

# ADSCs-CM 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞神经保护作用及其机制

肖欢欢<sup>1</sup> 尹侃<sup>2</sup> 肖雨<sup>3</sup> 张峥<sup>1</sup> 侯琳<sup>1</sup>

(1 青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266071;

2 青岛微能生命科技集团有限公司; 3 滨州医学院第二临床医学院)

**[摘要]** 目的 探讨人脂肪间充质干细胞条件培养基(ADSCs-CM)对 1-甲基-4-苯基吡啶(MPP<sup>+</sup>)诱导的 SH-SY5Y 细胞神经保护作用及其机制。方法 将 SH-SY5Y 细胞分为 Ctrl 组、PD 组、CM 组, Ctrl 组置于基础培养基中培养, PD 组于 MPP<sup>+</sup> (1.0 mmol/L) + 基础培养基中培养, CM 组于 MPP<sup>+</sup> (1.0 mmol/L) + ADSCs-CM 培养, 均培养 24 h。分别使用活性氧(ROS)试剂盒、三磷酸腺苷(ATP)试剂盒、线粒体复合物 I (C I) 活性试剂盒检测各组 SH-SY5Y 细胞中 ROS 含量、ATP 总量和线粒体 C I 活性; 使用单丹磺酰尸胺(MDC)荧光法观察各组 SH-SY5Y 细胞自噬率; 采用 Western blot 方法检测各组 SH-SY5Y 细胞线粒体自噬相关蛋白 P62、LC3 的表达水平。结果 PD 组与 Ctrl 组、CM 组比较, SH-SY5Y 细胞的 ROS 含量、ATP 总量、线粒体 C I 的活性、细胞自噬率、P62、LC3 II / I 蛋白相对表达量比较差异均有显著性( $t_{\text{LSD}} = 3.23 \sim 12.61, P < 0.05$ )。结论 ADSCs-CM 可改善 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞中线粒体的功能障碍, 其作用机制可能是通过影响自噬相关蛋白 P62、LC3 的表达实现的。

**[关键词]** 帕金森病; 培养基, 条件性; 间质干细胞; 细胞系, 肿瘤; 氧化性应激; 线粒体自噬; 神经保护; 1-甲基-4-苯基吡啶

**[中图分类号]** R742.5

**[文献标志码]** A

## NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ADSCs-CM ON MPP<sup>+</sup>-INDUCED SH-SY5Y CELLS AND ITS MECHANISM OF ACTION

XIAO Huanhuan, YIN Kan, XIAO Yu, ZHANG Zheng, HOU Lin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the neuroprotective effect of human adipose-derived mesenchymal stem cells-conditioned medium (ADSCs-CM) on 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>)-induced SH-SY5Y cells and the underlying mechanism. **Methods** SH-SY5Y cells were divided into three groups for 24 h culture: control group (basic culture medium), PD group (1.0 mmol/L MPP<sup>+</sup> + basic culture medium), and CM group (1.0 mmol/L MPP<sup>+</sup> + ADSCs-CM). The content of reactive oxygen species (ROS) in SH-SY5Y cells was determined using a ROS assay kit. The total amount of adenosine triphosphate (ATP) in SH-SY5Y cells was measured using an ATP assay kit. The activity of mitochondrial complex I (C I) in SH-SY5Y cells was determined using a mitochondrial C I activity assay kit. The autophagy rate of SH-SY5Y cells was observed by the monodansylcadaverine fluorescence method. Western blot was used to measure the expression of mitochondrial autophagy-related proteins (P62 and LC3) in SH-SY5Y cells. **Results** Compared with the control and CM groups, the PD group showed significant differences in ROS content, total ATP amount, mitochondrial C I activity, autophagy rate, and the relative expression levels of P62 and LC3 II / I proteins in SH-SY5Y cells ( $t_{\text{LSD}} = 3.23 - 12.61, P < 0.05$ ). **Conclusion** ADSCs-CM can improve MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells, possibly through influencing the expression of autophagy-related proteins P62 and LC3.

**[KEY WORDS]** Parkinson disease; Culture media, conditioned; Mesenchymal stem cells; Cell line, tumor; Oxidative stress; Mitophagy; Neuroprotection; 1-Methyl-4-phenylpyridinium

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的进行性神经退行性疾病,其主要原因是黑质中多巴胺能神经元的选择性死亡,目前的治疗方法主要是通过左旋多巴(一种多巴胺前体)增强正常运动所需的多巴胺能信号来改善症状<sup>[1]</sup>,但是长期使用会使药物敏感性降低。至今尚没有可以减缓疾病进

展或防止神经变性的有效方法,临床迫切需要寻找治疗 PD 新的靶点和生物标志物。

间充质干细胞(MSCs)条件培养基(CM)对 PD 有刺激神经发生和减少神经炎症的作用,但是具体作用机制还不是很明确。以前针对 MSCs 的研究多是使用骨髓 MSCs(BM-MSCs)<sup>[2]</sup>,目前可从脂肪组织<sup>[3]</sup>、牙髓<sup>[4]</sup>、子宫内膜<sup>[5]</sup>、皮肤<sup>[6]</sup>、羊水<sup>[7]</sup>、胎盘<sup>[8]</sup>和脐带血<sup>[9]</sup>中分离获取。由于皮下脂肪组织丰富,易于获取,并且具有最低限度的伦理考虑<sup>[10]</sup>,因此,在各类的成体干细胞中,使用人脂肪间充质干细胞

