

不同能量的培养条件对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞生长的影响

赵静姝, 王 蓉, 张景燕, 吴燕川, 姬志娟

(首都医科大学宣武医院中心实验室, 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)

【摘要】 目的 建立热量限制的体外模型, 观察不同能量培养条件下对人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 细胞生长代谢的影响。**方法** 将人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 细胞分别采用含有低浓度(2 g/L)、正常浓度(3.15 g/L)或高浓度(4.5 g/L)葡萄糖的培养基进行常规传代培养, 利用 MTT 代谢率、细胞生长曲线及 LDH 漏出率等指标观察各组细胞生长情况。**结果** 与正常葡萄糖浓度培养条件下培养的对照组相比, 高糖组细胞突起缩短, 细胞胞体皱缩, MTT 代谢率稍低(0.573 ± 0.001), LDH 漏出率高, 细胞生长状态差; 与对照组相比, 低糖组细胞突起伸展, MTT 代谢率较低(0.428 ± 0.003), LDH 漏出率低, 细胞生长速度缓慢, 但是形态良好。**结论** 高糖培养对细胞有损伤作用, 细胞代谢加速, 更容易衰老死亡; 而低糖培养起到保护作用, 在热量限制允许范围内降低培养液的含糖量, 不但不会对细胞造成损伤, 反而对细胞的代谢及生长起到保护作用, 延长细胞的总体寿命。

【关键词】 热量限制; 葡萄糖; 细胞生长; 细胞代谢; 细胞培养; 人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.02.015

Effects of Different Energy Supplies on the Growth of Cultured Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y Cells

ZHAO Jing-shu, WANG Rong, ZHANG Jing-yan, WU Yan-chuan, JI Zhi-juan

(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 establish an in vitro model of caloric restriction (CR) with human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells and observe the effects of different energy supplies on the growth of SH-SY5Y cells. **Methods** Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells were cultured in different media with glucose at different concentrations: low glucose group (2 g/L), normal glucose group (3.15 g/L) and high glucose group (4.5 g/L). MTT metabolic rate, cell growth curve and LDH leakage rate were measured to observe the cell growth status of different groups. **Results** Compared with the normal control group, the cells of the high glucose group had shorter cytoplasmic processes and shrank cell bodies, showed a little bit lower MTT metabolic rate, higher LDH leakage rate and poorer growth status, while the cultured cells of the low glucose group had more extensive processes, greatly lower MTT metabolic rate and lower LDH leakage rate, and the cells grew slower but showed good morphology. **Conclusions** Culture at high glucose concentration is injurious to cells and

【基金项目】北京市自然科学基金 7082043, 国家“十一五”863 计划“疫苗与抗体工程”资助项目(2006AA02A245), 首都医学发展科研基金(2007-3108), 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】赵静姝(1985 -), 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。

induces a higher metabolic rate, so the cells are inclined to be senescent and to die. Culture at low glucose concentration in an allowable range of caloric restriction is protective to the cells, unharmed to the cells, and favorable for cell growth and prolongs the cell survival.

【Key words】 Caloric restriction; Glucose; Cell growth; Cell metabolism; Cell culture; Human neuroblastoma, cell line SH-SY5Y

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,一般是指在生物体所摄入营养成分保证其不发生营养不良的情况下,将正常自由进食(ad libitum, AL)所得热量减去 30%~50%。最早由 McCay 等人于上世纪 30 年代提出,并发现这种进食方式可以延长小鼠的平均寿命和最长寿命^[1]。

CR 的研究多集中在各种动物模型中,CR 可以降低体重,下调血压,降低空腹血糖、胰岛素和胆固醇水平,维持年轻的生理状态^[2]。对恒河猕猴进行长达 20 多年的 CR 研究发现,CR 可降低恒河猕猴糖尿病、癌症、心血管疾病和脑萎缩等多种年龄相关性疾病的发生并延缓衰老^[3],并对很多年龄相关的如纹状体体积下降,运动功能迟缓,机体免疫系统下降等都有改善作用^[4]。

目前对于热量限制的体外细胞模型的研究报道较少,本实验旨在通过降低培养液中细胞的主要能量消耗来源葡萄糖的方式建立 SH-SY5Y 细胞热量限制模型,进一步探讨 CR 对细胞生长的影响,并为下一步探讨 CR 对人体各种作用的作用机制的研究打下基础,提供良好的体外模型。

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 细胞来自瑞典卡罗琳斯卡医学院。

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。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:正常对照组细胞培养条件为 DMEM × F12(Gibco)培养基中加入 10% 胎牛血清、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养,6 天传代 1 次,中间换液 1 次。高糖组与低糖组培养基分别为 DMEM (4.5 g/L L-glucose) 和 DMEM (2.0 g/L L-glucose) 加 10% 胎

