

天麻素联合异钩藤碱通过线粒体途径抑制 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞凋亡

李晓明, 荣 华, 潘思文, 董妙先*

齐齐哈尔医学院 医药科学研究所, 齐齐哈尔 161006

摘要:探讨天麻素和异钩藤碱联合应用对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制。本研究采用 ELISA 法检测细胞凋亡、荧光光度法检测 caspase-3/7 活性、MTS 法检测细胞增殖、JC-1 染色法检测线粒体膜电位、ELISA 法检测细胞色素 C (CytC) 含量、分光光度法检测烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 和总 NAD 含量、免疫印迹法检测 Akt 磷酸化水平。结果显示,天麻素联合异钩藤碱抑制了 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导 PC12 细胞凋亡,降低了 caspase-3/7 活性,提高线粒体跨膜电位,减少了 CytC 释放,增加了细胞增殖活性和 NAD⁺/NADH 比值。而天麻素联合异钩藤碱的这些药理作用可被 PD98059、LY294002 或/和 LiCl 预处理逆转。异钩藤碱单独或联合天麻素均显著提高 Akt 磷酸化水平。结果表明,天麻素联合异钩藤碱能通过线粒体途径抑制 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡,其作用可能与增加 Akt 磷酸化有关。

关键词:帕金森病;天麻素;异钩藤碱;细胞凋亡;线粒体膜电位

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)7-1096-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.7.003

The combination of gastrodin and isorhynchophylline inhibits PC12 cells from MPP⁺-induced apoptosis via mitochondrial events

LI Xiao-ming, RONG Hua, PAN Si-wen, DONG Miao-xian*

Institute of Medicine, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China

Abstract: A combination therapy could prove more effective than any one therapy alone through the regulation of multiple targets. Thus, the studies reported were designed to test the hypothesis that the combination of gastrodin and isorhynchophylline inhibits PC12 cells from MPP⁺-induced apoptosis *via* the mitochondrial pathway. To test this hypothesis, PC12 cells were treated with gastrodin or/and isorhynchophylline for 1 h prior to the challenge with MPP⁺ for additional 24 h in the presence or absence of PD98059, DPI, or/and LiCl. Then, we measured DNA fragmentation, caspase-3/7 activity, cell proliferation, mitochondrial membrane potential, supernatant cytochrome c concentration, total intracellular NAD and NADH concentration, and Akt phosphorylation by ELISA, MTS, flow cytometry, colorimetric assays, and Western Blot analysis. Results: The combination of gastrodin and isorhynchophylline inhibited PC12 cells from MPP⁺-induced apoptosis. Accompanying this, the combination of gastrodin and isorhynchophylline decreased caspase-3/7 activity, enhanced cells proliferation, increased JC-1 aggregates/JC-1 monomers ratio, decreased supernatant cytochrome c concentration, and elevated NAD⁺ and NAD⁺/NADH ratio in MPP⁺-challenged PC12 cells. PD98059, LY294002, or LiCl can partially reverse these changes mediated by the combination of gastrodin and isorhynchophylline. The combination of gastrodin and isorhynchophylline increased phosphorylation of Akt. Our results support our hypothesis and suggest attenuation of MPP⁺-induced apoptosis in PC12 cells by the combination of gastrodin and isorhynchophylline may relate to Akt phosphorylation.

Key words: Parkinson's disease; gastrodin; isorhynchophylline; apoptosis; mitochondrial membrane potential

帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 是一种伴随运动缺陷症状的中枢神经系统退行性疾病。90% 以上的 PD 为散发性发作,约 10% 的 PD 为家族性遗传发作。PD 主要病理生化特征是黑质多巴胺能神

收稿日期:2021-02-22 接受日期:2021-05-20

基金项目:国家自然科学基金(81873133)

