

## EPA/DHA 型磷脂酰胆碱对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

葛丽君<sup>1</sup>, 卢蔚波<sup>1</sup>, 简士凯<sup>1</sup>, 郑慧敏<sup>1</sup>, 薛静<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江工商大学海洋食品研究院 杭州 310012

<sup>2</sup>浙江工商大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 杭州 310012)

**摘要** 为探究 EPA/DHA 型磷脂酰胆碱(PC<sub>EPA/DHA</sub>)抗帕金森病(PD)的活性及其机制,采用 MPP<sup>+</sup>诱导 SH-SY5Y 细胞构建 PD 体外模型,分析 PC<sub>EPA/DHA</sub> 干预对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力、细胞形态及活性氧(ROS)水平等的影响,并结合转录组学技术筛选关键基因及通路。结果表明:1)PD 造模的最佳条件为 600 μmol/L MPP<sup>+</sup>处理 SH-SY5Y 细胞 24 h,PD 模型组细胞相对活力下降(53.71 ± 3.21)%;2)PC<sub>EPA/DHA</sub> 可剂量依赖性增强 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力,改善细胞形态和降低细胞氧化应激水平;3)转录组学结果表明:PC<sub>EPA/DHA</sub> 对 MPP<sup>+</sup>诱导 SH-SY5Y 细胞的保护作用与改善线粒体功能障碍,改善多巴胺和突触核蛋白相关功能以及抑制细胞凋亡等密切相关。

**关键词** EPA/DHA 型磷脂酰胆碱; 帕金森病; 氧化应激; 转录组学

文章编号 1009-7848(2024)05-0138-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.05.010

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是最常见的运动障碍疾病,是仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的第二大中枢神经系统退行性疾病<sup>[1]</sup>。帕金森病是一种慢性、进行性、多系统衰老的神经退行性疾病,主要症状包括运动迟缓、静止性震颤、僵硬和姿势不稳等运动症状,以及嗅觉缺陷、胃肠道功能障碍、自主神经不稳定等非运动症状<sup>[2-3]</sup>。由于人口老龄化的加快和缺乏神经保护疗法,因此 PD 患者数量持续增加,预计 2030 年我国患病人数将达 494 万,将对我国医疗系统和社会经济造成极大的负担<sup>[4-5]</sup>。最新研究表明,磷脂形式的二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)较乙酯和甘油酯形式等具有更好的生物利用度和生物安全性<sup>[6-7]</sup>,且已被证实具有改善大脑功能,调节血脂代谢和抵抗炎症等多种生理功效,对 AD 和 PD 等神经退行性疾病具有积极的改善作用<sup>[8-10]</sup>。Zhou 等<sup>[11]</sup>研究表明,EPA 型磷脂可通过降低微管相关蛋白 tau 的过度磷酸化和抑制 β 淀粉样肽的生成和积累来改善 SAMP8 小鼠的

记忆和认知功能。

现有研究大多采用直接提取的天然磷脂混合物,而未对其中具体磷脂亚类或分子所执行的功能进行研究,且研究大多仅关注少数基因和个别通路,或缺少体内、体外试验作为对照,具体的调控机制尚待深入研究。作为海洋磷脂的重要组成部分,富含 EPA/DHA 的磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC)不仅具备功能性脂肪酸 EPA 和 DHA 所具有的生理功能,还具有磷脂高生物利用度和脑摄取率的优势,同时含有重要的大脑营养素胆碱。众所周知,南极磷虾油中含有丰富的磷脂,课题组前期采用鸟枪法对南极磷虾磷脂进行分子鉴定,结果表明,南极磷虾油中含有丰富的磷脂,其中以 PC 居多,其主要分子类型包括 PC C16:0/C18:1、PC C16:0/C20:5、PC C18:1/C20:5、PC C16:0/C22:6、PC C16:0/C16:1、PC O-C16:0/C20:5 和 PC C20:5/C22:6 等<sup>[12]</sup>。本研究选择南极磷虾为试验原料,分离纯化富含 EPA/DHA 的磷脂酰胆碱(PC<sub>EPA/DHA</sub>)。采用 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞构建 PD 体外模型,首先明确 PC<sub>EPA/DHA</sub> 对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用,再结合转录组学技术系统探究其调控机制,以期为海洋源 PD 防治药物的开发提供数据支持。

收稿日期: 2023-05-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0311204)

第一作者: 葛丽君,女,硕士生

通信作者: 薛静 E-mail: 15700070449@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

南极磷虾粉, 辽渔集团有限公司; SH-SY5Y 细胞株(SCSP-5014), 中国科学院干细胞库(上海); MPP<sup>+</sup>碘化物【 $\geq 98\%$ (HPLC)】、二甲基亚砜(DMSO)、Trizol 试剂, 美国 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS), 上海素尔生物科技有限公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素混合液, 北京索莱宝科技有限公司; 磷酸盐缓冲液: 杭州兰堡海博生物技术有限公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇: 国药集团化学试剂有限公司; RNA-free water、PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, Code No. RR047A)、TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus, Code No. RR820Q/A/B), 大连 Takara 生物公司; 活性氧检测试剂盒、增强型 CCK-8 检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 设备与仪器

恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、Fresco 21 型高速冷冻离心机, 美国 Thermo 公司; 恒温金属浴, 杭州博日科技有限公司; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 日本松下电器产业株式会社; 恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司; 漩涡振荡器, 海门其林贝儿仪器制造有限公司; NanoDrop ND-1000 微量紫外-可见分光光度计、Mini Opticon Monitor 3 实时荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 倒置荧光显微镜, 日本尼康株式会社; SpectraMax190 全波长酶标仪, 美国 Molecular devices 公司; Illumina Hiseq 4000 高通量测序仪, 中国因美纳科学器材有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 PC<sub>EPA/DHA</sub> 的制备 南极磷虾粉经 95% 乙醇重复提取 3 次, 无水乙醇复提 2 次, 制得富含 PC 的南极磷虾油, 再加入 20 倍体积冷丙酮(4 °C), 8 000 r/min 离心 10 min 后移去上清, 再使用冷丙酮多次清洗沉淀, 直至上清液澄清无色后, 取沉淀真空脱溶。采用柱层析法对南极磷虾 PC 进行分离纯化, 条件如下: 硅胶颗粒大小为 200~300 目, 上样量为 1 g/50 g 硅胶, 洗脱液 V<sub>二氯甲烷</sub>:V<sub>甲醇</sub>=3:2, 回收 PC 组分并经液相色谱检测纯度达 97.32%, 经气相色谱检测, EPA 和 DHA 的相对含量达

42.88%。

1.3.2 SH-SY5Y 细胞培养 SH-SY5Y 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液 (含有 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素), 在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的恒温 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 视细胞生长情况每 2~3 d 传代 1 次, 传代 3 次后用于后续试验。试验中细胞传代控制在 13 代以内, 取对数期的细胞进行试验。期间采用倒置荧光显微镜对细胞形态进行观察。

