

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.04.011

Mitoferrin 过表达对鱼藤酮暴露下 PD 模型果蝇的影响

马雪凯, 肖桂然

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: 线粒体铁蛋白(mitoferrin)与线粒体功能联系密切, 而线粒体功能与帕金森病(Parkinson's disease, PD)密切相关。为研究 mitoferrin 对帕金森疾病的影响, 文章采用模式生物果蝇进行实验发现: 鱼藤酮暴露下的 PD 模型果蝇寿命、运动能力受到显著影响, 且 PD 模型果蝇的大脑活性氧(reactive oxygen species, ROS)荧光强度升高、腺苷三磷酸(ATP)水平降低; 多巴胺能神经元 mitoferrin OE 转基因果蝇在鱼藤酮暴露下的寿命、运动能力、ROS 积累等均有显著改善。结果表明, 多巴胺能神经元 mitoferrin OE 可以通过恢复大脑线粒体产能降低大脑的 ROS 积累挽救鱼藤酮暴露导致的果蝇 PD 表型。该研究为探究 PD 的发病机制和治疗提供了一定的理论支持。

关键词: mitoferrin 蛋白; 帕金森病(PD); 果蝇; 腺苷三磷酸(ATP); 活性氧(ROS)

中图分类号: Q963 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2025)04-0503-05

Effect of mitoferrin overexpression on rotenone induced *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease

MA Xuekai, XIAO Guiran

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Mitoferrin is closely associated with mitochondrial function, which is the focus in Parkinson's disease(PD). To study the effect of mitoferrin on PD, this paper adopted model organism *Drosophila melanogaster* for experimentation. It was found that the life span and motor ability of wild *Drosophila melanogaster* were significantly affected by rotenone exposure, and the fluorescence intensity of reactive oxygen species(ROS) of *Drosophila melanogaster* brain increased, while the adenosine triphosphate(ATP) level decreased. However, the life span, motor ability, ROS accumulation and ATP level of *Drosophila melanogaster* with dopaminergic neuron mitoferrin overexpression(mitoferrin OE) under rotenone exposure were significantly rescued. The results show that the dopaminergic neuron mitoferrin OE may save the *Drosophila melanogaster* PD model caused by rotenone exposure by restoring the brain mitochondrial productivity and reducing the brain ROS accumulation. This study provides theoretical support for exploring the pathogeny and treatment of PD.

Key words: mitoferrin; Parkinson's disease(PD); *Drosophila melanogaster*; adenosine triphosphate(ATP); reactive oxygen species(ROS)

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经系统退行性疾病, 同时 PD 最常见的症状是运动障碍, 其终生发病率约为 2%^[1]。PD 患者的临床

表现包括震颤、运动迟缓、身体不协调、肌肉僵直、不自主的摇晃等运动症状和频繁的情绪变化、焦虑、认知障碍、疼痛、睡眠障碍等非运动症状^[2]。目

收稿日期: 2023-02-24; 修回日期: 2023-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32170576); 安徽省重点研究与开发计划资助项目(202201020007)

作者简介: 马雪凯(1998—), 男, 山东栖霞人, 合肥工业大学硕士生;

肖桂然(1988—), 女, 山东邹城人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: xiaoguiran.101@163.com.

前,全球约有 800 万人受到 PD 的影响,PD 的持续时间长且难以治愈。给患者和护理人员带来过度压力,造成越来越大的社会经济负担^[3]。

PD 患者发病机理复杂,是一种受到遗传和环境因素影响的复杂疾病。*PINK1* 和 *parkin* 是常见的常染色体隐性 PD 基因,研究表明 *PINK1* 或 *parkin* 发生突变导致 PD 样表型^[4],但导致 PD 的单基因突变只在约 10% 的 PD 患者中发现,超过 90% 的 PD 患者是散发性 PD,即没有家族病史或遗传基因突变的情况。由重金属、化学农药、化工工艺毒副产物等环境毒素诱导的 PD 称为散发性 PD,对人类危害极大,研究表明,持续暴露于毒素环境易诱发各种神经退行性疾病。

