

2-BFI 对氟化钠致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

徐婉¹ 张才溢² 闫微³ 耿德勤⁴

摘要 目的 通过观察神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)线粒体形态、功能及细胞凋亡的发生情况,探究唑啉化合物2-(2-苯并咪唑基)-2-咪唑啉(2-BFI)对氟化钠(NaF)诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用。方法 用不同浓度NaF(0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 mmol/L)处理SH-SY5Y细胞24 h,用CCK-8法检测SH-SY5Y细胞增殖能力;用NaF和不同浓度的2-BFI(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 μ mol/L)处理24 h,用CCK-8法检测SH-SY5Y细胞增殖能力。应用透射电镜观察线粒体形态,用ATP检测试剂盒、线粒体红色荧光探针(TMRM)试剂盒检测线粒体功能,用TUNEL染色法检测细胞凋亡的发生情况,用蛋白印迹法检测Bcl-2、Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平。结果 SH-SY5Y细胞存活率随NaF浓度的升高而逐渐下降,选定NaF后续实验浓度为2.0 mmol/L($P < 0.01$);2-BFI治疗24 h可以提高细胞存活率,在10 mmol/L时,细胞存活率较高,为99.169%,当浓度高于10 mmol/L时,细胞存活率随之下降,选定10 mmol/L为2-BFI后续实验浓度。与对照组相比,NaF组线粒体形态改变,ATP水平和线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)下降,细胞凋亡率上升,Bcl-2蛋白含量减少,Bax、cleaved caspase-3蛋白表达增高;与NaF组相比,2-BFI给药组线粒体形态改善,ATP水平和 $\Delta\psi_m$ 升高,细胞凋亡率降低,Bcl-2蛋白含量升高,Bax、cleaved caspase-3蛋白表达降低。结论 2-BFI可以改善SH-SY5Y细胞线粒体形态及功能,减少SH-SY5Y细胞凋亡,从而对氟中毒发挥神经保护作用。

关键词 氟中毒;2-BFI;SH-SY5Y;线粒体凋亡

中图分类号 R 749.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1739-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.010

地方性氟中毒(以下简称“地氟病”)是以氟骨症、氟斑牙为主要特征的一种慢性全身性疾病^[1]。

2022-07-15 接收

基金项目:江苏省高校基础科学(自然科学)研究项目(编号:21KJB180012)

作者单位:徐州医科大学¹第一临床学院、³生命科学学院遗传学教研室,徐州 221000

²徐州医科大学附属东方医院精神科,徐州 221000

⁴徐州医科大学附属医院神经内科,徐州 221000

作者简介:徐婉,女,硕士研究生;

耿德勤,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: gengdeqin@126.com

有研究^[2]表明,过量氟暴露会导致中枢神经系统结构受损和功能障碍。唑啉化合物2-(2-苯并咪唑基)-2-咪唑啉[2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline, 2-BFI]是咪唑啉2受体的选择性配体,在中枢神经系统线粒体膜上强烈表达,有研究^[3]表明2-BFI对神经系统具有保护作用。但是2-BFI对地氟病的神经毒性是否具有保护作用,还有待进一步研究。该实验通过应用SH-SY5Y细胞建立地氟病模型,观察细胞凋亡及对线粒体功能的变化,探究2-BFI对氟中毒的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 NaF购自上海阿拉丁试剂有限公司;2-BFI购自英国TOCRIS生物科技公司;DMEM高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自美国Gibco公司;青链霉素溶液、CCK-8试剂盒、TRIzol购自徐州Vicmed公司;多功能酶标仪购自美国BioTek公司;倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司;cleaved caspase-3、Tubulin抗体购自美国CST公司;Bcl-2、Bax抗体购自沈阳万类生物科技有限公司;SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒、BCA蛋白检测试剂盒、RIPA裂解液、增强型ATP检测试剂盒、线粒体红色荧光探针(Mito-tracker red CMXRos, TMRM)试剂盒(C1049B)购自上海碧云天生物技术公司;奥德赛激光成像系统购自美国LI-COR公司;Tunnel试剂盒(货号:MA0224)购自大连美仑生物公司;透射电子显微镜购自上海NULL公司。

