

· 论 著 ·

毛蕊花糖苷通过调节线粒体自噬保护帕金森病神经细胞的作用研究^{*}

木塔力甫·艾买提¹,伊木然江·苏布哈提²,伊力亚尔·尼加提¹,艾尼瓦尔·吾买尔²,米娜^{3△}
(1. 新疆医科大学中心实验室,新疆 乌鲁木齐 830011;2. 新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830017;
3. 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨毛蕊花糖苷(ACT)对帕金森病(PD)细胞模型的保护作用,并揭示其可能的机制。**方法** 应用鱼藤酮(ROT)和 6-羟基多巴胺(6-OHDA)干预 PC-12 和 SH-SY5Y 细胞构建 PD 细胞模型,采用 MTT 比色法检测不同浓度 ACT 对 PC-12 细胞活性的影响;流式细胞技术分别检测 ACT 对 6-OHDA 和 ROT 损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用。利用激光共聚焦显微镜观察 ACT 对 NRK 和 PC-12 细胞线粒体自噬的影响。应用分子对接技术预测 ACT 与 PINK1、Parkin 的对接姿势和能量。**结果** ACT 对 PC-12 细胞作用 24 h 的 IC₅₀ 值为 695.5 μM;ACT 能降低 ROT 和 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞的凋亡发生率,差异有统计学意义($P<0.01$),且明显提高 NRK 和 PC-12 细胞的线粒体自噬水平;ACT 对 PINK1 和 Parkin 均具有较强的对接亲和力,其亲和能量均为-9.0 kcal/mol。**结论** ACT 可能通过抑制细胞凋亡和调节 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬而保护 PD 神经细胞。

[关键词] 毛蕊花糖苷; 帕金森病; 细胞凋亡; 线粒体自噬; 分子对接

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.16.003 **中图法分类号:**R915;R966

文章编号:1009-5519(2023)16-2715-06 **文献标识码:**A

Study on the protective effect of acteoside on nerve cells in Parkinson's disease by regulating mitochondrial autophagy^{*}
AIMAITI Mutalifu¹,SUBUHATI Yimuranjiang²,NIJIATI Yiliyaer¹,WUMAIER Ainiwaer²,MI Na^{3△}
(1. Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830017, China; 3. Research Institute of Clinical Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[Abstract] **Objective** To explore the protective effects and the possible underlying mechanism of acteoside (ACT) on the cell model of Parkinson's disease (PD). **Methods** The PD cell model was constructed by intervening PC-12 and SH-SY5Y cells with rotenone (ROT) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA). MTT colorimetric assay was used to detect the effect of different concentrations of ACT on PC-12 cell activity. Flow cytometry was used to detect the effect of ACT on apoptosis of SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA and ROT. Molecular docking techniques were used to predict the docking posture and energy of ACT with PINK1 and Parkin. **Results** The IC₅₀ value of ACT on PC-12 cells for 24 h was 695.5 μM. ACT decreased apoptosis rate of SH-SY5Y cells injured by 6-OHDA and ROT ($P<0.01$). ACT significantly enhanced mitophagy levels of the NRK and PC-12 cells. ACT had stronger docking effects and affinity energy between both PINK1 and Parkin, both of them had the same binding energy of -9.0 kcal/mol. **Conclusion** ACT may protect PD neurons by inhibiting apoptosis and regulating PINK1/Parkin-mediated mitophagy.

[Key words] Acteoside; Parkinson's disease; Apoptosis; Mitophagy; Molecular docking

帕金森病(PD)是一种慢性、进行性神经退行性疾病,临床表现为运动迟缓、静止性震颤、言语障碍、肌肉僵硬和姿势不稳等^[1]。PD 对患者和家属生活质量的影响巨大,甚至会给全社会造成沉重的经济负

^{*} 基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划自然科学青年项目(XJEDU2021Y029)。
作者简介:木塔力甫·艾买提(1986—),博士研究生,助理研究员,主要从事神经退行性疾病药理学研究。△ 通信作者,E-mail:mina2a@163.com。

担^[2]。截至 2020 年,在全球范围内已被注册和正在进行临床试验的 PD 候选药物有 145 种^[3],这些药物虽然能缓解症状、减缓疾病的进程,但随着病情的发展和恶化,可用的药物和对治疗方案会越来越有限,甚至无效^[3-4]。中医药对复杂性疾病的治疗有其独特的理论依据和治疗效应,在预防和延缓 PD 和其他老年性痴呆等神经退行性疾病方面具有较好的疗效^[5]。毛蕊花糖苷(ACT)是肉苁蓉^[6]、地黄^[7]和老鼠簕^[8]等多种中草药的重要活性成分之一,具有抗氧化^[8]、抗病毒^[9]、抗肿瘤^[10]、免疫调整^[11]和神经保护^[8,12]等多种生物效应和药理学活性,化学结构式见图 1。目前,关于 ACT 改善 PD 的作用机制尚不清楚。故本研究分别应用鱼藤酮(ROT)和 6-羟基多巴胺(6-OHDA)干预 PC-12 和 SH-SY5Y 细胞构建 PD 细胞模型,探讨 ACT 改善 PD 的作用,采用基因转染和激光共聚焦显微镜观察等技术分析 ACT 对线粒体自噬的影响,进一步运用分子对接技术讨论 ACT 通过调节线粒体自噬改善 PD 的分子机制,为 ACT 在药物研发中的发展提供理论和实验依据。