动物模型是实验医学中了解人类疾病发病机制以及发现治疗各种疾病方法的重要工具。研究表明 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶-6-羟基多巴胺、百草枯、鱼藤酮等可在动物模型中用于诱导 PD 的临床特征^[5]。其中鱼藤酮是一种亲脂性化合物,易透过血脑屏障,能抑制线粒体复合物 I 活性并产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致细胞氧化还原系统失衡,对多巴胺能神经元产生神经毒性^[6]。目前,没有一种治疗方法可以有效减缓或阻止 PD 的进展,但对 PD 遗传机制和环境原因机制已有新的发现,而深入了解 PD 的病理机制是治疗该疾病的关键。

Mitoferrin 是线粒体载体家族的一员,通过线粒体内膜运输铁的转运体,mitoferrin OE 导致线粒体铁水平增加^[7]。研究表明 mitoferrin 在血红素的组装、铁硫团簇(ISC)的生物合成中发挥重要作用^[8],mitoferrin 对细胞和线粒体铁稳态至关重要^[9]。铁的独特化学性质使其参与系统中氧自由基的形成和脂质过氧化过程的诱导,这与 PD 进程关系密切^[10]。Tsf1 和 dZIP13 是果蝇体内的铁转运蛋白,研究表明,利用遗传学手段敲低 Tsf1 和过表达 dZIP13 能改变细胞内铁水平,从而影响果蝇帕金森疾病模型^[11]。考虑到 mitoferrin 与铁、线粒体功能的关系及线粒体与 PD 的密切关系,推测 mitoferrin 可能影响鱼藤酮诱导的果蝇 PD 表型。

本文以模式生物果蝇为研究对象,通过果蝇杂交获得多巴胺能神经元特异性 mitoferrin OE 果蝇,在鱼藤酮暴露下建立果蝇 PD 模型进行实验。通过分析 PD 模型果蝇的寿命、爬行能力、弹跳能力研究 mitoferrin OE 对 PD 的影响。进一步检测果蝇大脑的 ROS 水平和线粒体产腺苷三

磷酸(ATP)的能力,探究 mitoferrin OE 影响 PD 的原理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 果蝇品系及试剂

果蝇品系如下:野生型果蝇 W1118(编号 B# W1118)、TH-GAL4 多巴胺能神经元特异性表达工具果蝇(编号 8848)均购于 Bloomington Stock Centre); mitoferrin OE(编号 UAS-CG4963, t5)购于清华大学果蝇库。果蝇在标准玉米培养基上培养,条件为 25 °C、60%湿度、12 h 光照/12 h 黑暗处理。

即用型果蝇培养基购于 Genesee Scientific,酵母、鱼藤酮购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、琼脂粉购于 Bio-Froxx;超纯水自备。

1.1.2 果蝇标准玉米培养基

标准玉米培养基配方如下:玉米粉 50 g,大豆粉 5 g,红糖 20 g,白糖 15 g,酵母 13 g,琼脂粉 4 g,超纯水 500 mL。搅拌均匀并加热煮沸,静置冷却后加入 2%防腐剂,分装即可。

1.1.3 即用型鱼藤酮果蝇培养基

按每个果蝇培养管 0.3 g 即用型果蝇培养基称取备用,按 1 mmol/L 鱼藤酮称取并溶于少量 DMSO 溶解,溶液加入超纯水中搅拌均匀后加入 1%酵母继续混匀,按每管 1 mL 混合液加入即用型果蝇培养基的果蝇培养管中。对照组使用等量 DMSO 即可。制备好的培养基避光放置。

1.2 实验方法

1.2.1 果蝇帕金森病造模

收集羽化时间间隔不超过 2 d 的果蝇,按照每个培养管 20 只果蝇分别放入即用型果蝇培养基和鱼藤酮果蝇培养基中,避光饲养,每 2 d 更换 1 次果蝇培养基。饲养 7 d 左右即可成模。

