

# 亚砷酸钠诱导 SH-SY5Y 细胞铁死亡的规律

夏双爽<sup>1</sup>, 田凤斐<sup>1</sup>, 任学科<sup>1</sup>, 王慧<sup>1</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 穆箭兵<sup>2</sup>, 郑金平<sup>1,3</sup>

1. 山西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 山西 太原 030001

2. 美国国立卫生研究院过敏与传染病研究所疟疾和媒介研究实验室, 美国 马里兰州 罗克韦尔 20852

3. 长治医学院公共卫生与预防医学系, 山西 长治 046000

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19707

## 摘要:

**[背景]** 砷可通过诱导神经元丢失导致神经毒性, 但其是否可诱导神经细胞铁死亡尚不清楚。

**[目的]** 探讨亚砷酸钠 (NaAsO<sub>2</sub>) 诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 铁死亡发生规律, 为研究 NaAsO<sub>2</sub> 神经毒性发生机制提供依据。

**[方法]** 选用 SH-SY5Y 细胞, 将实验分为空白对照组 (加入正常培养基)、阳性对照组 (加入终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup> 的铁死亡诱导剂 Erastin)、NaAsO<sub>2</sub> 染毒组 (NaAsO<sub>2</sub> 终浓度分别为 20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup>)、抑制剂组 [终浓度 20 μmol·L<sup>-1</sup> 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 特异性铁死亡抑制剂 Fer-1, 100 μmol·L<sup>-1</sup> 特异性铁死亡抑制剂去铁胺 (DFO), 20 μmol·L<sup>-1</sup> 坏死性凋亡抑制剂 Nec-1]、干预组 (在阳性对照组及 NaAsO<sub>2</sub> 各染毒组基础上分别加入 4 种抑制剂, 剂量同抑制剂组), 共 25 组, 染毒 24 h。实验重复 3 次。采用 CCK-8 法检测各组细胞存活率; 试剂盒检测细胞内丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽 (GSH) 含量、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPXS) 活性及 Fe<sup>2+</sup> 含量; 流式细胞仪检测脂质活性氧 (ROS) 水平。

**[结果]** 随 NaAsO<sub>2</sub> 染毒剂量增加, SH-SY5Y 细胞存活率呈下降趋势 ( $b=-0.984, P<0.001$ ); 20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 染毒组及 Erastin 组细胞存活率 [(85.15±1.32) %、(72.63±2.67) %、(65.28±1.71) %、(74.34±2.07) %] 均明显低于对照组存活率 ( $P<0.01$ )。Z-VAD-FMK 干预使 20、40、80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 染毒组及 Erastin 处理组细胞存活率上升至 (88.30±1.92) %、(81.72±2.43) %、(77.72±1.05) %、(85.28±1.97) % ( $P<0.05$ ), 脂质 ROS、MDA 含量下降 ( $P<0.05$ ), SOD 活性上升 ( $P<0.05$ ), 但 GSH 含量、GPXS 活性、Fe<sup>2+</sup> 含量均无明显变化 ( $P>0.05$ )。Fer-1、DFO 干预使 40 μmol·L<sup>-1</sup> 和 80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 染毒组、Erastin 处理组细胞存活率分别上升至 (86.33±2.31) %、(82.24±1.24) %、(88.76±2.87) % 和 (82.83±2.55) %、(79.66±0.67) %、(87.38±1.23) % ( $P<0.01$ ), 脂质 ROS 水平、MDA 下降 ( $P<0.05$ ), SOD 活性上升 ( $P<0.05$ ), 同时 GSH 含量、GPXS 活性上升 ( $P<0.05$ ), Fe<sup>2+</sup> 含量降低 ( $P<0.05$ )。Nec-1 干预 NaAsO<sub>2</sub> 各染毒组及 Erastin 处理组后, 细胞存活率、脂质 ROS 水平、MDA 含量、SOD 活性、GSH 含量、GPXS 活性及 Fe<sup>2+</sup> 含量均无明显变化 ( $P>0.05$ )。

**[结论]** NaAsO<sub>2</sub> 暴露可诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, 随着暴露剂量的增加可诱导细胞铁死亡。

**关键词:** 亚砷酸钠; 人神经母细胞瘤细胞; 铁死亡

**Ferroptosis patterns in SH-SY5Y cells induced by sodium arsenite** XIA Shuang-shuang<sup>1</sup>, TIAN Feng-jie<sup>1</sup>, REN Xue-ke<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, MU Jian-bing<sup>2</sup>, ZHENG Jin-ping<sup>1,3</sup> (1. Department of Toxicology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Rockville, MD 20852, USA; 3. Department of Public Health and Preventive Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

## Abstract:

**[Background]** Arsenic can cause neurotoxicity by inducing neuronal loss, but it is not clear whether it can induce ferroptosis in nerve cells.

