

氯化锰致人骨髓神经母细胞瘤细胞株线粒体损伤及对多巴胺分泌和 *PARK2* 表达的影响

范希敏^{1a}, 罗英^{1a}, 许洁^{1a}, 吴芹^{1b}, 刘杰^{1b}, 范奇元²

摘要:

[目的] 研究氯化锰对人骨髓神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)线粒体损伤、氧化应激、多巴胺分泌及 *PARK2* 表达的影响。

[方法] 0、100、300、500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度氯化锰染毒 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 用 MTT 法测细胞抑制率(反映线粒体损伤情况), 石墨炉原子吸收光谱法测定细胞内锰浓度, 高度水溶性四唑盐(WST-1)法测定细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性, 硫代巴比妥酸法测定细胞内丙二醛(MDA)含量, 反相高效液相色谱-荧光法测定细胞内多巴胺(DA)含量, 实时荧光定量-PCR 检测 *PARK2* mRNA 表达, 蛋白免疫印迹法检测 Parkin 蛋白表达。

[结果] 与对照组比较, MnCl_2 浓度为 300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞抑制率(线粒体损伤)增高($P < 0.01$)。与对照组比较, 染锰组细胞内锰浓度升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, MnCl_2 浓度为 300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时, SOD 活性和 DA 含量降低($P < 0.01$), MDA 含量升高($P < 0.01$); 细胞 *PARK2* mRNA 表达和 Parkin 蛋白表达降低($P < 0.01$)。相关性分析显示, *PARK2* mRNA 表达与细胞抑制率(线粒体损伤)、细胞内锰浓度及 MDA 含量呈负相关, r 值分别为 -0.872、-0.880、-0.862(均 $P < 0.01$); *PARK2* mRNA 表达与 SOD 活性、DA 含量以及 Parkin 蛋白表达呈正相关, r 值分别为 0.879、0.859、0.809(均 $P < 0.01$)。

[结论] 氯化锰暴露可引起 SH-SY5Y 细胞的线粒体损伤、氧化应激、DA 分泌减少和 *PARK2* 表达下降。

关键词: 氯化锰; 人骨髓神经母细胞瘤细胞株; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 多巴胺; *PARK2*

引用: 范希敏, 罗英, 许洁, 等. 氯化锰致人骨髓神经母细胞瘤细胞株线粒体损伤及对多巴胺分泌和 *PARK2* 表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(8): 707-711, 717. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17123

Effects of manganese chloride on mitochondrial damage, dopamine secretion, and expression of *PARK2* in human bone marrow neuroblastoma cells FAN Xi-min^{1a}, LUO Ying^{1a}, XU Jie^{1a}, WU Qin^{1b}, LIU Jie^{1b}, FAN Qi-yuan² (1.a.School of Public Health b.Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2.Department of Health Management, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi, Guizhou 563003, China). Address correspondence to FAN Qi-yuan, E-mail: 1719975989@qq.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To study the effects of manganese chloride (MnCl_2) on mitochondrial damage, oxidative stress, secretion of dopamine, and expression of *PARK2* in human bone marrow neuroblastoma cells (SH-SY5Y).

[Methods] SH-SY5Y cells were exposed to MnCl_2 (0, 100, 300, and 500 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. MTT assay was used to measure inhibition rate of the cells (mitochondrial damage), graphite furnace atomic absorption spectrometry for intracellular manganese concentration, water soluble tetrazolium salt (WST-1) assay for superoxide dismutase (SOD) activity, thiobarbituric acid assay for malondialdehyde (MDA) level, reverse phase high performance liquid chromatography-fluorometry for dopamine (DA) level, RT-PCR for the expression of *PARK2* mRNA, and Western blot for the expression of Parkin protein, respectively.

