

植物甾醇生理功能的线粒体调控机制*

楼静 崔亚娟 刘健康 赵琳**

(西安交通大学生命科学与技术学院, 线粒体生物医学研究所, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049)

摘要 植物甾醇是一类在植物中广泛存在的生物活性物质, 在食品、医药、化妆品等领域具有广阔应用前景. 植物甾醇作为胆固醇类似物可抑制胆固醇肠道吸收进而降低血液中胆固醇水平、降低心血管疾病风险; 此外, 植物甾醇还具有抑癌、抗炎退热、抗氧化和类激素等多种功能. 从亚细胞及分子水平深入探究植物甾醇的生物作用机制有助于充分开发植物甾醇的应用价值. 线粒体是细胞能量物质代谢最重要的场所, 胆固醇代谢、癌细胞增殖与凋亡、氧化应激和炎症反应等都与线粒体功能密切相关. 近年来研究提示植物甾醇可在多种模型中调控线粒体功能, 这可能是植物甾醇发挥各种生物学功能的重要潜在机制. 本文将首先整理归纳植物甾醇生物学功能, 并在此基础上详细讨论其线粒体相关调控机制, 以期为领域内基础研究者提供前沿思路和进展报告, 并为植物甾醇的应用提供参考依据.

关键词 β -谷甾醇, 胆固醇, 抗癌, 线粒体膜电位, 抗氧化酶
学科分类号 Q548, Q73

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0116

植物甾醇(phytosterol), 也称植物固醇(plant sterol), 是一种具有生物活性的甾体类化合物, 是构成植物细胞生物膜的重要组成部分^[1], 广泛存在于各种植物中. 它在各种油料类植物中的含量相对较高, 因此在植物油及其精炼后的下脚料中广泛存在^[2]. 植物甾醇一般为粉末状或片状的白色固体, 密度大于水, 且不溶于水, 但可溶于部分有机溶剂中. 它的熔点较高, 约为 130℃~140℃^[3]. 植物甾醇是以环戊烷多氢菲为主体骨架(甾核)的三萜类化合物(图 1), 通常含有 28~29 个碳原子, 形成 3 个六元环和 1 个五元环. 在分子结构上, C-3 位上连有的羟基是植物甾醇的主要活性基团, 大部分植物甾醇在 C-5 位有一个双键, C-17 位连有一个含 8~9 个碳的侧链 R 基. 植物甾醇在结构上与胆固醇相似, 区别只在于 C-17 位上连有的 R 基不同, 例如 β -谷甾醇(植物甾醇的一种)相对于胆固醇只是在侧链基团上多了一个乙基^[1,4-5]. 植物甾醇的种类繁多, 现已鉴别出的植物甾醇及衍生物有 200 多种^[2], 根据侧链的不同可将植物甾醇分为 4-无甲基甾醇、4-甲基甾醇和 4、4'-二甲基甾醇^[4], 目前研究最多的则为 4-无甲基甾醇, 包括 β -谷甾醇

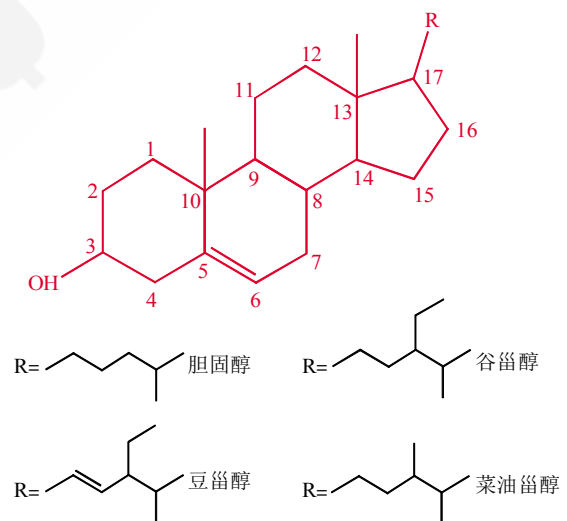


Fig. 1 The basic structure of phytosterol

图 1 植物甾醇的基本结构

* 国家自然科学基金青年项目(31600682)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 029-82665249, E-mail: zhaolin2015@xjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-14, 接受日期: 2018-07-16

醇、菜油甾醇、菜籽甾醇和豆甾醇等。天然的植物甾醇还可以分为游离型和酯化型^[5], 酯化型是指植物甾醇与酸发生酯化反应后形成的植物甾醇酯, 主要存在于谷物类, 包括甾醇乙酸酯、甾醇油酸酯等, 它的吸收利用率比游离型高。自然界中含有双键的植物甾醇被氢化后可形成饱和的植物甾烷醇, 植物甾烷醇较甾醇疏水性更强, 溶解度更低。

作为胆固醇的类似物, 植物甾醇被最早且最为广泛认可的生理功能是可以降低血液中低密度脂蛋白 - 胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平, 即具有降血脂作用, 因此对于心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVDs) 有防治效果。近年来, 关于植物甾醇的研究多集中在它的抗癌作用上。此外研究表明植物甾醇还具有抗炎退热、抗氧化和类激素等作用, 因而能够被应用于医药、食品加工和饲料行业中^[6-7]。

线粒体是真核生物中一种十分重要的细胞器, 它除了是细胞能量供应的“动力工厂”外, 还是许多重要生理活动和物质代谢的发生场所, 其中包括胆固醇的代谢转运、炎症反应、细胞凋亡、癌症发生、氧化应激和甾体类激素合成等生理活动, 其次, 线粒体也是由磷脂双分子层构成的具有双层膜结构的细胞器, 植物甾醇作为固醇的一种, 也能嵌入到线粒体膜结构中影响线粒体的功能。所以植物甾醇可能通过调控线粒体功能而发挥各种生理功能。

