

牛磺酸对氧化应激损伤的神经保护作用

高丽艳,朱东亚

(南京医科大学药学院药理实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨牛磺酸对过氧化氢(H_2O_2)引起的神经元损伤的保护作用。方法:采用不同浓度的 H_2O_2 处理神经元,制备体外氧化应激模型,造模前24 h分别给予5、15、25 mmol/L牛磺酸预处理。采用特异性荧光探针DCFH-DA检测神经元活性氧自由基水平,检测乳酸脱氢酶(LDH)释放率反映神经元损伤程度,用免疫印迹法检测脑源性营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及突触相关蛋白的表达水平。结果:与Control组比较,不同浓度的 H_2O_2 (25、50、100 μ mol/L)均能使LDH向胞外释放增多($P < 0.05$),15、25 mmol/L的牛磺酸均能减少 H_2O_2 引起的LDH的释放($P < 0.05$)。100 μ mol/L H_2O_2 使神经元胞内活性氧水平升高,仅25 mmol/L的牛磺酸能抑制 H_2O_2 诱导的胞内活性氧的增多($P < 0.05$)。100 μ mol/L H_2O_2 处理神经元导致BDNF、突触相关蛋白Synapsin和Spinophilin表达水平下降,给予25 mmol/L的牛磺酸能部分逆转 H_2O_2 诱导的蛋白水平的下降($P < 0.05$)。结论:牛磺酸能够减轻 H_2O_2 引起的神经元损伤,具有较好的神经保护作用。

[关键词] 牛磺酸;过氧化氢;氧化应激;乳酸脱氢酶;活性氧

[中图分类号] Q421

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1072-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20140814

Neuroprotection of taurine induced by hydrogen peroxide

Gao Liyan, Zhu Dongya

(Pharmacology Laboratory, School of Pharmacy, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of taurine on injured neurons induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Methods:** Neurons were treated with different doses of H_2O_2 . Oxidative stress model was prepared in vitro. Taurine was applied at 5, 15 or 25 mmol/L 24 h prior to H_2O_2 treatment. Specific fluorescent probe DCFH-DA was performed to analyze reactive oxygen species level of neurons. Lactic dehydrogenase (LDH) release assay was performed to detect the injury degree of neurons. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptic-related protein levels were evaluated by Western blotting. **Results:** Compared with the control group, different doses of H_2O_2 (5, 50 and 100 μ mol/L) increased LDH release to the extracellular medium ($P < 0.05$), while 15 and 25 mmol/L taurine decreased the release ($P < 0.05$). One hundred μ mol/L H_2O_2 led to an increase of reactive oxygen species level and decreased BDNF, synapsin and spinophilin protein expressions ($P < 0.05$). After treatment with 25 mmol/L taurine, the above indicators were attenuated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Taurine can alleviate H_2O_2 induced neuron damages and show neuroprotective effect against oxidative stress.

[Key words] taurine; hydrogen peroxide; oxidative stress; LDH; ROS

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1072-1076]

氧化应激是由体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成超过清除能力导致的一种病理状态。ROS主要包括:羟自由基、超氧阴离子、过氧化氢和单线态氧等。氧化应激与多种疾病的发生发展都有着密切的联系^[1-2],例如脑卒中、阿尔兹海默症、帕金森症等疾病。因此,清除自由基对改善上述神经退行性疾病的病理状态有着重要意义。牛磺酸是脑中含量最丰富的游离氨基酸之一,在中枢神经

系统中,神经细胞(神经元和胶质细胞)内含有高浓度(5~70 mmol/L)的牛磺酸^[3],并且有报道牛磺酸对缺血再灌注引起的氧化应激损伤有一定的保护作用^[4]。在SH-SY5Y细胞株上,牛磺酸能够逆转亚砷酸盐引起的脑源性营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达降低^[5]。除此之外,突触相关蛋白的表达也受到BDNF的紧密调控,且与BDNF的蛋白表达呈正相关^[6]。因此,我们推测牛磺酸可能通

