

论著

反油酸对人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞线粒体功能和细胞自噬的影响

范荣,孙昊,席元第,周催,吕晨艳,杨春,蔡夏夏,肖荣,麻微微

(首都医科大学公共卫生学院,北京 100069)

摘要:目的 研究反油酸对人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞线粒体功能和细胞自噬的影响。方法 体外培养人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞,加入不同剂量(0、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)的反油酸,24 h 后收集细胞,采用透射电镜观察细胞自噬小体;采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞活力;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)和蛋白免疫印迹(western blot)方法检测细胞自噬相关的基因和蛋白表达水平。结果 透射电镜观察细胞结构发现,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 反油酸可使细胞内出现自噬小体,并可以引起细胞活力下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$);100 $\mu\text{mol/L}$ 反油酸作用 24 和 48 h 后,细胞活力明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);100 $\mu\text{mol/L}$ 反油酸可使 SH-SY5Y 细胞中细胞色素 C(cytochrome c, cyt-c)基因 mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);随着反油酸浓度的升高,细胞浆中 cyt-c 蛋白表达水平逐渐升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。但是不同剂量的反油酸对 SH-SY5Y 细胞自噬微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)基因、Beclin1 基因、p62 基因、自噬相关基因 5(atg5)、自噬相关基因 12(atg12)mRNA 水平表达差异无统计学意义($P > 0.05$);但与对照组比较,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 反油酸可使 SH-SY5Y 细胞 LC3B 和 Beclin1 蛋白表达水平逐渐上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 反油酸可以引起人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞活力下降,可能与其引起细胞自噬小体形成,上调自噬相关蛋白表达水平,促进线粒体 cyt-c 蛋白释放入细胞浆有关。

关键词:反式脂肪酸;反油酸;线粒体;细胞自噬;人神经母细胞瘤细胞;神经退行性疾病;基因;细胞色素 C;蛋白

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2018)03-0223-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.03.001

Effect of elaidic acids on mitochondrial function and autophagy in SH-SY5Y cells

FAN Rong, SUN Hao, XI Yuan-di, ZHOU Cui, LYU Chen-yan, YANG Chun,

CAI Xia-xia, XIAO Rong, MA Wei-wei

(School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective The aim of this study was to determine the effects of elaidic acid on mitochondrial function and autophagy in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Methods** SH-SY5Y cells were cultured in vitro and treated with different concentrations (0, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) of elaidic acid for 24 hours. The morphology of cells and intracellular autophagosomes were observed by transmission electron microscope. The cell viability was detected by using CCK-8 detection kit. Real-time polymerase chain reaction (PCR) and western blot were used to measure the autophagy-related genes and proteins expression. **Results** Observation of cell structures found that intracellular autophagosomes formed with 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ of elaidic acid. 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ of elaidic acid might result in a decline in cell viability ($P < 0.01$). 100 $\mu\text{mol/L}$ of elaidic acid significantly decreased cell viability both after 24 and 48 h ($P < 0.05$). 100 $\mu\text{mol/L}$ of elaidic acid significantly decreased the cytochrome c (cyt-c) gene mRNA expression in SH-SY5Y cells ($P < 0.05$). The expression level of cyt-c protein in the cytoplasm was gradually elevated with the increase of elaidic acid concentrations ($P < 0.05$). But the differences with regard to the LC3B, Beclin1, p62, atg5 and atg12 genes mRNA expression levels of SH-SY5Y cells were not significant across different doses ($P > 0.05$). 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ of elaidic acid gave rise to the expression of LC3B and Beclin1 proteins up-regulated compared with the normal group ($P < 0.05$).

Conclusion Elaidic acid contributes to the decrease of SH-SY5Y cells viability, which may be associated with the

收稿日期:2018-04-02

基金项目:国家自然科学基金项目(81472982,81773406);北京市教育委员会科技发展计划一般项目(KM201710025007)

作者简介:范荣 女 硕士生 研究方向为营养与老年相关慢性疾病 E-mail: fanrong53782@sina.com

通信作者:麻微微 女 副教授 研究方向为营养与老年相关慢性疾病 E-mail: weiweima@ccmu.edu.cn

formation of autophagosomes, up-regulating autophagy protein expression, promoting the changes of mitochondrial permeability and releasing mitochondrial cyt-c protein into cytoplasm.

