



·论著·

ULK1小分子激活剂诱导细胞保护性自噬治疗帕金森病疗效观察

亚拉盖¹, 锡林塔娜²

1. 内蒙古自治区人民医院老年医学中心, 内蒙古 呼和浩特 010020
2. 内蒙古锡林郭勒盟蒙医医院心身医学科, 内蒙古 锡林浩特 026000

摘要:目的 探究ULK1小分子激活剂通过诱导细胞进行保护性自噬进程治疗帕金森病(PD)的疗效及其机制。方法 使用MPP⁺构建体外PD模型细胞;分别使用不同浓度的ULK1小分子激活剂BL918处理模型细胞,观察BL918对PD模型细胞生存率、凋亡情况影响;采用Western blotting检测BL918对PD细胞模型中自噬特异性蛋白P62及LC3 II表达影响;分析应用自噬抑制剂3MA对MPP⁺以及BL918诱导的自噬抑制程度。**结果** 随着MPP⁺浓度的升高,PD模型细胞活性呈现逐渐下降趋势;经BL918干预后细胞活性有所提高。随着BL918干预浓度的升高,PD模型细胞的活性有所升高,在0.5 mM浓度时PD细胞活性最大,明显高于其他浓度($P<0.05$)。流式细胞术检测显示,BL918的干预可以有效降低PD模型细胞的凋亡,凋亡率明显低于PD模型组($P<0.05$)。Western blotting检测显示BL918的应用可以升高P62蛋白以及LC3 II的表达($P<0.05$)。经自噬抑制剂3MA干预后,BL918减轻PD模型细胞凋亡的趋势有所减弱。**结论** ULK1的小分子激活剂对MPP⁺建立的PD模型细胞具有较好的保护作用,能够显著降低PD细胞凋亡,其原因可能与ULK1能够诱导细胞发生保护性自噬有关。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(5): 451-455.]

关键词: 帕金森病;ULK1;小分子激活剂;细胞保护性自噬;疗效观察

中图分类号:R742.5

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.05.009

Therapeutic effect of a small-molecule activator of ULK1 in treatment of Parkinson's disease by inducing cytoprotective autophagy

Yalagai¹, Xilintana²

1. Geriatrics Center, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous 010020, China
2. Department of Psychosomatic Medicine, Mongolian Medical Hospital of Xilin Gol League, Xilinhot, Inner Mongolia Autonomous 026000, China

Corresponding author: Yalagai, Email: yalagai101@163.com

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of a small-molecule activator of ULK1 in the treatment of Parkinson's disease (PD) by inducing cytoprotective autophagy. **Methods** MPP⁺ was used to establish *in vitro* PD model cells, and then the model cells were treated with different concentrations of BL918, a small-molecule activator of ULK1, to observe the effect of BL918 on the viability and apoptosis of PD model cells. Western blotting was used to investigate the effect of BL918 on the expression of the autophagy-specific proteins P62 and LC3 II in the PD cell models, and the autophagy inhibitor 3MA was used to analyze its inhibitory effect on autophagy induced by MPP⁺ and BL918. **Results** With the increase in MPP⁺ concentration, the viability of the PD model cells tended to decrease gradually, while the viability of cells was improved after BL918 intervention. With the increase in the concentration of BL918 intervention, the viability of PD model cells increased and reached the peak at the concentration of 0.5 mM, which was significantly higher than the viability of cells at other concentrations ($P<0.05$). Flow cytometry showed that BL918 intervention effectively reduced the

收稿日期:2021-03-10;修回日期:2021-05-24

作者简介:亚拉盖(1984—),女,蒙古族,博士,副主任医师,研究方向:帕金森及痴呆方向。Email:yalagai101@163.com。

apoptosis of PD model cells, with asignificantly lower apoptosis rate than the PD model group ($P<0.05$). Western blotting showed that the application of BL918 increased the protein expression of P62 and LC3 II ($P<0.05$). After intervention with the autophagy inhibitor 3MA, the tendency of BL918 to reduce the apoptosis of PD model cells was weakened. **Conclusions** The small-molecule activator of ULK1 has a good protective effect on PD model cells established by MPP⁺ and can significantly reduce the apoptosis of PD cells, since ULK1 can induce protective autophagy in cells.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(5): 451–455.]

