

甲基莲心碱对帕金森病细胞线粒体自噬的影响[△]

陈翠青^{1*}, 谭臣臣¹, 王电翠², 蒋 敏^{3#} (1. 康复大学青岛中心医院/青岛市中心医院神经内科, 山东 青岛 266042; 2. 康复大学青岛中心医院/青岛市中心医院血液科, 山东 青岛 266042; 3. 青岛市第六人民医院神经内科, 山东 青岛 266000)

中图分类号 R965;R742.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)02-0197-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.02.11



摘要 目的 探究甲基莲心碱(NEF)调节腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/UNC-51样激酶1(ULK1)信号通路对帕金森病(PD)细胞线粒体自噬的影响,从而探讨该药改善PD的作用机制。方法 用100 $\mu\text{mol/L}$ 的1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)处理SH-SY5Y细胞24 h以构建PD细胞模型,将PD模型细胞分为模型组(PD组)和NEF低、中、高浓度处理组(NEF-L、NEF-M、NEF-H组,2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)以及NEF高浓度+AMPK抑制剂组(NEF-H+Compound C组,10.0 $\mu\text{mol/L}$ NEF和50 $\mu\text{mol/L}$ Compound C);另取未经MPP⁺、NEF处理的细胞作为对照组。观察各组细胞的超微形态,检测其自噬体数量、存活率、凋亡率、线粒体膜电位的变化情况,胱天蛋白酶3(Caspase-3)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、Beclin-1蛋白的表达水平,以及mTOR、AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平。结果 与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞自噬体明显增多,膜电位有所升高,存活率、LC3-II/LC3-I、Beclin-1蛋白的表达和AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平均显著升高或上调,凋亡率和Caspase-3、p62蛋白的表达及mTOR蛋白的磷酸化水平均显著降低或下调,且上述改善作用均呈浓度依赖性($P<0.05$);Compound C能显著逆转高浓度NEF的上述改善作用($P<0.05$)。结论 NEF通过上调AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平,下调mTOR蛋白的磷酸化水平来促进PD模型细胞的线粒体自噬,抑制细胞凋亡,从而发挥神经细胞保护作用。

关键词 甲基莲心碱;帕金森病;线粒体自噬;AMPK/mTOR/ULK1信号通路

Effect of neferine on mitophagy in Parkinson's disease cells

CHEN Cuiqing¹, TAN Chenchen¹, WANG Diancui², JIANG Min³ (1. Dept. of Neurology, Qingdao Central Hospital, Rehabilitation University/Qingdao Central Hospital, Shandong Qingdao 266042, China; 2. Dept. of Hematology, Qingdao Central Hospital, Rehabilitation University/Qingdao Central Hospital, Shandong Qingdao 266042, China; 3. Dept. of Neurology, the Sixth People's Hospital of Qingdao, Shandong Qingdao 266000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effect of neferine (NEF) on mitophagy in Parkinson's disease (PD) cells by regulating the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1) signaling pathway, and explore the mechanism of this drug to improve PD. **METHODS** SH-SY5Y cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) for 24 h to construct a PD cell model. PD model cells were divided into model group (PD group), NEF low-, medium- and high-concentration groups (NEF-L, NEF-M, NEF-H group, 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$), and high concentration of NEF+AMPK inhibitor group (NEF-H+Compound C group, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ NEF+50 $\mu\text{mol/L}$ Compound C). The cells treated without MPP⁺ and NEF were used as the control group. The ultrastructure of the cells in each group was observed; the amount of autophagosomes, survival rate, apoptosis rate, mitochondrial membrane potential, and the protein expressions of Caspase-3, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and Beclin-1, as well as the phosphorylation levels of mTOR, AMPK and ULK1 were detected. **RESULTS** Compared with PD group, the amount of autophagosomes in NEF-L, NEF-M and NEF-H groups was increased, and membrane potential was increased; survival rate, LC3-II/LC3-I, protein expression of Beclin-1, and protein phosphorylation levels of AMPK and ULK1 were significantly increased or up-regulated; the apoptotic rate, protein expressions of Caspase-3 and p62, and protein phosphorylation level of mTOR were significantly decreased or down-regulated, and the above improvements were in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Compound C could significantly reverse the above improvement effect of high concentration of NEF ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** NEF can promote mitophagy and inhibit apoptosis of PD model cells by up-regulating protein phosphorylation levels of AMPK and ULK1,

and down-regulating protein phosphorylation level of mTOR, thus playing a protective role in nerve cells.

