

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.12.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20220124.1942.017.html\(2022-01-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20220124.1942.017.html(2022-01-26))

乌梅总黄酮对 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞 线粒体损伤的保护作用*

王春玲¹, 罗 宁², 文晓东^{2△}, 蒋媛静², 刘 钰², 冯文勇²

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院神经内科, 南宁 530011)

[摘要] **目的** 探讨乌梅总黄酮(FMF)对神经毒素 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)诱导人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞建立的帕金森病(PD)细胞模型钙调蛋白激酶(CaMKK β)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路的调控作用及对 SH-SY5Y 细胞线粒体功能的影响。**方法** 250 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,建立 PD 体外细胞模型,将细胞分为 5 组:对照组(只加 SH-SY5Y 细胞,不加药物)、模型组(250 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 孵育 24 h)、FMF 低剂量组(MPP⁺ + FMF 10 $\mu\text{mol/L}$)、FMF 中剂量组(MPP⁺ + FMF 50 $\mu\text{mol/L}$)和 FMF 高剂量组(MPP⁺ + FMF 100 $\mu\text{mol/L}$)。CCK-8 法检测细胞的存活率,JC-1 染色检测线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$);Western blot 检测 CaMKK β /AMPK 信号通路相关 CaMKK β 、AMPK 及磷酸化 CaMKK β (p-CaMKK)、磷酸化 AMPK(p-AMPK)表达水平。**结果** CCK-8 检测结果显示,FMF 预处理 24 h 后,FMF 低、中、高剂量组 MPP⁺ 损伤细胞的存活率均较模型组明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 $\Delta\Psi\text{m}$ 检测结果显示,与对照组相比,模型组细胞 $\Delta\Psi\text{m}$ 明显降低($P < 0.001$);与模型组相比,FMF 低、中、高剂量组 $\Delta\Psi\text{m}$ 明显升高($P < 0.001$)。Western blot 检测结果显示,与对照组比较,模型组 p-CaMKK β 、p-AMPK 表达水平均明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,FMF 低、中、高剂量组 p-CaMKK β 、p-AMPK 表达水平均明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。FMF 干预前、后各组间 CaMKK β 、AMPK 表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** FMF 可减轻 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞的损伤,这种保护作用可能是通过激活 CaMKK β /AMPK 通路,改善线粒体功能实现的。

[关键词] 帕金森病;乌梅总黄酮;1-甲基-4-苯基吡啶离子;钙调蛋白激酶;腺苷酸活化蛋白激酶;线粒体**[中图分类号]** R284.141 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)12-1981-06

Protective effect of fructus mume total flavone on mitochondrial damage induced by MPP⁺ in SH-SY5Y cells*

WANG Chunling¹, LUO Ning², WEN Xiaodong^{2△}, JIANG Yuanjing², LIU Yu², FENG Wenyong²

(1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China; 2. Department of Neurology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of fructus mume total flavone (FMF) on the regulation of calmodulin kinase/adenosine monophosphate activated protein kinase (CaMKK β /AMPK) pathway in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells induced by neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridyl ion (MPP⁺), a cell model of Parkinson's disease (PD), and the mitochondrial function in SH-SY5Y cells. **Methods** SH-SY5Y cells were treated with 250 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ for 24 h, and an in vitro model of PD was established. The cells were divided into 5 groups: the control group (only added SH-SY5Y cells, without any drug), the model group (250 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ incubated for 24 h), and the FMF low-, medium-, and high-dose groups (MPP⁺ + 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ FMF, respectively). CCK-8 assay was used to detect the cell survival rate, JC-1 staining was used

