

# 基于铁死亡探究 Nrf2/HO-1 信号通路对帕金森病模型小鼠行为学障碍的调控作用

郭敏 李佳 贺冠强 庞旭阳 王旭东 朱海生 李晓蕾

**【摘要】 目的** 探究核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1(Nuclear factorNF-E2-related factor 2/heme oxygenase,Nrf2/HO-1)信号通路对帕金森病 (Parkinson's disease,PD)模型小鼠行为学障碍的改善作用及其调控机制。**方法** 制备小鼠 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)模型,并给予 Nrf2 抑制剂 ML385 或铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1;实验结束后评估各组小鼠行为学表型、多巴胺能神经元损伤程度、氧化应激水平、Nrf2/HO-1 信号通路和铁死亡指标表达水平。**结果** 在 MPTP 小鼠模型中 ML385 加剧 MPTP 组小鼠行为学障碍及酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase,TH)阳性神经元丢失,进一步诱导  $Fe^{2+}$  沉积、活性氧(Reactive oxygen species,ROS)合成及丙二醛(Malondialdehyde,MDA)分泌,降低超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)和谷胱甘肽(Glutathione,GSH)的水平,增加酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(Acyl coenzyme a synthetase long chain family member 4,ACSL4)的蛋白表达,并抑制溶质载体家族 7 成员 11(Solute carrier family 7 member 11,SLC7A11)和谷胱甘肽过氧化物酶 4(Glutathione peroxidase 4,GPX4)的蛋白表达;给予 Ferrostatin-1 后可取消上述 ML385 介导的神经损伤作用,同时不影响 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平。**结论** Nrf2/HO-1 信号通路能够改善 PD 模型小鼠行为学障碍,其机制可能与抑制神经元铁死亡有关。

**【关键词】** 帕金森病 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 信号通路 氧化应激 铁死亡

**【中图分类号】** R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)05-0448-09

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.05.006

**Regulating effects of Nrf2/HO-1 signal pathway on ferroptosis-induced behavioral dysfunction in mouse model of Parkinson's disease** Guo Min\*, Li Jia, He Guanqiang\*, et al. \* Department of Neurology, Handan Central Hospital, Handan Hebei 056001

**【Abstract】 Objective** The purpose of this study is to investigate the ameliorative effects and the regulatory mechanisms of Nrf2/HO-1 signal pathway on behavioral dysfunction in mouse model of Parkinson's disease (PD). **Methods** Made preparation of MPTP mice model. In the MPTP mice model, ML385 (Nrf2 inhibitor) or Ferrostatin-1 (ferroptosis inhibitor) was administered. Behavioral analysis, dopaminergic neuronal losses, oxidative stress, and the expression of the proteins involved in the Nrf2/HO-1 signaling pathway and ferroptosis were evaluated after the experimental manipulation in mice. **Results** ML385 exacerbated behavioral deficits, tyrosine hydroxylase (TH)-positive neuronal losses, also further led to the overloaded iron deposition, ROS accumulation and Malondialdehyde (MDA) excretion. Meanwhile, ML385 decreased the level of SOD and glutathione (GSH), increased the protein expression of ACSL4 and the suppressed the protein expression of SLC7A11 and GPX4 in mouse model of PD. By contrast, administration of Ferrostatin-1 abolished the above ML385-mediated neurological damage effects without affecting the protein expression levels of Nrf2 and HO-1. **Conclusion** Nrf2/HO-1 signal pathway can improve behavioral impairment in MPTP-induced mice, and perhaps its mechanism is related to inhibiting ferroptosis of dopaminergic neuron.

**【Key words】** Parkinson's disease Nrf2/HO-1 signal pathway Oxidative stress Ferroptosis

基金项目:河北省卫健委项目(202105148);沧州市科技计划项目(21422083136);邯郸市科学技术研究与发展项目(21422083136)  
作者单位:056001 河北省邯郸市中心医院神经内三科[郭敏 贺冠强 庞旭阳 王旭东 朱海生(通信作者) 李晓蕾,检验科(李佳)]

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种好发于中老年人的神经退行性疾病 (Neurodegenerative diseases, NDDs)。有研究表明,帕金森病的患病率和发病率随着年龄的增长而增高<sup>[1]</sup>。PD 与多

种不良的临床运动障碍相关,包括运动迟缓、静息性震颤、强直和姿势不稳<sup>[2]</sup>。目前,大多数 PD 治疗处方药为左旋多巴和多巴胺受体激动剂<sup>[3]</sup>。前者是近年来常用的临床治疗 PD 药物,但会引起如运动障碍等不良反应<sup>[4]</sup>,而后者会引起严重的非运动副作用如幻觉和睡眠障碍等<sup>[5]</sup>。由于 PD 的发病进程漫长且缓慢,预防原发性神经变性或增强代偿机制的治疗可以有效防止 PD 患者晚期出现身体异常,研发此类靶向性抗 PD 药物可能成为一种有前景的治疗策略。

多巴胺能神经元死亡的确切原因目前尚不清楚,但有研究表明活性氧(Reactive oxygen species, ROS)引起的氧化应激反应通过诱导多巴胺自氧化、线粒体损伤和凋亡来参与 PD 的发病机制<sup>[6]</sup>。由于 PD 患者的抗氧化防御系统(Antioxidative defense systems, ADSs)受损,失控的氧化应激系统会损伤多巴胺能神经元,进而导致其死亡<sup>[7]</sup>。有研究发现,核因子 2-相关因子 2(Nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)是一种参与 ADSs 相关基因表达的转录因子包括过氧化氢酶(Catalase, CAT)<sup>[8]</sup>、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸[Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase, NAD(P)H]、醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO1)<sup>[9]</sup>和血红素加氧酶 1(Heme oxygenase 1, HO-1)<sup>[10]</sup>。因此, Nrf2 是新型神经保护药物的潜在靶点。