**[Objective]** This experiment is designed to study the ferroptosis patterns in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, and provide insights to study the mechanism underlying neurotoxicity induced by sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>).

**[Methods]** SH-SY5Y cells were divided into a blank control group (with normal medium), a positive control group (with a final concentration of 10 μmol·L<sup>-1</sup> ferroptosis inducer Erastin), three NaAsO<sub>2</sub> exposure groups (with a final concentration of 20, 40, 80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub>, respectively),

## 基金项目

国家自然科学基金项目 (30872137); 山西省重点研发计划国际科技合作项目 (201703D421021)

## 作者简介

并列第一作者。

夏双爽 (1992—), 女, 硕士生;

E-mail: 858216188@qq.com

田凤斐 (1980—), 女, 硕士, 讲师;

E-mail: fjtian2003@163.com

## 通信作者

郑金平, E-mail: zheng\_jp@sxmu.edu.cn

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-10-16

录用日期 2020-02-04

文章编号 2095-9982(2020)05-0468-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

## 引用

夏双爽, 田凤斐, 任学科, 等. 亚砷酸钠诱导 SH-SY5Y 细胞铁死亡的规律 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (5): 468-473.

## ► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19707

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

ZHENG Jin-ping, E-mail: zheng\_jp@sxmu.edu.cn

**Competing interests** None declared

**Received** 2019-10-16

**Accepted** 2020-02-04

## ► To cite

XIA Shuang-shuang, TIAN Feng-jie, REN Xue-ke, et al. Ferroptosis patterns in SH-SY5Y cells induced by sodium arsenite [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(5): 468-473.

## ► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19707

four inhibitor groups [with a final concentration of  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  specific ferroptosis inhibitor Fer-1,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  specific ferroptosis inhibitor deferoxamine (DFO), and  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  necrotic apoptosis inhibitor Nec-1, respectively], and sixteen intervention groups (four inhibitors were added to a group with the same positive control treatment and three groups with the same  $\text{NaAsO}_2$  exposure treatments respectively at the same dose of the inhibitor groups). A total of 25 groups were exposed following the designed protocol for 24 h. The experiment was repeated three times. CCK-8 method was used to detect cell survival rate of each group; corresponding kits were used to detect malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione (GSH) content, glutathione peroxidase (GPXS) activity, and  $\text{Fe}^{2+}$  content; flow cytometry was used to detect lipid reactive oxygen species (ROS) level.

**[Results]** The survival rate of SH-SY5Y cells showed a decreasing trend with the increasing  $\text{NaAsO}_2$  exposure concentration ( $b=-0.984$ ,  $P<0.001$ ). The cell survival rates of the  $20$ ,  $40$ , and  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  exposure groups and the Erastin group were  $(85.15\pm 1.32)\%$ ,  $(72.63\pm 2.67)\%$ ,  $(65.28\pm 1.71)\%$ , and  $(74.34\pm 2.07)\%$ , respectively, and were lower than that of the control group ( $P<0.01$ ). The Z-VAD-FMK intervention increased the survival rates of the cells exposed to  $20$ ,  $40$ , and  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  and the Erastin-treated cells to  $(88.30\pm 1.92)\%$ ,  $(81.72\pm 2.43)\%$ ,  $(77.72\pm 1.05)\%$ , and  $(85.28\pm 1.97)\%$ , respectively ( $P<0.05$ ), decreased the lipid ROS level and the MDA content ( $P<0.05$ ), and elevated the SOD activity ( $P<0.05$ ), but did not change the GSH content, GPXS activity, and  $\text{Fe}^{2+}$  content ( $P>0.05$ ). The Fer-1 intervention increased the cell survival rates of the  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  exposure groups and the Erastin group to  $(86.33\pm 2.31)\%$ ,  $(82.24\pm 1.24)\%$ , and  $(88.76\pm 2.87)\%$ , respectively, and the DFO intervention increased the rates to  $(82.83\pm 2.55)\%$ ,  $(79.66\pm 0.67)\%$ , and  $(87.38\pm 1.23)\%$ , respectively ( $P<0.01$ ); the two inhibitors also decreased the lipid ROS level and MDA content ( $P<0.05$ ), increased the SOD activity, GSH content, and GPXS activity ( $P<0.05$ ), and decreased the  $\text{Fe}^{2+}$  content ( $P<0.05$ ). The Nec-1 intervention did not change the cell survival rate, lipid ROS level, MDA content, SOD activity, GSH content, GPXS activity, and  $\text{Fe}^{2+}$  content in each  $\text{NaAsO}_2$  exposure group and the Erastin treatment group ( $P>0.05$ ).

