DOI:10.16016/j.2097-0927.202309083

Humanin 对鱼藤酮诱导的多巴胺神经元毒性的保护作用研究

单耀辉,张启夫,程 晋,叶 枫,张 玺,余文珮,王晓刚,赵远鹏,但国蓉,陈明亮,赛 燕 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系防化医学教研室

[**摘要**] **目的** 探讨 Humanin(HN)对鱼藤酮(rotenone,Rot)诱导的多巴胺神经元毒性损伤的保护作用和机制。**方法** 构建 Rot 染毒 PC12 细胞模型,实验设对照组、Rot 染毒组、HN 预处理 Rot 染毒组、单独 HN 处理组。采用 ELISA 检测 Rot 染毒细胞内外 HN 的含量,CCK-8 法检测细胞活性,ATP 检测试剂盒检测细胞内 ATP 含量,DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 水平,Western blot 分别检测线粒体自噬调控蛋白 Pink1、Parkin、p-Parkin、p62、LC3,线粒体生物发生调控蛋白 PGC1α 和分裂/融合调控蛋白 OPA1、MFN2、DRP1、p-DRP1 以及抗氧化应激调控蛋白 Keap1、Nrf2 的表达。采用 HBAD-mcherry-EGFP-LC3 腺病毒转染细胞观察自噬体和自噬溶酶体的数量。**结果** Rot 染毒组 PC12 细胞内 HN 浓度显著高于对照组($P<0.05$);与对照组比较,Rot 染毒组 PC12 细胞活性下降,ATP 含量下降,ROS 的生成增加,Rot 染毒后 PC12 细胞内 Pink1、p-Parkin 表达升高,LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值升高,p62 表达下降,细胞线粒体生物发生蛋白 PGC1α 和线粒体融合蛋白 MFN2、OPA1 表达下降,而线粒体分裂蛋白 p-DRP1 表达升高,抗氧化应激蛋白 Keap1 和 Nrf2 表达下降(P 均<0.05);与对照组比较,Rot 染毒组 PC12 细胞中自噬体和自噬溶酶体数量增多($P<0.05$),而 20 μmol/L HN 预处理可以改善 Rot 染毒引起的上述变化($P<0.05$)。**结论** HN 通过抑制线粒体自噬和线粒体分裂、促进线粒体生物发生和融合以及抗氧化应激,改善 Rot 诱导的多巴胺神经元毒性损伤。

[**关键词**] Humanin;鱼藤酮;多巴胺神经元;线粒体

[**中图法分类号**] R394.2; R742.5; R977.6 [**文献标志码**] A

Protective effect of Humanin on rotenone-induced dopamine neuron toxicity

SHAN Yaohui, ZHANG Qifu, CHENG Jin, YE Feng, ZHANG Xi, YU Wenpei, WANG Xiaogang, ZHAO Yuanpeng, DAN Guorong, CHEN Mingliang, SAI Yan Department of Chemical Defense Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism and protective effect of Humanin (HN) on rotenone (Rot)-induced toxic damage for dopamine neurons. **Methods** The Rot-poisened PC12 cell model was constructed, and the control group, the Rot poisening group, the HN pretreated Rot poisening group, and the HN treatment group were set up. ELISA was used to detect the content of HN inside and outside of Rot-infected cells, CCK-8 assay was used to detect cell viability, and ATP detection kit was used to detect the intracellular ATP content. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS) in cells. Western blotting was performed to detect the expression level of mitochondrial autophagy regulatory proteins Pink1, Parkin, p62, LC3, mitochondrial biogenesis regulatory protein PGC1α, division/fusion regulatory proteins OPA1, MFN2, DRP1, p-DRP1 and antioxidant stress regulatory proteins Keap1 and Nrf2. HBAD-mcherry-EGFP-LC3 adenovirus transfected cells was used to observed the number of autophagosomes and autophagolysosomes. **Results** The results showed that the

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81973090)

[**通信作者**] 赛 燕,E-mail:sai2000cn@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

intracellular concentration of HN in PC12 in the Rot poisening group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$); Compared with the control group, the Rot poisening group had significantly decreased activity of PC12 cells, decreased ATP content and increased production of ROS. After the poisen of Rot in PC12 cells, the expression of Pink1 and p-Parkin, the ratio of LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ and the expression of p-DRP1 in mitochondrial fusion protein was increased, while the expression of p62, the expression of mitochondrial biogenesis protein PGC1α, mitochondrial fusion proteins MFN2 and OPA1, and antioxidant stress proteins Keap1 and Nrf2 were decreased (all $P<0.05$). The number of autophagosomes and autophagolysosomes in PC12 cells in the Rot poisening group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and HN pretreatment (20 μmol/L) could significantly improve the changes mentioned above caused by Rot poisening ($P<0.05$). **Conclusion** HN ameliorates Rot-induced toxic damage for dopamine neurons by inhibiting mitophagy and mitochondrial division and promoting mitochondrial biogenesis and fusion, and anti-oxidative stress.

