

文章编号: 2095-9982(2018)04-0323-07

中图分类号: R114

文献标志码: A

【专栏: 萍并[a]芘的毒性效应】

## 萍并[a]芘对人神经母细胞瘤细胞能量代谢的影响

成丽霞<sup>1a</sup>, 班红芳<sup>1a</sup>, 吕懿<sup>1a</sup>, 王丹<sup>1a</sup>, 曹彬<sup>1a</sup>, 穆箭兵<sup>1b, 2</sup>, 郑金平<sup>1a</sup>**摘要:**

[目的] 研究萍并[a]芘(BaP)对人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞能量代谢的影响, 进一步探讨BaP的神经毒性。

[方法] 不同浓度BaP染毒SH-SY5Y细胞24 h, 采用MTT法检测细胞活力; 细胞丙二醛(MDA)测定试剂盒测定细胞内MDA含量; 超氧化物歧化酶(SOD)分型测试盒测定细胞内Mn-SOD含量; Seahorse XFp细胞能量分析仪检测细胞耗氧率(OCR)及胞外酸化率(ECAR)。

[结果] 随着BaP染毒浓度的增大, 细胞活力明显下降( $P_{\text{趋势}}<0.01$ ); 随着BaP染毒浓度的增大, 细胞内MDA水平升高( $P_{\text{趋势}}<0.01$ ), Mn-SOD水平降低( $P_{\text{趋势}}<0.01$ ), 1.0、10.0、100.0 μmol/L BaP组细胞内MDA含量明显高于对照组, Mn-SOD含量明显低于对照组( $P<0.05$ ); 随着BaP染毒浓度的增大, 细胞的基础有氧呼吸、ATP偶联有氧呼吸速率、有氧呼吸最大值、糖酵解水平、糖酵解最大值及糖酵解储备值均呈下降趋势( $P_{\text{趋势}}<0.01$ ), 各浓度组基础有氧呼吸、ATP偶联有氧呼吸速率明显低于对照组( $P<0.05$ ); 10.0、100.0 μmol/L BaP组有氧呼吸最大值、有氧呼吸储备值、糖酵解水平、糖酵解最大值及糖酵解储备值明显低于对照组( $P<0.05$ )。不同浓度BaP处理组MTT光密度值及Mn-SOD含量与基础有氧呼吸、ATP偶联有氧呼吸速率、有氧呼吸最大值、有氧呼吸储备值、糖酵解水平、糖酵解最大值及糖酵解储备值均呈正相关( $P<0.05$ ), 细胞内MDA含量与各细胞生物能量参数均呈负相关( $P<0.05$ )。

[结论] BaP造成SH-SY5Y细胞氧化损伤, 降低线粒体呼吸功能, 较高浓度时损伤有氧呼吸储备能力及糖酵解功能。

**关键词:** 萍并[a]芘; 人神经母细胞瘤细胞; 线粒体呼吸; 糖酵解; 能量代谢

**引用:** 成丽霞, 班红芳, 吕懿, 等. 萍并[a]芘对人神经母细胞瘤细胞能量代谢的影响[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(4): 323-329.

**DOI:** 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17607

**Effects of benzo[a]pyrene on energy metabolism in human neuroblastoma cells CHENG Li-xia<sup>1a</sup>, BAN Hong-fang<sup>1a</sup>, LÜ Yí<sup>1a</sup>, WANG Dan<sup>1a</sup>, CAO Bin<sup>1a</sup>, MU Jian-bing<sup>1b, 2</sup>, ZHENG Jin-ping<sup>1a</sup>(1.a. Department of Toxicology, School of Public Health b. School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland MD 20892-8132, USA). Address correspondence to ZHENG Jin-ping, E-mail: zheng\_jp@sxmu.edu.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.**

**Abstract:**

[Objective] To study the effect of benzo[a]pyrene (BaP) on energy metabolism of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and further explore the potential neurotoxicity of BaP.

[Methods] SH-SY5Y cells were exposed to different concentrations of BaP for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Malondialdehyde (MDA) content was measured by MDA assay kit, manganese (Mn)-superoxide dismutase (SOD) content by SOD typing test kit, and cell oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) by Seahorse XFp cell energy analyzer.

