

丙烯酰胺对 SH-SY5Y 神经细胞凋亡和 miR-21 表达的影响

邓飞飞, 李小婷, 朱明明, 梁照峰, 谢 玮, 朱剑云, 朱维维, 武洁姝, 耿珊珊, 谢春风, 钟才云*

(南京医科大学公共卫生学院营养与食品卫生系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨丙烯酰胺(AA)对人 SH-SY5Y 神经细胞凋亡和 miR-21 表达的影响。方法:不同浓度丙烯酰胺作用于人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞活力的影响,Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞凋亡,real-time PCR 检测 miR-21 表达水平,Western blot 检测 PTEN、p-AKT、AKT、Bcl-2、Bax、caspase 9 和 caspase 3 蛋白表达。结果:丙烯酰胺剂量依赖性地降低 SH-SY5Y 细胞活性,Hoechst 33258 染色显示明显细胞凋亡形态变化;丙烯酰胺显著降低 SH-SY5Y 细胞 miR-21 的表达,同时升高 PTEN、Bax、caspase 9、caspase 3 水平并降低 p-AKT 和 Bcl-2 表达。结论:丙烯酰胺可通过线粒体途径诱导 SH-SY5Y 神经细胞凋亡,其机制可能与丙烯酰胺引起 miR-21 表达下调有关。

[关键词] 丙烯酰胺;神经毒性;SH-SY5Y 细胞;凋亡;miR-21

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-947-06

doi:10.7655/NYDXBNS20130719

Effects of acrylamide on apoptosis and miR-21 expression in SH-SY5Y cells

Deng Feifei, Li Xiaoting, Zhu Mingming, Liang Zhaofeng, Xie Wei, Zhu Jianyun, Zhu Weiwei, Wu Jieshu, Geng Shanshan, Xie Chunfeng, Zhong Caiyun*

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of acrylamide on apoptosis and miR-21 expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Methods:** Cell viability of SH-SY5Y cells treated with different concentrations of acrylamide for 24 hours was measured by MTT. Hoechst 33258 staining was used for the determination of cell apoptosis; miR-21 expression was detected by real-time PCR; the expression levels of PTEN, p-AKT, AKT, Bcl-2, Bax, caspase 9 and caspase 3 were examined by Western blot. **Results:** Acrylamide exposure resulted in decreased viability and induction of apoptosis of SH-SY5Y cells in a dose-dependent manner. miR-21 expression was downregulated by acrylamide. Meanwhile, acrylamide increased the expression levels of PTEN, Bax, caspase 9 and caspase 3, and decreased p-AKT and Bcl-2 expression in SH-SY5Y cells. **Conclusion:** Acrylamide induces apoptosis of SH-SY5Y cells via mitochondrion pathway, and down-regulation of miR-21 may be involved in the regulation of apoptotic process induced by acrylamide.

[Key words] acrylamide; neurotoxicity; SH-SY5Y cells; apoptosis; miR-21

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):947-952]

丙烯酰胺(acrylamide, AA)是一种白色晶体化学物质,分子量小、亲水性高,易于经血液扩散至全身各个器官^[1]。人体可通过消化道、呼吸道、皮肤黏膜等多种途径接触丙烯酰胺。近年来,在一些油炸和烧烤的淀粉类食品,如炸薯条、炸土豆片中检出大量丙烯酰胺,其危害日益引起人们重视。

丙烯酰胺的神经毒性已经为许多学者公认,主要造成人类和动物的神经轴突病变,影响中枢与周边神经统,导致神经麻痹与运动失调等症状^[2]。研究表明,丙烯酰胺的神经毒性可能与氧化损伤、细胞凋亡有关。迄今,丙烯酰胺毒性与微小 RNA(mi-croRNAs, miRNAs) 之间关系的研究尚未见任何报道。miRNAs 是一组内源性非编码小 RNA,具有高保守性和组织特异性的特点,参与基因转录后表达调控^[3]。miR-21 是一种在细胞生长和凋亡过程中起着十分重要作用的 miRNA,其作为一种主要的抗凋亡 miRNA,通过靶向作用于多种细胞凋亡相关因

