

· 基础研究 ·

## 水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及机制

荣家闵,于明,葛雅琨,张仁文,劳军,张元新\*

吉林化工学院生物与食品工程学院,吉林 吉林 132022

**[摘要]** 目的:探究水飞蓟宾对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及可能机制。方法:采用体外培养方法,建立SH-SY5Y细胞的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤模型。用水飞蓟宾预处理细胞后MTT法测定细胞的存活率;流式细胞术检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)、细胞凋亡和线粒体膜电位的变化;Western blot法检测Cleaved-Caspase-9、Cleaved-Caspase-3蛋白表达情况。结果:与模型组比较,用50和100 μmol/L水飞蓟宾预处理SH-SY5Y细胞3 h能明显减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y损伤,显著提高细胞存活率( $P < 0.01$ )和减少凋亡( $P < 0.05$ ),减少细胞内ROS水平,稳定线粒体膜电位( $P < 0.05$ ),使Cleaved-Caspase-9和Cleaved-Caspase-3的表达量下降。结论:水飞蓟宾可以保护SH-SY5Y细胞免受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的损伤,其机制可能与水飞蓟宾的抗氧化性、保护线粒体膜电位和降低Cleaved-Caspase-9和Cleaved-Caspase-3的表达量有关。

**[关键词]** 水飞蓟宾;氧化应激;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;帕金森病

**[中图分类号]** R741.05

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)04-515-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20200410

## Protective effects and mechanism of silibinin on SH-SY5Y cell injury induced by hydrogen peroxide

RONG Jiamin, YU Ming, GE Yakun, ZHANG Renwen, LAO Jun, ZHANG Yuanxin\*

College of Food & Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect and possible mechanism of silibinin on cell damage of SH-SY5Y induced by hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). **Methods:** SH-SY5Y cell damage model was established by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. After pretreatment with silibinin, the cell viability was determined by MTT, reactive oxygen species(ROS), apoptosis and mitochondrial membrane potential(MMP) were determined by flow cytometry, and the expressions of Cleaved-Caspase-9 and Cleaved-Caspase-3 were detected by Western blot. **Results:** Compared to the model group, pretreatment with 50 μmol/L and 100 μmol/L silibinin for 3 h attenuated the damage of SH-SY5Y cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, improved the cell survival rate( $P < 0.05$ ), reduced the apoptosis rates( $P < 0.05$ ) and the release of ROS, stabilized MMP( $P < 0.01$ ), decreased the expression of Cleaved-Caspase-9 and Cleaved-Caspase-3. **Conclusion:** Silibinin can protect SH-SY5Y cell from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which may be related to its antioxidant capacity, protection of mitochondrial membrane potential, and reduction of the expression of Cleaved-Caspase-9 and Cleaved-Caspase-3.

**[Key words]** silibinin; oxidative stress; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Parkinson's disease

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04):515-520]

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见

**[基金项目]** 吉林省省级产业创新专项资金(2018C049-4);吉林省教育厅科研项目[吉教科合字(2016)第133号];吉林市科技局项目(201750259);吉林化工学院校级重大项目(20180101)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yxzhang@jlicet.edu.cn

的神经退行性疾病,其特征就在于黑质中多巴胺能神经元的选择性丧失。推测许多因素在PD的黑质纹状体多巴胺能神经元细胞死亡机制中起作用,包括氧化应激、活性氧(reactive oxygen species, ROS)的细胞毒性、细胞内钙稳态的紊乱和外源、内源性毒素以及线粒体功能障碍<sup>[1]</sup>。ROS在氧化应激中扮演重要的角色<sup>[2]</sup>,过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是ROS的主要成分

