

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research抑制线粒体丙酮酸载体对冈田酸诱导
SH-SY5Y 神经元细胞铜死亡的作用机制Inhibiting mitochondrial pyruvate carrier improved cuproptosis in SH-SY5Y cells
treated with Okada齐越¹, 黄培池¹, 陈巍²,
董笑博², 李纪彤³, 李昭⁴(1. 江苏省徐州医药高等职业学校 制药工程系,
江苏 徐州 221116; 2. 辽宁省中医药研究院 老年
病科, 辽宁 沈阳 110000; 3. 宁波大学 附属第一
医院 全科医学, 浙江 宁波 315010; 4. 沈阳医学
院 药理室, 辽宁 沈阳 110002)QI Yue¹, HUANG Pei-chi¹,
CHEN Wei², DONG Xiao-bo²,
LI Ji-tong³, LI Zhao⁴(1. Department of Pharmaceutical
Engineering, Jiangsu Provincial Xuzhou
Pharmaceutical Vocational College,
Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China;
2. Department of Geratology, Liaoning
Academy of Traditional Chinese Medicine,
Shenyang 110000, Liaoning Province,
China; 3. Department of General
Practice, First Affiliated Hospital of
Ningbo University, Ningbo 315010,
Zhejiang Province, China; 4. Department
of Pharmacology, Shenyang Medical
College, Shenyang 110002, Liaoning
Province, China)**基金项目:**国家自然科学基金青年基金资助项
目(82004340); 徐州市重点研发计划
(社会发展)面上基金资助项目
(KC22134)**作者简介:**齐越(1977-),女,教授,主要从事中
药新药药理及神经药理学的相关
研究**通信作者:**李昭,副教授

MP:13842047437

E-mail: lizhao77720@126.com

摘要:目的 研究抑制线粒体丙酮酸载体对冈田酸诱导 SH-SY5Y 神经元细胞铜死亡作用机制的影响。方法 冈田酸(OA)诱导 SH-SY5Y 细胞建立阿尔茨海默病(AD)模型,将细胞分为对照组(完全培养基)、模型组(20 nmol · L⁻¹ OA)和实验组[20 nmol · L⁻¹ OA + 1 μmol · L⁻¹ 2-氰基-3-(1-苯基-1H-吡啶-3-基)-2-丙烯酸(UK-5099)]。用细胞铜比色法试剂盒检测铜离子含量,用丙酮酸检测试剂盒检测丙酮酸含量,用免疫荧光染色检测各组细胞内丝氨酸 202/苏氨酸 205 位点磷酸化 Tau(AT8)以及铁氧还蛋白 1(FDX1)的表达情况,用蛋白质印迹法检测各组细胞内丙酮酸载体(MPC1/MPC2)和二氢硫辛酸转乙酰基酶(DLAT)的表达水平。结果 实验组、模型组和对照组的铜离子含量分别为(0.36 ± 0.01)、(0.90 ± 0.05)和(0.23 ± 0.04) μmol · g prot⁻¹,丙酮酸含量分别为(0.55 ± 0.04)、(0.33 ± 0.03)和(0.44 ± 0.04) μmol · 10⁸ cell⁻¹,AT8 表达水平分别为 91.46 ± 14.53、125.02 ± 14.43 和 72.57 ± 19.81,FDX1 表达水平分别为 98.93 ± 7.40、147.83 ± 18.63 和 79.18 ± 8.06,MPC1 蛋白相对表达水平分别为 0.59 ± 0.11、1.01 ± 0.14 和 0.55 ± 0.13,MPC2 蛋白相对表达水平分别为 0.54 ± 0.05、1.31 ± 0.07 和 0.43 ± 0.07,DLAT 蛋白相对表达水平分别为 0.72 ± 0.04、0.92 ± 0.07 和 0.53 ± 0.14,实验组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001)。结论 抑制线粒体丙酮酸载体可以减轻冈田酸诱导的 SH-SY5Y 神经元细胞铜死亡。

