

溶血磷脂酸联合 6-羟基多巴胺对 SH-SY5Y 细胞凋亡的诱导作用及其机制

李亚萍^{1,2}, 谭春艳³, 赵璐洁^{1,2}, 赵嘉怡^{1,2}, 李 婷², 杨 晓⁴, 杨晓云^{1,2}

(1. 山东第二医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 潍坊 261053; 2. 山东第二医科大学基础医学院智能诊疗与分子疾病协同创新重点实验室, 山东 潍坊 261053; 3. 山东第二医科大学基础医学院生理学系, 山东 潍坊 261053; 4. 山东第二医科大学护理学院护理学系, 山东 潍坊 261053)

[摘要] **目的:** 探讨溶血磷脂酸(LPA)联合6-羟基多巴胺(6-OHDA)对SH-SY5Y细胞凋亡的诱导作用,并阐明其相关作用机制。**方法:** 采用 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA建立帕金森病(PD)细胞模型,选用SH-SY5Y细胞、PC12细胞和N2a细胞,分为对照组(仅用不完全培养基)、 $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA组、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组、 $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA组和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组,处理24 h。采用噻唑蓝(MTT)法检测各组SH-SY5Y细胞活性,异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白V(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)染色结合流式细胞术检测各组SH-SY5Y细胞凋亡率,Western blotting法检测3种细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)相关蛋白表达水平以及SH-SY5Y细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和磷酸化的p38 MAPK(p-p38 MAPK)蛋白以及LPA1受体蛋白表达水平。**结果:** 与 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组比较, $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组SH-SY5Y细胞数和细胞活性均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),细胞凋亡率升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组比较, $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组3种细胞中Caspase-3蛋白表达水平无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$); $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组SH-SY5Y细胞中裂解的Caspase-3(Cleaved Caspase-3)蛋白表达水平明显升高($P<0.01$); $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组PC12细胞中Cleaved Caspase-3蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组N2a细胞中Cleaved Caspase-3蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组比较, $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组SH-SY5Y细胞中Bax和Bcl-2蛋白表达水平无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$),Bax/Bcl-2比值升高($P<0.05$); $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组SH-SY5Y细胞中p38 MAPK蛋白表达水平升高($P<0.05$), $4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+ $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA组SH-SY5Y细胞中p-p38 MAPK蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),p-p38 MAPK/p38 MAPK比值升高($P<0.05$);

[收稿日期] 2025-01-16 [录用日期] 2025-03-31

[基金项目] 山东省卫健委医药卫生科技发展计划项目(2018WS063);山东省教育厅基金项目(J14LK15);山东省教育厅国家级大学生创新创业训练计划项目(202010438026);山东第二医科大学博士科研启动基金科研创新计划项目(2024BKQ048)

[作者简介] 李亚萍(1997-),女,内蒙古自治区乌兰察布市人,在读硕士研究生,主要从事溶血磷脂酸生化药理学方面的研究。

[通信作者] 杨 晓,教授,硕士研究生导师(E-mail: yx0204@163.com);
杨晓云,副教授,硕士研究生导师(E-mail: yangxiaoyun@sdsu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 LPA1 受体蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。结论: LPA 与 6-OHDA 联合应用能明显诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, 其作用机制可能与上调细胞中 p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达水平有关。

[关键词] 溶血磷脂酸; 6-羟基多巴胺; SH-SY5Y 细胞; 细胞凋亡; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] Q545 [文献标志码] A

Inductive effect of lysophosphatidic acid combined with 6-hydroxydopamine on apoptosis of SH-SY5Y cells and its mechanism

LI Yaping^{1,2}, TAN Chunyan³, ZHAO Lujie^{1,2}, ZHAO Jiayi^{1,2}, LI Ting², YANG Xiao⁴, YANG Xiaoyun^{1,2}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; 2. Weifang Key Laboratory of Collaborative Innovation of Intelligent Diagnosis and Treatment and Molecular Diseases, School of Basic Medical Sciences, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; 3. Department of Physiology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; 4. Department of Nursing, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the inductive effect of lysophosphatidic acid (LPA) combined with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on the apoptosis of SH-SY5Y cells, and to clarify its related mechanism.

Methods: The Parkinson's disease (PD) cell model was established by using 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA; the SH-SY5Y cells, PC12 cells and N2a cells were selected and divided into control group (incomplete medium only), 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group, and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, and treated for 24 h. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect the activities of the SH-SY5Y cells in various groups; annexin V fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC)/propidium iodide (PI) staining and flow cytometry were used to detect the apoptotic rates of the SH-SY5Y cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of Caspase-3 related proteins in three kinds of cells and the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) proteins and LPA1 receptor protein in the SH-SY5Y cells in various groups.

