

银杏内酯B对肌萎缩侧索硬化细胞模型的保护作用及其机制

廖群¹, 杨碧莹², 杜宝新^{2*}, 侯晓妹²

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006;

2. 广东省中医院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨银杏内酯B(ginkgolide B,GB)对肌萎缩侧索硬化细胞模型c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路及细胞凋亡的影响。方法:通过含过表达人突变超氧化物歧化酶1(SOD1)^{G93A}基因(hSOD1^{G93A})和过表达人野生SOD^{WT}基因(hSOD1^{WT})与空质粒的慢病毒感染NSC34细胞,经一定浓度的嘌呤霉素筛选,倒置荧光显微镜下观察慢病毒的转染效率和细胞形态的变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检验感染细胞是否过表达SOD1蛋白,建立hSOD1^{G93A}NSC34细胞系后给予GB,细胞培养分组为正常组、模型组、不同浓度GB组(25,50,75,100 mg·L⁻¹)组,48 h后噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞存活率,筛选出最佳药物浓度,后续实验分组为以正常组,模型组,75 mg·L⁻¹ GB组,SP600125组,75 mg·L⁻¹ GB+SP600125组,流式细胞术检测各组细胞的凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化(p-)JNK,c-Jun,p-c-Jun,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白的表达。结果:与正常的NSC34细胞比较,hSOD1^{G93A} NSC34组细胞胞体变圆,突触减少、变短,而hSOD1^{WT} NSC34组细胞和空质粒组细胞形态学未发生明显变化,与正常组比较,hSOD1^{G93A} NSC34组,hSOD1^{WT} NSC34组细胞内SOD1蛋白水平显著升高($P<0.01$),肌萎缩侧索硬化(ALS)细胞模型成功建立。与正常组比较,模型组细胞存活率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,给予不同浓度GB后,细胞存活率均显著升高($P<0.01$),药物质量浓度为75 mg·L⁻¹时细胞存活率显著升高($P<0.01$)。后续实验,与正常组比较,模型组凋亡率,p-JNK,p-c-Jun,cleaved Caspase-3蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,75 mg·L⁻¹ GB组,SP600125组,75 mg·L⁻¹ GB+SP600125组凋亡率,p-JNK,p-c-Jun,cleaved Caspase-3蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:GB对肌萎缩侧索硬化细胞模型具有抑制细胞凋亡的保护作用,这种保护作用可能是通过JNK信号通路实现的。

[关键词] 超氧化物歧化酶1(hSOD1)^{G93A};肌萎缩侧索硬化;银杏内酯B;凋亡;c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0033-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201407

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200507.0836.001.html>

[网络出版日期] 2020-5-7 12:09

Protective Effect and Mechanism of Ginkgolide B on Amyotrophic Lateral Sclerosis Cell Model

LIAO Qun¹, YANG Bi-ying², DU Bao-xin^{2*}, HOU Xiao-mei²

(1. Second Clinical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ginkgolide B (GB) on the activation of c-Jun aminoterminal kinase (JNK) signaling pathway and apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis cell model. **Method:** NSC34 cells were infected by slow virus containing expression superoxide dismutase1 (SOD1)^{WT} and hSOD1^{G93A} and empty plasmid, and screened with a certain concentration of puromycin, so as to observe the transfection efficiency of slow virus and cell morphology under inverted fluorescence microscope. Western blot

[收稿日期] 20191113(024)

[基金项目] 广东省医学科学技术研究基金项目(A2019114);广东省中医药局科研项目(20203002)