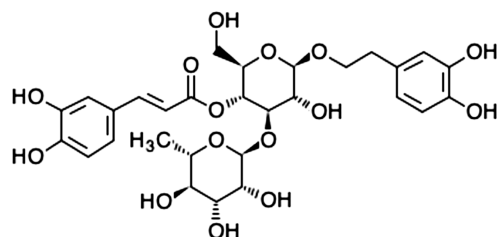


图 1 ACT 的化学结构式

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及试剂 ACT(HPLC 法检测纯度大于或等于 99.9%, #Y03F9H54484)购自上海源叶生物科技有限公司,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC-12 和人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。GFP-LC3(细胞自噬相关蛋白)载体和 TOM20(一种线粒体外膜蛋白)-GFP 稳定表达的大鼠肾细胞 NRK 为清华大学俞立教授提供。二甲基亚砜(DMSO, #D2447)、四甲基偶氮唑盐(MTT, #CT02)为日本 Sigma 公司产品。DMEM 高糖培养基(#8122122)为美国 Gibco 公司产品,胎牛血清(#2176404)为以色列 Biological Industries 公司产品,马血清(#16050122)为美国 Invitrogen 公司产品,胰蛋白酶(#15050065)为美国 Gibco 公司产品。Annexin V-PE/7-AAD 双染色细胞凋亡检测试剂盒(#559763)为美国 BD 公司产品,ROT(#28875)、6-OHDA(#H4381)为日本 Sigma 公司产品,线粒体红色荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos(#C1049B)为碧云天生物技术公司产品,溶酶体红色荧光探针 LysoTracker Red DND-99(#L-7528)为美国

Life Technologies 公司产品,细胞通透性细胞核复染剂 Hoechst 33342(#45885A)和遗传素(Geneticin, G418, #10131027)为美国 Invitrogen 公司产品。

1.1.2 仪器 二氧化碳培养箱:美国 Thermo Scientific 公司(HERAcell® 150i/240i),生物安全柜:美国 Thermo 公司(HERA SAFE KS),酶标仪:美国 Thermo Scientific 公司(Multiskan FC),四工位磁力搅拌水浴锅:上海赫田科学仪器有限公司(HJ-M4),倒置显微镜:中国舜宇公司(XD),低温高速离心机:美国 Sigma 公司(3-18KS),细胞核转染系统:瑞士 Lonza 公司(D-Nucleofector™),流式细胞仪:美国 BD 公司(LSRII),激光共聚焦显微镜:日本尼康公司(Ti-E C2+).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC-12 细胞、SH-SY5Y 细胞和 NRK 细胞置于二氧化碳(CO₂)培养箱(37℃, 50 mL/L CO₂)内培养,对 SH-SY5Y 细胞和 NRK 细胞给予含有 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 完全培养基(简称培养基),其内另加 0.292 μg/mL 谷氨酸、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素;对于 PC-12 细胞的培养,其培养基成分除了上述 DMEM 完全培养基所含成分外还要加入 5%(v/v)马血清。视细胞增殖状况,1~3 d 后进行换液、传代,细胞复苏后继续传 3 代,当细胞增殖进入对数生长期时,可以进行冻存或实验;ACT、6-OHDA 和 ROT 临用前以 DMSO 溶解,配成浓度分别为 250、200、500 mmol/L 的母液,其工作液用培养基稀释成不同浓度药物,同时保证培养基中 DMSO 浓度小于或等于 0.5%。

1.2.2 检测 ACT 对 PC-12 细胞活性的影响 取对数增长期的 PC-12 细胞,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化培养细胞,用含有 10%(v/v)胎牛血清和 5%(v/v)马血清的培养基重悬成单个细胞悬液,以每孔 5×10³ 个细胞密度接种于 96 孔培养板,将培养板置放于 CO₂ 培养箱,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下常规培养。10~16 h 后弃掉旧培养基,每孔加入浓度分别为 25、50、100、200、400、800 μmol/L 的含药培养基 200 μL,并另设对照组(含同浓度 DMSO 的培养基)和空白组(只含培养基,不含细胞和药物),以上各组均设 4 个复孔。分别将各组细胞继续培养 24 h 后,弃上清液,用 PBS 洗涤 1 遍,在避光条件下,每孔加入 MTT 溶液(0.25 g/L)200 μL,继续培养 4 h,弃掉 MTT 溶液,每孔加入 150 μL DMSO,轻轻振荡 10 min,使结晶充分溶解,用酶联免疫标记分析仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度值(A 值)。细胞存活率=(A 值_{处理组} - A 值_{空白组})/A(A 值_{对照组} - A 值_{空白组})×100%。

1.2.3 检测 ACT 对神经毒素损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 取对数增长期的 SH-SY5Y 细胞经胰

