

积雪草酸对 MPTP 诱导小鼠帕金森样运动症状的影响

赵梦蝶^{1,2}, 耿 骥³, 郭文洁⁴, 李 静³, 周炳杰³, 高 静^{3*}, 钱进军^{2*}

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学附属第四医院, 江苏 镇江 212013; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 4. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093)

摘要: **目的** 考察积雪草酸 (AA) 对 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导小鼠帕金森 (PD) 样运动症状的影响及其神经保护机制。 **方法** 取雄性 C57BL/6 小鼠 45 只, 除对照组 9 只小鼠外, 其余用 25 mg/kg MPTP 腹腔注射 7 d 建立帕金森病模型, 随机分为模型组, 积雪草酸低、高剂量组, 阳性对照组。造模同时开始连续 11 d 灌胃给予相应药物或溶剂 (0.5% 羧甲基纤维素钠), 第 12 天进行行为学测试。ELISA 试剂盒检测血清白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平; 免疫组织化学法检测黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性细胞; 检测中脑 IL-1 β 、TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2) 的 mRNA 表达, 以及丙二醛 (MDA) 含量。 **结果** 与模型组相比, 给予积雪草酸的小鼠在行为学测试中表现更好 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。而且, 积雪草酸通过上调 TH 表达、增加 TH 阳性细胞数量来有效保护黑质多巴胺能神经元 ($P < 0.05$); 抑制中脑 iNOS、COX-2、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 降低中脑 MDA 水平 ($P < 0.01$); 降低血清 IL-1 β 、TNF- α 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论** 积雪草酸能缓解 PD 小鼠运动障碍和多巴胺能神经元损伤, 抗炎、抗氧化是其可能的神经保护机制。

关键词: 积雪草酸; 帕金森病; 炎症反应; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0033-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.006

Effects of asiatic acid on MPTP-induced Parkinson's disease-like motor symptoms in mice

ZHAO Meng-die^{1,2}, GENG Ji³, GUO Wen-jie⁴, LI Jing³, ZHOU Bing-jie³, GAO Jing^{3*}, QIAN Jin-jun^{2*}

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. The Fourth Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 4. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of asiatic acid (AA) on 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) -induced Parkinson's disease (PD) -like motor symptoms in mice and its neuroprotective mechanism. **METHODS** Forty-five male C57BL/6 mice, except the nine mice in control group, were induced to be the PD models by peritoneal injection of 25 mg/kg MPTP for seven days and then were randomly assigned to model group, low-dose, high-dose AA groups and positive control group. Both the control group and the model group were administered with 0.5% sodium carboxyl methyl cellulose (CMC-Na) solution, the AA groups were dosed with 12.5 mg/kg and 25 mg/kg AA, respectively, and the positive control group was given 75 mg/kg daily intragastric gavage of levodopa for eleven days. On the twelfth day, behavioral tests were performed. Tyrosine hydroxylase (TH) positive cells in substantia nigra were detected by immunohistochemistry. The mRNA expres-

收稿日期: 2017-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373400, 81402938); 镇江市重点研发计划面上项目 (SH2016053); 江苏省卫生和计划生育委员会资助项目 (H201549)

作者简介: 赵梦蝶 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为帕金森病。E-mail: zhaomd1991@163.com

* **通信作者:** 高 静 (1966—), 女, 教授, 研究方向为药理学。E-mail: Jinggao@ujs.edu.cn

钱进军 (1968—), 男, 教授, 研究方向为脑血管疾病及神经退行性疾病。E-mail: qian-jinjun@163.com

sions of *iNOS*, *COX-2*, *TNF- α* , *IL-1 β* , and malonaldehyde (MDA) content in midbrain were measured. The levels of *IL-1 β* and *TNF- α* in the serum were detected using ELISA kits. **RESULTS** The mice treated with asiatic acid performed better in behavior tests than those in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, asiatic acid effectively protected the dopaminergic neurons in the substantia nigra due to upregulated TH expression and increased number of TH positive cells ($P < 0.05$). The asiatic acid-treated mice had their mRNA expressions of *IL-1 β* , *TNF- α* , *iNOS* and *COX-2* in midbrain markedly suppressed ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and a significant MDA level decrease in the midbrain tissue as well ($P < 0.01$). Furthermore, reductions of *IL-1 β* and *TNF- α* contents in the serum were observed ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** Asiatic acid attenuates motor dysfunction and dopaminergic neuronal deficits in PD mice, and the neuroprotective mechanisms may attribute to its anti-oxidative and anti-inflammatory activities.

