

Apelin-36 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡及线粒体功能的影响^{*}

窦姗姗 高丽颖 林馨怡 孟尧 董康 程葆华[△]
(济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘要 目的 探讨 apelin-36 对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡及线粒体功能的影响。方法 培养 SH-SY5Y 细胞,随机分为对照组、apelin-36 组、鱼藤酮组和 apelin-36+鱼藤酮组。通过鱼藤酮处理 SH-SY5Y 细胞建立帕金森病(Parkinson's disease, PD)体外模型,在给予 apelin-36 预处理后,通过 CCK-8 观察细胞活力, Hoechst 33342 检测细胞凋亡, Western blotting 检测 Bax、bcl-2、 α -synuclein 的表达,试剂盒检测线粒体复合物 I (complex I) 的表达和 ADP/ATP 的比值来观察线粒体功能。结果 与对照组相比,鱼藤酮组细胞活力下降,细胞凋亡增加, α -synuclein 的表达增加,bcl-2/Bax 比值下降,complex I 表达降低,ADP/ATP 比率升高(均 $P<0.05$);而给予 apelin-36 预处理后,与鱼藤酮组相比,apelin-36+鱼藤酮组细胞活力上升,细胞凋亡降低, α -synuclein 的表达减少,bcl-2/Bax 比值增高,complex I 表达升高,ADP/ATP 比率降低(均 $P<0.05$)。结论 Apelin-36 对鱼藤酮引起的 SH-SY5Y 细胞凋亡具有抑制作用,可减轻鱼藤酮所致的 SH-SY5Y 细胞线粒体功能紊乱,起到神经保护作用。

关键词 Apelin-36; 鱼藤酮; 帕金森病; 线粒体损伤; 凋亡

中图分类号: R742.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2022)08-234-05

Effects of apelin-36 on the apoptosis and mitochondrial dysfunction of SH-SY5Y cells induced by rotenone

DOU Shanshan, GAO Liying, LIN Xinyi, MENG Yao, DONG Kang, CHENG Baohua[△]
(College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of apelin-36 on rotenone-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction of SH-SY5Y cells. **Methods** SH-SY5Y cells were cultured and randomly divided into control group, apelin-36 group, rotenone group and apelin-36 + rotenone group. The vitro model of Parkinson's disease (PD) was established by treating SH-SY5Y cells with rotenone. After apelin-36 pretreatment, the cell viability was measured by CCK-8 assay. The apoptosis was measured by Hoechst 33342 staining. The expression of Bax, bcl-2 and α -synuclein was measured by western blotting. Mitochondrial function was detected by complex I and ADP/ATP ratio. **Results** Compared with the control group, the cell viability was decreased and apoptosis was increased in rotenone group. And α -synuclein expression was increased significantly in SH-SY5Y cells with rotenone treatment. Bcl-2/Bax ratio was decreased due to rotenone exposure. Complex I expression was decreased and ADP/ATP ratio was increased after rotenone treatment in SH-SY5Y cells. However, apelin-36 pretreatment significantly inhibited rotenone neurotoxicity including increasing cell viability and decreasing apoptosis of SH-SY5Y cells. Compared with rotenone group, α -synuclein expression was decreased and bcl-2/Bax ratio was increased significantly. And complex I expression was increased and ADP/ATP ratio was decreased significantly due to apelin-36 prertreatment. **Conclusion** Apelin-36 inhibited rotenone-induced the apoptosis of SH-SY5Y cells and alleviated rotenone-induced mitochondrial dysfunction, which played a neuroprotective role against rotenone neurotoxicity.

Keywords: Apelin-36; Rotenone; Parkinson's disease; Mitochondrial damage; Apoptosis

* [基金项目] 济宁医学院教师扶持基金(JYFC2018KJ003); 大学生创新训练项目(CX2019205)

[△] [通信作者] 程葆华, E-mail: chengbh1979@163.com

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的神经退行性疾病^[1], 其主要病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元发生退行性变, 并伴有路易氏小体 (Lewy body, LB) 出现。LB 主要是由于 α -突触核蛋白 (α -synuclein) 的异常积累形成的^[2]。PD 的发病机制还不清楚, 而线粒体功能障碍与 PD 发病机制密切相关^[3-4]。

鱼藤酮 (rotenone) 是一种细胞毒性物质, 可选择性地抑制细胞呼吸链 NADH 脱氢酶 (即复合物 I, complex I) 的活性, 使 NADH 氧化为 NAD 的过程受阻, 减少 ATP 生成, 阻碍质子传递, 细胞中活性氧的含量进而增加, 导致自由基过量累积, 从而促进细胞凋亡^[5-6]。

