

血管紧张素 II 对鱼藤酮诱导的多巴胺能细胞氧化应激的影响

赵洪锐,吴亮,田有勇,高擎,曹洁,欧洲,沙志涛,耿丛,张颖冬*

(南京医科大学附属南京医院神经内科,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:探讨血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 对多巴胺能细胞损伤的影响及其机制。方法:体外培养 CATH.a 细胞,鱼藤酮和(或)Ang II 处理细胞 24 h。采用噻唑蓝(methylthiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)法检测细胞存活率,蛋白印迹技术检测血管紧张素 II-1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)和血管紧张素 II-2 型受体(angiotensin II type 2 receptor, AT2R)蛋白表达,流式细胞仪检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量,荧光定量 PCR 检测尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶亚基 gp91^{phox} 和 p67^{phox} 基因表达,免疫荧光检测 gp91^{phox} 蛋白表达。结果:Ang II 通过 AT1R 导致鱼藤酮诱导的 CATH.a 细胞存活率降低($P < 0.05$)。Ang II 使 NADPH 氧化酶亚基 gp91^{phox} 和 p67^{phox} 表达增加($P < 0.05$),并呈剂量依赖性促进细胞内 ROS 产生。AT1R 阻滞剂氯沙坦和 NADPH 氧化酶抑制剂夹竹桃麻素使 Ang II 诱导的 ROS 产生减少($P < 0.01$)。结论:Ang II 作用于 AT1R,通过 NADPH 氧化酶产生 ROS,促进鱼藤酮诱导的多巴胺能细胞损伤,参与帕金森病的发生与发展。

[关键词] 血管紧张素 II;鱼藤酮;NADPH 氧化酶;活性氧;帕金森病

[中图分类号] R742.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)06-766-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20150602

Effects of angiotensin II on oxidative stress in rotenone-induced dopaminergic cells

Zhao Hongrui, Wu Liang, Tian Youyong, Gao Qing, Cao Jie, Ou Zhou, Sha Zhitao, Geng Cong, Zhang Yingdong*

(Department of Neurology, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of angiotensin II (Ang II) on injury of dopaminergic cells and its underlying mechanisms. **Methods:** CATH.a cells, a dopaminergic neuronal cell line stably expressing Ang II type 1 receptor (AT1R) and Ang II type 2 receptor (AT2R), were exposed to rotenone alone or in combination with Ang II for 24 h. The cell survival rate was measured by methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide (MTT). The protein levels of AT1R and AT2R were detected by Western blot. The intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were monitored using flow cytometry. The levels of gp91^{phox} and p67^{phox}, the two main subunits of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, were examined by RT-PCR and immunofluorescence staining. **Results:** The results showed that rotenone caused a significantly reduction on the survival rate of CATH.a cells ($P < 0.05$), which could be further exacerbated by Ang II via an AT1R-dependent manner ($P < 0.05$). Meanwhile, we revealed that Ang II exacerbated the rotenone-induced increase in intracellular levels of ROS ($P < 0.05$) as well as the expression of gp91^{phox} and p67^{phox} ($P < 0.05$). This exacerbation was abolished by NADPH oxidase inhibitor apocynin ($P < 0.01$) or AT1R blocker losartan ($P < 0.01$). **Conclusion:** These findings indicate that Ang II interacts with AT1R and subsequently exacerbates the rotenone-induced injury of dopaminergic cells via elevation of ROS levels through a NADPH oxidase-dependent manner. These findings have deepened our understanding on the role of Ang II in the pathogenesis of Parkinson's disease, and support the use of AT1R blockers in the treatment of this devastating disease.

