

· 论 著 ·

去氧紫草素对小鼠原代神经元线粒体自噬的影响

路丁乙, 李 婷, 姚铖铖, 陈佳意, 赵 洁, 韩秋影, 李爱玲, 潘 欣

(国家生物医学分析中心, 北京 100850)

摘要:目的 基于定位于线粒体上的 Keima(mt-Keima)荧光蛋白研究去氧紫草素对小鼠神经元线粒体自噬的影响。方法 分离 mt-Keima 转基因和 C57BL/6 野生型胚胎小鼠大脑皮质神经元(分别命名为 mt-Keima 神经元和 C57BL/6 神经元)。用激光共聚焦显微镜观察 mt-Keima 神经元在 561 和 458 nm 激发波长下荧光信号,鉴定 mt-Keima 神经元 mt-Keima 荧光蛋白的表达。用自噬抑制剂巴弗洛霉素 A1 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 mt-Keima 神经元 24 h,用激光共聚焦显微镜观察神经元内的荧光信号,分析 561 和 458 nm 激发波长下荧光强度比值,检测 mt-Keima 神经元评价线粒体自噬的可靠性。去氧紫草素 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 mt-Keima 神经元 24 h,用激光共聚焦显微镜观察神经元荧光变化,分析 561 和 458 nm 激发波长下荧光强度比值,评价去氧紫草素对线粒体自噬活性的影响。去氧紫草素 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 C57BL/6 神经元 24 h,免疫荧光法检测 C57BL/6 神经元线粒体外膜受体蛋白 Tom20 的表达,四甲罗丹明甲酯染料染色后用激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位的变化。结果 激光共聚焦显微镜结果显示,分离的 mt-Keima 神经元表达 mt-Keima 蛋白。与二甲亚砜(DMSO)对照组相比,巴弗洛霉素 A1 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 561 和 458 nm 激发波长下的荧光强度比值下降($P<0.01$),表明线粒体自噬水平降低,mt-Keima 神经元可用于检测神经元线粒体自噬活性。与 DMSO 对照组相比,去氧紫草素 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 mt-Keima 神经元在 561 和 458 nm 激发波长下荧光强度比值增强($P<0.01$),表明 mt-Keima 神经元线粒体自噬水平增加。免疫荧光结果表明,去氧紫草素 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理,可使 C57BL/6 神经元 Tom20 蛋白表达降低($P<0.01$);激光共聚焦显微镜观察结果显示,去氧紫草素 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理,对 C57LB/6 神经元线粒体膜电位无明显影响。结论 去氧紫草素在不造成线粒体损伤的前提下可促进小鼠原代神经元线粒体自噬。

关键词: 去氧紫草素; 线粒体; Keima 荧光蛋白; 线粒体自噬; 神经元

中图分类号: R285, R963

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)01-0011-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.01.002

神经元主要依赖氧化磷酸化产生能量,因此线粒体健康状态对神经元功能至关重要^[1]。线粒体自噬(mitophagy)通过自噬方式特异性去除受损的线粒体,是维持线粒体质量控制的关键环节。鉴于神经元的特殊功能,神经系统的线粒体自噬水平非常活跃。神经元线粒体自噬与衰老和神经退行性疾病密切相关,神经元线粒体自噬异常会导致细胞内受损的线粒体累积,进一步诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,导致线粒体过度破裂,引起细胞损伤,从而加速机体衰老进程^[2]。因此,通过药理学方法增加或者恢复线粒体自噬,为延缓衰老及治疗神经退行性疾病探索新的治疗靶

点已成为研究热点^[3-4]。

为开发潜在的促进线粒体自噬的化合物,本研究从包含 502 个天然小分子化合物库中筛选促进神经元线粒体自噬的小分子,筛选得到去氧紫草素,该化合物是从中药紫草中提取的活性物质,具有免疫调节、抗炎和抗肿瘤等多种生物活性^[5-7],目前尚未见其能促进神经元线粒体自噬的报道。本研究通过分离具有全身线粒体定位的 Keima 蛋白(mitochondria-targeted fluorescent protein Keima, mt-Keima)转基因胚胎小鼠^[8]和 C57BL/6 野生型胚胎小鼠大脑皮质神经元,验证去氧紫草素对神经元线粒体自噬的促进作用,为治疗神经退行性疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

mt-Keima 转基因孕小鼠,孕龄 14.5~16.5 d,美国

基金项目: 国家自然科学基金(31871390)**作者简介:** 路丁乙,硕士研究生,主要从事线粒体异常与肿瘤发生研究。**通讯作者:** 潘 欣, E-mail: xpan@ncba.ac.cn