KEY WORDS: asiatic acid; Parkinson's disease; inflammatory response; oxidative stress

帕金森病 (PD) 是一种不可逆的慢性进展性神经退行性疾病, 其临床运动症状主要为静止性震颤、肌强直、运动迟缓、姿势步态异常^[1]; 特征性病理改变是黑质致密部多巴胺能神经元选择性丢失, 残余神经元内路易小体聚集^[2]。尽管 PD 的发病机制尚未完全阐明, 但许多证据表明神经炎症反应和氧化应激在 PD 的发病中占有重要地位^[3-4]。目前 PD 的治疗仍以多巴胺替代治疗为主, 但仅能缓解运动症状, 而无法终止疾病进展^[5], 而且长期的多巴胺治疗会产生一系列副作用, 如周围神经损伤、症状波动、异动症^[6-7], 因此疗效好、副作用小的 PD 治疗药物亟待研发。

积雪草酸 (AA) 是传统中草药积雪草中的一种活性成分, 属五环三萜酸, 其生物活性非常丰富, 如抗氧化、抗炎、肝保护、神经保护、抗肿瘤^[8-12]。有学者报道, 积雪草酸可以保护 SH-SY5Y 细胞抵抗鱼藤酮诱导的细胞凋亡^[13]; 本课题组前期研究发现, 积雪草酸通过调节线粒体功能保护帕金森样损伤的神经细胞^[14], 这些研究成果提示积雪草酸可能成为 PD 的候选治疗药物。本研究采用 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 腹腔注射建立 PD 动物模型, 研究积雪草酸对 PD 小鼠运动功能的影响, 探讨积雪草酸的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 22 ~ 26 g, 购自常州卡文斯实验动物公司, 动物合格证号 0033461。

1.2 实验试剂 TH 抗体、 β -Actin 抗体、HRP-羊抗鼠、HRP-羊抗兔 (Santa Cruz 公司, 批号 sc-25269、sc-47778、sc-2005、sc-2357); MDA 试剂盒 (南京建成, 批号 20160428); BCA 蛋白试剂盒

(碧云天公司, 批号 p0009); *TNF- α* 、*IL-1 β* ELISA 试剂盒 (达科为公司, 批号 DKW12-1012-096, DKW12-1720-096); 左旋多巴 (罗氏公司, 批号 SH2443); 积雪草酸 (纯度 97%, 批号 546712)、MPTP (批号 M0896) 等其余药品或试剂 (Sigma 公司)。

1.3 小鼠帕金森病模型的造模和给药 45 只小鼠随机分为溶剂对照组、模型组、积雪草酸低剂量干预组、积雪草酸高剂量干预组、左旋多巴阳性对照组, 每组 9 只。小鼠连续 7 d 腹腔注射 MPTP (25 mk/kg) 建立帕金森病模型, 溶剂对照组腹腔注射生理盐水。在 MPTP 造模的同时开始连续给药 11 d, 溶剂对照组和模型组小鼠灌胃给予 0.5% CMC-Na, 积雪草酸干预组根据小鼠体质量分别灌胃给予积雪草酸 12.5 mk/kg 和 25 mg/kg (积雪草酸溶于 0.5% CMC-Na 中), 左旋多巴阳性对照组根据小鼠体质量灌胃给予左旋多巴 75 mg/kg (左旋多巴溶解于磷酸缓冲盐溶液), 第 12 天检测小鼠行为学指标。小鼠行为学实验结束后眼球取血, 断头取脑。

1.4 行为学实验

1.4.1 爬杆实验 (pole test) 在铁架台周围包裹纱布使其表面粗糙, 将直径 5 cm 的泡沫板固定于杆子顶部。实验时将小鼠头朝上放置于杆子顶端, 记录小鼠调转方向头朝下的时间 (turn time) 以及小鼠爬至杆子底端所需要的总时间 (T-LA)。每只小鼠检测 3 次, 每次检测间隔 2 min。

1.4.2 悬挂实验 (traction test) 悬挂实验可用于评估小鼠的抓握力量^[15]。用透明的有机玻璃制作悬挂实验箱, 水平放置一根直径 0.5 cm、距离地面 30 cm 的木杆, 木杆上方 0.8 cm 加盖, 以防止小鼠翻坐于木杆上。实验中小鼠悬挂于木杆, 记