1.2.2 果蝇寿命测定

各组准备 6 管果蝇,每管放入 20 只果蝇。放在果蝇培养箱中以 25 °C、60%湿度培养。每天换 1 次培养基,检查旧食物中是否有果蝇死亡,至果蝇全部死亡,及时记录。

1.2.3 果蝇爬行能力测定

将每组 20 只果蝇倒入攀爬管(管直径为 1.5 cm、管长为 20 cm)中,静置 15 min 待果蝇适应环境,在距底部 7 cm 处标记,敲击管子使果蝇落入管底部后立即计时,记录 8 s 内爬过 7 cm 标

记的果蝇数,以爬过刻度线的果蝇数与总数的比例作为爬行能力指标。

1.2.4 果蝇弹跳能力测定

将每组 10 只果蝇倒入空果蝇培养管,静置 15 min 待果蝇适应环境,将小管轻轻弹动开始弹跳行为学实验并计时,匀速、缓慢转动小管,记录 1 min 内果蝇的跳动次数,果蝇弹跳次数反映弹跳能力强弱。

1.2.5 ROS 测定

解剖果蝇大脑并收集到含有 PBS 的 12 孔板上,将 12 孔板置于冰上待全部组别解剖完成。用 PBS 将 DCFH-DA 原液稀释 1 000 倍制备工作液,将原有的 PBS 吸出,加入 DCFH-DA 工作液,避光孵育 10 min。用 PBS 室温避光洗 3 次。将样品放到载玻片上,封片后使用荧光显微镜观察果蝇大脑组织。

1.2.6 ATP 水平检测

解剖果蝇大脑并收集到 EP 管中,向管中加入 200 μL 无菌水,充分研磨 5 min。向 EP 管中加入 150 μL 无菌水,将样品沸水浴 5 min。待样品冷却,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 1 min。吸取 100 μL 上清至黑色不透明 96 孔板,进行 3 个平行对照实验。向 96 孔板中加入 100 μL Cell Titer-Glo 荧光细胞活性检测试剂盒的工作液。混匀后静置 10 min,使用荧光酶标仪检测化学发光强度,相对光单位值反映 ATP 的水平。

1.2.7 数据统计与分析

实验结果使用 Graph prism 9 进行 t 检验数据,实验结果均以(平均值 \pm 标准差)表示,组间统计学差异使用 One-way ANOVA 检验方法,NS 表示无显著性差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 PD 模型果蝇寿命分析

寿命是 PD 模型的重要指标之一。NF 和 RF 培养下的果蝇寿命如图 1 所示。

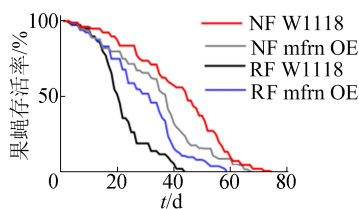


图1 果蝇存活率

图 1 中:NF(normal food)表示正常即用型果蝇培养基培养;RF(rotenone food)表示即用型鱼藤酮果蝇培养基培养;mfn OE 表示 mitoferrin OE。下同。由图 1 可知:NF 培养的 W1118 果蝇在 75 d 时全部死亡,而鱼藤酮暴露下 W1118 果蝇在 44 d 时全部死亡;但 mitoferrin OE 果蝇在 RF 暴露下第 59 天全部死亡。结果表明,喂养鱼藤酮的果蝇寿命缩短,但 mitoferrin OE 可以抵抗鱼藤酮诱导的果蝇寿命缩短。

2.2 PD 模型果蝇的爬行能力分析

爬行能力是观察 PD 模型是否造模成功的直观指标之一。正常食物和鱼藤酮暴露下的果蝇爬行能力如图 2 所示。从图 2 可以看出:NF 培养下,W1118 果蝇全部可以越过刻度线,即爬行能力为 100%,而相对 NF 培养下的 W1118 果蝇,鱼藤酮暴露一定时间后其爬行能力只有 2.86%;mitoferrin OE 果蝇在 NF 培养下的爬行能力为 92.86%,相对 NF 培养下 W1118 果蝇也有一定程度的下降,但在 RF 培养下,其爬行能力为 58.11%。结果表明 W1118 果蝇在鱼藤酮暴露下,其爬行能力相较于 NF 培养下的 W1118 果蝇有大幅下降,表明鱼藤酮成功诱导果蝇 PD 样。对于 mitoferrin OE 果蝇,NF 培养下会在一定程度上影响果蝇的爬行能力,但在鱼藤酮暴露下,mitoferrin OE 果蝇的爬行能力并没有比鱼藤酮暴露下 W1118 果蝇更低,反而抵抗鱼藤酮诱导的果蝇爬行能力的降低。

