

张跃其,胡炳蕾,王默然,等. 芹菜素对帕金森模型细胞氧化应激水平的影响及机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (12): 77-83.

Zhang YQ, Hu BL, Wang MR, et al. Effect of apigenin on oxidative stress in Parkinson's disease model cells and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 77-83.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 12. 012

芹菜素对帕金森模型细胞氧化应激水平的影响及机制的研究

张跃其¹, 胡炳蕾², 王默然³, 马海强⁴, 张 君⁵, 陈学丛^{1*}

(1.潍坊市人民医院神经内科, 山东 潍坊 261000; 2.潍坊市中医医院妇科, 山东 潍坊 261000;

3.潍坊市中医医院老年科, 山东 潍坊 261000; 4.潍坊市中医医院骨科, 山东 潍坊 261000;

5.山东第一医科大学第一附属医院神经内科, 济南 250013)

【摘要】 目的 研究芹菜素 (AGN) 对 MPP⁺ 诱发的帕金森细胞模型中自噬、氧化应激的影响及神经保护作用。**方法** CCK-8 筛选 AGN 有效浓度, SH-SY5Y 细胞分 6 组: ①对照组; ②MPP⁺ 组; ③A 组: AGN 浓度 10 $\mu\text{mol/L}$; ④B 组: AGN 浓度 20 $\mu\text{mol/L}$; ⑤C 组: AGN 浓度 40 $\mu\text{mol/L}$; ⑥D 组: AGN 浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 。确定 AGN 有效浓度后将细胞分为 3 组: 对照组、MPP⁺ 组及 AGN+MPP⁺ 组。检测细胞凋亡及 Caspase3、Bcl-2、Bax、LC3-II、LC3-I、Beclin-1、ULK1 蛋白表达, 检测丙二醇、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶水平。分析每组 GFP-LC3 斑点。**结果** AGN 在 40 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著降低 MPP⁺ 诱导的细胞毒性损伤, 选择 40 $\mu\text{mol/L}$ 作为最佳药物保护浓度进行后续研究。AGN+MPP⁺ 组细胞凋亡率较 MPP⁺ 组下降 ($P<0.05$)。相较于 MPP⁺ 组, AGN+MPP⁺ 组 Caspase3 表达降低, Bcl-2/Bax 值升高 (P 值均 <0.01)。与 MPP⁺ 组比较, AGN+MPP⁺ 组抑制 MDA 的表达 ($P<0.05$), 恢复 GPX 和 SOD 的活性 ($P<0.05$)。AGN+MPP⁺ 组细胞内 GFP-LC3 斑点较 MPP⁺ 组显著减少 ($P<0.05$)。对比 MPP⁺ 组, AGN+MPP⁺ 组 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、ULK1 表达显著降低 (P 值均 <0.05)。**结论** AGN 能减轻 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 增强抗氧化能力, 其细胞保护作用可能与降低细胞自噬水平相关。

【关键词】 芹菜素; 自噬; 氧化应激; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 12-0077-07

Effect of apigenin on oxidative stress in Parkinson's disease model cells and its mechanism

ZHANG Yueqi¹, HU Binglei², WANG Moran³, MA Haiqiang⁴, ZHANG Jun⁵, CHEN Xuecong^{1*}

(1. Department of Neurology, Weifang People's Hospital, Weifang 261000, China. 2. Department of Gynecology, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261000. 3. Department of Geriatrics, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261000. 4. Department of Orthopedics, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261000. 5. Shandong Department of Neurology, First Affiliated Hospital of First Medical University, Jinan 250013)

【Abstract】 Objective To study the effect of apigenin (AGN) on autophagy and oxidative stress, and its neuroprotection in MPP⁺-induced Parkinson's model cells. **Methods** CCK-8 assays were used to screen the effective concentration of AGN. SH-SY5Y cells were divided into six groups: ① Control group; ② MPP⁺ group; ③ group A: 10 $\mu\text{mol/L}$ AGN; ④ group B: 20 $\mu\text{mol/L}$ AGN; ⑤ group C: 40 $\mu\text{mol/L}$ AGN; ⑥ group D: 100 $\mu\text{mol/L}$ AGN. After

[基金项目] 潍坊市卫生和计划生育委员会中医药科研项目 (2018-1-006)。

[作者简介] 张跃其 (1981—), 男, 副主任医师, 研究方向: 神经退行性疾病。E-mail: zhangyueqi0126@126.com

[通信作者] 陈学丛 (1987—), 男, 主治医师, 研究方向: 脑血管病及神经退行性疾病。E-mail: 346395661@qq.com

determining the effective concentration of AGN, the cells were divided into three groups: Control, MPP⁺, and AGN+MPP⁺ groups. Apoptosis, protein expression of Caspase 3, Bcl-2, Bax, LC3-II, LC3-I, Beclin-1, and ULK-1, and propylene glycol, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels were examined. Analyze each group of GFP-LC3 spots.