精密称取NaF粉末41.99 mg,加入50 ml PBS缓冲液混匀至完全溶解,配制成20 mmol/L的储存液;在1 mg 2-BFI粉末中加入4.49 ml PBS缓冲液混匀至完全溶解,配制成1 mmol/L的母液,0.22 μ m 无菌过滤器过滤后于-20 $^{\circ}$ C保存,按需要浓度培养基稀释后使用。

1.2 细胞培养与分组 SH-SY5Y细胞购自中国科学院上海细胞库;SH-SY5Y细胞在DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清和1%青链霉素)中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。分组方法:① NaF筛选实验分组,将细胞随机分为对照组(不做处理)和实验

组(加入浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 mmol/L 的 NaF 培养 24 h)^[4]; ② 2-BFI 筛选实验分组,将细胞分为对照组(不做处理)、损伤组(仅 NaF)、2-BFI 组(NaF 和浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-BFI 培养 24 h)^[5]; ③ 药物浓度筛选之后将 SH-SY5Y 细胞随机分为对照组(不做处理)、NaF 组、NaF + 2-BFI 组,处理 24 h。

1.3 CCK-8 法检测细胞活性 将细胞按分组加入不同药物作用 24 h 后,加入 CCK-8 试剂 10 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,用酶标仪测量 450 nm 波长处吸光度(A)值。设置不含任何药物和细胞的等体积的培养液为空白孔。细胞存活率 = $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.4 ATP 浓度测定 吸除培养基,每孔加入 200 μl 裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min,取上清液测定浓度:加 100 μl ATP 检测工作液到检测孔内,室温放置 3 min,以消耗本底 ATP。在检测孔内加入 20 μl 样品或标准品,迅速混匀,用荧光酶标仪进行测定,根据标准曲线计算出样品中 ATP 的浓度^[6]。

1.5 线粒体膜电位检测 应用 TMRM 染色检测线粒体膜电位。取出孔板,吸除细胞培养液,加入 PBS 洗涤 1 次,加入 2 μl TMRM 染色液和 198 μl PBS 轻轻混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后,移液器吸弃 TMRM 工作液,加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的新鲜细胞培养液。用倒置荧光显微镜观察、拍照。

1.6 透射电子显微镜 将药物处理好的细胞胰酶消化离心,收集细胞,用 2.5% 戊二醛固定、脱水、包埋、固化,将制备好的样本进行超薄切片,用 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,然后用透射电镜进行观察、拍照。

1.7 TUNEL 染色法 用 PBS 洗涤细胞孔板后,加入组织固定液于室温下固定 30 min,通透 5 min,加入 50 μl TUNEL 检测液,使检测液均匀覆盖在样本上,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min,DAPI 染色液室温孵育 5 min。荧光显微镜下观察细胞染色结果,显示红色荧光的细胞为凋亡细胞。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.8 蛋白质印迹法 每个大皿加入 150 μl 细胞裂解液(RIPA:PMSF = 100:1),裂解完全后置于提前预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的离心机中,12 000 r/min 转速下离心 20 min。通过 BCA 法测定蛋白浓度,配平后煮沸使蛋白充分变性。15% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转至 NC 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,二抗室温孵育 2 h 后使用奥德赛

系统扫描条带,用 Image J 软件分析图像,以目的蛋白与内参蛋白的吸光度比值作为结果进行统计分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行统计分析,GraphPad Prism 8.0 软件做图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaF 对 SH-SY5Y 细胞活性的抑制作用

