

# 虾青素促进丙烯酰胺所致大鼠海马神经细胞损伤的恢复<sup>△\*</sup>

曹秀明, 樊宇, 祁小倩, 宋冬雪, 李钧

(哈尔滨商业大学, 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:**目的 从细胞水平上研究虾青素对丙烯酰胺所致海马神经细胞损伤恢复的影响。方法 通过 B<sub>27</sub> 无血清培养法进行 SD 乳鼠的大脑海马神经细胞的分离、培养及其鉴定; MTT 法检测细胞存活率, 比色法测定细胞内抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 的活性, 线粒体的 MDA 及 NO 的含量。结果 虾青素能提高丙烯酰胺损伤过的海马神经细胞的存活率, 提高了丙烯酰胺损伤后细胞 SOD、CAT 活性、GSH-Px 的活力, 并降低了细胞线粒体中的 MDA 和 NO 的含量。结论 虾青素对丙烯酰胺造成的高海马神经细胞损伤有促进恢复的作用。

**关键词:** 虾青素; 丙烯酰胺; 海马神经细胞; 氧化损伤

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2015)03-009-05

## Astaxanthin promotes acrylamide-damaged hippocampal neurons to restore damage

CAO Xiu-ming, FAN Yu, QI Xiao-qian, SONG Dong-xue, LI Jun

(Research Centre of Life Sciences and Environment Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Astaxanthin on the acrylamide-damaged hippocampal neurons. **Methods** The hippocampal neuron isolated from SD neonatal rats, cultured by B<sub>27</sub> serum-free medium and identified by NSE immunohistochemistry assay. MTT assay was used to examine the cell viability. The activity of SOD, CAT, GSH-Px was determined with Colorimetric methods as well as the content of MDA and NO of chondriosome in the hippocampal neuron. **Results** Astaxanthin improved the cell viability of acrylamide-damaged hippocampal neurons, and the activity of SOD, CAT and GSH-Px as well as reduced the content of MDA and NO of chondriosome. **Conclusion** astaxanthin promoted acrylamide-damaged hippocampal neurons to restore damage.

**Key words:** Astaxanthin; acrylamide; hippocampal neurons; oxidative damage

丙烯酰胺(Acrylamide, ACR)为常见的化工原料之一,是医药、涂料及染料等生产过程的中间体,并在工业及科研中得到了广泛的应用<sup>[1]</sup>。ACR 丙烯酰胺具有中等毒性,其中毒现象主要表现在对神经系统的毒害,是 1 种蓄积性的神经毒

物。不少文献表明,人接触丙烯酰胺会对中枢及周围神经均造成损害。丙烯酰胺对中枢神经系统的损伤主要表现在运动失调、颤抖、中脑损伤及大脑皮质功能受损等方面,进而引起嗜睡、平衡发生紊乱、幻觉及混合性记忆丧失<sup>[2-3]</sup>。其神经损伤机

\* △基金项目:黑龙江省教育厅科研项目(12541197)资助

作者简介:曹秀明(1964-),女,博士,副研究员。Tel.:13936245746 E-mail:caoxiuming\_smx@163.com

收稿日期:2015-01-04

制可能是由于其对神经系统具有氧化损伤作用<sup>[4-5]</sup>。前期研究表明虾青素对活性氧所致的细胞膜,线粒体的损伤有保护作用<sup>[6-7]</sup>,本实验探讨了虾青素对丙烯酰胺损伤的海马神经细胞的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器

新生 1-3 d SD 大鼠,雌雄兼用,由哈尔滨医科大学动物中心提供。

胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),DMEM 培养基(HyClone 公司),胰蛋白酶(Invitrogen 公司),NSE 免疫组化试剂盒(南京建成生物工程研究所),阿糖胞苷(Sigma 公司),B<sub>27</sub>(GIBCO 公司),多聚赖氨酸(Sigma 公司),D-Hanks 缓冲液(上海研卉生物科技有限公司)。IP 细胞裂解液(碧云天公司)。超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒,过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒,谷胱甘肽过氧化物酶(GXH-Px)测定试剂盒,线粒体提取试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

DL-CJ-1N 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司),CO-150 CO<sub>2</sub> 培养箱(SANYO 公司 JAPAN),CKX 41 倒置显微镜(OLYMPUS 公司,JAPAN),Anke TDL80-2B 离心机(上海安亭科学仪器厂),Model 680 酶标仪(美国 BIO RAD 公司)。