**[Conclusion]**  $\text{NaAsO}_2$  exposure can induce apoptosis of SH-SY5Y cells, and with the increase of exposure dose it can induce ferroptosis.

**Keywords:**  $\text{NaAsO}_2$ ; human neuroblastoma cell; ferroptosis

砷是一种天然存在的类金属,广泛分布于土壤、水、矿物、植物中。地方性砷中毒已经成为人们高度重视的公共卫生问题之一,世界卫生组织国际癌症研究机构将砷和无机砷化合物列为I类致癌物<sup>[1]</sup>。研究表明,砷可通过血脑屏障对中枢神经系统造成危害,引起人群或动物神经发育、认知能力及神经行为学改变<sup>[2-5]</sup>。砷通过诱导神经细胞凋亡、坏死<sup>[6-7]</sup>导致神经元丢失,是砷引起神经毒性的主要机制<sup>[8]</sup>。

2012年, Dixon等<sup>[9]</sup>研究小分子物质Erastin杀死含有致癌基因RAS突变的癌细胞时发现了一种铁依赖性的细胞死亡形式——铁死亡(ferroptosis)。近年来,国内外研究发现,许多有害因素和药物如 $\text{PM}_{2.5}$ 、铝、甲醛、谷氨酸、索拉非尼、顺铂等也可以诱导细胞发生铁死亡,为细胞死亡的主要形式之一<sup>[10-13]</sup>。铁死亡主要诱因是铁代谢功能障碍, $\text{Fe}^{2+}$ 含量异常升高,然而铁稳态及代谢需要与转铁蛋白、转铁蛋白受体、二价金属蛋白及膜铁转运蛋白等多种蛋白相互协调,通过铁摄取、铁储存、胞内的铁代谢及铁释放等途径共同维持,但铁代谢障碍具体机制尚不明确<sup>[9]</sup>。有研究表明,铁死亡本质是谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭,谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPXS)酶活性下降,脂质氧化物不能通过GPXS催化GSH还原反应代谢,在 $\text{Fe}^{2+}$ 的催化下异常代谢,与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 发生芬顿反应,产生 $\text{Fe}^{3+}$ 及高反应自由基,从而诱导产生大量脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS),

破坏细胞内氧化还原平衡,触发细胞死亡<sup>[14]</sup>。并且, Erastin可以诱导氧化应激和半胱天冬酶(caspase)-9依赖性细胞凋亡<sup>[15]</sup>。Z-VAD-FMK是一种细胞渗透性的、不可逆的泛caspase抑制剂,是研究细胞凋亡的一种关键化合物<sup>[16]</sup>。Nec-1是一种有效的、选择性的和可渗透细胞的坏死性凋亡抑制剂,通过抑制坏死性凋亡途径中受体相互作用蛋白激酶1激酶起作用<sup>[17]</sup>。Fer-1是铁死亡特异性抑制剂,通过阻断胱氨酸和谷胱甘肽产生,抑制脂质ROS的产生,减少细胞的氧化应激反应,从而抑制铁死亡发生<sup>[18]</sup>。去铁胺(deferoxamine, DFO)作为铁螯合剂能够与铁离子结合,降低细胞内的铁含量,阻止脂质ROS与铁发生反应,从而减少细胞铁死亡的发生<sup>[19-20]</sup>。所以本研究通过参考文献[7]报道的剂量及根据前期预实验结果,将存活率控制在60%~90%范围内,选用Erastin作为阳性对照,分别用Z-VAD-FMK、Fer-1、DFO、Nec-1 4种抑制剂进行干预,检测SH-SY5Y细胞存活率、脂质ROS水平、MDA含量、SOD活性、GSH含量、GPXS活性及 $\text{Fe}^{2+}$ 含量,探讨 $\text{NaAsO}_2$ 诱导SH-SY5Y细胞死亡方式及发生规律,为进一步研究砷的神经毒性发生机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

亚砷酸钠(Merck公司,德国),人神经母细胞瘤细胞株SH-SY5Y(武汉Procell公司,中国),特级胎牛

血清、最低必需培养基 (MEM) /F12 培养基、胰蛋白酶、青霉素链霉素 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 中国), Z-VAD-FMK、Fer-1、DFO、Nec-1 (MCE, 美国), 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、GSH、GPXS、 $Fe^{2+}$  检测试剂盒 (南京建成, 中国)、脂质 ROS (Thermo Forma, 美国), DNM-9602G 酶标分析仪 (北京普朗新公司, 中国), 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国)。