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式,由铁依赖的脂质过氧化作用启动,并受到多种生物学过程的调控,如铁代谢、氧化还原稳态、脂质和氨基酸代谢<sup>[11]</sup>。大量铁离子通过芬顿反应诱导产生脂质 ROS,进而加速脂质的过氧化反应,最终导致细胞发生铁死亡<sup>[12]</sup>。此外,铁死亡的启动还涉及到谷胱甘肽过氧化物酶 4(Glutathione peroxidase 4, GPX4)的失活以及氨基酸代谢的功能失调,例如谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的耗竭、胱氨酸的缺失及脂质 ROS 防御机制的失衡<sup>[13]</sup>。铁死亡自 2012 年被提出以来已被发现与包括 NDDs 在内的多种疾病密切相关<sup>[14]</sup>。有研究证实,铁沉积在 PD 动物模型<sup>[15]</sup>和患者<sup>[16]</sup>的黑质致密部(Substantia nigra pars compacta, SNc)区是选择性升高的,并有助于多巴胺能神经元铁死亡的启动。有研究进一步发现,铁螯合治疗可以显著抑制铁死亡和改善 PD 综合征<sup>[17]</sup>。因此,抑制 SNc 区中的铁沉积以改善多巴胺能神经元铁死亡是治疗 PD 的潜在靶点。

最近研究表明, Nrf2 及其下游靶基因 HO-1 介导酸枣仁复方对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中神经元铁死亡和突触损伤的防治作用<sup>[18]</sup>。在缺血再灌注损伤中葛根素通过上调 Nrf2/HO-1 通路、降低 ROS 水平,进而抑制细胞发生铁死亡<sup>[19]</sup>。此外,食品药品监督管理局(Food and drug administration, FDA)最新批准的 omaveloxolone,作为 Nrf2 激活剂可以有效减少遗传性运动失调(Friedreich ataxia, FA)中 ROS 的产生并改善其铁代谢水平<sup>[20]</sup>。因此,本研究利用 MPTP 小鼠模型,旨在探讨 Nrf2/HO-1 信号通路通过调控多巴胺能神经元铁死亡介导 PD 模型小鼠行为学障碍的相关机制,为临床 PD 的防治提供一定的理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购自 Charles River (中国北京);所有小鼠均在无特定病原体的条件下饲养和处理;所有操作均按照动物护理和使用委员会批准的方案进行。

#### 1.1.2 试剂

MPTP, ML385, Ferrostatin-1 (Selleck);组织 Fe<sup>2+</sup> 测定、SOD, MDA, GSH 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);二氢乙啶(Dihydroethidium, DHE)试剂盒、增强型化学发光试剂(Enhanced chemiluminescence, ECL)发光液(ThermoFisher Scientific);3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(Vector Laboratories);二喹林甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白水平试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI)封片剂(碧云天生物技术研究); $\beta$ -肌动蛋白(Beta actin,  $\beta$ -actin)抗体(Santa Cruz);山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(Cell signaling technology);酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)抗体(Abcam);SLC7A11 抗体、GPX4 抗体、ACSL4 抗体、Nrf2 抗体、HO-1 抗体(Proteintech)。

#### 1.1.3 仪器

BX53 型光学显微镜(Olympus), Sorvall X1 Pro 型离心机、凝胶成像系统(ThermoFisher Scientific)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组、造模及给药

用随机数字表将小鼠分为对照(Control, CON)组、模型组(MPTP组)、ML385组、MPTP + ML385组和MPTP + ML385 + Ferrostatin-1组。除CON组和ML385组外,其他各组均接受MPTP刺激,即每周注射2次MPTP(20 mg/kg),连续注射5周;对照组小鼠注射等量的生理盐水。依据先前的研究<sup>[21-22]</sup>将ML385(30 mg/kg)和Ferrostatin-1(2 mg/kg)溶于含2%二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)的生理盐水中,在MPTP模型制备结束后立即进行腹腔给药;对照组给予20  $\mu$ L等体积含2% DMSO的生理盐水。

### 1.2.2 爬杆实验

小鼠在实验开始前1 d在杆子(直径1 cm、高50 cm)上训练120 s,记录小鼠从杆子上转身到爬下所需的总时间。

### 1.2.3 旷场实验

测试开始前先将小鼠在测试室中放置30 min以适应环境;将小鼠放置在实验用正方形塑料箱(40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 35 cm)中央,令其自由探索10 min。使用SMART 3软件(西班牙Panlab Harvard Apparatus公司)记录和分析小鼠的行为学表现。

### 1.2.4 免疫组化

选择超灵敏聚合物辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)IHC检测系统(美国拜尔莱柏特公司)用于免疫组化检测;将载玻片脱蜡、复水,并在柠檬酸缓冲液中微波10 min 3次以进行抗原回收,在流动的自来水中逐步冷却;将制备好的玻片在5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中浸泡10 min,用自来水冲洗3次,再放入1%封闭缓冲液中浸泡10 min;在载玻片上孵育特异性一抗,用盖玻片盖住每张载玻片后置于4℃下过夜,以进行抗体结合;将载玻片浸入三乙醇胺缓冲盐水溶液(Tris buffered saline, TBS)以松开盖玻片,室温下用超级增强剂溶液覆盖切片,40 min后用TBS冲洗,然后用HRP结合物孵育切片2 h;TBS彻底清洗后用DAB显色并用苏木精反染;DAB阳性信号的定量分析采用Image J软件。

### 1.2.5 小鼠脑组织中氧化应激指标及Fe<sup>2+</sup>水平检测

组织中的Fe<sup>2+</sup>, SOD, MDA和GSH的水平是通过相关试剂盒检测。在进行组织铁水平检测时用9倍体积的生理盐水研磨组织样本,按照试剂盒说明进行铁显影,并测量光密度值,铁离子水平以 $\mu$ mol/L/g表示;在进行氧化应激指标检测时液氮研

磨、制备脑组织匀浆,在10000 r/min下离心15 min,收集上清液后按照试剂盒说明书进行检测, SOD水平以U/mg表示,MDA水平以nmol/mg表示, GSH水平以 $\mu$ mol/g表示。

### 1.2.6 ROS水平检测

按照DHE试剂盒说明书检测中脑组织ROS的合成水平;将10  $\mu$ m厚的冰冻切片与DHE溶液在37℃孵育30 min,然后用DAPI封片处理;阳性细胞标记为红色,细胞核标记为蓝色;每块组织随机选取5个切片( $\times$ 400倍)拍照, Image J软件进行后续分析。

### 1.2.7 Western blotting

取小鼠脑组织提取蛋白质,放射免疫沉淀分析缓冲液裂解样品后选用BCA蛋白检测试剂盒定量蛋白质水平;在100℃下进行蛋白质变性10 min;每孔装入约30  $\mu$ g总蛋白,并在特定水平的十二烷基硫酸钠变性聚丙烯酰胺凝胶上分离;然后将蛋白质转移到聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;在室温下用5%脱脂乳封闭膜2 h;将本实验对应一抗和二抗依次孵育膜;采用ECL化学发光法进一步检测印迹, Image J软件对条带进行定量分析。

