

## 利用 $\alpha$ -突触核蛋白预制纤维作用于分化的SH-SY5Y细胞 建立帕金森病细胞模型

粟璟曦<sup>1</sup>, 宋琼<sup>1</sup>, 景子涵<sup>1</sup>, 陈良颢<sup>1</sup>, 邹春林<sup>1,2</sup>

(1. 广西医科大学基础医学院转化医学研究中心长寿与老年相关疾病教育部重点实验室, 神经科学研究所广西脑科学研究重点实验室, 南宁 530021; 2. 再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心, 广西再生医学重点实验室, 南宁 530021)

**摘要** **目的** 探讨利用 $\alpha$ -突触核蛋白预形成纤维( $\alpha$ -Syn PFF)作用于视黄酸(RA)分化的SH-SY5Y细胞建立帕金森病细胞模型的可行性。**方法** 将SH-SY5Y细胞随机分为未分化组和RA分化组, Western blotting检测酪氨酸羟化酶(TH)、多巴胺转运蛋白(DAT)、淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG3)、巢蛋白(Nestin)表达水平, 免疫荧光染色检测微管相关蛋白2(MAP2)、神经元特异核蛋白(NeuN)表达情况。将经RA分化后的SH-SY5Y细胞随机分为control组和 $\alpha$ -Syn PFF组, Hoechst 33342染色检测细胞核固缩情况, 一氧化氮(NO)含量检测试剂盒测定细胞内NO生成量, Western blotting检测TH、多聚腺苷酸二磷酸(PAR)、多聚腺苷酸二磷酸核糖酶(PARP)表达水平, 免疫荧光染色检测细胞内129位丝氨酸磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白(pS129- $\alpha$ -Syn)及磷酸化组蛋白H2AX( $\gamma$ H2AX)表达情况。**结果** RA处理可诱导SH-SY5Y细胞胞体变小、突起变长。Western blotting结果显示, RA处理可提高SH-SY5Y细胞TH、DAT、LAG3表达水平, 降低Nestin表达水平( $P < 0.05$ );  $\alpha$ -Syn PFF处理可使分化的SH-SY5Y细胞TH蛋白表达水平降低, PAR、PARP-1、cleaved PARP-1蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。免疫荧光染色结果显示, RA处理能提高SH-SY5Y细胞MAP2和NeuN表达水平( $P < 0.001$ );  $\alpha$ -Syn PFF处理可使分化的SH-SY5Y细胞 $\gamma$ H2AX和pS129- $\alpha$ -Syn的表达水平升高( $P < 0.01$ )。Hoechst 33342染色结果显示,  $\alpha$ -Syn PFF处理可使分化的SH-SY5Y细胞核固缩( $P < 0.001$ )。NO检测结果显示,  $\alpha$ -Syn PFF处理可提高分化的SH-SY5Y细胞内NO含量( $P < 0.01$ )。**结论**  $\alpha$ -Syn PFF作用于RA分化的SH-SY5Y细胞可建立帕金森病细胞模型。

**关键词** 帕金森病;  $\alpha$ -突触核蛋白预制纤维; 视黄酸; SH-SY5Y细胞; 细胞模型

中图分类号 R285 文献标志码 B 文章编号 0258-4646(2025)01-0005-07

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250109.1103.018>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.01.002

### Establishment of a cellular model of Parkinson disease by treating differentiated SH-SY5Y cells with $\alpha$ -synuclein preformed fibrils

SU Jingxi<sup>1</sup>, SONG Qiong<sup>1</sup>, JING Zihan<sup>1</sup>, CHEN Lianghao<sup>1</sup>, ZOU Chunlin<sup>1,2</sup>

(1. Center for Translational Medicine, Key Laboratory of Longevity and Aging-related Diseases, Ministry of Education, Institute of Neuroscience and Guangxi Key Laboratory of Brain Science, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Collaborative Innovation Center of Regenerative Medicine and Medical Bioresource Development and Application Co-constructed by the Province and Ministry, Guangxi Key Laboratory of Regenerative Medicine, Nanning 530021, China)

**Abstract** **Objective** To establish a cellular model of Parkinson disease by treating retinoic acid (RA)-differentiated SH-SY5Y cells with  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils ( $\alpha$ -Syn PFF). **Methods** SH-SY5Y cells were divided into undifferentiated and RA-differentiated groups. The expression levels of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), lymphocyte activation gene 3 (LAG3), and Nestin proteins in the cells were detected using Western blotting, whereas those of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and neuronal nuclei (NeuN) were detected using immunofluorescence staining. Furthermore, RA-treated SH-SY5Y cells were divided into control and  $\alpha$ -Syn PFF groups, and their levels of chromatin condensation were detected using Hoechst 33342 staining. Nitric oxide (NO) levels were measured using a NO assay kit. Additionally, the protein levels of TH, poly (ADP-ribose) (PAR), and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in these cells were detected using Western blotting, whereas their expression levels of phosphorylated  $\alpha$ -Syn (pS129- $\alpha$ -Syn) and phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) were detected using immunofluorescence staining. **Results** Treatment with RA resulted in a reduction in cell body size and the elongation of protrusions in SH-SY5Y cells. The results of Western blotting showed that