### 1.2 海马神经细胞的分离、培养与鉴定

采用微孔滤膜除菌的 0.1 g/L 多聚氨基酸包被 6 孔培养板,待用。选取 SD 新生乳鼠 4 只,浸泡在 75% 的酒精中 5 min 后,取出脱脂棉擦干体表酒精,用剪刀剪开皮肤和颅骨取全脑,用 D-Hanks 缓冲液冲洗组织 3 次。沿着脑中线将大脑皮层拨开,使海马组织暴露,准确取出海马组织并将其置于冰 D-Hanks 溶液中,仔细剔除血管和脑膜,并将海马组织剪碎。加入 0.25% 的胰酶,置于 37 °C 培养箱中进行消化,消化时间为 10 min,消化期间 5 min 轻轻摇晃 1 次;消化后加入含 10% 血清的 DMEM 培养基终止消化。用吸管轻轻吹打细胞数次,200 目筛网过滤,1 000 r/min 离心 4 min,弃上清,收集细胞,加入含 10% 血清的 DMEM 培养基,轻轻吹打制成单细胞悬液,细胞悬液浓度调整至 1×10<sup>6</sup>/mL,按 2 mL/孔接种于 6 孔板中,置于

37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。培养 12 h 后观察,细胞贴壁有明显突起后可以更换培养基,采用含有 2% B<sub>27</sub> 的 DMEM 培养基(不含血清)继续培养 3 d,换无血清 DMEM 培养基(含有 2% B<sub>27</sub> 和 10 μmol/L 阿糖胞苷)进行培养,以后每隔 3 d 进行 1 次换液,海马神经细胞培养至 7 d 时供实验使用。对培养 7 d 的海马神经细胞采用神经元特异烯醇化酶抗体(NSE)染色法进行鉴定。染色过程按照 NSE 鉴定试剂盒的说明进行,倒置显微镜下进行观察和照相。

### 1.3 虾青素对丙烯酰胺所致海马神经细胞生存能力损伤的保护作用

实验分为 5 组:对照组(control 组)、丙烯酰胺组(ACR 组)、虾青素组(终浓度分别为 1.0×10<sup>-5</sup>、1.0×10<sup>-6</sup>和 1.0×10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>,AST 组)。对照组加入无血清培养液(含有 2% B<sub>27</sub> 和 10 μmol/L 阿糖胞苷)培养 48 h;丙烯酰胺组加入含 8.0×10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的丙烯酰胺培养基培养细胞 24 h,弃去含有丙烯酰胺的培养液,使用无血清培养液(含有 2% B<sub>27</sub> 和 10 μmol/L 阿糖胞苷)培养细胞 24 h;虾青素低、中、高组细胞加入含 8.0×10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的丙烯酰胺培养液培养细胞 24 h,弃去丙烯酰胺培养液,分别使用虾青素终浓度为 1.0×10<sup>-5</sup>、1.0×10<sup>-6</sup>、1.0×10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> 无血清培养液(含有 2% B<sub>27</sub> 和 10 μmol/L 阿糖胞苷)培养细胞 24 h。

每组 6 个平行孔,处理时间终止时,弃去上清液,每孔加入 100 μL 新鲜配制的含有 0.5 mg/mL MTT 培养液培养细胞 4 h,弃上清,每孔加入 200 μL DMSO,置于微型振荡器上振荡 15 min,使用酶标仪在波长 570 nm 处进行光密度值的测定,按照如下公式进行海马神经细胞存活率的计算:细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

### 1.4 虾青素对丙烯酰胺作用下海马神经细胞抗氧化酶系统的保护作用

虾青素对 SOD, CAT, GSH-Px 的活性的影响,测定方法严格按照试剂盒说明书操作。

### 1.5 虾青素对海马神经细胞线粒体的保护作用

用培养 7 d 的海马神经细胞按着试剂盒的方法提取线粒体,用生理盐水制线粒体混悬液,考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白含量。按 1.3 分组方法进行实验分组,96 孔板每孔加入 100 μL 线粒

体悬液,每个实验组设 3 个平行孔,(1)对照组:加入 50  $\mu\text{L}$  生理盐水。(2)丙烯酰胺组:加入 50  $\mu\text{L}$  丙烯酰胺溶液使其终浓度为  $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的。(3)虾青素组:线粒体混悬液中加入高、中、低剂量的虾青素溶液 50  $\mu\text{L}$ ,使其终浓度分别为  $1.0 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times 10^{-6}$ 、 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和终浓度为  $8.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯酰胺溶液。各实验组在  $37^\circ\text{C}$  水浴震荡温浴 1 h。于 96 孔细胞培养板中每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT(终浓度为 5 g/L),  $37^\circ\text{C}$  孵育 4 h,吸取培养上清液,每孔加 100  $\mu\text{L}$  DMSO,振荡 10 min,酶标仪 570 nm 处测定 OD 值,其值即代表海马神经细胞线粒体的活性。

