

鱼藤酮诱导线粒体轻度损伤细胞氧化应激时 硫氧还蛋白转录水平降低

丁红群^{1,2} 丁 镇¹ 熊御云² 高 静^{2*}

(¹ 南京大学生命科学学院, 南京 210093; ² 江苏大学药学院, 镇江 212013)

摘要 观察鱼藤酮诱导的线粒体轻度损伤细胞氧化应激时硫氧还蛋白转录水平的变化, 探讨细胞氧化损伤的可能机制。通过荧光素发光法检测 ATP 生成、细胞内活性氧(ROS)水平的变化, 流式细胞术检测线粒体膜电位, 了解低剂量鱼藤酮对线粒体功能的影响; 继而用 H₂O₂ 诱导细胞氧化损伤, MTT 法检测细胞活性, 观察正常及线粒体缺陷细胞氧化应激时, 胞内硫氧还蛋白(Trx) mRNA 水平的变化。结果表明, 鱼藤酮以剂量依赖方式抑制线粒体 ATP 的产生、降低线粒体膜电位, 而细胞内 ROS 水平增高; 当线粒体损伤细胞氧化应激时胞内 Trx mRNA 水平降低, 提示鱼藤酮诱导线粒体轻度损伤细胞抗氧化能力降低与 Trx 转录受到抑制有关。

关键词 帕金森病; 线粒体缺陷; 鱼藤酮; 氧化应激; 硫氧还蛋白

帕金森病(PD)是最常见的神经系统退行性疾病之一。由于 PD 的致病机制复杂, 阐明其发病机制, 延缓神经元的进行性死亡一直是研究者关注的课题。有关 PD 的流行病学调查发现, 接触某些农药如鱼藤酮(rotenone)是 PD 发生的高危因素, 而鱼藤酮是细胞内线粒体呼吸链复合物 I 的特异性抑制剂^[1,2]。线粒体不仅是细胞的能量“供应站”, 也是胞内产生活性氧(ROS)和启动凋亡的主要细胞器。目前的研究表明, 胞内线粒体缺陷和脑内氧化应激的加重均为导致神经元损伤的重要原因, 且线粒体缺陷细胞氧化应激易感性增高^[3-5]。但线粒体轻度损伤时, 细胞内线粒体功能的变化及线粒体轻度损伤细胞抗氧化能力变化的可能机制尚未阐明。

细胞内的氧化还原调节酶系统包括谷胱甘肽(GSH)系统、超氧化物歧化酶(SOD)系统、过氧化氢酶系统和硫氧还蛋白(Trx)系统等, 其中 GSH 系统和 Trx 系统作为细胞内最主要的氧化调节系统, 在神经系统抗氧化过程中发挥着重要的调节作用。Trx 系统由 Trx、硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TR)和 NADPH 共同构成。还原型的 Trx 可以催化许多有二硫键暴露的蛋白质的还原, 维持其活性, 还可直接与 ROS 反应, 减少氧自由基的损害。对 PD 的研究结果表明, Trx 可以对抗 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)引起的神经元损伤^[6]。本实验室先前的研究表明, Trx 在叠氮钠诱导的原代培养神经元氧化损伤中显著下调^[3,4], 而鱼藤酮诱导线粒体损伤细胞

氧化应激时, Trx 减少^[5]。但线粒体损伤的程度及 Trx 转录水平的变化尚不清楚。

本实验通过低剂量鱼藤酮诱导 SH-SY5Y 细胞线粒体轻度损伤, 模拟 PD 早期神经元轻度损伤。通过检测胞内 ATP 生成、线粒体膜电位及 ROS 水平的变化, 了解低剂量鱼藤酮对线粒体功能的影响, 比较正常和线粒体轻度损伤细胞氧化应激时 Trx 在两类细胞中的转录水平的差异, 分析 Trx 变化与线粒体损伤细胞抗氧化能力降低的相关性, 以期从调控 Trx 的角度为 PD 的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞由首都医科大学宣武医院盛树力教授惠赠。

1.1.2 药品与试剂 MTT 为 Sigma 公司产品; 改进的 Eagle 培养基(modified Eagle medium, MEM)为 Gibco BRL 产品; ENLITEN[®] ATP 检测试剂盒、AMV、Rnasin、dNTP、Oligo(dT)₁₅、Taq 酶、Hepes 购自 Promega 公司; Tripure 为 Roche 产品; 胎牛血清为杭州四季青产品; 30% 过氧化氢(H₂O₂) (分析纯), 南京化学试剂