基金项目: 国家自然科学基金(81971191); 广西医科大学大学生创新创业训练计划(202210598033, 202210598010)

作者简介: 粟璟曦(1998-), 女, 硕士研究生。

通信作者: 邹春林, E-mail: zouchunlin@sohu.com

收稿日期: 2024-01-26

网络出版时间: 2025-01-09 15:02:25

RA treatment could increase the TH, DAT, and LAG3 levels and decrease the Nestin level in SH-SY5Y cells ( $P < 0.05$ ).  $\alpha$ -Syn PFF treatment decreased the TH protein level and increased the PAR, PARP-1, and cleaved PARP-1 levels in differentiated SH-SY5Y cells ( $P < 0.05$ ). According to the immunofluorescence results, RA treatment increased the expression levels of MAP2 and NeuN in SH-SY5Y cells ( $P < 0.001$ ). The  $\alpha$ -Syn PFF treatment increased the expression levels of  $\gamma$ H2AX and pS129- $\alpha$ -Syn in RA-differentiated SH-SY5Y cells ( $P < 0.01$ ). The Hoechst 33342 staining results showed that  $\alpha$ -Syn PFF treatment led to chromatin condensation in the differentiated SH-SY5Y cells ( $P < 0.001$ ) and increased the NO levels ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** A cellular model of Parkinson disease can be established by treating RA-differentiated SH-SY5Y cells with  $\alpha$ -Syn PFF.

**Keywords** Parkinson disease;  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils; retinoic acid; SH-SY5Y cells; cellular model

帕金森病(Parkinson disease, PD)是患病率仅次于阿尔茨海默病的神经退行性疾病,多发于老年人群且致残性极高<sup>[1]</sup>。预计2040年全球患病人数将达到1 420万<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -Syn)异常聚集形成路易体及黑质致密部的多巴胺能神经元变性是其主要病理学特征<sup>[3]</sup>。 $\alpha$ -Syn预制原纤维传播模型是近年来研究PD病理进程的热点模型,该模型的PD动物在相关脑区能观察到早期的 $\alpha$ -Syn异常聚集并在诱导数月后出现多巴胺能神经元损伤、 $\alpha$ -Syn聚集体形成和运动障碍<sup>[4]</sup>。

通过脑内注射 $\alpha$ -突触核蛋白预制纤维( $\alpha$ -synuclein preformed fibrils,  $\alpha$ -Syn PFF)建立PD小鼠模型需要6个月<sup>[5]</sup>,因此利用 $\alpha$ -Syn PFF快速建立PD体外细胞模型,对于PD发病机制及治疗药物的研究有着重要的意义。PD研究中最广泛使用的细胞系是人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y细胞),但该细胞不具有成熟神经元的特征,克服该缺陷的常用方法是使用视黄酸(retinoic acid, RA)将该细胞分化为具有成熟神经元特征的细胞<sup>[6]</sup>。目前, $\alpha$ -Syn PFF诱导的PD细胞模型常使用原代小鼠胚胎皮层神经元,但培养原代小鼠胚胎皮层神经元过程较为复杂,不利于进行PD治疗药物的筛选实验,而未分化的SH-SY5Y细胞对 $\alpha$ -Syn PFF损伤不敏感。因此,本研究旨在探讨使用 $\alpha$ -Syn PFF处理RA分化的SH-SY5Y细胞建立PD细胞模型的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

RA购自美国Sigma-Aldrich公司, $\alpha$ -Syn PFF购自美国GeneTex公司,Hoechst33342购自美国ThermoFisher Scientific公司,一氧化氮(nitric oxide, NO)含量检测试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公

司,0.25%胰蛋白酶、三抗混合液、Ham's F12培养液、EMEM培养基、DMEM培养基、胎牛血清购自加拿大Wisent生物技术有限公司;鼠源多巴胺转运蛋白(dopamine transporter, DAT)单克隆抗体(MAB369)、鼠源巢蛋白(Nestin)单克隆抗体(MAB5326)、兔源酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体(AB152)、兔源神经元特异核蛋白(neuronal nuclei, NeuN)多克隆抗体(ABN78)、鼠源磷酸化 $\alpha$ -突触核蛋白(pS129- $\alpha$ -synuclein, pS129- $\alpha$ -Syn)单克隆抗体(MABN826)、鼠源磷酸化组蛋白H2A.X(phosphorylated histone H2AX,  $\gamma$ H2AX)单克隆抗体(05-636)、兔源微管相关蛋白2(microtubule-associated protein 2, MAP2)多克隆抗体(M3696)购自美国Merck公司;兔源淋巴细胞活化基因3蛋白(lymphocyte activation gene 3, LAG3)多克隆抗体(16616-1-AP)购自美国Proteintech公司;兔源聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)单克隆抗体(9532)购自美国Cell Signaling Technology公司;鼠源聚(ADP-核糖)(PAR)单克隆抗体(AG-20T-0001)购自美国AdipoGen Life Science公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(7074)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠二抗(7076)购自美国Cell Signaling Technology公司。

倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司;Mini ChemiTM迷你型化学发光成像仪购自北京赛智创业科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养:SH-SY5Y细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),培养于含10%胎牛血清、1%青霉素-抗真菌素混合液的Ham's F12和EMEM培养基中,放置于37 °C、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱培养和传代。

1.2.2 细胞分组:RA分化实验分为未分化组及RA

分化组,取对数生长期的SH-SY5Y细胞,分别用不含RA的培养基及含10  $\mu\text{mol/L}$  RA的培养基培养; $\alpha$ -Syn PFF传播实验分为control组及 $\alpha$ -Syn PFF组,取经RA分化后的SH-SY5Y细胞,分别用不含 $\alpha$ -Syn PFF的培养基及含5  $\mu\text{g/mL}$   $\alpha$ -Syn PFF的培养基培养。

1.2.3 细胞分化方案:SH-SY5Y细胞使用0.25%胰酶消化后,重悬于含10  $\mu\text{mol/L}$  RA、10%胎牛血清、1%青霉素-抗真菌素混合液的高糖DMEM培养基中,置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的细胞培养箱培养,4 d后取出并加入5  $\mu\text{g/mL}$ 的 $\alpha$ -Syn PFF,放入培养箱继续培养4 d。

1.2.4 细胞形态学评估:当神经元细胞突起长度 $>50$   $\mu\text{m}$ 时,即认为细胞已经分化。随机选择至少100个细胞进行显微镜成像,并使用ImageJ软件分析神经元细胞突起长度。实验独立重复3次。

1.2.5 Hoechst 33342染色检测细胞核形态的变化:PBS清洗细胞1次,加入7  $\mu\text{mol/L}$  Hoechst 33342染色工作液于37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育15 min,培养基洗涤1次,倒置荧光显微镜下检测荧光。每组细胞随机选择3个视野拍摄照片,实验独立重复3次,以亮蓝色荧光细胞与总细胞数的比值作为细胞核固缩比例。

1.2.6 NO含量检测:使用NO含量检测试剂盒测定细胞内NO水平。各组细胞经0.25%胰酶消化离心后,提取液重悬细胞,置于冰上超声破碎,离心后取上清液加入试剂盒内反应试剂,混匀,室温静置10 min后使用全波长酶标仪在550 nm波长处测定吸光度值,根据公式计算样品NO生成量,实验独立重复3次。

1.2.7 Western blotting检测DAT、Nestin、TH、LAG3、PAR、PARP表达情况:使用添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解各组处理的SH-SY5Y细胞,取上清液进行Western blotting检测。裂解产物经SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜上。使用5%脱脂牛奶封闭90 min,然后添加DAT、Nestin、TH、LAG3、PAR、PARP、 $\beta$ -actin(1 : 1 000)一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,第2天使用HRP标记的IgG二抗(1 : 5 000)室温孵育1 h,化学发光法检测。使用ImageJ软件分析蛋白灰度值,实验独立重复3次,以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值评估目的蛋白表达量。

1.2.8 免疫荧光染色检测MAP2、NeuN、pS129- $\alpha$ -Syn、 $\gamma$ H2AX表达情况:PBS清洗细胞1次,加入4%多聚甲醛室温固定细胞1 h,固定后PBS再次清洗,加入

0.1%Triton-X室温破膜1 h,PBS清洗后加入5%驴血清室温封闭1 h,然后添加MAP2、NeuN、AIF、pS129- $\alpha$ -Syn、 $\gamma$ H2AX一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,第2天使用PBS清洗后添加Alexa Fluor<sup>®</sup> 488/555荧光二抗(1 : 200)室温避光孵育1 h,PBS清洗,加入DAPI(1 : 5 000)室温避光孵育5 min,倒置荧光显微镜下观察。每组细胞随机选择3个视野拍摄照片,实验独立重复3次,使用ImageJ软件分析荧光强度。

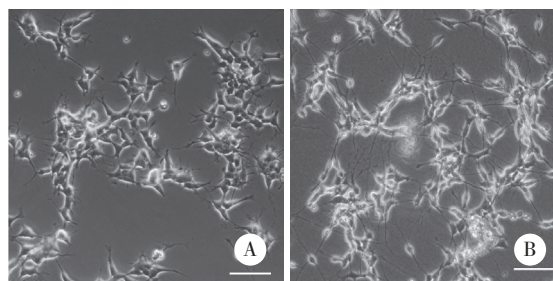
### 1.3 统计学分析

采用SPSS 23.0统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用独立样本 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RA诱导分化对SH-SY5Y细胞形态的影响

未分化组SH-SY5Y细胞呈梭形,细胞突起较短,突起长度平均为 $(16.66 \pm 2.30)$   $\mu\text{m}$ ,RA分化组SH-SY5Y细胞胞体变小变圆,细胞突起明显变细长,并交织成网状,形态上更接近神经元特征,细胞突起长度平均为 $(56.2 \pm 5.86)$   $\mu\text{m}$ ,与未分化组比较,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图1。