[Key words] angiotensin II; rotenone; NADPH oxidase; reactive oxygen species; Parkinson's disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(06):766-771]

[基金项目] 国家自然科学基金(81271418);江苏省自然科学基金(BK2012524);江苏省“六大人才高峰”项目(N02012-WS-086)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangyingdong@aliyun.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种包含运动和非运动临床症状的神经退行性疾病。目前的治疗主要是减轻患者症状,而不能从根本上减少神经元的丢失。越来越多的研究证据显示氧化应激在 PD 等一些神经退行性疾病中发挥着重要作用^[1-3]。

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)作用于血管紧张素 II-1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R),通过氧化应激和炎性反应在心脏和肾脏等疾病中发挥着重要作用^[4]。Ang II 是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)中最重要的一种血管肽,参与调节血压和水盐平衡。研究表明,许多组织中含有局部的 RAS,其中脑,包括基底节和多巴胺系统,也存在局部的 RAS^[5]。Rodriguez-Perez 等^[6]指出在一些对多巴胺能退行性变更易感的动物模型,如老龄和绝经期动物模型,黑质中的 RAS 活性增高。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶是线粒体外活性氧(reactive oxygen species, ROS)的最主要来源。Ang II 作用于 NADPH 氧化酶,产生的 ROS 在高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等年龄相关性疾病中发挥重要作用^[7-8]。然而,Ang II 是否参与 PD 的发生发展及其机制尚不明确。本研究用神经毒性药物鱼藤酮(rotenone, Rot)处理多巴胺能神经元 CATH.a 细胞作为 PD 的细胞模型,探讨 Ang II 在 PD 中的作用,为 PD 的治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

CATH.a 细胞(ATCC, 美国),RPMI-1640 培养基、0.25%的胰酶/EDTA 消化液、马血清、胎牛血清(Gibco 公司,美国),Rot(rotenone, Rot)、Ang II、氯沙坦(losartan)、夹竹桃麻素(apocynin, Apo)、PD123319(Sigma 公司,美国),兔抗 AT1R 抗体、兔抗 AT2R 抗体、羊抗 gp91^{phox} 抗体、鼠抗 β -actin 抗体(Santa Cruz 公司,美国),羊抗兔 IgG/HRP、羊抗鼠 IgG/HRP、驴抗羊 IgG/FITC(武汉博士德公司),噻唑蓝(methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂盒(南京凯基公司),ROS 检测试剂盒(海门碧云天生物技术研究所),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),逆转录试剂盒、SYBR Premix EX Taq 定量 PCR 试剂盒(大连宝生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 CATH.a 细胞培养及分组

CATH.a 细胞常规培养在含 8%马血清和 4%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于含 5%CO₂、37℃培养箱内培养。待细胞贴壁并 85%融合时用含 1%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养。给予 Rot 100 nmol/L 制作 PD 细胞模型,加入 Ang II 100 nmol/L 刺激或用 AT1R 阻滞剂氯沙坦(losartan)1 μ mol/L、AT2R 阻滞剂 PD123319 1 μ mol/L 和 NADPH 氧化酶抑制剂 Apo 预处理 30 min 后,加入 Ang II 100 nmol/L,各组细胞分别培养 24 h。各组实验至少重复 3 次。

1.2.2 MTT 检测细胞存活率

96 孔板中培养各组 CATH.a 细胞,加入新鲜配置的 MTT 溶液 0.5 mg/mL 37℃ 孵育 3 h,再加入 100 μ L 二甲亚砜(DMSO),孵育 10 min,并使用微量振荡器振荡使结晶完全溶解,用全自动酶标仪于 490 nm 波长测吸光度值。各组实验至少重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测

各组处理同前,于 10 cm 培养皿内加入 500 μ L 蛋白裂解液提取细胞总蛋白,蛋白含量采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定。取等量样品经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,加入抗 AT1R(1:1 000)、AT2R(1:1 000)、内参 β -actin(1:1 000)抗体 4℃孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 1:3 000 的羊抗兔和羊抗鼠 IgG/HRP 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min, ECL 显影液显色并曝光成像。图像采用 Image J 分析软件进行灰度分析。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量

取生长良好的 CATH.a 制成细胞悬液 2 mL/孔接种于 6 孔板,置 37℃ 5%CO₂ 的培养箱中孵育 24 h。根据活性氧检测试剂盒说明书,按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μ mol/L。去除细胞培养液,加入适当体积稀释好的细胞 DCFH-DA,细胞培养箱中孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,收集细胞后用流式细胞仪检测。流式细胞仪参数为:激发波长 488 nm,发射波长 525 nm。各组实验至少重复 3 次。

