

叠氮钠、过氧化氢对 SH-SY5Y 细胞内 硫氧还蛋白还原酶的影响

张婷婷, 高静*, 杨晓荷, 许琳¹, 徐江英¹

(南京大学医学院, 南京 210093; ¹南京军医学院基因中心, 南京 210099)

摘要: 过度氧化应激是诱发许多神经退变病的重要因素。叠氮钠(NaN_3)是线粒体有氧呼吸链细胞色素c氧化酶(COX)的特异性抑制剂, 过氧化氢(H_2O_2)释放氧自由基造成氧化损伤, 两者都可以用于氧化应激情况下神经元损伤模型的建立。硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TR)特异性的还原氧化型的硫氧还蛋白(thioredoxin, TRx), 调节细胞中氧化还原的平衡。现以不同浓度 NaN_3 或 H_2O_2 处理人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 细胞), 建立损伤模型。通过 MTT 法、形态学方法检测 SH-SY5Y 细胞损伤程度。同时, 通过 Western blot 定量法、免疫细胞化学法, 检测损伤的 SH-SY5Y 细胞中 TR 含量的改变, 观察 TR 在胞内的分布。实验表明, NaN_3 、 H_2O_2 均以浓度依赖方式损伤 SH-SY5Y 细胞; TR 分布于 SH-SY5Y 细胞的胞浆, 表明 TR 是一种分泌蛋白, 损伤后分布无明显变化。但一定浓度的 NaN_3 作用后 3h, 胞内 TR 水平显著降低, 即神经系统内呼吸链受损可抑制 TR 的表达, 为神经退变病的防治提供了新的思路。

关键词: 叠氮钠; 过氧化氢; 氧化应激; 硫氧还蛋白还原酶(TR)

中图分类号: R741; Q42 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-189-04

神经退行性疾病的共同特征是特定区域神经元功能的丧失, 即神经元的不可逆损伤、死亡。越来越多证据表明, 过度氧化应激参与了神经退行性疾病的病理机制, 在老年痴呆症(AD)、帕金森综合症(PD)、多发性硬化症(ALS)等疾病中都发现了电子传递链异常和自由基增多导致的细胞损伤。因此, 神经元内氧化还原平衡的维持, 对保护神经元、延缓衰老及对抗损伤有重要意义。硫氧还蛋白系统是脑内一种重要的氧化调节系统, 它在脑内的功能是通过调节胞内氧化还原平衡的调控, 修复过氧化的巯基蛋白并清除过量氧自由基。近年来, TR 与神经退变病的关系已引起人们注意^[1]。

研究表明, AD 患者氧化应激增强与神经细胞内线粒体缺陷密切相关。脑组织活检显示 AD 患者细胞内线粒体存在明显异常, 原位杂交技术显示线粒体有氧呼吸链细胞色素 C 氧化酶(COX, 即呼吸链复合体 IV)特异性缺陷。这些异常和缺陷导致线粒体的供能减少, 加剧氧化应激损伤, 是引发神经元数目减少的原因之一^[2]。叠氮钠(NaN_3)是 COX 的特异性抑制剂, 能诱发神经细胞 COX 缺陷及氧化损

伤, 过氧化氢(H_2O_2)可产生自由基, 直接造成氧化损伤。本实验即以 NaN_3 或 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤, 建立神经元损伤的离体模型, 进行形态学观察和细胞活性分析, 并通过 Western blot 定量法, 免疫细胞化学法检测 SH-SY5Y 细胞损伤后 TR 的改变, 探讨 TR 在神经损伤中的可能作用, 为神经退变病的预防和治疗开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞

北京首都医科大学宣武医院盛树力教授惠赠。

1.2 药品与试剂

叠氮钠: 化学纯, 上海试剂采购供应站; 过氧化氢: 分析纯, 南京化学试剂厂; MTT: Sigma 公司产品, 用 D-Hanks 溶解, 避光保存; 胎牛血清: HyClone 产品, 用前加热灭活, -20°C 保存;