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81260420); 贵州省自然科学基金(编号: 黔科合 sy 字[2012]3140); 遵义医学院基础药理省部共建教育部重点实验室开放课题(编号: 2014-2)

[作者简介] 范希敏(1991—), 女, 硕士生; 研究方向: 金属毒理; E-mail: ximinfan@sina.com

[通信作者] 范奇元, E-mail: 1719975989@qq.com

[作者单位] 1.遵义医学院 a.公共卫生学院 b.基础药理省部共建教育部重点实验室, 贵州 遵义 563003; 2.遵义医药高等专科学校卫生管理系, 贵州 遵义 563003

[Results] The cell inhibition rates (mitochondrial damage) of the 300 and 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 groups were increased compared with the control group ($P < 0.01$). The intracellular manganese concentration of the SH-SY5Y cells was increased in the MnCl_2 groups compared with the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the control group, decreasing SOD activities and DA levels and increasing MDA levels were observed in the 300 and 500 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 groups ($P < 0.01$). At the same time, the expressions of *PARK2* mRNA and Parkin protein were also decreased ($P < 0.01$). The results of correlation analysis revealed that the expression of *PARK2* mRNA was inversely correlated with cell inhibition rate (mitochondrial damage) ($r = -0.872$), intracellular manganese concentration ($r = -0.880$), and MDA level ($r = -0.862$) (all $P_s < 0.01$), respectively; the expression of *PARK2* mRNA was positively correlated with SOD activity ($r = 0.879$), DA level ($r = 0.859$), and the expression of Parkin protein ($r = 0.809$) (all $P_s < 0.01$), respectively.

[Conclusion] MnCl_2 exposure could induce mitochondrial damage, oxidative stress, and decreased DA secretion and expression of *PARK2* in SH-SY5Y cells.

Keywords: manganese chloride; human bone marrow neuroblastoma cells; superoxide dismutase; malondialdehyde; dopamine; *PARK2*

Citation: FAN Xi-min, LUO Ying, XU Jie, et al. Effects of manganese chloride on mitochondrial damage, dopamine secretion, and expression of *PARK2* in human bone marrow neuroblastoma cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(8): 707-711, 717. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17123

锰(manganese, Mn)是地壳中天然存在量较为丰富的元素,它是机体正常生长、发育和维持细胞内稳态所需的微量元素^[1-2]。锰暴露主要发生在职业暴露和生活环境暴露,前者如铁合金冶炼、采矿、干电池生产,以及玻璃和陶瓷的制造,后者可见于用甲基-环戊二烯基三羰基锰作为汽油抗爆剂、含锰农药如代森锰(Maneb)的杀真菌剂、高锰酸盐作为饮用水净化剂等,多种机会均使得普通人群锰暴露增加^[3-5]。尽管锰对于代谢功能是必需的,但是高剂量的锰暴露可能导致以中枢神经系统受损为主要表现的锰中毒。综合国内外文献,锰中毒的机制可能包括线粒体损伤、氧化应激和对多巴胺神经元损伤等方面。锰中毒的特征是中毒症状类似于特发性帕金森病^[6],又称帕金森病(Parkinson's disease, PD),例如步态障碍(“公鸡走路”)等。*PARK2*基因又称*Parkin*基因,是常染色体隐性遗传的青少年型帕金森综合征的致病基因^[7],其表达产物Parkin蛋白是一种E3泛素蛋白连接酶,能泛素化多种底物^[8]。Parkin可以促进由急性神经毒素暴露引起的PD中多巴胺能神经元的存活^[9]。在PD中Parkin蛋白的功能丧失会导致多巴胺能细胞死亡^[10]。在细胞模型中,Parkin的表达可以恢复胶质细胞源性神经营养因子/受体酪氨酸激酶缺陷细胞中的线粒体功能^[11]。诱导Parkin表达可以保护纹状体多巴胺能神经末梢免受甲基苯丙胺(冰毒)诱导的神经毒性^[12]。据文献报道,*PARK2*可通过抑制氧化应激反应降低氧化损伤和线粒体自噬功能,并保护多巴胺能神经元等方面对神经系统起保护作用^[13]。虽然*PARK2*在维持

神经细胞的正常功能中发挥着重要作用,且本课题组前期动物实验结果显示,锰暴露可导致大鼠*PARK2* mRNA表达水平降低^[14],但关于锰暴露所引起的线粒体损伤、氧化应激和对多巴胺能神经元的影响与*PARK2*改变之间的关系尚不完全清楚,故选择人骨髓神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)为本实验的研究对象,从细胞分子水平开展研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