录小鼠落地时间, 设置最大值 3 min, 超过 3 min 则记录为 3 min。每只小鼠检测 3 次, 每次检测间隔 2 min。

1.5 检测中脑黑质区 MDA 水平 取部分小鼠 125 mm³ 大小的中脑组织, 加入 1 mL 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 匀浆, 4 ℃、12 000 × *g* 离心 10 min, 取上清, 参照 MDA 试剂盒说明书检测中脑组织中的 MDA 水平。

1.6 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平 小鼠眼球取血后室温静置, 4 ℃ 过夜, 3 500 r/min 离心, 取上层澄清的血清, 参照小鼠 IL-1 β 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒说明书检测各组小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 含量。

1.7 Real-time 定量 PCR 检测中脑炎症因子 mRNA 表达 提取小鼠中脑组织的 RNA 并逆转录为 cDNA, 将 cDNA 样本置于 Real-time 定量 PCR 体系^[9]。引物序列: *TNF- α* 正向 5'-CTTCTGTCTACT-GAACTTCGGG-3', *TNF- α* 反向 5'-CAGGCTTGT-CACTCGAATTTTG-3'; *IL-1 β* 正向 5'-ACGGAC-CCCAAAGATGAAG-3', *IL-1 β* 反向 5'-TTCTCCA-CAGCCACAATGAG-3'; *iNOS* 正向 5'-GCAAACAT-CACATTCAGATCCC-3', *iNOS* 反向 5'-TCAGCCT-CATGGTAAACACG-3'; *COX-2* 正向 5'-ACACTC-TATCACTGGCATCC-3', *COX-2* 反向 5'-GAAGGA-CACCCTTTCACAT-3'; β -*actin* 正向 5'-ACCTTCTA-CAATGAGCTGCG-3', β -*actin* 反向 5'-CTGGATGGC-TACGTACATGG-3'。

1.8 蛋白印迹 (Western blot) 法检测中脑黑质区 TH 表达 将小鼠中脑组织的蛋白样品通过 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳结束后将蛋白从凝胶转至 PVDF 膜上, BSA 封闭液中封闭 1 h 后置于一抗稀释液中, 4 ℃ 摇床孵育过夜, 清洗后加入二抗稀释液中, 室温孵育 1 h, 清洗后加入 ECL 发光液, 用 Tanon 成像仪进行发光成像。

1.9 免疫组化检测中脑黑质区的 TH 水平 小鼠脑组织 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 脱蜡水化后用柠檬酸钠抗原修复液高压抗原修复, PBS 清洗后 0.25% Triton-X100 浸泡 10 min, PBS 清洗后 3% H₂O₂ 浸泡 10 min, 加入 2.5% BSA 封闭液室温封闭 1 h, 随后加入抗 TH 抗体稀释液, 4 ℃ 孵育过夜, PBS 清洗后加入二抗稀释液, 室温孵育 1 h, 清洗后滴加 DAB 显色液, Nikon ECLIPSE Ti 显微镜观察切片。

1.10 数据统计 实验数据分析采用 GraphPad

Prime 5 统计软件, one-way ANOVA 方差分析, 组间比较采用 *q* 检验, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