牛血清,余与正常对照组相同。

1.2.2 MTT 代谢率测定:将 SH-SY5Y 细胞以 2×10^3 /mL 接种于 96 孔板(Costar 产品),分为以上三组,每组 12 孔,培养 3 d 后统一换成 DMEM × F12 无血清培养液,继续培养 24 h 后做 MTT 代谢率测定,每孔加 MTT (5 mg/mL) 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h,吸出培养液,每孔加入 DMSO 200 μ L, 振摇 10 min,用全波长酶标仪(Multiskan Spectrum)测定 550 nm 处光密度值(A)。

1.2.3 细胞生长形态观察及细胞计数:将 SH-SY5Y 细胞以 2×10^2 /mL 接种于 6 孔板(Costar 产品),分为以上 3 组,每组 8 孔,自接种后第 3、5、7、9、11、13、15、16 天时,用倒置显微镜(Olympus 产品)观察细胞形态,并采用台盼蓝染色计数法计算细胞数目。

1.2.4 LDH 漏出率测定:将细胞计数实验中各孔细胞培养液收集,按照 LDH 测定试剂盒所示方法(比色法),测定 550 nm 处光密度值,同时做 LDH 标准曲线。

1.3 统计学分析

用 SPSS 11.5 软件统计分析,资料数据以平均值 \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

结果显示高糖组 A 值为 0.573 ± 0.001 , 低于对照组 (0.742 ± 0.003), 降低幅度为 22.78%, 两组相比 $P < 0.01$; 低糖组 A 值为 0.428 ± 0.003 , 低于对照组, 降低幅度为 42.32%, 两组相比 $P < 0.01$ 。(图 1)

2.2 细胞生长曲线

细胞生长曲线如图 2 所示,在生长初期,各组细胞均随生长天数延长,数目显著增多,到第 11 天左右,各组细胞达到生长顶峰,随后各组细胞以不同

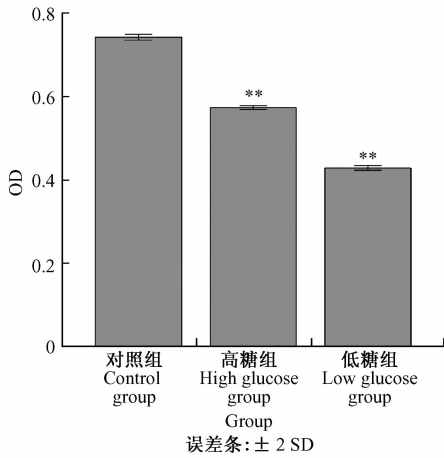


图 1 不同能量对 SH-SY5Y 细胞生长代谢率的影响

Fig. 1 Effect of different energy supplies on the metabolic rate of SH-SY5Y cells

注:与对照组相比, **P < 0.01

Note: **P < 0.01, compared with the control group

速度死亡。其中与对照组相比,高糖组细胞生长略慢,当达到顶峰后,细胞死亡明显,细胞数目下降幅度较大。而低糖度细胞总体生长过程缓慢,在达到顶峰以后,细胞死亡不太明显,而且在实验观察终点,低糖组细胞数目高于对照组和高糖组,说明低糖生长环境下细胞生长慢,代谢速度低,对衰老的细胞起到了一定的保护作用,降低细胞的死亡速度。

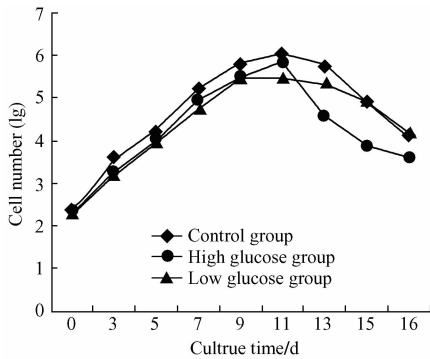


图 2 不同能量组细胞生长曲线

Fig. 2 The cell growth curves of different groups

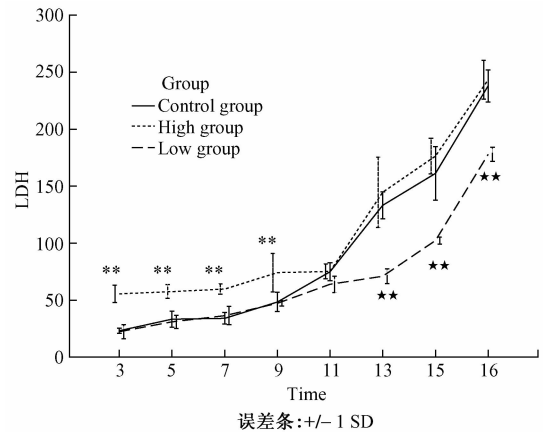
2.3 细胞形态学观察

图 3 所示为各组细胞在不同生长阶段时的细胞形态。图 3.1 所示为生长初期第 3 天的细胞形态,各组细胞数目尚少,细胞在 6 孔板中分布集中,成簇生长,低糖组细胞数目明显较其他两组少。图 3.2 所示为生长中期第 11 天的细胞形态,各组细胞达到汇合状态,数目达到顶峰,细胞生长良好,尤其是低糖组的细胞突起伸展良好细长,而高糖组细胞的突起则相对缩短,不明显。图 3.3 所示为生长末期第