[第一作者] 廖群,在读硕士,从事中西医结合诊治神经系统疾病研究,Tel:020-39318490,E-mail:578963983@qq.com

[通信作者] *杜宝新,硕士,主任医师,从事肌萎缩侧索硬化症基础与临床研究,Tel:020-39318491,E-mail:dbx.dr@163.com

method was used to verify whether infected cells were over-expressing SOD1 target proteins. The hSOD1^{G93A}-NSC34 cell lines were established and given GB. Cell cultures were divided into normal group, model group and different concentrations of ginkgolide B groups (25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹). After 48 h, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to detect cell survival rates, and select the best drug concentration. Subsequent experimental groups were divided into normal group, model group, 75 mg·L⁻¹ GB group, SP600125 group, and 75 mg·L⁻¹ GB + SP600125 group. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of each group of cells. Western blot was used to detect the expressions of phosphorylation (p)-JNK, c-Jun, p-c-Jun, and cysteine aspartic acid protease -3 (Caspase-3) proteins. **Result:** Compared with normal NSC34 cells, hSOD1^{G93A}-NSC34 cell body became round, the synapses decreased and shortened, but the cell morphology of hSOD1^{WT}-NSC34 cell and empty plasmid group did not change significantly. Western blot showed that hSOD1^{G93A}-NSC34, hSOD1^{WT}-NSC34 intracellular SOD1 protein levels increased significantly ($P < 0.01$), and the amyotrophic lateral sclerosis cell model was established. Compared with the normal group, the cell activity in the model group was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the cell activity increased at different concentrations of GB, especially when the drug concentration was 75 mg·L⁻¹ ($P < 0.01$). In subsequent experiments, compared with the normal group, the apoptosis, and expressions of p-JNK, p-c-Jun, and cleaved Caspase-3 proteins in the model group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the apoptosis and p-JNK, p-c-Jun, released Caspase-3 protein expressions of 75 mg·L⁻¹ GB group, SP600125 group, 75 mg·L⁻¹ GB + SP600125 group decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** GB has a protective effect on the cell model of atrophy lateral sclerosis, which may be realized by JNK signal pathway.

[Key words] hSOD1^{G93A}; amyotrophic lateral sclerosis; ginkgolide B; apoptosis; c-Jun amino-terminal kinase (JNK) signal pathway

肌萎缩性侧索硬化(ALS)是一种神经退行性疾病,其特征在于运动神经元进行性死亡导致致命性瘫痪。目前ALS的具体病因尚不明确,存在比较多的假说如遗传机制、兴奋性谷氨酸毒性、加速细胞凋亡、氧化应激等^[1-2]。研究发现ALS患者的脑脊液中炎性细胞因子白细胞介素-18(IL-18)水平增加,而IL-18是由血小板活化因子(PAF)(一种主要的神经炎症介质)刺激的树突细胞产生的,与此同时最新研究发现在ALS转基因超氧化物歧化酶1(SOD1)-G93A小鼠的脊髓中PAF受体(PAFR)过表达,这表明PAF参与ALS^[3-4]。银杏内酯B是银杏叶的主要萜内酯成分,是血小板活化因子(PAF)受体具有高度选择性的和竞争性抑制剂。在脑缺血、脑出血、缺血缺氧、帕金森病模型及体外培养的神经元发挥神经保护效应,主要通过抗炎、抗凋亡、能量代谢、星形胶质细胞保护、抗兴奋性毒性及免疫调节等机制,产生神经保护作用^[5-6]。本研究探讨银杏内酯B对表达hSOD1^{G93A}基因的NSC34细胞的保护作用及其机制,为银杏内酯B治疗ALS细胞模型提供实验依据,同时为寻求中药治疗肌萎缩侧索硬化提供前期研究基础。

1 材料

1.1 细胞 NSC34鼠神经元细胞购自北京中科质检生物技术有限公司(批号HT2018020501)。

1.2 试剂 银杏内酯B(上海诗丹德标准技术服务有限公司,纯度≥98%,批号5909)(用DMSO溶解,浓度控制在千分之一);胎牛血清(美国Gibco公司,批号SH30074.03);噻唑蓝(MTT),嘌呤霉素(美国Mpbio公司,批号分别为QR14912,815M418);超氧化物歧化酶-1(SOD-1)小鼠源多克隆抗体(美国Santa公司,批号J1118);磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK),c-Jun,p-c-Jun兔源多克隆抗体(美国Affinity公司,批号分别为84b6974,67k0674,37j3230);辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(武汉博士德生物工程有限公司,批号BST13J7B50);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国CST公司,批号51332S);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号C1602)。