收稿日期: 2003-07-25; 修回日期: 2003-09-08

江苏省自然科学基金(BK2000015)、南京大学分析中心测试基金资助

* 通讯作者, E-mail: jinggao@nju.edu.cn

胰蛋白酶: Sigma 公司产品; Modified Eagle Medium (MEM): Gibco 产品; TR 抗体: 第二军医大学南京军医学院基因中心许琳教授制备; 免疫细胞化学试剂: 福州迈新公司即用型 SABC(过氧化物酶)试剂盒。

1.3 细胞培养

将 SH-SY5Y 细胞接种于装有 MEM 培养基(10% 胎牛血清)的培养瓶中, 置于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养。约 4~5 天传代一次, 实验均用 30~50 代的细胞, 分别在 6 孔培养板、96 孔培养板及 50ml 的培养瓶中实验。

1.4 损伤模型的建立

1.4.1 NaN₃ 药物浓度依赖性实验 细胞在 96 孔板培养 3~4 天后, 加入 NaN₃, 使各组药物浓度分别为 0、96、128、160、192、224、288(mmol/L), 作用 1h 换液, 1h 后 MTT 法测细胞活性。

1.4.2 H₂O₂ 药物浓度依赖性实验 细胞在 96 孔板培养 3~4 天后, 加入 H₂O₂ 使药物浓度分别为 0、50、100、200、400、600、800、1000(μmol/L), 作用 1h 换液, 1h 后 MTT 法测细胞活性。

1.5 MTT 法测细胞活性

96 孔细胞培养板每孔加 25 ml MTT 使终浓度为 1 mg/ml, 37℃ 继续孵育 4h 后每孔加 DMSO 100 ml 待结晶物充分溶解, 用酶联免疫检测仪于 570 nm 处测光吸收值。

1.6 Western blot

当 50 ml 培养瓶中的细胞密度达到 70%~80% 时, 用终浓度为 128 mmol/L 的 NaN₃ 处理细胞 1h, 分别于 3、6、12h 后收集样品; 或用终浓度为 200μmol/L 的 H₂O₂ 处理 1h, 分别于 3、6、12h 后收集样品。用 D-Hanks 洗涤细胞, 每瓶加入细胞裂解液 200μl, 将细胞刮下, 17000g 离心 5~10s, 取上清液。用牛血清白蛋白(BSA)作标准蛋白, 对上清液进行蛋白定量, 取等量蛋白溶液冻干, 用 20μl 裂解液溶解, 加入等体积的电泳缓冲液, 样品置于 100℃ 水浴 5min, 取 20μl 上样, 在 200V 恒定电压下电泳约 1h, 转膜, 5% 脱脂奶封闭抗体 1h, 加入兔抗人 TR 一抗(1:200), 4℃ 过夜, PBS 洗涤三次后加羊抗兔二抗(1:300)于 37℃ 作用 1h, PBS 洗涤三次, 用 DAB 溶液显色 3~5min, 镜检。

1.7 免疫细胞化学

SH-SY5Y 细胞接种于内置盖玻片的 6 孔板, 培养 3~4 天后, 用 NaN₃ (终浓度为 128 mmol/L) 或用 H₂O₂

(终浓度为 200 μmol/L) 处理 1h, 3h 后吸干培养液, PBS 冲洗, 无水乙醇固定 24h, 自然晾干。将盖玻片取出放于载玻片上, 0.1% 胰酶消化 5min, 非特异性血清封闭, 加 TR 抗体(1:10), 室温湿盒过夜。用 0.05% Tween-20 的 PBS 冲洗, 加生物素标记二抗, 37℃, 30min。用 0.05% Tween-20 的 PBS 冲洗, 加 SABC 液, 37℃, 30min。用 0.05% Tween-20 的 PBS 冲洗, 用 DAB 溶液显色 3-5min, 镜检。