[**Key words**] Humanin; rotenone; dopamine neuron; mitochondria

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81973090). Corresponding author: SAI Yan, E-mail: sai2000cn@163.com

鱼藤酮(rotenone,Rot)作为农业生产中广泛使用的杀虫剂,容易在环境中造成污染,生物细胞中的线粒体、NADH 脱氢酶及其他物质接触 Rot 后易发生损伤、失活等毒性改变[1]。大量研究表明,Rot 作为线粒体复合物Ⅰ的抑制剂,能有效损伤线粒体功能,造成多巴胺神经元损伤,因而研究者使用 Rot 染毒模型开展帕金森病(Parkinson's disease,PD)研究[2]。Rot 对多巴胺神经元的损伤可能存在以下机制:既可增强多巴胺神经元对其他毒害因素的敏感性,也可直接诱发多巴胺神经元细胞凋亡,也涉及氧化应激、自由基损伤、兴奋性氨基酸的毒性作用、线粒体过度自噬、钙超载、线粒体功能异常、生物膜损害等[3]。PC12 细胞源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤,具有多巴胺神经元的生理特性和功能,广泛用于神经系统疾病的体外研究,PC12 细胞染毒可复制出 PD 体外模型。前期研究表明,Rot 诱导 PC12 细胞损伤与线粒体稳态、线粒体膜通透性、氧化应激等有关[4]。另外,Rot 暴露可导致线粒体自噬相关蛋白表达水平发生变化[5]。

Humanin(HN)是 2001 年发现的一种线粒体衍生肽,由线粒体 16S 核糖体 RNA(16S rRNA)上的开放阅读框编码,在线粒体中,它是由 21 个氨基酸组成的肽,而在细胞质中,它是由 24 个氨基酸组成的肽,虽然序列不同,但它们都具有相似的生物学功能[6]。HN 是细胞产生的,也可作为分泌型多肽,它可直接在细胞内发挥作用,也可以自分泌后与细胞发生作用[6]。近年来的研究证实,HN 对大脑、心脏、胰腺和睾丸等器官具有广泛的保护作用[7-8]。HN 可通过抗炎、抗凋亡和抗氧化应激等作用发挥保护功能[9-10]。在创伤性脑损伤中 HN 可抑制自噬相关蛋白 LC3 Ⅱ、Beclin-1 和 Vps34 活化,并在创伤性脑损伤后受损皮层和海马中维持 p62 水平,进而抑制细胞凋亡和自噬发挥保护作用[11]。研究发现 HN 可通过增加细胞活力,降低乳酸脱氢酶释放减少 NMDA 暴露后 ROS 的产生,改善 NMDA 诱导的神经元损伤[12]。HN 还可通过改善大脑线粒体功能在脑的 I/R 损伤期间发挥神经保护作用[13]。然而,目前国内外关于 HN 对 PD 的干预效应尚不清楚。本研究拟探讨 HN 对 Rot 诱导的多巴胺神经元变性损伤的保护作用和可能的作用机制,为 Rot 诱导的多巴胺神经元损伤和 PD 的防治提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

SpectraMax M2E 多功能酶标仪购自美国美谷分子公司;台式低温离心机购自美国贝克曼库尔特公司;超声破碎仪购自德国 Hielscher 公司;荧光倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司;凝胶成像系统购自法国 Vilber Lourmat 公司;激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司;电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;Rot(纯度≥95%,溶于 DMSO)、HN(纯度≥95%,溶于双蒸水)购自美国 Sigma 公司;RPMI1640 培养基、青-链霉素双抗、胎牛血清、胰蛋白酶 EDTA 溶液购自以色列 Viva Cell 公司;CCK-8 试剂盒、ATP 检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、PAGE 快速凝胶试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、β-Actin 一抗、PGC-1α 一抗、山羊抗兔及山羊抗鼠抗体、抗荧光淬灭封片液、DAPI 染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL 发光液购自美国 Millipore 公司;Pink1、Parkin、p62、LC3、DRP1、MFN2 一抗购自美国 abcam 公司;p-DRP1、OPA1 一抗购自美国 CST 公司;p-Parkin 一抗购自西班牙 Affinity 公司;Keap1 一抗购自美国 ABclonal 公司;Nrf2 一抗购

自英国 Cohesion biosciences 公司;mcherry-EGFP-LC3 腺病毒购自上海汉恒生物科技有限公司;大鼠 HN 肽(MT-RNR2)酶联免疫吸附测定试剂盒购自上海酶联生物有限公司。

1.2 细胞培养

将从中国科学院细胞库(上海)购买的高分化 PC12 细胞株传代处理,培养在含 10%血清和 1%双抗的 RPMI1640 培养基中,孵育在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中,当细胞密度达到约 80%时再次传代,使细胞保持在对数期。

1.3 PC12 细胞的存活率检测

实验设对照组、Rot 染毒组、浓度梯度(5、10、20 μmol/L)的 HN 预处理 Rot 染毒组、浓度梯度(5、10、20 μmol/L)的 HN 单独处理组、空白组,其中对照组接种 PC12 细胞并加入完全培养基,空白组只加入完全培养基,无其他处理因素。实验分组后,将生长至 80%的 PC12 细胞按照分组接种到 96 孔板,每组 6 个复孔,每孔接种 1×10^4 个细胞并加入 100 μL 完全培养基。细胞密度达到约 65%时,分别用不同浓度的 HN 进行预处理 8 h,后用 1 μmol/L Rot 染毒处理 24 h;更换新的完全培养基后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 工作液,在培养箱中放置 2 h,进行细胞活性检测,以对照组细胞存活率为参考(细胞存活率设定为 100%),其余各组细胞存活率 = [(处理组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白对照组 OD 值)] ×100%。