### 1.2.8 统计学处理

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准误表示,采用GraphPad Prism 9软件中Tukey-Kramer多重比较的单因素方差分析或Student's *t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 ML385对小鼠行为学的影响

与对照组比较,模型组小鼠爬杆所需总时间显著增加(图1),而自主运动总距离显著降低(图1)( $P < 0.05$ );与模型组比较,ML385进一步加重上述小鼠行为学缺陷( $P < 0.05$ )(图1)。

### 2.2 ML385对小鼠中脑黑质TH表达水平的影响

免疫组化显示,MPTP组小鼠中脑黑质多巴胺神经元明显缺失( $P < 0.01$ );给予ML385后加重上述趋势( $P < 0.01$ )(图2)。

### 2.3 ML385对小鼠中脑黑质氧化应激水平及Fe<sup>2+</sup>水平的影响

与对照组比较,MPTP显著增高小鼠中脑ROS水平( $P < 0.01$ );给予ML385后进一步促进ROS生成( $P < 0.05$ )(图3)。

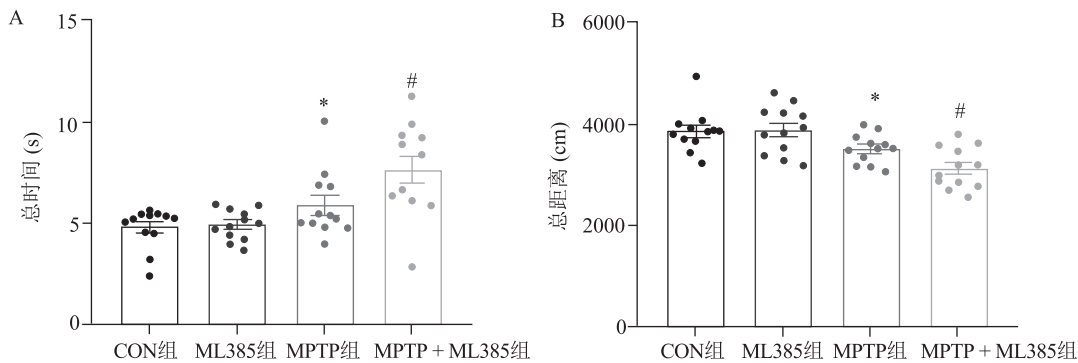


图 1 ML385 加重 MPTP 模型小鼠运动障碍 A 为爬杆测试所用的时间;B 为旷场试验总的运动距离; $n = 12$ ;与 CON 组比较,  $* P < 0.05$ ;与模型组比较,  $\# P < 0.05$

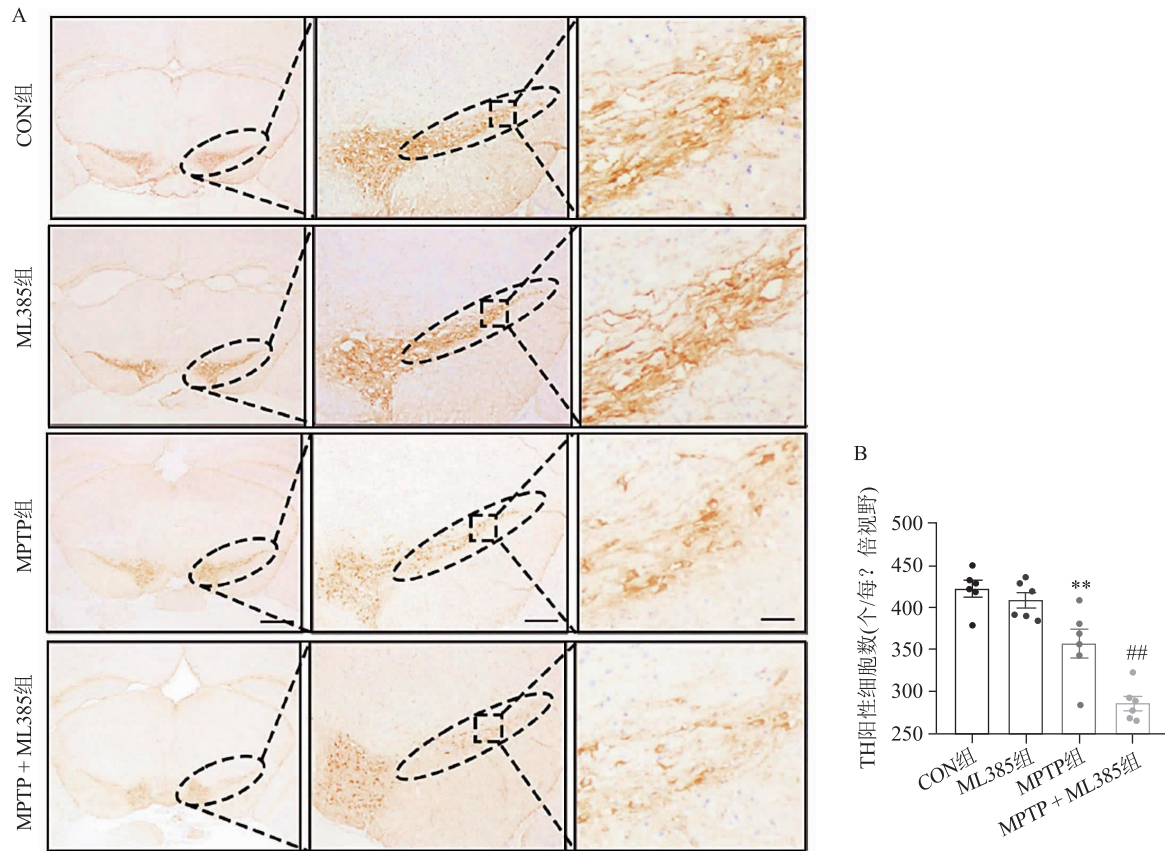


图 2 ML385 加重 MPTP 模型小鼠多巴胺能神经元的丢失 A,B 为小鼠中脑 TH 细胞免疫组化和统计分析;标尺 = 800、100、50  $\mu\text{m}$ ;  $n = 6$ ;与 CON 组比较,  $** P < 0.01$ ;与模型组比较,  $## P < 0.01$