## 1.2 细胞培养与分组

选取 SH-SY5Y 细胞, 加入 MEM/F12 培养液 (含 10% 特级胎牛血清、1% 青霉素链霉素) 置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 3~4 d, 融合度达到 80%~85%, 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行细胞接种染毒及传代。

设空白对照组, 加入正常培养基; 阳性对照组, 加入终浓度为  $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的铁死亡诱导剂 Erastin;  $\text{NaAsO}_2$  染毒组,  $\text{NaAsO}_2$  终浓度分别为 20、40、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 抑制剂组, 终浓度  $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK,  $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  特异性铁死亡抑制剂 Fer-1,  $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  特异性铁死亡抑制剂 DFO,  $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  坏死性凋亡抑制剂 Nec-1; 干预组, 在阳性对照组及  $\text{NaAsO}_2$  各染毒组基础上分别加入 4 种抑制剂, 即终浓度  $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK,  $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  特异性铁死亡抑制剂 Fer-1,  $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  特异性铁死亡抑制剂 DFO,  $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  坏死性凋亡抑制剂 Nec-1。

## 1.3 CCK-8 法检测细胞活力

将细胞以  $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$  接种于 96 孔板中, 待细胞进入对数生长期, 根据分组, 分别加入相应药物, 每个浓度设置 3 个复孔。染毒 24 h 后, 每孔加入  $10\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 1 h 后用酶标分析仪在 450 nm 波长检测各孔光密度值 ( $D$ ), 计算各组细胞活力, 实验重复 3 次。

## 1.4 细胞内脂质 ROS 水平、MDA 含量、SOD 活性、GSH 含量、GPXS 活性、 $Fe^{2+}$ 含量测定

将细胞以  $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$  接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 待细胞进入对数生长期, 根据分组, 分别加入相应药物, 24 h 后测定相应指标。

用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰蛋白酶消化收集细胞, 每组加入含有  $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  C11-BODIPY 荧光探针的无血清培养基,  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 30 min, 采用流式细胞仪, 在 488、510 nm 发射波长下, 用异硫氰酸荧光素 (FITC) 参数设置检测 DCF, 得出脂质 ROS 水平, 进行 3 次重复。

用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 2 次, 裂解取上

清液, 采用生化法, 按照试剂盒说明书测定并计算出 MDA 含量、SOD 活性、GSH 含量、GPXS 活性及  $Fe^{2+}$  含量 (均以蛋白计), 酶标分析仪检测各个浓度光密度值, 设置 3 个平行样。

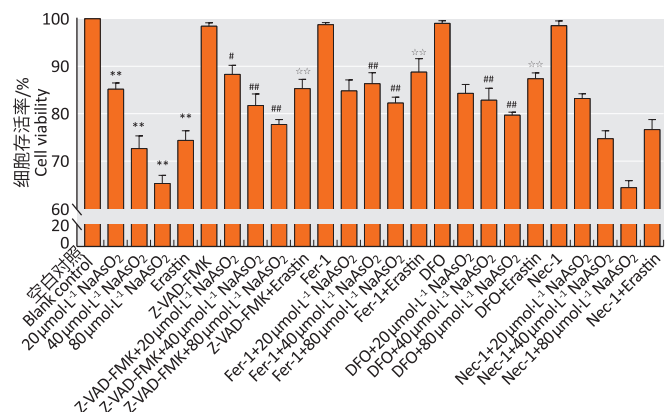
## 1.5 统计学分析

用 SPSS 20.0 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- $t$  法, 趋势检验采用线性回归分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 细胞活力