* 通信作者 Tel:86-452-2663373; E-mail:dmx1969@126.com

神经元渐进性缺失,导致纹状体多巴胺水平降低^[1],1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)具有线粒体复合物 I 抑制作用,进入体内后生成活性 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺),MPP⁺在线粒体内产生的自由基引起线粒体损伤^[2]。线粒体介导的多巴胺能神经元凋亡是 PD 重要病理机制^[3]。在 PD 患者死亡后的脑组织中,一些濒死的神经元表现出凋亡的形态学特征^[4]。针对线粒体损伤而开展的 PD 治疗研究受到基础和临床医学研究者的广泛关注。自 1967 年 Cotzias 等将左旋多巴首次成功应用于 PD 临床治疗以来,多巴胺替代治疗一直是治疗 PD 的主要手段,但这种疗法仅能在一定程度上缓解临床症状,不能从根本上延缓疾病进程^[5]。中医药治疗 PD 具有疗效稳定持久,毒副作用较小的优势。随着对 PD 发生、发展凋亡机制的研究深入,中药有效成分联合在 PD 神经保护治疗中展现出显著优势^[6]。我们前期研究发现,天麻素和异钩藤碱均在体内体外帕金森病模型中发挥神经保护作用^[7,8],PD 是遗传和环境因素引起的复杂疾病,基于多靶点的联合用药治疗 PD 越来越受到关注。本研究旨在探讨天麻素和异钩藤碱联合应用保护 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞凋亡的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

Safire 2 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Stratagene Mx3005P Real-time PCR 仪(Agilent 公司);JY-ZY5 电泳槽和 JY200C 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);Smart ChemiTM Image Analysis System(北京赛智创业科技有限公司);HL-2000 分子杂交箱(美国 UVP 公司);ELX800 全自动酶标仪(BioTek 公司)。

1.1.2 细胞株和药品

PC12 细胞株(中科院上海细胞库);MPP⁺ iodide(Sigma-Aldrich 公司,批号:035M4782V);异钩藤碱(南京景竹生物科技有限公司,批号:JZ18102901);天麻素(南京景竹生物科技有限公司,批号:JZ18061402);氯化锂(Lithium chloride, LiCl; Sigma-Aldrich 公司,批号:MKBV0497V);LY294002(Sigma-Aldrich 公司,批号:092M4616V);PD98059(Sigma-Aldrich 公司,批号:MKBR5598V)。

1.1.3 试剂和引物

Caspase-Glo[®] 3/7 Assay (Promega 公司,批号:0000126888); Quantikine[®] rat/mouse cytochrome c assay kit (R&D systems 公司,批号:P131219);JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(翊圣生物,批号:J6901150);高灵敏度化学发光检测试剂盒(康为世纪公司,批号:022819190619);二抗(康为世纪公司,批号:40420);Anti-Akt antibody (Santa Cruz 公司,批号:D0219);Anti-p-Akt antibody (Santa Cruz 公司,批号:J0721);Cell Titer 96[®] Aqueous Non-Radioactive cell Proliferation Assay (Promega 公司,批号:0000312867);Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Assay Kit (Roche 公司,批号:29876600);烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)/NADH Quantification Kit (BioVision 公司,批号:9G020337)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理

PC12 细胞用含 10% 小牛血清及 1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养液培养,细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,每 2 ~ 3 天更换 1 次培养液。细胞密度生长融合达 70% ~ 80% 时传代。加入 250 μM MPP⁺ 预处理对数生长期的 PC12 细胞 1 h 后,加入天麻素(1 μM)和/或异钩藤碱(0.3 μM)共同孵育 24 h 后,收集细胞。为了分析细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)、蛋白激酶 B(Protein Kinase B, PKB/Akt)和糖原合成激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)信号通路的作用,在 MPP⁺ 损伤之前,PC12 细胞用 PD98059、LY294002 或/和氯化锂预处理 30 min。

1.2.2 caspase-3/7 活性检测

按 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay 试剂盒说明书,PC12 细胞加入 Caspase-Glo[®] 试剂,在室温孵育 60 min 后,酶标仪测量荧光值。通过计算处理组荧光值/对照组荧光值来确定 caspase-3/7 的活性。

1.2.3 JC-1 染色法检测线粒体膜电位

按 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书,PC12 细胞加入 JC-1 染色工作液,37 °C 孵育 20 min,JC-1 染色缓冲液洗涤,细胞培养液重悬 PC12 细胞,采用流式细胞仪检测 JC-1 线粒体膜电位。