KEYWORDS neferine; Parkinson's disease; mitophagy; AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway

[△]基金项目 青岛市医药卫生科研指导项目(No.2022-WJZD056)

*第一作者 主治医师。研究方向:神经内科。E-mail: oewms6@163.com

#通信作者 主治医师。研究方向:神经内科。E-mail: f48kwf@163.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是全球第二常见的神经退行性疾病,全球患病人数超过600万^[1]。由于老年人口不断增长,PD发病率逐渐升高,其预防及治疗以药物为主,但副作用较多、疗效有限^[1]。PD病理机制复杂且高度多样,以静止性震颤、肌肉僵硬、运动迟缓等多种运动症状为主要临床表现;此外,非运动症状在PD患者中也较为常见,包括认知和行为障碍、睡眠不规律、感觉和自主神经功能障碍^[2-3]。

甲基莲心碱(neferine, NEF)是从莲种子中提取的双苄基异喹啉生物碱成分,具有抗炎、抗氧化、抗心律失常、抗高血压、抗血栓形成、抗血小板聚集、改善遗忘等多种药理活性,已被用于高热、心律失常、高血压、血小板聚集、肥胖和睡眠不足等症的治疗^[4]。据报道,NEF可通过阻断核因子 κ B信号转导来抑制脂多糖介导的小胶质细胞活化,进而抑制慢性神经炎症,对PD小鼠具有一定的保护作用^[5],但具体作用机制尚不完全清楚。

研究指出,自噬是负责细胞清除和维持细胞稳态的生物学过程,可能是PD发病机制的重要组成部分^[6]。腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/UNC-51样激酶1(UNC-51-like kinase 1, ULK1)信号通路与自噬调节相关。其中,AMPK为高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是调节代谢过程和炎症反应的关键能量传感器,可直接磷酸化mTOR复合物1(mTOR complex 1, mTORC1)信号通路的若干组分,从而导致mTORC1活性下调,减少mTOR的表达,下调的mTOR则可通过磷酸化促使ULK1活化并促进自噬的发生^[7]。据报道,厚朴酚可通过激活AMPK/mTOR/ULK1信号通路促进自噬,从而改善阿尔茨海默病相关病理损伤^[8]。但NEF是否能够通过调节AMPK/mTOR/ULK1信号通路来影响PD细胞的线粒体自噬尚不清楚。为此,本研究基于AMPK/mTOR/ULK1信号通路,初步探讨NEF对PD细胞线粒体自噬的影响,旨在为阐明NEF改善PD的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括GENios Plus型酶标仪(成都市科迈普生物科技有限公司)、Forma™ Steri-Cycle™ i160型CO₂培养箱和Talos L120C TEM型透射电镜(美国Thermo Fisher Scientific公司)、BX51型荧光显微镜(日本Olympus公司)、FACSymphony™ A5型流式细胞仪(美国BD公司)、Tanon EPS 600型电泳仪(上海天能科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

NEF对照品(批号SN8050,纯度 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司;AMPK抑制剂Compound C的对照

品(批号HY-13418A,纯度99.91%)、1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium ion, MPP⁺;批号HY-W008719,纯度99.94%)均购自美国MCE公司;兔源胱天蛋白酶3(Caspase-3)、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)、磷酸化ULK1(phosphorylated ULK1, p-ULK1)、AMPK、mTOR、ULK1、Beclin-1、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗、DMEM培养基(批号分别为MA5-45039、PA5-104982、44-1125G、PA5-78249、PA5-105297、PA5-34663、MA5-32699、PA1-16857、PA1-183、31460、11965092)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔源p62、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体(批号分别为ab109012、ab192890)均购自英国Abcam公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(批号WK304)购自北京百奥莱博科技有限公司;单丹磺酰尸胺(monodansyl cadaverine, MDC)试剂盒、线粒体膜电位试剂盒(批号分别为C3018S、C2006)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞

人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y(批号SNL-092)购自武汉尚恩生物技术有限公司。

2 方法

2.1 SH-SY5Y细胞培养与PD细胞模型建立

取SH-SY5Y细胞,在常规条件下培养,待其生长、融合至80%~90%时进行实验。取上述SH-SY5Y细胞,用100 μ mol/L的MPP⁺诱导培养24 h,以构建PD细胞模型(经MTT法检测,若诱导后的细胞存活率较正常细胞显著降低,则说明PD细胞模型构建成功)^[9]。

2.2 NEF干预浓度筛选

依据相关文献^[6]及前期实验结果,将构建成功的PD模型细胞用不同浓度的NEF(0、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 μ mol/L)处理24 h,另设不加MPP⁺、NEF的对照组以及不加药物、不加细胞的空白组,每组设置6个复孔。处理后,每孔细胞加入MTT溶液10 μ L,孵育4 h,加二甲亚砜混匀,用酶标仪于490 nm波长下检测其吸光度,并按下式计算细胞存活率:细胞存活率=(实验组吸光度-空白组吸光度)/(对照组吸光度-空白组吸光度) $\times 100\%$ 。根据细胞存活率检测结果筛选最优药物干预浓度,用于后续实验。