过调控 BDNF 保护氧化应激引起的神经损伤。本研究通过体外实验在神经元上用不同浓度的过氧化氢模拟氧化应激,给予牛磺酸处理来探讨其抗氧化应激的效应以及可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

孕 15 d ICR 小鼠,清洁级,由南京医科大学实验动物中心提供。牛磺酸、DCFH-DA、 β -actin、多聚鸟氨酸购自美国 Sigma 公司,乳酸脱氢酶(LDH)活性试剂盒购自南京建成公司,神经元培养基购自美国 Gibco 公司,HBSS 缓冲盐购自上海线碧云天公司。Synapsin 抗体购自美国 CST 公司,Spinophilin 抗体购自美国 Millipore 公司,BDNF 抗体购自美国 Abcam 公司。ECL 发光液购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 皮层神经元培养

从孕 15 d 的 ICR 胚胎中分离出原代皮层神经元,培养在含 2%B27 的神经元培养基中。将孕 15 d 胎鼠分离出皮层,在含有 0.125%的胰酶中 37℃消化 10 min,转移至 15 ml 离心管中,4℃ 5 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,接着加入 4 ml 10% FBS、DMEM/F12 (1:1)终止消化。4℃ 5 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,将沉淀重悬于 2 ml 神经元培养基中,计数神经元并按需接种于包被有多聚鸟氨酸的细胞培养板或皿中^[7]。

1.2.2 LDH 释放测定

收集神经元胞外培养液 100 μ l 供测定使用,弃去多余胞外培养液,接着用 100 μ l ddH₂O -80℃反复冻融细胞 2 次,作为细胞内液供测定使用。用 LDH 试剂盒测定 LDH 活性。混匀,各管中吸取 200 μ l 加入 96 孔板,于 440 nm 处测定吸光度(absorbance, A)值。LDH 释放(%)=胞外 A 值/(胞外 A 值 + 胞内 A 值) \times 100%,胞外 A 值 = 胞外测定 A 值 - 胞外对照 A 值,胞内 A 值 = 胞内测定 A 值 - 胞内对照 A 值。

1.2.3 胞内活性氧测定

体外培养第 9 天的神经元于 37℃加载 15 μ mol/L DCFH-DA 30 min 后,用 HBSS 洗 2 遍。用不同浓度的 H₂O₂(25、50、100 μ mol/L)处理,记录不同时间点 Ex 488 nm,Em 525 nm 处 DCF 的荧光强度。ROS 的相对荧光强度表示为(F_t-F₀)/F₀,F_t为某一时间点测定的荧光强度,F₀为加入 H₂O₂之前荧光强度的基值。DCFH-DA 自身没有荧光,但可以自由穿过

细胞膜,进入细胞后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH,细胞内的 ROS(主要是羟基自由基)可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF,通过检测 DCF 的荧光强度来反映胞内 ROS 水平。

1.2.4 蛋白质印迹分析

细胞样品在预冷的中效裂解液中裂解 30 min,裂解结束后 12 000 g 离心 15 min,吸取蛋白上清,加入相应体积的 6 \times 上样缓冲液,100℃煮样 10 min。样品于 10%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,分离后的蛋白转移至硝酸纤维素膜。目的蛋白于 5%的脱脂奶粉中室温封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。孵育一抗兔来源 β -actin (1:2 000)、BDNF (1:1 000)、Synapsin(1:1 000)、Spinophilin(1:1 000)4℃过夜。次日,弃去一抗,TBST 洗膜 4 次,每次 15 min,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1 000) 30℃孵育 2 h,TBST 洗膜 4 次,每次 15 min,末次洗膜后,迅速以 ECL 发光液试剂 A 液和 B 液各 1 ml 混合后,于膜上反应约 1 min,放进凝胶成像系统(Bio-Rad)扫描,图片扫描后用 Image Lab(Bio-Rad)软件进行数据分析。