Results: The MTT assay results showed that compared with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, the numbers and activities of the SH-SY5Y cells in 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The flow cytometry results showed that compared with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, the apoptotic rates of the SH-SY5Y cells in 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The Western blotting results showed that compared with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, the expression levels of Caspase-3 protein in three kinds of cells in 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group had no significant changes, and the differences were not statistically significant ($P>0.05$); the expression levels of Cleaved Caspase-3 protein in the SH-SY5Y cells in 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group were significantly increased ($P<0.01$); the expression levels of Cleaved Caspase-3 protein in the PC12 cells in 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression level of Cleaved

Caspase-3 protein in the N2a cells in $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group was increased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group, the expression levels of Bax and Bcl-2 proteins in the SH-SY5Y cells in $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group had no significant changes, and the differences were not statistically significant ($P > 0.05$), but the Bax/Bcl-2 ratio was increased ($P < 0.05$); the expression level of p38 MAPK protein in the SH-SY5Y cells in $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group was increased ($P < 0.05$); the expression level of p-p38 MAPK protein in the SH-SY5Y cells in $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group was significantly increased ($P < 0.01$), and the p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio was increased ($P < 0.05$); the expression level of LPA1 receptor protein in the SH-SY5Y cells in $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group was decreased ($P < 0.05$).

Conclusion: The combined application of LPA and 6-OHDA can significantly induce the apoptosis of SH-SY5Y cells, and its mechanism may be related to the up-regulated expression levels of p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in the cells.

KEYWORDS Lysophosphatidic acid; 6-hydroxydopamine; SH-SY5Y cell; Apoptosis; p38 mitogen-activated protein kinase

帕金森病 (Parkinson disease, PD) 是神经系统退行性疾病, 病理特征是大脑黑质致密区多巴胺能神经元丢失和路易小体形成^[1-2], 神经炎症通过导致多巴胺能神经元丢失加重 PD 进展^[3]。PD 的病因还包括细胞凋亡、氧化应激和线粒体功能障碍等^[4]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 下游信号通路包括 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 和细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK), 其中 p38 MAPK 在中枢神经系统炎症反应中发挥重要作用, 参与 PD 的发生发展过程^[5-7]。p38 MAPK 是神经炎症的关键介质, 参与调节免疫系统的多种功能^[8-9]。6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 的结构与多巴胺能神经元神经递质相似, 通过触发氧化应激等相关细胞毒性诱导多巴胺能神经元和去甲肾上腺素能神经元变性, 可用于建立晚期 PD 模型^[10-13]。溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 是一种活跃磷脂信号分子^[14-15], 参与神经系统多个发育过程, 如皮质发育、大脑皮层的生长和折叠以及神经元生长锥的出现和回缩等^[16]。LPA 通过 LPA1~LPA6 受体在中枢神经系统疾病中发挥作用^[17-18]。研究^[19]表明: LPA 受体在脑组织中呈高丰度表达, 且表达于神经祖细胞、神经元和星形胶质细胞等细胞中。LPA 可直接促进巨噬细胞中促炎介质的释放, 如白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 和活性氧 (reactive

oxygen species, ROS), 加速因巨噬细胞功能障碍和炎症引起的疾病发展^[20]。LPA 还可促进核因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF- κB) 的核易位, 从而促进炎症因子的产生^[21]。LPA1 受体在神经系统高表达, 通过 ERK 和 p38 MAPK 激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含吡林结构域 3 炎性小体^[22]。本课题组前期研究^[23]显示: LPA1 在 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠模型中表达下调, 提示 LPA 在 PD 中的作用仍需深入研究。LPA1 受体参与海马区谷氨酸能突触成熟, 还在皮质发育、创伤性脑损伤、脊髓损伤和中风中发挥神经保护作用, 并且在 LPA1 基因缺失的小鼠中观察到学习和记忆缺陷现象^[24], 表明 LPA1 受体在中枢神经系统正常生理活动中发挥重要作用, 但 LPA1 在 PD 中的作用尚不明确。LPA 及其受体在 PD 中的作用及其分子机制仍未完全阐明, 本研究以 LPA 为切入点, 探讨 LPA 介导 p38 MAPK 信号通路在 6-OHDA 诱导的 PD 细胞模型中的作用, 阐明 LPA 对多巴胺能神经元细胞凋亡的影响以及神经炎症在 PD 中的作用, 旨在为开发靶向 LPA 的药物及新的 PD 治疗靶点提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y 细胞)、大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 (PC12 细胞) 和小鼠脑神经瘤细胞系 (N2a 细胞) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM 高糖培养基购自浙江森瑞生物科技有限公司, RPMI Medium 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, MEM