蛋白酶消化后,以每孔 $(1\sim5)\times10^5$ 个细胞密度接种于 6 孔培养板培养,10~16 h 后弃掉旧培养基,分别加入浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA、1 $\mu\text{mol/L}$ ROT、50 $\mu\text{mol/L}$ ACT、40 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA + 50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 和 1 $\mu\text{mol/L}$ ROT+50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 的培养基 2 mL,并设空白对照组(含同浓度 DMSO 的培养基),为每组设置 3 个复孔,继续培养 24 h 后收集细胞,离心($2\,000\text{ r/min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 5 min,弃上清液,取 $2\sim10)\times10^5$ 细胞悬浮液,同样条件离心、弃上清液,加入 400 μL 的 1 $\times$ Binding Buffer 重悬,分别加入 5 μL 7-AAD 和 5 μL PE Annexin V,轻轻混匀。在室温下,避光反应 5~15 min,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.2.4 构建 GFP-LC3 稳定表达的 PC-12 细胞系及观察线粒体自噬 预先配制转染质粒载体的缓冲液,并提前清理和灭菌处理电转杯备用。培养 PC-12 细胞,当细胞进入增殖旺盛的对数生长期时,用胰蛋白酶消化并离心后,用细胞转染缓冲液悬浮细胞并转至电转杯,加入一定浓度(1~2 λ)的 GFP-LC3 载体,紧接着用 Lonza 电穿孔仪进行转染,随后把细胞接种到 4 孔玻璃底培养皿中,置入 CO_2 培养箱孵育 24 h 后,在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光,确定电转染是否成功。实验中所使用的 GFP-LC3 载体具有 G418 抗性,因此本研究按照这个特点对转染后的细胞进行纯化。分别培养 TOM20-GFP 稳定表达的 NRK 细胞和上述 GFP-LC3 稳定表达的 PC-12 细胞,药物干预后用 100 nmol/L 溶酶体或线粒体红色荧光探针、200 nmol/L 细胞核复染剂进行染色,在 1 h 内进行激光共聚焦显微镜观察并采集图像,图中红色和绿色荧光共定位位点的数量和强度表明线粒体自噬发生的强度。

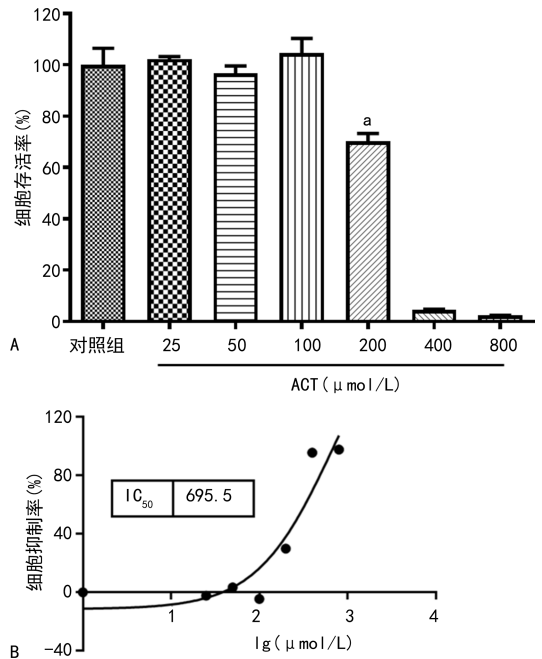
1.2.5 分子对接分析 为了探讨 ACT 改善 ROT 诱导的神经细胞线粒体自噬异常的确切作用机制,对 ACT 与线粒体自噬相关关键蛋白质进行分子对接分析。(1)采集配体(ACT)和受体(蛋白质)的分子信息:查找调节线粒体自噬相关的主要蛋白质,应用相应数据库下载 ACT(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>)和蛋白质(<https://www.rcsb.org/>)相关文件,并用 MGLTools-1.5.6、AutoDockTools 和 PyMOL^[13]对文件进行格式转换。(2)配体与蛋白质分子的自动对接:分别应用 AutoDockTools 和 AutoDock Vina^[14]对 ACT 和每一种蛋白质分子进行对接。(3)分子对接可视化分析:应用 PyMOL 对 ACT 和对应蛋白质进行结合,并把结果调整为最清楚的可视化状态后保存,进一步应用蛋白质-配体识别分析服务器^[15]进行分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 统计分析软件进行数据分析,实验计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对各组重复数据进行非参数单因素方差分析,半数抑制浓

度(IC_{50})的计算用非线性回归(拟合曲线)分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ACT 对 PC-12 细胞活性的影响 分别用不同浓度的 ACT 对 PC-12 细胞作用 24 h 后,ACT 在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度内对细胞没有毒性作用(图 2A);对实验数据进行回归分析可知,ACT 对 PC-12 细胞作用 24 h 后, IC_{50} 值为 695.5 $\mu\text{mol/L}$ (图 2B)。实验结果显示,ACT 很有可能是在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度内对神经细胞具有一定程度的治疗效应。