收稿日期: 2007-04-10 接受日期: 2007-05-11

教育部优秀青年教师资助计划项目及江苏大学高级人才科研启动基金资助(No.07JDG012)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0511-8791552, E-mail: jinggao@ujs.edu.cn, jinggao@nju.edu.cn

厂; 活性氧检测试剂盒购于北京普利莱基因技术公司; 鱼藤酮、3,3,-dihexyloxacarboxyanine iodite [DiOC₆(3)]、胰蛋白酶均为 Sigma 公司产品; 其余化学试剂均为市售分析纯。

1.1.3 实验仪器 Thermo CO₂ 培养箱; MD SpectraMax M5 多功能酶标仪; Bio-Rad 550 酶标仪; MJ Research PTC-100 PCR 仪; Olympus CKx41 显微镜; Kendro Biofuge Primo R 冷冻离心机; Sanyo Labo Autoclave MLS-3020 全自动高压灭菌锅; Shimadzu AY120 电子分析天平; BD FACS Calibur 流式细胞仪; Nikon eclipse TE2000-5 荧光显微镜; 北京创美凝胶成像系统等。

1.2 方法

1.2.1 人 SH-SY5Y 的培养 将 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔(每孔 2 ml)或 96 孔(每孔 100 ml)培养板, 接种密度为 3×10^4 个/ml。MEM 培养基(10% 胎牛血清), 置 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 鱼藤酮诱导线粒体轻度损伤 SH-SY5Y 细胞

96 孔板或 6 孔板培养 24 h 后, 加入鱼藤酮, 终浓度 3 nmol/L。溶剂对照组加入等体积的 DMSO 溶液(终浓度为 0.2%, 对细胞无明显损伤)。48 h 后, MTT 法检测细胞存活率。

1.2.3 H₂O₂ 诱导的细胞氧化应激损伤 正常组细胞培养 72 h, 线粒体缺陷细胞培养 24 h, 再以鱼藤酮诱导 48 h 后, 换无血清的 MEM, 加入 H₂O₂(终浓度分别为 0、50、100、200、400、800 μmol/L), 对照组加入等体积的 D-Hank's 溶液, 作用 1 h, 换 Hank's 液, MTT 法检测细胞活性, 显微镜观察细胞形态。

1.2.4 MTT 法检测细胞活性 96 孔培养板每孔加 25 μl MTT (终浓度为 1 mg/ml), 37 °C 温育 4 h 后, 吸去培养液, 每孔加 100 μl DMSO, 2 h 后, 用酶联免疫检测仪于 570 nm 处测光吸收值。结果用相对存活率表示, 计算公式如下: 相对存活率(%) = (吸光值_{给药组} / 吸光值_{对照组}) × 100 %

1.2.5 荧光素发光法检测细胞内 ATP 水平 细胞内 ATP 在荧光素酶及 Mg²⁺ 催化下可发生反应: ATP + 荧光素 + O₂ → 氧化荧光素 + AMP + PPi + 光。故可通过测定所发出的荧光检测 ATP 水平。6 孔板培养 SH-SY5Y 细胞 24 h 后加入鱼藤酮, 使终浓度分别为 3、5、10 nmol/L, 诱导 48 h。吸去培养板中的培养基, 4 °C PBS 洗一次, 0.25% 胰蛋白酶消化成细胞悬液细胞计数, 取含相同数量细胞的悬液, 500 g 离心 5 min。弃上清液, 加入 2.5% 三氯乙酸(TCA)提取 ATP。加入 pH 7.77 的 400 μl Tris-HCl 中和。4 °C 12 000 g 离

心 5 min, 吸取 20 μl 上清液, 加入 100 μl 含荧光素的检测液, 2 s 后用 SpectraMax M5 多功能酶标仪于测发光强度, 根据标准曲线计算 ATP 量。

1.2.6 流式细胞术测定线粒体膜电位 DiOC₆(3) 是一种亲脂性的阳离子荧光染料, 能够与活细胞线粒体内外膜结合, 其荧光强度与线粒体跨膜电位正相关。将鱼藤酮损伤的细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化成细胞悬液, 37 °C 下 DiOC₆(3)(终浓度为 40 nmol/L) 负载 30 min, 500 g 离心 4 min, PBS 洗两次。激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm 进行检测。每组样本常规吸取 10 000 个细胞, 分析低荧光强度的细胞数占总细胞数的百分比, 分析线粒体膜电位的变化。