A, undifferentiated group; B, RA-differentiated group. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

图1 未分化和经RA诱导分化的SH-SY5Y细胞形态

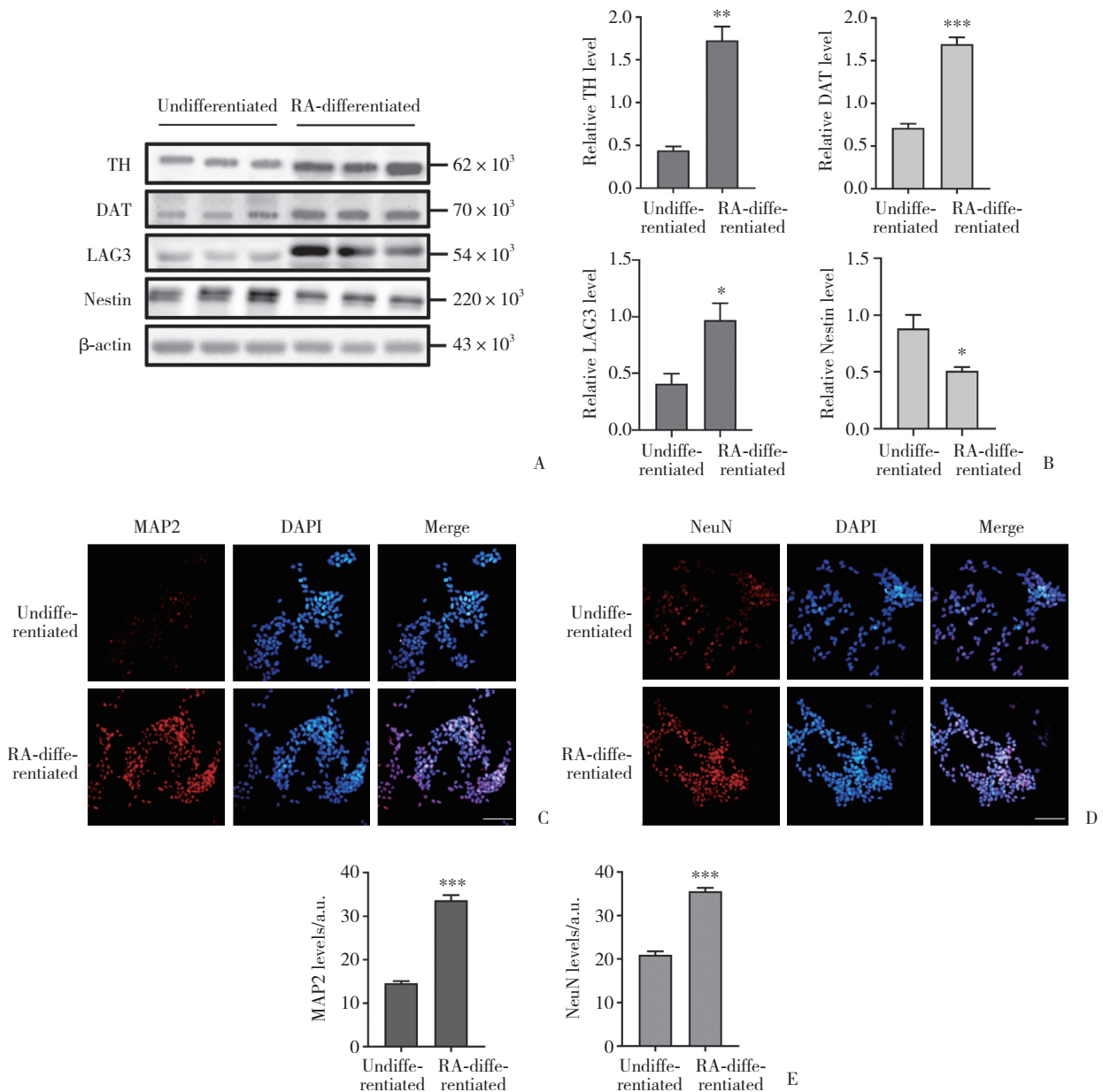
Fig.1 Morphologies of undifferentiated and RA-differentiated SH-SY5Y cells

### 2.2 RA诱导分化对SH-SY5Y细胞相关蛋白表达的影响

与未分化组SH-SY5Y细胞相比,RA诱导分化可导致SH-SY5Y细胞的多巴胺能神经元标志物TH和DAT表达水平增高,病理性 $\alpha$ -Syn纤维聚集体的关键受体LAG3表达水平增高,神经干细胞标志物Nestin表达水平降低,成熟神经元标志物MAP2和NeuN表达水平增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫荧

光染色结果也显示,与未分化组比较,RA分化组的MAP2和NeuN阳性细胞数明显增多( $P < 0.001$ )。上述

实验结果显示,RA诱导分化可促进SH-SY5Y细胞向多巴胺能神经元分化。见图2。



A, Western blotting showing the TH, DAT, LAG3, and nestin protein levels; B, relative expression levels of the TH, DAT, LAG3, and Nestin proteins, each standardized to the  $\beta$ -actin level; C, immunofluorescence images showing the MAP2 levels (scale bar = 100  $\mu$ m); D, immunofluorescence images showing the NeuN levels (scale bar = 100  $\mu$ m); E, quantitative analysis of the MAP2 and NeuN fluorescence intensity levels. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. undifferentiated group.

