

文章编号 1006-8147(2015)01-0006-03

论著

## 同型半胱氨酸对小鼠成神经瘤细胞毒性作用研究

苟芸, 黄国伟, 陈爽, 张绪梅

(天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:研究同型半胱氨酸(Hcy)对小鼠成神经瘤细胞(N2a)毒性作用并探讨其对 pERK1/2 蛋白表达的影响。方法:培养的 N2a 细胞加入不同浓度 Hcy,随机分为 4 组:分别为正常对照组及 Hcy 低、Hcy 中、Hcy 高浓度组,根据预实验结果确定以上 4 组 Hcy 干预浓度分别为 0、30、300 和 1 000  $\mu\text{mol/L}$ 。作用 72 h 后,用酶标仪测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性,MTT 法检测细胞增殖情况,蛋白质免疫印迹法检测 N2a 细胞 pERK1/2 蛋白表达水平。结果:与正常对照组相比,Hcy 低、中、高浓度组细胞培养液中 LDH 活性均显著升高,差异具有统计学意义( $P$  值分别为 0.013、0.008 和 0.011,  $P<0.05$ )。低、中、高浓度 Hcy 作用后,MTT 检测细胞增殖活力下降,OD 值降低,与对照组比较,差异具有统计学意义( $P$  值分别为 0.01、0.006 和 0.009,  $P<0.05$ )。各 Hcy 干预组 pERK1/2 蛋白表达量降低,且中、高浓度 Hcy 组 pERK1/2 蛋白表达量与对照组相比差异具有统计学意义( $P$  值分别为 0.038、0.007,  $P<0.05$ )。结论:Hcy 能抑制磷酸化的 ERK1/2 蛋白表达,从而对 N2a 产生毒性作用,进而抑制 N2a 增殖,提示降低血清中 Hcy 水平可以对神经细胞产生保护作用。

**关键词** 同型半胱氨酸;小鼠;成神经瘤细胞 N2a;细胞凋亡;pERK1/2

中图分类号 R15

文献标志码 A

### Neurotoxicity of homocysteine on mouse N2a neuroblastoma cells

GOU Yun, HUANG Guo-wei, CHEN Shuang, ZHANG Xu-mei

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the neurotoxicity of homocysteine (Hcy) on mouse neuroblastoma cells (N2a) and its effect on pERK1/2 protein level. **Methods:** Cultured N2a cells were divided into four groups according to the concentrations of homocysteine: control group (Hcy 0  $\mu\text{mol/L}$ ), low-Hcy (30  $\mu\text{mol/L}$ ), moderate-Hcy (300  $\mu\text{mol/L}$ ), high-Hcy (1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) groups. After 72 h Hcy treatment, the toxicity of N2a cells was detected by LDH (lactate dehydrogenase) assay kit, cell proliferation ability was detected by MTT methods, and the protein expression of pERK1/2 was detected by western blot. **Results:** The LDH activity in Hcy-treated groups was increased compared with control group ( $P<0.05$ ). The cells proliferation ability was decreased after Hcy treatment, and OD values were reduced compared with control group ( $P<0.05$ ). The protein expression of pERK1/2 decreased after Hcy treatment, and significant differences among the moderate, high Hcy dose groups and control group were found ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The toxic effect of Hcy on N2a cells may be caused by reduced ERK1/2 protein phosphorylation expression. It suggests that a low serum Hcy level may have a protective effect on neural cells.

**Key words** homocysteine; mouse; neuroblastoma cell; cell apoptosis; pERK1/2

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种体内不能自行合成的含硫四碳氨基酸,也是蛋氨酸和半胱氨酸重要的中间代谢产物。流行病学研究显示,血浆中 Hcy 水平升高是阿尔兹海默症、血管性痴呆、帕金森病和中风等神经退行性疾病的危险因素之一<sup>[1-2]</sup>。此外,有研究报道,母体内 Hcy 浓度升高可以导致胎儿神经管畸形<sup>[3]</sup>。Hcy 可增加血脑屏障的通透性导致大脑对 Hcy 的暴露,发挥其神经毒性作用<sup>[4]</sup>。有关 Hcy 如何损伤神经系统,以及引发神经退行性病变的具体机制尚不清楚。目前研究认为,Hcy

