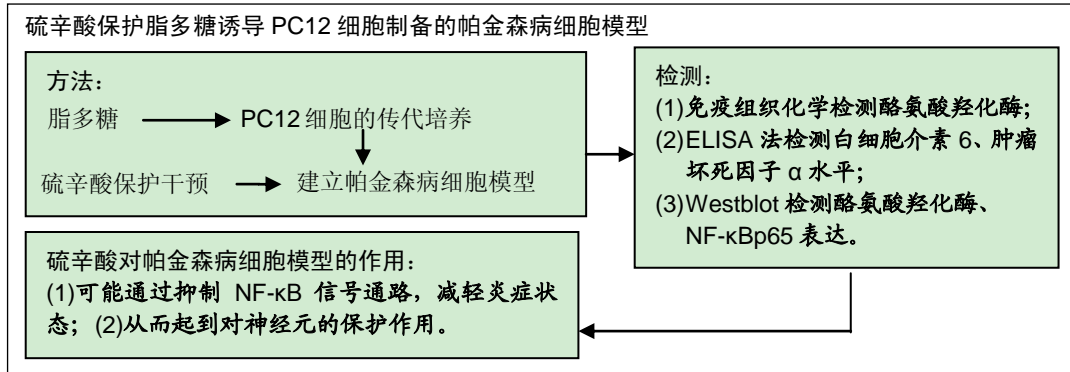


# 硫辛酸对脂多糖诱导帕金森病细胞模型的保护作用及机制

高华<sup>1,2</sup>, 李艳霞<sup>1</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 杨新玲<sup>1</sup> (<sup>1</sup>新疆医科大学第二附属医院神经内科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063; <sup>2</sup>新疆医科大学第五附属医院神经内科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0595 ORCID: 0000-0001-6267-149X(高华)

文章快速阅读:



高华, 女, 1979 年生, 新疆维吾尔自治区伊犁巩留县人, 汉族, 2018 年新疆医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事帕金森病的研究。

通讯作者: 杨新玲, 博士, 主任医师, 新疆医科大学第二附属医院神经内科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063

文献标识码: B

稿件接受: 2018-08-07



文题释义:

**小胶质细胞的活化:** 小胶质细胞作为构成中枢神经系统免疫防御的第一线, 如果在一定条件下受到损伤, 这些细胞将被激活并在这种状态下改变它们的形态、增殖状态, 迁移到破坏位点, 影响相关酶类和受体的表达, 释放多种炎症因子, 如一氧化氮, 肿瘤坏死因子 α, 白细胞介素 6 等。

**神经炎症:** 血脑屏障的存在被认为可以阻止外周的免疫细胞进入脑内, 所以中枢神经系统被认为是“免疫豁免区”。但研究表明脑内的胶质细胞可以发挥免疫应答功能与外周免疫细胞相同, 它们的激活时可以介导脑内炎症免疫的发生。

摘要

**背景:** 近年越来越多的研究证实神经免疫和炎症反应参与了帕金森病的发病, 硫辛酸目前被证实具有抗炎和神经保护作用。

**目的:** 探讨硫辛酸对脂多糖诱导 PC12 细胞制备的帕金森病细胞模型的保护作用及相关可能机制。

**方法:** 将 PC12 细胞分为正常细胞组、脂多糖-帕金森病组和硫辛酸+脂多糖-帕金森病组。硫辛酸预处理 PC12 细胞 2 h 后, 再用脂多糖干预 PC12 细胞。用 CCK8 法筛选最佳帕金森细胞模型制备的脂多糖浓度以及硫辛酸最佳干预浓度; 细胞免疫组织化学法检测各组细胞中酪氨酸羟化酶的表达; ELISA 法检测各组细胞上清液中白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平; Western blot 检测各组细胞中 NF-κBp65、酪氨酸羟化酶的蛋白表达情况。

**结果与结论:** ①建造帕金森细胞模型最佳脂多糖的质量浓度为 600 μg/L, 最佳硫辛酸干预浓度为 25 μmol/L; ②硫辛酸干预后可以促进酪氨酸羟化酶阳性细胞表达, 减少帕金森病细胞模型的炎症因子释放, 并且可以抑制 NF-κBp65 的产生, 提高酪氨酸羟化酶含量; ③结果提示, 硫辛酸对帕金森病细胞模型的作用可能通过抑制 NF-κB 信号通路, 减轻炎症状态, 从而起到对神经元的保护作用。

**关键词:**

硫辛酸; 帕金森病; 脂多糖; NF-κB; PC12 细胞; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子 α; 组织构建

**主题词:**

硫辛酸; 帕金森病; 脂多糖类; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子 α; 组织工程

中图分类号: R446

**基金资助:**

国家自然科学基金项目(U1503222), 项目负责人: 杨新玲

Gao Hua, MD, Attending physician, Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Department of Neurology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Yang Xinling, MD, Chief physician, Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

## Protective effects and the mechanism of lipoic acid on cell model of Parkinson's disease induced by lipopolysaccharide

Gao Hua<sup>1,2</sup>, Li Yanxia<sup>1</sup>, Wang Dan<sup>1</sup>, Yang Xinling<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Neuroimmune and inflammatory reaction have been shown to participate in the occurrence of

Parkinson's disease. Lipoic acid possesses anti-inflammatory and neuroprotective roles.

