低剂量TPT(200 ng/L)暴露Medaka(日本青鳉) 4 周后, 其体内TPT浓度可达到约 1000 ng/g^[3]。目前对TPT毒性的研究主要集中于其生殖毒性和肝脏毒性^[4,5]。有研究发现^[6], TPT 可进入大鼠脑组织并保持化学稳定性, 这提示大脑可能是 TPT 的作用靶标。但是, 目前尚缺乏 TPT 神经毒性的相关研究。

帕金森病(Parkinsons disease, PD)又称震颤麻痹, 是一种常见的神经系统退行性疾病, 主要发生于中老年人群^[7~9]。帕金森病的主要病理特点是黑质多巴胺(Dopamine, DA)能神经元变性坏死^[10]和病人脑内路易小体(Lewys body, LB)的形成, 其中路易小体中的主要成分 α -共核蛋白(α -synuclein)的异常聚集是其重要特点^[11]。遗传因素及环境因素都有可能致帕金森病^[12,13]。近年来的大量研究证明长期农药暴露是导致帕金森病的原因之一^[14]。越来越多的证据显示^[15~17], 遗传或环境因素导致的泛素蛋白酶体系统(UPS)功能障碍在帕金森病的形成中起着重要的作用。

泛素蛋白酶体系统(UPS)是真核细胞内最重要的蛋白水解机制, 细胞内约 80%的蛋白都是通过UPS进行降解的^[18,19]。UPS由泛素(ubiquitin, Ub)、泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)和蛋白酶体组成。泛素在E1, E2, E3 的级联催化下, 生成多聚泛素并与靶蛋白共价结合, 从而被蛋白酶体识别, 将靶蛋白降解。真核细胞蛋白酶体最常见的形式是 26S 蛋白酶体, 由一个 20S 的核心颗粒和两个 19S 的帽子组成。20S 核心颗粒含有多个催化蛋白质水解的活性位点, 均位于其 β 亚基上。目前已经明确的催化活性至少有 3 个, 它们分别是肽谷氨酰胺水解酶样活性(β 1 亚基)、类胰蛋白酶活性(β 2 亚基)及类糜蛋白酶活性(β 5 亚基)^[20]。研究发现, 帕金森病患者黑质内蛋白酶体类糜蛋白酶活性有明显的下降^[15]。UPS功能的降低削弱了黑质细胞中 α -共核蛋白及其他蛋白的正常降解, 诱导黑质细胞死亡。

研究表明, TPT可以结合在蛋白酶体的 β 5 亚基上, 从而不可逆抑制真核细胞 26S蛋白酶体的类糜蛋白酶活性^[21]。因此, 我们假设长期TPT暴露, 可能抑制神经细胞蛋白酶体活性, 导致帕金森病。为验证这一

引用格式: 陈曦, 时国庆, 钟广蓉, 等. 三苯基锡对神经细胞蛋白酶体活性与相关蛋白水平的影响. 科学通报, 2009, 54: 2962~2966

Chen X, Shi G Q, Zhong G R, et al. Triphenyltin inhibition of the proteasome activity and its influence on substrate protein levels in nerve cells. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0678-1

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-19-2962>

假设,我们选择具有许多神经退行性疾病病理学特征的人骨髓神经瘤母细胞SH-SY5Y作为实验细胞^[22],考察TPT暴露对其蛋白酶体活性及 α -共核蛋白蛋白水平的影响。

1 材料和方法

() 实验细胞. 人骨髓神经瘤母细胞 SH-SY5Y, 购自中国协和医科大学基础所细胞中心。

() 主要试剂和仪器. RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司(Waltham, MA, USA), 三苯基锡, (纯度 95%)购自 Acros Organics 公司 (Morris Plains, NJ, 美国), 溶于 DMSO 中, 配成 50 mmol/L 的储存液于 4℃ 保存. 荧光底物 Z-GGL-AMC, 以及 Proteasome 抗体购自 Biomol 公司(Plymouth Meeting, PA, 美国), α -共核蛋白抗体, 细胞凋亡蛋白 (Bax)抗体, 泛素(ubiquitin)抗体, 肌动蛋白(actin) 抗体, 核转录因子 NF- κ B 的抑制蛋白(I κ B- α)抗体, 以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔和羊抗鼠二抗都购自 Santa Cruz Biotechnology 公司(Santa Cruz, CA, USA), 多功能酶标仪, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (Waltham, MA, USA)。

