

## 2 结 果

### 2.1 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抑制 PMA 诱导 THP-1 巨噬细胞炎症因子的表达

用 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (10 nmol/L) 和/或 PMA (250 μmol/L) 处理 THP-1

巨噬细胞 6 h, 采用荧光定量 PCR 和 ELISA 法检测 TNFα、IL-1β、IL-6 和 IL-10 的表达水平。如图 1 和图 2 所示, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (10 nmol/L) 显著抑制 PMA (250 μmol/L) 作用下 THP-1 巨噬细胞 TNFα、IL-1β 和 IL-6 的表达, 并上调 IL-10 的表达水平。

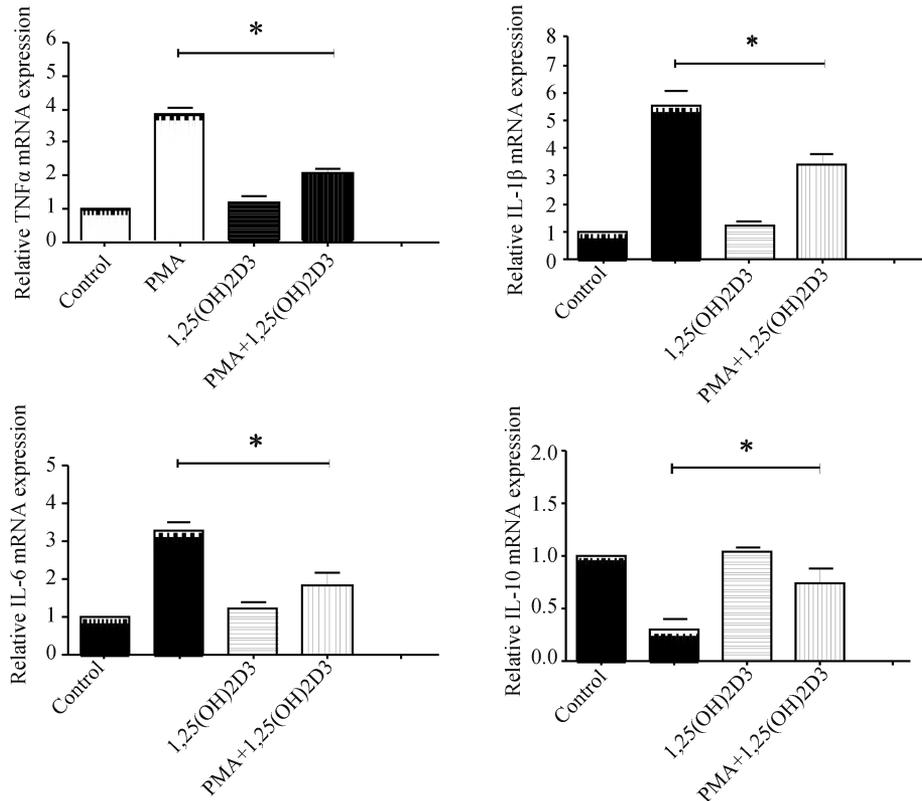


图 1 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对 PMA 作用下 THP-1 巨噬细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 (n=3) 荧光定量 PCR 法检测 TNFα(左上图)、IL-1β(右上图)、IL-6(左下图)和 IL-10(右下图)mRNA 的表达(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>+PMA 与 PMA 组比较, \*:P<0.05)

### 2.2 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 上调 PMA 作用下 THP-1 巨噬细胞 AMPKα1 磷酸化

用 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 处理 THP-1 巨噬细胞不同时间(0, 15, 30, 60, 120 min), 采用 Western-blot 检测 AMPKα1 和磷酸化 AMPKα1 的表达, 如图 3 所示, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 上调 THP-1 巨噬细胞磷酸化 AMPKα1 水平。选择 60 min 为时间点, 如图 4 所示, PMA 下调 THP-1 巨噬细胞 AMPKα1 磷酸化, 而 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 显著上调 PMA(250 μmol/L) 作用下 THP-1 巨噬细胞 AMPKα1 磷酸化水平。