A. 细胞存活率(与对照组比较,* $P<0.01$);B. 细胞抑制率。

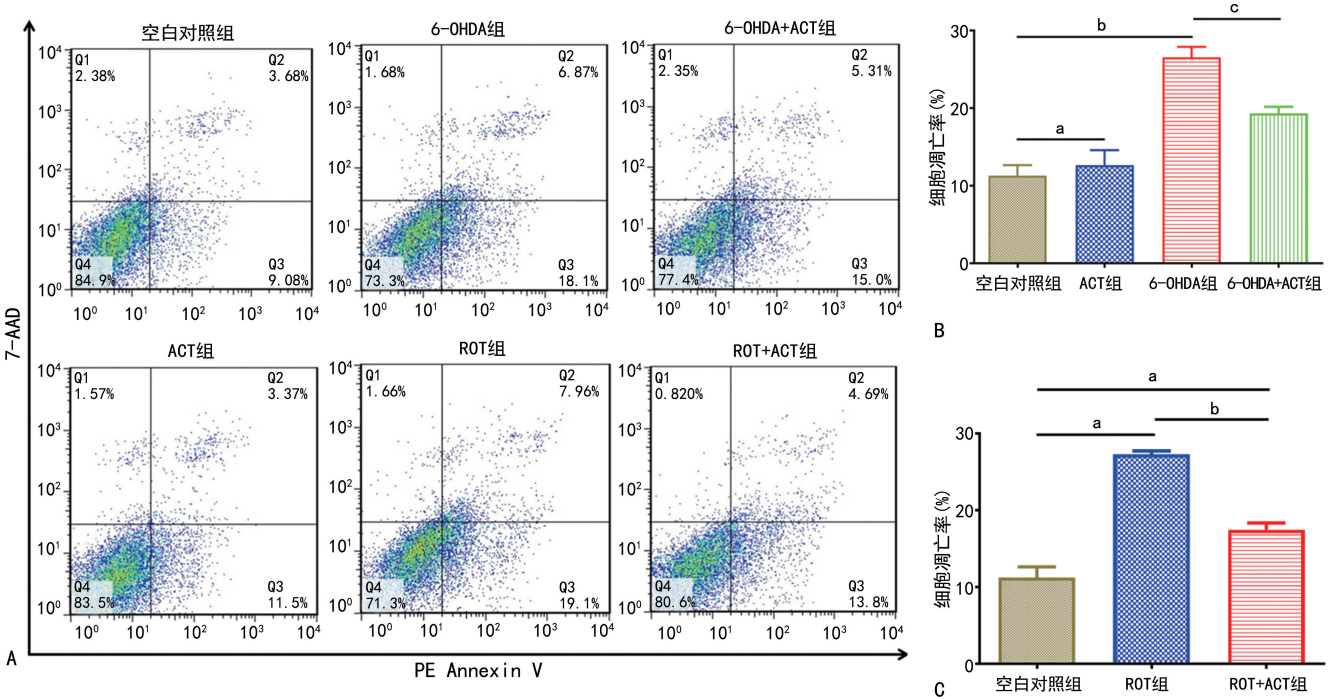
图 2 ACT 对 PC-12 细胞活性的影响

2.2 ACT 对神经毒素损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 图 3 所示,与空白对照组相比,50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 对 PC-12 细胞干预 24 h 后没有诱导细胞凋亡,40 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 和 1 $\mu\text{mol/L}$ ROT 对 PC-12 细胞作用 24 h 后明显诱导细胞凋亡,分别对 2 种模型组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 处理细胞 24 h 后明显降低细胞凋亡发生率,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 对神经细胞具有损伤修复作用,其损伤修复功能可能是通过抑制细胞凋亡而实现。

2.3 ACT 对线粒体自噬的影响 图 4 所示,与空白对照组相比,50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 对 TOM20-GFP 稳定表达的 NRK 细胞干预 4 h 后,明显提高了线粒体和溶酶体的共定位概率,表明 ACT 明显诱导 NRK 细胞的线粒体自噬水平。图 5 所示,与空白对照组相比,50 $\mu\text{mol/L}$ ACT 对 GFP-LC3 稳定表达的 PC-12 细胞干预 24 h 后,明显提高了定位在溶酶体的红色荧光位点与自噬体的 GFP-LC3 绿色荧光位点的共定位频率;虽然 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ROT 对 PC-12 细胞作用 24 h