图2 RA诱导分化对SH-SY5Y细胞相关蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of retinoic acid-induced differentiation on the expression of related proteins in SH-SY5Y cells

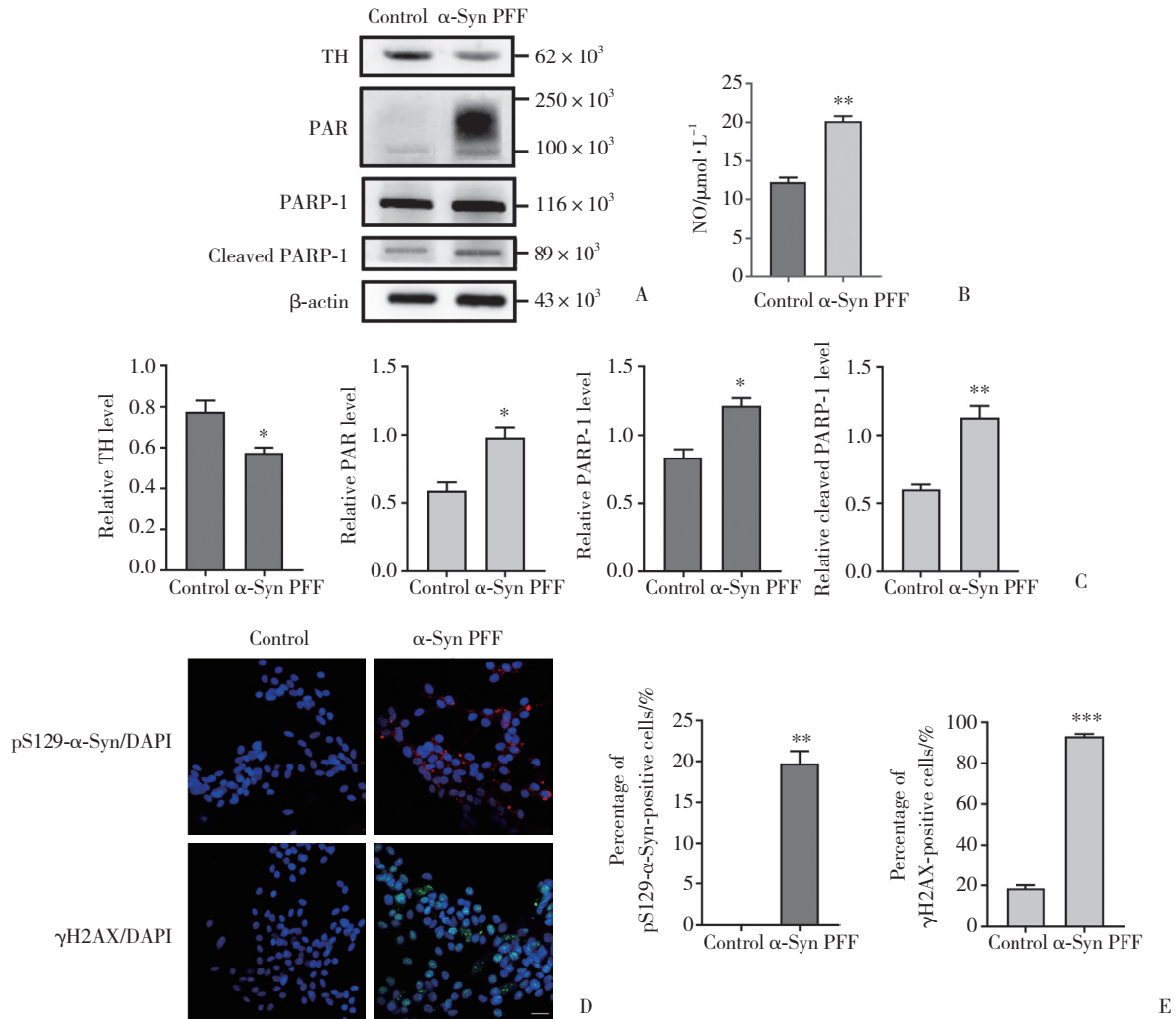
### 2.3 $\alpha$ -Syn PFF对RA诱导分化的SH-SY5Y细胞相关蛋白表达及NO合成量的影响

与control组分化细胞相比, $\alpha$ -Syn PFF使分化的SH-SY5Y细胞多巴胺能神经元标志物TH表达减少,介导PARP-1依赖性细胞死亡途径的相关蛋白

