

热量限制对 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响

陈娟¹, 张景燕¹, 王蓉¹, 赵静姝¹, 郭瑾², 吴燕川¹, 赵志炜¹

(1. 首都医科大学宣武医院中心实验室, 北京老年病医疗研究中心, 神经变性病教育部重点实验室, 北京 100053;
2. 中国人民解放军总医院 301 超声诊断科)

【摘要】 目的 观察热量限制培养条件下, SH-SY5Y 细胞抗氧化应激损伤的能力。**方法** 建立过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型。体外培养 SH-SY5Y 细胞, 分为对照组、损伤组 (50、100、250、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)、低糖组 (2 g/L)、低糖 + 损伤组, 进行细胞形态观察、测定各组细胞的噻唑蓝 (MTT) 代谢率、乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率。**结果** 与对照组比较, (50、100、250、500、1 000) $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤 1 h 后 MTT 代谢率测定细胞活力, 50 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其他组与对照组比较, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 细胞活力呈递减趋势, 差异具有显著性 ($P < 0.01$); 选定 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组为损伤应激源。用低糖预处理细胞 24 h, 给与 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 损伤 1 h 后测定 MTT 代谢率显示, 与对照组比较, 损伤组活力明显下降, 低糖组活力上升 ($P < 0.01$); 与损伤组比较, 低糖 + 损伤组活力明显上升 ($P < 0.01$); 继续培养至 7 h 发现, 与对照组比较, 低糖组活力上升 ($P < 0.01$); 与损伤组比较, 低糖 + 损伤组活力明显上升 ($P < 0.01$)。进一步检测 LDH 漏出率显示, 损伤 1 h 后结果显示, 与对照组比较, 损伤组漏出率明显增加 ($P < 0.05$), 低糖组漏出率稍有减少 ($P > 0.05$); 与损伤组比较, 低糖 + 损伤组漏出率明显减少 ($P < 0.01$); 继续培养 7h 显示, 低糖 7h 组与低糖 1 h 组比较, 漏出稍有增多 ($P > 0.05$), 低糖 + 损伤组 7 h 组与低糖 + 损伤组 1 h 组比较漏出率稍有增加 ($P < 0.05$); 细胞形态学观察显示, 未加损伤之前, 低糖组的细胞形态, 与对照组比较无明显改变。加入损伤药物 1h 后的细胞形态与对照组比较无明显改变。加入损伤药物 7 h 后的细胞形态, 低糖组和对照组细胞突起伸展良好细长, 损伤组可见细胞数目明显减少, 死细胞多, 突起回缩, 细胞明显变圆, 贴壁性不好, 透光性差。**结论** 热量限制能提高神经细胞的抗氧化应激能力, 增加细胞生存率, 降低死亡率。

【关键词】 氧化应激; SH-SY5Y 细胞; 细胞培养; 热量限制

【中图分类号】 R33; R734 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)10-0033-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2012. 010. 008

Effect of Caloric Restriction on Oxidative Damage in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y Cells

CHEN Juan, ZHANG Jing-yan, WANG Rong, ZHAO Jing-shu, GUO Jin, WU Yan-chuan, ZHAO Zhi-wei
(Central Laboratory, Beijing Geriatric Medical Research Center, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Xuanwu Hospital of Capital Medical University. Beijing 100053, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of caloric restriction on oxidative damage in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells in vitro. **Methods** To establish an in vitro model of H_2O_2 -induced oxidative stress damage of SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were cultured *in vitro*. The cells were divided into four groups: control group, H_2O_2 (250

【基金项目】北京市自然科学基金(7082043);首都卫生发展科研专项项目(2011-1001-02);北京市卫生系统高层次卫生技术人才计划资助项目(2009-3-64)。