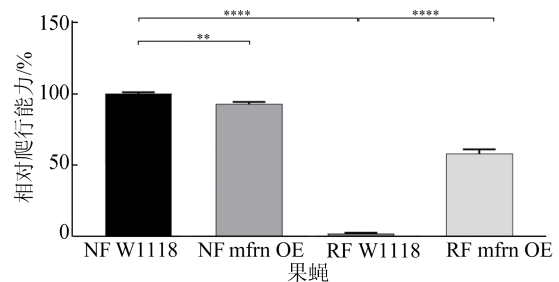


图2 果蝇的爬行能力

2.3 PD 模型果蝇的弹跳能力分析

果蝇的弹跳能力如图 3 所示。由图 3 可知,相较于 NF 培养,RF 培养下 W1118 果蝇的弹跳能力大幅下降, NF 培养下 mitoferrin OE 果蝇的弹跳能力下降 15%左右,而 RF 培养下,mitoferrin OE 弹跳能力相较于 RF 培养下的 W1118 果蝇则有显著挽救效果。结果表明,鱼藤酮暴露下,果蝇的弹跳能力大幅下降,而 mitoferrin OE

能挽救鱼藤酮暴露导致的果蝇弹跳能力的降低。

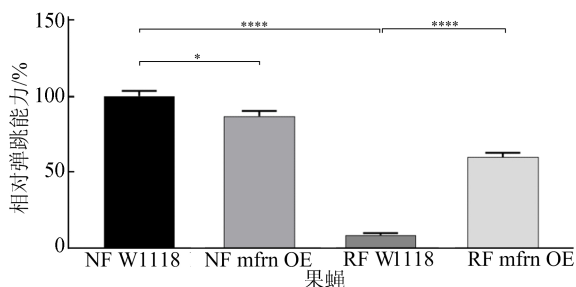
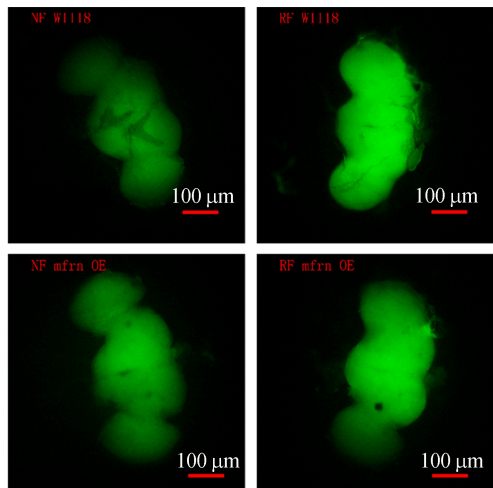


图 3 果蝇的弹跳能力

2.4 PD 模型果蝇的氧化应激压力分析

果蝇在鱼藤酮暴露下,鱼藤酮会抑制线粒体复合物 I 活性、干扰线粒体功能,提高大脑氧化应激水平。果蝇大脑 ROS 染色如图 4a 所示,荧光强度量化图如图 4b 所示。



