

自噬参与氢溴酸樟柳碱对缺氧状态下 PC12 细胞损伤的保护作用

陈丹丹^{1,2}, 彭成^{1,3*}, 李梦婷¹, 于思¹, 万峰⁴, 谢晓芳^{1,3*}

- (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 雅安职业技术学院, 四川雅安 625000;
3. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
4. 成都第一制药有限公司, 成都 610031)

[摘要] 目的:研究氢溴酸樟柳碱对缺氧状态下肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(rats pheochromocytoma cells, PC12)自噬相关因子的影响。探讨氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤神经细胞模型的保护作用及机制。方法:运用氯化钴(CoCl_2)处理 PC12 细胞建立化学性缺氧模型,设空白组,模型组,阳性组(丁基苯酚),氢溴酸樟柳碱高、中、低浓度组($100, 50, 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。采用倒置显微镜观察细胞形态,噻唑蓝(MTT)比色法测定细胞相对存活率,单丹磺酰尸胺荧光染色(MDC)和透射电镜技术检测自噬小体的变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)技术检测微管相关蛋白1轻链3(LC3),Beclin-1等蛋白的表达。结果:氢溴酸樟柳碱干预后细胞存活率显著提高,细胞形态恢复较好。MDC 荧光染色和透射电镜下自噬小体的数量增多,LC3-II 及 Beclin-1 的表达显著提升。结论:自噬在缺氧状态下对细胞有保护作用,氢溴酸樟柳碱通过诱导低氧状态细胞自噬发挥了神经保护作用。

[关键词] 氢溴酸樟柳碱; 肾上腺嗜铬细胞瘤细胞; 缺氧; 自噬; 神经保护

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0144-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200144

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1020.018.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:20

Protective Effect of Anisidine Hydromide on Autophagy-related Factors of PC12 Cell Induced by Hypoxia

CHEN Dan-dan^{1,2}, PENG Cheng^{1,3*}, LI Meng-ting¹, YU Si¹, WAN Feng⁴, XIE Xiao-fang^{1,3*}

- (1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;
2. Ya'an Polytechnic College, Ya'an 625000, China; 3. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of TCM Resources, Chengdu 611137, China; 4. Chengdu No. 1 Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of anisidine hydromide on the expression of autophagy-related protein, in order to explore the protective effect and possible mechanism of anisidine hydromide on rats pheochromocytoma cells (PC12) induced by hypoxia. **Method:** PC12 cells were divided into control group, model group, *n*-butylphthalide group, and high-dose, middle-dose and low-dose anisidine hydromide groups ($100, 50, 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The relative viability of PC12 cells induced by hypoxia was measured by thiazole blue chromatometry (MTT), and the morphology of PC12 cells was observed. The morphological changes in

[收稿日期] 20170601(015)

[基金项目] 四川省科技支撑计划项目(2016SZ0027)

[第一作者] 陈丹丹, 博士, 讲师, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究, Tel: 13795847283, E-mail: chengdan88@126.com

[通讯作者] * 彭成, 博士生导师, 研究员, 从事疾病动物模型与中药复方药理研究, Tel: 028-61800099, E-mail: pengchengchengdu@126.com;

* 谢晓芳, 博士, 副研究员, 从事中药药理与毒理研究, Tel: 028-61800231, E-mail: xxfl4544@163.com

autophagosome were observed by transmission electron microscope and monodansylcadaverine (MDC) fluorescence staining. The expressions of microtubule associated protein 1 light chain3 (LC3) and Beclin-1 protein were detected by Western blot method. **Result:** The viability rates of cells were significantly improved after intervention with anisodine hydromide, and the expressions of LC3-II and Beclin-1 were significantly improved after intervention with anisodine hydromide. These results were consistent with the observation of transmission electron microscope and MDC fluorescence staining. **Conclusion:** Autophagy has a protective effect on PC12 cell induced by hypoxia, and anisodine hydromide could prevent the injury of PC12 cells induced by hypoxia through activating autophagy.

