

◆特邀栏目◆

岩藻黄素抗 D-gal 诱导 SH-SY5Y 细胞衰老作用及机制研究*

朱敏敏¹, 李云鹏¹, 张 森¹, 李晓双², 成 敏³, 周珍珠¹, 刘顺梅^{1,4**}

(1. 潍坊医学院生命科学与技术学院, 山东潍坊 261053; 2. 潍坊医学院科研处, 山东潍坊 261053; 3. 潍坊医学院基础医学院, 山东潍坊 261053; 4. 潍坊医学院医学研究实验中心, 山东潍坊 261053)

摘要:衰老相关的神经退行性疾病发病率不断增高,严重影响老年人生活质量,为探讨岩藻黄素(Fucoxanthin, FUCO)对神经细胞的抗衰老作用及其机制,采用 D-gal 诱导人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 细胞)衰老,然后在细胞培养基中添加 FUCO 对细胞进行干预,检测其细胞活力、SA- β -半乳糖苷酶活性及细胞内丙二醛(MDA)含量,细胞内自噬体形成及自噬(Autophagy)相关蛋白的表达。研究结果显示,5,10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 可明显抑制 D-gal 诱导的细胞衰老,显著提高 SH-SY5Y 细胞活力($P < 0.05$),降低 SH-SY5Y 细胞内 SA- β -半乳糖苷酶的活性($P < 0.05$)和 MDA 含量($P < 0.05$),但 20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 的抑制作用不明显($P > 0.05$)。光学显微镜观察结果显示,5,10,20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 组细胞内自噬体数量明显比模型组增多;Western blot 检测结果显示,与模型组比较,10,20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 组自噬相关蛋白 ATG5 表达增多、LC3 II/LC3 I 增大、p-mTOR/mTOR 减小($P < 0.05$)。表明 FUCO 具有抗 D-gal 诱导的 SH-SY5Y 细胞衰老的作用,其作用机制可能与适度调节自噬途径有关。

关键词:岩藻黄素 SH-SY5Y 细胞 抗衰老 自噬 D-gal

中图分类号:R96 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)03-0310-11

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20210608.001

0 引言

自噬(Autophagy)是一种自降解过程,通过清除体内衰老和受损的细胞器以实现细胞的自我更新。适度的自噬通过消化、降解胞内受损的 DNA、功能失

调的线粒体等降低氧化应激,可延缓细胞的衰老^[1,2],但自噬过度也会加速细胞的衰老。在衰老进程中,细胞自噬作用呈下调趋势。然而,自噬可被机体内外的多种因素诱导而发生,自噬能调整细胞在应激条件下的存活能力,不同因素诱导的自噬作用增强

收稿日期:2021-05-07

* 国家自然科学基金面上项目(81870237),山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MD094,ZR2010DM010)和山东省大学生科技创新基金项目(S202010438058)资助。

【作者简介】

朱敏敏(1988-),女,在读硕士研究生,主要从事藻类药用活性物质研究。

【**通信作者】

刘顺梅(1967-),女,博士,副教授,主要从事藻类活性物质研究,E-mail:liushm@wfm.c.edu.cn。

【引用本文】

朱敏敏,李云鹏,张森,等.岩藻黄素抗 D-gal 诱导 SH-SY5Y 细胞衰老作用及机制研究[J].广西科学,2021,28(3):310-320.

ZHU M M,LI Y P,ZHANG M,et al. Anti-aging Effect and Mechanism of Fucoxanthin on D-gal Induced SH-SY5Y Cells [J]. Guangxi Sciences, 2021,28(3):310-320.

是多种真核生物寿命延长所必需的^[3,4]。研究表明自噬与细胞衰老具有非常密切的关系,是极其重要的衰老相关的调节机制^[5,6]。自噬与阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病的发生密切相关,自噬相关通路的缺陷可能会导致上述疾病的发生^[7,8]。由此看来,能调控神经细胞自噬的物质可能会对神经退行性疾病的预防具有重要意义,对这类物质的研究有可能为神经退行性疾病的防治提供新思路和新药物。

岩藻黄素(Fucoxanthin, FUCO)是广泛存在于褐藻和硅藻中的类胡萝卜素,具有抗癌^[9,10]、抗氧化^[11,12]、降血糖^[13,14]等多种生物活性。Lashmanova等^[15]和Moskalev等^[16]用果蝇和线虫研究发现FUCO具有延缓衰老的作用,本课题组也发现FUCO可抑制H₂O₂引起的人WI-38细胞早衰^[17],Zhang等^[18]发现FUCO能通过调控自噬途径减轻外伤对神经细胞的损伤作用。

鉴于神经自噬与个体衰老、神经退行性疾病的发生都具有非常密切的关系,本研究利用D-gal诱导建立神经细胞衰老模型,研究FUCO抗神经细胞衰老的作用,并探讨自噬是否参与其抗衰老作用过程,期为FUCO的药用活性研究提供理论基础,为我国丰富的海藻资源的高值化利用及衰老相关神经退行性疾病的预防治疗提供理论指导与参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

CO₂细胞培养箱(Thermo Scientific,150i);酶标仪(Thermo Scientific,Multiskan Go);透射电子显微镜(日立,HT-7700);化学发光凝胶成像系统(ProteinSimple,FluorChem Q)。

人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y细胞,上海酶研生物科技有限公司);FUCO(Sigma,纯度为≥95%);D-半乳糖(D-Galactal,D-gal,索莱宝生物科技有限公司,纯度为99.0%);噻唑蓝(MTT)、丙二醛(MDA)及SA-β-半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司);雷帕霉素(Med Chem Express);β-actin小鼠单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(中杉金桥生物技术有限公司);mTOR、LC3及ATG5兔单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Cell Signaling Technology)。

FUCO的配制:将50 mg FUCO用10 mL二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide,DMSO)溶解,涡旋振荡

促进FUCO充分溶解,FUCO终浓度为7 588 μmol/L,分装后置于冰箱-80℃保存备用。

D-gal的配制:称取适宜质量的D-gal,用DMEM高糖培养基溶解,配成浓度为300 mg/mL的母液,在超净工作台用0.22 μm一次性无菌过滤器过滤,分装后置于冰箱-20℃保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 D-gal对SH-SY5Y细胞活力的影响