Keywords: Parkinson's disease; ULK1; small-molecule activator; cytoprotective autophagy; therapeutic effect

帕金森病是一种高发于中老年人的慢性神经系统退行性疾病,85岁以上患病率约为3%~5%^[1-2]。帕金森病患者的主要临床表现包括不自主震颤、运动迟缓、肌强直等运动障碍,该病具有进展性和不易控制等特点^[3-5]。当前对帕金森病的治疗多依赖服药干预,但传统的多巴胺治疗方式一方面副作用大,另一方面也难以纠正PD进程,治疗效果差强人意,因而联合治疗成为帕金森症治疗研究热点^[6-7]。近些年随着分子生物学的发展,线粒体功能障碍、氧化应激、神经炎症、自噬等多种PD发病机制逐渐被发掘出来,从分子角度对PD实施干预已成为当下研究热点方向之一^[8-9]。ULK1小分子激动剂是近些年研究较多的生物制剂,有研究显示此类制剂能够对细胞行为产生明显的影响,但该制剂对PD细胞的影响机制尚不清晰^[10]。本研究旨在通过建立体外细胞模型的方式,分析ULK1小分子激动剂对PD细胞行为、蛋白表达等方面的干预效果,以期改善PD患者预后提供临床参考。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

MPP⁺和ULK1小分子激动剂BL918均购自美国Sigma公司;PD模型细胞购自中国科学院细胞库;DMEM/F12培养基、胰蛋白酶、牛血清等均购自美国GIBCO公司。

1.2 细胞培养与干预方法

将模型PD细胞置于DMEM/F12培养基中,于37℃、5%CO₂条件下进行集中培养,并取对数期的生长细胞进行模型建立与观测。

1.2.1 MTT法检测不同浓度MPP⁺及不同时间干预对PD模型细胞存活率影响 将生长状态良好的PD模型细胞消化传代后接种于培养板中,将培养板中的细胞在37℃、5%CO₂条件下培养12 h,区分为空白组和0.1mM、0.5mM、1.0mM和2.0mM不同浓度MPP⁺干预组,分别孵育6 h、12 h、24 h、48 h和72 h后进行细胞存活率的检测。具体方式为孵育结束前4 h加入MTT溶液,继续孵育结束后加入DMSO,震荡10 min后使用酶标仪于490 nm处检测样品的吸光度(OD),细胞存活率=给药组OD值/阴性组OD值×100(%)。

1.2.2 MTT法检测不同浓度BL918对PD模型细胞活性影响 将生长状态良好的PD模型细胞消化传代后接种于培养板中,将培养板中的细胞在37℃、5%CO₂条件下培

养12 h,区分为空白、0.1 mM、0.5 mM、1.0 mM和2.0 mM等不同浓度BL918干预组,分别进行干预12 h后使用酶标仪检测细胞存活率。

1.2.3 Hoechst染色法检测MPP⁺和BL918对PD模型细胞凋亡影响 将生长状态良好的PD模型细胞消化传代后接种于培养板中,将培养板中的细胞在37℃、5%CO₂条件下培养12 h,区分为空白、MPP⁺组、BL918组和BL918+MPP⁺组,采用Hoechst染色法分别检测4个组细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blotting法检测不同浓度BL918干预对PD自噬蛋白表达影响 将生长状态良好的PD模型细胞消化传代后接种于培养板中,将培养板中的细胞在37℃、5%CO₂条件下培养12 h,将细胞区分为空白、0.1 mM、0.5 mM、1.0 mM和2.0 mM等不同浓度BL918干预组,于干预12 h时采用Western blotting法检测P62蛋白以及LC3 II蛋白的表达情况。

