

· 特约论著 ·

PPAR γ 激动剂对抗经氟诱导的 SH-SY5Y 神经细胞氧化损伤*

刘仙红^{1,2,3}, 陈 丹⁴, 曾晓晓^{1,2,3}, 董阳婷^{1,2,3,4}, 邓 婕^{1,2,3}, 齐晓岚^{1,2,3},
吴昌学^{1,2,3}, 李 毅^{1,2,3}, 宋 辉^{1,2,3}, 官志忠^{1,2,3,4**}

(1. 贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学附院 病理科, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 观察过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 激动剂 15d-PGJ2 对氟诱导人神经母瘤 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响。方法: 将体外培养的 SH-SY5Y 细胞, 分为对照组、染氟组 (NaF 组)、单纯 PPAR γ 激动剂组 (R 组)、干预组 (R + NaF 组), 先加入 15d-PGJ2 2 h 后再加 NaF, 各组处理后培养 48 h, 用蛋白印记法检测 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白表达水平, 微量酶标法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量, 分析 PPAR γ 蛋白与 SOD 活性及 MDA 含量的相关关系。结果: 与对照组相比, R 组 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白水平、SOD 活性及 MDA 含量无明显改变 ($P > 0.05$), NaF 组 SH-SY5Y 细胞 PPAR γ 蛋白水平和 SOD 活性明显降低, MDA 含量明显增加 ($P < 0.05$); R + NaF 组 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白表达水平及 SOD 活性明显高于 NaF 组, MDA 含量明显低于 NaF 组 ($P < 0.05$); SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白表达水平与 SOD 活性呈正相关关系 ($r = 0.771, P < 0.05$), 与 MDA 含量呈负相关关系 ($r = -0.762, P < 0.05$)。结论: 过量氟会导致体外培养的 SH-SY5Y 细胞发生氧化损伤, 而 PPAR γ 激动剂 15d-PGJ2 处理后可减轻氟诱导的细胞氧化损伤。

[关键词] 氟; 过氧化物酶体增殖激活受体 γ ; 激动剂; 氧化性应激; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707 (2018) 10-1149-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.006

Study on PPAR γ Agonist on SH-SY5Y Neuron Oxidative
Damage Induced by Fluorosis

LIU Xianhong^{1,2,3}, CHEN Dan⁴, ZENG Xiaoxiao^{1,2,3}, DONG Yangting^{1,2,3,4}, DENG Jie^{1,2,3}, QI Xiaolan^{1,2,3},
WU Changxue^{1,2,3}, LI Yi^{1,2,3}, SONG Hui^{1,2,3}, GUAN Zhizhong^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Group Disease of Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of Pathophysiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist 15d-PGJ2 on the oxidative damage induced by fluorosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Methods:** The SH-SY5Y cells were cultivated vitro. The cells were divided into normal control group, fluoride group (NaF group), PPAR γ agonist group (R group), and intervention group (R + NaF group), cells were first treated with 20 hr 15d-PGJ2 first and then NaF, the culture time of each group was 48 h. The level of PPAR γ protein in the cells was detected by Western blotting. The activity

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81760571); 贵州省创新计划资助项目 [黔教合协同创新中心 (2014) 06, 黔科通 (2016) 161]; 贵阳市联合基金资助项目 [筑科合同 (2017) 30-3 号]
** 通信作者 E-mail: 1457658298@qq.com
网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.001.html>

of SOD and the content of MDA were determined by biochemical methods and the correlation between PPAR γ protein, SOD activity and MDA content was analyzed. **Result:** Compared with the control group, there were no significant changes of the level of PPAR γ protein, SOD activity, and MDA content in the R group ($P > 0.05$), while the level of PPAR γ protein and SOD activity in the NaF group were significantly decreased, and the MDA content was significantly increased ($P < 0.05$). In R + NaF group, the level of PPAR γ protein expression and the activity of SOD in SH-SY5Y cells were significantly higher, and the content of MDA was significantly lower than those in the fluoride group ($P < 0.05$). The level of PPAR γ protein in SH-SY5Y cells was positively correlated with SOD activity ($r = 0.771, P < 0.05$) and negatively correlated with MDA content ($r = -0.762, P < 0.05$). **Conclusion:** Excess fluoride may cause oxidative damage to cultured neurons in vitro, whereas PPAR γ agonist 15d-PGJ2 may attenuate the fluorine-induced cellular oxidative damage.