1.2.4 细胞色素 C(cytochrome c, Cyt-c)含量检测

按 Quantikine[®] rat/mouse cytochrome c assay kit 试剂盒说明书,收集 PC12 细胞上清液,加 Cyt-c 结

合物,加洗液,加底物溶液,加停止液。在 450 nm 处酶标仪测定光密度。用标准物浓度和 OD 值绘制标准曲线,计算 PC12 细胞培养上清中 Cyt-c 含量。

1.2.5 免疫印迹检测 Akt 磷酸化水平

采用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取 PC12 细胞蛋白质,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,湿法转膜,TBST 封闭液(含 5% 脱脂牛奶)室温封闭 PVDF 膜 2 h。加入 p-Akt 一抗杂交液 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜,加相应二抗 37 °C 孵育 2 h。加入超敏化学发光液发光,X 光片曝光。图像分析软件 AlphaEaseFC™ (瑞士 Alpha Innotech 公司)分析印迹条带的积分光密度,并用 Akt1 积分光密度值进行归一化。

1.2.6 细胞增殖分析

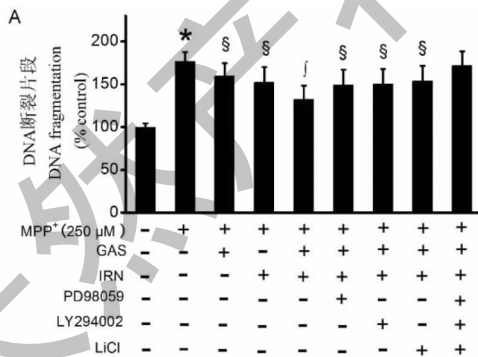
按 CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay 试剂盒说明书测定细胞增殖活性,酶标仪 490 nm 处测定吸光度值,细胞存活率 = 处理组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

1.2.7 细胞凋亡检测

按 Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Assay Kit 试剂盒说明书,裂解 PC12 细胞,离心取上清液。加入检测试剂孵育,加入终止液,405 nm 处测定 OD 值。

1.2.8 分光光度法测定细胞总 NAD 和 NADH 含量

按照 NAD⁺/NADH Quantification Kit 说明书用



操作,酶标仪 450 nm 处测定吸光度值,根据标准曲线计算总 NAD 和 NADH 含量。

1.2.9 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 天麻素、异钩藤碱单用及联用对 PC12 细胞凋亡和 caspase-3/7 活性的影响

ELISA 结果显示(如图 1A),与空白对照组比较,MPP⁺ 组 PC12 细胞凋亡显著增加($P < 0.05$);与 MPP⁺ 组比较,天麻素组和异钩藤碱组 PC12 细胞凋亡显著减少(均 $P < 0.05$)。与天麻素或异钩藤碱单独处理组比较,天麻素联合异钩藤碱组细胞凋亡显著减少(均 $P < 0.05$)。如图 1B 所示,与空白对照组比较,MPP⁺ 组 caspase-3/7 活性显著增加($P < 0.05$);与 MPP⁺ 组比较,天麻素组和异钩藤碱组 caspase-3/7 活性显著减少(均 $P < 0.05$)。而天麻素联合异钩藤碱组 caspase-3/7 活性较二者单独处理组显著降低(均 $P < 0.05$)。天麻素联合异钩藤碱对 PC12 细胞凋亡和 caspase-3/7 活性的抑制效应可部分被 PD98059 和 LY294002 或 LiCl 单独预处理逆转,而 PD98059、LY294002 和 LiCl 联合预处理则完全逆转这些药理效应。

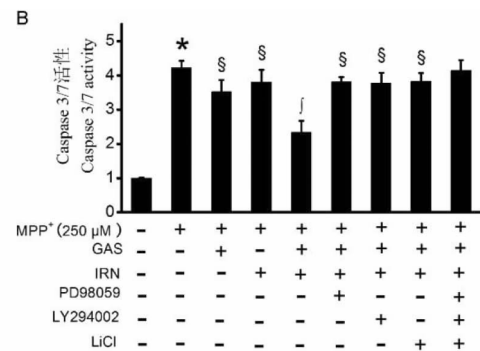


图 1 天麻素联用异钩藤碱对 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞凋亡(A)和 caspase-3/7 活性(B)的影响

