FGF21对鱼藤酮导致神经细胞损伤的作用及其机制

陈映洁,高向东,陈 松*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室,南京 211198)

摘 要 采用鱼藤酮诱导SH-SY5Y细胞损伤建立帕金森病样病变细胞模型,探讨成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21,FGF21)对其作用及机制。以不同浓度的FGF21对鱼藤酮诱导的神经细胞损伤模型进行干预,MTT法检测神经细胞活性;采用Annexin V-FITC/PI双染法分析神经细胞凋亡情况;Western blot检测FGF21及鱼藤酮对神经细胞酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)和α-突触核蛋白(α-synuclein,α-syn)表达的影响;采用DCFH-DA荧光探针检测FGF21及鱼藤酮对神经细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平的作用。结果显示:FGF21能够减少鱼藤酮致神经细胞的损伤,抑制神经细胞凋亡,缓解鱼藤酮引起的神经细胞TH和α-syn水平的异常,同时降低神经细胞内异常ROS水平,提示FGF21可能通过调控氧化应激进而缓解鱼藤酮导致的神经细胞损伤。

关键词 成纤维细胞生长因子21;帕金森病;鱼藤酮;细胞凋亡;活性氧

中图分类号 R966 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)06-0718-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200611

引用本文 陈映洁,高向东,陈松.FGF21对鱼藤酮导致神经细胞损伤的作用及其机制[J].中国药科大学学报,2020,51(6):718-723.

Cite this article as: CHEN Yingjie, GAO Xiangdong, CHEN Song. Effects and mechanisms of FGF21 on neuronal damage induced by rotenone[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(6): 718-723.

Effects and mechanisms of FGF21 on neuronal damage induced by rotenone

CHEN Yingjie, GAO Xiangdong, CHEN Song*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract In this study, the SH-SY5Y cell model with Parkinson's disease-like lesions was established by using rotenone, and the effect and mechanism of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on the cell model were explored. Different concentrations of FGF21 were used to treat neuronal injury model induced by rotenone, and cell viabilities were detected by MTT assay. Effects of FGF21 and rotenone on the apoptotic levels of SH-SY5Y cells were analyzed by using Annexin V-FITC detection kit. Western blot was used to assess the effects of FGF21 and rotenone on the protein levels of tyrosine hydroxylase (TH) and α-synuclein (α-syn) in SH-SY5Y cells. Effects of FGF21 and rotenone on reactive oxygen species (ROS) levels in SH-SY5Y cells were tested using DCFH-DA fluorescent probe. The results showed that FGF21 could reduce the damage in SH-SY5Y cells induced by rotenone, inhibit cell apoptosis, alleviate the abnormalities of TH and α-syn in SH-SY5Y cells induced by rotenone and down-regulate the abnormal ROS levels in SH-SY5Y cells. The results suggested that FGF21 may attenuate rotenone-induced neuronal damage through regulation of oxidative stress.

Key words fibroblast growth factor 21; Parkinson's disease; rotenone; apoptosis; reactive oxygen species

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673435, No. 81872850) and the "Double First-Class" University Project (No. CPU2018GF08)

收稿日期 2020-05-13 * **通信作者** Tel:025-86185396 E-mail:ChenS@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81673435,No. 81872850);"双一流"大学资助项目(No. CPU2018GF08)

帕金森病（Parkinson's disease，PD）是最常见的神经退行性疾病之一，临床主要表现为运动迟缓、静止性震颤、肌强直和姿势反射障碍等症状[1]。PD 主要病理特征包括黑质致密部多巴胺能神经元死亡和减少[1-2]以及异常聚集 α-突触核蛋白（α-synuclein，α-syn）形成的路易小体等[3]。随着人口老龄化和全球人均预期寿命的延长，PD 患病人数逐年上升。PD 具体发病机制目前尚无定论，其复杂性伴随着临床挑战，因此，PD 的发病机制和治疗方案受到研究者们的广泛关注。

研究表明，神经退行性疾病与糖尿病之间存在关联[4-5]，从糖脂代谢调节分子中寻求神经退行性疾病的防治药物可能是有效研究策略。成纤维细胞生长因子 21（fibroblast growth factor 21，FGF21）是成纤维细胞生长因子家族的一员，其作为代谢调控的研究热点之一，在糖尿病相关疾病治疗中具有一定的潜力。有文献报道，情绪稳定剂锂和丙戊酸可能通过 FGF21 发挥协同神经保护作用，FGF21 可能成为治疗中枢神经系统疾病的先导分子[6]。已有研究表明 FGF21 可以保护动物大脑抵抗 D-半乳糖[7]和 $A\beta_{25-35}$[8]的影响，提示 FGF21[8-9]可能在神经退行性疾病中发挥一定的潜在作用。然而，FGF21 在 PD 中具体作用及机制尚有待进一步深入研究。