[**Key words**] anisodine hydromide; rats pheochromocytoma cells (PC12); hypoxia; autophagy; neuroprotection

神经细胞死亡主要有 3 种形式:坏死、凋亡、自噬。近年来,学术界对细胞自噬的研究热度颇高。自噬是对细胞内大分子物质及细胞器降解的过程。自噬对细胞在应激情况下的存活、程序性细胞死亡以及细胞内病原体的清除有重要作用。研究资料表明,自噬在神经系统疾病中对疾病病理生理有着密切相关。目前,大多数研究证实自噬具有神经保护作用,而自噬功能的异常则可导致多种脑血管疾病的发生或发展。如 ZHANG 等^[1]研究发现自噬功能的激活对神经细胞缺血缺氧具有保护作用。靳晓飞等^[2]在研究中发现缺氧缺糖/复氧复糖可以诱导神经细胞发生自噬,而细胞自噬可以抑制细胞凋亡,发挥神经保护作用。SHENG 等^[3]研究发现,自噬参与了缺血预处理所介导的神经保护作用。亦有研究资料表明:自噬参与清除阿尔茨海默症(AD)中 $\alpha\beta$ 沉积斑和异常 tau 蛋白聚合物,而自噬缺陷或不足是造成 AD 等疾病的重要原因^[4]。

中药山莨菪为茄科植物唐古特山莨菪 *Anisodus tanguticus* 的根。其别名有七厘散,唐古特东莨菪、藏茄、樟柳桤、唐传那保、樟柳参等,《全国中草药汇编》,《云南中草药》,《云南中药资源名录》等对其均有记载。具有镇痛解痉,活血去瘀,止血生肌之功效。樟柳碱是从茄科植物唐古特山莨菪根中所分离得到的莨菪烷类生物碱,研究资料显示,莨菪烷类生物碱如山莨菪碱,东莨菪碱,阿托品等均可通过对抗神经细胞坏死与凋亡等途径保护脑缺血缺氧损伤。如报道显示腹腔注射山莨菪碱、东莨菪碱、阿托品能降低急性前脑缺血再灌注大鼠表现出降低异常增高的脑钙离子含量,减轻缺血性损伤的病理改变^[5],腹腔注射山莨菪碱可增加大鼠脑缺血再灌注后热休克蛋白 70 的表达,减少神经元凋亡,促进神经元的存活^[6]。早期也有报道显示,樟柳碱对脑缺血再灌注损伤大鼠具有保护作用,表现在能减轻脑组织水肿,降低异常升高的前脑钙离子含量^[7]。岳天立

等^[8]研究结果指出,大鼠静脉注射樟柳碱 30 min 后,药物在纹状体、大脑皮层及海马有较高分布,表明樟柳碱容易透过血脑屏障。新近的研究资料显示,樟柳碱因具有较好的溶解性,与常见的其他莨菪烷类生物碱相比,在血液中显示出较高生物利用度^[9]。上述资料表明,樟柳碱或许在治疗脑血管疾病方面有其独到的优势。

但目前,莨菪烷类生物碱对神经细胞自噬功能的影响尚未见报道,本研究拟选择具有较好生物利用度和血脑屏障通透性的莨菪烷类生物碱的代表品种氢溴酸樟柳碱(樟柳碱的氢溴酸盐),采用研究神经系统疾病的常用工具细胞大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(rats pheochromocytoma cells,PC12),采用氯化钴(CoCl_2)诱导 PC12 细胞构建缺氧损伤模型,拟从细胞形态,细胞存活率,细胞超微结构,自噬相关蛋白的表达等多方面考察自噬在神经细胞缺氧损伤中的作用以及氢溴酸樟柳碱的干预作用。