Fig. 1 Effects of gastrodin and/or isorhynchophylline on apoptosis (A) and caspase-3/7 activity (B) in MPP⁺-treated PC12 cells

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与 MPP⁺ 组比较,§ $P < 0.05$;与天麻素或异钩藤碱单用组比较,§ $P < 0.05$;GAS:天麻素;IRN:异钩藤碱,下同。Note: * $P < 0.05$ vs control; § $P < 0.05$ vs MPP⁺; § $P < 0.05$ vs GAS or IRN alone; GAS: Gastrodin; IRN: Isorhynchophylline.

2.2 天麻素联用异钩藤碱对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞增殖的影响

MTS 分析结果显示(见图 2):与空白对照组比

较,MPP⁺ 组细胞增殖活性显著减少($P < 0.05$);与 MPP⁺ 组比较,天麻素联合异钩藤碱组细胞增殖活性显著增加(均 $P < 0.05$),且天麻素联合异钩藤碱

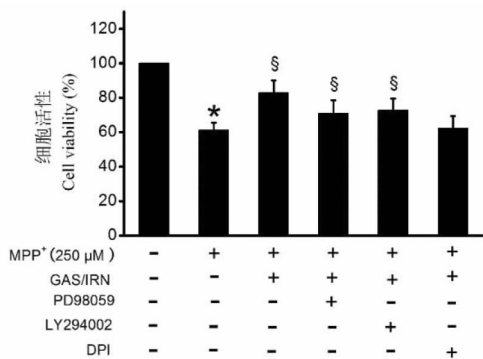


图2 天麻素联合异钩藤碱对 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of gastrodin combined with isorhynchophylline on cells proliferation in MPP⁺-treated PC12 cells

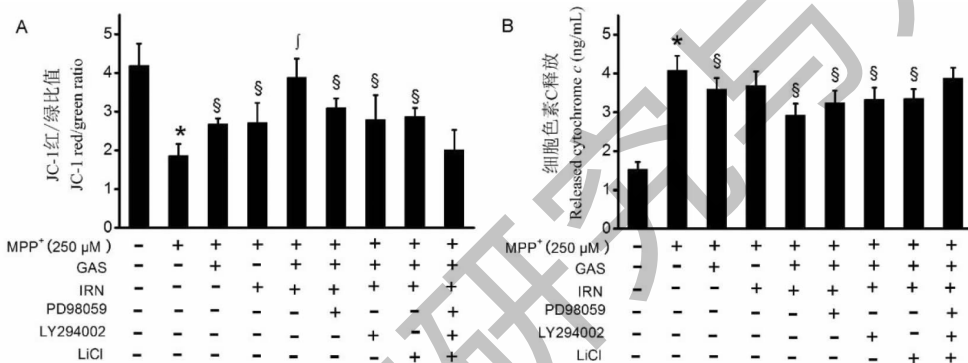


图3 天麻素、异钩藤碱单用及联用对 JC-1 红/绿比值 (A) 和细胞培养上清液中 cyct-C 含量 (B) 的影响

Fig. 3 Effects of gastrodin and/or isorhynchophylline on JC-1 aggregates/JC-1 monomers ratio (A) and supernatant cytochrome c concentration (B) in MPP⁺-treated PC12 cells

JC-1 红/绿比值的增加效应和对细胞培养上清液中 cyct-C 含量的降低效应明显强于二者单独处理组 (均 $P < 0.05$)。天麻素联合异钩藤碱对 JC-1 红/绿比值的增加效应和对细胞培养上清液中 cyct-C 含量的降低效应可部分被 PD98059、LY294002 或 LiCl 单独预处理逆转,而 PD98059、LY294002 和 LiCl 联合预处理则完全逆转这些药理效应。

2.4 天麻素联合异钩藤碱对 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值的影响

如图 4A 和 B 所示,与空白对照组比较, MPP⁺ 组 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值显著降低 (均 $P < 0.05$); 与 MPP⁺ 组比较,天麻素联合异钩藤碱组 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值显著增加。天麻素联合异钩藤碱对 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值的增加效应可部分被 PD98059、LY294002 或 LiCl 单独预处理逆转,而 PD98059、LY294002 和 LiCl 联合预处理则完全逆转天麻素联合异钩藤碱对 NAD⁺ 含

