

[10]

何渝熙, 魏庆中, 熊启良, 等. 骨质疏松性骨折与骨密度关系的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 219-224.

[11]

王洪恩, 张慧敏. 运动性骨骼肌和心肌损伤与肌钙蛋白的关系[J]. 中国临床康复, 2005, 32(9): 201-203.

[12]

杨 芳, 郑洪新, 朱 辉, 等. 补肾、健脾、活血法对糖皮质激素诱导骨质疏松症大鼠骨密度、骨骼肌肌钙蛋白影响的比较研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(5): 871-873.

[13]

邓阿黎, 周忠明, 姜惠中, 等. 滋补肝肾中药方对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织影响的实验研究[J]. 中国药师, 2011, 14(2): 154-157.

[14]

涂国卿, 邹来勇. 热敏灸对骨质疏松大鼠 ALP 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2134-2135.

[15]

李 环, 韩丽萍, 梁 芳. 仙鹿壮骨方对去卵巢大鼠骨质疏松症骨密度和血清降钙素的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(6): 4-6.

[16]

黄海玲, 李 海, 王金花, 等. 雌激素与不同剂量的葛根素联合对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(33): 5228-5231.

松果菊苷通过调控 GFRα1/AKT 信号通路抑制 MPP⁺ 诱导的多巴胺能细胞 SH-SY5Y 凋亡

赵 卿¹, 张 鹏², 白 宇¹, 张利军¹, 侯郁青¹, 蔡定芳^{3,4}
(1. 上海中医药大学附属普陀医院神经内科, 上海 200062; 2. 上海中医药大学附属普陀医院中心实验室, 上海 200062; 3. 复旦大学附属中山医院中西医结合科, 上海 200032; 4. 复旦大学中西医结合研究所, 上海 200032)

摘要: **目的** 研究肉苁蓉提取物松果菊苷 (echinacoside) 对 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP⁺) 诱导帕金森病模型 SH-SY5Y 细胞的保护机制。**方法** SH-SY5Y 细胞分别接受磷酸缓冲溶液 (PBS)、MPP⁺ 和/或松果菊苷处理后, 分析细胞生长情况, 采用 Western blot 结合免疫荧光法分析各处理组细胞内胶质细胞源性神经营养因子家族受体 α1 (GFRα1) 及其下游抗凋亡 AKT (蛋白激酶 B) 磷酸化及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 水平变化, 并观察 AKT 抑制剂 LY249002 对松果菊苷对 SH-SY5Y 的保护功能的影响。**结果** 松果菊苷可以显著缓解 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的凋亡 [MPP⁺ vs MPP⁺/松果菊苷, (25.12 ± 4.33)% vs (5.13 ± 1.51)%, *P* < 0.01]。松果菊苷可以抑制 MPP⁺ 下调 SH-SY5Y 细胞内 GFRα1 表达和 AKT 磷酸化。进一步的研究表明特异性阻断 AKT 信号通路可以取消松果菊苷促进 SH-SY5Y 在 MPP⁺ 诱导损伤下生存的功能, 但不影响松果菊苷提高 GFRα1 的表达。对 SH-SY5Y 细胞内 Caspase-3 活性分析的结果显示, 松果菊苷可以抑制 MPP⁺ 诱导 Caspase-3 的活化 [MPP⁺ vs MPP⁺/松果菊苷, (7.22 ± 1.51) vs (1.81 ± 0.42), *P* < 0.01], 但是这一作用可以被 AKT 抑制剂阻断。**结论** 松果菊苷通过上调 GFRα1/AKT 通路抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 发挥保护神经细胞存活的功能。

关键词: 松果菊苷; SH-SY5Y 细胞; 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP⁺); 胶质细胞源性神经营养因子受体 α1 (GFRα1); GFRα1/AKT 信号通路; 凋亡

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)06-1225-07
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.005

Echinacoside inhibits apoptosis of SH-SY5Y cell through GFRα1/AKT pathway

ZHAO Qing¹, ZHANG Peng², BAI Yu¹, ZHANG Li-jun¹, HOU Yu-qing¹, CAI Ding-fang^{3,4}
(1. Department of Neurology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. Central Laboratory, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3. Department of Integrative Medicine, Zhong-

