

• 论 著 •

过氧化氢对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响*

陈红艳, 耿 森[△], 胡亚卓

(中国人民解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853)

摘要:目的 观察过氧化氢(H₂O₂)诱导 SH-SY5Y 细胞损伤后对线粒体膜电位的影响。方法 向培养的 SH-SY5Y 细胞加入 H₂O₂ 100、200、500 μmol/L 作用 24 h 诱导产生氧化损伤,应用 MTT 比色法检测细胞存活率,测定培养液中一氧化氮(NO)含量;并采用流式细胞仪检测细胞凋亡及线粒体膜电位。结果 与空白对照组比较,其他实验组随 H₂O₂ 浓度的加大,细胞存活率、线粒体膜电位逐渐下降,而 NO 的释放量及细胞凋亡数显著性增多,差异均有统计学意义(P<0.05)。结论 H₂O₂ 可引发细胞内 NO 的产生,使线粒体膜电位下降,导致神经细胞凋亡,从而造成脑细胞损伤,其损伤程度与 H₂O₂ 浓度呈正相关。

关键词:过氧化氢; 细胞凋亡; 线粒体; 膜电位; SH-SY5Y 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1665-03

Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells*

Chen Hongyan, Geng Miao[△], Hu Yazhuo

(Institute of Geriatrics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of exogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in SH-SY5Y cells. **Methods** Following treatment with 100, 200 and 500 μmol/L H₂O₂ for 24 hours, the viability of SH-SY5Y cells were measured by MTT assay and the content of NO in culture media was determined. The apoptosis of cells and the mitochondrial $\Delta\psi$ were detected by using flow cytometry (FCM) and immunofluorescence histochemical method respectively. **Results** Along with the increase of the concentration of H₂O₂, the content of NO and the apoptotic percentage increased, but the cell viability and $\Delta\psi$ decline in SH-SY5Y cells, compared with untreated cells. **Conclusion** H₂O₂ exposure could cause apoptosis of neurocytes by the induction of the production of NO and the decline of $\Delta\psi$ in cells, and the effects might be dependent on the dose of H₂O₂.

Key words: hydrogen peroxide; apoptosis; mitochondria; membrane potentials; SH-SY5Y cell

过氧化氢(H₂O₂)是体内氧化代谢的中间产物,同时又是一种活性氧,很容易穿透细胞膜产生细胞毒性^[1],引起细胞 ATP 衰竭、DNA 损伤、脂质过氧化反应以及细胞死亡^[2]。线粒体呼吸链是细胞产生 ATP 的主要部位,也是氧化应激活性氧(ROS)产生的主要部位,同时也是易遭受 ROS 攻击的部位。线粒体 DNA 和蛋白质损伤将降低线粒体的生物能量^[3]。Fe²⁺-半胱氨酸产生的活性氧主要是羟自由基,损伤作用很大,是引起组织损伤的最主要的一类氧自由基^[4]。线粒体呼吸链的损伤引起线粒体膜电位降低,因此线粒体 ROS 的产生与线粒体膜电位密切相关^[5]。笔者用不同浓度的 H₂O₂ 作用于体外培养的人 SH-SY5Y 细胞株中,观察 H₂O₂ 对线粒体的损伤方式。

1 材料与方 法

1.1 材料 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 药物与试剂 H₂O₂ 购自北京化工厂;二甲基亚砜(DMSO)购自北京化工厂产品;RPMI-1640 培养基(含 HEPES 5 958 mg/L、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL)购自北京天润善达生物科技有限责任公司;胎牛血清,由美国 Clark 公司提供;MTT 购自 Sigma 公司;十二烷基硫酸钠(SDS)购自 BIB 公司;胰蛋白酶-EDTA 消化液,购自北京 So-

larbio 科技有限公司;总 RNA 提取试剂 Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶均购于天泽基因生物工程有限公司;一氧化氮(NO)购自南京建成生物工程研究所;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自北京博奥森生物科技有限公司;线粒体检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。

1.2.2 仪器与设备 倒置显微镜(日本 Olympus);倒荧光显微镜数码相机(日本 Olympus BX-60)、CO₂ 培养箱(美国 Thermo);酶标仪(瑞士 TECAN);流式细胞仪(美国 BD FACS Calibur)。