### 1.6 对海马神经细胞线粒体 MDA, NO 含量的

影响

线粒体制备见方法按 1.5 进行。测定方法严格按照 MDA 和 NO 试剂盒说明书操作。

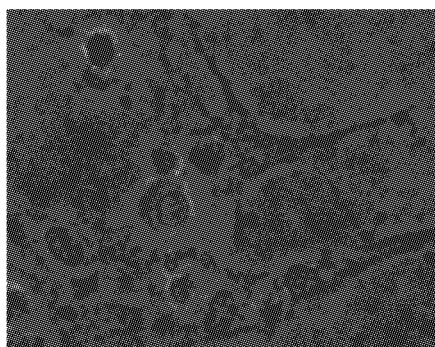
### 1.7 数据处理

对所有数据采用 SPSS17.0 统计软件进行方差分析,各数据均使用均数士标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )来表示。

## 2 结果

### 2.1 海马神经细胞的鉴定结果

经 NSE 免疫组化鉴定显示,所培养的海马神经细胞呈棕色阳性染色,而未加一抗的神经细胞并未呈阳性反应,表明原代培养的细胞为神经细胞。



a 对照组(未加一抗)海马神经细胞  
a Hippocampal neurons were identified using immunohistochemistry without primary antibody



b 免疫组化染色的海马神经细胞  
b Hippocampal neurons were identified using immunohistochemistry

图 1 海马神经细胞细胞的鉴定结果( $\times 200$ )

Fig. 1 Identification of hippocampal neurons ( $\times 200$ )

### 2.2 虾青素对海马神经细胞存活率的影响

结果如 Fig1 所示,ACR 组的海马神经细胞存活率明显降低,同对照组相比具有显著差异( $P < 0.01$ ),而虾青素高、中剂量组( $1.0 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times$

$10^{-6} \text{ mol/L}$ )细胞存活率较 ACR 组明显升高( $P < 0.01$ )。同对照组相比,虾青素高剂量组( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ )海马神经细胞的存活率也有升高( $P < 0.05$ )。

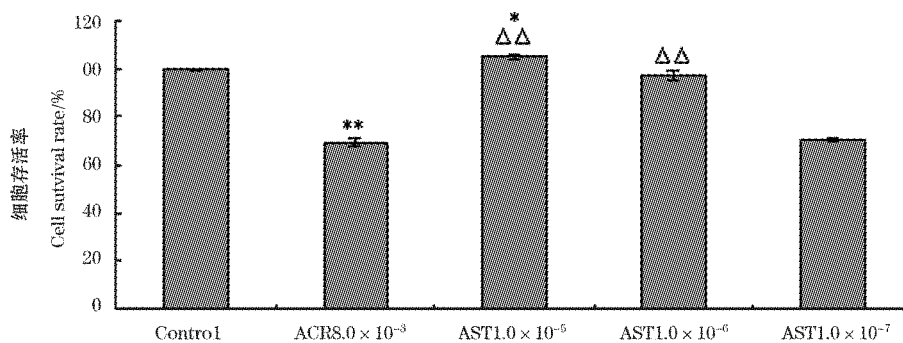


图 2 虾青素对 ACR 作用下海马神经细胞存活率的影响

Fig. 2 The effect of Astaxanthin on cell survival rate exposed to ACR

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control; △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$  vs ACR

2.3 虾青素对丙烯酰胺作用下海马神经细胞抗氧化酶系统的保护作用

结果如图 3 所示,同对照组比较,ACR 损伤组海马神经细胞的 GSH-Px, SOD 和 CAT 的活性

非常显著地降低( $P < 0.01$  vs Control)。同 ACR 损伤组相比,AST 高、中剂量组( $1.0 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )细胞 GSH-Px, SOD 和 CAT 活性显著提高( $P < 0.01$ ),