本研究采用鱼藤酮建立 PD 样损伤神经细胞模型，考察在该模型下 FGF21 对神经细胞的细胞活性和细胞凋亡、酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）和 α-syn 变化、以及胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平的影响，在细胞水平上探讨 FGF21 对鱼藤酮导致 PD 样神经细胞损伤的保护作用及机制。

1　材　料

1.1　试　剂

FGF21（纯度：95.66%，实验室制备）；鱼藤酮（纯度：98.12%，美国 MCE 公司）；ROS 检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒（中国碧云天生物技术研究所）；胰蛋白酶、MTT（中国 Biosharp 公司）；DMEM 高糖培养基、胎牛血清（美国 Gibco 公司）；蛋白酶抑制剂、Marker（美国 Thermo 公司）；PVDF 膜（美国 Millipore 公司）；β-actin 抗体（中国 Abclonal 公司）；TH 抗体，α-syn 抗体，羊抗兔 IgG，羊抗鼠 IgG（美国 Cell Signaling Technology 公司）；其他试剂均为国产分析纯。

1.2　仪　器

高速冷冻离心机、全波长酶标仪（美国 Thermo 公司）；电泳仪、转膜仪（美国 Bio-Rad 公司）；多功能凝胶成像系统（中国 Tanon 公司）；流式细胞仪（美国 BD 公司）。

1.3　细　胞

SH-SY5Y 细胞株购自美国菌种保藏中心（ATCC）。

2　方　法

2.1　细胞培养

SH-SY5Y 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，放置于 37 ℃含有 5% CO_2 的细胞培养箱中 3~4 d，待生长到约 80% 时进行传代。

2.2　鱼藤酮致 SH-SY5Y 细胞损伤模型建立[10]

收集密度为每毫升 5×10^4 个的 SH-SY5Y 细胞悬液，以每孔 100 μL 铺在 96 孔细胞板内，铺板时注意充分混匀。10 h 后以梯度浓度 0.8，0.4，0.2，0.1，0.05 ，0.025 μmol/L 的鱼藤酮孵育 SH-SY5Y 细胞 24 h，MTT 法检测细胞活性：每孔加入 MTT 10 μL，37 ℃放置 4 h，吸去培养基，各孔加入 DMSO 150 μL 并放于摇床震摇 10 min 使结晶物充分溶解，设置酶标仪参数为 570 nm 为检测波长，630 nm 为参比波长，检测各孔内吸收度。

2.3　FGF21 对鱼藤酮致 SH-SY5Y 细胞损伤的干预作用

状态良好的 SH-SY5Y 细胞铺于 96 孔板，在细胞培养箱中培养 10 h 后，选取 0.1 μmol/L 鱼藤酮作为造模浓度，同时选用浓度为 5，1，0.2，0.04，0.008 μmol/L 的 FGF21 干预细胞 24 h 后，MTT 法检测各组细胞活性。

2.4　FGF21 及鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

收集状态良好的 SH-SY5Y 细胞，以每毫升 5×10^4 个细胞的密度，每孔 1 mL 铺于 6 孔板，选取 0.1 μmol/L 鱼藤酮作为造模浓度，5 μmol/L FGF21 作为给药浓度，实验分为空白组、模型组和给药组，共孵育 24 h 后，采用 Annexin V-FITC/PI 双染法结合流式检测 SH-SY5Y 细胞凋亡情况。实验步

骤:收集每组细胞培养液于EP管内,用预冷的PBS洗涤细胞3次,用胰酶消化并于显微镜下观察细胞形态,当大部分细胞间隙变大立即用收集的细胞培养液轻轻吹打对应的各组细胞收集到EP管中,1 000 r/min离心5 min,弃除上清液,PBS重悬细胞计数。每个EP管中加入Annexin V-FITC结合液195 μL与细胞充分混匀,并加入Annexin V-FITC染色液5 μL和PI染色液10 μL,上下颠倒轻轻混匀。室温避光孵育20 min,上机前重悬细胞,检测各组荧光值,各组细胞避光放于冰上并于1 h内完成检测。