Results AGN at 40 $\mu\text{mol/L}$ significantly reduced the cytotoxic damage induced by MPP⁺. Therefore, 40 $\mu\text{mol/L}$ AGN was chosen as the optimal protective concentration for subsequent experiments. The apoptosis rate of the AGN+MPP⁺ group was lower than that of the MPP⁺ group ($P < 0.05$). Compared with the MPP⁺ group, expression of Caspase 3 was decreased and the Bcl-2/Bax ratio was increased in the AGN+MPP⁺ group (all $P < 0.01$). Compared with the MPP⁺ group, expression of MDA was inhibited ($P < 0.05$) and the activities of GPX and SOD were restored in the AGN+MPP⁺ group ($P < 0.05$). Intracellular GFP-LC3 spots in the AGN+MPP⁺ group were significantly reduced compared with those in the MPP⁺ group ($P < 0.05$). Compared with the MPP⁺ group, the LC3-II/LC3-I ratio and expression of Beclin-1 and ULK1 were significantly reduced in the AGN+MPP⁺ group (all $P < 0.05$). **Conclusions** AGN alleviates apoptosis of SH-SY5Y cells induced by MPP⁺ and enhances their antioxidant capacity. Its cytoprotective effect may be related to reduction of autophagy.

【Keywords】 apigenin; autophagy; oxidative stress; apoptosis

帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,主要表现为静息性震颤、姿势异常、肢体僵硬和运动障碍,60岁以上的人群中患病率约为1%^[1],而未来20年罹患人数将增加一倍,全世界PD患者预计将超过1400万^[2],因此,针对PD治疗措施的研究具有重要的社会及临床意义。PD的神经化学特征包括活性氧生成、线粒体功能障碍、炎症、错折叠蛋白的积累和泛素蛋白酶体系统功能障碍。目前研究发现自噬途径调控异常在PD的发生发展过程中发挥着重要作用^[3],其参与了PD患者中多种病理过程,最终出现清除受损蛋白质和/或细胞器功能异常。

芹菜素(4',5,7-三羟基黄酮,apigenin, AGN)是存在于水果和蔬菜(例如洋葱,橙子)中的类黄酮的一个子类^[4],而类黄酮可以保持黑质纹状体的完整性和功能性^[5]。AGN在各种细胞类型中具有多种生物活性,例如抗氧化、抗炎和抗肿瘤发生^[4]。研究发现AGN可保护脑神经血管抵抗淀粉样蛋白- β_{25-35} 诱导的小鼠神经毒性^[6],此外AGN可预防小胶质细胞介导的炎症毒性,并维持适当的神经胶质神经元相互作用^[7]。AGN可以作为潜在的神经保护剂来对抗与PD相关的病理过程^[4]。自噬是细胞降解自身受损细胞器和大分子物质的生理过程,其与PD的发展密切相关^[8],目前尚未有关于AGN对PD细胞模型中的神经保护作用及自噬影响的报道。因此,在本研究中,我们研究了AGN对MPP⁺诱发的PD模型中细胞自噬、氧化应激的影响及神经保护作用,为新的PD临床治疗措施提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自美国 ATCC (ATCC-CRL-2260TM)公司。

1.2 主要试剂与仪器

芹菜素购自 Sigma-Aldrich 公司(纯度 98%, 12806KH);胎牛血清(FBS)以及 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;链霉素及青霉素购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 试剂盒购自上海碧云天公司;凋亡检测试剂盒购自法国 Transgene 公司;Capase-3 兔单克隆抗体、Bcl-2 兔单克隆抗体及 Beclin 兔单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;LC3-II 兔单克隆抗体、Bax 兔单克隆抗体、ULK1 兔单克隆抗体、 β 单克隆抗体-鼠单克隆抗体购自美国 CST 公司;二抗及 ECL 发光试剂盒购自上海碧云天公司;PVDF 膜购自美国 Millipore;蛋白电泳系统购自北京六一仪器厂;酶标仪购自美国 Bio-Rad;激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司;流式细胞仪购自美国 BD(FACS Aria III)公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中。细胞培养箱孵育条件为 37℃、5% CO₂。细胞密度 90% 时胰酶消化传代,按照每孔 2×10^3 个细胞接种到 96 孔板进行后续相关实验。