1 材料

1.1 细胞 PC12 细胞购于江苏凯基生物细胞库,批号 KG063。

1.2 药品与试剂 氢溴酸樟柳碱(成都第一药业有限公司,纯度为 99%,批号 140903);丁苯酞(*n*-butylphthalide,NBP)氯化钠注射液(石药集团恩必普药业有限公司,批号 618160320);DMEM 高糖培养基(Gibco 公司,批号 1812193);小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 20150511); CoCl_2 , protease inhibitor cocktail,单丹磺酰尸胺(MDC)(美国 Sigma 公司,批号分别为 BCBP8148V,095M4022V,BCBM3760V);二甲基亚砜(DMSO,分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号 20151216);蛋白定量测试盒(南京建成生物技术有限公司,批号 20160407);RIPA 裂解缓冲液(Biosharp 公司,批号 NO66057015);PMSF(蛋白酶抑制剂,武汉博士德生物技术有限公司,批号 21MA12);Anti-LC3B 兔

多克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号 GR252926-7); Anti-Beclin-1 (Cell Signaling 公司,批号 lot2); 辣根标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 109525); 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 14MA18)。

1.3 仪器 EPED-E2-30TJ 型实验室级超纯水器(南京易普达科技发展有限公司); 1384 型超净工作台, 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DM3000B 型荧光显微镜(德国 Leica 公司); H-600IV 型透射电镜(日立高新技术公司); GS-900 校准型光密度计, Mini Trans-Blot 型转膜系统, Fluorchem E 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司); Mini P-4 型垂直电泳仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 细胞培养, 造模及给药 PC12 细胞培养采用含 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C 5% CO₂ 条件下培养, 选取对数生长期细胞进行实验。设空白组, 模型组, 阳性药组(丁基苯酞 130 μmol·L⁻¹), 氢溴酸樟柳碱高、中、低浓度组(100, 50, 25 μmol·L⁻¹)。造模方法参考文献资料^[10], 采用 500 μmol·L⁻¹ 无血清 DMEM 配置的 CoCl₂, 作用细胞 24 h, 除空白组给与 DMEM 培养基外, 其余各组在给予 500 μmol·L⁻¹ CoCl₂ 造模 DMEM 培养液的同时分别向培养液中加入终浓度 130 μmol·L⁻¹ 的丁基苯酞, 100, 50, 25 μmol·L⁻¹ 的氢溴酸樟柳碱, 共培养 24 h。

2.2 细胞形态观察 细胞干预完成后, 在倒置显微镜下观察细胞生长状态并拍照。

2.3 细胞存活率的检测 取对数生长期的 PC12 细胞, 按照以每孔 1 × 10⁴ 个/mL 的活细胞悬液 100 μL/孔接种于 96 孔培养板中。在 37 °C 5% CO₂ 条件下常规培养过夜后, 按设定的分组要求进行分组处理, 每孔 6 个复孔。细胞干预完成后, 分别加入 5 g·L⁻¹ 的噻唑蓝(MTT) 20 μL 继续孵育 4 h, 吸去培养基, 加入 DMSO 150 μL, 酶标仪 570 nm 波长检测吸光度 A, 计算细胞生长抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{处理组 } A}{\text{空白组 } A} \times 100\%$$

2.4 MDC 荧光染色检测自噬小体 PC12 细胞干预结束后, 每孔加入 PBS 稀释的 MDC 储备液 50 μL(终浓度为 0.05 mol·L⁻¹); 37 °C 孵育 30 min, 弃去 MDC 工作液, PBS 清洗细胞 3 次; 荧光显微镜

观察, 激发滤光片波长为 338 nm, 阻断滤光片波长为 515 nm, 绿色荧光小点即为自噬小体。

2.5 透射电镜观察自噬小体 PC12 细胞干预完成后, PBS 洗涤、离心、收集细胞, 采用 3% 戊二醛固定细胞, 4 °C 过夜; 用 PBS 漂洗; 然后用 1% 锇酸固定液 4 °C 再固定, 再用 PBS 漂洗; 丙酮逐级脱水, Epon812 包埋, 半薄切片光学定位, 超薄切片, 用 3% 醋酸铀及枸橼酸铅双重染色, 透射电镜观察、照相。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白的表达 PC12 细胞完成干预后, 用无菌预冷的 PBS 溶液清洗, RIPA 裂解液冰上裂解, 离心, 收集上清液, 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取蛋白样品 30 μg 行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 然后电转至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭后, 将 PVDF 膜放于稀释好的一抗微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3) II 及 Beclin-1 (1:1 000) 中孵育, 4 °C 过夜, TBST 洗膜 3 次后, 将膜放入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 中 37 °C 孵育 1 h 后, TBST 清洗, 使用电化学发光(ECL)显影液对 PVDF 膜进行显色发光处理, 利用 Bio-Rad 图像分析系统对蛋白条带成像, 使用 Image-Lab 软件进行相关条带灰度值的分析。