[**Key words**] fluoride; peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator; agonist; oxidative stress; superoxide dismutase; malondialdehyde

微量氟是机体需要的重要元素之一,但摄入过量的氟可造成机体多系统、多器官的广泛性病理损害,近年来的研究表明慢性氟中毒可对中枢神经系统造成氧化损伤^[1]。过氧化物酶体增植物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)广泛表达于中枢神经系统^[2], PPAR γ 的激活能促进神经细胞的分化和成熟,参与神经细胞程序性死亡,并认为 PPAR γ 的激活与神经细胞的炎症和氧化应激有关^[3]。Yu 等^[4]发现癫痫持续状态动物模型予以 PPAR γ 激动剂处理后,可显著抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生和脂质过氧化,同时可增加过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 的抗氧化作用。本研究通过建立氟中毒诱导细胞损伤人神经母瘤细胞 SH-SY5Y 模型,观察 PPAR γ 激动剂 15d-PGJ2 对细胞发生氧化应激的影响,探讨其对氟中毒诱导细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司),CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。分析级氟化钠(sodium fluoride, NaF)、PPAR γ 激动剂 15d-PGJ2(美国 Sigma 公司)、蛋白印迹(Western blotting) Maker(美国 Thermo 公司)、ECL 试剂盒(美国 Amersham 公司)、改良杜氏伊格尔培养液混合营养物 F-12 (DMEM/F-12)、青-链霉素、胰蛋白酶(美国 Hy-

clone 公司)、胎牛血清(美国 Sciencell 公司),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒及丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞培养及分组

SH-SY5Y 细胞来源于美国菌种保藏中心库,由贵州医科大学分子生物学重点实验室保存。SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板内(1×10^8 个/L)培养,每孔 2.0 mL,用含 10% 胎牛血清的 F12/DMEM 培养基培养细胞,待细胞生长至 80% ~ 90% 时更换无血清培养基培养 12 h;将细胞分为对照组、染氟组(NaF 组,4 mmol/L NaF)、单纯 PPAR γ 激动剂组(R 组,20 μ mol/L 15d-PGJ2)、干预组(R + NaF 组,20 μ mol/L 15d-PGJ2 预处理 2 h 后再加 4 mmol/L NaF),根据分组分别加入 NaF 和 15d-PGJ2,于 CO₂ 培养箱中培养 48 h 后检测相关指标。

1.3 PPAR γ 蛋白表达水平检测

蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PPAR γ 蛋白表达水平,细胞培养 48 h 后收集细胞,强效裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后,用 PPAR γ 抗体(稀释比例 1:1 000)4 $^{\circ}$ C 过夜。再加入 HRP 标记的抗兔二抗(稀释比例 1:5 000),室温振荡孵育 1 h。将膜与 ECL 试剂反应,凝胶成像系统扫描 PVDF 膜曝光,Image J 软件分析条带灰度值(以内参 β -actin 蛋白条带校正),计算实验组与对照组相对蛋白表达水平。

1.4 SOD 和 MDA 检测

SH-SY5Y 细胞培养 48 h 后,用微量酶标法检测培养基中的 SOD 活性及 MDA 含量,按照试剂盒说明书操作。

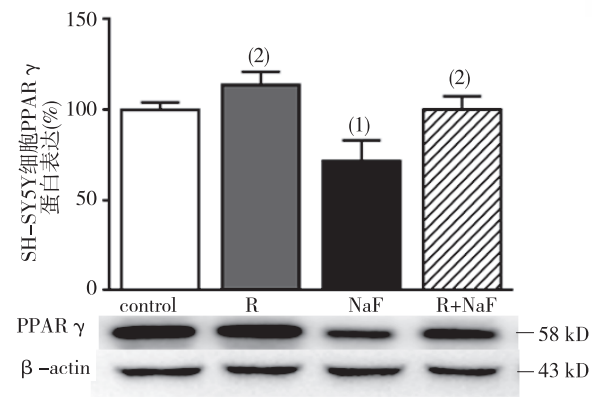
1.5 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对数据进行单因素方差分析;对 PPAR γ 蛋白与 SOD 活性和 MDA 含量的关系进行 *Pearson* 相关性分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白表达