## 3 讨 论

流行病学调查显示, 我国超过 90% 以上的人群存在 VD 缺乏(参照美国内分泌学会指南, 血清 25-

羟胆钙化醇(25(OH)D<sub>3</sub>) 含量低于 20 ng/mL 为 VD 缺乏, 低于 30 ng/mL 为 VD 不足), 提示 VD 缺乏是我国重要的健康问题<sup>[4]</sup>。除了参与钙磷代谢, VD 缺乏与多种慢性炎症疾病密切相关, 然而 VD 与上述疾病是否存在直接因果关系尚不明确<sup>[1]</sup>。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 是 VD 在体内的活性成分, 通过与维生素 D 受体(VDR) 结合, 启动胞内机制发挥调节免疫功能、抑制炎症和抗氧化等作用<sup>[5]</sup>。在前期研究中, 发现 VD 能够显著促进 As 斑块巨噬细胞向抗炎 M2 型极化, 从而抑制 As 的发生发展<sup>[3]</sup>。在本研究中, 发现 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 能够抑制 PMA 诱导的巨噬细胞炎症反应, 这进一步为 VD 与肥胖/2 型糖尿病相关提供了直接的实验证据。

近来研究发现, 细胞代谢在调节巨噬细胞免疫/

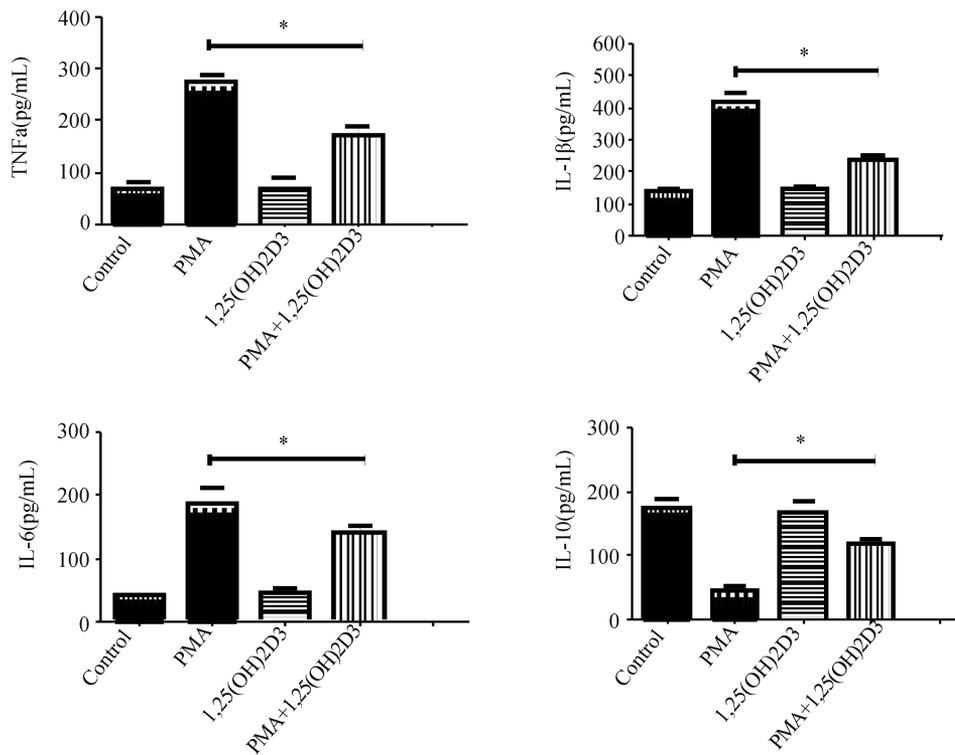


图 2 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对 PMA 作用下 THP-1 巨噬细胞炎症因子表达的影响 (n=3) ELISA 法检测 TNFα (左上图)、IL-1β (右上图)、IL-6 (左下图) 和 IL-10 (右下图) 的表达 (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>+PMA 与 PMA 组比较, \* :P<0.05)