**OBJECTIVE:** To investigate the protective effects of lipoic acid on PC12 cell models of Parkinson's disease induced by lipopolysaccharide and the underlying mechanism.

**METHODS:** PC12 cells were divided into blank control, model (Parkinson's disease model induced by lipopolysaccharide) and treatment (Parkinson's disease model treated by lipoic acid) groups. PC12 cells were pretreated with lipoic acid for 2 hours, and then stimulated with lipopolysaccharide. The optimal concentration of lipopolysaccharide and lipoic acid was determined by cell counting-kit 8 assay. The expression of tyrosine hydroxylase was detected by immunohistochemistry. The levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 6 were detected by ELISA kit. The protein expression levels of nuclear factor- $\kappa$ Bp65 and tyrosine hydroxylase were detected by western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The optimal concentration of lipopolysaccharide was 600  $\mu$ g/L for constructing cell model of Parkinson disease, and 25  $\mu$ mol/L lipoic acid was the optimal intervention concentration. Lipoic acid could increase the number of tyrosine hydroxylase positive cells, reduce the release of inflammatory factors in cell model of Parkinson's disease, inhibit the production of nuclear factor- $\kappa$ Bp65 and increase tyrosine hydroxylase content. Therefore, lipoic acid exhibits its effects on cell model of Parkinson's disease through inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway and reducing inflammation, thereby exerting neuroprotection.

**Subject headings:** Thioctic Acid; Parkinson Disease; Lipopolysaccharides; Interleukin-6; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Tissue Engineering  
**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. U1503222 (to YXL)

## 0 引言 Introduction

长期以来中枢神经系统都被认为是“免疫豁免区”,不存在免疫炎症<sup>[1]</sup>。近年来发现多种神经系统退行性疾病中的病变部位有免疫炎症的存在<sup>[2]</sup>,越来越多的研究也证实脑内的胶质细胞可介导或激活脑内免疫炎症的发生<sup>[3]</sup>,这使得神经免疫炎症迅速成为当代神经科学研究的一大热点。

帕金森病作为一种神经系统退行性疾病,临床运动症状主要表现为静止性震颤、运动迟缓和肌张力增高等<sup>[4]</sup>,非运动症状有睡眠紊乱、抑郁、认知障碍、脂溢性皮炎等<sup>[5]</sup>。帕金森病的主要病理机制为中脑多巴胺能神经元的丧失,路易小体形成,造成脑内多巴胺含量减少<sup>[6-7]</sup>,其具体发病机制有多种学说,如氧化应激及线粒体功能障碍或异常、炎症免疫反应的参与、变性蛋白的异常聚集沉淀、毒性神经递质的增加等有关<sup>[8]</sup>。在帕金森病脑内可以发现小胶质细胞的活化<sup>[9]</sup>。目前不少研究表明小胶质细胞可激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,启动炎症应答导致脑内炎症递质的增加。也有部分研究显示黑质区内存在 RAS 系统,在其激活状态下通过 RhoA/Rho 激酶(Rock)通路诱发中枢神经系统的炎症<sup>[10]</sup>。诸多研究证实帕金森病与神经炎症密切相关,但其发生的具体机制涉及多个方面并不明确<sup>[11]</sup>。

脂多糖是一种革兰阴性菌胞壁的主要成分,可以作为炎症激活物质促进小胶质细胞的活化和激活<sup>[12]</sup>。在炎症帕金森病的模型制备中,发现通过不同途径给予脂多糖(体内注射或脑立体定位注射),均可以促使黑质区多巴胺能神经元的减少,能很好模拟帕金森病的病理变化<sup>[13]</sup>。硫辛酸因为其明显的抗氧化性而受到广泛应用,主要是因为它作为线粒体  $\alpha$ -酮酸氧化脱氢酶系中的重要辅助因子,能有效清除氧自由基而发挥作用<sup>[14-15]</sup>。近几年研究发现,硫辛酸可以通过不同的路径发挥对神经元的保护作用:①它可以抑制脂多糖诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,降低炎症反应,减轻鱼藤酮诱导的黑质区神经元的损伤<sup>[16]</sup>;②具有抵抗低氧状态、金属离子对神经元的损伤作用<sup>[17-18]</sup>;③减少  $\beta$ -淀粉样蛋白的沉积保护皮质神经元<sup>[19-20]</sup>。