#### 1.3.3 试验分组

1.3.3.1 PD 造模浓度的筛选 将细胞接种于 96 孔板, 当 SH-SY5Y 细胞生长密度达 70%~80% 时分组如下: 对照组(不添加 MPP<sup>+</sup>)、MPP<sup>+</sup>试验组和空白组(仅含有培养液, 无细胞), MPP<sup>+</sup>试验组分别加入 150, 300, 450, 600, 1 200 μmol/L MPP<sup>+</sup>。培养 24 h 后进行观察及检测分析, 每组 4 孔作平行。

1.3.3.2 PC<sub>EPA/DHA</sub> 的 功 效 测 定 将 细胞 接 种 于 96 孔板, 当 SH-SY5Y 细胞生长密度达 70%~80% 时分组如下: 1) 对照组: 不添加 MPP<sup>+</sup>和 PC<sub>EPA/DHA</sub>; 2) PD 模型组: MPP<sup>+</sup>; 3~5) PC<sub>EPA/DHA</sub> 干预组: MPP<sup>+</sup>+PC<sub>EPA/DHA</sub>(低、中、高剂量分别为 2, 10, 20 μmol/L); 6) 空白组: 仅含有培养液, 无细胞。MPP<sup>+</sup>(600 μmol/L) 干预前 6 h 向试验组添加不同剂量的 PC<sub>EPA/DHA</sub> 进行预处理, 模型组和对照组加入相同体积溶剂。添加 MPP<sup>+</sup>继续培养 24 h 后进行观察及检测分析。每组 4 孔作为平行。

1.3.3.3 CCK-8 检测细胞增殖活力 按照 1.3.3.2 节进行分组, 培养结束后每孔加入增强型 CCK-8 溶液 20 μL。培养箱继续培养 1.5 h 后于波长 450 nm 处测定吸光值, 并计算细胞活力。细胞相对活力(%)=(A<sub>试验组</sub>-A<sub>空白组</sub>)/(A<sub>对照组</sub>-A<sub>空白组</sub>)×100。每孔检测 3 次。

1.3.4 活性氧 ROS 检测 按照体积比 1:1 000 用无血清培养液稀释 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA), 使终浓度为 10 μmol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。采用荧光酶标仪进行检测, 使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 检测荧光强度并计算活性

氧(ROS)相对水平。ROS 相对水平= $(A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$ 。每孔检测3次。

**1.3.5 细胞中 RNA 提取** 用胰酶消化细胞并重悬于培养液中,2 000×g 离心 5 min,弃上清液后,加入 1 mL Trizol 致使细胞裂解,室温放置 5 min。待反应结束后,于 4 °C 条件下 12 000×g 离心 5 min,弃沉淀。加入 200 μL 氯仿,混合均匀后,室温放置 15 min。待反应结束后,于 4 °C 条件下 12 000×g 离心 15 min,吸取上层水相于新离心管中,并加入 500 μL 异丙醇,混合均匀后,室温放置 5 min。待反应结束后,于 4 °C 条件下 12 000×g 离心 10 min,弃上清液,提取的 RNA 沉于离心管里。加入 1 mL 75%乙醇溶液,轻轻振荡离心管,悬浮 RNA,并于 4 °C 条件下 8 000×g 离心 5 min,弃上清液。室温干燥 10 min 后,加入 50 μL RNA-free water 溶解 RNA 样品,分装后置于-80 °C 备用。

**1.3.6 RNA-Seq 文库构建及测序** 取 5 μg 总 RNA,使用 oligo(dT)磁珠对其进行两轮纯化,对其带有 PolyA 的 mRNA 进行特异性捕获。将富集的 mRNA 在高温条件下利用二价阳离子进行片段化。通过逆转录酶的作用将片段化的 RNA 合成 cDNA。然后使用大肠杆菌 (*E. coli*) DNA polymerase I,与 RNase H 进行二链合成,将这些 DNA 与 RNA 的复合双链转化成 DNA 双链,同时在二链中掺入 DUTP,将双链 DNA 的末端补齐为平末端。再在其两端各加上一个 A 碱基,使其能够与末端带有 T 碱基的接头进行连接,利用磁珠对其片段大小进行筛选和纯化。以 UDG 酶消化二链,再经 PCR 使其形成片段长度为 (300 ± 50)bp 的文库。最后使用 Illumina HiSeq 4000 测序仪按照标准操作对其进行双端测序,读长 150 bp。

**1.3.7 测序数据分析** 使用 Cutadapt 和内部的 perl 脚本去除包含适配器污染、低质量碱基和未确定碱基的 reads。使用 FastQC 验证序列质量,使用 HISAT2 软件将上述 reads 映射至 [ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-96/fasta/mus\\_musculus/dna/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-96/fasta/mus_musculus/dna/) 基因组,使用 StringTie 组装每个样本的映射 reads,然后使用 LC Sciences 的专有 Perl 脚本合并所有转录组以重建综合转录组。以 FPKM 的差

异倍数 > 2 或 < 0.5,  $P < 0.05$  为标准筛选差异表达基因。最后参考 KEGG 数据库对差异基因进行注释和富集分析。

**1.3.8 数据分析** 采用 SPSS 21.0 进行显著性分析,试验数据均以平均值±标准偏差表示。绘图采用 EXCEL、MetaboAnalyst 3.0 及联川在线分析平台 <https://www.omicstudio.cn/tool> 实现。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MPP<sup>+</sup>造模浓度的筛选

MPP<sup>+</sup>浓度对细胞活力的影响见图 1。由图可知,当浓度低于 300 μmol/L 时,MPP<sup>+</sup>对 SH-SY5Y 细胞活力的影响较小,而随着 MPP<sup>+</sup>作用浓度的增加,SH-SY5Y 细胞活力呈显著下降趋势( $P < 0.05$ )。当 MPP<sup>+</sup>浓度达到 600 μmol/L 和 1 200 μmol/L 时,培养 24 h 后细胞活力较对照组分别下降(53.71 ± 3.21)%和(70.83 ± 4.83)%。因此,后续试验选择 600 μmol/L MPP<sup>+</sup>进行 PD 造模。

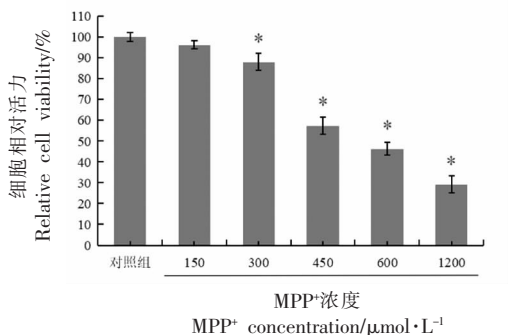
### 2.2 PC<sub>EPA/DHA</sub> 缓解 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力下降