1.4 细胞分组及处理

实验分为对照组、Rot 染毒(Rot)组、HN 预处理 Rot 染毒(HN+Rot)组、单独 HN 处理(HN)组。Rot 染毒剂量根据课题组前期研究结果确定[4],HN 干预浓度根据本研究方法 1.3 部分细胞存活率的实验结果确定。当细胞密度达到约 65%时,用 20 μmol/L 的 HN 预处理对应的实验组 8 h 后,再用 1 μmol/L Rot 染毒 24 h 后开展后续实验。

1.5 细胞内及培养液中 HN 浓度的检测

将 PC12 细胞按照 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板,每孔加入 2 mL 的完全培养液,分组处理(本实验目的是检测 HN 浓度,因此不设 HN 干预组),每组 6 个复孔,染毒时更换细胞培养液,染毒 24 h 后提取细胞培养液,4 ℃ 1 000×*g* 离心 20 min,取上清液置于冰上;培养皿底部的细胞用预冷的 PBS 清洗 2 遍后,加入 100 μL 的裂解液,冰上裂解 30 min,而后使用细胞刮刮取细胞裂解液,置于预冷的 EP 管中,超声 10 s,按 4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液置于冰上。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书的操作方法予以蛋白定量,用裂解液配平后按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

1.6 ATP 含量检测

将 PC12 细胞按照 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板,每孔加入 2 mL 的完全培养液,按照本研究方法 1.4 部分所述分组处理细胞,每组 6 个复孔,处理结束后用 ATP 检测试剂盒进行检测,根据标准曲线计算 ATP 的浓度。

1.7 ROS 水平检测

将 PC12 细胞按照 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,每孔 2 mL 新鲜的完全培养基,按照前述方法分组处理细胞,处理完成后用预冷的 PBS 洗 2 遍。用无血清培养液将 DCFH-DA 探针按照 1∶1 000 稀释成 10 μmol/L。将稀释好的 DCFH-DA 按每孔 1 mL 加入 6 孔板中,37 ℃细胞培养箱内孵育 20 min,每隔 3~5 min 取出颠倒混匀,促进细胞和探针充分接触。细胞用无血清细胞培养液洗涤 3 次,将未进入细胞内的 DCFH-DA 充分去除。将细胞置于荧光倒置显微镜下观察、拍照并计算荧光强度。

1.8 Western blot 实验

PC12 细胞分组处理后,每皿 PC12 细胞用 100 μL 预冷的含有蛋白酶抑制剂 PMSF(1 mmol/L)的 RIPA 裂解液充分裂解后提取细胞蛋白,蛋白定量后等质量等体积配平,加入 Loading buffer,98 ℃变性 10 min。采用 Western blot 检测各组蛋白中 Pink1、Parkin、p-Parkin、LC3、p62、PGC1α、MFN2、OPA1、DRP1、p-DRP1、Keap1、Nrf2 的表达情况。在凝胶成像装置(Fusion FX)进行曝光拍照,使用 Image J 软件测定相关蛋白条带的灰度值,以相对蛋白含量比值对条带进行分析。

1.9 HBAD-mCherry-EGFP-LC3 腺病毒转染观察细胞自噬流

在 24 孔板中制作爬片,将 PC12 细胞按照 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板,每孔加入 500 μL 完全培养液,恒温培养箱内进行培养,过夜贴壁细胞融合率达到 30%~50%时,按照 HBAD-mCherry-EGFP-LC3 腺病毒(上海汉恒生物公司)说明书进行腺病毒感染。将分组处理后的 PC12 细胞用 4%多聚甲醛室温固定 30 min,再用 PBS 缓冲液洗 3 遍,每次 5 min。加入少量的 DAPI 染色液,室温放置 5 min,吸去 DAPI 染色液,用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min。准备载玻片,做好标记,在载玻片底部正中央滴 1 滴抗荧光淬灭封片液,用镊子和钩针勾起爬片倒扣在抗荧光淬灭封片液上,放入暗盒中,4 ℃ 保存。激光共聚焦显微镜下观察自噬体和自噬溶酶体并拍照。统计各组细胞中红色斑点和黄色斑点的数量并进行分析。

1.10 统计学分析

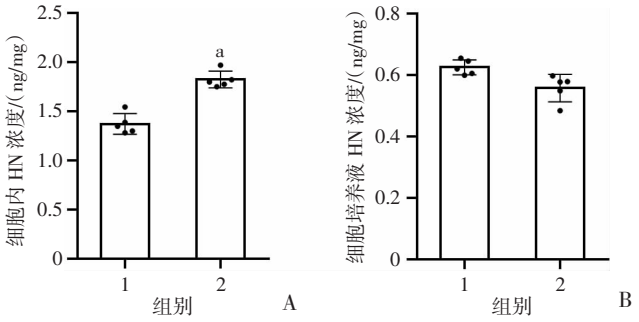
所有实验重复至少 3 次。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。均数比较使用 SPSS 26.0 统计软件进行单因素方差分析

(ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验,$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　Rot 染毒对 PC12 细胞分泌释放 HN 的影响

Rot 染毒组细胞内的 HN 含量较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$,图 1A)。而细胞培养液的 HN 含量与对照组比较,差异无统计学意义(图 1B)。

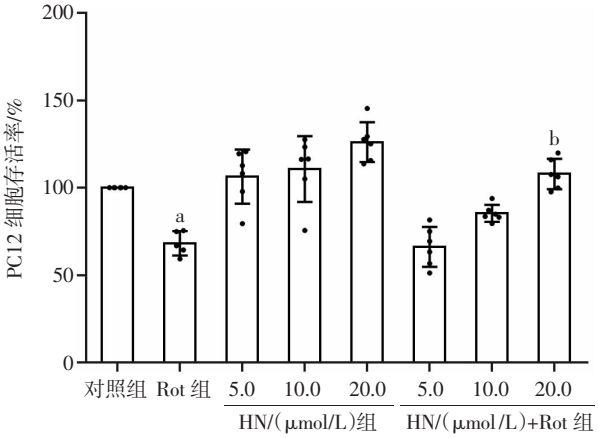


1:对照组;2:Rot 染毒组;a: $P<0.05$,与对照组比较
A:对照组和 Rot 染毒组细胞内 HN 浓度比较;B: 对照组和 Rot 染毒组细胞培养液中 HN 浓度比较

图 1　对照组和 Rot 染毒组细胞内和细胞外 HN 浓度

2.2　HN 预处理对 Rot 染毒 PC12 细胞活性的影响

Rot 染毒组细胞的存活率较对照组明显降低($P<0.05$)。用不同浓度的 HN 预处理可以提高细胞存活率,尤其是浓度梯度为 20 μmol/L 时,HN 对 Rot 诱导的细胞损伤有明显的保护作用($P<0.05$,图 2),因此本研究使用的 HN 浓度为 20 μmol/L。

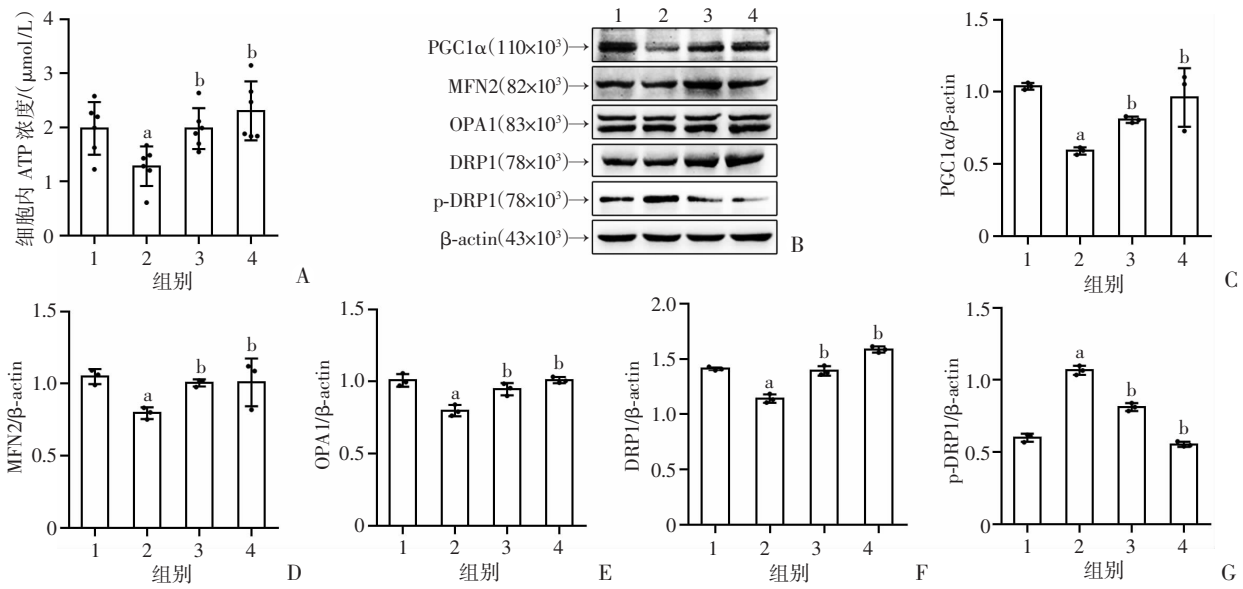


a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 Rot 染毒组比较

图 2　Rot 染毒和浓度梯度的 HN 干预后细胞存活率的变化

2.3　HN 预处理对 Rot 染毒 PC12 细胞线粒体功能和线粒体稳态的影响

与对照组比较,Rot 染毒组细胞内 ATP 浓度明显降低($P<0.05$),HN 预处理能显著提高 ATP 浓度($P<0.05$,图 3A);Rot 染毒组 PGC1α、MFN2、OPA1、DRP1 蛋白表达水平下降,而 p-DRP1 蛋白表达水平升高,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),HN 预处理能明显逆转 Rot 染毒诱导的线粒体稳态相关蛋白表达水平的变化($P<0.05$,图 3B~G)。