因此,该实验对大鼠嗜铬细胞瘤(PC12 细胞)进行脂多糖的处理,建立体外帕金森病的细胞模型,通过硫辛酸对

脂多糖诱导的帕金森病细胞模型保护作用及其机制的研究,为进一步帕金森病炎症机制的探讨及将硫辛酸作为可能防治帕金森病以及延缓其进展的一个新前景的治疗方案提供基础研究依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 6 月至 2018 年 1 月在新疆医科大学第一临床医学院中心实验室完成。

1.3 材料 1640 高糖培养基(Hyclone 公司)、 $\alpha$ -硫辛酸(奥力宝注射液 德国史达德大药厂)、脂多糖(Sigma 公司)、CCK8(BIOSHARP 日本)、胎牛血清(FBS)(Gibco 公司)和白细胞介素(IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司 中国)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔多克隆抗体 NF- $\kappa$ B p65(武汉三鹰生物技术有限公司);大鼠嗜铬细胞瘤细胞株 PC12(高分化)(中国科学院细胞库)。

1.4 实验方法

1.4.1 PC12 细胞的培养与传代 用含体积分数 10%的胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 1640 培养基。于 37  $^{\circ}$ C、饱和湿度、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,细胞达到 80%-90%汇合时,用 0.25%的胰酶消化,按(4-6) $\times$ 10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup> 传代。一般一两天换液 1 次,三四天传代 1 次。实验时取对数生长期细胞。

1.4.2 脂多糖诱导的帕金森病细胞模型的建立 将 PC12 细胞,以 5 $\times$ 10<sup>3</sup>/孔的密度接种在 96 孔板中,于 37  $^{\circ}$ C、饱和湿度、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,加入脂多糖:质量浓度分别为 200, 600, 1 000  $\mu$ g/L, 24 h 后, PBS 洗 2 遍,每孔加入 100  $\mu$ L 含有 10% CCK8 的无血清培养液,避光培养 4 h,用酶标仪于 450 nm 波长处测定每孔吸光值。最佳的脂多糖干预建造帕金森病细胞模型的浓度标准:选择细胞活性(存活率)降低接近于正常对照组 50%左右的浓度作为最佳浓度。细胞存活率=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(正常组吸光度值-空白组吸光度值) $\times$ 100%。同样的方法对硫辛酸的保护浓度

进行筛选。

1.4.3 采用 CCK8 方法对硫辛酸进行最合适浓度的筛选。在选择 600  $\mu\text{g/L}$  的脂多糖后,在建造细胞模型前 2 h 给予硫辛酸 1, 25 和 50  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的预处理。预处理后采用 CCK8 方法检测干预后的细胞活性,以细胞活性为 50% 左右为合适的干预浓度(筛选方法同脂多糖)。

1.4.4 细胞分组情况 将 PC12 细胞分为正常细胞对照组、脂多糖-帕金森病组、硫辛酸+脂多糖-帕金森病组。

1.4.5 免疫组织化学法检测酪氨酸羟化酶的表达 在 3 组细胞中,均采用细胞爬片后, PBS 冲洗 2 次, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 20 min, 2 遍 PBS 冲洗后, 加入一抗[酪氨酸羟化酶(TH), 1:200], 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。PBS 冲洗 2 次, 加入通用型二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温 30 min, DAB 显色, 苏木精复染, 免疫组织化学细胞片 3 张, 每张随机选取 5 个视野(不重叠), 显微镜下观察计数并获取图像。

1.4.6 ELISA 法检测各组中白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平 PC12 细胞以  $5 \times 10^3$ /孔的密度接种在 96 孔板中, 置于体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 24 h。用硫辛酸(25  $\mu\text{mol/L}$ )预处理 2 h 后, 再用脂多糖(600  $\mu\text{g/L}$ )刺激细胞, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 24 h, 2 000 r/min 离心, 收集细胞上清, 置 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存待测。严格按照说明书进行测定, 每组均设 3 个复孔。

1.4.7 Western blot 检测 NF- $\kappa\text{B}$  p65、酪氨酸羟化酶含量 PC12 细胞悬液浓度调整为  $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ , 取 1 mL 加于 6 孔板内, 置于体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。24 h 后细胞完全贴壁生长时, 用硫辛酸(25  $\mu\text{mol/L}$ )预处理 2 h 后, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  继续分别培养 24 h。用冷的 PBS 洗 2 遍, 在 150  $\mu\text{L}$  RIPA 细胞裂解液中冰上裂解 30 min, 用细胞刮快速刮下, 转移到离心管中, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min, 离心 10 min, 取上清。加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 将待测蛋白在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, PVDF 膜转膜, 5% 脱脂奶封闭, 然后分别加入 1:1 000 第一抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。次日用 TBST 洗 3 遍, 每遍 15 min 后再分别加入 1:1 000 的抗兔第二抗体。室温孵育 1 h, ECL 显色。将定影后的胶片, 通过凝胶成像系统扫描分析结果。采用 Quantity One 图像分析软件进行吸光度分析。将各部分的吸光值与各总蛋白条带吸光值的比值作为其蛋白的相对表达量。

