

研究论文

依达拉奉对MPP⁺处理的PC12细胞线粒体融合和分裂平衡的保护作用

焦阳¹, 郑月², 宋成洁^{3,*}

¹中国人民解放军陆军第七十一集团军医院, 徐州 221004; ²南京医科大学生物化学与分子生物学系, 南京 210029; ³徐州医科大学生理学教研室, 徐州 221004

摘要: 本文旨在探讨依达拉奉(edaravone, Eda)对帕金森病细胞模型线粒体融合、分裂动态平衡的作用及机制。用500 μmol/L 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺)处理PC12细胞建立帕金森病细胞模型, 采用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度Eda对MPP⁺处理的PC12细胞存活率的影响, 用激光共聚焦显微镜检测线粒体形态, 用Western blot检测线粒体融合与分裂相关蛋白OPA1、MFN2、DRP1和Fis1的表达变化。结果显示, 预先加入不同浓度的Eda能减轻MPP⁺处理的PC12细胞损伤, 作用呈一定的量效关系; 经MPP⁺处理48 h, PC12细胞线粒体出现碎片化, OPA1和MFN2蛋白表达下调, DRP1和Fis1蛋白表达上调, 而Eda预处理能逆转PC12细胞的上述变化, 但对Fis1的蛋白表达没有影响。以上结果提示, Eda可上调OPA1和MFN2的蛋白表达, 下调DRP1的表达, 从而抑制线粒体碎片化, 发挥神经细胞线粒体保护作用。

关键词: 依达拉奉; MPP⁺; PC12细胞; 线粒体融合; 线粒体分裂

中图分类号: R285.5

Protective effect of edaravone on balance of mitochondrial fusion and fission in MPP⁺-treated PC12 cells

JIAO Yang¹, ZHENG Yue², SONG Cheng-Jie^{3,*}

¹The 71st Group Military Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Xuzhou 221004, China; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ³Department of Physiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of edaravone (Eda) on the balance of mitochondrial fusion and fission in Parkinson's disease (PD) cell model. A cell model of PD was established by treating PC12 cells with 500 μmol/L 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). Thiazole blue colorimetry (MTT) was used to detect the effect of different concentrations of Eda on the survival rate of PC12 cells exposed to MPP⁺. The mitochondrial morphology was determined by laser confocal microscope. Western blot was used to measure the protein expression levels of mitochondrial fusion- and fission-related proteins, including OPA1, MFN2, DRP1 and Fis1. The results showed that pretreatment with different concentrations of Eda antagonized MPP⁺-induced PC12 cell damage in a dose-dependent manner. The PC12 cells treated with MPP⁺ showed mitochondrial fragmentation, up-regulated DRP1 and Fis1 protein expression levels, and down-regulated MFN2 and OPA1 protein expression levels. Eda could reverse the above changes in the MPP⁺-treated PC12 cells, but did not affect Fis1 protein expression. These results suggest that Eda has a protective effect on the mitochondrial fusion disruption induced by MPP⁺ in PC12 cells. The mechanism may be related to the up-regulation of OPA1/MFN2 and down-regulation of DRP1.

Key words: edaravone; MPP⁺; PC12 cells; mitochondrial fission; mitochondrial fusion

Received 2019-11-30 Accepted 2020-02-13

This work was supported by the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (No. 81701084).

*Corresponding author. E-mail: songcj09@xzhmu.edu.cn

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是与年龄相关的第二大常见神经退行性疾病, 是进行性发展的致死性复杂疾病^[1]。无论是家族性还是散发性 PD, 线粒体功能障碍一直被认为是 PD 发病最为重要的因素^[2]。线粒体是细胞内能量产生的重要细胞器, 对于中枢神经细胞来说, 线粒体的融合与分裂动态平衡尤为重要^[3]。只有融合与分裂达到平衡, 才能维持神经元长胞体、树突与轴突的远距离运输和能量均匀分布。本研究组前期研究显示, PD 的发病与线粒体融合与分裂平衡改变密切相关, 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 可以促进 DRP1 转移至线粒体, 从而引起线粒体过度分裂和细胞损伤^[4]。