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82060888);广西中医药管理局立项项目(GZZC2020107);2018 广西中医药大学一流学科项目(2018XK089);广西中医药大学 2020 年校级课题(2020MS049)。作者简介:王春玲(1974—),讲师/助理研究员,博士,主要从事中药防治神经退行性疾病研究。△ 通信作者, E-mail:wenxiaodong0912dr@163.com。

to detect the change of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), Western blot was used to detect the expression levels of CaMKK β /AMPK signaling pathway relative proteins CaMKK β , AMPK, phosphorylated CaMKK β (p-CaMKK) and phosphorylated AMPK (p-AMPK). **Results** The results of CCK-8 showed that after FMF pretreatment for 24 h, the survival rate of MPP⁺ damaged cells in the FMF low-, medium-, and high-dose groups was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of $\Delta\Psi_m$ test showed that, compared with the control group, the $\Delta\Psi_m$ of cells in the model group was decreased significantly ($P < 0.001$). Compared with the model group, the $\Delta\Psi_m$ of cells in the FMF low-, medium-, and high-dose groups was significantly increased ($P < 0.001$). Western blot analysis of related proteins showed that, compared with the control group, the expression levels of p-CaMKK β and p-AMPK were significantly reduced in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of p-CaMKK β and p-AMPK were significantly increased in the FMF low-, medium-, and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference in the expression levels of CaMKK β and AMPK before or after FMF pretreatment ($P > 0.05$). **Conclusion** FMF can alleviate the damage of MPP⁺ to SH-SY5Y cells, and this protective effect may be achieved by activating the CaMKK β / AMPK pathway and improving mitochondrial function.

[**Key words**] Parkinson's disease; fructus mume total flavone; 1-methyl-4-phenylpyridinium; Ca²⁺ / calmodulin dependent protein kinase kinase; adenosine monophosphate-activated protein kinase; mitochondrion

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于中老年人的中枢神经系统变性疾病,其特征性病理改变是黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性死亡。迄今为止,PD中黑质DA神经细胞死亡的原因尚不完全清楚,目前研究认为脑细胞线粒体损伤及其功能障碍是导致PD发病的机制之一^[1-2]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为体内能量平衡的主要传感器,对于调控应激状态下机体的正常代谢至关重要,钙调蛋白激酶(Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, CaMKK β)作为AMPK上游因子,可以通过其磷酸化来激活AMPK。CaMKK β /AMPK信号通路参与了细胞增殖、分化、凋亡、保护线粒体功能、对抗氧化应激等生理过程^[3-4]。研究表明,CaMKK β /AMPK信号通路通过直接或间接调节各种与PD相关的蛋白,抑制神经细胞凋亡,在PD发病机制及神经元保护中发挥着重要作用^[5]。此外,有证据显示,线粒体是CaMKK β /AMPK信号通路发挥神经保护作用的主要细胞器,AMPK通过直接或间接调节线粒体功能参与神经元的不同阶段调控^[6-7]。

乌梅(Fructus Mume)为蔷薇科植物梅Prunus mume(Sieb.) Sieb. et Zucc.的干燥近成熟果实,为治疗PD的常用中药及配伍用药,乌梅总黄酮(Fructus Mume total flavone, FMF)为乌梅提取的有效成分,具有抗氧化、清除自由基、抗肿瘤、抗炎等药理作用^[8]。本课题组前期研究发现,FMF具有保护PD模型大鼠神经元的作用,可以减轻6-羟基多巴(6-

hydroxydopamine, 6-OHDA)引起的线粒体功能损伤^[9],但是其作用机制尚不清楚。本实验拟通过神经毒素1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺)诱导人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞建立PD细胞模型,采用不同浓度的FMF干预,探讨FMF体外实验中的神经保护作用及相关机制,为临床应用乌梅和开发FMF新型防治PD提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

SH-SY5Y细胞购自中国科学院细胞生物研究所,由广西中医药大学科学实验中心实验室保存传代。

1.1.2 药品及试剂

纯度95%的FMF对照品(西安赛奥生物科技有限公司,批号:20210714)。DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);胰蛋白酶(美国Sigma公司);线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白定量试剂盒(BCA Protein Assay Kit,美国Cell Signaling Technology公司);CCK-8试剂盒(美国Abcam公司)。兔抗CaMKK β 一抗、兔抗AMPK一抗、兔抗磷酸化CaMKK β (p-CaMKK β)一抗、兔抗磷酸化AMPK(p-AMPK)一抗(美国Santa Cruz公司);羊抗兔二抗(美国Abcam公司)。

