◇药学研究◇

1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞发生铁死亡的实验观察

宋蕊,刘晨旭,张睿,李冰洁,李庆林

(安徽中医药大学、新安医学教育部重点实验室,安徽 合肥 230012)

摘要:目的 进行 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenyl pyridine,MPP +)诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞铁死亡(Ferroptosis)的研究。**方法** 采用噻唑蓝法(MTT)检测细胞存活率和筛选铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1)的最佳作用浓度;倒置显微镜观察 Ferrostatin-1 对 PC12 细胞的保护作用;MDC 染色检测细胞自噬;ELISA 法检测 caspase-3 的酶活性;流式细胞术检测活性氧 ROS。**结果** 1 mmol · L^{-1}MPP + 对 PC12 细胞有明显抑制作用;5 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 能够明显提高 PC12 细胞的存活率;倒置显微镜观察结果表明 Ferrostatin-1 预保护后,PC12 细胞损伤明显减少;MDC 染色检测细胞自噬和 ELISA 法检测 caspase-3 的酶活性结果显示 Ferrostatin-1 对 MPP + 诱导的 PC12 细胞自噬和凋亡的保护作用不明显;ROS 活性氧检测结果显示 ROS 在胞内增加,可能发生氧化应激,加 Ferrostatin-1 后 ROS 荧光强度减弱。**结论** Ferroptosis 能够显著抑制 MPP + 诱导的 PC12 细胞损伤,且 Ferrostatin-1 对细胞的自噬和凋亡作用不明显,推测出 MPP + 诱导 PC12 细胞的损伤可能有 Ferroptosis 的存在。

关键词:帕金森病;铁死亡;1-甲基-4-苯基吡啶离子;铁死亡抑制剂;PC12 细胞

doi:10.3969/j.issn.1009 – 6469.2017.02.007

Investigation of MPP + induced ferroptosis in PC12 cells

SONG Rui, LIU Chenxun, ZHANG Rui, LI Bingjie, LI Qinglin

(*Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui, Hefei* 230012, *China*)

Abstract: Objective To study MPP + induced ferroptosis in PC12 cells. **Methods** The cell viability was detected and the optimum concentrations of Ferrostatin-1 were screened by MTT assay; the protective effect of Ferrostatin-1 on PC12 cells were by inverted

通信作者:李庆林,男,教授,博士生导师,研究方向:分子药理学,E-mail:qinglin_lee@ hotmail.com

[35] ZHAO LJ, JIANG H, PAPASIAN CJ, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(1): 17-29.

[36] MURUGANANDAN S, ROMAN AA, SINAL CJ. Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(2): 222-234.

[37] MOHR S, BOTTIN MC, LANNES B, et al. Microdissection, mRNA amplification and microarray: a study of pleural mesothelial and malignant mesothelioma cells[J]. Biochimie, 2004, 86(1): 13-19.

[38] FERNANDEZ-RANVIER GG, WENG J, YEH RF, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling[J]. Arch Surg, 2008, 143(9): 841-846.

[39] NTIKOUDI E, KIAGIA M, BOURA P, et al. Hormones of adipose tissue and their biologic role in lung cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(1): 22-30.

[40] ZHENG Y, LUO S, WANG G, et al. Downregulation of tazarotene induced gene-2 (TIG2) in skin squamous cell carcinoma[J]. Eur J Dermatol, 2008, 18(6): 638-641.

[41] LIN W, CHEN YL, JIANG L, et al. Reduced expression of chemerin is associated with a poor prognosis and a lowed infiltration of both dendritic cells and natural killer cells in human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Lab, 2011, 57(11/12): 879-885.

[42] TAN BK, CHEN J, FARHATULLAH S, et al. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin[J]. Diabetes, 2009, 58(9): 1971-1977.

[43] KUKLA M, MAZUR W, BUŁDAK RJ, et al. Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines-visfatin, chemerin and vaspin-in chronic hepatitis[J]. Mol Med, 2011, 17(11/12): 1397-1410.