氯化锰(MnCl_2)·4 H_2O 、引物合成[生工生物工程(上海)股份有限公司,中国],硝酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心,中国),锰溶液标准品(1.000 g/L)(上海市计量测试技术研究院,中国),DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone,美国),胎牛血清(Gibco,美国),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国),Trizol、逆转录试剂盒(Takara,日本),多巴胺(dopamine, DA)标准品(Sigma,美国),Parkin抗体(Abcam,英国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及染毒 SH-SY5Y细胞购于美国标准生物制品收藏中心,细胞培养于含有10%(体积分数,后同)胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养液中,置于37℃、5% CO_2 培养箱内孵育。根据 MnCl_2 的浓度(0、100、300、500 $\mu\text{mol/L}$)将细胞分为4组(对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组),染毒时间为24 h。

1.2.2 MTT法测细胞抑制率 消化细胞制成细胞悬液,用细胞计数仪进行计数,以 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,过夜培养后;换配制好的含不同 MnCl_2 浓度的培养液,培养24 h;每孔加入20 μL MTT工作液(避光操作),继续培养4 h;弃培养液,每孔加入DMSO 150 μL ,使结晶充分溶解,用酶标仪测 D 值,波长为490 nm。细胞线粒体的损伤状况用细胞抑制率来反映,细胞抑制率 $= (D_{\text{对照组}} - D_{\text{实验组}}) / D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞内锰含量的测定 细胞的消化^[15]:收集细胞,并进行细胞计数;向收集的细胞加入200 μL 浓硝酸,恒温水浴箱孵育2 h(60 $^{\circ}\text{C}$)。用石墨炉原子吸收光谱法测定细胞内锰含量。

1.2.4 细胞内SOD活性和MDA含量的测定 用BCA(bicinchoninic acid)法测定细胞样本中的蛋白含量,然后采用高度水溶性四唑盐法和硫代巴比妥酸法分别测定SOD活性和MDA含量。

1.2.5 细胞内DA含量的测定 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)-荧光法测定细胞内DA含量,色谱条件: Eclipse XD_B-C18(5 μm , 4.8 mm $\times$ 150 mm);流动相: 甲醇:缓冲液[含0.02 mol/L柠檬酸(一水)-0.05 mol/L碳酸氢钠]=20:80,流速0.8 mL/min;柱温25 $^{\circ}\text{C}$;荧光检测激发波长 $\lambda_{\text{EX}}=280$ nm,发射波长 $\lambda_{\text{EM}}=330$ nm。先进行线性范围、重复性、稳定性及加样回收率的考察,经过方法学验证后,收集染毒细胞用0.2 mol/L高氯酸500 μL 处理后离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 $\times g$, 10 min),取上清10 μL 立即作HPLC检测。

1.2.6 *PARK2* mRNA表达 使用实时荧光定量-PCR测定SH-SY5Y细胞*PARK2* mRNA表达。收集细胞采用Trizol提取细胞中总RNA,测定样本中RNA的浓度,然后用逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA(引物序列见表1)。最后用IQTM SYBR Green Supermix进行RT-PCR定量,反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 1个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 1个循环;80 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 80个循环。结果分析(相对定量法):以 C_t 值为统计参数计算, C_t 均值=(样品 C_t 值+副孔 C_t 值)/2,中间值=sum(C_t 均值)/样品数, $\Delta C_t=C_t$ 均值-中间值,基因表达量 $=2^{-\Delta C_t}$,相对定量=目的基因表达

量/内参基因表达量 $\times 100\%$,设对照组相对定量的均数为100%。

1.2.7 Parkin蛋白表达 使用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Parkin蛋白表达。收集细胞加入裂解液提取蛋白,用BCA法进行蛋白定量。蛋白变性后上样、电泳、电转,孵脱脂牛奶、一抗(1:200)和二抗,用移液枪将显影剂均匀打在膜上,曝光,最后用凝胶图象分析系统进行分析,计算目的蛋白相对含量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0对数据进行单因素方差分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;使用Pearson相关系数来评估指标之间的关联。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞内锰浓度

与对照组比较,不同浓度染锰组细胞内锰浓度均有增高($P<0.05$),见表2。

2.2 细胞抑制率

与对照组比较, MnCl_2 浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞抑制率无明显变化($P>0.05$); MnCl_2 浓度为300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞抑制率增高($P<0.01$),见表2。

