

慢性乙醇中毒损伤神经元后线粒体膜电位的影响

熊叶 黄董洋 方千发 李涵 唐枫怡 陈琳*

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 探讨慢性乙醇中毒损伤神经元后线粒体膜电位的影响。方法 研究选择了 PC12 细胞(神经细胞株)为实验目标,将实验分为正常对照组,乙醇损伤组:培养液中加入无水乙醇,浓度分别为 0.5g/L、1.5g/L、3.0g/L,对照组加入等量的 PBS 溶液。通过线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)染色步骤,观察荧光倒置显微镜下第 24h、4d、7d 荧光强度,并计算各处理组的平均红绿荧光强度的比值,以此来代表 PC12 细胞株的线粒体膜电位水平。结果 与对照组相比,乙醇组作用第 24h、4d、7d 后,海 PC12 细胞株的线粒体膜电位均降低 ($P<0.05$)。与乙醇组 (0.5g/L) 相比,乙醇组 (1.5g/L) 作用 24h、4d、7d 后,线粒体膜电位降低 ($P<0.05$),而乙醇组 (3.0g/L),线粒体膜电位均升高 ($P<0.05$)。结论 在乙醇作用后,PC12 细胞株内线粒体膜电位降低,结果提示乙醇可通过此种机制导致 PC12 细胞发生损伤。

关键词: 慢性;乙醇中毒;神经元;线粒体膜电位

乙醇可以对人体的多个系统造成损伤,就中枢神经系统而言,它可以改变神经元的活性和功能,导致一系列的行为变化[1]。长期饮酒会对大脑神经系统产生严重损害,甚至造成死亡,在乙醇依赖和死亡率对治疗的影响中提到,对于乙醇依赖患者,会对其他因素造成的疾病的治疗也有一定影响[2]。研究表明[3],急性乙醇中毒会抑制中枢神经系统,造成中枢神经系统功能紊乱,临床表现为意识异常和行为异常,严重者可造成多器官衰竭,也是多种神经精神疾病的病因及诱因,如乙醇性震颤、多发性神经病变、阿尔茨海默症及帕金森氏症等等[4]。由此可见,乙醇可以对神经元外部形态的变化与超微结构的改变息息相关。因此,本课题组以观察细胞线粒体膜电位的变化,检测早期细胞凋亡情况。以期从亚细胞层面研究乙醇对神经元的影响,为进一步探究乙醇对中枢神经系统造成的损伤及其机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

PC12 细胞(神经细胞株);儿茶素;乙醇;RPMI-1640 培养基;PBS 溶液;优级胎牛血清;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1);倒置相差显微镜。

1.2 方法

1.2.1 乙醇处理及分组

1.2.1.1 PC12 细胞处理及分组

准备 RPMI-1640 培养基;优质胎牛血清。培养条件要求:气相:空气,95%;二氧化碳,5%。温度:37 摄氏度,培养箱湿度为 70%-80%。冻存液:90%血清,10%DMSO,现用现配。实验分为正常对照组,乙醇损伤组:培养液中加入无水乙醇,浓度分别为 0.5g/L、1.5g/L、3.0g/L,对照组加入等量的 PBS 溶液。

1.2.2 JC-1 染色工作液的配制

取适量的 JC-1,按照每 50 μ L JC-1 加入 8mL 超纯水的比例稀释 JC-1,剧烈震荡充分溶解并混匀 JC-1。然后再加入 2mL JC-1 染色缓冲液,混匀后即为 JC-1 染色工作液。实验前根据此比例配制适量的 JC-1 染色工作液备用。JC-1 孵育:经 PBS 溶液、不同浓度乙醇作用不同时间后,取出培养 PC12 细胞株的 24 孔板。弃掉培养液,用预热的 PBS 溶液清洗 3 遍,每遍 3min,注意动作轻柔。然后每孔加入 600 μ L 的培养液,培养液中可以含有血清和酚红,继续加入 600 μ L 的 JC-1 染色工作液,充分混匀。于培养箱中孵育 20min。JC-1 染色缓冲液的配制:在孵育期间,按照每 1mL JC-1 染色缓冲液加入 4mL 无菌水的比例,配制适量的 JC-1 染色缓冲液,冰浴备用。

1.3 检测 PC12 细胞线粒体膜电位情况

荧光倒置显微镜下拍照,每孔随机选取 15 个区域,每个区域得到红色荧光和绿色荧光两张图片。用 Image-J 软件计算平均红、绿荧光强度值,平均荧光强度的计算方法为荧光强度/面积,计算第 24h、4d、7d 荧光强度,计算各处理组的平均红绿荧光强度的比值,代表 PC12 细胞线粒体膜电位。