收稿日期: 2015-12-04
基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81202814); 上海市卫生和计划生育委员会青年课题 (20124y116)
作者简介: 赵 卿 (1978—), 博士, 主治医师, 主要从事神经内科相关疾病的临床和基础研究。Tel: (021) 22233222-58082, E-mail: qingzhao2010@hotmail.com

han Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 4. Institute of Integrative Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: AIM To study the protective effects of echinacoside, extracted from *Cistanches Herba*, on 1-methyl-4-phenylpyridiniumion (MPP^+) -induced SH-SY5Y cells of Parkinson's disease model. **METHODS** After SH-SY5Y cells were treated with phosphate buffer saline (PBS), 40 $\mu\text{g/mL}$ echinacoside, 1 mmol/L MPP^+ , and/or both of echinacoside and MPP^+ , cell proliferation was detected, and GFR α 1, phosphorylated AKT molecule (protein kinase B) as well as Caspase-3 protein level were analyzed by Western blot and immunofluorescence. Echinacoside's protective effects were also evaluated when AKT phosphorylation was blocked by an AKT specific inhibitor, LY49002. **RESULTS** Echinacoside significantly decreased cell apoptosis induced by MPP^+ in SH-SY5Y cells [MPP^+ vs MPP^+ /echinacoside, $(25.12 \pm 4.33)\%$ vs $(5.13 \pm 1.51)\%$, $P < 0.01$]. Data indicated that echinacoside could up-regulate the expression of GFR α 1, a critical pro-survival receptor, and improve AKT phosphorylation after SH-SY5Y cells were exposed to MPP^+ . Further study suggested that LY49002 could abrogate echinacoside's function of improving cell survival but not affecting its effect of increasing GFR α 1. Echinacoside also could inhibit Caspase-3 activation induced by MPP^+ in SH-SY5Y [MPP^+ vs MPP^+ /ECH, (7.22 ± 1.51) vs (1.81 ± 0.42) , $P < 0.01$]. But its function depended on AKT activation. **CONCLUSION** In summary, our data strongly support that echinacoside protects cell against MPP^+ -induced apoptosis through GFR α 1/AKT signal pathway in SH-SY5Y cells.

KEY WORDS: echinacoside; SH-SY5Y cell; MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridiniumion); glial cell-derived neurotrophic factor family receptor α 1 (GFR α 1); GFR α 1/AKT singal pathway; apoptosis

随着我国老年人口的不断增加,神经退行性疾病的发病率也逐年提高。帕金森病(Parkinson's disease, PD)发病率在神经退行性疾病中占第二位^[1]。PD患者中脑黑质区多巴胺能神经元丢失导致运动神经元重要神经递质多巴胺合成和释放都急剧下降^[2]使病人出现少动、震颤、强直等运动障碍症状。如何抑制多巴胺能神经元的减少和增加脑内多巴胺含有量是治疗PD的主要方案,而与多巴胺替代治疗相比,保护多巴胺能神经元和减少多巴胺能神经元的凋亡是更加根本性的治疗^[3]。但到目前为止,临床上还没有发现特异性保护大脑多巴胺能神经元的治疗药物。松果菊苷(echinacoside, ECH)是传统中药肉苁蓉中提取的主要活性糖苷,已有研究表明松果菊苷具有较强的抗自由基能力^[4]。体外实验已经证明松果菊苷可抑制大鼠神经元样细胞PC12^[5]、小肠内皮细胞^[6]和人神经元样细胞SH-SY5Y细胞(又称神经母细胞瘤细胞)^[7]的凋亡;本课题组前期体内研究表明,松果菊苷可以缓解1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的小鼠的PD症状,抑制PD小鼠纹状体内多巴胺能神经元的凋亡,并促进胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)的表达^[8-9]。SH-SY5Y细胞具有合成多巴胺和多巴胺受体的特征,1-甲基-4-苯基吡啶离子

(1-methyl-4-phenylpyridiniumion, MPP^+)诱导的SH-SY5Y细胞凋亡模型已经被广泛应用于研究PD发病的分子机制和药效学评价^[7,10-11]。另有研究发现,松果菊苷可以通过保护线粒体发挥抑制 MPP^+ 诱导SH-SY5Y细胞的凋亡^[12]。为了进一步揭示松果菊苷保护神经细胞的分子机制,本研究以 MPP^+ 诱导SH-SY5Y细胞凋亡为PD细胞模型,研究神经细胞增殖和促存活调控关键受体—GDNF受体 α 1(GDNF receptor α 1, GFR α 1)和其下游信号通路中重要激酶AKT是否参与松果菊苷保护神经细胞的调控。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂 松果菊苷(纯度大于98%)购买自成都普思生物科技有限公司(PS0004-0100, 20 mg);双苯酰亚胺(Hoechst 33342)、多聚L-赖氨酸和碘化1-甲基-4-苯基吡啶(水溶液中解离成 MPP^+)从美国Sigma公司购买;DMEM细胞培养基和胎牛血清从美国Gibco公司购买;AKT磷酸化抑制剂LY294002从美国Santa Cruz公司购买;化学发光底物从苏州康为世纪公司购买;Caspase-3活性检测试剂盒从碧云天生物技术研究购买。