表2 不同浓度 MnCl_2 染毒后细胞内锰浓度($n=3$)及细胞抑制率($n=6$)($\bar{x} \pm s$)

MnCl_2 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞内锰浓度 ($\text{ng}/10^5\text{cell}$)	D_{490}	细胞抑制率(%)
0	9.508 ± 0.997	0.866 ± 0.012	0
100	$12.433 \pm 0.485^*$	0.847 ± 0.012	2.217 ± 1.577
300	$27.720 \pm 1.428^{**}$	$0.799 \pm 0.015^{**}$	$10.018 \pm 2.497^{**}$
500	$52.583 \pm 2.054^{**}$	$0.713 \pm 0.026^{**}$	$17.630 \pm 2.780^{**}$
F	622.379	77.176	93.886
P	0.000	0.000	0.000

[注]与对照组比较,*: $P<0.05$;**: $P<0.01$ 。

2.3 细胞内SOD活性、MDA和DA含量

与对照组比较, MnCl_2 浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内SOD活性、MDA和DA含量无明显变化($P>0.05$); MnCl_2 浓度为300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内SOD活性和DA含量明显降低($P<0.01$),细胞内MDA含量明显增加($P<0.01$),见表3。

2.4 细胞*PARK2* mRNA和Parkin蛋白的表达

与对照组比较, MnCl_2 浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞*PARK2* mRNA和Parkin蛋白的表达无明显变

表1 RT-PCR的引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
β -actin (NM_001099771)	GGGGCATGCATCAGAAAGAG	GCAGCTCGTTGTAGAAGGTG
<i>PARK2</i> (NM_013987)	AAAGGCCCTGTCAAAGACT	TTGTTGCGATCAGGTGCAAA

化($P>0.05$); MnCl_2 浓度为 300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞 *PARK2* mRNA 和 Parkin 蛋白的表达明显降低($P<0.01$), 见表 4。

表 3 不同浓度 MnCl_2 染毒后细胞内 SOD 活性、MDA 和 DA 含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MnCl_2 ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	DA ($\mu\text{g/L}$)
0	83.712 $\pm$ 2.219	1.195 $\pm$ 0.180	2.768 $\pm$ 0.063
100	79.567 $\pm$ 5.443	1.582 $\pm$ 0.270	2.717 $\pm$ 0.070
300	65.715 $\pm$ 5.721**	3.900 $\pm$ 0.533**	2.221 $\pm$ 0.060**
500	46.747 $\pm$ 7.212**	5.901 $\pm$ 0.588**	1.568 $\pm$ 0.099**
<i>F</i>	27.967	78.446	168.670
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

[注]**: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

表 4 不同浓度 MnCl_2 染毒后细胞 *PARK2* mRNA 和 Parkin 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MnCl_2 ($\mu\text{mol/L}$)	<i>PARK2</i> mRNA (%)	Parkin
0	100.000 $\pm$ 16.126	0.451 $\pm$ 0.042
100	82.834 $\pm$ 14.651	0.437 $\pm$ 0.011
300	51.641 $\pm$ 10.860**	0.330 $\pm$ 0.022**
500	35.717 $\pm$ 6.508**	0.230 $\pm$ 0.016**
<i>F</i>	16.082	48.564
<i>P</i>	0.001	0.000

[注]**: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

2.5 *PARK2* mRNA 表达与各指标间的相关分析

PARK2 mRNA 表达与细胞内锰浓度($r=-0.880$, $P<0.01$)、细胞抑制率($r=-0.872$, $P<0.01$), 及 MDA 含量($r=-0.862$, $P<0.01$)呈负相关; *PARK2* mRNA 表达与 SOD 活性($r=0.879$, $P<0.01$)、DA 含量($r=0.859$, $P<0.01$), 及 Parkin 蛋白表达($r=0.809$, $P<0.01$)呈正相关。

3 讨论

SH-SY5Y 细胞是人骨髓神经母细胞瘤细胞株, 该细胞与正常多巴胺能神经细胞在功能上相似, 因此广泛应用于神经系统退行性病变(如 PD)的发病机制和防治措施的研究。此外, 该细胞的种属为人类, 更适合作为人群疾病的体外实验。