2.3 细胞分组与给药

将PD模型细胞随机分为PD组和NEF低、中、高浓度处理组(NEF-L、NEF-M、NEF-H组)以及NEF高浓度+AMPK抑制剂组(NEF-H+Compound C组),另取未经MPP⁺、NEF处理的SH-SY5Y细胞作为对照组,每组设6个复孔。NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞分别用2.5、5.0、10.0 μ mol/L的NEF(浓度根据“2.2”项下结果设置)处理24 h,NEF-H+Compound C组细胞用10.0 μ mol/L的

NEF和50 $\mu\text{mol/L}$ 的Compound C^[10]共同处理24 h。

2.4 细胞增殖检测

采用MTT法检测。取对数生长期SH-SY5Y细胞,按 1×10^4 个/孔接种至96孔板内,按“2.1”“2.3”项下方法造模、分组、处理。24 h后,按“2.2”项下方法检测各组细胞的存活率。

2.5 细胞超微形态观察

采用透射电镜观察。取对数生长期SH-SY5Y细胞,按 1×10^4 个/孔接种至96孔板内,按“2.1”“2.3”项下方法造模、分组、处理。24 h后,以1 500 r/min离心5 min,收集细胞,以3%戊二醛溶液固定,再经醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色后,使用透射电镜观察各组细胞的超微形态。

2.6 细胞自噬体数量检测

采用MDC染色法检测。取对数生长期SH-SY5Y细胞,按 5×10^5 个/孔接种至6孔板内,按“2.1”“2.3”项下方法造模、分组、处理。24 h后,收集细胞,用磷酸盐缓冲液清洗,每孔加入 5×10^{-5} mol/L的MDC试剂,于室温下避光孵育15 min,使用荧光显微镜观察各组细胞内自噬体(呈绿色荧光)数量的变化情况。

2.7 细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期SH-SY5Y细胞,按 5×10^5 个/孔接种至6孔板内,按“2.1”“2.3”项下方法造模、分组、处理。24 h后,收集细胞,用磷酸盐缓冲液清洗3次,离心,弃上清液,细胞用培养基调整密度后,依次加入Annexin V-FITC缓冲液、PI染液,于室温下避光孵育30 min,使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况,并记录凋亡率(即流式图右上和右下象限细胞百分率之和)。

2.8 细胞线粒体膜电位检测

采用JC-1探针法检测。取对数生长期SH-SY5Y细胞,按 5×10^5 个/孔接种至6孔板内,按照“2.1”“2.3”项下方法造模、分组、处理。24 h后,收集细胞,用磷酸盐缓冲液清洗,于37 $^{\circ}\text{C}$ 下加入0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的JC-1探针试剂,避光染色1 h;收集细胞,用乙二胺四乙酸-胰蛋白酶分散后,使用荧光显微镜观察细胞线粒体膜电位的变化情况(JC-1为单体时,呈绿色荧光,提示线粒体发生损伤,膜电位较低;JC-1为聚合物时,呈红色荧光,提示线粒体损伤缓解,膜电位较高)。

2.9 细胞中凋亡、自噬相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期SH-SY5Y细胞,按 1×10^6 个/孔接种至6孔板内,按照“2.1”“2.3”项下方法造模、分组、处理。24 h后,收集细胞,提取蛋白,检测浓度后加热变性。取变性蛋白适量,经电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上,于室温下以脱脂牛奶封闭;洗膜后,加入Caspase-3、p-mTOR、mTOR、p62、LC3、Beclin-1、p-AMPK、AMPK、p-ULK1、ULK1、 β -actin一抗(稀释比例分别为1:5 000、1:1 000、1:1 000、1:10 000、

1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:5 000、1:2 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:10 000),于室温下孵育2 h;洗膜后,以ECL发光显影、成像。使用Quantity One软件分析蛋白条带的灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,再以LC3-II与LC3-I、p-mTOR与mTOR、p-AMPK与AMPK、p-ULK1与ULK1的表达水平比值分别表示自噬活性和mTOR、AMPK、ULK1蛋白的磷酸化水平。