线性回归分析表明, 单独染毒  $\text{NaAsO}_2$  组随染毒剂量增加, SH-SY5Y 细胞存活率呈下降趋势 ( $b=-0.984$ ,  $P<0.001$ ); 20、40、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  染毒组及 Erastin 处理组细胞存活率分别为 (85.15 $\pm$ 1.32)%、(72.63 $\pm$ 2.67)%、(65.28 $\pm$ 1.71)%、(74.34 $\pm$ 2.07)%, 均明显低于对照组 (均  $P<0.01$ )。Z-VAD-FMK 干预使 20、40、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  染毒组及 Erastin 处理组细胞存活率分别升高至 (88.30 $\pm$ 1.92)%、(81.72 $\pm$ 2.43)%、(77.72 $\pm$ 1.05)%、(85.28 $\pm$ 1.97)%; Fer-1 干预使 40、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  染毒组及 Erastin 处理组细胞存活率升高至 (86.33 $\pm$ 2.31)%、(82.24 $\pm$ 1.24)%、(88.76 $\pm$ 2.87)%; DFO 干预使 40、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaAsO}_2$  染毒组及 Erastin 处理组细胞存活率升高至 (82.83 $\pm$ 2.55)%、(79.66 $\pm$ 0.67)%、(87.38 $\pm$ 1.23)%; 均高于同浓度  $\text{NaAsO}_2$  染毒组 (均  $P<0.05$ )。Nec-1 干预后,  $\text{NaAsO}_2$  各染毒组及 Erastin 处理组细胞存活率均无明显变化 (均  $P>0.05$ )。结果如图 1 所示。



[注] \*\*: 与空白对照组相比,  $P<0.01$ ; 与同浓度  $\text{NaAsO}_2$  染毒组相比, #:  $P<0.05$ , ##:  $P<0.01$ ; ☆☆: 与 Erastin 组相比,  $P<0.01$ 。

[Note] \*\*: Compared with the blank control group,  $P<0.01$ ; Compared with the same concentration  $\text{NaAsO}_2$  exposure group, #:  $P<0.05$ , ##:  $P<0.01$ ; ☆☆: Compared with the Erastin group,  $P<0.01$ 。