1.8 统计

实验数据用 SAS 软件进行单因素方差分析, 组间比较作 *q* 检验。

2 结果

2.1 叠氮钠与过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

将 SH-SY5Y 细胞培养于 96 孔板, 建立损伤模型, MTT 法测细胞活性。在 0 至 288 mmol/L 范围内随 NaN₃ 作用浓度的增大, 细胞活性逐渐降低(图 1), 96 mmol/L 即有显著变化, 128 mmol/L 极显著降低细胞活性; 在 0 至 1000 μmol/L 范围内, 随着 H₂O₂ 作用浓度的增大, 细胞活性逐渐降低(图 2), 50 μmol/L 即有显著变化, 200 μmol/L 极显著降低细胞活性。

倒置相差显微镜下观察对照组 SH-SY5Y 细胞胞体丰满, 周围有光晕, 立体感强, 突起平滑细长(图 3a); 128 mmol/L 叠氮钠损伤的细胞立体感下降, 突起消失, 细胞缩成圆形(图 3b); 200μmol/L H₂O₂ 损伤的细胞也产生皱缩, 突起基本消失(图 3c)。

2.2 损伤 SH-SY5Y 细胞中 TR 水平的变化

Western blot 法检测 NaN₃ 或 H₂O₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞内 TR 的变化。用 128 mmol/L NaN₃ 或 200μmol/L H₂O₂ 作用 1h, 分别于 3h、6h、12h 后检测 TR 的变化。结果表明 NaN₃ 对 TR 的含量有显著影响, 3h 减少, 12h 仍未恢复, 但 H₂O₂ 对 TR 的影响不明显。

2.3 免疫细胞化学结果

免疫细胞化学(图 5)显示, 在 SH-SY5Y 细胞中, TR 主要分布于胞浆。NaN₃、H₂O₂ 损伤后, TR 的分布未见明显变化。

3 讨论

本实验结果表明, 在一定范围内, SH-SY5Y 细胞损伤程度与 NaN₃、H₂O₂ 呈量效依赖关系。

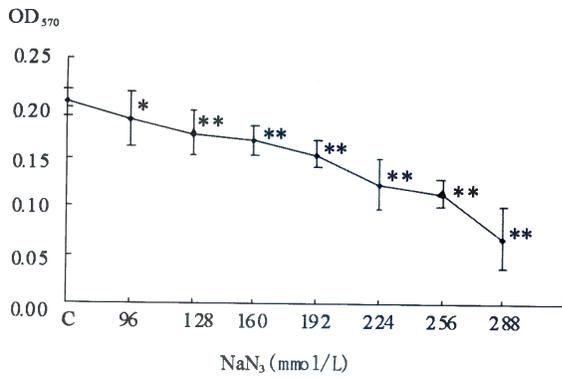


图1 不同浓度叠氮钠作用1h对SH-SY5Y细胞活性的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与正常组比)

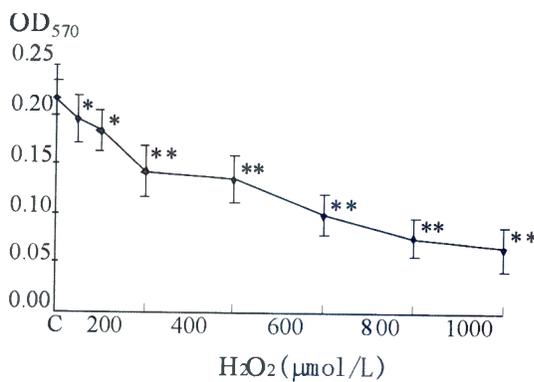


图2 不同浓度过氧化氢作用1h对SH-SY5Y细胞活性的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与正常组比)