() 细胞培养和药物处理. SHSY-5Y 培养于 RPMI-1640 培养基中, 含 15%胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL, 置于含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内 37℃ 培养传代^[22]. 将SHSY-5Y细胞接种于培养皿内, 培养 48 h 后, 加药处理, 并设空白对照组. 所有实验均取对数生长期细胞。

() 蛋白酶体活性检测. 参考文献^[23]的方法, 以蛋白酶体类糜蛋白酶活性代表细胞蛋白酶体活性. 主要操作如下: 细胞收集后用磷酸盐缓冲液淋洗 3 次, 加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.5% NP40), 4℃ 振荡裂解 30 min 后, 12000 r/min 4℃ 离心 15 min, 收集上层清液. 用 Bradford 方法测细胞裂解液蛋白含量, 并将各组样品浓度调至相同. 向 96 孔酶标板样品孔中加入 96 μ L Tris-HCl 缓冲液、2 μ L 细胞裂解液, 蛋白酶体底物 Z-GGL-AMC, 37℃ 避光培养 2 h. 在激发波长 380 nm, 发射波长 460 nm 的条件下测量其荧光底物的荧光值。

() 细胞存活率检测. 将收集的细胞悬浊液, 立即用 0.5%台盼蓝染色 1 min, 迅速在倒置光学显微镜下观察统计, 死细胞被染成蓝色, 活细胞拒染而呈无色. 统计活细胞数和死细胞数, 计算细胞死亡率。

() 蛋白印迹分析方法. 蛋白印迹分析如前所

述^[21], 主要操作步骤是将细胞裂解液用 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分离, 结束后转至 PVDF 膜, 牛奶封闭 2 h, TBST 洗涤, 一抗 4℃ 反应过夜, TBST 洗涤, 然后与二抗 4℃ 反应 4 h, 用 TBST 漂洗后, 与 ECL 试剂反应, 在暗室中进行 X 光胶片曝光, 显影和定影。

() 统计学方法. 以上实验均重复 3 次, 所有数据以均数 $\pm$ 标准偏差($\bar{x} \pm SD$)表示. 显著性评价采用学生 *t* 检验($P < 0.05$).

2 实验结果

2.1 TPT 诱导神经细胞死亡

我们首先考察了 TPT 对人骨髓神经瘤母细胞 SHSY-5Y 的神经毒性. 取对数期细胞, 将细胞分别暴露于 DMSO, 0.1, 1 及 10 μ mol/L TPT 中^[21], 培养 12 h 后, 利用台盼蓝染色观察统计细胞存活率, 以溶剂 DMSO 处理细胞作为空白对照组, 结果如图 1 所示. 结果显示, TPT 对神经细胞具有毒性, 与 DMSO 组相比, 随着 TPT 浓度的升高, 在 0.1, 1.0 和 10 μ mol/L TPT 处理组的存活率分别为 94.8%, 52.9%和 27.7%。

图 1 不同浓度 TPT 暴露对 SHSY-5Y 细胞存活率的影响

2.2 TPT 抑制 SHSY-5Y 细胞蛋白酶体活性

蛋白酶体是 TPT 在细胞中的分子靶标之一^[21], 为了考察 TPT 对 SHSY-5Y 细胞蛋白酶体活性的影响. 我们取对数期 SHSY-5Y 细胞, 分别用 0.1~10 μ mol/L 不同浓度 TPT 暴露, 以溶剂 DMSO 作为对照, 培养 12 h 后, 收集细胞, 裂解. 取细胞裂解液, 分别测其蛋白酶体活性. 结果如图 2(a). 我们发现, 在低剂量 0.1 μ mol/L TPT 暴露下, 蛋白酶体活性略有升高, 但是随着 TPT 浓度的增加, 蛋白酶体活性迅速降低, 在 1.0 和 10 μ mol/L TPT 处理组中, 蛋白酶体活性抑制率分别为 69.5%和 97.4%。