与对照组比较, MPTP 模型小鼠中脑组织内 SOD 和 GSH 水平降低 ( $P < 0.05$ ) (图 4), MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  水平升高 ( $P < 0.05$ ) (图 4), 而 ML385 预处理进一步降低 SOD 和 GSH 的水平 ( $P < 0.05$ ), 同时促进 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  的表达上调 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

2.4 ML385 对小鼠中脑黑质铁死亡相关蛋白相对表达水平的影响

Western blot 显示, MPTP 显著降低 SLC7A11 和 GPX4 相对表达水平, 同时增加 ACSL4 蛋白相

对表达 ( $P < 0.05$ ); ML385 处理后进一步加强上述蛋白相对表达趋势 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

2.5 Ferrostatin-1 对 ML385 改善小鼠运动障碍的影响

与模型组比较, ML385 处理后小鼠爬杆所需总时间增加 (图 6), 而自主运动总距离降低 ( $P < 0.05$ ) (图 6); 上述小鼠运动障碍的情况在 Ferrostatin-1 给药后显著改善 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

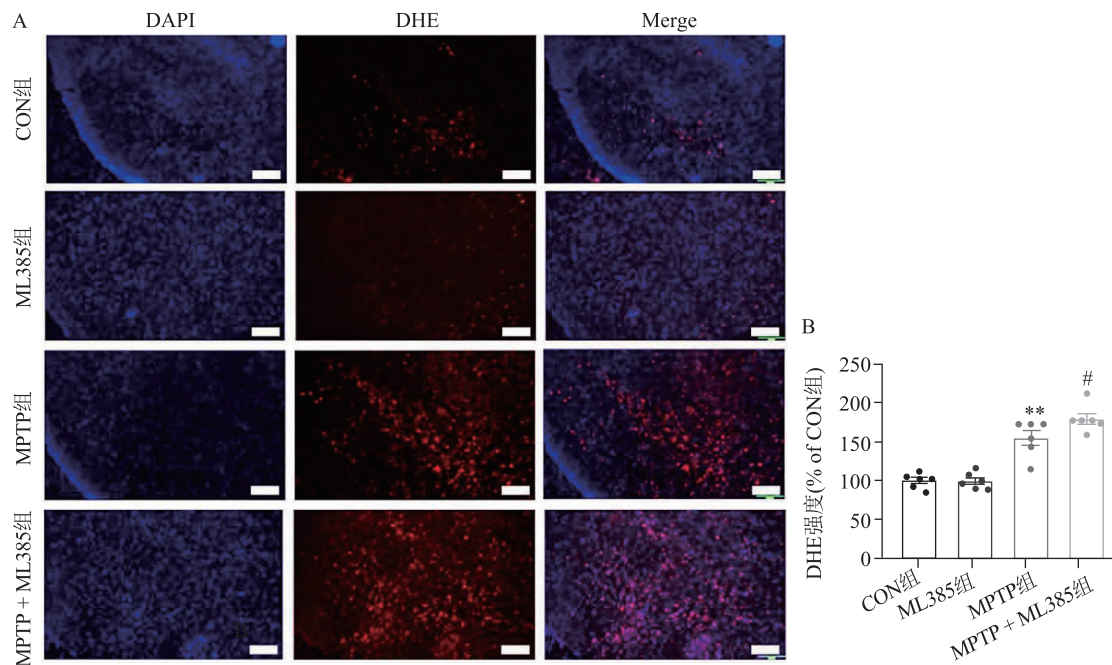


图3 ML385对小鼠中脑黑质 ROS 水平的影响 A,B为小鼠中脑 ROS-DHE 染色和统计分析;标尺 = 200 $\mu$ m; $n$  = 6;与 CON 组比较, \*\*  $P$  < 0.01;与模型组比较, #  $P$  < 0.05

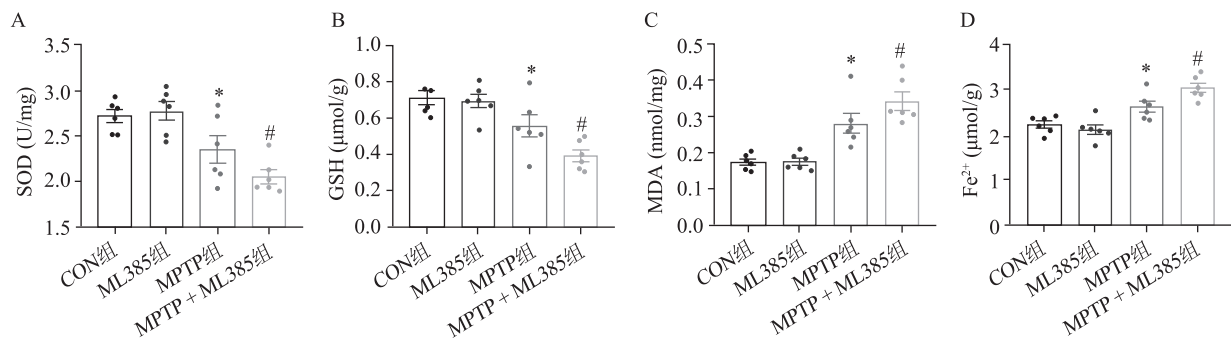


图4 ML385对小鼠中脑黑质 SOD,GSH,MDA 和 Fe<sup>2+</sup> 水平的影响 A为 SOD 水平;B为 GSH 水平;C为 MDA 水平;D为 Fe<sup>2+</sup> 水平; $n$  = 6;与 CON 组比较, \*  $P$  < 0.05;与模型组比较, #  $P$  < 0.05

