TOCP 对人成神经瘤细胞 SH-SY5Y 的氧化损伤作用

龙鼎新[1,2],伍一军[1],蒋 伟[3]
(1. 中国科学院动物研究所 分子毒理学实验室,北京 100101;2. 南华大学 公共卫生学院;
3. 南华大学公共卫生学院 2007 级卫生检验 01 班)

摘 要: 目的 研究三邻甲苯基磷酸酯(TOCP)对人成神经瘤细胞(SH-SY5Y)的氧化损伤作用。 **方法** 常规方法培养 SH-SY5Y 细胞,经 TOCP 染毒,分别检测不同浓度(0 ~ 1.0 mmol/L)TOCP 作用 48 h 以及相同浓度 TOCP(0.5 mmol/L)作用不同时间后(0、24、48、72 h)细胞内丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)的含量变化,MDA 含量用硫代巴比妥酸法(TBA)检测,CAT 含量用可见光分光光度法检测。 **结果** TOCP 染毒 SH-SY5Y 细胞 48 h 的半数抑制浓度(IC_{50})为 0.77 mmol/L。随着 TOCP 染毒浓度的增高,细胞内 MDA 的含量逐渐增高,CAT 含量逐渐下降,这种变化趋势呈现明显的剂量—效应关系($P<0.05$)。随着 TOCP 染毒时间的延长,细胞内 MDA 和 CAT 含量均呈明显的时间—效应关系。 **结论** TOCP 对 SH-SY5Y 细胞有明显的氧化损伤作用。

关键词: SH-SY5Y 细胞; 三邻甲苯基磷酸酯; 氧化损伤; 丙二醛; 过氧化氢酶
中图分类号:R1 **文献标识码:**A **文章编号:**2095 - 1116(2011)03 - 0266 - 04

Study on the Oxidative Damage of Tri-ortho-cresyl Phosphate to SH-SY5Y Cells

LONG Ding-xin, WU Yi-jun, JIANG Wei
(*Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, *China*)

Abstract: Objective To study the oxidative damage of tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP) to human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Method** The cultured SH-SY5Y cells were treated with TOCP at different concentrations (0 ~ 1.0 mmol/L) or at the same concentration of TOCP (0.5 mmol/L) for different time (24, 48, 72 h), and then, intracellular malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) content were detected by thiobarbituric acid method (TBA) and visible light spectrophotometry respectively. **Results** The half of inhibitory concentration (IC_{50}) of TOCP treatment to SH-SY5Y cells for 48 h was 0.77 mmol/L. With the increased concentration of TOCP treatment, intracellular MDA content gradually increased, while CAT levels gradually decreased, which showed significant dose-response relationship ($P<0.05$). With the TOCP treatment time prolonged, intracellular MDA and CAT levels showed obvious time-effect relationship. **Conclusion** TOCP can cause oxidative damage on human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Key words: SH-SY5Y; TOCP; oxidative damage; MDA; CAT

三邻甲苯基磷酸酯(tri-ortho-cresyl phosphate, TOCP)是三甲苯磷酸酯的 3 种异构体(邻、对及间位)之一,分子式 $C_{21}H_{21}O_4P$(图 1)。常温下,TOCP 为无味、微黄透明的油状液体。不溶于水,能溶于醇、醚、苯、氯仿及二甲基亚砜(DMSO)等有机溶剂。由于其具有化学和热稳定性,可作为增塑剂、软化剂、阻燃剂使用,常用于塑料、塑酯、橡胶、涂料及合成纤维等工业,亦可作为溶剂、汽油中铅的净化剂及

收稿日期:2011 - 03 - 25
基金项目:"863"计划(2006AA06Z423);湖南省教育厅优秀青年基金(09B087);南华大学博士启动基金(2010XQD19).
通讯作者:伍一军,电话:010 - 64807251, E-mail: wuyj@ ioz. ac. cn.