为了进一步验证TPT对SHSY-5Y细胞蛋白酶体活性的抑制能力,我们取对数期细胞,将其分别暴露于0.1~2.5 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度 TPT中培养12 h(图2(b)),利用免疫印迹方法(Western blot)考察了TPT对细胞蛋白酶体、泛素化蛋白(Ub)、核转录因子NF- κB 的抑制蛋白I κB (inhibitor of NF- κB)、细胞凋亡蛋白Bax等的影响。结果显示,与溶剂对照组相比,TPT处理各组蛋白酶体含量有轻微增加,但各暴露组之间蛋白酶体含量变化不明显。与对照组相比,TPT暴露组泛素化蛋白发生了聚集,而且呈现浓度效应。I κB 蛋白和Bax蛋白的降解均通过泛素-蛋白酶体途径,我们的结果显示,0.1 $\mu\text{mol/L}$ TPT暴露导致I κB 蛋白和Bax蛋白的积累,表明其降解途径受到抑制。随TPT浓度的增加,I κB 蛋白和Bax蛋白水平降低,而泛素化的I κB 蛋白(分子量约56 kD)和二聚体Bax蛋白(分子量约36 kD)水平升高,这与之前的报道一致^[21]。

为考察 TPT 对 SHSY-5Y 细胞蛋白酶体抑制的时间效应,我们取对数期细胞,用1.0 $\mu\text{mol/L}$ TPT 暴露不同时间,观察其蛋白酶体活性及相关蛋白水平的变化,结果如图3所示。TPT 暴露导致细胞蛋白酶体

活性的迅速降低,暴露2 h后蛋白酶体活性降低约60%,暴露12 h后蛋白酶体活性降低75.5%(图3(a))。免疫印迹分析显示,暴露2 h后,泛素化蛋白(Ub-proteins)即显著积累(图3(b)),进一步证明了1.0 $\mu\text{mol/L}$ TPT暴露2 h即显著抑制SHSY-5Y细胞蛋白酶体活性。随TPT暴露时间的增加,细胞中泛素化I κB 蛋白的含量也逐步增加,说明其降解途径受到了抑制。TPT暴露4 h后,细胞促凋亡蛋白Bax含量开始升高,暴露8 h后,Bax二聚体蛋白含量明显升高,表明发生了钙依赖型蛋白酶Calpain的活化^[24],提示启动了细胞死亡的生化过程。

图2 不同浓度TPT暴露对蛋白酶体相关蛋白表达量的影响
(a) 不同浓度TPT暴露对蛋白酶体活性的影响; (b) 不同浓度TPT暴露对相关蛋白表达量的影响

图3 不同时间TPT暴露对蛋白酶体及相关蛋白表达量的影响
(a) 不同时间TPT暴露对蛋白酶体活性的影响; (b) 不同时间TPT暴露对相关蛋白表达量的影响

2.3 TPT 暴露导致 α -共核蛋白的异常聚集

作为路易小体(Lewys body, LB)的重要组成成分, α -共核蛋白的异常聚集是帕金森病的主要病理特征之一^[25]。为考察TPT暴露是否引起神经细胞 α -共核蛋白的异常积聚,我们分别用0.1~2.5 $\mu\text{mol/L}$ TPT暴露SHSY-5Y细胞12 h,以溶剂DMSO作为对照,考察细胞中 α -共核蛋白的含量变化,结果如图4所示。 α -共核蛋白是短周期蛋白,可通过蛋白酶体途径迅速降解,因此DMSO对照组未有 α -共核蛋白检出。利用 α -共核蛋白多克隆抗体,可以在TPT暴露组检测到分