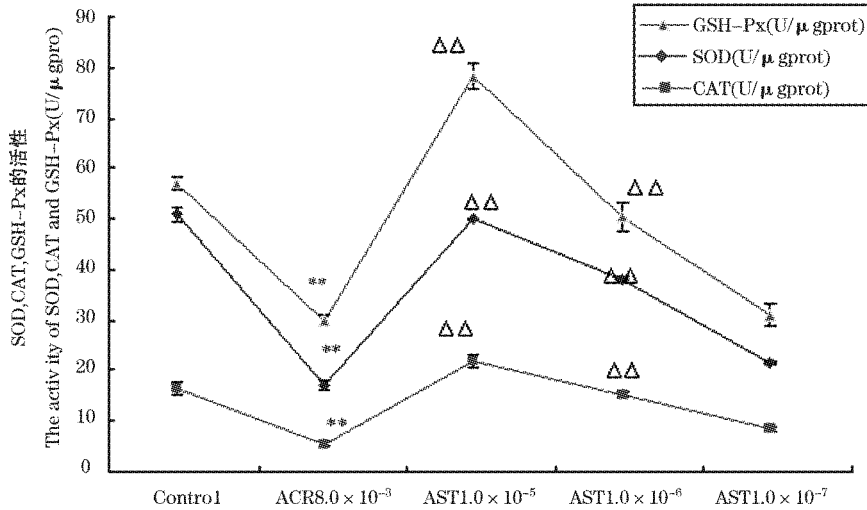


图 3 虾青素对丙烯酰胺损伤的海马神经细胞 SOD, CAT 和 GSH-Px 的活性的影响  
Fig. 3 The effects of Astaxanthin on activities of SOD, CAT and GSH-Px of hippocampal neurons damaged by ACR  
注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs ACR.

2.4 虾青素对海马神经细胞线粒体的保护作用

虾青素对海马神经细胞线粒体活性的影响见表 1, ACR 损伤造成线粒体活性与对照组相比显著下降( $P < 0.01$  vs Control), 虾青素高、中剂量组可以非常显著地提高线粒体活性( $P < 0.01$  vs ACR), 低剂量组可以显著提高线粒体的活性。

虾青素对海马神经细胞线粒体 MDA, NO 含量的影响结果见表 2, 同对照组相比, 经 ACR 损伤后海马神经细胞线粒体的 MDA 含量明显增加( $P < 0.01$  vs Control; )。虾青素高、中、低剂量组( $1.0 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times 10^{-6}$ 、 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ )线粒体 MDA 含量均非常显著降低( $P < 0.01$  vs ACR)。线粒体 NO 含量也由于 ACR 损伤而呈现非常显著地升高( $P < 0.01$  vs Control)。虾青素高、中剂

量组的线粒体 NO 含量则非常显著地下降( $P < 0.01$  vs ACR)。低剂量组也可以显著降低 NO 的含量( $P < 0.05$  vs ACR)

表 1 虾青素对丙烯酰胺损伤的线粒体的活性的影响  
Table 1 The effect of Astaxanthin on the activity of mitochondria damaged by ACR ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Group	Dose/mol · L <sup>-1</sup>	Mitochondrial activity
Control	—	0.687 ± 0.001
ACR	$8.0 \times 10^{-3}$	0.471 ± 0.016**
AST	$1.0 \times 10^{-5}$	0.700 ± 0.001 $\Delta\Delta$
AST	$1.0 \times 10^{-6}$	0.673 ± 0.014 $\Delta\Delta$
AST	$1.0 \times 10^{-7}$	0.492 ± 0.021 $\Delta$

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs ACR.

表 2 虾青素对丙烯酰胺损伤的线粒体 MDA 和 NO 含量的影响

Table 2 The effect of Astaxanthin on content of MDA and NO of mitochondria damaged by ACR ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Group	Dose/mol · L <sup>-1</sup>	MDA/nmol · μg <sup>-1</sup> prot	NO/μmol · μg <sup>-1</sup> prot
Control	—	3.080 ± 0.290	1.591 ± 0.123
ACR	$8.0 \times 10^{-3}$	8.160 ± 0.156**	6.333 ± 0.091**
AST	$1.0 \times 10^{-5}$	3.271 ± 0.291 $\Delta\Delta$	1.676 ± 0.269 $\Delta\Delta$
AST	$1.0 \times 10^{-6}$	4.234 ± 0.201 $\Delta\Delta$	3.234 ± 0.273 $\Delta\Delta$
AST	$1.0 \times 10^{-7}$	6.264 ± 0.13 $\Delta\Delta$	5.908 ± 0.162 $\Delta$

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs ACR.