1.3.2 CCK-8 筛选 AGN 有效浓度

以 CCK-8 法检测细胞活力。向每孔加入 CCK-8 溶液 20 μL ,将培养板在培养箱中孵育 2 h,用酶标

仪测定 450 nm 处的吸光度,计算细胞活性。实验重复 3 次。本部分实验分 6 组:①对照组;DMEM 培养基;②MPP⁺组:DMSO(浓度 0.5%)+2.5 mmol/L 的 MPP⁺诱导细胞 24 h;③A 组:加入 AGN 孵育细胞 2 h 后再加入 MPP⁺,AGN 终浓度 10 μ mol/L,MPP⁺终浓度 2.5 mmol/L;④B 组:AGN 终浓度 20 μ mol/L,MPP⁺终浓度 2.5 mmol/L;⑤C 组:AGN 终浓度 40 μ mol/L,MPP⁺终浓度 2.5 mmol/L;⑥D 组:AGN 终浓度 100 μ mol/L,MPP⁺终浓度 2.5 mmol/L。

1.3.3 细胞凋亡率检测

确定 AGN 有效浓度后,将细胞分为 3 组:对照组、MPP⁺组及芹菜素有效剂量组。采用 AnnexinV 与 PI 共染法检测细胞凋亡。将细胞培养于 96 孔板,每孔加入 Annexin V-FITC 结合液,轻轻重悬细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀,加入 10 μ L 碘化丙啶染色液轻轻混匀,室温(25 $^{\circ}$ C)避光孵育 20 min,随后置于冰浴中,用流式细胞仪 FITC 和 PI 通道检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.3.4 蛋白质免疫印迹检测

收集细胞经匀浆后,经 RIPA 法裂解提取蛋白。超声裂解仪裂解 10 次后低温离心机中离心 30 min,取上清并用 BCA 法定量蛋白浓度,蛋白经 SDS-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜,脱脂牛奶摇床上封闭 1 h,加入一抗后置 4 $^{\circ}$ C 恒温摇床过夜。洗膜 3 次后室温孵育二抗 1 h,利用化学发光试剂盒显影蛋白条带,采用 Image-J 软件分析定量蛋白条带, β -actin 为内参。实验重复 3 次。

1.3.5 氧化应激检测

分别收集 3 组细胞到离心管内,离心后超声波破碎细胞,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后取上清,采用丙二醛(malonaldehyde, MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)检测试剂盒用来检测各组中氧化应激相关底物的改变,分光光度计检测吸光度,具体方法参照试剂盒说明书。每组实验均重复 3 次。

1.3.6 GFP-LC3 质粒转染

将 SH-SY5Y 细胞按照每孔 2×10^5 个接种 6 孔板,每孔转染 2 μ g GFP-LC3 质粒,孵育 6 h 更换新培养基,加入相应的药物处理 24 h 后进行 GFP-LC3 斑点计数分析。在胞浆及胞核中 GFP-LC3 散在分布的细胞为自噬阴性细胞,出现 GFP-LC3 斑点聚集的为自噬阳性细胞,各组计数至少 100 个自噬阳性

细胞中的 GFP-LC3 斑点。于激光共聚焦显微镜下扫描转染细胞。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21 软件进行统计分析。计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数的比较采用 ANOVA 分析检验,事后各组间的两两比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

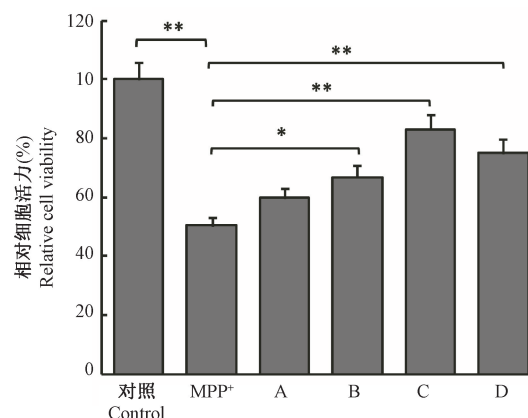
2 结果

2.1 AGN 对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞的保护作用

本实验首先通过 CCK-8 法对 AGN 的有效保护浓度进行筛选。如图 1 所示,20 μ mol/L、40 μ mol/L、100 μ mol/L 三种浓度的 AGN 能显著降低 MPP⁺诱导的细胞毒性损伤,细胞活性明显改善(相较 MPP⁺组, P 值分别 < 0.05 、 < 0.01 、 < 0.01)。AGN 浓度在 40 μ mol/L 时保护作用最强,选择 40 μ mol/L 作为最佳药物保护浓度进行后期实验研究。