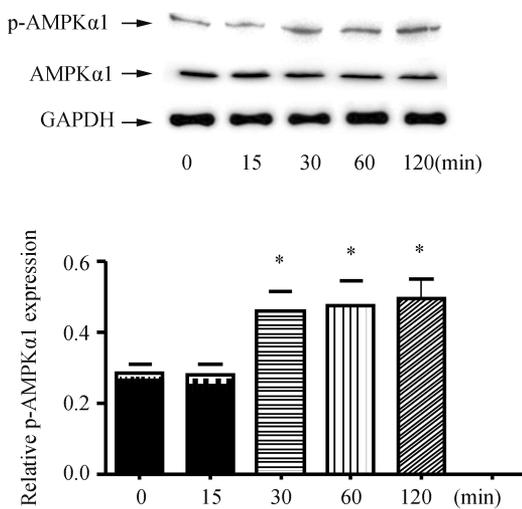


图 3 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对 THP-1 巨噬细胞 AMPKα1 和 p-AMPKα1 表达的影响 (n=3) Western blot 法检测 AMPKα1 和 p-AMPKα1 表达 (与 0 min 组比较, \* :P<0.05)

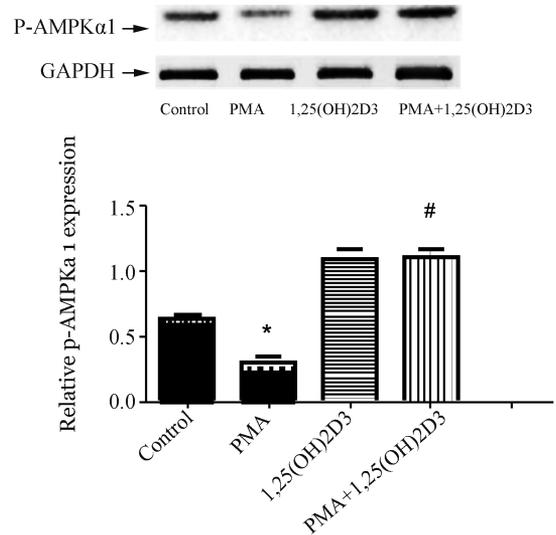


图 4 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对 PMA 作用下 THP-1 巨噬细胞 AMPKα1 和 p-AMPKα1 表达的影响 (n=3) Western blot 法检测 AMPKα1 和 p-AMPKα1 表达 (与 control 组比较, \* :P<0.05; 与 PMA 组比较, #:P<0.05)

炎症过程中起着关键作用<sup>[6]</sup>。在 FFA、游离胆固醇等促炎因素作用下,巨噬细胞脂肪酸氧化 (Fatty Acid Oxidation, FAO) 水平明显下降,有氧糖酵解 (Aerobic Glycolysis, AG) 活性显著增加,导致细胞呈

促炎状态,表现为促炎因子 TNFα、IL-1β 和 IL-6 的上调及抗炎因子 IL-10 的下调<sup>[7-8]</sup>。5'单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-activated Protein Kinase, AMPK)

是维持细胞代谢平衡的关键蛋白酶,由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  3 个亚基组成的异源三聚体蛋白,其中  $\alpha$  亚单位起催化作用, $\beta$  和  $\gamma$  亚单位起稳定作用<sup>[9]</sup>。研究证实,肥胖状态下 ATM 的 AMPK 活性受到显著抑制,细胞 FAO 水平明显下降,AG 活性显著增加,因此调节 AMPK 活性成为改善胰岛素抵抗和 2 型糖尿病新的靶点<sup>[10]</sup>。Li 等<sup>[11]</sup> 最近报道 VD 能够通过激活 AMPK/mTOR 信号增强二甲双胍对前列腺癌细胞的抑制作用<sup>[11]</sup>。VD 能够通过激活自噬介导的 AMPK 信号减轻鱼藤酮引起的神经损伤<sup>[5]</sup>。在本研究中,发现 PMA 能够下调 AMPK $\alpha$ 1 的磷酸化水平,而 VD 能够显著上调 PMA 作用下 THP-1 巨噬细胞 AMPK $\alpha$ 1 的磷酸化水平,提示 AMPK $\alpha$ 1 活化可能参与了 VD 对 PMA 诱导巨噬细胞促炎/抗炎因子表达的调节作用。然而,VD 抑制 PMA 诱导的巨噬细胞炎症反应是否通过调节细胞 FAO/AG,将在后续实验中进一步证实。