机油添加剂等[1],因此,在工业上及日常生活上用途极为广泛。

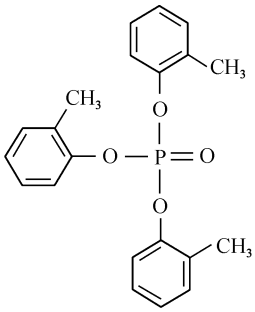


图 1　TOCP 化学结构式

TOCP 对动物具有神经毒性、生殖毒性及免疫毒性等多器官系统毒性作用[2~5]。前期研究表明,TOCP 能抑制 SH-SY5Y 细胞增殖,致 SH-SY5Y 细胞周期阻滞于 G1 期,并呈现浓度依赖和时间依赖性关系[6]。这些结果提示 TOCP 可能对正处于发育中的神经组织/细胞产生毒性作用。近年有研究表明,有机磷化合物可以诱导氧化应激,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及抗氧化反应[7~9]。作为有机磷酸酯类化合物的 TOCP 也可以引起成年母鸡神经组织的脂质过氧化[2],本文通过检测经 TOCP 染毒之后 SH-SY5Y 细胞中丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)含量的变化情况,为 TOCP 是否也会导致神经细胞的脂质过氧化反应提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

SH-SY5Y 细胞系由中国科学院动物研究所分子毒理学实验室提供;DMEM 培养基购自 Sigma 公司;胎牛血清购自天津 TBD 灏洋生物制品公司;胰蛋白酶购自 Gibco 公司;青霉素钠盐和硫酸链霉素购自华北制药有限公司;Tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP,色谱纯)购自 BDH Chemical Ltd Poole England;噻唑蓝(thiozoyl blue tetrazolium bromide, MTT)购自 Amersco;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、CAT 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2　细胞的培养

SH-SY5Y 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 CO_2 培养箱(37℃,5% CO_2,饱和湿度)中进行培养。

1.3　药物处理

细胞接种于 60 mm 培养皿中,培养 24 h 后,去除培养基,换上新鲜培养基,加入一定浓度的 TOCP (DMSO 配制)继续培养 24 ~72 h。对照组和处理组细胞的 DMSO 浓度为 0.1%。

1.4　MTT 法测定细胞增殖

将处于对数期生长期的细胞以 1×10^4/孔的密度接种到 96 孔细胞培养板中,在细胞贴壁生长 24 h 后,更换新鲜含不同浓度 TOCP(0、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mmol/L)的培养基,培养不同时间(24、48、72 h)后,加入 MTT(终浓度为0.5 mg/mL),继续培养 4 h。吸出培养基,加入150 μL DMSO。室温震荡 10 min 以充分溶解结晶,然后在酶标仪(BIO-RAD Benchmark)上以无细胞的孔为空白测定 570 nm 的吸收值。每个浓度设置3 ~4 个重复,重复 3 次实验。

1.5　MDA 和 CAT 的测定

SH-SY5Y 细胞接种于 100 mm 培养皿中,培养 24 h后,去除培养基,换上新鲜培养基,加入不同浓度的 TOCP(0、0.25、0.50 和 1.00 mmol/L)继续培养 48 h,以及在 0.50 mmol/L 浓度下分别培养(0、24、48、72 h)。对照组和处理组细胞的 DMSO 浓度为 0.1%。时间终点胰酶消化收获细胞,冰冷 PBS 洗 2 次,离心收集细胞,200 μL PBS 重悬,冰上间断超声破碎细胞 15 s(分 3 次,每次超声 5 s,间断 5 s),测定蛋白浓度,超声悬液用于 MDA 和 CAT 的测定。

1.5.1　*硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量*　按照试剂盒操作说明书配制标准管、标准空白管、测定管和测定空白管。各管配制好后旋涡混匀器混匀,试管口用保鲜膜扎紧,用针头刺一小孔,水浴 40 min,取出后流水冷却,然后 4 000 rpm × 10 min,取上清,532 nm处测定各管吸光度值(A)。按以下公式计算 MDA 的含量。

$$\text{MDA(nmol/mg prot)} = \frac{A_{测定管} - A_{测定空白管}}{A_{标准管} - A_{标准空白管}} \times 标准品浓度(10\ \text{nmol/mL}) \div 蛋白含量(\text{mg prot/mL})$$