MPP⁺ 可特异性抑制细胞呼吸链的 NADH 脱氢酶 (complex I), 也是线粒体呼吸链复合物 I 抑制剂。研究表明, MPP⁺ 有多巴胺神经元毒性, 可破坏线粒体的融合与分裂平衡^[5]。依达拉奉 (edaravone, Eda) 是已经应用于治疗急性缺血性卒中的药物, 其通过抗氧化应激减少自由基产生, 保护线粒体, 从而发挥神经保护作用^[6]。Chen 等研究显示, Eda 对 MPP⁺ 处理的大鼠星形胶质细胞具有抗氧化、抗凋亡作用^[7], 但具体作用机制尚不明确。本研究以成年大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞系 (PC12 细胞) 作为多巴胺能神经元模型, 用 MPP⁺ 处理复制 PD 细胞模型, 从线粒体分裂与融合角度探讨 Eda 对 PC12 细胞线粒体的保护机制, 以期 Eda 保护 PD 中神经元的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 PC12 细胞购自上海润然医学检验中心实验室, 胎牛血清、DMEM 培养基、100 U/L 青霉素和 100 mg/mL 链霉素购自美国 Gibco 公司, MPP⁺ 和噻唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司, 兔抗大鼠 β -actin、兔抗大鼠 OPA1、兔抗大鼠 MFN2、兔抗大鼠 DRP1 和兔抗大鼠 Fis1 抗体购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司。

1.2 PC12 细胞培养 细胞培养在高糖 DMEM 培养基中, 培养基含有 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 mg/mL 链霉素。细胞在 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞状态稳定, 融合度达 70%~80% 时进行消化, 传代培养。

1.3 细胞分组与药物处理 按 1×10^6 个/mL 密

度接种 PC12 细胞于 96 孔板或 6 cm 培养皿。96 孔板培养的细胞用于 MTT 比色法检测, 6 cm 培养皿中细胞用于 Western blot 检测。96 孔板中细胞分为 6 组: 0 μ mol/L Eda 组、1 μ mol/L Eda 组、10 μ mol/L Eda 组、0.5 mmol/L MPP⁺ 组 (MPP⁺ 组)、1 μ mol/L Eda+MPP⁺ 组和 10 μ mol/L Eda+MPP⁺ 组。后两组细胞分别用不同浓度 Eda 孵育 30 min 后加入 0.5 mmol/L MPP⁺^[8]。每组设置 6 个复孔, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 进行 MTT 比色法检测。

6 cm 培养皿细胞分为 4 组: 正常对照组 (Con 组)、0.5 mmol/L MPP⁺ 组 (MPP⁺ 组)、10 μ mol/L Eda 组 (Eda 组)、10 μ mol/L Eda+MPP⁺ 组 (MPP⁺+Eda 组)。后两组细胞用 Eda 孵育 30 min 后加入 0.5 mmol/L MPP⁺。各组细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 进行 Western blot 和线粒体染色检测。

1.4 MTT 比色法 96 孔板每孔加入 20 μ L MTT 工作液 (浓度为 5 mg/mL), 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h。吸弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 混匀后于 490 nm 处读取 OD 值, 计算细胞存活率。

1.5 Western blot 加药处理后, 细胞用 PBS 洗 3 次, 加入蛋白裂解液 200 μ L, 用细胞刮刮下细胞, 将细胞裂解液吸取到 EP 管中, 置冰上反应 15 min, 然后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, BCA 法测定细胞蛋白浓度。蛋白上样量为 20 μ g, 加入蛋白上样缓冲液后, 水浴 100 °C 加热 10 min。蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入抗 β -actin、OPA1、MFN2、DRP1 和 Fis1 抗体, 稀释比例均为 1:1 000, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h 后洗膜, 发光试剂 ECL 显色曝光, 读取条带灰度值, 以 β -actin 为内参计算各蛋白的相对表达量。