CCK-8 结果显示,SH-SY5Y 细胞的生长受到不同浓度的 NaF 的抑制,且细胞存活率随 NaF 浓度的升高呈下降趋势。与对照组相比,NaF 1.5 mmol/L 组($F = 12.89$, $P < 0.05$)、NaF 4.0 mmol/L 组($F = 12.89$, $P < 0.001$)细胞存活率下降,差异有统计学意义。以上提示 NaF 1.5 mmol/L 时开始出现明显抑制作用,当 NaF 浓度为 4.0 mmol/L 时,细胞抑制作用过度。当 NaF 质量浓度太低时,不能有效抑制细胞增殖,而 NaF 浓度过高则会引起细胞死亡过量,因此本实验选用 2.0 mmol/L 处理 24 h 作为后续研究的最佳浓度。见图 1。

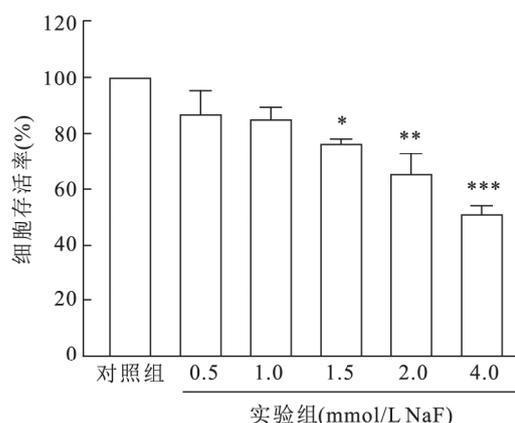


图1 NaF 对细胞增殖的影响

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 2-BFI 对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响 用 2.0 mmol/L NaF 处理 24 h 后再加入不同浓度的 2-BFI 处理 24 h。CCK-8 结果显示,当 2-BFI 浓度在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 到 10 $\mu\text{mol/L}$ 之间,细胞活性随药物浓度的升高而升高。与 NaF 组相比,2-BFI 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率最高为 99.16% ($F = 21.18$, $P < 0.001$),差异有统计学意义;当 2-BFI 浓度大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率随 2-BFI 浓度升高反而下

降 2-BFI 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,差异有统计学意义 ($F = 21.18, P < 0.01$)。见图 2。以上说明 2-BFI 发挥保护作用存在一个最佳浓度范围,浓度过高对细胞会产生损伤作用。因此 2-BFI 最佳作用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

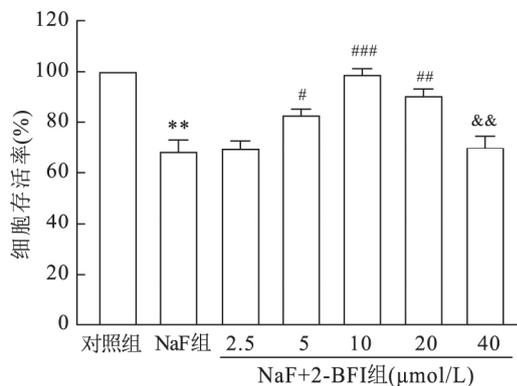


图 2 2-BFI 对细胞增殖的影响

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NaF 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 NaF + 2-BFI 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: && $P < 0.01$

2.3 2-BFI 对 SH-SY5Y 细胞线粒体形态的影响

通过电镜观察可知,对照组 SH-SY5Y 细胞线粒体呈椭圆形,线粒体嵴清晰,结构完整;NaF 组线粒体出现不同程度结构缺失,线粒体肿胀,结构松散,甚至部分呈空泡状,形态延长,出现丝状和管状线粒体;2-BFI 组大部分线粒体结构正常,有部分嵴模糊,但基本具有完整结构。见图 3。

2.4 2-BFI 对线粒体功能的影响

与对照组比较,NaF 组 ATP 水平下降 ($F = 1.155, P < 0.001$);与 NaF 组比较,NaF + 2-BFI 组 SH-SY5Y 细胞的 ATP 水平升高 ($F = 1.155, P < 0.001$)。见图 4。与对照组相比,NaF 组 TMRM 荧光强度降低 ($F = 15.61, P < 0.01$);与 NaF 组比较,NaF + 2-BFI 组 TMRM 的荧

光信号升高 ($F = 15.61, P < 0.01$)。见图 5。以上结果提示 2-BFI 可以改善 NaF 引发的线粒体膜电位 ($\Delta\psi_m$) 的降低情况。