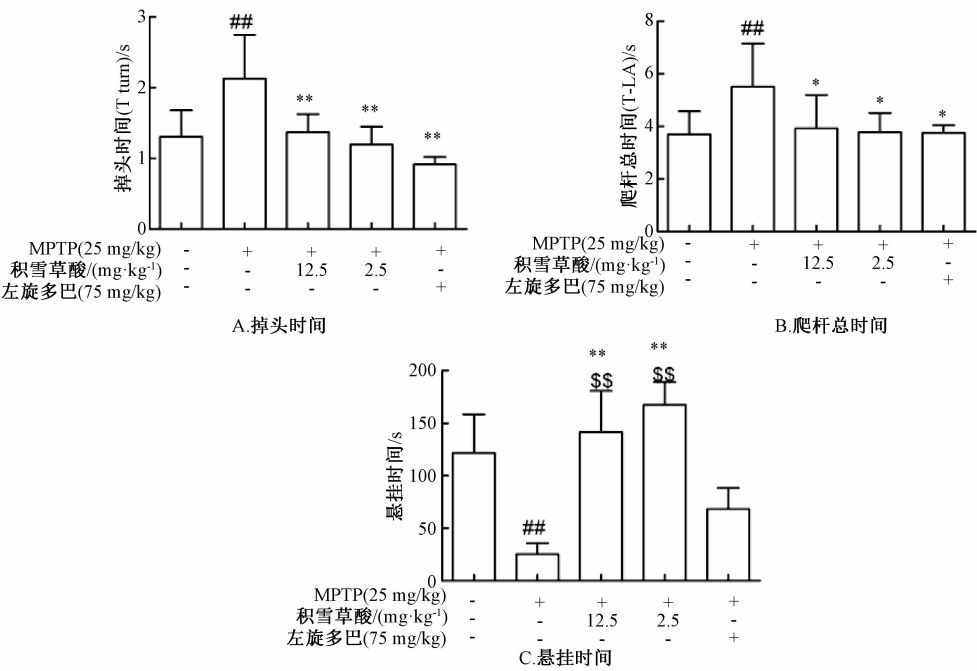
2.1 积雪草酸对 PD 小鼠行为学的影响 爬杆实验可用于评估小鼠运动迟缓, 且有研究认为 T-LA 时间可能与多巴胺能神经元的丢失程度有一定相关性^[16]。与对照组比较, 模型组小鼠的运动协调明显受损 ($P < 0.01$), 积雪草酸和左旋多巴处理的小鼠与模型组小鼠相比, 调头和爬到杆底所用的时间显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明积雪草酸和左旋多巴能有效改善 PD 小鼠的运动迟缓。与对照组相比, PD 小鼠的抓握能力显著降低 ($P < 0.01$), 积雪草酸干预组小鼠在木杆上悬挂停留时间较模型组小鼠显著延长 ($P < 0.01$), 而左旋多巴治疗组小鼠与 PD 小鼠相比, 其悬挂时间无显著差异 ($P > 0.05$)。如图 1 所示。

2.2 积雪草酸对 PD 小鼠黑质部分多巴胺能神经元的影响 如图 2 所示, 与对照组小鼠相比, 模型组小鼠黑质部分 TH 阳性细胞显著减少 ($P < 0.01$), TH 蛋白表达下调 ($P < 0.01$)。积雪草酸和左旋多巴能部分挽救 MPTP 诱导的 TH 阳性细胞丢失并上调 TH 蛋白表达 ($P < 0.05$)。

2.3 积雪草酸对 PD 小鼠中脑促炎因子和炎症介质 mRNA 水平的影响 由图 3 可见, MPTP 腹腔注射可分别导致小鼠中脑 *iNOS* 和 *COX-2* 的 mRNA 水平呈 3 倍及 6 倍增高 ($P < 0.01$), 同时模型组小鼠中脑的 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 水平较对照组小鼠也显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 积雪草酸和左旋多巴处理组小鼠中脑 *iNOS*、*COX-2*、*TNF- α* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并且高剂量积雪草酸优于左旋多巴 ($P < 0.01$)。

2.4 积雪草酸对 PD 小鼠外周血促炎因子水平的影响 PD 小鼠外周血的 IL-1 β 和 TNF- α 水平较对照组显著上升 ($P < 0.01$)。与模型组小鼠比较, 积雪草酸和左旋多巴能有效抑制 PD 小鼠血清 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$)。积雪草酸高剂量组小鼠血清的 TNF- α 水平较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 而左旋多巴对其无显著影响 ($P > 0.05$)。见图 4A ~ B。