1.1.3 仪器

超净工作台(江苏省苏州空气净化设备公司);CO₂培养箱(日本三洋公司);IX51型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);低温离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);流式细胞仪(美国Beckman公司);全自动荧光酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SH-SY5Y细胞用DMEM培养基(含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)培养,置于37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱中。隔天换液,每2~3天以1:3传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞模型的构建及分组

取对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度 1×10^5 /mL,接种于96孔板,细胞贴壁后,加入不同终浓度MPP⁺溶液(0、125、250、500、1 000、2 000 μmol/L),分别处理16、24、48 h,CCK-8法检测细胞活性。以0 μmol/L MPP⁺为对照组,细胞活性及细胞数量明显下降,最终确定250 μmol/L终浓度的MPP⁺作用24 h,建立PD的细胞模型。细胞实验分为5组:对照组(只加SH-SY5Y细胞,不加药物)、模型组(250 μmol/L MPP⁺)、FMF低剂量组(250 μmol/L MPP⁺+10 μmol/L FMF)、中剂量组(250 μmol/L MPP⁺+50 μmol/L FMF)和高剂量组(250 μmol/L MPP⁺+100 μmol/L FMF)。FMF各剂量组用不同终浓度的FMF(10、50、100 μmol/L)预处理24 h后,然后再加入250 μmol/L终浓度的MPP⁺继续培养24 h。

1.2.3 CCK-8法检测细胞存活率

细胞分组及处理同1.2.2。待细胞贴壁后,按照分组给予不同处理,至相应时间点,加入CCK-8工作液(每孔10 μL),混匀,于37℃培养箱中孵育3 h,3 h后在全自动定量酶标仪上测定490 nm处各孔吸光度(A₄₉₀)值。实验重复3次取其均值。按以下公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=实验组A₄₉₀值/对照组A₄₉₀值×100%。

1.2.4 ΔΨ_m检测

细胞分组及处理同1.2.2。各组细胞处理结束后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,加入JC-1染色工作液,置于细胞培养箱中37℃孵育20 min,孵育结束后除去染色溶液,用JC-1染色缓冲液洗涤2次,胰蛋白酶消化收集细胞,然后用流式细胞仪检测细胞ΔΨ_m。

1.2.5 Western blot检测 CaMKKβ、AMPK表达及其磷酸化水平

细胞分组及处理同1.2.2。细胞培养24 h后收集细胞,提取总蛋白,使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白水平,取30 μg总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,并将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,5%脱脂奶粉室温下封闭2 h,TBST洗3次,每次5 min,分别加入稀释好的一抗:CaMKKβ(1:500)、AMPK(1:1 000)、p-AMPK(1:1 000)、p-CaMKKβ(1:1 000)一抗抗体和GADPH抗体(内参,1:2 000)孵育,4℃过夜TBST洗3次,每次5 min,加入辣根过氧化物酶标记与一抗同源的二抗IgG(1:2 000)室温50 min,TBST洗3次,每次5 min。将滤膜放入配好的显色液中反应1 min,采用Tanon软件拍摄图像并进行半定量分析。各组目的蛋白的相对表达水平=目的条带灰度值/内参条带灰度值。

1.3 统计学处理

用SPSS22.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FMF对SH-SY5Y细胞存活率的影响

模型组SH-SY5Y细胞存活率降低至(53.00±6.16)%,与对照组(100%)比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。MPP⁺处理前分别给予不同浓度的FMF干预后,细胞存活率明显提高,FMF低、中、高剂量组细胞存活率分别为(62.67±8.36)%、(72.00±6.33)%、(86.67±6.65)%,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 FMF对MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞ΔΨ_m的影响

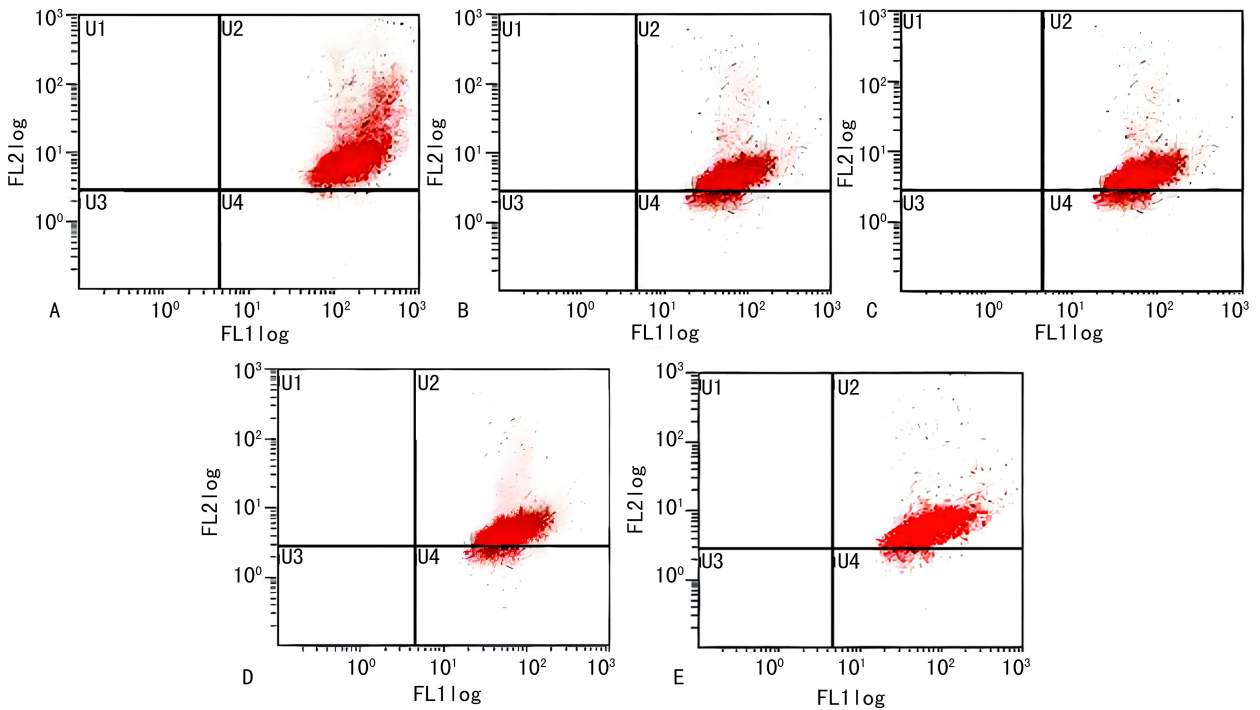
与对照组[(20.54±3.23)%]比较,模型组细胞ΔΨ_m[(1.92±0.63)%]明显下降($P < 0.001$)。与模型组相比,FMF低、中、高剂量组细胞ΔΨ_m均上升,分别为(6.68±0.83)%、(9.76±1.92)%、(16.77±3.47)%,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图1。

2.3 FMF对MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞CaMKKβ、AMPK表达及其磷酸化水平的影响

Western blot检测结果显示,与对照组相比,模型组细胞p-CaMKKβ、p-AMPK表达水平均明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,FMF低、中、高剂量组p-CaMKKβ表达水平均明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),FMF低、中、高剂量均能上调p-AMPK表达

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。经 FMF 低、中、高剂量处理后,细胞内的 CaMKK β 、AMPK 表达水平与模型组细胞