1.2 细胞培养和处理 SH-SY5Y细胞购买自中国科学院细胞库。细胞被培养在含有10%胎牛血清和1%青链霉素的DMEM培养基。培养温度为37℃,培养箱内含饱和水气和5%CO₂。 MPP^+ 在

使用前用灭菌水配制,松果菊苷被溶于灭菌的磷酸缓冲溶液(PBS)溶液里。加药处理前,细胞被种到6孔细胞培养板中,每孔 5×10^5 ,培养24 h后,加药后继续培养24 h收样。细胞用RIPA裂解液(购买自上海多彩生物科技有限公司)裂解后用Western blot分析AKT磷酸化水平和GFR α 1水平。

1.3 细胞活力分析 细胞被种到24孔培养板中,每孔 8×10^4 ,24 h后分别给与1 mmol/L MPP⁺、40 μ g/mL的松果菊苷或40 μ g/mL松果菊苷+1 mmol/L MPP⁺、PBS作为对照。在研究松果菊苷调控AKT磷酸化与SH-SY5Y细胞凋亡关系时,细胞药物处理中全部加入1 mmol/L的MPP⁺,实验组细胞分别加入40 μ g/mL松果菊苷、40 μ g/mL松果菊苷+20 μ mol/L LY490002,空白对照仅加PBS对照,无任何药物处理。所有细胞活力分析,每个处理设6个复孔,实验重复3次。实验开始每天计数活细胞数。

1.4 Western blot 分析 Western blot用常规方法,具体见参考文献[13]。兔抗AKT抗体、兔抗磷酸化AKT S473抗体和兔抗GFR α 1抗体从美国CST公司购买,按照1:1 000稀释倍数用于杂交转印后的PVDF膜(购自美国Pall公司)。小鼠抗 β -Actin单克隆抗体(购自美国Santa Cruz)按照1:3 000稀释倍数杂交转印后的PVDF膜。HRP偶联的羊抗兔IgG和HRP偶联的山羊抗小鼠IgG(购自美国Jackson Immuno Research Laboratories)按照1:10 000稀释倍数用于Western blot。显色采用化学发光的方法,用天能化学发光成像仪(上海天能)采集和分析图像。

1.5 免疫荧光分析 细胞种到用多聚赖氨酸包被过的盖玻片上,培养过夜,加入不同的药物处理24 h后,用冷甲醇固定。小鼠抗 α -Tubulin单克隆抗体(购自美国Sigma公司)和兔抗GFR α 1抗体(购自美国CST公司)都按照1:1 000稀释到一抗稀释液(购自上海多彩生物科技有限公司)中使用。具体方法按照抗体说明书操作。二抗分别使用FITC标记的羊抗小鼠IgG和Alex565标记的羊抗兔IgG(购买自美国Life Technologies公司),1:2 000稀释后使用,使用方法参照二抗说明书进行。细胞核用5 μ g/mL的Hoechst 33342室温染色5 min,PBS洗涤4次后,用甘油封片。细胞爬片用莱卡SP8激光共聚焦显微镜(德国Leica公司制造)观察和拍照。

1.6 TUNEL 标记细胞凋亡分析 细胞爬片制备和

药物处理和免疫荧光相同。实验分为对照组、40 μ g/mL松果菊苷、1 mmol/L MPP⁺、MPP⁺/松果菊苷组。细胞处理24 h后,用冷PBS洗涤2次后,冷甲醇固定。根据Tunel试剂盒(罗氏诊断公司)说明书进行标记。结果用尼康荧光显微镜(NIKON,日本)拍照,每个爬片选取不连续的5个视野,统计阳性细胞率。