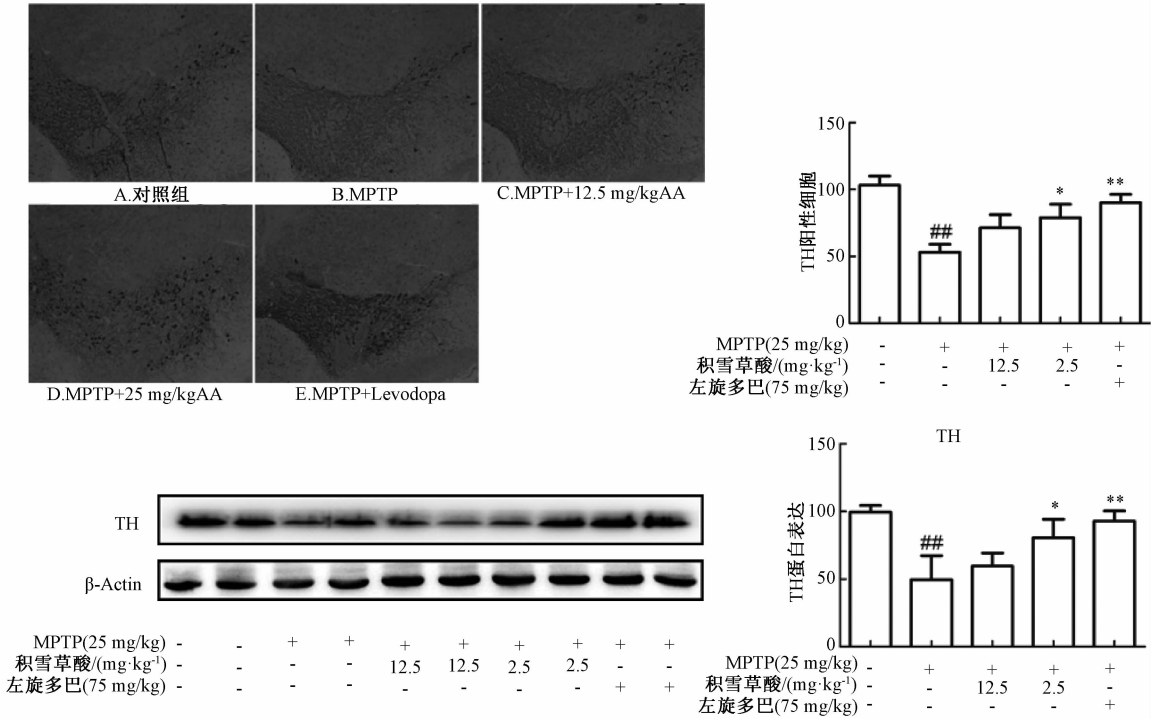
2.5 积雪草酸对 PD 小鼠中脑 MDA 水平的影响 如图 4C 所示, 模型组小鼠中脑 MDA 水平较对照组显著增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 积雪草



注：与对照组（积雪草酸）比较，^{##}*P* < 0.01；与模型组（MPTP）比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01；与左旋多巴组比较，^{\$}*P* < 0.01

图 1 积雪草酸对 PD 小鼠行为学损伤的影响 (n = 6)

Fig. 1 Effect of AA on behavioral impairment of PD mice (n = 6)



注：与对照组（积雪草酸）比较，^{##}*P* < 0.01；与模型组（MPTP）比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01

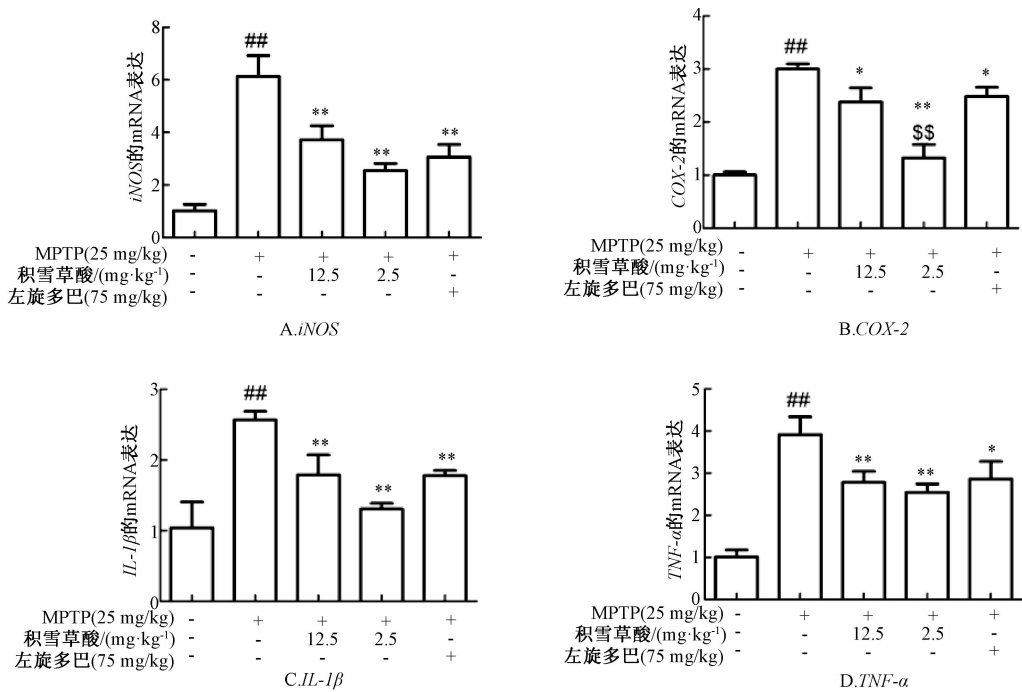
图 2 积雪草酸对 PD 小鼠多巴胺能神经元的影响 (n = 5, 200 ×)