之一,可以跨膜扩散进入细胞内,是目前比较常用的细胞氧化应激诱导剂,常用来建立细胞氧化应激损伤模型。

预防由氧化应激诱导的细胞死亡的合理方法之一是从膳食或药物中摄入抗氧化剂。水飞蓟宾是从水飞蓟种子中提取出来的一类天然多酚类黄酮,是水飞蓟素的主要活性成分<sup>[3]</sup>,其用于肝脏疾病的治疗已经有2 000多年的历史<sup>[4]</sup>。目前大量研究表明水飞蓟素对各种神经障碍模型如阿尔茨海默病、PD和脑缺血具有保护作用。而减少氧化应激、炎症细胞因子和改变细胞凋亡机制是水飞蓟素神经保护的主要机制<sup>[5]</sup>。有研究发现水飞蓟素通过提高酶和非酶抗氧化功能来保护神经元免受氧化应激和亚硝化应激,它能够抑制氧自由基、超氧自由基以及蛋白质氧化产物的形成<sup>[6]</sup>。水飞蓟素混合物中的水飞蓟宾主要负责其抗氧化活性<sup>[7]</sup>。水飞蓟素治疗可降低乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、一氧化氮(nitric oxide, NO)和ROS水平,维持氧化还原平衡<sup>[8]</sup>。此外,它还能通过维持线粒体功能的完整性来抑制线粒体凋亡途径<sup>[9-10]</sup>。目前对于水飞蓟宾在神经保护方面的研究较少且其机制尚不清楚,本文研究了水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞株购自上海中科院细胞库。MTT(Amresco公司,美国),水飞蓟宾、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司,美国);DMEM、F12(大连美伦生物);胎牛血清(天津康源生物技术有限公司),ROS检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天有限公司);凋亡检测试剂盒、Mouse Anti-Active Caspase-3、Mouse Anti-Caspase-9、Anti-Mouse IgG/HRP(Bioss公司,美国),GAPDH(Santa Cruz公司,美国)。流式细胞仪(BECKMAN公司,美国),CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Thermo公司,美国),细胞成像微孔板检测系统(Biotek Cytation 5,美国),蛋白电泳仪、化学发光成像系统(BIO-RAD公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及药物配制

用含胎牛血清(10%)、链霉素(100 U/mL)、青霉素(100 U/mL)的DMEM/F12混合培养基,在恒温37℃含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养SH-SY5Y细胞。水飞蓟宾用DMSO配制成500 mmol/L的母液,再用培

养基稀释成实验浓度。

#### 1.2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导SH-SY5Y细胞氧化损伤模型的建立

取生长状态良好的SH-SY5Y细胞按照1×10<sup>4</sup>个/孔接种到96孔板中,待细胞覆盖率达到70%~80%,用0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用于细胞,每组设置3个复孔,24 h后加入100 μL不完全培养基和10 μL 5 mg/mL MTT,继续培养4 h后吸出孔内培养基,每孔加入150 μL DMSO,震荡6 min,在酶标仪490 nm波长下检测每孔吸光度。

#### 1.2.3 水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞活力的影响

细胞培养同上,待细胞的覆盖率达到70%~80%,分别加入水飞蓟宾0、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000、400.000、800.000 μmol/L作用于细胞,每组设置3个复孔,24 h后,用MTT法测定吸光度值。

#### 1.2.4 水飞蓟宾保护SH-SY5Y的最佳时间和药物浓度的筛选

细胞培养同上,待细胞的覆盖率达到70%~80%,分别加入水飞蓟宾0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00 μmol/L作用于细胞3、6、12 h,弃去培养液,再加入终浓度为200 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>培养24 h,用MTT法测定吸光度值。

#### 1.2.5 细胞凋亡的检测

流式细胞术检测细胞凋亡率。取状态良好的SH-SY5Y细胞以4×10<sup>5</sup>个/孔接种6孔板,待细胞覆盖率达到70%~80%,替换为含水飞蓟宾50、100 μmol/L的完全培养基2 mL,空白组和模型组只更换培养基,预处理细胞3 h后,吸出培养基,空白组只更换培养基,模型组和水飞蓟宾组加入含200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养基2 mL处理细胞24 h后收集细胞,用预冷的PBS洗涤细胞2次,按照试剂盒说明书,用1× Binding Buffer结合液调节细胞浓度为1×10<sup>6</sup>个/mL,吸取100 μL的细胞液于1.5 mL离心管中,加入4 μL AnnexinV-FITC和4 μL PI染料室温避光孵育5 min,上机检测。

#### 1.2.6 细胞内ROS水平的测定

流式细胞术检测细胞内ROS含量。细胞培养和药物处理条件同上,药物处理后收集细胞,每组加入无血清培养基稀释好的DCFH-DA染料1 mL,37℃细胞培养箱内孵育20 min。孵育后用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,上机检测。