[44] VERMI W, RIBOLDI E, WITTAMER V, et al. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin[J]. J Exp Med, 2005, 201(4): 509-515.

[45] LINDHOLM-PERRY AK, KUEHN LA, REMPEL LA, et al. Evaluation of Bovine chemerin (RARRES2) Gene Variation on Beef Cattle Production Traits[J]. Front Genet, 2012, 3: 39.

[46] HEROVÁ M, SCHMID M, GEMPERLE C, et al. Low dose aspirin is associated with plasma chemerin levels and may reduce adipose tissue inflammation[J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 256-262.

[47] TAKAHASHI M, TAKAHASHI Y, TAKAHASHI K, et al. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes[J]. FEBS Letters, 2008, 582(5): 573-578.

(收稿日期:2016-06-27,修回日期:2016-07-20)

microscope observation, the cell autophagy were inspected by MDC staining; caspase-3 enzyme activity were tested by ELISA method, the intracellular ROS was analyzed by ROS assay kit. **Resluts** The results manifested that 1 mmol · L^{-1} MPP + had obvious inhibitory effect on PC12 cells. 5 μmmol · L^{-1} Ferrostatin-1 can obviously improve the survival rate of PC12 cells. After Ferrostatin-1 incubation, the injury on PC12 cells were significantly reduced. MDC staining exhibited that the protection effect of Ferrostatin-1 on the autophagy of PC12 cells induced by MPP + was not obvious. Caspase-3 activity tests showed that the protection effect of Ferrostatin-1 on the apoptosis of PC12 cells induced by MPP + was not remarkable. The intracellular ROS was increased significantly, which lead to oxidative stress. And incubation with Ferrostatin-1 can reduce the intensity of fluorescence. **Conclusion** Ferrostatin-1 can significantly inhibit PC12 cells′ injury induced by MPP +, and the effect of Ferrostatin-1 on autophagy and apoptosis is not significant. It assumed the existence of ferroptosis on the model of MPP + damaged PC12 cells.

Key words: Parkinson's disease; Ferroptosis; MPP +; Ferrostatin-1; PC12 cells

帕金森病(PD)是由于纹状体多巴胺含量明显减少和黑质纹状体多巴胺能神经元进行性缺失为特征的中枢神经系统退行性疾病[1]。1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP +)是1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)的体内代谢产物,是一种多巴胺能神经元毒素,被普遍应用于帕金森症各种细胞或动物模型的研究。近几年研究发现,小分子化合物(包括 erastin,盐酸兰吡立松,苹芰酰胺等)可以导致 RAS 基因突变,肿瘤细胞会发生一种氧化性的、非凋亡性的细胞死亡[2-3]。这种细胞死亡形式的作用机制与谷氨酸的氧化毒性相类似,柳氮磺胺吡啶、erastin、盐酸兰吡立松等药物可通过抑制胱氨酸/谷氨酸反转运体来抑制胱氨酸的跨膜穿梭,细胞内的氧化还原平衡被破坏并且最终形成了铁离子依赖性的氧化性死亡方式,即铁死亡(Forroptosis)[4],因此,铁的集聚和铁依赖的脂质和胞质 ROS 的生成是 Forroptosis 的必要条件[4]。近些年,国内外研究表明帕金森病及细胞凋亡[5]、自噬[6]等死亡形式有关,但帕金森病与 Forroptosis 的相关文章还未见报道。

目前,有报道表明[7],Forroptosis 的发生可能与肿瘤和神经退行性疾病有关,铁在帕金森病发生时参与了细胞死亡的现象,并且在帕金森病病人的脑内发现铁的沉积,同样,氧化应激反应的增强、自由基的大量生成对神经细胞造成氧化损伤是导致帕金森病的主要原因之一[8],而 Forroptosis 的发生也是由于氧化损伤,并且根据发生条件推测帕金森病可能也与 Forroptosis 有关。本研究探讨帕金森病中可能的一种新的死亡形式——Forroptosis,为帕金森病的研究开拓新的领域,为其机制的研究和临床治疗提供理论依据和新的突破口。