1.2.5 荧光定量 PCR

采用 TRIzol 法抽提细胞总 RNA。按逆转录试剂盒说明书操作逆转录合成 cDNA,利用 Primer Premier 5.0 设计引物,引物序列见表 1。以 cDNA 为模板,按荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作,在反应体系中加入目的基因的引物设定反应参数进行目的基因的扩增,总反应体系为 25 μ L。反应参数:预变性 95℃ 5 min;变性 94℃ 30s,退火 60℃ 30 s,延伸

72℃ 40 s,共40个循环;终末延伸72℃ 10 min。以GAPDH作为内参,用ABI 7500型实时荧光定量PCR仪进行熔解曲线分析,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

表1 荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time PCR	
基因	引物序列(5'→3')
gp91 ^{phox}	上游-CAGGAGTTCCAAGATGCCTG
	下游-GATTGGCCTGAGATTCATCC
p67 ^{phox}	上游-CAGCCAGCTTCGGAACATG
	下游-GACAGTACCAGGATTACATC
GAPDH	上游-CGTCCC GTAGACAAAATG
	下游-TAGTGGGGTCTCGCTCC

1.2.6 细胞免疫荧光染色

细胞爬片,用预冷的4%多聚甲醛固定10 min,加入一抗gp91^{phox}(1:100),湿盒4℃孵育过夜,二抗选用FITC标记的荧光抗体,用DAPI染核,在荧光显微镜下以351 nm和490 nm分别激发DAPI和FITC并拍照,以仪器内部软件将其进行合图。

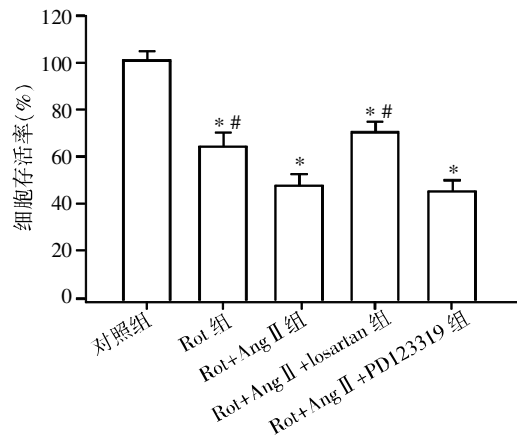
1.3 统计学方法

采用SPSS17.0行统计学处理,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II通过AT1R促进鱼藤酮诱导的CATH.a细胞损伤

如图1所示,CATH.a细胞经Rot 100 nmol/L处理24 h后,MTT法检测细胞存活率与对照组相比明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。加用100 nmol/L Ang II处理组细胞存活率下降,为对照组的(48.33 ± 8.50)%,与Rot组相比,差异具有统计



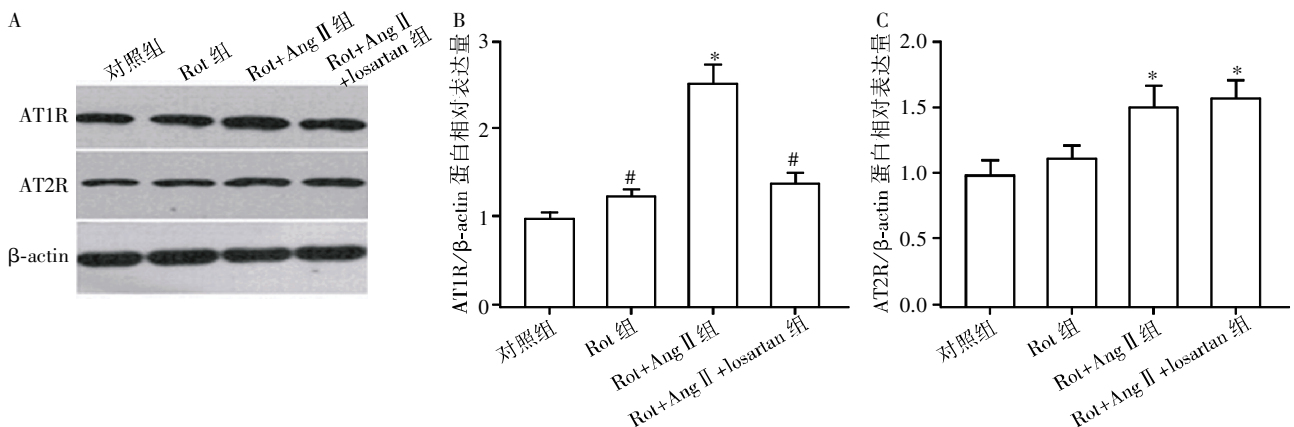
与对照组比较,* $P < 0.05$;与Rot+Ang II组比较,# $P < 0.05$ 。