2.7 统计学处理 数据分析在 SPSS 17.0 软件包中处理, 正态计量指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 氢溴酸樟柳碱对 PC12 细胞细胞形态的影响 空白组细胞胞体呈梭形, 胞体饱满周围有晕光, 细胞密度较大, 突起较长, 互相交织, 呈簇状生长; 模型组细胞形态不规则, 大部分细胞损伤呈圆形, 胞体略小, 突起缩回, 可见死亡细胞漂浮于液面, 大量细胞聚集成团; 各组治疗药物处理后受损细胞数量减少, 细胞形态恢复较好。见图 1。

3.2 氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞存活率的影响 CoCl₂ 造模后细胞存活率显著降低, 与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$); 与模型组比较, 氢溴酸樟柳碱高、中浓度组均能显著提高细胞存活率($P < 0.05$), 氢溴酸樟柳碱低浓度组表现出升高细胞存活率的趋势, 但无统计学意义。见表 1。

3.3 MDC 荧光染色观察氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞自噬小体的影响 空白组可见少量荧光斑点, 荧光强度较弱; 与空白组比较, 模型组荧光斑点有所增多且荧光强度增强; 与模型组相比, 各给药组荧光斑点增多, 且荧光强度明显增强。见图 2。

3.4 氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞超微结

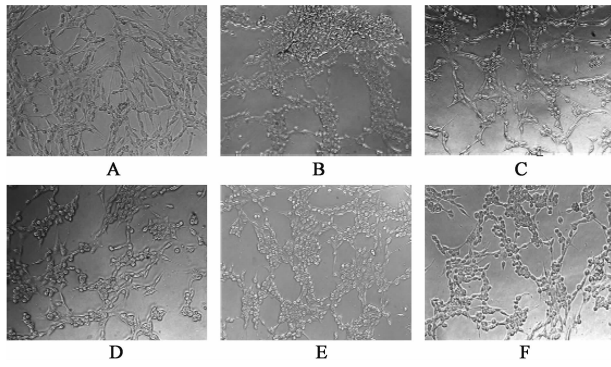


图 1 氢溴酸樟柳碱对 PC12 细胞细胞形态的影响 (光镜, ×200)

Fig. 1 Effect of anisidine hydromide on morphology of PC12 cells induced by hypoxia (optical microscope, ×200)

表 1 氢溴酸樟柳碱对 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of anisidine hydromide on relative viability of PC12 cells induced by hypoxia ($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	相对存活率
空白	-	100 ± 0
模型	-	65.77 ± 11.35 ¹⁾
丁基苯酚	130	84.91 ± 20.04 ²⁾
氢溴酸樟柳碱	100	84.87 ± 19.95 ²⁾
	50	85.17 ± 11.74 ²⁾
	25	79.55 ± 10.14

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

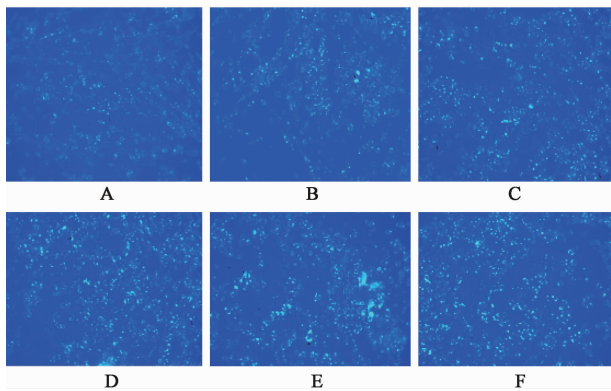


图 2 氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞自噬小体的影响 (MDC, ×200)