1.7 Caspase-3 活性分析 细胞被种到6孔培养板中,每孔 5×10^5 ,24 h后分别给与1 mmol/L MPP⁺、40 μ g/mL的松果菊苷或40 μ g/mL松果菊苷+1 mmol/L MPP⁺,PBS作为对照。在研究松果菊苷调控AKT磷酸化与SH-SY5Y细胞凋亡关系时,细胞药物处理中全部加入1 mmol/L的MPP⁺,实验组细胞分别加入40 μ g/mL松果菊苷、40 μ g/mL松果菊苷+20 μ mol/L LY490002,空白对照仅加PBS对照,无任何药物处理。细胞加药后24 h,用Caspase-3试剂盒的细胞裂解液裂解细胞,并定量蛋白后,按照说明书方法进行测定。每个处理设3个复孔,实验重复3次。

1.8 结果统计 所有Western blot结果用天能图像分析系统进行灰度分析,并以内参蛋白作为对照,结果为目的蛋白与内参蛋白灰度的比值。磷酸化水平表示为以磷酸化信号与总蛋白信号的比值。数据处理用微软EXCEL完成,并使用学生氏*t*检验进行显著性检验,当 $P < 0.05$ 时为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 松果菊苷减少MPP⁺诱导SH-SY5Y的凋亡 已有多个研究表明MPP⁺可以诱导SH-SY5Y细胞凋亡,本研究中通过SH-SY5Y生长曲线显示,MPP⁺也显著抑制了SH-SY5Y细胞的生长,处理3 d时抑制率为80.4%(图1A~B),并明显诱导细胞凋亡(图1C~D)。单独加入松果菊苷对SH-SY5Y细胞的正常生长没有明显的影响,但是对于存在MPP⁺时,松果菊苷可以显著的减少SH-SY5Y细胞的凋亡,保护了SH-SY5Y细胞和恢复了在MPP⁺存在时细胞的生长(图1A)。细胞的形态显示松果菊苷保护了细胞正常结构,减少细胞凋亡(图1B)。采用TUNEL标记法分析凋亡细胞水平显示,MPP⁺显著地诱导了SH-SY5Y细胞的凋亡[MPP⁺处理组 vs 对照组,(25.12 ± 4.33)% vs (3.01 ± 0.51)%, $P < 0.01$]。而且松果菊苷可以显著的降低凋亡细胞比例(MPP⁺ vs MPP⁺/松果菊苷,(25.12 ± 4.33)% vs (5.13 ± 1.51)%, $P < 0.01$)。

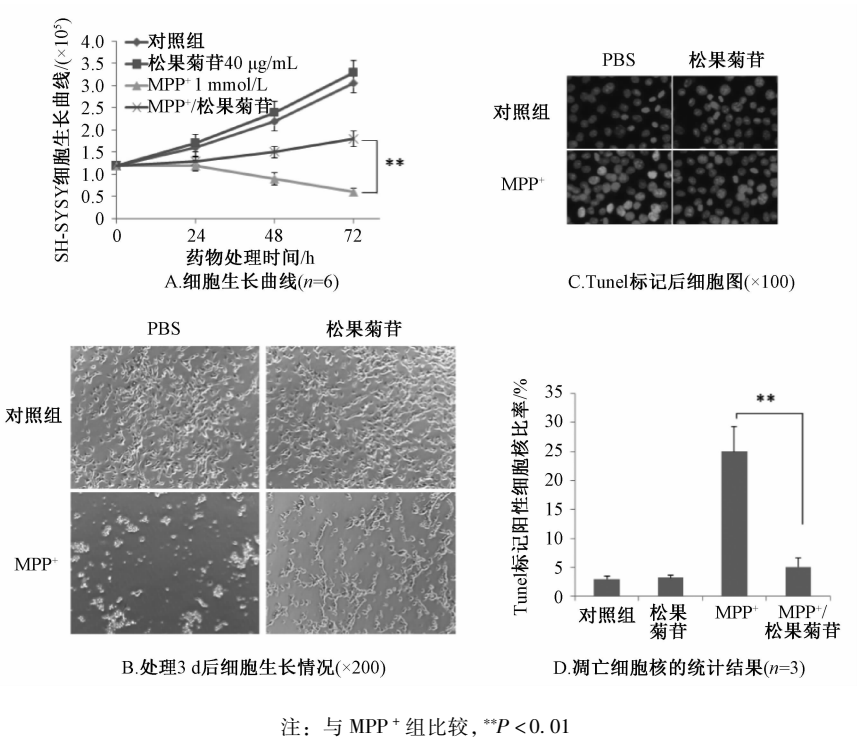
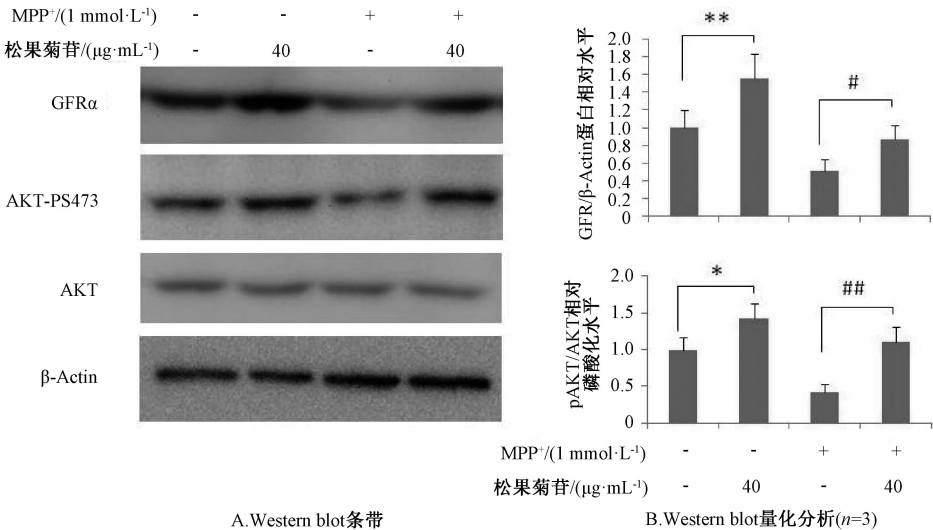


