

维生素E、维生素C、牛磺酸对苯并[a]芘致SH-SY5Y细胞能量代谢损伤的影响

王丹¹, 吕懿¹, 曹彬¹, 成丽霞¹, 任学科¹, 穆箭兵², 郑金平^{1,3}

1. 山西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 山西 太原 030001

2. 美国国立卫生研究院, 美国马里兰州 贝塞斯达 001240

3. 长治医学院公共卫生与预防医学系, 山西 长治 046000

摘要:

[目的] 观察维生素E、维生素C、牛磺酸对苯并[a]芘(BaP)暴露引起人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)能量代谢损伤的影响。

[方法] 分别用DMSO、BaP (1 μmol/L)、BaP (1 μmol/L) + 维生素E (50 μmol/L)、BaP (1 μmol/L) + 维生素C (100 μmol/L)、BaP (1 μmol/L) + 牛磺酸 (100 μmol/L) 处理SH-SY5Y细胞24 h后, 用MTT法检测细胞存活率, ROS活性氧检测试剂盒检测细胞内ROS水平, 细胞丙二醛(MDA)测定试剂盒检测细胞内MDA含量, 超氧化物歧化酶(SOD)分型试剂盒检测细胞内SOD活性, Seahorse XFP细胞能量分析仪检测细胞线粒体呼吸功能和糖酵解功能。

[结果] BaP染毒组细胞存活率(84.2%±1.2%)、SOD活性[(60.19±1.02) U/mg] 低于溶剂对照组[100%±3.74%、(67.37±0.78) U/mg] ($P<0.05$), ROS水平(60.73%±3.15%) 和MDA含量[(0.837±0.104) μmol/g] 则高于溶剂对照组[31.27%±1.40%、(0.382±0.083) μmol/g] ($P<0.05$)。BaP染毒组基础有氧呼吸速率[(2.64±0.43) pmol/min]、ATP偶联的有氧呼吸速率[(2.09±0.32) pmol/min]、有氧呼吸最大值[(3.42±0.03) pmol/min]、有氧呼吸储备值[(0.78±0.44) pmol/min] 均低于溶剂对照组[(4.89±0.43、4.16±0.24、7.06±0.11、2.18±0.35) pmol/min] ($P<0.05$)。质子漏耗氧速率[(0.55±0.16) pmol/min]、糖酵解水平[(3.54±1.02) mpH/min]、糖酵解最大值[(5.94±0.47) mpH/min]、糖酵解储备值[(2.40±0.61) mpH/min] 与溶剂对照组[(0.73±0.27) pmol/min、(2.71±0.66) mpH/min、(5.75±0.65) mpH/min、(3.04±0.19) mpH/min] 相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。维生素E、维生素C、牛磺酸干预组细胞存活率(90.2%±1.1%、91.9%±3.1%、98.2%±2.1%)、SOD活性[(67.28±0.43)、(66.23±0.70)、(65.47±1.17) U/mg] 明显高于BaP染毒组[84.2%±1.2%、(60.19±1.02) U/mg] ($P<0.05$)。细胞内ROS水平(34.53%±1.96%、37.07%±2.42%、38.77%±2.31%)、MDA含量[(0.477±0.095)、(0.544±1.09)、(0.558±0.152) μmol/g] 则低于BaP染毒组[60.73%±3.15%、(0.837±0.104) μmol/g] ($P<0.05$)。维生素E、维生素C、牛磺酸干预组基础有氧呼吸速率[(4.30±0.36)、(4.44±0.35)、(4.42±0.51) pmol/min]、ATP偶联的有氧呼吸速率[(3.45±0.20)、(3.70±0.19)、(3.60±0.34) pmol/min]、有氧呼吸最大值[(5.53±0.03)、(5.52±0.04)、(5.56±0.02) pmol/min] 均高于BaP染毒组[(2.64±0.43)、(2.09±0.32)、(3.42±0.03) pmol/min] ($P<0.05$)。有氧呼吸储备值[(1.23±0.35)、(1.08±0.31)、(1.14±0.50) pmol/min] 与BaP染毒组[(0.78±0.44) pmol/min] 相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。糖酵解压力测试结果显示, 5组间3项指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