2.5 FGF21及鱼藤酮对SH-SY5Y细胞TH和α-syn表达量的影响

细胞铺板及给药干预实验步骤见"2.4"项。共孵育24 h后,提取细胞总蛋白,Western blot检测各实验组TH和α-syn蛋白水平变化。实验步骤:使用预冷的PBS洗涤细胞2次,加入RIPA裂解液(按1∶200加入蛋白酶抑制剂),细胞板置于冰上,细胞刮刀轻轻刮取细胞收集于EP管中,涡旋仪每隔3 min充分振荡裂解30 min,然后在4 ℃条件下以12 000 r/min离心15 min取上清液即为细胞总蛋白,蛋白制样后进行SDS-PAGE电泳,湿转恒流转膜40 min,转膜后的PVDF膜以5%脱脂奶粉封闭2 h,TBST洗涤3次,每次10 min,孵育一抗放置于摇床上4 ℃过夜,TBST洗涤后放置于摇床上常温孵育二抗2 h,洗涤、化学发光显色成像,检测目的蛋白变化。

2.6 FGF21及鱼藤酮对SH-SY5Y细胞内ROS生成水平的影响

细胞铺板及给药干预实验步骤见"2.4"项。共孵育24 h后,采用DCFH-DA探针结合流式检测SH-SY5Y细胞内ROS水平。实验步骤:以无血清DMEM高糖培养基稀释DCFH-DA溶液使其终浓度为10 μmol/L并避光保存;轻轻吸去6孔板内培养基,用胰酶消化并于显微镜下观察细胞形态,当大部分细胞间隙变大立即用DMEM高糖培养基将细胞轻轻吹打并收集在EP管内,1 500 r/min离心5 min,弃培养基,每管加入已稀释的DCFH-DA溶液1 mL,重悬细胞,37 ℃避光孵育20 min,1 500 r/min离心5 min收集细胞,用无血清DMEM高糖培养基洗涤3次,流式细胞仪检测各组细胞荧光强度。

2.7 统计分析

实验结果采用GraphPad分析软件进行统计分析,以$\bar{x} \pm s$表示,One-way ANOVA检验进行组间比较,$P < 0.05$时表明差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 鱼藤酮致SH-SY5Y细胞损伤模型建立

以不同浓度鱼藤酮损伤SH-SY5Y细胞后,MTT法检测细胞活性。结果如图1所示,鱼藤酮对SH-SY5Y细胞活性损伤呈现一定的浓度依赖性。当0.1 μmol/L鱼藤酮作用于SH-SY5Y细胞24 h时,与对照组比,细胞损伤率约为30%,选取该浓度为鱼藤酮的造模浓度。

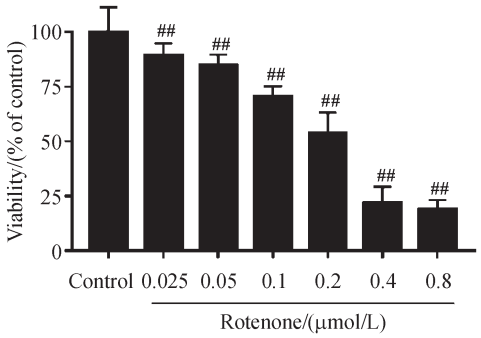

Figure 1 Effects of different concentrations of rotenone on SH-SY5Y cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$P<0.01$ *vs* control group

3.2 FGF21对鱼藤酮致SH-SY5Y细胞损伤的干预作用

根据"3.1"项实验结果,选用0.1 μmol/L鱼藤酮损伤SH-SY5Y细胞,分别与梯度浓度FGF21孵育24 h后,MTT检测细胞活性。结果如图2所示,鱼藤酮模型组与对照组相比细胞活性下降;给药FGF21后,与模型组相比,给药组细胞活性增加,且呈现一定的剂量依赖性。

3.3 FGF21及鱼藤酮对SH-SY5Y细胞凋亡的影响

采用鱼藤酮对神经细胞损伤并进行FGF21干预,Annexin V-FITC/PI双染法检测神经细胞凋亡情况。流式检测结果如图3所示,与对照组比较,模型组细胞凋亡比例显著升高,FGF21给药组其细胞凋亡比例显著少于模型组,说明FGF21对鱼藤酮导致的神经细胞异常凋亡具有一定干预作用,并对神经细胞发挥保护作用。