1.5.2　*可见光分光光度法测定 CAT 活性*　按照试剂盒操作说明书配制对照管和测定管。各管配制好后旋涡混匀器混匀,37℃准确反应 1 min,各管再按要求加入相应试剂或匀浆液后,混匀,于波长 405 nm处,0.5 cm 光径比色杯,测定各管吸光度值(A)。按以下公式计算 CAT 的含量。

$$\text{CAT 活力(U/mg prot)} = (A_{对照管} - A_{测定管}) \times 271 \times \frac{1}{60 \times 取样量} \div 蛋白含量(\text{mg prot/mL})$$

1.6 统计学分析

统计数据表示为 $\bar{x} \pm s$。多组之间比较采用单因素方差分析,采用 LSD 法进行实验组与对照组比较,$P<0.05$ 认为差异有显著性。

2 结　　果

2.1 TOCP 对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

用不同浓度 TOCP(0、0.05、0.10、0.25、0.50 和 1.00 mmol/L)处理 SH-SY5Y 细胞 24 ~ 72 h,与对照组比较,各浓度组 TOCP 处理细胞 24 h 细胞存活没有明显差异。但 TOCP 处理 48 h 或 72 h,细胞增殖则受到明显的抑制,呈浓度依赖关系,48 h 和 72 h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 0.77 mmol/L 和 0.07 mmol/L(图 2)。形态学上,TOCP 并没有诱导 SH-SY5Y 细胞出现神经突起样结构的分化特征(图 3),这提示 TOCP 抑制细胞的增殖与细胞分化无关。

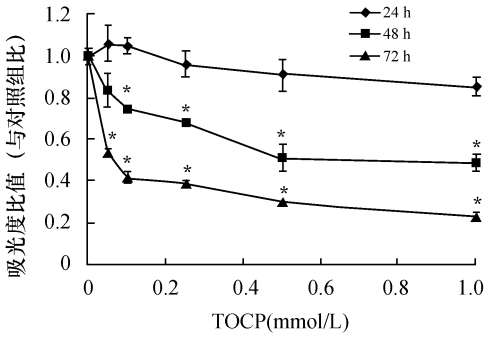
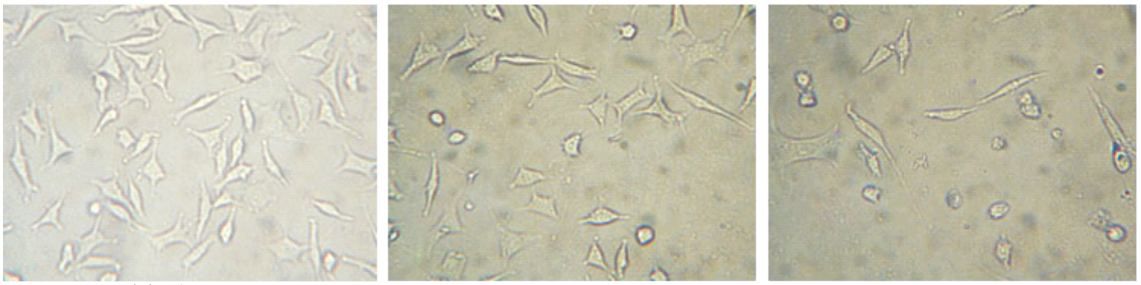