培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胎牛血清购自美国 OmnimAbs 公司, 1% 青-链霉素混合液购自北京索莱宝生物科技有限公司, 细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司, LPA 和 6-OHDA 均购自美国 Sigma 公司, 一抗兔抗 β -actin 和兔抗 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 购自武汉三鹰生物技术有限公司, 一抗兔抗 GAPDH 购自美国 MCE 公司, 一抗兔抗含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteiny l aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、兔抗裂解的 Caspase-3 (Cleaved Caspase-3) 和兔抗 LPA1 购自美国 Abcam 公司, 一抗 Bcl-2、p38 MAPK 和磷酸化的 p38 MAPK (phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, 二抗山羊抗兔 IgG 购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (annexin V fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC) / 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡双染试剂盒购自美国 BD 公司。Tanon 4600 系列全自动化学发光图像分析仪购自上海天能科技有限公司, BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪购自美国 BD 公司, Elx800™ 型酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

1.2 细胞培养和分组 用无菌生理盐水溶解 6-OHDA, 配制成一定浓度的母液, 分装后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中, 使用时用培养基将 6-OHDA 稀释至终浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。SH-SY5Y 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养; PC12 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 RPMI Medium 1640 培养基中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养; N2a 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 MEM 培养基中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。待细胞生长至合适密度后, 分为对照组 (仅用不完全培养基)、 $4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA 组、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组、 $4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA 组和 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组, 共 6 组, 分别作用细胞 24 h, 然后进行后续实验操作。

1.3 各组 SH-SY5Y 细胞数 将待传代的 6 cm 细胞培养皿中 SH-SY5Y 细胞制备成 1 mL 细胞悬液, 6 孔细胞培养板每孔取 $150\text{ }\mu\text{L}$ SH-SY5Y 细胞悬液接种, 各组 SH-SY5Y 细胞培养 24 h 后, 弃掉旧的

培养基, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗 1 次, 光学显微镜 100 倍视野下观察各组 SH-SY5Y 细胞状态, 各组随机挑选 10 个不同的视野拍照, 拍照后进行细胞计数, 将 6 孔细胞培养板中 6 个处理组的细胞制备成 1 mL 的细胞悬液, 用血细胞计数板进行计数, 记录各组每毫升的细胞数。

1.4 噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 法检测各组 SH-SY5Y 细胞活性

按照“1.2”中方法, 将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 分为 6 组, 每组设置 3 个复孔, 各组作用 24 h, 然后避光加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT 溶液, 置于培养箱中静置 4 h, 使 MTT 与存活的 SH-SY5Y 细胞充分反应, 然后每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 摇床放置 15 min, 酶标仪于波长 490 nm 处测定其吸光度 (A) 值, 计算细胞活性。细胞活性 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) $\times 100\%$, 其中对照孔为对照组, 空白孔为培养基对照组 (用于调零)。

1.5 Annexin V-FITC/PI 染色结合流式细胞术检测各组 SH-SY5Y 细胞凋亡率

分别收集各组 SH-SY5Y 细胞, 进行细胞计数, 各组细胞数约为每毫升 1×10^6 个。用提前预冷的 PBS 缓冲液洗涤各组细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心后弃掉上清液, 重复 2 次。然后用 $100\text{ }\mu\text{L}$ $1\times$ 缓冲液重悬各组细胞, 各加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V FITC 和 $5\text{ }\mu\text{L}$ PI 吹打混匀, 避光 15 min 后再加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ $1\times$ 缓冲液吹打混匀, 过 400 目筛网后, 立刻上机进行检测。细胞凋亡率 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

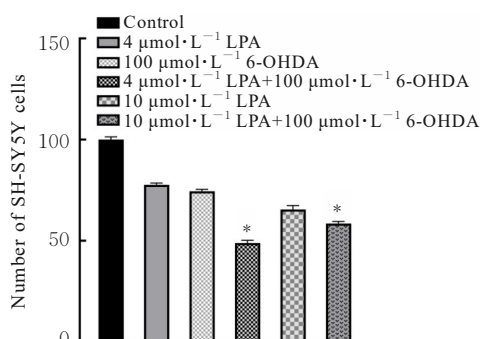
1.6 Western blotting 法检测 3 种细胞中相关蛋白表达水平

各组 SH-SY5Y 细胞、PC12 细胞和 N2a 细胞培养 24 h 后, 收集细胞, 提取细胞的总蛋白, Western blotting 法具体步骤见参考文献 [25]。其中, 一抗的稀释比例: β -actin (1:8 000)、GAPDH (1:15 000)、Caspase-3 (1:6 000)、Cleaved Caspase-3 (1:2 000)、LPA1 受体 (1:3 000)、Bcl-2 (1:1 000)、BAX (1:4 000)、p38 MAPK (1:1 000) 和 p-p38 MAPK (1:5 000), 二抗山羊抗兔稀释比例为 1:2 000。一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, 用化学发光成像系统进行化学发光, 保存图像, 采用 Image J 软件进行蛋白条带灰度值分析, 以 GAPDH 和 β -actin 为内参蛋白, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

1.7 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。各组细胞中 Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达水平以及 LPA1 受体蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 SH-SY5Y 细胞数和细胞活性 SH-SY5Y 细胞计数结果显示:与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞数降低 ($P < 0.01$)。见图 1。MTT 法检测结果显示:与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组细胞活性降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。