1.2.5 Hoechst染色法检测自噬抑制剂3MA对PD模型细胞凋亡影响 将生长状态良好的PD模型细胞消化传代后接种于培养板中,将培养板中的细胞在37℃、5%CO₂条件下培养12 h,将细胞区分为空白、BL918、MPP⁺、3MA、3MA+MPP⁺、BL918+3MA组,采用Hoechst染色法分别检测5个组细胞凋亡情况。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据处理和分析。计数资料以例和百分率[n(%)]表示,组间比较行卡方检验。计量资料以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用SNK-q检验。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 PD模型细胞存活率随MPP⁺浓度变化

不同浓度的MPP⁺干预会对PD模型细胞的存活率产生明显的影响,随着MPP⁺浓度的升高以及干预时间延长,PD模型细胞的存活率随之下降,呈负相关。不同浓度MPP⁺干预下,处理时间延长会使PD模型细胞损伤逐渐加重,活性逐渐降低,选择同一时间点开展纵向比较显示,MPP⁺浓度越大,细胞活性损伤越明显。见图1。

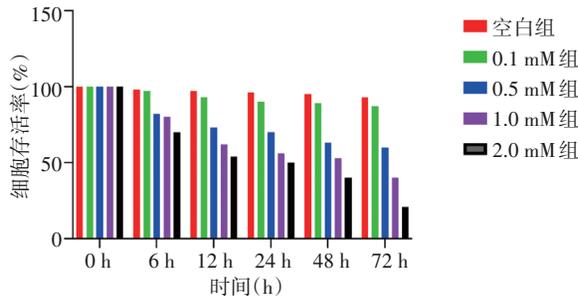
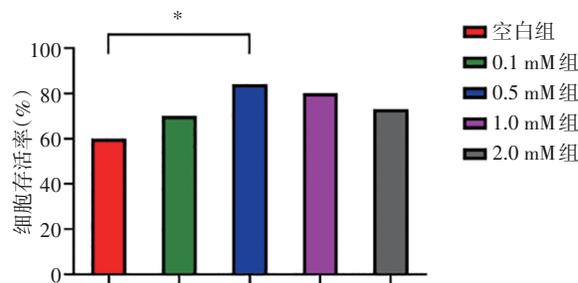


图1 不同浓度MPP⁺及不同干预时间对PD细胞存活率影响

2.2 PD细胞活性随BL918浓度变化

随着BL918干预浓度升高,PD模型细胞存活率出现了明显升高趋势,BL918浓度为0.5 mM时,PD模型细胞存活率达到最高,明显高于空白组细胞存活率,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组间差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

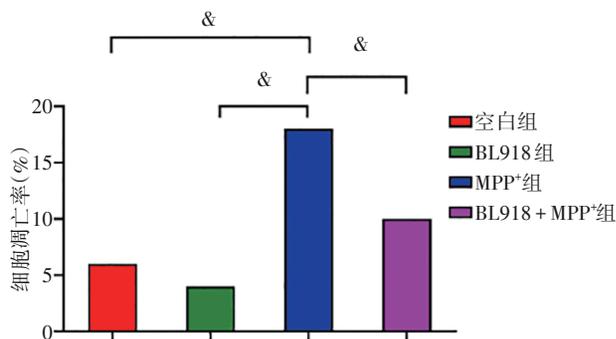


①0.5 mM组与空白组比较, $P < 0.05$

图2 不同浓度BL918对PD模型细胞活性影响

2.3 PD细胞凋亡率随MPP⁺和BL918变化

与空白组模型PD细胞相比较,MPP⁺的加入会明显升高PD细胞凋亡率;BL918会明显降低PD细胞凋亡率;BL918+MPP⁺的加入会使PD细胞凋亡率维持在中间水平。MPP⁺组PD细胞凋亡率明显高于空白组、BL918组和BL918+MPP⁺组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