1:对照组;2:Rot 染毒组;3:HN 预处理 Rot 染毒组;4:HN 单独处理组;a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 Rot 染毒组比较
A:Rot 染毒或 HN 干预后细胞内 ATP 浓度变化;B:Western blot 检测线粒体稳态相关蛋白表达;C~G:线粒体稳态相关蛋白半定量分析

图 3　Rot 染毒或 HN 干预后细胞内 ATP 浓度和线粒体稳态相关蛋白表达水平变化

2.4 HN 预处理对 Rot 染毒 PC12 细胞 ROS 水平和抗氧化应激蛋白表达影响

Rot 染毒组细胞内 ROS 水平较对照组明显增高,HN 预处理能有效降低 Rot 引起的 ROS 水平升高($P<0.05$,图 4A、B)。Rot 染毒组抗氧化应激蛋白 Keap1 和 Nrf2 表达水平与对照组比较显著下降($P<0.05$),HN 预处理可以显著改善 Rot 暴露细胞内 Keap1、Nrf2 蛋白表达水平($P<0.05$,图 4C~E)。

2.5 HN 预处理对 Rot 染毒 PC12 细胞内线粒体自噬的影响

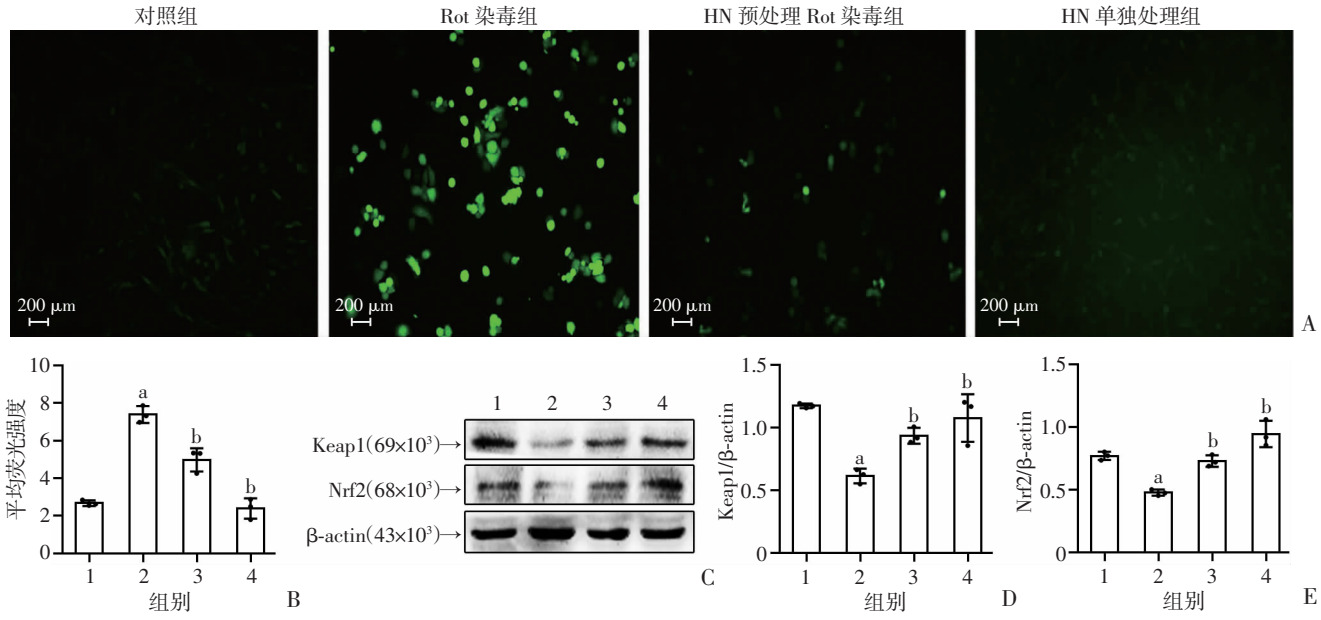
与对照组比较,Rot 染毒组细胞变圆、突触消失,自噬体和自噬溶酶体数量增多($P<0.05$);HN 预处理 Rot 染毒组细胞形态有所改善,自噬体和自噬溶酶体数量减少,与 Rot 染毒组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 5A~C)。Rot 染毒组细胞内 Pink1、p-Parkin 蛋白表达水平升高,LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 比值升高,p62 蛋白表达水平下降,与对照组比较均有显著性差异($P<0.05$),HN 预处理可以抑制 Rot 染毒所致 PC12 细胞内线粒体自噬相关蛋白表达变化,与 Rot 染毒组比较有显著差异($P<0.05$,图 5D~I)。

3 讨论

PD 的发病率逐年升高,严重影响老年患者的生活质量,需切实有效的治疗和预防方法[14]。本研究通过建立 Rot 染毒的多巴胺神经元毒性损伤模型,探究 HN 的保护作用及相关可能机制,为研究治疗和预防 PD 提供一定的理论依据。