[基金项目] 南京医科大学引进人才启动资金

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cyzhong@njmu.edu.cn

cn

子发挥抗凋亡作用。miR-21 的表达下调可促进多种细胞的凋亡过程。

神经细胞凋亡是神经退行性变疾病发展的重要机制。人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞因其细胞形态、生理和生化功能与正常神经细胞相似,被广泛用于神经系统疾病的发病机制研究^[4]。关于丙烯酰胺诱导神经细胞凋亡是否与其引起 miR-21 表达变化有关,目前未见相关报道。本研究以人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为体外模型,探讨丙烯酰胺对人神经细胞凋亡与 miR-21 表达变化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株(中国科学院上海细胞库);丙烯酰胺(99.9%)(美国 Amresco 公司);RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(奥地利 PAA laboratories 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);胰蛋白酶、Hoechst 33258 荧光染色试剂盒(上海碧云天公司);IX-70 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, 韩国 Biosharp 公司);逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司);抗人 PTEN、p-AKT、AKT、Bcl-2、Bax、caspase 9、caspase 3 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);β-actin 抗体(美国 Bioworld 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞培养在含 10%胎牛血清,青霉素为 100 U/ml,链霉素为 100 μg/ml 的 RPMI1640 培养基中,在 37℃和 5%CO₂ 恒温培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次,待细胞长满至 80%左右单层时,用 0.25%胰蛋白酶溶液进行消化、传代。取生长良好的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 方法检测细胞活力

取对数生长期的细胞,制成细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 2 000 个细胞,设 6 个平行,12 h 后加丙烯酰胺溶液(药物终浓度为 0、0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mmol/L),培养 24 h 后,每组加入浓度为 5 g/L 的 MTT 20 μl,继续孵育 4 h 后,弃去上清加入 DMSO 150 μl,震荡 10 min 待结晶溶解后用酶标仪 490 nm 波长测定吸光度值。

1.2.3 Hoechst 33258 荧光染色检测凋亡

将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4 个/ml 密度接种于 6 孔培养板内,24 h 后加入丙烯酰胺,终浓度分别为

0、1、2、4 mmol/L。培养 24 h 后,用 Hoechst 33258 荧光染色检测细胞凋亡方法,详见参考文献^[5]。

1.2.4 real-time PCR 检测 miR-21 和 miR-146a 表达

常规收集细胞,用 PBS 洗 2 次,按照 TRIzol 法提取总 RNA,测定 RNA 浓度,逆转录合成 cDNA,按试剂盒说明书配置反应体系,每组设 3 个平行样,利用 7300 进行 real-time PCR 实验。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

常规收集细胞,用 PBS 洗 2 次,按照总蛋白提取试剂盒说明提取总蛋白,-20℃保存备用。用 BCA 法进行蛋白定量。取 60 μg 蛋白质样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜,对膜依次进行封闭、一抗(1:1 000)4℃过夜、二抗(1:10 000)室温孵育 1 h。ECL 显色、显影、定影。采用 Image J 软件对免疫印迹条带扫描后进行分析,各实验组重复 3 次以上。

1.3 统计学方法

数据以 SPSS11.0 统计软件处理分析,各组之间的数据比较采用方差分析,多组间两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

丙烯酰胺作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,对细胞活力产生明显影响(图 1)。随着丙烯酰胺浓度的增加,细胞活性逐渐降低;当丙烯酰胺浓度为 4 mmol/L 时,SH-SY5Y 细胞活力仅为对照组的 47%。

2.2 丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞凋亡的诱导作用

细胞发生凋亡的早期,可出现明显的细胞形态学的变化,包括染色质固缩、细胞核致密浓染或呈碎块状致密浓染。本实验通过 Hoechst 33258 染色,荧光显微镜下观察细胞形态学的变化,结果显示丙烯酰胺诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡随丙烯酰胺浓度的