实验分组:设空白对照组(仅用DMEM培养基培养)和不同浓度D-gal组(DMEM培养基中分别含5,10,20,30,40,50 mg/mL D-gal),每组6个复孔,实验重复3次。

细胞以5×10³个/孔接种于96孔细胞培养板中,培养24 h后,空白对照组吸弃孔内原有培养基,加入新的DMEM培养基,其余各组吸弃孔内原有培养基,加入含不同浓度D-gal的DMEM培养基,置于细胞培养箱中继续培养12 h。12 h后按照MTT试剂盒说明书检测各组的细胞活力。

1.2.2 D-gal对SH-SY5Y细胞SA-β-半乳糖苷酶活性的影响

根据MTT实验结果,5 mg/mL的D-gal处理组细胞活力与空白对照组相差很小,故本实验中D-gal最低浓度选择10 mg/mL。实验设空白对照组(仅用DMEM培养基培养)和不同浓度D-gal组(培养基中含10,20,30,40,50 mg/mL D-gal),每组3个复孔。

将细胞接种于12孔板中,药物处理方法同1.2.1节。依据SA-β-半乳糖苷酶染色试剂盒说明书的方法步骤检测各组细胞SA-β-半乳糖苷酶的活性。在光学显微镜下观察各组细胞蓝染情况,每个复孔随机选取3个视野(每组共选取9个视野)计数细胞总数及蓝染阳性细胞数,计算各组SA-β-半乳糖苷酶阳性细胞率(蓝染阳性细胞数/细胞总数×100%)。

1.2.3 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞活力的影响

实验分组:实验设空白对照组(Con)、D-gal模型组(Mod,30 mg/mL D-gal)、维生素E对照组(VE,30 mg/mL D-gal + 50 μmol/L VE)和3个FUCO组。FUCO组分别用F5(30 mg/mL D-gal + 5 μmol/L FUCO)、F10(30 mg/mL D-gal + 10 μmol/L FUCO)和F20(30 mg/mL D-gal + 20 μmol/L FUCO)表示,每组设6个复孔,实验重复3次。

细胞悬液以5×10³个/孔接种于96孔细胞培养板中,24 h后,空白对照组和模型组吸弃孔内原有培

培养基, 更换新的 DMEM 培养基, 其余各组吸弃孔内原有培养基, 换为含不同浓度药物的培养基。各组置于培养箱中预培养 2 h 后, 除空白对照组外, 其余各组均加入 D-gal 溶液, 使其终浓度为 30 mg/mL, 在培养箱中培养 12 h 后, 用 MTT 法检测各组细胞活力。

1.2.4 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞 SA- β -半乳糖苷酶活性的影响

实验分组和药物处理同 1.2.3 节。将细胞接种于 12 孔板中, 每组 3 个复孔。细胞培养结束后按照 SA- β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书的检测方法, 检测各组细胞的 SA- β -半乳糖苷酶活性。显微镜下每个复孔随机选取 3 个视野计数 SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞率(同 1.2.2 节)。

1.2.5 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞脂质过氧化物(MDA)含量的影响

将细胞接种于含有 DMEM 培养基的无菌培养皿中培养, 实验分组和药物处理同 1.2.3 节, 药物处理结束后, 将各组细胞吸弃原有培养基, PBS 清洗两次, 每皿各加入 150 μ L 裂解液(磷酸酶抑制剂: 蛋白酶抑制剂: RIPA 裂解液 = 1:1:100, 体积比), 冰上裂解 20 min。裂解结束后用细胞刮刮下细胞, 收集裂解液于 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照 MDA 检测试剂盒说明书检测各组细胞的 MDA 含量。MDA 含量 = 样品 MDA 含量/单位重量的蛋白含量。

1.2.6 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞自噬体的影响

实验分组同 1.2.3 节, 另设自噬阳性对照雷帕霉素组(Rapamycin, RAP, DMEM 培养基中含有 20 μ mol/L 的 RAP)和自噬阴性对照 3-甲基腺嘌呤组(3-methyladenine, 3-MA, DMEM 培养基中含有 5 μ mol/L 的 3-MA)。细胞以 1×10^7 个/皿接种于无菌平皿中, 24 h 后, 空白对照组和模型组吸弃孔内原有培养基, 更换新的 DMEM 培养基, 其余各组吸弃孔内原有培养基, 换为含不同浓度药物的培养基。培养 2 h 后, 空白对照组吸弃原有培养基, 更换新的 DMEM 培养基, 其余各组均加入 D-gal 溶液至其终浓度为 30 mg/mL, 继续在培养箱中培养 12 h。12 h 后收集各组细胞用 3% 戊二醛固定过夜, 梯度酒精脱水后用环氧树脂包被, 超薄切片后固定于铜网中, 用乙酸双氧铀和柠檬酸铅分别固定 15-30 min, 在透射电子显微镜下观察自噬体的形成情况。

1.2.7 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞自噬相关基因蛋白表达的影响

实验分组和药物处理同 1.2.6 节。经 D-gal 处理 12 h 后, 各组细胞在冰上进行裂解, 收集细胞裂解液于离心管中, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心, 取上清用聚氰基丙烯酸正丁酯法(BCA 法)检测蛋白浓度。每组各取 20 μ g 总蛋白至加样孔中进行 SDS-PAGE 电泳, 经转膜、封闭、洗涤后, 目的蛋白分别与 β -actin 小鼠单克隆抗体溶液、mTOR、LC3 及 ATG5 兔单克隆抗体溶液在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日, 洗掉一抗后, 上述目的蛋白再分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗和山羊抗兔二抗溶液在室温孵育 2 h, 然后用化学发光凝胶成像系统进行显影, 用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.2.8 统计学方法