对细胞增殖活性的提高作用可部分被 PD98059 或 LY294002 单独预处理逆转, DPI 则完全逆转天麻素联合异钩藤碱对细胞增殖活性的提高作用。

2.3 天麻素、异钩藤碱单用及联用对 MPP⁺ 处理 PC12 细胞线粒体跨膜电位和 Cyt-c 释放的影响

如图 3 所示,与空白对照组比较, MPP⁺ 组 PC12 细胞 JC-1 红/绿比值显著降低 ($P < 0.05$), 而细胞培养上清液中 cyct-C 含量显著增加 ($P < 0.05$)。与 MPP⁺ 组比较,天麻素组 JC-1 红/绿比值显著增加 ($P < 0.05$), 而细胞培养上清液中 cyct-C 含量显著减少 ($P < 0.05$)。异钩藤碱组 JC-1 红/绿比值显著增加 ($P < 0.05$), 而细胞培养上清液中 cyct-C 含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。天麻素联合异钩藤碱对

量和 NAD⁺/NADH 比值的增加效应。

2.5 天麻素、异钩藤碱单用及联用对 MPP⁺ 处理 PC12 细胞 Akt 磷酸化水平的影响

我们以前研究发现,天麻素增加了 MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 细胞 ERK1/2 磷酸化水平^[8], 异钩藤碱减少了 GSK-3β 磷酸化水平^[7], Akt 是调控 GSK-3β 磷酸化的关键上游信号分子^[9]。因此,我们进一步观察天麻素、异钩藤碱单用及联用对 MPP⁺ 处理 PC12 细胞 Akt 磷酸化水平的影响。Western blot 结果显示 (如图 5A 和 B): 与空白对照组比较, MPP⁺ 组 Akt 磷酸化水平无显著性差异 ($P > 0.05$); 与 MPP⁺ 组比较,天麻素单独组 Akt 磷酸化水平无显著性差异 ($P > 0.05$), 异钩藤碱单独组和天麻素联合异钩藤碱组 PC12 细胞 Akt 磷酸化水平均显著增加 (均 $P < 0.05$)。而天麻素联合异钩藤碱组 PC12 细胞 Akt 磷酸化水平与异钩藤碱单独组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。表明天麻素联合异钩藤碱活化 Akt

的药物组分是异钩藤碱,而不是天麻素。

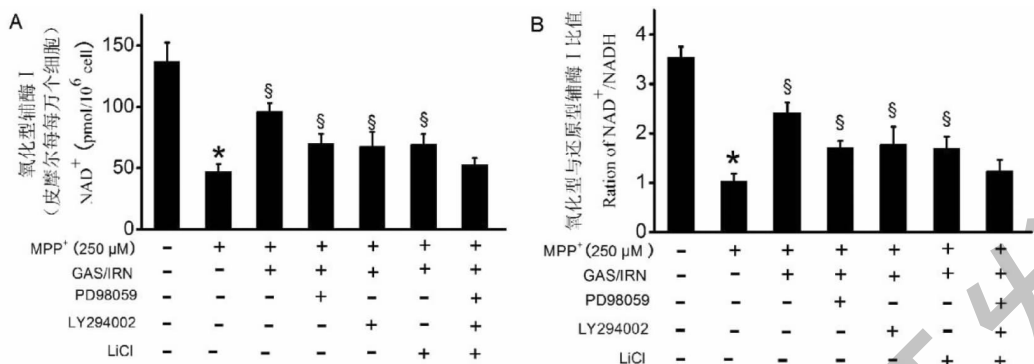


图4 天麻素联合异钩藤碱对 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞 NAD⁺ 含量(A) 和 NAD⁺/NADH 比值(B) 的影响

Fig. 4 Effects of gastrodin combined with isorhynchophylline on NAD⁺ concentration (A) and NAD⁺/NADH ratio(B) in MPP⁺-treated PC12 cells