PC<sub>EPA/DHA</sub> 对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响见图 2。由图 2 可知,PC<sub>EPA/DHA</sub> 可剂量依赖性增强 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力,其中低剂量时改善效果不显著( $P > 0.05$ ),而中、高剂量 PC<sub>EPA/DHA</sub> 组较模型组细胞活力分别增加(19.96 ± 3.80)%和(30.77 ± 6.01)%,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 PC<sub>EPA/DHA</sub> 缓解 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞形态异常

由图 3 可知,在光学倒置显微镜下观察,对照组 SH-SY5Y 细胞以贴壁细胞为主,少量细胞悬浮,细胞呈梭形或多边形态,并以轴突结构在细胞间形成广泛交联。PD 模型组细胞数量减少,且形态发生明显变化,主要表现为细胞贴壁性变差,悬浮细胞较多,细胞收缩失去梭状或多边形态,轴突缩短或消失,细胞间交联减少。经 PC<sub>EPA/DHA</sub> 处理的 SH-SY5Y 细胞贴壁性较 PD 模型组显著改善,且细胞形态和轴突结构有所恢复,接近正常细胞形态。





注：“\*”表示与对照组相比差异显著( $P<0.05$ ),下同。

图 1 MPP<sup>+</sup>浓度对细胞活力的影响

Fig.1 Effects of MPP<sup>+</sup> concentration on cell viability

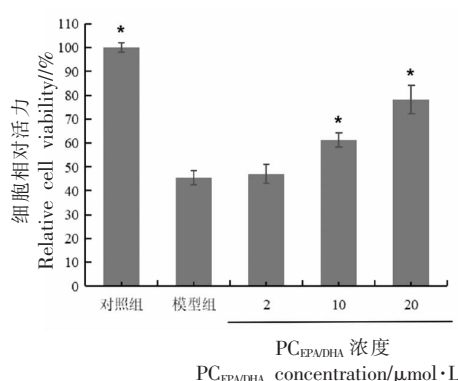
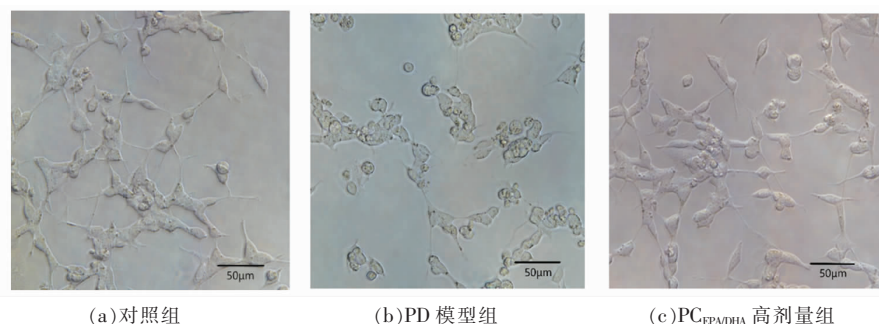


图 2 PC<sub>EPA/DHA</sub>对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Fig.2 Effects of PC<sub>EPA/DHA</sub> on the viability of MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells



(a)对照组 (b)PD 模型组 (c)PC<sub>EPA/DHA</sub> 高剂量组

图 3 PC<sub>EPA/DHA</sub>对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞形态的影响

Fig.3 Effects of PC<sub>EPA/DHA</sub> on the morphology of MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells

#### 2.4 PC<sub>EPA/DHA</sub>缓解 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞 ROS 增加

由图 4 可知,经 MPP<sup>+</sup>处理后,模型组 ROS 水平为对照组( $3.90 \pm 0.72$ )倍,且差异显著( $P<0.05$ ),而采用 PC<sub>EPA/DHA</sub>进行预处理的细胞 ROS 水平呈剂量依赖性下降趋势,其中低剂量组差异不显著,而中、高剂量组 ROS 水平分别下降至对照组的( $2.17 \pm 0.43$ )倍和( $1.61 \pm 0.33$ )倍,且差异显著( $P<0.05$ )。

#### 2.5 转录组学数据分析

2.5.1 差异基因统计 将对照组、PD 模型组和高剂量 PC<sub>EPA/DHA</sub> 干预组(KPC\_PD)进行转录组学测序,并对各组间差异表达基因进行统计分析。以  $\log_2$ (差异倍数)为横轴,以  $-\lg(P$  值)为纵轴,以红色为显著上调,蓝色为显著下调,灰色为差异不显著,绘制火山图见图 5,统计柱状图见图 6。

由图 6 可知,PD 组较对照组显著上调基因

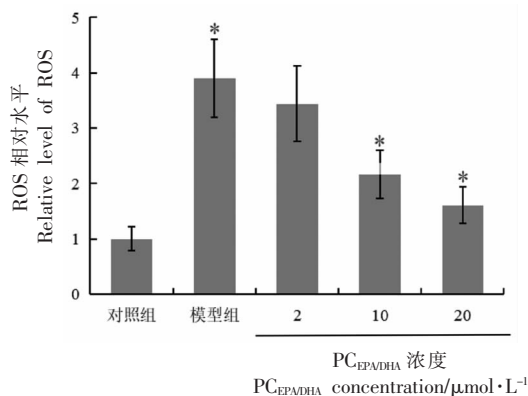


图 4 PC<sub>EPA/DHA</sub>对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞 ROS 相对水平的影响

Fig.4 Effects of PC<sub>EPA/DHA</sub> on the relative levels of ROS in MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells

2 965 个,下调 1 605 个;KPC\_PD 组较对照组显著上调 1 463 个,下调 1 101 个;而 KPC\_PD 组较 PD 组显著上调基因 1 054 个,下调 1 248 个。