1.5 主要观察指标 ①建立帕金森病细胞模型的最合适的脂多糖质量浓度; ②硫辛酸干预细胞模型的最佳浓度; ③免疫组织化学法检测各组细胞酪氨酸羟化酶的表达; ④ELISA 法检测检测各组细胞炎症因子的表达; ⑤Western blot 检测各组 NF- $\kappa\text{B}$  p65 和酪氨酸羟化酶的表达。

1.6 统计学分析 用 SPSS 17.0 统计学软件, 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

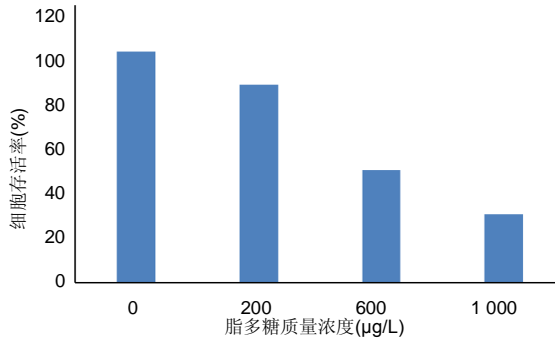
2.1 脂多糖诱导的帕金森病细胞模型的建立 在 200, 600, 1 000  $\mu\text{g/L}$  不同脂多糖质量浓度下, 其细胞存活率分别为 85%, 49%, 30%, 相对于未进行干预的细胞组为基准(100%, 单纯加入 CCK8 检测)。通过 CCK8 方法筛选建立帕金森病细胞模型的最合适的脂多糖质量浓度为 600  $\mu\text{g/L}$ , 见图 1, 在此质量浓度下细胞的存活率在 50% 左右, 故作为后续实验研究条件。

2.2 硫辛酸干预细胞模型的最佳浓度的测定 在确定了合适的脂多糖(600  $\mu\text{g/L}$ )建造帕金森细胞模型的质量浓度后, 在脂多糖-帕金森病模型之前给予硫辛酸进行保护性干预 2 h 后, 在不同浓度(1, 25 和 50  $\mu\text{mol/L}$ )采用 CCK8 方法检测其细胞存活率分别为 51%, 71%, 61%, 以未进行干预的细胞组为基准(100%, 单纯加入 CCK8 检测), 最合适的硫辛酸的浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ , 在此浓度下, 相对于 1  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$ , 对细胞存活率有很好的保护作用, 可以使单纯的脂多糖-帕金森病组细胞存活率从 51% 上升至 71%, 以此为最佳浓度, 见图 2。

2.3 各组细胞酪氨酸羟化酶的表达 可以看到表现胞浆为棕黄色的酪氨酸羟化酶的表达, 细胞胞体略有缩小, 突触更明显。PC12 的细胞正常组中, 酪氨酸羟化酶的阳性细胞数表现最为多。在给予脂多糖(600  $\mu\text{g/L}$ )建造的帕金森病细胞模型中, 可以发现细胞活性部分被损害, 脂多糖-帕金森病组中酪氨酸羟化酶的阳性细胞数减少, 给予硫辛酸(25  $\mu\text{mol}$ )保护性干预后可以观察到酪氨酸羟化酶的数量略有所恢复, 将 3 组(每组包含有 15 个视野)的酪氨酸羟化酶阳性细胞数进行比较[(143 $\pm$ 4), 105 $\pm$ 5], (124 $\pm$ 1)个], 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图 3, 4。

2.4 ELISA 法检测各组细胞炎症因子表达 在正常细胞组、脂多糖-帕金森病组和硫辛酸+脂多糖-帕金森病组的 3 组细胞中, 白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平在脂多糖-帕金森病组相对于正常细胞组明显增加, 加入硫辛酸后可以抑制两者的产生, 从而使其表达有所下降。即白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平在脂多糖+硫辛酸组中, 相比较脂多糖-帕金森病组有所减少, 但较正常细胞组仍有较高表达[白细胞介素 6: (80.02 $\pm$ 1.25), (138.10 $\pm$ 2.11), (109.60 $\pm$ 1.30) ng/L; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ : (116.60 $\pm$ 3.55), (228.00 $\pm$ 2.12), (162.00 $\pm$ 5.08) ng/L], 3 组间比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图 5。