杰克森实验室, 库存号: 028072, 本实验室繁殖; C57BL/6 野生型孕小鼠, 孕龄 14.5~16.5 d, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK(京)2016-0006。神经元基础培养基、胎牛血清、N-2、B27 无血清添加剂和 DMEM 高糖培养基, 美国 Gibco 公司; 马血清和荧光封片剂(含 DAPI), 北京中杉金桥生物技术有限公司; 青霉素-链霉素双抗和多聚赖氨酸, 中科迈晨北京科技有限公司; 巴弗洛霉素 A1, 美国 Selleck 生物科技有限公司, 实验前溶于二甲亚砜(DMSO), 母液浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 去氧紫草素(含量 99.36%), 上海陶素生化科技有限公司, 实验前溶于 DMSO, 母液浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 胰蛋白酶和羰基氰化氯苯胺(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP), 美国 Sigma 公司; 小鼠抗人线粒体外膜受体蛋白 Tom20 单克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司; Alexa Fluor 488 标记羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体和 Hoechst 33342 细胞核染料、Lab-Tek 八腔室和四甲罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine, TMRM), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。激光共聚焦荧光显微镜, 德国 Zeiss 公司; 倒置相差显微镜, 日本 Nikon 公司; 黑色 96 孔板和高内涵成像分析仪, 美国 Perkin Elmer 公司。

1.2 原代神经元的分离及培养

分离 *mt-Keima* 转基因和 C57BL/6 野生型胚胎小鼠大脑皮质神经元^[9](分别命名为 *mt-Keima* 神经元和 C57BL/6 神经元), 接种于含 10% 胎牛血清、10% 马血清和 1% 青霉素-链霉素双抗混合液的 DMEM 培养基中, 于 37°C , 5% CO_2 恒温培养箱培养 6 h, 换为神经元培养基(含 2% B27、1% N-2、谷氨酰胺以及青霉素-链霉素双抗混合液的 Neurobasal 基础培养基)继续培养, 培养 6~7 d 用于实验。

1.3 *mt-Keima* 荧光蛋白在 *mt-Keima* 神经元中表达的检测

分离得到的 *mt-Keima* 神经元按每孔 2×10^4 均匀接种于 Lab-Tek 八腔室中, 在神经元培养基中培养 7 d, 置激光共聚焦显微镜下观察, 在波长为 561 和 458 nm 激发下检测荧光强度, 反映 *mt-Keima* 荧光蛋白的表达。

1.4 巴弗洛霉素 A1 抑制 *mt-Keima* 神经元线粒体自噬的检测

分离得到的 *mt-Keima* 神经元在体外分化第 6 天时, 分别用巴弗洛霉素 A1 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和终浓度为 0.1% 的 DMSO(DMSO 对照组)处理 24 h 后, 置

激光共聚焦显微镜下观察, 在波长为 561 和 458 nm 激发下检测神经元荧光强度并拍照。用 Volocity 软件处理拍摄的图像, 分析每个神经元中 561 和 458 nm 荧光强度, 该荧光强度比值为线粒体自噬指数, 表示神经元线粒体自噬活性。

1.5 去氧紫草素促进 *mt-Keima* 神经元线粒体自噬的检测

分离得到的 *mt-Keima* 神经元在体外分化第 6 天时, 分别用去氧紫草素 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和终浓度为 0.1% 的 DMSO(DMSO 对照组)处理 24 h, 同 1.4 测定神经元线粒体自噬活性。