关键词:丙酮酸载体;冈田酸;铜死亡;Tau 蛋白;三羧酸循环**DOI:**10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.005**中图分类号:**R97 **文献标志码:**A**文章编号:**1001-6821(2025)09-1223-06

Abstract: Objective To investigate the effect of inhibition of mitochondrial pyruvate carrier on Okada-induced cuproptosis in SH-SY5Y cells. **Methods** SH-SY5Y cells were induced by okada acid (OA) to establish a model of Alzheimer's disease (AD). The cells were divided into control group (complete medium), model group (20 nmol · L⁻¹ OA) and experimental group [20 nmol · L⁻¹ OA + 1 μmol · L⁻¹ 2-cyano-3-(1-phenyl-1H-indole-3-yl)-2-acrylic acid (UK-5099)]. Copper ion content was detected by cell cupric colorimetric kit. Pyruvate content was detected by pyruvate detection kit, and the expressions of phosphorylated Tau (AT8) and ferredoxin 1 (FDX1) in each group were detected by immunofluorescence staining. The expression levels of mitochondrial pyruvate carrier (MPC1/MPC2) and dihydrolipoyl transacetylase (DLAT) were detected by Western blot.

Results The contents of copper ions in experimental group, model group and control group were (0.36 ± 0.01) , (0.90 ± 0.05) and $(0.23 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot \text{g prot}^{-1}$; the pyruvate content were (0.55 ± 0.04) , (0.33 ± 0.03) and $(0.44 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot 10^8 \text{ cell}^{-1}$; the AT8 expression levels were 91.46 ± 14.53 , 125.02 ± 14.43 and 72.57 ± 19.81 ; the FDX1 expression levels were 98.93 ± 7.40 , 147.83 ± 18.63 and 79.18 ± 8.06 ; the relative expression levels of MPC1 protein were 0.59 ± 0.11 , 1.01 ± 0.14 and 0.55 ± 0.13 ; the relative expression levels of MPC2 protein were 0.54 ± 0.05 , 1.31 ± 0.07 and 0.43 ± 0.07 ; the relative expression levels of DLAT protein were 0.72 ± 0.04 , 0.92 ± 0.07 and 0.53 ± 0.14 , respectively. The above indexes in the experimental group were statistically significant compared with those in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Inhibition of mitochondrial pyruvate carrier can alleviate Okada-induced cuprotosis of SH-SY5Y cells.

Key words: pyruvate carrier; okadaic acid; copper death; Tau protein; tricarboxylic acid cycle

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,主要表现为进行性认知障碍和行为改变。AD病因复杂,越来越多的证据表明,大脑中Tau蛋白过度磷酸化所形成神经纤维缠结是AD的重要病理标志之一^[1]。铜作为机体所必需的一种微量元素,具有较强的氧化还原能力,与神经元的发育、成熟息息相关^[2]。TSVETKOV等^[3]提出了一种具有铜依赖性的细胞死亡方式——铜死亡,其不同于目前已知的细胞死亡方式(如细胞凋亡、坏死性凋亡、焦亡、铁死亡等),是一种金属离子诱导的调节性细胞死亡。研究发现,AD神经元内 Cu^+ 增多,Tau蛋白过度磷酸化^[4],神经元发生死亡,但是否为铜死亡,尚不明确。本研究拟用冈田酸(okadaic acid, OA)诱导SH-SY5Y细胞模拟AD模型,并给予线粒体丙酮酸载体(mitochondrial pyruvate carrier, MPC)抑制药2-氰基-3-(1-苯基-1H-吡唑-3-基)-2-丙烯酸(UK-5099),考察AD的神经元死亡是否为铜死亡。

