

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.20.007

硫辛酸通过激活 PI3K/Akt 通路保护帕金森小鼠神经元的作用研究*

苏正伟¹ 范文慧² 王文慧⁴ 玄明文⁵ 赵虹^{3Δ}

(哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科五病房 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要 目的:明确硫辛酸(lipoic acid, LA)是否通过活化脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B(Phosphoinositide 3-kinases/Protein kinase B, PI3K/Akt)通路保护小鼠帕金森(Parkinson's disease, PD)神经元损伤。**方法:**将 130 只健康 C57BL 雄性小鼠随机分为 PD 模型组(A 组)、PD 模型自然恢复组(B 组)、硫辛酸干预组(C 组)、硫辛酸加阻滞剂干预组(D 组)、对照组(E 组)。采用免疫组化方法检测黑质内酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)阳性细胞数, Western Blot 方法检测中脑 TH、总 Akt 和 p-Akt 蛋白表达,相应试剂盒检测中脑内 GSH(Glutathione)和 MDA(Malondialdehyde)的含量。**结果:**(1)与 E 组比较, A 组 TH 阳性细胞数显著减少($P<0.01$), B 组、D 组明显减少($P<0.05$), C 组无明显统计学意义($P>0.05$)。(2)与 E 组比较, A 组、B 组 TH 蛋白表达显著减少($P<0.01$), C 组、D 组 TH 表达明显减少($P<0.05$); 分别与 A 组、B 组比较, C 组 TH 表达显著增多($P<0.01$), D 组无明显统计学意义($P>0.05$)。(3)与 E 组比较, A 组、B 组、D 组中脑内 p-AKT 表达显著减少($P<0.01$), C 组差异无明显统计学意义($P>0.05$); 分别与 A 组、B 组比较, C 组 pAkt 表达显著增多($P<0.01$), D 组差异无明显统计学意义($P>0.05$)。(4)与 E 组比较, C 组中脑 GSH 水平明显增加($P<0.05$), A 组、B 组明显减少($P<0.05$), D 组差异无统计学意义($P>0.05$); 与 E 组比较, A 组、B 组 MDA 表达显著增加($P<0.01$), C 组、D 组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**硫辛酸可能通过激活 PI3K/Akt 通路,减轻氧化应激损伤,进而发挥其保护神经元的作用。

关键词:帕金森; 硫辛酸; 氧化应激; 脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B

中图分类号: E-33; R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)20-3831-06

Mechanism of Lipoic Acid Protecting Neurons in Parkinson's Mice on PI3K/Akt Pathway*

SU Zheng-wei¹, FAN Wen-hui², WANG Wen-hui⁴, XUAN Ming-wen⁵, ZHAO Hong^{3Δ}

(Department of Neurology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT Objective: To determine whether lipoic acid (LA) could protect mouse Parkinson's disease (PD) neuronal damage by activating the PI3K/Akt pathway. **Methods:** 130 healthy C57BL male mice were randomly divided into 5 groups (n=20): PD model group (group A), PD model natural recovery group (group B), lipoic acid intervention group (group C), Lipoic acid with blocker intervention group (group D), control group (group E). Immunohistochemistry was used to detect the number of tyrosine hydroxylase (TH) positive cells in the substantia nigra; The expression of TH, Total Akt and p-Akt in the middle brain was detected by Western Blot. The corresponding kits were used to detect GSH and MDA in the midbrain. **Results:** (1) Compared with group E, the number of TH positive cells in group A was significantly decreased ($P<0.01$); Group B and Group D were significantly decreased ($P<0.05$); group C was not statistically significant ($P>0.05$). (2) Compared with group E, the expression of TH protein in group A and B was significantly decreased ($P<0.01$), and the expression of TH in group C and D was significantly decreased ($P<0.05$); Compare with group A and group B respectively, the expression of TH was significantly increased in group C ($P<0.01$), and group D was no significant ($P>0.05$). (3) Compared with group E, the expression of pAKT in brains of group A, group B and group D was significantly decreased ($P<0.01$), and there was no significant difference in group C ($P>0.05$); compared with group A and group B respectively. The expression of pAkt was significantly increased in group C ($P<0.01$), and there was no significant different in group D ($P>0.05$). (4) Compared with group E, the level of GSH in the middle brain was increased ($P<0.05$) in group C, and significantly decreased in group A and group B ($P<0.05$), group D was no significant difference ($P>0.05$); Compared with group E, the expression of MDA in group A and group B was significantly increased ($P<0.01$), there was no significant difference in group C and group D ($P>0.05$). **Conclusions:** Lipoic acid may play a role in protecting neurons by activating the PI3K/Akt pathway, reducing oxidative stress damage.