[Results] As the concentration of BaP increased, the cell viability decreased ( $P_{\text{trend}}<0.01$ ), the intracellular MDA level increased ( $P_{\text{trend}}<0.01$ ), and the Mn-SOD level decreased ( $P_{\text{trend}}<0.01$ ). The cells treated with 1.0, 10.0, and 100.0 μmol/L BaP showed significantly higher MDA levels and significantly lower Mn-SOD levels than the control cells ( $P<0.05$ ). As the concentration of BaP increased, the basal OCR, ATP-linked OCR, maximal respiration, glycolysis, glycolytic capacity, and glycolytic reserve displayed a downward trend ( $P_{\text{trend}}<0.01$ ), the basal OCR and ATP-linked OCR of the exposed groups were significantly lower than those of

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 30872137); 山西省优势和特色重点学科建设经费(无编号)

[作者简介] 成丽霞(1992—), 女, 硕士生; 研究方向: 卫生毒理学; E-mail: 892649080@qq.com

[通信作者] 郑金平, E-mail: zheng\_jp@sxmu.edu.com

[作者单位] 1.山西医科大学 a.公共卫生学院卫生毒理学教研室 b.基础医学院, 山西 太原 030001; 2.美国国立卫生研究院, 马里兰州 贝塞斯达 MD 20892-8132

the control group ( $P < 0.05$ ), and the maximal respiration, spare respiratory capacity, glycolysis, glycolytic capacity, and glycolytic reserve of the 10.0 and 100.0  $\mu\text{mol/L}$  BaP groups were significantly lower than those of the control group ( $P < 0.05$ ). Optical density of MTT and Mn-SOD level of the BaP exposed groups were positively correlated with basal OCR, ATP-linked OCR, maximal respiration, spare respiratory capacity, glycolysis, glycolytic capacity, and glycolytic reserve ( $P < 0.05$ ). Intracellular MDA level was negatively correlated with various cellular bioenergy indicators ( $P < 0.05$ ).

[Conclusion] BaP can cause oxidative damage in SH-SY5Y cells, reduce mitochondrial respiratory function, and impair the spare respiratory capacity and glycolytic function of SH-SY5Y cells at higher concentrations.

**Keywords:** benzo[*a*]pyrene; human neuroblastoma cell; mitochondrial respiratory; glycolysis; energy metabolism

**Citation:** CHENG Li-xia, BAN Hong-fang, LÜ Yi, et al. Effects of benzo[*a*]pyrene on energy metabolism in human neuroblastoma cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(4): 323-329. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17607

苯并[*a*]芘(benzo[*a*]pyrene, BaP)是最常见的环境职业污染物, 主要来源于化石燃料和植物/木材的不完全燃烧<sup>[1]</sup>。BaP的致癌性已受到广泛关注<sup>[2]</sup>, 近年国内外学者发现BaP具有神经毒性和神经发育毒性, 可引起暴露人群的认知功能障碍及学习记忆能力损伤<sup>[3-4]</sup>。BaP在体内的代谢活化过程中会产生大量的活性氧(ROS)<sup>[5]</sup>, ROS主要攻击线粒体的主要靶标, 导致线粒体功能异常, 细胞能量代谢紊乱<sup>[6]</sup>。神经细胞对氧和能量供应失调异常敏感, 因此BaP对神经细胞能量代谢的影响可能是BaP神经毒作用的一个重要机制。

Seahorse XFp细胞能量分析仪可实时监测细胞耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)和胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR), 检测灵敏度高, 可准确反映细胞能量代谢情况。

本研究利用Seahorse XFp细胞能量分析仪检测BaP染毒后人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞能量代谢情况, 进一步探讨BaP的神经毒作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

CK40倒置显微镜(OLYMPUS, 日本), 3100 CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Forma, 美国), DNM-9602G酶标分析仪(北京普朗新公司, 中国), Seahorse XFp细胞能量分析仪(Seahorse, 美国)。

BaP(Sigma, 美国), 特级Procell血清、MEM/F12(武汉普赛诺公司, 中国), 青链霉素混合液(北京索莱宝公司, 中国), 大鼠肝S9(Thermo Forma, 美国), MTT试剂盒、细胞丙二醛(MDA)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)分型测试盒(南京建成生物工程研究所, 中国), XFp线粒体压力测试盒、XFp糖酵解压力测试盒、XFp探针板、XFp 8板(Seahorse, 美国)。

## 1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y细胞培养 从武汉普赛诺公司购入SH-SY5Y细胞, MEM/F12培养液(加10%Procell血清、1%双抗)置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的孵箱中培养, 培养3~4 d以1:2进行传代, 根据实验要求以合适浓度将细胞接种于96孔板/6孔板, 待细胞进入对数生长期, 融合度达到80%~85%, 进行实验。