* $P < 0.01$ vs $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

图1 各组 SH-SY5Y 细胞数

Fig. 1 Numbers of SH-SY5Y cells in various groups

表1 各组 SH-SY5Y 细胞活性

Tab. 1 Activities of SH-SY5Y cells in various groups

Group	Cell activity
Control	100.00 ± 1.35
$4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA	84.98 ± 2.86
$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA	83.89 ± 3.20
$4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA	69.19 ± 3.40**
$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA	74.65 ± 3.51
$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA	71.14 ± 3.50*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

2.2 各组 SH-SY5Y 细胞凋亡率 Annexin V -FITC/PI 染色结合流式细胞术检测结果显示:与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 ($20.63\% \pm 2.31\%$) 比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞凋亡率 ($14.37\% \pm 3.34\%$) 升高 ($P < 0.01$), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞凋亡率 ($11.80\% \pm 2.27\%$) 升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组 3 种细胞中 Caspase-3 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平

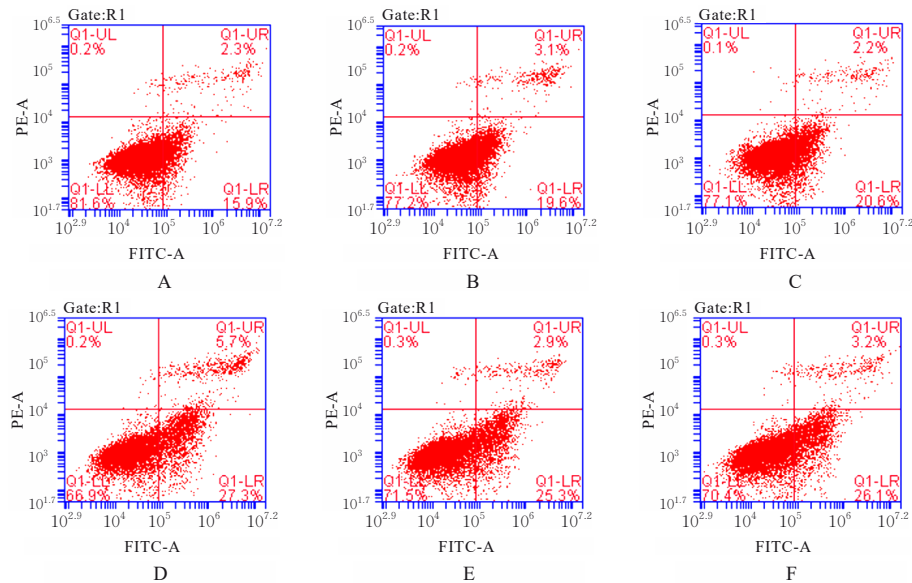
Western blotting 法检测 3 种细胞 Caspase-3 相关蛋白表达情况,结果显示:与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 3 种细胞中 Caspase-3 蛋白表达水平无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。见图 3A 和 3B。与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 PC12 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 3C 和 3D。与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 N2a 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 3E 和 3F。

2.4 各组 SH-SY5Y 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平及 Bax/Bcl-2 比值

Western blotting 法检测结果显示:与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达水平无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 Bax/Bcl-2 比值升高 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 各组 SH-SY5Y 细胞中 p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达水平

Western blotting 法检测结果显示:与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 p38 MAPK 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 p-p38 MAPK 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 p-p38/p38 比值升



A: Control group; B: $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; C: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; D: $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; E: $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; F: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

图2 各组 SH-SY5Y 细胞凋亡情况

Fig. 2 Apoptosis of SH-SY5Y cells in various groups

高 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 各组 SH-SY5Y 细胞中 LPA1 受体蛋白表达水平 Western blotting 法检测结果显示: 与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 SH-SY5Y 细胞中 LPA1 受体蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图 6。