1.3 仪器 SZ61型奥林巴斯光学显微镜(日本Olympus公司);5804R型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Victor X5型多功能酶标仪(美国Perkin Elme公司);FC500型流式细胞仪(美国

Beckman公司); Mini PROTEAN Tetra型电泳仪, Mini Trans-Blot型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 NSC34鼠神经元细胞,用(DMEM高糖培养液+10%FBS+5%青链霉素)培养基培养细胞,放置于37℃ 5% CO₂的培养箱中。每隔2~3 d换代。

2.2 慢病毒载体转染 细胞传代至3次以上,取对数生长的细胞,胰酶消化离心后取 8×10^4 个细胞接种于6孔板,放置于37℃ 5% CO₂培养箱第2天转染。更换新的完全培养液,每孔分别加入hSOD1^{WT}和hSOD1^{G93A}和空质粒的慢病毒16 μL,感染16 h,吸出含病毒颗粒培养液,更换新鲜培养液(不含双抗),96 h后于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况。

2.3 筛选稳定株 于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达后,用质量浓度为2 mg·L⁻¹嘌呤霉素进行筛选,每1 d更换含2 mg·L⁻¹嘌呤霉素的新鲜培养液(DMEM+10%FBS不含青链霉素),筛选2~3周。

2.4 MTT比色法检测细胞存活率,筛选GB最佳药物浓度 以每孔5 000个细胞加入96孔板,每孔100 μL,重复5个复孔,分组为正常组、模型组、不同浓度银杏内酯B组(25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹),药物干预48 h后,每孔加入MTT 20 μL继续孵育4 h后取出,吸出含MTT培养基,每孔加入DMSO 150 μL,放置于摇床上震荡10 min,于570 nm酶标仪处测定吸光度A,计算出细胞存活率。细胞存活率= $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{阴性组}}) \times 100\%$ 。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数生长细胞,以密度为 2×10^5 个/孔接种于6孔板,药物干预48 h后,消化离心取 1×10^5 个细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,依次加入Annexin V-FITC结合液195 μL,Annexin V-FITC 5 μL和PI 10 μL,室温避光孵育20 min,用FC500流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白 各组细胞相关干预和处理后,充分裂解,BCA法测蛋白浓度后加入蛋白裂解液将每组蛋白浓度调整为等质量等体积等浓度,加入1/5 loading buffer,100℃ 5 min蛋白变性,每孔10 μL等量上样,聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳,转膜,将PVDF膜放入封闭液室温下封闭1 h,加入相对应的一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,次日加入二抗(1:3 000)孵育1 h,TBST洗膜后,加入适量ECL显影液上机显色拍照,Image Lab计算相关蛋白表达。

2.7 统计学处理 采用SPSS 23.0软件对数据进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据符合方差齐性要求,各组间差异采用单因素方差分析LSD检验,若方差不齐,采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 慢病毒感染NSC34细胞筛选和细胞形态学变化 感染后细胞均有绿色荧光表达;与正常NSC34细胞组比较,感染空质粒,hSOD1^{WT}组细胞形态学上未见明显变化,感染hSOD1^{G93A}组细胞胞体变圆,突触减少,且突触变短。见图1。



A.NSC34组;B.空质粒组;C.hSOD1^{WT}组;D.hSOD1^{G93A}组(图2同)

图1 感染后各组细胞的荧光表达和细胞形态(免疫荧光,×40)

Fig. 1 Fluorescence expression and cell morphology of infected cells in each group(IF,×40)

3.2 细胞感染后各组SOD1蛋白的表达影响 与正常NSC34组比较,空质粒组细胞内SOD1蛋白水

平未见明显差异;与空质粒组比较,hSOD1^{WT},hSOD1组细胞内SOD1蛋白水平显著升高($P <$

0.01), ALS细胞模型建立成功。见图2,表1。

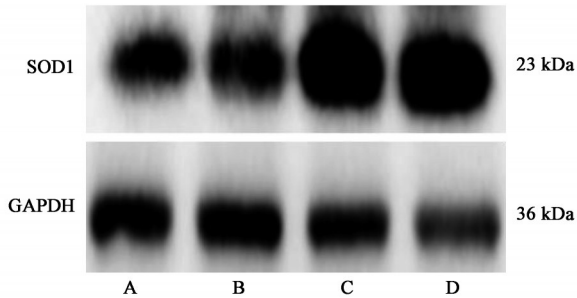


图2 细胞感染后SOD1蛋白的表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of SOD1 protein expression after infection cells