#### 1.2.7 JC-1染色检测线粒体膜电位

细胞培养和药物处理条件同上,药物处理后离

心收集细胞,用500 μL的完全培养基重悬细胞,加入500 μL JC-1染色工作液37℃下温育20 min,离心收集细胞,用染色缓冲液洗涤细胞2次,用流式细胞仪检测。

### 1.2.8 Western blot法检测Caspase-9和Caspase-3蛋白表达情况

细胞分组处理同上,PBS洗涤细胞2次,每组加入适量含1 mmol/L蛋白酶抑制剂PMSF的细胞裂解液,冰上充分裂解30 min,4℃13 000 g离心5 min,收上清,用BCA法测定蛋白浓度。取40 μg总蛋白,经10%的SDS-PAGE分离后,转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h;分别加入用TBST稀释的Mouse Anti-Caspase-3(1:500)、Mouse Anti-Caspase-9(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)抗体,4℃过夜孵育,用TBST洗膜3次,每次10 min,加入抗鼠的IgG(1:2 000),室温孵育2 h,TBST洗膜3次,每次10 min,用ECL超敏化学发光试剂盒显影。

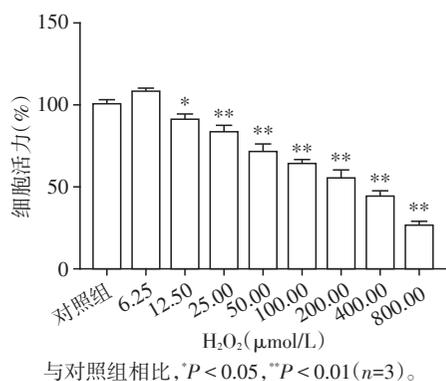
### 1.3 统计学方法

采用SPSS19.0统计分析软件处理。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示,两组间比较采用*t*检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对SH-SY5Y细胞活力的影响

MTT法检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对SH-SY5Y细胞活力的影响(图1)。SH-SY5Y细胞经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后细胞活力明显下降,在12.5~800.0 μmol/L浓度范围内,随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度升高,细胞活力呈梯度下降,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ),当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度为200 μmol/L时细胞活力为(55.00±1.52)%,接近50%,故选择200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为最佳模型浓度。



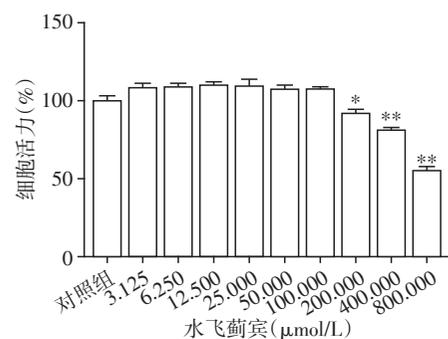
与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对SH-SY5Y细胞活力的影响

Figure 1 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the cell viability of SH-SY5Y cells

### 2.2 水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞活力的影响

MTT法检测水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞活力的影响(图2)。水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞活力的抑制作用不明显,只有当水飞蓟宾的浓度高于200 μmol/L时才显著抑制细胞的活力( $P < 0.05, P < 0.01$ ),为了验证水飞蓟宾低浓度长时间预处理和高浓度短时间预处理对SH-SY5Y细胞的保护效果,后续实验水飞蓟宾的浓度选择从6.25~800.00 μmol/L。预处理时间选择3、6、12 h。



与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图2 不同浓度水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞活力的影响

Figure 2 Effects of silibinin on the cell viability of SH-SY5Y cells

### 2.3 水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞氧化损伤的保护

MTT法检测水飞蓟宾保护SH-SY5Y细胞免受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤情况(图3)。用水飞蓟宾25、50、100、200 μmol/L预处理SH-SY5Y细胞3 h后,对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞损伤起到了保护作用,与模型组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且50 μmol/L和100 μmol/L的水飞蓟宾保护作用具有显著的统计学差异( $P < 0.01$ )。用不同浓度水飞蓟宾分别预处理6 h和12 h,其保护效果均明显弱于预处理3 h,所以后续实验选择水飞蓟宾浓度为50 μmol/L和100 μmol/L,预处理时间为3 h。