1 植物甾醇的生理功能

植物甾醇的生理功能总结于图 2。

1.1 植物甾醇的降胆固醇作用

植物甾醇最早被研究发现的是其降胆固醇作用, 早在 1951 年, Peterson 等^[8]通过给鸡喂食大豆甾醇, 发现鸡血清中胆固醇水平明显下降。1953 年植物甾醇对人类高胆固醇症的治疗效果也被发现^[9], 自此关于植物甾醇的降胆固醇效果被越来越多的研究所证实。2003 年, Katan 的研究中对 41 个实验的 meta 分析结果显示成年人平均摄入 2 g/d 的植物甾醇能使血液中 LDL-C 的浓度降低 10%^[10], 进一步研究表明, 植物甾醇主要通过减少胆固醇的肠道吸收来降低血液中的胆固醇水平, 2 g/d 的植物甾醇摄入使 LDL-C 的肠道吸收减少 30%~40%^[11]。同时, 植物甾醇还有辅助他汀类 (statin) 药物降血脂的作用, 8 个研究 (包含 306 个病人) 的随机对照 meta 分析结果表明, 相比于单一他汀类的治疗, 1.7~6 g/d 植物甾醇或植物甾烷醇与他汀类的共同

作用更能显著降低总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和 LDL-C^[12]。

植物甾醇降胆固醇的主要机制是由于它与胆固醇具有相似的结构, 而且疏水性更强, 因此能竞争性地抑制或取代肠内对胆固醇的吸收, 并且植物甾醇能够通过促进胆固醇的异化作用及抑制胆固醇在肝脏内的合成, 从而降低机体内胆固醇的含量^[13-14]。在 Wang 等^[15]的研究中发现, 植物甾醇 C3 位上的羟基, 对于植物甾醇降低胆固醇活性十分重要, 通过甲基化或乙基化封闭 C3 位的羟基, 形成 β -谷甾醇的衍生物, 给仓鼠喂食衍生物后并不能改善 5 mmol/L 高胆固醇饮食组仓鼠血浆中的胆固醇浓度。

在植物甾醇降胆固醇作用被广泛认可后, 市场上添加植物甾醇的功能性食品的种类也越来越丰富, 因为天然食物中的植物甾醇含量相对较少, 所以目前主要将提纯精炼的植物甾醇添加到包括高脂或低脂的牛奶、酸奶、水果或蔬菜汁等含天然植物甾醇的食物中^[16]。

1.2 植物甾醇的抗癌作用

植物甾醇对乳腺癌^[17]、前列腺癌^[18]、肺癌^[19]、卵巢癌^[20]、肠癌^[21]等多种癌症都有抑制作用。乳腺癌和前列腺癌是在欧美国家发病率极高的两种肿瘤, 但在亚洲国家的发病率则相对较低, 出现这种状况的一部分原因在于饮食习惯的不同, 相对而言, 欧美国家对于动物源食物摄入较多, 对于植物源食物摄入较少, 而植物源食物由于富含一些包括植物甾醇在内的植物素, 因而被认为可能具有抗癌作用。

乳腺癌是女性中发病率极高的一种恶性肿瘤^[22]。近些年来关于植物甾醇的抗癌作用在乳腺癌中也得到了验证。Awad 等^[23]的研究表明用 β -谷甾醇连续处理 72 h 可使乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长减少 70%。胆固醇代谢在乳腺癌的发展中也起到重要作用, 乳腺癌细胞中胆固醇水平较高^[24], 而植物甾醇能使胆固醇水平显著降低。植物甾醇还能改变癌细胞膜的结构和功能, 它能够通过抑制基膜细胞的浸润来减少癌细胞的转移, 限制癌细胞与基膜间的黏附作用^[25]。动物实验结果也表明在高脂食物中添加植物甾醇能有效抑制鼠乳腺癌细胞的生长^[17]。

前列腺癌是男性中发病率极高的一种恶性肿瘤, 植物甾醇对前列腺癌也具有抑制作用。用 β -谷甾醇和菜油甾醇的复合物处理前列腺癌 DU145 和 PC-3 细胞 72 h, 细胞的生长被显著抑制, 同时细胞流式法测定结果表明细胞多处于

G0/G1, 即植物甾醇能使细胞周期停滞, 促进细胞趋于凋亡. 植物甾醇的抗癌机制存在于以下几个方面: 提高抗氧化酶活性, 减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生; 使细胞周期停滞, 抑制癌细胞生长和增殖; 减少癌细胞的浸润, 抑制

癌细胞转移; 减少癌症组织中的血管生成; 促进凋亡途径; 减少血液中的胆固醇水平, 抑制胆固醇进入肿瘤细胞膜脂筏中, 进而减少抗凋亡信号而促进凋亡, 最终降低患癌风险^[25-26].

