

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00472

激活 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体减轻大脑皮质神经元氧糖剥夺损伤

信如娟¹, 赵婷¹, 倪敏², 李冬洁², 沈甫明^{1*}

1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433
2. 同济大学附属上海第十人民医院药学部, 上海 200072

[摘要] **目的** 研究激活 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR) 对大脑皮质神经元氧糖剥夺损伤的作用及可能机制。**方法** 取体外培养 7 d 的原代大脑皮质神经元, 随机分为 3 组: 对照组、氧糖剥夺组、PNU-282987 ($\alpha 7$ nAChR 激动剂) 组。氧糖剥夺组细胞氧糖剥夺 12 h; PNU-282987 组用 PNU-282987 预处理细胞 24 h, 然后氧糖剥夺 12 h。采用 CCK-8 测定 3 组大脑皮质神经元存活率, 比色法检测上清液乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 含量, 流式细胞术检测细胞凋亡率和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产量, 蛋白质印迹法检测血红素氧化酶 (hemoxygenase-1, HO-1)、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 表达量。**结果** 与氧糖剥夺组相比, PNU-282987 可提高大脑皮质神经元存活率 ($P < 0.05$), 降低 LDH 含量 ($P < 0.05$), 抑制细胞凋亡 ($P < 0.05$), 降低 ROS 产量 ($P < 0.05$), 同时使 HO-1 蛋白表达升高、HIF-1 α 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)。**结论** 激活 $\alpha 7$ nAChR 具有抗大脑皮质神经元氧糖剥夺损伤作用, 该作用可能与抗氧化应激有关。

[关键词] $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体; 大脑皮质神经元; 氧糖剥夺; 氧化性应激

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0472-05

Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor alleviates cerebral cortical neuron injury induced by oxygen-glucose deprivation

XIN Ru-juan¹, ZHAO Ting¹, NI Min², LI Dong-jie², SHEN Fu-ming^{1*}

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Clinical Pharmacy, the 10th People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of activating $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) on cerebral cortical neurons injury induced by oxygen-glucose deprivation (OGD) and the possible mechanism. **Methods** Cerebral cortical neurons cultured for 7 d were randomly divided into three groups: control group, OGD group (Cells experienced a 12 h oxygen-glucose deprivation) and OGD group treated with PNU-282987 (Cells experienced a 12 h oxygen-glucose deprivation with PNU-282987 pretreatment for 24 h). Cell viability was determined by CCK-8 assay, lactate dehydrogenase (LDH) was examined to reflect cell injury, apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production were analyzed by flow cytometry, and expression of hemoxygenase-1 (HO-1) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) were detected by Western blotting analysis. **Results** OGD resulted in cell death, LDH increase, and cell apoptosis. Compared with the OGD group, PNU-282987 pretreated group had significantly increased cell survival ($P < 0.05$), significantly decreased LDH level and ROS production ($P < 0.05$), and significantly inhibited cell apoptosis ($P < 0.05$). Meanwhile, HO-1 protein expression was significantly increased and HIF-1 α protein expression was significantly reduced in PNU-282987 pretreated group compared with the OGD group ($P < 0.05$). **Conclusion** Activation of $\alpha 7$ nAChR can protect cerebral cortical neurons against OGD-induced injury, which may be related to the anti-oxidative stress.

[Key words] $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor; cerebral cortical neurons; oxygen-glucose deprivation; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5): 472-476]

脑缺血性损伤发病率高, 可致死致残或造成脑 损伤和功能障碍; 其主要表现形式是神经元活性降

[收稿日期] 2015-01-13 **[接受日期]** 2015-03-02

[基金项目] 上海市自然科学基金青年项目 (13ZR145930010). Supported by the Youth Project of Natural Science Foundation of Shanghai (13ZR145930010).

[作者简介] 信如娟, 硕士生. E-mail: xinrujuan1112@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871276, E-mail: fumingshen@126.com

低、凋亡和死亡^[1]。因此,研究脑缺血性损伤机制及保护药物,对预防缺血性脑血管疾病的发生、发展具有重要意义。PNU-282987 是 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)的激动剂,胆碱能抗炎通路通过迷走神经作用于 $\alpha 7nAChR$ 从而抑制炎症细胞因子的产生和释放,抑制炎症反应。应用 PNU-282987 可减少神经细胞死亡,降低脑水肿,改善蛛网膜下隙出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)的神经功能状态^[2]。本实验利用原代培养的氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)大鼠皮质神经元模型,研究 $\alpha 7nAChR$ 激动剂 PNU-282987 对氧糖剥夺损伤后大鼠皮质神经元的影响及可能机制,以期为脑缺血性损伤的治疗提供新的潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物、药物和试剂 孕 15~18 d 的 SD 大鼠由上海西普尔-必凯实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016]提供。Neurobasal medium、B27、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司),PNU-282987、多聚赖氨酸、阿糖胞苷(Sigma 公司),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenate, LDH)试剂盒(Promega 公司),Annexin V-FITC 试剂盒(BD 公司),血红素氧化酶(HO-1, ENZO 公司),缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α , Abcam 公司),GAPDH、活性氧(ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术研究所),CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所)。