图 1 松果菊苷保护 SH-SY5Y 细胞和抑制 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡
Fig. 1 ECH protects cells against cell apoptosis induced by MPP⁺

这些结果表明松果菊苷可以保护 SH-SY5Y 细胞，抑制 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡 (图 1C ~ D)。

2.2 松果菊苷抑制 MPP⁺ 诱导的 GFR α 1 水平下降和 AKT 磷酸化水平的降低 AKT 作为 GDNF/GFR α 1 信号通路下游的重要蛋白磷酸化激酶，在细胞生长和抗凋亡方面发挥重要的调控功能。因此，本研究调查 MPP⁺ 是否也调控了 SH-SY5Y 细胞内的 GFR α 1 水平，结果显示，MPP⁺ 下调了

GFR α 1 水平，同时，MPP⁺ 也可以抑制 SH-SY5Y 细胞内的 AKT 磷酸化水平 (图 2)。松果菊苷处理可以有效地抑制 MPP⁺ 的这一功能，部分恢复由于 MPP⁺ 导致的 SH-SY5Y 细胞中 GFR α 1 水平下降和 AKT 磷酸水平降低 (图 2)。这个结果和 GFR α 1 的免疫荧光检测结果相一致。松果菊苷可以部分恢复 SH-SY5Y 细胞在 MPP⁺ 存在的条件下 GFR α 1 的表达 (图 3)。



注：与对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；与 MPP⁺ 组比较，#P < 0.05，##P < 0.01

图 2 Western blot 分析松果菊苷对 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞内 GFR α 1 水平和 AKT 磷酸化水平变化的影响
Fig. 2 Effects of ECH on changes of GFR α 1 and phosphorylated AKT regulated by MPP⁺ in SH-SY5Y cells

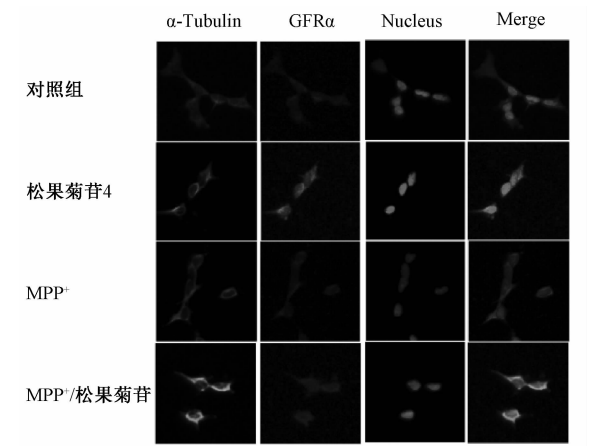


图3 共聚焦分析松果菊苷逆转MPP⁺诱导SH-SY5Y细胞中GFRα1水平下降(×630)