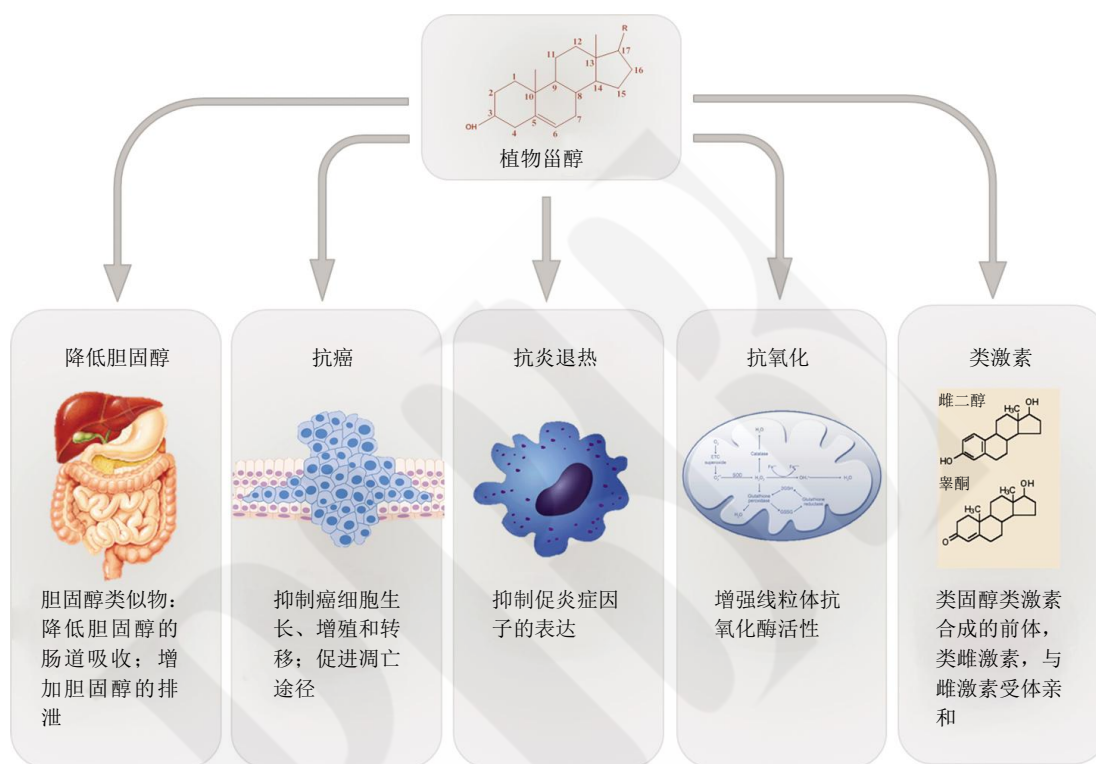


Fig. 2 The physiological functions of phytosterol

图 2 植物甾醇的生理功能

1.3 抗炎退热作用

经植物甾醇预处理后的小鼠模型中, 在诱导自身脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)产生时, 发现植物甾醇能使 EAE 的起始延缓 2 d, 使疾病的严重程度降低 55%, 并发现在中枢神经系统中, 炎症浸润减少 82%, 相关的促炎症因子的表达降低^[28]. 在 Kim 等^[27]的试验中, 连续摄入 8 w 的谷甾醇(20 mg/kg)可抑制高脂饮食引起的 C57BL/6J 小鼠体内促炎症细胞因子和内毒素(lipopolysaccharides, LPS)的增加. 在高脂饮食诱发的结肠炎中, 谷甾醇能降低结肠的炎症反应, 抑制髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO, 与肠道炎症严重程度正相关)的活性及促炎症因子的表达.

谷甾醇能显著抑制经 LPS 处理后肠巨噬细胞中促炎症因子和炎症相关酶环氧化酶 2 (cyclooxygenase2, COX2)和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达, 以及核转录因子 κ B(nuclear transcription factor-kappa B, NF- κ B)的激活^[27]. C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是机体受到微生物入侵或组织损伤等炎症刺激时肝细胞合成的一种急性相蛋白, 它对炎症的高度敏感性使其成为广泛研究的血液炎症标记物, Rocha 等^[23]的文章中对 20 个研究进行 meta 分析, 结果表明平均 2.24 g/d 的植物甾醇摄入能降低血液中的 CRP 浓度. 植物甾醇还具有类似抗炎药物氢化可的松的抗炎作用和阿司匹林的退热作用, 而且不具有药物副作用^[6].

1.4 抗氧化作用

当线粒体膜上的电子传递链发生质子漏时, 能够产生氧自由基, 过多的氧自由基会使脂质过氧化而损伤细胞膜, 而且能使 DNA 发生氧化损伤而突变. 线粒体内的多种抗氧化酶能够清除过多的自由基, 构成机体内重要的抗氧化系统^[28]. 研究表明植物甾醇能增强线粒体中抗氧化酶活性, 提高谷胱甘肽还原型 / 氧化型 (GSH/GSSG) 的比率, 并减少线粒体 ROS 的产生. 在 RAW264.7 巨噬细胞中, 豆蔻酸乙酸佛波醇 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 能诱导细胞氧化损伤, 在经 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -谷甾醇处理后, GSH/GSSG 的比率、锰超氧化物歧化酶 (Mn superoxide dismutase, MnSOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 活性明显增加^[29]. Shi 等^[30] 的实验表明, 当 β -谷甾醇融入海马神经细胞 HT22 的质膜中时, 能抑制葡萄糖氧化酶诱导的细胞中 ROS 的产生和脂质的过氧化. β -谷甾醇也能够进入大脑, 并能在脑细胞质膜中累积, 抑制脂质过氧化, 因而对与脂质过氧化相关的阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 拥有潜在的缓解作用^[31]. 然而, 也有研究表明植物甾醇能减少脂溶性抗氧化剂 β 胡萝卜素 (维生素 A 前体)、番茄红素和 α 生育酚 (维生素 E) 的吸收^[1], 因此也可能对机体内的抗氧化系统产生副作用.

植物甾醇的抗氧化功能在于其分子结构中含有亲水性羟基和碳碳双键, 容易发生氧化反应. 其次, 当发生自由基反应时, 侧链 R 基上含有一个亚乙基, 能快速形成一个自由基, 并随即异构化为叔自由基, 由于叔自由基比脂肪酸碳中心的自由基更稳定, 因而能够保护脂肪酸链免受氧化损伤^[3, 32].

1.5 类激素作用

植物甾醇的类激素作用表现在两个方面, 首先植物甾醇是合成固醇类激素的前体, 因其含有 3 β -羟基和 5、6 位双键的结构特征, 因此在肠道菌群的作用下可以发生生物转化, 如侧链发生裂解后可生成 19C 固醇如睾酮 (testosterone)、雄烯二酮 (androstenedione, AED)、1, 4 雄烯二酮 (androstadienedione, ADD)^[32]. 其次植物甾醇具有类雌激素作用, 并对雌激素受体具有亲和力, 植物甾醇能够增加雌鼠血浆中雌二醇和促黄体素的水平, 还能诱导性未成熟雌性虹鳟鱼卵黄蛋白原的形成^[33], 植物甾醇因具有类雌激素作用而在动物生产中有很好的应用价值, 能够改善动物的繁殖性能.

2 植物甾醇对线粒体的影响及其发挥生理功能的线粒体调控机制

植物甾醇发挥生理功能的线粒体调控机制总结于图 3.

