doi:10.11659/jjssx.07E016010

·基础研究·

褪黑素对缺氧状态下 N2A 细胞的抗氧化应激作用及机制研究

郭 骏,陈 语,胡 攀,任伟剑,王洪伟,张敬东,项良碧,刘欣伟 (沈阳军区总医院骨科,全军重症战创伤实验室,辽宁沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 探究褪黑素(MT)对缺氧状态下小鼠神经母细胞瘤(N2A)细胞超氧化物歧化酶(SOD)、氧自由基(ROS)、丙二醛(MDA)含量变化的影响。**方法** 取原代培养的小鼠神经母细胞瘤细胞随机分为对照组、缺氧组、MT 治疗组,治疗组以 5 μg/mL 的褪黑素工作液孵育 24 h 建立治疗模型。除对照组外的细胞培养箱中通入 95% N_2 + 5% CO_2 的混合气体,在低浓度血清中培养 24 h,使细胞处于氧胁迫状态,建立 N2A 细胞缺血缺氧模型。采用黄嘌呤氧化法、荧光定量检测法及硫代巴比妥酸比色法检测 N2A 细胞内 SOD、ROS、MDA 含量变化。**结果** 与对照组相比,缺氧组与 MT 治疗组的 SOD 表达量均有明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);MT 治疗组与缺氧组相比细胞 SOD 表达量有显著恢复,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比缺氧组与 MT 治疗组的 ROS、MDA 表达量均有明显升高($P<0.05$),MT 治疗组与缺氧组相比细胞 ROS、MDA 表达量有显著恢复,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 褪黑素对继发性缺血缺氧神经细胞损伤具有保护作用,其机制可能与褪黑素通过直接清除细胞内的自由基或者上调细胞内抗氧化物的表达水平相关。

[关键词] 褪黑素;脊髓损伤;氧化应激;神经保护

[中图分类号] R681.5+4 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-07-13

Effect and mechanism of melatonin in anti-oxidative stress in N2A cells under hypoxia conditions

GUO Jun, CHEN Yu, HU Pan, REN Wei-jian, WANG Hong-wei, ZHANG Jing-dong, XIANG Liang-bi, LIU Xin-wei (Department of Orthopaedics, General Hospital of Shenyang Military Region, Severe War-Related Trauma Center of PLA, Shenyang Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of melatonin on the changes of superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) in N2A cells under hypoxia conditions. **Methods** Randomly divided the primary cultured neuroblastoma cells of mouse into the control group, hypoxia group, and MT treatment group. The MT treatment group were given melatonin 5 μg/mL for 24 h to set up the treatment model. Rsbiotech of the hypoxia group and MT treatment group were given gaseous mixture of 95% N_2 and 5% CO_2, The ischemia hypoxia model of N2A cells was set up with cells in the oxidative stress state and cultured for 24 hours at low concentrations of serum. The content of SOD, ROS, and MDA was measured respectively by xanthine oxidase, fluorogenic quantitative detection and thiobarbituric acid chromatometry. **Results** The expression of SOD in hypoxia group and MT treatment group were significantly decreased compared with that in control group ($P<0.05$). The level of SOD in MT treatment group significantly recovered compared with hypoxia group with singnificant difference ($P<0.05$). The expression of MDA and ROS in hypoxia group and MT treatment group were significantly increased compared with that in control group ($P<0.05$). The level of MDA and ROS in MT treatment group significantly recovered compared with hypoxia group with singnificant difference ($P<0.05$). **Conclsion** Melatonin provides a protective effect on the secondary damage of nerve cells with hypoxia ischemia. The possible mechanism is melatonin could play the role of free radical scavenging and up-regulate the expression level of antioxidants.

Keywords: melatonin; spinal cord injury; oxidative stress; nerve protection

脊髓损伤多见于交通事故、工矿事故或运动意外,据报道全世界每年有 1 500 ~ 5 340 万人遭受脊髓损伤,伤后患者一般难以自行痊愈,严重影响日常生活[1]。脊髓受到损伤后产生一系列氧化应激反应,使机体内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)增多,进而破坏线粒体膜的完整性[2-3]。线粒体功能受损后会生产更多的活性氧通过正反馈调节扩大效应,使氧化应激损伤持续存在,最终导致脊髓组织细胞的凋亡,脂质过氧化物和氧自由基引发的氧化应激反应是脊髓继发性损伤的标志。褪黑素(melatonin, MT)是松果体腺体分泌的一种吲哚胺类激素,其不仅能维持昼夜节律,提高免疫功能,更是一种高效的自由基清除剂和抗氧化剂。目前关于 MT 在脊髓损伤治疗中的作用及机制的报道少见。本次实验在建立缺氧细胞模型的基础上给予 MT 干预,观察通过 MT 对缺氧状态下 N2A 细胞中 SOD、ROS、MDA 表达的影响,以探讨 MT 对缺氧状态下细胞的保护作用。