1 材料与方法

1.1 试剂 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所。MPP +、二甲基亚砜(DMSO)、丹酰戊二胺(MDC)均购自 Sigma 公司;铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1)购自 Selleck Chemicals 抑制剂专家;噻唑蓝(MTT)购自武汉生命技术有限公司,Amersco 进口分装;PBS 购自北京中杉生物技术有限公司;RPMI-l640 购自 Gibco 公司;胰蛋白酶购自 Amersco 公司;乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2)购自 Sigma 进口分装,沃德赛斯生物公司;Caspase-3 活性检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所、ROS 荧光测定试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 仪器 艾科浦超纯水系统购自重庆颐洋企业发展有限公司;灭菌锅购自日本 Tomy KOQYO 公司;电子精密天平购自上海精密科学仪器有限公司;MCO-175 型 CO_2 培养箱购自日本 Sanyo 公司;LD4-8 型低速离心机购自北京医用离心机厂;SW-CJ-1F型洁净工作台购自苏净集团安泰公司;Spectra Max M5 多功能酶标仪购自美国 MD 公司;水浴恒温箱购自常州国华电器有限公司;快速混匀器购自常州国华电器有限公司;-80 ℃冰箱购自日本 Sanyo 公司;CK2 型倒置显微镜和 BX60 型荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 细胞培养及分组 PC12 细胞接种于培养瓶中,培养基采用 RPMI-1640(含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U · mL^{-1} 和链霉素 100 U · mL^{-1})置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱,相对饱和湿度的条件下培养。细胞呈单纯贴壁生长,隔日换液,待细胞长至 80% ~90% 的密度,用细胞消化液消化传代,每 2 ~ 4 d 传代 1 次,当细胞达到对数生长期时进行实验。实验分为正常对照组(0 mmol · L^{-1})、MPP + 模型组(1 mmol · L^{-1})、Ferrostatin-1 给药组(2.5、5、10 μmol · L^{-1})。

1.4 建立 MPP + 损伤 PC12 细胞的模型 取对数生长期的 PC12 细胞,实验设 6 个复孔,每孔 100 μL,设置空白对照组和正常对照组,放置在 5% CO_2、37 ℃培养箱中培养过夜后,加入不同浓度的 MPP +(0.25、0.5、1、2、4 mmol · L^{-1}),经 24 h 后,然后加 5 g · L^{-1} 的 MTT 每孔 20 μL,继续再培养箱

孵育 4 h,弃去旧培养基,每孔加 150 μL DMSO,振荡 10 min 后,用酶标仪检测 490 nm 处吸光度值。

1.5 不同剂量 Ferrostatin-1 对 PC12 细胞的影响 操作同“1.4”项,加入不同浓度的 Ferrostatin-1(2.5、5、10 μmol · L^{-1})作用 PC12 细胞 24 h 后,进行 MTT 检测。

1.6 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞存活率的影响 操作同“1.4”项,加入不同浓度的 Ferrostatin-1(2.5、5、10 μmol · L^{-1})预保护 2 h,再加入 1 mmol · L^{-1}MPP + ,24 h 后,进行 MTT 检测。

1.7 不同浓度的 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞的形态 取对数生长期的 PC12 细胞,消化收集细胞悬液并接种于 6 孔板中,每孔 2 mL。置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 贴壁后,按照“1.3”项的细胞分组进行给药处理,继续培养 24 h 后,利用倒置显微镜观察各组细胞形态并拍照。

1.8 MDC 染色检测自噬 将对数生长期的 PC12 细胞,消化离心,吹打均匀后种于 6 孔板中,每孔 2 mL,置于培养箱中过夜培养,细胞完全贴壁后,弃去旧培养液,按照“1.3”项下的细胞分组进行给药,处理 24 h 后,弃去旧培养基,用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 50 μmol · L^{-1}的 MDC 染液 500 μL,于培养箱中避光孵育 30 min 后,用 PBS 洗 3 次,置于倒置荧光显微镜下观察。