1.2.7 DCFH-DA 探针法检测细胞内 ROS 水平

DCFH-DA 本身没有荧光, 进入细胞后, 被细胞内酯酶水解转化生成不能透过细胞膜的 DCFH。在有 ROS 存在的条件下, DCFH 被氧化生成绿色荧光物质 DCF。实验时, SH-SY5Y 细胞培养于 96 孔板上, 24 h 后, 不同浓度的鱼藤酮损伤 48 h, 加入无血清培养基稀释的 DCFH-DA 溶液(终浓度为 10 μmol/L), 37 °C 下负载 30 min, PBS 洗两次。荧光显微镜进行观察, 并用荧光酶标仪在激发光波长 488 nm, 发射光波长 525 nm 定量分析荧光强度。

1.2.8 RT-PCR 检测 Trx 转录水平 提取细胞内的总 RNA, 在 AMV 逆转录酶的作用下反转录合成 cDNA。再以合成的 cDNA 为模板, 利用特定的目的基因的引物, 在含有 DNA 聚合酶、dNTP 和镁离子的缓冲液中, 通过变性、退火、延伸等步骤的多次循环, 得到足够数量的目的基因的 DNA 片段。扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 其在凝胶中的迁移率与其自身的分子大小成负相关, 据此可将不同大小的 DNA 片段区分开来。通过溴化乙锭(EB)与 DNA 分子的嵌合, 可在紫外灯下观察不同位置的条带。

具体操作如下:

总 RNA 提取: 取 6 孔板上培养的细胞, 吸去培养基, 用 D-Hank's 液冲洗后, 每孔加 1 ml Tripure, 提取总 RNA, 加适量的无 RNA 酶水溶解。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 18 S 和 28 S 带, 在紫外分光光度计上测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值, A₂₆₀/A₂₈₀ 了解 RNA 纯度, 样品浓度(μg/ml) = A₂₆₀ × 稀释倍数 × 40。

逆转录: 取 2 μg 细胞总 RNA, 0.5 μg oligo(dT)₁₅, 4 μl AMV 5× 缓冲液, 20 U Rnasin, 共 15 μl。70 °C 变性 5 min, 在冰上加 4 μl 4×dNTP (2.5 mmol/L), 1.5 μl 10 U/μl AMV RT, 共 20 μl。42 °C 60 min, 95 °C 5 min,

4 °C 放置, -20 °C 保存。

PCR: 以 β -肌动蛋白为内参, 其上游引物为: 5'-GCC TCA GGT AGT GCT G-3', 下游引物为: 5'-GTC GGA AGG TGG ACA GCG A-3'; Trx 的上游引物为: 5'-CTG CTT TTC AGG AAG CCT TG-3', 下游引物为: 5'-TGT TGG CAT GCA TTT GAC TT-3'。反应体系 2.5 μ l 10 \times 缓冲液, 5 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 4 μ l 2.5 mmol/L 4 \times dNTP, 20 pmol 引物 1, 20 pmol 引物 2, 4 μ l cDNA 模板, 2.5 u Taq 酶, 加无 RNA 酶水至 25 μ l, 加 10 μ l 石蜡油。反应程序 95 °C, 30 s 变性。然后 94 °C, 20 s; 57 °C, 30 s; 72 °C, 50 s; 29 次循环(在线性期内)。最后 72 °C 延伸 7 min。4 °C 保存。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照、分析。

1.2.9 统计 实验数据用 SASS 软件进行单因素方差分析(ANOVA), 组间比较作 q 检验。显著性标准为 $\alpha=0.05$ 或 0.01。所有实验重复 3 次。

2 结果

2.1 低剂量鱼藤酮不影响 SH-SY5Y 细胞活性

图 1A 可以看出 1~5 nmol/L 鱼藤酮处理 SH-SY5Y 细胞后, 仅 5 nmol/L 对细胞存活率有轻度抑制。3 nmol/L 鱼藤酮作用 48 h 对细胞存活率无显著影响, 也不引起细胞形态的显著变化(图 1B)。因此将 3 nmol/L 选作鱼藤酮的阈下剂量, 研究其对线粒体功能的影响。