Key words: Parkinson; Lipoic acid; Oxidative stress; PI3K/Akt

Chinese Library Classification (CLC): E-33; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)20-3831-06

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D201249); 哈尔滨市科学技术局资助项目(2015RAXYJ065)

作者简介: 苏正伟(1993-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 神经病学, E-mail: 735977320@qq.com

Δ 通讯作者: 赵虹(1966-), 女, 硕士生导师, 教授, 主要研究方向: 神经病学

E-mail: zhaohongwenzhang@163.com, 电话: 15945186637

(收稿日期: 2019-03-20 接受日期: 2019-04-16)

前言

帕金森病是一种以黑质神经黑色素降低,黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)的腹外侧部和尾部大量神经元的丢失^[1],以及神经递质多巴胺含量减少为主要的病理特征的神经系统退行性病变。PD的病因尚且不明,但既往研究表明氧化应激、线粒体功能障碍、炎症反应和内源性或外源性毒物因子与其发病密不可分^[2]。其中,氧化应激(Oxidative stress)与PD的发生关系密切。由于大脑本身对氧的需求量巨大,导致其本身就处于容易受到氧化损伤的状态,平时由于抗氧化机制的拮抗作用^[3],机体处于一种动态平衡的状态。但当氧化作用增强或者抗氧化作用减弱时,大量的氧化中间产物的蓄积,会导致能量代谢异常,炎性产物增加,进而导致细胞变性坏死。

硫辛酸,具有水溶性和脂溶性两种性特征,可以透过血脑屏障直接发挥其抗氧化作用,被喻为“抗氧化剂中的抗氧化剂”^[4]。目前,已有研究表明LA可以在细胞中激活PI3K/Akt信号通路,诱导Akt磷酸化^[5,6]。本研究拟探讨硫辛酸能否激活PI3K/Akt通路,减轻氧化应激,进而保护帕金森小鼠神经元,以期硫辛酸用于治疗帕金森病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/130只,雄性,鼠龄8周,体重22-25g,SPF级饲养条件,饲养条件为恒温(25±2)℃,每日光照12h,饲养期间自由进食、饮水,购于北京维通利华公司,动物生产许可证:SCXK(京)2016-0006,所有动物实验遵照《实验动物关怀与使用指南》进行,所有实验程序均由哈尔滨医科大学动物使用委员会批准,动物使用许可证:SYXK(黑)2018-007。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)、硫辛酸购于美国SIGMA公司,谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购于碧云天生物技术公司,TH、Akt和p-Akt(Ser473)抗体购于美国ABCAM公司,特异性PI3K/Akt通路阻滞剂LY294002购于北京碧云天公司,超敏ECL化学发光试剂盒、磷酸酶抑制剂购于万类生物公司,DAB显色试剂盒、购于索莱宝公司,舒泰50购于法国维克公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 MPTP与生理盐水2.5g:1L的混合溶液,小鼠称重后,每次25mg/kg(10mL/kg)背部皮下注射,每周注射2次(周一和周五早上10:00),连续注射5周,所用的溶液均每天新鲜配制,配好溶液于4℃保存,造模成功的模型可在给药后出现震颤、竖毛、立尾、肌强直等表现,在最后一次给药后上述症状持续24h而仍然存在者视为造模成功。

1.2.2 实验分组和硫辛酸干预 130只小鼠分为对照组(背部皮下注射生理盐水)30只、PD造模组(背部皮下注射MPTP)100只。100只PD造模组小鼠5周后随机取80只成功造模小鼠按随机数字法分为4组(n=20):PD模型组(A组)、PD模型自然恢复组(B组)、LA干预组(C组)、LA加阻滞剂干预组(D组),30只假手术组5周再随机取20只作为对照组(E组)。造模成功后B组每日腹腔内注射等量生理盐水共14d;C组每日腹腔注射

LA 40mg/kg共14d;D组每日腹腔注射LA 40mg/kg和特异性PI3K/Akt通路阻滞剂:LY294002 0.3mg/kg;E组每日腹腔注射等量生理盐水。

1.2.3 行为学检测 在停药后第二天,进行行为学检测:自主活动计数(Openfield):自制活动场地为底30cm×30cm,高15cm的塑料盒,底部等分25小格,在安静、昏暗的环境中进行测试。在每组小鼠适应盒子中的条件后,记录5分钟内移动小格的数目(Ambulation)和在盒子里站起的次数(Rearing),连续测量5次计算平均值。爬杆实验(Poletest):制作直径1cm,高55cm的直木棒,杆顶安装小球限制小鼠停留,木棒表面沾覆纱布。记录各组实验对象从移动脚步到爬到底的时长。每个测试间隔为1分钟,持续测量5次计算出均值。求出变异系数(Coefficient of variation, CV):变异系数用于比较检测结果的稳定性。

