

- [7] Kim W H, Lee S K, Lee H C, et al. Shell-grinder's asthma [J]. Yonsei Med J, 1982, 23 (2) : 123-130.
- [8] 安爱芝, 孙月芹. 食坑虾引起过敏性休克 1 例 [J]. 医学理论与实践, 2003, 16 (8) : 877.
- [9] 许岩, 许红. 食用虾爬子引起过敏性休克 1 例 [J]. 沈阳医学院学报, 2000, 2 (2) : 108.
- [10] Wild L G, Lehrer S B. Fish and shellfish allergy [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2005, 5 (1) : 74-79.
- [11] 王晓雯. 中国对虾主要过敏原的鉴定及性质的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [12] Tsabouri S, Triga M, Makris M, et al. Fish and shellfish allergy in children: review of a persistent food allergy [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2012, 23 (7) : 608-615.
- [13] 吴海明, 胡志和. 海虾过敏原的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31 (7) : 168-172.
- [14] 刘光明, 梁银龙, 翁凌, 等. 锯缘青蟹主要过敏原的纯化与鉴定 [J]. 水生生物学报, 2010, 3 (1) : 108-114.

论著

植物甾醇对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响

刘河汝, 安秀峰, 代晓曼, 张波

(北京联合大学应用文理学院 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要:目的 初步探讨植物甾醇对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响。方法 采用体外细胞培养的方法,用不同浓度的植物甾醇与细胞共同培养,倒置显微镜观察细胞形态,MTT 法测定细胞存活率,流式细胞术测定细胞凋亡率。结果 与对照组比较,从 1 $\mu\text{mol/L}$ 植物甾醇起即对细胞的存活率有明显影响,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);植物甾醇浓度由低到高,随着浓度的增加,对细胞的形态影响越明显,突触变短,胞体萎缩甚至死亡;不同浓度的植物甾醇可引起细胞不同程度的早期凋亡。结论 植物甾醇对体外培养的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞有潜在的毒性作用,能够抑制细胞增殖和引起细胞凋亡。

关键词:植物甾醇;人神经母瘤细胞;细胞存活率;细胞凋亡;细胞毒理学

中图分类号:R15;Q946 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)06-0497-04

Study on cell proliferation and apoptosis of phytosterol on SH-SY5Y cell

LIU He-ru, AN Xiu-feng, DAI Xiao-man, ZHANG Bo

(Key Laboratory for Bioactive Material and Functional Food, College of Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100190, China)

Abstract: Objective It was discussed in the article about the effect of plant sterol on cell proliferation and apoptosis of SH-SY5Y cell. **Methods** Using cell culture, SH-SY5Y cells were treated with different concentrations of plant sterol. Morphology of the cells was analyzed by inverted microscope, cell survival rate by MTT assay, determination of cell apoptosis by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, phytosterol concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$, had a significant effect on cell survival rate ($P < 0.01$); Morphological comparison revealed increase with different concentrations of plant sterol including shorter synapses, cellular degeneration and atrophy; Early apoptosis was caused by different concentrations of plant sterol. **Conclusion** Phytosterols has the potential to be cytotoxic for neuron by inhibiting cell growth and inducing apoptosis.

Key words: Phytosterol; SH-SY5Y cell; cell viability; apoptosis; cell toxicology

植物甾醇 (plant sterol or phytosterol) 广泛存在于植物的根、茎、叶、果实和种子中,是植物细胞膜

的组成部分,在所有来源于植物种子的油脂中都含有丰富的植物甾醇。它是一种类似于环状醇结构的物质,有游离型和酯化型两种,酯化型植物甾醇更易溶于有机溶剂,其吸收利用率比游离型提高 5 倍左右,功能更广^[1]。植物甾醇是 3 位羟基的甾体化合物,以环戊烷全氢菲为主体骨架,占四环三萜类化合物的大部分,它的主要成分包括 β -谷甾醇 (β -

收稿日期:2013-09-04

作者简介:刘河汝 女 硕士生 研究方向为生物活性物质的功能与毒理 E-mail:liuhu0919@sina.com

通讯作者:张波 女 教授 研究方向为生物活性物质的功能与毒理 E-mail:zhangbo_wl@buu.edu.cn

sitosterol)、豆甾醇(stigmasterol)以及菜油甾醇(campesterol),其中以 β -谷甾醇为主,占总植物甾醇的60%~90%^[2]。

因为植物甾醇的结构与胆固醇(胆固醇)相似,所以其在人体的吸收途径和胆固醇一样,通过胆固醇吸收蛋白(Niemann Pick C1 like 1, NPC1L1)进行吸收,因而食用植物甾醇可竞争性地抑制人体肠道对胆固醇的吸收,从而起到降低血液中胆固醇的作用^[3]。目前普遍认为,植物甾醇通过抑制小肠对外源性胆固醇(从食物中摄取)和内源性胆固醇(来源于胆汁)的吸收,而起到降低血清中胆固醇的作用^[4-5]。有研究表明,每天服用2.2 g左右的植物甾醇或植物甾醇酯即可使血浆中胆固醇降低60%左右,低密度脂蛋白胆固醇降低12%左右^[6-9]。