Fig. 3 ECH recovers GFRα1 expression in SH-SY5Y cells during MPP⁺ treatment (×630)

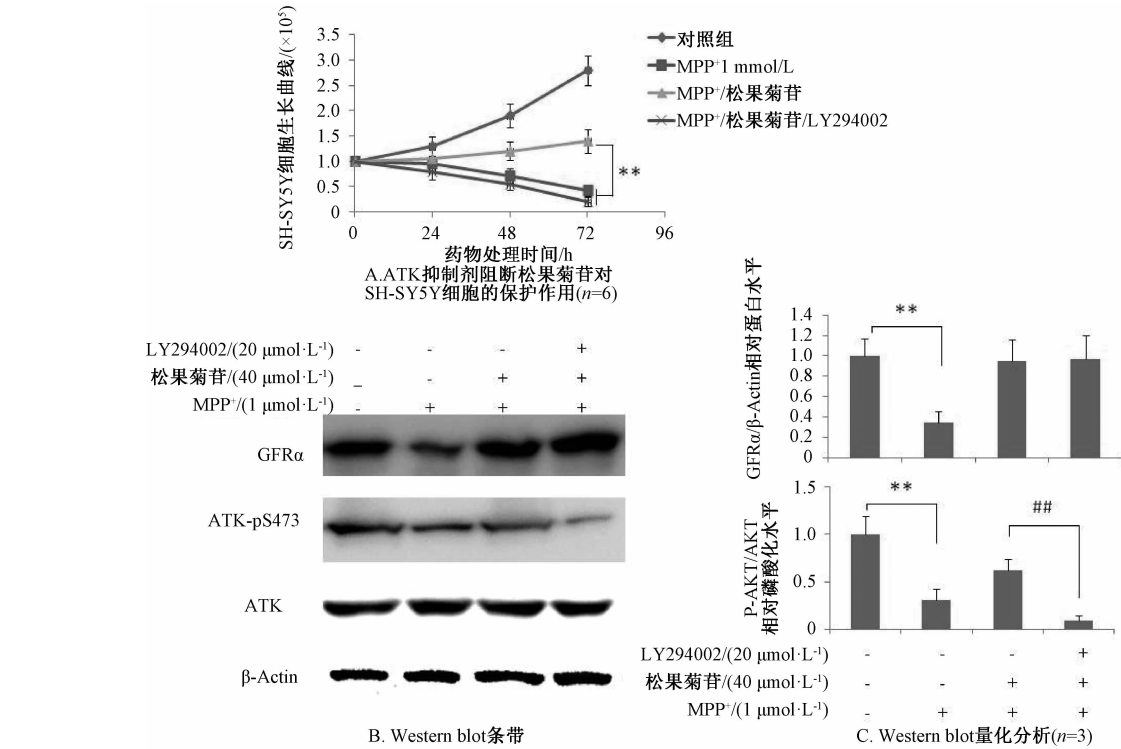
2.3 AKT磷酸化水平影响松果菊苷保护SH-SY5Y效果

考虑到AKT在GDNF/GFRα1信号通路中的

重要地位,本研究进一步调查了AKT磷酸化在松果菊苷发挥抗神经元样细胞凋亡功能中的作用。结果显示,给予AKT磷酸化抑制剂LY294002可以有效地阻断松果菊苷的SH-SY5Y细胞保护功能(图4A)。Western blot结果显示,LY294002有效的抑制AKT的磷酸化,对GFRα1表达没有明显的影响(图4B~C)。

2.4 松果菊苷抑制MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞内Caspase-3活化

为了进一步研究松果菊苷抑制MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞凋亡,本研究检测了松果菊苷对MPP⁺诱导SH-SY5Y细胞凋亡过程中的重要细胞凋亡调控Caspase-3的活性。结果显示,松果菊苷显著地抑制了MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞内Caspase-3的活性增加(MPP⁺ vs MPP⁺/松果菊苷是7.22±1.51 vs 1.81±0.42, $P<0.01$)。此外,抑制AKT的磷酸化可以取消松果菊苷的上述作用。这些结果和松果菊苷保护SH-SY5Y结果相一致。见图5。



注: A 图中,与MPP⁺/松果菊苷/LY294002组比较,** $P<0.01$; C 图中,与对照组比较,** $P<0.01$;与MPP⁺/松果菊苷组比较,## $P<0.01$

