

## 血清 miRNA-181a 在帕金森病中神经保护作用及机制分析

孔程程<sup>1</sup>, 杨文平<sup>1</sup>, 华建<sup>1,2</sup>, 刘妍<sup>3</sup>, 丁海霞<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院老年神经科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>无锡锡山人民医院神经内科, 江苏 无锡 214011; <sup>3</sup>南京医科大学药学院干细胞与神经再生研究所, 江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的:探讨 miRNA-181a 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenyl-pyridinium, MPP<sup>+</sup>)诱导的帕金森病(Parkinson's disease, PD)多巴胺能神经元损伤的影响及其相关机制。方法:采用胎龄 12.5 d 的 C57BL/6 小鼠胚胎中脑进行多巴胺能神经元原代培养,依据不同处理方法分为 4 组:①空白对照(Control)组;②PD 模型(MPP<sup>+</sup>)组;③阴性对照(miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>)组;④miRNA-181a+MPP<sup>+</sup>组。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)可以选择性标记多巴胺能神经元,因此采用荧光显微镜对各组 TH 染色阳性神经元数目、初级突触分枝及最长突触长度进行观察,分析各组之间的差异。结果:Control 组多巴胺能神经元细胞体积较大,呈圆形或三角形,胞体发出 1 个、2 个或多个长的分枝以及轴突发出的次级突起,胞体和轴突表面光滑,形态完整,神经元分枝之间相互交织呈网络,联系密切。miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>组经 MPP<sup>+</sup>作用后多巴胺能神经元的数量减少,绝大多数表现为胞体存在,分枝数目及最长突触长度明显减少,网状交织稀少,表面不光滑,有的呈串珠样肿胀或轴突中断、丢失,仅存胞体,少数也表现为胞体空虚、丢失,仅存突起。miRNA-181a+MPP<sup>+</sup>组较 miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>组多巴胺能神经元数目有所增加,胞体形态较好,分枝数目与最长突触长度较 miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>组有所改善,且表面较光滑,神经元死亡程度较低。结论:miRNA-181a 对 MPP<sup>+</sup>所致多巴胺能神经元损伤起到神经保护作用。

**[关键词]** miRNA-181a; 帕金森病; 原代培养; 多巴胺能神经元; 神经保护

**[中图分类号]** R742.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1081-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20170903

## A study of neuroprotective mechanism of serum miRNA-181a in Parkinson's disease

Kong Chengcheng<sup>1</sup>, Yang Wenping<sup>1</sup>, Hua Jian<sup>1,2</sup>, Liu Yan<sup>3</sup>, Ding Haixia<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Geriatric Neurology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Nephrology, the Xishan Hospital, Wuxi 214011; <sup>3</sup>Department of Stem Cell And Neural Regeneration, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the neuroprotective mechanism of serum miRNA-181a on dopaminergic neurons in primary cell model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP<sup>+</sup>). **Methods:** Embryonic mouse mesencephalic primary neurons were cultured *in vitro* and divided into four groups: a blank control group, a MPP<sup>+</sup> group, a miRNA-NC+MPP<sup>+</sup> group, a miRNA-181a+MPP<sup>+</sup> group. Dopaminergic neurons dendrites and axons were identified and counted by using tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining under microscope in each group. **Results:** The dopaminergic (DA) neurons exhibited intact circular or triangular bodies and a variety of dendrites and axons derived from bodies, and had intact morphous and interweaved closely in the control group. The group treated by MPP<sup>+</sup> were specifically found that the number of dopaminergic neurons decreased strikingly, axons and dendrites disappeared completely, and bodies remained. The axons appeared abnormal varicosities, apparent string-of-beads change. The axons and dendrites almost fragmented, only few cell bodies disappeared and exhibited axonal root. In the MPP<sup>+</sup> group, the number of dopaminergic neurons increased, and cell bodies, axons, dendrites and the death of the dopaminergic neurons became improvement. **Conclusion:** The results suggested that miRNA-181a may play an important role in protecting dopaminergic neurons in MPP<sup>+</sup> induced Parkinson's disease.