比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1、图 2。



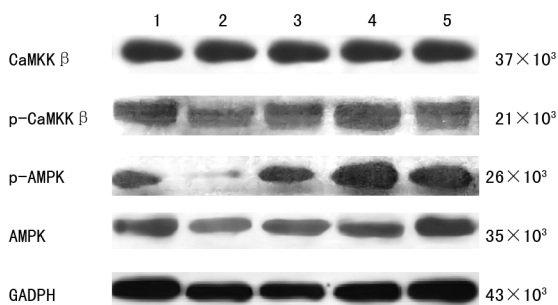
A: 对照组; B: 模型组; C: FMF 高剂量组; D: FMF 中剂量组; E: FMF 低剂量组。

图 1 流式细胞术检测 FMF 对各组 SH-SY5Y 细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响

表 1 FMF 对 PD 体外细胞模型中 CaMKK β 、AMPK 表达及磷酸化水平的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	p-CaMKK β /GADPH	CaMKK β /GADPH	p-AMPK/GADPH	AMPK/GADPH
对照组	2.23 \pm 0.24	0.75 \pm 0.07	1.49 \pm 0.17	0.52 \pm 0.07
模型组	1.29 \pm 0.12 ^a	0.67 \pm 0.05	0.51 \pm 0.14 ^a	0.47 \pm 0.05
FMF 低剂量组	1.56 \pm 0.13 ^c	0.69 \pm 0.04	0.74 \pm 0.13 ^c	0.49 \pm 0.04
FMF 中剂量组	1.67 \pm 0.20 ^b	0.71 \pm 0.06	1.07 \pm 0.21 ^b	0.51 \pm 0.06
FMF 高剂量组	1.95 \pm 0.19 ^b	0.70 \pm 0.05	0.84 \pm 0.15 ^b	0.50 \pm 0.05

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$; ^c: $P < 0.05$, 与模型组比较。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: FMF 低剂量组; 4: FMF 中剂量组; 5: FMF 高剂量组。

图 2 Western blot 检测 FMF 对 PD 体外细胞模型中 CaMKK β 、AMPK 表达及其磷酸化水平的影响

3 讨论

越来越多的研究表明,线粒体功能损害及其引发的细胞氧化应激损伤在 PD 的发病机制中起重要作用^[10-11]。因此,将线粒体作为 PD 治疗的靶点,改善线

粒体功能障碍,减轻线粒体氧化应激损伤,降低 DA 能神经元死亡成为防治 PD 的重要策略^[12]。

FMF 是从中药乌梅中提取的主要有效成分,具有抗氧化应激、抗衰老、抗炎、抗病毒等药理作用^[13-14]。本课题组研究发现,FMF 能下调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)水平,升高 Bcl-2/Bax 比值,抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。但是 FMF 的神经保护作用是否与靶向线粒体、拮抗线粒体氧化应激损伤有关,以及其具体作用机制,目前国内外还少有相关研究报道。MPP⁺ 是一种神经毒剂,通过神经细胞的多巴胺转运体(DAT)进入细胞后损伤线粒体功能,导致 DA 能神经元损伤; SH-SY5Y 细胞的生理功能、细胞形态与正常的神经细胞相似, MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞建立的 PD 体外模型已得到国内外学者一致公认,并被广泛用于 PD 的实验研究^[15]。因此,本研究采用 MPP⁺ 诱导损

伤 SH-SY5Y 细胞建立 PD 的体外模型。

本研究采用 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞, CCK-8 法检测细胞的存活率, 确定最佳建模浓度及时间为 MPP⁺ 250 μmol/L 处理 24 h, 并用于研究 FMF 对 PD 体外细胞模型的保护作用及其可能的机制。结果表明, 在 MPP⁺ 刺激 SH-SY5Y 细胞前 24 h, 给予 10、50、100 μmol/L FMF 可抑制 MPP⁺ 作用所产生的细胞存活率下降, 且改变与药物呈剂量依赖关系, 以 100 μmol/L FMF 保护作用最明显, 提示在一定浓度范围内 FMF 对 MPP⁺ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞具有保护作用。本课题组之前的研究也发现 FMF 对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤具有明显的干预作用^[16], 因此该实验结果与以前的报道一致。