2.2 AGN 对 MPP⁺诱导模型细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响

后续实验分为 3 组:对照组、MPP⁺组、AGN + MPP⁺组(AGN 40 μ mol/L)。如图 2A、2B 所示,MPP⁺组细胞凋亡率为 11.03%,较对照组升高($P < 0.01$);AGN + MPP⁺组细胞凋亡率为 6.12%,较 MPP⁺组下降($P < 0.05$)。随后我们比较了各组 Caspase3 及 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。如图 2C、2D 所示,相较于对照组,MPP⁺组细胞 Caspase3 表达明显



注:与 MPP⁺组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 不同剂量 AGN 对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞活性的影响

Note. Compared with the MPP⁺ group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

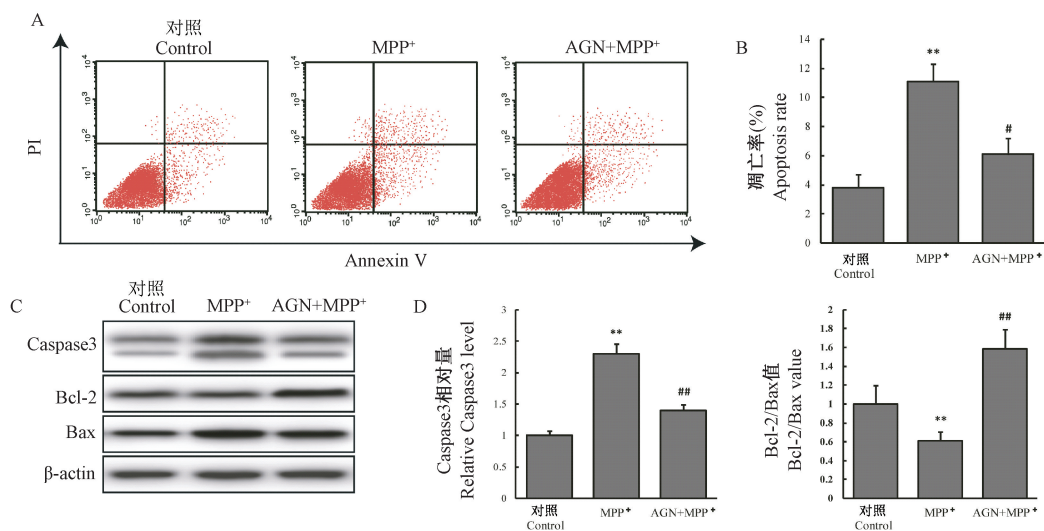
Figure 1 Effects of different doses of AGN on the viability of SH-SY5Y cells induced by MPP⁺

升高, Bcl-2/Bax 值明显降低 ($P < 0.01$); 而 AGN + MPP⁺ 组相较 MPP⁺ 组, Caspase3 表达降低, Bcl-2/Bax 值明显升高 ($P < 0.01$)。以上结果表明 AGN 可改善 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡。

2.3 AGN 对 MPP⁺ 诱导模型细胞氧化应激的影响

进一步检测各组中氧化应激相关底物表达及

酶活性。和对照组相比, MPP⁺ 促进了 MDA 表达 ($P < 0.01$), 而与 MPP⁺ 组比较 AGN 可抑制 MDA 的表达 ($P < 0.05$)。和对照组相比, MPP⁺ 组细胞 GPX 和 SOD 活性降低, 而与 MPP⁺ 组比较 AGN 能恢复 GPX 和 SOD 的活性 ($P < 0.05$)。见图 3。

