

N-乙酰半胱氨酸经Nrf2/HO-1通路拮抗TDCIPP诱导的小鼠海马神经元氧化损伤

黎嘉玲, 赵伟, 刘艳, 曾丽君, 吴茵茹, 胡恒芳, 陈能洲*

广东药科大学, 广东广州510310

DOI:10.62836/medicine.v3i4.1349

摘要: 有机磷阻燃剂TDCIPP的神经毒性及机制尚不明确。本研究探究TDCIPP诱导小鼠海马神经元氧化损伤的效应及机制。采用TDCIPP处理HT22细胞建立体外模型, 检测细胞活力、氧化应激及Nrf2和HO-1表达。结果显示TDCIPP剂量依赖性降低细胞活力, SOD活性和GSH含量下降, MDA升高, Nrf2及HO-1表达增强。NAC预处理可抵抗这些变化。研究为阐明TDCIPP神经毒理机制提供了新证据, 提示靶向氧化应激及Nrf2/HO-1通路的干预策略可能是防治神经损伤的潜在方向。

关键词: TDCIPP; 氧化应激; Nrf2/HO-1通路; 海马神经元; N-乙酰半胱氨酸

N-acetylcysteine Antagonizes TDCIPP-induced Oxidative Damage in Mouse Hippocampal Neurons via the Nrf2/HO-1 Pathway

Jialing Li, Wei Zhao, Yan Liu, Lijun Zeng, Yinru Wu, Hengfang Hu, Nengzhou Chen

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong

Abstract: The neurotoxicity and mechanisms of TDCIPP remain unclear. This study examined TDCIPP-induced oxidative damage in mouse hippocampal neurons. An in vitro model using HT22 cells assessed cell viability, oxidative stress, and Nrf2/HO-1 expression. TDCIPP reduced viability, decreased SOD activity and GSH, increased MDA, and upregulated Nrf2 and HO-1. NAC pretreatment reversed these effects. This study provides new evidence for TDCIPP's neurotoxic mechanisms, suggesting oxidative stress and Nrf2/HO-1 pathway as potential intervention targets.

Keywords: TDCIPP; Oxidative stress; Nrf2/HO-1 pathway; Hippocampal neurons; N-acetylcysteine

*基金项目: 2024年广东药科大学大学生创新创业训练计划项目 (G202410573038)。

作者简介: 黎嘉玲 (2002-), 女, 广东药科大学预防医学专业, 本科在读。

通讯作者: 陈能洲 (1987-), 男, 讲师, 研究方向: 环境污染物神经毒性作用机制。

有机磷阻燃剂三(1,3-二氯-2-丙基)磷酸酯(TDCIPP)作为阻燃剂和增塑剂广泛应用于商业产品生产中,包括塑料、纺织品、绘画颜料和家具中[1]。目前已在孕妇外周静脉血及新生儿脐带血中检测出多种有机磷阻燃剂[2]。TDCIPP能导致大鼠海马神经元数量减少及认知功能损伤,但TDCIPP是否通过直接诱导海马神经元发生氧化损伤从而介导其毒性,尚缺乏系统的研究证据。

氧化应激是多种外源性化学物诱导神经毒性的核心机制之一,其标志物如超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的对维持机体抗氧化酶系统和氧化系统的平衡起着重要的作用,是衡量机体的抗氧化能力的重要指标[3]。Nrf2与抗氧化反应元件(ARE)结合,启动下游抗氧化、抗炎蛋白及解毒酶等的表达,构成Nrf2/ARE通路,是机体抵御各种氧化应激的重要保护通路[4]。然而,在TDCIPP的神经毒性研究中,目前尚缺乏对氧化应激标志物的检测,更鲜有关于Nrf2/HO-1信号通路是否参与其毒性的分子机制探讨。本研究通过建立TDCIPP暴露的小鼠海马神经元细胞氧化损伤模型,探讨Nrf2/HO-1信号通路在其毒理机制中的作用。研究结果将为揭示TDCIPP的神经毒理学机制提供新的实验证据,具有公共卫生与环境毒理学意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