图1 Ang II对鱼藤酮诱导的CATH.a细胞存活率的影响
Figure 1 Effects of Ang II on the survival rate of rotenone-incubated CATH.a cells

学意义($P < 0.05$)。losartan 1 $\mu\text{mol/L}$ 预处理30 min后,再加入100 nmol/L Ang II,Rot+Ang II+losartan组细胞存活率为对照组的(70.12 ± 7.91)%,与Rot+Ang II组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而加用PD123319 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理的Rot+Ang II+PD123319组,细胞存活率为对照组的(46.02 ± 8.27)%,与Rot+Ang II处理组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 Ang II对AT1R和AT2R蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与对照组相比,100 nmol/L Ang II刺激24 h后,AT1R表达增加($P < 0.05$),1 $\mu\text{mol/L}$ losartan处理组AT1R较Ang II处理组降低($P < 0.05$,图2A、B)。100 nmol/L Ang II刺激24 h后,也可使AT2R表达增加,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而1 $\mu\text{mol/L}$ losartan处理组AT2R表达与Ang II处理组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,图2A、C)。



与对照组比较,* $P < 0.05$;与Rot+Ang II组比较,# $P < 0.05$ 。

图2 Ang II对鱼藤酮诱导的CATH.a细胞AT1R和AT2R蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of Ang II on the protein levels of AT1R and AT2R in rotenone-incubated CATH.a cells

2.3 Ang II 对鱼藤酮诱导的 CATH.a 细胞内 ROS 的影响

细胞内 ROS 增加是细胞氧化应激状态的主要标志。流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量如图 3 所示, CATH.a 细胞经 100 nmol/L Rot 处理 24 h 后, 细胞内 ROS 水平较对照组显著增加。1、10、100 和 1 000 nmol/L Ang II 刺激 24 h, 细胞内 ROS 产生分别是对照组的 2.50、3.02、4.11 和 4.83 倍, 随 Ang II 剂量的增高而增多, 且 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L Ang II 处理组细胞内 ROS 产生与单用 Rot 处理组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 单独给予 100 nmol/L Ang II 处理 CATH.a 细胞后, ROS 水平也增加 ($P < 0.05$)。

2.4 Ang II 对 NADPH 氧化酶活性的影响

NADPH 氧化酶的两个主要亚基为 gp91^{phox} 和 p67^{phox}。荧光定量 PCR 结果显示, CATH.a 细胞经 100 nmol/L Rot 处理 24 h 后, gp91^{phox} 和 p67^{phox} 表达较对照组增高。100 nmol/L Ang II 刺激后, gp91^{phox} 和 p67^{phox} 表达增高, 与 Rot 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。1 $\mu\text{mol/L}$ losartan 处理的 Rot+Ang II 组, gp91^{phox} 和 p67^{phox} 表达较 Rot+Ang II 组降低 ($P < 0.05$, 图 4A、B), 各处理组 gp91^{phox} 蛋白的荧光表达如图 4C 所示; Rot 处理组 gp91^{phox} 蛋白表达较对照组增多, Rot+Ang II 组 gp91^{phox} 蛋白表达较

Rot 处理组增多, 而 1 $\mu\text{mol/L}$ losartan 处理后的 Rot+Ang II+losartan 组, gp91^{phox} 蛋白表达较 Rot+Ang II 组减少。