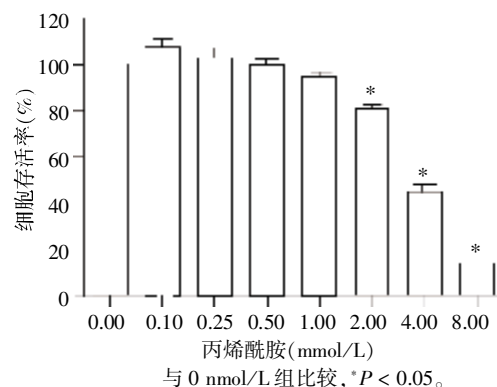


图1 丙烯酰胺对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

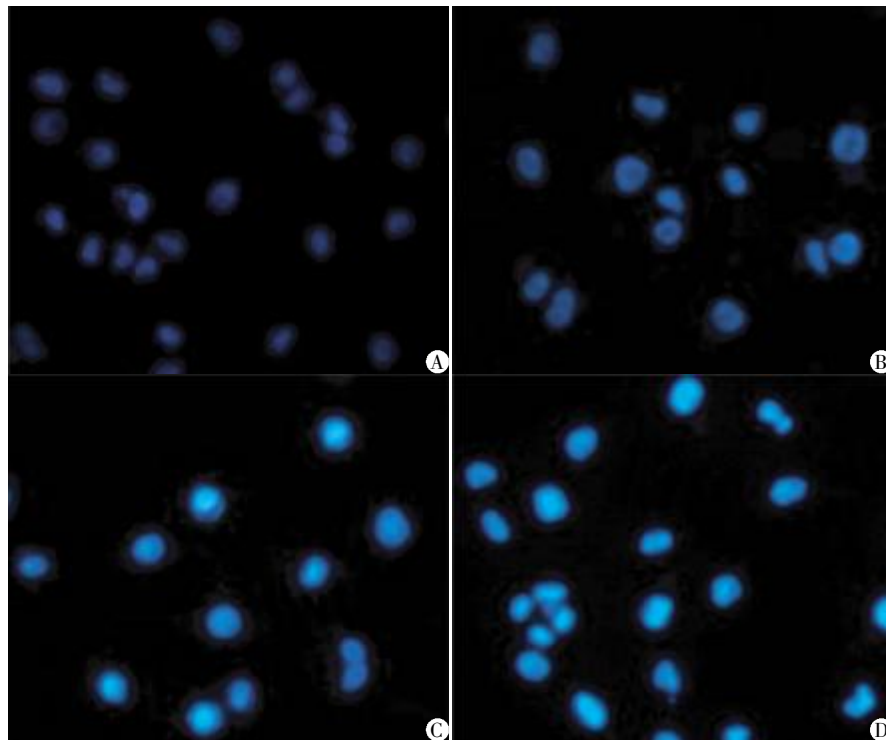
Figure 1 Effect of acrylamide on the viability of SH-SY5Y cells