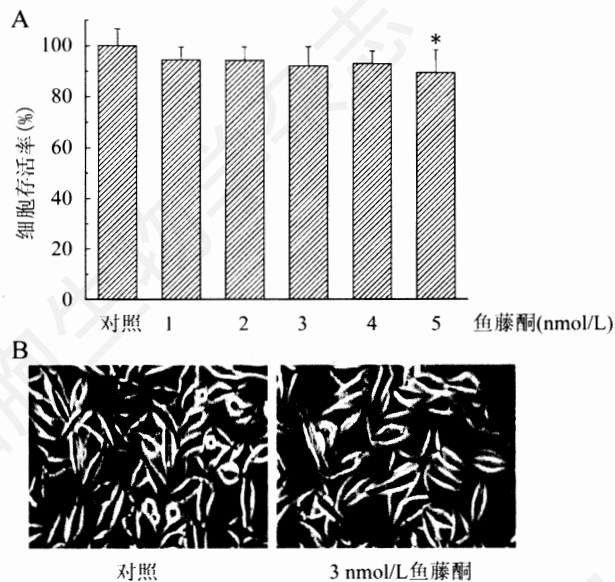


图 1 低剂量鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞的影响

A: MTT 法检测细胞存活率($\bar{x} \pm s$, $n=3$; 与对照组比, $*P<0.05$); B: 3 nmol/L 鱼藤酮对细胞形态无明显影响(200 \times)。

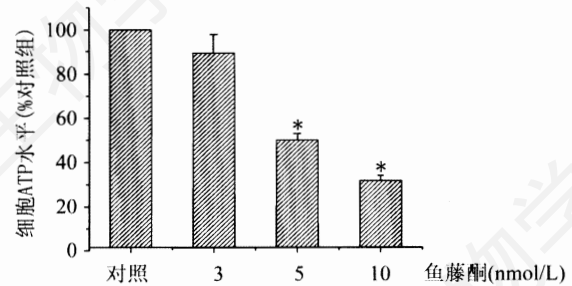


图 2 鱼藤酮诱导的胞内 ATP 的变化

$\bar{x} \pm s$, $n=3$; 与正常对照组比, $*P<0.05$ 。

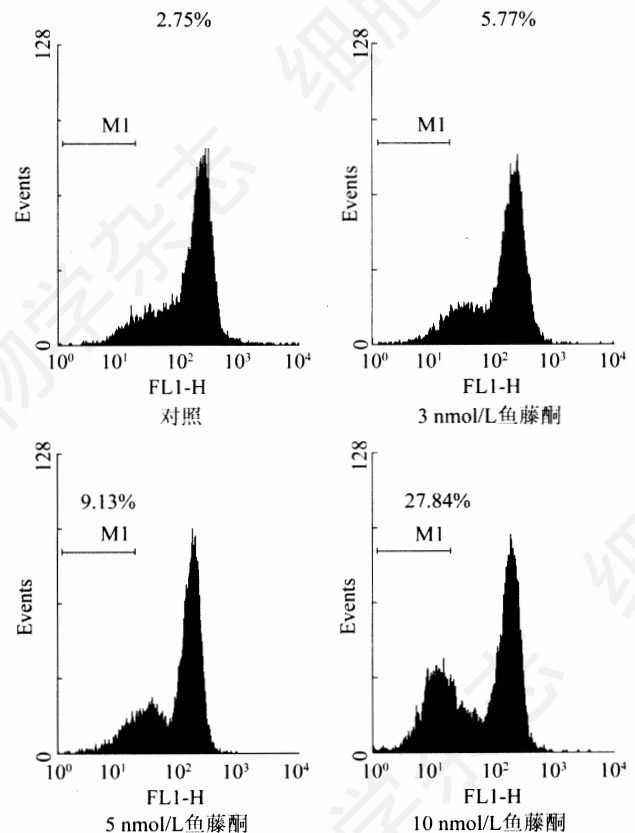


图 3 鱼藤酮诱导的线粒体膜电位(MMP)的变化

横坐标表示 DiOC₆(3) 的荧光强度, 纵坐标表示某一荧光强度值所对应的细胞数, 图左上角表示 MMP 降低细胞的百分数。

2.2 鱼藤酮降低细胞内 ATP 水平

由图 2 可以看出, 鱼藤酮处理后细胞内 ATP 与对照组相比均降低, 且随着剂量增加降低的幅度增大。其中, 5、10 nmol/L 组与对照组相比分别降低 50.77% 和 69.24%, 差异显著。