1.6 线粒体染色 MitoTracker Green (#M7512, Invitrogen) 是一种氧化型的绿色荧光染料, 包含标记线粒体的弱巯基反应性的氯甲基官能团, 可被动地穿过细胞膜直接聚集到活性的线粒体上, 一旦染色便不易脱色, 不受线粒体膜电位的影响。将 PC12 细胞用 MitoTracker Green (终浓度为 100 nmol/L) 在 37 °C 培养箱中染色 12 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次洗涤 5 min。然后在共聚焦显微镜 (FV1200, Olympus) 下分析 PC12 细胞线粒体情况。

1.7 统计学方法 实验数据采用 mean \pm SD 表示, 应用 SPSS 22.0 统计软件进行统计检验, 采用单因

素方差分析和卡方检验进行多组间比较, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Eda对MPP⁺处理的PC12细胞存活率的影响

MTT 比色法检测结果显示, 和 0 $\mu\text{mol/L}$ Eda 组相比, 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ Eda 组细胞存活率无明显变化。和 0 $\mu\text{mol/L}$ Eda 组相比, MPP⁺ 组细胞存活率显著下降; 和 MPP⁺ 组相比, 1 $\mu\text{mol/L}$ Eda+MPP⁺ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ Eda+MPP 组细胞存活率显著提高, 且细

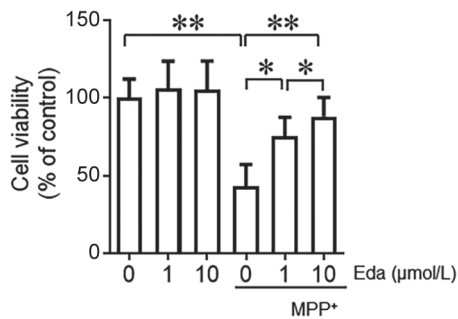


图 1. 依达拉奉(Eda)对MPP⁺处理的PC12细胞存活率的影响
Fig.1. The effect of edaravone (Eda) on the survival rate of MPP⁺-induced PC12 cells. Cell viability of PC12 cells was measured with MTT method. Data are mean \pm SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

胞存活率随 Eda 浓度的增加而显著升高 (图 1), 因此后续实验将选择 10 $\mu\text{mol/L}$ Eda 作为处理浓度。

2.2 Eda对线粒体网格结构的影响

激光共聚焦显微镜观察结果显示, 对照组与 Eda 组的线粒体形态正常, 线粒体呈典型的管状结构, 加入 MPP⁺ 后线粒体发生收缩和断裂, 呈现明显的碎片化结构, 呈点状、短杆状 (片段化)。给予 Eda 预处理的 PC12 细胞内片段化线粒体明显减少 (图 2A)。统计结果显示, 53.5% 的对照组细胞线粒体呈现延伸的管状结构, 而只有 21.6% 呈点状、短杆状; 相反, 62.6% 的 MPP⁺ 组细胞线粒体呈点状和颗粒状, 表现为典型的断裂状态, 而 18.1% 的细胞线粒体呈正常的管状结构; MPP⁺+Eda 组具有正常管状结构线粒体的细胞达到总量的 49.2% (图 2B), 提示 Eda 可以逆转 MPP⁺ 导致的线粒体融合或分裂功能异常。

2.3 Eda对MPP⁺处理的PC12细胞线粒体融合、分裂蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与对照组比较, MPP⁺ 组 PC12 细胞中 OPA1 和 MFN2 蛋白表达水平均显著下调 (均 $P < 0.05$, 图 3), 提示 MPP⁺ 可诱导 PC12 细胞线粒体融合障碍。和 MPP⁺ 组相比, MPP⁺+Eda 组 OPA1 和 MFN2 蛋白表达水平均显著上调, 差异