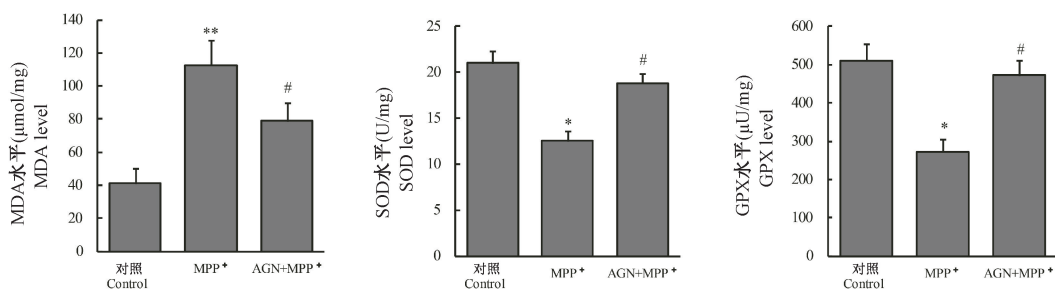


注: A: 流式细胞法检测各组凋亡率; B: 各组细胞凋亡率比较; 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 MPP⁺ 组比较, # $P < 0.05$; C: 免疫印迹法检测各组 Caspase3 及 Bcl-2、Bax 蛋白表达; D: 各组 Caspase3 表达相对量及 Bcl-2/Bax 值比较; 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 MPP⁺ 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 2 AGN 对细胞模型凋亡及凋亡相关蛋白的影响

Note. A, Apoptotic rate of each group was detected by flow cytometry. B, Comparison of cell apoptosis rate in each group. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with MPP⁺ group, # $P < 0.05$. C, Western blot was used to detect the expression of Caspase3, Bcl-2 and Bax protein in each group. D, Comparison of the relative level of Caspase3 and Bcl-2/Bax value in each group. Compared with Control group, ** $P < 0.01$. Compared with MPP⁺ group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of AGN on cell apoptosis and apoptosis-related proteins



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MPP⁺ 组比较, # $P < 0.01$ 。

图 3 AGN 对模型细胞氧化应激的影响

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with MPP⁺ group, # $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of AGN on oxidative stress of model cells

2.4 AGN 对 MPP⁺ 诱导模型细胞 GFP-LC3 斑点形成及自噬蛋白的影响

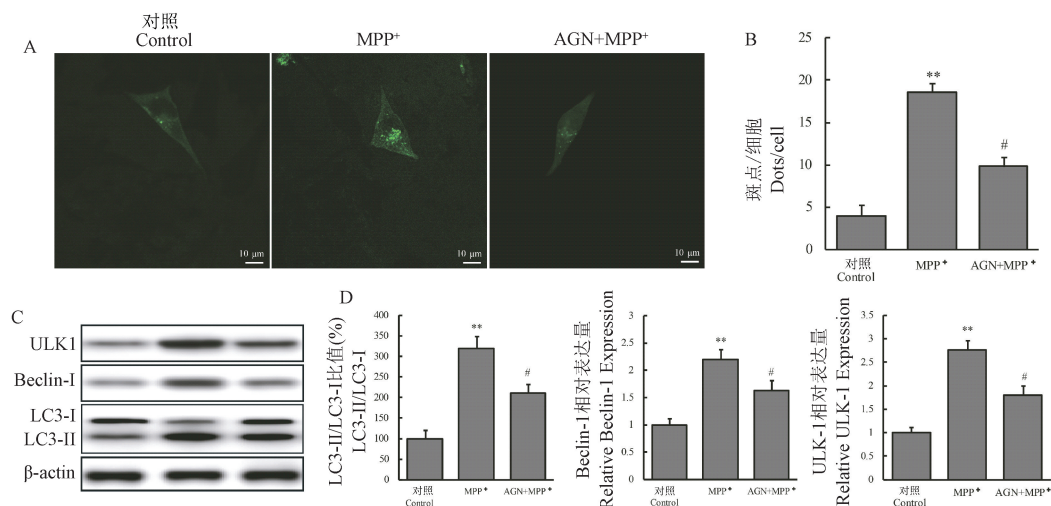
为进一步明确 AGN 对 MPP⁺ 诱导模型细胞自噬的影响,我们进行了 GFP-LC3 斑点形成实验。GFP-LC3 斑点作为胞浆内的自噬标志物,可以反映出自噬体对 LC3 蛋白的募集情况。将 GFP-LC3 质粒转染 SH-SY5Y 细胞,结果显示 MPP⁺ 组细胞内 GFP-LC3 斑点较对照组显著增多 ($P < 0.01$),而 AGN+MPP⁺ 组细胞内 GFP-LC3 斑点较 MPP⁺ 组显著减少 ($P < 0.05$)。见图 4A、4B。随后我们观察了 LC3、Beclin-1 及 ULK-1 蛋白的表达水平。MPP⁺ 处理后,LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、ULK1 表达较对照组显著增加 (P 值均 < 0.01);而对比 MPP⁺ 组,AGN+MPP⁺ 组 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、ULK1 表达显著降低 (P 值均 < 0.05),见图 4C、4D。以上结果进一步证明了 AGN 可显著降低 MPP⁺ 诱导模型细胞的自噬体形成及自噬水平。