1.2 原代大鼠皮质神经元的培养 无菌环境下,取孕 15~18 d 大鼠,分离大脑皮质,将其剪成 1 mm³ 的组织块,用 0.125% 胰蛋白酶在 37℃ 条件下消化 8 min,每间隔 2 min 轻摇 1 次。FBS 终止消化后,轻轻吹打数次,352 \times g 离心 5 min,弃上清。用 DMEM 吹打混匀,取细胞悬液,用细胞计数板计数。调整细胞密度为每毫升 1×10^6 个,接种于预先用 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸溶液包被的 96 孔培养板或 6 孔培养板中(96 孔板每孔 100 μ L,6 孔板每孔 2 mL),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育。于培养 36 h 在培养液中加入阿糖胞苷以抑制神经胶质细胞的增殖。培养 7 d 后,以微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)单克隆一抗和含绿色荧光的二抗标记神经元,Hoechst 33258 标记细胞核进行免疫荧光细胞化学分析。

1.3 大鼠皮质神经元氧糖剥夺损伤模型 取原代培养的大鼠皮质神经元,随机分为正常对照组(control)、氧糖剥夺组、PNU-282987 组。在氧糖剥夺前 24 h,在培养液中加入 PNU-282987,使其终浓度为 10 μ mol/L,更换无糖 DMEM 培养液,然后将除对照组外的各组细胞同时移至恒温(37℃)密闭容器内,连续充以无氧气体(90% N₂,10% CO₂),在氧糖剥夺条件下培养 12 h 后,进行各项实验。

1.4 大鼠皮质神经元存活率检测 将原代培养的大鼠大脑皮质神经元接种入 96 孔板中,每孔接种 100 μ L,使每孔细胞数为每毫升 10^6 个。7 d 后,将细胞分为正常对照组(control)、氧糖剥夺组、PNU-282987 组。PNU-282987 组加入 PNU-282987 干预 24 h 后,以氧糖剥夺损伤神经元,并于损伤后 12 h 加入 CCK-8 检测各组细胞活性。每孔加入 10 μ L CCK-8,置 37℃ 孵箱孵育 1 h,酶联免疫检测仪选取 490 nm 波长,测定光密度值。记录对照组及各实验组的光密度值,计算各组大鼠皮质神经元存活率。

1.5 大鼠皮质神经元 LDH 含量检测 将原代培养的大鼠大脑皮质神经元接种入 96 孔板中,每孔接种 100 μ L,细胞密度为每毫升 10^6 个。分组同前,在氧糖剥夺 12 h 后,取细胞培养上清测定 LDH 含量。

1.6 大鼠皮质神经元凋亡检测 将原代培养的大鼠大脑皮质神经元以每毫升 10^5 个的细胞密度接种于 6 孔板中,培养 7 d 后,分组及给药同前,在氧糖剥夺 12 h 后,收集细胞悬液,用 Annexin V-FITC 和 PI 室温避光染色,15 min 后终止反应,流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.7 大鼠皮质神经元 ROS 产量检测 将原代培养的大鼠大脑皮质神经元接种入 6 孔板中,每孔接种 2 mL,细胞密度为每毫升 10^6 个。分组同前,在氧糖剥夺 12 h 后,收集细胞悬液,加入 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA)于 37℃ 避光染色 20 min,终止反应,流式细胞术测定细胞内 ROS 产量。

1.8 大鼠皮质神经元 HIF-1 α 和 HO-1 蛋白表达检测 取各组大鼠皮质神经元,提取细胞蛋白,取蛋白样品用 10% SDS-PAGE 分离后,用湿转法转移至硝酸纤维素膜上,用 5% BSA 于 37℃ 封闭 1 h,用抗 HIF-1 α 、HO-1 和 GAPDH 等抗体 4℃ 孵育过夜,加入二抗室温孵育 30 min,用 Odyssey 仪器扫描、分析