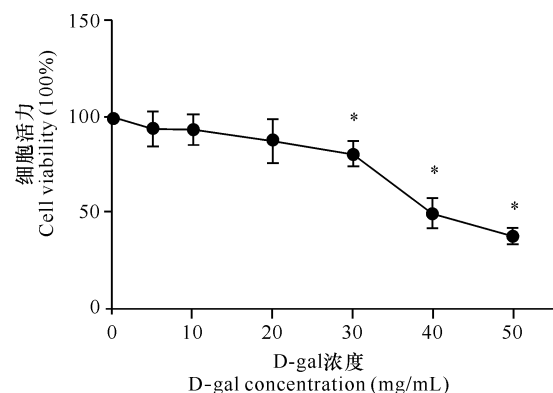
计量资料经方差齐性检验为方差齐性, 采用 SPSS22.0、GraphPad Prism7 统计学软件进行实验数据分析, 正态计量数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多组数据间的比较用单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SH-SY5Y 细胞衰老模型的建立

2.1.1 D-gal 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

不同浓度 D-gal 处理 SH-SY5Y 细胞 12 h 后各组细胞活力见图 1。设空白对照组细胞活力为 100%, 与对照组相比, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL D-gal 组细胞活力分别降至(94.24 \pm 9.03)%、(93.68 \pm 7.83)%、(88.10 \pm 11.07)%、(80.78 \pm 6.91)%、(49.66 \pm 7.87)%、(37.92 \pm 4.41)%, 细胞活力随



* : $P < 0.05$ D-gal 组 vs 空白对照组

* : $P < 0.05$ D-gal group vs blank control group

图 1 D-gal 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of D-gal on the viability of SH-SY5Y cells

D-gal 的浓度增加明显下降。显微镜下观察可见空白对照组细胞生长良好, 细胞边缘清晰, 而高浓度 D-gal 处理的细胞边缘模糊, 细胞变圆且数量减少。实验结果表明 D-gal 浓度超过 30 mg/mL 时会对细胞产生较大毒性作用。

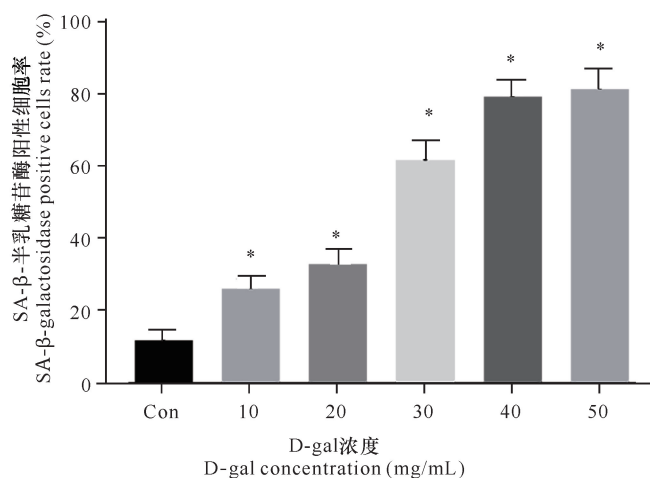
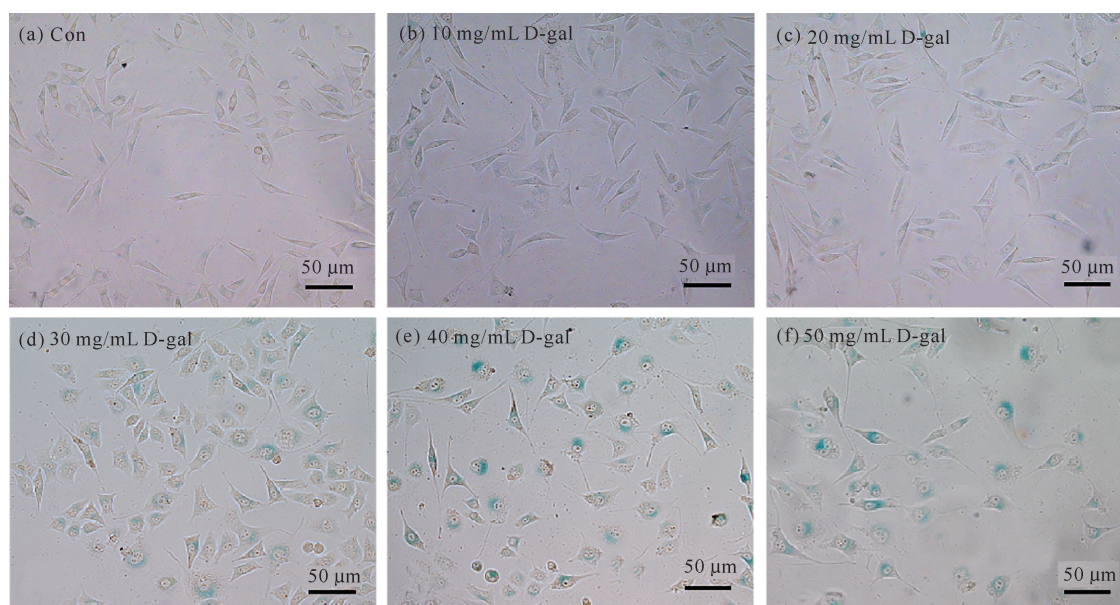
2.1.2 D-gal 对 SH-SY5Y 细胞 SA- β -半乳糖苷酶活性的影响

如图 2 所示, 与空白对照组相比, 经 D-gal 处理的 SH-SY5Y 细胞均有不同程度的蓝染, 10, 20 mg/mL D-gal 组细胞蓝染程度较浅, 30, 40, 50 mg/mL D-gal 组细胞蓝染程度加深, 且部分细胞变圆, 体积增大, 细胞数量减少。不同浓度 D-gal 组的 SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞率均较空白对照组明显增高 ($P <$

0.05)。上述结果表明 D-gal 可诱导 SH-SY5Y 细胞早衰, 可用于建立细胞衰老模型。

2.2 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 3 所示, 设空白对照组细胞活力为 100%, 与空白组相比, 模型组细胞活力下降明显, 为 $(73.56 \pm 5.98)\%$, 且两者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比, VE 组的细胞活力增加 ($P < 0.05$)。5, 10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 处理组的细胞活力分别为 $(90.11 \pm 7.17)\%$ 、 $(84.71 \pm 6.33)\%$, 均比模型组细胞活力明显增高 ($P < 0.05$), 20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 组细胞活力与模型组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。实验结果说明 FUCO 可抑制 D-gal 引起的