1.2.4 免疫组织化学染色 分别取各组中脑做石蜡切片,按免疫组织化学试剂盒使用说明操作,于显微镜下观察并摄影。每只随机选取3张,每张随机选取4个视野,在同一视野面积,同一放大倍数,同一背景光强度下采集图像。用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统软件统计TH阳性细胞数。

1.2.5 Western blot 检测法 小鼠冰上断头分离脑后分离中脑,生理盐水冲洗后称重,加入RIPA裂解,匀浆器匀浆致细胞全部溶解后,在离心机上12000r/min离心30min,取上清。使用5×蛋白上样缓冲液混匀蛋白上清后于95℃加热10分钟,待其充分变性。分别取五组中脑样本经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转印蛋白至PVDF膜,脱脂奶粉封闭分别后加兔抗鼠TH、Akt和p-Akt单克隆抗体(1:500)4℃孵育过夜,加HRP标记的羊抗兔的IgG(1:1000),室温孵育2h,TBST漂洗后ECL显色,图像扫描计算处理。

1.2.6 氧化应激指标 应用相关试剂盒检测谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平。

1.3 统计学分析

应用SPSS 21统计软件分析数据,采用Graphpad 6.0作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 帕金森病模型小鼠的行为学变化

100只背部皮下注射MPTP的C57小鼠5周后有5只死亡,E组20只无死亡。在开放场地实验中,与E组相比,A组、B组、D组小鼠移动格数及站立次数显著减少($P < 0.01$),C组无明显统计学差异($P > 0.05$);在爬杆实验中,与E组相比,A组、B组、D组小鼠爬杆时间显著增加($P < 0.01$),C组爬杆时间明显增加($P < 0.05$);与A组相比,C组爬杆时间明显减少($P < 0.05$)。站立次数计数较移动格数和爬杆实验变异系数略高,最高一组为38%,但综合分析可见各实验变异系数均以较低幅度波动,显示出结果的可靠性较高,见表1、表2。

2.2 免疫组化检测各组小鼠中脑黑质TH的表达

E组右侧中脑黑质致密部可见大量TH阳性神经元,排列整齐,呈条带状。而A组和B组排列散乱稀疏,C组和D组介于二者之间;与E组比较,A组TH阳性细胞数显著减少($P <$

表 1 小鼠行为学实验结果($\bar{x} \pm s, n=25$)
Table 1 Result of behavioral exhibition($\bar{x} \pm s, n=25$)

Groups	Ambulation (n)	Rearing (t)	Grid (s)
A	76.44 $\pm$ 5.42**	22.6 $\pm$ 2.15**	18.99 $\pm$ 1.8**
B	86.2 $\pm$ 6.88**	25.6 $\pm$ 3.14**	14.81 $\pm$ 1.42**
C	156.76 $\pm$ 6.97 ^{##}	62.4 $\pm$ 3.82 ^{##}	6.66 $\pm$ 0.74 [#]
D	114.84 $\pm$ 9.32**	38.8 $\pm$ 2.86** [#]	12.74 $\pm$ 1.87**
E	170.32 $\pm$ 13.38	66.6 $\pm$ 3.87	5.38 $\pm$ 0.69

Note: Compared with group E, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with group A and group B, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 2 行为学检测第 1 到第 5 次结果的变异系数
Table 2 CV calculated from 1st to 5th test on behavioral exhibition of PD mice in 5 tests($n=5$)

Turn	Ambulation					Rearing					Grid				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	9.77	12.16	6.65	11.39	7.87	17.59	17.61	10.75	20.57	11.19	7.44	12.12	14.14	12.81	9.19
2	13.21	7.11	11.91	15.32	12.63	13.12	18.06	8.67	22.75	12.56	27.21	15.92	14.61	19.85	16.22
3	6.89	11.37	9.84	9.3	9.38	20.16	13.73	15.76	19.85	10.49	16.78	22.95	23.27	9.38	20.22
4	7.54	15	7.58	10.36	8.61	38	20.34	12.36	17.09	12.52	10.45	16.98	19.68	13.84	16.69
5	9.84	8.26	13.89	14.84	5.95	31.07	20.95	12.72	24.98	14.34	11.74	15.96	24.98	9.18	11.16