1.3 细胞培养 SH-SY5Y 细胞,常规培养,含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔 3 d 换液,待细胞生长至融合状态时胰蛋白酶常规消化、传代,选取对数生长期细胞进行实验。

1.4 方 法

1.4.1 实验分组与处理 (1)空白对照组(N);(2)100 μmol/L H₂O₂ 组(M1);(3)200 μmol/L H₂O₂ 组(M2);(4)500 μmol/L H₂O₂ 组(M3)。细胞以 1.0×10⁶/mL 密度接种在 96 孔培养板中,每孔加入 100 μL 完全培养基,37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h,除 N 组外,其余各组分别加 100、200、500 μmol/L H₂O₂,作用 24 h,每组设 8 个平行样。

1.4.2 MTT 比色法检测细胞 SH-SY5Y 增殖 细胞存活率

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81041026);军队中医药科研专项基金资助项目(10ZY244);军队“十一五”指令性课题(08ZL078)。

[△] 通讯作者, E-mail: gengmiao_2006@sina.com。

用细胞增殖抑制实验(MTT 比色法)测定。生长良好的在镜下观察细胞,待细胞密度达到 1.0×10^6 /mL,更换培养基为无血清 RPMI-1640 培养液,继续培养 24 h,在避光条件下,每孔加入 MTT 0.5 mg/mL,继续培养 4 h,弃上清液 100 μ L 后每孔加 DMSO 100 μ L,振荡 10 min,于酶标仪上测波长为 570 nm 的吸光度值(A)。

1.4.3 NO 含量测定 细胞加入不同浓度的 H_2O_2 损伤 24 h 后,用胰蛋白酶裂解,按照试剂盒的说明测定 NO 含量。

1.4.4 细胞凋亡率检测 采用 Annexin V/PI 染色法,收集各组消化后细胞,调细胞浓度为 1.0×10^6 /mL,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明操作,室温、避光、反应 15 min,行流式细胞术检测,激发波长(Ex)488 nm,发射波长(Em)530 nm。检测凋亡细胞与继发性坏死细胞,计算出总的死亡细胞,以百分率表示。

1.4.5 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的测定 JC-1 为一种特异性的阳离子荧光染料,可定位在线粒体膜上,其聚集程度与膜电位成正比。当线粒体膜电位增高时,红色荧光增强,红色荧光和绿色荧光的比值可代表膜电位的高低^[6]。细胞同步化后,细胞加入不同浓度的 H_2O_2 损伤 24 h 后,用 PBS 液漂洗细胞 2 次,然后与 10 μ mol/L 的 JC-1 37 $^{\circ}$ C 负载 15 min, PBS 洗 2 次后于 Ex 488 nm, Em 530 nm 处测定红色荧光值, Em 590 nm 处测定绿色荧光值,以红色荧光值与绿色荧光值的比值的大小来表示膜电位的高低。

1.5 统计学处理 计数资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 软件进行 *t* 检测。

2 结 果

2.1 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤后的形态学变化 将细胞置于倒置显微镜下,观察形态学变化:N 组细胞生长良好,单个细胞呈梭形,少数呈类三角形,透光率高; H_2O_2 不同剂量组细胞密度显著降低,细胞聚拢,整个细胞的形态由梭形逐渐变为细长形、皱缩,最后细胞间隙增大,导致成片细胞间出现空白,透光率降低。见图 1。

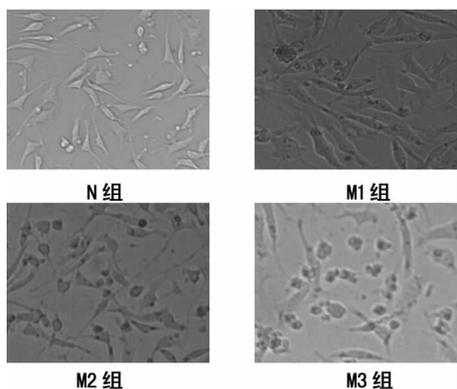
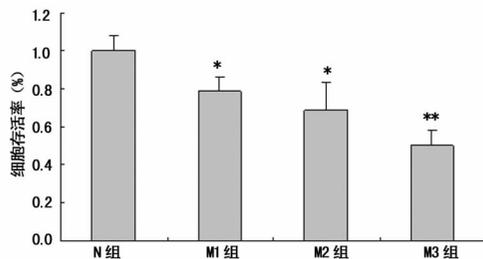