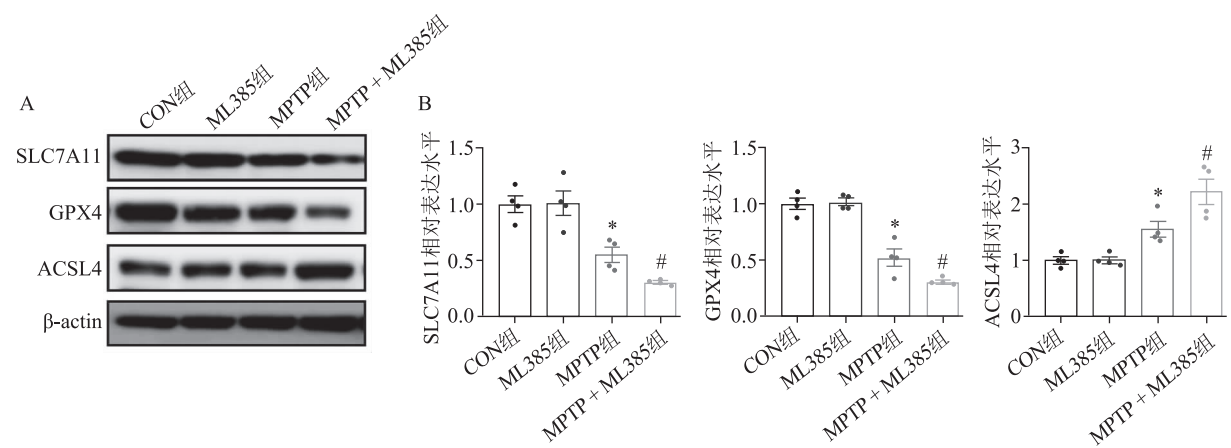


图5 ML385增加 MPTP 模型小鼠黑质铁死亡相关蛋白的相对表达 A为 SLC7A11,GPX4,ACSL4 相对表达水平;B为各组 SLC7A11, GPX4,ACSL4 相对表达水平比较; $n$  = 4;与 CON 组比较, \*  $P$  < 0.05;与模型组比较, #  $P$  < 0.05



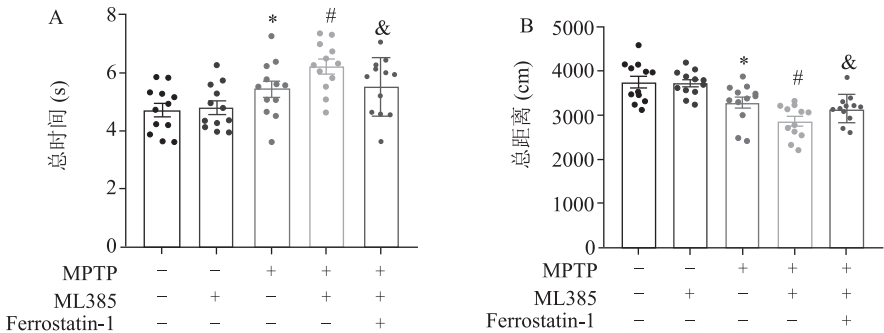


图6 Ferrostatin-1 取消 ML385 对 MPTP 模型小鼠运动障碍的加重作用  $n=12$ ;与 CON 组比较,  $*P<0.05$ ;与模型组比较,  $\#P<0.05$ ;与 MPTP+ML385 组比较,  $\&P<0.05$

2.6 Ferrostatin-1 对 ML385 减少黑质 TH 阳性神经元丢失的影响

如图 7 所示,与模型组比较,给予 ML385 的小鼠黑质 TH 阳性细胞数减少( $P<0.05$ );Ferrostatin-1 处理可显著缓解上述神经元丢失情况( $P<0.05$ )。

2.7 Ferrostatin-1 对 ML385 降低黑质氧化应激水平及  $Fe^{2+}$  水平的影响

如图 8 所示,ML385 给药后小鼠中脑 ROS 水平明显高于 MPTP 组( $P<0.05$ );Ferrostatin-1 预处理后显著抑制上述趋势( $P<0.05$ )。

ML385 给药后进一步降低模型组小鼠中脑 SOD 和 GSH 水平( $P<0.05$ ),升高 MDA 和  $Fe^{2+}$  水平( $P<0.05$ );Ferrostatin-1 预处理后 SOD 和 GSH 水平明显上调( $P<0.05$ ),而 MDA 和  $Fe^{2+}$  水平下调( $P<0.05$ )(图 9)。

2.8 Ferrostatin-1 对小鼠中脑黑质 Nrf2/HO-1 通路的影响

Western blotting 显示,ML385 可显著降低模型组中脑 Nrf2 和 HO-1 的相对表达水平( $P<0.05$ );进一步给予 Ferrostatin-1 治疗不影响上述蛋白相对表达水平变化趋势(图 10)。

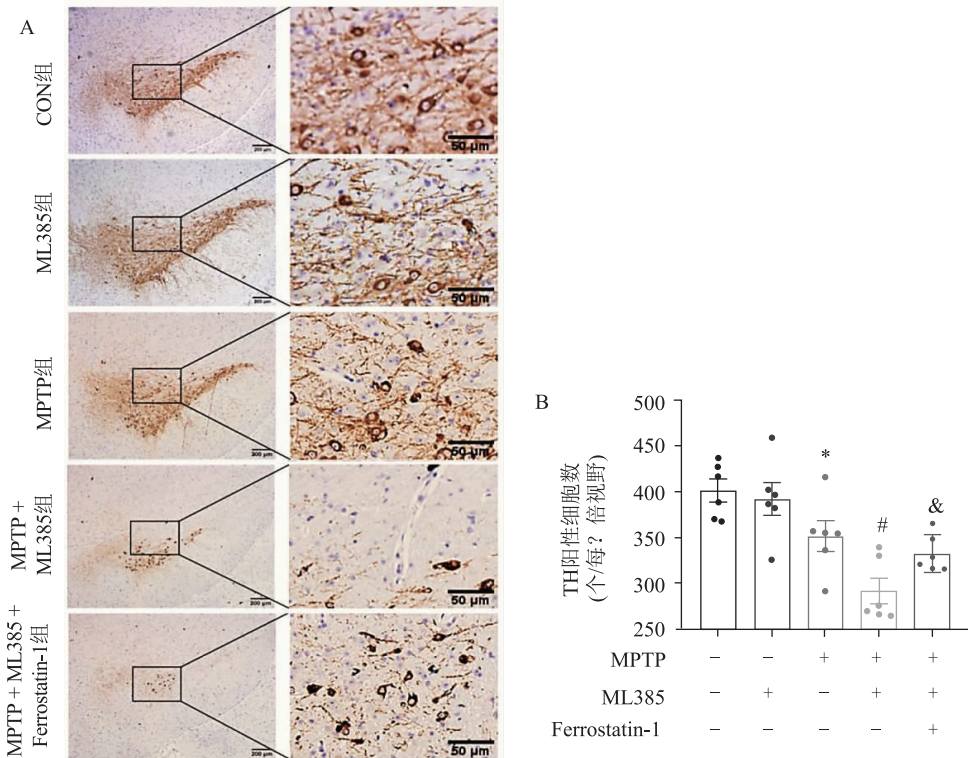


图7 Ferrostatin-1 恢复 ML385 对黑质 TH 阳性神经元丢失的抑制作用 A 为 TH 染色;B 为各组 TH 阳性神经元数比较; $n=6$ ;与 CON 组比较,  $*P<0.05$ ;与模型组比较,  $\#P<0.05$ ;与 MPTP+ML385 组比较,  $\&P<0.05$