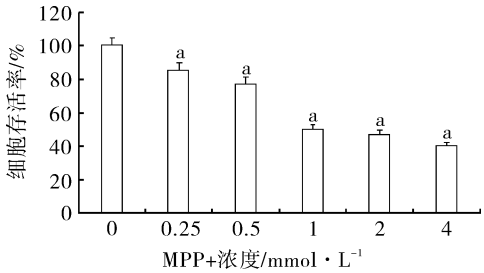
1.9 caspase-3 活性检测 按照试剂盒的说明书进行样品处理,离心收集细胞后,用冷 PBS 洗 2 次后,在细胞中加入 100 μL 冷的裂解缓冲液,置冰上 15 min,每隔 5 min 高速涡旋振荡 15 s,离心后将上清液吸入另一个干净离心管。再按照说明书检测 caspase-3 活性,每个组分别取 10 μL 裂解上清液,加入 90 μL 检测缓冲液,再分别加入 10 μL Ac-DEVD-pNA,避光,37 ℃过夜,测定 A = 405 nm,利用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.10 流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS) 取对数生长期的 PC12 细胞,消化收集后,细胞悬液接种于 6 孔板中,每孔 2 mL。置于培养箱中过夜培养,细胞完全贴壁后,弃去旧培养液,按照“1.3”项下的细胞分组进行给药,处理 24 h 后,弃去旧培养基,用 PBS 洗 2 遍,加入含有 H_2DCFH-DA 荧光染料的无血清培养基,在培养箱中孵育 20 min,避免光照,再用预冷的 PBS 洗 2 次去除多余染料后收集细胞,加入 700 μL PBS 轻轻混匀细胞,立即在流式细胞仪上检测(激发波长:485 nm;发射波长:530 nm)。

1.11 统计学方法 实验数据均为计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 + LSD-t 检验。使用统计软件 SPSS 17.0 进行统计。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP + 诱导 PC12 细胞损伤模型的建立 如图 1 所示,MPP + 对 PC12 细胞的损伤呈现一定的时效和量效关系,随着 MPP + 作用剂量的增加,细胞的存活率呈下降趋势。1 mmol · L^{-1}MPP + 作用于 PC12 细胞 24 h 时与正常对照组相比,细胞存活率下降至(50.20 ± 2.10)%,接近 IC_{50} 值。因此我们选择 1 mmol · L^{-1} MPP + 作为造模的最佳浓度。



注:与正常对照组比较,$^aP < 0.01$。

图 1 不同剂量 MPP + 作用于 PC12 细胞 24 h($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 Ferrostatin-1 对 PC12 细胞存活率的影响 如图 2 所示,2.5 ~ 10 μmol · L^{-1}范围内的 Ferrostatin-1 对 PC12 细胞作用 24 h 后与正常对照组相比,细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$),表明在 2.5 ~ 10 μmol · L^{-1} 剂量范围内,Ferrostatin-1 对 PC12 细胞的生长无显著影响。

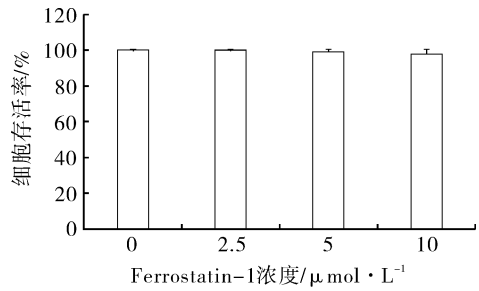
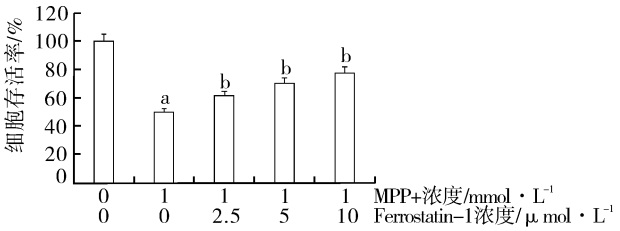