PD 发病机制还没有完全阐明,但大量研究证明线粒体功能障碍是导致 PD 的重要机制之一[15]。已有研究证实,氧化应激、炎症和自噬功能异常是导致线粒体功能障碍的重要原因[16-17]。本研究发现,与正常对照组比较,Rot 染毒组 PC12 细胞明显变圆、突触消失,部分细胞死亡漂浮,通过检测 PC12 细胞的活性、ATP 的含量和细胞内外 HN 含量发现,染毒组的细胞活性和 ATP 的含量较对照组下降,细胞内 HN 的含量显著增加,其可能的原因是 Rot 染毒环境下,PC12 细胞线粒体复合体 Ⅰ 的功能被抑制从而使 ATP 生成受限、细胞活性下降,最终导致 PC12 细胞损伤,而外源性 HN 的干预可以有效改善这一过程。有研究证实 HN 通过增加线粒体质量,提高 mtDNA/nDNA 的比例,显著促进线粒体生物合成,从而增加 ATP 的水平[18]。

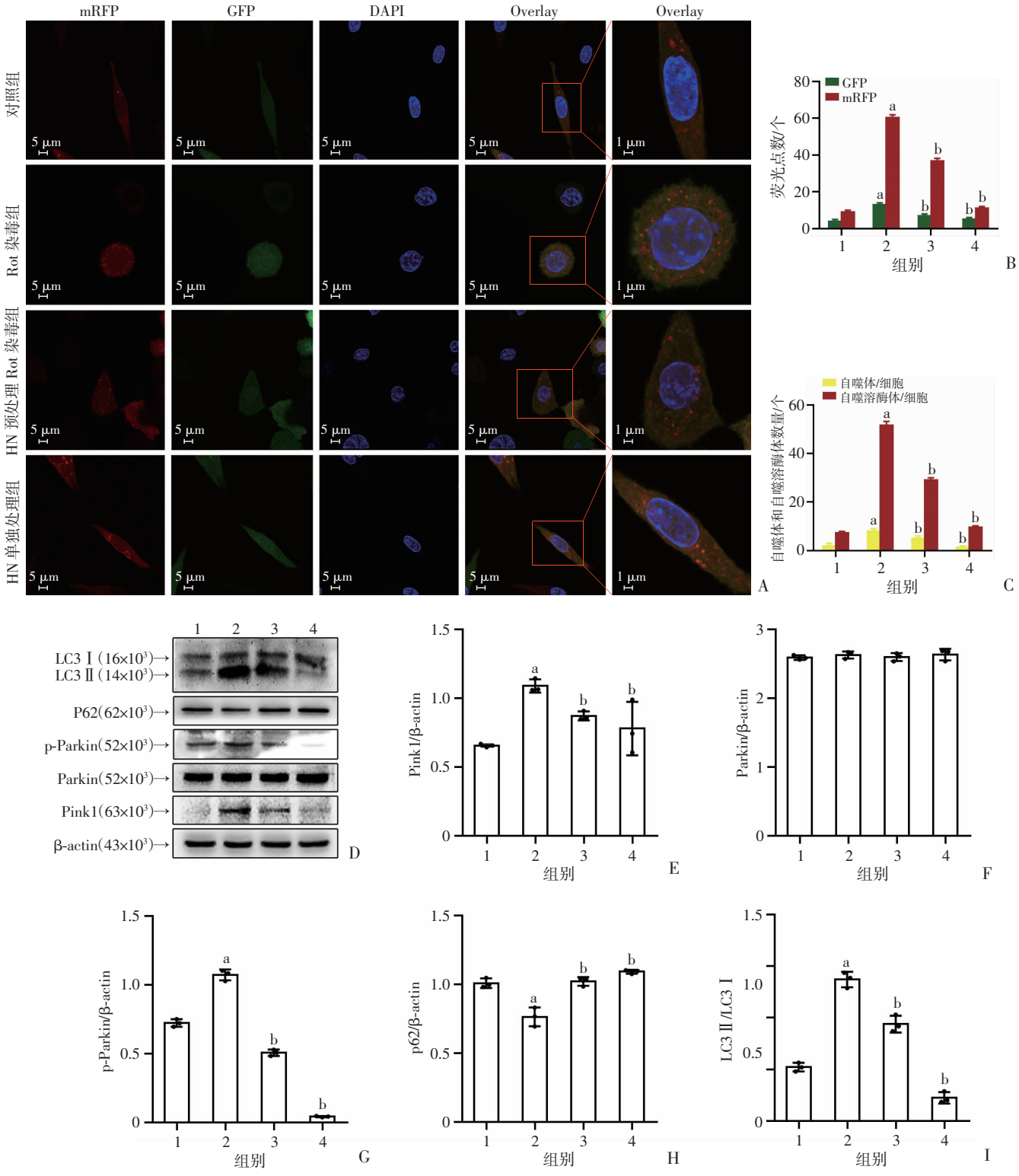
课题组前期研究发现,线粒体生物发生以及线粒体分裂融合在 Rot 暴露所致的线粒体功能障碍中有着不可替代的作用[4]。线粒体通过生物发生、分裂和融合来保持稳态,维持线粒体稳态在细胞代谢或细胞面临外界压力时对维持线粒体功能发挥着关键的作用。