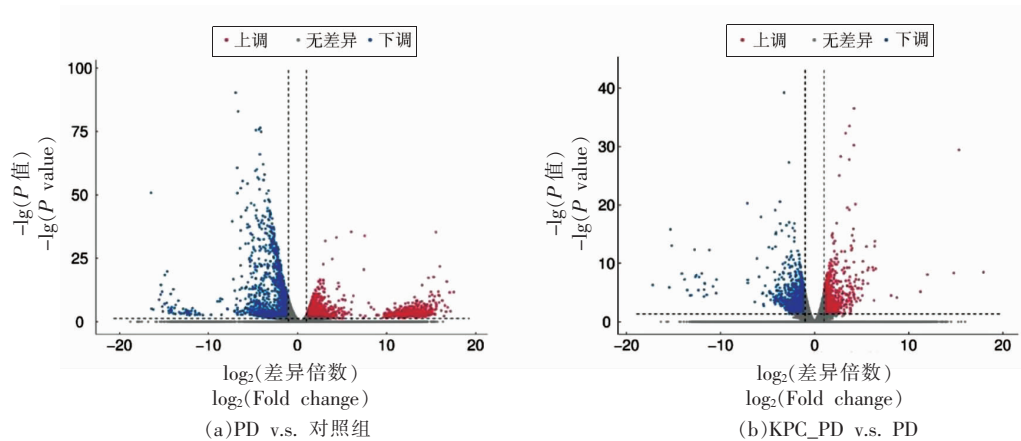


图5 各组间差异基因统计火山图

Fig.5 Volcano plot of differential genes among groups

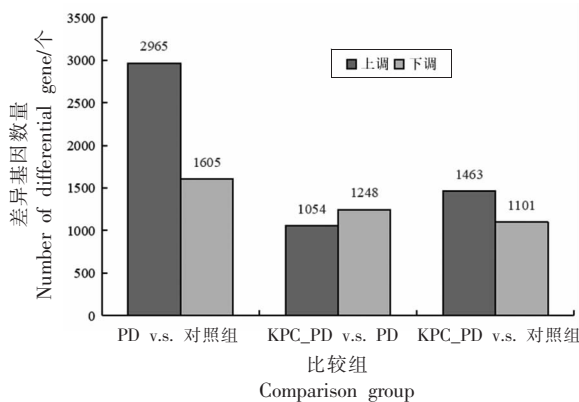


图6 各组间差异基因统计柱状图

Fig.6 Histogram of differential genes between groups

**2.5.2 KEGG 富集分析** 对差异基因进行 KEGG 富集分析,结果见图 7 和图 8。由图 7 可知,PD 组和对照组之间的差异基因显著富集到核糖体(Ribosome)、AMPK 信号通路(AMPK signaling pathway)、胰岛素信号通路(Insulin signaling pathway)、Hippo 信号通路(Hippo signaling pathway)、多巴胺能神经突触(Dopaminergic synapse)、内吞通路(Endocytosis)、动物线粒体自噬通路(Mitophagy - animal)、mTOR 信号通路(mTOR signaling pathway)等。由图 8 可知,PD 组和 KPC\_PD 组之间的差异基因显著富集到 PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、Hippo 信号通路(Hippo signaling pathway)、细胞衰老(Cellular senescence)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、多巴胺能神经突触信号通路(Dopamin-

ergic synapse)、TGF- $\beta$  信号通路(TGF- $\beta$  signaling pathway)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)、胆碱能神经突触信号通路(Cholinergic synapse)等。

**2.5.3 差异基因分析** 对差异倍数较大的代表性基因进行分析,结果见表 1。首先,对氧化磷酸化相关差异表达基因进行具体分析。PD 组中 *MT-ND1*、*MT-ND2*、*MT-ND3*、*MT-ND4*、*MT-ND4L*、*MT-ND5*、*MT-ND6*、*NDUFS1*、*MT-CYB*、*MT-CO1*、*MT-CO2*、*MT-CO3*、*MT-ATP6*、*MT-ATP8* 和 *ATP5MC3* 等基因较对照组显著下调,其中 *MT-ND3*、*MT-CYB*、*MT-CO2*、*MT-CO3* 等基因表达量仅为对照组的 0.04、0.06、0.05、0.06 倍。KPC\_PD 组中上述基因较 PD 组显著上调,其中 *MT-ND3*、*MT-CYB*、*MT-CO2*、*MT-CO3* 等基因表达量分别为 PD 组的 16.92、14.52、13.72、10.21 倍。

其次,对多巴胺及突触核蛋白相关差异基因进行具体分析。PD 组中 *UBA7*、*UBE2L3*、*DDC*、*SLC18A1* 等基因较对照组显著下调,*SNCA*、*SNCAIP*、*PINK1*、*DRD2* 和 *ADCY5* 等基因较对照组显著上调,其中 *SNCAIP* 表达量显著上调至对照组的 9.14 倍,*UBE2L3* 表达量显著下调至对照组的 0.12 倍。KPC\_PD 组中上述基因表达量较 PD 组显著回调,其中 *SNCAIP* 表达量为 PD 组的 0.10 倍。

此外,PD 组中 *ID1*、*ID2*、*ID3*、*ID4*、*SPPI*、*SNAI2*、*XIAP*、*SGK1*、*CXCL12*、*IL1B* 等基因表达量