2.10 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 NEF干预浓度筛选结果

与对照组(100%)比较,经MPP⁺诱导而未经NEF处理的细胞的存活率[(53.64 $\pm$ 5.21)%]显著降低($P<0.05$)。经MPP⁺诱导并经1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的NEF处理后,细胞的存活率分别为(56.47 $\pm$ 6.25)%、(67.19 $\pm$ 7.03)%、(79.24 $\pm$ 8.18)%、(88.37 $\pm$ 9.09)%、(89.76 $\pm$ 9.20)%;当NEF ≥ 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,对应组别细胞的存活率均显著高于未经NEF处理的细胞($P<0.05$),且经10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ NEF处理的细胞的存活率组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。基于此,本研究选择2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验NEF的干预浓度。

3.2 细胞增殖变化

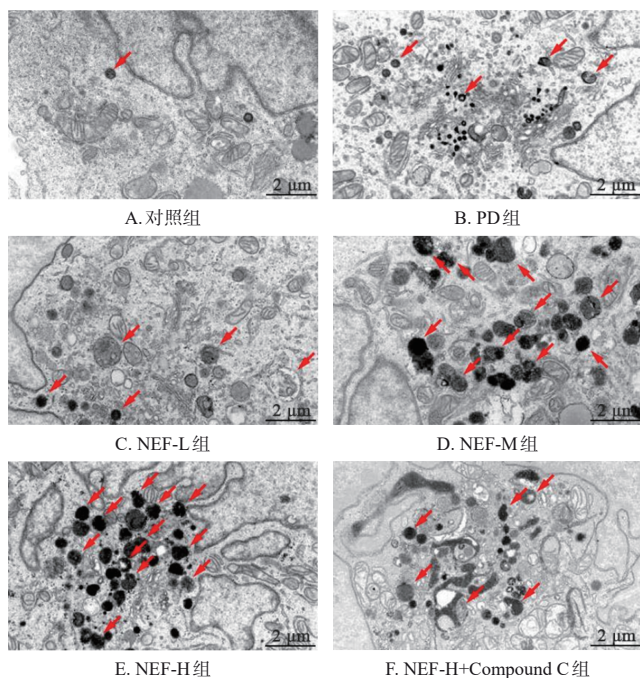
与对照组(100%)比较,PD组细胞的存活率[(52.79 $\pm$ 5.18)%]显著降低($P<0.05$);与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞的存活率[(68.23 $\pm$ 7.09)%、(80.48 $\pm$ 8.21)%、(89.78 $\pm$ 9.14)%]均显著升高,且呈浓度依赖性($P<0.05$);与NEF-H组比较,NEF-H+Compound C组细胞的存活率[(72.62 $\pm$ 7.35)%]显著降低($P<0.05$)。

3.3 细胞超微形态变化

对照组细胞较为完整,形态正常,自噬体较少;与对照组比较,PD组细胞内可见自噬体形成,线粒体中空明显;与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞内部分线粒体中空并呈多膜样结构,自噬体明显增多,且上述变化有一定的浓度依赖趋势;与NEF-H组比较,NEF-H+Compound C组细胞内线粒体中空减少,自噬体明显亦减少。结果见图1。

3.4 细胞内自噬体数量变化

对照组细胞内绿色荧光较弱,自噬体较少;与对照组比较,PD组细胞内绿色荧光增强,自噬体增多;与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞内绿色荧光进一步增强,自噬体进一步增多,且上述变化有一定的浓度依赖趋势;与NEF-H组比较,NEF-H+Compound C组细胞内绿色荧光减弱,自噬体减少。结果见图2。



箭头:自噬体。
图1 各组细胞超微形态的透射电镜显微图(醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色)

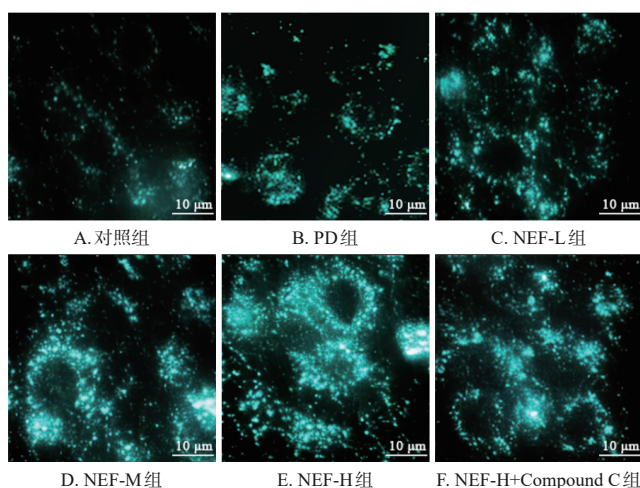


图2 各组细胞内自噬体数量变化的显微图(MDC 染色)