### 2.4 水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞凋亡的影响

Annexin-V/PI双标流式细胞术检测细胞的凋亡情况(图4)。对照组细胞凋亡率为(4.52±2.98)%;200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用细胞24 h后,模型组细胞的凋亡率为(26.10±2.56)%,与对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显著诱导了细胞的凋亡( $P < 0.05$ );当加入50、100 μmol/L的水飞蓟宾预处理后细胞凋亡率分别为(14.30±1.21)%和(20.01±4.09)%。与模型组相比,水飞蓟宾预处理组显著减少了细胞凋亡( $P < 0.05$ )。

### 2.5 水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞内ROS的影响

DCFH-DA单标流式细胞术检测细胞内ROS的

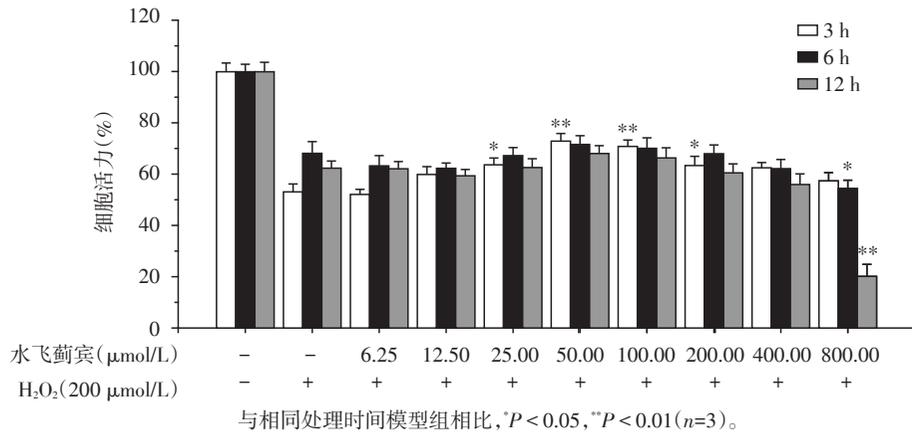


图3 水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞活力的影响

Figure 3 Effects of silibinin on the cell viability of SH-SY5Y cells incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

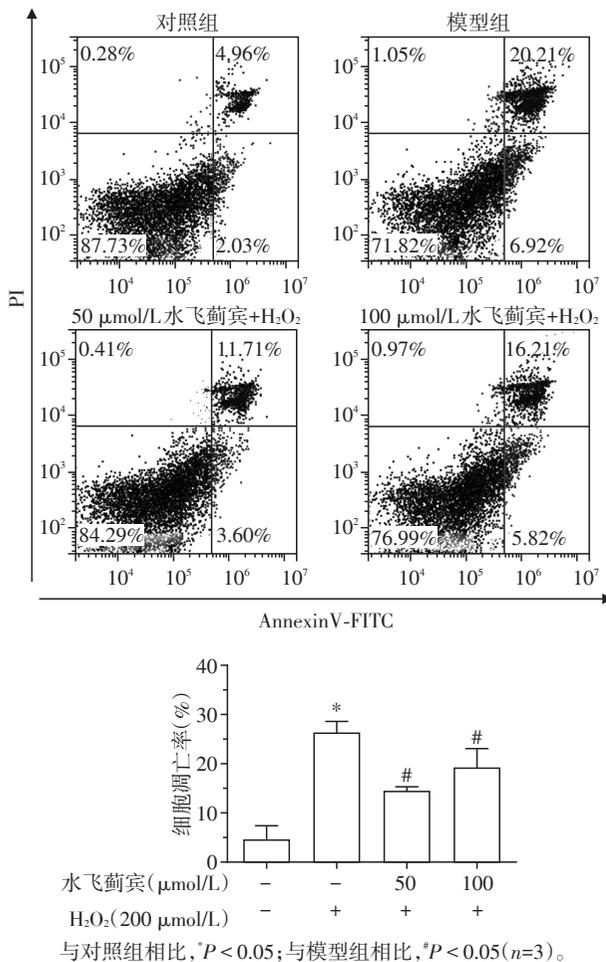


图4 流式细胞仪分析水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of silibinin on the apoptosis of SH-SY5Y cells incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by FCM

水平(图5)。200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以使细胞内ROS水平增多,与对照组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05);用50 μmol/L和100 μmol/L的水飞蓟宾预处