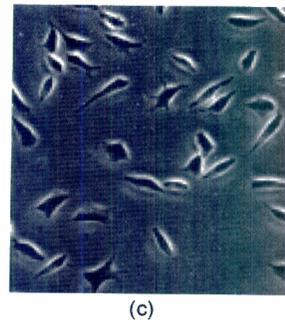
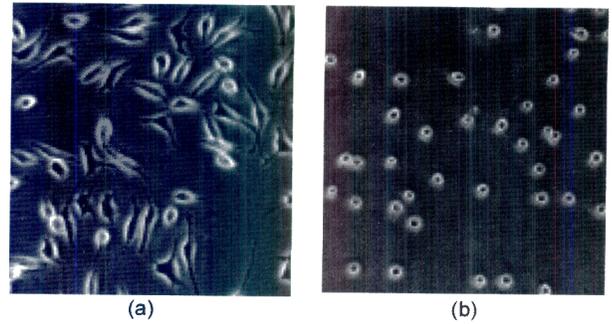


图3 叠氮钠或过氧化氢对SH-SY5Y细胞形态的影响($\times 200$) (a) 正常的SH-SY5Y细胞; (b) 128 mmol/L叠氮钠作用1h; (c) 200 μ mol/L过氧化氢作用1h。

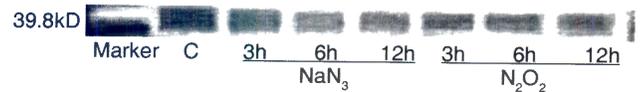


图4 叠氮钠或过氧化氢作用1h后不同时间, 胞内TR含量的变化

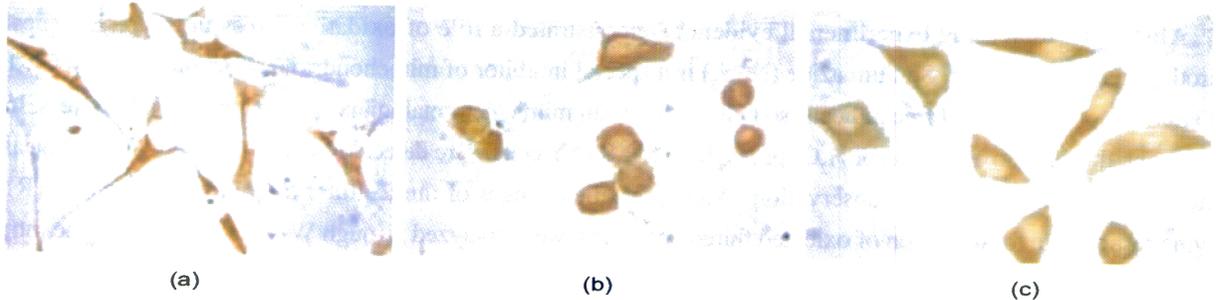


图5 叠氮钠或过氧化氢对SH-SY5Y细胞内TR分布的影响($\times 400$) (a) 正常的SH-SY5Y细胞; (b) 128 mmol/L叠氮钠作用1h; (c) 200 μ mol/L过氧化氢作用1h。

NaN₃ 特异性抑制 COX, 进而抑制细胞色素 c 的电子传递功能, 导致线粒体能量合成减少, 阻碍了能量依赖的微管蛋白的组装与聚合, 造成神经细胞轴突损伤, 最终导致细胞死亡^[3]。NaN₃ 损伤的大鼠海马区 LTP (long-term potentiation) 异常^[4], 在 Morris 水迷宫和辐射迷宫试验中表现出学习记忆行为的缺陷^[5]。

另外, COX 缺陷的原发因素可能与 mtDNA 突

变有关, 这种突变主要由氧自由基的毒性作用引起。mtDNA 损伤的累积导致线粒体电子传递的异常, 从而进一步加剧氧自由基的产生、mtDNA 的突变以及脂质和蛋白质的氧化, 最终导致细胞的死亡^[6]。

硫氧还蛋白系统是体内调节氧化还原平衡的重要组成部分, 包括硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TR)、硫氧还蛋白 (thioredoxin,