[结论] BaP暴露可导致SH-SY5Y细胞氧化损伤, 降低线粒体呼吸功能, 维生素E、维生素C、牛磺酸对BaP暴露引起的能量代谢损伤具有一定的保护作用。

关键词: 苯并[a]芘; 人神经母细胞瘤细胞; 能量代谢; 维生素E; 维生素C; 牛磺酸

Effects of vitamin E, vitamin C, and taurine on energy metabolism injury of SH-SY5Y cells induced by benzo[a]pyrene WANG Dan¹, LÜ Yi¹, CAO Bin¹, CHENG Li-xia¹, REN Xue-ke¹, MU Jian-bing², ZHENG Jin-ping^{1,3} (1. Department of Toxicology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 001240, USA; 3. Department of Public Health and Preventive Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

Abstract:

[Objective] To observe the effects of vitamin E, vitamin C, and taurine on energy metabolism damage of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) induced by benzo[a]pyrene (BaP) exposure.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18521

基金项目

国家自然科学基金项目(30872137); 山西省重点研发计划国际科技合作项目(201703D421021)

作者简介

王丹(1993—), 女, 硕士生;
E-mail: 18215531078@163.com

通信作者

郑金平, E-mail: zheng_jp@sxmu.edu.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-08-15

录用日期 2018-12-06

文章编号 2095-9982(2019)02-0181-05

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

王丹, 吕懿, 曹彬, 等. 维生素E、维生素C、牛磺酸对苯并[a]芘致SH-SY5Y细胞能量代谢损伤的影响[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(2): 181-185.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18521

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHENG Jin-ping, E-mail: zheng_jp@sxmu.edu.com

Competing interests None declared

Received 2018-08-15

Accepted 2018-12-06

►To cite

WANG Dan, LÜ Yi, CAO Bin, et al. Effects of vitamin E, vitamin C, and taurine on energy metabolism injury of SH-SY5Y cells induced by benzo[a]pyrene[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(2): 181-185.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18521

[Methods] SH-SY5Y cells were treated with DMSO, BaP (1 $\mu\text{mol/L}$), BaP (1 $\mu\text{mol/L}$) + vitamin E (50 $\mu\text{mol/L}$), BaP (1 $\mu\text{mol/L}$) + vitamin C (100 $\mu\text{mol/L}$), and BaP (1 $\mu\text{mol/L}$) + taurine (100 $\mu\text{mol/L}$), respectively. After 24 h of treatment, cell viability was measured by MTT assay, reactive oxygen species (ROS) level was detected with ROS detection kit, cellular malondialdehyde (MDA) content was assessed with MDA assay kit, superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated with SOD typing test kit, and mitochondrial respiratory and glycolysis of the cells were detected with Seahorse XFp cell energy analyzer.