$\Delta\Psi_m$ 是稳定线粒体膜完整性, 维持线粒体正常功能的关键因素^[17]。当 $\Delta\Psi_m$ 降低时, 引起线粒体膜通透性改变, 影响线粒体呼吸链, 使体内氧自由基生成增加, 进一步加重线粒体损伤, 引起神经细胞功能障碍甚至死亡; 此外, 受损的线粒体释放细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 和凋亡诱导因子, 造成神经细胞凋亡^[18]。本实验观察了 FMF 对 SH-SY5Y 细胞线粒体功能的影响。JC-1 染色是检测 $\Delta\Psi_m$ 的常用方法^[19]。JC-1 检测结果显示, 模型组细胞 $\Delta\Psi_m$ 下降, FMF 干预抑制了 $\Delta\Psi_m$ 的下降, 随着 FMF 浓度增加, $\Delta\Psi_m$ 逐渐上升, 提示在一定浓度范围内 FMF 可部分恢复 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞的 $\Delta\Psi_m$, 具有保护线粒体膜功能的作用。

有研究表明, CaMKK β 、AMPK 是与 PD 发生、发展密切相关的蛋白^[6,20]。AMPK 是细胞重要的能量感受器和调节器, 是能量代谢的关键调节因子^[21]。有研究显示, 在 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 PD 小鼠和 MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 细胞中, AMPK 磷酸化受到抑制, 应用 AMPK 的药理抑制剂 Compound C 抑制 AMPK 的表达可增加 MPP⁺ 诱导的细胞死亡^[22-23]。AMPK 受 CaMKK β 调节, CaMKK β 是一种激活钙调素依赖蛋白激酶的激酶, 是 AMPK 的主要上游蛋白激酶, 可以激活 AMPK, 其作用位点是 AMPK α 亚基 Thr172^[24]。有研究证实在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型脑中 CaMKK β 表达明显下调^[25]。近年研究显示, 线粒体是 CaMKK β /AMPK 信号通路发挥神经保护作用的细胞靶器官, AMPK 通过直接或间接调节线粒体功能参与神经元的不同阶段调控^[26-27]。p-CaMKK β 、p-AMPK 是 CaMKK β 、AMPK 的活化状态, 是 CaMKK β /AMPK 信号通路活化的标志^[28]。本研究中, MPP⁺ 明显降低 SH-SY5Y 细胞 CaMKK β 、AMPK 磷酸化水平, 而 FMF 处理后可以明显提高 CaMKK β 、AMPK 的磷酸化水平。基于这些结果, 认

为 FMF 可能通过激活 CaMKK β /AMPK 信号通路发挥对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的神经保护作用。

综上所述, FMF 可明显减轻 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤, 抑制线粒体功能障碍。其潜在的作用机制可能是 FMF 能够调节 CaMKK β /AMPK 信号通路, 缓解线粒体损伤, 从而发挥神经保护作用。CaMKK β /AMPK 信号通路可能成为治疗 PD 的有效靶点, 而 FMF 如何启动 CaMKK β /AMPK 信号通路, 需要通过进一步的实验完善研究。

参考文献

- [1] PARK J S, DAVIS R L, SUE C M. Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(5):21.
- [2] ROCHA E M, DE MIRANDA B, SANDERS L H. Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 109(Pt B):249-257.
- [3] SUNDARARAMAN A, AMIRTHAM U, RAN GARAJAN A. Calcium-oxidant signaling network regulates AMP-activated protein kinase (AMPK) activation upon matrix deprivation[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(28):14410-14429.
- [4] YU H, ZHANG H, DONG M, et al. Metabolic reprogramming and AMPK α 1 pathway activation by caulerpin in colorectal cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(1):161-172.
- [5] LIU C, YE Y, ZHOU Q, et al. Crosstalk between Ca²⁺ signaling and mitochondrial H₂O₂ is required for rotenone inhibition of mTOR signaling pathway leading to neuronal apoptosis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7):7534-7549.
- [6] CURRY D W, STUTZ B, ANDREWS Z B, et al. Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in Parkinson's disease[J]. *J Parkinsons Dis*, 2018, 8(2):161-181.
- [7] MAO H, TAO T, SONG D, et al. Zedoarondiol inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cells proliferation via regulating AMP-activated protein kinase signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6):1506-1520.
- [8] 张小琼, 侯晓军, 杨敏, 等. 乌梅的药理作用研究