* : $P < 0.05$ D-gal 组 vs 空白对照组

* : $P < 0.05$ D-gal group vs blank control group

图 2 D-gal 对 SH-SY5Y 细胞 SA- β -半乳糖苷酶活性的影响

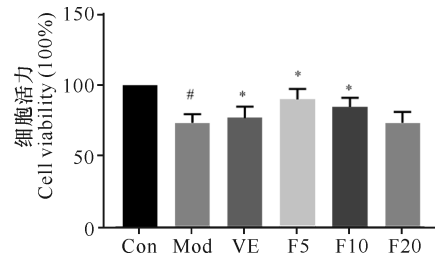
Fig. 2 Effect of D-gal on the SA- β -galactosidase activity of SH-SY5Y cells

细胞活力下降, 具有较好的抗细胞衰老作用。

2.3 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞SA- β -半乳糖苷酶活性的影响

如图4所示, 与空白对照组相比, 模型组的细胞蓝染程度加深, 蓝染细胞阳性率增高。与模型组相比, VE组的蓝染细胞阳性率降低($P < 0.05$), 且蓝染程度变浅; 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO组蓝染细胞阳性率较模型组明显减少($P < 0.05$), 且蓝染程度下降; 与模型组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO组蓝染细胞阳性率减少, 但与模型组之间无明显差异($P > 0.05$)。SA- β -半乳糖苷酶活性增加是细胞衰老的重要标志物, 也是检测衰老的金标准。本实验结果充分说明FUCO可以逆转D-gal引发的细胞衰老, 具有较强的抗衰老

活性。

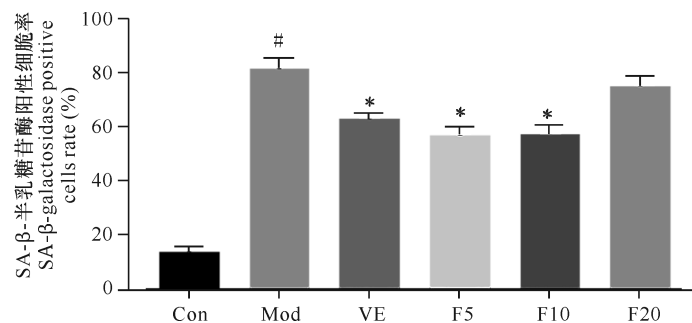
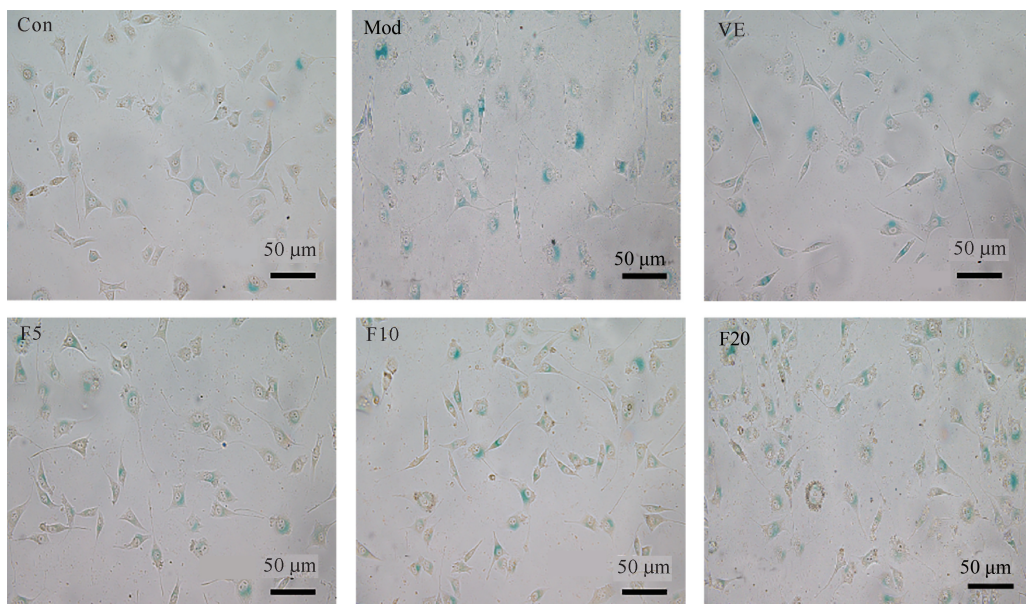


: $P < 0.05$ Mod vs Con, * : $P < 0.05$ 药物组 vs Con

: $P < 0.05$ Mod vs Con, * : $P < 0.05$ drug group vs Con

图3 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞活力的影响

Fig. 3 Effect of FUCO on the viability of senescence SH-SY5Y cells induced by D-gal



: $P < 0.05$ Mod vs Con, * : $P < 0.05$ 药物组 vs Con

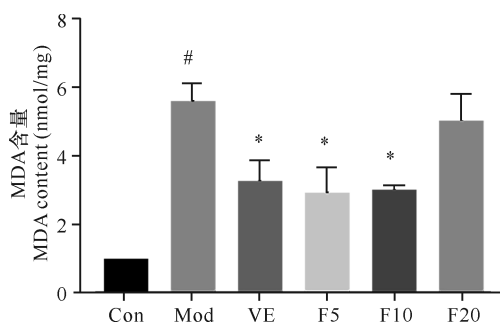
: $P < 0.05$ Mod vs Con, * : $P < 0.05$ drug group vs Con

图4 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞SA- β -半乳糖苷酶活性的影响

Fig. 4 Effect of FUCO on the SA- β -galactosidase activity of senescence SH-SY5Y cells induced by D-gal

2.4 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞 MDA 含量的影响

从图 5 可以看出,模型组细胞的 MDA 含量明显高于空白对照组,为空白组 MDA 含量的 5 倍多。VE 组及 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 组的 MDA 含量明显低于模型组 ($P < 0.05$), 20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 组的 MDA 含量低于模型组,但二者之间无明显差别 ($P > 0.05$)。