Fig. 2 Effect of AA on dopaminergic neurons of PD mice (n = 5, 200 ×)

酸和左旋多巴处理组小鼠中脑 MDA 明显下降 (*P* < 0.01)。

3 讨论

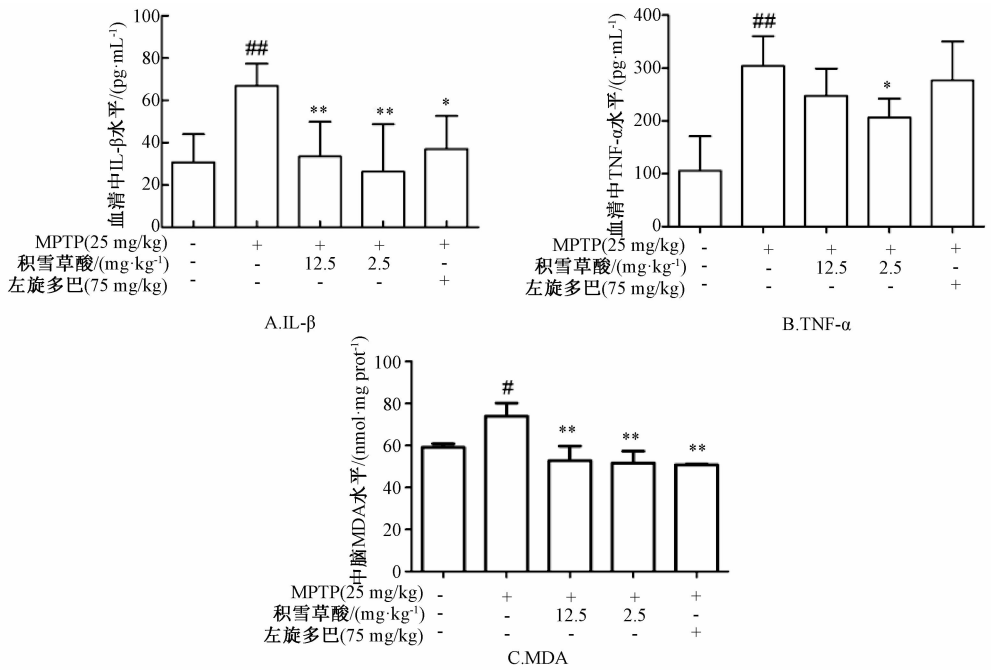
PD 是最常见的神经变性疾病之一，目前已用



注：与对照组（积雪草酸）比较，^{##}*P* < 0.01；与模型组（MPTP）比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01；与左旋多巴组比较，^{\$\$}*P* < 0.01

图 3 积雪草酸对小鼠中脑 *iNOS*、*COX-2*、*TNF-α*、*IL-1β* mRNA 水平的影响 (*n* = 6)

Fig. 3 Effects of AA on the mRNA levels of *iNOS*, *COX-2*, *TNF-α* and *IL-1β* in the midbrain of mice (*n* = 6)



注：与对照组（积雪草酸）比较，[#]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与模型组（MPTP）比较，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01

图 4 积雪草酸对小鼠血清 *TNF-α*、*IL-1β* 水平及中脑 MDA 含有量的影响 (*n* = 6)

Fig. 4 Effects of AA on *TNF-α* and *IL-1β* levels in the serum and MDA content in the midbrain of mice (*n* = 6)

于临床的相关治疗药物无法预防 PD 发生或阻止其进展，且长期使用会带来一定的副作用。因此，发挥中医用药特色，寻找有效治疗 PD 的中药具有重要意义。

MPTP 是经典的帕金森造模剂，其腹腔注射可使小鼠黑质 TH 表达及 TH 阳性细胞显著减少（图 2），导致明显的帕金森样运动症状，提示多巴胺合成受限导致小鼠运动障碍。积雪草酸和左旋多巴

能有效挽救部分多巴胺能神经元,并改善小鼠运动障碍(图1)。阳性对照组小鼠运动功能改善是由于左旋多巴的直接补充,积雪草酸干预组小鼠运动障碍缓解可能归因于其对多巴胺系统的间接神经保护作用。