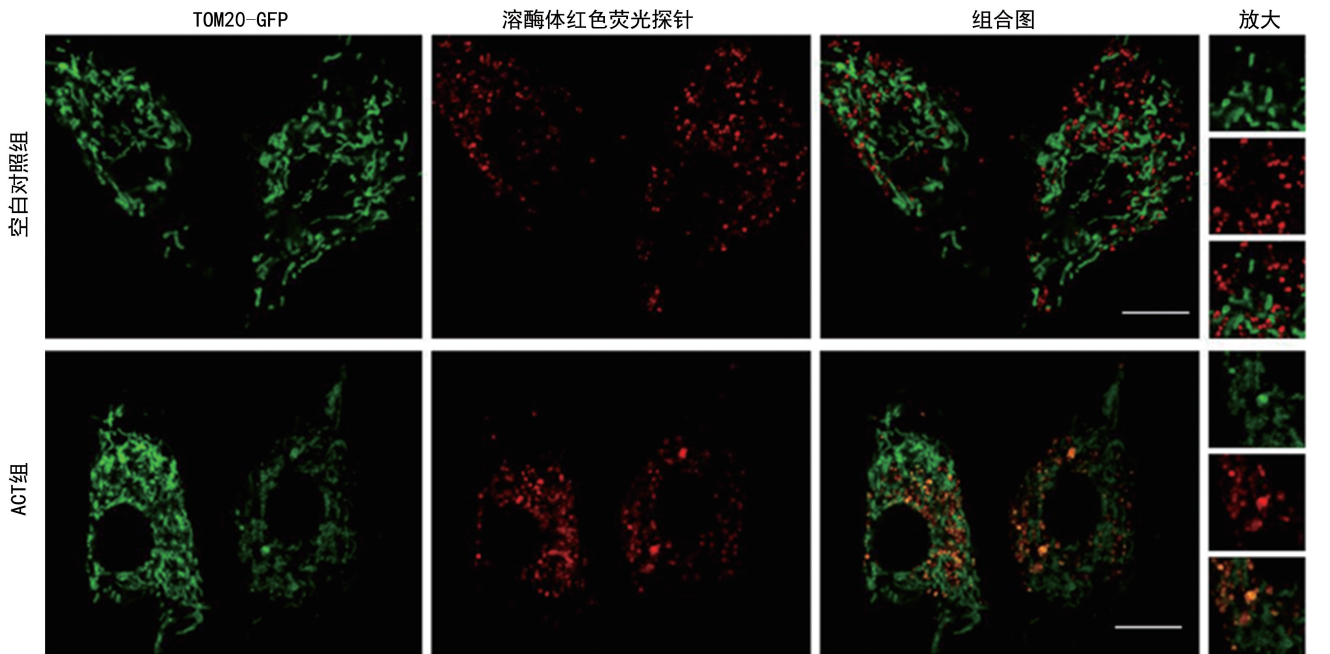
后同样也能提高线粒体自噬,但是可以发现细胞受到了一定的损伤;ROT 与 ACT 共干预细胞 24 h 后,由 ROT 引起的细胞损伤得到了实质性的改善,同时发

生线粒体自噬。此结果表明,ACT 对 ROT 损伤 PC-12 细胞的保护作用很有可能是通过调节线粒体自噬异常而实现。



A. 流式细胞术检测 ACT 对 6-OHDA 和 ROT 损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用;B. ACT 对 6-OHDA 损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡作用的统计分析结果(与空白对照组比较,^a $P>0.05$,^b $P<0.01$;与 6-OHDA 组比较,^c $P<0.01$);C. ACT 对 ROT 损伤的 SH-SY5Y 细胞凋亡作用的统计分析结果(与空白对照组比较,^a $P<0.01$;与 ROT 组比较,^b $P<0.01$)。