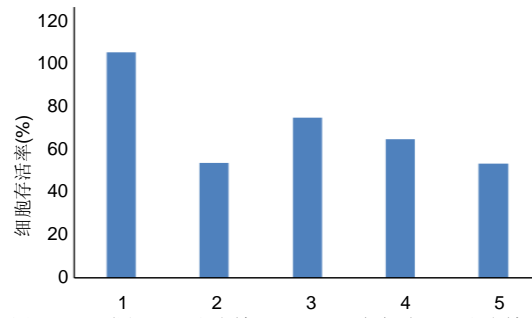
2.5 Western blot 检测各组 NF- $\kappa\text{B}$  p65 和酪氨酸羟化酶的表达 正常细胞的对照组中, 酪氨酸羟化酶和 NF- $\kappa\text{B}$  p65 均有表达。以此为对照基线, 在脂多糖-帕金森病组中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 表达含量增加, 同时促使酪氨酸羟化酶表达含量减少。给予硫辛酸干预后可降低脂多糖-帕金森病组中 NF- $\kappa\text{B}$  p65 的表达含量, 提高的酪氨酸羟化酶的表达。但硫辛酸-脂多糖-帕金森病组中两者相对于正常细胞的对照组中, 不能恢复正常状态。其两者的含量在 3 组比较差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图 6。



图注: 通过 CCK8 方法筛选建立帕金森病细胞模型的最合适的脂多糖质量浓度为 600 μg/L, 细胞的存活率在 50% 左右。

图 1 不同脂多糖质量浓度下细胞存活率

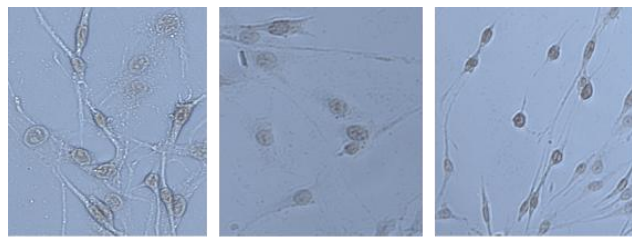
Figure 1 Cell survival rate after stimulation by different concentrations of lipopolysaccharide



图注: 1: 正常组; 2: 脂多糖+1 μmol/L 硫辛酸; 3: 脂多糖+25 μmol/L 硫辛酸; 4: 脂多糖+50 μmol/L 硫辛酸; 5: 脂多糖-帕金森病组。最合适的硫辛酸的浓度为 25 μmol/L, 可以使单纯的脂多糖-帕金森病组细胞存活率从 51% 上升至 71%。

图 2 不同硫辛酸浓度下细胞存活率

Figure 2 Cell survival rate after stimulation by different concentrations of lipoic acid

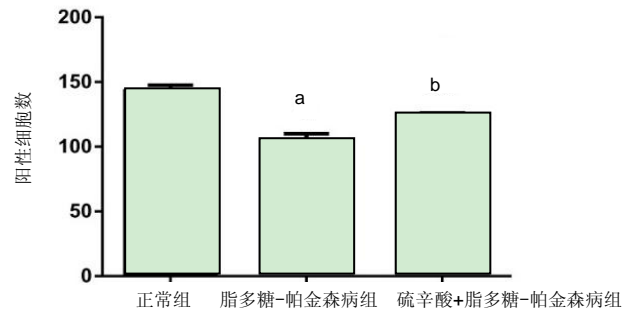


正常组 脂多糖-帕金森病组 硫辛酸+脂多糖-帕金森病组

图注: 给予硫辛酸保护性干预后可以观察到酪氨酸羟化酶的数量略有所恢复。

图 3 各组细胞免疫组织化学检测酪氨酸羟化酶的表达(x200)

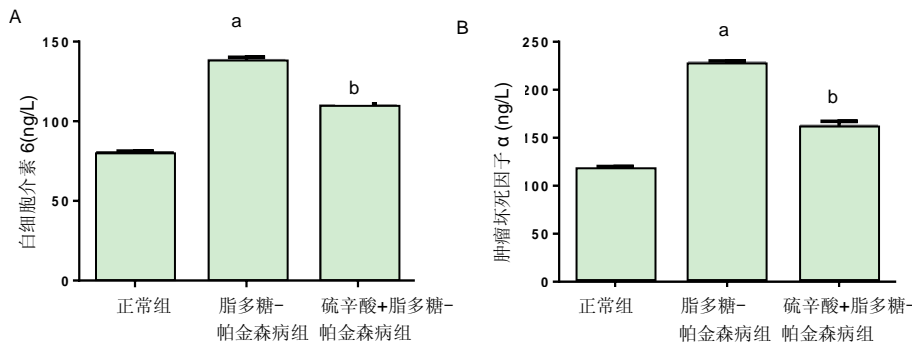
Figure 3 Expression of tyrosine hydroxylase in each group detected by immunohistochemistry (x200)



图注: 与正常组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与脂多糖-帕金森病组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05。