1.6 C57BL/6 神经元 Tom20 表达的检测

将 Platinum Line Cover Glass 玻片置 24 孔板内, 加入多聚赖氨酸 $300 \mu\text{L}$, 置 37°C 培养箱培养 1 h 后, 每孔接种 4×10^4 C57BL/6 神经元。在体外分化第 6 天时, 分别用去氧紫草素 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和终浓度为 0.1% 的 DMSO(DMSO 对照组)处理 24 h。神经元用 4% 多聚甲醛于 37°C 固定 15 min(多聚甲醛需提前预温), 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗 1 次; 用含 0.3% Triton X-100 的 PBS 打孔 10 min, 用含 3% 羊血清的 PBS(封闭液)室温封闭 1 h, 随后加入小鼠抗人 Tom20 单克隆抗体(1:400) 4°C 孵育过夜, 用 Alexa Fluor 488 标记羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体(1:400)室温孵育 1 h, 最后用荧光封片剂(含 DAPI)封片。室温晾干后, 置激光共聚焦显微镜下分析荧光强度, 表示 Tom20 蛋白表达水平。

1.7 C57BL/6 神经元线粒体膜电位的测定

C57BL/6 神经元在体外分化第 6 天时, 分别用去氧紫草素 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 24 h 和 CCCP $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 12 h(CCCP 为线粒体解偶剂, 破坏线粒体膜电位, 为阳性对照)。溶剂 DMSO(终浓度为 0.1%)处理 24 h 作为 DMSO 对照组。吸弃八腔室中的神经元培养基, 用神经元基础培养基稀释 TMRM, 配制成 TMRM 染色液(终浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在 37°C 孵育 30 min 后, 吸弃染色液, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 培养液换成新的神经元培养基, Hoechst 33342 (1:1000)溶于 PBS 中染核 8 min, 置激光共聚焦显微镜下观察扫描, 检测红色荧光强度, 表示线粒体膜电位水平。

1.8 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 GraphPad Prism6.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用双样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mt-Keima 荧光蛋白在 mt-Keima 神经元中表达

由图 1 所示,将分离的 mt-Keima 神经元体外培养 7 d 后,激光共聚焦荧光显微镜下观察发现,在 561 nm 激发下有明显的点状聚集红色荧光,指示进入酸性溶酶体中的线粒体;在 458 nm 激发下,神经元中有丝网状绿色荧光,指示中性胞浆中的线粒体。由此表明,mt-Keima 荧光蛋白在 mt-Keima 神经元中表达。

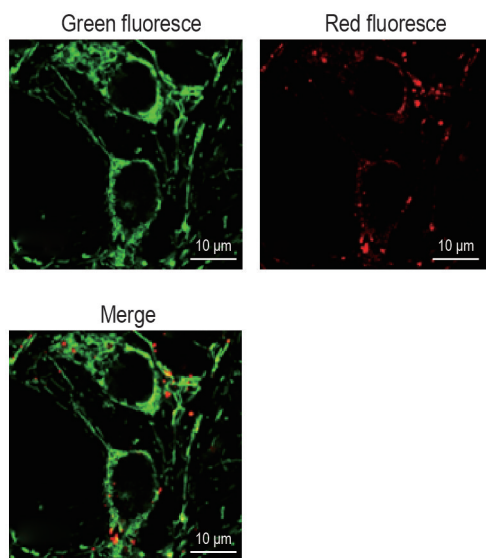


Fig. 1 Expression of mitochondrial-targeted form of fluorescent reporter unit Keima (mt-Keima) in primary neurons isolated from *mt-Keima* transgenic embryonic mice detected by confocal fluorescence microscopy. The neurons were excited with 458 nm laser (green) and 561 nm laser (red). Green fluoresce indicated mitochondria in neutral cytoplasm. Red fluoresce indicated mitochondria in lysosomes.