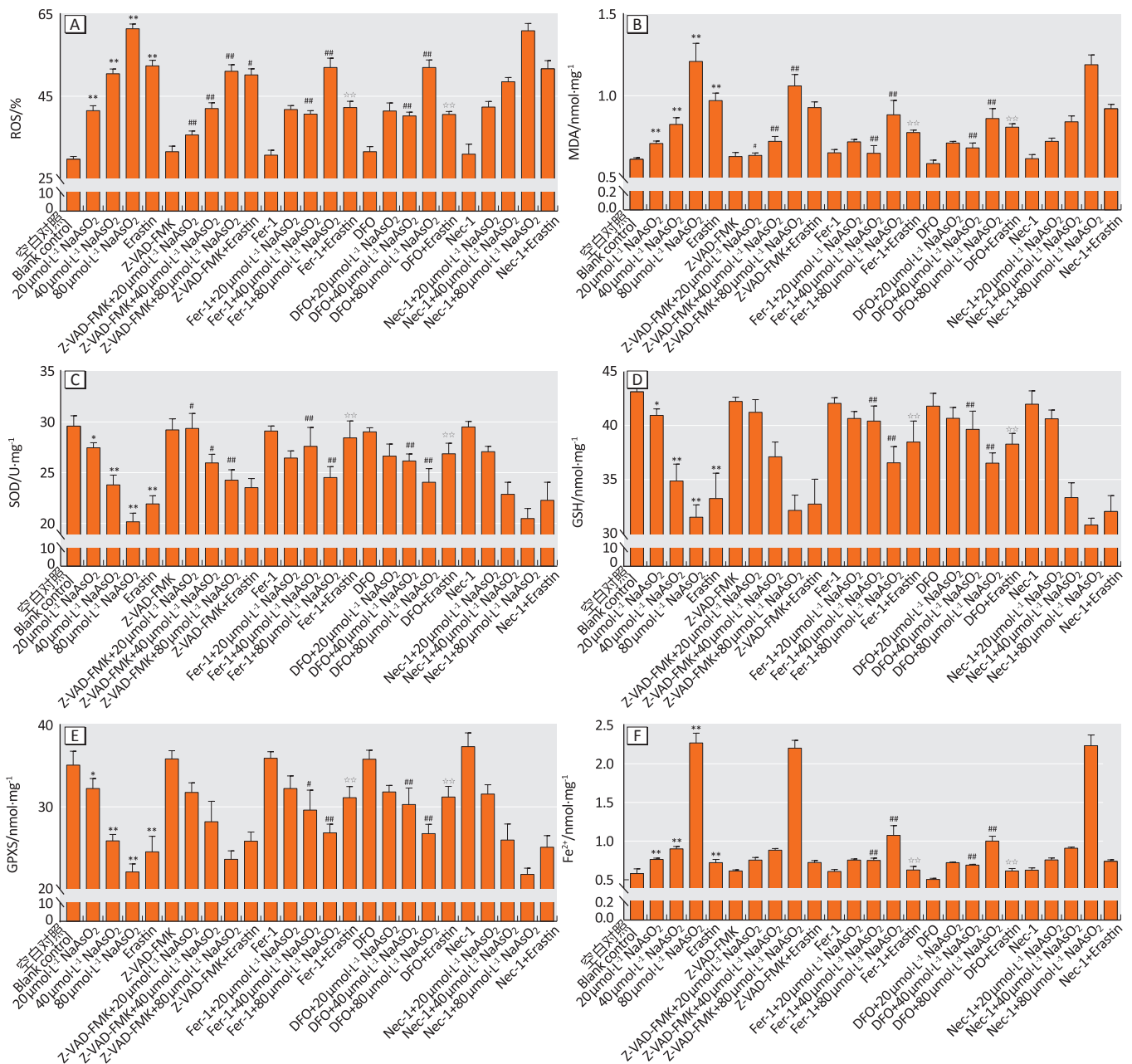
图 1 SH-SY5Y 细胞活力的变化

Figure 1 Changes in cell viability of SH-SY5Y cells

## 2.2 脂质ROS水平、MDA含量、SOD活性、GSH含量、GPXS活性、Fe<sup>2+</sup>含量

随NaAsO<sub>2</sub>染毒剂量增加, SH-SY5Y细胞脂质ROS水平、MDA及Fe<sup>2+</sup>含量逐渐升高 ( $b=0.996, P<0.001$ ;  $b=0.863, P<0.001$ ;  $b=0.921, P<0.001$ ), SOD活性、GSH含量、GPXS活性逐渐降低 ( $b=-0.973, P<0.001$ ;  $b=-0.967, P<0.001$ ;  $b=-0.969, P<0.001$ )。Z-VAD-FMK干预组与相应各NaAsO<sub>2</sub>染毒组相比较, 脂质ROS水

平、MDA含量下降 (均  $P<0.05$ ), SOD活性上升 ( $P<0.05$ ), 但不引起GSH含量、GPXS活性及Fe<sup>2+</sup>含量变化 (均  $P>0.05$ ); 干预Erastin组, 仅脂质ROS水平下降 ( $P<0.05$ )。Fer-1、DFO干预组与40、80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub>染毒组及Erastin组比较, 不仅脂质ROS水平、MDA含量下降 (均  $P<0.05$ ), SOD活性上升 (均  $P<0.05$ ), 而且GSH含量、GPXS活性也上升 (均  $P<0.05$ ), 同时Fe<sup>2+</sup>含量下降 (均  $P<0.01$ )。结果如图2所示。



[注] 与空白对照组相比, \* :  $P<0.05$ , \*\* :  $P<0.01$ ; 与同浓度NaAsO<sub>2</sub>染毒组相比, # :  $P<0.05$ , ## :  $P<0.01$ ; ☆☆ : 与Erastin组相比,  $P<0.01$ 。

[Note] Compared with the blank control group, \* :  $P<0.05$ , \*\* :  $P<0.01$ ; Compared with the same-concentration NaAsO<sub>2</sub> exposure group, # :  $P<0.05$ , ## :  $P<0.01$ ; ☆☆ : Compared with the Erastin group,  $P<0.01$ .

图2 SH-SY5Y细胞脂质ROS水平(A)、MDA(B)、SOD(C)、GSH(D)、GPXS(E)、Fe<sup>2+</sup>(F)含量的变化  
Figure 2 Changes of lipid ROS (A), MDA (B), SOD (C), GSH (D), GPXS (E), and Fe<sup>2+</sup> (F) levels in SH-SY5Y cells

### 3 讨论

本研究发现, NaAsO<sub>2</sub> 染毒 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 可导致细胞存活率明显下降; 当凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 及特异性铁死亡抑制剂 Fer-1、DFO 抑制后, 细胞存活率明显升高; 20 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 暴露可诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, 随着暴露剂量的增加可诱导细胞铁死亡。

砷具有直接的神经毒性作用, 可以通过破坏血脑屏障的完整性进入中枢神经系统, 导致神经元损伤<sup>[21-23]</sup>。以往的研究表明长期砷暴露可致大鼠海马神经元凋亡, 呈现核膜皱缩、核仁消失和染色质凝聚等表现<sup>[24]</sup>。铁死亡作为一种新发现的死亡方式, 受到越来越多的关注。铁死亡是一种铁离子依赖的、以脂质过氧化产物和致死 ROS 的积累为特点的非典型细胞死亡方式, 与凋亡、坏死和自噬在形态学、生物化学和遗传学等方面均有差异, 典型的特征为线粒体变小, 但双层膜的密度增加<sup>[25-26]</sup>。有研究显示, 砷暴露可引起肝癌 HepG2 细胞铁死亡<sup>[27]</sup>, 但其是否可以通过诱发神经细胞铁死亡而发挥神经毒性作用还不是很清楚。本研究选用的 SH-SY5Y 细胞来源于神经系统发育的神经嵴, 是一种分化程度较低的神经母细胞瘤, 其细胞形态和生理生化功能与正常神经细胞相似<sup>[28-29]</sup>。该细胞易获得且数量稳定, 具有多种酶活性, 其表面有多种受体, 参与相应的生理活动, 已被广泛用于神经毒性及机制的研究<sup>[30]</sup>。