图 4 各组酪氨酸羟化酶阳性细胞数量的比较

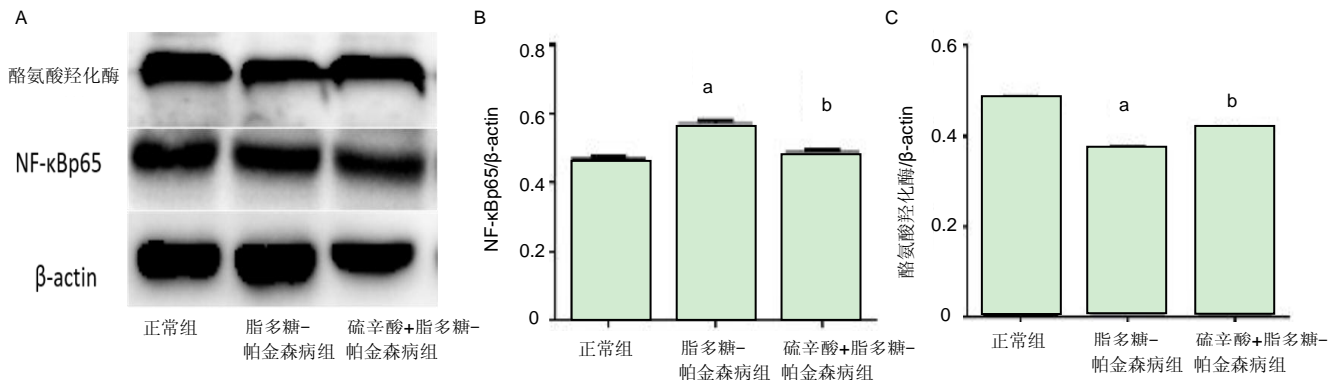
Figure 4 Comparison of number of tyrosine hydroxylase positive cells among groups



图注: 图 A 为白细胞介素 6 表达; B 为肿瘤坏死因子 α 表达。与正常组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与脂多糖-帕金森病组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05。

图 5 ELISA 法检测各组细胞炎症因子的表达

Figure 5 Expression of inflammatory factors in each group detected by ELISA



图注: 图 A 为电泳图; B 为 NF-κB p65 相对表达; C 为酪氨酸羟化酶相对表达。给予硫辛酸干预后可降低脂多糖-帕金森病组中 NF-κB p65 的表达, 提高酪氨酸羟化酶的表达。与正常组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与脂多糖-帕金森病组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05。

图 6 各组细胞酪氨酸羟化酶和 NF-κB p65 的表达

Figure 6 Expression levels of nuclear factor-κB p65 and tyrosine hydroxylase in each group

### 3 讨论 Discussion

帕金森病作为一种常见的神经系统退行性疾病,具有一定的年龄依赖性,随着人口老龄化的到来,发病的人数也日趋增多,随之带来的社会和经济负担也越来越重。但目前其具体的发病机制并不明确(包括了多种的病因及机制学说),其治疗方法和途径也有限,目前的治疗方法主要为对症支持治疗,以缓解症状、减慢疾病进展为主,暂无有效的病因治疗,故无法治愈。因此,探究帕金森病的致病机制显得尤为重要、紧迫<sup>[21]</sup>,对于帕金森病的发病机制研究及有效治疗进行探讨也成为目前众多科学研究的一个方向。

硫辛酸是线粒体脱氢酶的辅酶,同时具有脂溶性和水溶性。可以激活胰岛素通路;可作为金属离子螯合剂;抗氧化剂,降低氧化应激损伤<sup>[22-23]</sup>;也可转化为二氢硫辛酸(DHLA),发挥作用<sup>[24]</sup>。硫辛酸具有广泛的生物学效应,也已经被应用于临床治疗和辅助治疗方面,主要参与氧化应激和炎症相关类疾病,例如心血管系统疾病、与认知功能障碍相关性疾病、糖尿病等<sup>[25]</sup>,可以改善多种疾病的临床症状<sup>[26-28]</sup>。

有相关报道硫辛酸发挥抗炎作用,可以抑制脂多糖介导的炎症反应<sup>[29-31]</sup>。在炎症反应的相关通路中,NF- $\kappa$ B是传统经典模式,也是最为常见的炎症信号通路,参与了多种的炎症应答和反应<sup>[32]</sup>。鉴于帕金森病的炎症机制学说和硫辛酸的多种药理机制,选择脂多糖诱导后NF- $\kappa$ B的激活,观察对机体炎症状态及TH的影响。