16 天时细胞形态,各组细胞之间差异比较明显,高糖组细胞死亡显著,视野中仅残存少量活细胞,对照组细胞死亡相对较少,但是细胞已经有皱缩,突起结构消失,失去活性,台盼蓝染色时着色较深,低糖组细胞较对照组和高糖组细胞死亡数目少,活性好(图 3 见文后彩插 3)。

2.4 LDH 漏出率测定结果

图 4 所示为各组细胞在不同生长阶段的 LDH 漏出率测定结果。高糖组的 LDH 漏出率始终较其他两组高,说明高糖组代谢快,而且在生长阶段的初期,高糖组与对照组相比,LDH 漏出率的差异有统计学意义。在生长阶段后期高糖组和正常组细胞较低糖组受损明显,代谢产生的废物等致使细胞生长环境变差,不利于细胞生长,从而使细胞大量死亡,LDH 漏出显著,而低糖组细胞则因代谢缓慢,整个生长环境相对平衡,从而细胞在生长后期仍能保持良好的生长状态,LDH 漏出率与对照组相比差异有统计学意义。而且 LDH 漏出率的结果与生长曲线相结合来看结果是一致的。



注:高糖组与对照组相比, **P < 0.01; 低糖组与对照组相比, **P < 0.01

图 4 不同能量组 LDH 漏出率的测定结果

Note: **P < 0.01, the high glucose group compared with the control group; **P < 0.01, the low glucose group compared with the control group.

Fig. 4 The cell LDH leakage rates in different groups

3 讨论

热量限制(30% ~ 50%)这种对机体的干预方式的有利作用已经在各种生理和病理动物模型中得到验证,作用广泛,涉及到延缓衰老、对抗各种老年性疾病,使机体保持年轻生理状态等。其中热量

限制对于改善动物认知功能,预防和改善神经退行性疾病的作用也是当今研究的热点之一。SH-SY5Y 细胞来源于人神经母细胞瘤,其细胞形态及生理、生化功能与正常神经元相似,已广泛用于神经生物学的研究。本实验遵循热量限制的定义,将在体适度热量限制转换成降低细胞体外培养条件中葡萄糖的浓度,将一般体外培养人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 葡萄糖浓度从 3.15 g/L 下降到 2 g/L (36% 热量限制),观察这样的条件对细胞基本生长情况的影响,并采用高糖培养条件作为阳性对照,应用 MTT 代谢率测定,细胞生长曲线及 LDH 漏出率测定等基本指标对这一体外模型进行评价。

本实验观察到低糖培养条件下 MTT 代谢率测定结果低,细胞代谢缓慢,在整个生长周期中,细胞生长缓慢,生长环境相对稳定,该组细胞保持了较恒定的细胞生长能力和修复能力,虽然早期细胞生长较慢,但是其保持了一定的增殖潜力,在实验末期相对于其他两组死亡不明显,LDH 漏出率偏低,残存有活性的细胞数较多,细胞形态仍较年轻,如突起伸展良好。我们得到的结论是低糖培养条件不但不会对细胞造成损伤,反而起到一定程度的保护作用,延缓细胞进入衰老阶段的进程,让细胞处在有活力的生长阶段。这一结论与 CR 在动物实验中的研究结论相一致^[6],CR 可以使机体延缓衰老,可能就是 CR 使细胞保持了年轻的生理状态,从而使得整个机体处于协调状态,更有效的延长寿命,延缓衰老。

在上述低糖培养条件对人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 降低代谢,保护其生长能力的同时,作为阳性对照的高糖培养条件显示了一系列相反的作用,高糖培养条件可以导致细胞衰老加快,LDH 漏

出率增加,死亡加速,和既往报道结果一致^[7]。

热量限制对机体的各种作用机制已经被人们研究了 70 多年,仍然未完全得以阐述,本实验通过建立人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 热量限制模型,可在相对简单可控条件下进行生长、代谢以及深入分子信号转导相关的一系列细胞和分子水平的研究,为热量限制对神经系统疾病的研究提供了基础支持。

参考文献:

- [1] McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. 1935[J]. Nutrition, 1989, 5(3):155-171.
- [2] Ding Q, Ash C, Mracek T, et al. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulating adiponectin in rats[J]. J Nutr Biochem, 2011, [Epub ahead of print].
- [3] Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys [J]. Science, 2009, 325(5937):201-204.
- [4] Matochik JA, Chefer SI, Lane MA, et al. Age-related decline in striatal volume in rhesus monkeys: assessment of long-term caloric restriction [J]. Neurobiol Aging, 2004, 25(2):193-200.
- [5] Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, et al. Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008, 63(6):556-559.
- [6] Edward JM. Overview of caloric restriction and aging [J]. Mechanisms Aging Dev, 2005, 126(9):913-922.
- [7] 王蓉,张景艳,张岱,等. APP17 肽对高糖引起神经毒作用的影响[J]. 中国糖尿病杂志,2000, 8(3):168-170.

[修回日期]2011-09-10