【作者简介】陈娟(1980-),女,在读硕士研究生,研究方向:神经元退行性变的发生机制和防治策略。

【通讯作者】王蓉,女,研究员,博士研究生导师,研究方向:神经元退行性变的发生机制和防治策略。E-mail: rong_wang72@yahoo.com.cn。

$\mu\text{mol/L}$) group, low glucose (2g/L) group, and low glucose + H_2O_2 group. Cell morphology, thiazolyl blue (MTT) metabolism rate, and lactate dehydrogenase (LDH) leakage rate were measured to observe the cell growth status in different groups. **Results** Compared with the control group, the MTT metabolism rate in the cells treated with $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for one hour was not significantly changed ($P > 0.05$), but it was significantly decreased in the 100 , 250 , 500 , $1000\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 -treated groups than that of control group ($P < 0.01$), and there was a tendency that along with the increase of H_2O_2 concentration, the cell activity was increasingly decreased. So, the H_2O_2 concentration of $250\text{ }\mu\text{mol/L}$ was selected to generate oxidative stress. The MTT metabolism rate in the cells pretreated with low glucose for 24 hours and treated with $250\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for one hour was significantly decreased than that of control group ($P < 0.01$), but significantly increased than that of the H_2O_2 group ($P < 0.01$). When the cells were further cultured for 7 hours, the metabolism rate of the low glucose group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). Compared with the H_2O_2 group, the metabolism rate of the low glucose + H_2O_2 group was significantly increased ($P < 0.01$). The LDH leakage rate in the cells treated with $250\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 1 hour was significantly increased than that of the control group ($P < 0.05$). The LDH leakage rate in the low glucose treated group was slightly decreased, and the rate of the low glucose + H_2O_2 group was significantly lower than that of the H_2O_2 -treated group ($P < 0.01$). When the cells were further culture for 7 hours, the LDH leakage rate of the low glucose group treated for 7 hours was slightly higher than that of cells cultured for 1 hour ($P > 0.05$). The LDH leakage rate of the low glucose + H_2O_2 group cultured for 7 hours was slightly higher than that of cells cultured for 1 hour ($P > 0.05$). The histological observation revealed that the morphology of cells treated with low glucose was similar to that of the control group, and it was similar at one hour after H_2O_2 added. At 7 hours after addition of H_2O_2 , the cells of the low glucose group and control group had well stretching cytoplasmic projections, but in the H_2O_2 group, the cell number was significantly reduced, with a lot of dead cells, and the cells became rounded in shape and with poor adherence and transparence. **Conclusion** Caloric restriction can improve the viability and anti-oxidative stress ability of neurons, and reduce the cell mortality.

【Key words】 Oxidative stress; Human neuroblastoma; cell line SH-SY5Y; Cell culture; Caloric restriction

神经退行性疾病的共同特征是特定区域神经元功能的丧失,即神经元的不可逆损伤、死亡。越来越多证据表明,氧化应激参与了神经退行性疾病的病理机制,在阿尔茨海默病、帕金森综合症、脑卒中等疾病中都发现了自由基增多导致的细胞损伤,增多的氧自由基能攻击蛋白质、脂肪酸和脂质膜,从而破坏细胞的功能和完整性。因此,减少神经元内氧自由基的产生,对保护神经元、延缓衰老及对抗损伤有重要意义^[1]。

热量限制饮食在很多物种中能够改善健康和延缓衰老,近年来大量研究发现,热量限制饮食可以减少多种与年龄相关的疾病的发生^[2],但至今其延缓衰老的机制尚未十分清楚。有研究表明,热量限制延缓衰老可能机制之一是抗氧化应激^[3]。热量限制大大降低了脑、心脏和肝脏中线粒体活性氧物质的产率,可能是延缓衰老进程的一个基本机制^[4]。本实验拟通过观察低热量培养对过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响,为进一步探讨热量限制在氧化应激损伤中的保护机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株:人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞来自瑞典卡罗林斯卡医学院。

1.1.2 试剂:噻唑兰 (MTT) 购自 Sigma 公司,二甲基亚砜 (DMSO) 购自北京亚太精细化工公司,乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒,购自北京化工厂,编号 001012,30% 过氧化氢购自北京化工试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理:细胞用 DMEM * F12 (Gibco) 培养基培养 (3.0 g/L -glucose),加入 10% 胎牛血清、青霉素 100 IU/mL 、链霉素 100 IU/mL 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。贴壁细胞生长密度达到 70% ~ 80% 时,分组处理:对照组及损伤组,换用 DMEM * F12 加入 1% 血清,培养 24 h;低糖组及低糖 + 损伤组,换用低糖组培养基为 DMEM (2.0 g/L -glucose) 加 1% 胎牛血清,培养 24 h;予以 $250\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 分别损伤 1 h 和 7 h。用于后续实验。

1.2.2 MTT 代谢率测定:将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板中,细胞接种密度 $1.0 \times 10^4/\text{孔}$,待细胞贴壁生长至 70% ~ 80% 时予以相应处理,加入 MTT 溶液

(5.0 g/L)20 μ L 继续培养 4 h 后,弃去培养液,每孔加入 150 μ L DMSO 作用 10 min 后,用全波长酶标仪 (Multiskan Spectrum)测定 570 nm 处光密度值。

1.2.3 细胞生长形态观察:用倒置显微镜 (Olympus 产品)观察培养的细胞,比较对照组和实验组细胞的形态。

1.2.4 LDH 漏出率测定细胞培养方法:同前,按照 LDH 试剂盒所示方法(比色法),测定 570 nm 处光密度值,同时做条图。

1.3 统计学方法

用 SPSS11.5 软件统计分析,资料数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异显著性检验用单因素方差分析 (One Way ANOV) 及重复资料的方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 认为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 MTT 代谢率测定