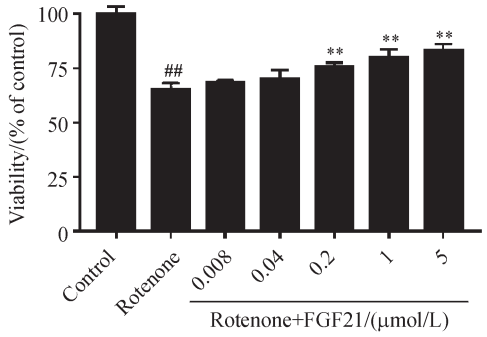

Figure 2　Protective effects of FGF21 against rotenone-induced toxicity on SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

##P<0. 01 *vs* control group;** P<0. 01 *vs* rotenone group

3. 4　FGF21 及鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞 TH 和 α-syn 表达量的影响

用 0. 1 μmol/L 鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞损伤造模，采用 5 μmol/L FGF21 进行干预，Western blot 检测各实验组细胞 TH 和 α-syn 的表达量。结果如图 4 所示，与对照组相比，鱼藤酮损伤后细胞 TH 水平下降，α-syn 水平升高；而 FGF21 能一定程度上缓解模型组中 TH 和 α-syn 的表达量的异常。说明 FGF21 能缓解鱼藤酮导致的神经细胞 PD 样病理改变。

3. 5　FGF21 及鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞内 ROS 生成水平的影响

采用鱼藤酮对神经细胞损伤并进行 FGF21 干预，DCFH-DA 探针法检测细胞内 ROS 水平。结果如图 5 所示，与对照组相比，鱼藤酮损伤后细胞内 ROS 显著增加，而 FGF21 给药组与模型组相比 ROS 显著降低，说明 FGF21 可缓解鱼藤酮引起的神经细胞内 ROS 水平异常，对细胞发挥了一定的抵抗氧化损伤的作用。

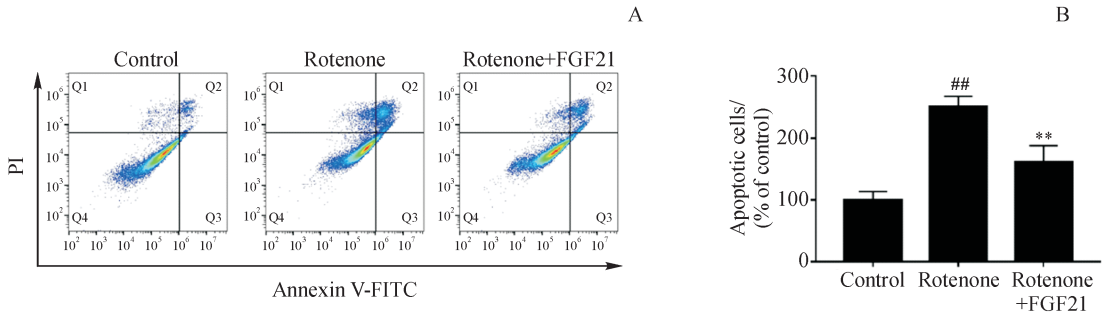

Figure 3　Effects of FGF21 and rotenone on the apoptotic levels of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A:Analysis of apoptotic levels in SH-SY5Y cells by flow cytometry;B:Quantification of apoptotic levels

P<0. 01 *vs* control group;** P<0. 01 *vs* rotenone group

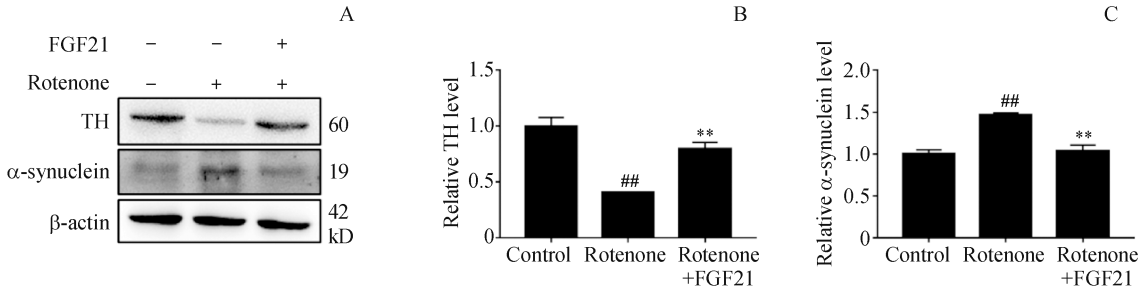

Figure 4　Effects of FGF21 and rotenone on the protein levels of TH and α-syn in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A:Detection of protein levels of TH and α-syn by Western blot;B:Quantitative analysis of protein levels of TH;C:Quantitative analysis of protein levels of α-syn