2.5 Ang II 受体阻滞剂和 NADPH 氧化酶抑制剂对 Ang II 诱导的氧化应激的影响

流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量如图 5 所示, CATH.a 细胞经 100 nmol/L Rot 处理 24 h 后, 细胞内 ROS 水平较对照组增加。100 nmol/L Ang II 刺激后, ROS 产生为对照组的 4.10 倍, 且与 Rot 处理组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。1 $\mu\text{mol/L}$ losartan 处理的 Rot+Ang II+losartan 组, ROS 表达较

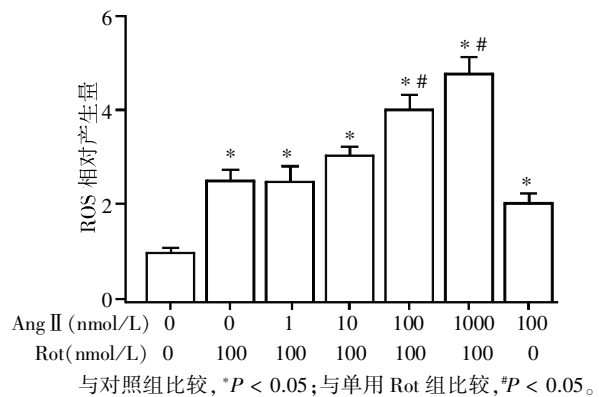
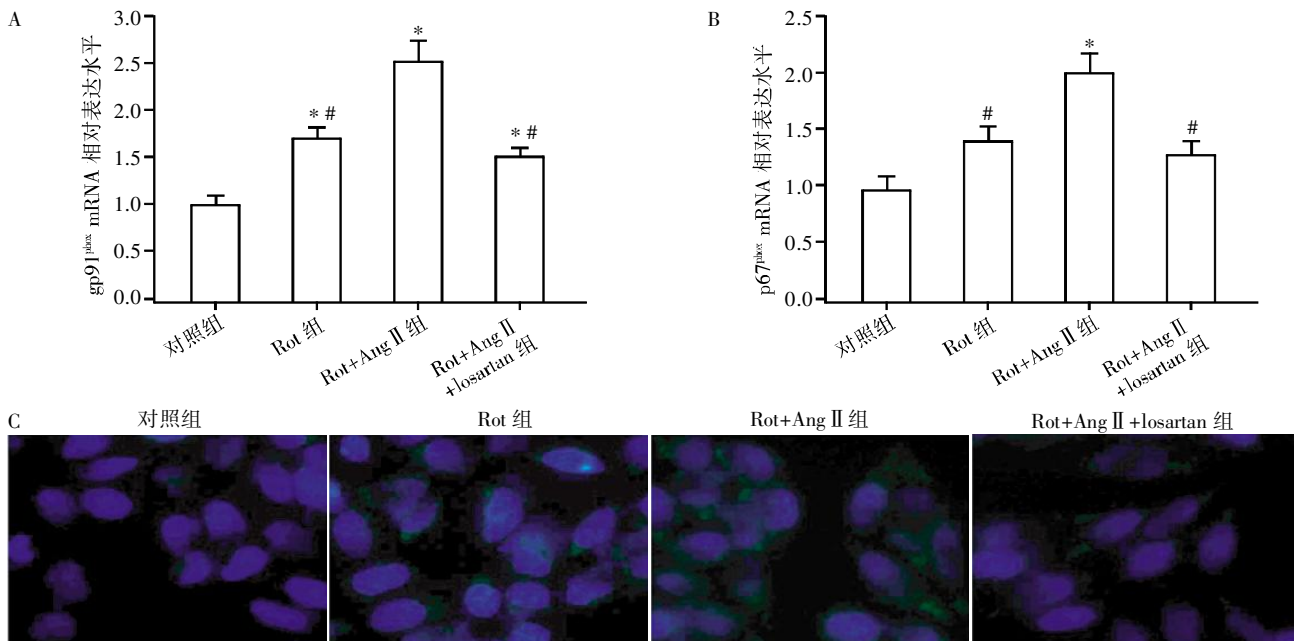
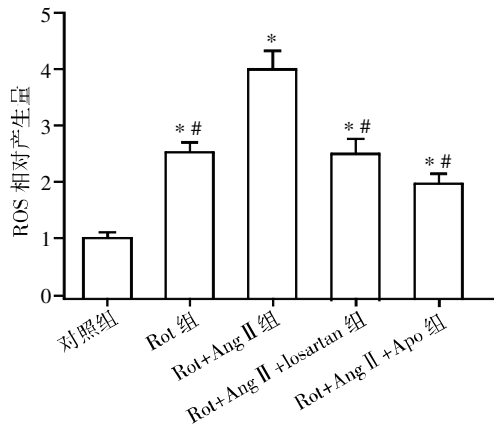