1:对照组;2:Rot 染毒组;3:HN 预处理 Rot 染毒组;4:HN 单独处理组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Rot 染毒组比较

A:Rot 染毒或 HN 干预后 DCFH-DA 探针染色观察;B:Rot 染毒或 HN 干预后细胞内平均荧光强度变化;C:Western blot 检测抗氧化应激相关蛋白表达;D~E:抗氧化应激相关蛋白半定量分析

图 4 Rot 染毒或 HN 干预后细胞内 ROS 水平和抗氧化应激蛋白表达水平变化



1:对照组;2:Rot 染毒组;3:HN 预处理 Rot 染毒组;4:HN 单独处理组;a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 Rot 染毒组比较

A: Rot 染毒或 HN 干预后自噬双标共聚焦图像;B~C: Rot 染毒或 HN 干预后细胞内自噬体和自噬溶酶体数量变化;D: Western blot 检测线粒体自噬相关蛋白表达;E~I:线粒体自噬相关蛋白半定量分析

图 5 Rot 染毒或 HN 干预后自噬流和自噬相关蛋白表达水平变化

本研究结果表明,Rot 诱导 PC12 细胞中线粒体生物发生和线粒体融合能力下降,线粒体分裂蛋白 DRP1 磷酸化水平升高,加剧线粒体分裂,而 HN 预处理可以显著改善这种情况。与此一致的是,PGC1α 已被证实在 PD 患者中显著下调[19]。也有研究表明,PD 中的细胞功能障碍和线粒体异常与 DRP1 蛋白使线粒体片段化密切相关[20]。因此,本研究结果证明 HN 是通过促进线粒体生物发生和融合、抑制线粒体分裂调节线粒体稳态和功能,从而改善 Rot 诱导的 PC12 细胞毒性损伤。

自噬是细胞进行线粒体质量控制维持线粒体稳态的最关键途径之一[17]。线粒体自噬(一种特殊的自噬)介导功能失调的线粒体的选择性清除,以防止细胞内功能失调的细胞器的有害影响。线粒体自噬受多种信号通路的调节,Pink1/Parkin 信号通路是其中的经典通路[21]。已有研究证实,在氧化应激、膜电位降低和蛋白聚集时线粒体外膜的 Pink1 招募 Parkin,Parkin 发生磷酸化,后通过下游自噬相关受体与吞噬泡上的 LC3 结合,并促使 LC3 Ⅰ向 LC3 Ⅱ转化,促进自噬体形成,启动自噬过程[22-23]。本研究发现,在 Rot 的作用下,PC12 细胞自噬体和自噬溶酶体数量显著增加,自噬流增强,细胞变圆、轴突变短,Pink1、p-Parkin 蛋白表达水平上调,LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比值升高,p62 蛋白表达水平下调,而 HN 预处理可以显著改善 Rot 诱导的 PC12 细胞线粒体过度自噬,与金丝桃苷通过抑制自噬减轻 Rot 诱导的中枢神经元损伤结果一致[24]。因此,HN 通过调控线粒体自噬来改善 Rot 诱导的 PC12 细胞毒性损伤。

氧化应激在 PD 病的发生发展中扮演重要角色[16]。Rot 靶向线粒体复合物 I 抑制其活性,诱导线粒体活性氧的产生,同时破坏机体抗氧化应激系统[25]。本研究发现,Rot 处理的 PC12 细胞,ROS 水平显著升高,伴有 Keap1/Nrf2 蛋白表达的降低,而 HN 预处理显著逆转 Rot 暴露所致的氧化应激的增加。说明 HN 通过激活抗氧化机制来改善 Rot 暴露所致的神经毒性。

综上所述,HN 可显著改善 Rot 所致多巴胺神经元毒性损伤,其保护作用涉及抗氧化应激、线粒体生物发生和分裂融合、自噬等通路相关蛋白的表达调控,但相关详细的机制需要继续深入探究。相信随着研究的不断拓展,线粒体衍生肽 HN 可能会成为 PD 治疗和预防的新的研究热点。

参考文献:

[1] BISBAL M, SANCHEZ M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(5): 762-766. DOI: 10.4103/1673-5374.249847.

[2] 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.

[3] OLUBODUN-OBADUN T G, ISHOLA I O, ADEYEMI O O. Impact of environmental toxicants exposure on gut-brain axis in Parkinson disease[J]. Drug Metab Pers Ther, 2022, 37(4): 329-336. DOI: 10.1515/dmpt-2021-0144.

[4] PENG K G, XIAO J S, YANG L K, *et al*. Mutual antagonism of PINK1/parkin and PGC-1α contributes to maintenance of mitochondrial homeostasis in rotenone-induced neurotoxicity[J]. Neurotox Res, 2019, 35(2): 331-343. DOI: 10.1007/s12640-018-9957-4.

[5] SHARMA S, PATEL F, ARA H, *et al*. Rotenone-induced 4-HNE aggresome formation and degradation in HL-1 cardiomyocytes: role of autophagy flux[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 4675. DOI: 10.3390/ijms23094675.