Key words: Trans fatty acids; elaidic acid; mitochondria; autophagy; SH-SY5Y cells; neurodegenerative diseases; genes; cytochrome c; protein

反式脂肪酸(trans fatty acids, TFAs)属于不饱和脂肪酸,包括单不饱和 TFAs 和多不饱和 TFAs,其化学结构分别对应一个或多个非共轭的双键构型^[1]。近年来,有研究^[2]表明,长期摄入富含 TFAs 的食物与老年痴呆症等神经退行性疾病的发生发展具有一定关联。研究^[3]发现,TFAs 能穿过血脑屏障,与脑中脂质结合,抑制长链多不饱和脂肪酸的合成,加速神经退行性疾病的病程^[4]。细胞自噬是清除细胞内蛋白质聚集体的重要途径^[5],适当的自噬过程可以促进疾病的恢复,而非正常自噬则将使疾病恶化^[6-7]。线粒体是细胞凋亡调控中心,在细胞自噬的发生中具有重要作用。综上所述,TFAs 可能通过调节细胞自噬水平和线粒体功能来影响认知功能,但具体机制尚不明确,因此,本研究拟采用 TFAs 的主要成分反油酸(elaidic acid)为研究对象,探讨其对神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞自噬和线粒体功能的影响,为研究神经退行性疾病发病机制及其相应治疗方案提供基础数据和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源

神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞来源于北京协和细胞资源中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

恒温 CO₂ 培养箱, IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus), HT7700 型透射电子显微镜(日本 HITACHI), Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(奥地利 Tecan), PTC-0200 型 DNA Engine[®] Peltier Thermal Cycler 热循环仪、CFX Connect[™] 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测系统、蛋白免疫印迹(western blot)检测设备均购自美国 Bio-Rad。

改良杜氏伊格尔培养基(DMEM, 美国 Corning), 青霉素-链霉素混合液、胰蛋白酶、细胞计数试剂盒 8(CCK8)均购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 胎牛血清、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)均购自美国 HyClone, 二甲基亚砜(DMSO)、反油酸(纯度 ≥99.0%)均购自美国 Sigma, 细胞总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega), RevertAid[™] 第一链 cDNA 合成试剂盒(德国 Thermo), 通用型 SYBR[®] 快速定量

PCR 试剂盒(美国 KAPA), 线粒体和胞浆蛋白制备试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司), 自噬微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)多克隆抗体、β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体均购自美国 CST, Beclin1 多克隆抗体、孔蛋白-线粒体内参照(VDAC1)多克隆抗体(美国 Abcam), LC3B、Beclin1、自噬相关基因 5(atg5)、自噬相关基因 12(atg12)、p62、β-actin 基因合成引物均由上海生工生物工程有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制

1 g 反油酸完全溶于 3.54 ml DMSO 中, 配制成 1 mol/L 储备液后, 用 DMEM 稀释为 10 mmol/L 工作液, 分装在离心管中, -80 °C 保存。染毒前, 将工作液稀释为 400 μmol/L, 采用倍比稀释的方法进行染毒, 同时, 采用和反油酸同样的方法配制溶剂对照。

1.2.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、0.1 g/ml 链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5.0% CO₂ 培养箱中培养 SH-SY5Y 细胞。

1.2.3 细胞分组与处理

将 SH-SY5Y 细胞以 2.0 × 10⁵/ml 接种于 25 cm² 培养瓶中 24 h 后染毒, 各组反油酸的剂量分别为 0(对照组)、10、20、50、100 μmol/L, 继续培养 24 h 后收集细胞备用。

1.2.4 细胞形态学观察

将各组细胞用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 胰酶消化后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清收集细胞。使用含 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L PB 固定细胞 3 h, 弃固定液, 用 0.1 mol/L PB 清洗样品 3 次, 每次 10 min, 将固定细胞放入 2% 琼脂糖凝胶中, 用 4% 锇酸固定 1 h, 使用预冷 0.1 mol/L PB 清洗, 醋酸双氧铀染色 1 h 后梯度乙醇(30%、60%、70%、90% 及 100%)脱水, 采用环氧树脂包埋并制作超薄切片, 以 5% 醋酸双氧铀和 2% 枸橼酸铅双重染色后, 在透射电子显微镜下观察细胞超微结构并拍照。