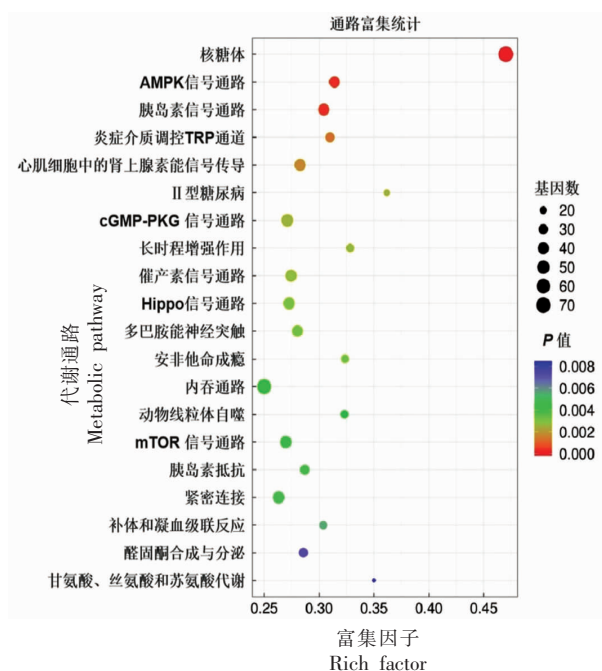


图 7 PD 组和对照组差异基因的 KEGG 分析

Fig.7 KEGG analysis of differential genes between the PD and control group

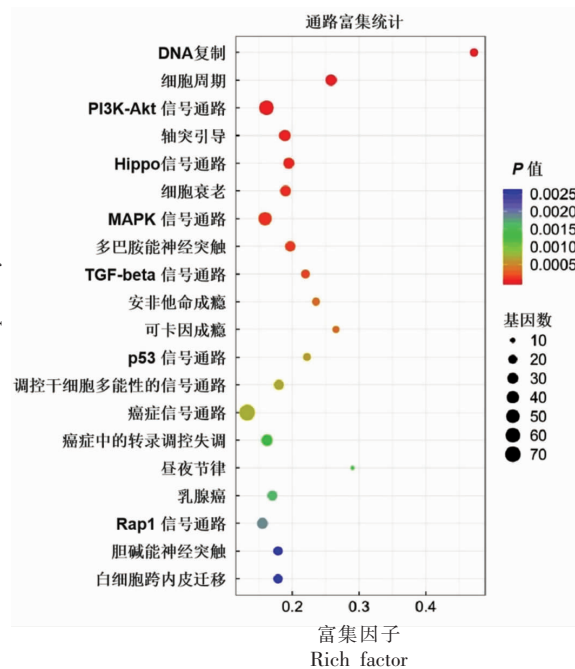


图 8 PD 组和 KPC\_PD 组差异基因的 KEGG 分析

Fig.8 KEGG analysis of differential genes between the PD and KPC\_PD group

较对照组显著下调, 其中 *ID1*、*ID2*、*SNAI2*、*CXCL12* 表达量为对照组的 0.05, 0.08, 0.07, 0.05 倍, 而 *SLC25A6*、*DDIT3*、*VDAC2* 和 *VCAM1* 等基因表达量较对照组显著上调, 其中 *DDIT3* 和 *VCAM1* 分别上调为对照组的 7.65 倍和 8.52 倍。KPC\_PD 组中上述基因表达量较 PD 组显著回调, 其中 *ID1*、*ID2*、*SNAI2*、*CXCL12* 表达量上调至 PD 组的 18.40, 12.96, 13.00, 14.63 倍。

### 3 讨论

病理学上, 帕金森病被定义为黑质区多巴胺神经元的大量变性、缺失和死亡, 以及其残留胞浆中同心形的嗜酸性包涵体 (Lewy 小体) 的形成<sup>[13-14]</sup>。Lewy 小体形成的关键步骤则是  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -Synuclein) 的异常聚集。 $\alpha$ -突触核蛋白可调节神经可塑性、整合突触前信号, 调节突触处的多巴胺含量<sup>[15]</sup>。基因突变后  $\alpha$ -突触核蛋白呈病理性积聚, 当细胞不能及时清除时则会对神经元产生毒性而加速其变性、死亡。*SNCA* 基因是  $\alpha$ -突触核蛋白形成的关键基因, 是与 PD 发病最密切相关的遗传易感因素。*PINK1* 为同源性磷酸酶-张力

蛋白诱导的激酶 1 基因, 在调节线粒体功能等方面发挥重要作用, 研究证实野生型 *PINK1* 的过表达可下调多巴胺能神经元中酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH) 的表达与多巴胺的合成<sup>[16-17]</sup>。*SNCAIP* 编码  $\alpha$ -突触核蛋白的相互作用蛋白, 可促进 Lewy 小体样包涵体的形成和神经变性。上述基因的突变已被证实与 PD 的发病密切相关<sup>[18]</sup>。泛素对蛋白质的修饰是针对异常或短命蛋白质进行降解的重要细胞机制, 而  $\alpha$ -突触核蛋白结构或功能改变则会引起泛素-蛋白酶体系统功能异常, 导致  $\alpha$ -突触核蛋白初原纤维聚集形成 Lewy 小体, 进而引起神经元变性<sup>[19]</sup>。本研究中, PD 组中 *SNCA*、*PINK1* 和 *SNCAIP* 的表达量较对照组显著上调, 而 *UBA7* (泛素激活酶 7) 和 *UBE2L3* (泛素连接酶 E2L3) 的表达量显著下调, 提示 PD 组  $\alpha$ -突触核蛋白表达异常增加和蛋白质降解功能异常。然而, 在经 PC<sub>EPA/DHA</sub> 预处理的 KPC\_PD 组中, 上述基因的表达量显著回调, 表明 PC<sub>EPA/DHA</sub> 有助于减少 SH-SY5Y 细胞内  $\alpha$ -突触核蛋白的异常合成和累积, 从而缓解神经元损伤。

研究表明, 遗传易感性降低了患者神经元的

表 1 各试验组间代表性差异基因  
Table 1 Representative differential genes among experimental groups

基因	介绍	差异倍数			功能
		PD v.s. 对照组	KPC_PD v.s. 对照组	KPC_PD v.s. PD	
氧化磷酸化相关差异基因					
<i>MT-ND1</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 1	0.23*	1.31	5.77*	复合物 I
<i>MT-ND2</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 2	0.12*	0.88	7.62*	
<i>MT-ND3</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 3	0.04*	0.67	16.92*	
<i>MT-ND4</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 4	0.15*	0.77	5.16*	
<i>MT-ND4L</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 4L	0.17*	0.78	4.67*	
<i>MT-ND5</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 5	0.39*	1.17	3.00*	
<i>MT-ND6</i>	线粒体编码的 NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 6	0.15*	0.94	6.19*	
<i>NDUFS1</i>	NADH: 泛醌氧化还原酶核心亚基 S1	0.48*	0.65	1.37*	
<i>MT-CYB</i>	线粒体编码的细胞色素 b	0.06*	0.80	14.52*	复合物 III
<i>MT-CO1</i>	线粒体编码的细胞色素 c 氧化酶 I	0.11*	0.77	7.13*	复合物 IV
<i>MT-CO2</i>	线粒体编码的细胞色素 c 氧化酶 II	0.05*	0.69	13.72*	
<i>MT-CO3</i>	线粒体编码的细胞色素 c 氧化酶 III	0.06*	0.80	10.21*	
<i>MT-ATP6</i>	线粒体编码的 ATP 合酶膜亚基 6	0.40*	1.27	3.19*	复合物 V
<i>MT-ATP8</i>	线粒体编码的 ATP 合酶膜亚基 8	0.11*	0.84	7.95*	
<i>ATP5MC3</i>	ATP 合酶膜亚基 c 基因座 3	0.12*	0.19	1.61*	
多巴胺及突触核蛋白相关差异基因					
<i>UBA7</i>	泛素样修饰激活酶 7	0.62*	1.27	2.06*	与帕金森病相关的基因, 泛素介导的蛋白质降解
<i>UBE2L3</i>	泛素连接酶 E2 L3	0.12*	0.21	1.81*	
<i>SNCA</i>	$\alpha$ -突触核蛋白	1.57*	0.75	0.48*	与帕金森病相关的基因, 路易体形成
<i>SNCAIP</i>	$\alpha$ -突触核蛋白相互作用蛋白	9.14*	0.95	0.10*	
<i>PINK1</i>	PTEN 诱导激酶 1	3.51*	1.78	0.51*	与帕金森病相关的基因
<i>DDC</i>	多巴胺羧酶	0.70*	1.40	2.01*	多巴胺形成
<i>DRD2</i>	多巴胺受体 D2	2.22*	1.04	0.47*	多巴胺受体
<i>SLC18A1</i>	溶质载体家族 18 成员 A1	0.41*	1.12	2.75*	囊泡膜转运体
<i>ADCY5</i>	腺苷酸环化酶 5	3.88*	1.82	0.47*	iSPN/dSPN

(续表 1)