### 3 讨论

日常生活中,丙烯酰胺主要是通过职业暴露、摄入高温、油炸及烘烤类食物而进入人体内<sup>[8-9]</sup>。除此以外,普通人群还可以通过饮用受到 ACR 污染的水,抽烟等途径摄入 ACR。大脑海马区主要参与大脑的记忆,是老年痴呆及帕金森等多种疾病的主要发生区<sup>[9]</sup>。实验证明丙烯酰胺可以造成海马神经细胞的氧化损伤表现在细胞成活率下降,细胞内的抗氧化酶超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性下降,还能损伤细胞的线粒体活性并增加 MDA 和 NO 含量<sup>[6]</sup>。

超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT 与谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px,是机体及细胞中十分重要的抗氧化酶系,其不仅可以清除自由基、降低细胞中过氧化物含量,还可以对抗自由基所引起的细胞以及机体的氧化损伤,避免细胞及机体中过氧化物的进一步蓄积。实验表明虾青素可以修复丙烯酰胺损伤引起的海马神经细胞抗氧化酶的活性,也再 1 次证明虾青素确实是 1 种有效的抗氧化成分。一定剂量的虾青素可以使 ACR 损伤后的海马神经细胞的抗氧化酶活力及存活率恢复至正常组水平。高剂量组虾青素作用后的细胞存活率和抗氧化酶的活力甚至高于对照组,可能是由于过量虾青素的作用进一步提高了已经恢复了正常抗氧化水平的细胞的抗氧化酶的活性,从而提高了细胞的存活能力。

作为真核细胞中的膜性细胞器之一,线粒体不仅是合成 ATP、调节细胞氧化及还原信号、控制细胞基因表达等许多重要功能的场所,还是活性氧(ROS)的产生场所,因此,细胞线粒体对于细胞的生长、衰老、死亡等多个方面均具有重要的影响。研究线粒体的损伤及保护对于预防许多退行性疾病、衰老和心血管疾病具有重要的意义。MDA 是线粒体膜脂质过氧化的最终分解产物,因此,其含量多少可以间接反映细胞线粒体受自由基攻击的严重程度。此外,线粒体内 NO 水平也间接反映了

线粒体的受损程度。通过对线粒体活性、线粒体中 MDA 及 NO 含量进行检测发现,一定剂量的虾青素可以恢复 ACR 引起的海马神经细胞的线粒体活性下降,并恢复受损线粒体内的 MDA 及 NO 水平,表明丙烯酰胺对海马神经细胞的线粒体造成了氧化损伤,而虾青素可以修复这种损伤,机制可能同其抗氧化活性有关。

综上所述,虾青素对丙烯酰胺所致海马神经细胞的损伤具有保护作用,不仅可以修复海马神经细胞的形态损伤,恢复海马神经细胞的抗氧化能力,还可以缓解线粒体膜脂质过氧化程度,对 ACR 引起的海马神经细胞及其线粒体的氧化损伤具有修复作用。

### 参考文献

- [1] 张雁林,赵金恒,徐希娴,等. 丙烯酰胺的毒性研究进展[J]. 中国工业医学杂志,2014,27(5): 353-356.
- [2] 王超,王声远,王玥,等. 丙烯酰胺接触工人职业健康的影响因素分析[J]. 职业卫生与应急救援,2014,32(5):261-264.
- [3] 郭灿烂,李斌,肖经纬. 丙烯酰胺神经毒性机制研究概况[J]. 卫生研究,2010,39(3):282-285.
- [4] 石晶,张德兴,贺新红,等. 丙烯酰胺神经毒性的研究进展[J]. 解剖学研究,2009,31(4):287-290.
- [5] 李闪霞,姜红芹,崔宁,等. 丙烯酰胺对大鼠大脑皮质神经细胞退变 bcl-2 及 ba x 表达的影响[J]. 毒理学杂志,2008,22(1): 31-32.
- [6] 曹秀明,杨贵群,杨菲菲. 虾青素对过氧化氢所致 HepG2 细胞线粒体氧化损伤及生存能力下降的保护作用[J]. 中国海洋药物,2010,29(5):26-32.
- [7] 曹秀明,王宗利,杨贵群. 虾青素对过氧化氢所致质膜氧化损伤的保护作用[J]. 中国海洋药物,2009,28(5):44-50.
- [8] Rosen J, Heilenas K E. Analysis acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Analyst*,2002,127: 880-882.
- [9] TarekeE,RydbergP, Karlsson S, et al. Acrylamide: A cooking careinogen[J]. *Chem Res Toxicol*,2000,13:517-522.
- [10] 赵保路. 自由基、天然抗氧化剂与神经退行性疾病生物物理学报[J]. 2010, 26(4):263-274.