1.2.5 CCK8 检测细胞活力

将细胞以 1.0 × 10⁶/ml 接种于 96 孔板中, 设 5 组, 每组 6 孔, 每孔加细胞悬液 100 μl, 在 37 °C、5.0% CO₂ 培养箱中培养 24 h 使细胞完全贴壁后, 将每孔原始培养基取出, 置换为无血清培养基配制的反油酸, 每组浓度分别为 10、20、50、100 μmol/L,

同时设置对照组(0 $\mu\text{mol/L}$),继续培养 24 h,于每孔加入 20 μl CCK8 试剂(避光保存),孵育 4 h 后,每孔加入 150 μl DMSO,摇床低速振荡 10 min,酶标仪 570 nm 波长测定吸光度(A)值。细胞活力(%) = $[A(\text{处理}) - A(\text{空白})] / [A(\text{对照}) - A(\text{空白})] \times 100\%$ 。重复 3 次,如结果趋势一致,同时为避免批次间误差,选择其中一次具有代表性的结果。

1.2.6 细胞线粒体的提取

通过线粒体蛋白制备试剂盒从细胞中分离线粒体和胞浆成分。传代培养的细胞用 PBS 洗 3 次,再用胰酶消化后,PBS 洗涤,4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞(每次提取需要 2×10^7 个细胞),加入 1.5 ml 冰预冷的线粒体-细胞缓冲液(mito-cyto isolation buffer,试剂盒提供)重悬细胞,将细胞悬液转移到匀浆器中,于冰上研磨后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 $\times g$ 离心 5 min,收集上清液并转移到新的离心管,再次 800 $\times g$ 离心 5 min,收集上清液并转移到新的离心管 12 000 $\times g$ 离心 10 min,管底沉淀即为线粒体。采用 western blot 方法检测线粒体和 cyt-c 蛋白水平。

表 1 LC3B, Beclin1, atg5, atg12, p62 和 β -actin 引物序列

Table 1 LC3B, Beclin1, atg5, atg12, p62 and β -actin primers'sequence

引物	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	温度/ $^{\circ}\text{C}$
β -actin	AAACGGCTACCACATCCA	CTCATTCCAATTACAGGG	48
LC3B	CTGTTGGTGAACGGACACAG	CAATTCATCCCGAAGCTCT	50
Beclin1	GAGGATGGAAGGCTTAAG	GCCTGGGCTGTGCTAAGT	50
atg5	GGCCATCAATCGGAAACTCAT	CAGCCACAGGACGAAACAGC	50
atg12	TAATTGGTCCCCCTACTCCG	ATCCGTAAGTCTTCCCCTCCAG	49
p62	TGCCCAGACTACGACTTGTG	GAGAAGCCCTCAGACAGGTG	57

1.2.8 western blot 法检测线粒体及胞浆中 cyt-c 蛋白及细胞自噬相关蛋白表达水平

自噬相关蛋白表达水平的检测:细胞经过反油酸染毒孵育 24 h 后,加入 0.5 ml 的蛋白裂解缓冲液,用前加苯甲基磺酰氟(PMSF),使 PMSF 的终浓度为 1 mmol/L,充分裂解后,4 $^{\circ}\text{C}$ 涡旋振荡 40 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 $\times g$ 离心 15 min,上清液即为总蛋白,用二奎琳甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒进行蛋白定量。

取 60 μg 蛋白全细胞蛋白电泳样品,用 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳分析,初始电压为 80 V,当染料进入分离胶后,电压调到 120 V。电泳结束后,用聚偏二氟乙烯(PVDF)膜进行蛋白的转膜(4 $^{\circ}\text{C}$ 、60 V、2 h)。转膜后,用 5% 的脱脂牛奶封闭膜 1 h 后,用蒸馏水冲洗膜 3 次;用洗膜缓冲液(TBST)稀释一抗,将漂洗后的 PVDF 膜放入相应抗体中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。采用按 1:5 000 稀释于 TBST 的抗兔 IgG,室温孵育膜 1 h。将漂洗过的膜用增强化学发光法(ECL)显色液显色,暗室里曝光