图 2　TOCP 对 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制作用

*:与 0 h 比较,$P<0.05$



溶剂对照组　　0.5 mmol/L TOCP48 h组　　1.0 mmol/L TOCP48 h组

图 3　TOCP 对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

2.2 MDA/CAT 随 TOCP 浓度改变的量效关系

细胞内 MDA 含量可以作为脂质过氧化的一种标志物。SH-SY5Y 细胞用不同浓度的 TOCP 处理 48 h 后,与未处理组 SH-SY5Y 细胞(对照组)比较,随着 TOCP 染毒浓度的增高,细胞内 MDA 含量也逐渐升高,这种变化趋势呈现明显的剂量—效应关系($P<0.05$)(图 4)。

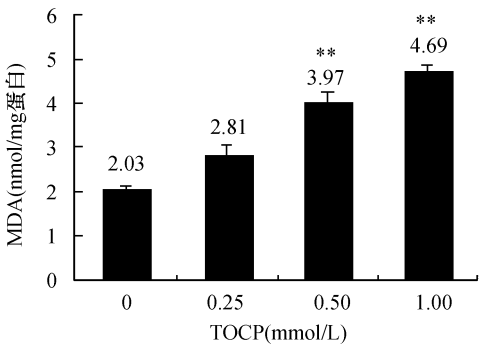


图 4　TOCP 对 SH-SY5Y 细胞内 MDA 含量的影响

与对照组(0 mmol/L)比较,*:$P<0.05$,**:$P<0.01$

细胞内 CAT 作为抗氧化的保护性指标之一,SH-SY5Y 细胞用不同浓度的 TOCP 处理 48 h 后,由图 5 可见,与未处理组 SH-SY5Y 细胞(对照组)比较,随着 TOCP 染毒浓度的增高,细胞内 CAT 含量也逐渐降低,这种变化趋势呈现明显的剂量—效应关系($P<0.05$)。

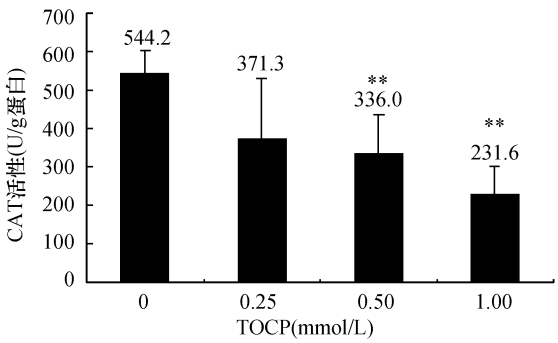


图 5　TOCP 对 SH-SY5Y 细胞中 CAT 活性的影响

与对照组(0 mmol/L)比较,*:$P<0.05$,**:$P<0.01$

2.3 MDA/CAT 随染毒时间改变的时效关系

采用 0.5 mmol/L 浓度的 TOCP,结果如图 6、图 7 所示,24 h 组与对照组 MDA 含量比较差异无显著性,而培养 48 h 和 72 h 两组 MDA 含量的变化与对照组比较差异有显著性($P<0.01$),而 CAT 的检测结果示培养 24、48、72 h 3 组与对照组比较均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。