1.2.5 细胞形态

体外培养第 8 天的神经元,25 mmol/L 牛磺酸预孵 24 h,之后 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 3 h,PBS 洗 2 遍,4% PFA 室温固定 15 min,PBS 洗 2 遍,于奥林巴斯显微镜明场 100 倍镜拍摄。

1.3 统计学方法

采用 STATA9.0 统计学分析软件,定量资料表示为均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)。采用单因素方差分析和 Scheffe's 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

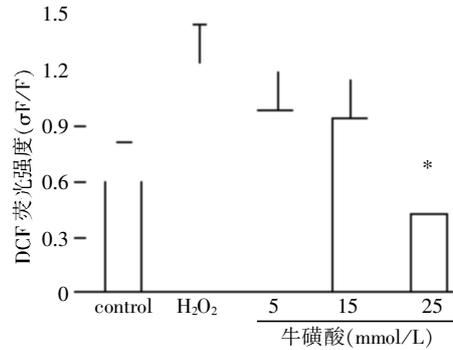
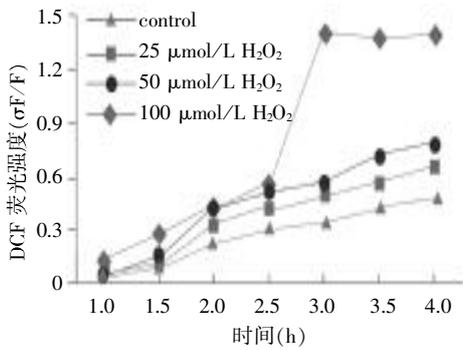
2.1 牛磺酸减轻氧化应激所致神经元损伤

将不同浓度 H₂O₂ 处理体外培养 9 d 的神经元,每隔 0.5 h 测定胞内 ROS 值。结果显示各浓度的 H₂O₂ 均使胞内 ROS 有一定程度的升高,100 μ mol/L 的 H₂O₂ 处理 3 h 后使得 ROS 有大幅度的增加,且在之后的 1 h 都维持在一个较高的水平(图 1A)。用不同浓度的牛磺酸(5、15、25 mmol/L)预处理神经元 24 h,然后加入 100 μ mol/L H₂O₂,3 h 后测定胞内 ROS 的生成水平。仅牛磺酸浓度为 25 mmol/L 时,能明显减少 H₂O₂ 导致的胞内 ROS 升高(图 1B),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

体内生成过多的 ROS 容易引起 DNA 的氧化损伤及蛋白质的表达异常,严重时会导致细胞死亡。通

过测试 LDH 释放率来检测神经元的活力,将不同浓度 H₂O₂ 处理体外培养第 9 天的神经元,3 h 后测定 LDH 的释放。结果显示,不同浓度的 H₂O₂ 均能造成 LDH 向胞外的释放增多,且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$,图 2A)。之后,我们用不同浓度的牛磺酸(5、

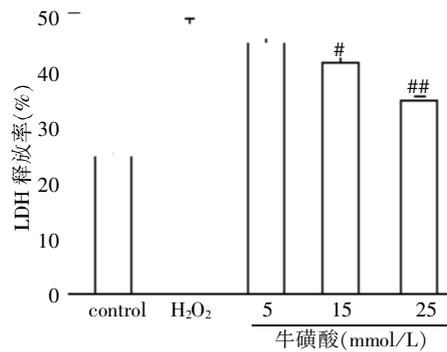
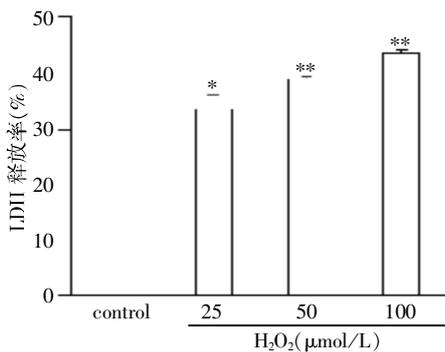
15、25 mmol/L)预孵神经元 24 h,再用 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 3 h,同样测定 LDH 的胞外释放。结果显示,15、25 mmol/L 的牛磺酸均能降低 LDH 向胞外的释放($P < 0.05$,图 2B),减轻氧化应激所致神经元损伤。