1.2.7 实时 PCR 检测细胞自噬相关基因 mRNA 表达水平

细胞经反油酸染毒,胰酶消化离心后,加入 200 μl RNA 裂解液,刮下细胞,按照总 RNA 提取试剂盒的方法提取细胞中 RNA,测定含量后,取 1 μg 总 RNA 于无菌 EP 管中,70 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 10 min 后混匀放置冰上 5 min,按照逆转录试剂盒说明书,将 RNA 逆转录为 cDNA,配制逆转录反应体系总体积为 20 μl 。以 cDNA 作为模版,使用实时荧光定量 PCR 仪对 β -actin、LC3B、Beclin1、p62、atg5、atg12 基因的 cDNA 全序列进行扩增。参考美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库设计每个基因的特异引物,引物由上海生工生物公司合成(见表 1)。PCR 程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 热启动 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。实时荧光 PCR 产物用 Bio-Rad CFX Manager 分析软件进行半定量分析,以 β -actin 作为内参基因,采用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 表达相对比值(Ct 为循环数), $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{处理组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。差别倍数 = $2^{\Delta\Delta Ct}$,对照组的数值设为 1。试验重复 3 次。

后扫描。观察结果用扫描仪扫描照片,用 Fluorchem FC2 软件进行图像并分析。以 β -actin 蛋白作为内参照,用目的蛋白与相应的 β -actin 蛋白条带平均光密度比值表示目的蛋白的相对表达量。

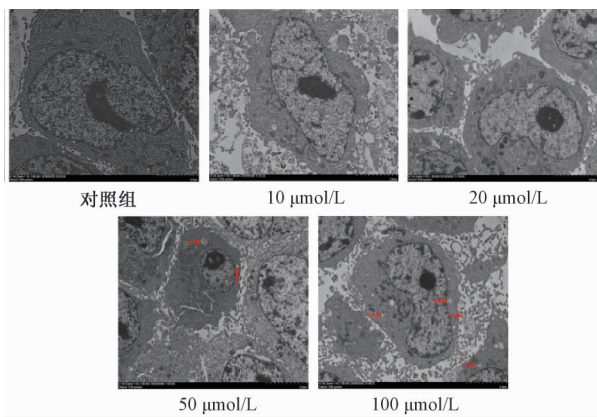
将上述提取的细胞线粒体样品按照此 western blot 步骤检测线粒体及胞浆中 cyt-c 蛋白表达水平。线粒体中 cyt-c 蛋白以孔蛋白-线粒体内参照蛋白(VDAC1)作为内参照,胞浆中 cyt-c 蛋白以 β -actin 蛋白作为内参照,用目的蛋白与相应的内参照条带平均光密度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用最小显著性差异(LSD)法或 Tamhane's 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有试验均重复 3 次或以上。

2 结果

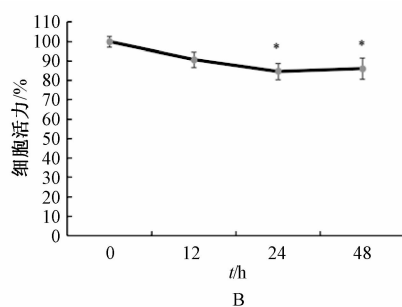
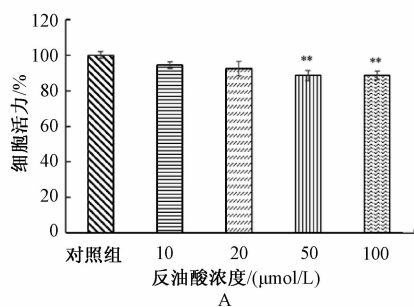
2.1 反油酸对 SH-SY5Y 细胞自噬小体形成的影响
由图 1 可见,对照组细胞生长良好,未见形态异