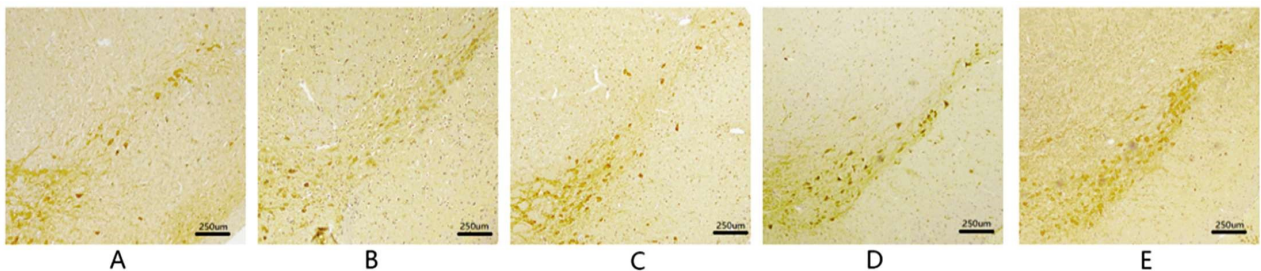


图 1 免疫组化各组小鼠中脑黑质 TH 的表达($\times 10$ 倍)

Fig.1 Detection of TH expression in the substantia nigra in each group of mice by Immunohistochemistry($\times 10$)

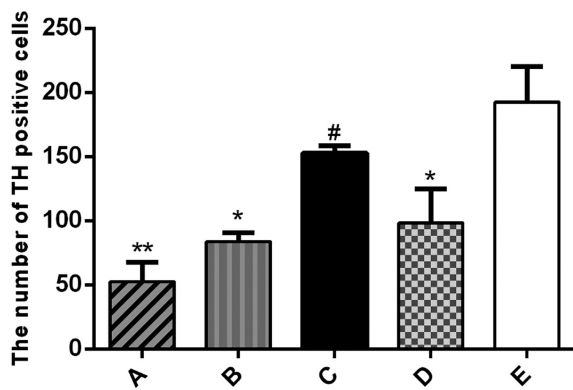


图 2 免疫组化切片 TH 阳性细胞数分析

Fig.2 Analysis of the number of TH positive cells in immunohistochemical sections

Note: Compared with group E, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with group A and group B, [#] $P<0.05$.

0.01), B 组、D 组明显减少($P<0.05$), C 组 TH 阳性细胞数无明显统计学意义($P>0.05$); 分别与 A 组、B 组比较, C 组 TH 阳性细

胞数明显增多($P<0.05$), D 组差异无明显统计学意义($P>0.05$), 见图 1、图 2。

2.3 LA 对脑 TH 表达的影响

与 E 组比较, A 组、B 组中脑内 TH 表达显著减少 ($P<0.01$), C 组、D 组明显减少($P<0.05$); 分别与 A 组、B 组比较, C 组 TH 表达显著增多($P<0.01$), D 组差异无明显统计学意义($P>0.05$), 说明 LA 可以增加中脑内 TH 蛋白的表达, 但与 E 组比较, C 仍存在差异, 尚未达到治愈状态。见图 3。

2.4 LA 对脑 Akt 表达的影响

从结果上看, 各组中脑内总 Akt 与 E 组相比变化不大, 差异无明显统计学意义($P>0.05$); 但与 E 组比较, A 组、B 组、D 组中脑内 pAkt 表达显著减少 ($P<0.01$), C 组差异无明显统计学意义($P>0.05$); 分别与 A 组、B 组比较, C 组 pAkt 表达显著增多($P<0.01$), D 差异无明显统计学意义($P>0.05$), 说明 MPTP 会降低磷酸化 Akt 蛋白的表达, 而 LA 可以激活 PI3K/Akt 信号通路增加中脑内磷酸化 AKT 蛋白的水平, 同时 D 组的结果显示出 PI3K 阻滞剂 LY294002 对硫辛酸增加磷酸化 Akt 的阻断作用, 表明了 PI3K 参与其中。见图 4。