2.2 mt-Keima 荧光蛋白反映 mt-Keima 神经元线粒体自噬活性的验证

在激光共聚焦荧光显微镜下检测 mt-Keima 荧光强度。结果表明,与 DMSO 对照组相比,巴弗洛霉素 A1 100 nmol·L⁻¹ 处理后,mt-Keima 神经元红色荧光信号减弱,线粒体自噬指数下降 ($P<0.01$),表明巴弗洛霉素 A1 可抑制 mt-Keima 神经元线粒体自噬,mt-Keima 荧光蛋白可很好地反映线粒体自噬活性(图 2)。

2.3 去氧紫草素促进 mt-Keima 神经元线粒体自噬

mt-Keima 神经元给予去氧紫草素 100 nmol·L⁻¹ 处理后,与 DMSO 对照组相比,神经元中红色荧光信号增强,线粒体自噬指数增加 ($P<0.01$)(图 3),表明去氧紫草素可促进 mt-Keima 神经元线粒体自噬。

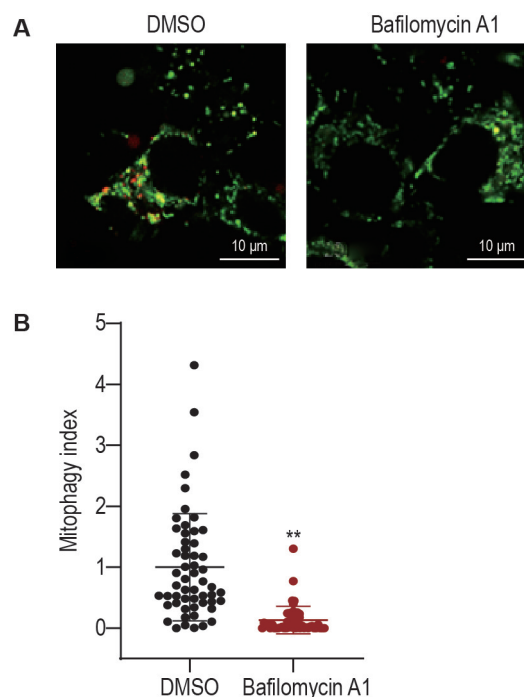


Fig. 2 Effect of bafilomycin A1 on mitophagy in primary neurons isolated from *mt-Keima* transgenic embryonic mice detected by confocal fluorescence microscopy. The primary neurons were treated with bafilomycin A1 100 nmol·L⁻¹ for 12 h. Mitophagy index=red fluorescent intensity/green fluorescent intensity. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s$, $n=55$ (DMSO group), 51 (bafilomycin A1 group). ** $P<0.01$, compared with DMSO group.

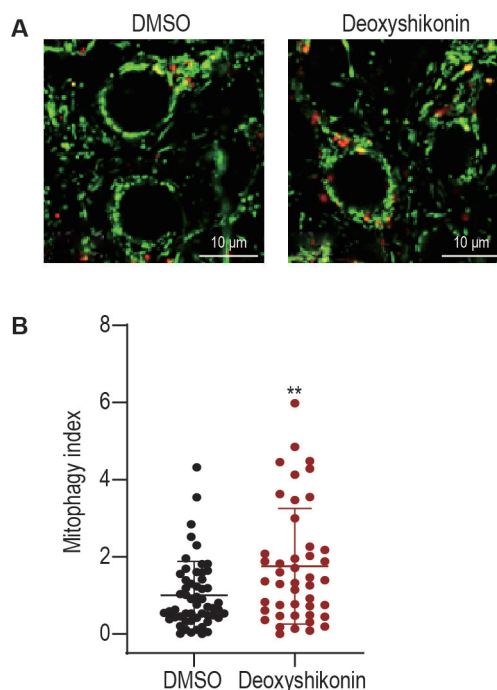


Fig. 3 Effect of deoxyshikonin on mitophagy in primary neurons isolated from *mt-Keima* transgenic embryonic mice detected by confocal fluorescence microscopy. The primary neurons were treated with deoxyshikonin 100 nmol·L⁻¹ for 24 h. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s$, $n=55$ (DMSO group), 45 (deoxyshikonin group). ** $P<0.01$, compared with DMSO group.