注:放大倍数均为1500倍;标尺=5.0 μm

图1 反油酸对SH-SY5Y细胞自噬的影响

Figure 1 Effect of elaidic acid on autophagy of SH-SY5Y cells



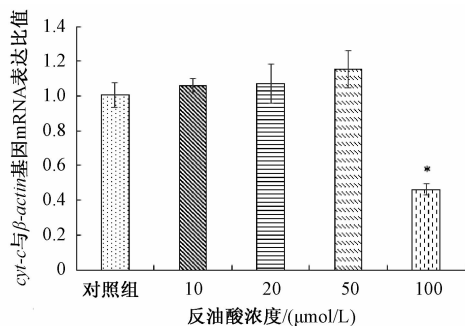
注:A为不同剂量反油酸作用24 h后对SH-SY5Y细胞活力的影响;B为100 μmol/L反油酸作用不同时间对SH-SY5Y细胞活力的影响;*表示与对照组比较, $P < 0.05$,**表示与对照组比较, $P < 0.01$

图2 反油酸对SH-SY5Y细胞活力的影响($n = 6$)

Figure 2 Effect of different elaidic acid on cell viability of SH-SY5Y cells

2.3 反油酸对SH-SY5Y细胞 *cyt-c* 基因和线粒体及细胞浆 *cyt-c* 蛋白表达的影响

由图3可见,加入100 μmol/L反油酸后,与对照组比较,细胞内 *cyt-c* 基因 mRNA 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由图4可见,随着反油酸的剂量逐渐增加,与对照组比较,线粒体内 *cyt-c* 蛋白水平逐渐降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);而细胞浆中 *cyt-c* 蛋白表达水平逐渐升高,差



注:*表示与对照组比较, $P < 0.05$

图3 反油酸对SH-SY5Y细胞 *cyt-c* 基因 mRNA 表达的影响($n = 3$)

Figure 3 Effect of elaidic acid on *cyt-c* gene mRNA expression in SH-SY5Y cells

常。随着反油酸浓度的升高,SH-SY5Y 细胞逐渐皱缩,细胞间隙增大,核固缩,核膜完整但核内结构消失,转为无结构致密均质。50 和 100 μmol/L 组出现低电子密度的自噬小体。

2.2 反油酸对SH-SY5Y细胞活力的影响

SH-SY5Y 细胞加入不同剂量的反油酸后,各组细胞活力均有不同程度的下降。其中,当反油酸浓度为50 和 100 μmol/L 时,作用细胞24 h 后,与对照组比较,细胞活力明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。SH-SY5Y 细胞加入100 μmol/L 反油酸作用24 和 48 h 后,细胞活力均明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图2。

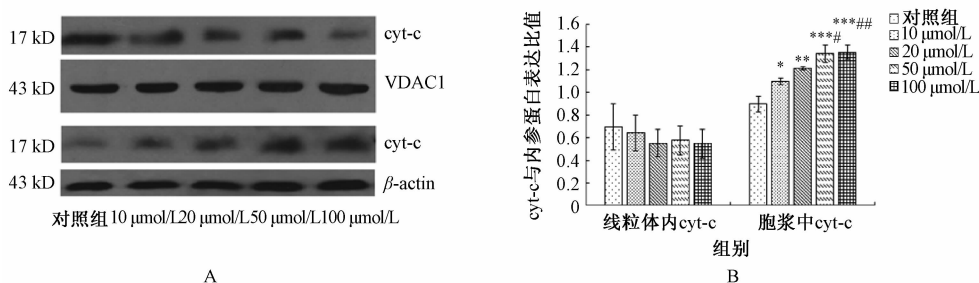
异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 反油酸对SH-SY5Y细胞自噬相关基因和蛋白表达的影响

随着反油酸浓度的增加,与对照组比较,各组细胞自噬相关基因表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);50 和 100 μmol/L 反油酸可使SH-SY5Y 细胞 LC3B 和 Beclin1 蛋白表达水平逐渐升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图5~6。