硝基氧化应激可导致线粒体功能障碍,从而促进多巴胺能神经元的退变^[17],反之,抑制 iNOS 的表达或活性是保护多巴胺能神经元的一种重要途径^[18]。本实验结果提示,积雪草酸的神经保护作用可能与其抑制 PD 小鼠中脑 iNOS 的 mRNA 表达水平有关(图3)。COX-2 参与神经炎症反应过程^[19],并能诱导多巴胺氧化应激,从而促进 PD 进展^[20]。在 PD 患者及小鼠的黑质中都存在 COX-2 表达上调^[21-22],可能成为 PD 治疗靶点,有研究发现 COX-2 抑制剂对 MPTP 诱导的 PD 小鼠运动障碍和神经递质改变都有明显改善作用^[23-24]。非甾体类抗炎药(NSAIDs)对 PD 小鼠多巴胺神经元的丢失有一定的抵抗作用^[25],并且在一项随访研究中发现规律服用 NSAIDs 能降低 PD 的发病风险^[26-27]。本实验结果与这些研究报道一致,积雪草酸能抑制 PD 小鼠中脑 COX-2 的 mRNA 表达,从而保护多巴胺能神经元。此外,Chao^[28]还发现积雪草酸能抑制 PD 小鼠脑组织 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达。小胶质细胞介导的慢性、持续性神经炎症在 PD 的发病及进展中都发挥了关键作用,其活化后产生的 IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子可促进多巴胺能神经元的退变^[29],反之,使用 IL-1 受体拮抗剂或 IL-1 基因敲除小鼠阻滞 IL-1 β 能改善多巴胺系统功能障碍及运动缺陷^[30-31]。积雪草酸和左旋多巴显著抑制了 MPTP 诱导的小鼠中脑 TNF- α 及 IL-1 β 转录水平的上调(图3),综上所述,积雪草酸对 PD 的神经保护作用可能由于其缓解了中枢神经系统炎症反应。

PD 患者外周血 CD4⁺、CD45RO⁺ T 细胞(活化的 T 细胞)及 TNF- α 水平显著上升^[32-33],提示外周免疫反应激活可能参与 PD 的发病或发展。MPTP 诱导的 PD 小鼠外周血 IL-1 β 、TNF- α 水平显著上升(图4),积雪草酸有效降低了两水平。而且,本课题组首次探讨了积雪草酸对 PD 小鼠外周炎症反应的抑制效应。

氧化应激对多巴胺能神经元的退变起着重要作用^[34],自由基会破坏重要的细胞成分,如蛋白质、多糖、脂质双分子层、DNA,导致细胞氧化损伤。本研究通过 MPTP 腹腔注射复制 PD 动物模型,发

现 PD 小鼠中脑 MDA 水平上升(图4),积雪草酸显著降低了其水平,表明它能缓解 PD 小鼠脑组织氧化应激。此外,积雪草酸能通过抗氧化途径保护鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤^[13]。多巴胺在富氧环境下可发生自生氧化,产生有害的活性氧(ROS),导致细胞能量衰竭,促进细胞损伤^[35],但实验结果显示左旋多巴治疗组的 PD 小鼠脑组织 MDA 水平较模型组显著下降,其原因可能是细胞的抗氧化保护机制未受破坏^[36]。

本研究发现,积雪草酸能改善 MPTP 诱导的 PD 小鼠运动障碍,保护多巴胺能神经元。其神经保护机制可能为抑制 PD 小鼠中枢神经系统及外周免疫系统的炎症反应,改善中枢氧化应激,从而发挥神经保护作用。因此,积雪草酸有望成为 PD 治疗的候选药物,但其临床治疗的潜在应用仍需要更多的基础研究和临床试验。

参考文献:

- [1] Eriksen J L, Wszolek Z, Petrucelli L. Molecular pathogenesis of Parkinson disease [J]. *Arch Neurol*, 2005, 62 (3): 353-357.
- [2] Dexter D T, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 132-144.
- [3] Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(6): 4094-4125.
- [4] Ransohoff R M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration [J]. *Science*, 2016, 353(6301): 777-783.
- [5] Shen T, Pu J, Si X, et al. An update on potential therapeutic strategies for Parkinson's disease based on pathogenic mechanisms [J]. *Expert Rev Neurother*, 2016, 16(6): 711-722.
- [6] Hauser R A, McDermott M P, Messing S. Factors associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson disease [J]. *Arch Neurol*, 2006, 63 (12): 1756-1760.
- [7] Kimber T, Blumbers P, Thompson P. Severe ataxic polyneuropathy associated with chronic levodopa use in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2013, 19(9): 847-849.
- [8] Cho C W, Choi D S, Cardone M H, et al. Glioblastoma cell death induced by asiatic acid [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22 (6): 393-408.
- [9] Guo W, Liu W, Jin B, et al. Asiatic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis via suppressing mitochondria-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 24(2): 232-238.
- [10] Krishnamurthy R G, Senut M C, Zemke D, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from *Centella asiatica*, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(11): 2541-2550.