与 H₂O₂ 组比较, * $P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 1 牛磺酸对活性氧的影响

Figure 1 Influence of taurine on reactive oxygen species



与 control 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ 。与 H₂O₂ 组比较, * $P < 0.05$, ## $P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 2 牛磺酸对 LDH 释放的影响

Figure 2 Influence of taurine on LDH release

2.2 牛磺酸减轻氧化应激对神经元 BDNF、Synapsin 及 Spinophilin 表达的影响

25 mmol/L 的牛磺酸预孵神经元 24 h,100 μ mol/L H₂O₂ 处理 3 h 后,免疫印迹法检测 BDNF、突触相关蛋白 Synapsin 及 Spinophilin 表达水平。结果显示,100 μ mol/L 的 H₂O₂ 使得神经元 BDNF、Synapsin 及 Spinophilin 蛋白表达降低,而 25 mmol/L 的牛磺酸能部分逆转 H₂O₂ 造成的 BDNF、Synapsin 及 Spinophilin 表达的减少,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

2.3 牛磺酸减轻氧化应激对神经元形态学变化的影响

体外培养第 9 天的神经元预孵 25 mmol/L 牛磺酸 24 h,100 μ mol/L H₂O₂ 处理 3 h 后,于显微镜

下观察神经元的形态。可以看出正常神经元胞体呈锥体形,H₂O₂ 处理过的神经元胞体变鼓,趋近正圆形,而 25 mmol/L 牛磺酸预处理神经元能部分逆转这样的形态变化(图 4)。

3 讨论

氧化应激可引起 DNA 的氧化损伤和蛋白质的表达异常,使机体处于易损状态。H₂O₂ 可通过增加羟自由基的生成产生细胞损伤作用。研究表明,H₂O₂ 与细胞内的 ADP-Fe²⁺作用生成羟自由基,引起微粒体的脂质过氧化损伤^[8]。由此可以看出 H₂O₂ 对细胞的损伤主要是由羟自由基介导的。ROS 对神经元的损伤主要表现在以下几个方面:细胞膜发生脂质过氧化反应,膜磷脂被破坏降解;细胞膜对钠、钙及大分