[Results] The cell viability ($84.2\% \pm 1.2\%$) and SOD activity [$(60.19 \pm 1.02) \text{ U/mg}$] were significantly lower, while the ROS level ($60.73\% \pm 3.15\%$) and MDA content [$(0.837 \pm 0.104) \mu\text{mol/g}$] were significantly higher in the BaP-treated group than in the vehicle control group [$100\% \pm 3.74\%$, $(67.37 \pm 0.78) \text{ U/mg}$, $31.27\% \pm 1.40\%$, and $(0.382 \pm 0.083) \mu\text{mol/g}$, respectively] ($P < 0.05$). The basal oxygen consumption rate (OCR) [$(2.64 \pm 0.43) \text{ pmol/min}$], ATP-linked OCR [$(2.09 \pm 0.32) \text{ pmol/min}$], maximal respiration [$(3.42 \pm 0.03) \text{ pmol/min}$], and spare respiratory capacity [$(0.78 \pm 0.44) \text{ pmol/min}$] in the BaP-treated group were lower than those in the vehicle control group [(4.89 ± 0.43) , (4.16 ± 0.24) , (7.06 ± 0.11) , and $(2.18 \pm 0.35) \text{ pmol/min}$, respectively] ($P < 0.05$), while the proton leak OCR [$(0.55 \pm 0.16) \text{ pmol/min}$], glycolysis level [$(3.54 \pm 1.02) \text{ mpH/min}$], glycolytic capacity [$(5.94 \pm 0.47) \text{ mpH/min}$], and glycolytic reserve [$(2.40 \pm 0.61) \text{ mpH/min}$] in the BaP-treated group were not statistically different from those in the vehicle control group [$(0.73 \pm 0.27) \text{ pmol/min}$, $(2.71 \pm 0.66) \text{ mpH/min}$, $(5.75 \pm 0.65) \text{ mpH/min}$, and $(3.04 \pm 0.19) \text{ mpH/min}$, respectively] ($P > 0.05$). The cell viabilities ($90.2\% \pm 1.1\%$, $91.9\% \pm 3.1\%$, and $98.2\% \pm 2.1\%$) and SOD activities [(67.28 ± 0.43) , (66.23 ± 0.70) , and $(65.47 \pm 1.17) \text{ U/mg}$] in the groups treated with vitamin E, vitamin C, and taurine in addition to BaP were significantly higher than those in the BaP-treated group [$84.2\% \pm 1.2\%$ and $(60.19 \pm 1.02) \text{ U/mg}$], while the ROS levels ($34.53\% \pm 1.96\%$, $37.07\% \pm 2.42\%$, and $38.77\% \pm 2.31\%$) and MDA contents [(0.477 ± 0.095) , (0.544 ± 1.09) , and $(0.558 \pm 0.152) \mu\text{mol/g}$] were lower [$60.73\% \pm 3.15\%$ and $(0.837 \pm 0.104) \mu\text{mol/g}$] ($P < 0.05$). The basal OCR [(4.30 ± 0.36) , (4.44 ± 0.35) , and $(4.42 \pm 0.51) \text{ pmol/min}$], ATP-linked OCR [(3.45 ± 0.20) , (3.70 ± 0.19) , and $(3.60 \pm 0.34) \text{ pmol/min}$], and maximal respiration [(5.53 ± 0.03) , (5.52 ± 0.04) , and $(5.56 \pm 0.02) \text{ pmol/min}$] in the groups treated with vitamin E, vitamin C, and taurine in addition to BaP were significantly higher than those in the BaP-treated group [(2.64 ± 0.43) , (2.09 ± 0.32) , and $(3.42 \pm 0.03) \text{ pmol/min}$, respectively] ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the spare respiratory capacity between the three groups [(1.23 ± 0.35) , (1.08 ± 0.31) , and $(1.14 \pm 0.50) \text{ pmol/min}$] and the BaP-treated group [$(0.78 \pm 0.44) \text{ pmol/min}$] ($P > 0.05$). The results of glycolysis stress test showed no differences in the three glycolysis function indicators among the five groups ($P > 0.05$).

[Conclusion] Exposure to BaP can cause oxidative damage in SH-SY5Y cells and reduce mitochondrial respiratory, which may be protected by vitamin E, vitamin C, and taurine.