: $P < 0.05$ Mod vs Con, * : $P < 0.05$ 药物组 vs Con

: $P < 0.05$ Mod vs Con, * : $P < 0.05$ drug group vs Con

图 5 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effect of FUCO on the MDA content of senescence SH-SY5Y cells induced by D-gal

2.5 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞自噬体的影响

如图 6 所示,空白对照组细胞结构正常,线粒体数目较多,细胞偶尔出现自噬体(箭头)。Mod 组部分细胞出现体积变大、核仁变小甚至消失、线粒体肿胀等不良状态,状态好的细胞内自噬体数量较少,但状态不好的细胞内可见大量自噬体。与模型组比,VE 组的细胞边界清晰,核仁清楚,自噬体数目有增多趋势;F5 组细胞状态好,线粒体数目较多,胞质内自噬体数量也较模型组中状态良好的细胞内自噬体数量有所增多;F10 和 F20 组自噬体明显增多,且随 FUCO 浓度增大而增多,高倍镜下可清楚地观察到自噬体中包含着多种细胞内容物。自噬阳性对照 RAP 组的自噬体数目最多,自噬阴性对照 3-MA 组细胞内自噬体数目比 RAP 组明显减少。透射电子显微镜下观察自噬体形成情况可以直观反映细胞内自噬作用大小,本实验结果说明 FUCO 可以增强细胞内的自噬活性。

2.6 岩藻黄素对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞自噬相关蛋白的影响

图 7 所示为自噬相关蛋白检测结果。与空白组相比,模型组 ATG5 蛋白表达和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达比值均上调 ($P < 0.05$), LC3 II / LC3 I 蛋白表达比值下调 ($P < 0.05$)。与模型组相比,VE 组 LC3 II / LC3 I 蛋白表达比值轻度上调, p-mTOR/mTOR 比值下调 ($P < 0.05$)。F5 组 ATG5、LC3 II / LC3 I 比值和 p-mTOR/mTOR 比值均较模型组有所下调, F10、F20 及自噬阳性对照 RAP 组细胞的 ATG5 和 LC3 II / LC3 I 比值明显较模型组上调 ($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR 比值明显下调 ($P < 0.05$)。自噬阴性对照 3-MA 组 ATG5 和 LC3 II / LC3 I 比值较 RAP 组下调, p-mTOR/mTOR 比值较 RAP 组上调。

3 讨论

3.1 D-gal 诱导 SH-SY5Y 细胞建立细胞衰老模型

D-gal 是建立衰老模型的常用诱导剂^[19]。Li 等^[20]的研究表明浓度高于 30 mg/mL 的 D-gal 可明显引起 SH-SY5Y 细胞活力下降, Shen 等^[21]用 55 mmol/L D-gal 诱导星形胶质细胞一周成功建立细胞衰老模型。本实验发现, D-gal 浓度过大,会导致细胞大量死亡,结合细胞活力和 SA- β -半乳糖苷酶活性实验结果,最终选用 30 mg/mL 的 D-gal 处理细胞 12 h 成功建立 SH-SY5Y 细胞衰老模型,该结果与 Li 等^[20]实验结果相似。

3.2 FUCO 对 D-gal 诱导衰老的 SH-SY5Y 细胞的抗衰老作用

细胞衰老时会出现细胞活力下降、SA- β -半乳糖苷酶活性增加、MDA 含量升高等状况。本研究通过检测上述 3 个指标探讨 FUCO 对 D-gal 诱导细胞衰老的干预作用。研究发现, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 FUCO 能明显抑制 D-gal 引起的细胞活力下降 ($P < 0.05$), 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 FUCO 作用不明显 ($P > 0.05$), 且随着 FUCO 浓度的增大, 细胞活力表现出一定下降趋势。FUCO 对 D-gal 引发的衰老标志物 SA- β -半乳糖苷酶的活性增高也具有较好的抑制效应, 表现为 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO 组比 D-gal 模型组的 SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞数明显减少 ($P < 0.05$), 细胞蓝染程度较