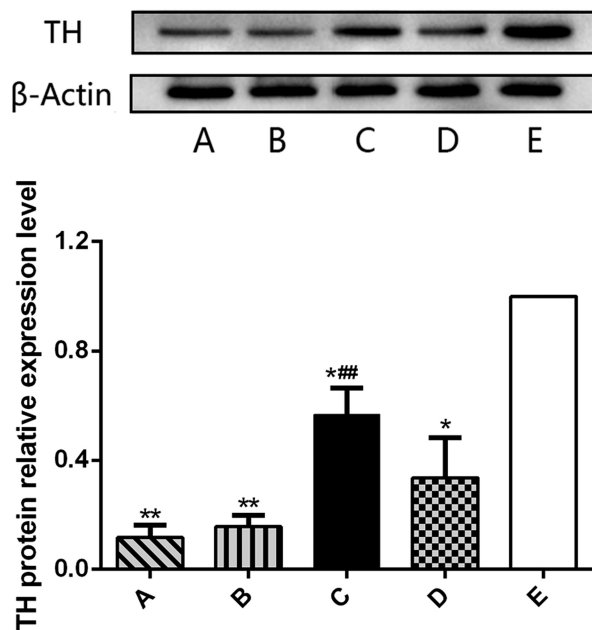


图3 Western blotting 检测各组小鼠中脑 TH 蛋白表达

Fig.3 Detection of TH protein expression in the brain of each group by western blotting

Note: Compared with group E, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with group A and group B, *** $P<0.01$.

2.5 各组小鼠中脑氧化应激水平比较

与 E 组比较, C 组中脑 GSH 水平明显增加($P<0.05$), A 组、B 组明显减少($P<0.05$), D 组差异无统计学意义($P>0.05$); 与 E 组比较, A 组、B 组 MDA 表达显著增加 ($P<0.01$), C 组、D 组表达相对变化较小无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明 MPTP

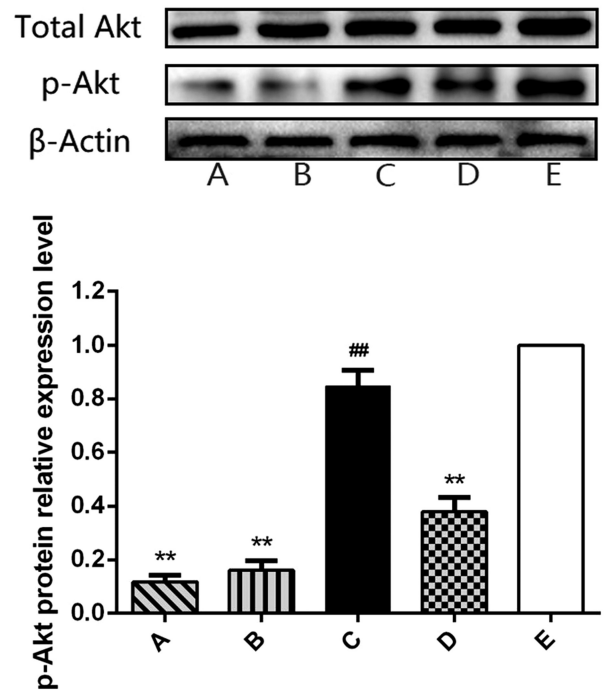


图4 Western blotting 检测各组小鼠中脑 pAKT 蛋白表达

Fig.4 Detection of pAKT protein expression in the brain of each group by western blotting

Note: Compared with group E, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with group A and group B, *** $P<0.01$.

可以诱导氧化应激加剧, 而 LA 可以在一定程度上拮抗其氧化损伤。见表 3。

表 3 各组小鼠中脑 GSH、MDA 含量的比较($\bar{x}\pm s$, $n=25$)

Table 3 The GSH and MDA content in the midbrain of mice from different groups($\bar{x}\pm s$, $n=25$)

	A	B	C	D	E
GSH(mg/gprot)	23.66± 4.43*	25.52± 3.48*	33.12± 6.83*	28.41± 1.8	30.1± 5.86
MDA(nmol/mgprot)	8.81± 1.8**	7.5± 2.04**	5.5± 0.85	5.79± 0.84	4.96± 1.34

Note: Compared with group E, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

PD 是一种同时具有神经系统和全身性非运动性病变的疾病, 是仅次于阿尔茨海默病的第二大常见的神经退行性疾病^[7], 发达国家发病率为每 10 万人有 14 个, 多见于 65 岁或以上的人群。该疾病在 50 岁之前的发病率相对较低, 但随着年龄的增长患病率逐年增加。65 岁或以上人群的发病率, 男性约为 2%, 女性约为 1.3%^[8]。PD 是一种复杂的多系统疾病, 本质上是神经退行性变性, 其中静止性的震颤, 平衡性障碍以及步态的异常和跌倒是其普遍的临床表现^[9], 其他的非运动性症状还包括嗅觉功能障碍^[10], 睡眠和行为障碍(RBD), 抑郁表现和疼痛发作等^[11], 这些都对严重的影响了患者的生活质量, 同时也对社会造成沉重的负担, 因此去寻找切实有效的治疗方法对于个人和整个社会都是十分迫切的。