3 讨论

PD 病理特征是黑质中的多巴胺能神经元逐渐丧失,随后纹状体中多巴胺水平下降,当神经元减少 50%~70% 时会表现出临床症状^[9]。目前研究证

实氧化应激是 PD 致病机制的重要因素,导致线粒体稳态失调,进而出现细胞凋亡、神经元减少^[10]。在本研究我们发现 AGN 能减轻 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡,增强抗氧化能力,并能降低细胞自噬水平,提示 AGN 对帕金森模型细胞的保护作用与降低细胞自噬水平相关。

氧化应激在 PD 中的神经变性改变起着关键作用,可促炎性细胞因子、活性氧 (ROS)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 以及超氧化物的释放而加速神经退行性过程,加剧了多巴胺能神经元的损伤^[10-11]。PD 患者纹状体和黑质致密部的尸检表明,氧化应激会损害脂质、蛋白质和 DNA 功能,同时降低 SOD、过氧化氢酶和 GPX 的含量^[12-14]。SOD 和 GPX 是清除活性氧自由基的主要酶,其水平降低会使细胞更容易受到氧化损伤^[13]。PD 患者 GPX、SOD 显著耗竭,蛋白质及 DNA 氧化水平显著增加^[15]。人体解剖数据表明,氧化应激的启动最终导致神经元死亡^[14]。另一项临床研究表明,PD 患者黑质多巴胺能神经元的核因子 κB (NF- κB) 的核易位倍数增加,并且 NF- κB 由氧化应激触发,放大了炎症和凋亡程序的过程^[16]。因此,具有神经保护、抗氧化效能的药物具有减缓神经变性进程的潜力,有助于促进神经元细胞存活,从而减轻疾病表现。在各种 PD 实



注:A:激光共聚焦显微镜下各组细胞内 GFP-LC3 斑点;B:各组 GFP-LC3 斑点比较;与对照组比较,** $P < 0.01$;与 MPP⁺ 组比较,# $P < 0.05$;C:免疫印迹法检测各组 LC3、Beclin-1 及 ULK1 蛋白表达;D:各组 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、ULK1 表达比较;与对照组比较,** $P < 0.01$;与 MPP⁺ 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 4 AGN 对 GFP-LC3 斑形成及自噬蛋白的影响

Note. A, GFP-LC3 spots in each group observed by the confocal laser microscope. B, Comparison of GFP-LC3 spots in each group. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with MPP⁺ group, # $P < 0.05$. C, Western blot was used to detect the expression of LC3, Beclin-1 and ULK1 proteins in each group. D, Comparison of the LC3-II/LC3-I ratio and the expression of Beclin-1, ULK1 in each group. Compared with Control group, ** $P < 0.01$. Compared with MPP⁺ group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of AGN on GFP-LC3 plaque formation and autophagy protein

验模型中,用抗炎药抑制神经炎症可减轻多巴胺能神经退行性变^[17]。

在本研究中,AGN 作用下 SOD、GPX、MDA 水平的改变证实了 AGN 对 PD 模型细胞具有很好抗氧化应激作用。AGN 是多种植物中存在的多酚类物质,已知其具有多种生理益处,尤其是在清除自由基、改善认知障碍、改善学习和记忆方面^[18]。有研究对 AGN 在转基因帕金森果蝇模型中的治疗效能进行了检测,发现其可改善果蝇的运动能力^[19]。对小胶质细胞的研究证明,AGN 对炎性介质具有抑制作用,表明其在神经退行性疾病中可能具有神经保护作用^[18]。另一项研究表明 AGN 能促进成年小鼠的神经发生,提示其具备神经保护和神经营养能力^[20]。