不同浓度过氧化氢作用 1 h 后,采用 MTT 法检测细胞活力。结果显示随着过氧化氢浓度的增加,细胞活力呈递减趋势(图 1)。

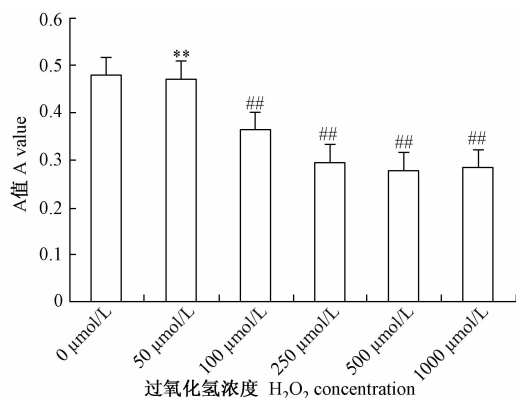


图 1 不同浓度过氧化氢对细胞活力的影响

注:与对照组相比 ** $P > 0.05$; ## $P < 0.01$ 。误差条: $\pm 2 s$

Fig. 1 Effect of different concentrations of hydrogen peroxide on the SH-SY5Y cells viability

Note: ** $P > 0.05$, vs. control group; ## $P < 0.01$, vs. control group

用 250 μ mol/L 过氧化氢分别处理 1 h 和 7 h,和对照组比较,低糖组活力明显上升;与损伤组比较,低糖 + 损伤组活力上升(图 2)。

2.2 LDH 漏出率测定结果

与空白组比较,损伤组漏出率明显增加, $P < 0.05$,低糖组 1h 漏出率稍有减少, $P > 0.05$;与损伤组比较,低糖 + 损伤组 1 h 漏出率明显减少, $P <$

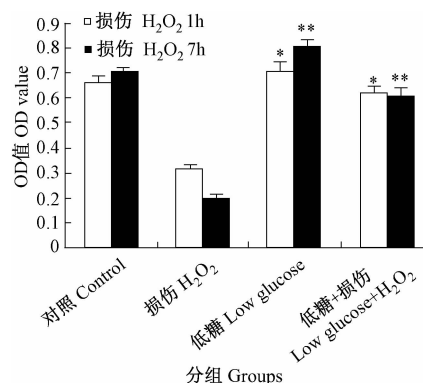


图 2 热量限制对过氧化氢损伤不同时间段的影响

注:损伤 1h,与空白组比较, * $P < 0.01$;与损伤组比较, * $P < 0.01$;

损伤 7 h,与空白组比较, ** $P < 0.01$;

与损伤组比较, ** $P < 0.01$ 。误差条: $\pm 2 s$

Fig. 2 Effect of caloric restriction for different times on the hydrogen peroxide-induced cell damage

Note: Damaged for 1 hour, * $P < 0.01$, vs. control group;

* $P < 0.01$, vs. H₂O₂ group; damaged for 7 h, ** $P < 0.01$,

vs. control group; ** $P < 0.01$, vs. H₂O₂ group.

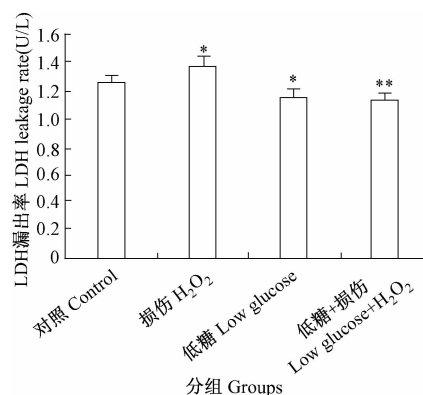


图 3 LDH 漏出率测定

注:图 3 为过氧化氢损伤 1h 的细胞 LDH 漏出率。与空白组比较,

* $P > 0.05$;与损伤组比较, ** $P < 0.01$ 。误差条: $\pm 2 s$

Fig. 3 The LDH leakage rates in the cells of different groups

Note: H₂O₂-treated for 1 hour. * $P > 0.05$, vs.

control group; ** $P < 0.01$, vs. H₂O₂ group

0.01,继续培养至 7 h 显示,低糖组漏出率由 (1.154 $\pm$ 0.062) 增加至 (1.223 $\pm$ 0.107);低糖 + 损伤组漏出率由 (1.128 $\pm$ 0.542) 增加至 (1.262 $\pm$ 0.081), $P < 0.01$ (图 3)。