增加而增加,呈剂量—效应关系(图 2)。

2.3 丙烯酸酰胺对 SH-SY5Y 细胞中 miR-21 和 miR-146a 表达的影响

用不同浓度的丙烯酸酰胺作用 SH-SY5Y 细胞

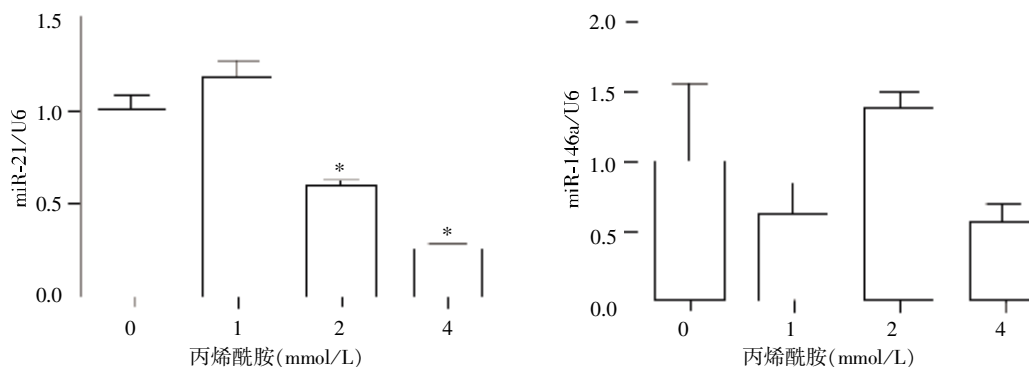
24 h 后,RT-PCR 检测 miR-21 和 miR-146a 的表达水平。结果显示,丙烯酸酰胺显著降低 SH-SY5Y 细胞的 miR-21 的表达水平,而丙烯酸酰胺对 miR-146a 表达水平未产生明显影响(图 3)。



A~D:丙烯酸酰胺 0、1、2、4 mmol/L。

图 2 丙烯酸酰胺对 SH-SY5Y 细胞凋亡的诱导效应($\times 100$)

Figure 2 Acrylamide induced apoptosis in SH-SY5Y cells($\times 100$)



与 0 mmol/L 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 丙烯酸酰胺对 SH-SY5Y 细胞 miR-21 和 miR-146a 表达的影响

Figure 3 Effect of acrylamide on expression levels of miR-21 and miR-146a in SH-SY5Y cells

2.4 丙烯酸酰胺对 PTEN、p-AKT、Bcl-2、Bax、caspase 9、caspase 3 表达的影响

基于上述丙烯酸酰胺下调 miR-21 表达水平的实验结果,进一步观察了丙烯酸酰胺对 miR-21 的凋亡相关靶基因及 caspase 表达水平的变化。不同浓度

丙烯酸酰胺作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,用 Western blot 检测 PTEN、p-AKT、Bcl-2、Bax、caspase 9、caspase 3 的表达(图 4)。随着丙烯酸酰胺浓度的增加,PTEN 和 Bax 的表达水平明显升高,而 p-AKT、Bcl-2 的表达水平明显下降;丙烯酸酰胺显著增加了 caspase

9 和 caspase 3 的活性。

3 讨论

丙烯酰胺作为一种常见的化工原料,广泛存在于人们的生活中。2002年4月瑞典国家食品管理局(National Food Administration, NFA)和斯德哥尔摩大学研究人员率先报道在一些油炸和烘烤的淀粉类食品中检出高浓度丙烯酰胺,之后挪威、英国、瑞士

和美国等国家也相继报道了类似结果^[6]。各国的检测结果显示,丙烯酰胺在油炸、烘烤高淀粉食品(如炸薯片、炸薯条、饼干、面包等)中含量较高,而在鱼、肉、啤酒、以及蒸煮食品中含量较低^[7],其中以炸薯片中含量最高,平均达 1 312 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。最近德国科学家又有并报道称在一些婴儿食品中发现较高的丙烯酰胺,有的含量甚至 2 倍于炸薯条。淀粉类食品在加热过程中,尤其是在与美拉德反应早期产物共同