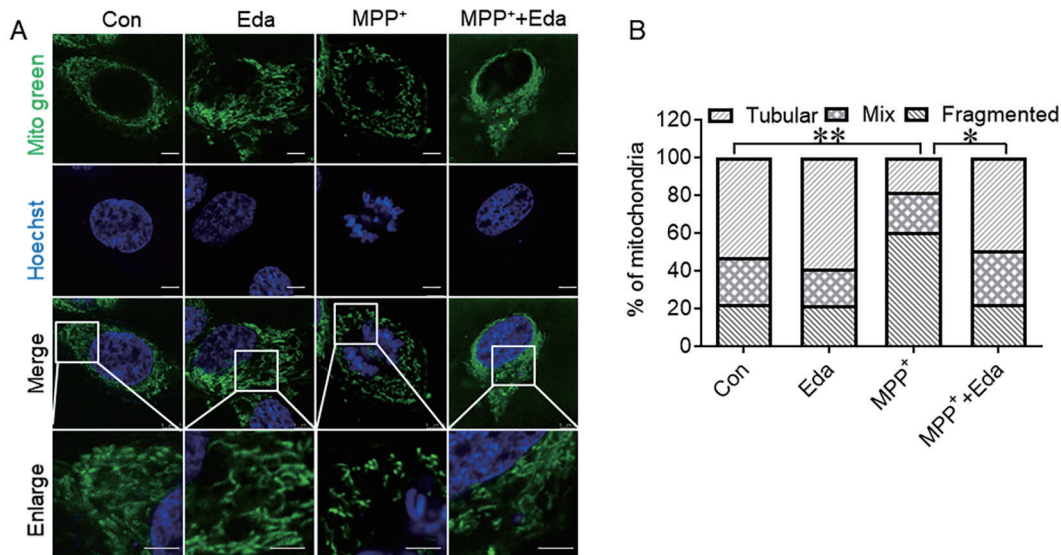


图 2. 依达拉奉(Eda)对MPP⁺处理的线粒体形态的影响

Fig. 2. The effect of Edaravone (Eda) on MPP⁺-induced mitochondrial morphology. A: Changes in mitochondrial morphology were observed in PC12 cells. Mitochondria were labeled with MitoTracker Green and observed by laser confocal microscope. Scale bar, 5 μm . B: Quantification of mitochondrial architecture of panel A. Cells were divided into three categories, "Tubular" with $>90\%$ of mitochondria forming elongated interconnected networks, "Mix" with mixed tubular and short mitochondria, and "Fragmented" with $>90\%$ short punctiform mitochondria. $n = 100$ cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

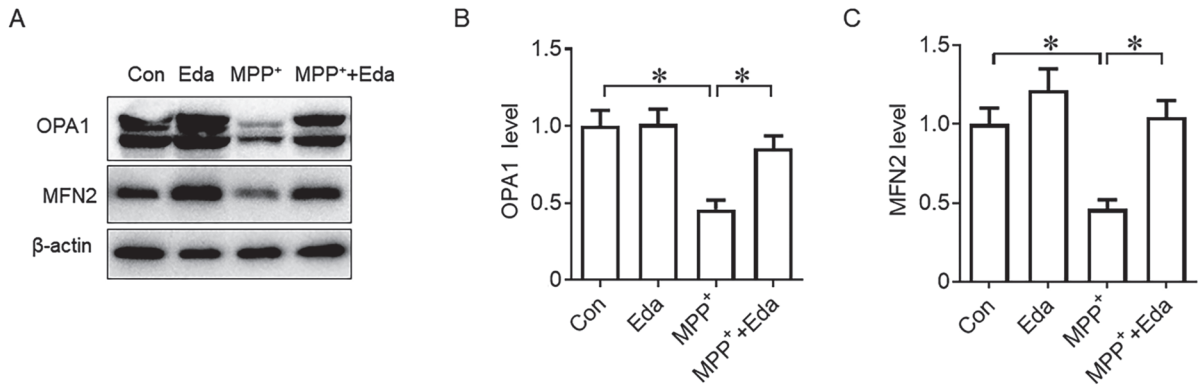


图 3. 依达拉奉(Eda)对MPP⁺处理的PC12细胞线粒体融合蛋白表达的影响

Fig. 3. Effect of edaravone (Eda) on the protein expression levels of mitochondrial fusion proteins detected by Western blot. A: Representative blots of OPA1 and MFN2. B, C: Quantitative analysis results of OPA1 (B) and MFN2 (C). Data are mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$.