Fig. 2 Effect of anisidine hydromide on autophagy of PC12 cell induced by hypoxia (MDC, ×200)

构变化的影响 在空白组中偶见自噬体,核内染色质分布均匀,核膜清晰,细胞胞浆中细胞器结构清晰;与空白组比较,模型组中自噬体增多,出现细胞核固缩,染色质聚集,细胞体积减小;各组药物治疗后自噬体增多,细胞超微结构较模型组有所改善。见图 3。

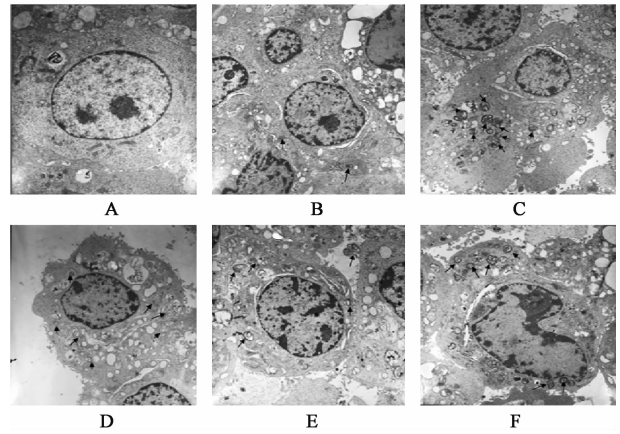


图 3 氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞超微结构变化的影响 (透射电镜, ×5 000)

Fig. 3 Effect of anisidine hydromide on ultrastructure of PC12 cells induced by hypoxia (transmission electron microscope, ×5 000)

3.5 氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞自噬相关蛋白的影响 空白组细胞 Beclin-1 及 LC3 II 均只有少量表达,与空白组比较,模型组 Beclin-1 及 LC3 II 蛋白的表达均显著升高 ($P < 0.01$),由此可见缺氧应激激活细胞自噬。与模型组比较,氢溴酸樟柳碱中低浓度组均能显著提高 Beclin-1 的表达 ($P < 0.01$),氢溴酸樟柳碱各浓度组显著提高 LC3 II 的表达 ($P < 0.01$)。各组 PC12 细胞自噬相关蛋白的表达见表 2,图 4。

表 2 氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞自噬相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of anisidine hydromide on expression of Beclin-1 and LC3 II ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Beclin-1 /GAPDH	LC3 II /GAPDH
空白	-	0.390 ± 0.057	1.428 ± 0.042
模型	-	2.193 ± 0.122 ¹⁾	2.200 ± 0.054 ¹⁾
丁基苯酚	130	2.355 ± 0.242	2.433 ± 0.051 ²⁾
氢溴酸樟柳碱	100	2.755 ± 0.530	3.751 ± 0.058 ²⁾
	50	4.933 ± 0.741 ²⁾	3.226 ± 0.044 ²⁾
	25	3.985 ± 0.893 ²⁾	2.907 ± 0.025 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

自噬产生于应激状态下,饥饿、氧化、压力等因素均可诱导其产生^[11],近年来有研究报道显示,自噬已经成为缺氧条件下机体的重要调节机制^[12]。而自噬功能的异常可导致多种脑血管疾病的发生或发展^[13]。尽管在脑血管疾病中,自噬的角色尚存争议,但大部分离体,整体以及临床试验均显示适度自

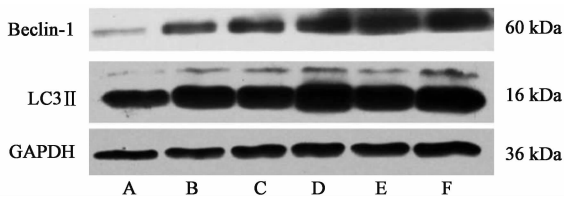


图 4 氢溴酸樟柳碱对 Beclin-1 及 LC3-II 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of anisidine hydromide on protein expression of Beclin-1 and LC3 II of PC12 cells induced by hypoxia