表1 细胞感染后各组SOD-1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of SOD1 protein expression in each group after infection cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	感染剂量/ μL	SOD1
NSC34	-	1.00
空质粒	16	0.74 \pm 0.17
hSOD1 ^{WT}	16	1.99 \pm 0.23 ^{1,2)}
hSOD1 ^{G93A}	16	2.03 \pm 0.38 ^{1,2)}

注:与NSC34组比较¹⁾ $P<0.01$;与空质粒组比较²⁾ $P<0.01$ 。

3.3 银杏内酯B对ALS细胞模型存活率的影响与正常组比较,模型组细胞存活率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,给予不同浓度银杏内酯B后,细胞活力增加,药物浓度为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞存活率显著增加($P<0.01$)。表明银杏内酯B药物质量浓度为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可显著增加肌萎缩侧索硬化细胞模型的存活率。见表2。

3.4 银杏内酯B对ALS细胞模型凋亡率的影响与正常组比较,模型组凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组比较, $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 银杏内酯B组,SP600125组, $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 银杏内酯B+SP600125组均能使细胞凋亡率显著降低($P<0.01$),且 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 银杏内酯B+SP600125组的细胞凋亡率显著低于 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 银杏内酯B组细胞凋亡率($P<0.01$),提示了银杏内酯

表2 银杏内酯B对ALS细胞模型存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 2 Effect of ginkgolide B on viability of ALS model cell($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
正常	-	100.00
模型	-	66.78 \pm 2.73 ¹⁾
银杏内酯B	25	65.51 \pm 3.20
	50	75.67 \pm 4.03 ²⁾
	75	83.04 \pm 4.10 ²⁾
	100	79.97 \pm 3.59 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表3同)。

B的药理作用可能是通过JNK信号通路介导的。见表3。

表3 银杏内酯B对ALS细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of ginkgolide B on apoptosis in ALS cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
正常	-	3.13 \pm 0.85
模型	-	37.83 \pm 1.97 ¹⁾
银杏内酯B	75	19.77 \pm 1.76 ²⁾
SP600125	-	13.33 \pm 0.32 ²⁾
银杏内酯B+SP600125	75	11.47 \pm 0.42 ²⁾

3.5 银杏内酯B对ALS细胞模型p-JNK, c-Jun, p-c-Jun, Caspase-3蛋白表达的影响与正常组比较,模型组p-JNK, Caspase-3蛋白表达, p-c-Jun/c-Jun蛋白显著升高($P<0.01$);与模型组比较,银杏内酯B组, SP600125组,银杏内酯B+SP600125组p-JNK, Caspase-3, p-c-Jun/c-Jun蛋白明显降低($P<0.05, P<0.01$),与银杏内酯B+SP600125组比较,银杏内酯B组p-JNK, Caspase-3, p-c-Jun/c-Jun蛋白表达较高($P<0.05$)。见表4,图3。

4 讨论

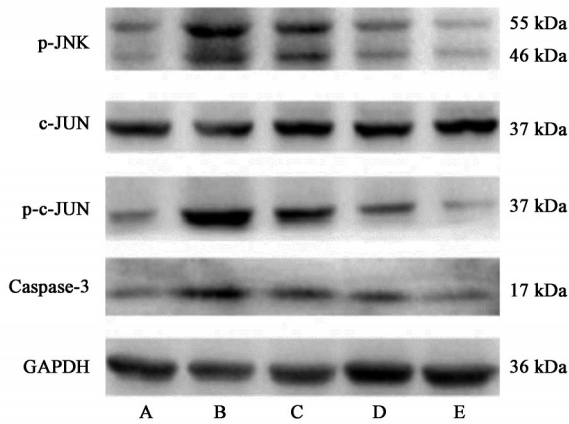
ALS,也称为Lou Gehrig's病,是一种进行性神经退行性疾病,其特征在于运动神经元的选择性丧失,导致肌肉萎缩,瘫痪,并最终导致死亡。多数