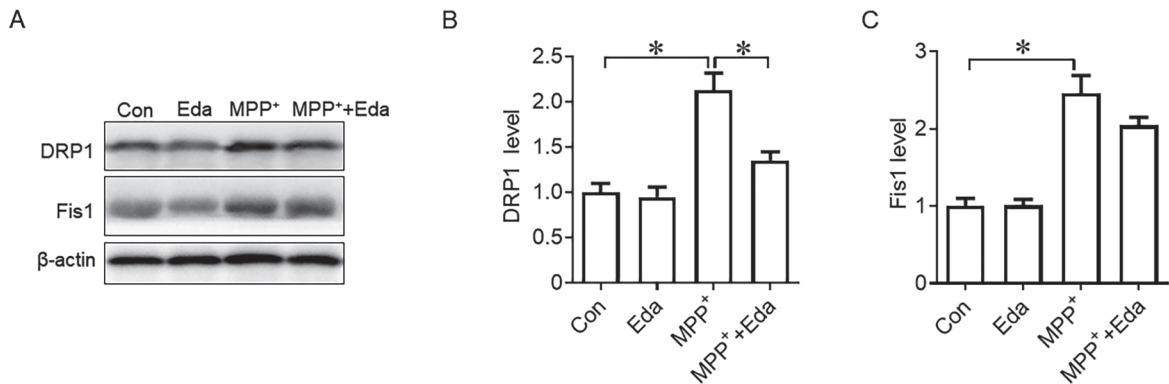


图 4. 依达拉奉(Eda)对MPP⁺处理的PC12细胞线粒体分裂蛋白表达的影响

Fig. 4. Effect of edaravone (Eda) on the protein expression level of mitochondrial fission proteins detected by Western blot. A: Representative blots of DRP1 and Fis1. B, C: Quantitative analysis results of DRP1 (B) and Fis1 (C). Data are mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$.

具有显著性 (均 $P < 0.05$, 图 3)。

2.4 Eda 对 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞线粒体分裂蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与对照组比较, MPP⁺ 组 PC12 细胞中 DRP1 和 Fis1 蛋白表达水平显著上调 (均 $P < 0.05$, 图 4), 提示 MPP⁺ 可诱导 PC12 细胞线粒体分裂障碍。和 MPP⁺ 组相比, MPP⁺+Eda 组 DRP1 蛋白表达水平显著下调, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 而 Fis1 表达未见明显改变 (图 4)。

3 讨论

线粒体分裂和融合有助于维持线粒体的功能和质量管理。MFN2 和 OPA1 分别介导线粒体外膜和内膜的融合, 而 DRP1 是线粒体分裂的关键因素。也有研究证明线粒体分裂与融合的动态失衡与活性

氧 (reactive oxygen species, ROS) 关系密切^[6]。本研究结果显示, MPP⁺ 处理的 PC12 细胞中显示出片段化的线粒体结构, Eda 拮抗 MPP⁺ 诱导的 DRP1 表达上调以及 MFN2 和 OPA1 的表达下调, 由此可见 Eda 对 MPP⁺ 诱导的毒性的对抗作用可能是通过保持线粒体融合与分裂两者之间的平衡来实现的 (图 5)。

MPP⁺ 是线粒体复合酶 I 抑制剂, 可引起线粒体复合酶 I 的活性降低, 从而导致细胞内氧自由基增加, 线粒体膜电位下降, 线粒体融合-分裂等一系列反应, 引起细胞凋亡。已有文献报道 Eda 减弱 MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 氧化应激, 减少 ROS 产生, 进而抑制细胞凋亡^[9]。本研究结果进一步验证了 Eda 能对抗 MPP⁺ 诱导的细胞死亡, 提高细胞的存活率。此外, Eda 能够改善 MPP⁺ 导致的线粒体片