3.5 细胞凋亡情况

与对照组 $[(2.28 \pm 0.26)\%]$ 比较,PD组细胞的凋亡率 $[(39.72 \pm 4.13)\%]$ 显著升高($P < 0.05$);与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞的凋亡率 $[(32.58 \pm 3.31)\%]$ 、 $[(27.02 \pm 2.57)\%]$ 、 $[(21.04 \pm 2.10)\%]$ 均显著降低,且呈浓度依赖性($P < 0.05$);与NEF-H组比较,NEF-H+Compound C组细胞的凋亡率 $[(30.86 \pm 3.23)\%]$ 显著升高($P < 0.05$)。各组细胞凋亡的流式图略。

3.6 细胞线粒体膜电位变化

与对照组比较,PD组细胞的绿色荧光较强,红色荧光较弱,线粒体发生损伤,膜电位较低;与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞的绿色荧光减弱,红色荧光增强,线粒体损伤有所缓解,膜电位有所升高,且上述

变化有一定的浓度依赖趋势;与NEF-H组比较,NEF-H+Compound C组细胞的绿色荧光增强,红色荧光减弱,线粒体发生损伤,膜电位降低。结果见图3。

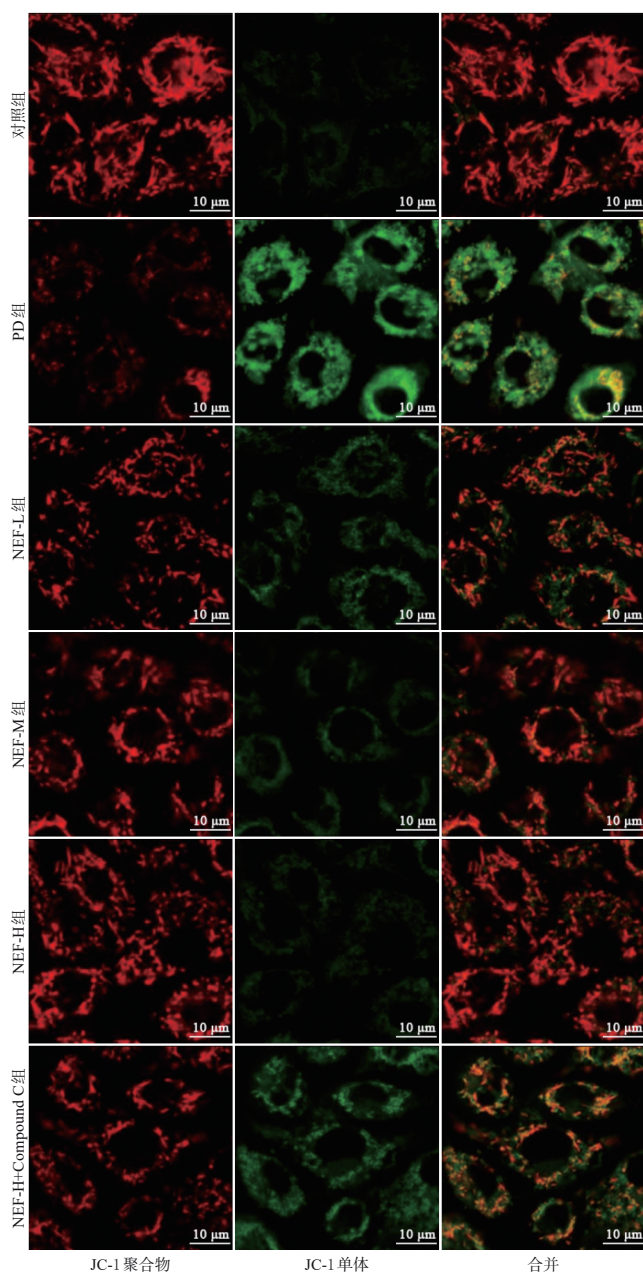


图3 各组细胞线粒体膜电位变化的显微图(JC-1 探针)

3.7 细胞中凋亡、自噬相关蛋白表达比较

与对照组比较,PD组细胞中LC3- II/LC3- I、Beclin-1蛋白的表达水平均显著降低,Caspase-3、p62蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$);与PD组比较,NEF-L、NEF-M、NEF-H组细胞中LC3- II/LC3- I、Beclin-1蛋白的表达水平均显著升高,Caspase-3、p62蛋白的表达水平均显著降低,且呈浓度依赖性($P < 0.05$);与NEF-H组比较,NEF-H+Compound C组细胞中LC3- II/LC3- I、Beclin-1蛋白的表达水平均显著降低,Caspase-3、p62蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图4、表1。