图 1 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤后的形态学变化

2.2 不同浓度的 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞损伤的存活率影响 与 N 相比, H_2O_2 损伤组细胞存活率显著降低,且差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),呈剂量依赖关系,见图 2。

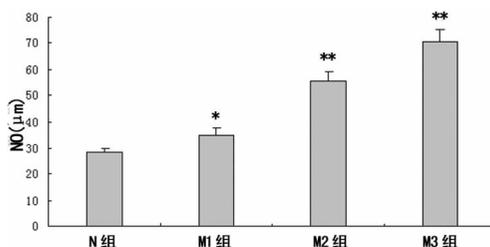
2.3 不同浓度的 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞损伤的培养液中 NO 的影响 与 N 组比较, H_2O_2 损伤后的 SH-SY5Y 细胞中 NO 含量明显增加,并随 H_2O_2 浓度增加,细胞中 NO 含量也增加,见图 3。

2.4 不同浓度的 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞损伤的凋亡作用 流式细胞术检测结果表明,正常 SH-SY5Y 细胞凋亡率小于 3%;小剂量 H_2O_2 损伤后的细胞以早期、中期凋亡为主,随 H_2O_2 浓度的加大,SH-SY5Y 细胞凋亡以中、晚期为主。当 H_2O_2 浓度达到 500 μ mol/L 时,细胞以死亡为主,见图 4。



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与 N 组比较。

图 2 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞损伤的存活率影响



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与 N 组比较。

图 3 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞损伤的培养液中 NO 的影响

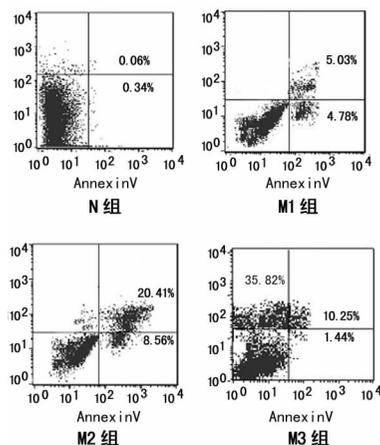


图 4 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞损伤的凋亡作用

2.5 不同浓度 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响 不同浓度 H_2O_2 处理后(M1、M2、M3 组)的细胞红、绿荧光值的比率(0.297、0.766、3.541)和 N 组(0.075)比较有明显的增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),SH-SY5Y 细胞损伤线粒体膜电位的下降与 H_2O_2 的损伤浓度呈正相关。

3 讨 论

SH-SY5Y 细胞系是一种分化程度较低的肿瘤细胞。该细胞的细胞形态、生理和生化功能与正常神经细胞相似,被广泛应用于神经系统疾病的研究。氧化应激在神经退行性疾病相关的神经细胞死亡中发挥重要作用。本研究采用不同浓度的 H_2O_2 对该细胞处理,通过 H_2O_2 产生氧自由基诱发氧化应激损伤,观察损伤状态下细胞凋亡与线粒体膜电位的变化。

H_2O_2 主要损伤细胞的膜性结构,在细胞发生凋亡早期,膜磷脂酰丝氨酸由脂膜内侧翻向外侧,与检测试剂 Annexin V 有高度亲和力,而此阶段碘化丙啶(PI)不能通过细胞膜,因此 AnnexinV 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一^[7]。研究发现, H_2O_2 的作用有明显的剂量依赖性,低浓度 H_2O_2 (100、200 $\mu\text{mol/L}$)作用下,SH-SY5Y 不能被 PI 染色,说明此时细胞膜是完整的,以凋亡早期改变为主,而高浓度 H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/L}$)作用下,大部分 SH-SY5Y 能被 PI 染色,说明此时细胞膜的完整性已被破坏,细胞死亡以坏死为主,即凋亡或坏死依赖于活性氧簇的暴露浓度^[8]。本研究结果提示,一定浓度的 H_2O_2 诱导的细胞损伤表现为细胞凋亡与继发性坏死,其中 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内,凋亡率增高,但继发性死亡率增加不明显, H_2O_2 浓度增加到 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡率明显增加,但继发性死亡率也明显增加。