- [11] Ma K, Zhang Y, Zhu D, *et al.* Protective effects of asiatic acid against *D*-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in hepatocytes and kupffer cells co-cultured system via redox-regulated leukotriene C4 synthase expression pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 603(1-3): 98-107.
- [12] Tang X L, Yang X Y, Jung H J, *et al.* Asiatic acid induces colon cancer cell growth inhibition and apoptosis through mitochondrial death cascade[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(8): 1399-1405.
- [13] Nataraj J, Manivasagam T, Thenmozhi J A, *et al.* Neuroprotective effect of asiatic acid on rotenone-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress-mediated apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells[J]. *Nutr Neurosci*, 2017, 20(6): 351-359.
- [14] Xiong Y, Ding H, Xu M, *et al.* Protective effects of asiatic acid on rotenone- or H₂O₂-induced injury in SH-SY5Y cells[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4): 746-754.
- [15] Arai N, Misugi K, Goshima Y, *et al.* Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) -treated C57 black mouse model for parkinsonism[J]. *Brain Res*, 1990, 515(1-2): 57-63.
- [16] Matsuura K, Kabuto H, Makino H, *et al.* Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion[J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 73(1): 45-48.
- [17] Akbar M, Essa M M, Daradkeh G, *et al.* Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitrooxidative stress[J]. *Brain Res*, 2016, 1637: 34-55.
- [18] Choi J Y, Park C S, Kim D J, *et al.* Prevention of nitric oxide-mediated 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate[J]. *Neurotoxicology*, 2002, 23(3): 367-374.
- [19] Williams C S, DuBois R N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(3 Pt 1): G393-G400.
- [20] Hastings T G. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase [J]. *J Neurochem*, 1995, 64(2): 919-924.
- [21] Knott C, Stern G, Wilkin G P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2000, 16(6): 724-739.
- [22] Teismann P, Tieu K, Choi D K, *et al.* Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5473-5478.
- [23] Gupta A, Dhir A, Kumar A, *et al.* Protective effect of cyclooxygenase (COX) -inhibitors against drug-induced catatonia and MPTP-induced striatal lesions in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 94(2): 219-226.
- [24] Gupta A, Kumar A, Kulkarni S K. Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX) -2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(4): 974-981.
- [25] Aubin N, Curet O, Deffois A, *et al.* Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice[J]. *J Neurochem*, 1998, 71(4): 1635-1642.
- [26] Chen H, Zhang S M, Herman M A, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease[J]. *Arch Neurol*, 2003, 60(8): 1059-1064.
- [27] Chen H, Jacobs E, Schwarzschild M A, *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease[J]. *Ann Neurol*, 2005, 58(6): 963-967.
- [28] Chao P C, Lee H L, Yin M C. Asiatic acid attenuated apoptotic and inflammatory stress in the striatum of MPTP-treated mice [J]. *Food Funct*, 2016, 7(4): 1999-2005.
- [29] Glass C K, Saijo K, Winner B, *et al.* Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 918-934.
- [30] Koprich J B, Reske-Nielsen C, Mithal P, *et al.* Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2008, 5: 8.
- [31] Tanaka S, Ishii A, Ohtaki H, *et al.* Activation of microglia induces symptoms of Parkinson's disease in wild-type, but not in IL-1 knockout mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10: 143.
- [32] Bas J, Calopa M, Mestre M, *et al.* Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism[J]. *J Neuroimmunol*, 2001, 113(1): 146-152.
- [33] Dobbs R J, Charlett A, Purkiss A G, *et al.* Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism[J]. *Acta Neurol Scand*, 1999, 100(1): 34-41.
- [34] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier [J]. *Neuropharmacology*, 2001, 40(8): 959-975.
- [35] Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself[J]. *Acta Med Okayama*, 2008, 62(3): 141-150.
- [36] Lipski J, Nistico R, Berretta N, *et al.* L-DOPA: a scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 94(4): 389-407.