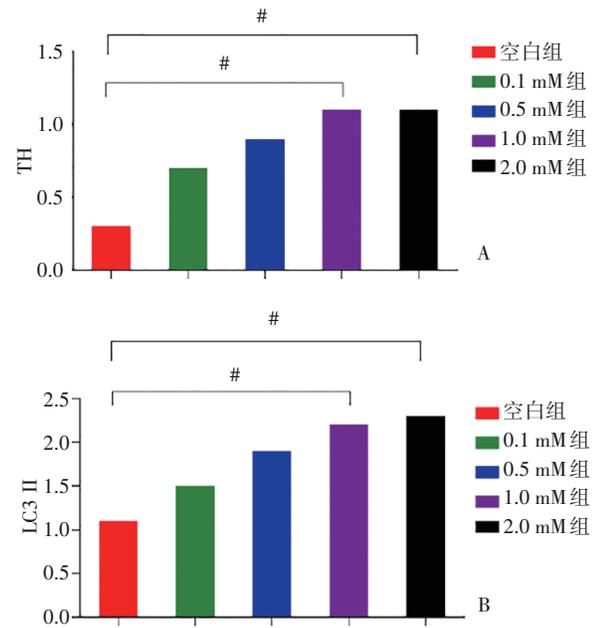


①MPP⁺组与其他各组比较, $P < 0.05$

图3 MPP⁺和BL918对PD模型细胞凋亡影响

2.4 PD细胞蛋白表达随BL918变化

同空白组相比较,加入BL918的PD细胞中P62蛋白和LC3II蛋白表达量明显更高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4-5。



A: P62蛋白; B: LC3 II; ①与空白组相比较, $P < 0.05$

图4 不同浓度BL918干预对PD细胞蛋白表达影响

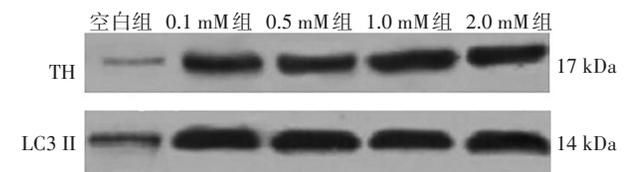
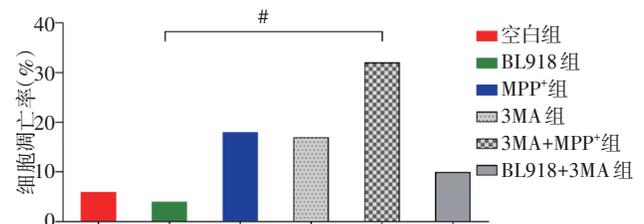


图5 P62及LC3 II蛋白条带图

2.5 PD细胞凋亡随自噬抑制剂3MA的变化

使用自噬抑制剂3MA对PD模型细胞进行干预后,凋亡率最高的是3MA+MPP⁺组,凋亡率最低的是BL918组。多组间PD细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图6。



①3MA+MPP⁺组与BL918组比较, $P < 0.05$

图6 自噬抑制剂3MA对PD模型细胞凋亡影响

3 讨论

近些年PD病因和发病机制逐渐被发掘出来,为PD的治疗提供了新的思路,诸如环境因素、遗传因素、中枢神经系统自身衰老、氧化应激、线粒体功能障碍、神经炎症、自噬等都被证实同PD的发生和发展具有密切联系^[11]。细胞自噬是一种细胞膜包裹部分胞质、蛋白质和细胞器并形成自噬体,而后内涵体与自噬体形成自噬内涵体,并最终与溶酶体相结合形成自噬溶酶体,通过降解捕获蛋白质、细胞器等进程,来达到稳定细胞内环境、更新细胞器目的的过程^[12-14]。自噬是一种细胞保守性机制,该进程在机体的多种生理进程中发挥重要作用,诸如受损蛋白质清理、病原体清理、细胞凋亡、肿瘤抑制等^[15-16]。近些年关于自噬与PD的相关研究逐渐成为热点话题,研究发现,PD的病理基础为黑质-纹状体多巴胺的减少或缺失,以及Lewy小体的形成有密切联系,而细胞可以通过自噬进程来降解清除Lewy小体,由此可见自噬进程与PD的发生发展具有密切联系^[17]。