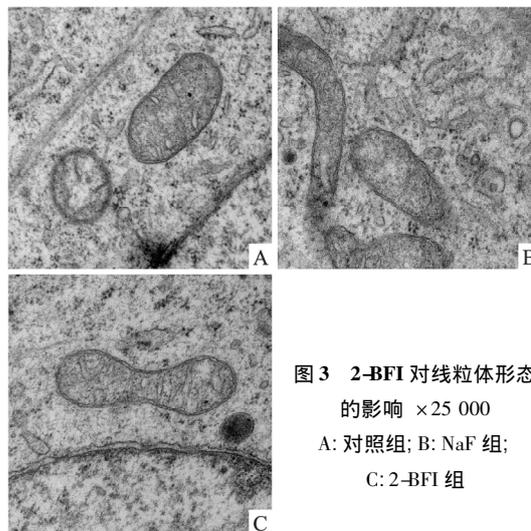


图 3 2-BFI 对线粒体形态的影响 $\times 25\ 000$
A: 对照组; B: NaF 组;
C: 2-BFI 组

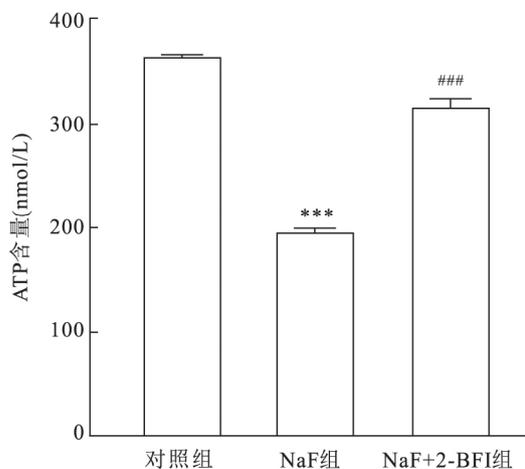


图 4 2-BFI 对 ATP 水平的影响

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 NaF 组比较: ### $P < 0.001$

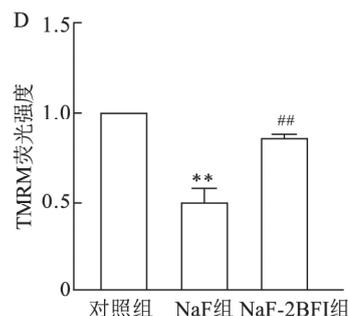
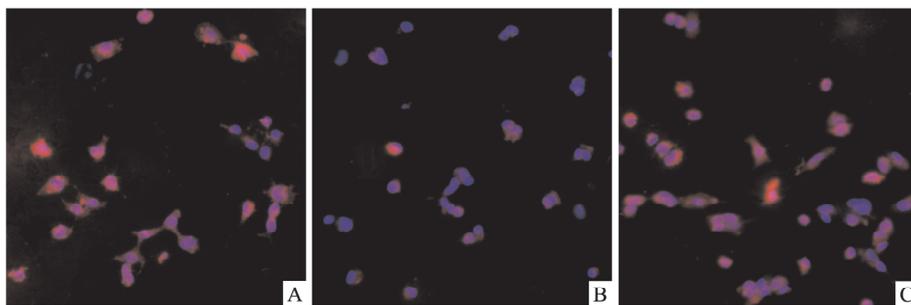


图 5 2-BFI 对线粒体膜电位的影响 TMRM 染色 $\times 20$

A: 对照组; B: NaF 组; C: NaF + 2-BFI 组; D: 各组荧光强度统计; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NaF 组比较: ## $P < 0.01$