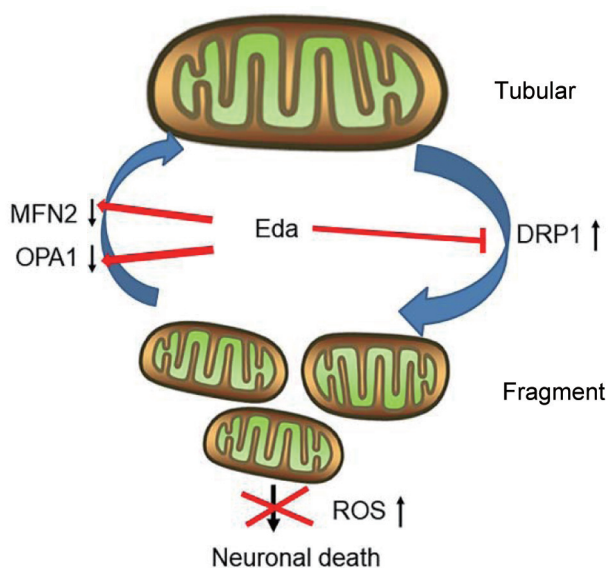


图 5. 依达拉奉(Eda)对MPP⁺诱导的帕金森病(PD)细胞模型中线粒体动力学的作用机制

Fig. 5. Mechanism of the effect of edaravone (Eda) on mitochondrial dynamics in the Parkinson's disease (PD) cell model induced by MPP⁺. Both fission and fusion enable dynamic morphological changes of the mitochondrial network, contributing to mitochondrial maintenance, function and quality control. The MPP⁺-induced increase in DRP1, as well as decrease in MFN2 and OPA1, were all partially prevented by Eda, indicating that Eda-induced protection against MPP⁺ toxicity is mediated by the preservation of balance between mitochondrial fission and fusion.

段化, 逆转并上调 MPP⁺ 降低的线粒体融合相关蛋白 MFN2、OPA1 表达, 表明 Eda 对 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞有保护作用, 而其保护机制可能与改善线粒体分裂、融合紊乱有关。

线粒体作为一种高度动态的细胞器, 通过不断地分裂和融合改变其形态, 形成一个高度动态的网络, 以适应细胞环境的变化, 在细胞内穿梭以到达能量需求高的部位^[10, 11]。在家族遗传性或毒素诱导的 PD 模型中, 线粒体动力学失衡是导致多巴胺能神经元丢失的主要病理因素^[5]。当能量需求升高, 线粒体易于融合, 呈网状结构, 可促进能量与物质交换。当细胞分裂时, 线粒体也发生分裂以满足自身需求, 如果分裂过度则会使其功能受损, 呈短棒状, 即线粒体碎片化^[12]。本研究组前期研究显示, MPP⁺ 促使 SH-SY5Y 细胞 ROS 产生增加, 神经元线粒体呈碎片化, 进而降低细胞活性, 导致细胞死亡^[4]。而对线粒体碎片化的抑制, 可以减轻线粒体损伤, 进而保护神经元^[13]。本研究结果显示, Eda

可以抑制 MPP⁺ 线粒体碎片化, 起到神经元保护的作用。

线粒体的形态是由线粒体融合与分裂速度决定的。线粒体融合、分裂依赖多种蛋白的共同调节, 其中主要的融合蛋白有 MFN2 和 OPA1, 主要的分裂蛋白有 DRP1 和 Fis1。MFN2 位于线粒体外膜, 主要参与线粒体外膜融合, 其为线粒体融合的重要执行因子, OPA1 定位在线粒体内外膜间隙, 主要参与线粒体内膜融合。Fis1 和 DRP1 都是参与线粒体分裂的重要蛋白。在正常细胞中, DRP1 主要位于胞浆, 在线粒体分裂时才发生转位, 主要转移到线粒体外膜分裂位点。当 DRP1 活化、线粒体分裂增加时, 线粒体融合会被抑制, 导致线粒体分裂与融合紊乱, 这是神经元损伤诱发神经退行性病变的重要因素^[14]。本研究结果显示, MPP⁺ 可诱发线粒体分裂与融合的动态失衡, 线粒体融合相关蛋白 MFN2、OPA1 表达下调, DRP1 和 Fis1 表达上调, 给予 Eda 预处理能够逆转此种改变, 提示神经元线粒体分裂、融合紊乱可能参与了 PD 的发病, 而 Eda 能够改善线粒体分裂、融合紊乱, 为其临床应用提供理论依据。