[基金项目] 辽宁省科学技术基金(2015020403)

[通信作者] 刘欣伟,E-mail:liuxinweils@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及仪器 SIGMA 3-30K 冷冻离心机(湘仪,中国)、-80 ℃超低温冰箱(海尔,中国)、倒置显微镜(OLYMPUS,日本)、细胞培养箱(Thermo,美国)、MI11 型倒置显微镜(Olympus,日本)、血清 (Gibco,美国)、DMEM 细胞培基(Hyclone,美国)、胎牛血清(TBD,美国)、胰蛋白酶(TBD,美国)、褪黑素(Sigma,美国)、超氧化物歧化酶比色法试剂盒(索来宝,中国)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(索来宝,中国)。

1.1.2 N2A 细胞的培养 37 ℃恒温水浴复苏细胞,1 000 rpm 离心去除冻存液,加入新鲜培养基接种于一次性塑料培养瓶。37 ℃,5% CO_2、饱和湿度条件下培养小鼠成神经瘤细胞(N2A),培养基为含有 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 高糖细胞培养基。细胞冻存于含 30% FBS、60% DMEM 培养基、10% DMSO 的细胞冻存液中,首先在 -20 ℃放置 2 ~ 4 h,之后 -80 ℃放置过夜,最后在液氮中冷冻保存。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将原代培养的 N2A 细胞随机分为正常组、缺氧组、治疗组。治疗组以 5 μg/mL 的褪黑素工作液孵育 24 h 建立治疗模型。

1.2.2 N2A 缺氧模型的建立 在装有 N2A 细胞培养箱中通入 95% N_2 + 5% CO_2 的混合气体,调整温度为 37 ℃,箱内饱和湿度,用低浓度血清培养 24 h,使细胞处于氧胁迫条件,建立 N2A 细胞缺血缺氧模型。

1.2.3 N2A 细胞中 SOD 含量测定 将生长状态良好的原代 N2A 细胞,调整密度为 1×10^5/mL,随机分为正常组、模型组、治疗组。将对数期生长期细胞分别加至 6 孔板中,静置培养 24 h。治疗组中加入作用浓度为 5 μg/mL 褪黑素工作液(无水乙醇溶解,0.9% 生理盐水稀释)孵育 24 h,除正常组外,治疗组和模型组均进行缺血缺氧处理,时间为 24 h。模型组及治疗组细胞经缺血缺氧处理后,更换为正常培养基孵育24 h。提取各组细胞培养液,收集细胞,裂解细胞。根据超氧化物歧化酶比色法试剂盒说明书操作,用分光光度计在 532 nm 处检测吸光度值。

1.2.4 N2A 细胞中 ROS 活性测定 将生长状态良好的原代 N2A 细胞,调整密度为 1×10^5/mL,随机分为正常组、模型组、MT 治疗组。将处于对数期原代 N2A 细胞分别加入 6 孔板,培养 24 h。治疗组中加入作用浓度为 5 μg/mL 工作液孵育 24 h,除正常组外,MT 治疗组和模型组均进行缺血缺氧处理,时间为 24 h。模型组及 MT 治疗组细胞经缺血缺氧后,更换为正常培养基孵育 24 h。用胰蛋白酶消化液消化 N2A 细胞 3 ~ 5 min,待细胞完全消化后,2 000 rpm 室温条件下离心 5 ~ 10 min,收集细胞沉淀,此时上清为细胞培养基。事先已将 DCFH-DA 稀释至 10 μmol/L,用 DCFH-DA 稀释液悬浮收集的细胞,并调节细胞浓度为 $10^6 \sim 2 \times 10^7$/mL。将细胞混合液放置于 37 ℃细胞培养箱内培养 20 min,每隔 5 min 颠倒混匀。用无血清细胞培养液充分洗涤细胞以便彻底除去未反应的 DCFH-DA。上机测试。