在帕金森病的动物模型中发现肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1和白细胞介素6均有增高,给予抑制炎症反应干预后,可以减轻6-羟基多巴胺或其他神经毒素对多巴胺能神经元的损伤<sup>[33-34]</sup>。硫辛酸被证实发现可以改善机体的炎症状态通过抑制白细胞介素6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的产生<sup>[35]</sup>,这在该实验中也有所反映,在制备的帕金森病的细胞模型中,可以观察到肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及白细胞介素6炎症因子明显增加( $P < 0.05$ ),呈现一种炎症的状态。硫辛酸也被证实,其也可以通过抑制血管细胞黏附分子(VCAM)和基质金属蛋白酶9的表达,有效保护血管内皮进而阻滞由慢性炎症介导的血管类疾病相关疾病的转归和发展<sup>[36]</sup>。硫辛酸可通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活,降低白细胞介素6、IFN- $\gamma$ 等炎症因子的释放,减少神经系统损伤<sup>[37]</sup>,亦可通过激活Akt信号通路来抑制炎症反应<sup>[38]</sup>。虽然在实验中可以观察到白细胞介素6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 炎症因子水平的下降,以及NF- $\kappa$ Bp65的减少,酪氨酸羟化酶的含量有所增加,但具体路径并不能十分清晰明确,可能包含多种机制的交互性。在给予硫辛酸在帕金森病模型鼠治疗后,发现其行为学症状得以改善,可以抑制中脑黑质区小胶质细胞的活化和聚集,减少炎症因子产生,从而减轻多巴胺能神经元的损伤<sup>[39]</sup>。

该研究发现,通过脂多糖干预PC12细胞可以建立帕金森病细胞模型,建造的帕金森病模型细胞可以表达酪氨酸羟化酶,

从而为下一步关于帕金森病理或发病机制研究建立实验基础。在此基础上,给予外源性的硫辛酸干预后,首先可以观察到脂多糖-帕金森病组,其酪氨酸羟化酶阳性细胞的数量有所增加,同时肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及白细胞介素6炎症因子水平有所减少,在进行Western blot检测酪氨酸羟化酶及NF- $\kappa$ B通路相关蛋白NF- $\kappa$ B p65表达时,酪氨酸羟化酶表达相对于单纯的脂多糖-帕金森病组有所增加,NF- $\kappa$ B p65有所减少,说明硫辛酸在一定程度上参与了炎症的反应通路,可以减少脂多糖-帕金森病中的参与炎症表达重要NF- $\kappa$ B p65蛋白的产生,从而减轻炎症反应,提高酪氨酸羟化酶的表达。NF- $\kappa$ B通路的激活或抑制也是多种因素共同的结果,会受到不同影响状态下的调控,因而考虑到,硫辛酸可能通过NF- $\kappa$ B通路参与到了炎症反应过程中,从而起到保护神经元的作用,但其具体抗炎的作用机制不知道,推测可能是炎症通路复杂的级联反应或与自我炎症免疫反应的协同作用,共同抑制NF- $\kappa$ B通路的激活。

该课题实验中,发现了硫辛酸可以有效抑制NF- $\kappa$ B信号通路,抑制炎症因子的生成,可以保护多巴胺能神经元,这为硫辛酸治疗帕金森病提供了实验性基础。但实验也存在局限性,该实验并未采用中脑多巴胺的神经元直接进行研究,尚不能完全反映神经元在不同状态下的生理特点。对于硫辛酸的治疗机制尚需进一步通过原代细胞和动物实验来验证,同时对于某种相关分子信号通路中其他相关的关键靶分子仍需进一步研究和证实,进行协同验证。

**致谢:** 感谢新疆医科大学中心实验室工作人员提供的帮助。

**作者贡献:** 实验设计为高华第一作者、李艳霞第二作者、杨新玲通讯作者,实验实施为高华第一作者、李艳霞第二作者,王丹第三作者。实验评估为高华第一作者、杨新玲通讯作者。高华第一作者成文,杨新玲通讯作者审核,高华第一作者和对文章负责。细胞干预采用盲法评估。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(U1503222)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。Checked twice by iThenticate.