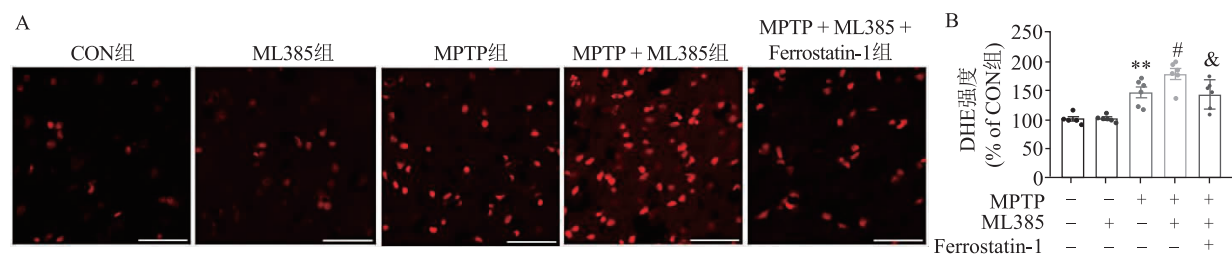


图8 Ferrostatin-1 对小鼠中脑黑质 ROS 水平的影响 A 为 DHE 染色;B 为各组 DHE 水平比较;标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ;  $n = 6$ ;与 CON 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ ;与 MPTP + ML385 组比较, &  $P < 0.05$

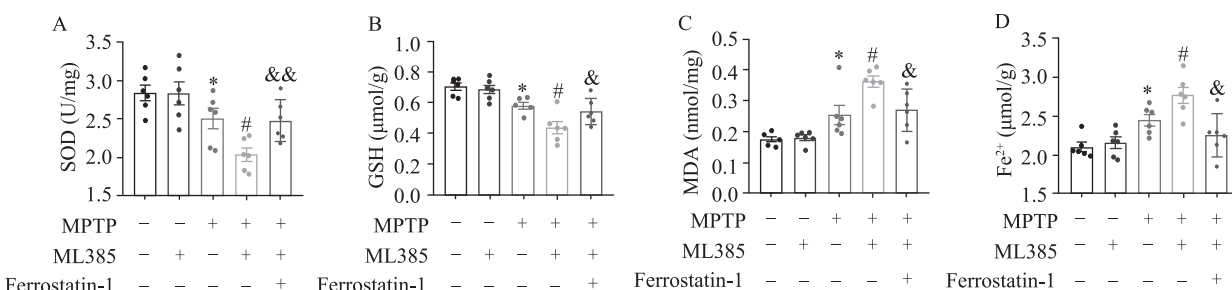


图9 Ferrostatin-1 对小鼠中脑黑质 SOD, GSH, MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  水平的影响 A 为 SOD 水平;B 为 GSH 水平;C 为 MDA 水平;D 为  $\text{Fe}^{2+}$  水平;  $n = 6$ ;与 CON 组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ ;与 MPTP + ML385 组比较, &  $P < 0.05$

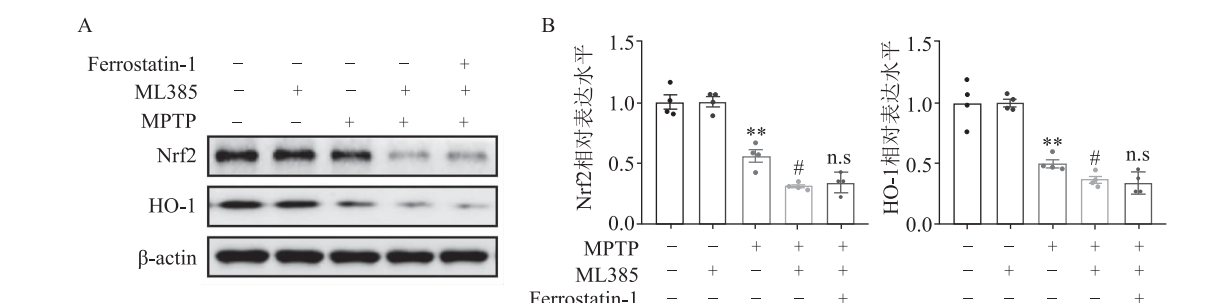


图10 Ferrostatin-1 不影响 MPTP 模型小鼠黑质 Nrf2 和 HO-1 的蛋白相对表达水平 A 为 Nrf2, HO-1 表达水平;B 为各组 Nrf2, HO-1 表达水平比较;  $n = 4$ ;与 CON 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , n.s  $P > 0.05$

3 讨论

PD 是目前最严重及最常见的 NDDs 之一,随着人口老龄化加重,其患病率预计将进一步显著增高<sup>[23]</sup>。多项研究详细阐述 Nrf2/HO-1 通路激活的神经保护作用及铁死亡参与 NDDs 发病进程的重要意义<sup>[24]</sup>,然而 Nrf2/HO-1 通路活化是否有助于改善 PD 患者中铁死亡发生尚不清楚。为了验证 Nrf2/HO-1 通路在 PD 模型小鼠铁死亡发生中的调控作用,本实验首先通过腹腔注射 MPTP 建立小鼠 PD 模型,并给予 Nrf2 抑制剂 ML385 处理;结果表明 ML385 可加重 MPTP 引起的小鼠运动障碍,SNc 区 TH 表达水平下降、增加  $\text{Fe}^{2+}$  沉积、ROS 合成及 MDA 分泌,进一步降低 SOD 和 GSH 的水平,增加 ACSL4 的蛋白表达及抑制 SLC7A11 和 GPX4

的蛋白水平,提示抑制 Nrf2 通路激活可加重多巴胺能神经元的丢失、氧化应激水平及细胞铁死亡程度,而给予铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 后可取消上述 ML385 介导的神经损伤作用,同时不影响 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平。综上所述, Nrf2/HO-1 信号通路能够改善 PD 模型小鼠行为学障碍,其机制可能与抑制神经元铁死亡有关。