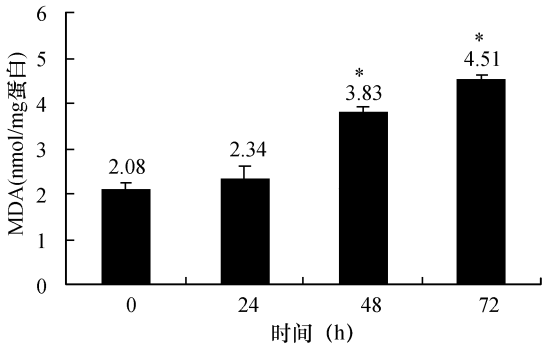


图 6 TOCP 对 SH-SY5Y 细胞中 MDA 含量影响的时效关系

与对照组(0 h)比较,*:$P<0.01$

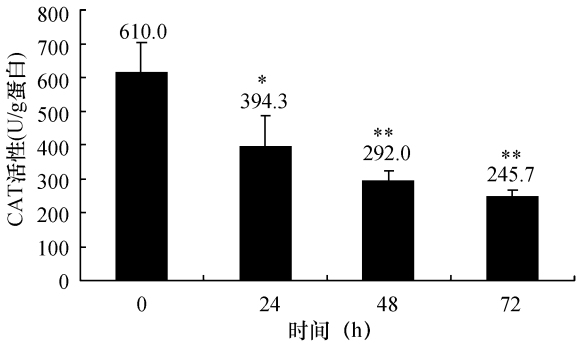


图 7 0.5 mmol/L TOCP 对 SH-SY5Y 细胞中 CAT 活性影响的时效关系

与对照组(0 h)比较,*:$P<0.05$,**:$P<0.01$

3 讨 论

TOCP 广泛应用于工业生产中,其毒性作用也引起了广大学者的关注。过去的研究主要集中在其诱发的迟发性神经毒性上[2,3]。为了更进一步研究 TOCP 诱发的神经毒性机制,本文采用 SH-SY5Y 细胞为模型,首先研究了 TOCP 对未分化 SH-SY5Y 细胞增殖的影响,发现 TOCP 能抑制细胞增殖,并呈浓度依赖和时间依赖性关系,提示 TOCP 可能对正处于发育中的神经组织/细胞产生毒性作用,并进一步探讨了 TOCP 对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用机制。

一般说来,在细胞分化的过程中细胞增殖减少,但从细胞形态上来看,TOCP 并不诱导细胞的分化。这就提示了 TOCP 对 SH-SY5Y 细胞的增殖抑制不是诱导分化所致。

许多外源化学物进入机体后可以产生氧自由基引起氧化损伤。在细胞氧化损伤的研究中,对于细胞内活性氧基团和抗氧化剂的检测常常是一个非常重要的指标,因其直接反应细胞的状态。自由基是指某些原子的外层轨道中有不成对的电子基团,它具有非常活泼的化学性质,可以直接攻击细胞或损伤并产生更多的自由基团,甚至引起链式反应。细胞在正常代谢中可产生自由基,氧自由基攻击生物膜磷脂中的多不饱和酸引发脂质过氧化作用:一者可引起细胞代谢和功能障碍,甚至死亡;二者可形成新的氧自由基。但体内存在抗氧化系统,如过氧化氢酶(CAT)等,通过一些化学反应可以缓冲及清除自由基而避免其伤害作用。过氧化氢酶(CAT)是过氧化物酶体的标志酶,广泛存在于细胞及某些组织内的过氧化物体中,是一种类似“清除剂”作用的酶类,它的主要作用就是催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2,使得 H_2O_2 不致于与 O_2 在铁螯合物作用下反应生成非常有害的 $-OH$:$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$,达到清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一,因此,其含量的改变亦可间接反映出细胞的自我保护能力的改变。丙二醛(MDA)为脂质过氧化的代谢产物,是反映细胞或机体内脂质过氧化程度的常用指标,其含量的改变可间接地反映出细胞受到自由基攻击的严重程度或细胞损伤的程度。

近年来研究表明,有机磷化合物可以诱导氧化应激,产生活性氧以及抗氧化反应[7~9]。作为有机磷酸酯类化合物的 TOCP 也可以引起成年母鸡神经组织的脂质过氧化,导致氧化应激[2]。本课题组进一步的实验结果发现,TOCP 可导致培养的 SH-SY5Y 细胞内 MDA 含量的增加,同时导致 CAT 含量降低,并呈明显的剂量—效应和时间—效应关系。而前者是反映细胞受到氧化损害的重要指标,后者则反映细胞体内抵抗氧化损害的关键酶。提示 TOCP 可以引起细胞内抗氧化能力减弱,使细胞更容易受到自由基等的损伤。这样导致细胞体内的 H_2O_2 水平将持续增高,最终对细胞造成损害,甚至死亡。TOCP 对培养的 SH-SY5Y 细胞增殖的抑制可能与其对细胞的氧化损伤有关。

(下转第 272 页)