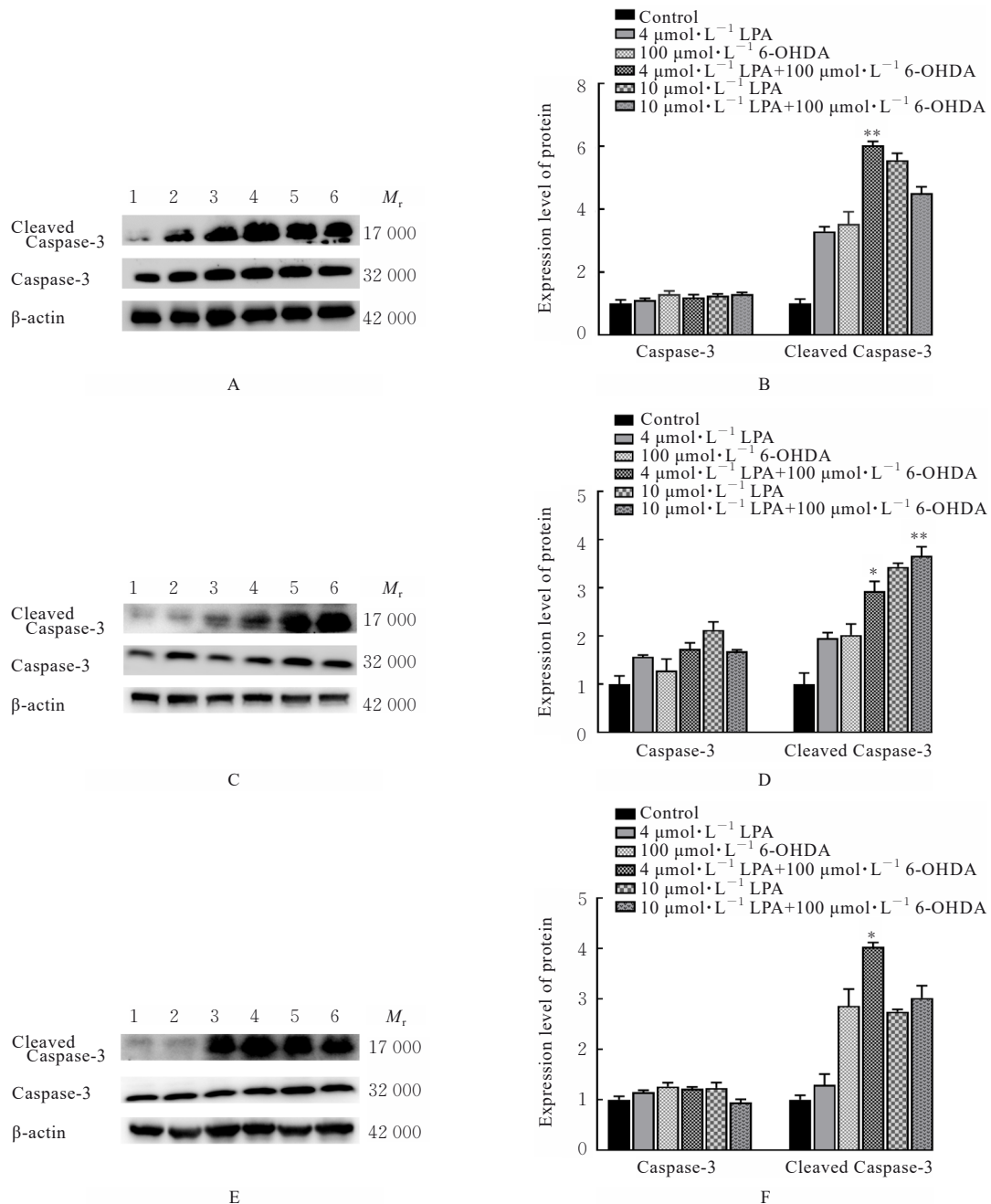
3 讨论

LPA 受体在中枢神经系统发育过程中参与调节神经元的增殖、迁移和分化。LPA2 受体的缺失完全恢复了海马网络兴奋性的变化、谷氨酸能传递的增加和癫痫发作活动, 同时抑制 LPA1/3 受体会诱导炎症和氧化应激从而使脊髓脱髓鞘恶化^[26]; LPA5 受体-蛋白激酶 D (protein kinase D, PKD) 信号可能在 BV-2 和原代小鼠小胶质细胞中诱导炎症及迁移反应^[27]。提示 LPA 信号在神经系统疾病的病理过程中发挥重要作用。然而 LPA 在 PD 中作用的分子机制仍不清楚, 本研究以 6-OHDA 诱导 SH-SY5Y 细胞构建 PD 细胞模型, 探讨 LPA 信号在 PD 细胞模型中的分子机制。

本研究中流式细胞术检测结果表明: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 未明显诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, 而联合 LPA 后能明显提高 SH-SY5Y 细胞凋亡率。Western blotting 法检测结果显示: 与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, LPA 的联合应用

使 SH-SY5Y 细胞中 Bax/Bcl-2 比值和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高, 与流式细胞术检测结果一致, 表明 LPA 联合 6-OHDA 通过提高凋亡相关蛋白表达水平显著诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡。SH-SY5Y 细胞、PC12 细胞和 N2a 细胞均能用来制备 PD 细胞模型, 因此, 本研究对 PC12 细胞和 N2a 细胞中的凋亡相关蛋白进行平行检测, Western blotting 法检测结果显示: 与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组比较, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组在 PC12 细胞和 N2a 细胞中 Caspase-3 蛋白表达水平无明显变化, 而 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高, 与 SH-SY5Y 细胞检测结果一致, 表明 LPA 与 6-OHDA 联合应用均可上调 SH-SY5Y 细胞、PC12 细胞和 N2a 细胞中 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平, 从而诱导上述 3 种细胞凋亡。