随 NaAsO<sub>2</sub> 染毒剂量增加, SH-SY5Y 细胞存活率下降, 表明 NaAsO<sub>2</sub> 染毒可导致细胞某种形式的死亡。本研究分别用 Z-VAD-FMK、Fer-1、DFO、Nec-1 四种抑制剂进行干预, 从而判断细胞的死亡形式。结果表明: Erastin 处理组存活率为 (74.34±2.07)%, Z-VAD-FMK、Fer-1、DFO 干预后, Erastin 处理组存活率分别提高了 14.7%、19.4%、17.5%; Z-VAD-FMK 干预后仅脂质 ROS 水平明显下降, Fer-1、DFO 干预后细胞脂质 ROS 水平及 MDA、Fe<sup>2+</sup> 含量均下降, SOD 活性、GSH 含量及 GPXS 活性上升, 说明 Erastin 可引起 SH-SY5Y 细胞铁死亡和凋亡的发生。

当 NaAsO<sub>2</sub> 浓度为 20 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 仅 Z-VAD-FMK 干预可使细胞存活率、SOD 活性升高, 脂质 ROS 水平、MDA 含量均明显下降, GSH 含量、GPXS 活性、Fe<sup>2+</sup> 含量均无明显变化, 说明此时细胞的死亡方式为凋亡; 但当 NaAsO<sub>2</sub> 浓度为 40 μmol·L<sup>-1</sup> 及 80 μmol·L<sup>-1</sup> 时, Z-VAD-FMK、Fer-1、DFO 干预后, 均可逆转细胞生长

抑制, 干预 40 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 染毒组存活率分别提高了 12.5%、18.9% 和 14.0%, 干预 80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 染毒组存活率分别提高了 19.1%、26.0% 和 22.0%, 铁死亡抑制剂对细胞生长抑制的逆转比例高于凋亡抑制剂; Z-VAD-FMK 干预 40 μmol·L<sup>-1</sup> 及 80 μmol·L<sup>-1</sup> NaAsO<sub>2</sub> 染毒组后可使 SOD 活性升高, 脂质 ROS 水平、MDA 含量下降, GSH 含量、GPXS 活性、Fe<sup>2+</sup> 含量依旧无明显变化, 但 Fer-1、DFO 干预后不仅可使细胞 SOD 活性升高, 脂质 ROS 水平、MDA 含量下降, 还能引起 GSH 含量、GPXS 活性升高, Fe<sup>2+</sup> 含量下降, 并且变化趋势与 Erastin 处理组一致, 表明随 NaAsO<sub>2</sub> 染毒剂量的增加, SH-SY5Y 细胞死亡形式由凋亡转为铁死亡和凋亡并存, 且死亡方式主要为铁死亡; 而 Nec-1 干预 NaAsO<sub>2</sub> 各染毒组细胞存活率、氧化抗氧化指标均无明显变化, 表明 NaAsO<sub>2</sub> 染毒没有诱导坏死性凋亡的发生。

综上, 本研究显示 NaAsO<sub>2</sub> 暴露可诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, 随着暴露剂量的增加可诱导细胞铁死亡。其机制可能为 SH-SY5Y 细胞内 GSH 耗竭, GPXS 活性降低, 深入机制还需进一步研究。

### 参考文献

- [1] IARC monograph programme on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum, 1978, 18: 15-35.
- [2] TAN Z, KANG T, ZHANG X, et al. Nerve growth factor prevents arsenic-induced toxicity in PC12 cells through the AKT/GSK-3β/NFAT pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4726-4738.
- [3] RODRÍGUEZ-BARRANCO M, LACASAÑA M, AGUILAR-GARDUÑO C, et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis [J]. Sci Total Environ, 2013, 454-455: 562-577.
- [4] MONDAL N K, CHAKRABORTY D, ROY P, et al. Correlation between arsenic intoxication and cognitive ability of primary school children of West Bengal [J]. Asian Pac J Trop Dis, 2014, 4 Suppl 2: S850.
- [5] JING J, ZHENG G, LIU M, et al. Changes in the synaptic structure of hippocampal neurons and impairment of spatial memory in a rat model caused by chronic arsenite exposure [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(5): 1230-1238.
- [6] REYES-BECERRIL M, ANGULO C, SANCHEZ V, et al.