各蛋白质条带,蛋白激活水平以免疫印迹中条带的灰度值与内参的比值来表示。

1.9 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件作为作图和分析工具,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 大鼠原代大脑皮质神经元鉴定 取培养至 7 d 的神经元,以神经元树突标记物 MAP-2 抗体对培养的细胞进行免疫荧光染色,并使用 Hoechst 33258 标记细胞核,以 MAP-2 阳性细胞占 Hoechst 33258 染色细胞的比例进行大脑皮质神经元的纯度鉴定。如图 1 所示,Hoechst 染色细胞为蓝色荧光,MAP-2 染色细胞为绿色荧光,merge 图的细胞纯度鉴定结果显示大脑皮质神经元纯度在 95% 以上。

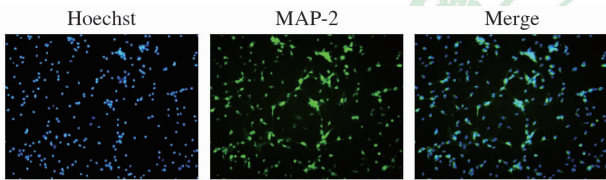


图 1 大鼠大脑皮质神经元鉴定

Fig 1 Identification of cultured rat cerebral cortical neurons MAP-2: Microtubule-associated protein-2. Original magnification: $\times 100$

2.2 PNU-282987 提高氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元存活率 与对照组相比,氧糖剥夺 12 h 后细胞存活率下降 $[(42.8 \pm 1.6)\% \text{ vs } (100.0 \pm 2.9)\%, P < 0.01]$,提示氧糖剥夺能够导致明显的大脑皮质神经元损伤;给予 PNU-282987 处理后,细胞存活率上升 $[(50.6 \pm 1.2)\% \text{ vs } (42.8 \pm 1.6)\%, P < 0.01]$,表明 PNU-282987 对氧糖剥夺损伤的大脑皮质神经元具有保护作用。

2.3 PNU-282987 降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元培养上清 LDH 含量 氧糖剥夺 12 h 后,检测各孔培养上清中 LDH,结果发现氧糖剥夺可导致大脑皮质神经元 LDH 释放增加 $(1.92 \pm 0.18 \text{ vs } 1.00 \pm 0.09, P < 0.01)$,而 PNU-282987 可抑制氧糖剥夺损伤神经元 LDH 的释放 $(0.80 \pm 0.10 \text{ vs } 1.92 \pm 0.18, P < 0.05)$ 。

2.4 PNU-282987 降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑

皮质神经元凋亡率 Annexin V-FITC 流式细胞仪分析结果(图 2)显示,与正常对照组相比,氧糖剥夺损伤 12 h 后凋亡细胞数明显增加 $[(27.70 \pm 8.50)\% \text{ vs } (6.30 \pm 0.83)\%, P < 0.01]$,PNU-282987 给药后可明显减少氧糖剥夺引起的细胞凋亡 $[(12.30 \pm 1.98)\% \text{ vs } (27.70 \pm 8.50)\%, P < 0.05]$ 。结果表明经过 PNU-282987 处理后,大脑皮质神经元对氧糖剥夺的耐受性明显增强。

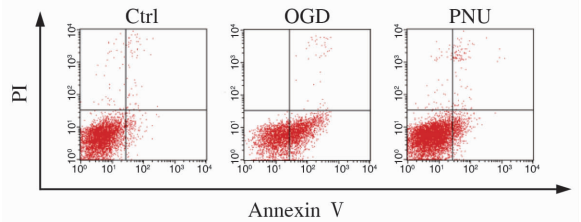


图 2 PNU-282987 降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元凋亡率

Fig 2 PNU-282987 decreased the apoptosis rate in cerebral cortical neurons exposed to OGD

Ctrl: Control; OGD: Oxygen-glucose deprivation; PNU: PNU-282987; PI: Propidium iodide

2.5 PNU-282987 降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元 ROS 产量 流式细胞术分析结果(图 3)显示,氧糖剥夺损伤可使大脑皮质神经元 ROS 产量增加 $(1.24 \pm 0.02 \text{ vs } 1.00 \pm 0.04, P < 0.01)$;PNU-282987 可抑制氧糖剥夺损伤神经元 ROS 产量的升高 $(0.99 \pm 0.03 \text{ vs } 1.24 \pm 0.02, P < 0.01)$ 。

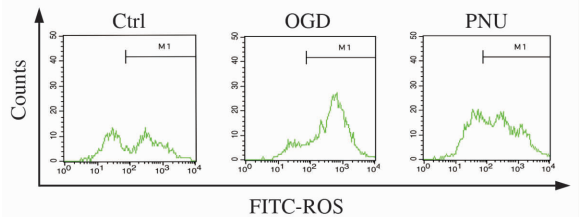


图 3 PNU-282987 降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元 ROS 产量

Fig 3 PNU-282987 reduced OGD-induced ROS production in cerebral cortical neurons

Ctrl: Control; OGD: Oxygen-glucose deprivation; PNU: PNU-282987; ROS: Reactive oxygen species