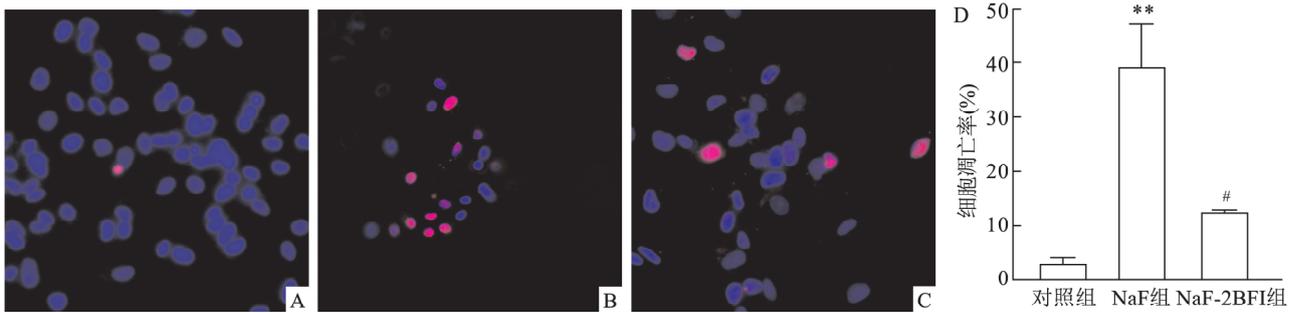


图6 2-BFI对氟中毒细胞凋亡率的影响 TUNEL 荧光染色 ×20

A: 对照组; B: NaF 组; C: NaF + 2-BFI 组; D: 凋亡率统计; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NaF 组比较: # $P < 0.05$

