

# 镇肝熄风汤含药血清对6-OHDA诱导PC12 细胞损伤保护作用的抗氧化机制分析

邹宇<sup>1</sup>, 董妙先<sup>2\*</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** **目的:**观察镇肝熄风汤含药血清对6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导PC12细胞凋亡的影响,并探讨其是否通过抗氧化活性发挥神经保护作用。**方法:**将40只Wistar大鼠随机分为空白组、镇肝熄风汤低、中、高剂量组,每组10只。镇肝熄风汤按照8,16,32 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,空白组灌胃等体积生理盐水,采血制备含药和空白血清。常规培养PC12细胞,分为空白组、模型组、镇肝熄风汤低、中、高剂量组,空白组和模型组给予空白血清,其他3组给予10%含药血清,孵育1h,再加100 μmol·L<sup>-1</sup>6-OHDA共孵育24h后收集细胞。采用MTS法检测细胞活性,流式细胞术检测细胞凋亡,分光光度法检测脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)水平,实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测醌氧化还原酶-1(NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO-1)mRNA表达。**结果:**与空白组比较,模型组细胞活力明显降低,而细胞凋亡和LPO水平明显增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,10%的镇肝熄风汤低、中、高剂量含药血清组细胞活力显著增加,而细胞凋亡和LPO水平明显减少( $P < 0.05$ )。与模型组比较,10%的镇肝熄风汤低、中、高剂量含药血清组NQO-1 mRNA表达明显上调( $P < 0.05$ ),而空白组与模型组NQO-1 mRNA表达无显著性差异。**结论:**镇肝熄风汤含药血清具有保护6-OHDA诱导PC12细胞损伤的作用,其机制可能与上调PC12细胞NQO-1 mRNA表达进而提高了细胞抗氧化能力有关。

**[关键词]** 镇肝熄风汤; 血清药理; 神经保护; 细胞凋亡; 氧化应激; 醌氧化还原酶-1; 脂质过氧化物

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0112-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfxj.2017090112

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0916.004.html>

**[网络出版时间]** 2017-02-15 9:16

## Antioxidant Mechanism of Zhengan Xifeng Tang-containing Serum in Protecting 6-OHDA-induced PC12 Cell Injury

ZOU Yu<sup>1</sup>, DONG Miao-xian<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;

2. Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine the effect of Zhengan Xifeng Tang on 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced apoptosis of PC12 cell, and its antioxidant activity on neuroprotection. **Method:** A total of 40 male Wistar rats were randomly divided into the control group and high, middle and low-dose Zhengan Xifeng Tang groups (32, 16, 8 g·kg<sup>-1</sup>). Rats were given Zhengan Xifeng Tang with intragastric administration to prepare Zhengan Xifeng Tang-containing serum. The control group was given the same volume of normal saline. The proliferation of PC12 cells were cultured and divided into the blank group, the model group and high, middle and low-dose Zhengan Xifeng Tang groups. The blank group and the model group were given blank serum, the other

**[收稿日期]** 20161212(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373629)

**[第一作者]** 邹宇, 硕士, 讲师, 从事药理学工作, Tel:0452-2663159, E-mail: zouyu2311@sina.com

**[通讯作者]** \*董妙先, 主任医师, 从事中医药防治神经退行性疾病的基础研究工作, Tel:0452-2663120, E-mail: dmx1969@126.com

three groups were given 10% drug-containing serum incubated for 1 h, and added with  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-OHDA to co-cultured for 24 h. the cell viability was measured by MTS. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. Measurements of lipid peroxidation (LPO) levels were performed using spectrophotometry method. Real-time PCR were used to analyze the expression of NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) mRNA. **Result:** Compared with blank control, cell viability was significantly decreased, whereas apoptosis and LPO levels were significantly increased in 6-OHDA-exposed PC12 cells ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, cell viability were significantly increased, whereas apoptosis and LPO levels were significantly decreased in Zhengan Xifeng Tang-containing serum treatment groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, NQO-1 mRNA expression were significantly up-regulated in Zhengan Xifeng Tang-containing serum treatment groups ( $P < 0.05$ ), but with no significant difference in NQO-1 mRNA expression between the normal group and model group. **Conclusion:** Zhengan Xifeng Tang-containing serum has the neuroprotective effect against 6-OHDA-induced apoptosis, which may be attributable to its antioxidant properties through up-regulation of NQO-1 mRNA expression.