2.4 去氧紫草素促进 C57BL/6 神经元 Tom20 的降解

免疫荧光法检测结果表明,与 DMSO 对照组相比,去氧紫草素 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后绿色荧光减弱,提示 C57BL/6 神经元 Tom20 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$) (图 4),表明去氧紫草素促进 C57BL/6 神经元线粒体降解,线粒体自噬活性增强。

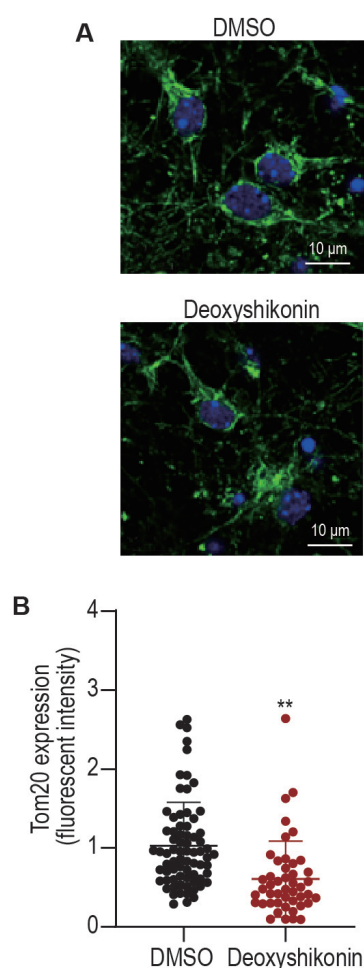


Fig.4 Effect of deoxyshikonin on expression of mitochondrial import receptor subunit Tom20 in primary neurons isolated from C57BL/6 wild-type embryonic mice detected by immunofluorescence staining. See Fig.3 for the neuron treatment. Nuclei were labelled with DAPI. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=73$ (DMSO group), 46 (deoxyshikonin group). ** $P < 0.01$, compared with DMSO group.

2.5 去氧紫草素对 C57BL/6 神经元线粒体膜电位的影响

如图 5 显示,与 DMSO 对照组比较,阳性对照 CCCP 处理后,C57BL/6 神经元红色荧光信号强度降低,表明线粒体膜电位下降 ($P < 0.01$);去氧紫草素处理后,C57BL/6 神经元均呈较强红色荧光,与 DMSO 对照组相比无显著差异,表明去氧紫草素对 C57BL/6 神经元线粒体膜电位无明显影响。

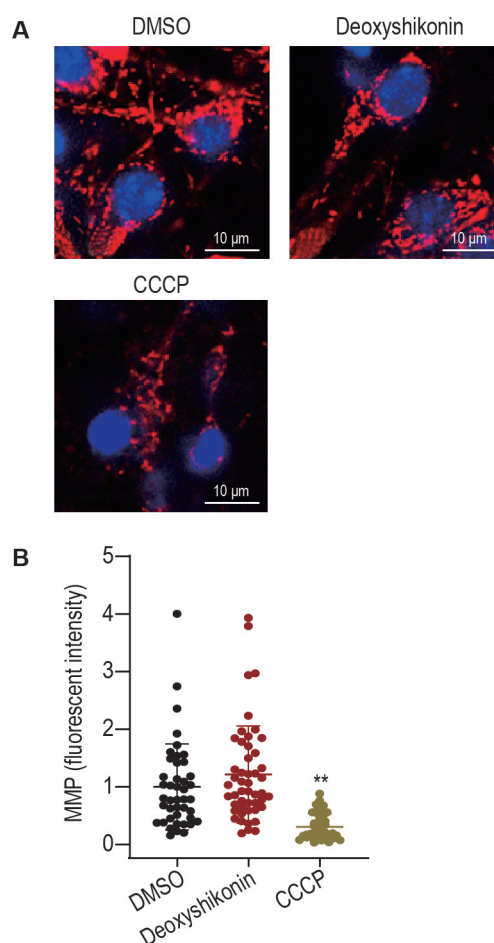


Fig.5 Effect of deoxyshikonin on mitochondrial membrane potential (MMP) in primary neurons isolated from C57BL/6 wild-type embryonic mice detected by confocal fluorescence microscopy. The primary neurons were treated with deoxyshikonin $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h or carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) $10 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 12 h and stained with TMRM. Nuclei were labelled with Hoechst. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=43$ (DMSO group), 49 (deoxyshikonin group), 41 (CCCP group). ** $P < 0.01$, compared with DMSO group.