3 讨论

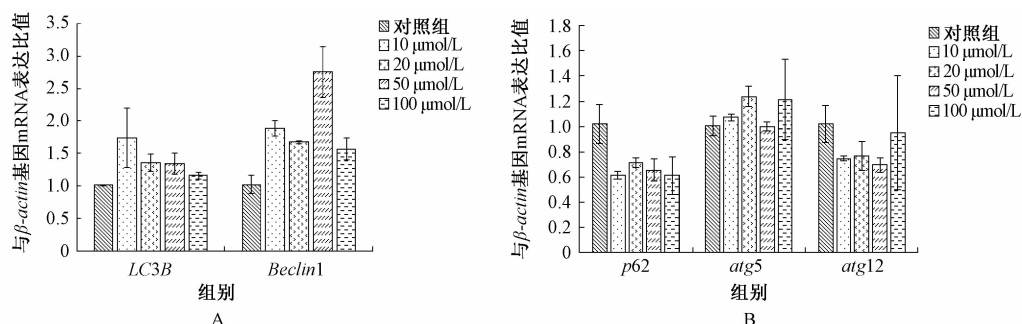
目前国内外研究暂缺乏对于TFAs与SH-SY5Y细胞的毒性剂量-反应关系研究,而据文献报道,TFAs与人成熟脂肪细胞^[8]、血管内皮细胞^[9]、HepG2细胞^[10]、细胞活力及功能研究中表明,100 μmol/L的反油酸可以引起细胞产生毒性作用。本研究采用CCK-8法检测细胞活力,发现100 μmol/L的反油酸能够引起细胞活力下降,因此,确定选用100 μmol/L作为高剂量。本研究结果表明,加入50 和 100 μmol/L的反油酸后,细胞活力下降,细胞内出现自噬小体;100 μmol/L反油酸作用24 和 48 h 后,细胞活力均明显降低;反油酸可使



注:A为线粒体内和细胞浆中 cyt-c 蛋白及相应内参照的 western blot 条带,图中 VDAC1 为线粒体内 cyt-c 蛋白内参照, β -actin 为胞浆中 cyt-c 蛋白内参照;B为线粒体内和细胞浆中 cyt-c 蛋白表达平均光密度值与相应内参照平均光密度值的比值柱形图; *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与对照组比较, $P < 0.01$; ***表示与对照组比较, $P < 0.001$; #表示与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$; ##表示与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.01$

图4 反油酸对 SH-SY5Y 细胞线粒体和细胞浆 cyt-c 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

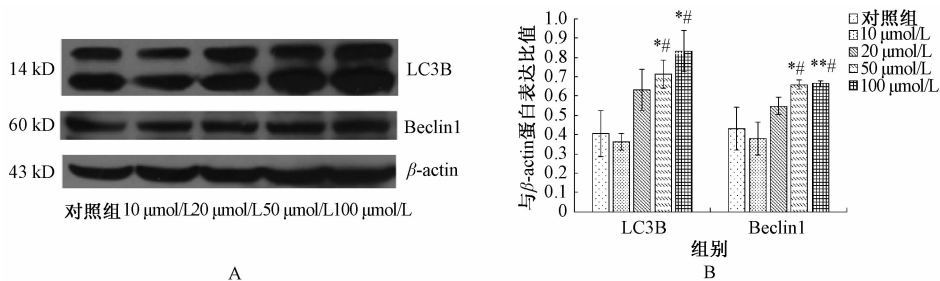
Figure 4 Effect of elaidic acid on the expression of cyt-c proteins in mitochondria and cytoplasm of SH-SY5Y cells



注:A为 LC3B、Beclin1 基因与内参照 mRNA 水平表达比值的柱形图;B为 p62、atg5 和 atg12 基因与内参照 mRNA 水平表达比值的柱形图

图5 反油酸对 SH-SY5Y 细胞 LC3B、Beclin1、p62、atg5 和 atg12 基因 mRNA 表达的影响 ($n = 3$)

Figure 5 Effect of elaidic acid on LC3B, Beclin1, p62, atg5 and atg12 mRNA expression in SH-SY5Y cells



注:A为 LC3B 和 Beclin1 蛋白及内参照的 western blot 条带;B为 LC3B 和 Beclin1 蛋白表达平均光密度值与内参照平均光密度值的比值柱形图; *表示与对照组比较, $P < 0.05$; **表示与对照组比较, $P < 0.01$; #表示与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$

图6 反油酸对 SH-SY5Y 细胞 LC3B 和 Beclin1 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Figure 6 Effect of elaidic acid on LC3B and Beclin1 proteins expression in SH-SY5Y cells

胞浆内 cyt-c 蛋白表达水平增高,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的反油酸可使 LC3B 和 Beclin1 蛋白表达水平逐渐升高。