1.4 统计分析

正态分布计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析进行多组间比较,所有数据均采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。图片处理选用 Image-J 软件。

2 结果

2.1 乙醇作用下 PC12 细胞株线粒体膜电位情况

与对照组相比,乙醇组作用第 24h、4d、7d 后,PC12 细胞株的线粒体膜电位均降低 ($P<0.05$)。与乙醇组 (0.5g/L) 相比,乙醇组 (1.5g/L) 作用 24h、4d、7d 后,线粒体膜电位降低 ($P<0.05$),而乙醇组 (3.0g/L),线粒体膜电位均升高 ($P<0.05$)。详见表 1、图 1。

表 1 乙醇作用下 PC12 细胞株线粒体膜电位比较

组别	浓度 (g/L)	24h	4d	7d
正常对照组	-	0.789 \pm 0.047	0.865 \pm 0.053	0.854 \pm 0.061
乙醇处理组	0.5	0.498 \pm 0.105	0.514 \pm 0.129	0.562 \pm 0.144
1.5	0.425 \pm 0.052	0.480 \pm 0.094	0.415 \pm 0.005	
3.0	0.501 \pm 0.090	0.625 \pm 0.158	0.715 \pm 0.172	

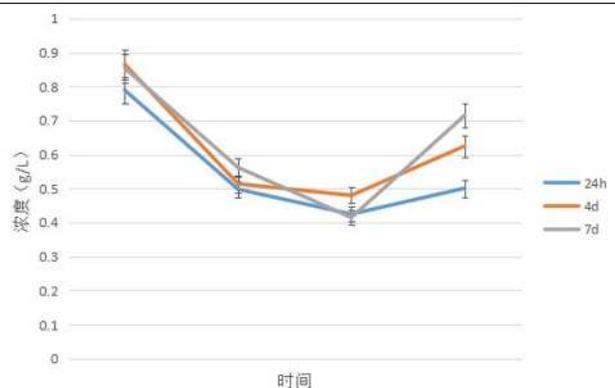


图 1 乙醇作用不同时间 PC12 细胞株线粒体膜电位变化

3 讨论

乙醇所导致的中枢神经系统损伤及其临床症状与神经元内部

亚细胞结构的改变关系密切。乙醇作用后,神经细胞数量减少,神经元内线粒体肿胀破裂,内嵴粒脱落,内嵴断裂、消失,呈空泡化,高尔基体压实,细胞核染色质在核膜周边凝集[5]。对于神经细胞特有的结构——突触来说,其数量明显减少,超微结构也发生改变,突触小泡数量减少,突触间隙变窄,甚至模糊不清[6]。除此之外,神经元内的其他超微结构也发生了一定变化,包括内质网、高尔基体、溶酶体等[7]。由此可见,在乙醇对中枢神经系统造成可观察到的形态学改变及临床症状之前,神经元内部的亚细胞结构就已经发生了改变,这些亚细胞结构相互作用,引起氧化应激、炎症反应等病理过程,导致中枢神经系统形态受损,功能障碍。

从乙醇在体内的代谢过程来看。首先,在乙醇脱氢酶和微粒体乙醇氧化系统的作用下,将乙醇氧化成乙醛;其次,由乙醛脱氢酶介导,在线粒体内,将乙醛氧化成乙酸[8];最后,乙酸在线粒体内参与柠檬酸循环中,将其彻底代谢成 ATP、二氧化碳和水,体内相关酶的含量直接影响着乙醇的代谢,具有种族、个体等差异[9]。由此可见,乙醇所导致的神经损伤与线粒体息息相关。线粒体可以为细胞活动提供能量,除此之外,它还参与多种生理过程的调节,包括细胞增殖与分化、细胞凋亡、氧化应激反应、脂质代谢、钙稳态和信号通路的维持等[10]。对于神经细胞来说,因其具有长的轴突和树突等特殊结构,线粒体对其生长发育的作用及影响就更为显著,尤其是在能量需求很大的轴突远端,线粒体对多个生理过程的正常运转至关重要,包括突触的组装、动作电位的产生、突触囊泡的转运和循环等。线粒体呈囊状结构,由双层生物膜包裹,形成外膜、膜间隙、内膜和基质四个部分[11]。线粒体膜间隙是外膜和内膜之间的空隙,其中充满无定形液体,由于外膜含有孔蛋白,通透性较高,而线粒体内膜通透性较低,使得膜间隙内容物的组成和微环境与细胞质基质十分相似,含有许多生化反应底物、可溶性酶和辅因子等,比如细胞色素 C、Caspase 酶原、腺苷酸激酶和凋亡诱导因子,这些物质与呼吸作用、细胞凋亡等过程息息相关。线粒体膜电位的形成与线粒体结构密切相关[12]。质子泵位于线粒体内膜中,可将线粒体基质中产生的质子泵入膜间隙,在线粒体内膜两侧形成质子浓度梯度,结果是膜间隙中有大量的正电荷,而线粒体基质中产生大量的负电荷,使内膜两侧形成电位差,从而形成横跨线粒体内膜的跨膜电位,简称为线粒体膜电位[13]。本文研究表明,与对照组相比,乙醇组作用第 24h、4d、7d 后,PC12 细胞株的线粒体膜电位均降低 ($P<0.05$)。与乙醇组 (0.5g/L) 相比,乙醇组 (1.5g/L) 作用 24h、4d、7d 后,线粒体膜电位降低 ($P<0.05$),而乙醇组 (3.0g/L),线粒体膜电位均升高 ($P<0.05$)。