2.3 鱼藤酮诱导线粒体膜电位的下降

如图 3 所示, 鱼藤酮处理后, 线粒体膜电位较低的细胞的百分比随剂量增大而增加。说明鱼藤酮能够剂量依赖性地降低线粒体膜电位。

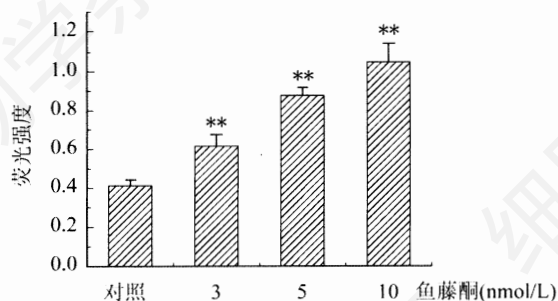


图4 不同浓度鱼藤酮对细胞内ROS的影响

荧光酶标仪定量检测胞内ROS的量。 $\bar{x} \pm s, n=3$, 与对照组比, ** $P < 0.01$ 。



图5 不同浓度的H₂O₂对SH-SY5Y细胞Trx mRNA的影响

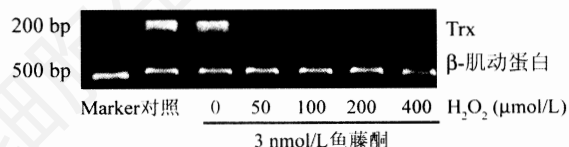


图6 不同浓度H₂O₂对线粒体轻度损伤SH-SY5Y细胞Trx mRNA水平的影响

2.4 鱼藤酮诱导细胞内ROS水平升高

荧光酶标仪定量检测表明,DCF的荧光强度随鱼藤酮剂量增加而增强,3 nmol/L鱼藤酮处理即能显著增加细胞内ROS的量(图4)。

2.5 Trx mRNA在H₂O₂诱导的氧化损伤中的变化

2.5.1 正常细胞内Trx在H₂O₂诱导的氧化应激中的变化 RT-PCR结果显示,正常SH-SY5Y细胞在给予50~400 μmol/L H₂O₂刺激1 h后,细胞内Trx mRNA水平(图5)没有明显改变。

2.5.2 线粒体轻度损伤细胞内Trx在H₂O₂诱导的氧化损伤中的变化 3 nmol/L鱼藤酮对SH-SY5Y细胞内Trx水平无明显影响,但预处理后的细胞再用不同剂量的H₂O₂(50~400 μmol/L)刺激1 h,Trx mRNA水平随着H₂O₂剂量增大而降低(图6)。

3 讨论

虽然鱼藤酮诱导神经细胞损伤已是公认的PD病理模型之一。PD发病中出现的25%左右的轻度complex I抑制^[7-9]。有文献报道,1~5 nmol/L鱼藤酮可抑制30%左右complex I的活性^[10]。本文采用低剂量鱼藤酮处理SH-SY5Y细胞48 h,研究其线

粒体功能的变化,发现细胞存活率、形态均无明显变化。

作为维持生命活动的最重要的细胞器之一,线粒体是细胞内的能量工厂,同时也是ROS产生的源泉。理论上,complex I抑制会造成呼吸链电子传递受阻,ATP合成障碍,膜电位下降,ROS大量产生,并介导后续的Ca²⁺失衡,线粒体细胞色素c释放,caspase激活等,最终导致细胞死亡。但有一个量变的过程,线粒体损伤也有一个积累的过程,达到一定阈值,即可导致细胞损伤、死亡。本实验通过检测细胞内ATP、ROS的水平以及线粒体膜电位的变化发现,在3 nmol/L鱼藤酮诱导的complex I轻度抑制的细胞中,胞内ATP和线粒体膜电位均有降低的趋势,但只有胞内ROS增加显著。这样轻微的线粒体损伤可以导致细胞氧化应激易感性显著升高^[5]。或许因mtDNA没有组蛋白保护、缺乏完善的DNA损伤修复系统,过度氧化可导致其mtDNA突变不断增加、累积,最终损伤细胞。这种变化趋势与临床观察到的PD病人老年起病,进行性发展的特点相吻合。