材料与方法

1 材料

细胞 SH-SY5Y细胞(人神经母细胞瘤细胞),购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

药品与试剂 UK-5099,规格:每瓶10 mg,纯度:99.95%,批号:KGM12500-500,购自美国MCE公司;OA,规格:每瓶10 mg,纯度:98%,批号:78111-17-8,购自上海源叶生物科技有限公司。胎牛血清,购自浙江天杭生物科技有限公司;细胞铜比色法测试盒,购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Tau兔抗一抗、铁氧还蛋白1(ferredoxin-1, FDX1)兔抗一抗、膜受体分子-溶质运载蛋白7家族成员11(solute carrier family 7 member 11, xCT)兔抗一抗、热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)兔抗一抗,均购自英国Abcam公司;谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione

peroxidase 4, GPX4)鼠抗一抗、腺苷三磷酸酶铜转运B(Cu-translocating beta polypeptide 7B, ATP7B)兔抗一抗、二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPYD)兔抗一抗、硫辛酸合成酶(lipoic acid synthetase, LIAS)兔抗一抗、二氢硫辛酸转乙酰基酶(dihydrolipoyl transacetylase, DLAT)兔抗一抗、神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)兔抗一抗,均购自武汉三鹰生物技术有限公司;丝氨酸202/苏氨酸205磷酸化位点(serine 202/threonine 205 phosphorylation site, AT8)鼠抗一抗,购自美国Invitrogen公司;铜转运蛋白1[solute carrier family 31(copper transporters), member 1, SLC31A1]兔抗一抗,购自美国NOVUS公司;肌动蛋白(beta-actin, β -actin)兔抗一抗,购自美国Immunoway公司;丙酮酸含量检测试剂盒、细胞增殖/毒性检测试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8),均购自北京索莱宝科技有限公司;活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、免疫荧光染色试剂盒-抗兔Alexa Fluor 555,均购自上海碧云天生物技术有限公司。

仪器 IC1000自动细胞计数仪,上海睿钰生物科技有限公司产品;DMI3000B倒置荧光显微镜,德国Leica公司产品;INFINITE 200 PRO酶标仪,瑞士Tecan公司产品;041BR118462垂直电泳槽湿转膜系统,美国Bio-Rad公司产品;Azure 300化学发光成像仪,美国Azure Biosystems公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养

SH-SY5Y细胞用含15%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基,并放置于含5% CO_2 、37℃恒温细胞培养箱中维持培养,每2~3 d更换新鲜培养基保持细胞长势良好。

2.2 模型构建^[5]

取对数生长期的SH-SY5Y细胞,调整细胞密度

为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 100 μL 接种至 96 孔板中, 设为对照组和模型组, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 吸弃旧培养基, 每孔再次加入完全培养基 100 μL , 培养 24 h, 吸弃旧培养基, 模型组加入 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OA 溶液 (用完全培养基稀释), 对照组加入同等体积的完全培养液, 每孔 100 μL 。按照上述实验条件, 接种 2 块 96 孔板, 均放置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温细胞培养箱中培养 24 h, 往一块 96 孔板的每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 测定细胞生存率; 另一块 96 孔板, 收集的细胞中加入裂解液, 用蛋白质印迹法测定细胞内 Tau 蛋白水平。若与对照组相比, 模型组细胞生存率下降、Tau 蛋白水平明显升高, 则证明模型成立。

2.3 细胞分组与处置方法

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 100 μL 接种至 96 孔板中, 设为对照组、模型组和实验组, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 吸弃旧培养基, 实验组加入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 UK-5099 溶液 (用完全培养基稀释), 对照组和模型组均加入同等体积的完全培养液, 每孔 100 μL 。放置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温细胞培养箱中培养 24 h, 吸弃旧培养基, 实验组和模型组均加入 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OA 溶液 (用完全培养基稀释), 对照组加入同等体积的完全培养液, 每孔 100 μL , 继续培养 24 h。

2.4 CCK-8 法检测细胞生存率^[6]

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种至 96 孔板中, 按“2.3”的方法进行分组和处置, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; 以完全培养基做空白孔, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定各组的光密度。根据测得的光密度值, 计算细胞生存率。

2.5 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法测定细胞中的 Cu^{+} 浓度及丙酮酸含量^[7]