表4 银杏内酯B对ALS细胞模型p-JNK, c-Jun/p-c-Jun, Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of ginkgolide B on p-JNK, c-Jun/p-c-Jun, Caspase-3 protein expression of ALS cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	p-JNK/GAPDH	p-c-Jun/c-Jun	Caspase-3/GAPDH
正常	-	0.61 \pm 0.17	0.39 \pm 0.11	0.33 \pm 0.06
模型	-	1.70 \pm 0.11 ¹⁾	1.02 \pm 0.23 ¹⁾	0.64 \pm 0.09 ¹⁾
银杏内酯B	75	1.24 \pm 0.27 ^{2,4)}	0.62 \pm 0.19 ^{2,4)}	0.41 \pm 0.05 ^{2,4)}
SP600125	-	0.77 \pm 0.32 ³⁾	0.47 \pm 0.28 ³⁾	0.39 \pm 0.15 ³⁾
银杏内酯B+SP600125	75	0.42 \pm 0.08 ³⁾	0.25 \pm 0.11 ³⁾	0.23 \pm 0.02 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与银杏内酯B+SP600125组比较⁴⁾ $P<0.05$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. 银杏内酯 B; D. SP600125 组; E. 银杏内酯 B+SP600125 组

图3 各组细胞 p-JNK, c-Jun/p-c-Jun, Caspase-3 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of p-JNK, c-Jun/p-c-Jun, Caspase-3 protein expression in each group

ALS 病例为偶发性, 神经元死亡是由于神经炎症, 细胞凋亡, 线粒体或蛋白酶体功能障碍或谷氨酸兴奋性中毒引起的, 约有 10% 的 ALS 病例是由于家族突变而遗传的。迄今为止, 还没有药物可以有效地遏制 ALS 进展, 只有 2 种药物已被批准用于治疗, 利鲁唑, 适当提高生存率和生活质量; 依达拉奉, 仅在疾病的早期阶段有一定的疗效^[7-9]。银杏内酯 B, 被认为是自然界中最强的天然血小板活化因子, 有研究表明, 在大鼠研究中银杏内酯 B 以剂量依赖性方式减少神经元细胞凋亡并阻断脑缺血后 p-SAPK/JNK 水平和核转位的增加^[10]; 银杏内酯 B 预处理增加 SH-SY5Y 细胞活力, 减弱细胞内 ROS 积累, 从而减少细胞凋亡, 线粒体功能障碍和 ER 应激^[11]。

本研究是以 hSOD1^{G93A}-NSC34 细胞作为 ALS 的细胞模型, 来探讨银杏内酯 B 对 ALS 细胞模型的保护作用及其机制。实验结果表明, 在给予 75 mg·L⁻¹ 银杏内酯 B 后, hSOD1^{G93A}-NSC34 细胞活力显著增加。

JNK 是细胞内重要的应激调节蛋白, 未激活时主要存在于细胞质, 激活后则迅速表达并发生磷酸化, 环境应激和细胞因子均能导致 JNK 的激活, 激活的 JNK 发生磷酸化, p-JNK 在介导神经细胞死亡中发挥着重要作用^[12-13]。研究表明, SOD1 可调节 JNK 活性, JNK 途径可能在 ALS 的运动神经元中发挥神经保护作用, ALS 中缺乏诱导抗氧化酶, 其中许多可以通过 JNK 途径调节^[14], 这都说明 JNK 信号通路与 ALS 密切相关。本实验结果显示, 在给予银杏内酯 B 和 JNK 抑制剂 SP00125 后, 细胞凋亡率,

p-JNK, p-c-Jun, Caspase-3 蛋白表达明显降低, 且银杏内酯 B+SP600125 的作用高于银杏内酯 B 和 SP600125, 这说明银杏内酯 B 对肌萎缩侧索硬化细胞模型的保护作用可能是通过 JNK 信号通路。