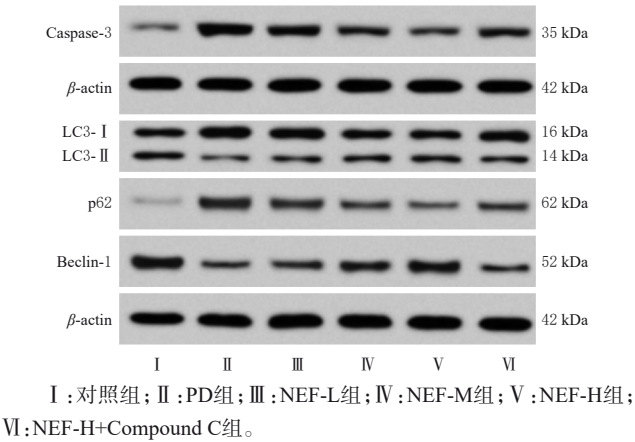


图4 各组细胞中凋亡、自噬相关蛋白表达的电泳图

表1 各组细胞中凋亡、自噬相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Caspase-3/ β -actin	LC3-II/LC3-I	p62/ β -actin	Beclin-1/ β -actin
对照组	0.26 $\pm$ 0.02	1.02 $\pm$ 0.13	0.22 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.17
PD组	1.08 $\pm$ 0.13 ^a	0.26 $\pm$ 0.02 ^a	0.97 $\pm$ 0.09 ^a	0.31 $\pm$ 0.02 ^a
NEF-L组	0.87 $\pm$ 0.08 ^b	0.39 $\pm$ 0.03 ^b	0.83 $\pm$ 0.07 ^b	0.48 $\pm$ 0.03 ^b
NEF-M组	0.65 $\pm$ 0.06 ^{bc}	0.62 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.64 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.70 $\pm$ 0.06 ^{bc}
NEF-H组	0.40 $\pm$ 0.04 ^{cd}	0.85 $\pm$ 0.07 ^{cd}	0.45 $\pm$ 0.04 ^{cd}	0.91 $\pm$ 0.08 ^{cd}
NEF-H+Compound C组	0.72 $\pm$ 0.06 ^e	0.52 $\pm$ 0.04 ^e	0.71 $\pm$ 0.05 ^e	0.53 $\pm$ 0.04 ^e

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与PD组比较, $P<0.05$; c: 与NEF-L组比较, $P<0.05$; d: 与NEF-M组比较, $P<0.05$; e: 与NEF-H组比较, $P<0.05$ 。

3.8 细胞中 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路相关蛋白表达比较

与对照组比较, PD 组细胞中 AMPK、ULK1 蛋白的磷酸化水平均显著降低, mTOR 蛋白的磷酸化水平显著升高 ($P<0.05$); 与 PD 组比较, NEF-L、NEF-M、NEF-H 组细胞中 AMPK、ULK1 蛋白的磷酸化水平均显著升高, mTOR 蛋白的磷酸化水平均显著降低, 且呈浓度依赖性 ($P<0.05$); 与 NEF-H 组比较, NEF-H+Compound C 组细胞中 AMPK、ULK1 蛋白的磷酸化水平均显著降低, mTOR 蛋白的磷酸化水平显著升高 ($P<0.05$)。结果见图 5、表 2。

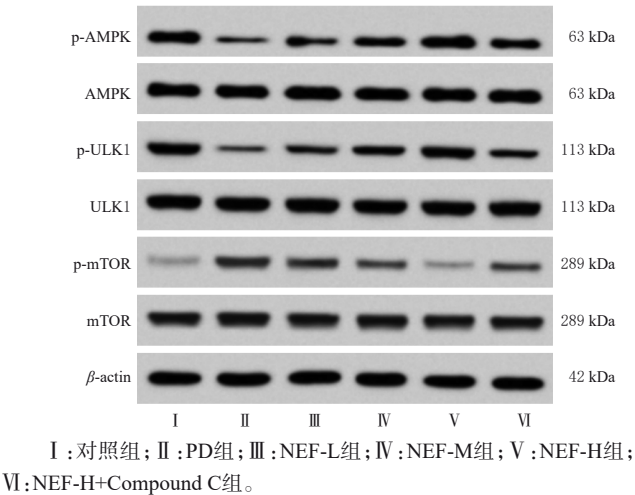


图5 各组细胞中 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路相关蛋白表达的电泳图

表2 各组细胞中 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	p-AMPK/AMPK	p-ULK1/ULK1	p-mTOR/mTOR
对照组	0.91 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.02
PD组	0.25 $\pm$ 0.02 ^a	0.20 $\pm$ 0.02 ^a	0.89 $\pm$ 0.09 ^a
NEF-L组	0.41 $\pm$ 0.04 ^b	0.37 $\pm$ 0.03 ^b	0.73 $\pm$ 0.06 ^b
NEF-M组	0.63 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.54 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.51 $\pm$ 0.05 ^{bc}
NEF-H组	0.82 $\pm$ 0.07 ^{cd}	0.76 $\pm$ 0.06 ^{cd}	0.32 $\pm$ 0.03 ^{cd}
NEF-H+Compound C组	0.56 $\pm$ 0.05 ^e	0.42 $\pm$ 0.04 ^e	0.60 $\pm$ 0.05 ^e