图 3 Ang II 对 CATH.a 细胞 ROS 生成量的影响
Figure 3 Effects of Ang II on the intracellular ROS levels in rotenone-incubated CATH.a cells



A、B: 荧光定量 PCR 检测各组 gp91^{phox}(A)、p67^{phox}(B) mRNA 的表达, 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 Rot+Ang II 组比较, # $P < 0.05$ 。C: 免疫荧光染色检测 gp91^{phox} 的表达 ($\times 400$), CATH.a 细胞 DAPI 染核 (蓝色荧光), 各组 gp91^{phox} 蛋白表达 (绿色荧光)。
图 4 荧光定量 PCR 检测各组 gp91^{phox}、p67^{phox} mRNA 的表达及免疫荧光染色检测 gp91^{phox} 的表达
Figure 4 The levels of NADPH oxidase subunits gp91^{phox} and p67^{phox} in rotenone-incubated CATH.a cells were detected by RT-PCR and immunofluorescence staining

Rot+Ang II 处理组降低($P < 0.05$)。NADPH 氧化酶抑制剂 Apo 500 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 30 min, Rot+Ang II +Apo 组 ROS 水平较 Rot+Ang II 处理组降低($P < 0.05$)。



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 Rot+Ang II 组比较, # $P < 0.05$ 。

图5 AT1R 阻滞剂氯沙坦和 NADPH 氧化酶抑制剂夹竹桃麻素对 Ang II 诱导的 CATH.a 细胞 ROS 产生的影响
Figure 5 Effects of AT1R antagonist losartan and NADPH oxidase inhibitor apocynin on the elevation of ROS production induced by Ang II in rotenone-incubated CATH.a cells

3 讨论

PD 为继阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 之后的临床常见神经变性病, 以多巴胺能神经元变性、脱失为主要病理特征。虽然家族性 PD 有一些基因突变基础, 但大多数原发性 PD 的病因尚不清楚, 近年来研究表明多种机制参与多巴胺能神经元的变性, 包括线粒体功能障碍、氧化应激、炎症和泛素-蛋白酶体系统激活等^[9]。

由于神经元的高氧耗致其对氧化损伤更易感, 氧化应激被认为是神经退行性疾病的主要发病机制之一。氧化应激主要发生在多巴胺能神经元线粒体和细胞膜等电子丰富的细胞器, 导致神经元损伤^[10]。更重要的是, ROS 可以直接激活细胞内的凋亡级联系统, 促进多巴胺能细胞凋亡^[11]。Ang II 激活小胶质细胞及 NADPH 氧化酶, 释放 ROS, 促进多巴胺能细胞凋亡^[12]。Zawada 等^[13]在一种多巴胺能细胞系中证实了 NADPH 氧化酶和线粒体之间存在相互联系。1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 处理的神经元诱导线粒体释放 ROS, 后者可以导致 NADPH 氧化酶产生 ROS, 而且 NADPH 氧化酶产生的 ROS 可以被 AT1R 阻滞剂氯沙坦阻断。线粒体和 NADPH 氧化酶产生的 ROS 通过相互之间的一种正反馈形式形成恶性循环, 导致细胞内 ROS 水平增高。Rot 常被用

来制作 PD 的细胞和动物模型。本课题组前期实验证明坎地沙坦酯通过抑制内质网应激对 Rot 诱导的 PD 模型有保护作用^[14]。在本研究中, Ang II 可显著增加 Rot 诱导的 ROS 产生, 而这种作用可被 NADPH 氧化酶的抑制剂夹竹桃麻素阻断。在 Ang II 作用下, NADPH 氧化酶的亚基 gp91^{phox} 和 p67^{phox} 表达增加, 这些表明 Ang II 通过 NADPH 氧化酶对多巴胺能细胞产生氧化损伤。