子量分别为 19, 36, 50, 65 kD 的 4 个条带。其中, 19 kD 条带为 α -共核蛋白单体, TPT 暴露导致了 α -共核蛋白的积累, 但各暴露组间差异不明显。3 个条带为 α -共核蛋白的聚集体^[26]。我们注意到, 不同 TPT 暴露浓度下, α -共核蛋白的聚集体的存在形式不同。低剂量暴露下, α -共核蛋白的聚集体主要以三聚体或四聚体的形式存在, 而高剂量下则主要以二聚体形式存在。利用 1.0 $\mu\text{mol/L}$ TPT 处理 SHSY-5Y 细胞, 考察 α -共核蛋白异常积聚的动力学效应发现, 暴露 2 h, α -共核蛋白出现明显积累; 暴露 4 h, 二聚体形式 α -共核蛋白形成, 暴露 8 h, 三聚体或四聚体 α -共核蛋白形成, 暴露 12 h 后, 三聚体或四聚体 α -共核蛋白水平降低, 更多的 α -共核蛋白形成二聚体。

3 讨论

长期以来, 人们对于 TPT 的毒性研究主要集中在肝脏毒性和生殖毒性方面, 其神经毒性并不清楚。我们的研究表明, 随着 TPT 浓度的增加, SHSY-5Y 细

胞存活率逐步下降, 显示 TPT 可能具有神经毒性。

对细胞蛋白酶体的抑制是 TPT 导致细胞死亡的途径之一^[21]。I κ b 蛋白和 Bax 蛋白的降解均通过泛素-蛋白酶体途径, 其作为蛋白酶体直接作用靶标, 我们用 TPT 暴露均可以导致 SHSY-5Y 细胞中泛素化 I κ b 蛋白和 Bax 蛋白的积累(图 2(b)), 显示蛋白酶体活性被抑制。但是, 在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TPT 暴露组测到的蛋白酶体活性有轻微升高。我们认为, 这可能是因为 TPT 对蛋白酶体的抑制诱导细胞应激响应, 导致蛋白酶体核心蛋白(20S)表达量升高(图 2(b))。从而总体表现为蛋白酶体活性的升高。由于泛素化蛋白的降解需要通过 26S 蛋白酶体, 而 TPT 暴露并未改变细胞内 26S 蛋白酶体的水平, 或 26S 蛋白酶体水平的升高并不足以抵消 TPT 对其活性位点的抑制, 从而导致泛素化蛋白的积累。

我们发现, 低浓度 TPT 暴露导致细胞内 I κ b 蛋白积累, 而高浓度 TPT 暴露导致细胞内 I κ b 蛋白含量降低, 而泛素化 I κ b 蛋白积累(图 2(b))。I κ b 蛋白是 NF κ B 的抑制蛋白, I κ b 蛋白从 NF κ B 二聚体蛋白上解离并发生泛素化是 NF κ B 活化的关键步骤。而 NF κ B 活化与神经变性疾病的发生密切相关^[27]。因此, 我们的研究暗示 TPT 暴露可能导致神经变性疾病的发生。

我们发现 TPT 暴露组出现 α -共核蛋白聚集体(图 4), 而 α -共核蛋白需要通过蛋白酶体途径快速降解。我们注意到蛋白酶体活性的抑制发生在细胞中 α -共核蛋白聚集体形成之前(图 3(b), 图 4(b)), 因此, 我们认为蛋白酶体活性的抑制是导致 α -共核蛋白的积累和聚集体形成的原因之一。 α -共核蛋白的聚集反过来又可能加剧蛋白酶体的功能损伤, 从而进入一个恶性循环。

我们的研究强烈暗示 TPT 具有神经毒性, 其致毒途径之一是通过抑制细胞蛋白酶体活性, 进而导致神经细胞内蛋白的异常聚集及细胞内环境的紊乱, 最终导致神经元细胞的死亡。