(a) 果蝇大脑 ROS 染色

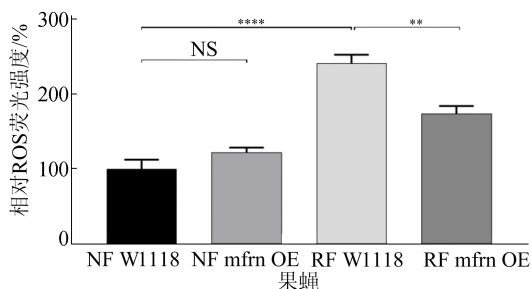


图 4 果蝇大脑 ROS 水平

从图 4 可以看出:在 NF 培养下,果蝇大脑 ROS 的荧光强度最弱,而鱼藤酮诱导的 PD 模型果蝇大脑内 ROS 荧光强度显著上升(236.63%);mitoferrin OE 果蝇在 NF 培养下 ROS 荧光强度有略微上升(110.14%),但与 NF 培养的 W1118 果蝇相比没有显著性差异;在 RF 培养下 mito-

ferrin OE 果蝇 ROS 的荧光强度显著降低(180.93%)。结果表明鱼藤酮暴露会增加大脑内的 ROS 水平,影响大脑内的氧化还原水平,但鱼藤酮暴露下的 mitoferrin OE 果蝇大脑的 ROS 水平相对 W1118 果蝇有明显挽救效果。说明 mitoferrin OE 能抵抗鱼藤酮暴露导致的大脑 ROS 水平升高,缓解鱼藤酮诱导的果蝇大脑氧化应激压力。

2.5 PD 模型果蝇的 ATP 水平

线粒体是 ATP 的主要来源,ATP 水解时释放能量,是生物体内直接的能量来源。果蝇大脑的 ATP 水平如图 5 所示。结果显示,W1118 果蝇在 RF 培养下的 ATP 水平显著降低(40.36%),表明鱼藤酮暴露下,果蝇线粒体复合物 I 受到抑制,线粒体产生 ATP 能力下降。mitoferrin OE 在 NF 培养下的 ATP 水平与 W1118 相比有所降低(95.97%),在 RF 培养下 mitoferrin OE 果蝇的大脑 ATP 水平相对 W1118 果蝇有一定挽救趋势(47.43%)。结果表明 mitoferrin OE 可能影响线粒体功能从而导致线粒体产能过程的异常。但在鱼藤酮暴露下,mitoferrin OE 能够挽救 PD 果蝇异常的 ATP 水平。

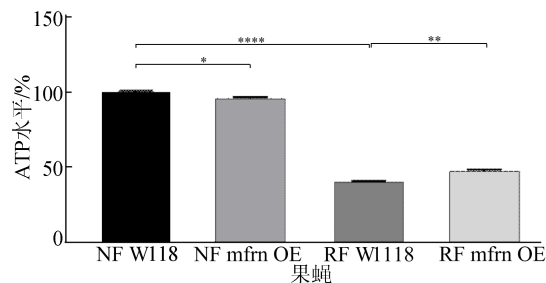


图 5 果蝇的 ATP 水平

3 结 论

本文以模式生物果蝇为研究对象,探究 mitoferrin OE 对鱼藤酮暴露下诱导的 PD 模型果蝇影响。结果表明,鱼藤酮暴露下 PD 模型果蝇的寿命缩短、爬行能力和弹跳能力下降,说明鱼藤酮成功诱导果蝇 PD 样,而 RF 培养下 mitoferrin OE 挽救 PD 模型果蝇表型。此外,鱼藤酮暴露抑制果蝇线粒体复合物 I 活性,使果蝇大脑内 ROS 水平上升,大脑内 ATP 水平降低,而 RF 培养下 mitoferrin OE 使果蝇大脑内 ROS 水平下降,ATP 水平回升。虽然 mitoferrin OE 对果蝇产生一定程度的负面影响,但在鱼藤酮暴露下,果蝇多

巴胺能神经元 mitoferrin OE 能抵抗鱼藤酮诱导的 PD 模型果蝇表型。这对研究 PD 的发病机制和找寻治疗 PD 的有效方法提供了一定的理论支持。

[参 考 文 献]