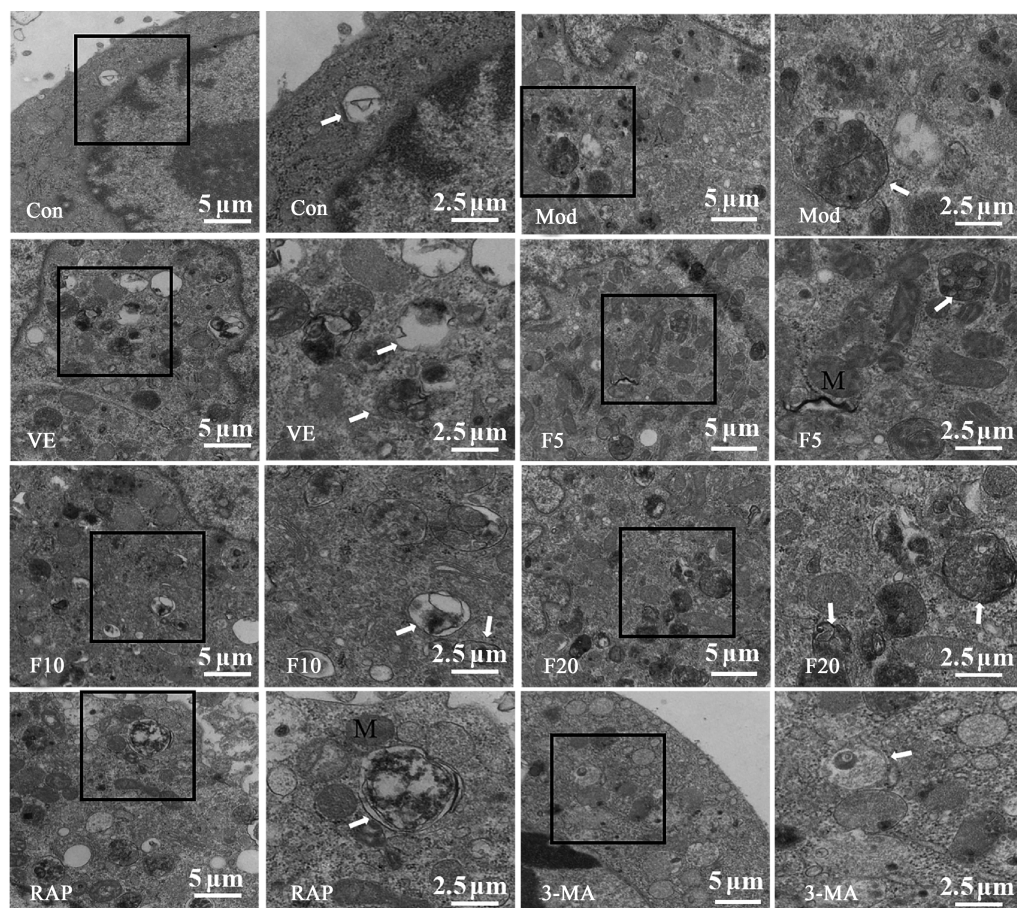


图6 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞自噬体的影响

Fig. 6 Effect of FUCO on the autophagosome of senescence SH-SY5Y cells induced by D-gal

浅;20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO组SA- β -半乳糖苷酶阳性细胞率比模型组降低,但两组之间无明显差异($P > 0.05$)。上述结果与本课题组前期研究^[17]中发现5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的FUCO可抑制 H_2O_2 诱导的WI-38细胞的活力下降和SA- β -半乳糖苷酶活性增高结果相似。

MDA是脂质过氧化反应产物,MDA的含量升高是细胞衰老的重要标志之一。本实验发现模型组比空白组细胞的MDA含量明显增高,而5-20 $\mu\text{mol/L}$ 的FUCO可明显降低D-gal诱导的MDA含量增高。Zeng等^[22]发现3 $\mu\text{mol/L}$ FUCO就可明显降低TBT诱导的HepG2细胞内的MDA含量。上述结果表明FUCO可抑制外界刺激引发的细胞脂质过氧化,延缓细胞衰老的发生。

以上关于细胞活力、SA- β -半乳糖苷酶活性和MDA含量检测实验中,我们发现5,10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO的抗衰老作用效果相差很小,20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO的抗衰老效果与前二者比相差较大,3个FUCO组没有表现出特别明显的剂量-效应关系。Zhang

等^[18]在研究FUCO对外伤引起的小鼠继发性脑损伤的干预作用时发现,灌胃给药的50,100,200 mg/kg 3个剂量中100 mg/kg的抗损伤作用效果最好,脑室注射给药的0.01,0.05,0.1 mmol/L 3个剂量中0.05 mmol/L的抗损伤效果最好,该研究中两种给药方式都没有发现明显的药物量效关系。综合考虑本研究及Zhang等^[18]的研究结果,没有出现明显的量效关系的原因可能是设置的3个FUCO浓度不太合适,应设置更多的浓度梯度,例如可在低于5 $\mu\text{mol/L}$ 及10-20 $\mu\text{mol/L}$ 增设适当的药物浓度,这样有可能会检测到较明显的量效关系,下一步将验证该设想。

Lashmanova等^[15]研究表明0.3-5.0 $\mu\text{mol/L}$ FUCO能延长黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫的寿命。无毛老鼠局部使用0.001%的FUCO溶液预处理可减轻UVB诱导的光老化过程中皱纹的形成^[23]。结合本实验结果,FUCO对D-gal诱导的神经细胞衰老具有较好的抑制作用。

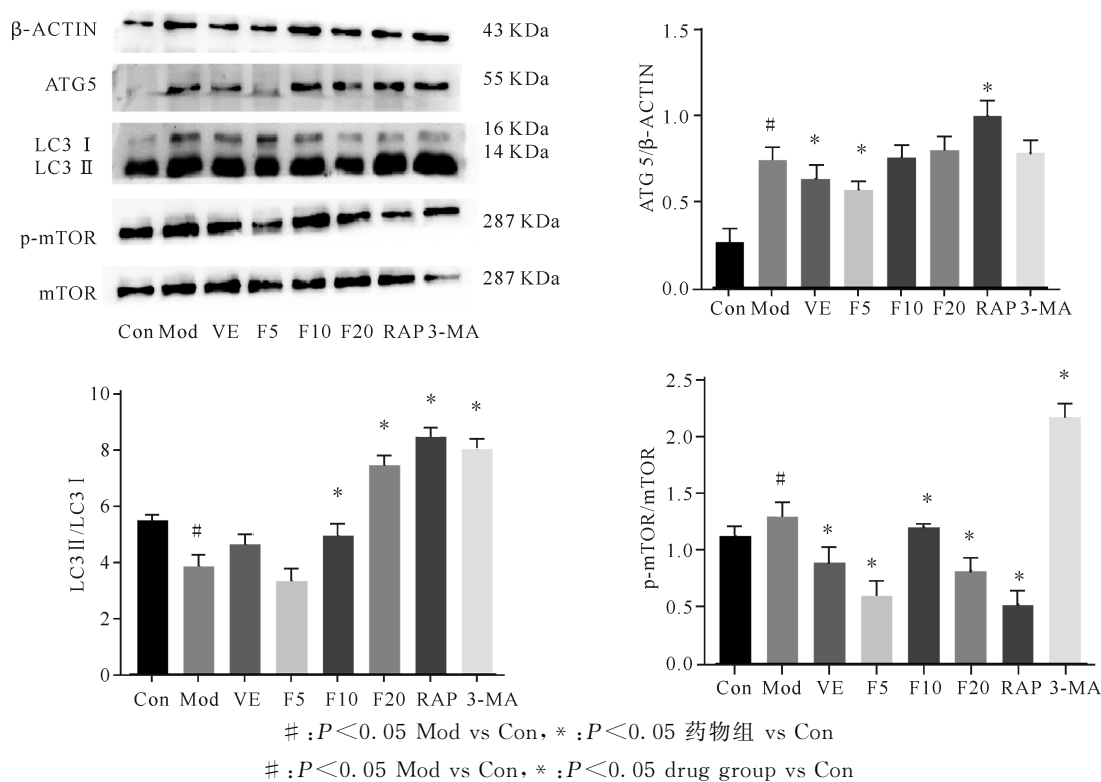


图7 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞自噬蛋白的影响

Fig. 7 Effect of FUCO on the autophagy protein of senescence SH-SY5Y cells induced by D-gal