综上,本实验证实 VD 抑制 PMA 诱导的巨噬细胞炎症因子表达,并激活 THP-1 巨噬细胞 AMPK $\alpha$ 1 磷酸化水平,这将为肥胖和 2 型糖尿病的防治提供一种新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases [J]. *J Inflamm Res*, 2014, 29(7): 69-87.
- [2] Karkeni E, Marcotorchino J, Tourniaire F, et al. Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1782-1793.
- [3] Yin K, You Y, Swier V, et al. Vitamin D protects against atherosclerosis via regulation of cholesterol efflux and macrophage polarization in hypercholesterolemic swine [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35 (11): 2432-2442.
- [4] Yu S, Fang H, Han J, et al. The high prevalence of hypovitaminosis D in China: a multicenter vitamin D status survey [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(8): e585.
- [5] Karkeni E, Marcotorchino J, Tourniaire F, et al. Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1782-1793.
- [6] Oishi Y, Manabe I. Integrated regulation of the cellular metabolism and function of immune cells in adipose tissue [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(3): 294-303.
- [7] Alvarez-Curto E, Milligan G. Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 19.
- [8] Lu J, Chen X, Zhang Y, et al. Astragalus polysaccharide induces anti-inflammatory effects dependent on AMPK activity in palmitate-treated RAW264.7 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31 (6): 1463-1470.
- [9] Steinberg GR, Schertzer JD. AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92(4): 340-345.
- [10] Ruderman NB, Carling D, Prentki M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 2764-2772.
- [11] Li HX, Gao JM, Liang JQ, et al. Vitamin D3 potentiates the growth inhibitory effects of metformin in DU145 human prostate cancer cells mediated by AMPK/mTOR signalling pathway [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(6): 711-717.

(本文编辑:蒋湘莲)

## PFOS 致 SH-SY5Y 细胞凋亡及可能机制

全小青<sup>1,2</sup>, 李 武<sup>1</sup>, 曾怀才<sup>2\*</sup>

(1. 南华大学公共卫生学院环境医学与放射卫生研究所, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学后勤服务中心医务所)

**摘要:** **目的** 探讨全氟辛烷磺酸盐(PFOS)对成人神经母瘤细胞(SH-SY5Y)的凋亡效应及可能的机制。**方法** 实验中 PFOS 剂量设置为 200、150、100、50、10、1  $\mu\text{mol/L}$  和 DMSO(对照组)。体外培养 SH-SY5Y 细胞,以不同浓度 PFOS(1、10、50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞。染毒 24 h 和 48 h 后用 CCK8 法检测 SH-SY5Y 细胞活性,应用 Annexin-V FITC/PI 双染法结合流式细胞术检测细胞凋亡,紫外和荧光分光光度法检测 SH-SY5Y 细胞超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GSH)、总活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)的影响。**结果** PFOS 暴露降低了 SH-SY5Y 细胞活性,并呈明显的剂量效应关系;PFOS 导致 SH-SY5Y 细胞凋亡;紫外和荧光分光光度法结果显示 PFOS 引起 SH-SY5Y 细胞中 SOD 和 GSH 水平下降,与对照组相比,最高剂量组 PFOS 引起 GSH 含量从  $8.00 \pm 0.12 \text{ nmol/mg}$  蛋白降至  $5.89 \pm 0.90 \text{ nmol/mg}$  蛋白;同时引起总活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)水平上升,与对照组相比,最高剂量组 PFOS 引起 MDA 含量从  $1.92 \pm 0.17 \text{ nmol/mg}$  蛋白显著上升至  $6.95 \pm 0.26 \text{ nmol/mg}$  蛋白。**结论** PFOS 可能通过对 SH-SY5Y 细胞产生氧化应激损伤从而对 SH-SY5Y 细胞产生毒性效应。