研究^[11]发现,TFAs 通过影响铺展、黏附及细胞膜成分等方面降低细胞的存活率,生长抑制率与反油酸浓度和作用时间呈正相关^[12],其改变细胞膜的流动性,进而影响细胞膜受体的响应,加重脑神经细胞氧化损伤水平^[13],引起脑神经细胞内质网应激-线粒体损伤,从而影响细胞的生命活动^[10]。TFAs 将阻碍必需脂肪酸和胆固醇等脂质在细胞内的正常代谢^[14],TFAs 对细胞表现出了明显的细胞毒性^[15]。本研究结果提示,反油酸表现出明显的细胞毒性,随反油酸浓度升高,细胞间隙增大,细胞内

形成自噬小体;50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的反油酸可明显降低细胞活力。

自噬,即自体吞噬,是指溶酶体降解利用细胞内物质成分的过程。一些情况下,自噬促进细胞死亡,导致或促进疾病的发展进程^[16]。研究^[17]显示,在细胞进行自噬时自噬小体将增多,自噬小体增多可视为细胞自噬水平提高的表现。研究^[18]表明,当发生神经退行性疾病时,细胞将发生自噬,如创伤性脑损伤后有明显的自噬发生。同时有研究^[19]表明,发生神经退行性疾病时神经细胞和星形胶质细胞内自噬相关分子 Beclin1 表达明显上调;在对肌萎缩性脊髓侧索硬化症模型小鼠的研究^[20]中发现,在

症状出现前阶段神经细胞有明显的自噬增加,运动神经细胞胞体有明显自噬改变。另一项研究^[21]证明,在肌萎缩性脊髓侧索硬化症症状出现阶段自噬小体增多。由此可见,在神经退行性疾病发生时,常伴有非正常的细胞自噬。

Beclin1、LC3B作为自噬检测的标志性蛋白,其主要定位在细胞浆及部分细胞核内部,其表达情况反映了胞内自噬体的数量^[22]。LC3B因子的主要作用是控制自噬体的形成,自噬体经进一步引导与溶酶体结合后进行完全自噬^[23],细胞进行自噬时LC3B的蛋白表达量将增加^[24],其含量与自噬泡数量呈正比,是自噬研究中最明显、最常用的标志物^[25]。Beclin1基因位于人类染色体17q21上,是哺乳动物参与自噬的特异性基因。目前的研究^[26-27]表明,Beclin1基因参与细胞自噬和细胞凋亡过程,是自噬小体形成的关键分子。本研究结果表明反油酸上调LC3B和Beclin1蛋白的表达水平,表现出促进细胞自噬的作用。

Beclin1蛋白作为各种调控通路的汇集点发挥了至关重要的作用,可以影响线粒体膜的通透性,促进线粒体cyt-c蛋白的释放。cyt-c蛋白是一种水溶性蛋白,主要存在于线粒体内外膜间隙中,线粒体cyt-c蛋白是控制细胞凋亡发生的阀门,它具有调控细胞能量代谢和凋亡的双重功能,直接介导细胞凋亡^[28]。本研究中,随着加入反油酸的剂量逐渐增加,与对照组比较,线粒体内cyt-c蛋白水平表达逐渐降低,而细胞浆中cyt-c蛋白表达水平逐渐升高,提示反油酸引起了cyt-c蛋白从线粒体释放到细胞浆中,最终导致了细胞凋亡。

综上所述,本研究结果表明反油酸可使SH-SY5Y细胞活力下降,导致LC3B和Beclin1蛋白表达水平逐渐增加,提高线粒体膜的通透性,使线粒体cyt-c蛋白释放到胞浆中的浓度增高,最终导致细胞凋亡。本研究探讨了TFAs对SH-SY5Y细胞的毒性作用机制,为研究神经退行性疾病的发生发展提供了依据。