MPTP 模型动物的神经细胞死亡涉及多种程序性细胞死亡模式包括铁死亡<sup>[25]</sup>。PD 模型动物的血脑屏障受损,大量游离铁和铁蛋白进入脑组织。MPTP 作为神经毒素诱导产生的酸性环境可促进  $\text{Fe}^{2+}$  与转铁蛋白的解离,导致细胞外  $\text{Fe}^{2+}$  水平升高,进而促进神经元对铁的摄取增加<sup>[26]</sup>。过量  $\text{Fe}^{2+}$  通过 Fenton 反应促进脂质过氧化,增加 ROS 产生和脂质过氧化积累。GPX4 将 GSH 还原为氧化型

谷胱甘肽(Oxidised glutathione,GSSC), GSSC 将脂质过氧化物转化为无毒的脂质醇,后者是一种重要的抗氧化剂<sup>[27]</sup>。PD 模型导致脂质过氧化物蓄积,消耗大量的 GSH,同时 GPX4 的表达水平和活性降低,导致抗氧化系统严重失衡。过氧化物的大量积累和抗氧化能力的严重缺乏激活铁死亡,最终导致细胞损伤甚至死亡<sup>[28]</sup>。本实验结果表明,MPTP 模型小鼠中脑的 ROS,MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  水平升高,而 GSH,GPX4 和 SOD 活性降低,表明铁死亡被激活,这与其他研究结果<sup>[29]</sup>一致。

铁死亡过程涉及相对复杂的生物学过程和非经典机制包括铁代谢紊乱、氨基酸抗氧化系统失衡和脂质过氧化物在体内蓄积。在众多调控铁死亡的信号通路中 Nrf2 介导的信号通路越来越受到广泛关注。Nrf2 是抗氧化过程的主要保护性调节因子,Nrf2 的激活对 PD 具有神经保护作用<sup>[30]</sup>;第二阶段解毒酶如 HO-1 可由 Nrf2 在抗氧化反应元件激活后表达<sup>[31]</sup>。此外,HO-1 及其血红蛋白降解产物是高效、敏感的抗氧化酶,作为 ROS 的清除剂,保护细胞免受氧化损伤和炎症<sup>[32]</sup>。SLC7A11 是胱氨酸/谷氨酸转运基因,是调控“铁过载介导的铁死亡”的关键基因,其敲除可诱导海马神经元发生铁死亡<sup>[33]</sup>。GPX4 通过抗氧化活性来防止脂质过氧化,维持膜脂双分子层稳态,从而抑制铁死亡<sup>[34]</sup>。此外,ACSL4 作为铁死亡的正性调节因子,可激活长链脂肪酸促进脂质合成,增加细胞对铁死亡的敏感性<sup>[35]</sup>。多项研究发现,靶向 Nrf2/HO-1 等相关信号通路,诱导或抑制铁死亡,是抗癌症、预防 NDDs 和缺血性疾病的潜在治疗方法<sup>[36]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,ML385 组 SCL7A11,GPX4 蛋白表达水平进一步降低,ACSL4 蛋白表达水平则升高。这提示 Nrf2 介导的信号通路参与调控 MPTP 小鼠模型铁死亡过程;Ferrostatin-1 处理后可取消上述 Nrf2 介导的蛋白表达趋势,同时不影响 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达情况。这表明在 MPTP 小鼠模型中 Nrf2/HO-1 信号通路能够调控中脑神经元铁死亡水平。

综上所述,本实验结果表明 Nrf2/HO-1 信号通路通过调控神经元铁死亡,减少多巴胺能神经元丢失、降低氧化应激水平,从而减轻 PD 模型小鼠行为学障碍,这可能为研发 PD 临床治疗靶点提供了新的选择和思路。

## 参 考 文 献

[1] Chen XY, Liu C, Xue Y, et al. Changed firing activity of nigra

dopaminergic neurons in Parkinson's disease[J]. *Neurochemistry International*, 2023, 162(0): 105465.

[2] Camargo CHF, Ferreira-Peruzzo SA, Ribas DIR, et al. Imbalance and gait impairment in Parkinson's disease: discussing postural instability and ataxia[J]. *Neurological Sciences*, 2024, 45(4): 1377-1388.

[3] Mantry S, Deshmukh S, Mahajan K, et al. A potential use of dopamine agonist and monoamine oxidase B inhibitor in Parkinson's disease as apply by transdermal patch[J]. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2023, 11(1): 2546-2557.

[4] di Biase L, Pecoraro PM, Carbone SP, et al. Levodopa-Induced dyskinesias in Parkinson's disease: an overview on pathophysiology, clinical manifestations, therapy management strategies and future directions[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(13): 4427.

[5] Scanga A, Lafontaine AL, Kaminska M. An overview of the effects of levodopa and dopaminergic agonists on sleep disorders in Parkinson's disease[J]. *J Clin Sleep Med*, 2023, 19(6): 1133-1144.

[6] Chakrabarti S, Bisaglia M. Oxidative stress and neuroinflammation in parkinson's disease: the role of dopamine oxidation products[J]. *ANTIOXIDANTS*, 2023, 12(4): 955.

[7] Chagraoui A, Anouar Y, De Deurwaerdere P, et al. To what extent may aminochrome increase the vulnerability of dopaminergic neurons in the context of Parkinson's disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2024, 168: 106528.

[8] Tognoloni A, Bartolini D, Pepe M, et al. Platelets rich plasma increases antioxidant defenses of tenocytes via Nrf2 signal pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13299.

[9] Wu JL, Hou SM, Yang L, et al. P62/SQSTM1 upregulates NQO1 transcription via Nrf2/Keap1a signaling pathway to resist microcystins-induced oxidative stress in freshwater mussel *crassostrea plicata*[J]. *Aquat Toxicol*, 2023, 255: 106398.

[10] Wei H, Li T, Zhang Y, et al. Cold stimulation causes oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in broiler heart via regulating Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2023, 116(0): 103658.

[11] Wu LY, Xian XH, Tan ZX, et al. The role of Iron metabolism, lipid metabolism, and redox homeostasis in Alzheimer's disease: from the perspective of ferroptosis[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(5): 2832-2850.

[12] Endale HT, Tesfaye W, Mengstie TA. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1226044.

[13] Dar NJ, John U, Bano N, et al. Oxytosis/ferroptosis in neurodegeneration: the underlying role of master regulator glutathione peroxidase 4 (GPX4) [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(3): 1507-1526.

[14] Zhang JB, Jia X, Cao Q, et al. Ferroptosis-regulated cell death as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases: current status and future prospects[J]. *ACS chemical neuroscience*, 2023, 14(17): 2995-3012.