与对照组相比,R 组 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白水平有升高趋势,但两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);NaF 组 SH-SY5Y 细胞中 PAR γ 蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$);与 NaF 组相比,R + NaF 组 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白表达水平则明显升高 ($P < 0.05$),见图 1。



(¹)与对照组比较, $P < 0.05$; (²)与 NaF 组比较, $P < 0.05$
图 1 SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白表达水平
Fig. 1 Expression level of PPAR γ protein in SH-SY5Y cells

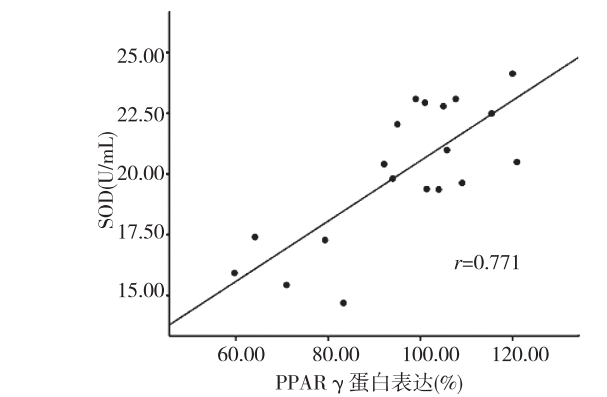


图 2 SH-SY5Y 细胞中 SOD、MDA 含量与 PPAR γ 蛋白表达水平的相关性
Fig. 2 Correlation analysis of SOD, MDA and PPAR γ protein expression in SH-SY5Y cells

2.2 SH-SY5Y 细胞培养基中 SOD 活性和 MDA 含量

与对照组比较,R 组 SH-SY5Y 细胞培养基中 SOD 活性及 MDA 含量无明显改变,NaF 组中 SOD 活性则明显降低,MDA 含量明显增加 ($P < 0.05$);在 R + NaF 组 SH-SY5Y 细胞培养基中 SOD 活性虽然低于对照组 ($P < 0.05$),但明显高于 NaF 组,MDA 含量则明显低于 NaF 组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组 SH-SY5Y 细胞培养基中 SOD 及 MDA 含量 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Expressions of SOD and MDA in SH-SY5Y cell

分组	SH-SY5Y 细胞培养基	
	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mgprot)
对照组	22. 62 \pm 0. 97	1. 22 \pm 0. 20
R 组	22. 13 \pm 1. 45 ⁽¹⁾	1. 30 \pm 0. 10 ⁽¹⁾
NaF 组	16. 11 \pm 1. 06 ⁽²⁾	2. 03 \pm 0. 43 ⁽²⁾
R + NaF 组	19. 80 \pm 1. 23 ⁽¹⁾⁽²⁾	1. 59 \pm 0. 46 ⁽¹⁾

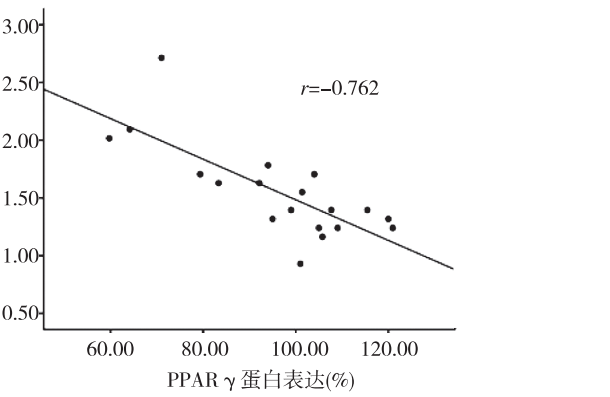
(¹)与 NaF 组比较, $P < 0.05$; (²)与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 SOD 活性、MDA 含量与 PPAR γ 蛋白表达水平的关系

SH-SY5Y 细胞中 PPAR γ 蛋白水平与 SOD 活性呈正相关关系 ($r = 0.771, P < 0.05$),提示 PPAR γ 蛋白表达水平越高,SOD 活性越高,其抗氧化作用越强;PPAR γ 蛋白水平与 MDA 含量呈负相关关系 ($r = -0.762, P < 0.05$),提示 PPAR γ 蛋白表达水平越高,MDA 含量越低,其氧化作用越弱,见图 2。