最近, Vanmierlo 等^[10]的研究结果表明,植物甾醇在脑和肝脏等组织中大量积累高达2~3倍。植物甾醇可透过血脑屏障,且不可逆地积累在脑组织中。而 Weingärtner 等^[11]进行的动物试验结果显示,在食物中添加植物甾醇和植物甾醇烷醇可使血浆中胆固醇浓度降低,同时也使植物甾醇和植物甾醇烷醇在血浆中的浓度升高,在肝脏和脑组织中的含量增加,并且血液中单核细胞的数量以及超氧化和脂质过氧化产物的含量也增加。McDaniel 等^[12]对于膳食补充植物甾醇的安全性也提出了质疑,指出喂养植物甾醇对ATP结合盒转运子G5/G8基因敲除鼠有较大的毒性作用。这些试验研究均表明有必要深入研究食物中添加植物甾醇和植物甾醇烷醇的安全性和临床有效性。

本研究采用未分化的人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞作为细胞模型,通过观察SH-SY5Y细胞在植物甾醇存在情况下的细胞形态、细胞存活率以及细胞凋亡的变化,初步探讨植物甾醇的体外神经毒性作用。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

超净工作台、CO₂培养箱、倒置显微镜、流式细胞仪等。植物甾醇(含量: β -谷甾醇 \geq 40%,菜油甾醇 \geq 20%,豆甾醇 \geq 15%,总含量 \geq 95%,陕西森弗生物技术有限公司)、DMEM/F12培养基(美国Gibco)、胎牛血清(浙江天航生物科技有限公司)、胰蛋白酶(Invitrogen)、DMSO(Sigma-Aldrich)、MTT(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及形态观察

使用含10%胎牛血清及1%双抗(青霉素-链霉

素)的DMEM/F12培养基,于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞。设定植物甾醇浓度为0、0.5、1、2、4、8、16、32 μ mol/L(将植物甾醇溶于无水乙醇中,配成10 mmol/L的原液,后将原液溶于无血清培养基中配制各浓度植物甾醇溶液),倒置显微镜下观察各组细胞形态的变化。

1.2.2 MTT法测细胞存活率

将细胞转接至96孔板中,细胞浓度调整为 4×10^3 个/孔。加植物甾醇后继续培养6、24、48 h,每个浓度设定平行的6个孔,每孔加MTT 20 μ l,继续孵育4 h,弃上清液,每孔加入150 μ l的DMSO,振荡10 min,选择570 nm波长,在酶标仪上测定吸光度值,细胞活力以对照组的百分比表示。

1.2.3 AnnexinV-PI双染色法测细胞凋亡

设定植物甾醇浓度为0、0.5、1、2、4、8 μ mol/L。细胞培养24 h后,收集待测细胞,弃上清液,用预冷的PBS润洗2次,4℃、1 000 r/min离心5 min,弃上清。将细胞重悬于200 μ l binding buffer,加入10 μ l AnnexinV-FITC,避光室温反应15 min或4℃反应30 min。细胞悬液用200目筛网过滤,转移至流式管中,样品临上机之前加5 μ l PI,迅速检测。每组3个平行进行测定。

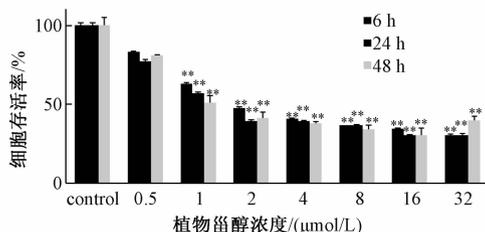
1.3 统计学分析

用SPSS 13.0统计软件进行数据录入和单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。实验数据均用means \pm s表示。

2 结果与分析

2.1 植物甾醇对SH-SY5Y细胞存活率的影响

由图1可知,随着植物甾醇浓度的增大,SH-SY5Y细胞存活率降低,当植物甾醇浓度达1 μ mol/L时,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着时间的增长,植物甾醇对细胞生长的抑制率也有所提高,细胞存活率整体呈下降趋势。6、24、48 h的半数致死浓度 IC_{50} 分别为2.3、1.2、0.4 μ mol/L。