**关键词:** 全氟辛烷磺酸钾盐; 成人神经母瘤细胞; 氧化应激; 凋亡

中图分类号:R329.25 文献标识码:A

## The Study of SH-SY5Y Cells Apoptosis Induced by PFOS and Its Mechanism

QUAN Xiaoqin, LI Wu, ZENG Huaicai

(*Institute of Environmental Medicine and Radiation Health, School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China*)

**Abstract:** **Objective** Explore the apoptosis effects of PFOS on SH-SY5Y cells and its mechanism. **Methods** The experiment was divided into seven groups, the control (DMSO) and the PFOS groups (1, 10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol/L}$ ). The cell viability and time-efficiency of SH-SY5Y were determined by CCK8, the apoptosis rate were detected by Annexin-V FITC/PI double-staining, respectively. The effects of PFOS on oxidative stress damage in SH-SY5Y cells were detected by UV spectrophotometry and fluorescence methods. **Results** PFOS treatment significantly decreased SH-SY5Y cell viability in a dose dependent manner. The apoptosis effects were observed in SH-SY5Y cells obviously after PFOS exposure 48 h; The results of UV and fluorescence spectrophotometry showed that PFOS induced SH-SY5Y cell superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GSH) decreased, compared with the control, and the highest group of PFOS decreased GSH from  $8 \pm 0.12 \text{ nmol/mg}$  protein to  $5.89 \pm 0.9 \text{ nmol/mg}$  protein. While the total reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) levels increased, compared with the control, the highest group of PFOS elevated MDA from  $1.92 \pm 0.17 \text{ nmol/mg}$  protein to  $6.95 \pm 0.26 \text{ nmol/mg}$  protein. **Conclusion** PFOS produced oxidative stress damage in SH-SY5Y cells, which may be the mechanisms of neurotoxicity induced by PFOS.

**Key words:** PFOS; SH-SY5Y cells; oxidative stress; apoptosis

收稿日期:2016-03-03;修回日期:2016-06-28

基金项目:国家自然科学基金(81273026),湖南省卫生厅(B2011-044),衡阳市科技局(2011KS9)。

\* 通讯作者, E-mail: zenghuaicai@126.com

全氟辛烷磺酸盐(Perfluorooctane Sulfonates, PFOS)是近十年出现具有环境持久性有机污染物,因其疏水疏油的特殊性质而被广泛的应用于工业、农业和日常生活的各种材料如润湿剂、抗腐蚀剂、泡沫

灭火剂以及皮革、造纸、服装等产品中<sup>[1-2]</sup>。研究表明 PFOS 不但存在于水体、空气、食品和乳汁等多种环境介质中,而且也存在于野生动物和人体内<sup>[3-4]</sup>。PFOS 在职业暴露人群和非职业人群血液中的平均含量分别是 33.46 ng/mL 和 34.16 ng/mL<sup>[5]</sup>。由于 PFOS 在人体通过与血清白蛋白牢固结合并且半衰期长达 5.4 年<sup>[6]</sup>,远大于 PFOS 在大鼠体内的半衰期(100 天)<sup>[7]</sup>,所以其对人体的健康效应备受关注。研究报道 PFOS 能够通过血脑屏障<sup>[8]</sup>和胎盘屏障<sup>[9]</sup>,故发育中的神经系统容易受到 PFOS 暴露。PFOS 在人体内主要蓄积在肝脏、血液和大脑,并且在大脑中的蓄积浓度也可达到血液中 PFOS 浓度的 32%<sup>[10]</sup>,因此,关于 PFOS 的神经系统毒性备受关注。