3 讨论

研究表明,过量的氟在体内蓄积,可导致过多



的自由基产生,机体总氧化水平升高,总抗氧化能力降低,造成机体全身性的病理损伤^[5]。而在地方性(或慢性)氟中毒全身性损伤的发病机制中,氧化应激是迄今为止唯一能对氟中毒引起的机体多系统改变给出较全面的和相对合理解释的学说^[6]。在氧化应激的状态下,过多的活性氧会引起细胞膜脂质、蛋白质和 DNA 损伤,进一步引起细胞的损伤及凋亡^[7-8]。

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是配体活化的核转录因子,经研究发现有 α 、 β 、 γ 3 种亚型,其中研究较广的是 PPAR γ ^[9-10]。PPAR γ 能够参与体内多种生理和病理的过程,如调节血糖、代谢脂肪等,其在被特异性配体活化后形成异二聚体,与靶基因上的特异性的 DNA 反应元件结合,从而调控靶基因的转录和表达^[11]。近年来的研究也表明 PPAR γ 的激活与细胞的炎症和氧化应激有关^[12-13]。在有关小鼠脂肪细胞的研究中发现,PPAR γ 的活化可以抑制 MAP/微管亲和力调控激酶 4 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4, Mark4)所引起的氧化应激和炎症反应,主要表现为 ROS 和白介素 6 (IL-6)表达的减低以及 SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的升高^[14]。此外,PPAR γ 被激活后能够减轻紫外线诱导小鼠皮肤成纤维细胞早衰,并通过下调活性氧的产生起到抗氧化作用^[15]。近年来不断有研究发现 PPAR γ 激动剂的神经保护作用^[16]。研究显示,PPAR γ 激动剂在激活 PPAR γ 后能够通过多种途径来增强抗炎基因的转录和表达,从而抑制炎症和氧化应激反应,治疗神经系统疾病,如神经变性疾病和退行性病变、创伤性损伤、中风、脱髓鞘等疾病^[17-18]。在培养体外原代皮层神经元研究中发现,过氧化氢可能通过负性调节 PPAR γ (表达下调及降低活性)引起神经元损伤,而当外源性激活 PPAR γ 后,神经元过氧化氢损伤有所缓解^[19]。此外,张婧媛等^[20]研究发现,在原代培养大鼠缺氧性皮质神经细胞模型中,PPAR γ 激动剂能够减轻缺氧再复氧后神经细胞的损伤,其保护作用可能是通过降低环加氧酶-2(COX-2)蛋白表达水平而实现的。虽然已有大量研究显示 PPAR γ 激动剂对许多中枢神经系统疾病有保护作用,但尚无关于其对慢性氟中毒神经损伤是否存在保护作用的研究,因此,本课题通过氟诱导神经细胞氧化损伤模型来探讨 PPAR γ 激动剂的

保护作用及其对氧化损伤的影响。

本研究发现,氟处理 SH-SY5Y 细胞引起 PPAR γ 蛋白含量显著降低, SOD 活性显著降低, MDA 含量水平显著升高,提示过量氟的摄入可能引起细胞内氧化应激水平的增加,抗氧化能力降低, PPAR γ 可能参与其中。15d-PGJ2 是 PPAR γ 的天然配体,与该受体具有特异的亲和作用,是 PPAR γ 强有力的外源性激动剂。本研究中,在给予 15d-PGJ2 和 NaF 处理的细胞中观察到细胞内 PPAR γ 蛋白较染氟组显著升高,同时 SOD 活性升高, MDA 含量下降明显,相关分析结果显示细胞中 PPAR γ 蛋白与 SOD 表达水平呈正相关关系,与 MDA 呈负相关关系,提示 PPAR γ 激动剂 15d-PGJ2 对氟诱导的细胞氧化损伤有一定的保护作用,这为慢性氟中毒抗氧化损伤的研究提供一个新的思路。