小鼠海马神经元细胞(HT22)购置瑾原生物公司。高糖DMEM培养基(Gibco)、细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8,上海碧云天公司)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)购于南京建成科技有限公司。逆转录试剂盒(TakaRa)、荧光定量PCR试剂盒(TakaRa)。

1.2 细胞模型

HT22细胞在含有10%FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中培养。所有细胞均在37℃、5%CO₂和95%湿度环境下培养。TDCIPP浓度为1、5、

10、50 μM,处理HT22细胞24小时,通过检测细胞活力和氧化应激相关指标观察细胞损害作用。

N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理HT22细胞2h,然后加入50 μM TDCIPP处理24h。实验分4组:对照组、TDCIPP处理组(50 μM)、NAC处理组(2mM)、NAC+TDCIPP组(2mM NAC与50 μM TDCIPP共同处理)。

1.3 细胞活力检测

在96孔细胞培养板上接种HT22细胞。测定时吸走原液每孔加20 μl cck8溶液和80 μl完全培养液混匀,于恒温培养箱孵育30min后用多功能酶标仪测定450nm波长处的吸光度值。

1.4 氧化应激水平检测

分别收集对照组与处理组细胞,置于1ml生理盐水的干净试管中,用超声粉碎仪粉碎制成细胞匀浆,再按照试剂说明书要求严格操作测定细胞内的GSH、SOD、MDA。

1.5 基因表达水平检测

为了评估细胞中Nrf2、HO-1基因表达变化,使用RT-qPCR检测Nrf2、HO-1的mRNA表达水平。使用TRIZOL提取总RNA,逆转录为cDNA,将得到的cDNA进行RT-qPCR。GAPDH为内参基因,用于归一化处理。研究使用的引物序列见表1。

1.6 统计分析

采用SPSS26.0进行统计学处理,以Mean±SD表示正态分布计量资料,三组及以上比较采用方差分析,采用独立样本t检验方法处理组间比较,所有统计分析基于双侧假设检验,检验水准0.05, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 有机磷阻燃剂TDCIPP暴露引起小鼠海马神经元氧化损伤并导致细胞活力下降

如图1A所示,梯度浓度TDCIPP暴露24小

表1. 引物序列

引物名称	上下游引物
GAPDH-F	TATGTCGTGGAGTCTACTGGTGTC
GAPDH-R	TGAGTTCATATTTCTCGTGGTT
Nrf2-F	CCTTGTA CTTTGAAGACTGTATGC
Nrf2-R	CAAGCGACTCATGGTCATCTAC
HO-1-F	GTGACAGAAGAGGCTAAGACCG
HO-1-R	ACAGGAAGCTGAGAGTGAGGAC

时HT22细胞活力下降, 其中中、高剂量组细胞活力下降显著 ($P<0.05$)。TDCIPP暴露24小时HT22细胞中SOD活性和GSH量下降 (图1B,D), 中、高剂量组下降明显 ($P<0.05$)。同时发现TDCIPP暴露引起细胞中MDA含量上升 (图1C), 中、高剂量组上升明显, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 TDCIPP暴露的小鼠海马神经元氧化损伤模型中Nrf2/HO-1基因表达变化

如图1A所示, 梯度浓度TDCIPP暴露24小时小鼠海马神经元细胞Nrf2基因和HO-1基因表达升高, 其中中、高剂量组基因表达增强显著, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 干预对TDCIPP暴露的小鼠海马神经元氧化损伤的影响

与对照组相比, 高剂量TDCIPP处理组HT22细胞中细胞活力降低。NAC处理后, HT22细胞活力升高, 差异有统计学意义。与对照组比较, TDCIPP处理组HT22细胞中SOD和GSH水平降低, MDA水平显著升高。NAC处理后, HT22细胞中SOD和GSH水平升高, MDA水平降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图3)。

2.4 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 干预对TDCIPP暴露的小鼠海马神经元氧化损伤模型中Nrf2/HO-1基因表达的影响

与对照组比较, TDCIPP处理组HT22细胞中Nrf2基因和HO-1基因表达升高。NAC处理后, HT22细胞升高的Nrf2基因和HO-1基因表达下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图4)。