[ **Key words** ] Zhengan Xifeng Tang; serum pharmacology; neuroprotection; apoptosis; oxidative stress; NADPH quinone oxidoreductase 1; lipid peroxidation

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的病理基础是中脑黑质多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元进行性变性导致 DA 含量降低<sup>[1]</sup>。以 DA 替代治疗可以缓解 PD 临床症状,但却不能阻止 DA 能神经元进一步变性<sup>[2]</sup>。目前美国 FDA 批准的抗 PD 新药均无神经保护作用<sup>[3]</sup>。中医药防治 PD 有独特优势,震颤和身体摇动是中医脏象学说中肝风内动的病理表现,古代医家多从内风论治<sup>[4-5]</sup>。中医学认为 PD 病机为肝肾阴虚为本,肝风内动为标<sup>[6-7]</sup>。镇肝熄风汤出自张锡纯《医学衷中参西录》,治疗 PD 具有一定的临床基础<sup>[8]</sup>。课题组前期采用附子汤灌胃联合 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 单侧损毁黑质法复制 PD 肝阳上亢型大鼠模型研究发现镇肝熄风汤具有改善 PD 模型动物行为学作用<sup>[9]</sup>。众多研究表明醌氧化还原酶-1 (NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 对多巴胺醌的细胞毒性损伤具有保护作用<sup>[10]</sup>。本研究旨在验证“镇肝熄风汤对 PD 的神经保护作用可能与其抗氧化特性有关”的科学假说。

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 220 ~ 240 g,由维通利华(北京)实验动物科技有限公司提供,动物合格证号 SCXK(京)2012-0001。本研究获得齐齐哈尔医学实验动物伦理委员会批准[(齐)伦审(2016)04 号]。

**1.1.2 药物及试剂** 6-OHDA(美国 Santa Cruz 公司,批号#D2312)。镇肝熄风汤由牛膝(批号 130501)-赭石(批号 30301)-龙骨(批号 130501)-龟甲(批号 140701)-牡蛎(批号 140701)-天冬(批号 13110)-白芍(批号 130401)-玄参(批号 130601)-茵陈(批号

130201)-麦芽(批号 130501)-川楝子(批号 140301)-甘草(批号 130601)比例为 60:60:30:30:30:30:30:12:12:12:9 组成,以上方剂饮片均购自哈尔滨市盛泰中药饮片加工厂。将代赭石(包煎)30 g,龟甲 30 g 和牡蛎 15 g 加水 500 mL 水先煎 15 min 后,其余生药再加水 700 mL,浸泡 15 min 后,再共煎 30 min,取汁。再加水 700 mL 煎煮 30 min,取汁。将 2 次煎煮药液合并,合并液浓缩至 58 mL (生药质量浓度  $3.0 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous MTS Reagent powder(美国 Promega 公司;批号 0000095765), Annexin V-FITC-PI Apoptosis Detectio 试剂盒(康为世纪公司,批号 00021408), 脂质过氧化物 (LPO) 试剂盒(美国 Cayman 公司,批号 0463754), untra SYBR Mixture (with Rox) 试剂盒(康为世纪公司,批号 00151503), TRIZOL Reagent(美国 Ambion 公司,批号 87804), primeScript<sup>™</sup> RT reagent 试剂盒(TakaRa 宝生物工程大连有限公司,批号 BK4001)。NQO-1 上游引物 5'-CTCTTACTAGCCTAGCCTGTAGC-3',下游引物 5'-TGCCGTAGTTGAATGATGTCT-3';GAPDH 上游引物 5'-GACAACTTTGGCATCGTGGA-3',下游引物 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.1.3 含药血清制备**<sup>[11]</sup> Wistar 大鼠随机空白组(等量生理盐水灌胃)、镇肝熄风汤低剂量组( $8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,相当于临床成人等效剂量的 3 倍)、中剂量组( $16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,相当于临床成人等效剂量的 6 倍)和高剂量组( $32 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,相当于临床成人等效剂量的 12 倍),每组 10 只。适应性喂养 3 d 后,每天灌胃给药

2 次,连续 7 d。末次给药 1 h 后,大鼠经 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后腹主动脉采血,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集血清,同组混合。56 ℃ 水浴灭活补体 30 min,经 0.22 μm milllex® GP 针头式过滤器除菌分装后,-20 ℃ 冻存。