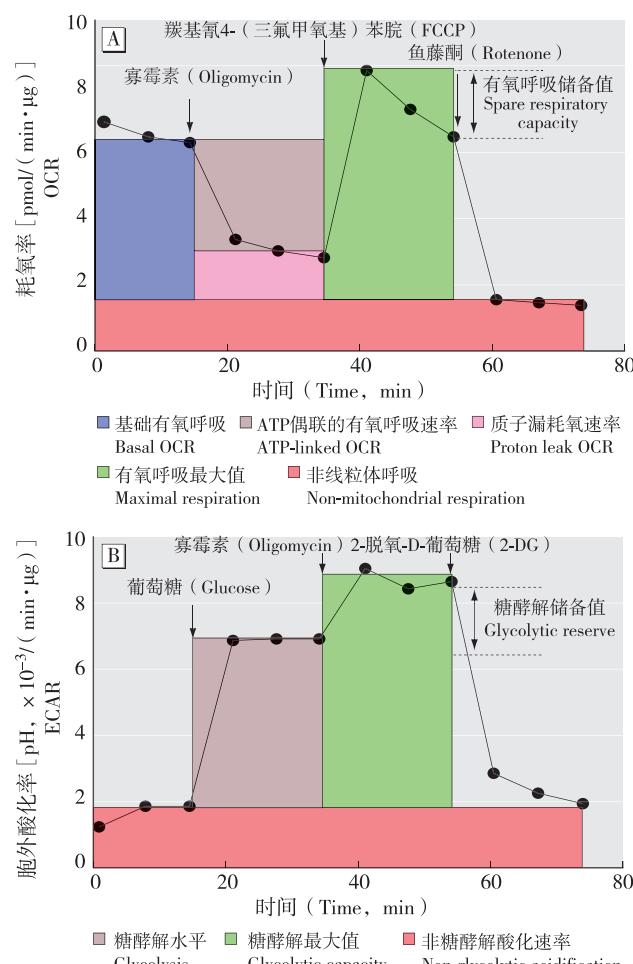
1.2.2 MTT法检测细胞活力 将浓度为5×10<sup>5</sup>个/mL的SH-SY5Y细胞悬液接种于96孔板中, 待细胞进入对数生长期, 以BaP+S9-mix(占总体积的3%)染毒细胞, 使BaP的终浓度为0.0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$ , 染毒24 h后, 弃去旧培养液, 加入含5 mg/mL MTT溶液的MEM/F12培养液150  $\mu\text{L}$ , 包上锡箔纸, 37℃、5%CO<sub>2</sub>培养4 h, 每孔加150  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡10 min, 用酶标仪在570 nm波长检测各孔光密度值( $D$ ), 设置5个平行样, 计算平均值, 细胞存活率=[( $D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}$ )/( $D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}$ )]×100%。

1.2.3 SH-SY5Y细胞内MDA及锰(Mn)-SOD含量测定 将细胞以1×10<sup>6</sup>/mL浓度接种于6孔板中, 待细胞进入对数生长期, 以BaP+S9-mix(占总体积的3%)染毒细胞, 使BaP的终浓度为0.0、0.1、1.0、10.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$ , 染毒24 h后, 严格按照试剂盒说明书分别测定细胞内MDA及Mn-SOD含量(均以每mg蛋白计), 酶标仪检测各个浓度光密度值, 设置3个平行样。

1.2.4 Seahorse XFp细胞能量分析仪检测细胞能量代谢情况 将细胞以50 000/孔浓度接种到XF8板, 待细胞进入对数生长期, 以BaP+S9-mix(占总体积的3%)染毒细胞, 使BaP的终浓度为0.0、0.1、1.0、10.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$ , 染毒24 h后, 弃去旧培养液, 严格按照制造商说明书测量OCR和ECAR。检测结束后, BCA法测定每孔蛋白浓度, 以消除铺板过程及各浓度组细胞生存率不同带来的误差。

线粒体压力测试旨在评估线粒体有氧呼吸能力, 经过一段时间的基础读数后, 将用于估计生物能量功能的化合物依次加入XF8板。寡霉素抑制腺苷三磷酸(ATP)合成酶, 用于确定ATP偶联的有氧呼吸速率; 琥基氯4-(三氟甲氧基)苯酰(FCCP)是一种质子解偶联剂, 使细胞耗氧量达到最大, 用于确定有氧呼吸最大值; 鱼藤酮抑制烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶, 可明显抑制线粒体呼吸, 用于确定非线粒体呼吸。然后通过这些重要参数来计算线粒体的有氧呼吸储备值(有氧呼吸最大值-基础有氧呼吸)及质子漏耗氧速率(基础有氧呼吸-ATP偶联的有氧呼吸速率)<sup>[7-9]</sup>, 见图1A所示。

糖酵解压力测试旨在评估细胞糖酵解功能, 加入葡萄糖用于确定饱和状态下糖酵解水平, 加入寡霉素抑制线粒体呼吸, 用于确定糖酵解最大值<sup>[7-10]</sup>。通过这些参数来计算糖酵解储备值(糖酵解最大值-糖酵解水平)<sup>[7]</sup>, 见图1B所示。



[注]A: 线粒体压力测试曲线; B: 糖酵解压力测试曲线。

[Note] A: The curve of cell mito stress test; B: The curve of glycolysis stress test.