Keywords: benzo[a]pyrene; human neuroblastoma cell; energy metabolism; vitamin E; vitamin C; taurine

苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, BaP) 是环境与职业生产中接触的主要污染物之一。研究表明BaP具有神经毒性,可引起人群或动物学习记忆能力损伤和神经行为学改变^[1-2]。氧化损伤和细胞凋亡是BaP引起神经毒性的主要机制^[3-4]。BaP在代谢活化过程中会产生大量活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)^[5],其攻击的主要靶标为线粒体,可导致线粒体氧化供能异常^[6-7]。本课题组前期的研究发现,低浓度BaP暴露会降低人神经母细胞瘤细胞的线粒体呼吸功能,较高浓度时则会损伤线粒体结构以及糖酵解的能力,造成神经细胞能量代谢异常,并且与细胞氧化损伤密切相关^[8]。维生素E、维生素C、牛磺酸作为常用的抗氧化剂,对毒物引起的氧化应激及神经系统损伤均有保护作用^[3, 9-10]。本研究通过探讨维生素E、维生素C、牛磺酸对BaP暴露导致的SH-SY5Y细胞能量代谢损伤的抑制作用,为BaP神经毒性的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

CO₂培养箱 (Thermo Forma, 美国), 超净工作台 (苏州苏净安泰, 中国), DNM-9602G酶标分析仪 (北京普朗新公司, 中国), Seahorse XFp 细胞能量分析仪

(Seahorse, 美国)。BaP、寡霉素、鱼藤酮、2-脱氧-D-葡萄糖、葡萄糖 (Sigma, 美国), DMSO (北京索莱宝, 中国), 维生素E、牛磺酸 (南京建成生物工程研究所, 中国), 维生素C (天津市光复精细化工研究所, 中国), 大鼠肝S9 (大鼠肝细胞匀浆液的去线粒体上清液, Thermo Forma, 美国), MTT试剂盒、细胞丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 分型试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国), ROS活性氧检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司, 中国), XFp线粒体压力测试盒、XFp糖酵解压力测试盒 (Seahorse, 美国)。

1.2 细胞选择及培养

选择具有神经元生长特点的神经母细胞瘤细胞株SH-SY5Y (购于武汉Procell公司), 细胞采用MEM/F12培养基 (含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素), 37℃、5%CO₂条件下孵育。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理因素 实验分为5组。①溶剂对照组: 培养基中加入DMSO (与BaP体积相同)、大鼠肝S9混合液 (S9-mix, 占总体积3%)。②BaP染毒组: 培养基中加入BaP (终浓度1 $\mu\text{mol/L}$)、S9-mix。③维生

素E干预组:培养基中加入BaP(终浓度1 μmol/L)、S9-mix,同时加入维生素E(终浓度50 μmol/L)。④维生素C干预组:培养基中加入BaP(终浓度1 μmol/L)、S9-mix,同时加入维生素C(终浓度100 μmol/L)。⑤牛磺酸干预组:培养基中加入BaP(终浓度1 μmol/L)、S9-mix,同时加入牛磺酸(终浓度100 μmol/L)。将5×10⁵/mL的细胞接种到相应的培养板中,待细胞进入对数生长期,各实验分组处理24 h后,分别测细胞活力、细胞内ROS水平、细胞内MDA含量和SOD活性、线粒体呼吸功能和糖酵解功能。

1.3.2 MTT法检测细胞活力 将5×10⁵/mL的细胞悬液接种于96孔板中,待细胞进入对数生长期,按以上分组处理,24 h后,加入含MTT溶液的新鲜培养液150 μL(MTT终质量浓度为5 mg/mL),在37℃、5%CO₂条件下避光孵育4 h后,每孔加150 μL DMSO,震荡10 min,使紫色结晶完全溶解。采用酶标仪检测570 nm波长处各孔光密度(D)值。以溶剂对照组所测得D值为100%,细胞相对存活率=(D_{实验组}-D_{空白组})/(D_{溶剂对照组}-D_{空白组})×100%。

1.3.3 细胞内ROS水平测定 将5×10⁵/mL的细胞悬液接种于6孔板中,待细胞进入对数生长期,按照以上分组处理,24 h后,收集细胞,用不含血清、二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯终浓度为10 μmol/L的培养基悬浮细胞,37℃、5%CO₂孵育20 min后,用无血清培养基清洗细胞2次,将细胞悬浮于500 μL无血清培养基中。加入试剂盒中的活性氧刺激物设置阳性对照组。采用流式细胞仪在488 nm激发波长、525 nm发射波长下进行检测。