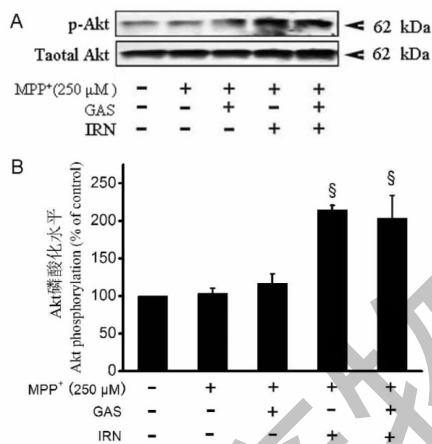


图5 天麻素或/和异钩藤碱对 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞 Akt 磷酸化的影响

Fig. 5 Effects of gastrodin and/or isorhynchophylline on Akt phosphorylation in MPP⁺-treated PC12 cells

3 讨论与结论

以改善运动症状为核心的多巴胺替代治疗目前仍是 PD 治疗的基石,但受到远期疗效和并发症的制约^[10]。“神经保护”已成为延缓 PD 进展的重要治疗策略^[11]。PD 是由多种因素导致的发病机制复杂疾病,而联合用药诱导的生物靶标之间的协同作用可能是改善 PD 复杂病理的有效手段。中药复方天麻钩藤饮能明显改善 PD 患者症状,我们在前期研究中发现,天麻素和异钩藤碱分别是天麻和钩藤的抗 PD 的主要活性成分^[9]。

在 PD 患者脑中已经检测到许多凋亡的神经元和氧化应激,而氧化应激是启动细胞凋亡信号通路

的重要因素^[12],而多巴胺能神经元过度凋亡在 PD 的进展中都起关键作用,PD 的各种病因最终经细胞凋亡这一共同通路导致 PD 发病^[13]。MPTP 通过脑血屏障被胶质细胞摄取氧化后生成 MPP⁺,中脑多巴胺能神经元通过多巴胺转运体摄取 MPP⁺后,在线粒体内抑制线粒体复合物 I 活性,导致中脑黑质多巴胺能神经元凋亡,MPTP/MPP⁺ 是诱导 PD 模型的有效药物^[14]。本研究显示,MPP⁺ 增加 PC12 细胞凋亡和 caspase-3/7 活性,天麻素或者异钩藤碱单独均能显著抑制 PC12 细胞凋亡和 caspase-3/7 活性,天麻素和异钩藤碱联用的抑制作用明显强于二者单独抑制作用。

近年来随着对线粒体结构和功能的深入研究,发现 PD 的进行性发展与线粒体密切相关^[15]。线粒体功能障碍导致线粒体外膜通透性增加,线粒体内 Cyt-c 释放到细胞质,并与凋亡蛋白酶激活因子 1 结合形成多聚体,激活 caspase-9 和 caspase-3,导致静息状态的核酸内切酶活化,最终引起 DNA 断裂和细胞凋亡^[16],而多巴胺能神经元凋亡可导致 PD 的发生。本研究显示,MPP⁺ 降低 PC12 细胞 JC-1 红/绿比值,增加细胞培养上清液 cyct-C 含量,而天麻素和异钩藤碱联合应用对 JC-1 红/绿比值的增加和细胞培养上清液 cyct-C 降低的效应明显强于二者单独应用,提示天麻素和异钩藤碱联合应用的神经保护作用与改善线粒体功能障碍有关。ERK1/2、Akt 和 GSK-3β 信号通路在天麻素和异钩藤碱联合应用神经保护作用中发挥重要作用。

烟酸进入体内后可以在酶的作用下生成 NAD⁺ 和 NADP⁺。NAD⁺ 是呼吸链的重要组成之一,参与

生物体内的氧化还原反应,提高细胞内 NAD⁺/NADH 的含量可缓解神经退行性疾病^[17]。Akt 信号通路是细胞内重要的促存活信号通路,Akt 磷酸化水平增加可对抗神经元凋亡并促进神经元存活,Akt 已被证实参与 PD 发病过程^[18]。有研究表明,PD 患者黑质致密部 Akt 水平降低^[19]。本研究显示,MPP⁺降低 PC12 细胞 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值,而天麻素和异钩藤碱联合应用提高了 PC12 细胞 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值。异钩藤碱单独或与天麻素联合均增加了 PC12 细胞 Akt 磷酸化水平。Akt 在天麻素和异钩藤碱联合应用提高细胞 NAD⁺ 含量和 NAD⁺/NADH 比值中发挥重要作用。