Apelin 最初是从牛胃组织中分离出来的。Apelin-13、apelin-17 和 apelin-36 是 apelin 前体肽经水解生成的生物活性形式。越来越多的证据表明, apelin 可能在 PD 模型中具有神经保护作用^[7-8]。

本实验用鱼藤酮刺激 SH-SY5Y 细胞, 制作 PD 体外模型, 然后用 apelin-36 干预, 研究 apelin-36 的神经保护作用及对线粒体功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 人神经母细胞瘤细胞系 (SH-SY5Y 细胞) 购自美国菌种保藏中心 (ATCC); DMEM 培养液 (美国 Hyclone 公司); 鱼藤酮 (美国 Sigma 公司); Apelin-36 (美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司); CCK-8 (日本 Dojindo 公司); Hoechst 33342 检测试剂盒 (日本 Dojindo 公司); 线粒体复合物 I (complex I) ELISA 试剂盒 (酶免), ADP/ATP 比率检测试剂盒 (日本 Dojindo 公司); RIPA 裂解液 (碧云天公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (天根生物公司); 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (万类生物公司); α -synuclein 抗体、bcl-2 抗体、Bax 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); β -actin 抗体 (北京中杉金桥有限公司)。

1.1.2 仪器 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); 台式低温高速离心机 (美国 Beckman 公司); 超声波细胞粉碎仪 (江苏波场智能科技股份有限公司); 普通光学

显微镜、倒置生物显微镜 (日本 Olympus 公司); 酶标仪、电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 激光共聚焦扫描显微镜 (SP8) (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SH-SY5Y 细胞培养于 DMEM 培养基中, 内含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (100 U/ml)。将 SH-SY5Y 细胞接种于 96、12 或 6 孔板在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞生长至约 90% 后, 后续根据需要加入鱼藤酮和 apelin-36。

1.2.2 药物处理及分组 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 5×10^4 /孔的密度接种于 96、12 或 6 孔板中, 随机分成 4 组: 对照组、apelin-36 组、鱼藤酮组、apelin-36+鱼藤酮组, 置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 待细胞长至约 90%, apelin-36 组、apelin-36+鱼藤酮组先给予 apelin-36 (10^{-6} M) 预处理, 其他两组加入相同剂量的 PBS, 鱼藤酮组、apelin-36+鱼藤酮组 2h 后给予鱼藤酮 (500 μ M) 处理, 其他两组加入相同剂量 PBS, 放入培养箱培养 24h, 然后进行后续实验。

1.2.3 细胞活力测定 用 CCK-8 法测定细胞活力。首先将 SH-SY5Y 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种在 96 孔培养板中, 细胞长至约 90%, 按上述方法进行药物处理。继续培养约 22h 后, 加入 CCK-8 溶液 (10 μ l/孔), 避光继续孵育 2h。最后在酶标仪 450nm 处测量吸光度值。每组设 6 个复孔, 实验平行重复 3 次。

1.2.4 细胞凋亡检测 将 SH-SY5Y 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 12 孔板的盖玻片上, 细胞长至约 90%, 后按上述方法药物处理。继续培养约 22h 后, 用 PBS 冲洗细胞, 用 4% 多聚甲醛固定 20min, 然后用 PBS 清洗 3 次。随后, 加入 5mg/ml 的 Hoechst 33342, 避光在室温下放置 15min, 再用 PBS 冲洗两次。染色细胞在倒置荧光显微镜下成像。每组选择 3 张照片, 计数凋亡细胞数。

1.2.5 线粒体复合物-I (complex I) 检测 SH-SY5Y 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种在 6 孔培养板中。细胞长至约 90%, 然后按上述方法进行药物处理。继续培养约 22h 后, 去除上清液, 按照人 Complex I ELISA 试剂盒的说明进行操作。

1.2.6 ADP/ATP 比率检测 SH-SY5Y 细胞以 $5 \times$

10^4 /孔的密度接种在白色 96 孔培养板中。细胞长至约 90%, 后按上述方法药物处理。继续培养约 22h 后, 按照 ADP/ATP 比率检测试剂盒说明操作。