3 讨论

线粒体是细胞中的代谢中心和信号枢纽^[10]。研究表明,线粒体功能障碍是多种神经退行性疾病的共同特征^[11-13]。因此,清除受损的线粒体,维持线粒体的正常功能,对于改善神经退行性疾病具有重要意义。由于神经元的再生能力低,能量需求高,线粒体自噬活性对神经元的健康状态至关重要^[14-15]。Keima 蛋白具有 pH 敏感性且不易被溶酶体进行降解的特性,目前已被应用于检测线粒体自噬。Katayama 等^[10]将线粒体定位序列与 Keima 进行融合表达,将 Keima 定位于线粒体,用于指示线粒体自噬。Sun 等^[8]构建了 *mt-Keima* 转基因小鼠模型,可在体内更符合生理条件下分析线粒体自噬

过程。本研究分离 *mt-Keima* 转基因胚胎小鼠大脑皮质神经元,经巴弗洛霉素 A1 处理后,神经元线粒体自噬被抑制,表明 *mt-Keima* 蛋白可用于检测线粒体自噬活性。

靶向线粒体自噬,通过药理学手段提高线粒体自噬水平,为干预衰老及年龄相关疾病提供新的途径,也是目前研究的热点^[16-18]。天然化合物在自然界中广泛存在,一般不良反应较小。目前报道的诱导线粒体自噬的天然化合物,如尿石素 A、亚精胺或烟酰胺单核苷酸等,可保护细胞并达到延缓衰老的作用^[16,19-20],然而在临床中可广泛应用的还非常少。因此,开发新的促进神经元线粒体自噬的天然化合物具有重要意义。本研究结果表明,基于 *mt-Keima* 体系筛选得到的天然小分子化合物去氧紫草素能促进 *mt-Keima* 神经元的线粒体自噬,并通过免疫荧光实验用 C57BL/6 神经元得到进一步验证。

线粒体膜电位是反映细胞内线粒体功能状态的重要参数之一。本研究结果表明,去氧紫草素 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 C57BL/6 神经元,并不影响线粒体膜电位,表明其在不造成线粒体损伤的前提下可促进神经元线粒体自噬。由于神经元较为敏感,高浓度去氧紫草素可导致神经元死亡,因此本研究选择 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行实验。实验结果表明,该浓度未导致神经元损伤,但可诱导线粒体自噬。

已知磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of Rapamycin, mTOR)途径是细胞自噬的重要通路。目前有研究表明,紫草素可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导宫颈癌细胞和乳腺癌细胞发生自噬^[21-22],从而发挥杀伤肿瘤细胞的作用。因此,去氧紫草素促进神经元线粒体自噬是否也靶向 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有待进一步研究。

综上所述,去氧紫草素可促进神经元线粒体自噬,在延缓衰老和治疗神经退行性疾病方面可能具有较好的应用前景。本研究为治疗衰老及年龄相关疾病提供了新思路。

参考文献:

- [1] Scheibye-Knudsen M, Fang EF, Croteau DL, *et al*. Protecting the mitochondrial powerhouse[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(3): 158-170.
- [2] Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons[J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1336-1349.
- [3] Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1062-1065.
- [4] Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, *et al*. Mitophagy in neurodegeneration and aging[J]. *Neurochem Int*, 2017, 109: 202-209.
- [5] Lin TJ, Lin HT, Chang WT, *et al*. Shikonin-enhanced cell immunogenicity of tumor vaccine is mediated by the differential effects of DAMP components[J/OL]. *Mol Cancer*, 2015, 14:174 [2021-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26403780/>. DOI: 10.1186/s12943-015-0435-9.
- [6] Zhang N, Peng F, Wang Y, *et al*. Shikonin induces colorectal carcinoma cells apoptosis and autophagy by targeting galectin-1/JNK signaling axis[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(1):147-161.
- [7] Liu Y, Kang X, Niu G, *et al*. Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 626-635.
- [8] Sun N, Yun J, Liu J, *et al*. Measuring *in vivo* mitophagy [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 685-696.
- [9] 董华, 李婷, 陈佳意, 等. 构建基于 Keima 蛋白的细胞自噬评价体系[J]. *生物技术通讯 (Letters in Biotechnology)*, 2019, 30(2): 158-162, 200.
- [10] Katayama H, Kogure T, Mizushima N, *et al*. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery[J]. *Chem Biol*, 2011, 18(8): 1042-1052.
- [11] Nguyen M, Wong YC, Ysselstein D, *et al*. Synaptic, mitochondrial, and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Trends Neurosci*, 2019, 42(2): 140-149.
- [12] Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 745-754.
- [13] Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives[J / OL]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(5): 21 [2021-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616350/>. DOI: 10.1007/s11910-018-0829-3.
- [14] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2006, 443(7113):787-795.
- [15] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, *et al*. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 880-884.
- [16] Fang EF, Kassahun H, Croteau DL, *et al*. NAD⁺ replenishment improves lifespan and healthspan in