综上, Eda 能够通过抑制 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞线粒体分裂, 促进其融合, 从而改善线粒体功能, 进而修复受损细胞, 但其具体的作用机制有待进一步的研究。

参考文献

- Ruiperez V, Darios F, Davletov B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog Lipid Res* 2010; 49(4): 420–428.
- Essawy SS, Tawfik MK, Korayem HE. Effects of adenosine receptor antagonists in MPTP mouse model of Parkinson's disease: mitochondrial DNA integrity. *Arch Med Sci* 2017; 13(3): 659–669.
- Oettinghaus B, Licci M, Scorrano L, Frank S. Less than perfect divorces: dysregulated mitochondrial fission and neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2012; 123(2): 189–203.
- Song C, Zhang J, Qi S, Liu Z, Zhang X, Zheng Y, Andersen JP, Zhang W, Strong R, Martinez PA, Musi N, Nie J, Shi Y. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links mitochondrial dysfunction to Parkinson's diseases. *Aging Cell* 2019; 18(3): e12941.
- Santos D, Esteves AR, Silva DF, Januário C, Cardoso SM. The impact of mitochondrial fusion and fission modulation

- in sporadic Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 2015; 52(1): 573–586.
- 6 Matsumoto S, Murozono M, Kanazawa M, Nara T, Ozawa T, Watanabe Y. Edaravone and cyclosporine A as neuroprotective agents for acute ischemic stroke. *Acute Med Surg* 2018; 5(3): 213–221.
 - 7 Chen H, Wang S, Ding JH, Hu G. Edaravone protects against MPP⁺-induced cytotoxicity in rat primary cultured astrocytes via inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *J Neurochem* 2008; 106(6): 2345–2352.
 - 8 Ba RQ, Liu J, Fan XJ, Jin GL, Huang BG, Liu MW, Yang JS. Effects of miR-199a on autophagy by targeting glycogen synthase kinase 3 β to activate PTEN/AKT/mTOR signaling in an MPP⁺ *in vitro* model of Parkinson's disease. *Neurol Res* 2020; 42(4): 308–318.
 - 9 Ma L, Cao TT, Kandpal G, Warren L, Fred Hess J, Seabrook GR, Ray WJ. Genome-wide microarray analysis of the differential neuroprotective effects of antioxidants in neuroblastoma cells overexpressing the familial Parkinson's disease α -synuclein A53T mutation. *Neurochem Res* 2010; 35(1): 130–142.
 - 10 Zilocchi M, Finzi G, Lualdi M, Sessa F, Fasano M, Alberio T. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease human samples and cellular models. *Neurochem Int* 2018; 118: 61–72.
 - 11 Gai C, Feng WD, Qiang TY, Ma HJ, Chai Y, Zhang SJ, Guo ZY, Hu JH, Sun HM. Da-Bu-Yin-Wan and Qian-Zheng-San ameliorate mitochondrial dynamics in the Parkinson's disease cell model induced by MPP⁺. *Front Pharmacol* 2019; 10: 372.
 - 12 Jiang X, Jin T, Zhang H, Miao J, Zhao X, Su Y, Zhang Y. Current progress of mitochondrial quality control pathways underlying the pathogenesis of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 4578462.
 - 13 Ju WK, Kim KY, Noh YH, Hoshijima M, Lukas TJ, Ellisman MH, Weinreb RN, Perkins GA. Increased mitochondrial fission and volume density by blocking glutamate excitotoxicity protect glaucomatous optic nerve head astrocytes. *Glia* 2015; 63(5): 736–753.
 - 14 Li N, Wu Y, Zhu L, Huang Y, Liu Z, Shi M, Soltys D, Zhang J, Chang Q. Extracellular microvesicles-derived from microglia treated with unaggregated alpha-synuclein attenuate mitochondrial fission and toxicity-induced by Parkinsonian toxin MPP⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 517(4): 642–647.