**1.4 仪器** Stratagene Mx3005P 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 Agilent 公司), XPE504 型分析天平(美国 Mettler Toledo 公司), ELX800 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), Safire2 型全波长多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司),FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 实验分组** 将常规培养的 PC12 细胞(购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)分为 5 组,正常组应用含 10% 的空白血清的 DMEM 培养液,模型组应用含 10% 的空白血清和 6-OHDA (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 DMEM 培养液,镇肝熄风汤含药血清高剂量组应用含 10% 的高剂量镇肝熄风汤含药血清和 6-OHDA (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 DMEM 培养液,镇肝熄风汤含药血清中剂量组应用含 10% 的中剂量镇肝熄风汤含药血清和 6-OHDA (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 DMEM 培养液,镇肝熄风汤含药血清低剂量组应用含 10% 的低剂量镇肝熄风汤含药血清和 6-OHDA (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 DMEM 培养液,药物处理时间为 24 h。

**2.2 MTS 法检测细胞存活率** PC12 细胞药物处理 24 h 后,在 96 孔板每孔加入 Cell Titer 96® Aqueous MTS Reagent 溶液 20 μL,置于孵箱中 2 h,酶标仪 490 nm 处读取各孔吸光度 A。并通过公式计算相对存活率。

$$\text{相对存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}})$$

**2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡** PC12 细胞药物处理 24 h 后,收集细胞置流式管中,按照 Annexin V-FITC-PI 细胞凋亡检测试剂说明操作,并用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**2.4 分光光度法检测 LPO 水平** PC12 细胞药物处理 24 h 后,收集细胞,按照 LPO 测定试剂盒说明操作采用酶标仪检测 LPO 水平。

**2.5 Real-time PCR 检测 NQO-1 mRNA 表达** PC12 细胞药物处理 24 h 后,收集细胞,加入 Trizol 试剂提取总 RNA,采用 primeScript™ RT 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。采用 untra SYBR Mixture (with Rox) Kit 检测 C<sub>t</sub> 值,PCR 反应条件为第一步是预变性,95 ℃ 预变性 30 s,共 1 个循环。第二步是 PCR 反应,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 31 s,共 40 个

循环。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法对 NQO-1 mRNA 表达进行相对定量<sup>[12]</sup>。

**2.6 统计分析** 采用 SPSS 13.0 软件包进行单因素方差分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较用 SNK 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞存活率的影响** MTS 预实验结果显示 100 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度的 6-OHDA 处理 24 h 是 PD 细胞模型制备的最佳处理浓度和时间。MTS 检测结果显示:与空白组比较,模型组细胞活力明显降低(P < 0.05)。与模型组比较,10% 的低、中、高剂量镇肝熄风汤含药血清组细胞活力明显增加(P < 0.05)。表明镇肝熄风汤含药血清显著地抑制了 6-OHDA 诱导 PC12 细胞死亡。见表 1。

表 1 镇肝熄风汤含药血清对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of Zhengan Xifeng Tang-containing serum on 6-OHDA-induced cell viability( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	细胞存活率/%
空白	-	100.0 ± 0.0
模型	-	51.5 ± 5.9 <sup>1)</sup>
10% 镇肝熄风汤含药血清	8	68.3 ± 4.8 <sup>2)</sup>
	16	71.9 ± 6.8 <sup>2)</sup>
	32	75.0 ± 4.6 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05(表 2~4)。

**3.2 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,模型组细胞凋亡明显增加(P < 0.05)。与模型组比较,10% 的低、中、高剂量镇肝熄风汤含药血清组细胞凋亡明显减少(P < 0.05)。表明镇肝熄风汤含药血清显著地抑制了 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡。见表 2。

表 2 镇肝熄风汤含药血清对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Zhengan Xifeng Tang-containing serum on 6-OHDA-induced apoptosis( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	凋亡率/%
空白	-	11.3 ± 2.2
模型	-	38.2 ± 4.8 <sup>1)</sup>
10% 镇肝熄风汤含药血清	8	24.3 ± 3.8 <sup>2)</sup>
	16	24.1 ± 3.8 <sup>2)</sup>
	32	19.3 ± 3.4 <sup>2)</sup>

**3.3 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞中 LPO 水平的影响** 与空白组比较,模型组 LPO 水平明显增加 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,10% 的低、中、高剂量镇肝熄风汤含药血清组 LPO 水平明显减少 ( $P < 0.05$ )。表明镇肝熄风汤含药血清显著地抑制了 6-OHDA 诱导 LPO 水平升高。见表 3。