图1 XF压力测试曲线

Figure 1 The curves of XF stress tests

1.2.5 统计学分析 用SPSS 13.0软件对数据进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD法, 趋势检验采用线性回归分析, Pearson相关分析相关关系。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 BaP对SH-SY5Y细胞活性的影响

BaP染毒细胞24 h后, 0.0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μmol/L组细胞相对存活率分别为100.0%、90.5%、88.6%、70.1%、71.6%、63.5%、65.9%和50.7%。0.1、0.5 μmol/L组细胞活力未受到明显影响, 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μmol/L组与对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 其效应呈剂量依赖性( $P_{\text{趋势}}<0.001$ ), 半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为100 μmol/L, 见表1。根据MTT试验结果筛选0.0、0.1、1.0、10.0、100.0 μmol/L进行后续实验。

表1 不同浓度BaP处理组细胞存活率( $n=5$ )

Table 1 Survival rates of SH-SY5Y cells treated with designed concentrations of BaP

BaP浓度(μmol/L) BaP concentration	光密度值( $\bar{x} \pm s$ ) <i>D</i>	细胞相对存活率(%) Cell relative survival rate
0.0	0.211 ± 0.02	100.0
0.1	0.191 ± 0.04	90.5
0.5	0.187 ± 0.02	88.6
1.0	0.148 ± 0.03**#	70.1
5.0	0.151 ± 0.02**#	71.6
10.0	0.134 ± 0.01**#	63.5
50.0	0.139 ± 0.02**#	65.9
100.0	0.107 ± 0.01**#○□	50.7
$P_{\text{趋势}}(P_{\text{trend}})$	0.000	—

[注]\*: 与对照组相比,  $P<0.05$ ; #: 与0.1 μmol/L组相比,  $P<0.05$ ; ○: 与1.0 μmol/L组相比,  $P<0.05$ ; □: 与10.0 μmol/L组相比,  $P<0.05$ 。

[Note]\*: Compared with the control group,  $P<0.05$ ; #: Compared with the 0.1 μmol/L group,  $P<0.05$ ; ○: Compared with the 1.0 μmol/L group,  $P<0.05$ ; □: Compared with the 10.0 μmol/L group,  $P<0.05$ .

### 2.2 BaP对细胞内MDA及Mn-SOD含量的影响

BaP染毒细胞24 h后, 细胞内MDA含量随染毒浓度的增加而增加( $P_{\text{趋势}}<0.01$ ), Mn-SOD含量随染毒浓度的增加而减少( $P_{\text{趋势}}<0.01$ ), 其中0.1 μmol/L与对照组相比差异无统计学意义( $P<0.05$ ); 1.0、10.0、100.0 μmol/L组与对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表2。

**表2 不同浓度BaP处理组细胞MDA及Mn-SOD水平**  
( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 2 MDA and Mn-SOD levels of SH-SY5Y cells treated with designed concentrations of BaP

BaP浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) BaP concentration	MDA含量( $\mu\text{mol/g}$ ) MDA level	Mn-SOD含量( $\times 10^3\text{U/g}$ ) Mn-SOD level
0.0	0.12 ± 0.05	47.37 ± 7.00
0.1	0.16 ± 0.05	45.52 ± 3.68
1.0	0.59 ± 0.04 <sup>*#</sup>	35.97 ± 6.64 <sup>*#</sup>
10.0	0.92 ± 0.04 <sup>*#○</sup>	25.95 ± 2.12 <sup>*#○</sup>
100.0	0.98 ± 0.04 <sup>*#○</sup>	19.84 ± 2.22 <sup>*#○</sup>
P趋势( $P_{\text{trend}}$ )	0.000	0.000

[注]\*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; #: 与0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,  $P < 0.05$ ; ○: 与1.0  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,  $P < 0.05$ 。

[Note]\*: Compared with the control group,  $P < 0.05$ ; #: Compared with the 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group,  $P < 0.05$ ; ○: Compared with the 1.0  $\mu\text{mol/L}$  group,  $P < 0.05$ .

### 2.3 BaP对细胞能量代谢的影响

线粒体压力测试结果显示: 各染毒组细胞基础有氧呼吸、ATP偶联的有氧呼吸速率与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且随着染毒浓度升高呈现下降趋势( $P_{\text{trend}} < 0.01$ ); 质子漏耗氧速率各染毒浓度间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 10.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$ 组有氧呼吸最大值及储备值与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图2A、表3。

糖酵解压力测试结果显示: 10.0、100.0  $\mu\text{mol/L}$ 组糖酵解水平、糖酵解最大值及储备值与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且均随着染毒浓度升高呈现下降趋势( $P < 0.01$ )。见图2B、表3。