PARP-1和PAR表达增加, $\alpha$ -Syn病理标志物pS129- $\alpha$ -Syn和DNA损伤标志物 $\gamma$ H2AX表达增加,NO合成量增加(均 $P < 0.05$ )。免疫荧光染色结果也显示, $\alpha$ -Syn PFF组的分化SH-SY5Y细胞pS129- $\alpha$ -Syn和 $\gamma$ H2AX阳性细胞数均呈明显上升趋势。提示 $\alpha$ -Syn PFF可以使

RA诱导分化的SH-SY5Y细胞通过PARP-1依赖性细胞死亡途径发生细胞死亡。见图3。

### 2.4 $\alpha$ -Syn PFF对RA诱导分化的SH-SY5Y细胞核形态的影响



A, Western blotting showing the TH, PAR, PARP-1, and cleaved PARP-1 protein levels of differentiated SH-SY5Y cells; B, NO levels of differentiated SH-SY5Y cells; C, relative expression levels of the TH, PAR, PARP-1, and cleaved PARP-1 proteins, each standardized to the  $\beta$ -actin level; D, immunofluorescence images showing the pS129- $\alpha$ -Syn and  $\gamma$ H2AX levels (scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ); E, percentages of pS129- $\alpha$ -Syn- and  $\gamma$ H2AX-positive cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group.

图3  $\alpha$ -Syn PFF对RA诱导分化的SH-SY5Y细胞相关蛋白表达及NO合成量的影响

Fig.3 Effect of  $\alpha$ -Syn PFF on the expression of related proteins and NO levels of RA-differentiated SH-SY5Y cells

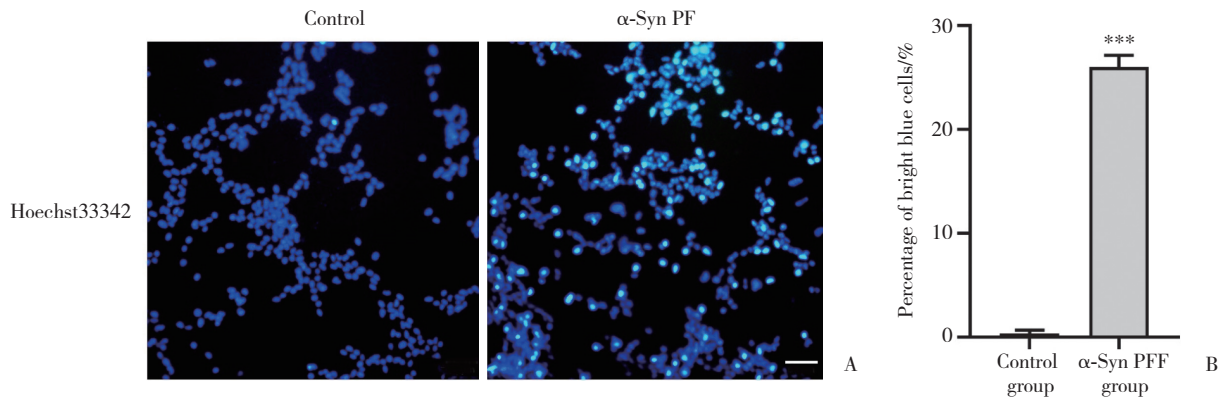
未添加 $\alpha$ -Syn PFF的分化SH-SY5Y细胞Hoechst 33342染色呈低蓝色荧光,染色质及细胞核形态正常,而添加了 $\alpha$ -Syn PFF的分化细胞Hoechst 33342染色呈亮蓝色荧光,提示细胞核染色质发生凝聚,细胞核固缩。与control组相比, $\alpha$ -Syn PFF组的亮蓝色荧光细胞数显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。见图4。

### 3 讨论

2012年,LUK等<sup>[7]</sup>将 $\alpha$ -Syn PFF应用于PD小鼠模型的制作,建立了包括路易体病理、多巴胺能神经元丢失和运动功能受损的小鼠PD模型,目前该模型已被广泛用于PD发病机制和治疗药物的筛选研究。但通过脑内注射 $\alpha$ -Syn PFF建立PD小鼠模型至少需要6个月的时间,利用 $\alpha$ -Syn PFF快速建立PD体外细胞

模型对研究PD治疗药物具有重要意义。目前常使用 $\alpha$ -Syn PFF处理原代小鼠胚胎皮层神经元,但从小鼠胚胎脑组织中分离培养神经元,操作具有一定的难度,且得到的细胞数量有限<sup>[8]</sup>。SH-SY5Y细胞来源于人神经母细胞瘤细胞系,具有神经元样形态和

生理特性,由于该细胞系具有许多多巴胺能神经元的特征,已被广泛用于研究PD的细胞模型。但该细胞在未分化状态下,主要表达不成熟神经元的标志物,缺乏成熟的神经元生物学特性,而使用RA可将其诱导分化为具有成熟神经元特征的细胞<sup>[9]</sup>。



A, fluorescence images of Hoechst 33342-stained differentiated SH-SY5Y cells (scale bar = 50  $\mu$ m); B, percentage of cells with condensed nuclei. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group.