最近研究显示 RAS 和黑质纹状体系统直接相互调节, 而且 Ang II 和多巴胺之间不正常的反应在神经退行性疾病的进展中发挥重要作用^[15]。脑内存在局部的 RAS 系统, 可以调节氧化应激和纹状体多巴胺的释放^[16]。Ang II 主要通过 AT1R 和 AT2R 两种受体起作用, 而且两种受体作用相反^[17]。在鱼藤酮所致的 PD 细胞模型中, AT2R 的激动剂 CGP42112 可以抑制 NADPH 氧化酶, 减轻氧化应激^[18]。本实验发现, 在 CATH.a 细胞中, Ang II 可使 AT1R 和 AT2R 表达增加。Ang II 诱导的氧化应激可以被 AT1R 阻滞剂氯沙坦阻断, 而不能被 AT2R 阻滞剂 PD123319 阻断。而且, 氯沙坦可以阻断 Ang II 诱导的细胞存活率下降。

综上所述, 本研究结果表明在鱼藤酮诱导的 PD 细胞模型中, Ang II 通过 NADPH 氧化酶促进细胞损伤, 参与 PD 的发生与发展, 且 Ang II 的这种作用是通过 AT1R 实现的。但对于其详细的作用机制和分子通路, 尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease[J]. Ann Neurol, 2003, 53(Suppl 3): S26-S38
- [2] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle[J]. Nat Med, 2010, 16(6): 653-661
- [3] 俱西驰, 屈秋民, 王伟, 等. 血清尿酸水平与帕金森病认知功能障碍的关系[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 33(1): 59-61
- [4] Schramm A, Matusik P, Osmenda G, et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology[J]. Vascul Pharmacol, 2012, 56(5-6): 216-231
- [5] McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(6): 901-918
- [6] Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Villar-Cheda B, et al. Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 2010, 224(2): 517-526

- [7] Wakui H, Dejima T, Tamura K, et al. Activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein exerts an inhibitory effect on vascular hypertrophy and oxidative stress in angiotensin II-mediated hypertension [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(3): 511-519
- [8] Wu J, Lin H, Liu D, et al. The protective effect of telmisartan in Type 2 diabetes rat kidneys is related to the downregulation of thioredoxin-interacting protein [J]. *J Endocrinol Invest*, 2013, 36(7): 453-459
- [9] 张颖冬. 脑内肾素血管紧张素系统在帕金森病发病机制中的作用 [J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(5): 1105-1109
- [10] Onyango IG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(3): 589-597
- [11] Liu J, Zhang FF, Li L, et al. ClC-3 deficiency prevents apoptosis induced by angiotensin II in endothelial progenitor cells via inhibition of NADPH oxidase [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(10): 1262-1273
- [12] Jöglar B, Rodríguez-Pallares J, Rodríguez-Pérez AI, et al. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin; relevance to progression of the disease [J]. *J Neurochem*, 2009, 109(2): 656-669
- [13] Zawada WM, Banninger GP, Thornton J, et al. Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 129
- [14] Wu L, Tian YY, Shi JP, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effects of candesartan cilexetil in the rotenone rat model of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 548: 50-55
- [15] Li H, Armando I, Yu P, et al. Dopamine 5 receptor mediates Ang II type 1 receptor degradation via a ubiquitin-proteasome pathway in mice and human cells [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2180-2189
- [16] Villar-Cheda B, Dominguez-Mejide A, Valenzuela R, et al. Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(7): 1726-1738
- [17] Armando I, Jezova M, Bregonzio C, et al. Angiotensin II AT1 and AT2 receptor types regulate basal and stress-induced adrenomedullary catecholamine production through transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1018: 302-309
- [18] Lu J, Wu L, Jiang T, et al. Angiotensin AT receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2014, 47: 16-24

[收稿日期] 2014-12-25

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。