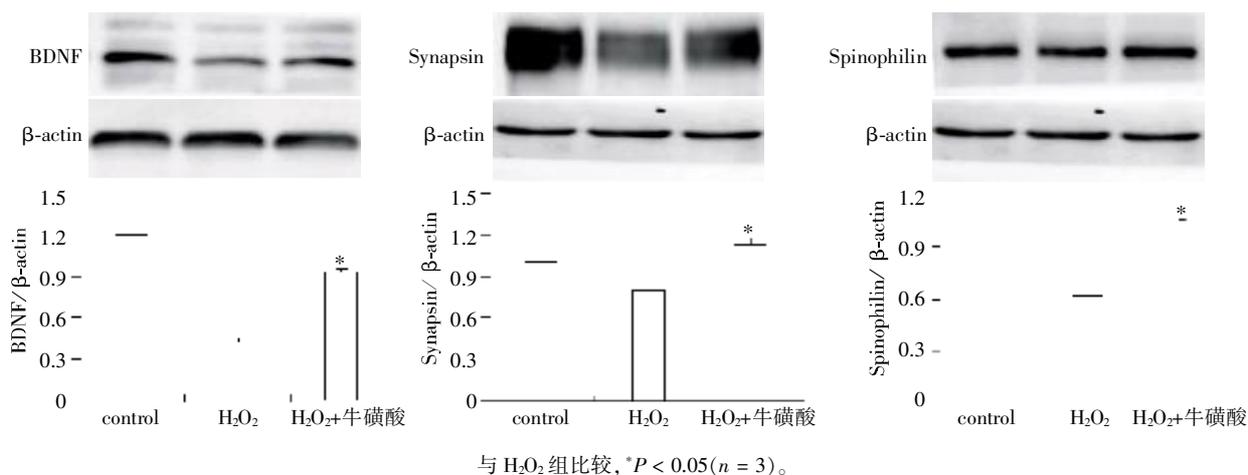
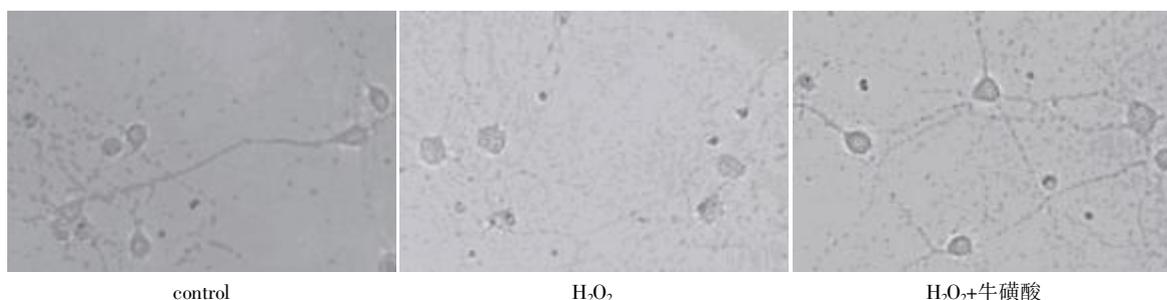


图 3 体外培养第 9 天的神经元突触相关蛋白 BDNF、Synapsin 及 Spinophilin 表达的变化

Figure 3 Synapses related BDNF, synapsin and spinophilin protein expressions at the 9th day of *in vitro* culture



对照细胞体呈椎体形;H₂O₂处理过的胞体变鼓,趋近正圆形;牛磺酸处理后能部分缓解神经元胞体变鼓的趋势。

图 4 体外培养第 9 天的神经元形态变化($\times 30$)

Figure 4 Morphological changes of neurons at the 9th day of *in vitro* culture ($\times 30$)

子物质通透性增加,神经元发生细胞毒性水肿;线粒体破坏,功能丧失^[9-10]。本研究中采用体外培养神经元给予 H₂O₂ 模拟氧化应激,引起神经元内 DCF 荧光强度增强,即 ROS 自由基生成增多,与文献报道一致。

Gharibani 等^[11]报道体外原代神经元经历缺氧复氧细胞活力降低至对照组的 49%,而给予 10 mmol/L 的牛磺酸后细胞活力增加到对照组的 85%。也有报道在 PC12 细胞中,60~80 mmol/L 的牛磺酸能减轻甲基苯丙胺诱导的细胞活力的丧失,增加 GPx 抗氧化活性^[12]。本实验中 15、25 mmol/L 牛磺酸能减少 H₂O₂ 诱导的 LDH 向胞外的释放,且 25 mmol/L 的牛磺酸能减轻氧化应激对神经元形态学变化的影响,表明牛磺酸的神经保护作用明确的。

研究表明,BDNF 对超氧阴离子引起的 PC12 细胞的死亡有保护作用^[13-14],所以我们推测 BDNF 可能参与了牛磺酸的抗氧化应激,实验也证明 25 mmol/L 的牛磺酸能够部分逆转氧化应激造成的 BDNF 蛋白表达的降低。Waterhouse 等^[6]报道树突部位合成的 BDNF 能够调节树突棘的形态;若 BDNF