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种至 96 孔板中, 按“2.3”的方法进行分组和处置, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 取收集好的细胞按约每 2.0×10^6 个细胞加入裂解液 0.2 mL, 混匀后, 冰上裂解 10 min, 在 4 $^\circ\text{C}$ 下, 以 $1.4 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 按照相对应的试剂盒说明书进行操作, 用细胞铜比色法测试盒检测铜离子含量, 用丙酮酸检测试剂盒检测丙酮酸含量。

2.6 罗丹明 123 法检测细胞中线粒体膜电位表达^[8]

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于底

部置有圆形玻璃爬片的 24 孔板中, 按“2.3”的方法进行分组和处置, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h, 用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 冲洗, 将罗丹明 123 ($1\ 000 \times$) 与染色缓冲液按 1:1 000 的比例, 每孔 200 μL 加入细胞孔里, 培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 抗荧光淬灭封片液后, 在荧光显微镜下观察。

2.7 二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (2', 7' - Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 法检测细胞中 ROS 表达情况^[9]

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于底部置有圆形玻璃爬片的 24 孔板中, 按“2.3”的方法进行分组和处置, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h, 用 PBS 冲洗, 按照 1:1 000 的比例用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 加入细胞孔中, 每孔 200 μL 烘箱 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 抗荧光淬灭封片液后, 在荧光显微镜下观察。

2.8 免疫荧光法测定细胞内 AT8、FDX1、SLC31A1 和 ATP7B 蛋白的表达情况^[10]

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于底部置有圆形玻璃爬片的 24 孔板中, 按“2.3”的方法进行分组和处置, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h, 用 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 加入 Triton X-100 通透液, 室温封闭, 加入一抗 4 $^\circ\text{C}$ 过夜, 避光加入荧光二抗, 加入 DAPI 室温染色, 抗荧光淬灭液封片, 在荧光显微镜下观察。

2.9 蛋白质印迹法测定细胞内 MPC、NeuN、Tau、AT8、抗氧化系统相关蛋白 (GPX4、x-CT) 和铜死亡相关蛋白 (SLC31A1、FDX1、LIAS、DLAT、HSP70) 的表达水平^[7]

调整细胞密度为 $1.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 6 孔板中, 按“2.3”的方法进行分组和处置, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h, 收集细胞, 提取细胞总蛋白, 定量, 每孔加入总蛋白 20 μg 进行电泳, 湿转法转膜, 全程冰浴, 室温封闭后, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育一抗过夜, 滴加 ECL 发光液进行曝光成像, 用 Image J 软件分析条带灰度值。

3 统计学处理

用 IBM SPSS Statistics 27 以及 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态且方差齐时, 用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 非正态分布或方差不等时, 则用非参数检验。

结 果

1 UK-5099 对 OA 致 SH-SY5Y 细胞 AD 模型的生存率的影响

实验组给予 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 UK-5099 溶液 + $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OA 溶液处理; 对照组给予完全培养

液处理;模型组给予 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 OA 溶液 + 完全培养液处理。

实验组、模型组和对照组的细胞生存率分别为 $(98.38 \pm 1.45)\%$ 、 $(82.07 \pm 1.32)\%$ 和 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 。模型组的细胞生存率与实验组和对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2 UK-5099 对 OA 致 SH-SY5Y 细胞 AD 模型中 Cu^{+} 浓度和丙酮酸含量的影响

实验组、模型组和对照组的 Cu^{+} 浓度分别为 (0.36 ± 0.01) 、 (0.90 ± 0.05) 和 $(0.23 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot \text{g prot}^{-1}$, 丙酮酸含量分别为 (0.55 ± 0.04) 、 (0.33 ± 0.03) 和 $(0.44 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot 10^8 \text{ cell}^{-1}$ 。模型组的 Cu^{+} 浓度和丙酮酸含量与实验组和对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 UK-5099 对 OA 致 SH-SY5Y 细胞 AD 模型中线粒体膜电位表达的影响

模型组与对照组相比,绿色荧光较弱;实验组与模型组相比,绿色荧光增强。实验组、模型组和对照组的平均荧光强度分别为 63.21 ± 11.87 、 21.76 ± 0.42 和 84.20 ± 10.37 。模型组的平均荧光强度与实验组和对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