1.3.4 细胞内MDA含量及SOD活性测定 将5×10⁵/mL的细胞悬液接种于6孔板中,待细胞进入对数生长期,按照以上分组处理,24 h后,用预冷的PBS清洗细胞2次,裂解取上清液,分别按照MDA和SOD试剂盒说明处理,采用酶标仪检测各孔D值。MDA含量(μmol/g)=[(D_{测定}-D_{空白})/(D_{标准}-D_{空白})]×标准品浓度(10 nmol/mL)/样本蛋白浓度(mg/mL),SOD活性(U/mg)=[(D_{对照}-D_{测定})/D_{对照}]/50%×反应体系稀释倍数/待测样本蛋白质量浓度(mg/mL)。

1.3.5 细胞能量代谢情况检测 将5×10⁴/mL的细胞悬液接种到XF8板中,37℃、5%CO₂条件下培养,待细胞生长进入对数期,按以上实验分组进行处理,同时在XFp探针板中加入线粒体压力测试盒中的水化液,置于37℃、无CO₂孵箱中水化12~72 h。细胞处理24 h

后,配置试验介质(线粒体压力测试试验介质和糖酵解压力测试试验介质),置于37℃水浴,调节pH至7.4。用相应的试验介质清洗细胞两次,加入180 μL试验介质,置于37℃、无CO₂孵箱中稳定1 h。按测试要求加样装载水化后的探针板,上机检测探针板是否可用。待探针板检测正常后,装载XF8板上机进行能量代谢检测。检测结束后,取出XF8板,加入胰酶消化细胞并计数,将数据标准化以消除细胞数量带来的差异。在线粒体压力测试中,基础读数用于确定基础有氧呼吸,加入寡霉素用于确定ATP偶联的有氧呼吸速率,加入羰基氰4-(三氟甲氧基)苯胺用于确定有氧呼吸最大值,加入鱼藤酮用于确定非线粒体呼吸,有氧呼吸储备值=有氧呼吸最大值-基础有氧呼吸,质子漏耗氧率=基础有氧呼吸-ATP偶联的有氧呼吸;在糖酵解压力测试中,加入葡萄糖用于确定糖酵解水平,加入寡霉素用于确定糖酵解最大值,糖酵解储备值=糖酵解最大值-糖酵解水平^[8]。

1.4 统计学分析

用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析,所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 对细胞存活率、ROS、MDA和SOD的影响

与溶剂对照组相比,BaP染毒组细胞存活率、SOD活性下降($P<0.05$),ROS水平、MDA含量明显增高($P<0.05$);维生素E、维生素C、牛磺酸干预组细胞存活率、SOD活性高于BaP染毒组($P<0.05$),ROS水平、MDA含量与BaP染毒组相比则降低($P<0.05$)。结果如表1所示。

表1 SH-SY5Y细胞存活率、ROS、MDA及SOD的变化

组别	细胞存活率 (%)	ROS水平 (%)	MDA含量 (μmol/g)	SOD活性 (U/mg)
溶剂对照组	100.0±3.7	31.27±1.40	0.382±0.083	67.37±0.78
BaP染毒组	84.2±1.2*	60.73±3.15*	0.837±0.104*	60.19±1.02*
维生素E干预组	90.2±1.1**	34.53±1.96 [#]	0.477±0.095 [#]	67.28±0.43 [#]
维生素C干预组	91.9±3.1**	37.07±2.42 [#]	0.544±0.109 [#]	66.23±0.70 [#]
牛磺酸干预组	98.2±2.1 [#]	38.77±2.31 [#]	0.558±0.152 [#]	65.47±1.17 [#]