图 3 ACT 对神经毒素损伤的 SH-SY5Y 细胞具有抗凋亡作用

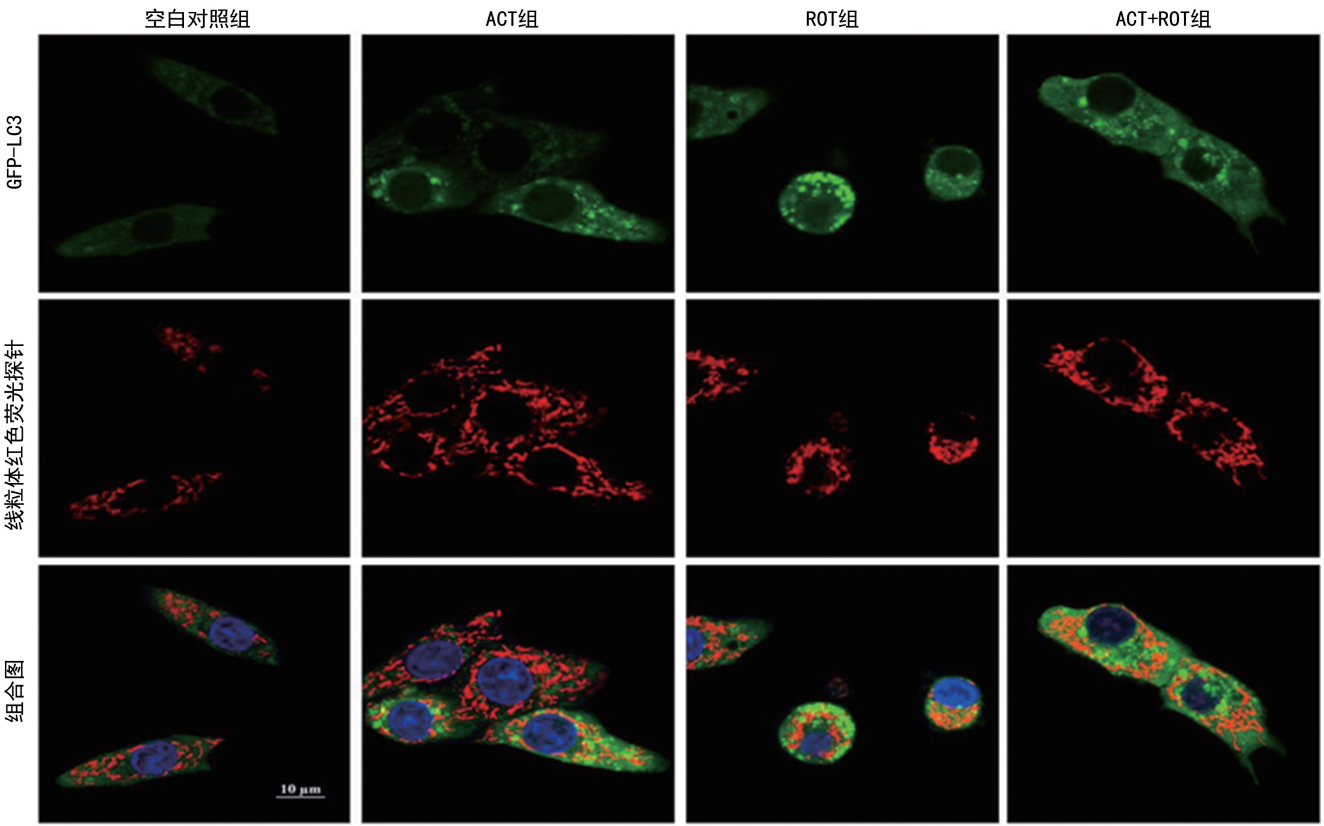


注:ACT 对 TOM20-GFP 稳定表达的 NRK 细胞作用 4 h 后明显提高线粒体自噬(比例尺 10 μ m)。

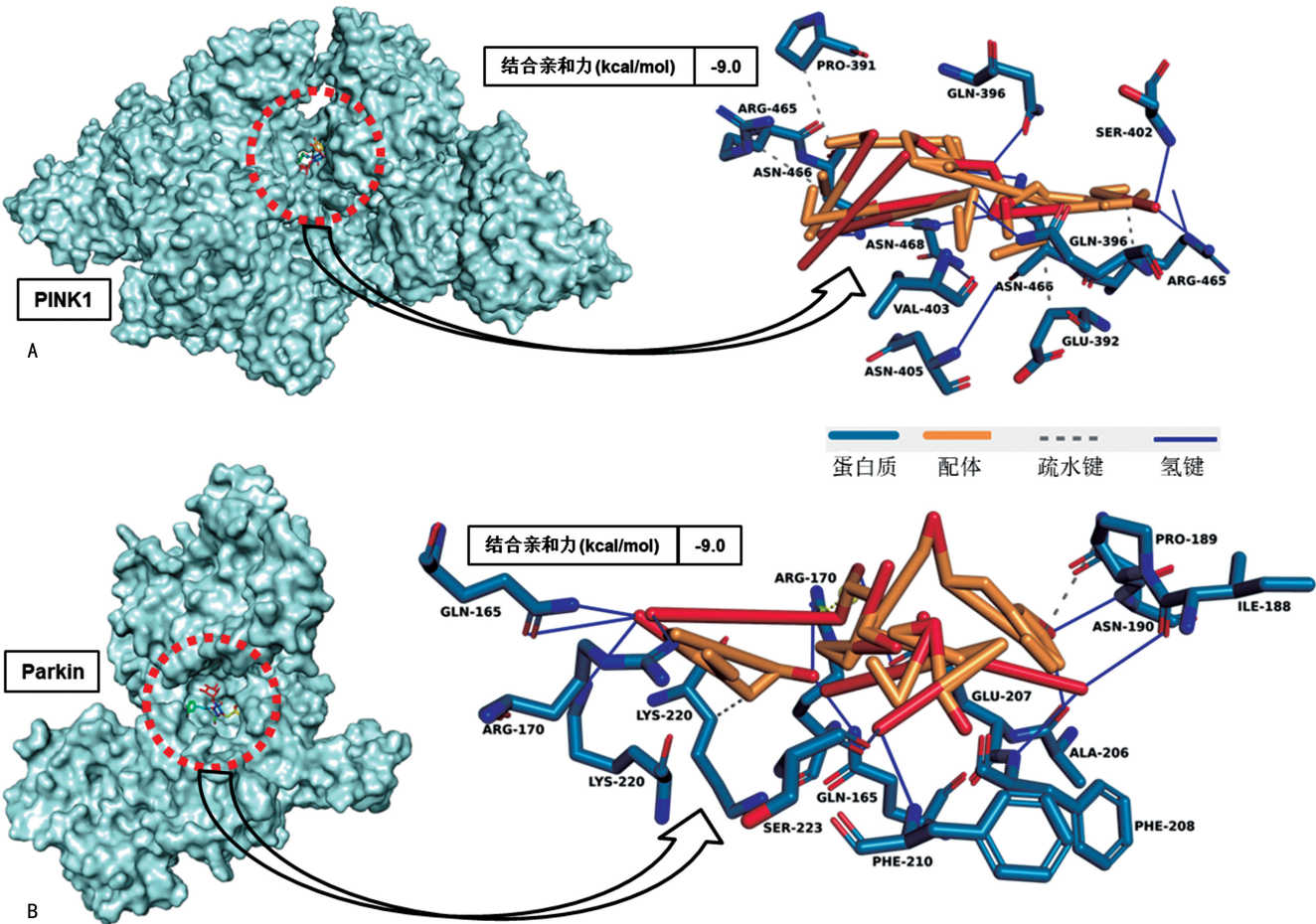
图 4 ACT 对 NRK 细胞作用提高线粒体自噬

2.4 ACT 与线粒体自噬相关蛋白之间的分子对接分析 本研究中选择线粒体自噬相关关键蛋白质 PINK1(一种泛素激酶)和 Parkin(一种 E3 泛素连接酶),与 ACT 进行分子对接分析。结果显示,ACT 对

PINK1 和 Parkin 均具有潜在的结合模式和亲和能量,它们之间的亲和能量均为-9.0 kcal/mol(图 6),说明 ACT 可能是通过激活 PINK1/Parkin 依赖性线粒体自噬途径而保护神经细胞,需要进一步实验验证。



注:ACT 对 GFP-LC3 稳定表达的 PC-12 细胞作用 24 h 后明显提高线粒体自噬。
图 5 ACT 对 PC-12 细胞作用提高线粒体自噬



A. ACT 对 PINK1(PDB ID:5OAT)的分子对接分析结果;B. ACT 对 Parkin(PDB ID:6HUE)的分子对接分析结果。

图 6 ACT 与线粒体自噬相关蛋白之间的分子对接分析

3 讨 论

PD 是中脑黑质致密部多巴胺能神经元的变性和丢失为主要病理特征的慢性神经退行性疾病^[16]。神经系统老化、环境污染、脑部损伤和遗传因素是引起 PD 的主要病因。GHAVAMI 等^[17]研究显示,神经细胞自噬和凋亡功能的障碍与 PD 发病密切相关。本研究发现,ACT 均能减少由 6-OHDA 和 ROT 损伤的神经细胞凋亡发生率。研究报道,线粒体自噬的发生能选择性清除已受损的线粒体而维持细胞正常生理功能^[18]。家族性和散发性 PD 发病过程中,神经细胞的破坏性病变集中于线粒体自噬途径上^[19]。本研究中,ACT 不仅提高了 NRK 细胞的线粒体自噬水平,而且还明显提高了 PC-12 细胞的线粒体自噬水平,同时保护细胞免受 ROT 损伤。

文献报道,线粒体自噬可分为 PINK1/Parkin 依赖性和非依赖性 2 种途径^[20]。其中,PINK1/Parkin 依赖的线粒体自噬是线粒体质量控制的最佳途径^[20]。PINK1 定位于线粒体外膜,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。Parkin 定位在细胞质中,是自身抑制的,需要通过 PINK1 激活,激活后可诱导线粒体自噬的发生,清除细胞内已受损的线粒体^[21],Parkin 与 PD 密切相关^[22]。本研究分子对接结果表明,ACT 与 PINK1 和 Parkin 之间具有较高的分子对接亲和能量,均为 -9.0 kcal/mol ,这进一步验证了 ACT 改善 PD 可能是通过介导 PINK1/Parkin 途径。本研究提示 ACT 可能是通过提高或调节 PINK1/Parkin 依赖性的线粒体自噬而保护 PD 神经细胞。

综上所述,ACT 对神经毒素损伤的神经细胞具有明显的修复和保护作用,这很可能是通过抑制细胞凋亡和诱导线粒体自噬,清除细胞内损伤线粒体的过程而实现;同时,ACT 调节的线粒体自噬很可能是属于 PINK1/Parkin 依赖型线粒体自噬。本研究并未能确认 ACT 通过调节 PINK1/Parkin 依赖的线粒体自噬途径而改善线粒体受损的神经细胞,从而治疗 PD,后期需要进一步实验验证。