发挥神经毒性作用的机制较为复杂,可能与 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体过度激活、氧化应激损伤及低甲基化等有关<sup>[5-7]</sup>。细胞外信号调节激酶(external-signal regulated kinase, ERK)1/2 是介导神经细胞损伤的一种重要信号蛋白分子,但目前有关 ERK1/2 如何介导神经细胞的损伤少有报道。小鼠 N2a 成神经瘤细胞系是一种来源于脑组织的细胞系,是进行神经系统研究的重要细胞模型。本实验以 N2a 细胞为受体细胞,研究 Hcy 是否通过调控 pERK 蛋白表达发挥其毒性作用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 同型半胱氨酸(H4628)购于 Sigma 公司;DMEM(#10569)购于 Gibco 公司;兔抗大鼠多

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81373003);中国博士后科学基金资助项目(2014M550148)

作者简介 苟芸(1990-),女,硕士在读,研究方向:营养与神经退行性疾病;通信作者:张绪梅, E-mail: zhangxumei@tjmu.edu.cn。

克隆一抗 ERK1/2 (#4695)、pERK1/2 (#4370) 购自 Cell Signaling 公司;BCA 蛋白试剂盒 (AR1046) 购于博士德公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (IH-0011) 购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;ECL 化学发光底物试剂盒 (WBKIS0100) 购于 Merck Millipore 公司;乳酸脱氢酶 (LDH) 测试盒 (A020-2) 购自南京建成生物工程研究所;小鼠成神经瘤细胞 N2a (目录号:TCM29) 购自中国科学院细胞库。

## 1.2 方法

**1.2.1 N2a 细胞培养** N2a 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液中贴壁生长。将细胞接种于直径 60 mm 培养皿置于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞完全贴壁, 浓度约为 5×10<sup>6</sup>, 将其分为 4 组: 正常对照组、Hcy 低、Hcy 中、Hcy 高浓度组, 以上 4 组 Hcy 干预浓度分别为 0、30、300、1 000 μmol/L。作用 72 h 后收集细胞和培养液进行相关指标的检测。

**1.2.2 以 LDH 试剂盒检测 LDH 活性** 收集 72 h 各组细胞培养液, 按试剂盒说明书操作。于 96 孔板中分别加入相应的试剂, 混匀, 室温放置 5 min, 于波长 450 nm 处用酶标仪测吸光度值。LDH 活性 (U/L) =  $\frac{\text{测定 OD}-\text{对照 OD}}{\text{标准 OD}-\text{空白 OD}} \times \text{标准品浓度} \times 1\,000$ , 计算 LDH 活性。

**1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活力** 将细胞制成悬液, 调整细胞密度为 1×10<sup>4</sup>/mL, 接种于 96 孔板, 每组 8 个复孔, 每孔 200 μL, 同时做空白对照。分别于 24、48、72、96 h 后每孔加 MTT 20 μL, 继续培养 4 h, 离心后弃孔内培养上清液, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解后, 用酶标仪于 490 nm 波长下测光密度 (OD) 值。

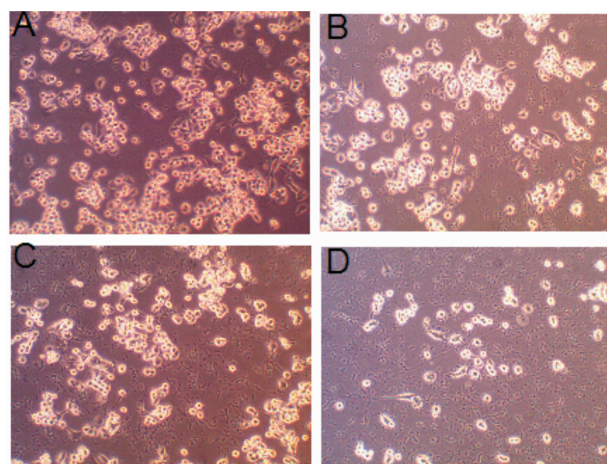
**1.2.4 Western blot 检测细胞中 pERK 和 ERK 蛋白表达** 收集细胞后用 PBS 洗两次, 800 r/min 离心 3 min, 弃上清。加 150 μL 裂解液后超声 3 次 (20 Hz, 每次 10 s, 间隔 10 s)。16 000 ×g, 4 ℃ 离心 15 min, 取上清液。细胞中蛋白浓度用 BCA 蛋白试剂盒检测。将等量蛋白 (约 30 μg) 在 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 转 NC 膜。将膜分别放在含 p-ERK (1:2 000) 和 ERK (1:2 000) 的抗体中 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加山羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 用化学发光底物试剂显色。蛋白条带用 ImageJ 2.0 软件进行定量分析。