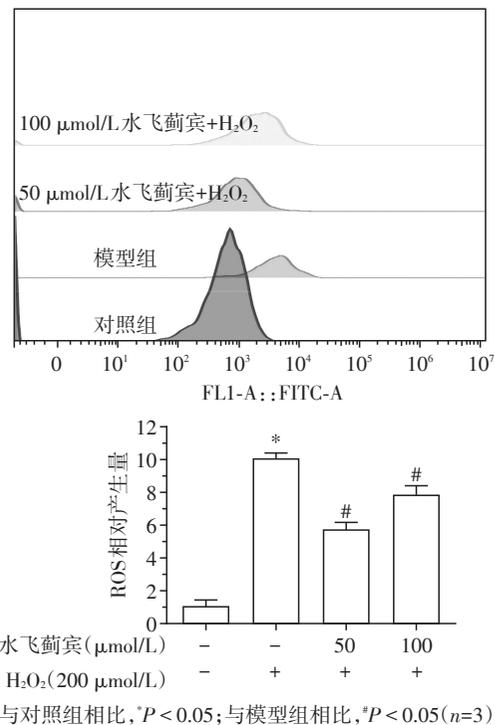


图5 流式细胞仪分析水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞活性氧含量的影响

Figure 5 Effects of silibinin on the ROS levels of SH-SY5Y cells incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by FCM

理细胞后,细胞内ROS的含量明显降低,与模型组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05),表明水飞蓟宾预处理后可以降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的ROS水平增加。

### 2.6 水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞线粒体膜电位的影响

JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的理想荧光探针。在线粒体膜电位较高时,JC-1以聚合物形式聚集在线粒体的基质中,可以产生红色荧光;在线粒

体膜电位较低时,JC-1 单体不能聚集在线粒体的基质中,可以产生绿色荧光。因此,荧光颜色是反映线粒体膜电位变化的有效探针。通常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。本实验结果见图6所示。对照组的绿色荧光(JC-1 单体)占比为(4.53±0.98)%;当加入200 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理细胞后,绿色荧光占比为(24.07±3.21)%,与对照组相比,模型组线粒体膜电位下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );用50 μmol/L和100 μmol/L的水飞蓟宾预处理后绿色荧光占比分别为(10.25±2.56)%和(14.12±2.47)%,与模型组相比,水飞蓟宾预处理组明显升高了线粒体膜电位( $P < 0.05$ )。表明水飞蓟宾对恢复细胞线粒体膜电位具有一定作用。

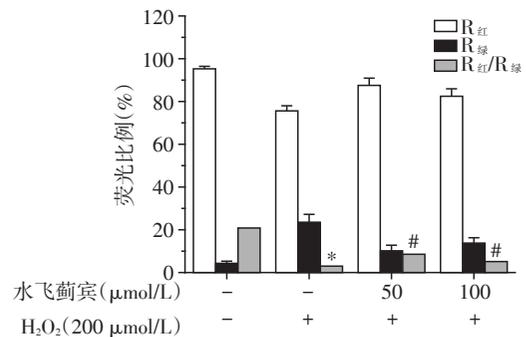
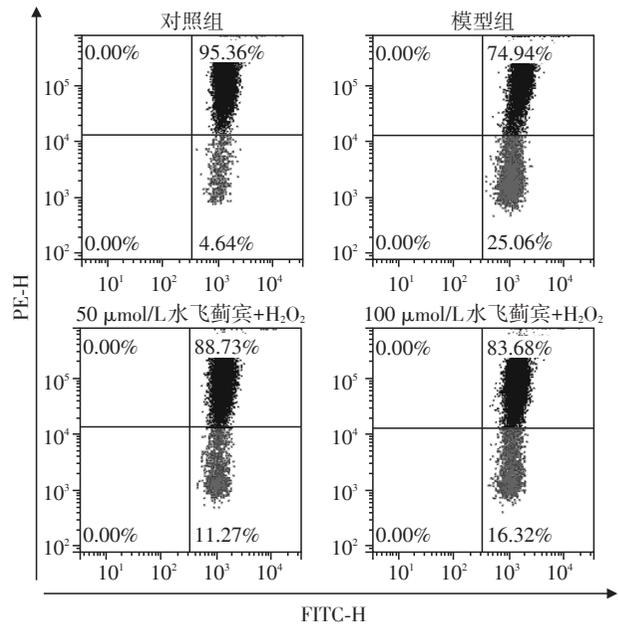
### 2.7 水飞蓟宾对SH-SY5Y细胞内 Cleaved-Caspase-9与 Cleaved-Caspase-3蛋白表达的影响