自噬是一种降解和回收细胞组分的溶酶体依赖性的内源性过程,目前已经证实其与 PD 的发生发展密切相关^[3]。在本研究中,AGN 在帕金森模型细胞中可抑制 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1、ULK-1,并抑制 LC3 斑点形成,减轻自噬水平。MPP⁺是线粒体呼吸链复合体的抑制剂,MPP⁺可模拟 PD 病理过程,其诱导的氧化损伤类似于 PD 患者大脑中发现的氧化损伤,损害细胞线粒体功能,而这会触发细胞自噬水平^[21]。此外,在 PD 患者中线粒体膜上 α -Syn 过度积累可导致心磷脂暴露于线粒体外膜,从而募集 LC3 连接蛋白,诱导线粒体自噬^[22]。Zhu 等^[23]在 2012 年的一项研究发现,加入 ERK 信号通路特异性抑制剂可抑制 MPP⁺导致的自噬水平升高。以 UO126 抑制 MPP⁺所致的自噬水平升高,会出现线粒体膜电位水平升高,线粒体活性氧水平降低^[24]。半胱氨酰白三烯受体拮抗剂可同步抑制花生四烯酸相关的炎性应激及自噬水平,从而保护神经元,发挥对全脑缺血的治疗作用^[25]。与上述研究类似,本研究中 MPP⁺可增强自噬及氧化应激水平,而 AGN 可抑制自噬及氧化应激水平。UNC51 样激酶(ULK1)是启动自噬级联反应的丝氨酸/苏氨酸激酶。研究发现,miR-132-5p 可靶向抑制 ULK1,改善细胞活力并减少 MPTP 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡^[26],百可利能抑制 ULK1 蛋白过度活化,减轻自噬水平,使帕金森模型小鼠纹状体中酪氨酸羟化酶表达上调,改善小鼠的运动障碍^[27]。另一项研究表明,在 MPP⁺处理的 MN9D 细胞中 ULK1 表达增加,而敲低 ULK1 则增加了神经元细胞的活力^[28]。本研究中 AGN 抑制了 MPP⁺诱导的 ULK1 表达增高,结合前述研究结果分析,AGN 可能是通过调控自噬通路影响了线粒体的氧化应激,进

而发挥细胞保护作用。

综上,我们的结果表明,AGN 能缓解 MPP⁺诱导的氧化应激,减轻细胞凋亡,降低细胞自噬水平。本研究揭示了 AGN 可能通过影响自噬来降低氧化应激水平,从而减弱了 MPP⁺介导的毒性,发生细胞保护作用。但由于氧化应激的复杂性及自噬调控的多样性,AGN 调控自噬及氧化应激的具体分子机制仍需我们进一步研究,为 PD 的转化治疗应用提供更多理论依据。

参考文献:

- [1] Chen HX, Liang FC, Gu P, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 288.
- [2] Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson pandemic—a call to action [J]. Jama Neurol, 2017, 75(1): 9–10.
- [3] Xu H, Watzlawik JO, Fiesel FC, et al. Autophagy in Parkinson's disease [J]. J Mol Biol, 2020, 432(8): 2651–2672.
- [4] Anusha C, Sumathi T, Joseph LD. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis [J]. Chem Biol Interact, 2017, 269: 67–79.
- [5] Siima AA, Stephano F, Munissi JJE, et al. Ameliorative effects of flavonoids and polyketides on the rotenone induced Drosophila model of Parkinson's disease [J]. Neurotoxicology, 2020, 81: 209–215.
- [6] Nikbakht F, Khadem Y, Haghani S, et al. Protective role of apigenin against A β 25–35 toxicity via inhibition of mitochondrial cytochrome C release [J]. Basic Clin Neurosci, 2019, 10(6): 557–566.
- [7] Dourado NS, Souza CDS, de Almeida MMA, et al. Neuroimmunomodulatory and neuroprotective effects of the flavonoid apigenin in *in vitro* models of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease [J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 119.
- [8] Cerri S, Blandini F. Role of autophagy in Parkinson's disease [J]. Curr Med Chem, 2018, 25(20): 3702–3718.
- [9] Silva S, Almeida AJ, Vale N. Importance of nanoparticles for the delivery of antiparkinsonian drugs [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(4): 508.
- [10] Guo JD, Zhao X, Li Y, et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1817–1825.
- [11] Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Neurobiol Dis, 2000, 7(4): 240–250.
- [12] Zhao J, Yu S, Zheng Y, et al. Oxidative modification and its implications for the neurodegeneration of Parkinson's disease [J]. Mol Neurobiol, 2016, 54(2): 1404–1418.
- [13] Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, et al. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging

- human substantia nigra compared to striatum; implications for Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(2): 358-369.
- [14] Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13031.
- [15] Al Shahrani M, Heales S, Hargreaves I, et al. Oxidative stress; mechanistic insights into inherited mitochondrial disorders and Parkinson's disease [J]. *J Clin Med*, 2017, 6(11): 100.
- [16] Wang Y, Wang GZ, Rabinovitch PS, et al. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages [J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 421-433.
- [17] Rai SN, Zahra W, Singh SS, et al. Anti-inflammatory activity of ursolic acid in MPTP-induced parkinsonian mouse model [J]. *Neurotox Res*, 2019, 36(3): 452-462.
- [18] Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of apigenin [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1305.
- [19] Siddique YH, Jyoti S, Naz F. Effect of epicatechin gallate dietary supplementation on transgenic drosophila model of Parkinson's disease [J]. *J Diet Suppl*, 2014, 11(2): 121-130.
- [20] Sharma P, Sharma S, Singh D. Apigenin reverses behavioural impairments and cognitive decline in kindled mice via CREB-BDNF upregulation in the hippocampus [J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 23(2): 118-127.
- [21] Prommahom A, Dharmasaroja P. Effects of eEF1A2 knockdown on autophagy in an MPP⁺-induced cellular model of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Res*, 2020, 164: 55-69.
- [22] Ryan T, Bamm VV, Stykel MG, et al. Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates α -synuclein [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 817.
- [23] Zhu JH, Gusdon AM, Cimen H, et al. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to depletion of functional mitochondria in chronic MPP⁺ toxicity: dual roles for ERK1/2 [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(5): e312.
- [24] Lin KL, Lin KJ, Wang P W, et al. Resveratrol provides neuroprotective effects through modulation of mitochondrial dynamics and ERK1/2 regulated autophagy [J]. *Free Radic Res*, 2018, 52(11-12): 1371-1386.
- [25] 石巧娟, 郭红刚, 楼琦, 等. 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过下调自噬减轻长爪沙鼠的全脑缺血再灌注损伤 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(1): 57-64.
- [26] Zhao J, Yang M, Li Q, et al. miR-132-5p regulates apoptosis and autophagy in MPTP model of Parkinson's disease by targeting ULK1 [J]. *NeuroReport*, 2020, 31(13): 959-965.
- [27] 梁宇, 赵晓悦, 孔德文, 等. 百可利对鱼藤酮损伤模型小鼠自噬的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(10): 113-114.
- [28] Li Y, Zhang J, Yang C. UNC-51-like kinase 1 blocks S6k1 phosphorylation contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease model *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(2): 196-200.

[收稿日期] 2021-05-27

多发性线粒体功能障碍综合征(MMDS)并发心肌病的新型大鼠模型

多发性线粒体功能障碍综合征(MMDS)是一类与线粒体铁硫簇合成相关核基因(nDNA)突变引发的线粒体疾病。MMDS可造成线粒体结构和功能的严重破坏,从而损害多种代谢途径。近年来已有MMDS患者累及心脏的报道,但具体的临床症状和发病机制尚不清楚,同时缺乏相关的动物模型工具。

中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心基因工程技术课题组的研究人员,选择了一个已报道的MMDS致病基因Isca1,利用Isca1条件敲除(Isca1-cKO)大鼠与 α -MHC-Cre工具大鼠杂交培育建立心肌组织特异性Isca1敲除杂合子(Isca1-HET)大鼠。通过透射电镜分析、呼吸链复合物活性及能量生成分析来观察线粒体形态及功能改变,通过超声影像和组织病理学等技术观察模型大鼠成体后心脏发育特征,此外,通过阿霉素处理观察大鼠心脏对病理刺激的反应性。

结果显示Isca1-HET大鼠心肌组织表现出典型的MMDS特征,包括线粒体形态的破坏,线粒体呼吸链复合物I、II和IV酶活性受损以及ATP代谢异常。同时模型大鼠表现为典型的扩张型心肌病特征,包括心室壁变薄、心室扩张、心功能障碍和心肌纤维化等。

综上,本研究建立了一种MMDS并发心肌病的大鼠模型,该模型同时也可作为心肌能量代谢障碍及线粒体心肌病的模型工具。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 4(4):381-390; <https://doi.org/10.1002/ame2.12193>)。