的合成受到抑制,树突棘将会萎缩且突触传递的长时程增强效应也会减弱。突触相关蛋白的表达也受到 BDNF 的紧密调控,且与 BDNF 的蛋白表达呈正相关^[6,15]。本实验也证明了 25 mmol/L 的牛磺酸能逆转 H₂O₂ 引起的 Synapsin 和 Spinophilin 蛋白表达的降低,我们推测这一效应可能是由脑源性营养因子 BDNF 引起的。

综上所述,本研究显示牛磺酸能降低氧化应激引起的活性氧的增加,减少神经元的死亡,部分逆转氧化应激所致的 BDNF、Synapsin 及 Spinophilin 蛋白表达的减少,具有较好的神经保护作用。是否还存在除了 BDNF 以外的其他分子参与此过程仍有待进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing[J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247
[2] 杨玲,许速. 氧化应激与疾病发生的相关性[J]. 西南国防医药, 2012, 22(11): 1268-1270
[3] Hamberger A, Lindroth P, Nyström B. Regulation of glu-

- tamate biosynthesis and release *in vitro* by low levels of ammonium ions[J]. *Brain Res*, 1982, 237(2): 339-350
- [4] Wang JX, Li Y, Zhang LK, et al. Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(7): 821-827
- [5] Chou CT, Lin WF, Kong ZL, et al. Taurine prevented cell cycle arrest and restored neurotrophic gene expression in arsenite-treated SH-SY5Y cells[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(4): 811-819
- [6] Waterhouse EG, Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 42(2): 81-89
- [7] Luo CX, Jin X, Cao CC, et al. Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(11): 2041-2052
- [8] Klein SD, Walt H, Richter C. Photosensitization of isolated rat liver mitochondria by tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 348(2): 313-319
- [9] Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn[J]. *Biol Neonate*, 2001, 79(3-4): 180-186
- [10] Hegde ML, Mantha AK, Hazra TK, et al. Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases [J]. *Mech Ageing Dev*, 2012, 133(4): 157-168
- [11] Gharibani PM, Modi J, Pan C, et al. The mechanism of taurine protection against endoplasmic reticulum stress in an animal stroke model of cerebral artery occlusion and stroke-related conditions in primary neuronal cell culture [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 776: 241-258
- [12] Li Y, Hu Z, Chen B, Bu Q, et al. Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(1): 1-7
- [13] Yamagata T, Satoh T, Ishikawa Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12h cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species[J]. *Neurosci Res*, 1999, 35(1): 9-17
- [14] Huang YZ, McNamara JO. Neuroprotective effects of reactive oxygen species mediated by BDNF-independent activation of TrkB [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(44): 15521-15532
- [15] Bennett MR, Lagopoulos J. Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 112: 80-99

[收稿日期] 2014-01-14

(上接第 1065 页)

- species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16(3): 409-414
- [25] Kaltreider RC, Davis AM, Lariviere JP, et al. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109(3): 245-251
- [26] Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, et al. Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(12): 4957-4964
- [27] Bernstam L, Nriagu J. Molecular aspects of arsenic stress [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2000, 3(4): 293-322
- [28] Shen L, Xu W, Li A, et al. JWA enhances As₂O₃-induced tubulin polymerization and apoptosis via P38 in HeLa and MCF-7 cells[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(11): 1177-1193
- [29] Yih LH, Tseng YY, Wu YC, et al. Induction of centrosome amplification during arsenite-induced mitotic arrest in CGL-2 cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 2098-2106
- [30] Shtil AA, Mandlikar S, Yu R, et al. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 1999, 18(2): 377-384
- [31] Li Y, Li S, Han Y, et al. Calebin-A induces apoptosis and modulates MAPK family activity in drug resistant human gastric cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(1-3): 252-258
- [32] Kim IK, Park SM, Cho HJ, et al. 14-3-3sigma attenuates RhoGDI2-induced cisplatin resistance through activation of Erk and p38 in gastric cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2013, 4(11): 2045-2056

[收稿日期] 2014-02-24