PD 目前没有治愈的方法, 临床上主要以控制运动和非运

动系统症状, 同时预防并发症为主^[12]。以左旋多巴制剂为代表的药物治疗仍是最基本和有效的方法, 但效果不甚理想^[13]。其他新兴药物如辅酶 Q10^[14], 由于生物利用度差和缺乏脑渗透性, 其功效受到了很大阻碍, 除辅酶 Q10 外, 姜黄素因为其对抗氧化应激和保护线粒体功能也是十分有前景的药物^[15], 然而, 其临床疗效受限于水溶性差, 代谢快, 组织吸收性差等, 其他的诸如白藜芦醇^[16]、胡椒碱^[17]等也都由于种种缺陷治疗效果欠佳。除了药物治疗其他的新兴疗法, 包括手术治疗, 左旋多巴-卡比多巴输注凝胶, 皮下注射阿扑吗啡泵和深层脑刺激、聚焦超声等^[18], 这些治疗手段都可以在一定程度改善患者的临床症状, 特别是运动症状, 但其治疗都存在一定局限性且个体差异较大, 远期收益有待考证。

近些年的研究发现 LA 作为一种低分子量的两亲物质, 可以穿越血脑屏障直接减少中枢神经系统中的氧化应激水平, 因此它被认为是治疗神经退行性疾病如阿尔兹海默症 (AD)^[19]的

一种有效制剂,在治疗中风的辅助制剂 ALAnerv[®] [20]也含有硫辛酸的有效成分,除此之外其他神经系统疾病如多发性硬化[21],创伤性脑损伤[22]等均有证据表明 LA 对其有一定的治疗作用。LA 已知的可以在包括单核细胞在内的多种细胞内激活 PI3K/Akt 通路[5,6],使 Akt 磷酸化,而活化的 Akt 可以通过激活 mTOR,与 Nrf2/HO-1 和 GSK-3 β 协调作用调节氧化还原稳态[23],对抗氧化应激。除此之外 LA 还可以通过再生其他天然抗氧化剂的水平如 GSH、生育酚、抗坏血酸等抗氧化剂以及增加辅酶 Q10 的含量对抗氧化损伤[24],共同对抗氧化应激作用诱导的细胞凋亡和神经元坏死,减轻中枢神经系统氧化损伤[25]。

MPTP 由于其亲脂性的特性,可以透过血脑屏障生成有毒性的 MPP⁺,MPP⁺ 会在多巴胺能神经元的线粒体内蓄积,并且进一步破坏线粒体复合物 I 的功能,最终致使 ATP 生成减少和氧化中间产物的增加[26],极大的加剧了细胞氧化应激损伤,出现诸如静止性震颤、肌强直等帕金森样症状[27]。因此本实验应用 MPTP 作为制备帕金森模型的诱导剂,又因为是慢性造模更符合疾病的发展规律也更加稳定。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 即 PI3K/Akt 通路是一条研究比较深入的信号传导通路[28],涉及神经元存活和突触可塑性,还包括维持线粒体-电子转移链的功能完整性和线粒体生物合成的调节[29,30]。目前在细胞水平的实验中,有研究表明 ROS 积累导致氧化应激,会介导下调 p-PI3K/p-Akt 水平,导致 Nrf2 从细胞核转移到胞质引起抗氧化能力的降低,同时通过上调 p-PI3K/p-Akt 途径会减轻氧化应激诱导的细胞损伤[31]。因此可知 PI3K/Akt 通路的激活与氧化应激损伤负性相关,激活该通路会降低氧化应激损伤,即会增加 GSH 含量同时降低 MDA 含量。

本实验着重研究硫辛酸在动物水平上的作用,利用 MPTP 制备小鼠帕金森模型,通过注射有效剂量的硫辛酸观察其能否通过 PI3K/Akt 通路发挥抗氧化应激作用。结果显示在行为学检测中,LA 可以明显改善帕金森小鼠的运动能力,减轻如竖毛、震颤、姿势异常、步态缓慢等表现;Western Blot 实验中表明 LA 可以增加帕金森小鼠中脑内的 TH 含量,即相对的增加中脑内多巴胺的含量,这也是小鼠行为改善的原因之一;磷酸化 Akt 结果显示,LA 可以激活 PI3K/Akt 通路,诱导 Akt 磷酸化对抗氧化应激损伤;同时在氧化应激相关检测中 LA 可以增加 GSH 的含量同时降低 MDA 的含量,显示出 LA 可以通过激活 PI3K/Akt 通路减轻氧化应激损伤。本实验还同时加入自然恢复组和阻滞剂干预组进行对比,从结果上可以看出小鼠的运动能力、脑内 TH 和 p-Akt 含量会随时间有一定程度的恢复,但对比应用 LA 后差异仍十分明显,阻滞剂干预组的结果与自然恢复组相似甚至恢复程度好于自然恢复组,但对比只应用 LA 差异仍十分巨大,可以推测出 LA 在保护神经元,改善小鼠运动能力应该是具有多种途径的,而 PI3K/Akt 信号通路是其中相对比较重要的一种,因此在进行组间对比中自然恢复组的增设是十分客观和有必要的。