表 3 镇肝熄风汤含药血清对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞中 LPO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Zhengan Xifeng Tang-containing serum on 6-OHDA-induced LPO levels ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LPO 水平/%
空白	-	99.9 ± 12.0
模型	-	313.2 ± 11.4 <sup>1)</sup>
10% 镇肝熄风汤含药血清	8	229.3 ± 14.8 <sup>2)</sup>
	16	222.2 ± 19.4 <sup>2)</sup>
	32	187.8 ± 14.0 <sup>2)</sup>

**3.4 对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞 NQO-1 mRNA 表达的影响** 与模型组比较,10% 的低、中、高剂量镇肝熄风汤含药血清组 NQO-1 mRNA 表达明显上调 ( $P < 0.05$ ),而空白组与模型组 NQO-1 mRNA 表达无显著性差异。表明镇肝熄风汤含药血清呈剂量显著地上调了 PC12 细胞 NQO-1 mRNA 表达。见表 4。

表 4 镇肝熄风汤含药血清对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞 NQO-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of Zhengan Xifeng Tang-containing serum on 6-OHDA-induced NQO-1 mRNA expression ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NQO-1
空白	-	1.00 ± 0.12
模型	-	1.13 ± 0.15 <sup>1)</sup>
10% 镇肝熄风汤含药血清	8	1.59 ± 0.18 <sup>2)</sup>
	16	2.00 ± 0.17 <sup>2)</sup>
	32	2.13 ± 0.22 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

PD 是发生于中老年人黑质和黑质纹状体通路的变性疾病,以运动迟缓、静止性震颤、肌肉强直、姿势反射障碍为主要临床特征。近年来,虽然对 PD 发病机制的研究取得了很大进展,但目前对 PD 的治疗主要是 DA 替代疗法,该疗法主要是改善 PD 症状,并不能阻止 PD 的病程进展<sup>[13]</sup>。

中医学者认为 PD 的病机为本虚标实,本虚为肝肾不足,标实为肝风内动。震颤型 PD 以内风

证候多见,病位在肝和肾,治则以补肾柔肝、熄风止痉为主<sup>[14]</sup>。镇肝熄风汤是近代名医张锡纯《医学衷中参西录》中的著名组方,专为肝阳上亢而设,具有镇肝熄风、滋阴潜阳之功。笔者前期在 6-OHDA 中脑微量注射合并附子汤灌胃制备 PD 肝阳上亢证模型大鼠和 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠均发现镇肝熄风汤具有抗实验性 PD 的作用<sup>[9,15]</sup>。但作用机制尚不明确。

PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤分化的细胞株,能合成贮存并释放 DA,具有典型的神经细胞特征,是一种很好的研究神经细胞生理、病理及药理学的模型,常用于神经毒性损害研究。在治疗神经退行性疾病中,抗氧化药物的最终靶标是神经元,而 PC12 细胞模型为抗氧化药物在神经元中药理作用提供了研究手段<sup>[16]</sup>。6-OHDA 是 DA 能神经递质的羟基化衍生物,结构与 DA 类似。6-OHDA 与 DA 竞争摄取位点后摄入细胞,在细胞内通过氧化分解产生活性氧,导致选择性 DA 能神经元死亡<sup>[17]</sup>。本研究在体外采用 6-OHDA 诱导 PC12 细胞损伤模型,观察发现镇肝熄风汤含药血清具有保护 6-OHDA 诱导的神经细胞损伤作用。细胞死亡常见的 2 种形式为细胞凋亡与坏死,笔者进一步研究发现,镇肝熄风汤含药血清抑制了 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡。鉴于体内神经内分泌和免疫等复杂因素的影响,笔者体外研究发现镇肝熄风汤的神经保护作用、是否通过血脑屏障以及作用机制将来还需要通过动物模型验证。

研究发现,氧化应激在 PD 疾病发生发展中起重要作用<sup>[18]</sup>,氧自由基毒性可引起 DA 神经元细胞的死亡<sup>[19]</sup>。LPO 是体内氧化代谢的产物,是氧化应激程度评估的一个重要指标<sup>[20]</sup>。本研究发现,镇肝熄风汤含药血清抑制了 6-OHDA 诱导 LPO 水平升高,表明镇肝熄风汤抗氧化活性可能是其抗凋亡的机制之一。在 DA 能神经元胞质内合成的 DA 被转运到单胺能囊泡中储存,而没有储存的 DA 由于自氧化而生成有毒性的 DA 醌类物质。NQO-1 是一种具有催化醌双电子还原反应的黄素酶,对醌及其衍生物有解毒作用<sup>[21]</sup>。研究显示,NQO-1 酶活性降低可导致半醌和醌的代谢效率下降,使自由基毒性产物增加,从而加重神经元损伤。NQO-1 可抑制 DA 自动氧化过程而发挥抗氧化作用<sup>[22]</sup>。本研究发现,镇肝熄风汤含药血清上调了 PC12 细胞中 NQO-1 mRNA 表达,进而减少了 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞氧化应激,对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞损伤发挥