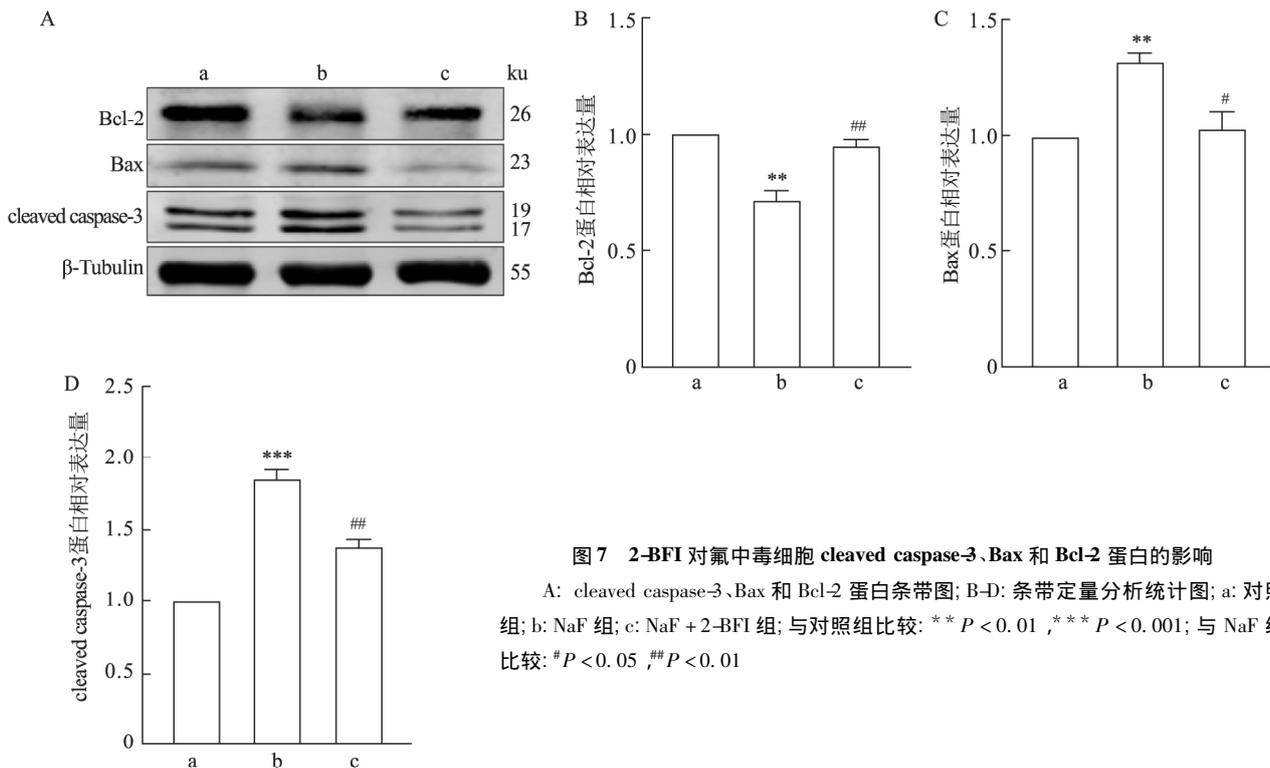


图7 2-BFI对氟中毒细胞 cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的影响

A: cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白条带图; B-D: 条带定量分析统计图; a: 对照组; b: NaF 组; c: NaF + 2-BFI 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NaF 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.5 2-BFI对细胞凋亡的影响 TUNEL 染色结果显示,与对照组比较,NaF 组阳性细胞数量增多,凋亡率升高 ($F = 15.61, P < 0.01$); 与 NaF 组比较,NaF + 2-BFI 组凋亡率下降 ($F = 15.61, P < 0.05$)。见图6。提示 2-BFI 可以缓解 NaF 引发的细胞凋亡。

与对照组比较,NaF 组的促凋亡蛋白 cleaved caspase-3、Bax 含量升高 ($F = 73.76, P < 0.001; F = 17.73, P < 0.01$), 抑制凋亡的 Bcl-2 含量降低 ($F = 39.33, P < 0.01$)。见图7。与 NaF 组相比 2-BFI 组的 cleaved caspase-3、Bax 蛋白含量降低 ($F = 73.76, P < 0.01; F = 17.73, P < 0.05$), Bcl-2 蛋白含量有所升高 ($F = 39.33, P < 0.01$)。

3 讨论

氟是自然界分布广泛的元素之一,由于氟化物高度可溶,可通过饮用、食物等介质进入人体,当人体过量摄入氟后,氟化物可以从胃肠吸收进入血液,然后再通过扩散透过生物膜如血脑屏障,从而对中枢神经系统产生影响^[7]。据报道,产前暴露于氟的小鼠大脑中的氟含量比未暴露的动物高 1.5 倍^[8]; 长期接触氟化物后,工人出现了嗜睡、记忆力减退和注意力障碍等神经精神症状^[9]。本研究显示,随着氟化钠浓度的升高,SH-SY5Y 细胞增殖受到抑制,细胞存活率不断下降,表明过量的氟会对神经系统产生毒性作用。

2-BFI 分子量小,极易透过血脑屏障。2-BFI 在

小胶质细胞中通过抗脂质氧化作用,稳定线粒体膜电位,减少凋亡蛋白释放,抑制细胞凋亡,对神经损伤产生保护作用^[10]。本实验结果显示,应用 2-BFI 处理 NaF 损伤的 SH-SY5Y 细胞,可显著提高细胞存活率,表明 2-BFI 在地方性氟中毒中有神经保护作用。

线粒体是真核生物进行氧化代谢的重要的细胞器,且一直处在分裂和融合的过程中,线粒体的形态在线粒体正常功能维持过程中起着重要的作用^[11]。由于大脑需要消耗大量的能量执行功能活动,然而大脑糖酵解能力不足,所以几乎全部依靠线粒体经氧化磷酸化过程产生的 ATP 来供能,且氟化物易在神经系统积聚,所以神经细胞的线粒体更容易受到氟化物的作用而受到损伤^[12]。本研究结果表明,氟化钠作用于 SH-SY5Y 细胞后,线粒体功能障碍。2-BFI 处理 24 h 之后,有效提高 ATP 生产量,稳定线粒体膜电位,表明在细胞氟中毒实验中,2-BFI 可以通过稳定持续线粒体形态和功能发挥神经保护作用。

细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种形式,它会对各种不同的毒性刺激做出反应^[13]。为了进一步检测 2-BFI 在细胞凋亡中是否发挥作用,该研究通过 TUNEL 染色法检测了细胞凋亡率,同时检测了凋亡通路相关蛋白 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2。研究结果显示,2-BFI 可降低 SH-SY5Y 细胞凋亡率,降低 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达,升高 Bcl-2 蛋白水平,提示 2-BFI 的氟中毒神经保护可能与抑制线粒体凋亡途径激活有关。

参考文献

[1] 刘洋,余波,原春生等. 2018 年河南省饮水型地方性氟中毒流行状况调查分析[J]. 中华地方病学杂志,2021,40(4):290-4.