- ataxia telangiectasia models via mitophagy and DNA repair[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(4): 566-581.
- [17] Fang EF, Hou Y, Palikaras K, *et al*. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3): 401-412.
- [18] Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, *et al*. Cardio-protection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine[J]. *Nat Med*, 2016, 22(12): 1428-1438.
- [19] Ryu D, Mouchiroud L, Andreux PA, *et al*. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents[J]. *Nat Med*, 2016, 22(8): 879-888.
- [20] Andreux PA, Blanco-Bose W, Ryu D, *et al*. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(6): 595-603.
- [21] 陈菊英, 刘朝纯, 曾智, 等. 紫草素通过 PI3K/Akt 通路促进人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬[J]. 中国药理学通报 (*Chinese Pharmacological Bulletin*), 2013, 29(2): 194-198.
- [22] 王书惠, 尹秀艳, 刘海英, 等. 紫草素通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和自噬[J]. 中国病理生理杂志 (*Chinese Journal of Pathophysiology*), 2019, 035(7): 1189-1194.

Effect of deoxyshikonin on mitophagy of mouse primary neurons

LU Ding-yi, LI Ting, YAO Cheng-cheng, CHEN Jia-yi, ZHAO Jie, HAN Qiu-ying, LI Ai-ling, PAN Xin
(National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)

Abstract: OBJECTIVE To explore the effect of deoxyshikonin on mitophagy of primary neurons using the mitochondria-targeted fluorescent protein Keima (mt-Keima). **METHODS** To validate the reliability of the mt-Keima system, the primary cortical neurons isolated from *mt-Keima* transgenic embryonic mice (mt-Keima neurons) were treated with autophagy inhibitor bafilomycin A1 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h, and mt-Keima fluorescence signals were observed and quantitatively analyzed by confocal fluorescence microscopy. Then, mt-Keima neurons were treated with deoxyshikonin $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h before mt-Keima fluorescence signals were observed and quantitatively analyzed using the same method. The expression of mitochondrial import receptor subunit Tom20 in primary neurons isolated from C57BL/6 wild-type embryonic mice (C57BL/6 neurons) was detected by immunofluorescence staining to further reflect the changes in mitophagy 24 h after the neurons were treated with deoxyshikonin $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The changes in mitochondrial membrane potential of C57BL/6 neurons were also detected by confocal fluorescence microscopy. **RESULTS** The results of confocal fluorescence microscopy showed that mt-Keima neurons expressed mt-Keima fluorescent protein. Compared with the DMSO group, mt-Keima displayed a lower fluorescence ratio (561 nm/458 nm) in the bafilomycin A1 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ group ($P < 0.01$), indicating that mt-Keima could be used to evaluate the extent of mitophagy. Compared with the DMSO group, mt-Keima displayed a higher fluorescence ratio (561 nm/458 nm) in the deoxyshikonin group ($P < 0.01$). In addition, immunofluorescence showed that deoxyshikonin promoted the degradation of Tom20 of C57BL/6 neurons ($P < 0.01$). The results of confocal fluorescence microscopy showed that there was no change in mitochondrial membrane potential of C57BL/6 neurons in the deoxyshikonin group compared with the DMSO group. **CONCLUSION** Deoxyshikonin promotes mitophagy in mouse primary neurons without causing any mitochondrial damage.

Key words: deoxyshikonin; mitochondria; Keima fluorescent protein; mitophagy; neurons

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31871390)

Corresponding author: PAN Xin, E-mail: xpan@ncba.ac.cn

(收稿日期: 2021-03-10 接受日期: 2021-04-27)

(本文编辑: 齐春会)