3.3 FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞自噬的影响

自噬是细胞的一种生存策略,细胞自噬对于维持细胞和个体的健康具有重要作用。适度激活细胞自噬具有抗衰老作用,调节细胞自噬水平已成为抗衰老的重要策略。有研究表明FUCO可通过Nrf2自噬途径在颅脑外伤模型中提供神经保护作用^[18],表明FUCO可能会通过调控自噬途径来对抗D-gal引起的神经细胞衰老。但目前还未发现有FUCO介导自噬途径抗衰老的研究报道。因此,本研究探讨了FUCO对D-gal诱导衰老的SH-SY5Y细胞自噬的影响作用。

透射电子显微镜观察自噬体形成的研究结果显示,空白对照组细胞发生自噬的水平较低,而D-gal模型组细胞自噬体数量明显比空白组高,这与前人使用D-gal诱导细胞或动物衰老研究的结果相似^[24,25],说明D-gal可引起细胞发生自噬。与模型组相比,F10、F20和RAP组细胞内自噬体数量明显比模型组增多,Western blot检测自噬相关蛋白表达的结果也显示上述3个组中细胞内的ATG5和LC3 II/LC3 I蛋白比值较模型组上调,p-mTOR/mTOR蛋白比值较模型组下调,表明上述3组细胞的自噬作用比模

型组增强。从Western blot检测结果可以看出,随着FUCO浓度增大,F5、F10和F20组的ATG5和LC3 II/LC3 I蛋白表达比值表现出明显浓度依赖性,p-mTOR/mTOR蛋白表达比值未表现出明显的剂量-效应关系,仅有F10和F20两组的p-mTOR/mTOR比值随浓度增加表达下调,该结果也与这两组的ATG5和LC3 II/LC3 I比值表现出的自噬增强趋势相吻合。F5组细胞的ATG5和LC3 II/LC3 I比值较模型组下调,意味着自噬作用减弱,这与透射电子显微镜结果显示F5组细胞较模型组自噬作用增强不一致,但本实验结果还发现F5组的p-mTOR/mTOR比值较模型组显著下调($P < 0.05$),这与其自噬体数目较模型组增多是吻合的。针对F5组自噬相关蛋白的表达与透射电子显微镜观察结果不一致的问题,将通过实验进一步验证。

从自噬体及自噬相关蛋白检测结果来看,FUCO在5-20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内可增强细胞自噬,其中20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO组自噬作用最强。综合分析本研究细胞活力、SA- β -半乳糖苷酶活性和MDA含量检测结果,发现20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO对细胞的保护作用并不明显,5,10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO的抗细胞衰老作用明显优于20 $\mu\text{mol/L}$ 。考虑到20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO组的

自噬作用最强, 猜想 F20 组很有可能是由于过度激活自噬, 对细胞造成了一定的伤害。这一猜想与胡晶晶等^[26]在研究大鼠心肌缺血再灌注损伤中提到的过度自噬是损伤的原因, 抑制自噬过度激活可减轻损伤的观点类似。综上所述, 我们认为 FUCO 可通过适度激活自噬途径抑制 D-gal 诱导的 SH-SY5Y 细胞衰老。

值得注意的是, 尽管透射电子显微镜观察结果显示模型组的自噬体数目比空白对照组多, 但模型组的 LC3 II/LC3 I 蛋白比值较空白组下调, p-mTOR/mTOR 蛋白比值较空白组上调, 这二个比值与细胞自噬增强时该蛋白的变化趋势不吻合。但是, 考虑到自噬与衰老过程都是由多条信号通路共同介导完成, 其中 mTOR、SIRT1 以及 p53 等多条信号通路的交叉点^[27], 是调控二者的关键蛋白, 受众多因素的调控, 特别是 mTOR 分子, 他是自噬调控信号通路中一个关键位置的激酶, 多种信号分子可调节其活性, mTOR 上游的 MAPK/Erk1/2、PI3K-1/Akt 等信号都会影响 mTOR 的活性, Yu 等^[28]也发现 FUCO 可通过激活 PI3K-1/Akt 并抑制 Erk 途径保护 H₂O₂ 引起的神经细胞损伤。p53 蛋白也可影响 mTOR 的活性, p53 在特定位置的适度过表达可抑制 mTOR, 激活自噬, 而其过度表达反而会抑制自噬, 使细胞表现出衰老的症状^[27]。因此, 对于模型组的 p-mTOR/mTOR 和 LC3 II/LC3 I 蛋白表达与透射电子显微镜结果不一致的问题, 还需通过排除自噬调控复杂通路中其他蛋白对自噬的影响才能阐明原因。

4 结论

本研究中细胞活力、SA- β -半乳糖苷酶活性和 MDA 含量检测结果表明, FUCO 在 5-10 μ mol/L 时对 D-gal 诱导衰老的神经细胞具有明显的抑制作用, 20 μ mol/L FUCO 的抗衰老作用较差。对细胞自噬体形成及自噬相关蛋白的研究结果表明, FUCO 很可能是通过适度激活细胞自噬来发挥其抗衰老作用。