[注]*:与溶剂对照组相比, $P<0.05$;#:与BaP染毒组相比, $P<0.05$ 。

2.2 对细胞能量代谢的影响

线粒体压力测试结果显示,质子漏耗氧速率5组间差异无统计学意义,其余指标5组不全相同。BaP染毒组基础有氧呼吸、ATP偶联的有氧呼吸速率、有氧呼吸最大值、有氧呼吸储备值低于溶剂对照组($P<$

0.05); 维生素E、维生素C和牛磺酸干预组基础有氧呼吸、ATP偶联的有氧呼吸速率、有氧呼吸最大值高于BaP染毒组 ($P<0.05$), 但有氧呼吸最大值、有氧呼吸储备值低于溶剂对照组 ($P<0.05$), 基础有氧呼吸与对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 维生素E、维生素C和牛磺酸干预组的有氧呼吸储备值与BaP染毒组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果如表2所示。

表2 维生素E、维生素C、牛磺酸对SH-SY5Y细胞线粒体呼吸功能的影响 (pmol/min)

组别	基础 有氧呼吸	ATP偶联的 有氧呼吸速率	质子漏耗 氧速率	有氧呼 吸最大值	有氧呼 吸储备值
溶剂对照组	4.89±0.43	4.16±0.24	0.73±0.27	7.06±0.11	2.18±0.35
BaP染毒组	2.64±0.43*	2.09±0.32*	0.55±0.16	3.42±0.03*	0.78±0.44*
维生素E干预组	4.30±0.36 [#]	3.45±0.20**	0.85±0.19	5.53±0.03**	1.23±0.35*
维生素C干预组	4.44±0.35 [#]	3.70±0.19 [#]	0.74±0.16	5.52±0.04**	1.08±0.31*
牛磺酸干预组	4.42±0.51 [#]	3.60±0.34**	0.81±0.18	5.56±0.02**	1.14±0.50*

[注]*: 与溶剂对照组相比, $P<0.05$; #: 与BaP染毒组相比, $P<0.05$ 。

糖酵解压力测试结果显示, 对照组、BaP染毒组和维生素E、维生素C、牛磺酸干预组间糖酵解水平、糖酵解最大值、糖酵解储备值差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结果如表3所示。

表3 维生素E、维生素C、牛磺酸对BaP暴露SH-SY5Y细胞糖酵解功能的影响 (mpH/min)

组别	糖酵解水平	糖酵解最大值	糖酵解储备值
溶剂对照组	2.71±0.66	5.75±0.65	3.04±0.19
BaP染毒组	3.54±1.02	5.94±0.47	2.40±0.61
维生素E干预组	2.78±0.83	5.93±0.89	2.78±0.83
维生素C干预组	3.33±1.28	6.06±0.79	2.74±0.58
牛磺酸干预组	3.47±0.83	6.14±0.41	2.68±0.43

3 讨论

氧和能量的稳态对于维持神经系统的功能至关重要。而BaP暴露会破坏这一稳态, 造成神经细胞能量代谢紊乱甚至细胞凋亡^[8]。这一改变主要由BaP代谢活化过程中产生的大量ROS攻击线粒体所致^[6-7], 同时细胞内抗氧化酶的含量也明显降低^[8], 从而引起严重氧化应激反应。本课题组前期研究发现BaP暴露会导致神经细胞能量代谢紊乱, 而抗氧化剂丁基羟基茴香醚 (butylated hydroxyanisole, BHA) 对BaP引起的能量代谢紊乱有很好的保护作用^[11]。为此, 本文选择了常用的抗氧化剂维生素E、维生素C和牛磺酸, 观察其是否对BaP引起的能量代谢紊乱具有保护作用, 为神经毒性的防治提供依据。本次实验采用SH-SY5Y细胞, 该细胞不仅形态类似神经元, 还具有许多人神经元的生