综上所述,在 PD 小鼠模型中,LA 可以激活 PI3K/Akt 信号通路,从而发挥其抗氧化应激的作用进而保护神经元并恢复酪氨酸羟化酶(TH)即黑质内多巴胺能神经元水平,而这种作用可以被 PI3K/AKT 通路阻滞剂(LY294002)在一定程度上所阻

滞。本实验目前仅检测 PI3K/Akt 通路总 Akt 和 p-Akt 表达情况,未检测其下游蛋白水平变化,有待进一步深入研究。同时未来随着中国老龄化问题逐渐加剧,PD 对家庭和社会带来的损害和负担也会愈加凸显,因此寻找客观有效的治疗方法是十分有前景和值得进一步深入研究的。

参考文献(References)

- [1] 张娜, 窦德强. 帕金森病分子病理机制研究进展[J]. 神经药理学报, 2013, 3(2): 35-42
- [2] Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease[J]. Prog Neurobiol, 2013, 106-107: 17-32
- [3] Guo JD, Zhao X, Li Y, et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1817-1825
- [4] Gorąca A1, Huk-Kolega H, Piechota A, et al. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential [J]. Pharmacological Reports, 2011, 63(4): 849-858
- [5] Müller C, Dünschede F, Koch E, et al. Alpha-lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(4): G769
- [6] Li DW, Li GR, Lu Y, et al. α -lipoic acid protects dopaminergic neurons against MPP⁺ induced apoptosis by attenuating reactive oxygen species formation[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(1): 108-14
- [7] Del RNL, Quiroga-Varela A, Garbayo E, et al. Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later [J]. Front Neuroanat, 2018, 12: 113
- [8] Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, et al. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(4): 204-223
- [9] Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(2): 337-350
- [10] Sauerbier A, Jenner P, Todorova A, et al. Non motor subtypes and Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2016, 1: S41-S46
- [11] Metzger JM, Emborg ME. Autonomic dysfunction in Parkinson disease and animal models[J]. Clin Auton Res, 2019, 10:1007
- [12] 陈生弟. 中国帕金森病治疗指南 (第三版)[A]. 江西省中西医结合学会神经科专业委员会. 江西省第七次中西医结合神经科学术交流会议论文集[C]. 江西省中西医结合学会神经科专业委员会: 江西省中西医结合学会, 2015: 4
- [13] Elkouzi A, Vedam-Mai V, Eisinger RS, et al. Emerging therapies in Parkinson disease- repurposed drugs and new approaches[J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15(4): 204-223
- [14] Chuen-Chungchang R, Liu J, Yu J, et al. Neuroprotection of Coenzyme Q10 in Neuro- degenerative Diseases[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, 16(8): 858-866
- [15] Susan H, Douglas K. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health[J]. Foods, 2017, 6(10): 92-96
- [16] Liu Q, Zhu D, Jiang P, et al. Resveratrol synergizes with low doses of L-DOPA to improve MPTP-induced Parkinson disease in mice [J]. Behav Brain Res, 2019, 367: 10-18
- [17] Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Piperine and Its Role in Chronic Diseases[J]. Oxygen Transport to Tissue XXXIII, 2016: 173-184