图4  $\alpha$ -Syn PFF对RA诱导分化的SH-SY5Y细胞核形态的影响

Fig.4 Effect of  $\alpha$ -Syn PFFs on the nuclear morphology in RA-differentiated SH-SY5Y cells

为比较未分化与RA诱导分化的SH-SY5Y细胞形态学及神经元标志物的差异,本研究对上述2种细胞进行了神经元标志物的探究和验证。TH和DAT同为多巴胺能神经元的标志物<sup>[10]</sup>。Nestin在成熟的神经细胞中不表达<sup>[11]</sup>。LAG3是 $\alpha$ -Syn PFF的细胞膜蛋白受体,可介导 $\alpha$ -Syn PFF进行细胞间传播<sup>[12]</sup>。NeuN在多数成熟神经元细胞中表达<sup>[13]</sup>。MAP2是识别成熟神经元细胞体及树突的标志物<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,RA使SH-SY5Y细胞神经突起变得细长并交织成网状,TH、DAT、LAG3、MAP2和NeuN表达水平增加,Nestin表达水平减少。验证了RA分化诱导能使SH-SY5Y细胞出现成熟神经元细胞特征的观点。

PARP-1依赖性细胞死亡是一种与DNA损伤密切相关的调节性细胞死亡形式,已被证明与PD的发病机制有关<sup>[15]</sup>。其主要特征是DNA损伤造成PARP-1快速激活,刺激PAR产生,PAR携带线粒体上的AIF进入细胞核,染色质发生溶解,细胞死亡<sup>[16]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>表明 $\alpha$ -Syn PFF作用于原代小鼠胚胎皮层的神经元时主要通过激活NO合酶造成DNA损伤,激活PARP-1,刺激产生PAR,最终导致 $\alpha$ -Syn在细胞内积累和神经元死亡。为使用 $\alpha$ -Syn PFF建立一种快速、便捷的PD体外细胞模型,本研究使用 $\alpha$ -Syn PFF作

用于RA分化诱导4 d后的SH-SY5Y细胞,探究 $\alpha$ -Syn PFF是否也通过激活NO合酶诱导DNA损伤,从而通过PARP-1依赖性细胞死亡途径造成RA分化的SH-SY5Y细胞死亡。结果显示, $\alpha$ -Syn PFF使RA诱导分化的SH-SY5Y细胞NO合成量增加,DNA损伤标志物 $\gamma$ H2AX表达水平增加,PARP-1和PAR表达水平增加,细胞核固缩, $\alpha$ -Syn病理标志物pS129- $\alpha$ -Syn表达水平增加,TH表达量减少。本研究结果证实了 $\alpha$ -Syn PFF通过PARP-1依赖性细胞死亡途径造成RA分化诱导的SH-SY5Y细胞死亡。

综上所述,本研究以分化后具有成熟神经元特征的SH-SY5Y细胞及PARP-1依赖性细胞死亡为切入点,利用 $\alpha$ -Syn PFF建立了RA分化的SH-SY5Y细胞损伤模型,初步证明了RA分化后的SH-SY5Y细胞具有类成熟神经元特征,并且 $\alpha$ -Syn PFF可能通过激活RA分化的SH-SY5Y细胞内的NO合酶造成DNA损伤,使PARP-1过度激活和PAR积累,从而造成细胞死亡。

#### 参考文献:

- [1] FENG C, FLORES M, DHOJ C, et al. Observation of  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils interacting with SH-SY5Y neuroblastoma cell mem-