参考文献

[1] PICELLI A, CAPECCI M, FILIPPETTI M, et al. Effects of robot-assisted gait training on postural instability in Parkinson's disease: A systematic review[J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2021, 57(3): 472-477.

[2] RAJIAH K, MAHARAJAN M K, YEEN S J, et al. Quality of life and caregivers' burden of

Parkinson's disease [J]. Neuroepidemiology, 2017, 48(3/4): 131-137.

[3] MCFARTHING K, BUFF S, RAFALOFF G, et al. Parkinson's disease drug therapies in the clinical trial pipeline: 2020 [J]. J Parkinsons Dis, 2020, 10(3): 757-774.

[4] CHAKRABORTY A, BRAUER S, DIWAN A. A review of possible therapies for Parkinson's disease[J]. J Clin Neurosci, 2020, 76: 1-4.

[5] 符小梅, 宋雷, 方淑环, 等. 中药调节内质网应激治疗神经退行性疾病研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(1): 149-157.

[6] AN C, PU X, WANG Q, et al. Cistanche extracts ameliorates the neurotoxicity induced by hydrogen peroxide in new mutant DJ-1-transfected neuroblastoma cellular models[J]. Brain Behav, 2019, 9(7): e01304.

[7] LI W, DENG R, JING X, et al. Acteoside ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibiting peroxynitrite-mediated mitophagy activation [J]. Free Radical Biol Med, 2020, 146: 79-91.

[8] ZHANG Y, SHEN J, MA X, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of acteoside isolated from *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis* [J]. Appl Biol Chem, 2022, 65(1): 29.