Johansson 等<sup>[11]</sup>用 PFOS 处理 10 天龄新生小鼠后,成年小鼠的认知和行为功能受到了影响,说明 PFOS 致新生小鼠学习记忆行为的损伤具有持续性。Chang 和王玉等<sup>[10,12]</sup>报道,产前和泌乳期暴露 PFOS 导致了子代大鼠的运动增加和认知功能的损伤。总之,PFOS 能导致实验动物活动增加、记忆功能和认知能力损伤等神经毒性。但是目前对 PFOS 引起神经毒性的潜在机制尚不清楚。本研究用 PFOS 处理 SH-SY5Y 细胞后检测氧化应激损伤相关指标变化来探讨其可能的神经毒性机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人源神经母瘤细胞(SH-SY5Y)购自中国科学院上海细胞库。PFOS 购自美国 Sigma 公司,溶于二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)中,配置成 200 mmol/L 的储存液,再用 DMSO 分别稀释成 150、100、50、10、1 mmol/L 储存液。实验中 PFOS 剂量设置为 200、150、100、50、10、1  $\mu\text{mol/L}$  和 DMSO(对照组)。

**1.2 细胞培养和染毒** SH-SY5Y 细胞生长于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中(内含终浓度为 100 U/mL 的青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  的链霉素),于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温、 $\text{CO}_2$  浓度为 5%的细胞培养箱中培养,待细胞处于对数生长期并生长至 60%融合度时,开始染毒。染毒时间为 24 h 和 48 h。

**1.3 主要仪器与试剂** 细胞培养箱,荧光倒置显微镜,ELX-800 酶标仪,CCK8 细胞活性检测试剂,AV-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,总谷胱甘肽检测试剂盒,脂质氧化产物(Malondialdehyde, MDA)

检测试剂盒,总 SOD 活性检测试剂盒(WST-8 法),活性氧检测试剂盒。

**1.4 细胞活性检测和细胞凋亡检测** 细胞活性检测:细胞活性检测采用 CCK8 法。将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔,接种密度为  $5.0 \times 10^3$  个/孔,经培养、染毒等步骤后,酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度值,细胞活性计算公式为:细胞活性(%) =  $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(\text{对照}) - A(\text{空白})] \times 100\%$ ; A(加药):具有细胞、CCK8 溶液和毒物溶液的孔的吸光度; A(空白):具有培养基和 CCK8 溶液而没有细胞的孔的吸光度; A(对照):具有细胞、CCK8 溶液而没有毒物溶液的孔的吸光度。细胞凋亡检测:将 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板,接种密度为  $2 \times 10^4$  个/mL,待细胞贴壁并长至 50%融合度时开始染毒,染毒 48 h 后,1  $\times$  PBS 洗涤 2~3 遍,用 0.25%胰蛋白酶消化 1~2 min(消化时间不要过长,以免引起假阳性),用无血清培养基吹打至悬液,室温离心收集细胞,用 PBS 洗涤细胞两次,按照凋亡试剂盒说明书进行操作。将细胞重悬 Binding Buffer 500  $\mu\text{L}$ ,加入 5  $\mu\text{L}$  AV-FITC 混匀后再加入 5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI),轻轻混匀,温室避光反应 10 min,在 1 h 内经流式细胞仪检测。

**1.5 氧化应激相关指标检测** 细胞总活性氧(Reactive oxygen species, ROS)、总超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(MDA)含量和细胞中总谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量的测定严格按照试剂盒说明书提供的操作步骤进行测定。

**1.6 统计学分析** 本研究所有数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,得到的数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,同时对 PFOS 染毒浓度和染毒时间对 SH-SY5Y 细胞活性的影响进行双因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 PFOS 暴露对 SH-SY5Y 细胞活性和细胞形态的影响** SH-SY5Y 细胞暴露于不同的 PFOS 剂量组和 DMSO(对照组)24 h 和 48 h 后,相对于对照组,SH-SY5Y 细胞分别在 50  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  剂量组出现细胞活性显著降低(图 1A);同时将 PFOS 处理时间和 PFOS 处理浓度对 SH-SY5Y 细胞活性的影响进行双因素方差分析,发现 PFOS 处理浓度( $F = 10.69, P < 0.05$ )和 PFOS 处理时间( $F = 6.96, P < 0.05$ )