基因	介绍	差异倍数			功能
		PD v.s. 对照组	KPC_PD v.s. 对照组	KPC_PD v.s. PD	
其它差异基因					
<i>SLC25A6</i>	溶质载体家族 25 成员 A6	3.06*	1.86	0.61*	线粒体腺嘌呤核苷酸转运子
<i>ID1</i>	DNA 结合抑制因子 1	0.05*	0.97	18.40*	抗凋亡, 促增殖基因, 神经发生
<i>ID2</i>	DNA 结合抑制因子 2	0.08*	1.05	12.96*	
<i>ID3</i>	DNA 结合抑制因子 3	0.11*	1.06	9.75*	
<i>ID4</i>	DNA 结合抑制因子 4	0.25*	0.79	3.22*	
<i>SPP1</i>	分泌磷蛋白 1	0.20*	1.10	5.55*	细胞增殖
<i>SNAI2</i>	蜗牛家族转录抑制因子 2	0.07*	0.96	13.00*	抗凋亡, 促增殖基因
<i>XIAP</i>	X-连锁凋亡抑制蛋白	0.12*	0.66	5.70*	抗凋亡
<i>SGKI</i>	血清/糖皮质激素调节酶 1	0.15*	0.79	5.19*	促进生长和增殖
<i>DDIT3</i>	DNA 损伤诱导转录因子 3	7.65*	1.86	0.24*	细胞死亡
<i>VDAC2</i>	电压依赖性阴离子通道 2	2.05*	1.35	0.66*	
<i>CXCL12</i>	C-X-C 基序趋化因子配体 12	0.05*	0.69	14.63*	骨髓增生与 b 细胞淋巴瘤生成
<i>IL1B</i>	白细胞介素 1β	0.23*	0.07	0.29*	炎症
<i>VCAMI</i>	血管细胞黏附分子 1	8.52*	3.75	0.44*	细胞黏附, 炎症

注: “\*”表示差异显著( $P < 0.05$ ); 差异倍数  $> 1$  视为上调,  $< 1$  视为下调。

线粒体呼吸作用, 来自 PD 患者的神经元显示线粒体拷贝数增加, 异常线粒体比例增加<sup>[20-21]</sup>。线粒体内源性功能障碍、间接外部压力和受损线粒体异常再生均会影响神经元的整体代谢, 减少神经元持续供能增加的遗传倾向最终会破坏大脑回路的功能。多种细胞受损机制会增加患者氧化负荷, 氧化应激缓冲能力受损会增加 PD 中神经元对细胞死亡的易感性。研究表明, SNCA 的表达升高也与氧化应激失调有关<sup>[22]</sup>。*MT-ND1*、*MT-ND2*、*MT-ND3*、*MT-ND4*、*MT-ND5*、*MT-ND6* 和 *NDUFS1* 参与编码线粒体复合物 I (Complex I), 其中 *MT-ND4* 基因的变异可导致遗传性和年龄相关性疾病, 而 *MT-ND1* 基因变异可导致线粒体功能障碍, 引起线粒体脑肌病和乳酸酸中毒等疾病的发生<sup>[23-24]</sup>。*MT-CYB* 参与编码线粒体复合物 III (Complex III), *MT-CO1*、*MT-CO2* 和 *MT-*

*CO3* 参与编码线粒体复合物 IV (Complex IV), *MT-ATP6*、*MT-ATP8* 和 *ATP5MC3* 参与编码线粒体复合物 V (Complex V), 上述基因均为线粒体氧化磷酸化功能相关基因, 且在 PD 组中均显著下调。这一结果与 PD 组 ROS 水平较对照组显著上调相一致, 提示 PD 组氧化磷酸化功能受到抑制, 线粒体功能障碍和氧化应激水平增加。研究表明, 采用 MPTP 制成亚急性 PD 模型中, 纹状体部线粒体复合物 I 活性显著降低, 与本研究结论一致<sup>[25]</sup>。上述差异基因在 KPC\_PD 组中显著下调, 这一结果与 KPC\_PD 组 ROS 水平较 PD 组显著下降相一致。上述结果表明 *PC<sub>EPA/DHA</sub>* 有助于改善 MPP<sup>+</sup>引起的 SH-SY5Y 细胞线粒体功能障碍, 降低细胞内氧化应激水平, 示意图见图 9。

多巴胺是重要的单胺儿茶酚胺类神经递质, 从突触前膜释放出



来,以不同亲和力激活细胞膜上的多巴胺受体并发挥作用<sup>[26]</sup>。当黑质的多巴胺能神经元丢失超过50%或纹状体的多巴胺能神经元丢失超过70%~80%时,PD的临床症状较为明显。*DDC*编码多巴脱羧酶,是催化生成多巴胺的关键酶,直接调控多巴胺等神经递质的表达水平<sup>[27]</sup>。*SLC18A1*编码囊泡单胺转运蛋白,负责多巴胺的转运。*DRD2*编码多巴胺受体2,位于多巴胺靶细胞的突触后膜和多巴胺能神经元的突触前膜,通过激活Gα/o抑制腺苷酸环化酶介导的间接纹状体通路抑制运

动<sup>[28]</sup>。*ADCY5*编码腺苷酸环化酶5,是膜结合型腺苷酸环化酶家族的成员之一,其可将三磷酸腺苷转化为第二信使环磷酸腺苷cAMP和焦磷酸盐,并参与多巴胺能神经突触的可塑性和iSPN/dSPN通路<sup>[29]</sup>。上述基因涉及多巴胺的合成、转运及生物效应等,在PD组中表达异常,而在PC<sub>EPA/DHA</sub>干预组中显著回调,提示PC<sub>EPA/DHA</sub>有助于缓解由MPP<sup>+</sup>引起的SH-SY5Y细胞内多巴胺代谢及功能失常。对上述机制绘制示意图见图10。