- [18] Thevathasan W, Debu B, Aziz T, et al. Pedunculo pontine nucleus deep brain stimulation in Parkinson's disease: a clinical review[J]. *Mov Disord*, 2018, 33: 10-20
- [19] Shinto L, Quinn J, Montine T, et al. A randomized placebo-controlled pilot trial of omega3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dis*, 2014, 38(1): 111-20
- [20] Choi KH, Park MS, Kim JT, et al. Lipoic Acid Use and Functional Outcomes after Thrombolysis in Patients with Acute Ischemic Stroke and Diabetes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163484
- [21] Salinthon S, Yadav V, Bourdette D, et al. Lipoic Acid: A Novel Therapeutic Approach for Multiple Sclerosis and Other Chronic Inflammatory Diseases of the CNS [J]. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 2008, 8(2): 132-142
- [22] de Sousa CNS, da Silva Leite CMG, da Silva Medeiros I, et al. Alpha-lipoic acid in the treatment of psychiatric and neurological disorders: a systematic review [J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(1): 39-52
- [23] Dong K, Hao P, Xu S, et al. Alpha-Lipoic Acid Alleviates High Glucose Suppressed Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells via Antioxidant Effect and PI3K/Akt Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(5): 1897-1906
- [24] Coles LD, Tuite PJ, Öz G, et al. Repeated-Dose Oral N-Acetylcysteine in Parkinson's Disease: Pharmacokinetics and Effect on Brain Glutathione and Oxidative Stress [J]. *Clin Pharmacol*, 2018, 58(2): 158-167
- [25] Ahmadinejad F, Geir MS, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress[J]. *Antioxidants*, 2017, 6(3): 59-66
- [26] Czlonskowska A, Kohunka M, Kurkowska-Jastrzebska I. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model[J]. *Neurodegeneration*, 1996, 5: 137-143
- [27] Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism [J]. *Am J Med*, 2019, (19): 235-239
- [28] Hu M, Li F, Wang W. Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 565-573
- [29] Dong K, Hao P, Xu S, et al. Alpha-Lipoic Acid Alleviates High Glucose Suppressed Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells via Antioxidant Effect and PI3K/Akt Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(5): 1897-1906
- [30] Wang X, Zhang X, Cheng Y, et al. Alpha-lipoic acid prevents bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a PI3K/Akt-dependent mechanism[J]. *Neurotoxicology*, 2010, 31(1): 101-112
- [31] Ali T, Kim T, Rehman S U, et al. Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease [J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(7): 6076-6093

(上接第 3830 页)

- [20] Garcia-Diez I, Hernandez-Munoz I, Hernandez-Ruiz E, et al. Transcriptome and cytogenetic profiling analysis of matched in situ/invasive cutaneous squamous cell carcinomas from immunocompetent patients[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2018, 23(12): 189-192
- [21] Peng C, Fuchao C, Benhong Z. The risk of dermatological toxicities of combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2018, 18(23): 1-17
- [22] Lee V, Yang X, Prouty S, et al. Srcasm Regulates Tyrosine Kinases in Skin Cancer: Implications for Precision Medicine [J]. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2018, 19(2): S103-S105
- [23] Abd E A, Sadik N, Shaker O G, et al. Single Nucleotide Polymorphism in SMAD7 and CHI3L1 and Colorectal Cancer Risk [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 9(11): 985-987
- [24] Zhou P, Xie W, Luo Y, et al. Protective Effects of Total Saponins of *Aralia elata* (Miq.) on Endothelial Cell Injury Induced by TNF-alpha via Modulation of the PI3K/Akt and NF-kappaB Signalling Pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 109-112
- [25] 金迎迎, 包兴, 柯悦, 等. 辛伐他汀通过调控 PI3K/AKT 通路介导的 EMT 参与放疗诱导的食管癌细胞耐受 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2018, 8(21): 1-6
- [26] 刘韵, 展望, 游文健, 等. 下调 miR-21 通过 PTEN/PI3K/Akt 信号转导抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的实验研究[J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2018, 12(21): 1-6
- [27] Li X, Wu X. MiR-21-5p promotes the progression of non-small-cell lung cancer by regulating the expression of SMAD7[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11(14): 8445-8454
- [28] 单晓民, 张文芳, 幸宇. 敲低 SPP1 通过 PI3K/AKT 信号通路促进 HSC-3 细胞凋亡[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 17(7): 1-5
- [29] 和义敏, 姚鹏, 梁小芳, 等. USP15 及 Smad7 在皮肤鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2018, 8(05): 599-602
- [30] Ryu T Y, Kim K, Kim S K, et al. SETDB1 regulates SMAD7 expression for breast cancer metastasis [J]. *BMB Rep*, 2018, 21(13): 863-867
- [31] Sun M, Shinoda Y, Fukunaga K. KY-226 protects blood-brain barrier function through the Akt/FoxO1 signaling pathway in brain ischemia [J]. *Neuroscience*, 2018, 31(15): 213-217
- [32] Bai Y, Liu Y, Jin S, et al. Expression of microRNA27a in a rat model of osteonecrosis of the femoral head and its association with TGFbeta/Smad7 signalling in osteoblasts[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 28(12): 678-681