在诸多凋亡的诱因中,NO 可直接诱导凋亡的发生,其原因可能是对 DNA 的直接损伤而导致细胞凋亡^[9],在氧化应激条件下,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达显著增高,从而生成过量的 NO 造成细胞损伤。本研究结果显示, H_2O_2 引发的细胞内 NO 的产生,与 H_2O_2 浓度呈正相关,从而导致神经细胞凋亡的发生。

在线粒体中可以形成 2 种具有高度生物活性的自由基:超氧阴离子和 NO。NO 与超氧阴离子形成超氧亚硝酸,产生这种超氧亚硝酸所消耗的氧占线粒体内膜所产生 H_2O_2 的 85%,它能诱导氧化应激,并促进线粒体释放细胞色素 C,诱发细胞凋亡^[10]。线粒体病变影响到细胞各成分的协调并危及细胞生命活动^[11]。线粒体如果功能紊乱,尤其是线粒体跨膜电位下降和(或)线粒体膜通透性转运孔开放是细胞凋亡发生的重要环节^[12]。

本研究表明, H_2O_2 可导致线粒体功能损伤,当浓度较低时(100、200 $\mu\text{mol/L}$),线粒体功能开始出现下降,当浓度较高时(500 $\mu\text{mol/L}$),线粒体功能呈进行性下降。随 H_2O_2 浓度的加大,自由基产生会急剧增多,形成恶性循环,过剩的 ROS 攻击线粒体膜磷脂中不饱和脂肪酸双键而导致脂质过氧化,由于神经组织具有较高的氧化代谢水平及含有丰富的高密度不饱和脂肪酸,特别易受氧自由基攻击造成损伤,同时产生的脂质过氧化物代谢产物使大分子物质交联、过量的 H_2O_2 引发细胞内 NO 的产生,线粒体膜电位下降,加剧细胞凋亡的发生、功能丧失,进一步引起脑组织的损伤。

参考文献

- [1] 曹纯章,杨绍娟,卜丽莎. 过氧化氢诱导心肌细胞凋亡性和非凋亡性死亡的研究[J]. 中国病理生理杂志,2000,16(5):457-461.
- [2] Meng XM,Reeves WB. Effects of chloride channel inhibitors on H_2O_2 induced renal epithelial cell injury[J]. Am J Physiol,2000,278(1):F83-90.
- [3] Calderón FH, Bonnefont A, Munoz FJ, et al. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide[J]. J Neurosci Res,1999,56(6):620-631.
- [4] Castellani R, Hirai K, Aliev G, et al. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci Res,2002,70(3):357-360.
- [5] Votyakova TV, Reynolds IJ. DeltaPsi (m)-dependent and-independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria[J]. J Neurochem,2001,79(2):266-277.
- [6] Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1991,88(9):3671-3675.
- [7] 李立平,韦瑛,蔡捷,等. 过氧化氢诱导血管内皮细胞凋亡与 Caspase-3 表达的实验研究[J]. 陕西医学杂志,2008,37(8):960-962.
- [8] Cole KK, Perez-Polo JR. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H_2O_2 injury[J]. J Neurochem,2002,82(1):19-29.
- [9] Zhao BL. Free radicals, natural antioxidants and neurodegenerative disease[J]. Acta Biophysica Sinica,2010,26(4):263-274.
- [10] 阚文宏. 线粒体一氧化氮合酶研究现状[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(8):698-370.
- [11] Kuza-Schughart LA, Habbersett RC, Freyer JP. Mitochondrial function in oncogene-transfected rat fibroblasts isolated from multicellular spheroids[J]. Am J Physiol,1997,273(5 pt 1):C1487-1495.
- [12] 蔡黔,周红,肖光夏,等. 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的影响[J]. 西北国防医学杂志,2004,25(4):241-245.

(收稿日期:2011-06-10)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别统计各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。