1.2.7 相关蛋白表达检测 Western blotting 用于检测 Bax、bcl-2、 α -synuclein 的表达, β -actin 作为对照。方法如下: 按上述方法处理细胞, 然后将 SH-SY5Y 细胞中提取的等量蛋白质 (30 μ g) 加载到 10% SDS-PAGE 上, 随后转移到 PVDF 膜上。在室温下, 用含 5% 无脂奶粉的 TBST (含 1% 吐温 20 的 TBS 缓冲液) 封闭膜 1h, 然后在 4 $^{\circ}$ C 与一抗孵育过夜。然后用 TBST 清膜 3 次, 在室温下与二抗 (1:5000) 孵育 1h。最后加入 ECL 溶液, 暗室内曝光显影。实验平行重复 3 次, 用 ImageJ 软件分析目标条带的灰度值。

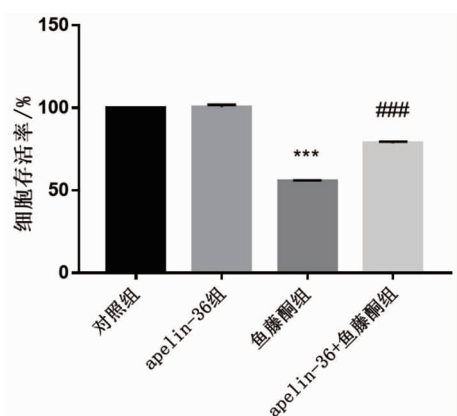
1.3 统计学方法

该实验中的数据使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析方法进行, 组间两两比较用 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 Apelin-36 对鱼藤酮处理的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

鱼藤酮 (500 μ M) 降低了 SH-SY5Y 细胞存活率, 而 apelin-36 (10 $^{-6}$ M) 预处理减轻了鱼藤酮的神经毒性并提高细胞活力。表明 apelin-36 对鱼藤酮诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞存在一定的保护作用。见图 1。

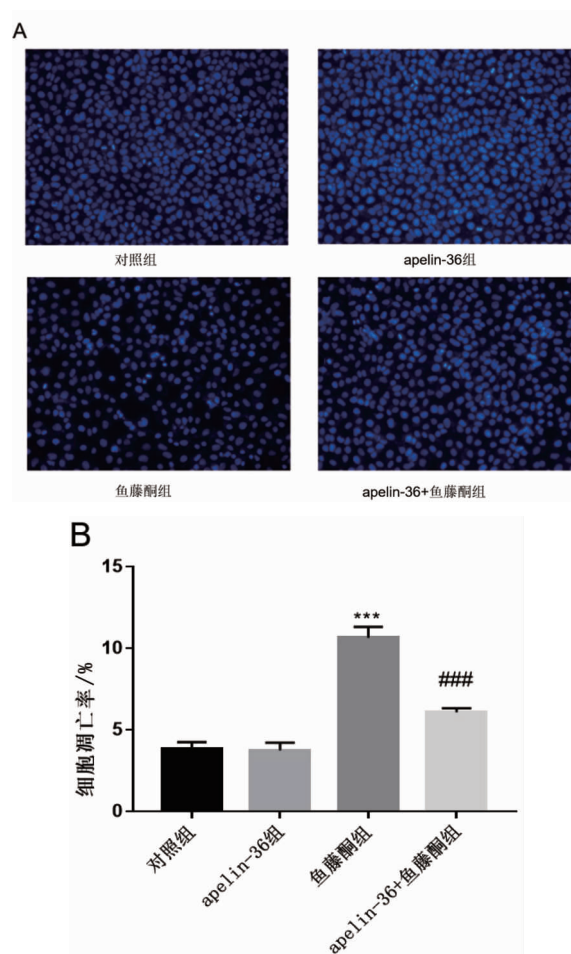


注: *** $P < 0.001$ vs. 对照组; ### $P < 0.001$ vs. 鱼藤酮组

图1 Apelin-36 对鱼藤酮刺激的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

2.2 Apelin-36 对鱼藤酮处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Hoechst 33342 染色结果 (图 2A) 显示, 与鱼藤酮组相比, apelin-36 减轻了鱼藤酮引起的细胞凋亡, 并显著降低了细胞凋亡率 (图 2B)。



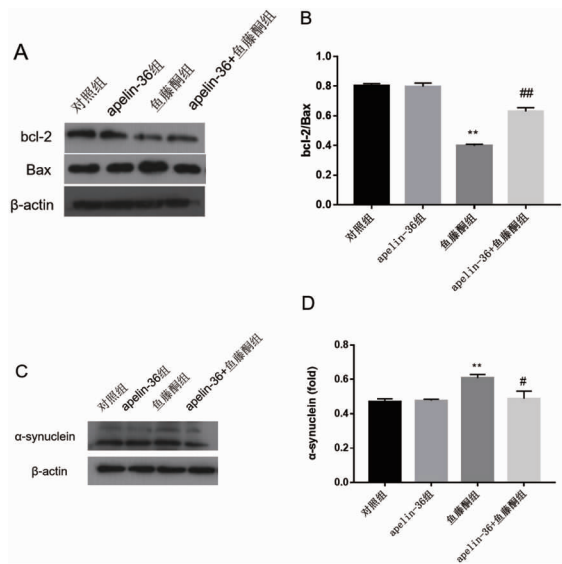
注: *** $P < 0.001$ vs. 对照组; ### $P < 0.001$ vs. 鱼藤酮组。