华丰等^[16]发现 MnCl_2 浓度为 200~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 SH-SY5Y 细胞的生长增殖有显著的抑制作用。本实验的预试结果显示, MnCl_2 浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞有明显的抑制作用。结合文献及预实验结果, 设置染毒组: 以 0 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 为对照组, 100 $\mu\text{mol/L}$ 为低剂量组, 300 $\mu\text{mol/L}$ 为中剂量组, 500 $\mu\text{mol/L}$ 为高剂量组。

线粒体是细胞有氧呼吸和供能的场所, 细胞生命活动的能量 95% 来源于线粒体。申玲等^[17]发现锰可导致大鼠肝脏线粒体氧化损伤, 主要表现在引起大鼠肝线粒体通透转换孔开放、膜电位下降。本实验采用 MTT 法, 通过检测活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为蓝紫色结晶甲瓚的能力来反映线粒体的功能。还原的甲瓚越多, 线粒体的功能越好, 甲瓚的量通过 *D* 值来反应。虽然细胞抑制率指标比较单一, 但测定方法简单, 稳定性好, 是反应线粒体损伤的综合性指标, 应用广泛。本实验结果显示, 与对照组比较, MnCl_2 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞抑制率无明显变化($P>0.05$); MnCl_2 浓度为 300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞抑制率增高($P<0.01$), 表明一定剂量的锰暴露可以导致线粒体损伤, 影响线粒体功能, 该作用可能参与了锰致神经细胞损害的过程。但锰如何对线粒体造成损伤的机制尚需进一步研究。

氧化应激是机体失衡的一种表现, 具体表现为体内氧化和抗氧化作用之间的平衡被破坏, 会造成细胞的损伤。锰暴露后产生活性氧具有氧化细胞生物分子的能力, 促进细胞损伤, 最终导致凋亡^[18]。SOD 活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力; MDA 的含量可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接地反映细胞受到自由基攻击损伤的严重程度。本实验结果显示, 与对照组比较, MnCl_2 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量无明显变化($P>0.05$); MnCl_2 浓度为 300、500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞内 SOD 活性明显降低($P<0.01$), 细胞内 MDA 含量明显增加($P<0.01$)。实验结果提示锰诱导 SH-SY5Y 细胞发生氧化损伤, 具体表现为 SOD 活性降低导致自由基的清除能力降低, 抗氧化能力降低; MDA 含量增加表明自由基增多, 引发脂质过氧化造成细胞损伤。氧化损伤抑制 SOD 活性使得机体清除氧自由基的能力下降, 导致自由基堆积, MDA 含量增加。

DA 是脑内一种重要的用来帮助细胞传送脉冲的单胺类神经递质, 是人中枢神经系统中最重要的儿茶酚胺神经递质之一, 并且涉及许多行为反应和脑功能。DA 低于正常水平可导致不同的神经退行性疾病。邓宇等^[19]发现锰可能通过下调多巴胺转运体 DAT 和多巴胺受体 DRD1 和 DRD2 的表达, 造成多巴胺能神经系统损伤, DA 含量降低。本实验结果显示, 与对照组比较, MnCl_2 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞内 DA 含量无明显变化($P>0.05$); MnCl_2 浓度为 300、500 $\mu\text{mol/L}$

时,细胞内DA含量明显降低($P<0.01$)。结果提示,锰暴露能够损伤多巴胺能神经元抑制DA的分泌,使DA含量减少。

PD与锰中毒不仅在临床症状上表现相似,在病理生理机制上也存在相似,如线粒体功能障碍、氧化应激、蛋白质聚集、自噬功能受损、异常信号转导等^[20]。目前发现9个基因的共13个基因位点与PD的发病相关,它们分别命名为*PARK* 1~13,而*PARK2*的功能缺失、突变与常染色体隐性遗传的青少年型帕金森综合征相关,其特征是早期发作^[21-24]。*PARK2*基因突变可出现细胞内蛋白降解障碍,使蛋白降解受阻、相互积聚,引起神经毒性。在正常大脑组织中特别是黑质区Parkin蛋白表达丰富。本实验结果显示,与对照组比较,MnCl₂浓度为100 μmol/L时,细胞*PARK2*表达无明显变化($P>0.05$);MnCl₂浓度为300、500 μmol/L时,细胞*PARK2*表达明显降低($P<0.01$)。结果提示,锰暴露可导致*PARK2*表达降低,这可能与细胞功能受损有关。