图 2 不同剂量 Ferrostatin-1 对 PC12 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞存活率的影响 如图 3 所示,Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞成一定的量效关系,5 μmol · L^{-1}和 10 μmol · L^{-1}可显著提高细胞存活率,细胞存活率分别为(70.80 ± 1.90)%和(77.82 ± 0.56)%,与模型组(49.9 ± 0.92)%相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



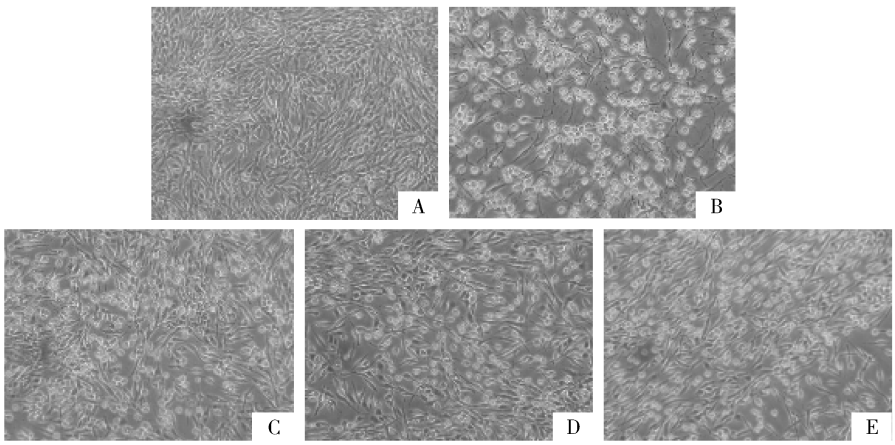
注:与正常对照组比较,$^{a}P<0.01$;与模型组比较,$^{b}P<0.01$。

图 3 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞存活率的影响($n=3$)

2.4 不同浓度的 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞的形态影响 倒置显微镜观察正常细胞形态,可见细胞形态完整且成梭形,折光性强,轴突清晰,贴壁性好,背景清晰(如图 4A);1 mmol · L^{-1} MPP + 作用 24 h 后,细胞形态不完整且皱缩成球形或椭圆形,折光性弱,轴突凌乱断裂,贴壁不牢,背景深(如图 4B);加入 2.5、5、10 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 预保护 2 h,再加入 1 mmol · L^{-1} MPP + 作用 24 h 后,细胞形态与模型组比较为完整,折光性也较强,轴突较清晰,贴壁相对较好(如图 4C、D、E)。

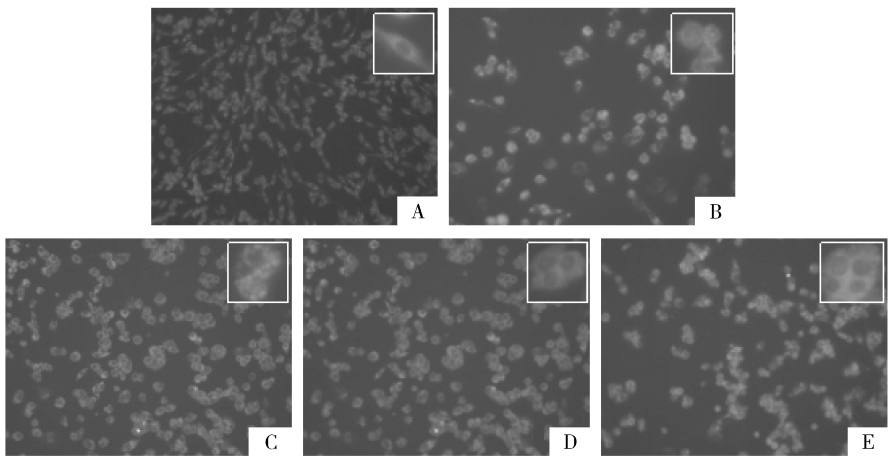
2.5 MDC 荧光染色检测自噬 如图 5 所示,1 mmol · L^{-1} MPP + 损伤 PC12 细胞产生自噬泡,出现许多亮绿色荧光点状聚集,表明 MPP + 作用于 PC12 细胞后,细胞自噬增加;Ferrostatin-1 给药组与模型组相比,亮绿色荧光没有显著变化。