参考文献

- [1] GLICK D, BARTH S, MACLEOD K F. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms [J]. *The Journal of Pathology*, 2010, 221(1): 3-12.
- [2] 张晓荣. 自噬对 D-半乳糖诱导的 C2C12 成肌细胞衰老的作用及机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [3] RUBINSZTEIN D C, MARINO G, KROEMER G. Autophagy and aging [J]. *Cell*, 2011, 146(5): 682-695.
- [4] MADEO F, TAVEMARAKIS N, KROEMER G. Can autophagy promote longevity? [J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(9): 842-846.
- [5] YOUNG A R J, NARITA M, FERREIRA M, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition [J]. *Genes & Development*, 2009, 23(7): 798-803.
- [6] GAMERDINGER M, HAJIEVA P, KAYA A M, et al. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3 [J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(7): 889-901.
- [7] MOREIRA P I, SANTOS R X, ZHU X W, et al. Autophagy in Alzheimer's disease [J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2010, 10(7): 1209-1218.
- [8] LI L, ZHANG X J, LE W D. Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Neurodegenerative Diseases*, 2010, 7(4): 265-271.
- [9] WANG J, MA Y H, YANG J S, et al. Fucoxanthin inhibits tumour-related lymphangiogenesis and growth of breast cancer [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(3): 2219-2229.
- [10] TAKAHASHI K, HOSSKAWA M, KASAJIMA H, et al. Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues [J]. *Oncology Letters*, 2015, 10(3): 1463-1467.
- [11] SACHINDRA N M, SATO E, MAEDA H, et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(21): 8516-8522.
- [12] BAE M, KIM M B, PARK Y K, et al. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(11): 158618. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158618.
- [13] LIN H T V, TSOU Y C, CHEN Y T, et al. Effects of low-molecular-weight fucoxanthin and high stability fucoxanthin on glucose homeostasis, lipid metabolism, and liver fucoxanthin in a mouse model of type II diabetes [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(4): 113. DOI: 10.3390/md15040113.
- [14] KONG Z L, SUDIRMAN S, HSU Y C, et al. Fucoxanthin-rich brown algae extract improves male reproductive function on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rat model [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4485. DOI: 10.3390/ijms20184485

- [15] LASHMANOVA E, PROSHKINA E, ZHIKRIVETSKAYA S, et al. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* [J]. *Pharmacological Research*, 2015, 100: 228-241.
- [16] MOSKALEV A, SHAPOSHNIKOV M, ZEMSKAYA N, et al. Transcriptome analysis reveals mechanisms of geroprotective effects of fucoxanthin in *Drosophila* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(Suppl 3): 77. DOI: 10.1186/s12864-018-4471-x.
- [17] 崔艳君, 唐娜, 牛建峰, 等. 岩藻黄素抗 H₂O₂ 诱导 WI-38 细胞早衰的作用研究 [J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(3): 48-52.
- [18] ZHANG L, WANG H D, FAN Y W, et al. Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46763. DOI: 10.1038/srep46763.
- [19] HAIDER S, LIAQUAT L, SHAHZAD S, et al. A high dose of short term exogenous D-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process [J]. *Life Sciences*, 2015, 124: 110-119.
- [20] LI N, HE Y Y, WANG L, et al. D-galactose induces necrotic cell death in neuroblastoma cell lines [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(12): 3834-3844.
- [21] SHEN Y, GAO H C, SHI X J, et al. Glutamine synthetase plays a role in D-galactose-induced astrocyte aging in vitro and in vivo [J]. *Experimental Gerontology*, 2014, 58: 166-173.
- [22] ZENG J, ZHANG Y P, RUAN J P, et al. Protective effects of fucoxanthin and fucoxanthinol against tributyltin-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(6): 5582-5589.
- [23] URIKURA I, SUGAWARA T, HIRATA T. Protective effect of fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(4): 757-760.
- [24] ZHANG D Y, CHEN Y F, XU X B, et al. Autophagy inhibits the mesenchymal stem cell aging induced by D-galactose through ROS/JNK/p38 signalling [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2020, 47(3): 466-477.
- [25] 刘小虎, 赵志慧, 周玥, 等. PI3K/Akt/mTOR 自噬通路在人参皂苷 Rg1 延缓 D-gal 诱导的卵巢早衰小鼠模型卵巢早衰中的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24): 6036-6042.
- [26] 胡晶晶, 周伟, 胡笑容. 肾交感消融通过抑制氧化应激和过度自噬减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *贵州医药*, 2020, 44(11): 1687-1689, 1701.
- [27] 薛嘉, 谢晓刚, 康健, 等. 通过自噬调控细胞衰老的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42(1): 110-115.
- [28] YU J, LIN J J, YU R, et al. Fucoxanthin prevents H₂O₂-induced neuronal apoptosis via concurrently activating the PI3-K/Akt cascade and inhibiting the ERK pathway [J]. *Food & Nutrition Research*, 2017, 61(1): 1304678. DOI: 10.1080/16546628.2017.1304678.

Anti-aging Effect and Mechanism of Fucoxanthin on D-gal Induced SH-SY5Y Cells

ZHU Minmin¹, LI Yunpeng¹, ZHANG Miao¹, LI Xiaoshuang², CHENG Min³,
ZHOU Zhenqiong¹, LIU Shunmei^{1,4}

(1. School of Bioscience and Technology, Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261053, China; 2. Division of Scientific Research Management, Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261053, China; 3. School of Basic Medicine Sciences, Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261053, China; 4. Experimental Center for Medical Research, Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261053, China)

Abstract: The increasing incidence of aging-related neurodegenerative diseases has seriously affected the life quality of the elderly. In order to explore the anti-aging effect of fucoxanthin (FUCO) on the nerve cells and

its mechanism, D-gal was used to induce the senescence of human neuroblastoma cell (SH-SY5Y cell), and then FUCO was added to the cell culture medium for the intervention. The cell viability, SA- β -galactosidase activity, intracellular malondialdehyde (MDA) content, intracellular autophagosome formation and autophagy-related protein expression were detected. The results showed that 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ FUCO significantly inhibited D-gal-induced cell senescence and significantly increased SH-SY5Y cell viability ($P < 0.05$), and reduced the intracellular SA- β -galactosidase activity ($P < 0.05$) and the MDA content ($P < 0.05$) in SH-SY5Y cell. But the anti-aging effect of 20 $\mu\text{mol/L}$ fucoxanthin was not significant ($P > 0.05$). The results of optical microscopy showed that the number of intracellular autophagosomes in the cells of the 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO group was significantly higher than that of the model group. In addition, the results of western blot showed that compared with the model group, the expression of autophagy-related protein ATG5 increased, LC3 II/LC3 I increased and p-mTOR/mTOR decreased in 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ FUCO group ($P < 0.05$). It shows that FUCO has the effect of resisting the senescence of SH-SY5Y cell induced by D-gal, and its mechanism of action may be related to the moderate regulation of autophagy pathway.

Key words: fucoxanthin, SH-SY5Y cell, anti-aging, autophagy, D-gal

责任编辑: 陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>