[6] CORADDUZZA D, CONGIARGIU A, CHEN Z C, *et al*. Humanin and its pathophysiological roles in aging: a systematic review[J]. Biology (Basel), 2023, 12(4): 558. DOI: 10.3390/biology12040558.

[7] ROCHETTE L, MELOUX A, ZELLER M, *et al*. Role of humanin, a mitochondrial-derived peptide, in cardiovascular disorders[J]. Arch Cardiovasc Dis, 2020, 113(8/9): 564-571. DOI: 10.1016/j.acvd.2020.03.020.

[8] THIANKHAW K, CHATTIPAKORN K, CHATTIPAKORN S C, *et al*. Roles of humanin and derivatives on the pathology of neurodegenerative diseases and cognition [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2022, 1866(4): 130097. DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130097.

[9] ZAPAŁA B, KACZYNSKI Ł, KIEC-WILK B, *et al*. Humanins, the neuroprotective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti-inflammatory properties [J]. Pharmacol Rep, 2010, 62(5): 767-777. DOI: 10.1016/s1734-1140(10)70337-6.

[10] WANG Y Y, LI N Y, ZENG Z Y, *et al*. Humanin regulates oxidative stress in the ovaries of polycystic ovary syndrome patients via the Keap1/Nrf2 pathway[J]. Mol Hum Reprod, 2021, 27(2): gaaa081. DOI: 10.1093/molehr/gaaa081.

[11] WANG T, ZHANG L, ZHANG M, *et al*. Gly14]-Humanin reduces histopathology and improves functional outcome after traumatic brain injury in mice[J]. Neuroscience, 2013, 231: 70-81. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.019.

[12] YANG X R, ZHANG H M, WU J Z, *et al*. Humanin attenuates NMDA-induced excitotoxicity by inhibiting ROS-

dependent JNK/p38 MAPK pathway[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 2982. DOI: 10.3390/ijms19102982.

[13] XU X S, CHUA C C, GAO J P, *et al*. Neuroprotective effect of humanin on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by a PI3K/Akt pathway[J]. Brain Res, 2008, 1227: 12-18. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.06.018.

[14] SIMON D K, TANNER C M, BRUNDIN P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology[J]. Clin Geriatr Med, 2020, 36(1): 1-12. DOI: 10.1016/j.cger.2019.08.002.

[15] MALPARTIDA A B, WILLIAMSON M, NARENDRA D P, *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.

[16] DORSZEWSKA J, KOWALSKA M, PRENDECKI M, *et al*. Oxidative stress factors in Parkinson's disease[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(7): 1383. DOI: 10.4103/1673-5374.300980.

[17] ELDEEB M A, THOMAS R A, RAGHEB M A, *et al*. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson's disease[J]. Physiol Rev, 2022, 102(4): 1721-1755. DOI: 10.1152/physrev.00041.2021.

[18] QIN Q Q, JIN J Q, HE F, *et al*. Humanin promotes mitochondrial biogenesis in pancreatic MIN_6 β-cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497(1): 292-297. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.071.

[19] HSU H T, YANG Y L, CHANG W H, *et al*. Hyperbaric oxygen therapy improves Parkinson's disease by promoting mitochondrial biogenesis *via* the SIRT-1/PGC-1α pathway[J]. Biomolecules, 2022, 12(5): 661. DOI: 10.3390/biom12050661.

[20] ZHANG X L, HUANG W M, SHAO Q H, *et al*. Drp1, a potential therapeutic target for Parkinson's disease, is involved in olfactory bulb pathological alteration in the Rotenone-induced rat model[J]. Toxicol Lett, 2020, 325: 1-13. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.02.009.

[21] LI J, YANG D M, LI Z P, *et al*. PINK1/parkin-mediated mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. Ageing Res Rev, 2023, 84: 101817. DOI: 10.1016/j.arr.2022.101817.

[22] RAKOVIC A, ZIEGLER J, MÅRTENSSON C U, *et al*. PINK1-dependent mitophagy is driven by the UPS and can occur independently of LC3 conversion[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(8): 1428-1441. DOI: 10.1038/s41418-018-0219-z.

[23] ZHOU Q, ZHANG Y, LU L, *et al*. Copper induces microglia-mediated neuroinflammation through ROS/NF-κB pathway and mitophagy disorder[J]. Food Chem Toxicol, 2022, 168: 113369. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113369.

[24] FAN H J, LI Y R, SUN M Y, *et al*. Hyperoside reduces rotenone-induced neuronal injury by suppressing autophagy[J]. Neurochem Res, 2021, 46(12): 3149-3158. DOI: 10.1007/s11064-021-03404-z.

[25] ARAB H H, SAFAR M M, SHAHIN N N. Targeting ROS-dependent AKT/GSK-3β/NF-κB and DJ-1/Nrf2 pathways by dapagliflozin attenuates neuronal injury and motor dysfunction in rotenone-induced Parkinson's disease rat model[J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(4): 689-703. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00722.

(收稿:2023-09-15;修回:2023-12-21)

(编辑 邓强庭)