2.6 caspase-3 酶活性检测 caspase-3 是细胞凋亡过程中的一个关键酶,细胞发生凋亡阶段,caspase-3 被激活,活化的caspase-3裂解相应的胞浆胞核底



注:A. 正常对照组;B. 1 mmol · L^{-1} MPP + 组;C. 2.5 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 + 1 mmol · L^{-1} MPP + 组;D. 5 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 + 1 mmol · L^{-1} MPP + 组;E. 10 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 + 1 mmol · L^{-1} MPP + 组。

图 4 倒置显微镜观察 PC12 细胞形态学变化(×400)



注:A. 正常对照组;B. 1 mmol · L^{-1} MPP + 组;C. 2.5 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 + 1 mmol · L^{-1} MPP + 组; D. 5 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 + 1 mmol · L^{-1} MPP + 组;E. 10 μmol · L^{-1} Ferrostatin-1 + 1 mmol · L^{-1} MPP + 组。

图 5 MDC 荧光染色法对细胞自噬的检测(×200)

物,最终导致细胞凋亡。将 caspase-3 序列特异性的多肽偶联至发色基团,当该底物被特定的 caspase-3 剪切后,发色基团即游离出来,通过酶标仪(λ = 405 nm 或 400 nm)测定其吸光值,考察 caspase-3 的活化程度。如图 6 所示,与对照组相比,模型组的 caspase-3 的酶活性明显升高(P < 0.05),Ferrostatin-1 给药组与模型组相比 caspase-3 活性变化不显著,基本没有降低活性(P > 0.05)。

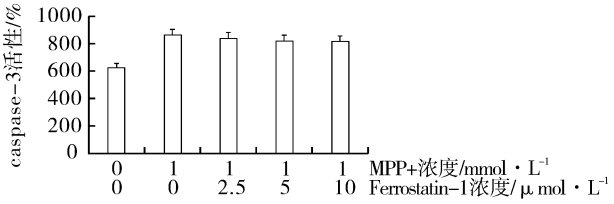
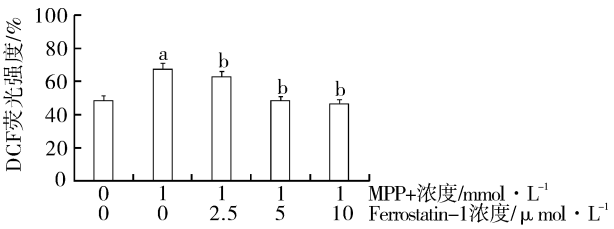


图 6 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞 caspase-3 的活性检测结果($\bar{x} \pm s$, n = 3)

2.7 ROS 活性检测 本研究采用二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法经流式细胞仪检测细胞内 ROS 的含量,该探针可自由穿入细胞膜,进入细胞内后可被细胞内酯酶水解为无荧光的 DCFH,DCFH 不易穿透细胞膜,但可与细胞内 ROS 反应生成强荧光的 DCF,且荧光强度与活性氧的生成量成正比。如图 7 所示实验结果显示,与对照组相比模型组荧光强度明显增强,表明 MPP + 可诱导 PC12 细胞产生大量的 ROS,与模型组相比,加药组荧光强度降低,说明 Ferrostatin-1 可减少 ROS 的产生。



注:与正常对照组比较,^{a}P < 0.01;与模型组比较,^{b}P < 0.01。

图 7 Ferrostatin-1 对 MPP + 损伤 PC12 细胞 ROS 的影响(n = 3)