**[Key words]** miRNA-181a; Parkinson's disease; primary cell culture; dopaminergic neurons; neuroprotection

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1081-1085]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81100835)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dhxnjmu@126.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见的中老年神经系统退行性疾病,是我国第2大神经退行性疾病<sup>[1]</sup>,主要病理改变是中脑黑质多巴胺(dopamin, DA)能神经元变性死亡、纹状体DA含量显著减少及黑质残存神经元胞质内出现嗜酸性包涵体,即路易小体,其中 $\alpha$ -突触核蛋白基因( $\alpha$ -synuclein, SNCA)编码的SNCA蛋白为路易小体的核心成分<sup>[2-3]</sup>,提示它在PD发病过程中起到重要作用。

miRNA是21~23个核苷酸的非编码单链微小RNA,研究表明miRNA与PD等神经退行性疾病密切相关<sup>[4-5]</sup>,有的可以直接调控PD相关基因的表达<sup>[6-7]</sup>。已有研究表明miRNA-181a具有稳定的特异性序列,在脑组织中表达丰富。在前脑缺血模型中已有其作用及机制的研究,在视网膜缺血再灌注损伤模型中发现上调miRNA-181a表达水平可以下调Bim mRNA及蛋白的表达水平<sup>[8]</sup>。

前期通过对散发PD患者与健康对照组的血清样本进行研究,发现miRNA-195在PD患者血清中上调,miRNA-185、miRNA-15b、miRNA-221和miRNA-181a在PD患者血清中下调<sup>[9]</sup>。表明这5种miRNA可能对PD的诊断起重要作用。首先通过计算机测序软件(www.microRNA.org)预测miRN-181a可以调控SNCA基因的表达。调控miRNA-181a的表达是否能促进PD患者中脑组织中残存DA能神经元的修复再生发挥保护作用,目前还没有报道。因此,本研究选择原代培养小鼠的DA能神经元模拟疾病的发生发展过程,进一步探讨miRNA-181a是否对1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenyl-pyridinium, MPP<sup>+</sup>)所致DA能神经元损伤具有神经保护作用及相关机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

性成熟的C57/BL/6小鼠(南京医科大学模式动物中心),自行交配获得胎龄12.5 d的胎鼠。神经元培养过程中所用培养基为神经诱导培养基(neural induction medium, NIM),由490 mL DMEM/F12、5 mL N2复合物、5 mL NEAA配制而成,以上试剂和B27均购自美国Gibco公司。胎牛血清(FBS)、0.05% Trypsin-EDTA(Life Technology公司,美国),多聚鸟氨酸(polyornithine, PORN)、多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)、MPP<sup>+</sup>(Sigma-Aldrich公司,美国)。目的基因miRNA慢病毒:小鼠miRNA-181a基因过表达重组慢病毒(LV-mmu-miRNA-181a)、阴性对照重组慢

病毒(LV-mmu-miRNA-NC)由上海吉凯基因化学技术有限公司提供。正置荧光显微镜80i、倒置荧光显微镜TS100(Nikon公司,日本)。

兔抗小鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体(1:1 000, Pel-Freez公司,美国),兔抗小鼠微管相关蛋白2(microtubule associated protein 2, MAP2)抗体(1:1 000, Sigma-Aldrich公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 调控SNCA基因的miRNA的预测

前期研究中确定5种miRNAs(miRNA-195、miRNA-15b、miRNA-221、miRNA-181a和miR-185)在PD组与健康对照组存在显著差异。SNCA基因主要编码 $\alpha$ -突触核蛋白,是第1个被发现的家族性PD致病基因。因此选择PD相关基因SNCA输入到TargetRNA栏,检测调控SNCA基因的miRNA。

#### 1.2.2 DA能神经元原代培养

取育龄12.5 d的孕鼠,颈椎脱臼处死后浸入75%酒精消毒10 s,剪开腹部暴露孕鼠子宫,剪断子宫系膜后迅速转移到预冷的PBS中(按1:100比例加入青、链霉素),更换镊子剪刀取出胚胎,分别经0.1%新洁尔灭2 s、75%酒精10 s皮肤消毒后,置于预冷PBS中,后放入超净台冰盒上。将待取的胎鼠置于解剖显微镜下,于预冷PBS缓冲液中,剥离胎鼠的脑壳与脑膜,分离中脑部位,将取出的中脑黑质组织块充分剪碎,加入0.05% Trypsin-EDTA放入细胞培养箱消化5 min,然后加入等体积提前配置好的终止消化液(10% FBS+90% DMEM/F12)终止消化,吸入15 mL离心管中1 500 r/min离心5 min,弃上清。随后DMEM/F12清洗2次,每次3 min,弃上清。沉淀用2 mL神经元培养基(NIM, 1:50 B27, 1:100 PS)重悬后200目筛网过滤,滤液即为最终的细胞悬液,经细胞计数器计数后稀释至所需的密度(用于免疫组化的细胞接种密度为 $1 \times 10^5$ 个/玻片)。将细胞悬液均匀接种到提前处理好的24孔板中的圆玻片上,每片100  $\mu$ L,盖好24孔板做好标记,放入细胞培养箱,24 h后补液至每孔500  $\mu$ L,并于培养的第3天半量换液,用于后续实验。