2.1 植物甾醇改变线粒体膜的流动性和膜电位, 调控线粒体凋亡途径

目前认为细胞凋亡的途径主要分为两种^[34], 第一种是死亡受体途径, 也称为外源性途径, 即由死亡受体 (如 Fas、TNF) 与 FADD 结合激活 caspase 级联通路; 第二种是线粒体途径, 也称为内源性途径, 即由 Bcl-2 家族的凋亡前蛋白信号起始, 刺激线粒体内细胞色素 c (cytochrome C, Cyt C) 释放, 从而与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptosis protease activating factor 1, Apaf1) 结合形成多聚体, 招募激活 caspase9 聚集成凋亡小体, 进而使 caspase3 发生剪切而活化, 启动 caspase 级联的凋亡程序. 此外, 线粒体凋亡途径也可不依赖于 caspase 途径, 通过线粒体释放凋亡诱导因子 (apoptosis induce factor, AIF) 直接诱导凋亡发生^[35]. 乳腺癌细胞分别用 60 $\mu\text{mol/L}$ 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -谷甾醇处理 24 h 后, 用 JC-1 法测定结果表明相比于对照组, JC-1 单体 / 聚合物比率分别提高 4.5 倍和 5 倍, 表明 β -谷甾醇能显著性地使癌细胞的线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 去极化, 线粒体膜电位下降被认为是细胞凋亡早期的一个重要特征, 能够诱导线粒体膜发生一系列反应, 促进细胞凋亡的发生^[36]. 在肺癌细胞 HepG2 中发现, 分别用 5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的豆甾醇处理 24 h 发现 MMP 呈现浓度依赖性降低, 位于 G0/G1 及 G2/M 期的细胞数目明显增多, 细胞凋亡水平增加^[37-38]. 在非小细胞肺癌 A549 细胞中的最新研究成果显示, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -谷甾醇能够明显通过 p53/p21 的激活引起 A549 细胞 caspase-3 和 9 活化, 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 阳性细胞增多、PARP (多腺苷二磷酸核糖聚合酶) 失活, PARP 本身是修复 DNA 损伤的, 但在执行凋亡过程中, 被 caspase3 作用而失活, 通过 caspase3 作用而剪切, 促进细胞解体, 并作为细胞发生凋亡的标记)、Bcl-2/Bax 比例改变、MMP 降低和 Cyt C 释放, 从而引起细胞凋亡^[37-38]. 相同的通过植物甾醇引起线粒体膜电位改变, 从而诱导癌细胞凋亡的机制还在人胃癌细胞 AGS^[39]、多发性骨髓瘤细胞 U266^[40]、乳腺癌细胞 MDA-MB-231^[36] 以及 N-二乙基亚硝胺

和氨基三醋酸铁诱导的大鼠肾癌模型^[41]等癌细胞及动物癌症模型中存在, 而且在肌管细胞 L6^[42]、多发性骨髓瘤细胞 U266^[40]、小鼠成肌细胞 C2C12^[43]以及人胃癌细胞 AGS^[39]中均发现 β - 谷甾醇诱导的 AMPK 的激活在促进细胞凋亡及死亡中发挥重要作用, 且 AMPK 的磷酸化水平呈现 β - 谷甾醇浓度依赖性. 并且 Awad 等^[44]在乳腺癌细胞中发现, β - 谷甾醇能够诱导抑制某些特定肿瘤细胞在体外的生长, 降低肿瘤成瘤的大小及转移. 此外, 该研究还发现 β - 谷甾醇诱导的外源性细胞凋亡途径主要通过提高 Fas 受体的表达及 caspase8 的活性来促进凋亡. 因此表明植物甾醇处理后可以同时通过外源及内源凋亡途径促进细胞凋亡, 内源性细胞凋亡途径主要通过改变线粒体膜电位促进癌细胞的凋亡.

对于正常细胞, 植物甾醇却能抑制某些损伤引起的细胞的凋亡, Li 等^[45]的研究中, 0.024 $\mu\text{mol/L}$ 或 2.4 $\mu\text{mol/L}$ β - 谷甾醇都能抑制辐射引起的胸腺细胞的凋亡, 主要是通过减少线粒体膜间隙中凋亡相关蛋白的流出, 包括抑制 Cyt C 释放到胞质, 同时减少 AIF 的线粒体核转运, 抑制辐射诱导的 caspase3 的活化、PARP 的失活、JNK(氨基末端激酶)的磷酸化和激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1, 是 JNK 的下游转录因子)的激活, 未活化的 JNK 不能磷酸化 Bcl-2, 从而阻碍线粒体凋亡途径, 抑制正常细胞凋亡.

Shi 等^[30]的研究表明, 用 15 $\mu\text{mol/L}$ β - 谷甾醇处理海马神经细胞的线粒体后, 能增加线粒体内膜的流动性, 而不影响外膜的流动性, 还能提高线粒体的膜电位. 文献研究提示植物甾醇影响线粒体膜电位的机制在于组成线粒体内膜(inner membrane, IM)和外膜(outer membrane, OM)的脂质种类不同. 外膜由饱和磷脂组成, 并且富含胆固醇, 胆固醇(包括其类似物——植物甾醇)促进饱和磷脂形成高度有序的脂筏样膜结构域, 进而帮助维持外膜的稳定性; 而线粒体内膜胆固醇较少, 主要是由不饱和的磷脂分子构成的, 胆固醇(植物甾醇)与不饱和的磷脂间的双键相互作用, 能使内膜变得无序而增加其流动性, 因此增加线粒体的膜电位^[46]. 在 C2C12 细胞中也发现同样的现象, 用 15 $\mu\text{mol/L}$ β - 谷甾醇处理细胞后, 线粒体内膜流动性增加进而增加线粒体电子传递, 提高线粒体膜电位^[47].