本课题组前期研究结果显示,在大鼠中亚慢性锰暴露导致脑组织(纹状体、皮质)和血液中*PARK2* mRNA表达降低,并伴随运动协调能力降低,酪氨酸羟化酶免疫组织化学染色表明锰暴露可损伤黑质中多巴胺能神经元,这可能与*PARK2* mRNA表达降低有关^[14]。本实验结果也表明,SH-SY5Y细胞锰暴露后*PARK2*表达降低。

本实验使用Pearson相关系数来评估指标之间的关联。相关性分析提示,锰暴露引起的线粒体损伤、氧化损伤和DA分泌减少可能与*PARK2*表达下降有关。

本实验从细胞分子水平对锰暴露引起的线粒体损伤、氧化应激和对多巴胺能神经元的影响与*PARK2*改变之间的关系进行研究,发现锰暴露可引起SH-SY5Y细胞的线粒体损伤、氧化应激、DA分泌减少和*PARK2*表达下降。在今后的研究中为了进一步明确*PARK2*与锰暴露的关系可进行*PARK2*的沉默和过表达实验,从正反两方面来进行研究。

参考文献

- [1] Chen P, Chakraborty S, Peres TV, et al. Manganese-induced neurotoxicity: from *C. elegans* to humans[J]. Toxicol Res (Camb), 2015, 4(2): 191-202.
- [2] 李威, 谭相石. 锰离子转运、代谢与稳态平衡调控[J]. 生命科学, 2012, 24(8): 867-880.
- [3] Burton NC, Guilarte TR. Manganese neurotoxicity: lessons learned from longitudinal studies in nonhuman primates[J]. Environ Health Perspect, 2009, 117(3): 325-332.
- [4] 孙中兴, 姜永根, 王海银. 锰的人体暴露水平与控制措施[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(6): 379-382.
- [5] 王充, 徐雷, 郑琳. 汽油抗爆剂甲基环戊二烯三羰基锰对广州大气污染的评价[J]. 现代预防医学, 2007, 34(7): 1300-1302.
- [6] Benedetto A, Au C, Aschner M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease[J]. Chem Rev, 2009, 109(10): 4862-4884.
- [7] 国华, 宋军平. 帕金森病发病机制最新国内外研究进展[J]. 职业与健康, 2012, 28(4): 490-492.
- [8] Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, et al. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization[J]. Nature, 2013, 496(7445): 372-376.
- [9] Duong T, Kim J, Ruley HE, et al. Cell-permeable parkin proteins suppress Parkinson disease-associated phenotypes in cultured cells and animals[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102517.
- [10] Romání-Aumedes J, Canal M, Martín-Flores N, et al. Parkin loss of function contributes to RTP801 elevation and neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(8): e1364.
- [11] Meka DP, Müller-Rischart AK, Nidadavolu P, et al. Parkin cooperates with GDNF/RET signaling to prevent dopaminergic neuron degeneration[J]. J Clin Invest, 2015, 125(5): 1873-1885.
- [12] Liu B, Traini R, Killinger B, et al. Overexpression of parkin in the rat nigrostriatal dopamine system protects against methamphetamine neurotoxicity[J]. Exp Neurol, 2013, 247: 359-372.
- [13] 范希敏, 范奇元. *PARK2*基因对神经系统保护作用机制的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(19): 2973-2974.
- [14] 罗英, 许洁, 范希敏, 等. *PARK2*基因在锰致大鼠运动功能降低中的作用[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(1): 27-30.
- [15] 丁冲, 谢丽, 商澎. 石墨炉原子吸收光谱法测定细胞中微量金属元素铁、铜、锰的含量[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(11): 71-73.
- [16] 华丰, 于锋. 自噬参与锰诱导的SH-SY5Y细胞毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(6): 452-455.