#### 1.2.3 DA能神经元慢病毒感染

阴性对照(miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>)组与miRNA-181a+MPP<sup>+</sup>组DA能神经元培养至第3天先吸出培养基至提前准备好的新EP管中标号为1,依据前期预实验,获得慢病毒转染细胞最佳转染浓度(即MOI=5)。按公式计算加入相应量的病毒:病毒体积=(MOI $\times$ 细胞数目)/病毒滴度,MOI=5,充分混匀。把培养皿中

剩余的培液吸至新 EP 管中标号为 2, 用封口膜封口, 以备下次换液用, 然后迅速把 EP 管 1 中的培养液加入培养皿中, 放入细胞培养箱。培养 6 h 后半量换液, 加入 6 h 前收集的 EP 管 2 中的培养基, 24 h 后全量换液。

#### 1.2.4 MPP<sup>+</sup>致 DA 能神经元损伤构建 PD 细胞模型

帕金森病模型(MPP<sup>+</sup>)组、阴性对照(miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>)组、miRNA-181a+MPP<sup>+</sup>组, DA 能神经元培养第 5 d 分别给予 10 μmol/L MPP<sup>+</sup>继续培养 48 h, 空白对照组只换液不进行其他任何处理。

#### 1.2.5 细胞免疫荧光染色与分析

用镊子夹取 24 孔板中需要做免疫组化的玻片放置于自制盒中, 加入 100 μL/片的 4%多聚甲醛(PFA)固定 30 min 后吸除; 加入 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 0.2% Triton 100 μL 孵育 10 min; 弃去 Triton, 加入 10% 驴血清 100 μL 孵育 1 h; 一抗(0.1% Triton+5% 驴血清), 4 °C 过夜; 次日弃去一抗, PBS 100 μL 漂洗 3 次, 每次 10 min; 二抗(5% 驴血清+PBS), 避光室温 30 min; 然后 PBS 100 μL 漂洗 3 次, 每次 10 min; 最后于国产载玻片上加入荧光封片胶封片。晾干后于倒置荧光显微镜下观察结果。阳性率统计分析: 200 倍光镜下, 随机选取 9 个视野, TH 阳性细胞/该视野细胞核总数, 取平均值, 实验重复 3 次。荧光图片通过 Image J 软件进行分析, 每个视野中 Hoechst 染色标记的细胞总数即为细胞总数。阳性神经元: 每批统计 2 张玻片所有阳性神经元数目, 共统计 6 张玻片 3 批独立实验的阳性神经元数目。初级突触分枝数目分析: 统计各组 TH 阳性神经元由胞体直接分出的突触分枝数目, 实验重复 3 次。最长突触长度分析: 统计各组 TH 阳性神经元最长突触长度, 实验重复 3 次。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件, 数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 SNK 法,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

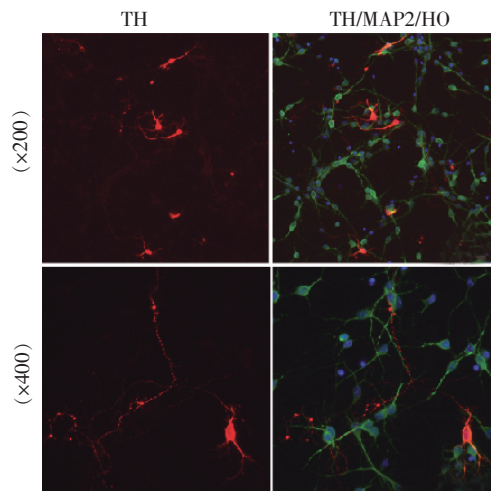
#### 2.1 采用预测软件预测调控 SNCA 基因的 miRNA

应用计算机测序软件(www.microRNA.org), 选择 PD 相关基因 SNCA 输入到 TargetRNA 栏, 检测到 SNCA 对应 miRNA-181a, 即由靶基因 SNCA 预测对应的 miRNA 为 miRNA-181a。