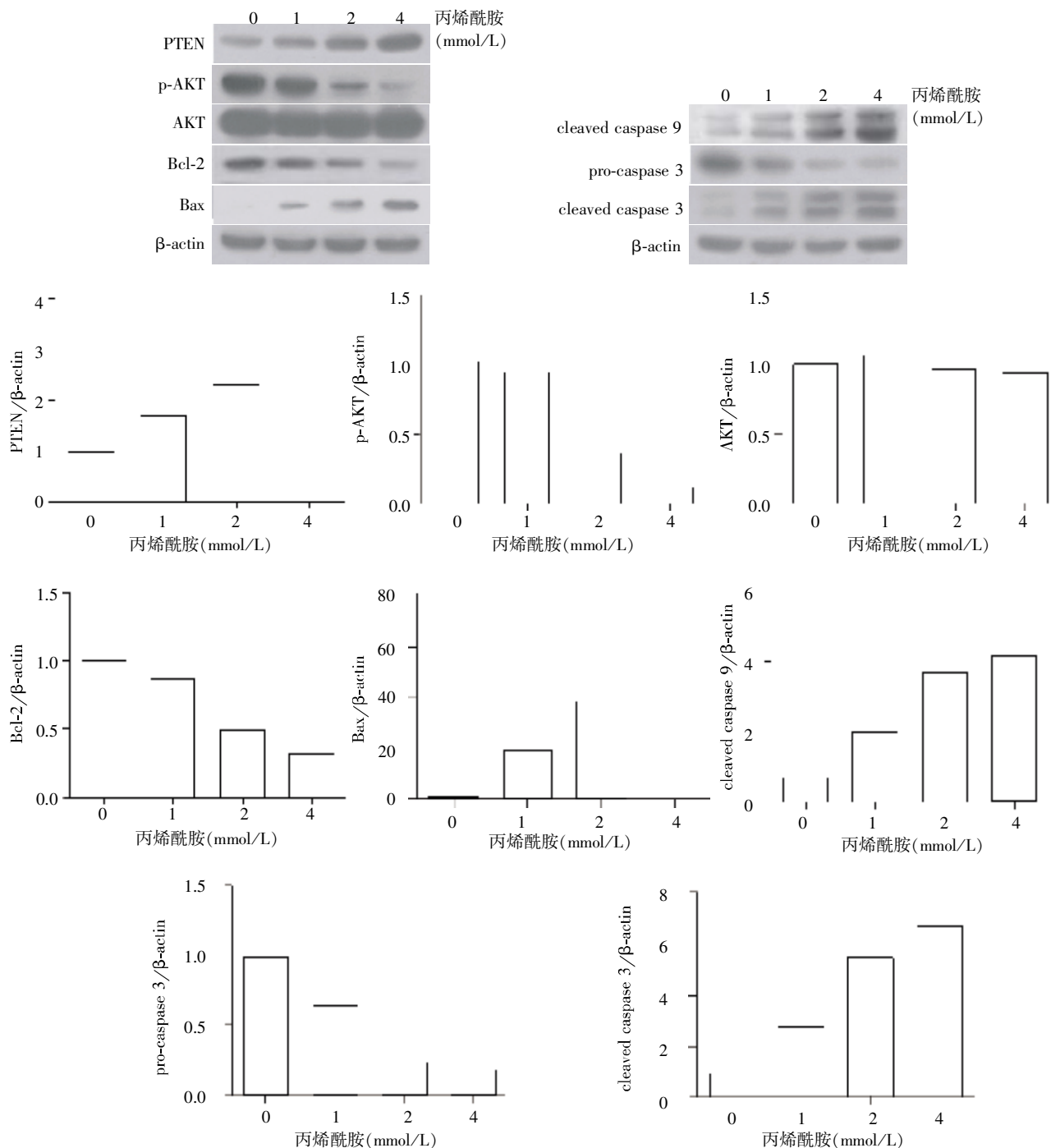


图4 丙烯酰胺对 PTEN、p-AKT、Bcl-2、Bax、caspase 9、caspase 3 蛋白表达水平的影响

Figure 4 Effect of acrylamide on protein expression levels of PTEN、p-AKT、Bcl-2、Bax、caspase 9 and caspase 3 in SH-SY5Y cells