噬对缺氧缺血性脑病具有积极的保护作用。胡中慧等^[14]通过研究细胞内自噬发生与缺氧时间的关系,发现在缺氧早期(缺氧 12 ~ 24 h)细胞内自噬泡增多,自噬现象明显,自噬相关蛋白 LC3 II, Beclin-1 等表达增加,细胞存活率也明显增加。汪文英^[15]通过研究低氧损伤下 PC12 细胞自噬与凋亡的关系研究发现,低氧损伤下,自噬发挥细胞保护作用,这种保护作用可能与抑制凋亡有关。HU 等^[16]报道显示,自噬对慢性脑缺血大鼠具有保护作用,其促生存作用与 Akt/CREB 信号通路有关。Carlioni 等^[17]研究发现大鼠脑缺血缺氧后脑组织中自噬相关基因 Beclin-1 表达上调,其在缺血缺氧 24 h 达到高峰,应用自噬激活剂后 Beclin-1 表达上调,死亡的神经元数量明显减少,而给予自噬抑制剂后,Beclin-1 表达下降,死亡神经元数量增多。表明,自噬参与缺糖缺氧后神经保护作用。ZHANG 等^[18]则证明脑外伤后激活了细胞自噬的发生,且能够维持长达 32 d,而自噬在脑损伤后早期主要参与保护周围神经细胞免于凋亡和退行性变,并在后期神经细胞损伤与修复过程中发挥生物学作用。

本研究中,CoCl₂ 作为一种化学性低氧模拟剂,当 Co²⁺ 作用于细胞后,可通过多种途径诱发细胞缺氧,模拟缺氧状态。由于其使用方便、理化性质稳定而成为诱导神经元慢性缺氧损伤的首选药物。PC12 细胞是公认的对氧敏感的细胞,在神经系统疾病及对环境氧含量的变化的信号传导机制方面广泛应用^[19]。而缺氧又是大多数疾病的根源,神经元对缺氧尤为敏感,故神经元缺氧模型广泛应用于筛选脑血管疾病的药物及作用机制研究。

而在目前自噬的研究方法中,应用透射电子显微镜观察自噬小体的变化是检测自噬最为公认的最经典、最直接的方法,被认为是检测自噬的金标准。本研究采用透射电镜技术直观的观察经樟柳碱干预后,PC12 细胞自噬小体显著增多,表明氢溴酸樟柳碱能促进缺氧条件下 PC12 细胞自噬的发生。

Beclin-1 是酵母自噬相关基因 Atg6/Vps30 的

哺乳动物同源基因,是激活自噬的上游信号分子,游离的 Beclin-1 能与多种蛋白质共同形成 III 型 PI3K 复合体,参与自噬体形成的初始步骤,因此,常以 Beclin-1 的表达来衡量自噬的发生^[20-21]。LC3 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8 (Aut7/Apg8) 基因的同源物,参与自噬体的形成。其有 I 型和 II 型之分,未发生自噬时,细胞内合成的 LC3 经过加工,成为胞质可溶性的 LC3 I,常规表达。当自体吞噬发生时,LC3 I 会被包括 Atg7 和 Atg3 在内的泛素样体系所修饰和加工形成 LC3 II。LC3 II 结合并始终位于胞内自噬体的膜上,普遍认为 LC3 II 的含量和发生自噬的程度成正比。因此,LC3 II 被认为是研究自噬活性较为可靠的生物学标志物^[22]。本研究中采用 Western blot 技术检测自噬相关蛋白的结果表明氢溴酸樟柳碱干预后,与模型细胞相比,与自噬发生相关的 Beclin-1 蛋白,和与自噬程度紧密相关的标识蛋白 LC3 II 含量均显著提升,进一步确证了氢溴酸樟柳碱促进了缺氧 PC12 细胞模型自噬的表达。再结合 MDC 染色观察结果:氢溴酸樟柳碱干预组荧光颗粒物质明显增多,荧光强度增强。以及细胞存活率和细胞形态结果:给予氢溴酸樟柳碱干预的细胞存活率显著提升,细胞形态较模型组损伤程度减轻。因此,笔者推测,自噬参与了氢溴酸樟柳碱对缺氧损伤 PC12 细胞的保护作用。而笔者的研究结果也再次验证自噬对缺氧损伤 PC12 细胞具有保护作用,该结论与文献报道吻合^[14]。