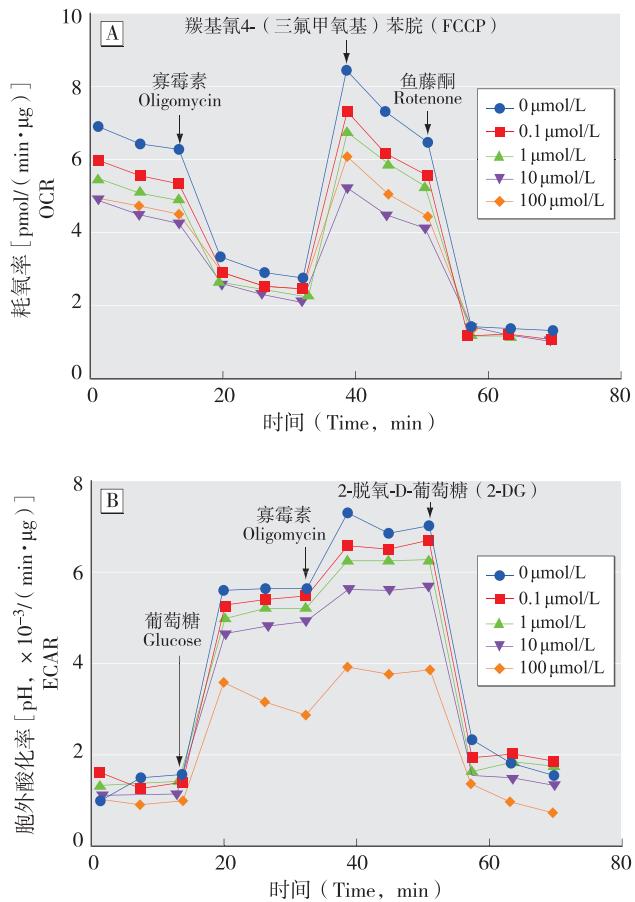
**表3 不同浓度BaP处理组细胞线粒体呼吸功能和糖酵解功能水平**( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 3 Mitochondrial respiration and glycolysis levels of SH-SY5Y cells treated with designed concentrations of BaP

分组( $\mu\text{mol/L}$ ) Group	细胞线粒体呼吸功能 [ $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \mu\text{g})$ ] Mitochondrial respiration					糖酵解功能 [ $\text{pH}, \times 10^{-3}/(\text{min} \cdot \mu\text{g})$ ] Glycolysis		
	基础有氧呼吸 Basal OCR	ATP偶联的有氧 呼吸速率 ATP-linked OCR	质子漏耗氧速率 Proton leak OCR	有氧呼吸最大值 Maximal respiration	有氧呼吸储备值 Spare respiratory capacity	糖酵解 Glycolysis	糖酵解最大值 Glycolytic capacity	糖酵解储备值 Glycolytic reserve
0.0	5.12 ± 0.24	3.53 ± 0.05	1.59 ± 0.19	5.95 ± 0.93	0.83 ± 0.07	4.10 ± 0.14	5.16 ± 0.13	1.05 ± 0.01
0.1	4.33 ± 0.23 <sup>*</sup>	2.98 ± 0.12 <sup>*</sup>	1.35 ± 0.12	5.05 ± 0.80	0.75 ± 0.03	3.92 ± 0.14	5.04 ± 0.25	1.12 ± 0.21
1.0	3.91 ± 0.25 <sup>*</sup>	2.59 ± 0.11 <sup>*#</sup>	1.33 ± 0.14	4.76 ± 0.75	0.85 ± 0.05	3.85 ± 0.11	4.89 ± 0.20	1.04 ± 0.11
10.0	3.30 ± 0.22 <sup>*#○</sup>	2.11 ± 0.11 <sup>*#○</sup>	1.20 ± 0.11	3.39 ± 0.44 <sup>*#</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>*#○</sup>	3.60 ± 0.11 <sup>*#</sup>	4.47 ± 0.16 <sup>*#</sup>	0.87 ± 0.05 <sup>#</sup>
100.0	3.39 ± 0.23 <sup>*#○</sup>	2.05 ± 0.09 <sup>*#○</sup>	1.34 ± 0.16	3.91 ± 0.80 <sup>*</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>*#○</sup>	2.18 ± 0.29 <sup>*#○</sup>	2.82 ± 0.21 <sup>*#○○</sup>	0.64 ± 0.10 <sup>*#○○</sup>
P趋势( $P_{\text{trend}}$ )	0.00	0.00	0.04	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00

[注]\*: 与对照组相比,  $P < 0.05$ ; #: 与0.1  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,  $P < 0.05$ ; ○: 与1.0  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,  $P < 0.05$ ; □: 与10.0  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,  $P < 0.05$ 。

[Note]\*: Compared with the control group,  $P < 0.05$ ; #: Compared with the 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group,  $P < 0.05$ ; ○: Compared with the 1.0  $\mu\text{mol/L}$  group,  $P < 0.05$ ; □: Compared with the 10.0  $\mu\text{mol/L}$  group,  $P < 0.05$ 。



[注]A: BaP染毒后线粒体压力测试曲线; B: BaP染毒后糖酵解压力测试曲线。

[Note] A: Curve of cell mito stress test of cells treated with different concentrations of BaP; B: Curve of glycolysis stress test of cells treated with different concentrations of BaP.