1.2.5 N2A 细胞中 MDA 含量测定 将生长状态良好的原代 N2A 细胞,调整密度为 1×10^5/mL,随机分为正常组、模型组、MT 治疗组。将处于对数期原代 N2A 细胞分别加入 6 孔板,培养 24 h。治疗组中加入作用浓度为 5 μg/mL 褪黑素工作液孵育 24 h,除正常组外,MT 治疗组和模型组均进行缺血缺氧处理,时间为 24 h。模型组及 MT 治疗组细胞经缺血缺氧后,更换为正常培养基孵育 24 h;提取各组细胞培养液,收集细胞,裂解细胞。根据丙二醛(MDA)测定试剂盒说明书操作,用分光光度计在 550 nm 处检测吸光度值。

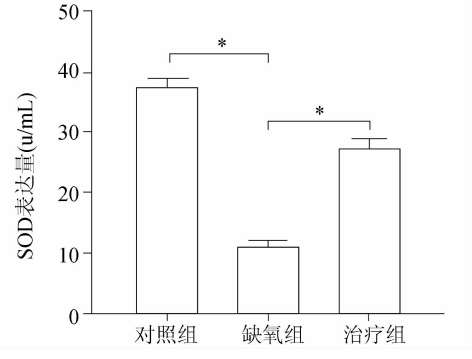
1.3 统计学方法

实验数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 N2A 细胞中 SOD 水平

对照组 SOD 表达量为(36.9 ± 2.99)u/mL,缺氧组为(11.2 ± 2.56)u/mL,MT 治疗组为(26.8 ± 3.12) u/mL,3 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。缺氧组的 SOD 水平低于对照组,给予褪黑激素作用(5 μg/mL)的细胞 MT 治疗组的 SOD 水平高于缺氧组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



*:$P < 0.05$

图 1 3 组 N2A 细胞中 SOD 表达量

2.2 各组 N2A 细胞中 ROS 水平

荧光定量检测结果(图 2)显示,缺氧组与治疗组的 ROS 水平均不同程度高于对照组(峰值右移),与图 3 结果相一致。给予褪黑素(5 μg/mL)工作液孵育的治疗组 ROS 水平有所降低,但仍高于对照组,介于对照组与缺氧组之间。说明 N2A 细胞经缺氧处理后体内 ROS 水平明显升高,氧化作用增强;褪黑素处理过后其抗氧化能力增强,ROS 水平有所降低。

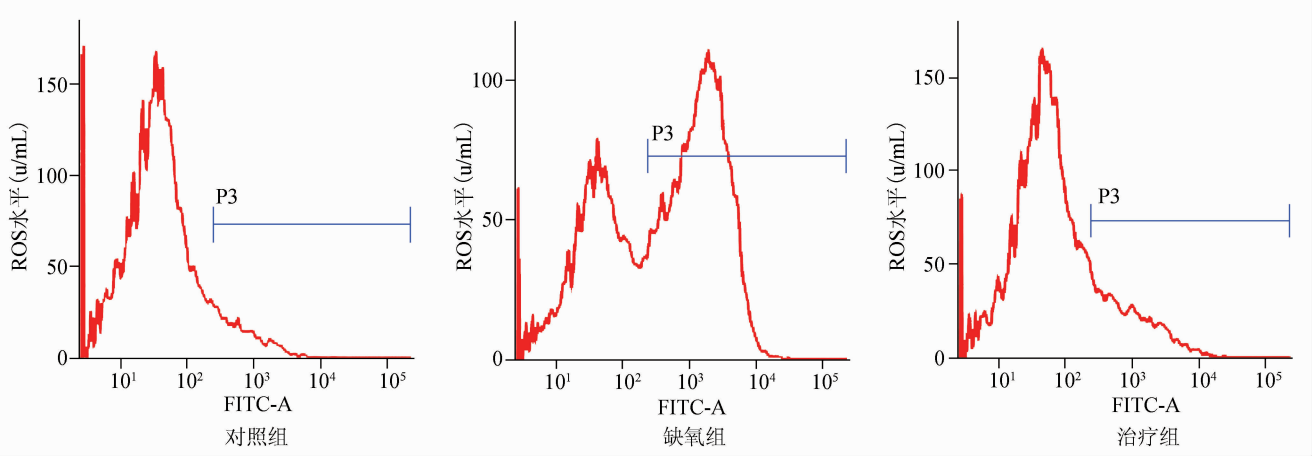
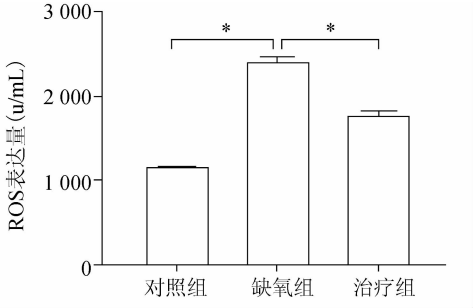