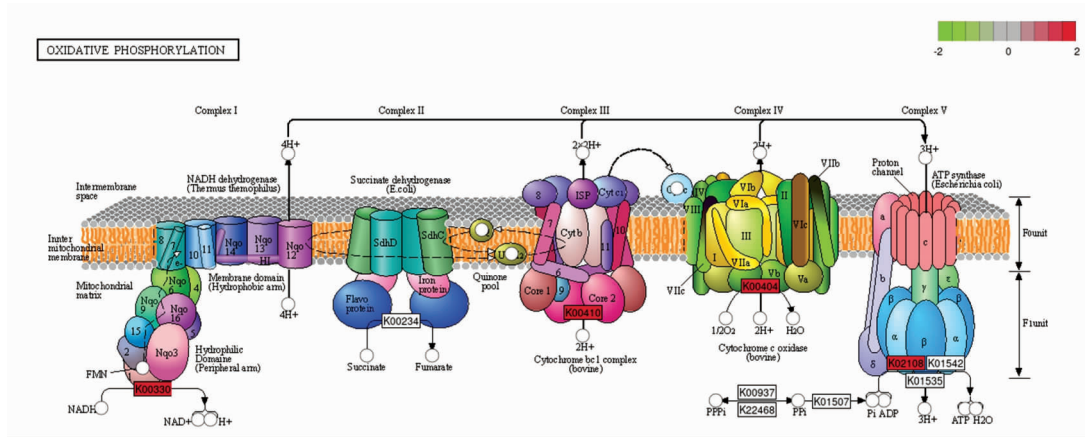


图9 氧化磷酸化信号通路

Fig.9 Oxidative phosphorylation signaling pathway

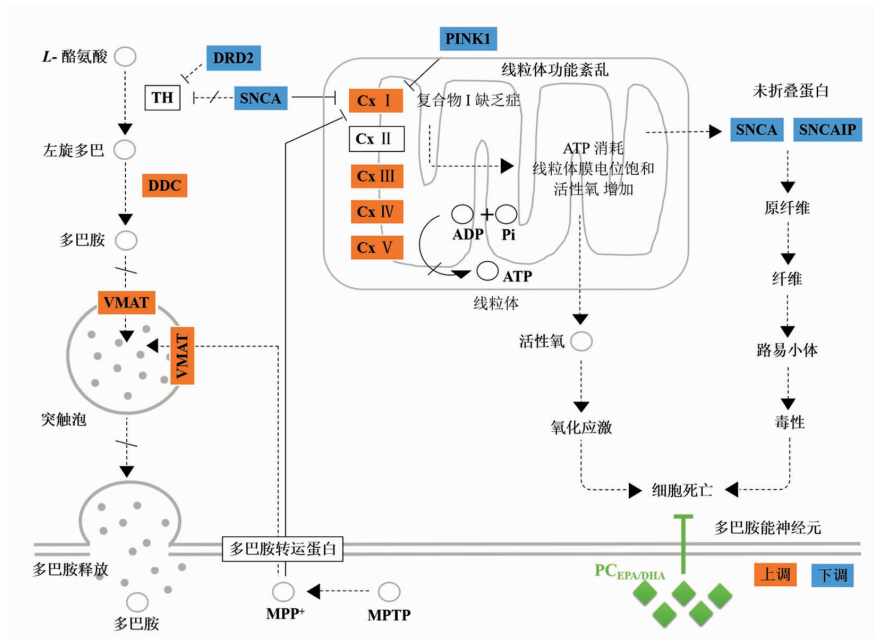


图10 PC<sub>EPA/DHA</sub>缓解MPP<sup>+</sup>诱导SH-SY5Y细胞损伤的示意图

Fig.10 Schematic diagram of PC<sub>EPA/DHA</sub> alleviating MPP<sup>+</sup>-induced damage in SH-SY5Y cells

此外, *SLC25A6* 编码线粒体腺嘌呤核苷酸转运蛋白, 可导致线粒体跨膜电位耗散和线粒体跨膜电位瞬时增高。 *ID1*、*ID2*、*ID3*、*ID4* 等编码分化抑制因子, 属于螺旋-环螺旋转录因子家族成员之一<sup>[30]</sup>。 *SPP1* 编码分泌型焦磷酸蛋白 1, *XIAP* 编码 X 连锁凋亡抑制蛋白。 *SNAI2* 是锌指转录因子 *SNAI1* 超家族成员, 为上皮间质转化转录因子之一。 *SGK1* 编码血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶。研究表明, 在小鼠 LPS 模型中, *SGK1* 抑制剂会加重器官损害, 并通过增加促炎因子和中性粒细胞的浸润促进炎症反应<sup>[31]</sup>。上述基因与抵抗细胞凋亡和促进细胞增殖等功能相关, 其在 PD 组中的表达显著下调, 而在 KPC\_PD 组中显著回调。 *DDIT3* 为 DNA 损伤诱导转录因子 3, *VDAC2* 为电压依赖性阴离子通道 2 基因, 上述细胞凋亡相关基因在 PD 组中表达显著上调, 而在 KPC\_PD 组中显著回调。 *IL1B* 编码白细胞介素 1 $\beta$ , *VCAM1* 编码血管细胞黏附分子 1, 均为典型的炎症因子, 而 KPC\_PD 组中 *IL1B* 和 *VCAM1* 的表达量较 PD 组显著下调。上述结果提示 PC<sub>EPA/DHA</sub> 对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用与限制细胞炎症、抑制细胞凋亡和死亡有关。

综上所述, PC<sub>EPA/DHA</sub> 可剂量依赖性增强 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞活力, 改善细胞形态和降低细胞氧化应激水平, 该作用与其改善线粒体功能障碍, 改善多巴胺和突触核蛋白相关功能, 以及抑制细胞凋亡等密切相关。后续还应针对上述功能基因和通路进行验证, 并通过体内试验等进一步验证其生理功效及作用机制。本研究可为南极磷虾在保健品和功能食品中的开发与应用提供一定的理论参考, 同时为“抗帕”药物的研发提供新的思路和方向。

### 参 考 文 献

- [1] WILLIAMS-GRAY C H, WORTH P F. Parkinson's disease[J]. *Medicine*, 2020, 48(9): 595-601.
- [2] BALESTRINO R, SCHAPIRA A H V. Parkinson disease[J]. *European Journal of Neurology*, 2020, 27(1): 27-42.
- [3] SALSONE M, VESCIO B, FRATTO A, et al. Cardiac sympathetic index identifies patients with Parkinson's disease and REM behavior disorder[J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2016, 26: 62-66.
- [4] DORSEY E R, CONSTANTINESCU R, THOMPSON J P, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030[J]. *Neurology*, 2007, 68(5): 384-386.
- [5] LI G, MA J F, CUI S H, et al. Parkinson's disease in China: A forty-year growing track of bedside work[J]. *Translational Neurodegeneration*, 2019, 8(1): 22.
- [6] ZHANG T T, XU J, WANG Y M, et al. Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids [J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 75: 100997.
- [7] LI Q, WU F J, WEN M, et al. The protective effect of Antarctic krill oil on cognitive function by inhibiting oxidative stress in the brain of senescence-accelerated prone mouse strain 8 (SAMP8) mice[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(1): 543-551.
- [8] WANG C C, WANG D, XU J, et al. DHA enriched phospholipids with different polar groups (PC and PS) had different improvements on MPTP-induced mice with Parkinson's disease[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 45: 417-426.
- [9] GODOY M A D, SARAIVA L M, CARVALHO L R P D, et al. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- $\beta$  oligomers[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(6): 1957-1975.
- [10] YAMASHITA S, HASHIMOTO M, HAQUE A M, et al. Oral administration of ethanolamine glycerophospholipid containing a high level of plasmalogen improves memory impairment in amyloid  $\beta$ -infused rats[J]. *Lipids*, 2017, 52(7): 575-585.
- [11] ZHOU M M, CHE H X, HUANG J Q, et al. Comparative study of different polar groups of EPA-enriched phospholipids on ameliorating memory loss and cognitive deficiency in aged SAMP8 mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(7): 1700637.
- [12] 陈康, 戴志远, 沈清, 等. 响应面法提取南极磷虾磷脂及其分子种组成的测定[J]. *南方水产科学*, 2017, 13(3): 104-112.
- [13] CHEN K, DAI Z Y, SHEN Q, et al. Extraction of