- 2014(12): 32.
- [12]刘明.紫外线诱导HaCaT细胞自噬及其拉曼光谱特性变化研究[D].广州:南方医科大学,2015.
- [13]罗昊翔,申元英,张态,等.短波紫外线对正常小鼠免疫功能的影响[J].大理学院学报,2009,8(12): 28-30.
- [14]Halliday GM, Damian DL, Rana S, et al. The suppressive effects of ultraviolet radiation on immunity in the skin and internal organs: implications for autoimmunity[J]. J Dermatol Sci, 2012, 66(3): 176-182.
- [15]翟杰.热应激对雏鸡外周血液免疫细胞功能及相关因子的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [16]李忠浩.热应激对荷斯坦奶牛外周血淋巴细胞凋亡与抗氧化特性的影响[D].南京:南京农业大学,2007.
- [17]Min L, Cheng J, Zhao S, et al. Plasma-based proteomics reveals immune response, complement and coagulation cascades pathway shifts in heat-stressed lactating dairy cows[J]. J Proteomics, 2016, 146: 99-108.
- [18]张晓明,苗榕生,谢蜀生,等.紫外线B照射对小鼠免疫功能影响的研究[J].中国预防医学杂志,2002,3(3): 216-218.
- [19]Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, et al. T cells in psoriatic lesional skin that survive conventional therapy with NB-UVB radiation display reduced IFN- γ expression[J]. Arch Dermatol Res, 2004, 295(12): 509-516.
- [20]Ravanat JL, Douki T. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities[J]. Radiat Phys Chem, 2016, 128: 92-102.
- [21]贾松柏,石晶明,陈翹,等.紫外线对人晶状体上皮细胞凋亡的诱导及*Bcl-2*, *Bax*基因的影响[J].中南大学学报(医学版),2012,37(7): 730-736.
- [22]Wali S, Sahoo A, Puri S, et al. Insights into the development and regulation of T follicular helper cells[J]. Cytokine, 2016, 87: 9-19.
- [23]Ito S, Kimura S, Warabi E, et al. p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis[J]. J Dermatol Sci, 2016, 83(3): 226-233.
- [24]田英,王秉贤.紫外辐射致免疫抑制的剂量-效应关系的实验研究[J].环境与健康杂志,1993,10(6): 243-245.
- [25]孙伟,刘扬.过量紫外线照射致免疫抑制机理的研究进展[J].中国公共卫生,2002,18(1): 113-114.
- [26]赵楠,李光华.热应激对机体免疫系统影响研究的进展[J].宁夏医学杂志,2014,36(6): 564-566.
- (收稿日期:2017-03-08;录用日期:2017-06-21)
- (英文编辑:汪源;编辑:丁瑾瑜;校对:王晓宇)

(上接第711页)

- [17]申玲,贾克.锰对大鼠肝脏线粒体氧化损伤的作用机制[J].蚌埠医学院学报,2011,36(12): 1293-1295.
- [18]Gorojod RM, Alaimo A, Porte Alcon SP, et al. The autophagic-lysosomal pathway determines the fate of glial cells under manganese-induced oxidative stress conditions[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 87: 237-251.
- [19]邓宇,王飞,徐斌,等.锰对小鼠黑质多巴胺转运体和受体表达影响的研究[J].实用预防医学,2014,21(3): 257-260.
- [20]Kwaky G F, Paoliello M M, Mukhopadhyay S, et al. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease: shared and distinguishable features[J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12(7): 7519-7540.
- [21]Song P, Trajkovic K, Tsunemi T, et al. Parkin modulates endosomal organization and function of the endo-lysosomal pathway[J]. J Neurosci, 2016, 36(8): 2425-2437.
- [22]Kim H J, Kim H J, Lee J Y, et al. Phenotype analysis in patients with early onset Parkinson's disease with and without *parkin* mutations[J]. J Neurol, 2011, 258(12): 2260-2267.
- [23]Hauser D N, Primiani C T, Cookson M R. The effects of variants in the *parkin*, *PINK1*, and *DJ-1* genes along with evidence for their pathogenicity[J]. Curr Protein Pept Sci, 2017, 18(7): 702-714.
- [24]Hunn B H, Cragg S J, Bolam J P, et al. Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease[J]. Trends Neurosci, 2015, 38(3): 178-188.
- (收稿日期:2017-01-16;录用日期:2017-06-21)
- (英文编辑:汪源;编辑:洪琪,丁瑾瑜;校对:王晓宇)