**图2 不同浓度BaP处理后SH-SY5Y细胞生物能量表型**

Figure 2 Bioenergy phenotypes of SH-SY5Y cells treated with designed concentrations of BaP

## 2.4 细胞内 MDA、Mn-SOD 含量及 MTT 光密度值与能量代谢各参数相关分析

采用 Pearson 相关的方法分别对细胞内 MDA、Mn-SOD 含量及 MTT 光密度值与能量代谢各参数进行相关分析,结果显示:MDA 含量与能量代谢各参数均呈负相关;MTT 光密度值及 Mn-SOD 含量与基础有氧呼吸、ATP 偶联的有氧呼吸速率、有氧呼吸最大值、有氧呼吸储备值、糖酵解水平、糖酵解最大值、糖酵解储备值均呈正相关,结果见表 4 所示。

**表 4 不同浓度 BaP 处理组细胞内 MDA、Mn-SOD 含量及 MTT 光密度值与能量代谢各参数的相关系数**

Table 4 The correlation coefficients of MDA level, Mn-SOD level, and MTT optical density with energy metabolism parameters of cells treated with designed concentrations of BaP

参数 (Parameter)	MTT	MDA	Mn-SOD
基础有氧呼吸 (Basal OCR)	0.840**	-0.901**	0.762**
ATP 偶联的有氧呼吸速率 (ATP-linked OCR)	0.890**	-0.948**	0.853**
质子漏耗氧速率 (Proton leak OCR)	0.483	-0.542*	0.292
有氧呼吸最大值 (Maximal respiration)	0.657**	-0.764**	0.556*
有氧呼吸储备值 (Spare respiratory capacity)	0.596**	-0.711**	0.626*
糖酵解水平 (Glycolysis)	0.643**	-0.734**	0.744**
糖酵解最大值 (Glycolytic capacity)	0.663**	-0.765**	0.773**
糖酵解储备值 (Glycolytic reserve)	0.626**	-0.752**	0.752**

[注]\*: P<0.05, \*\*: P<0.01。

[Note]\*: P<0.05, \*\*: P<0.01。

## 3 讨论

BaP 在细胞色素 P450 代谢酶 (CYPs) 的作用下活化为 7, 8-二羟-9, 10-环氧苯并[a]芘 (BPDE), 可穿透血脑屏障, 在中枢神经系统发挥毒性作用<sup>[11]</sup>。有研究表明 BaP 活化过程中会产生大量 ROS<sup>[5]</sup>, 降低机体抗氧化能力且抑制抗氧化酶活性, 诱导脑部区域产生氧化应激反应<sup>[12]</sup>。而线粒体作为供能中心, 是 ROS 损伤最敏感的靶器官, 线粒体呼吸链的损伤又导致 Ca<sup>2+</sup> 内流、氧自由基生成, 形成氧化应激增强的“恶性循环”<sup>[13-14]</sup>, 最终引起细胞凋亡<sup>[15]</sup>。中枢神经系统不仅受到化学物质的直接损害, 对能量供应失调也异常敏感。正常状态下, 神经细胞主要依靠线粒体有氧呼吸来进行能量供应<sup>[16]</sup>; 缺氧期间, 线粒体活性降低, 糖酵解成为其主要供能途径<sup>[17]</sup>。已有研究表明线粒体功能障碍和氧化应激对神经退行性疾病的发病起关键作用<sup>[18-19]</sup>。因此我们推测 BaP 可能引起神经细胞能量代谢紊乱。

SH-SY5Y 细胞衍生于人 SK-N-SH 细胞系亚克隆, 具有神经元形态及生理生化学特征, 广泛用于神经毒

作用机制的研究<sup>[20]</sup>。Seahorse XFp 细胞能量分析仪对功能细胞系进行无损检测, 可同时测量细胞内两条主要能量代谢通路——线粒体呼吸和糖酵解, 对完整描述细胞生理过程及病理状态至为关键。本研究参考本课题组之前做过的实验<sup>[21]</sup>、文献[15]及 MTT 结果设置 BaP 染毒浓度, 为更好地模拟体内环境, 在细胞培养液中加入 S9(体积分数 3%), 旨在研究 BaP 对 SH-SY5Y 细胞能量代谢的影响, 并分析其与细胞存活率及氧化损伤的关系, 以探讨 BaP 对神经细胞能量代谢的影响规律, 寻找潜在的生物标志, 为研究 BaP 神经毒作用机制提供依据。

MDA 是自由基引发脂质过氧化作用的终分解产物, SOD 是一种抗氧化酶, 其中 Mn-SOD 主要存在于真核生物线粒体中, 对线粒体氧化损伤起主要防御作用<sup>[22]</sup>, 两者水平相结合反映线粒体氧化损伤的程度<sup>[23]</sup>。本研究发现, 随着染毒浓度的增加, 细胞活力下降, 细胞内 MDA 含量逐渐升高, Mn-SOD 含量逐渐降低, 提示 BaP 引起线粒体氧化损伤, 与 LIANG 等<sup>[24]</sup> 报道基本一致。