- [2] Grandjean P. Developmental fluoride neurotoxicity: an updated review [J]. Environ Health 2019,18(1):110.
- [3] 杨婷,徐莎莎,陈轲扬等. 2-BFI 改善阿尔茨海默病模型大鼠认知功能的观察研究[J]. 中国药师,2021,24(5):797-800.
- [4] Zhang C Y, Chen R, Wang F, et al. EGb-761 attenuates the anti-proliferative activity of fluoride via DDK1 in PC-12 cells[J]. Neurochem Res 2017,42(2):606-14.
- [5] Tian J, Chen R, Hu L, et al. The protective effect of 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline against oxygen-glucose deprivation in cultured rat cortical astrocytes[J]. Neurosci Res 2018,133:1-6.
- [6] 武晓慧,李青,徐玉乔等. Ezh2 通过维持线粒体 ATP 合成功能促进骨骼肌细胞分化[J]. 中山大学学报(医学科学版),2020,41(6):841-9.
- [7] Kakumanu N, Rao S D. Images in clinical medicine. Skeletal fluorosis due to excessive tea drinking[J]. N Engl J Med 2013,368(12):1140.
- [8] Niu R, Xue X, Zhao Y, et al. Effects of fluoride on microtubule ultrastructure and expression of Tub α 1a and Tub β 2a in mouse hippocampus [J]. Chemosphere 2015,139:422-7.
- [9] Zhang S, Zhang X, Liu H, et al. Modifying effect of COMT gene polymorphism and a predictive role for proteomics analysis in children's intelligence in endemic fluorosis area in Tianjin, China[J]. Toxicol Sci,2015,144(2):238-45.
- [10] Tian J S, Zhai Q J, Zhao Y, et al. 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) improved the impairments in AD rat models by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. J Integr Neurosci 2017,16(4):385-400.
- [11] 王素文,宋小敏,李忱菲等. 线粒体分裂、线粒体自噬在烟草提取物诱导的支气管上皮细胞损伤模型中的作用[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(9):1343-9.
- [12] McBride H M, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse[J]. Curr Biol 2006,16(14):R551-60.
- [13] Ribeiro D A, Cardoso C M, Yujra V Q, et al. Fluoride induces apoptosis in mammalian cells: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Anticancer Res 2017,37(9):4767-77.

The protective effect of 2-BFI on SH-SY5Y cell neurotoxicity induced by NaF

Xu Wan¹, Zhang Caiyi², Yan Wei³, Geng Deqin⁴

¹First Clinical College, ³Dept of Genetics, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000;

²Dept of Psychiatry, Affiliated Dongfang Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000;

⁴Dept of Neurology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000)

Abstract Objective To observe the effect of sodium fluoride (NaF) and 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) on mitochondrial morphology, function, and apoptosis of SH-SY5Y cells, and to explore the protective effect of 2-BFI on NaF-induced injury. **Methods** Different concentrations of NaF (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mmol/L)