2.6 PNU-282987 降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元 HIF-1 α 蛋白表达、增加 HO-1 蛋白表达 与对照组比较,氧糖剥夺后大脑皮质神经元

HIF-1 α 蛋白表达增加(12.9 ± 4.24 vs 1.00 ± 0.04 , $P < 0.05$), HO-1 蛋白表达减少(0.15 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.01 , $P < 0.01$)。与氧糖剥夺组相比, PNU-282987 给药后 HIF-1 α 蛋白表达减少($1.4 \pm$

0.09 vs 12.9 ± 4.24 , $P < 0.05$), HO-1 蛋白表达增加(0.47 ± 0.07 vs 0.15 ± 0.08 , $P < 0.01$)。结果表明 PNU-282987 可抑制氧化应激,对神经元具有保护作用。详见图 4。

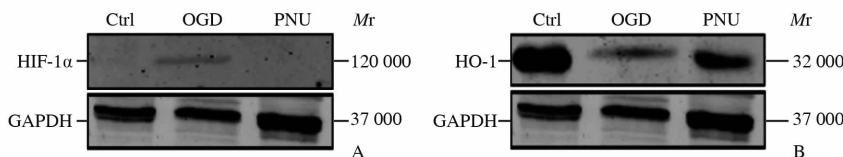


图 4 PNU-282987 对氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元 HIF-1 α (A)和 HO-1(B)蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of PNU-282987 on expression of HIF-1 α (A) and HO-1 (B) protein in cerebral cortical neuron exposed to OGD

Ctrl: Control; OGD: Oxygen-glucose deprivation; PNU: PNU-282987; HIF-1 α : Hypoxia inducible factor-1 α ; HO-1: Hemeoxygenase-1

3 讨论

本实验采用原代培养大鼠大脑皮质神经元,接近于体内细胞生物学特性,而氧糖剥夺模型是体外研究脑缺血性损伤的主要细胞模型,是细胞水平研究脑缺血性损伤的基本方法^[3]。近年来,脑缺血性损伤发病率逐年上升,给社会和家庭造成沉重的负担,因此研发神经元保护药物具有重要的临床意义。神经保护剂干预可阻断脑缺血性损伤的不同环节,起到神经保护作用^[4]。脑缺血性损伤涉及的级联反应包括兴奋性氨基酸毒性、梗死周围去极化、炎症反应、细胞凋亡等过程^[5]。脑缺血发生后,氧和葡萄糖供应减少,从而导致脑内氧化磷酸化过程发生障碍,能量减少甚至衰竭。而能量衰竭后又引起无氧糖酵解增加,产生的大量乳酸可引起组织酸中毒。LDH 作为参与机体能量代谢的酶,当细胞受到损伤时,细胞膜破裂,LDH 释放到细胞外,LDH 浓度越高,说明机体受损伤的程度就越大。因此,LDH 的活性改变可作为评价脑缺血程度的一个重要生化指标。有研究显示,神经元氧糖剥夺 12 h 时细胞凋亡明显^[6],PNU-282987 在氧糖剥夺条件下 $10 \mu\text{mol/L}$ 为最佳浓度^[7]。本研究结果表明,在大脑皮质神经元细胞氧糖剥夺 12 h 后 LDH 含量增加,而 PNU-282987 能降低 LDH 含量。

脑组织作为代谢最为活跃的器官,其自身能量和氧储备很少,能量来源完全依赖于血液所提供的氧和葡萄糖的有氧代谢,因而对缺血缺氧损伤极为敏感。脑缺血发生后,产生的大量乳酸引起组织酸

中毒,进而引起细胞死亡。Binienda^[8]研究证实,凋亡是神经元氧糖剥夺损伤后的重要死亡方式,并且凋亡率与氧糖剥夺损伤的程度在一定范围内呈正相关,因此抑制脑缺血性损伤后的凋亡能够降低神经细胞死亡率,减少受损神经元数量。本实验结果显示,氧糖剥夺可诱导神经元凋亡,PNU-282987 预处理后,细胞凋亡率下降,说明 PNU-282987 能抑制氧糖剥夺诱导的神经元凋亡。