2.3 细胞形态学观察

图 4、5、6(见彩插 1)所示为各组细胞在不同处理时段的细胞形态。图 4 为未加损伤之前,空白组、低糖组的细胞形态,各组细胞数目及形态与对照组比较无明显改变。图 5 为加入损伤药物 1h 后的细

胞形态与未加损伤钱比较无明显改变,图 6 为加入损伤药物 7 h 后的细胞形态,低糖组和空白组细胞突起伸展良好细长,损伤组可见细胞数目明显减少,死细胞多,细胞突起回缩,细胞明显变圆,贴壁性不好,透光性差。

3 讨论

热量限制(caloric restriction, CR)是指一种有计划的减少由食物提供的热量的进食方式,一般指在生物体所摄入营养成分在保证其不发生营养不良的情况下,将正常自由进食所得的热量减去 30% ~ 50%。早在 20 世纪 30 年代,McCay 等^[5]人就发现限制食物的摄入就能延长啮齿类动物的寿命。许多学者运用热量限制的方法在从酵母到灵长类动物中发现了类似的结果^[6]。在热量限制的动物和志愿者,可以看到一个稳定的生理变化:较低的体温、较低的血糖和胰岛素水平、以及脂肪和体重的降低^[7]、较强的应激耐受能力,包括热应激和氧化应激。神经元衰老机制研究中,氧化应激是加速神经元衰老的主要原因之一,虽然神经元衰老的机制仍不是很清楚,但长期以来一直认为氧化应激、DNA 损伤可能是神经元衰老的关键原因^[8]。

本实验观察到在细胞生长至对数期后给予低糖预处理 24 h,过氧化氢损伤 1 h(短期)和 7 h(长期),MTT 代谢率及 LDH 漏出率测定显示低糖组活力较损伤组活力明显增高,低糖组细胞形态维持良好,而损伤组细胞突触回缩,形态变圆,悬浮细胞和死细胞增多,显示低糖对短时间的急性氧化应激损伤和长期的氧化应激损伤都能起到一定的保护作用,这一结论与近年研究的热量限制抗氧化损伤的结论相符^[9],低糖通过模拟热量限制的作用,降低线粒体活性氧类物质的生成,上调相关解偶联蛋白的表达,提高机体的抗氧化酶水平,使机体内活性氧类物质生成减少,清除提高,从而发挥很好的抗氧化损伤作用^[10,11];也提示我们,在日常生活中减少碳水化合物的摄入的比例有益于提高自身的抗氧化应激能力,保持身体健康,延缓衰老。总之,CR 是一个生物体主动调节的过程,其延缓衰老的作用

可能是通过促进线粒体增殖进而降低自由基水平来实现的^[12]。本实验为热量限制抗氧化应激损伤提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Radak Z, Zhao ZF, Goto S, et al. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA [J]. *Molec Aspects Med*, 2011, 32: 305–315.
- [2] 赵静姝,王蓉. 热量限制与神经保护作用 [J]. *首都医科大学学报*, 2011, 32(4): 514–518.
- [3] Ha JS, Lim HM, Park SS. Extracellular hydrogen peroxide contributes to oxidative glutamate toxicity [J]. *Brain Res*, 2010, 1359: 291–297.
- [4] Ingram DK, Roth GS. Glycolytic inhibition as a strategy for developing calorie restriction mimetics [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46: 148–154.
- [5] McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size [J]. *Nutrition*, 1989, 5(3): 155–171.
- [6] 黄建华,夏世金,沈自尹. 热量限制延缓衰老及其在人类中的实践 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 22(27): 2251–2253.
- [7] Gupta RC, Milatovic S, Dettbarn WD, et al. Neuronal oxidative injury and dendritic damage induced by carbofuran; protection by memantine [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 219: 97–105.
- [8] Kwon SH, Kim JA, Hong SI, et al. Loganin protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting phosphorylation of JNK, p38, and ERK 1/2 MAPKs in SH-SY5Y cells [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58: 533–541.
- [9] Csiszar A, Labinskyy N, Jimenez R, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1 [J]. *Mechan Ageing Dev*, 2009, 130: 518–527.
- [10] Salmon AB, Richardson A, Pérez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? [J]. *Free Radical Biol Med*, 2010, 48: 642–655.
- [11] Jia ZQ, Misra HP. Reactive oxygen species in *in vitro* pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of NFκ B and caspase-3 [J]. *Free Radical Biol Med*, 2007, 42: 288–298.
- [12] 侯亚萍,汪华侨. 热量限制及其阿尔茨海默病等退行性疾病的可能作用 [J]. *解剖学研究*, 2010, 32(1): 53–58.

[修回日期]2012-09-25