**1.3 统计分析** 计数资料结果采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据, 多组间比较采用单因素方差分析,

若组间差异有统计学意义, 各组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态观察** 光镜下可见, 正常 N2a 细胞贴壁生长, 呈圆形或豆状, 簇拥成团, 边缘光滑, 折光性较强, 个别细胞有轴突。与对照组相比, 各 Hcy 干预组细胞量减少, 单个散在细胞增多; 细胞不易“抱团”且出现细胞碎片, Hcy 高浓度组尤其明显 (图 1), 提示 Hcy 可导致 N2a 细胞明显损伤。



A: 正常对照组; B: Hcy 低浓度组; C: Hcy 中浓度组; D: Hcy 高浓度组  
图 1 N2a 细胞形态学观察 (×100)

Fig 1 Morphologic observation of N2a cells (×100)

**2.2 Hcy 对 N2a 细胞的毒性作用** 细胞培养液 LDH 活性检测发现, 低、中、高浓度 Hcy 干预组的 LDH 活性均高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明 Hcy 造成细胞损伤, 膜通透性增高, 且在一定浓度范围内, Hcy 的毒性作用呈浓度依赖性。见表 1。

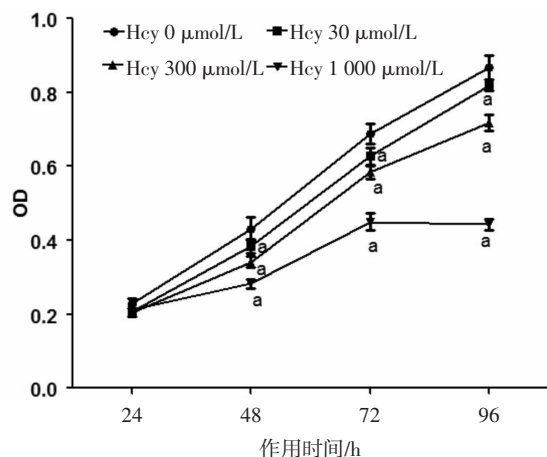
表 1 不同浓度 Hcy 对 N2a 细胞 LDH 活性的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The neurotoxicity of Hcy on N2a cells ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	LDH 活性 (U/L)
正常对照组	23.15±3.18
Hcy 低浓度组	29.52±1.82 <sup>a</sup>
Hcy 中浓度组	33.66±3.76 <sup>ab</sup>
Hcy 高浓度组	40.50±1.91 <sup>abc</sup>

与正常对照组比较 <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Hcy 低浓度组比较 <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 Hcy 中浓度组比较 <sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.3 Hcy 对 N2a 细胞增殖的影响** 在干预 48、72 和 96 h 后各个时间点, Hcy 低、中、高各浓度组的 OD 值均低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。且 Hcy 浓度越高, OD 值越低, 说明其抑制 N2a 增殖的效果越明显, 见图 2。

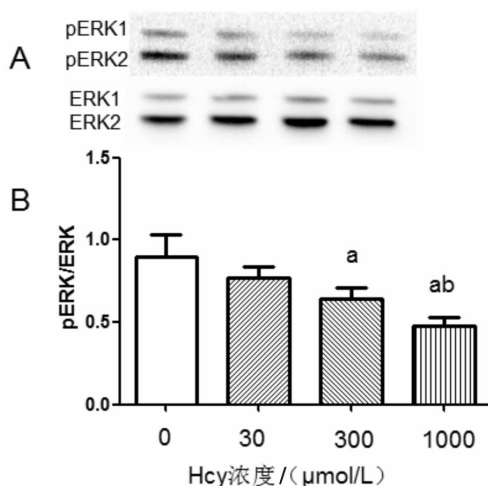


与正常对照组比较  $^*P<0.05$

图 2 Hcy 对 N2a 细胞增殖活力的影响

Fig 2 The homocysteine effect on the proliferation ability of N2a cells

2.4 pERK1/2 蛋白的表达 Western blot 分析各组 pERK1/2 蛋白的表达发现,中、高浓度 Hcy 作用组 pERK 蛋白表达量低于正常对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。另外,与 Hcy 低浓度组比较,Hcy 高浓度组 pERK 蛋白表达量亦显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。



A:pERK 蛋白表达;B:pERK/ERK

与正常对照组比较  $^*P<0.05$ ;与 Hcy 低浓度组比较  $^bP<0.05$

图 3 Hcy 对 pERK1/2 蛋白表达的影响

Fig 3 The Hcy effects on the protein expression of pERK1/2

### 3 讨论

正常人体内血浆中 Hcy 浓度为  $5\sim 15\ \mu\text{mol/L}$ <sup>[8]</sup>,遗传因素引起 Hcy 代谢相关的亚甲基四氢叶酸还原酶、胱硫醚- $\beta$ -合成酶缺乏或活性降低,或某些营养素缺乏(如叶酸、维生素  $B_6$ 、 $B_{12}$  缺乏)均可导致高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinaemia, HHcy)<sup>[9]</sup>。研究表明高同型半胱氨酸能显著提高在体和离体培养细胞中神经元的兴奋性和氧化损伤<sup>[9]</sup>。本实验