图 4 不同浓度和不同时间 TPT 暴露对 α -共核蛋白表达的影响

(a) 不同浓度 TPT 暴露对 α -共核蛋白表达量的影响; (b) 不同时间 TPT 暴露对 α -共核蛋白表达量的影响

参考文献

- 1 Harino H, Ohji M, Wattayakorn G, et al. Accumulation of organotin compounds in tissues and organs of dolphins from the coasts of Thailand. Arch Environ Contam Toxicol, 2008, 54: 145—153^[DOI]
- 2 Hoch M. Organotin compounds in the environment —an overview. Appl Geochem, 2001, 16: 719—743^[DOI]
- 3 Zhang Z, Hu J, Zhen H, et al. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on Medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. Environ Sci Technol, 2008, 42: 8133—8139^[DOI]

- 4 Grote K, Hobler C, Andrade A J, et al. Effects of in utero and lactational exposure to tributyltin chloride on pregnancy outcome and postnatal development in rat offspring. *Toxicology*, 2007, 238: 177—185[DOI]
- 5 Shunji U, Takashige K, Nobuyuki S, et al. Effects of butyltin compounds on mitochondrial respiration and its relation to hepatotoxicity in mice and Guinea pigs. *Toxicol Sci*, 2003, 75: 201—207[DOI]
- 6 Ohhira S, Matsui H. Comparative study of the metabolism of triphenyltin in hamsters and rats after a single oral treatment with triphenyltin chloride. *Toxicol Lett*, 1996, 85: 3—8[DOI]
- 7 Nutt J G, Wooten G F. Clinical practice diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1021—1027[DOI]
- 8 Elbaz A, Bower J H, Maraganore D M, et al. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol*, 2002, 55: 25—31[DOI]
- 9 De Rijk M C, Launer L J, Breteler M M, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology*, 2000, 54: S21—S23
- 10 Birkmayer W, Hornykiewicz O. The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr*, 1961, 73: 787—788
- 11 Forno L S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996, 55: 259—272[DOI]
- 12 Gandhi S, Wood N W. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: 2749—2755[DOI]
- 13 Savitt J M, Dawson V L, Dawson T M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: Molecules to medicine. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1744—1754[DOI]
- 14 Sun F, Kanthasamy A, Anantharam V, et al. Environmental neurotoxic chemicals-induced ubiquitin proteasome system dysfunction in the pathogenesis and progression of Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*, 2007, 114: 327—344[DOI]
- 15 McNanght K S, Olanow C W, Halliwell B, et al. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2: 289—294
- 16 Dinis-Oliveira R J, Remiao F, Carmo H, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 2006, 27: 1110—1122[DOI]
- 17 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998, 392: 605—608[DOI]
- 18 Goldberg A L. Functions of the proteasome: From protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35: 12—17[DOI]
- 19 Goldberg A L. Functions of the proteasome: The lysis at the end of the tunnel. *Science*, 1995, 268: 522—523[DOI]
- 20 Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, et al. The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25200—25209[DOI]
- 21 Shi G, Chen D, Zhai G, et al. The proteasome is a molecular target of environmental toxic organotins. *Enviro Health Perspect*, 2009, 117: 378—386
- 22 Ding Q, Dimayuga E, Martin S, et al. Characterization of chronic low level proteasome inhibition on neuronal homeostasis. *J Neurochem*, 2003, 86: 489—497[DOI]
- 23 Sun F E, Anantharam V, Latchoumycandane C, et al. Dieldrin induces ubiquitin-proteasome dysfunction in α -synuclein overexpressing dopaminergic neuronal cells and enhances susceptibility to apoptotic cell death. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315: 69—79[DOI]
- 24 Gao G, Dou Q P. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem*, 2000, 80: 53—72[DOI]
- 25 Balaban C D, O'Callaghan J P, Billingsley M L. Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: Comparative studies using silver degeneration stains, immunocytochemistry and immunoassay for neuronotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience*, 1988, 26: 337—361[DOI]
- 26 Oluwatosi-chiqbu Y, Robbins A, Scott C W, et al. Parkin suppresses wild-type alpha-synuclein-induced toxicity in SHSY-5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309: 679—684[DOI]
- 27 苏畅, 邓玉林, 庆宏. NF- κ B 在学习记忆以及神经变性疾病中的分子作用机制. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5: 432—435