综上所述,正常的线粒体膜电位是维持线粒体及细胞机制正常运转、功能正常发挥的前提,与细胞凋亡过程息息相关,凋亡是由基因控制的细胞内部发生的自主的程序性死亡,而线粒体膜电位下

降正是细胞凋亡早期的一个事件。在乙醇作用后,海马神经元内线粒体膜电位降低,该指标与细胞凋亡关系密切,也从侧面说明乙醇会导致细胞损伤的发生。

参考文献:

[1]李秀敏,邓源.乙醇的中枢神经系统损伤作用[J].中国临床康复,2005(21):181-183.

[2]王学才,刘琼美.整合式心理治疗对于酒精依赖症患者的治疗体会[J].当代医学,2012,18(12):84.

[3]王亚南,孙永红,支爱华,等.慢性乙醇中毒大鼠中枢氨基酸递质及行为学改变的研究[J].潍坊医学院学报,2009,31(01):1-3+6.

[4]孙雪莲,沈璐华,谢苗荣.急性酒精中毒大鼠心脏功能和交感-肾上腺髓质系统变化研究[J].中国全科医学,2007(14):1160-1163.

[5]肖哲曼,卢祖能,郑建全,等.乙醇对颈上神经节神经元钙内流的影响[J].武汉大学学报(理学版),2005(06):762-766.

[6]张丽凤,余双全,梁祚仁,等.五味子乙素对慢性酒精中毒大鼠海马突触超微结构的影响[J].中国比较医学杂志,2021,31(02):88-92.

[7]孟宪栋,亢君君.大鼠癫痫持续状态后海马 CA1 区锥体细胞层神经元突触 CB1R 超微结构变化[J].四川医学,2021,42(03):245-248.

[8]胡珏,黄光强,梁洁,等.龙眼叶乙醇提取物在大鼠体内的代谢产物初步研究[J].中国药房,2022,33(21):2572-2577.

[9]刘银银.有氧运动对老龄大鼠心肌线粒体能量代谢及自由基代谢的影响[D].西北师范大学,2014.

[10]Elahi Mahshid,Hojati Vida,Hashemitabar Mahmoud,et al. Negative effect of varicocele on sperm mitochondrial dysfunction: A cross-sectional study.[J]. International journal of reproductive biomedicine,2023,21(4):323-332.

[11]孙琰琰.线粒体在新生小鼠缺氧缺血性脑损伤中的调节作用[D].郑州大学,2018.

[12]陈慧莉,李建华,王树庆.线粒体跨膜电位和细胞凋亡相关性的研究[J].医学综述,2007(14):1041-1043.

[13] Ashok Deepthi,Papanicolaou Kyriakos,Sidor Agnieszka,et al. Mitochondrial Membrane Potential Instability on Reperfusion After Ischemia Does Not Depend on Mitochondrial Ca²⁺ Uptake.[J]. The Journal of biological chemistry,2023,299(6):104708-104708.

基金项目:湖南省大学生创新创业训练计划项目:湘教通[2022]174号-4588。

第一作者:熊叶,2000.03,女,汉,湖南永州,本科在读,临床专业;

*通讯作者:陈琳,1982.10,女,汉,湖南益阳,硕士,副教授,研究方向为精神医学、儿童青少年心理卫生保健。