- branes using scanning ion conductance microscopy [J]. ACS Chem Neurosci, 2022, 13 (24) : 3547-3553. DOI: 10.1021/acscchemneuro.2c00478.
- [2] 丁雨潇, 栗璟曦, 宋琼, 等. 食蟹猴纹状体内注射 $\alpha$ -突触核蛋白预制原纤维对嗅球病理改变的影响 [J]. 天津医药, 2023, 51 (6) : 586-590. DOI: 10.11958/20221892.
- [3] CHO E, KIM K, KIM H, et al. Reelin protects against pathological  $\alpha$ -synuclein accumulation and dopaminergic neurodegeneration after environmental enrichment in Parkinson's disease [J]. Neurobiol Dis, 2022, 175 : 105898. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105898.
- [4] POLINSKI NK, VOLPICELLI-DALEY LA, SORTWELL CE, et al. Best practices for generating and using alpha-synuclein pre-formed fibrils to model Parkinson's disease in rodents [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8 (2) : 303-322. DOI: 10.3233/JPD-171248.
- [5] KAM TI, MAO XB, PARK H, et al. Poly (ADP-ribose) drives pathologic  $\alpha$ -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease [J]. Science, 2018, 362 (6414) : eaat8407. DOI: 10.1126/science.aat8407.
- [6] CONSTANTINESCU R, CONSTANTINESCU AT, REICHMANN H, et al. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y [J]. J Neural Transm Suppl, 2007 (72) : 17-28. DOI: 10.1007/978-3-211-73574-9\_3.
- [7] LUK KC, KEHM VM, ZHANG B, et al. Intracerebral inoculation of pathological  $\alpha$ -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative  $\alpha$ -synucleinopathy in mice [J]. J Exp Med, 2012, 209 (5) : 975-986. DOI: 10.1084/jem.20112457.
- [8] GORDON J, AMINI S. General overview of neuronal cell culture [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2311 : 1-8. DOI: 10.1007/978-1-0716-1437-2\_1.
- [9] REHFELDT SCH, SILVA J, ALVES C, et al. Neuroprotective effect of luteolin-7-O-glucoside against 6-OHDA-induced damage in undifferentiated and RA-differentiated SH-SY5Y cells [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (6) : 2914. DOI: 10.3390/ijms23062914.
- [10] 王飞, 张小蕾, 李含章, 等. 抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路对MPP<sup>+</sup>处理的SH-SY5Y细胞自噬、凋亡及PD特征蛋白表达的影响 [J]. 天津医药, 2023, 51 (5) : 449-454. DOI: 10.1007/s12031-019-01291-2.
- [11] JARAMILLO-RANGEL G, CHÁVEZ-BRIONES MDL, ANCERARELLANO A, et al. Nestin-expressing cells in the lung: the bad and the good parts [J]. Cells, 2021, 10 (12) : 3413. DOI: 10.3390/cells10123413.
- [12] MAO XB, OU MT, KARUPPAGOUNDER SS, et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3 [J]. Science, 2016, 353 (6307) : aah3374. DOI: 10.1126/science.aah3374.
- [13] WIATRAK B, KUBIS-KUBIAK A, PIWOWAR A, et al. PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions [J]. Cells, 2020, 9 (4) : 958. DOI: 10.3390/cells9040958.
- [14] LV M, ZHANG YJ, LIANG L, et al. Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line [J]. Nanoscale, 2012, 4 (13) : 3861-3866. DOI: 10.1039/c2nr30407d.
- [15] MARTIRE S, MOSCA L, D'ERME M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: a focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Mech Ageing Dev, 2015, 146-148 : 53-64. DOI: 10.1016/j.mad.2015.04.001.
- [16] DAWSON TM, DAWSON VL. Mitochondrial mechanisms of neuronal cell death: potential therapeutics [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017, 57 : 437-454. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-105001.

(编辑 于 溪)

(上接第4页)

- hesperadin exerts dual functions to ameliorate cardiac ischemia/reperfusion injury and inhibit tumor growth [J]. Circulation, 2022, 145 (15) : 1154-1168. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055920.
- [3] RHEIN C, MÜHLE C, LENZ B, et al. Association of a CaMK2A genetic variant with logical memory performance and hippocampal volume in the elderly [J]. Brain Res Bull, 2020, 161 : 13-20. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.05.001.
- [4] TAO W, LEE J, CHEN X, et al. Synaptic memory requires CaMK II [J]. Elife, 2021, 10 : e60360. DOI: 10.7554/eLife.60360.
- [5] MARTINEZ-CANTON M, GALLEGO-SELLES A, GELABERT-REBATO M, et al. Role of CaMK II and sarcolipin in muscle adaptations to strength training with different levels of fatigue in the set [J]. Scand J Med Sci Sports, 2021, 31 (1) : 91-103. DOI: 10.1111/sms.13828.
- [6] LEBEK S, PICHLER K, REUTHNER K, et al. Enhanced CaMK II-dependent late  $I_{Na}$  induces atrial proarrhythmic activity in patients with sleep-disordered breathing [J]. Circ Res, 2020, 126 (5) : 603-615. DOI: 10.1161/circresaha.119.315755.
- [7] BOYLE AJ, SCHULTZ C, SELVANAYAGAM JB, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta inhibition and ventricular remodeling after myocardial infarction: a randomized clinical trial [J]. JAMA Cardiol, 2021, 6 (7) : 762-768. DOI: 10.1001/jamacardio.2021.0676.
- [8] DURAN J, NICKEL L, ESTRADA M, et al. CaMK II  $\delta$  splice variants in the healthy and diseased heart [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9 : 644630. DOI: 10.3389/fcell.2021.644630.
- [9] 齐爽, 孙旋旋, 王绮萱, 等.  $\beta$ 淀粉样蛋白<sub>1-42</sub>质粒的构建及其与钙调蛋白的结合作用 [J]. 中国医科大学学报, 2024, 53 (6) : 495-500. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.06.003.
- [10] BACKS J. CaMK II transforms glucose into reactive oxygen species [J]. Circ Res, 2020, 126 (10) : 1327-1329. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316982.
- [11] HEIJMAN J, MUNA AP, VELEVA T, et al. Atrial myocyte NLRP3/CaMK II nexus forms a substrate for postoperative atrial fibrillation [J]. Circ Res, 2020, 127 (8) : 1036-1055. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316710.
- [12] SONG Z, SONG H, LIU D, et al. Overexpression of MFN2 alleviates sorafenib-induced cardiomyocyte necroptosis via the MAM-CaMK II  $\delta$  pathway in vitro and in vivo [J]. Theranostics, 2022, 12 (3) : 1267-1285. DOI: 10.7150/thno.65716.

(编辑 陈 姜)