综上, 植物甾醇对于癌细胞具有抑制作用, 能降低癌细胞线粒体膜电位, 诱导线粒体凋亡途径, 进而促进癌细胞凋亡, 对于人体正常细胞植物甾醇

却具有保护作用, 能通过增加膜的流动性提高线粒体膜电位, 促进线粒体的功能, 同时也能通过减少 Cyt C 和 AIF 的和转运抑制正常细胞的凋亡.

2.2 植物甾醇增加线粒体中 GSH/GSSG水平和抗氧化酶的活性, 影响 ROS 释放水平

植物甾醇能通过增加线粒体中 GSH/GSSG 水平来缓解心肌缺血再灌注诱发的心肌损伤, 在该心肌损伤动物模型中, 3.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 35 $\mu\text{g/kg}$ 的 β - 谷甾醇能使雌性大鼠心肌损伤导致的乳酸脱氢酶逸出(LDH-leakage)分别减少 17% 和 31%, 使 GSH/GSSG 水平分别提高 100%和 128%, 同时非损伤动物模型中, β - 谷甾醇也能增加雌性心脏中线粒体谷胱甘肽氧化状态, 但都对雄性动物没有影响^[48]. 植物甾醇对于心脏保护作用的性别依赖性被认为主要是由于雄性动物对植物甾醇吸收利用效率低, 排泄速度快. 雌性小鼠对食物中植物甾醇的肠道吸收效率是雄性的 1.3 倍, 而且吸收后的植物甾醇直到 4 d 后还依然在雌性的某些组织器官中有一定量的存在, 雄性动物则在 1 d 以后就将大部分的植物甾醇排泄出体外, 并且部分植物甾醇能够在雄性动物性腺中被转化为类固醇类激素^[49], 因此降低了植物甾醇在雄性动物中的抗氧化作用. 研究还发现, 分别给予雌性大鼠 3.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 35 $\mu\text{g/kg}$ β - 谷甾醇都可以保护 CCl₄ 所导致的肝毒性, 机制与保护心肌损伤类似, 主要通过谷胱甘肽还原酶介导的线粒体内谷胱甘肽氧化还原循环增加有关, 使肝脏内 GSH/ GSSG 水平升高, 防止 ROS 损伤. 此外, β - 谷甾醇能够诱导肝脏内线粒体异柠檬酸脱氢酶活性增加. 异柠檬酸脱氢酶的活性对于 NADPH 的供给十分重要, NADPH 含量的增加为 GSSG 还原为 GSH 提供了更多的底物, 促进肝脏内 GSH/GSSG 水平升高^[50-51]. 在非小细胞肺癌 A549 细胞中, β - 谷甾醇通过抑制 Trx/Trx1 还原酶活性诱导过量 ROS 产生, ROS 积聚引发 DNA 损伤, 从而破坏癌细胞的生理功能^[49]. Ojo 等^[52]的研究中发现, 小麦胚芽中含有大量的植物甾醇, 小鼠给予 10% 的小麦胚芽饮食后, 可恢复高脂饮食所引起的线粒体复合物 2 水平的增加, 线粒体复合物 2 水平的增加提示代谢压力增加, 且小麦胚芽饮食可以恢复高脂饮食引起的 MnSOD 水平的下降. 在 Li 等^[45]的研究中发现 β - 谷甾醇能抑制经辐射处理的胸腺细胞中 ROS 的增加, 维持线粒体膜的稳定性, 同时还增加包括 SOD(superoxide dismutase, SOD)、GPx 和过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶的活性.

植物甾醇能够诱导细胞及动物体内 ROS 水平的下降, 阿尔茨海默病作为一种神经退行性疾病, 有越来越多的证据表明氧化应激反应中的自由基促进 AD 的产生, 所以摄入富含植物甾醇的食物可能有益于预防 AD 的产生. 文献报道, 植物甾醇对于 AD 的形成具有抑制作用, 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 是一种跨膜蛋白, APP 的加工与膜的脂筏结构密切相关, 在脂筏结构内和非脂筏结构内各存在有一个 APP 池, β -分泌酶和 γ -分泌酶能定位于脂筏结构上, 因此能使 APP 异常加工形成 sAPP β 和 A β , 而 α -分泌酶和一部分 γ -分泌酶定位于非脂筏结构, 因此使 APP 正常加工而形成 sAPP α 和 p3, A β 的沉积则是 AD 形成的重要病理特征. 作为脂筏结构的组成部分, 胆固醇对 APP 的加工也有影响. 同样, 当胆固醇被植物甾醇替代后也将影响 APP 的加工. 当用 15 μ mol/L 的谷甾醇处理 HT22 细胞后, 引起质膜中 9% 的胆固醇被谷甾醇所替代, 并与对照组相比, 细胞中 sAPP α 含量增加, A β 含量减少, 同时质膜脂筏中的 APP 减少, 非脂筏结构中的 APP 增加, 即谷甾醇促进 APP 的正常加工和 APP 向非脂筏结构中的迁移^[53], 提示 β -谷甾醇可能对 AD 有缓解作用.

2.3 植物甾醇调控线粒体解偶联蛋白的表达和 ATP 的生成, 影响细胞的能量来源

在 Wong 等^[48]的研究中发现, β -谷甾醇能够刺激 H9c2 细胞产生更多的 ATP, 但用 Clark 型氧电极检测时发现 β -谷甾醇同时刺激了线粒体 III 态(有充足的底物以及 ADP 存在的情况下氧气消耗的速率)及 IV 态(ADP 已经被完全磷酸化为 ATP 后线粒体的呼吸速率)的耗氧, 发现偶联效率降低. Wong 等^[47]发现, 用 β -谷甾醇处理 C2C12 细胞后, 随着 C2C12 肌管能量需求的增加, β -谷甾醇预保护的细胞表现出对 ATP 产生更快的线粒体反应, 该反应涉及了膜流动性的增加和诱导解偶联蛋白 3 (uncoupling protein3, UCP3) 的表达. 线粒体膜流动性增加使线粒体膜电位上升并伴随着 ROS 的产生, 为了防止过多 ROS 产生致使细胞凋亡, 该细胞通过 AMPK/PGC-1 α 促进氧化还原敏感的线粒体解偶联蛋白 UCP3 的表达^[49]. 在后续的研究中发现, 在细胞具有能量需求时, β -谷甾醇能够增加膜的流动性, 增加呼吸链电子传递提高 ATP 产量. 但在正常状态没有能量需求的条件下, β -谷甾醇同时也增加解偶联蛋白 UCP3 的表达, 该蛋白