P<0. 01 *vs* control group;** P<0. 01 *vs* rotenone group

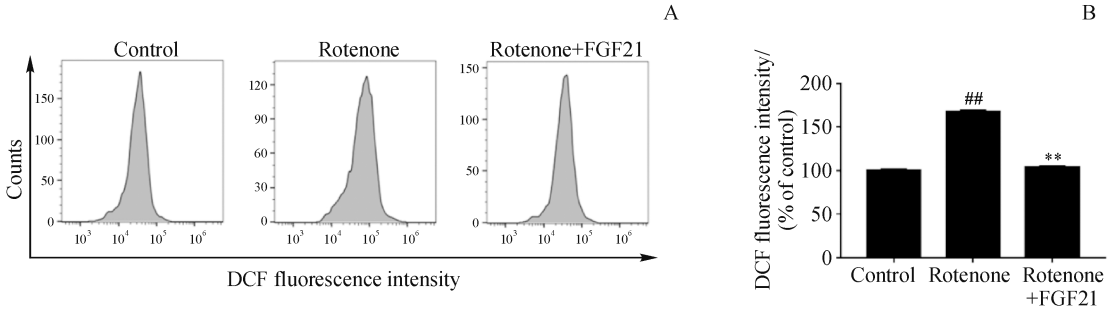

Figure 5 Effects of FGF21 and rotenone on the ROS levels in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A:Analysis of ROS levels in SH-SY5Y cells by flow cytometry;B:Quantification of ROS levels

$^{\#\#}P<0.01$ *vs* control group;$^{**}P<0.01$ *vs* rotenone group

4 讨 论

PD是世界第二大神经退行性疾病,仅次于阿尔茨海默病,其发病机制复杂,目前尚无定论,缺乏有效的治愈手段,使得大量研究寻求新的治疗思路与治疗靶标。研究表明FGF21能以简单扩散的方式通过血脑屏障[11],并且FGF21相关的受体系统在中枢神经系统中有表达[12],这为FGF21在神经系统疾病中发挥作用提供了前提。近年来,FGF21在中枢神经系统中发挥的生物学作用引起了研究者极大的关注[13-14]。体外研究发现FGF21能够增加线粒体呼吸链活性从而发挥对多巴胺能神经元的保护作用[15]。然而,FGF21在PD中具体作用及分子机制尚有待进一步研究。本研究采用鱼藤酮建立神经细胞PD样损伤模型,探索FGF21对神经细胞活性的影响,结果表明FGF21能够降低鱼藤酮所导致的神经细胞损伤,减少神经细胞凋亡。说明FGF21对PD样细胞模型发挥了一定的保护作用。

PD发病机制复杂,其中氧化应激在PD发生机制中备受关注。越来越多的研究表明氧化应激异常和线粒体功能障碍会引起中枢神经系统紊乱以及多巴胺能神经元退化和死亡[16-19]。PD相关基因如*SNCA*/α-*syn*,*Parkin*,*LRRK2*等的突变与帕金森病风险增加有关,且这些基因的突变在一定条件下会对线粒体产生重要影响,而线粒体功能的受损则会导致氧化应激异常[20]。导致PD发生的几种神经毒素如1-甲基-4-苯基-1,2,3,6四氢吡啶,6-羟基多巴胺,百草枯和鱼藤酮等对线粒体复合体Ⅰ发挥抑制作用,抑制ATP产生,阻断细胞内ATP参与的过程,产生大量自由基,从而导致氧化应激异常[21]。鱼藤酮可能导致氧化应激异常以及SH-SY5Y神经细胞TH和α-syn相关PD样病变[22-23]。大量研究表明,氧化应激调控策略在缓解神经退行性疾病及保护神经细胞中可能具备一定的潜力[8,24-26]。本研究发现FGF21可改善鱼藤酮导致的神经细胞内ROS水平异常,对PD相关的神经细胞损伤能发挥一定的保护作用,同时FGF21可缓解鱼藤酮引起的TH和α-syn异常;说明在PD相关的神经细胞损伤中,FGF21可能通过调节ROS相关途径从而改善神经细胞PD样病变,揭示了FGF21通过调控氧化应激进而发挥神经细胞保护作用。本研究为FGF21防治PD的作用及机制研究提供了实验基础,为PD药物研发新思路提供了实验依据。FGF21作为潜在药物分子,其成药性还有待进一步研究;FGF21在PD等神经退行性疾病中发挥作用的具体分子机制也还需深入探究。

参 考 文 献

[1] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, *et al*. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2000, **3**(12): 1301-1306.