Western blot 法检测凋亡相关蛋白表达情况(图7)。与对照组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以诱导 Cleaved-Caspase-9和 Cleaved-Caspase-3表达增加,而水飞蓟宾预处理后细胞的 Cleaved-Caspase-9和 Cleaved-Caspase-3表达较模型组减少。提示水飞蓟宾预处理后能够抑制凋亡相关蛋白 Caspase-9和 Caspase-3激活,从而减少H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡。

### 3 讨论

PD为年龄依赖的黑质多巴胺能神经元退行性疾病<sup>[11-12]</sup>,目前尚无治愈的方法<sup>[13]</sup>。研究表明,氧化应激和线粒体功能紊乱是诱发PD的主要因素,以保护线粒体和抗氧化为目标已成为预防PD疾病的主要研究热点<sup>[14]</sup>。

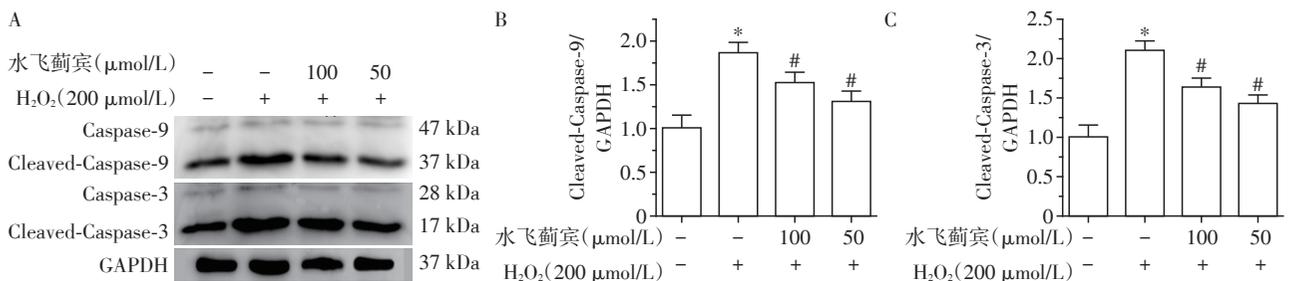
ROS水平是评价细胞氧化还原状态的主要指标,当细胞ROS的生成和消耗处于不平衡状态时就会诱发细胞产生氧化应激<sup>[15]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是一种重要的



与对照组相比,  $P < 0.01$ ; 与模型组相比,  $^*P < 0.05$  ( $n=3$ )。  
图6 流式细胞仪分析水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞线粒体膜电位影响

Figure 6 Effects of silibinin on the MMP of SH-SY5Y cells incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by FCM

ROS,极易透过细胞膜,与细胞内铁离子形成高活性的自由基,导致一系列损伤细胞的反应<sup>[16]</sup>。本研究发现,与对照组相比,加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后细胞ROS水平和细胞凋亡显著增加( $P < 0.05$ )。氧化应激可能会导



A: Western blot 检测细胞中 Caspase-9/Cleaved-Caspase-9和 Caspase-3/Cleaved-Caspase-3的表达; B: Cleaved-Caspase-9蛋白相对表达量分析结果; C: Cleaved-Caspase-3蛋白相对表达量分析结果。与对照组相比,  $^*P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^*P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图7 水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞Caspase-9/Cleaved-Caspase-9和Caspase-3/Cleaved-Caspase-3蛋白表达的影响  
Figure 7 Effects of silibinin on the expression of Caspase-9/Cleaved-Caspase-9 and Caspase-3/Cleaved-Caspase-3 of SH-SY5Y cells incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