质发挥功能时能消除线粒体内膜两侧的跨膜质子浓度差, 使通过浓度差驱动的氧化磷酸化进程减慢, 影响 ATP 的生成, 从而控制过多活性氧产生^[47]. 在动物模型中也发现, β -谷甾醇能够使 CCl₄ 损伤后肝脏内 ATP 含量增加, 说明 β -谷甾醇能够保护 CCl₄ 损伤后的电子传递及氧化磷酸化, 但在未受损的肝脏组织内, β -谷甾醇的加入反而会降低肝脏内 ATP 的水平, 这与 β -谷甾醇诱导解偶联蛋白表达有关, 解偶联蛋白的表达能够降低线粒体内过多 ROS 的产生^[51]. 综上, 植物甾醇能够影响细胞内 ATP 的产生, 但在不同细胞及不同处理条件下的影响存在差异.

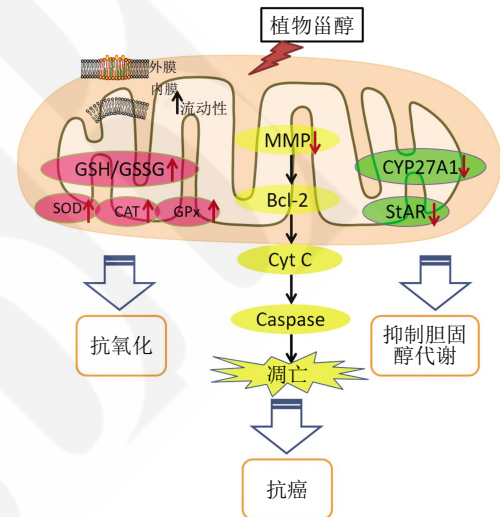


Fig. 3 The mitochondria related regulatory mechanism of physiological functions phytosterols play

图 3 植物甾醇发挥生理功能的线粒体相关调控机制

植物甾醇通过增加线粒体中 GSH/GSSG 水平及抗氧化酶(SOD、CAT、GPx)活性发挥抗氧化功能; 植物甾醇能直接融入到线粒体的膜结构而促进内膜的流动性, 从而降低 MMP 并促进线粒体凋亡途径发挥抗癌作用; 通过降低线粒体内与胆固醇代谢转运相关酶的表达而抑制胆固醇的代谢. MMP: 线粒体膜电位; Cyt C: 细胞色素 C; CYP27A1: 固醇-27 羟化酶; StAR: 性腺类固醇激素合成急性调节蛋白.

2.4 植物甾醇改变线粒体上与胆固醇代谢转运相关酶的表达

植物甾醇能抑制肝脏线粒体固醇-27 羟化酶 CYP27A1 的活性, 300 μ mol/L 的 β -谷甾醇可使 CYP27A1 的活性降低 50%, 该酶能够羟化胆固醇第 27 位碳, 并催化胆汁酸生物合成途径^[54], 从而影响胆固醇的代谢. 将成年雄性金鱼暴露于含 55% β -谷甾醇的水中 24~31 d 后, 分离出性腺线

粒体发现, 孕烯醇酮的产量减小, 该指标反应了线粒体内胆固醇库的含量减小, 表明 β -谷甾醇阻碍了胆固醇通过线粒体膜的转运^[55]. 植物甾醇还能够降低雄性金鱼体内的性腺类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)表达^[56], 该蛋白质通过调控胆固醇在线粒体内的转运, 影响类固醇类激素合成.

3 结语与展望

植物甾醇具有降胆固醇、抗癌、抗炎退热、抗氧化和类激素等生理功能, 这些生理功能的发挥与它对线粒体功能的调控密不可分. 植物甾醇能够通过直接融入到线粒体的膜结构中调节线粒体膜流动性、增加线粒体抗氧化防御能力、调节线粒体膜电位和解偶联蛋白的表达、调节 ATP 生成能力等方面影响线粒体的功能. 但是植物甾醇调控线粒体功能并发挥某些生物学功能的具体机制仍不十分明确, 如植物甾醇对于癌细胞与正常细胞的线粒体膜电位和线粒体凋亡途径的影响是相反的, 在不同细胞及不同生理状态下植物甾醇对线粒体 ATP 的产生存在差异. 因此植物甾醇调控线粒体功能的具体机制还需要进一步研究阐明.

植物甾醇由于具有上述重要的生理功能而被应用于食品、医药、化妆品和畜禽养殖等行业中, 美国食品药品监督管理局(FDA)在 2000 年通过了植物甾醇或甾烷醇酯的安全性普遍认可认证, 并批准此类产品可以添加“有益健康”的标志, 而中国卫生部分别于 2007 年和 2010 年批准植物甾醇酯和植物甾烷醇酯可以作为新资源食品. 在未来还需要更加深入和全面的认识植物甾醇的生物学功能和作用机制, 及其可能存在的毒副作用, 如对内分泌系统的影响、对其他脂溶性物质的吸收的影响等, 以支撑其作为功能性食品的开发和推广.