作用时,某些特定氨基酸(如天门冬氨酸)会释放出丙烯酰胺^[9]。

流行病学研究显示,许多国家人群都存在丙烯酰胺暴露风险。Kongings 等^[10]研究得出,荷兰人群丙烯酰胺暴露水平为 0.48 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$,其中 1~6 岁小孩为 1.04 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$,主要食物来源为炸薯片。此外,挪威人平均暴露水平男女性分别为 0.36 和 0.33 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$,其中 13 岁青少年男女分别为 0.52 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$ 和 0.49 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$,主要食物来源为马铃薯制品和咖啡。瑞典人暴露水平为 0.5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$,主要食物来源为咖啡和面包^[7]。德国人暴露水平为 0.6 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{bw}\cdot\text{d})$ 。我国尚缺少足够数量的各类食品中丙烯酰胺含量数据,以及这些食品的摄入量数据,因此还不能确定我国人群的暴露水平。由于丙烯酰胺具有神经毒性、遗传毒性和潜在的致癌性,因此食品中丙烯酰胺的污染引起国际社会高度关注。2005 年,世界卫生组织及联合国粮农组织食品添加剂联合专家委员会警告公共关注食品中的丙烯酰胺,呼吁采取措施减少食品中的丙烯酰胺含量,以确保食品的安全性。

丙烯酰胺的神经毒性主要导致神经末梢轴突肿胀、变性,造成肢体虚弱和共济失调,但其损伤机制较为复杂,目前还不是很清楚,可能与氧化损伤、细胞凋亡等有关^[11]。Sumizama 等^[12]发现丙烯酰胺能够通过 ERK 信号通路激活 caspase 3 活性导致细胞凋亡。丙烯酰胺也可以通过死亡受体 Fas 诱导细胞凋亡^[13]。本研究中观察了丙烯酰胺对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞凋亡的诱导效应。SH-SY5Y 细胞因其具有可兴奋性、分泌神经递质(多巴胺、去甲肾上腺素和/或乙酰胆碱)及与神经细胞相似的膜结合分子和胞质分子而表现出类似纹状体内多巴胺能神经元特性,且避免了神经细胞原代培养诸多不便因素给体外实验带来的局限,是研究神经元凋亡的最常用细胞模型。本研究发现,丙烯酰胺可明显诱导 SH-SY5Y 细胞产生凋亡,此种效应呈现为剂量-一效应关系。

MicroRNAs 作为一种新的基因表达调控机制,通过转录水平或转录后水平调控蛋白表达。miR-21 是一种重要的抗凋亡 miRNA,能靶向调节多种凋亡相关基因表达而调控凋亡过程^[14]。在成胶质瘤细胞中,miR-21 被认定为抗凋亡因子^[15]。Corsten 等^[16]发现在神经胶质瘤细胞中 miR-21 处于高表达水平,敲除 miR-21 后能促进细胞凋亡。Chen 等^[17]发现,在神经胶质瘤细胞 T98G 中,过表达 miR-21 减少了细胞

凋亡。为了探讨丙烯酰胺诱导的神经细胞凋亡是否与 miR-21 有关,本研究分析了丙烯酰胺对 miR-21 表达水平的影响。结果发现不同浓度丙烯酰胺处理 SH-SY5Y 后,miR-21 表达明显下调,而 miR-146a 并没有显著性变化,表明丙烯酰胺能选择性地下调 SH-SY5Y 细胞中 miR-21 的表达水平。

研究表明,miR-21 可直接调控 PTEN 的表达,其通过与 PTEN mRNA 的 3'UTR 区匹配直接降解 mRNA 或抑制其翻译;上调或下调 miR-21 可分别抑制或促进 PTEN 表达水平^[18]。PTEN 作为重要的抑癌基因,可通过抑制其下游 AKT 的磷酸化而促进细胞凋亡。Meng 等^[19]证实 miR-21 被抑制后,PTEN 的表达水平上升。Haas-Kogan 等^[20]发现,在 PTEN 突变的多形性胶质母细胞瘤细胞系 SF188 中转染野生型 PTEN 质粒后可降低 AKT 活性和磷酸化水平。由于 AKT 可通过磷酸化抑制促凋亡蛋白 Bad、Bax 以及 caspase9 而促进细胞存活,AKT 活性的降低则可促进细胞凋亡。除了调控 PTEN-AKT 途径以外,miR-21 还影响其他重要的细胞凋亡调控基因。Dong 等^[21]和 Shi 等^[22]分别在胰腺癌细胞和神经胶质母细胞瘤中发现 miR-21 能够直接靶向促进 Bcl-2 基因的表达。Bcl-2 可通过与 Bax 形成二聚体后,抑制线粒体释放细胞色素 C^[23],进而抑制其下游 caspase 9 和 caspase 3 活化来抑制凋亡。本研究发现,丙烯酰胺在下调 SH-SY5Y 细胞 miR-21 表达的同时,能增强 PTEN 表达水平,抑制 AKT 磷酸化,升高 Bax 并降低 Bcl-2 表达,增加 caspase 9 和 caspase 3 的活性,促进细胞凋亡。结果表明了丙烯酰胺通过线粒体途径诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。