保护作用。笔者的发现初步验证抗氧化活性是镇肝熄风汤 PD 神经保护重要机制的工作假说。

[参考文献]

[1] Gully J C, Sergeyev V G, Bhootada Y, et al. Up-regulation of activating transcription factor 4 induces severe loss of dopamine nigral neurons in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 627: 36-41.

[2] Tahmasian M, Bettray L M, van Eimeren T, et al. A systematic review on the applications of resting-state fMRI in Parkinson's disease; Does dopamine replacement therapy play a role [J]. *Cortex*, 2015, 73: 80-105.

[3] Perez-Lloret S, Rascol O. The safety and efficacy of safinamide mesylate for the treatment of Parkinson's disease [J]. *Expert Rev Neurother*, 2016, 16 (3): 245-258.

[4] 孙林娟, 宁侠, 周绍华. 周绍华治疗帕金森病经验 [J]. *中医杂志*, 2015, 56(3): 193-197.

[5] 陈宏志, 李静蔚, 何建成. 基于临床病案文献的帕金森病中医基本证候研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(8): 3216-3219.

[6] 贺文彬, 郭蕾, 张俊龙. 阿尔茨海默病与帕金森病共性证候要素研究的可行性探讨 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(12): 1473-1476.

[7] 白钰, 吕书勤, 马晓丽. 滋肾柔经汤改善帕金森病肝肾阴虚证的非运动症状 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(8): 182-186.

[8] 崔俊波. 镇肝熄风汤在内科疾病中的应用 [J]. *河南中医*, 2014, 34(2): 345-347.

[9] 王晓丽, 孙影, 朱兰芹, 等. 镇肝熄风汤对帕金森病肝肾阳上亢证大鼠中脑 Akt 和 GSK-3 $\beta$  磷酸化的影响 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2016, 18(8): 1374-1378.

[10] 王艳, 王娜, 俞国华, 等. NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 对多巴胺能细胞的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(10): 1917-1921.

[11] 钟广伟, 万玲, 王东生, 等. 平肝潜阳方含药血清对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖、迁移及 DNA 甲基化水平的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(5): 850-855.

[12] Arocho A, CHEN B, Ladanyi M, et al. Validation of

the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2006, 15(1): 56-61.

[13] Kulisevsky J, Luquin M R, Arbelo J M, et al. Advanced Parkinson's disease; clinical characteristics and treatment. Part II [J]. *Neurologia*, 2013, 28(9): 558-583.

[14] 陈宏志, 何建成. 基于期刊文献的帕金森病中医证候要素研究 [J]. *山东中医杂志*, 2014, 33(9): 722-725.

[15] 王晓丽, 兴桂华, 邹宇, 等. 镇肝熄风汤对帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元的保护作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(3): 848-850.

[16] 丁明杰, 史学义, 张妮, 等. NGF 诱导 PC12 细胞分化的神经细胞行为观察 [J]. *河南医科大学学报*, 2001, 36(3): 281-283.

[17] Blum D, Torch S, Lambeng N, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP; contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65(2): 135-172.

[18] 任燕冬, 井月娥, 张淑香, 等. 拜颠停复方对帕金森病小鼠模型氧化应激反应的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22): 154-157.

[19] Sarrafchi A, Bahmani M, Shirzad H, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease; New hopes in treatment with herbal antioxidants [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(2): 238-246.

[20] Teppner M, Böss F, Ernst B, et al. Application of lipid peroxidation products as biomarkers for flutamide-induced oxidative stress *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 238(3): 53-59.

[21] Kim J Y, Kim D Y, Son H, et al. Protease-activated receptor-2 activates NQO-1 via Nrf2 stabilization in keratinocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 2014, 74(1): 48-55.

[22] Park S Y, Kim D Y, KANG J K, et al. Involvement of activation of the Nrf2/ARE pathway in protection against 6-OHDA-induced SH-SY5Y cell death by  $\alpha$ -isocubebenol [J]. *Neurotoxicology*, 2014, 44: 160-168.

[责任编辑 周冰冰]