致细胞发生线粒体功能紊乱,释放细胞色素C,进一步刺激凋亡的启动子Caspase-9和凋亡的执行者Caspase-3来诱导细胞凋亡,造成细胞氧化损伤,而线粒体膜电位下降是细胞发生凋亡的早期事件<sup>[17]</sup>。本实验发现当加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后,细胞线粒体膜电位显著下降,Cleaved-Caspase-9和Cleaved-Caspase-3的表达量也会增多,说明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>成功诱导SH-SY5Y细胞的氧化损伤。有研究发现水飞蓟宾对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的PC12神经元凋亡具有一定的保护作用,这可能是通过水飞蓟宾的抗氧化应激作用来实现的<sup>[18]</sup>。也有研究表明黄酮类物质可以阻断氧化应激诱导的神经元损伤,该作用是通过阻断Caspase-3的激活而实现的<sup>[19]</sup>。李卫萍等<sup>[20]</sup>研究发现醒脑静对A $\beta$ 诱导的SH-SY5Y细胞凋亡具有保护作用,主要是由于醒脑静抑制了A $\beta$ 通过线粒体途径诱导的细胞凋亡。本研究发现,使用50  $\mu$ mol/L和100  $\mu$ mol/L的水飞蓟宾预处理SH-SY5Y细胞后,可以显著逆转H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导细胞的凋亡、线粒体膜电位降低和ROS的产生以及Cleaved-Caspase-9和Cleaved-Caspase-3的表达,对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的SH-SY5Y细胞氧化损伤具有一定的保护作用。

## [参考文献]

- [1] OLANOW C W. A rationale for monoamine oxidase inhibition as neuroprotective therapy for Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 1993, 8(Suppl 1): S1
- [2] AL-AYADHI L Y. Oxidative stress and neurodegenerative disease [J]. *Neurosciences*, 2004, 9(1): 19
- [3] GAZAK R, WALTEROVA D, KREN V. Silybin and silymarin - new and emerging applications in medicine [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(3): 315-338
- [4] KAUR M, AGARWAL R. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: How close we are to bedside? [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224(3): 350-359
- [5] BORAH A, PAUL R, CHOUDHURY S, et al. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(11): 847-853
- [6] CHTOUROU Y, TRABELSI K, FETOUI H, et al. Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(8): 1546-1557
- [7] PEREZ H J, CARRILLO S C, GARCIA E A, et al. Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Toxicology*, 2014, 319: 38-43
- [8] CHTOUROU Y, FETOUI H, SEFI M, et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats [J]. *Biometals*, 2010, 23(6): 985-996
- [9] FERNANDEZ-MORIANO C, GONZALEZ-BURGOS E, GOMEZ-SERRANILLOS M P. Mitochondria-targeted protective compounds in Parkinson's and Alzheimer's diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 408927
- [10] 王红军,姜媛媛,路平,等.水飞蓟宾的抗肿瘤、抗氧化和免疫调节分子药理学机制研究进展 [J]. *药学学报*, 2010, 45(4): 413-421
- [11] PINTO M, NISSANKA N, MORAES C T. Lack of parkin anticipates the phenotype and affects mitochondrial morphology and mtDNA levels in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(4): 1042-1053
- [12] THOME A D, HARMS A S, VOLPICELLI-DALEY L A. microRNA-155 regulates alpha-synuclein-induced inflammatory responses in models of parkinson disease [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(8): 2383-2390
- [13] ALDAKHEEL A, KALIA L V, LANG A E. Pathogenesis-targeted, disease-modifying therapies in Parkinson disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2014, 11(1): 6-23
- [14] JIN H J, KANTHASAMY A, GHOSH A, et al. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(8, SI): 1282-1294
- [15] STORZ G, IMLAY J A. Oxidative stress [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(2): 188-194
- [16] SINHA K, DAS J, PAL P B, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(7): 1157-1180
- [17] 戴振华,王亮,雍永宏.阿替洛尔对过氧化氢损伤小鼠心肌细胞有保护作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 28(5): 618-620, 634
- [18] JIANG H H, YAN F S, SHEN L, et al. Silymarin versus Silibinin: differential antioxidant and neuroprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in PC12 cells [J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11(5): 633-636
- [19] SCHROETER H, SPENCER J P, RICE-EVANS C, et al. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3 [J]. *Biochem J*, 2001, 358(Pt 3): 547-557
- [20] 李卫萍,杜菊梅,张磊,等.醒脑静对A $\beta$ 诱导的SH-SY5Y细胞凋亡的保护作用及机制 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(1): 26-29

[收稿日期] 2019-06-13