4 UK-5099 对 OA 致 SH-SY5Y 细胞 AD 模型中 AT8、FDX1、SLC31A1 和 ATP7B 蛋白的表达的影响

免疫荧光染色结果显示:AT8 主要表达于细胞质中,呈绿色荧光,FDX1 主要表达于细胞质中,呈红色荧光,故对 AT8/FDX1 进行细胞的共定位染色;由于 SLC31A1 和 ATP7B 均在细胞膜上表达,且呈绿色荧光,故两者均进行单染。

模型组与对照组相比,AT8/FDX1 和 SLC31A1 阳性表达水平均明显增加且荧光着色强,ATP7B 阳性表达水平明显降低且荧光着色弱($P < 0.05$, $P < 0.01$);实验组与模型组相比,AT8/FDX1 和 SLC31A1 阳性表达水平均明显减少且荧光着色弱,ATP7B 阳性表达水平明显增加且荧光着色强(均 $P < 0.01$)。结果见表 1。

5 UK-5099 对 OA 致 SH-SY5Y 细胞 AD 模型中相关蛋白的表达的影响

如表 2 和图 1 所示:模型组与对照组相比,细胞中 MPC1、MPC2、Tau、AT8、SLC31A1、FDX1、LIAS、DLAT 和 HSP70 蛋白相对表达水平均显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),GPX4、X-CT、NeuN、ATP7B 和 DPYD 蛋白相对表达水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$)。实验组与模型组相比,细胞中 MPC1、

表 1 各组细胞中丝氨酸 202/苏氨酸 205 位点磷酸化 Tau(AT8)、铁氧还蛋白 1(FDX1)、铜转运蛋白 1(SLC31A1)和腺苷三磷酸酶铜转运 B(ATP7B)表达情况的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the expression of serine 202 / threonine 205 phosphorylation site (AT8), ferredoxin 1 (FDX1), solute carrier family 31 (copper transporters), member 1 (SLC31A1) and Cu-translocating beta polypeptide 7B (ATP7B) in all groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	AT8	FDX1	SLC31A1	ATP7B
Control	6	72.57 ± 19.81	79.18 ± 8.06	74.51 ± 1.19	118.17 ± 12.81
Model	6	$125.02 \pm 14.43^{\#}$	$147.83 \pm 18.63^{##}$	$120.12 \pm 20.92^{\#}$	$61.88 \pm 5.82^{##}$
Experimental	6	$91.46 \pm 14.53^{**}$	$98.93 \pm 7.40^{**}$	$79.19 \pm 10.63^{**}$	$80.55 \pm 2.24^{**}$

Control group: Complete medium; Model group: $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ okadaic acid (OA); Experimental group: $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA + $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ UK-5099; Compared with control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; Compared with model group, $^{**}P < 0.01$.

表 2 各组细胞中蛋白表达情况的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of protein expression in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	MPC1	MPC2	GPX4	X-CT	NeuN	Tau	AT8
Control	0.55 ± 0.13	0.43 ± 0.07	1.02 ± 0.11	1.07 ± 0.16	1.38 ± 0.09	0.71 ± 0.03	0.59 ± 0.14
Model	$1.01 \pm 0.14^{\#}$	$1.31 \pm 0.07^{##}$	$0.54 \pm 0.06^{##}$	$0.41 \pm 0.14^{##}$	$0.86 \pm 0.09^{##}$	$1.21 \pm 0.22^{\#}$	$1.33 \pm 0.18^{\#}$
Experimental	$0.59 \pm 0.11^{*}$	$0.54 \pm 0.05^{**}$	$0.74 \pm 0.04^{**}$	$0.91 \pm 0.08^{**}$	$1.28 \pm 0.11^{**}$	$0.72 \pm 0.15^{**}$	$0.63 \pm 0.09^{*}$
Group	SLC31A1	FDX1	LIAS	DLAT	HSP70	ATP7B	DPYD
Control	0.54 ± 0.02	0.32 ± 0.10	0.62 ± 0.08	0.53 ± 0.14	0.86 ± 0.08	0.95 ± 0.02	1.05 ± 0.11
Model	$1.07 \pm 0.12^{##}$	$1.17 \pm 0.09^{\#}$	$1.31 \pm 0.14^{\#}$	$0.92 \pm 0.07^{\#}$	$1.29 \pm 0.07^{##}$	$0.39 \pm 0.03^{###}$	$0.36 \pm 0.02^{###}$
Experimental	$0.50 \pm 0.05^{**}$	$0.53 \pm 0.25^{*}$	$0.92 \pm 0.09^{**}$	$0.72 \pm 0.04^{*}$	$0.90 \pm 0.05^{**}$	$0.77 \pm 0.05^{***}$	$0.71 \pm 0.03^{***}$