3 讨论

本研究证实TDCIPP以剂量依赖性方式降低HT22细胞活力, 提示其具有神经元细胞毒性。TDCIPP暴露可诱导细胞的氧化应激反应, 并激活相关的细胞保护机制。本研究发现在小鼠海马神经元细胞中, TDCIPP暴露显著上调Nrf2和HO-1基因的mRNA表达水平。Nrf2作为细胞应对氧化应激的关键转录因子, 其激活可启动一系列II相解毒酶和抗氧化基因的转录, 包括HO-1[5]。本研究中HO-1的显著上调, 结合过往研究报告的TDCIPP暴露导致HMOX1 (编码HO-1的基因) 表达增加, 进一步支持了TDCIPP通过诱导氧化应激从而激活Nrf2/HO-1信号轴这一分子机制。这些结果共同提示, TDCIPP暴露所引起的氧化损伤触发了细胞的内在抗氧化防御系统, 其中Nrf2/HO-1通路的激活是细胞应对氧化应激负荷的重要代偿性保护反应。

N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 作为一种经典的抗氧化剂, 对氧化应激引起的脑细胞损伤具有保护作用[6]。本研究观察到NAC预处理可显著提升受TDCIPP暴露的HT22海马神经元细胞中SOD活性和GSH水平, 同时降低MDA含量, 证实了NAC的抗氧化干预能够有效拮抗TDCIPP导致的细胞活力下降和氧化损伤。通过抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 的干预实验进一步确认, NAC能够拮抗TDCIPP引起的Nrf2和HO-1基因表达升高, 从侧面证实了TDCIPP对Nrf2通路的激活依赖于氧化应激状态。

本研究存在一定局限性。仅在体外细胞模型中进行, 未涉及体内动物实验及临床样本验证, 这在一定程度上限制了结果的转化价值。本研究的发

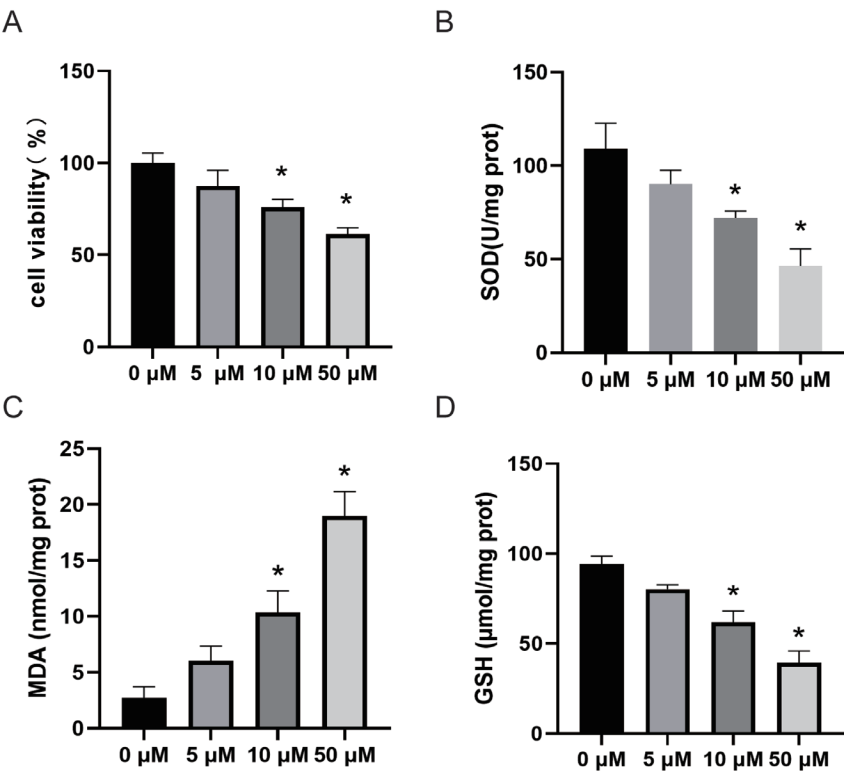


图1. TDCIPP暴露24小时后HT22细胞氧化损伤与细胞活力情况。A. 细胞活力变化情况，B. 细胞SOD活力变化情况，C. MDA变化情况，D. GSH变化情况 (n=6, *表示与对照组0 μM 对比 $P < 0.05$)