#### 2.2 DA 能神经元原代培养状态与阳性率

培养的细胞在显微镜下观察, 一般 4 h 后可见

细胞贴壁, 次日补液后可见有神经元突起爬出, 培养 3 d 后可见神经元胞体呈圆形或椭圆形, 突起数目增多, 相互交织呈网络状。DA 能神经元特异性免疫组化 TH 染色胞体呈圆形、椭圆形或者三角形, 立体感明显, 由胞体发出多个长的突起, 突起丰富, 长突起粗大, 有的突起上可见串珠样的膨起, 相互联系交织形成网络状(图 1), 经统计 DA 能神经元阳性率为 2%~3%。



正常状态 DA 神经元培养至第 7 天免疫组化检测 TH 和成熟细胞的标记物 MAP2。

图 1 DA 能神经元特异性免疫组化检测(x400)

Figure 1 Positive immunostaining of DA neurons(x400)

#### 2.3 MPP<sup>+</sup>致 DA 能神经元损伤构建 PD 细胞模型

DA 能神经元选择性变性和死亡是由 MPTP 的代谢产物 MPP<sup>+</sup>引起的, MPP<sup>+</sup>经 DA 转运体被 DA 能神经元所摄取, 并蓄积在 DA 能神经元内, 从而引起 DA 能神经元的损伤和死亡。其引起神经元变性、死亡的分子机制至今尚未完全明确。实验结果表明 MPP<sup>+</sup>处理 48 h 后 TH 阳性神经元数目明显减少, DA 能神经元突起数目减少, 突触长度缩短, 粗细不均匀, 有的仅残存根部, 轴突变性缩短, 出现串珠样改变甚至出现轴突凋亡崩解(图 2)。Control 组 TH 阳性神经元的数目、初级突触分枝数目、最长突触长度分别为(237.5±6.5)个、(4.44±0.28)个、(214.94±16.51)μm。MPP<sup>+</sup>组 TH 阳性神经元数目、初级突触分枝数目、最长突触长度分别为(106.0±5.0)个、(1.41±0.28)个、(38.11±10.45)μm, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 因此认为成功运用原代细胞构建出 PD 细胞模型。

#### 2.4 miRNA-181a 对 PD DA 能神经元状态的影响

miRNA-181a+MPP<sup>+</sup>组较阴性对照 miRNA-NC+MPP<sup>+</sup>组 TH 阳性神经元数目增多, 初级突触分枝数



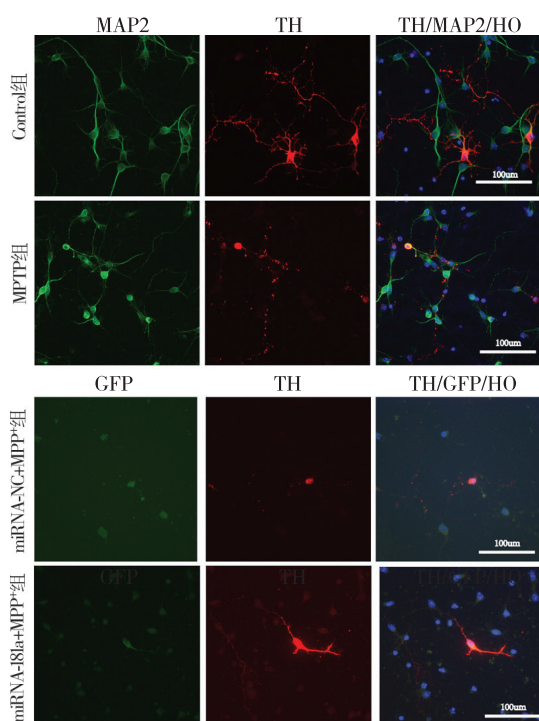
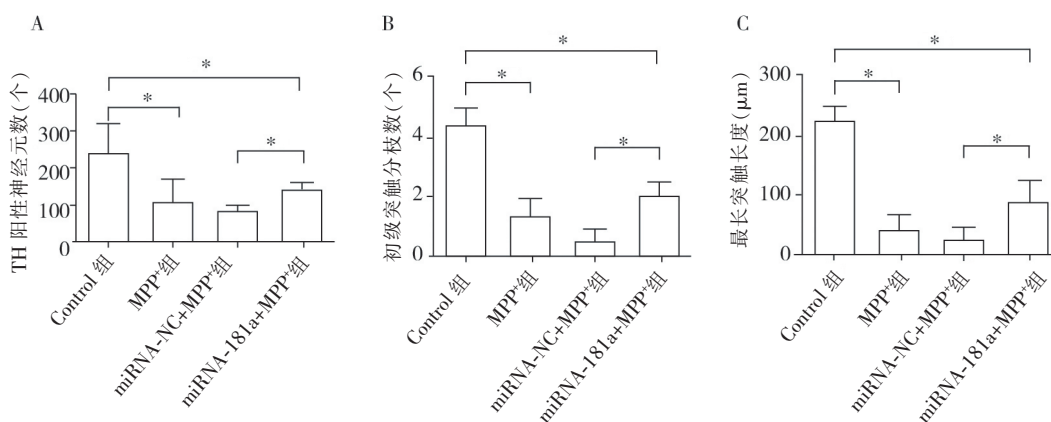