综上所述,丙烯酰胺可下调 SH-SY5Y 细胞 miR-21 表达水平并通过线粒体途径诱导细胞凋亡。miR-21 可能在丙烯酰胺诱导的细胞凋亡中发挥着重要的作用,然其确切的作用还需要进一步的研究加以验证。从 miRNA 角度探讨丙烯酰胺的神经毒性,将为更深入地研究其毒理学分子机制提供新的策略和新的科学依据。

[参考文献]

- [1] Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, et al. Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer[J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87(5): 1428-1438
- [2] 陈炯翰,詹东荣,张芳嘉,等. 丙烯酰胺之代谢、神经毒性与对食品安全之影响[J]. *台湾兽医志*, 2011, 37(1): 63-73

- [3] Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2009, 84(1):55-71
- [4] 冯波, 王蓉, 盛树力. 神经退行性疾病研究中拟神经细胞模型: 人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 的来源特性及应用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(6):121-123
- [5] 李小婷, 殷辰俞, 孟徐莲, 等. 褐藻糖胶抑制人肝癌细胞 HePG₂ 增殖的机制[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(9):1261-1265
- [6] Konings EJ, Baars AJ, van Klaveren JD, et al. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks[J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41(11):1569-1579
- [7] Svensson K, Abramsson L, Becker W, et al. Dietary intake of acrylamide in Sweden [J]. *Food and Chem Toxicol*, 2003, 41(11):1581-1586
- [8] Rudén C. Acrylamide and cancer risk-expert risk assessments and the public debate[J]. *Food and Chem Toxicol*, 2004, 42(3):335-349
- [9] Stadler RH, Blank I, Varga N, et al. Acrylamide from Maillard reaction products [J]. *Nature*, 2002, 419 (6906):449-450
- [10] Konings EJ, Baars AJ, van Klaveren JD, et al. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risks [J]. *Food and Chem Toxicol*, 2003, 41(11):1567-1579
- [11] 宋亚鹏. 丙烯酰胺神经毒性机制研究进展[J]. *畜牧兽医学杂志*, 2010, 29(2):43-45
- [12] Sumizawa T, Igisu H. Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells[J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(4):279-282
- [13] 刘燕群, 吴丽娜, 鲁雄兵, 等. 死亡受体途径在丙烯酰胺致 PC12 细胞凋亡中的影响 [J]. *现代预防医学*, 2011, 38(10):1908-1909
- [14] Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(5):706-713
- [15] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6029-6033
- [16] Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, et al. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma Growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell-delivered S-TRAIL in human gliomas [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19):8994-9000
- [17] Chen Y, Liu W, Chao T, et al. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G [J]. *Cancer Lett*, 2008, 272(2):197-205
- [18] Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(4):493-506
- [19] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2):647-658
- [20] Hass-Kogan D, Shalev N, Wong M, et al. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(21):1195-1198
- [21] Dong J, Zhao YP, Zhou L, et al. Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells[J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(1):8-14
- [22] Shi L, Chen J, Yang J, et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity[J]. *Brain Res*, 2010, 1352:255-264
- [23] Zhang H, Li Q, Li Z, et al. The protection of Bcl-2 overexpression on rat cortical neuronal injury caused by analogous ischemia/reperfusion *in vitro* [J]. *Neurosci Res*, 2008, 62(2):140-146

[收稿日期] 2013-04-17