- phospholipid from *Euphausia superba* by response surface method and determination of phospholipid molecular species[J]. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(3): 104–112.
- [13] MA M J. Biopsy pathology of neurodegenerative disorders in adults[M]// *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. Amsterdam; Elsevier, 2018: 659–680.
- [14] 朱羽婷, 朱向阳, 周永, 等. 氧化应激与帕金森病[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2019, 22(11): 1271–1276.
- ZHU Y T, ZHU X Y, ZHOU Y, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2019, 22(11): 1271–1276.
- [15] 蔡卫卫, 许晓辉, 刘超, 等. 血清  $\alpha$ -突触核蛋白及类胰岛素 1 号增长因子水平与帕金森病患者认知功能的相关性分析[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2021, 24(12): 1048–1053.
- CAI W W, XU X H, LIU C, et al. Correlative analysis of serum  $\alpha$ -syn, IGF-1 levels and cognitive function in patients with Parkinson's disease[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2021, 24(12): 1048–1053.
- [16] PODDIGHE S, DE ROSE F, MAROTTA R, et al. *Mucuna pruriens* (*Velvet bean*) rescues motor, olfactory, mitochondrial and synaptic impairment in *PINK1B9 Drosophila melanogaster* genetic model of Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110802.
- [17] ZHOU Z D, REFAI F S, XIE S P, et al. Mutant *PINK1* upregulates tyrosine hydroxylase and dopamine levels, leading to vulnerability of dopaminergic neurons[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 68(3): 220–233.
- [18] DEL REY N L G, QUIROGA-VARELA A, GARBAYO E, et al. Advances in Parkinson's Disease: 200 years later[J]. *Frontiers in neuroanatomy*, 2018, 12: 113.
- [19] 王一帆, 简崇东. 帕金森病相关 *SNCA* 基因位点的研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2021, 24(19): 1742–1748.
- WANG Y F, JIAN C D. Research progress of *SNCA* gene loci related to Parkinson's disease[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2021, 24(19): 1742–1748.
- [20] SEIBLER P, GRAZIOTTO J, JEONG H, et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant *PINK1* induced pluripotent stem cells[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2011, 31(16): 5970–5976.
- [21] CHUNG S, KISHINEVSKY S, MAZZULLI J, et al. Parkin and *PINK1* patient iPSC-derived midbrain dopamine neurons exhibit mitochondrial dysfunction and  $\alpha$ -synuclein accumulation[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(4): 664–677.
- [22] CHANG K H, LEE-CHEN G J, WU Y R, et al. Impairment of proteasome and anti-oxidative pathways in the induced pluripotent stem cell model for sporadic Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2016, 24: 81–88.
- [23] GU F, CHAUHAN V, KAUR K, et al. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism[J]. *Transl Psychiatry*, 2013, 3(9): e299.
- [24] GURSES C, AZAKLI H, ALPTEKIN A, et al. Mitochondrial DNA profiling via genomic analysis in mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis[J]. *Gene*, 2014, 538(2): 323–327.
- [25] 马琳, 牛海玲, 郭记宏, 等. 线粒体复合物及 ATP 酶活性在不同月龄帕金森病模型小鼠的差异[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2016, 24(7): 454–457.
- MA L, NIU H L, GUO J H, et al. The mitochondrial complex and ATP activity differences in mice with Parkinson's disease at different age[J]. *Journal of Brain and Nervous Diseases*, 2016, 24(7): 454–457.
- [26] PRZEDBORSKI S. The two-century journey of Parkinson disease research[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(4): 251–259.
- [27] 王凯, 李博, 于晓东, 等. 多巴脱羧酶参与调解无脊椎动物神经内分泌免疫系统研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(4): 170–177.
- WANG K, LI B, YU X D, et al. Research progress on dopa decarboxylase and its correlation with neuroendocrine immune system in invertebrates[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(4): 170–177.

- [28] TECUAPETLA F, JIN X, LIMA S Q, et al. Complementary contributions of striatal projection pathways to action initiation and execution [J]. *Cell*, 2016, 166(3): 703–715.
- [29] HALLS M L, COOPER D M F. Adenylyl cyclase signalling complexes—pharmacological challenges and opportunities[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 172: 171–180.
- [30] 尹琳, 黄从新. 分化抑制因子在心血管系统中的研究进展[J]. *中华心律失常学杂志*, 2021, 25(3): 270–273.
- [31] YIN L, HUANG C X. Research progress of inhibitor of differentiation in cardiovascular system[J]. *Chinese Journal of Cardiac Arrhythmias*, 2021, 25(3): 270–273.
- [31] ZHOU H X, GAO S G, DUAN X X, et al. Inhibition of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances TLR-mediated inflammation and promotes endotoxin-driven organ failure[J]. *FASEB J*, 2015, 9(9): 3737–3749.

### Protective Effect of EPA/DHA-rich Phosphatidylcholine on SH-SY5Y Cells Injured by MPP<sup>+</sup>

Ge Lijun<sup>1</sup>, Lu Weibo<sup>1</sup>, Jian Shikai<sup>1</sup>, Zheng Huimin<sup>1</sup>, Xue Jing<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012*

<sup>2</sup>*Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012*

**Abstract** To investigate the anti-Parkinson's disease (PD) activity of EPA/DHA-rich phosphatidylcholine (PC<sub>EPA/DHA</sub>) and related mechanisms, MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells were used to construct a Parkinson's disease cell model, and the effects of EPA/DHA-phosphatidylcholine (PC<sub>EPA/DHA</sub>) on the viability, cell morphology and ROS levels of MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells were analyzed, and the mechanism was explored by transcriptomic techniques. The results showed that the optimal condition for PD modeling was 600 μmol/L MPP<sup>+</sup> treatment of SH-SY5Y cells for 24 h. The relative cell viability of the PD model decreased by (53.71±3.21)%. PC<sub>EPA/DHA</sub> dose-dependently enhanced MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cell viability, improved cell morphology and reduced cellular oxidative stress levels. Transcriptomic results showed that the protective effects of PC<sub>EPA/DHA</sub> on MPP<sup>+</sup>-induced SH-SY5Y cells were closely associated with improved mitochondrial dysfunction, improved dopamine and synuclein alpha-related functions, and inhibition of apoptosis.

**Keywords** PC<sub>EPA/DHA</sub>; Parkinson's disease; oxidative stress; transcriptomics