本研究结果显示: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 联合应用显著抑制了 SH-SY5Y 细胞中 LPA1 受体蛋白的表达, 与本课题组前期研究 LPA1 受体蛋白在 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠模型中表达下调的结果相一致^[23], 提示在 PD 细胞模型凋亡中, LPA1 受体蛋白表达水平降低可能导致细胞氧化应激、细胞凋亡和线粒体功能障碍。本研究结果显示: 在 SH-SY5Y 细胞和 N2a 细胞中 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组



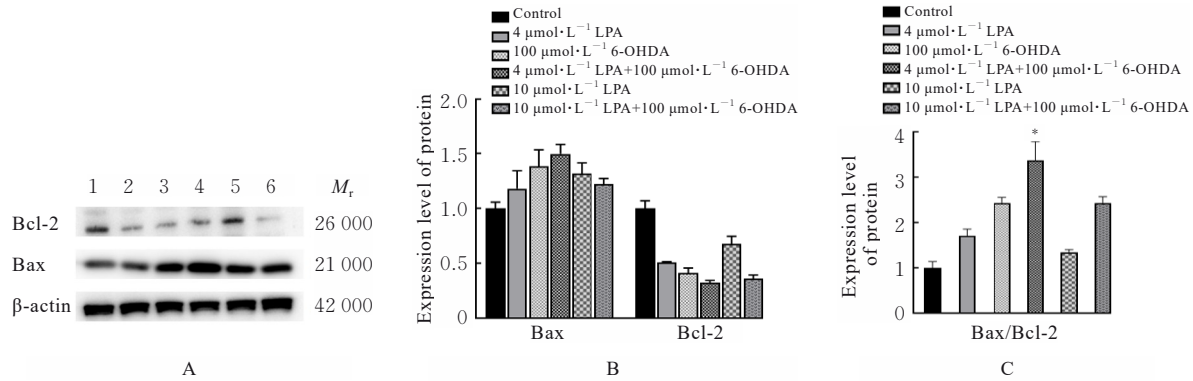
A, B: SH-SY5Y cells; C, D: PC12 cells; E, F: N2a cells; A, C, E: Electrophoregrams; B, D, F: Histograms. Lane 1: Control group; Lane 2: $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 3: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 4: $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 5: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 6: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

图3 各组3种细胞中Caspase-3和Cleaved Caspase-3蛋白表达电泳图及直条图

Fig. 3 Electrophoregrams and histograms of expressions of Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 preteins in three kind of cells in various groups

Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组相比 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平差异有统计学意义, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组与 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

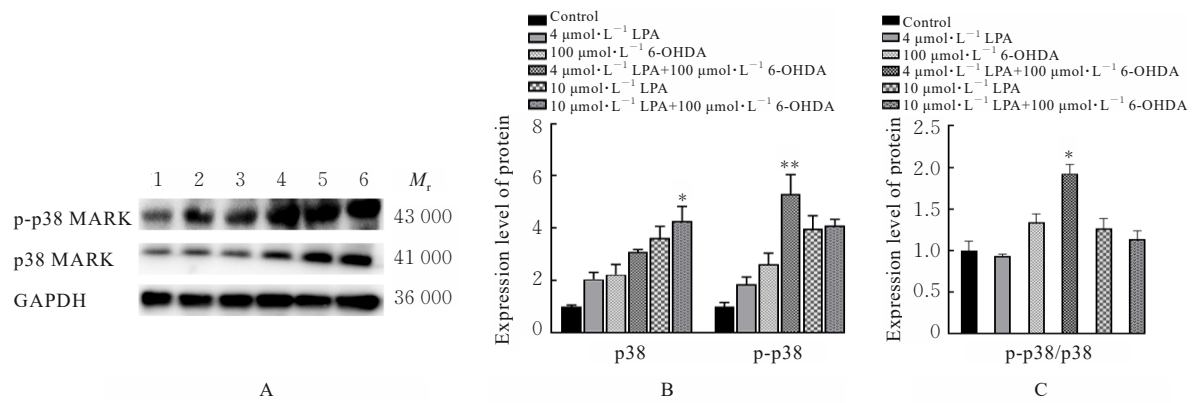
6-OHDA 组 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平比较差异无统计学意义, 其原因可能是由于 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 LPA1 受体蛋白表达水平明显降低, 从而导致 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA + $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组 Cleaved Caspase-3 蛋白



Lane 1: Control group; Lane 2: 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 3: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 4: 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 5: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 6: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group. * $P < 0.05$ vs 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

图4 各组 SH-SY5Y 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B, C)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B, C) of expressions of Bax and Bcl-2 proteins in SH-SY5Y cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 3: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 4: 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 5: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 6: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