在 ALS 的 SOD1 G93A 小鼠模型中, ER 应激通过同源结构域相互作用蛋白激酶 2 (HIPK2) 的磷酸化导致 JNK 信号的激活, JNK 的激活与 SOD1 聚集和细胞死亡密切相关, 增加 SOD1 聚集导致内质网应激增强的机制, 进而通过激活 JNK 导致细胞死亡^[15]。受损的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路与肌萎缩侧索硬化症密切相关, 细胞应激激活 MAP4K4, 导致磷酸化的 MAP4K4 激活 TAK1/MKK4/MKK7 级联反应, 导致 JNK 的磷酸化, 然后, JNK 磷酸化 c-Jun, 增强下游途径, 导致细胞凋亡^[16]。本实验结果显示模型组的 p-JNK, p-c-Jun, Caspase-3 蛋白表达明显高于正常组, 模型组+银杏内酯 B 可明显减少 p-JNK, p-c-Jun, Caspase-3 的蛋白表达, 这表明银杏内酯 B 可能抑制了 Caspase-3 的表达, 抑制了 JNK, c-Jun 的磷酸化, 从而减少细胞凋亡。

本研究结果表明银杏内酯 B 对肌萎缩侧索硬化细胞模型具有抑制细胞凋亡的保护作用, 这种保护作用可能是通过 JNK 信号通路实现的。

[参考文献]

- [1] RALLI M, LAMBIASE A, ARTICO M, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: autoimmune pathogenic mechanisms, clinical features, and therapeutic perspectives [J]. *Isr Med Assoc J*, 2019, 21 (7): 438-443.
- [2] DORST J, LUDOLPH A C, HUEBERS A. Disease-modifying treatment of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Am J Manag Care*, 2018, 24 (15 Suppl): S327-S335.
- [3] ITALIANI P, CARLESI C, GIUNGATO P, et al. Evaluating the levels of interleukin-1 family cytokines in sporadic amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 94.
- [4] BRIONES M R S, SNYDER A M, FERREIRA R C, et al. A possible role for platelet-activating factor receptor in amyotrophic lateral sclerosis treatment [J]. *Front Neurol*, 2018, doi: 10.3389/fneur.2018.00039.
- [5] LOU C, LU H, MA Z, et al. Ginkgolide B enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cell lines via inhibiting PAFR/NF-small ka, CyrillieB pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 563-572.
- [6] 黄建, 刘之荣. 银杏内酯 B 的神经保护作用及机制研

- 究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41(6):559-562.
- [7] BONIFACINO T, REBOSIO C, PROVENZANO F, et al. Enhanced function and overexpression of metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the spinal cord of the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis during disease progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4552.
- [8] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6):867-882.
- [9] ZHU Y, FOTINOS A, MAO L L, et al. Neuroprotective agents target molecular mechanisms of disease in ALS [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(1):65-75.
- [10] WANG X, JIANG C M, WAN H Y, et al. Neuroprotection against permanent focal cerebral ischemia by ginkgolides A and B is associated with obstruction of the mitochondrial apoptotic pathway via inhibition of c-Jun N-terminal kinase in rats [J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(2):232-242.
- [11] LI L, ZHANG Q G, LAI L Y, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide B on bupivacaine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, doi:10.1155/2013/159864.
- [12] 王晓丽, 崔红霞, 李宏铃, 等. 天麻钩藤饮含药血清对MPP⁺诱导PC12细胞凋亡JNK通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21):141-146.
- [13] 蔡艳, 蒋伟, 周爱玲, 等. 苦参素通过p38/JNK信号途径对海马神经元凋亡的影响[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4):731-738.
- [14] ZHU X, PERRY G, SMITH M A, Amyotrophic lateral sclerosis: a novel hypothesis involving a gained 'loss of function' in the JNK/SAPK pathway [J]. *Redox Rep*, 2003, 8(3):129-133.
- [15] BHINGE A, NAMBOORI S C, ZHANG X, et al. Genetic correction of SOD1 mutant iPSCs reveals ERK and JNK activated AP1 as a driver of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(4):856-869.
- [16] WU C, WATTS M E, RUBIN L L. MAP4K4 activation mediates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(5):1143-1156.

[责任编辑 周冰冰]