图 2 各组 TH 阳性神经元的形态学比较(×400)

Figure 2 Morphology analysis of TH positive neurons in each group(×400)



A: 各组 TH 阳性神经元数比较;B: 各组初级突触分枝数目比较;C: 各组最长突触长度比较。两组比较,\*P<0.05。

图 3 过表达 miRNA-181a TH 阳性神经元形态学比较

Figure 3 Morphology analysis of TH positive neurons after overexpression of miRNA-181a

体形态较好,初级突触分枝数目与最长突触长度较 miRNC-NC+MPP+组有所改善,且表面较光滑,神经元死亡程度较低。

PD 的病因和发病机制十分复杂,研究认为是遗传因素与环境因素的共同作用导致的,其中 SNCA 基因是第 1 个被发现的家族性 PD 致病基因,其异常聚集的出现是 PD 的主要病理特征<sup>[10]</sup>。正常生理条件下,SNCA 蛋白是位于中枢神经系统神经突触前膜末梢不定形的小分子可溶性蛋白质,环境或基

因增多,最长突触长度及形态均有改善(图 2,3)。miRNA-NC+MPP+组 TH 阳性神经元的数目、初级突触分枝数目、最长突触长度分别为(87.0±1.0)个、(0.62±0.19)个、(25.08±9.55)µm。miRNA-181a+MPP+组 TH 阳性神经元的数目、初级突触分枝数目、最长突触长度分别为(146.0±1.0)、(2.07±0.21)个、(87.37±17.13)µm(图 3)。因此在前期 PD 患者血清学研究的基础上发现在 DA 能神经元原代培养中,miRNA-181a 对 MPP+所致 DA 能神经元损伤具有神经保护作用。

### 3 讨论

前期通过对散发 PD 患者与健康对照组的血清样本进行研究,发现 miRNA-195 在 PD 患者血清中上调,miRNA-185、miRNA-15b、miRNA-221 和 miRNA-181a 在 PD 患者血清中下调。在此基础上通过慢病毒感染 DA 能神经元,免疫荧光染色法观察到 miRNC-NC+MPP+组 DA 能神经元的数量减少,形态不规则,分枝数目及轴突长度明显减少,轴突断裂、缩短、串珠样肿胀、丢失等。而 miRNA-181a+MPP+组较 miRNC-NC+MPP+组 DA 能神经元数目有所增加,胞

因的改变极易引起 SNCA 发生错误折叠,同时其二级结构可因环境的改变而出现动态变化,蛋白质出现寡聚体,纤维性蛋白质逐渐增多,可溶性改变,继而路易小体出现,最终令 DA 能神经元受损。因此寻找改善 PD 中 DA 能神经元凋亡,保护 DA 能神经元的新靶点具有重要意义。

近年来关于 miRNAs 的研究越来越多<sup>[11]</sup>,发现 miRNAs 参与 PD 等神经退行性疾病的发生发展<sup>[12]</sup>,miRNA 主要与靶 mRNA 的 3' 端非编码区域(3'

untranslated region,3'UTR)结合,引发靶 mRNA 的降解或抑制翻译,介导转录后基因沉默,从而调节与疾病发生发展有关的基因表达<sup>[13]</sup>。其中 miRNA-7 和 miRNA-153 可以调节 SNCA,miRNA-7 可以抑制 SNCA 的表达,通过结合到 SNCA mRNA 的 3'UTR 区域,保护细胞免受氧化应激介导的细胞死亡<sup>[14]</sup>。并且已有研究表明 miRNA-181a 具有稳定的特异性序列,在脑组织中表达丰富。已有研究其在前脑缺血模型及视网膜缺血再灌注损伤模型中的作用及机制<sup>[15]</sup>。应用计算机测序软件预测 miRNA-181a 可以调控 SNCA 基因的表达,因此 miRNA-181a 是否可以下调 SNCA 的表达减慢 PD 的疾病进展,为寻找 PD 的发病机制及治疗提供了新方向。