参 考 文 献

- [1] Sayeed M S B, Karim S M R, Sharmin T, *et al.* Critical analysis on characterization, systemic effect, and therapeutic potential of beta-sitosterol: a plant-derived orphan phytosterol. *Medicines*, 2016, **3**(4): 29
- [2] Ulbricht C E. An evidence-based systematic review of beta-sitosterol, sitosterol (22, 23- dihydrostigmasterol, 24-ethylcholesterol) by the natural standard research collaboration. *Journal of Nutraceuticals Functional & Medical Foods*, 2016, **13**(1): 35-92
- [3] 代广辉, 王敏. 植物甾醇性质、功能及其在食品中的应用. 开封教育学院学报, 2016, **36**(2): 261-262
Dai G H, Wang M. *Journal of Kaifeng Institute of Education*, 2016, **36**(2): 261-262
- [4] Valitova J N, Sulkarnayeva A G, Minibayeva F V. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry*, 2016, **81**(8): 819-834
- [5] Mirasmoreno B, Sabaterjara A B, Pedreno M A, *et al.* Bioactivity of phytosterols and their production in plant *in vitro* cultures. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, **64**(38): 7049-7058
- [6] Xuan L, Peng S, Wei Z. Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 2015, **13**(7): 4231-4254
- [7] Declodet A I, Landschoot A V, Vanhaecke L. Fractional factorial design-based optimisation and application of an extraction and UPLC-MS/MS detection method for the quantification of phytosterols in food, feed and beverages low in phytosterols. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**(27): 7731-7744
- [8] Peterson D W. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine Society for Experimental Biology & Medicine*, 1951, **78**(1): 143
- [9] Pollak O J. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation*, 1953, **7**(5): 702-706
- [10] Katan M B, Grundy S M, Jones P, *et al.* Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 2003, **78**(8): 965-978
- [11] Demonty I, Ras R, Van-Der-Knaap H G, *et al.* Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *Journal of Nutrition*, 2009, **139**(2): 271-284
- [12] Scholle J M, Baker W L, Talati R, *et al.* The effect of adding plant sterols or stanols to statin therapy in hypercholesterolemic patients: systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 2009, **28**(5): 517-524
- [13] De S E, Mensink R P, Plat J. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2012, **56**(7): 1058-1072
- [14] Ikeda I. Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. *Journal of Oleo Science*, 2015, **64**(1): 9-18
- [15] Wang X, Huang W, Lei L, *et al.* Blockage of hydroxyl group partially abolishes the cholesterol-lowering activity of β -sitosterol. *Journal of Functional Foods*, 2015, **12**: 199-207
- [16] Ras R T, Trautwein E A. Consumer purchase behaviour of foods with added phytosterols in six European countries: data from a post-launch monitoring survey. *Food & Chemical Toxicology*, 2017, **110**: 42-48
- [17] Llaverrias G, Escolà-Gil J C, Lerma E, *et al.* Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, **24**(1): 39-48
- [18] Ifere G O, Equan A, Gordon K, *et al.* Cholesterol and phytosterols differentially regulate the expression of caveolin 1 and a downstream prostate cell growth-suppressor gene. *Cancer*

- Epidemiology, 2010, **34**(4): 461–471
- [19] Huang J, Xu M, Fang Y J, *et al.* Association between phytosterol intake and colorectal cancer risk: a case-control study. *British Journal of Nutrition*, 2017, **117**(6): 839–850
- [20] Bin Sayeed M S, Ameen S S. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. *Nutrition & Cancer-an International Journal*, 2015, **67**(8): 1216–1222
- [21] Sadek N F, Yuliana N D, Prangdimurti E, *et al.* Plant sterol esters in extruded food model inhibits colon carcinogenesis by suppressing inflammation and stimulating apoptosis. *Journal of Medicinal Food*, 2017, **20**(7): 659–666
- [22] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics. *Cancer J Clin*, 2011, **61**(2): 69–90
- [23] Rocha V Z, Ras R T, Gagliardi A C, *et al.* Effects of phytosterols on markers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 2016, **248**: 76–83
- [24] Jr G B. Plant sterols as anticancer nutrients: evidence for their role in breast cancer. *Nutrients*, 2013, **5**(2): 359–387
- [25] Ramprasath V R, Awad A B. Role of phytosterols in cancer prevention and treatment. *Journal of Aoac International*, 2015, **98**(3): 735–738
- [26] Shahzad N, Khan W, Md S, *et al.* Phytosterols as a natural anticancer agent: current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2017, **88**: 786–794
- [27] Kim K A, Lee I A, Gu W, *et al.* β -Sitosterol attenuates high-fat diet-induced intestinal inflammation in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 in the NF- κ B pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, **58** (5): 963–972
- [28] 廖日滔, 郭静科, 李冰洁, 等. 自由基相关细胞信号传导的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2014(11): 1573–1583
Liao R T, Guo J K, Li B J, *et al.* *Chinese Journal of Cell Biology*, 2014(11): 1573–1583
- [29] Vivancos M, Moreno J J. beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med*, 2005, **39**(1): 91–97
- [30] Shi C, Wu F, Zhu X, *et al.* Incorporation of β -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation *via* estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1830**(3): 2538–2544
- [31] Rong S, Xu R, Li W. Phytosterols and dementia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016, **71**(4): 1–8
- [32] 李博, 李满, 杨雪, 等. 植物甾醇的生理功能及在动物生产中的应用. *饲料博览*, 2011, **2011**(1): 42–45
Li B, Li M, Yang X, *et al.* *Feed Review*, 2011, **2011**(1): 42–45
- [33] Xiong L, Liu H, Xu L, *et al.* Role identification and application of SigD in the transformation of soybean phytosterol to 9α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione in *Mycobacterium neoaurum*. *Journal of Agricultural & food Chemistry*, 2017, **65**(3): 626–631
- [34] Xu W, Guo G, Li J, *et al.* Activation of Bcl-2-Caspase-9 apoptosis pathway in the testis of asthmatic mice. *Plos One*, 2016, **11** (3): e149353
- [35] Gruber H E, Hoelscher G L, Bethea S, *et al.* Mitochondrial membrane potential and nuclear and gene expression changes during human disc cell apoptosis: *in vitro* and *in vivo* annulus findings. *Spine*, 2015, **40**(12): 876–882
- [36] Vundru S S, Kale R K, Singh R P. β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1(2013-10-25), 2013, **13**(1): 280
- [37] Kim Y S, Li X F, Kang K H, *et al.* Stigmaterol isolated from marine microalgae *Navicula incerta* induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Bmb Reports*, 2013, **47**(8): 433–438
- [38] Rajavel T, Packiyaraj P, Suryanarayanan V, *et al.* β -Sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells *via* ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 2071
- [39] Shin E J, Choi H K, Sung M J, *et al.* Anti-tumour effects of beta-sitosterol are mediated by AMPK/PTEN/HSP90 axis in AGS human gastric adenocarcinoma cells and xenograft mouse models. *Biochemical Pharmacology*, 2018, **152**: 60–70
- [40] Sook S H, Lee H J, Kim J H, *et al.* Reactive oxygen species-mediated activation of AMP-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase plays a critical role in beta-sitosterol-induced apoptosis in multiple myeloma U266 cells. *Phytotherapy Research Ptr*, 2014, **28**(3): 387–394
- [41] Sharmila R, Sindhu G. Modulation of angiogenesis, proliferative response and apoptosis by β -sitosterol in rat model of renal carcinogenesis. *Indian J Clin Biochem*, 2017, **32**(2): 142–152
- [42] Hwang S L, Kim H N, Jung H H, *et al.* Beneficial effects of beta-sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2008, **377**(4): 1253–1258
- [43] Wong H S, Chen J, Leong P K, *et al.* A cistanches herba fraction/ beta -sitosterol causes a redox-sensitive induction of mitochondrial uncoupling and activation of adenosine monophosphate-dependent protein kinase/peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 in C2C12 myotubes: a possible mechanism underlying the weight reduction effect. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, **2015**: 142059
- [44] Awad A B, Chinnam M, Fink C S, *et al.* β -Sitosterol activates fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*, 2007, **14**(11): 747–754
- [45] Li C R, Zhou Z, Lin R X, *et al.* beta-sitosterol decreases irradiation-induced thymocyte early damage by regulation of the intracellular redox balance and maintenance of mitochondrial membrane stability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, **102**(3): 748–758
- [46] Martinez-Seara H, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, *et al.* Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of the double-bond position. *Biophysical Journal*, 2008, **95** (7): 3295–3305
- [47] Wong H S, Leong P K, Chen J, *et al.* β -Sitosterol increases