参考文献

- [1] 魏丽芳,李培武,谢立华,等.食用油脂中反式脂肪酸研究进展[J].食品工业科技,2008(2):294-298.
- [2] 秦书琪.反式脂肪酸与老年痴呆症发病相关性的研究进展[J].卫生研究,2015,44(1):143-146.
- [3] 胡燕,陈忠杰.不饱和脂肪酸与人体健康关系探讨[J].肉类研究,2011,25(1):17-20.
- [4] 藏小丹,申玉凤.反式脂肪酸的危害及其检测方法研究进展[J].中国林副特产,2012,33(3):79-82.
- [5] 席兴宇,孙寅玮.细胞自噬与神经退行性疾病[J].生物学通报,2014,49(6):11-14.
- [6] 刘雨晴,陈丰嘉,吴海歌.自噬与小胶质细胞相关神经炎症[J].中国生物化学与分子生物学报,2016,32(9):976-983.
- [7] 地里夏提·白克力,伊利夏提·肖开提,李学军.自噬在肿瘤耐药中的作用研究进展[J].国际药理学杂志,2015,42(3):303-309.
- [8] 白英龙,孟涛,任丽娜,等.反式脂肪酸对人脂肪细胞脂联素mRNA表达的影响[J].环境与健康杂志,2012,29(6):511-513.
- [9] 邱斌,刘蓉,邓泽元,等.反式脂肪酸TransC18:1诱导内皮细胞凋亡的研究[J].食品与生物技术学报,2011,30(4):588-591.
- [10] 刘莹,刘会昌,石建新.反油酸处理对人HepG2细胞代谢组的影响[J].食品工业科技,2016,37(11):332-337.
- [11] LOPEZ-GARCIA E, SCHULZE M B, MEIGS J B, et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction [J]. Journal of Nutrition, 2005,135(3):562-566.
- [12] 于化泓,李湘梅,刘蓉,等.反油酸对人脐静脉内皮细胞活力的影响[J].食品科学,2010,31(19):372-374.
- [13] 于化泓,梁忠爽,李湘梅,等.反式脂肪酸对血管内皮细胞损伤的影响[J].食品科学,2011,32(19):244-247.
- [14] 赵晨煜.膳食摄入反式脂肪酸的研究进展[J].农产品加工,2016(10):74-75.
- [15] 刘莹,刘会昌,石建新.膳食反式脂肪酸的风险评估研究进展[J].食品安全质量检测学报,2015(8):3160-3166.
- [16] MARIÑO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(2):81-94.
- [17] 张妮,贾连群,杨关林,等.化痰祛痰方对高脂血症大鼠肝脏自噬小体形成信号通路相关基因的影响[J].中医杂志,2016,57(22):1959-1963.
- [18] SMITH C M, CHEN Y, SULLIVAN M L, et al. Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly? [J]. Neurobiology of Disease, 2011, 43(1):52-59.
- [19] LIU C L, CHEN S Y, DIETRICH D, et al. Changes in autophagy after traumatic brain injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(4):674-683.
- [20] LI L, ZHANG X J, LE W D. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice [J]. Autophagy, 2008, 4(3):290-293.
- [21] MORIMOTO N, NAGAI M Y, MIYAZAKI K, et al. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene [J]. Brain Research, 2007, 1167(5):112-117.
- [22] GUO G F, JIANG W Q, ZHANG B, et al. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer [J]. World Journal of Gastroenterology, 2011, 17(43):4779-4786.
- [23] 高雅,邢皓月.自噬在神经退行性疾病中的作用研究进展[J].中国科技信息,2013(11):169-170.
- [24] LI X F, CHEN D P, OUYANG F Z, et al. Increased autophagy sustains the survival and pro-tumorigenic effects of neutrophils in human hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Hepatology, 2015, 62(1):131-139.
- [25] 李荣虎,于论,缪珀,等.缺氧缺血海马组织中自噬相关蛋白Beclin-1和LC3的表达变化以及雷帕霉素对其表达的影响[J].中国当代儿科杂志,2015,17(4):400-404.
- [26] 叶挺,邵增务. Bcl-2/Beclin-1复合体在自噬中的调节作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2013,29(6):513-519.
- [27] WIRAWAN E, LIPPENS S, VANDEN BERGHE T, et al. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond [J]. Autophagy, 2012, 8(1):6-17.
- [28] 鲁翠芳,李世英.论细胞色素C、细胞凋亡诱导因子与细胞凋亡的关系[J].当代医药论丛,2013,11(11):37-40.