3 讨论

帕金森病是仅次于阿尔兹海默症的第二大神经退行性疾病。在全球人口老龄化的趋势下,帕金森病的机制研究越来越受到人们的关注,因为机制研究是疾病研究的基础。目前,关于帕金森病的病因尚未清楚,已有研究表明其与遗传、环境因素、感染、衰老、氧化应激、自由基、神经生长因子缺乏及线粒体功能缺陷等有关,是多种机制协同作用的结果。近年来,铁依赖性的细胞死亡形式——Ferroptosis 备受关注,研究表明这种细胞死亡形式可能与神经退行性疾病(帕金森病、阿尔兹海默症等)的发生发展密切相关[7]。本研究建立 MPP + 诱导 PC12 细胞损伤的模型,在体外模拟帕金森病的病理过程,以初步探索 MPP + 诱导的细胞 Ferroptosis 的存在,开辟帕金森病研究的新机制。

20 世纪 70 年代末研究发现 MPTP 可导致帕金森病及多巴胺能神经退行性疾病,PC12 细胞系即大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞克隆,是目前广泛被用来研究神经细胞的功能、分化和死亡的一种体外细胞培养模型。利用 MPP + 对 PC12 细胞造帕金森模型已被公认为经典模型之一[9]。

Ferroptosis 是在生物化学、形态学和遗传学等方面不同于凋亡、自噬和坏死的一种细胞死亡方式。Forroptosis 的形态学特征为线粒体变小,但线粒体的双层膜密度增加,并且细胞质和脂质 ROS 增多。凋亡的形态学特征为细胞皱缩、染色质边集、核浓缩、膜起泡、出现凋亡小体、DNA 降解等[10]。坏死的形态学特征是细胞肿胀、膜破裂、线粒体受损、染色体溶解,之后细胞被溶解[11]。自噬的形态学特征为细胞内出现许多双层膜结构的自噬泡,自噬泡内为细胞质和核糖体、高尔基器、内质网等细胞器,但细胞骨架成分却大部分保存基本被保留[12]。Forroptosis 的潜在的分子标记物是前列腺素内过氧化物合酶 2(Ptgs2)的mRNA 水平上调[13],凋亡的标志是 caspase-3 的活化[14],自噬的标志是 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 比值的升高[15],MDC 能够特异性的标记细胞内自噬体和溶酶体,自噬体增多时其荧光强度会相应增强。Ferrostatin-1 是一种潜在的特异性 Forroptosis 抑制剂[16-17],能够降低 erastin 引起的肿瘤细胞的死亡率,在神经退行性疾病中,这种非凋亡进程的抑制剂 Ferrostatin-1 可能能够保护生物体免受神经损伤。有相关研究表明,Ferrostatin-1 在亨廷顿舞蹈病、脑室周围白质软化症等细胞模型中能够抑制细胞死亡[18]。Ferrostatin-1 是一种抗氧化剂,抑制脂质过氧化作用,但是不能抑制线粒体 ROS 的产生和不能降低溶酶体膜通透性,线粒体 ROS 的产生与 Forroptosis 的发生无关。本实验中,Ferrostatin-1能够抑制胞内 ROS 的产生,且能抑制 MPP + 对 PC12 细胞的损伤,可能与其抑制了产生 Forroptosis 的铁依赖的 ROS 有关,从而达到保护 PC12 细胞免受损伤的作用,我们推测帕金森模型中可能存在 Forroptosis。MDC 是一种嗜酸性染色

剂,可作为细胞自噬的标志[19],可以特异性的标记自噬体和溶酶体,自噬小体增多时,它的荧光强度也会相对增强。本实验研究结果表明,与正常对照组比,模型组出现自噬小体,荧光增强,与模型组相比,Ferrostatin-1给药组的 MDC 荧光强度和自噬程度变化不大,说明 Ferrostatin-1 不能够阻止 MPP + 诱导的 PC12 细胞自噬,因而,间接性的表明其不能够保护细胞免受自噬的损伤。caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的重要部分,也是凋亡的关键酶和最终效应器。有研究表明,MPP + 能够诱导促凋亡蛋白 caspase-3 的表达增加[20],本实验的研究结果表明,与正常对照组相比,模型组的 caspase-3 酶活性明显增加,与 Ferrostatin-1 给药组相比 caspase-3 酶活性差异无统计学意义,说明 Ferrostatin-1 可能不能抑制 MPP + 引起的 PC12 细胞凋亡。