图 2 3 组 N2A 细胞流式细胞术检测结果图

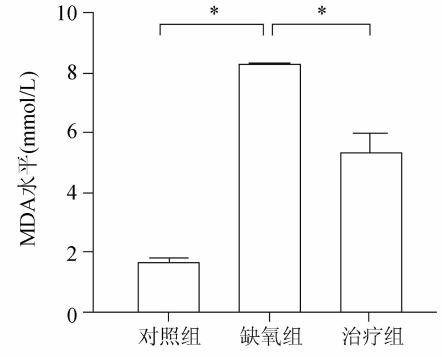


*:$P<0.05$

图 3 3 组 N2A 细胞中 ROS 表达量

2.3 各组 N2A 细胞中 MDA 水平

对照组细胞中 MDA 表达量为(1.69 ±0.05)mmol/L,缺氧组为(8.21 ±0.07)mmol/L,MT 治疗组为(5.25 ±0.03)mmol/L,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。缺氧组的 MDA 水平高于对照组,给予褪黑激素作用(5 μg/mL)后 MT 治疗组的 MDA 水平低于缺氧组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



*:$P<0.05$

图 4 3 组 N2A 细胞中 MDA 表达量

3 讨论

脊髓损伤可导致肢体瘫痪、严重生理功能紊乱,甚至死亡[4]。目前,脊髓损伤的治疗方法分为手术治疗和非手术治疗,手术治疗的目的是尽早解除脊髓压迫通过内固定维持脊柱的稳定性,非手术治疗旨在减轻脊髓继发性损伤,促进神经功能的恢复和再生[5]。目前,甲泼尼松龙作为临床上治疗脊髓损伤的一线药物,伤后 8 h 内使用可有效改善神经功能紊乱,但是其副作用较多临床应用仍受争议[6-7]。脊髓损伤后其病理生理机制将发生很大改变,首先脊髓受到机械性压迫导致细胞水肿、微血管渗透性改变及血液流动学改变[8],继之激发机体氧化应激反应产生大量的氧自由基(ROS),破坏线粒体膜的完整性,线粒体功能受损后会生成更多活性氧促使氧化应激损伤持续存在,最终导致神经细胞的死亡。已有的研究结果证明,脊髓损伤后引发的脂质过氧化反应提高了机体中 ROS 的表达水平,而机体内 ROS 增多与细胞内丙二醛(MDA)的含量成正比[9-10],因此可以将 MDA 作为细胞内氧化应激水平反应标志物,通过检测细胞内 MDA 的含量反应其氧化应激水平。本实验中我们预先将培养箱通入 95% N_2 +5% CO_2 的气体,调整温度为 37 ℃,调整箱内饱和湿度,调整低浓度血清培养 24 h,使细胞处于氧胁迫条件,建立 N2A 细胞缺血缺氧模型。流式细胞术检测处于缺氧条件下 N2A 细胞内 SOD、ROS 表达水平变化,同时检测细胞内 MDA 的表达量。结果显示,在缺氧状态下,细胞内 ROS 表达水平升高,SOD 表达水平降低,MDA 表达量升高,说明脊髓损伤患者可导致脊

髓组织的氧化应激状态,进而导致神经细胞受损。

褪黑激素是松果体分泌的一种神经内分泌激素,参与许多重要的生理和病理进程,目前褪黑素对脊髓氧化性损伤的保护作用逐渐被认知。体外实验[11]和临床实验[12-13]均证实褪黑素作为强大的自由基清除剂,不仅可减轻氧化应激所造成的神经元损伤,同时抑制小胶质细胞活化增生,在急性脊髓损伤的治疗中发挥着重要的神经保护作用。Erkan 等[14]研究表明,褪黑素与甲泼尼龙琥珀酸钠具有相同的抗氧化能力,但是在治疗继发性脊髓损伤中,褪黑素的作用效果更好。Gul 等[15]分别采用 50 mg/kg、100 mg/kg 不同剂量的褪黑素治疗小鼠脊髓损伤,结果表明,100 mg/kg 褪黑素治疗效果更优,它可同时降低髓内神经细胞水肿及水通道蛋白-4、胶原纤维蛋白的水平。通过体外实验研究证实褪黑素对受损的神经组织起保护作用,尤其是对髓鞘、神经细胞核及线粒体,它不仅可以保护神经细胞免受缺氧损伤,同时可以降低中性粒细胞诱导毒性[16-17]。本实验对治疗组细胞给予 5 μg/mL 褪黑素工作液处理后,可部分清除细胞内的 ROS,使 SOD 和 MDA 的转录和翻译水平上调,其差异有统计学意义。褪黑素能直接清除自由基,减轻氧化应激损伤,由此推测褪黑素可能通过抑制脊髓损伤后氧自由基损伤这一途径来减轻神经细胞凋亡。但是,褪黑素作用后并不能完全消除缺血缺氧对细胞造成的损伤,只能部分拮抗缺氧引起的氧化应激反应,至于具体的作用机理尚需进一步研究。