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与PD组比较, $P<0.05$; c: 与NEF-L组比较, $P<0.05$; d: 与NEF-M组比较, $P<0.05$; e: 与NEF-H组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

PD 发病率高, 影响我国近 2% 老年人的生活质量^[11]。研究指出, PD 的神经病理学特征是黑质中多巴胺能神经元的进行性丢失, 伴有路易体和神经突的积累, 其主要成分是聚集的 α -突触核蛋白 (由 *SNCA* 基因编码), 从而导致黑质纹状体神经变性^[11]。现有治疗方法可以缓解 PD 患者的早期症状, 但不能阻止疾病进展或逆转现有病情^[11]。因此, 寻找新的药物对于 PD 的临床治疗至关重要。

莲子心是莲种子的绿色胚, 是一种可食用的中草药, 具有多种营养和药用价值, 可用于治疗神经退行性疾病、失眠、高烧和心血管疾病^[12]。NEF 是莲子心所含的主要双苄基异喹啉生物碱成分, 具有抗心律失常、抗高血压、抗癌、抗氧化、抗炎、治疗神经退行性疾病等作用^[4]。Wu 等^[13]研究表明, NEF 可显著提高 SH-SY5Y 细胞的活力并降低其活性氧水平, 抑制 β 淀粉样蛋白和 tau 蛋白诱导的毒性, 并增强线虫的抗应激能力, 具有神经保护作用。自噬是一种高度保守的分解代谢过程, 可将异常蛋白和细胞器隔离到自噬体中, 并将其递送到溶酶体进行降解和回收, 对细胞稳态调节、压力适应和生存至关重要^[14]。一项缺血性脑损伤研究指出, NEF 可显著抑制 LC3-II、Beclin-1 和 p62 等自噬相关蛋白表达的上调, 并阻止自噬体的形成^[15]。本研究通过构建 PD 细胞模型发现, 细胞出现线粒体损伤并发生凋亡, 自噬体明显增加, 说明经 MPP^+ 诱导后细胞发生了自噬和凋亡; 经 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 NEF 干预后, PD 细胞中自噬体增多, 自噬加重, 凋亡率显著降低, Caspase-3、p62 蛋白的表达显著下调, LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白的表达显著升高或上调, 线粒体损伤有所改善, 且上述作用具有浓度依赖性, 提示 NEF 能够促进细胞线粒体自噬进而缓解细胞凋亡。这一结果与文献^[15]有所不同, 可能与所用模型不同、所涉疾病发生机制不同有关。然而, 无论是促进自噬还是抑制自噬, 两项研究均证明了 NEF 对缺血性脑损伤和 PD 有一定的改善作用。

AMPK 是能量代谢、细胞生长和自噬的重要调节因子^[16]。AMPK 作为关键的能量传感器, 可通过磷酸化来激活 ULK1 蛋白, 以维持细胞能量稳态并促进自噬, 而 mTOR 是细胞生长的中枢调节剂和自噬的关键制动器, 具有抑制 ULK1 激活的能力^[16]。研究报道, AMPK 被激

活后,ULK1 蛋白可以被磷酸化的 AMPK 直接激活,也可以通过 mTOR 的失活间接激活,进而导致颗粒细胞自噬^[17]。据报道,激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路可提高 LC3- II/LC3- I、Beclin-1 水平,降低 p62 水平,从而促进自噬^[8]。Zaki 等^[18]研究发现,罗氟司特可通过上调 p-AMPK、p-ULK1、Beclin-1 蛋白的表达和 LC3- II/LC3- I,以及下调 p62、p-mTOR 蛋白的表达来恢复细胞的自噬功能。本研究结果显示,经 NEF 处理后,PD 模型细胞中 AMPK、ULK1 蛋白的磷酸化水平均显著升高,mTOR 蛋白的磷酸化水平均显著降低,与上述研究的结果基本一致。为明确 NEF 的作用是否与 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路有关,本研究在高浓度 NEF 的基础上联用了 AMPK 抑制剂 Compound C,结果显示,该抑制剂逆转了 NEF 对 PD 模型细胞各定量指标的改善作用。