- [1] ARKINSON C, WALDEN H. Parkin function in Parkinson's disease[J]. *Science*, 2018, 360(6386): 267-268.
- [2] POLYMERPOULOS M H, LAVEDAN C, LEROY E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease[J]. *Science*, 1997, 276(5321): 2045-2047.
- [3] MACCHI Z A, KOLJACK C E, MIYASAKI J M, et al. Patient and caregiver characteristics associated with caregiver burden in Parkinson's disease: a palliative care approach [J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2020, 9: S24-S33.
- [4] GE P, DAWSON V L, DAWSON T M. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2020, 15(1): 1-18.
- [5] BISBAL M, SANCHEZ M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach [J]. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(5): 762-766.
- [6] THIRUGANAM T, SANTHAKUMAR K. Chemically induced models of Parkinson's disease[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2022, 252: 109213.
- [7] RICHARDSON D R, LANE D J R, BECKER E M, et al. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(24): 10775-10782.
- [8] MUDD A T, WAWORUNTU R V, BERG B M, et al. Dietary Alpha-Lipoic acid alters piglet neurodevelopment [J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2016, 4: 44.
- [9] PARADKAR P N, ZUMBRENNEN K B, PAW B H, et al. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(4): 1007-1016.
- [10] METZENDORF C, WU W L, LIND M I. Overexpression of *Drosophila mitoferrin* in l(2)mbn cells results in dysregulation of Fer1HCH expression[J]. *Biochemical Journal*, 2009, 421(3): 463-471.
- [11] XUE J, LI G, JI X, et al. *Drosophila* ZIP13 over-expression or transferrin1 RNAi influences the muscle degeneration of Pink1 RNAi by elevating iron levels in mitochondria [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2022, 160(5): 540-555.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 502 页)

- [29] 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022: 1-18.
- [30] 王莹, 赵全利, 胡莹, 等. 上虞某铅锌矿区周边土壤植物重金属质量比及其污染评价[J]. *环境化学*, 2011, 30(7): 1354-1360.
- [31] 迟清华, 鄢明才. 应用地球化学元素丰度数据手册[M]. 北京: 地质出版社, 2007: 82-83.
- [32] WANG S, CAI L M, WEN H H, et al. Spatial distribution and source apportionment of heavy metals in soil from a typical county-level city of Guangdong Province, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 655: 92-101.
- [33] 陈文德, 彭培好, 李贤伟, 等. 岩-土-植系统中重金属元素的迁聚规律研究[J]. *土壤通报*, 2009, 40(2): 369-373.
- [34] 刘意章, 肖唐付, 熊燕, 等. 西南高镉地质背景区农田土壤与农作物的重金属富集特征[J]. *环境科学*, 2019, 40(6): 2877-2884.
- [35] 马宏宏, 彭敏, 刘飞, 等. 广西典型碳酸盐岩区农田土壤-作物系统重金属生物有效性及迁移富集特征[J]. *环境科学*, 2020, 41(1): 449-459.
- [36] 夏飞强. 金寨-霍山地区元素地球化学特征及找矿潜力评价[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
- [37] RUDNICK R L, GAO S. Composition of the continental crust [J]. *Treatise on Geochemistry (Second Edition)*, 2014, 4: 1-51.
- [38] 余顶杰, 王勇生, 杨乘飞, 等. 郟庐断裂带南段两侧花岗岩地球化学特征: 对大别造山带中-下地壳流动的限定[J]. *岩石学报*, 2016, 32(4): 1001-1012.
- [39] 陈武, 任明强, 芦正艳, 等. 贵州典型喀斯特区土壤地球化学特征研究[J]. *中国岩溶*, 2010, 29(3): 246-252.
- [40] 牟保磊. 元素地球化学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999: 57-64, 82-91.
- [41] NRIAGU J O. Arsenic in the environment (Part II) [M]. New York: Wiley, 1994: 17-49.
- [42] 周亚龙, 杨志斌, 王乔林, 等. 雄安新区农田土壤-农作物系统重金属潜在生态风险评估及其源解析[J]. *环境科学*, 2021, 42(4): 2003-2015.
- [43] 王秋艳. 碳酸盐岩风化成土过程中重金属迁移富集特征及环境风险评估[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.

(责任编辑 吴亮)