- 进展[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3567-3570.
- [9] 文晓东, 罗宁, 王春玲, 等. 乌梅总黄酮对帕金森病大鼠脑线粒体呼吸链酶复合物影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(10): 27-31.
- [10] RYAN B J, HOEK S, FON E A, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's; from familial to sporadic disease[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(4): 200-210.
- [11] RANI L, MONDAL A C. Emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease progression: pathogenic and therapeutic implications [J]. Mitochondrion, 2020, 50: 25-34.
- [12] LUO Y, HOFFER A, HOFFER B, et al. Mitochondria: a therapeutic target for parkinson's disease? [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 20704-20730.
- [13] 邓婉婷. 乌梅各组分生物活性研究及提取工艺优化[D]. 广州: 广东药学院, 2015: 20-63.
- [14] 杨莹菲, 胡汉昆, 刘萍, 等. 乌梅化学成分、临床应用及现代药理研究进展[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 415-418.
- [15] RAMALINGAM M, KIM S J. The neuroprotective role of insulin against MPP⁺-induced Parkinson's disease in differentiated SH-SY5Y cells[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(4): 917-926.
- [16] 王春玲, 文晓东, 罗宁, 等. 乌梅总黄酮对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制[J]. 海南医学院学报, 2021, 27(7): 494-499.
- [17] LYAMZAEV K G, TOKARCHUK A V, PAN TELEEVA A A, et al. Induction of autophagy by depolarization of mitochondria[J]. Autophagy, 2018, 14(5): 921-924.
- [18] YANG S, LI X, DOU H, et al. Sesamin induces A549 cell mitophagy and mitochondrial apoptosis via a reactive oxygen species-mediated reduction in mitochondrial membrane potential [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2020, 24(3): 223-232.
- [19] MARCONDES N A, TERRA S R, LASTA C S, et al. Comparison of JC-1 and MitoTracker probes for mitochondrial viability assessment in stored canine platelet concentrates: a flow cytometry study [J]. Cytometry A, 2019, 95(2): 214-218.
- [20] XU X, WANG R, HAO Z, et al. DJ-1 regulates tyrosine hydroxylase expression through CaMKK β /CaMKIV/CREB1 pathway in vitro and in vivo [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 869-879.
- [21] STEINBERG G R, CARLING D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(7): 527-551.
- [22] PARK J S, LEEM Y H, PARK J E, et al. Neuroprotective effect of β -Lapachone in MPTP-Induced Parkinson's disease mouse model: involvement of astroglial p-AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Biomol Ther (Seoul), 2019, 27(2): 178-184.
- [23] WU Y C, LI X Q, ZHU J X, et al. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease [J]. Neurosignals, 2011, 19(3): 163-174.
- [24] ZHOU X, CAO Y, AO G, et al. CaMKK β -dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of Hydrogen sulfide on neuroinflammation [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(12): 1741-1758.
- [25] WAN S X, PAN X, QIAN J J, et al. Downregulation of ATP13A2 in midbrain dopaminergic neurons is related to defective autophagy in a mouse model of Parkinson's disease [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(7): 1853-1858.
- [26] TOYAMA E Q, HERZIG S, COURCHET J, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress [J]. Science, 2016, 351(6270): 275-281.
- [27] ZHENG A, LI H, XU J, et al. Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice; role of AMP-activated protein kinase activation [J]. Br J Nutr, 2015, 113(11): 1667-1676.
- [28] CHAUHAN A S, LIU X, JING J, et al. STIM2 interacts with AMPK and regulates calcium-induced AMPK activation [J]. FASEB J, 2019, 33(2): 2957-2970.