综上所述,本研究明确了天麻素与异钩藤碱联用具有协同作用,可以更好的抑制 PD 相关的神经元凋亡,其机制可能与改善线粒体功能有关,但是联用体外协同神经保护作用需要在体内实验验证,以及其协同神经保护的分子机制有待进一步研究。

参考文献

- Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: implications in Parkinson's disease pathogenesis [J]. *BBA-Proteins Proteom*, 2019, 1867: 890-908.
- Alvarez-Fischer D, Vernik T, Vulinovic F, et al. Transgenerational transduction of MPTP-induced alterations in a Parkinson's disease mouse model [J]. *Parkinsonism Relat D*, 2020, 79: 88-90.
- Zhang Q, Hu C, Huang J, et al. ROCK1 induces dopaminergic nerve cell apoptosis via the activation of Drp1-mediated aberrant mitochondrial fission in Parkinson's disease [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51: 1-13.
- Larsen SB, Hanss Z, Krüger R. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 373: 21-37.
- Lees AJ, Tolosa E, Olanow CW. Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr [J]. *Mov Disord*, 2015, 30: 19-36.
- Lu F, Li XZ, Liu SM, et al. Study on the intervention effects of the effective components of *Acanthopanax senticosus* Harms on wildtype α -synuclein transgenic mice based on the changes of brain microRNAs [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2020, 23: 405-411.
- Li XM, Zhang XJ, Dong MX. Isorhynchophylline attenuates MPP⁺-induced apoptosis through endoplasmic reticulum

stress- and mitochondria-dependent pathways in PC12 cells: Involvement of antioxidant activity [J]. *Neuromol Med*, 2017, 19: 480-492.

- Wang XL, Xing GH, Hong B, et al. Gastrodin prevents motor deficits and oxidative stress in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: involvement of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2014, 114: 77-85.
- Li Q, Niu C, Zhang X, et al. Gastrodin and isorhynchophylline synergistically inhibit MPP⁺-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells by targeting ERK1/2 and GSK-3 β pathways: involvement of Nrf2 nuclear translocation [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9: 482-493.
- Elsworth JD. Parkinson's disease treatment: past, present, and future [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2020, 127: 785-791.
- Rabiei Z, Solati K, Amini-Khoei H. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57: 355-362.
- Zhu YT, Zhu XY, Zhou Y, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease [J]. *Chin J Pract Nerv Dis (中国实用神经疾病杂志)*, 2019, 22: 1271-1276.
- Liu J, Liu W, Yang H. Balancing apoptosis and autophagy for Parkinson's disease therapy: targeting Bcl-2 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10: 792-802.
- Zhong WW, Zhang ZB, Zhang LC, et al. Protective effect of rosemarinic acid on MPTP-induced dopaminergic neurons toxicity [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29: 1723-1727.
- Liddell JR, White AR. Nexus between mitochondrial function, iron, copper and glutathione in Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2018, 117: 126-138.
- Zhong Y, Huang QL, Mo MM, et al. Protective effects and mechanism of curcumin against H₂O₂-induced oxidative injury on HT29 cells [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 401-407.
- Lehmann S, Loh SH, Martins LM. Enhancing NAD⁺ salvage metabolism is neuroprotective in a PINK1 model of Parkinson's disease [J]. *Biol Open*, 2017, 6: 141-147.
- Luo S, Kang SS, Wang ZH, et al. Akt phosphorylates NQO1 and triggers its degradation, abolishing its antioxidative activities in Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2019, 39: 7291-7305.
- Peng T, Liu X, Wang J, et al. Long noncoding RNA HAGLROS regulates apoptosis and autophagy in Parkinson's disease via regulating miR-100/ATG10 axis and PI3K/Akt/mTOR pathway activation [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47: 2764-2774.