总之,褪黑素能通过清除氧自由基及对抗氧化酶转录水平的调节,来减轻缺血缺氧诱导的神经细胞损伤。表明褪黑素可用于缺血缺氧所致的神经损伤,为脊髓损伤患者神经功能损害的防治提供实验基础。

[参考文献]

[1] Nakanishi K,Tanaka N,Kamei N,et al. Resection of spinous processes can cause spinal cord injury in patient with ossification of the posterior longitudinal ligament in the thoracic spine[J]. Spinal Cord,2014,52(3):S19-21. doi:10.1038/sc.2014.151.

[2] Tsai MJ,Liao JF,Lin DY,et al. Silymarin protects spinal cord and cortical cells against oxidative stress and lipopolysaccharide stimulation[J]. Neurochem Int,2010,57(8):867-875. doi:10.1016/j.neuint.2010.09.005.

[3] Sena LA,Li S,Jairaman A. Mitochondria are required for antigenspcific T cell activation through reactive oxygen species signaling[J]. Immunity,2013,38(2):225-236. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.020.

[4] 赵 喆,姚 远,杜长国. 巨噬细胞迁移抑制因子在小鼠脊髓损伤后的表达研究[J]. 局解手术学杂志,2014,23(1):1-4. doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201401001.

[5] 胥少汀,葛宝丰. 实用骨科学[M]. 第 4 版. 北京:人民军医出版社,2012:674.

[6] Oshio K,Binder DK,Yang B,et al. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord[J]. Neuroscience,2004,127(3):685-693.

[7] Saadoun S,Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cordoedema[J]. Neuroscience,2010,168(4):1036-1046. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.019.

[8] Rowland JW,Hawryluk GWJ,Kwon B. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies:promise on the horizon[J]. Neurosurg Focus,2008,25(5):E2. doi:10.3171/FOC.2008.25.11.E2.

[9] Oeemig JS,Aranko AS. Solution structure of DnaE intein from Nostoc punctiforme:structural basis for the design of a new split intein suitable for site-specific chemical modification[J]. FEBS Lett,2009,583(9):1451-1456. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.058.

[10] Ji C,Zhang J,Cammack N,et al. Development of a novel dual CCR5-dependent and CXCR4-dependent cell-cell fusion assay system with inducible gpl60 expression[J]. J Biomol Screen,2006,11(1):65-74.

[11] Poeggeler B,Saarela S,Reiter RJ,et al. Melatonin:a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor:new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro[J]. Ann N Y Acad Sci,1994,738:419-420. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831x.

[12] Reiter RJ. The indoleamine melatonin as a free radical scavenger,electron donor,and antioxidant. In vitro and in vivo studies[J]. Adv Exp Med Biol,1996,398:307-313.

[13] He C,Wang J,Zhang Z,et al. Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under in Vitro Conditions[J]. Int J Mol Sci,2016,17(6):E939. doi:10.3390/ijms17060939.

[14] Erkan K,Mürvet T,Selcuk P,et al. Comparison of the effects of melatnin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury[J]. J Neurosurg,2000,93(1):77-84.

[15] Gul Ş,Çelik SE,Kalaycl M. Dose-dependent neuroprotective effects of melatonin on experimen-tal spinal cord injury in rats[J]. Surg Neurol,2005,64(4):355-361.

[16] Fujimoto T,Nakamura T,Ikeda T. Potent protective effects of melatonin on experimental spinal cord injury[J]. Spine,2000,25(7):769-775.

[17] Munoz-Casares FC,Padillo FJ,Briceno J,et al. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia injury of the pancreas[J]. J pineal Res,2006,40(3):195-203.

(编辑:周小林)