[2] Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, **12**(6): 359-366.

[3] Braak H, Del Tredici K, Rüb U, *et al*. Staging of brain pathology related to sporPDic Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2003, **24**(2): 197-211.

[4] Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus[J]. *J Mol Med*, 2004, **82**(8): 510-529.

[5] Moran C, Beare R, Wang W, *et al*. Type 2 diabetes mellitus, brain atrophy, and cognitive decline[J]. *Neurology*, 2019, **92**(8): e823-e830.

[6] Leng Y, Wang Z, Tsai LK, *et al*. FGF-21, a novel metabolic regulator, has a robust neuroprotective role and is dramatically elevated in neurons by mood stabilizers[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, **20**(2): 215–223.

[7] Yu Y, Bai F, Wang W, *et al*. Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, **133**: 122–131.

[8] Chen S, Chen ST, Sun Y, *et al*. Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease[J]. *Redox Biol*, 2019, **22**: 101133.

[9] Yin J, Bao LC, Tian H, *et al*. Genetic fusion of human FGF21 to a synthetic polypeptide improves pharmacokinetics and pharmacodynamics in a mouse model of obesity[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, **173**(14): 2208–2223.

[10] Venkatesh GV, Rajasankar S, Ramkumar M, *et al*. Agaricus blazei extract attenuates rotenone-induced apoptosis through its mitochondrial protective and antioxidant properties in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. *Nutr Neurosci*, 2018, **21**(2): 97–107.

[11] Hsuchou H, Pan W, Kastin AJ. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood[J]. *Peptides*, 2007, **28**(12): 2382–2386.

[12] Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, *et al*. Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, **24**(10): 2050–2064.

[13] Bookout AL, De Groot MH, Owen BM, *et al*. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system[J]. *Nat Med*, 2013, **19**(9): 1147–1152.

[14] Sun Y, Gao XD, Chen S. Effect and mechanism of FGF21 on astrocyte damage induced by $A\beta_{25-35}$[J]. *J China Pharm Univ*（中国药科大学学报）, 2019, **50**(4): 490–496.

[15] MäKelä J, Tselykh TV, Maiorana F, *et al*. Fibroblast growth factor-21 enhances mitochondrial functions and increases the activity of PGC-1α in human dopaminergic neurons via Sirtuin-1[J]. *Springer Plus*, 2014, **3**(1): 2.

[16] Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2011, **26**(6): 1049–1055.

[17] Zhu J, Chu CT. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, **20**: S325–334.

[18] Jenner P, Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease[J]. *Neurology*, 2006, **66**(10 Suppl 4): S24–36.

[19] Parker WD Jr, Parks JK, Swerdlow RH. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex[J]. *Brain Res*, 2008, **1189**: 215–218.

[20] Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson's disease pathogenesis[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2008, **4**(11): 600–609.

[21] Gandhi S, Wood NW. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, **14**(18): 2749–2755.

[22] Sun C, Mo M, Wang Y, *et al*. Activation of the immunoproteasome protects SH-SY5Y cells from the toxicity of rotenone[J]. *Neurotoxicology*, 2019, **73**: 112–119.

[23] Ramalingam M, Huh YJ, Lee YI. The impairments of α-synuclein and mechanistic target of rapamycin in rotenone-induced SH-SY5Y cells and mice model of Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2019, **13**: 1028.

[24] Yun HM, Jin P, Park KR, *et al*. Thiacremonone potentiates antioxidant effects to improve memory dysfunction in an APP/PS1 transgenic mice model[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, **53**(4): 2409–2420.

[25] Chattopadhyaya I, Gupta S, Mohammed A, *et al*. Neuroprotective effect of *Spirulina fusiform* and amantadine in the 6-OHDA induced Parkinsonism in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, **15**: 296.

[26] Alghamdi BSA. Possible prophylactic anti-excitotoxic and antioxidant effects of virgin coconut oil on aluminium chloride-induced Alzheimer's in rat models[J]. *J Integr Neurosci*, 2018, **17**(3/4): 593–607.