[15] Shen QQ, Jv XH, Ma XZ, et al. Cell senescence induced by toxic interaction between  $\alpha$ -synuclein and Iron precedes nigral dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(2): 268-281.

[16] Zhang DL, Yao JY, Sun JY, et al. Iron accumulation in the ventral tegmental area in Parkinson's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1187684.

[17] Jiang XY, Wu KY, Ye XY, et al. Novel druggable mechanism



of Parkinson's disease; potential therapeutics and underlying pathogenesis based on ferroptosis[J]. *Med Res Rev*, 2023, 43 (4):872-896.

[18] Long QH, Li T, Zhu QH, et al. Suanzaoren decoction alleviates neuronal loss, synaptic damage and ferroptosis of AD via activating DJ-1/Nrf2 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323:117679.

[19] Li CX, Liu Y. Puerarin reduces cell damage from cerebral ischemia-reperfusion by inhibiting ferroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 693:149324.

[20] Pilotto F, Chellapandi DM, Puccio H. Omaveloxolone: a groundbreaking milestone as the first FDA-approved drug for Friedreich ataxia[J]. *Trends Mol Med*, 2024, 30(2):117-125.

[21] Shi KN, Li PB, Su HX, et al. MK-886 protects against cardiac ischaemia/reperfusion injury by activating proteasome-Keap1-NRF2 signalling[J]. *Redox Biol*, 2023, 62:102706.

[22] Zhang M, Liu ZM, Zhou W, et al. Ferrostatin-1 attenuates hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by inhibiting ferroptosis[J]. *Transl Pediatr*, 2023, 12(11):1944-1970.

[23] Wojciechowska O, Kujawska M. Urolithin A in health and diseases: prospects for Parkinson's disease management[J]. *ANTIOXIDANTS*, 2023, 12(7):1479.

[24] Wang Y, Lv MN, Zhao WJ. Research on ferroptosis as a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Ageing Research Reviews*, 2023, 91(0):102035.

[25] Liu T, Wang P, Yin H, et al. Rapamycin reverses ferroptosis by increasing autophagy in MPTP/MPP + -induced models of Parkinson's disease[J]. *Neural regeneration research*, 2023, 18 (11):2514-2519.

[26] Bailey DK, Clark W, Kosman DJ. The Iron chelator, PBT434, modulates transcellular Iron trafficking in brain microvascular endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2021, 16(7):e0254794.

[27] Zhang YG, Ye P, Zhu H, et al. Neutral polysaccharide from *Gastrodia elata* alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation via the NRF2/HO-1 signaling pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(3):e14456.

[28] Zheng ZJ, Zhang SS, Liu XJ, et al. LRRK2 regulates ferroptosis through the system Xc-GSH-GPX4 pathway in the neuroinflammatory mechanism of Parkinson's disease[J]. *J Cell Physiol*, 2024, 239(5):e31250.

[29] Li T, Tan Y, Ouyang S, et al. Resveratrol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ferroptosis[J]. *Gene*, 2022, 808:145968.

[30] Zamanian MY, Parra RMR, Soltani A, et al. Targeting Nrf2 signaling pathway and oxidative stress by resveratrol for Parkinson's disease: an overview and update on new developments[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(6):5455-5464.

[31] Hassanein EHM, Ibrahim IM, Abd-Alhameed EK, et al. Nrf2/HO-1 as a therapeutic target in renal fibrosis[J]. *Life Sci*, 2023, 334:122209.

[32] Lin QS, Li S, Jin HJ, et al. Mitophagy alleviates cisplatin-induced renal tubular epithelial cell ferroptosis through ROS/HO-1/GPX4 axis[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(4):1192-1210.

[33] Jiang PY, Zhou LY, Zhao LY, et al. Puerarin attenuates valproate-induced features of ASD in male mice via regulating Slc7a11-dependent ferroptosis[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2024, 49(3):497-507.

[34] Li JB, Liu J, Zhou Z, et al. Tumor-specific GPX4 degradation enhances ferroptosis-initiated antitumor immune response in mouse models of pancreatic cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(720):eadg3049.

[35] Chen XQ, Zhu J, Li XZ, et al. ARHGAP6 suppresses breast cancer tumor growth by promoting ferroptosis via RhoA-ROCK1-p38 MAPK signaling[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2024, 29(1):6.

[36] Yan RH, Lin BY, Jin WW, et al. NRF2, a superstar of ferroptosis[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(9):1739.

(2024-03-21 收稿)

(上接第 447 页)

[14] Yazdankhah M, Ghosh S, Shang P, et al. BNIP3L-mediated mitophagy is required for mitochondrial remodeling during the differentiation of optic nerve oligodendrocytes[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10):3140-3159.

[15] 吕霞, 黄丽, 张美琳, 等. 氟西汀调节 TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症体信号通路改善 CUMS 大鼠抑郁样行为[J]. *天津医药*, 2023, 51(2):160-165.

[16] Liu FY, Cai J, Wang C, et al. Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):347.

[17] Chen MX, Wang Z, Lai X, et al. Transient cardiac electrophysiological changes in a rat model of subarachnoid haemorrhage: a brain-heart interaction[J]. *Europace*, 2023, 25(6):euad171.

[18] Song MY, Lee DY, Chun KS, et al. The role of NRF2/KEAP1 signaling pathway in cancer metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9):4376.

[19] Shahcheraghi SH, Salemi FTE, Alam W, et al. The role of NRF2/KEAP1 pathway in glioblastoma: pharmacological implications[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(5):91.

[20] Cordaro M, D'Amico R, Morabito R, et al. Physiological and biochemical changes in NRF2 pathway in aged animals subjected to brain injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55(2):160-179.

[21] Zheng XH, Liu K, Xie QQ, et al. PHB2 alleviates neurotoxicity of prion peptide PrP106-126 via PINK1/Parkin-Dependent mitophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21):15919.

[22] Sherkhane B, Kalvala AK, Arruri VK, et al. Renoprotective potential of myo-inositol on diabetic kidney disease; focus on the role of the PINK1/Parkin pathway and mitophagy receptors[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(6):e23032.

[23] Li S, Liu MY, Chen JX, et al. L-carnitine alleviates cardiac microvascular dysfunction in diabetic cardiomyopathy by enhancing PINK1-Parkin-dependent mitophagy through the CPT1a-PHB2-PARL pathways[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2023, 238(3):e13975.

(2024-03-12 收稿)