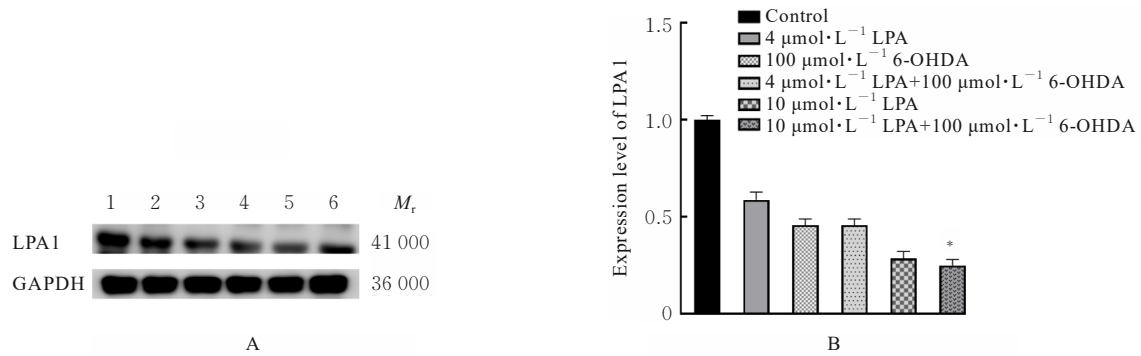
图5 各组 SH-SY5Y 细胞中 p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B, C)

Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B, C) of expressions of p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in SH-SY5Y cells in various groups

表达水平低于 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 组。6-OHDA 诱导 PD 模型通过触发氧化应激细胞毒性诱导多巴胺能神经元变性, 提示 LPA 可能协同 6-OHDA 增强细胞氧化应激反应促进细胞凋亡, LPA 联合 6-OHDA 的诱导作用机制复杂, 值得进一步实验研究探讨。

MAPK 信号通路促进环氧合酶-2 的表达, 导致小胶质细胞诱导的神经元死亡^[28], p38 MAPK 参与小胶质细胞和星形胶质细胞等介导的神经炎症反应, p38 MAPK 还参与细胞氧化应激反应、细胞增殖和细胞凋亡过程, 与阿尔茨海默病等神经退行性病变有关^[29]。小胶质细胞是中枢神经系统中的主要免疫

细胞, 占神经胶质细胞的 5%~12%^[30-31], 活化的小胶质细胞是导致 PD 患者黑质、纹状体和脑脊液中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、ROS、一氧化氮和促凋亡蛋白水平升高的原因之一^[32-33]。LPA 激活 MAPK 信号通路促进小胶质细胞神经炎症相关转录因子信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、信号转导及转录激活蛋白 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)、p53 和 c-Jun 的磷酸化以及 IL-6 和 TNF- α 的分泌^[34],



Lane 1: Control group; Lane 2: 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 3: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 4: 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group; Lane 5: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA group; Lane 6: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LPA+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group. * $P<0.05$ vs 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA group.

图6 各组SH-SY5Y细胞中LPA1受体表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of LPA1 receptor in SH-SY5Y cells in various groups

表明MAPK信号通路在神经系统疾病中发挥重要作用。本研究结果显示: LPA联合6-OHDA显著上调SH-SY5Y细胞中p38 MAPK和p-p38 MAPK蛋白表达水平,提示LPA联合6-OHDA可能通过激活p38 MAPK信号通路促进SH-SY5Y细胞凋亡。

综上所述, LPA与6-OHDA联合应用能够显著诱导SH-SY5Y细胞凋亡,其机制可能与上调细胞中p38 MAPK和p-p38 MAPK信号通路蛋白表达水平有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李亚萍和谭春艳参与实验操作、数据整理、统计学分析及论文撰写,赵璐洁、赵嘉怡和李婷参与实验操作及统计学分析,杨晓和杨晓云参与研究选题、数据整理及论文审核。

[参考文献]

- [1] TANSEY M G, WALLINGS R L, HOUSER M C, et al. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(11): 657-673.
- [2] ZHU F D, WANG B D, QIN D L, et al. *Carpesii fructus* extract exhibits neuroprotective effects in cellular and *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14515.
- [3] GRAVANDI M M, ABDIAN S, TAHVILIAN M, et al. Therapeutic targeting of Ras/Raf/MAPK pathway by natural products: a systematic and mechanistic approach for neurodegeneration [J]. *Phytomedicine*, 2023, 115: 154821.
- [4] DILNASHIN H, BIRLA H, KESWANI C, et al.

Neuroprotective effects of *tinospora cordifolia* via reducing the oxidative stress and mitochondrial dysfunction against rotenone-induced PD mice[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(17): 3077-3087.