- mitochondrial electron transport by fluidizing mitochondrial membranes and enhances mitochondrial responsiveness to increasing energy demand by the induction of uncoupling in C2C12 myotubes. *Journal of Functional Foods*, 2016, **23**: 253–260
- [48] Wong H S, Chen N, Leong P K, *et al.* β -Sitosterol enhances cellular glutathione redox cycling by reactive oxygen species generated from mitochondrial respiration: protection against oxidant injury in H9c2 cells and rat hearts. *Phytotherapy Research*, 2014, **28** (7): 999–1006
- [49] Sanders D J, Minter H J, Howes D, *et al.* The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat. *Food & Chemical Toxicology*, 2000, **38**(6): 485–491
- [50] Mk J S S, Koh H J, Lee S M, *et al.* Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP (+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(19): 16168–16176
- [51] Wong H S, Chen J H, Leong P K, *et al.* β -Sitosterol protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity but not gentamicin nephrotoxicity in rats *via* the induction of mitochondrial glutathione redox cycling. *Molecules*, 2014, **19**(11): 17649–17662
- [52] Ojo B, Simenson A J, O'Hara C, *et al.* Wheat germ supplementation alleviates insulin resistance and cardiac mitochondrial dysfunction in an animal model of diet-induced obesity. *Br J Nutr*, 2017, **118**(4): 241–249
- [53] Wang J, Wu F, Shi C. Substitution of membrane cholesterol with β -sitosterol promotes nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 2013, **247**: 227–233
- [54] Lizard G. Impact of phytosterols on mitochondrial functions. *British Journal of Nutrition*, 2011, **106**(4): 461–462
- [55] Leusch F D L, Maclatchy D L. *In vivo* implants of β -sitosterol cause reductions of reactive cholesterol pools in mitochondria isolated from gonads of male goldfish (*Carassius auratus*). *General & Comparative Endocrinology*, 2003, **134**(3): 255–263
- [56] Sharpe R L, Woodhouse A, Moon T W, *et al.* Beta-sitosterol and 17 β -estradiol alter gonadal steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression in goldfish, *Carassius auratus*. *General & Comparative Endocrinology*, 2007, **151**(1): 34–41

The Physiological Functions of Phytosterols and Their Underlying Mechanism of Regulating Mitochondria*

LOU Jing, CUI Ya-Juan, LIU Jian-Kang, ZHAO Lin**

(Center of Mitochondrial Biology and Medicine, The Key Laboratory of Biomedical Information Engineer of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract Phytosterols are a type of bioactive substances widely found in plants and have broad application prospects in food, medicine, cosmetics and other fields. Phytosterols, as cholesterol analogues, can inhibit the absorption of cholesterol in the intestine and decrease serum cholesterol level and thus reduce the risk of cardiovascular diseases. In addition, phytosterols have many other functions such as cancer suppression, anti-inflammation or anti-fever, anti-oxidation and hormone-like effects. In-depth exploration of the subcellular and molecular mechanism of phytosterols' biological functions contributes to the full development of the application value of phytosterols. Mitochondria are the most important sites for cellular energy metabolism. Cholesterol metabolism, cancer cell proliferation and apoptosis, oxidative stress, and inflammatory response are all closely related to mitochondrial function. Recent studies have suggested that phytosterols can regulate mitochondrial function in various models, which potentially may be a pivotal mechanism underlying phytosterols' various biological functions. This article will first summarize the biological functions of phytosterols and then discuss its mitochondria-related regulatory mechanisms in detail, hoping to provide frontier insights and progress report for researchers in the field as well as to provide reference for the application of phytosterols.

Key words β -sitosterol, LDL-C, anticancer, mitochondrial membrane potential, antioxidase

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0116

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31600682).

**Corresponding author.

Tel: 86-29-82665249, E-mail: zhaolin2015@xjtu.edu.cn

Received: April 14, 2018 Accepted: July 16, 2018