综上所述,Ferrostatin-1 能够保护 PC12 细胞免受 MPP + 的损伤,通过对 MDC、caspase-3 的检测排除自噬和凋亡的影响,因此,其保护机制与自噬、凋亡无关,可能与 Forroptosis 有关,Ferrostatin-1 又可以抑制能够引起 Forroptosis 产生的 ROS 的增加,以上结果都证明了 MPP + 诱导 PC12 细胞损伤中可能存在 Forroptosis,关于 Forroptosis 方面机制的研究,有待进一步的探讨。

参考文献

[1] GAWEDA-WALERYCH K, MOHAGHEGHI F, ZEKANOWSKI C, et al. Parkinson's disease-related gene variants influence pre-mRNA splicing processes[J]. Neurobiol Aging, 2016, 47: 127-138.

[2] SHAW AT, WINSLOW MM, MAGENDANTZ M, et al. Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(21): 8773-8778.

[3] RAJ L, IDE T, GURKAR AU, et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS[J]. Nature, 2011, 475(7355): 231-234.

[4] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.

[5] PENEDER TM, BAUER J, PIFL C. Apoptosis-inducing factor in nigral dopamine neurons: Higher levels in primates than in mice [J]. Mov Disord, 2016, 31(11): 1729-1733.

[6] WANG HH, LIN CY, SU SH, et al. Activation of salt-inducible kinase 2 promotes the viability of peritoneal mesothelial cells exposed to stress of peritoneal dialysis[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2298.

[7] 关鹏,石振华,李亚青,等. 铁死亡:一种新的细胞死亡方式[J]. 生物化学与生物物理进展,2013,40(2):137-140.

[8] NORRIS EH, GIASSON BI, ISCHIROPOULOS H, et al. Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications[J]. J Biol Chem, 2003, 278(29): 27230-27240.

[9] CHIASSON K, DAOUST B, LEVESQUE D, et al. Dopamine D2 agonists, bromocriptine and quinpirole, increase MPP + -induced toxicity in PC12 cells[J]. Neurotox Res, 2006, 10(1): 31-42.

[10] GROOTJANS S, HASSANNIA B, DELRUE I, et al. A real-time fluorometric method for the simultaneous detection of cell death type and rate[J]. Nat Protoc, 2016, 11(8): 1444-1454.

[11] RAMI A, KÖGEL D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin[J]. Autophagy, 2008, 4(4): 422-426.

[12] MENZIES FM, FLEMING A, BINSZTEIN DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases[J]. Nat Rev Neurosci, 2015, 16(6): 345-357.

[13] YANG WS, SRIRAMARATNAM R, WELSCH ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. Cell, 2014, 156(1/2): 317-331.

[14] SUN X, OU Z, XIE M, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death[J]. Oncogene, 2015, 34(45): 5617-5625.

[15] 胡文君,戴敏. 细胞自噬在动脉粥样硬化发生发展中的作用[J]. 安徽医药,2015,19(12):2245-2250.

[16] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression[J]. Nature, 2015, 520(7545): 57-62.

[17] FRIEDMANN ANGELI JP, SCHNEIDER M, PRONETHB, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(12): 1180-1191.

[18] SKOUTA R, DIXON SJ, WANG J, et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(12): 4551-4556.

[19] PANDEY N, SCHMIDT RE, GALVIN JE. The alpha-synuclein mutation E46K promotes aggregation in cultured cells[J]. Exp Neurol, 2006, 197(2): 515-520.

[20] LIU WB, ZHOU J, QU Y, et al. Neuroprotective effect of osthole on MPP + -induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production[J]. Neurochem Int, 2010, 57(3): 206-215.

(收稿日期:2016-08-21,修回日期:2016-12-02)