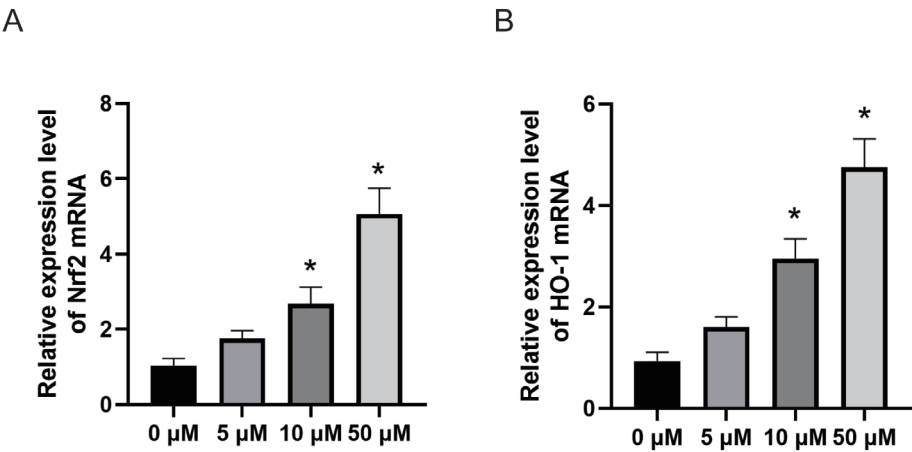


图2. TDCIPP暴露24小时HT22细胞Nrf2/HO-1基因表达情况。A. Nrf2基因表达变化情况，B. HO-1基因表达变化情况 (n=6, *表示与对照组0 μM 对比 $P < 0.05$)。