图4 AKT抑制剂阻断松果菊苷保护SH-SY5Y功能

Fig. 4 AKT inhibitor blocks ECH function of protecting SH-SY5Y cells apoptosis induced by MPP⁺

3 讨论

PD作为世界上第二大神经退行性疾病,其发病和衰老具有重要的相关性。组织和分子病理研究

显示,GDNF水平的下降和多巴胺能神经元内PI3K/AKT信号通路的抑制在PD的发展过程中发挥了重要的调控作用^[14-16]。其直接的病理表现为

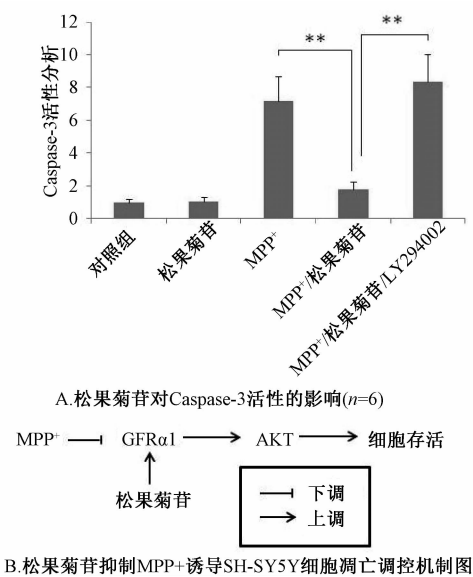


图 5 松果菊苷通过 AKT 通路抑制 MPP⁺ 诱导的 Caspase-3 活化和调控 SH-SY5Y 细胞凋亡

Fig. 5 ECH inhibits Caspase-3 activation and cell apoptosis induced by MPP⁺ in SH-SY5Y cells

α -突触核蛋白 (α -synuclein) 聚集, 形成路易氏小体, 多巴胺能神经元的功能逐渐丧失和凋亡^[1]。最新的研究表明, 当 GDNF/Ret 通路被阻断后, GDNF/GFR α 1 可以发挥与 GDNF/Ret 相同的对多巴胺能神经元系统的保护功能^[17]。此外, 更多的研究也证明了 GFR α 1 相对于其他 GDNF 的受体, 对于多巴胺能运动神经元的分化和增殖发挥了更重要的调控功能^[18-19]。祖国医学早在《黄帝内经》中已经出现了震颤类疾病的记载, 其发病机制多与“肝肾不足、阴虚风动”有关。临床中使用“补肾养肝”方药治疗帕金森病患者能明显延缓症状的加重^[20], 其中具有代表性的中药肉苁蓉素有“沙漠人参”之美誉, 具有极高的药用价值, 是中国传统的名贵中药材。肉苁蓉味甘、性温, 具有补肾壮阳、填精补髓、养血润燥等功效。松果菊苷是其主要活性成分之一。前期实验结果表明松果菊苷能上调 PD 小鼠模型中脑组织 GDNF 表达, 本研究借助细胞模型深入探讨松果菊苷对 GDNF 相关受体和信号通路的调控。本研究中观察到的松果菊苷可以提高 SH-SY5Y 细胞表达 GFR α 1, 并对 MPP⁺ 诱导的细胞损伤有保护作用, 结果与上述文献报道相一致。最近研究已经证实, PI3K/AKT 信号通路作为 GDNF/GFR α 1 通路的下游, 参与 GFR α 1 多种生物学功能的调控, 尤其是促增殖与抗凋亡^[21-22]。

MPP⁺ 可以通过抑制 AKT 磷酸化来发挥诱导神经细胞凋亡的功能^[23]。本研究结果显示了在 SH-SY5Y 细胞里, MPP⁺ 不仅抑制 AKT 的磷酸化, 同时还下调了 GFR α 1 的表达 (图 2)。松果菊苷可以显著的逆转 MPP⁺ 抑制 AKT 磷酸化与 GFR α 1 表达的功能。但通过使用 AKT 抑制剂阻断 AKT 磷酸化后, 松果菊苷虽然仍然可以提高 GFR α 1 的表达, 但其促进 SH-SY5Y 存活的功能并没有恢复 (图 4)。这些结果表明, AKT 的磷酸化是松果菊苷保护 SH-SY5Y 细胞、抑制 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的关键调控激酶。综合结果, 本研究揭示了松果菊苷保护 SH-SY5Y 一个新的分子机制 (图 5B), 即通过上调 GFR α 1 表达来激活 AKT 来实现松果菊苷对 SH-SY5Y 细胞的保护, AKT 信号通路处于松果菊苷发挥保护功能的关键地位。

致谢 感谢上海交大学生命科学技术学院袁运生博士在细胞培养和其他实验技术方面提供的帮助。

参考文献:

[1] Kalia L V, Lang A E. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912.