本研究通过设立不同细胞分组的方式,就ULK1小分子激活剂对PD细胞行为、蛋白表达等进程的影响进行了分析,结果显示,接受不同浓度MPP⁺干预后的PD模型细胞在存活率方面存在明显的不同,MPP⁺是构建PD模型中最为常用的毒性物质之一,该物质能够特异性抑制线粒体的正常功能,从而造成神经细胞能量代谢障碍,最终使多巴胺能神经元的损伤、凋亡与缺失。本研究的研空结果显示,随着MPP⁺浓度的升高以及作用时间的延长,PD模型细胞的活性越来越低,这提示MPP⁺细胞毒性较为明显,可以作为PD模型细胞处理对照来分析BL918对PD细胞行为的影响。本研究进一步就不同浓度BL918对PD模型细胞活性影响进行了分析,结果显示,随着BL918干预浓度的升高,PD细胞的存活率也出现了明显的升高趋势,在BL918浓度为0.5 mM时,PD模型细胞的存活率达到最高,明显高于空白组细胞存活率。已有研究指出,对MPP⁺造模的PD模型小鼠使用自噬激活剂处理后,小鼠的多巴胺能神经元数量会出现明显升高,同时其运动能力也会明显改善,该学者分析认为自噬进程有效缓解了PD模型小鼠的病情,效果明显^[18]。本研究还就BL918对PD细胞的凋亡情况进行了研究,结果显示BL918的加入可以显著降低PD细胞凋亡率,BL918+MPP⁺组别的设置有效减小了实验误差,提示BL918的应用切实降低了PD细胞的凋亡。本文作者分析认为,该结果说明BL918在PD细胞模型中具有神经保护作用,能够减轻PD细胞的凋亡进程,结合上文中BL918对PD细胞活性的影响,这说明BL918对PD细胞的行为会产生影响。本研究通过设立3MA组并进行组间比较发现,同空白对照组比较,3MA的加入很明显增加了细胞的凋亡,3MA+MPP⁺组PD细胞凋亡率更是处于各组中最高水平,而3MA组中

BL918的加入使PD细胞凋亡情况得以改善,这印证了BL918影响了PD细胞的生物活动进程。

本研究还就BL918对自噬相关蛋白LC3 II和P62的表达展开了研究,结果显示BL918的加入明显升高了上述蛋白的表达。已有研究指出,P62蛋白在阿尔兹海默症、帕金森病、多系统萎缩等疾病特征性病理改变和淀粉样小体中均表达为阳性,且形态与各种神经变性病组织学一级响应特异性蛋白表达结果一致,推荐将P62蛋白作为神经变性病辅助病理诊断指标^[19]。还有针对帕金森大鼠开展的动物实验结果显示,PD模型大鼠LC3 II蛋白表达会出现显著升高,而利用五虎追风散能够通过调控LC3 II蛋白的表达来调节神经元自噬进程,进而发挥神经元保护作用^[20]。本文作者分析认为,BL918对LC3 II蛋白与P62蛋白表达的调控一定程度上证实了ULK1的小分子激活剂对PD模型细胞的保护作用,也印证了自噬进程对PD细胞进程的影响。

综上所述,ULK1的小分子激活剂对MPP⁺建立的PD细胞模型具有较好的保护作用,能够显著降低PD细胞凋亡,分析其原因可能与ULK1能够诱导细胞发生保护性自噬有关。