[参考文献]

- [1] ZHANG Q C, BIAN H M, GUO L W, et al. Pharmacologic preconditioning with berberine attenuating ischemia-induced apoptosis and promoting autophagy in neuron[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 1197-1207.
- [2] 靳晓飞, 张颖, 李爱英. 缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞自噬的形态学变化与细胞凋亡的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(12): 2157-2162.
- [3] SHENG R, ZHANG L S, HAN R, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning[J]. Autophagy, 2010, 6(4): 482-494.
- [4] 章梦琦, 滕燕, 王文, 等. 自噬在阿尔茨海默病中的作用及中药的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 355-359.
- [5] 彭新琦, 可君. 三种萜萜类药物在大鼠急性前脑缺血及再灌注损伤中的作用[J]. 中国药理学报, 1992, 13(4): 357-358.
- [6] 蒋崇慧, 杨光田, 汤彦. 山萜萜碱在大鼠脑缺血再灌

- 注时对神经元凋亡的影响[J]. 中国急救医学, 2001, 21(3):131-133.
- [7] XU W, DENG Y F. Effect of anisodine on acute forebrain ischemia-reperfusion damage in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 1996, 17(2):161-163.
- [8] 岳天立, 王桂芬, 宋振玉. ^3H -东莨菪碱和 ^3H -樟柳碱代谢的比较[J]. 药学学报, 1979, 14(4):208-217.
- [9] TIAN F J, LI C Y, WANG X. et al. Comparative study on pharmacokinetics of a series of anticholinergics, atropine, anisodamine, anisodine, scopolamine and tiotropium in rats[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2014, 40(3):245-253.
- [10] 曾季平, 王立祥, 胡晓燕, 等. 氯化钴对PC12细胞的凋亡作用[J]. 卫生毒理学杂志, 2005, 19(2):105-107.
- [11] TIAN F, Deguchi K, Yamashita T, et al. *In vivo* imaging of autophagy in a mouse stroke model[J]. Autophagy, 2010, 6(8):1107-1114.
- [12] Giordano S, Darley-Usmar V, ZHANG J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease[J]. Redox Biol, 2014, 2(1):82-90.
- [13] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice[J]. Nature, 2006, 441(7095):880-884.
- [14] 胡中慧, 马慧萍, 樊鹏程, 等. PC12细胞在缺氧条件下的自噬现象[J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(1):65-68.
- [15] 汪文英. 低氧损伤下PC12细胞自噬与凋亡的关系研究[D]. 上海:上海交通大学, 2015.
- [16] HU M, LIU Z, LV P, et al. Akt/CREB signalling play an important role in the neuroprotective effect of nimodipine in a rat model of vascular dementia[J]. Behav Brain Res, 2017, 325(Pt A):79-86.
- [17] Carloni S, Buonocore G, Balduino W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury[J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3):329-339.
- [18] ZHANG Y B, LI S X, CHEN X P, et al. Autophagy is activated and might protect neurons from degeneration after traumatic brain injury[J]. Neurosci Bull, 2008, 24(3):143-149.
- [19] Charlier N, Leclere N, Felderhoff U, et al. Hypoxia-induced cell death and changes in hypoxia-inducible factor-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 104(1):21-30.
- [20] Gabryel B, Kost A, Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia is a potential target for neuroprotective strategies[J]. Pharmacol Rep, 2012, 64(1):1-15.
- [21] Tassa A, Roux M P, Attaix D, et al. Class III phosphoinositide3-kinase-Beclin-1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes[J]. Biochem J, 2003, 376(Pt 3):577-586.
- [22] Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, et al. Overview of macro-autophagy regulation in mammalian cells[J]. Cell Res, 2010, 20(7):748-762.

[责任编辑 邹晓翠]