[2] Lees A J, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2009, 373(9680): 2055-2066.

[3] Pagonabarraga J, Kulisevsky J, Strafella A P, et al. Apathy in Parkinson's disease: clinical features, neural substrates, diagnosis, and treatment [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14 (5): 518-531.

[4] Wang Y H, Xuan Z H, Tian S, et al. Echinacoside protects against 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial dysfunction and inflammatory responses in PC12 cells via reducing ROS production [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 189239.

[5] Kuang R, Sun Y, Zheng X. Suppression of nitric oxide implicated in the protective effect of echinacoside on H₂O₂-induced PC12 cell injury [J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5 (4): 571-574.

[6] Jia Y, Guan Q, Guo Y, Du C. Echinacoside stimulates cell proliferation and prevents cell apoptosis in intestinal epithelial MODE-K cells by up-regulation of transforming growth factor- β 1 expression[J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118(1): 99-108.

[7] Deng M, Zhao J Y, Tu P F, et al. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNF alpha-induced apoptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 505(1-3): 11-18.

[8] Zhao Q, Gao J, Li W, et al. Neurotrophic and neurorescue effects of Echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. *Brain Res*, 2010, 1346: 224-236.

[9] Zhao Q, Cai D, Bai Y. Selegiline rescues gait deficits and the

- loss of dopaminergic neurons in a subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 883-891.
- [10] Zhang Z G, Wu L, Wang J L, *et al.* Astragaloside IV prevents MPP⁺-induced SH-SY5Y cell death via the inhibition of Bax-mediated pathways and ROS production[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 209-216.
- [11] Conn K J, Gao W W, Ullman M D, *et al.* Specific up-regulation of GADD153/CHOP in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium-treated SH-SY5Y cells[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(6): 755-760.
- [12] Zhu M, Zhou M, Shi Y, *et al.* Effects of echinacoside on MPP⁺-induced mitochondrial fragmentation, mitophagy and cell apoptosis in SH-SY5Y cells[J]. *J Integr Med*, 2012, 10(12): 1427-1432.
- [13] Yuan Y, Zhang X, Weng S, *et al.* Expression and purification of bioactive high-purity recombinant mouse SPP₁ in *Escherichia coli*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(2): 421-432.
- [14] Hunot S, Bernard V, Faucheux B, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain; a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 1996, 103(8-9): 1043-1052.
- [15] Yue X, Hariri D J, Caballero B, *et al.* Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in pre-clinical *in vivo* models of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2014, 258: 385-400.
- [16] Jha S K, Jha N K, Kar R, *et al.* p38 MAPK and PI3K/AKT signalling cascades in Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2015, 4(2): 67-86.
- [17] Meka D P, Muller-Rischart A K, Nidadavolu P, *et al.* Parkin cooperates with GDNF/RET signaling to prevent dopaminergic neuron degeneration[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 1873-1885.
- [18] Marks C, Belluscio L, Ibáñez C F. Critical role of GFRα1 in the development and function of the main olfactory system[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(48): 17306-17320.
- [19] Garcès A, Haase G, Airaksinen M S, *et al.* GFRα1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(13): 4992-5000.
- [20] 赵 虹, 李文伟, 高俊鹏等. 补肾养肝方药治疗肝肾阴虚型帕金森病临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(9): 780-784.
- [21] Bogen O, Joseph E K, Chen X, *et al.* GDNF hyperalgesia is mediated by PLCγ, MAPK/ERK, PI3K, CDK5 and Src family kinase signaling and dependent on the IB4-binding protein versican[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(1): 12-19.
- [22] Pezeshki G, Franke B, Engele J. Evidence for a ligand-specific signaling through GFRα1-1, but not GFRα1-2, in the absence of Ret[J]. *J Neurosci Res*, 2001, 66(3): 390-395.
- [23] Cui W, Li W, Han R, *et al.* PI3-K/Akt and ERK pathways activated by VEGF play opposite roles in MPP⁺-induced neuronal apoptosis[J]. *Neurochem Int*, 2011, 59(6): 945-953.