参 考 文 献

- [1] 原凌云,周以军,朱妮,等. 2015年安康市居民期望寿命及寿命损失情况分析[J]. 职业与健康, 2017, 33(2): 200-202; 207.
- [2] ANSARI AM, AHMED AK, MATSANGOS AE, et al. Cellular GFP toxicity and immunogenicity: potential confounders in in vivo cell tracking experiments[J]. Stem Cell Rev Rep, 2016, 12(5): 553-559.
- [3] OLIVEIRA DE CARVALHO A, FILHO ASS, MURILLO-RODRIGUEZ E, et al. Physical exercise for Parkinson's disease: clinical and experimental evidence[J]. Clin Pract Epidemiol Ment Health, 2018, 14: 89-98.
- [4] PRETORIUS E, PAGE MJ, MBOTWE S, et al. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) can reverse the amyloid state of fibrin seen or induced in Parkinson's disease[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0192121.
- [5] CERAVOLO R, COSSU G, BANDETTINI DI POGGIO M, et al. Neuropathy and levodopa in Parkinson's disease: evidence from a multicenter study[J]. Mov Disord, 2013, 28(10): 1391-1397.
- [6] 张丽. 美多巴联合普拉克索治疗帕金森病的有效性及其安全性[J]. 中国实用医药, 2017, 12(3): 121-122.
- [7] CEBALLOS-BAUMANN AO, SCHROETELERFE, FIETZEKUM, et al. Aktivierende Therapien bei Parkinson-syndromen[J]. Nervenheilkunde, 2018, 37(4): 264-271.
- [8] CAPUTI V, GIRON MC. Microbiome-gut-brain axis and toll-like receptors in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1689.
- [9] HELMICH RC, VAILLANCOURT DE, BROOKS DJ. The future

- of brain imaging in Parkinson's disease[J]. *J Parkinson's Dis*, 2018, 8(S1): S47-S51.
- [10] 于梅,李连涛,董同宝,等. 强化核心肌力训练对帕金森病康复的效果[J]. *广东医学*, 2015, 36(1): 77-79.
- [11] 王昆,罗小娜,李时光,等. Nrf2/HO-1 信号通路在 6-羟基多巴胺帕金森病模型大鼠神经损伤中的作用[J]. *中国医药生物技术*, 2019, 14(3): 237-244.
- [12] MOHAMMADI A, AMOUEIAN VG, RASHIDI E. Dysfunction in brain-derived neurotrophic factor signaling pathway and susceptibility to schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's diseases[J]. *Curr Gene Ther*, 2018, 18(1): 45-63.
- [13] Anon. MAO-B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2002, 17(Suppl 4): S38-S44.
- [14] 戴毅,吴玉泉,成军,等. 普拉克索联合恩他卡朋治疗对帕金森病非运动症状的临床疗效及安全性评价[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(20): 1996-1998.
- [15] STELLA F, BANZATO CEM, EMABQUAGLIATO, et al. Dementia and functional decline in patients with Parkinson's disease[J]. *Dement Neuropsychol*, 2008, 2(2): 96-101.
- [16] DUNNEWOLD RJ, JACOBI CE, HILTEN JJVAN. Quantitative assessment of bradykinesia in patients with Parkinson's disease[J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 74(1): 107-112.
- [17] 张五松. 神经节苷脂联合普拉克索治疗帕金森病的临床疗效[J]. *中国民康医学*, 2019, 31(9): 26-28.
- [18] 赵海康,李立宏,潘力,等. 帕金森病多巴胺能神经元轴突变性新的体外实验细胞模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(9): 2286-2291.
- [19] 王圆圆,朱明伟,王鲁宁,等. P62 蛋白在常见神经变性病中的表达观察[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2019, 19(8): 573-580.
- [20] 梁健芬,陈炜,张兴博,等. 加味五虎追风散保护神经元的作用机制研究[J]. *广西中医药*, 2018, 41(5): 55-58.

责任编辑:龚学民