脑缺血性损伤导致细胞凋亡涉及多种病理环节,氧化应激是其核心环节。氧糖剥夺损伤引起神经元细胞内产生大量自由基,导致氧化应激,产生 ROS。ROS 作为细胞内重要的信使,可活化多种信号通路,进而导致细胞损伤,其中包括 HIF-1 α 和 HO-1 信号通路^[9]。HIF-1 α 是氧化还原敏感的转录因子,它是异源二聚体结构,由缺氧性诱导亚基 α 和结构调节性亚基 β 组成;正常条件下 HIF-1 α 的表达很少,缺氧时, α 亚基作为主要的调节因子进入细胞核内与 β 亚基结合形成二聚体而活化,结合低氧效应元件发挥效应,调控下游基因的转录^[10]。HO-1 作为 HIF-1 α 靶基因,可参与细胞凋亡和增殖调控,其表达可以减少细胞死亡、蛋白质氧化及脂质过氧化,抵抗氧化应激对神经元的损害,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖^[11]。本实验结果显示,氧糖剥夺损伤诱导大脑皮质神经元 HIF-1 α 的表达增加,HO-1 蛋白表达降低,PNU-282987 可反馈性降低氧糖剥夺损伤诱导的大脑皮质神经元 HIF-1 α 表达,增加 HO-1 蛋白表达。这提示 PNU-282987 可通过降低 HIF-1 α 表达,增加 HO-1 表达,减少氧化应激损伤,

从而对神经元起到抗凋亡的作用。

研究表明,应用 $\alpha 7nAChR$ 激动剂可增加血肿区域小胶质细胞的数量,进而对脑内出血引起的损伤具有神经保护作用^[12]; Park 等^[13] 研究证实,激活 $\alpha 7nAChR$ 可降低小神经胶质细胞的活性和减少脂多糖诱导的 TNF- α 的释放;另有研究证实,激活 $\alpha 7nAChR$ 可减轻早期脑损伤^[2]。但激动 $\alpha 7nAChR$ 对大脑皮质神经元的作用尚未见报道。本研究发现激活 $\alpha 7nAChR$ 对氧糖剥夺损伤的大脑皮质神经元具有抗凋亡作用,同时降低氧化应激产生的 ROS 产量,调节 HO-1 与 HIF-1 α 蛋白表达,以抵抗氧糖剥夺引起的氧化应激损伤,证实 PNU-282987 对神经元的保护作用至少部分通过抗氧化应激而实现,提示 $\alpha 7nAChR$ 有望成为脑缺血性损伤研究的新靶点。

[参考文献]

- [1] Lu Y, Zhang J, Ma B, Li K, Bai H, Yang Q, et al. Glycine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice[J]. *Neurochem Int*, 2012, 61: 649-658.
- [2] Duris K, Manaenko A, Suzuki H, Rolland W B, Krafft P R, Zhang J H. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 attenuates early brain injury in a perforation model of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2011, 42: 3530-3536.
- [3] Ye R, Li N, Han J, Kong X, Cao R, Rao Z, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. *Neurosci Res*, 2009, 64: 306-310.
- [4] Kemmeren J M, Tanis B C, van den Bosch M A, Bolten E L, Helmerhorst F M, van der Graaf Y, et al. Risk of Arterial Thrombosis in Relation to Oral Contraceptives (RATIO) study: oral contraceptives and the risk of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2002, 33: 1202-1208.
- [5] Sanderson T H, Reynolds C A, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47: 9-23.
- [6] 陈江瑛, 闫振文, 张素平, 尹义臣. 氯沙坦对离体培养大鼠海马神经元缺氧缺血损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19: 984-987.
- [7] Parada E, Egea J, Buendia I, Negredo P, Cunha A C, Cardoso S, et al. The microglial $\alpha 7$ -acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 1135-1148.
- [8] Binienda Z. A fetal rat model of acute perinatal ischemia-hypoxia[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 765: 28-38, 59-61.
- [9] Singh M, Thomas P, Shukla D, Tulsawani R, Saxena S, Bansal A. Effect of subchronic hypobaric hypoxia on oxidative stress in rat heart[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169: 2405-2419.
- [10] Semenza G L. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011, 76: 347-353.
- [11] Nakamura T, Matsushima M, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N, et al. Attenuation of transforming growth factor- β -stimulated collagen production in fibroblasts by quercetin-induced heme oxygenase-1[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44: 614-620.
- [12] Hijioka M, Matsushita H, Ishibashi H, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates neuropathological changes associated with intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Neuroscience*, 2012, 222: 10-19.
- [13] Park H J, Lee P H, Ahn Y W, Choi Y J, Lee G, Lee D Y, et al. Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26: 79-89.

[本文编辑] 尹 茶