[9] XIAO Y, REN Q, WU L. The pharmacokinetic property and pharmacological activity of acteoside: A review [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113296.

[10] CHEIMONIDI C, SAMARA P, POLYCHRONOPOULOS P, et al. Selective cytotoxicity of the herbal substance acteoside against tumor cells and its mechanistic insights[J]. Redox Biol, 2018, 16: 169-178.

[11] GAN L, LI X, ZHU M, et al. Acteoside relieves mesangial cell injury by regulating Th22 cell chemotaxis and proliferation in IgA nephropathy[J]. Ren Fail, 2018, 40(1): 364-370.

[12] XIA D, ZHANG Z, ZHAO Y. Acteoside attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(11): 1645-1651.

(下转第 2724 页)

[10] 周敬华,韩瑞钰,默义,等. 非梗阻性无精子症基因多态性分析研究[J]. 中国男科学杂志,2018,32(6):28-33.

[11] 王俊龙,孙璨,李朋,等. 隐睾后非梗阻性无精子症患者睾丸精子获得率临床分析[J]. 中华泌尿外科杂志,2015,36(2):139-143.

[12] GILANY K,JAFARZADEH N,MANI-VARNOSFADERANI A, et al. Metabolic fingerprinting of seminal plasma from non-obstructive azoospermia patients:Positive versus negative sperm retrieval [J]. J Reprod Infertil, 2018,19(2):109-114.

[13] 胡皓睿,周晓明,廖明,等. 睾丸体积和生殖激素水平对非梗阻性无精子症患者睾丸中有无精子的预测价值研究[J]. 中国全科医学,2020,23:678-681.

[14] 黄维加,肖桂初,蒋英,等. 无精子症患者血清和精浆细胞因子水平的检测[J]. 中国热带医学,2006,6(4):583-584.

[15] JING T,WANG P T,ZHENG S G,et al. A novel therapeutic method for azoospermia resulted from distal deferential obslruction[J]. J Sex Med,2018,15(7):321.

[16] 高庆强,朱来晴,石亮,等. 944 例无精子症患者不同病理分型精子检出率与临床精子检出率相关性研究[J]. 国际泌尿系统杂志,2020,40(3):532-534.

[17] 张时君,杜晶,吕仁华,等. 非梗阻性无精子症患者睾丸局部生精功能的超声造影评估[J]. 上海交通大学学报(医学版),2017,37(10):1368-1371.

[18] 王俊龙,孙璨,李朋,等. 隐睾后非梗阻性无精子症患者睾丸精子获得率临床分析[J]. 中华泌尿外科杂志,2015,36(2):139-143.

[19] 赵紫东,薛生娟,王宏,等. 睾丸活组织玻璃压片镜检对无精子症的诊断价值[J]. 中国男科学杂志,2007,21(2):48-49.

[20] 檀大羨,张海英,吕福通,等. 精液生精细胞检查在无精子症鉴别诊断中的价值[J]. 江西医药,2006,41(4):195.

[21] 陈从良,赵永平,徐小明,等. 睾丸及附睾穿刺行 ICSI 治疗梗阻性无精子症的结局[J]. 当代医学,2020,26(9):16-18.

[22] 袁长巍,曹兴午,李翠英. 973 例无精子者睾丸体积、生殖激素与精液细胞学分析[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(7):925-927.

(收稿日期:2022-09-28 修回日期:2023-06-09)

(上接第 2720 页)

[13] LILL M A,DANIELSON M L. Computer-aided drug design platform using PyMOL[J]. J Comput Aided Mol Des,2011,25(1):13-19.

[14] TROTT O,OLSON A J. Autodock vina:Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem,2010,31(2):455-461.

[15] SALENTIN S,SCHREIBER S,HAUPT V J, et al. PLIP:Fully automated protein-ligand interaction profiler[J]. Nucleic Acids Res,2015,43(W1):W443-447.

[16] PAN P Y,ZHU Y,SHEN Y, et al. Crosstalk between presynaptic trafficking and autophagy in Parkinson's disease[J]. Neurobiol Dis,2019,122:64-71.

[17] GHAVAMI S,SHOJAEI S,YEGANEH B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. Prog Neurobiol,2014,112:24-49.

[18] FAN P,XIE X H,CHEN C H,et al. Molecular regulation mechanisms and interactions between reactive oxygen species and mitophagy [J]. DNA Cell Biol,2019,38(1):10-22.

[19] WANG X. Destructive cellular paths underlying familial and sporadic Parkinson disease converge on mitophagy[J]. Autophagy,2017,13(11):1998-1999.

[20] EVANS C S,HOLZBAUR E L F. Quality control in neurons:Mitophagy and other selective autophagy mechanisms[J]. J Mol Biol,2020,432(1):240-260.

[21] LIU J,LIU W,LI R, et al. Mitophagy in Parkinson's disease:From pathogenesis to treatment[J]. Cells,2019,8(7):712.

[22] 李凤娇,李艳芹. Parkin 蛋白与人类疾病的关系及其天然产物调节作用[J]. 重庆医学,2022,51(10):1788-1793.

(收稿日期:2022-12-02 修回日期:2023-06-22)