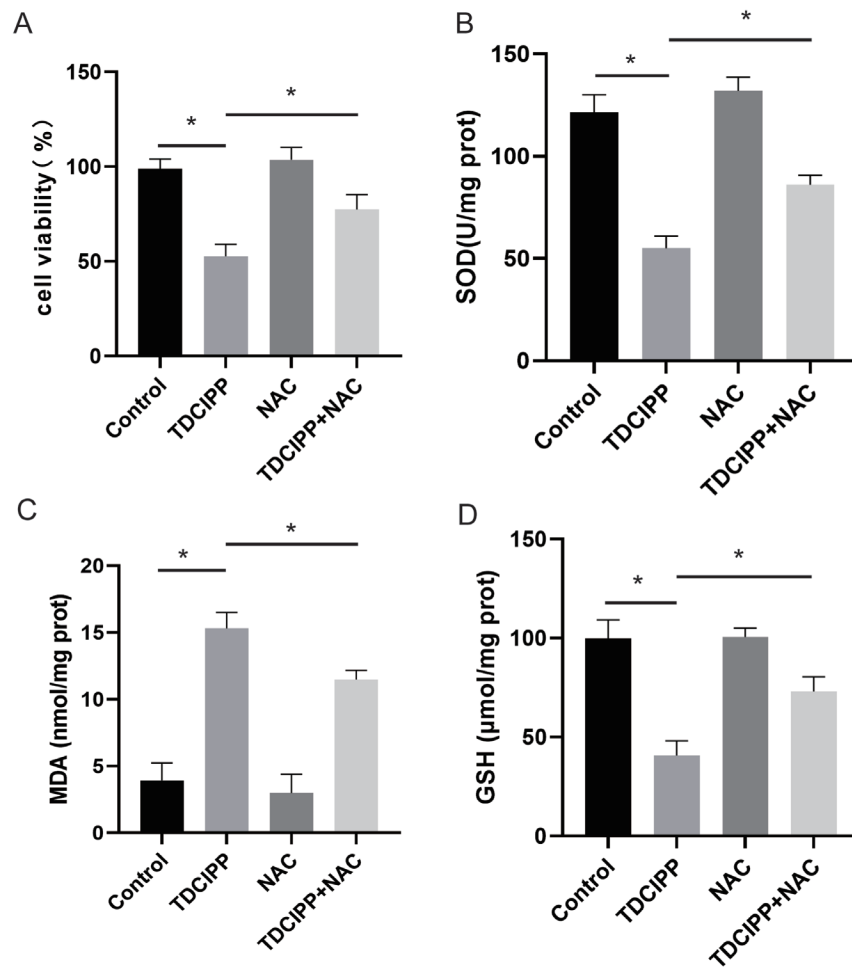


图3. N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 干预对TDCIPP暴露的小鼠海马神经元氧化损伤的影响。A. NAC对TDCIPP暴露的HT22细胞活力变化情况, B. NAC对TDCIPP暴露的HT22细胞SOD活力变化情况, C. NAC对TDCIPP暴露的HT22细胞MDA变化情况, D. NAC对TDCIPP暴露的HT22细胞GSH变化情况 (n=6, *表示两组对比P<0.05)。

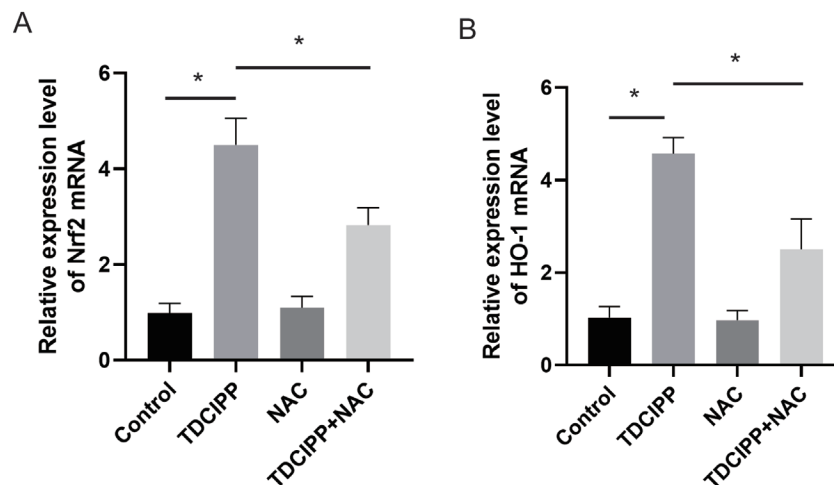


图4. N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 干预对TDCIPP暴露的小鼠海马神经元氧化损伤模型中Nrf2/HO-1基因表达的影响。A. NAC对TDCIPP暴露的HT22细胞Nrf2基因表达变化情况, B. NAC对TDCIPP暴露的HT22细胞HO-1基因表达变化情况 (n=6, *表示两组对比P<0.05)。

现,即抗氧化剂NAC能够逆转TDCIPP诱导的氧化损伤及Nrf2/HO-1通路的上调,虽然在机制层面提供了证据,但仍需在后续研究中通过合适的体内动物模型(如啮齿类动物暴露模型)进行验证,以确认其体内效应及安全性。

参考文献

- [1]周启星,赵梦阳,来子阳,等.有机磷阻燃剂的环境暴露与动物毒性效应[J].生态毒理学报,2017,12(5):1-11.
- [2]宋玉,周妮娅,王晓刚,等.重庆市孕妇与新生儿体内有机磷阻燃剂负荷水平、组成分布和相关性研究[J].中华疾病控制杂志,2024,28(5):503-509+529.
- [3]林俊东,黄琼霄,陈国豪,等.纳米金刚石对癫痫细胞模型SOD、GSH-Px、MDA的影响[J].临床医学工程,2019,26(12):1653-1655.
- [4]易小芳,谭超.Nrf2/ARE通路调节机制的研究进展[J].天津医药,2015,43(5):573-575.
- [5]王甜甜,陈淳媛,杨雷,等.Nrf2/HO-1信号轴在氧化应激性疾病中的机制[J].中南大学学报(医学版),2019,44(1):74-80.
- [6]卢理英,彭潇,张旭.N-乙酰半胱氨酸对糖氧剥夺诱导星形胶质细胞损伤的抑制作用及机制研究[J].中国现代应用药学,2018,35(9):1290-1294.