同时由于 DA 能神经元原代获取的困难以及培养难度较大,现在关于 miRNA 的研究大多用 SH-SY5Y 细胞<sup>[16]</sup>,虽然其在某些功能上近似于 DA 能神经元,但来源于肿瘤细胞,许多生物学特性与 DA 能神经元明显不同,并不能完全模拟疾病的发病机制,诱导后基因水平也有可能发生改变,与 DA 能神经元的相关性往往受到质疑。近年来大鼠胚胎中脑 DA 能神经元培养常被用于建立 PD 细胞模型<sup>[17]</sup>,小鼠中脑 DA 能神经元培养并不十分常见,因为小鼠胚胎鼠(胎龄 12.5~15.0 d)的中脑 DA 能神经元与大鼠胚胎鼠或新生鼠的原代培养相比,手术操作过程相对复杂。但以往研究表明,采用 1-甲基-4-苯基-四氢吡啶(MPTP)在体内建立 PD 动物模型,小鼠比大鼠具有更明显的种族易感性。因此,小鼠胚胎中脑 DA 能神经元的原代细胞培养可能为 PD 的实验研究提供一个更为敏感的细胞模型,与机体内的环境更加接近。

综上所述,DA 能神经元原代培养建立 PD 细胞模型模拟疾病的发生发展过程,避免了应用肿瘤细胞系存在的问题,发现 miRNA-181a 对 MPP<sup>+</sup>所致 DA 能神经元损伤具有神经保护作用。为寻找治疗 PD 的新药物靶点,以及开发治疗 PD 的新药物和方法提供了思路。

#### [参考文献]

- [1] De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(6): 525-535
- [2] Mutez E, Lepretre F, Le Rhun E, et al. SNCA locus duplication carriers: from genetics to Parkinson disease phenotypes[J]. *Hum Mutat*, 2011, 32(4): E2079-2090
- [3] Volpicelli-Daley LA. Effects of alpha-synuclein on axonal transport[J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 9(16):25-31
- [4] Harraz MM, Dawson TM, Dawson VL. Micro RNAs in Parkinson's disease[J]. *J Chem Neuroanat*, 2011, 42(2): 127-130
- [5] Ma L, Wei L, Wu F, et al. Advances with microRNAs in Parkinson's disease research [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2013, 7(10): 1103-1113
- [6] Alieva AK, Filatova EV, Karabanov AV, et al. miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2015, 21(1): 72-74
- [7] Ghanbari M, Darweesh SK, de Looper HW, et al. Genetic variants in microRNAs and their binding sites are associated with the risk of Parkinson disease[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(3): 292-300
- [8] He Y, Liu JN, Zhang JJ, et al. Involvement of microRNA-181a and Bim in a rat model of retinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(1): 33-40
- [9] Ding H, Huang Z, Chen M, et al. Identification of a panel of five serum miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016, 22(1): 68-73
- [10] Fuchs T, Tichopad JA, Golub Y, et al. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain[J]. *FASEB J*, 2008, 22(5): 1327-1334
- [11] Wang H, Ye Y, Zhu Z, et al. MiR-124 Regulates apoptosis and autophagy process in MPTP model of Parkinson's disease by targeting to Bim[J]. *Brain Pathol*, 2016, 26(2): 167-176
- [12] Xiong R, Wang Z, Zhao Z, et al. MicroRNA-494 reduces DJ-1 expression and exacerbates neurodegeneration [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(3): 705-714
- [13] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582-600
- [14] Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by miR-7 and miR-153[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(17): 12726-12734
- [15] Moon JM, Xu L, Giffard RG. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(12):1976-1982
- [16] Noronha C, Perfeito R, Laco M, et al. Expanded and wild-type ataxin-3 modify the redox status of SH-SY5Y cells overexpressing alpha-synuclein[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(5): 1430-1437
- [17] Carlos F, Michel B. Rapid reduction of ATP synthesis and lack of free radical formation by MPP<sup>+</sup> in rat brain synaptosomes and mitochondria[J]. *Brain Res*, 2003, 975(1/2): 214-221

[收稿日期] 2017-02-07