化和功能特点, 常代替神经元进行神经毒性的研究^[12]。实验剂量参考实际暴露或应用剂量、文献报道剂量及预实验结果确定^[13]。

神经系统主要依靠线粒体有氧呼吸合成ATP提供能量, 缺氧情况下, 糖酵解则为主要的供能途径^[14-15]。其中基础有氧呼吸用于反映细胞在基础状态下的能量需求, ATP偶联的有氧呼吸速率主要反映线粒体合成ATP的能力, 质子漏耗氧速率则反映线粒体的结构损伤, 有氧呼吸最大值反映细胞可以达到的最大呼吸速率, 有氧呼吸储备值反映紧急状况下细胞对外界刺激的耐受能力^[8]。糖酵解水平、糖酵解最大值、糖酵解储备值反映细胞的糖酵解能力。实验结果显示, BaP暴露导致细胞基础有氧呼吸速率、ATP偶联的有氧呼吸速率及有氧呼吸最大值、有氧呼吸储备值降低, 而质子漏耗氧速率、糖酵解水平、糖酵解最大值、糖酵解储备值并未受到影响。这表明低浓度的BaP暴露降低了基础状态下细胞的能量消耗, 减弱了紧急状况下细胞对外界压力的应对能力, 这主要由于线粒体合成ATP能力降低所致, 而线粒体的结构及电子传递链并未发生损伤, 糖酵解能力并未受到影响。同时本实验结果显示, BaP暴露导致细胞内ROS水平增高、SOD活性降低, 过量的ROS会氧化细胞中的多不饱和脂肪酸, 造成脂质过氧化, MDA含量也相应增加, 这提示细胞能量代谢的损伤与氧化损伤有关。维生素E、维生素C和牛磺酸干预可以减轻细胞内氧化损伤, 抑制BaP暴露导致的基础有氧呼吸速率、ATP偶联的有氧呼吸速率及有氧呼吸最大值降低, 改善能量代谢紊乱。这提示维生素E、维生素C和牛磺酸干预对BaP暴露导致的基础状态下能量需求降低及线粒体合成ATP能力下降、细胞可以达到的最大呼吸速率降低等能量代谢紊乱具有保护作用, 推测这可能与其抗氧化作用清除自由基, 抑制脂质过氧化有关。

值得注意的是, 维生素E、维生素C和牛磺酸干预组ATP偶联的有氧呼吸速率及有氧呼吸最大值虽然高于BaP暴露组, 但仍然低于对照组, 表明本实验设定的维生素E、维生素C和牛磺酸干预剂量虽然可以减少BaP暴露对细胞ATP偶联的有氧呼吸速率及有氧呼吸最大值造成的损伤, 但并不能完全消除这种损伤。考虑到处理时间是24h, 在这个过程中, 细胞对维生素E、维生素C和牛磺酸进行代谢, 其抗氧化性减弱甚至消失, 但BaP却很难代谢排出机体, 损伤持续存在, 因此无法完全消除这种损伤; 也可能与维生素E、

维生素C和牛磺酸的剂量过低不足以对抗这种损伤有关。维生素E、维生素C和牛磺酸干预对细胞紧急状况下应对外界刺激的能力的改变无差异,也可能与这一原因有关。或许更大剂量、多次添加维生素E、维生素C和牛磺酸可以恢复细胞对抗外界刺激的能力,完全恢复细胞有氧呼吸功能,但是还需进一步探讨。本实验中低浓度BaP暴露并未引起线粒体结构损伤及糖酵解功能改变,而高浓度BaP暴露会引起线粒体结构改变^[8],研究发现线粒体功能障碍和ATP耗竭与BaP诱导的坏死和凋亡有关^[16],当高浓度BaP暴露时,维生素E、维生素C和牛磺酸干预是否可以改善其引起的损伤,有待于进一步研究。