EFHD2 蛋白的缺失对小鼠 Sertoli 细胞紧密连接蛋白的影响

叶晓林¹, 胥国麟¹, 钱体军², 秦凤², 王云涛¹, 程煜航³, 赵文珍¹

摘要 目的 研究 EF-手域蛋白 D2 (EFHD2) 在小鼠睾丸内的定位及表达, 及 EFHD2 蛋白在 Sertoli 细胞中的缺失对紧密连接蛋白组分 Occludin 的影响。方法 取成年小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑及睾丸组织提取总 RNA 和蛋白质, 运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EFHD2 在各器官组织中 mRNA 和蛋白质水平的差异性; 运用免疫荧光和免疫组化技术, 检测 EFHD2 在睾丸组织中的定位和表达。运用 siRNA 干扰技术降低 Sertoli 细胞中 EFHD2 来检测 Occludin 蛋白的表达。结果 qRT-PCR 显示 EFHD2 在睾丸中表达量最高; Western blot 结果显示在睾丸组织中表达水平较高; 间接免疫荧光和免疫组化结果显示该蛋白主要分布在 Sertoli 细胞内, 与细胞骨架波形蛋白具有共定位, 即明确该蛋白表达在

Sertoli 细胞。EFHD2 蛋白表达降低后, Occludin 蛋白表达也减少。结论 EFHD2 蛋白在睾丸组织中表达量相对较高, 主要分布于睾丸 Sertoli 细胞中, 与波形蛋白共定位, 且能影响紧密连接蛋白 Occludin 的正常表达。提示 EFHD2 能促进和维持 Sertoli 细胞的细胞连接结构, 为精子发生提供一个稳定的微环境。

关键词 EF-手域蛋白 D2; 睾丸; Sertoli 细胞; Occludin 蛋白; 波形蛋白; 精子发生

中图分类号 R 321.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1744-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.011

2022-06-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82160280); 云南省科技厅科技计划项目(编号: 202101BA070001-041、202101BA070001-108、202001BA070001-084)

作者单位: 大理大学基础医学院¹ 组织学与胚胎学教研室、² 病原与媒介生物研究所, 大理 671000

³大理大学 2018 级临床医学专业, 大理 671000

作者简介: 叶晓林 男 硕士研究生;

赵文珍 女 教授 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zzw6565

@qq.com

EFHD2 属于 EF-手域家族成员, 是一个 26.8 ku 大小的高度保守的蛋白质, 由一个低复杂性的带有丙氨酸延伸的 N-末端区域、一个功能性 SH3 结合基序、两个功能性 EF-手结构域和一个 C-末端螺旋结构域组成。研究显示其功能为一种调节因子, 能够调节肌动蛋白构成细胞骨架, 参与成核作用, 同时调节细胞的扩散和迁移^[1-2], 还参与内吞和囊泡运输^[3-4]。目前 EFHD2 在神经系统疾病和肿瘤细胞迁移方面的研究较多, 主要是涉及信号传导及细胞

were used to treat SH-SY5Y cells for 24 h, and then Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to screen the proliferation ability of SH-SY5Y cells; SH-SY5Y cells were treated with NaF and different concentrations of 2-BFI (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, and the proliferation ability of SH-SY5Y cells was detected by CCK-8 assay. The transmission electron microscope was used to observe the mitochondrial morphology, the mitochondrial function was detected by ATP detection kit and Mito-Tracker Red CMXRos kit, cell apoptosis was detected by TUNEL staining, and the expressions of Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 protein were detected by Western blot. **Results** The cell survival rate of SH-SY5Y gradually decreased with the increase of NaF concentration. The selected NaF was 2.0 mmol/L. 2-BFI treatment for 24 h could improve the cell survival rate. At 10 mmol/L, the cell survival rate was higher (99.169%), and 10 mmol/L was selected as the 2-BFI follow-up experimental concentration. Compared with the control group, the mitochondrial morphology of the NaF group changed, ATP levels and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) decreased, the apoptosis rate increased, Bcl-2 protein content decreased, expression of Bax and cleaved caspase-3 protein increased. Compared with Group NaF, 2-BFI administration improved mitochondria morphology, increased ATP levels and $\Delta\psi\text{m}$, reduced cell apoptosis rate, increased Bcl-2 protein content, and reduced Bax, cleaved caspase-3 protein expression. **Conclusion** 2-BFI can improve mitochondrial morphology and function, reduce cell apoptosis, and play neuroprotective role in fluorosis SH-SY5Y cells.

Key words fluorosis; 2-BFI; SH-SY5Y; mitochondria apoptosis