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Muldoon LL, Alvarez JI, Begley DJ, et al. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(1):13-21.
- [2] Jha MK, Suk K, G1ia. based biomarkers and their functional role in the CNS. *Expert Rev Proteomics.* 2013;10:43-63.
- [3] Gonz61ez H, Elgueta D, Montoya A, et al. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuro-inflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol.* 2014;274:1-13.
- [4] Sveinbjomsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;139:318.
- [5] He H, Wang S, Tian J, et al. Protective effects of 2, 3, 5, 4-tetra-hydroxystilbene-2-O-B-dglucoside in the MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: Involvement of reactive oxygen species mediated JNK, P38 and mitochondrial pathways. *Eur J Pharmacol.* 2015;767:175-182.
- [6] Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function-implications for parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;137(3):331-359.
- [7] Gallagher DA, Schapira AH. Etiopathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem.* 2009;9(10):860-868.
- [8] Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biol.* 2014;2(1):82-90.
- [9] Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Pallares J, Dominguez-Mejide A, et al. opamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(10):1337-1342.
- [10] Borrajo A, Rodriguez-Perez AI, Diaz-Ruiz C, et al. Microglial TNF-alpha mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia.* 2014;62(1):145-157.
- [11] Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011;18:85-64.
- [12] 杨丽娟,董军,陆大祥,等.姜黄素对脂多糖激活小胶质细胞培养基诱导损伤的海马神经元保护作用及机制[J].中国病理生理杂志,2010, 26(4):742-747.
- [13] 和青.LPS经鼻小鼠帕金森病模型的建立及Rho激酶靶点干预探讨[D].上海:复旦大学,2013.
- [14] Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, et al. Lipoic acid as a potential therapy for chronic disease associated with oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2004;11(9):1135-1146.
- [15] 李艳花,和青,尉杰忠,等.硫辛酸对脂多糖诱导的帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元损伤的影响[J].中国病理生理杂志, 2015,31(2): 201-206.
- [16] Zaitone SA, Abo-Eimatt DM, Shaalan AA. Acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain implication for Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;100(3): 347-360.
- [17] Müller U, Krieglstein J. Prolonged pretreatment with alpha-lipoic acid protects cultured neurons against hypoxic, glutamate-, or iron-induced injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15(4): 624-630.
- [18] Perez-Matos MC, Morales-Alvarez MC, Mendivil CO. Lipids: A Suitable Therapeutic Target in Diabetic Neuropathy? *J Diabetes Res.* 2017;2017:6943851.
- [19] Dong Y, Wang H, Chen Z. Alpha-Lipoic Acid Attenuates Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury via Insulin Receptor and PI3K/Akt-Dependent Inhibition of NADPH Oxidase. *Int J Endocrinol.* 2015;2015, 903186.
- [20] Kamarudin MN, Mohd Raflee NA, Hussein SS, et al. (R)-(+)-alpha-lipoic acid protected NG108-15 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3β pathway and suppression of NF-κβ-cytokines. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8: 1765-1780.
- [21] Kones R. Mitochondrial therapy for Parkinson's disease: neuroprotective pharmacotherapy may be disease-modifying. *Clin Pharmacol.* 2010;2:185-198.
- [22] 马玲,周勇,王莉,等.硫辛酸减轻高尿酸血症大鼠氧化应激损伤[J].基础医学与临床,2015,35(8):1037-1041.
- [23] Rochette L, Ghibu S, Richard C, et al. Direct and indirect antioxidant properties of alpha-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57(1):114-125.
- [24] Kleinkauf-Rocha J, Bobermin LD, Machado PM, et al. Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(3):165-170.
- [25] Papanas N, Ziegler D. Efficacy of alpha-lipoic acid in diabetic neuropathy. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(18):2721-2731.
- [26] Zhao L, Hu FX. Alpha-Lipoic acid treatment of aged type 2 diabetes mellitus complicated with acute cerebral infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(23):3715-3719.
- [27] Saygin M, Asci H, Cankara FN, et al. The impact of high fructose on cardiovascular system: Role of alpha-lipoic acid. *Hum Exp Toxicol.* 2015;35(2):194-204.
- [28] Hegazy SK, Tolba OA, Mostafa TM, et al. Alpha-lipoic acid improves subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2013;10(1):58-67.
- [29] Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, et al. Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3β in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *Neurosci Res.* 2013;77(1-2):87-96.
- [30] Jiang S, Zhu W, Li C, et al. alpha-Lipoic acid attenuates lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(1):100-107.
- [31] Ying Z, Xie X, Chen M, et al. Alpha-lipoic acid activates eNOS through activation of PI3-kinase/Akt signaling pathway. *Vascu Pharmacol.* 2015;64:28-35.
- [32] Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol, Cell Mol Physiol.* 2006;290(1):L622-L645.
- [33] Wu DC, Teismann P, Tieu K, et al. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10):6145-6150.
- [34] Zhang F, Qian L, Flood PM, et al. Inhibition of IκB kinase-beta protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(3):822-833.
- [35] Li Y, Ma QG, Zhao LH, et al. Effects of lipoic acid on immune function, the antioxidant defense system, and inflammation-related genes expression of broiler chickens fed aflatoxin contaminated diets. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):5649-5662.
- [36] Kim HS, Kim HJ, Park KG, et al. Alpha-lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF-kappaB transcriptional activity. *Exp Mol Med.* 2001;39(1):106-113.
- [37] Li G, Fu J, Zhao Y, Ji K, et al. Alpha-lipoic acid exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated rat mesangial cells via inhibition of nuclear factor kappa b (NF-kappaB) signaling pathway. *Inflammation.* 2015;38(2):510-519.
- [38] Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, et al. Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3β in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *Neurosci Res.* 2013;77(1/2):87-96.
- [39] Li YH, He Q, Yu JZ, et al. Lipoic acid protects dopaminergic neurons in lps-induced parkinson's disease model. *Metab Brain Dis.* 2015;30(5):1-10.