MPC: Mitochondrial pyruvate carrier; GPX4: Glutathione peroxidase 4; NeuN: Neuron-specific nuclear protein; AT8: Serine 202/threonine 205 phosphorylation site; LIAS: Lipoic acid synthetase; DLAT: Dihydrolipoyl transacetylase; HSP70: Heat shock protein 70; ATP7B: Cu-translocating beta polypeptide 7B; DPYD: Dihydropyrimidine dehydrogenase; Dose and n refer to table 1; Compared with control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$; Compared with model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

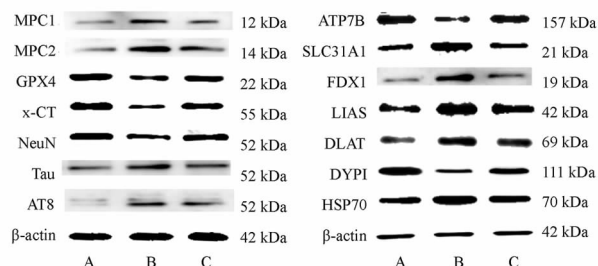


图1 用蛋白质印迹法测定各组细胞中的蛋白表达情况

Figure 1 The protein expression in each group was determined by Western blot assay

A: Control group; B: Model group; C: Experimental group.

MPC2、Tau、AT8、SLC31A1、FDX1、LIAS、DLAT 和 HSP70 蛋白相对表达水平均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), GPX4、x-CT、NeuN、ATP7B 和 DPYD 蛋白相对表达水平均显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

6 UK-5099 对 OA 致 SH-SY5Y 细胞 AD 模型中 ROS 的表达影响

模型组与对照组相比,表现为较强的绿色荧光;实验组与模型组相比,绿色荧光减弱。实验组、模型组和对照组的平均荧光强度分别为 129.17 ± 3.79 、 176.08 ± 15.90 和 34.54 ± 6.57 。模型组的平均荧光强度与实验组和对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

讨 论

关于 AD 脑内神经细胞死亡方式的研究主要还是围绕着凋亡、坏死和自噬。铜死亡作为体内一种与 TCA 循环有关的细胞死亡方式,在 AD 研究中是很有价值的,抑制铜死亡可能具有神经细胞保护作用,而目前对于铜死亡与 AD 的相关研究数量非常有限。研究发现,AD 模型小鼠脑内 Cu^{+} 含量增加, Tau 蛋白过度磷酸化,神经元出现死亡^[11],但是否为铜死亡,尚不明确。

Tau 蛋白过度磷酸化作为 AD 的一个重要病理改变,不仅会降低微管稳定性,损伤轴突运输,而且磷酸化 Tau 蛋白氨基末端与神经元线粒体相连,可以导致线粒体功能异常和突触损伤^[12-13]。SH-SY5Y 细胞系被广泛应用于 AD 的 Tau 病理相关生物研究^[14]。OA 作为一种海洋生物毒素,可选择性抑制蛋白磷酸酯酶,使 Tau 蛋白过度磷酸化,并可引起氧化损伤。有多项研究表明,OA 可致 SH-SY5Y 细胞 Tau 蛋白过度磷酸化,造成 SH-SY5Y 细胞 AD 模型^[15-16]。因此,本实验选用 OA 孵育 SH-SY5Y 细胞制备 AD 细