综上所述,过量氟会导致体外培养 SH-SY5Y 细胞发生氧化损伤,而 PPAR γ 激动剂 15d-PGJ2 处理后可减弱氟诱导的细胞氧化损伤。

4 参考文献

- [1] 王丽静,杨宝顺,邵波. 氟中毒对中枢神经系统的影响及相关治疗[J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(4): 426-428.
- [2] GRAY E, GINTY M, KEMP K, et al. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha agonists protect cortical neurons from inflammatory mediators and improve peroxisomal function[J]. Eur J Neurosci, 2011, 33(8):1421-1432.
- [3] STORER P D, XU J, CHAVIS J, et al. Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes; implications for multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol, 2005, 161(1-2):113-122.
- [4] YU X, SHAO X G, SUN H, et al. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus[J]. Brain Research, 2008, 1200(1):146-158.
- [5] 陈修文, 万昌武, 官志忠, 等. 氟中毒病区人群血清中多种氧化应激指标的综合分析[J]. 工业卫生与职业病, 2016, 42(4):249-252.
- [6] 官志忠, 氧化应激在地方性氟中毒分子发病机制中的作用[J]. 中华地方病学杂志, 2016, 35(2):79-82.
- [7] BARBIER O, ARREOLA-MENDOZA L, DEL RAZO L M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity[J]. Chem

- Biol Interact, 2010, 188(2):319–333.
- [8] 刘燕斐, 官志忠. 慢性氟中毒性肝损伤及其发病机制[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(5):588–590.
- [9] VELLA S, CONALDI P G, FLORIO T, PAGANO A. PPAR gamma in neuroblastoma: the translational perspectives of hypoglycemic drugs [J]. PPAR Res, 2016, 2016: 3038164.
- [10] CHOI S S, PARK J Y, CHOI J H. Revisiting PPAR γ as a target for the treatment of metabolic disorders[J]. BMB Rep, 2014, 47(11): 599–608.
- [11] CRAFT S, WASTON G S. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms [J]. Lancet Neurol, 2004, 3(3):169–178.
- [12] BLANQUICETT C, KANG B Y, RITZENTHALER J D, et al. Oxidative stress modulates PPAR gamma in vascular endothelial cells. [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2010, 48(12):1618.
- [13] MOHAPATRA S K, GURI A J, CLIMENT M, et al. Immunoregulatory actions of epithelial cell PPAR gamma at the colonic mucosa of mice with experimental inflammatory bowel disease. [J]. Plos One, 2010, 5(4):10215.
- [14] LIU Z, LU G, CHEN Y, et al. Mark4 promotes oxidative stress and inflammation via binding to PPARgamma and activating NF-kappaB pathway in mice adipocytes [J]. Scientific Reports, 2016, 6:21382.
- [15] CHEN L, BI B, ZENG J, et al. Rosiglitazone ameliorates senescence-like phenotypes in a cellular photoaging model[J]. Journal of Dermatological Science, 2015, 77(3):173–181.
- [16] KAPADIA R, YI J H, VEMUGANTI R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists[J]. Front Biosci, 2009, 1(13):1813–1826.
- [17] YU X, SHAO X G, SUN H, et al. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus [J]. Brain Res, 2008, 20(8):146–158.
- [18] 邓永兵, 唐文渊. PPAR 的神经保护作用研究进展[J]. 中华神经疾病研究杂志, 2010, 9(1): 92–94.
- [19] 王宁, 韩晶, 徐艳炜, 等. 过氧化氢损伤原代皮质神经元中 PPAR γ 的改变[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(21):1686–1690.
- [20] 张婧媛, 张艳桥, 张一娜, 等. PPAR γ 激动剂减轻缺氧性大鼠神经细胞损伤的作用机制[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(1):89–92.
- (2018-07-20 收稿, 2018-09-15 修回)
- 中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅
-
- (上接第 1132 页)
- [42] 李勇, 刘泽鸿, 叶春玲, 等. JCS 对 LA795 肺腺癌小鼠移植瘤转移的抑制作用研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2009, 24(5): 469–471.
- [43] 张海波, 田蓓, 任崇敏, 等. 金刺参九正合剂及其主要成分治疗癌症效果的 Meta 分析[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(4): 796–800.
- [44] 李泽荣, 丘栋. 辛伐他汀联合血脂平胶囊治疗高脂血症的临床疗效[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(19): 88–89.
- [45] 卢素琳, 钟恒亮, 张贵林, 等. 苗药仙人掌胃康胶囊抗溃疡作用的实验研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2000, 6(3):158–160.
- [46] 何孙香, 熊泽民, 汪波. 消痞和胃胶囊治疗胃癌前病变 32 例临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 233–236.
- [47] 胡晚枚, 熊康宁, 向廷杰, 等. 贵州喀斯特高原山地植物篱物种选择与试验示范[J]. 济南大学学报, 2017, 31(5): 445–451.
- (2018-07-03 收稿, 2018-09-06 修回)
- 编辑: 文箫颖