MTT 检测结果 Hcy 干预组 OD 值小于对照组( $P$ 值分别为 0.010、0.006 和 0.009,  $P<0.05$ ),说明 Hcy 可抑制 N2a 细胞的增殖活力。LDH 是一种稳定的蛋白质,存在于正常细胞的胞质中,一旦细胞膜受损,LDH 即被释放到细胞外。本实验通过检测细胞培养液中 LDH 活性,发现 Hcy 干预组培养液 LDH 活性高于对照组( $P$ 值分别为 0.013、0.008 和 0.011,  $P<0.05$ ),说明 Hcy 可对 N2a 细胞膜造成损伤。故光镜下发现 Hcy 干预组细胞数量少于对照组的原因可能为 Hcy 抑制 N2a 增殖使产生子代细胞的数目减少或者是对细胞膜产生损伤进而引起细胞死亡数目增多造成。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是真核生物信号传递网络中的重要途径之一,在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用,其家族成员之一 ERK1/2 在中枢神经系统高度表达,调控神经细胞的生长、增殖与分化,并在神经细胞损伤机制中扮演着重要的角色<sup>[10-12]</sup>。有研究表明,叶酸缺乏可提高培养神经细胞内 Hcy 的浓度,且叶酸可通过激活 ERK1/2 磷酸化促进神经干细胞增殖<sup>[13-15]</sup>。本研究结果表明,Hcy 干预可减少 ERK1/2 磷酸化水平抑制神经细胞增殖。鉴于体内叶酸可作为 Hcy 代谢的辅助因子,促进 Hcy 合成甲硫氨酸,进而降低 Hcy 水平<sup>[17]</sup>,同时,流行病学研究和临床调查发现,脑梗死等中枢神经系统疾病患者血清中的叶酸值明显低于其他病人,而长期补充叶酸、维生素  $B_6$ 、 $B_{12}$  等 B 族维生素可有效降低 Hcy 水平,促进脑损伤患者神经系统的生长、修复和恢复,并认为这种作用可能与叶酸影响神经细胞的增殖、分化与凋亡有关<sup>[18]</sup>。故我们推测 Hcy 浓度的改变可能介导叶酸对神经细胞增殖作用,叶酸可能通过降低 Hcy 浓度在神经系统发育及维持中起保护作用。本实验将为叶酸及 Hcy 在神经系统疾病发生发展过程中作用机制的研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(3): 435
- [2] Schalinske K L, Smazal A L. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker[J]. Adv Nutr, 2012, 3(6): 755
- [3] Wang Fang, Wang Jianhua, Guo Jin, et al. PCMT1 gene polymorphisms, maternal folate metabolism, and neural tube defects: a case-control study in a population with relatively low folate intake[J]. Genes Nutr, 2013, 8(6): 581
- [4] Lominadze D, Tyagi N, Sen U, et al. Homocysteine alters cerebral microvascular integrity and causes remodeling by antagonizing GA-BA-A receptor[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 371(1/2): 89

(下转第 17 页)



肝癌<sup>[14]</sup>、前列腺癌<sup>[15]</sup>等肿瘤中也得到证实。我们的研究也证明在乳腺癌中 Ebp1 的降表达促进肿瘤的迁移和侵袭。在腺样囊性癌中证实 Ebp1 与 MMP-9 (金属蛋白酶 9) 和 E-cadherin 的表达呈负相关<sup>[13]</sup>, 因此推测 Ebp1 影响 T47D 野生型细胞的迁移和侵袭可能通过 MMPs 的激活和上皮间质转化,但是需要进一步的研究证实。