胞模型。结果表明, $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA 可以降低 SH-SY5Y 细胞生存率,具有细胞损伤作用;为了进一步考察 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA 是否诱导 SH-SY5Y 细胞发生了 Tau 蛋白过度磷酸化,本课题组考察了 SH-SY5Y 细胞内的 Tau 以及 AT8 的表达情况,结果表明, Tau 及 AT8 蛋白相对表达水平均显著增加。以上结果说明: $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA 作用 SH-SY5Y 细胞可以诱导 Tau 蛋白过度磷酸化,符合 AD 模型制备标准,与文献^[17]研究一致,并且此模型的 Cu^{+} 含量显著增加,可满足本实验要求。

铜死亡是一种以铜离子诱导的,并以线粒体应激所引发的一种细胞死亡形式,主要特征为脂酰化线粒体酶的过度累积和铁-硫簇的蛋白丢失,铜死亡主要在线粒体呼吸过程中发挥重要作用。为了进一步考察 OA 诱导的 SH-SY5Y 细胞模型是否发生了铜死亡,本研究考察了铜死亡的相关指标。FDX1 被认为是重要的铜死亡调节因子,处于蛋白质硫辛酸化的上游,介导 DLAT 脂酰化^[18-19],脂酰化的 DLAT 与 Cu^{+} 结合后,诱导 DLAT 发生聚寡聚化,产生细胞毒性。LIAS 作为硫辛酸蛋白质加工修饰中的重要成分,参与线粒体代谢。FDX1 与 LIAS 共同调控 DLAT 的脂酰化。FDX1 同时还破坏铁硫簇蛋白的稳定性,造成铜死亡发生^[20]。通过免疫荧光、蛋白质印迹等实验手段,本研究发现,铜死亡相关蛋白 FDX1、LIAS 和 DLAT 表达水平均显著增加,DPYD 表达水平显著下降,说明在 OA 诱导的 AD 模型中,神经元的死亡存在铜死亡。

MPC 的主要功能是将细胞质中的丙酮酸转运至线粒体中。丙酮酸作为一种重要的代谢中间体,参与线粒体的 TCA 循环^[21]。因此, MPC 在 TCA 循环中起着关键作用。既然铜死亡与 TCA 循环高度相关,所以抑制 MPC 可考察 AD 模型中神经元细胞铜死亡作用机制。UK-5099 作为 MPC 的抑制药,在本实验中得到应用。NeuN 是一种神经元特异性的核抗原,能够标记成熟的神经元,常被用于直接评估神经元的死亡^[22]。本研究发现,与模型组相比, UK-5099 可以增加 NeuN 表达水平,降低丙酮酸含量及 MPC 表达水平,说明抑制 MPC 表达可以限制丙酮酸进入线粒体,降低神经元发生铜死亡。

本研究发现,在 OA 诱导 SH-SY5Y 细胞制备 AD 模型中, Tau 蛋白过度磷酸化,神经元发生铜死亡,用 UK-5099 抑制铜死亡路径中的 MPC, Tau 蛋白过度磷酸化降低,铜死亡相关蛋白表达减少,说明抑制线粒体丙酮酸载体可减轻 AD 模型神经元铜死亡。但本

研究仍需要进一步的实验验证,如在 SH-SY5Y 细胞模型瞬时转染 MPC 基因,或在 p301s 模型小鼠侧脑室注射 pLenti-U6-shRNA(MPC),以此确证本实验结论。

参考文献:

- [1] ZHENG Q, WANG X. Alzheimer's disease: Insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy [J]. *Protein Cell*, 2025, 16(2): 83—120.
- [2] SABALIC A, MEI V, SOLINAS G, et al. The role of copper in Alzheimer's disease etiopathogenesis: An updated systematic review [J]. *Toxics*, 2024, 12(10): 755.
- [3] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Sci*, 2022, 375(6586): 1254—1261.
- [4] VOSS K, HARRIS C, RALLE M, et al. Modulation of tau phosphorylation by environmental copper [J]. *Transl Neurodegener*, 2014, 3(1): 24.
- [5] CARDOSO S, CARVALHO C, CORREIA S C, et al. Protective effects of 2,4-dinitrophenol in okadaic acid-induced cellular model of Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(6): 167222.
- [6] RUAN Y, ZHU X, SHEN J, et al. Mechanism of nicotiflorin in San-Ye-Qing rhizome for anti-inflammatory effect in ulcerative colitis [J/OL]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155564. 2024-03-22 [2024-11-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38554577/>.
- [7] 杜宇峰,王颖新,陈煌辉,等. 吡非尼酮对慢性非细菌性前列腺炎大鼠的作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(19): 2858—2863.
- [8] YAN S, YU L, CHEN Z, et al. ZBP1 promotes hepatocyte pyroptosis in acute liver injury by regulating the PGAM5/ROS pathway [J]. *Ann Hepatol*, 2024, 29(4): 101475.
- [9] ALASMARI A. Achillea fragrantissima (Forssk.) Sch. Bip instigates the ROS/FADD/c-PARP expression that triggers apoptosis in breast cancer cell (MCF-7) [J/OL]. *PLoS One*, 2024, 19(5): e0304072. 2024-05-31 [2024-06-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38820323/>.
- [10] 李莎,楚新歌,邱新茹,等. 安五脂素对氧化应激诱导的海马神经元 HT22 细胞自噬和凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(13): 1865—1868.
- [11] HO T, AHMADI S, KERMAN K. Do glutathione and copper interact to modify Alzheimer's disease pathogenesis [J/OL]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 181: 180—196. 2022-01-25 [2024-11-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35092854/>.
- [12] TORRES A K, RIVERA B I, POLANCO C M, et al. Phosphorylated Tau as a toxic agent in synaptic mitochondria: Implications in aging and Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(8): 1645—1651.
- [13] SINGH M, ALI H, RENUKA JYOTHI S, et al. Tau proteins and senescent cells: Targeting aging pathways in Alzheimer's disease [J/OL]. *Brain Res*, 2024, 1: 1844. 2024-12-01 [2024-12-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39155034/>.
- [14] GABRIELLI A P, NOVIKOVA L, RANJAN A, et al. Inhibiting mtDNA transcript translation alters Alzheimer's disease-associated biology [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(12): 8429—8443.
- [15] GONG Y, WANG Y, LI Y, et al. Curculigoside, a traditional Chinese medicine monomer, ameliorates oxidative stress in Alzheimer's disease mouse model via suppressing ferroptosis [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(5): 2462—2481.
- [16] DE MEDEIROS L M, DE BASTIANI M A, RICO E P, et al. Cholinergic differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and its potential use as an in vitro model for Alzheimer's disease studies [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(11): 7355—7367.
- [17] DENG J, LIU B, TAO Q, et al. The co-oligomers of Aβ42 and human islet amyloid polypeptide exacerbate neurotoxicity and alzheimer-like pathology at cellular level [J/OL]. *Neurosci*, 2024, 547: 37—55. 2024-04-09 [2024-11-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38604526/>.
- [18] TANG D L, CHEN X, KROEMER G. Cuproptosis: A copper-triggered modality of mitochondrial cell death [J]. *Cell Res*, 2022, 32(5): 417—418.
- [19] DREISHPOON M B, BICK N R, PETROVA B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(9): 105046.
- [20] SHABBIR A, REHMAN K, AKASH M S H, et al. Differential neuroprotective effect of curcuminoid formulations in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(45): 67981—67996.
- [21] CEYZERIAT K, BADINA A M, PETRELLI F, et al. Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier in astrocytes reduces amyloid and tau accumulation in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease [J/OL]. *Neurobiol Dis*, 2024, 200: 106623. 2024-10-01 [2024-11-02]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39103022/>.
- [22] ZHU W, LI Y, ZHAO J, et al. The mechanism of triptolide in the treatment of connective tissue disease-related interstitial lung disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 541—552.

(收稿日期 2024-12-09)