图2 Apelin-36 对鱼藤酮刺激的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

2.3 Apelin-36 对鱼藤酮诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞中 bcl-2、Bax 和 α -synuclein 表达的影响

与对照组相比较, 鱼藤酮组 bcl-2 的表达显著降低, Bax 的表达显著增加; 而 apelin-36+鱼藤酮组与鱼藤酮组相比, apelin-36 则明显上调了 bcl-2 的表达, 减少了 Bax 的表达 (图 3A)。鱼藤酮组 bcl-2/Bax 的比值与对照组相比明显降低, 而 apelin-36+鱼藤酮组与鱼藤酮组相比, bcl-2/Bax 的比值明显升高, 说明 apelin-36 减轻了鱼藤酮造成的细胞凋亡 (图 3B)。与对照组相比, 鱼藤酮组 α -synuclein 的表达显著增加, 而 apelin-36+鱼藤酮组与鱼藤酮组相比, apelin-36 明显减少了 α -synuclein 的表达

(图 3C、3D)。

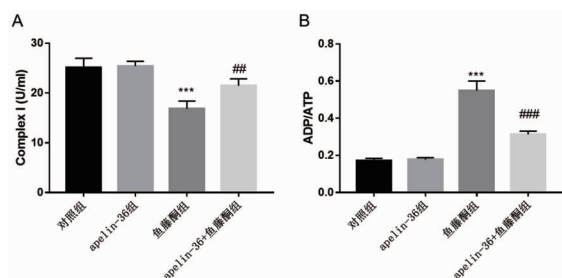


注: ** $P < 0.01$ vs. 对照组; # $P < 0.05$ vs. 鱼藤酮组;
$P < 0.01$ vs. 鱼藤酮组

图 3 Apelin-36 对鱼藤酮刺激的 SH-SY5Y 细胞中 bcl-2、Bax 和 α -synuclein 表达的影响

2.4 Apelin-36 对鱼藤酮诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞中 complex I 和 ADP/ATP 的影响

与对照组相比,鱼藤酮组 complex I 的表达下调,ADP/ATP 比率显著上调;而与鱼藤酮组相比,apelin-36 和鱼藤酮共处理组逆转了这种现象。见图 4。



注: *** $P < 0.001$ vs 对照组; ### $P < 0.001$ vs 鱼藤酮组;
$P < 0.01$ vs 鱼藤酮组

图 4 Apelin-36 对鱼藤酮诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞中 complex I 和 ADP/ATP 的影响

3 讨论

线粒体是有氧呼吸发生的主要场所,除了为细胞提供能量外,线粒体还参与了细胞信息传递、细胞分化、和细胞凋亡等过程,而且拥有调控细胞生长和细胞周期的能力^[9]。研究显示错误折叠的 α -

synuclein 的过度累积导致了神经退行性变,而线粒体功能障碍参与了错误折叠的 α -synuclein 累积这一过程^[10-11]。

鱼藤酮是一种可直接透过细胞膜和血脑屏障的细胞毒性物质。线粒体 complex I 可被鱼藤酮选择性地阻断,从而使 NADH 的氧化过程受阻,ATP 生成减少,细胞中活性氧增加,进而自由基增加,进一步导致氧化应激^[12],最终引起细胞凋亡。因此鱼藤酮可导致细胞线粒体功能障碍,引起细胞凋亡。在本实验中,与对照组相比,鱼藤酮组 α -synuclein 表达明显升高,bcl-2/Bax 比值明显降低,细胞活力明显降低,细胞凋亡显著增多。Bcl-2 家族蛋白是典型的凋亡相关蛋白,可操控线粒体的外膜通透性。促凋亡蛋白 Bax 可与抗凋亡蛋白 bcl-2 结合形成调节细胞凋亡的异二聚体,当细胞发生凋亡时,bcl-2/Bax 比率降低^[13]。与鱼藤酮组相比,apelin-36 和鱼藤酮共处理组中 α -synuclein 的表达明显降低,说明 apelin-36 预处理可减少错误折叠的 α -synuclein 累积;同时,apelin-36 和鱼藤酮共处理组中 bcl-2/Bax 比率明显升高,细胞活力显著升高,细胞凋亡则明显减少,说明 apelin-36 预处理可减少细胞凋亡,因此 apelin-36 可减轻鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞的神经毒性作用,对神经细胞起到保护作用。