线粒体作为 ATP 合成的主要部位, 对细胞的能量平衡和人类健康起着重要作用<sup>[25]</sup>。线粒体压力测试通过 4 个参数评估细胞有氧呼吸能力<sup>[7]</sup>: 基础有氧呼吸反映细胞基础状态下的能量需要, 包括 ATP 偶联的有氧呼吸速率 (反映线粒体 ATP 合成能力) 和质子漏耗氧速率 (反映线粒体的结构损伤); 有氧呼吸最大值反映细胞可以达到的最大呼吸速率; 储备呼吸能力反映紧急状况下细胞对外界压力的对抗能力, 在高能耗心血管和神经元系统中尤为重要, 若未能及时提供足够量的 ATP 可能会迅速导致灾难性事件, 对细胞氧化应激能力发挥关键作用, 可作为是“健康”的前瞻性指标<sup>[7]</sup>。本研究发现 BaP 可降低细胞基础有氧呼吸及 ATP 偶联的有氧呼吸速率, 而质子渗漏未受到影响, 说明 BaP 降低基础状态下 SH-SY5Y 细胞能量消耗, 主要是由于 ATP 的合成能力受损所导致的, 提示 BaP 可能抑制 ATP 合成酶活性, 并未损伤电子传递链 (ETC) 及线粒体膜结构, 在线粒体结构损伤之前就已经引起能量代谢改变, 从而影响机体的生理适应能力, 与 DRANKA 等<sup>[26-27]</sup>的研究一致。较高浓度 (10.0、100.0 μmol/L) 时细胞有氧呼吸最大值及储备值下降, 提示较高浓度的 BaP 可降低线粒体活性, 减弱细胞对氧化应激的承受能力并影响紧急情况下对外界压力的应对能力<sup>[26]</sup>。此外, 细胞还存在另一

条能量代谢途径——糖酵解。糖酵解压力测试通过3个参数评估底物饱和状态下糖酵解功能。本研究发现较高浓度(10.0、100.0 μmol/L)时糖酵解水平、糖酵解最大值及糖酵解储备值均下降,提示较高浓度的BaP才会对SH-SY5Y细胞糖酵解产生影响。由此可以推出BaP主要损伤线粒体呼吸功能,只有在较高浓度时才会对糖酵解功能产生影响。

相关分析发现能量代谢与氧化损伤密切相关,因此我们推测BaP可能引起细胞氧化应激,从而损伤线粒体造成细胞能量代谢紊乱,但其具体毒作用机制还需要更进一步的研究来验证。本次研究采用SH-SY5Y细胞作为研究对象,初步探索BaP对神经细胞的能量代谢规律,建立方法体系,但细胞实验有一定局限性,后续我们将会通过动物及人群实验加以验证。

## 参考文献

- [1] CAMPBELL J, FRANZEN A, VAN LANDINGHAM C, et al. Predicting lung dosimetry of inhaled particleborne benzo[*a*]pyrene using physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. Inhal Toxicol, 2016, 28(11): 520-535.
- [2] ARLT VM, KRAIS AM, GODSCHALK RW, et al. Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[*a*]pyrene [J]. Toxicol Sci, 2015, 146(2): 213-225.
- [3] JEDRYCHOWSKI WA, PERERA FP, CAMANN D, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children [J]. Environ Sci Pollut Res, 2015, 22(5): 3631-3639.
- [4] 李卫星, 张红明, 胡志鹏, 等. 焦炉工人神经行为改变及其影响因素研究 [J]. 环境与职业医学, 2011, 28(4): 205-209, 214.
- [5] BOLTON JL, TRUSH MA, PENNING TM, et al. Role of quinones in toxicology [J]. Chem Res Toxicol, 2000, 13(3): 135-160.
- [6] QIAN Y, XU S, YANG X, et al. Purinergic receptor P2Y6 contributes to 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced oxidative stress and cell death in neuronal SH-SY5Y cells [J]. J Neurosci Res, 2018, 96(2): 253-264.
- [7] YANG M, CHADWICK AE, DART C, et al. Bioenergetic profile of human coronary artery smooth muscle cells and effect of metabolic intervention [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177951.
- [8] 田月洋. 肌肤对星形胶质细胞及神经元能量代谢的调节作用 [D]. 温州: 温州医科大学, 2014.
- [9] BADDING MA, FIX NR, ANTONINI JM, et al. A comparison of cytotoxicity and oxidative stress from welding fumes generated with a new nickel-, copper-based consumable versus mild and stainless steel-based welding in RAW 264.7 mouse macrophages [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e101310.
- [10] MOYER AL, WAGNER KR. Mammalian Ms51 is a skeletal muscle-specific gene modulating cellular metabolism [J]. J Neuromuscul Dis, 2015, 2(4): 371-385.
- [11] MOFFAT I, CHEPELEV N, LABIB S, et al. Comparison of toxicogenomics and traditional approaches to inform mode of action and points of departure in human health risk assessment of benzo[*a*]pyrene in drinking water [J]. Crit Rev Toxicol, 2015, 45(1): 1-43.
- [12] KIM HS, KWACK SJ, LEE BM. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[*a*]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[*a*]pyrene [J]. Chem Biol Interact, 2000, 127(2): 139-150.
- [13] 秦双立. 线粒体损伤和氧化应激的关系 [J]. 国外医学医学地理分册, 2013, 34(3): 197-201.
- [14] GRAY NE, SAMPATH H, ZWEIG JA, et al. Centella asiatica attenuates amyloid-β-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 45(3): 933-946.
- [15] NIE JS, ZHANG HM, ZHAO J, et al. Involvement of mitochondrial pathway in benzo[*a*]pyrene-induced neuron apoptosis [J]. Hum Exp Toxicol, 2014, 33(3): 240-250.
- [16] HONG CT, CHAU KY, SCHAPIRA AH. Meclizine-induced enhanced glycolysis is neuroprotective in Parkinson disease cell models [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25344.
- [17] BAZZIGALUPPI P, EBRAHIM AMINI A, WEISSPAIR I, et al. Hungry neurons: metabolic insights on seizure dynamics [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2269.
- [18] YAO J, CHEN S, MAO Z, et al. 2-Deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21788.
- [19] WANG SY, WEI YH, SHIEH DB, et al. 2-deoxy-d-glucose can complement doxorubicin and sorafenib to suppress the growth of papillary thyroid carcinoma cells [J]. PLoS One,