- [5] LIU Z Y, YAO X Q, JIANG W S, et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 90-110.
- [6] RATIH K, LEE Y R, CHUNG K H, et al. L-Theanine alleviates MPTP-induced Parkinson's disease by targeting Wnt/ β -catenin signaling mediated by the MAPK signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 226: 90-101.
- [7] LIU X D, ZHANG R, FAN J J, et al. The role of ROS/p38 MAPK/NLRP3 inflammasome cascade in arsenic-induced depression-/anxiety-like behaviors of mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 261: 115111.
- [8] MUNOZ L, AMMIT A J. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(3): 561-568.
- [9] CHAKRABORTY J, CHAKRABORTY S, CHAKRABORTY S, et al. Entanglement of MAPK pathways with gene expression and its omnipresence in the etiology for cancer and neurodegenerative disorders[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2023, 1866(4): 194988.
- [10] DONG L G, AN M Q, GU H Y, et al. PACAP/PAC1-R activation contributes to hyperalgesia in 6-OHDA-induced Parkinson's disease model rats via promoting excitatory synaptic transmission of spinal dorsal horn neurons[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(12): 2418-2431.

- [11] SLÉZIA A, HEGEDŰS P, RUSINA E, et al. Behavioral, neural and ultrastructural alterations in a graded-dose 6-OHDA mouse model of early-stage Parkinson's disease[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 19478.
- [12] YU J J, MENG J H, QIN Z W, et al. Dysbiosis of gut microbiota inhibits NMNAT2 to promote neurobehavioral deficits and oxidative stress response in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 117.
- [13] TIAN Y, LU J, HAO X Q, et al. FTH1 Inhibits Ferroptosis Through Ferritinophagy in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(4): 1796-1812.
- [14] PEI J Q, CAI L, WANG F, et al. LPA(2) contributes to vascular endothelium homeostasis and cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2022, 131(5): 388-403.
- [15] YANAGIDA K, SHIMIZU T. Lysophosphatidic acid, a simple phospholipid with myriad functions [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 246: 108421.
- [16] YUNG Y C, STODDARD N C, MIRENDIL H, et al. Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system[J]. *Neuron*, 2015, 85(4): 669-682.
- [17] SALGADO-POLO F, BORZA R, MATSOUKAS M T, et al. Autotaxin facilitates selective LPA receptor signaling[J]. *Cell Chem Biol*, 2023, 30(1): 69-84.e14.
- [18] MAGKRIOTI C, ANTONOPOULOU G, FANIDIS D, et al. Lysophosphatidic acid is a proinflammatory stimulus of renal tubular epithelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7452.
- [19] XU L X, SU J, GUO L T, et al. Modulation of LPA1 receptor-mediated neuronal apoptosis by Saikosaponin-d: a target involved in depression[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 155: 150-161.
- [20] CHANG C L, LIN M E, HSU H Y, et al. Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1 β expression mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages[J]. *J Biomed Sci*, 2008, 15(3): 357-363.
- [21] TAND X Y, WANG X Y, ZHAO Y Y, et al. Doxycycline attenuates breast cancer related inflammation by decreasing plasma lysophosphatidate concentrations and inhibiting NF- κ B activation[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 36.
- [22] LEE C H, SAPKOTA A, GAIRE B P, et al. NLRP3 inflammasome activation is involved in LPA (1)-mediated brain injury after transient focal cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8595.
- [23] YANG X Y, ZHAO E Y, ZHUANG W X, et al. LPA signaling is required for dopaminergic neuron development and is reduced through low expression of the LPA1 receptor in a 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease[J]. *Neurol Sci*, 2015, 36(11): 2027-2033.
- [24] BIRGBAUER E. Lysophospholipid receptors in neurodegeneration and neuroprotection [J]. *Explor Neuroprotective Ther*, 2024, 4(4): 349-365.
- [25] 牟笑笑, 管清燕, 孔 荐, 等. 溶血磷脂酸下调盐酸阿霉素诱导的卵巢癌SKOV3细胞的凋亡[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(10): 1401-1407.
- [26] CHOI J H, OH J, LEE M J, et al. Inhibition of lysophosphatidic acid receptor 1-3 deteriorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing oxidative stress [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 240.
- [27] PLASTIRA I, BERNHART E, GOERITZER M, et al. Lysophosphatidic acid via LPA-receptor 5/protein kinase D-dependent pathways induces a motile and pro-inflammatory microglial phenotype[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 253.
- [28] XIA Q, HU Q, WANG H, et al. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(3): e1702.
- [29] IBA M, KIM C, KWON S, et al. Inhibition of p38 α MAPK restores neuronal p38 γ MAPK and ameliorates synaptic degeneration in a mouse model of DLB/PD[J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(695): eabq6089.
- [30] RANSOHOFF R M, PERRY V H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 119-145.
- [31] NORRIS G T, KIPNIS J. Immune cells and CNS physiology: microglia and beyond [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(1): 60-70.
- [32] NAGATSU T, MOGI M, ICHINOSE H, et al. Cytokines in Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm Suppl*, 2000(58): 143-151.
- [33] HARMS A S, FERREIRA S A, ROMERO-RAMOS M. Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2021, 141(4): 527-545.
- [34] PLASTIRA I, BERNHART E, JOSHI L, et al. MAPK signaling determines lysophosphatidic acid (LPA)-induced inflammation in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 127.