Trx) 和 NADPH。Trx 是一种普遍存在的多功能蛋白, 在其保守区有具氧化功能的硫 / 双硫键, 可以还原其它蛋白的双硫键及清除自由基。而 TR 是一种含硒蛋白, 可以维持 Trx 的氧化平衡[Trx-S₂-Trx-(SH)₂] [7]。原代培养神经元损伤时, 胞内 Trx 表达水平降低[8]。

本实验中, 叠氮钠损伤后 SH-SY5Y 细胞内 TR 表达量下降, 而 H₂O₂ 损伤对 TR 的影响不明显, 提示正常神经元可能通过其他还原机制对神经元起应激保护作用, 而叠氮钠诱导线粒体损伤时, TR 在神经损伤中的作用可能更为重要, 为进一步研究 AD、氧化应激及抗氧化蛋白之间的关系提供有意义的资料。

参 考 文 献

- [1] ARNE H. Thioredoxin and glutaredoxin systems[J]. *J Biol Chem*, 1989, **64**(24): 13963 - 13966.
- [2] IRIS M, STEPHAN Z, HANS-JURGEN M. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients[J]. *Neurobiol Aging*, 2000, **21**: 455 - 462.
- [3] MARCHETTI P, CASTEDO M, SUSIN S A, *et al.* Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis[J]. *J Exp Med*, 1996, **184**(3): 1155 - 1160.
- [4] BENNETT M C, DIAMOND D M, STRYKER S L, *et al.* Cytochrome oxidase inhibition: a novel animal model of Alzheimer's disease[J]. *Geriatr Psychiatry Neurol*, 1992, **5**(2): 93 - 101.
- [5] BENNETT M C, ROSE G M. Chronic sodium azide treatment impairs learning of the Morris water maze task[J]. *Behav Neural Biol*, 1992, **58**(1): 72 - 75.
- [6] 张 兰, 李 林. 阿尔采末症与线粒体缺陷[J]. *生理科学进展*, 1999, **30**: 363 - 364.
- [7] GARTH P, DEBBIE M, AMY C. The role of the redoxprotein thioredoxin in cell growth and cancer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, **29**: 312 - 322.
- [8] 秦 艳, 高 静, 张婷婷等. 叠氮钠损伤神经细胞内硫氧化蛋白 mRNA 的变化[J]. *实验生物学报*, 2002, **35**: 26 - 30.

Effects of H₂O₂ or NaN₃ on Thioredoxin Reductase in SH-SY5Y Cells

ZHANG Ting Ting, GAO Jing*, YANG Xiao He, XU Lin¹, XU Jiang Ying¹

(School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China; ¹Gene Center of Nanjing Military Medical College, Nanjing 210099, China)

Abstract: Increasing experimental evidence demonstrated a role of oxidative stress in the pathogenesis of neurodegeneration diseases. Sodium azide (NaN₃) is a special inhibitor of mitochondrion cytochrome c oxidase(COX), and H₂O₂ can produce lots of free radicals, so both of them can mimic neuronal injury induced by oxidative stress. In this experiment, the neurotoxic effects of H₂O₂ or NaN₃ on SH-SY5Y cells were detected by means of cell viability measurement (MTT) and morphological observation. Moreover, the changes of intracellular thioredoxin reductase(TR), the enzyme responsible for reduction of oxidized thiredoxin (Trx), were analyzed through Western blotting and the intracellular distribution of TR was observed using immunohistochemical method. It was found that SH-SY5Y cells could be insulted by either NaN₃ or H₂O₂ in a dose-dependent manner. TR was identified in plasma, suggesting it is a secreted protein. A substantial down-regulation of TR in SH-SY5Y cells was only observed 3 h later following NaN₃-induced injury. This decrease in the antioxidative TR may contribute to the dysfunction of mitochondria and subsequent neurodegeneration.

Key words: sodium azide; hydrogen peroxide; oxidative stress; thioredoxin reductase

This work was supported by Jiangsu Nature and Science Funds (BK2000015) and Analysis funds of Nanjing University

*Corresponding author, E-mail: jinggao@nju.edu.cn