- Methylmercury, cadmium and arsenic (III) -induced toxicity, oxidative stress and apoptosis in Pacific red snapper leukocytes [J]. *Aquat Toxicol*, 2019, 213 : 105223.
- [7] SELVARAJ V, ARMISTEAD MY, COHENFORD M, et al. Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line [J]. *Chemosphere*, 2013, 90 (3) : 1201-1209.
- [8] TOLINS M, RUCHIRAWAT M, LANDRIGAN P. The developmental neurotoxicity of arsenic : cognitive and behavioral consequences of early life exposure [J]. *Ann Glob Health*, 2014, 80 (4) : 303-314.
- [9] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis : an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5) : 1060-1072.
- [10] 郭仪青, 陈广. 铁死亡调控机制与肿瘤发生与治疗的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2019, 50 (2) : 88-93.
- [11] WANG Y, TANG M. PM<sub>2.5</sub> induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance [J]. *Environ Pollut*, 2019, 254 : 112937.
- [12] 李壮, 王琼, 程丽婷, 等. 麦芽酚铝染毒致雄性大鼠神经元铁死亡及其机制研究 [J]. *环境卫生学杂志*, 2019, 9 (2) : 103-107.
- [13] 李晓娜. 甲醛通过上调 Warburg 效应诱导 HT22 细胞铁死亡 [D]. 衡阳 : 南华大学, 2018.
- [14] KWON MY, PARK E, LEE SJ, et al. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (27) : 24393-24403.
- [15] HUO H, ZHOU Z, QIN J, et al. Erastin disrupts Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) and induces apoptotic death of colorectal cancer cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (5) : e0154605.
- [16] TENG BT, TAM EW, BENZIE IF, et al. Protective effect of caspase inhibition on compression-induced muscle damage [J]. *J Physiol*, 2011, 589 (13) : 3349-3369.
- [17] 杜学柯, 荆忍, 张韵希, 等. 程序性坏死特异性抑制剂-1 对呼吸机相关性肺损伤的保护作用 [J]. *天津医药*, 2019, 47 (9) : 924-927.
- [18] SKOUTA R, DIXON SJ, WANG J, et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136 (12) : 4551-4556.
- [19] TANG HM, TANG HL. Cell recovery by reversal of ferroptosis [J]. *Biol Open*, 2019, 8 (6) : bio043182.
- [20] MIOTTO G, ROSSETTO M, DI PAOLO M L, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1 [J]. *Redox Biol*, 2020, 28 : 101328.
- [21] VAHIDNIA A, VAN DER VOET G B, DE WOLFF F A. Arsenic neurotoxicity—a review [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2007, 26 (10) : 823-832.
- [22] SUN B F, WANG Q Q, YU Z J, et al. Exercise prevents memory impairment induced by arsenic exposure in mice : implication of hippocampal BDNF and CREB [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (9) : e0137810.
- [23] 王艳艳, 姜红梅, 安玉, 等. 三氧化二砷对小鼠大脑组织神经递质代谢酶基因及其受体基因表达谱的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2012, 29 (11) : 671-673.
- [24] SUN H, YANG Y, SHAO H, et al. Sodium Arsenite-induced learning and memory impairment is associated with endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in rat hippocampus [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10 : 286.
- [25] 赵喆, 鲍秀琦, 张丹. 铁死亡调控机制及其在帕金森病中的研究进展 [J]. *药学学报*, 2019, 54 (3) : 399-406.
- [26] 李燕新, 郝延磊, 杨燕, 等. 铁死亡在神经系统疾病中的研究进展 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35 (8) : 762-765.
- [27] 赵田禾, 孙东雷, 李欣洋, 等. 三氧化二砷对肝癌 HepG2 细胞铁死亡影响的研究 [J]. *现代预防医学*, 2019, 46 (10) : 1847-1851.
- [28] ENCINAS M, IGLESIAS M, LIU Y, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells [J]. *J Neurochem*, 2000, 75 (3) : 991-1003.
- [29] XIE HR, HU LS, LI G Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line : in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123 (8) : 1086-1092.
- [30] COCCO S, SECONDO A, DEL VISCOVO A, et al. Polychlorinated biphenyls induce mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (6) : e0129481.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)