综上所述,维生素E、维生素C和牛磺酸对低剂量BaP暴露引起的能量代谢紊乱有不同程度的保护作用,其机制可能与其抗氧化作用,清除自由基,抑制脂质过氧化,保护线粒体ATP合成能力有关。Seahorse XFP细胞能量分析仪可以在低剂量BaP暴露引起线粒体功能障碍的早期检测到基础有氧呼吸速率、ATP偶联的有氧呼吸速率等指标的变化,此时线粒体结构尚未发生损伤,未涉及坏死和凋亡,维生素E、维生素C和牛磺酸对这种损伤具有改善作用,这为BaP诱导的神经细胞线粒体损伤的早期发现及预防治疗提供了可行性。但更高剂量的维生素E、维生素C、牛磺酸干预是否可以改善BaP暴露导致的细胞应对外界刺激的能力下降以及是否可以降低高剂量BaP暴露引起的细胞损伤,还需要进一步探究。

参考文献

- [1] 李卫星, 张红明, 胡志鹏, 等. 焦炉工人神经行为改变及其影响因素研究[J]. 环境与职业医学, 2011, 28 (4): 205-209, 214.
- [2] GROVA N, SCHROEDER H, FARINELLE S, et al. Sub-acute administration of benzo[a]pyrene (BaP) reduces anxiety-related behaviour in adult mice and modulates regional expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors genes in relevant brain regions [J]. *Chemosphere*, 2008, 73 (S1): S295-S302.
- [3] LIN S, REN A, WANG L, et al. Oxidative stress and apoptosis in Benzo[a]pyrene-induced neural tube defects [J]. *Free Radical Biol Med*, 2018, 116: 149-158.
- [4] PATEL B, DAS SK, PATRI M. Neonatal Benzo[a]pyrene exposure induces oxidative stress and DNA damage causing neurobehavioural changes during the early adolescence period in rats [J]. *Dev Neurosci*, 2016, 38 (2): 150-162.
- [5] WANG Q, CHEN W, XU X, et al. RIP1 potentiates BPDE-induced transformation in human bronchial epithelial cells through catalase-mediated suppression of excessive reactive oxygen species [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (9): 2119-2128.
- [6] QIAN Y, XU S, YANG X, et al. Purinergic receptor P2Y6 contributes to 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced oxidative stress and cell death in neuronal SH-SY5Y cells [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 96 (2): 253-264.
- [7] ANGELOVA PR, ABRAMOV AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592 (5): 692-702.
- [8] 成丽霞, 班红芳, 吕懿, 等. 苯并[a]芘对人神经母细胞瘤细胞能量代谢的影响[J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (4): 323-329.
- [9] SÁRKÖZI K, PAPP A, HORVÁTH E, et al. Green tea and vitamin C ameliorate some neuro-functional and biochemical signs of arsenic toxicity in rats [J]. *Nutr Neurosci*, 2016, 19 (3): 102-109.
- [10] 杨猛, 张霞霞, 刘文瑜, 等. 牛磺酸对染锰大鼠神经氧化损伤的保护作用[J]. 工业卫生与职业病, 2017, 43 (6): 410-413.
- [11] 成丽霞. 苯并[a]芘对SH-SY5Y细胞能量代谢的影响[D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
- [12] 谭斐, 吴晓黎, 景良, 等. 硫酸软骨素蛋白多糖抑制神经元轴突生长体外生物模型的建立[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40 (1): 4-7, 11.
- [13] 席华星, 聂继盛, 牛侨. 苯并[a]芘对神经细胞DNA损伤及细胞周期的影响[J]. 环境与职业医学, 2012, 29 (10): 620-623, 628.
- [14] HONG CT, CHAU KY, SCHAPIRA AHV. Meclizine-induced enhanced glycolysis is neuroprotective in Parkinson disease cell models [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25344.
- [15] BAZZIGALUPPI P, AMINI EA, WEISSPAPIR I, et al. Hungry neurons: metabolic insights on seizure dynamics [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (11): 2269.
- [16] JIANG Y, ZHOU X, CHEN X, et al. Benzo (a) pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null Hep3B cells [J]. *Mutat Res*, 2011, 726 (1): 75-83.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈姣; 校对: 邱丹萍)