- 2015, 10(7): e0130959.
- [20] UBERTI D, PICCIONI L, COLZI A, et al. Pergolide protects SH-SY5Y cells against neurodegeneration induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 434(1/2): 17-20.
- [21] 许国耀, 郑金平, 王春芳, 等. 苯并[a]芘对原代培养大鼠神经元细胞损伤及Hsp70表达的影响[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(4): 256-260.
- [22] WANG M, SU X, LI Y, et al. Cloning and expression of the Mn-SOD gene from Phascolosoma esculenta [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(5): 759-764.
- [23] HONG Y C, PARK E Y, PARK M S, et al. Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population [J]. Toxicol Lett, 2009, 184(2): 139-144.
- [24] LIANG X, TANG Y, DUAN L, et al. Adverse effect of subchronic exposure to benzo(a)pyrene and protective effect of butylated hydroxyanisole on learning and memory ability in male Sprague-Dawley rat [J]. J Toxicol Sci, 2014, 39(5): 739-748.
- [25] BAUGHMAN J M, NILSSON R, GOHIL V M, et al. A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis [J]. PLoS Genet, 2009, 5(8): e1000590.
- [26] HILL B G, BENAVIDES G A, LANCASTER J R, et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy [J]. Biol Chem, 2012, 393(12): 1485-1512.
- [27] DRANKA B P, BENAVIDES G A, DIERS A R, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(9): 1621-1635.

(收稿日期: 2017-10-11; 录用日期: 2017-12-21)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)

### 【告知栏】

## 《环境与职业医学》编辑部喜获上海市“巾帼文明岗”荣誉称号

3月9日, 在“美丽绽放新时代 天使建功新作为”上海市卫生计生系统纪念“三八”国际妇女节108周年主题活动上, 上海市疾病预防控制中心《环境与职业医学》编辑部喜获上海市“巾帼文明岗”荣誉称号。

在巾帼文明岗创建评比过程中, 编辑部以“怀琢玉心, 拥锦绣笔, 创文明岗, 塑巾帼风”为建岗口号, 立足岗位, 紧紧围绕“九个一”建岗目标, 有计划、有步骤, 扎扎实实开展了丰富多彩的主题活动。例如, 举办向身边优秀女性学习的座谈会, 学习“全国先进工作者”张曦同志、三八红旗标兵肖萍同志的优秀事迹; 开展读书学习交流活动, 引导班组成员养成阅读习惯, 开阔视野, 丰富精神生活; 组织捐赠旧衣物给边境贫困人群, 参加乙肝知识宣传活动和献血活动; 结合工作内容, 开展公众满意度问卷调查, 主动接受读者、作者和审稿人的监督与评价……在近一年的创建过程中, 编辑部同事从硬件、软件各方面落实规范化的目标管理, 提升女性素质, 弘扬行业新风, 促进行业发展。

编辑部将永怀琢玉之心, 手拥锦绣之笔, 在编辑岗位上兢兢业业, 为办好一流学术期刊而不懈努力!

《环境与职业医学》编辑部

2018年4月25日