综上所述,NEF 通过上调 AMPK 蛋白的磷酸化水平而使其活化,活化的 AMPK 蛋白可使下游 ULK1 蛋白的磷酸化水平升高、mTOR 蛋白的磷酸化水平降低,进而促进 PD 模型细胞线粒体自噬,抑制细胞凋亡,从而发挥神经细胞保护作用。本研究为未来 NEF 治疗 PD 提供了可参考的实验依据,但本研究仅通过体外细胞实验初步证实了 NEF 与 PD 细胞自噬的关系,该成分能否在体内也发挥相同的作用及具体机制尚需相关动物实验进一步验证。

参考文献

- [1] LIZAMA B N, CHU C T. Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease[J]. Mol Aspects Med, 2021, 82: 100972.
- [2] MINCHEV D, KAZAKOVA M, SARAFIAN V. Neuroinflammation and autophagy in Parkinson's disease-novel perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14997.
- [3] NECHUSHTAI L, FRENKEL D, PINKAS-KRAMARSKI R. Autophagy in Parkinson's disease[J]. Biomolecules, 2023, 13(10): 1435.
- [4] LI S J, ZHANG Y Y, ZHANG J, et al. Neferine exerts ferroptosis-inducing effect and antitumor effect on thyroid cancer through Nrf2/HO-1/NQO1 inhibition[J]. J Oncol, 2022, 2022: 7933775.
- [5] LI T, ZHAI Y X, ZHENG T Y, et al. Neferine exerts anti-inflammatory activity in BV-2 microglial cells and protects mice with MPTP-induced Parkinson's disease by inhibiting NF- κ B activation[J]. Mol Med Rep, 2023, 28(6): 235.
- [6] KINET R, DEHAY B. Pathogenic aspects and therapeutic avenues of autophagy in Parkinson's disease[J]. Cells, 2023, 12(4): 621.
- [7] HAN D, KIM D, KIM H, et al. Methylsulfonylmethane ameliorates metabolic-associated fatty liver disease by restoring autophagy flux via AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1302227.
- [8] WANG X C, JIA J P. Magnolol improves Alzheimer's

disease-like pathologies and cognitive decline by promoting autophagy through activation of the AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 161: 114473.

- [9] 彭秀华,柳明杰. MiR-486-5p 靶向 TRPM2 对帕金森病模型细胞自噬和凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(1): 115-122.
- PENG X H, LIU M J. Effect of miR-486-5p targeting TRPM2 on autophagy and apoptosis in Parkinson's disease model cells[J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(1): 115-122.
- [10] 时延龙,周鹏,王雪凯,等. 银杏内酯 K 调节 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对乳腺癌细胞自噬和凋亡的影响[J]. 西部医学, 2024, 36(1): 42-46.
- SHI Y L, ZHOU P, WANG X K, et al. Influences of ginkgolide K on autophagy and apoptosis in breast cancer cells by regulating AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. Med J West China, 2024, 36(1): 42-46.
- [11] MA Z W, LIANG H, HU B C, et al. Autophagy-regulating miRNAs: novel therapeutic targets for Parkinson's disease: review[J]. Int J Mol Med, 2023, 51(6): 50.
- [12] WANG M Y, ZHANG S S, AN M F, et al. Neferine ameliorates nonalcoholic steatohepatitis through regulating AMPK pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154798.
- [13] WU M C, GAO Y H, ZHANG C, et al. Liensinine and neferine exert neuroprotective effects via the autophagy pathway in transgenic *Caenorhabditis elegans*[J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23(1): 386.
- [14] TU H Y, YUAN B S, HOU X O, et al. α -synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Aging Cell, 2021, 20(12): e13522.
- [15] SENGKING J, OKA C, WICHA P, et al. Neferine protects against brain damage in permanent cerebral ischemic rat associated with autophagy suppression and AMPK/mTOR regulation[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(12): 6304-6315.
- [16] YANG C L, DENG Z W, ZENG Q H, et al. BMAL1 involved in autophagy and injury of thoracic aortic endothelial cells of rats induced by intermittent heat stress through the AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 661: 34-41.
- [17] LIN M L, HUA R, MA J, et al. Bisphenol A promotes autophagy in ovarian granulosa cells by inducing AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathway[J]. Environ Int, 2021, 147: 106298.
- [18] ZAKI E S, SAYED R H, SAAD M A, et al. Roflumilast ameliorates ovariectomy-induced depressive-like behavior in rats via activation of AMPK/mTOR/ULK1-dependent autophagy pathway[J]. Life Sci, 2023, 327: 121806.

(收稿日期: 2024-07-04 修回日期: 2024-12-24)

(编辑: 邹丽娟)