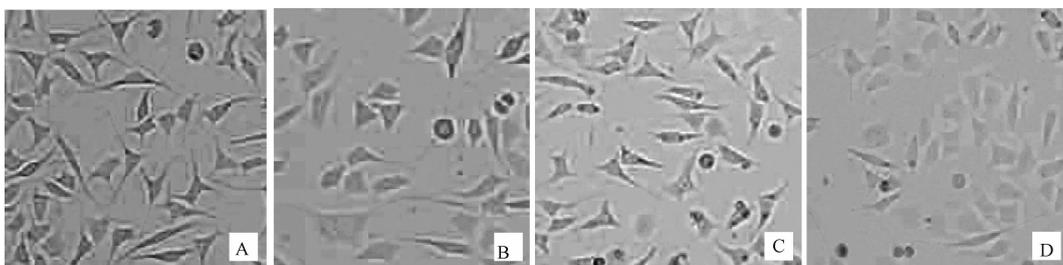
注:与对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$

图1 不同浓度植物甾醇对SH-SY5Y细胞存活率的影响
Figure 1 Changes of cell viability after phytosterol treatment at different concentrations

2.2 植物甾醇对 SH-SY5Y 细胞形态的影响

由细胞增殖试验可得 24 h 时 IC_{50} 为 $1.2 \mu\text{mol/L}$, 故设植物甾醇的浓度分别为 0.5 、 2 、 $8 \mu\text{mol/L}$, 加入 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 浓度的植物甾醇 24 h 后, 与对照组比

较, 神经细胞的突触开始变短、减少。随着植物甾醇的增加, 细胞突触明显减少, 细胞出现萎缩甚至死亡。见图 2。



注: A 为对照组, B-D 浓度分别为 0.5 、 2 、 $8 \mu\text{mol/L}$

图 2 植物甾醇对 SH-SY5Y 细胞形态作用的影响 (24 h)

Figure 2 Cell shape with treatment of phytosterol

2.3 植物甾醇对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

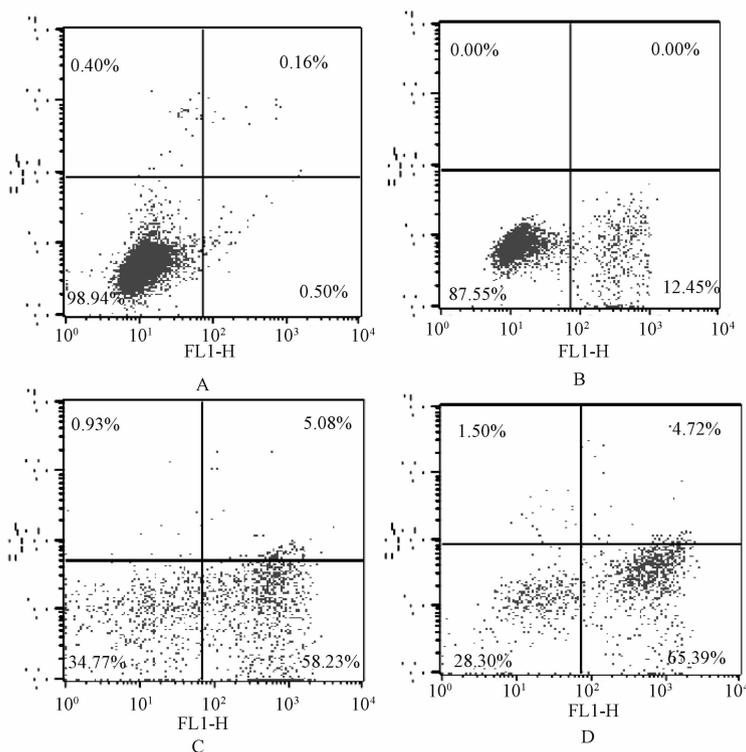
从图 3 和表 1 可知, 随着植物甾醇的增大, 细胞凋亡率增加, 植物甾醇浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率为 12.5% , 植物甾醇浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时, 凋亡率达到 64.31% , 植物甾醇浓度为 $8 \mu\text{mol/L}$ 时, 凋亡率高达 70.11% 。而且, 加入植物甾醇 24 h 后, 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响主要集中在早期凋亡。

表 1 植物甾醇对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Table 1 Apoptosis of SH-SY5Y cell line in different phytosterol groups

浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	凋亡率/%		
	早期	晚期	总凋亡率
0	0.50 ± 1.48	0.16 ± 2.49	0.66 ± 3.97
0.5	$12.45 \pm 3.25^*$	0.10 ± 0.01	$12.45 \pm 3.26^*$
2	$58.23 \pm 5.46^{**}$	6.08 ± 2.59	$64.31 \pm 8.05^{**}$
8	$65.39 \pm 4.39^{**}$	4.72 ± 1.62	$70.11 \pm 6.01^{**}$

注: 与对照组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$



注: A 为对照组, B-D 浓度分别为 0.5 、 2 、 $8 \mu\text{mol/L}$

图 3 植物甾醇对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 (24 h)