综上所述,本研究证实 Ebp1 的表达量下降后导致乳腺癌细胞增殖和侵袭能力增强,而其中的分子机制尚不明确。但是,Ebp1 对乳腺癌的影响为探究肿瘤的发生发展以及治疗提供了新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Zheng H, Li Y, Wang Y Z, et al. Downregulation of COX-2 and CYP 4A signaling by isoliquiritigenin inhibits human breast cancer metastasis through preventing anoikis resistance, migration and invasion[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280(1): 10
- [2] Yoo J Y, Wang X W, Rishi A K, et al. Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(3): 683
- [3] Lu Y, Zhou H, Chen W, et al. The ErbB3 binding protein EBP1 regulates ErbB2 protein levels and tamoxifen sensitivity in breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 126(1): 27
- [4] Hu B Y, Xiong Y C, Ni R Z, et al. The downregulation of ErbB3 binding protein 1 (EBP1) is associated with poor prognosis and enhanced cell proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1/2): 175
- [5] Zhang Y, Linn D, Liu Z, et al. EBP1, an ErbB3-binding protein, is decreased in prostate cancer and implicated in hormone resistance[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(10): 3176
- [6] Liu Z X, Ahn J Y, Liu X, et al. Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(29): 10917
- [7] Zhang Y, Woodford N, Xia X, et al. Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(8): 2168
- [8] Akinmade D, Lee M, Zhang Y X, et al. Ebp1-mediated inhibition of cell growth requires serine 363 phosphorylation[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(4): 851
- [9] Ghosh A, Awasthi S, Hamburger A W. ErbB3-binding protein EBP1 decreases ErbB2 levels via a transcriptional mechanism[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3): 1161
- [10] Zhang Y X, Akinmade D, Hamburger A W. Inhibition of heregulin mediated MCF-7 breast cancer cell growth by the ErbB3 binding protein EBP1[J]. *Cancer Lett*, 2008, 265(2): 298
- [11] Kim C K, Nguyen T L, Joo K M, et al. Negative regulation of p53 by the long isoform of ErbB3 binding protein Ebp1 in brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9730
- [12] Chen J J, Peck K, Hong T M, et al. Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5223
- [13] Sun J, Luo Y X, Tian Z, et al. Expression of ERBB3 binding protein 1 (EBP1) in salivary adenoid cystic carcinoma and its clinicopathological relevance[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 499
- [14] Zhang Y X, Ali T Z, Zhou H, et al. ErbB3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 240

(2014-08-11 收稿)

(上接第 8 页)

- [5] Ataie A, Ataee R, Shadifar M, et al. Interaction of memantine with homocysteine on the apoptosis in the rat hippocampus cells[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2012, 1(3): 145
- [6] Lee S J, Kang M H, Min H. Folic acid supplementation reduces oxidative stress and hepatic toxicity in rats treated chronically with ethanol[J]. *Nutr Res Pract*, 2011, 5(6): 520
- [7] Fiorito G, Guarerra S, Valle C, et al. B-vitamins intake, DNA-methylation of One Carbon Metabolism and homocysteine pathway genes and myocardial infarction risk: the EPICOR study[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014, 24(5): 483
- [8] Guo H Y, Xu F K, Lü H T, et al. Hyperhomocysteinemia independently causes and promotes atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2014, 11(1): 74
- [9] 程丝,冯娟,王宪.高同型半胱氨酸血症治疗研究进展[J].*生理科学进展*,2011,42(5):329
- [10] Parmar M S, Jaumotte J D, Wyrostek S L, et al. Role of ERK1, 2, and 5 in dopamine neuron survival during aging[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(3): 669
- [11] Matteucci A, Gaddini L, Villa M, et al. Neuroprotection by rat Müller glia against high glucose-induced neurodegeneration through a mechanism involving ERK1/2 activation[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 125: 20
- [12] Yang K, Cao F J, Sheikh A M, et al. Up-regulation of Ras/Raf/ERK1/2 signaling impairs cultured neuronal cell migration, neurogenesis, synapse formation, and dendritic spine development[J]. *Brain Struct Funct*, 2013, 218(3): 669
- [13] Ortuno-Sahagún D, González R M, Verdaguer E, et al. Glutamate excitotoxicity activates the MAPK/ERK signaling pathway and induces the survival of rat hippocampal neurons in vivo[J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 52(3): 366
- [14] Türkçü F M, Koz O G, Yarangümeli A, et al. Plasma homocysteine, folic acid, and vitamin B<sub>12</sub> levels in patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and normotensive glaucoma[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2013, 49(5): 214
- [15] Zhang X M, Huang G W, Tian Z H, et al. Folate stimulates ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in fetal neural stem cells[J]. *Nutr Neurosci*, 2009, 12(5): 226
- [16] Zhang X M, Huang G W, Tian Z H, et al. Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 45(1): 14
- [17] Cao H, Hu X H, Zhang Q, et al. Hyperhomocysteinemia, low folate concentrations and MTHFR C677T mutation in abdominal aortic aneurysm[J]. *Vasa*, 2014, 43(3): 181
- [18] 周小红,刘向一.脑梗塞患者血清叶酸浓度的改变[J].*中华临床医学杂志*,2006,7(8):49

(2014-07-30 收稿)