氧化损伤是ROS产生及细胞内抗氧化系统失衡的结果。以往的实验发现,在相同剂量(200 μmol/L)的H₂O₂刺激下,正常组细胞仍然保持细胞的正常活性及形态,而线粒体损伤细胞则不能。分析胞内抗氧化系统发现,Trx明显降低^[5]。曾有人推测,在线粒体损伤时,参与细胞内调节氧化还原的酶系统可能不同。用GSH的耗竭剂抑制GSH系统的功能后,胞内的Trx系统发挥主要的抗氧化作用^[11]。因此,在complex I轻度抑制时,Trx可能在氧化应激中发挥主要作用。而Trx转录受到抑制是Trx降低的原因之一,Trx的耗竭最终将导致细胞氧化还原紊乱、死亡。当然,仅还原型Trx可以催化二硫键暴露的蛋白质的还原,维持其活性,或直接与ROS反应,减少对细胞的损害。因此,研究胞内Trx的变化必须同时重视Trx活性的分析。

有研究表明,应用体外重组的Trx可以保护神经元对抗损伤^[12]。我们的实验也证实,药物保护细胞对抗氧化应激与上调Trx表达有关^[13],Trx还可以对抗MPTP引起的神经元损伤^[6]。因此,胞内Trx水平可以作为筛选神经保护药物的指标之一。综上所述,本文在线粒体轻度缺陷氧化损伤细胞模型上,进一步观察了氧化应激与Trx转录水平的变化的相关性,探讨Trx在线粒体轻度缺陷细胞氧化应激损伤中的作用,对于阐明PD早期神经元损伤机制,寻找抗PD药

物作用靶点进行了有益的探索。

参考文献 (References)

- [1] Hertzman C *et al.* *Am J Ind Med*, 1990, **17**: 349
- [2] Le Couteur DG *et al.* *Biomed Pharmacother*, 1999, **53**: 122
- [3] Gao J *et al.* *Neurochem Int*, 2007, **50**: 379
- [4] 邹月等. *实验生物学报*, 2004, **37**: 15
- [5] Ding Z *et al.* *J Nanjing University*, 2006, **42**: 470
- [6] Bai J *et al.* *Neurosci Lett*, 2002, **321**: 81
- [7] Leist M *et al.* *Exp Cell Res*, 1999, **249**: 396
- [8] King TD *et al.* *Brain Res*, 2001, **919**: 106
- [9] Zhang JG *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2001, **393**: 87
- [10] Sherer TB *et al.* *Brain Res*, 2001, **891**: 94
- [11] Yang X *et al.* *Toxicology*, 2004, **204**: 209
- [12] Tanito M *et al.* *Invest ophthalmol Vis Sci*, 2002, **43**: 1162
- [13] Gao J *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, **37**: 119

Transcription of Thioredoxin was Inhibited in Rotenone-induced Mitochondrial Dysfunctional Cells Exposed to H₂O₂

Hong-Qun Ding^{1,2}, Zhen Ding¹, Yu-Yun Xiong², Jing Gao^{1,2*}

(¹School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; ²School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract To study the pathological changes of thioredoxin (Trx) mRNA in cells exposed to H₂O₂ with mild mitochondrial dysfunction, the human neuroblastoma SH-SY5Y cells were insulted by low dose of rotenone to mimic the partial complex I impairment in PD. On this *in vitro* model, the changes of ATP and reactive oxygen species (ROS) production, and mitochondrial membrane potential (MMP) were investigated to compare the differences between the mitochondrial deficiency cells and normal ones. Furthermore, mRNA of intracellular redox protein, thioredoxin (Trx), from both kinds of cells followed by H₂O₂ exposure were analyzed. The results demonstrated that rotenone could dose dependently decrease cellular ATP level and MMP, increase cellular ROS production. Without affecting the cell viability, 3 nmol/L rotenone exposure do not alter the cell morphology and ATP synthesis but increased the ROS generation, which indicated mitochondria had been insulted slightly. It was found that Trx mRNA levels in mitochondrial dysfunctional SH-SY5Y cells insulted by H₂O₂ were lower than normal ones. These results, together with our previous study, demonstrated that the increased susceptibility to oxidative stress in mitochondrial dysfunctional SH-SY5Y cells might be at least in part related to the down-regulation of Trx.

Key words Parkinson's disease; mitochondrial deficiency; rotenone; oxidative stress; thioredoxin

Received: April 10, 2007 Accepted: May 11, 2007

This work was supported by Excellent Young Teachers Program of the Ministry of Education and the Jiangsu University (No. 07JDG012)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-511-8791552, E-mail: jinggao@ujs.edu.cn, jinggao@nju.edu.cn