Figure 3 Changes of cell apoptosis with treatment of phytosterol

3 讨论

近年来的研究表明,大量摄入植物甾醇以及植物甾醇酯会对机体产生毒副作用^[13-14]。植物甾醇还大量积累在脑和肝脏等组织中。同时还发现,植物甾醇可透过血脑屏障并不可逆地积累在脑组织中^[9],不同的植物甾醇穿过血脑屏障的能力不同,菜油甾醇透过血脑屏障的能力远大于谷甾醇,体外培养脑内皮细胞试验也表明这一点。

细胞凋亡(apoptosis)是细胞内外环境变化以及基因调控所引发的细胞主动死亡的过程,对保持机体处于稳定状态起着重要作用^[15-16]。细胞凋亡分为早期和晚期两个阶段。早期检测有4种:磷脂酰丝氨酸(PS)在细胞外膜上的检测(早期PS从细胞膜内侧转移到外侧);细胞内氧化还原状态改变的检测;细胞色素C的定位检测;线粒体膜电位变化的检测。由于细胞凋亡晚期中,核酸内切酶在核小体之间剪切核DNA,产生大量长度在180~200 bp的DNA片段。晚期检测有3种方法:通过DNA末端转移酶检测、连接介导的PCR检测、端粒酶检测。

本试验采用体外培养人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞,研究植物甾醇对神经细胞的作用及其机理。随着植物甾醇浓度的增加和培养时间的延长,细胞的形态发生了明显变化。通过MTT试验检测细胞活性的结果表明,随着植物甾醇浓度的增加和培养时间的延长,细胞存活率降低,说明植物甾醇对神经细胞的生长有抑制作用。在细胞增殖试验结果的基础上,我们检测了植物甾醇对SH-SY5Y细胞的凋亡的影响,结果表明,随着植物甾醇浓度的升高,细胞凋亡率升高。与细胞增殖试验结果相对应,植物甾醇能够引起SH-SY5Y细胞产生凋亡,尤其是早期凋亡。这些结果表明植物甾醇可能对神经细胞有一定的毒性作用,可抑制体外培养的SH-SY5Y细胞的增殖,引起细胞凋亡。而对于可能的凋亡途径,需要更深入的研究和探讨。

参考文献

[1] 韩军花,杨月欣.植物甾醇的性质、功能及应用[C].营养与保健食品研究及科学进展学术资料汇编,2002.
[2] XU X L, Robert Bittman, Guy Duportail, et al. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of

ordered sphingolipid/sterol domains(rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide [J]. Biol Chem, 2001, 276(36):33540-33546.

- [3] L'Abbe M R, Dumais L, CHAO E, et al. Health claims on foods in Canada [J]. J Nutr, 2008, 138(6):1221S-1227S.
[4] Ostlund R E. Phytosterols in human nutrition [J]. Annu Rev Nutr, 2002, 22:533-549.
[5] Weststrate J A, Meijer G W. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects [J]. Eur J Clin Nutr, 1998, 52(5):334-343.
[6] Lees A M, Mok H Y I, Lees R S, et al. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance [J]. Atherosclerosis, 1977, 28(3):325-338.
[7] Davis H R. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis [J]. Biol Chem, 2004, 279(32):33586-33592.
[8] Lichtenstein A H, Appel L J, Brands M, et al. Summary of American heart association diet and lifestyle recommendations revision 2006 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(10):2186-2191.
[9] Law M. Plant sterol and stanol margarines and health [J]. BMJ, 2000, 320(7238):861-864.
[10] Vanmierlo T, Weingärtner Oliver, Susanne van der Pold, et al. Dietary intake of plant sterols stably increases plant sterol levels in the murine brain [J]. Lipid Res, 2012, 53(4):726-735.
[11] Weingärtner O, Ulrich C, Lütjohann D, et al. Differential effects on inhibition of cholesterol absorption by plant stanol and plant sterol esters in apoE -/- mice [J]. Cardiovasc Res, 2011, 90(3):484-92.
[12] McDaniel A L. Phytosterol Feeding Causes Toxicity in ABCG5/G8 Knockout Mice [J]. Am J Pathol, 2013, 182(4):1131-1138.
[13] Weingärtner O, Lütjohann D, Ji S, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols [J]. Am Coll Cardiol, 2008, 51(16):1553-1561.
[14] Calpe-Berdiel L, Méndez-González J, Blanco-Vaca F, et al. Increased plasma levels of plant sterols and atherosclerosis: a controversial issue [J]. Curr Atheroscler Rep, 2009, 11(5):391-398.
[15] Palojoki E. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats [J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2001, 280(6):H2726-H2731.
[16] Mirkes P E. 2001 Warkany lecture: To die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development [J]. Teratology, 2002, 65(5):228-239.