鱼藤酮通过阻断 complex I 造成了 ATP 生成减少,而 ATP 的生成减少降低了线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$),导致线粒体膜的通透性改变,引起了线粒体功能紊乱^[14-15]。本研究首次在鱼藤酮 PD 体外模型中通过检测线粒体 complex I 的表达和 ADP/ATP 的比率,来讨论 apelin-36 是否可以减轻鱼藤酮造成的线粒体功能紊乱。与对照组相比,鱼藤酮组 complex I 的表达明显降低,而 ADP/ATP 的比率显著升高,这说明鱼藤酮造成了线粒体功能紊乱。与鱼藤酮组相比,apelin-36 和鱼藤酮共处理组 complex I 的表达明显升高,而 ADP/ATP 的比率显著降低,说明 apelin-36 可以减轻鱼藤酮造成的线粒体功能紊乱。

综上所述,apelin-36 可以减轻鱼藤酮造成的线粒体功能紊乱,减少错误折叠的 α -synuclein 累积,提高细胞活力,减少细胞凋亡,起到神经保护作用。而 apelin-36 通过何种信号传导途径减轻鱼藤酮造成的线粒体功能紊乱还不清楚,值得进一步研究,

为 apelin 成为治疗 PD 的潜在临床药物提供新的证据。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurodegenerative diseases: A decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (10): 1055-1063. DOI: 10. 1038/nm1113.
- [2] Song JX, Lu JH, Liu LF, et al. HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/alpha-synuclein overexpression: a process modulated by the natural autophagy inducer corynoxine B [J]. *Autophagy*, 2014, 10 (1): 144-154. DOI: 10. 4161/auto. 26751.
- [3] Katila N, Bhurtel S, Park PH, et al. Metformin attenuates rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial damage via the AKT/Nrf2 pathway [J]. *Neurochem Int*, 2021, 148: 105120. DOI: 10. 1016/j. neuint. 2021. 105120.
- [4] Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2016, 139 (1): 216-231. DOI: 10. 1111/jnc. 13731.
- [5] Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16 (9): 920-934. DOI: 10. 1089/ars. 2011. 4033.
- [6] Radad K, Al-Shraim M, Al-Emam A, et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease [J]. *Folia Neuropathol*, 2019, 57 (4): 317-326. DOI: 10. 5114/fn. 2019. 89857.
- [7] Angelopoulou E, Paudel YN, Bougea A, et al. Impact of the apelin/APJ axis in the pathogenesis of Parkinson's disease with therapeutic potential [J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99(9): 2117-2133. DOI: 10. 1002/jnr. 24895.
- [8] Zhu J, Dou S, Jiang Y, et al. Apelin-36 exerts the cytoprotective effect against MPP⁺-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells through PI3K/Akt/mTOR autophagy pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 224: 95-108. DOI: 10. 1016/j. lfs. 2019. 03. 047.
- [9] Chen QY, Kirk K, Shurubor YI, et al. Rewiring of glutamine metabolism is a bioenergetic adaptation of human cells with mitochondrial DNA mutations [J]. *Cell Metab*, 2018, 27 (5): 1007-1025. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2018. 03. 002.
- [10] Xie H, Hu H, Chang M, et al. Identification of chaperones in a MPP⁺-induced and ATRA/TPA-differentiated SH-SY5Y cell PD model [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8 (12): 5659-5671.
- [11] Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in parkinson's disease: From mechanism to therapy [J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(4): 329-343. DOI: 10. 1016/j. tibs. 2020. 11. 007.
- [12] Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2009, 41 (6): 517-521. DOI: 10. 1007/s10863-009-9250-6.
- [13] Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak [J]. *Nature*, 1995, 374 (6524): 733-736. DOI: 10. 1038/374733a0.
- [14] Li B, Chauvin C, De Paulis D, et al. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1817(9): 1628-1634. DOI: 10. 1016/j. bbabio. 2012. 05. 011.
- [15] Xiong YJ, Song YZ, Zhu Y, et al. Neuroprotective effects of olanzapine against rotenone-induced toxicity in PC12 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41 (4): 508-515. DOI: 10. 1038/s41401-020-0378-6.

(收稿日期 2022-05-11)

(本文编辑:石俊强)