**[收稿日期]** 2022-11-19; **[修订日期]** 2023-01-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81472542);山东省重点研发计划项目(2019GSF107025);山东省医药卫生科技发展计划项目(202102021-141)

**[通讯作者]** 张峥, Email: qdzenobiazz@163.com; 侯琳, Email: qingyi001@126.com

(ADSCs)的研究越来越多<sup>[11]</sup>。本研究通过 1-甲基-4-苯基吡啶(MPP<sup>+</sup>)诱导 SH-SY5Y 细胞损伤来模拟环境毒素导致的神经元损伤,探讨 ADSCs-CM 对 MPP<sup>+</sup>诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体功能的影响及其作用机制,为进一步寻找 PD 治疗靶点和开发 PD 的新治疗策略奠定实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞和试剂

人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)购自美国细胞培养物收藏中心(ATCC),ADSCs-CM 由青岛大学基础医学院干细胞再生医学研究院提供。二辛可宁酸测定(BCA)试剂盒、线粒体复合物 I(CI)活性测定试剂盒购买于北京索莱宝科技有限公司,MPP<sup>+</sup>(德国 Sigma 公司),JC-1 试剂盒(上海爱必信生物科技有限公司),活性氧(ROS)检测试剂盒、三磷酸腺苷(ATP)测定试剂盒、线粒体提取试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗人 LC3/P62(英国 Abcam 公司)。

### 1.2 细胞的处理和分组

将 SH-SY5Y 细胞于含体积分数 0.10 胎牛血清和体积分数 0.01 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中,置于 37 °C、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养,隔天更换一次培养基,每 2~3 d 传代一次。将生长密度达到 70%~80% 的 SH-SY5Y 细胞分为 Ctrl 组、PD 组和 CM 组,Ctrl 组于完全培养基中常规培养,PD 组在完全培养基中加入 1.0 mmol/L 的 MPP<sup>+</sup>以构建 PD 细胞模型<sup>[12]</sup>,将 CM 组置于含有 1.0 mmol/L MPP<sup>+</sup> 的 ADSCs-CM 中进行培养,均培养 24 h。

### 1.3 研究方法

**1.3.1** 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光方法检测 SH-SY5Y 细胞中 ROS 的含量 取处理 24 h 的各组 SH-SY5Y 细胞,去除原有的细胞培养液后,加入 1 mL 用基础培养基稀释的终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA,37 °C 下孵育 20 min,然后用无血清细胞培养基冲洗细胞 3 次,完全去除细胞表面的 DCFH-DA,通过荧光显微镜观察绿色荧光强度。

**1.3.2** ATP 测定试剂盒测定 SH-SY5Y 细胞中 ATP 总量 取处理 24 h 的各组 SH-SY5Y 细胞,严格按照 ATP 测定试剂盒测定方法操作,并使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪来测定各组 SH-SY5Y 细胞中 ATP 总量。

**1.3.3** 各组 SH-SY5Y 细胞中线粒体 CI 酶活性的测定 取处理 24 h 的各组 SH-SY5Y 细胞,严格按照线粒体提取试剂盒的提取方法提取线粒体蛋白,然后于线粒体蛋白中加入提取缓冲液,按照线粒体 CI 活性测定试剂盒的操作要求,测定线粒体 CI 的活性。

**1.3.4** 单丹磺酰尸胺(MDC)荧光法观察细胞自噬 在处理 24 h 的各组 SH-SY5Y 细胞的 6 孔板中,每孔加入 1 mL MDC 染色液,置于 37 °C 的恒温培养箱当中避光孵育 30 min。吸弃 MDC 染色液并使用 1 mL Assay Buffer 洗涤 3 次。最后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光。

**1.3.5** Western blot 实验检测 SH-SY5Y 细胞中 P62、LC3 蛋白相对表达量 在处理 24 h 的各组 SH-SY5Y 细胞中加入含有 1 mmol/L 苯甲磺酰氟的缓冲液(RIPA),采用放射免疫沉淀法提取细胞中总蛋白,并用 BCA 蛋白分析试剂盒对提取的蛋白进行定量。将等量的蛋白样品(30 μg)用体积分数 0.10 的 SDS-PAGE 分离胶,转移到 PVDF 上,室温下用体积分数 0.05 的牛血清白蛋白(BSA)封闭 3 h 后,与一抗 4 °C 孵育过夜。然后将二抗(1:5 000)在室温下孵育 1 h。使用增强化学发光试剂显现反应条带,使用 ImageG-Pro Plus6 软件分析目的蛋白条带 P62、LC3 和内参蛋白条带 GAPDH 的灰度值,将目的蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带的灰度值进行比较,得出目的蛋白的相对表达量。

## 2 结 果

### 2.1 各组 SH-SY5Y 细胞内 ROS 含量比较

Ctrl 组、PD 组、CM 组 SH-SY5Y 细胞 ROS 含量分别为 1.00±0.00、2.23±0.41、0.74±0.06,组间比较差异显著( $F=33.46, P<0.05$ )。其中,PD 组与 Ctrl 组、CM 组与 PD 组细胞中 ROS 含量比较差异均有显著性( $t_{LSD}=5.21、6.26, P<0.05$ ),Ctrl 组与 CM 组细胞中 ROS 含量比较差异无显著性( $P>0.05$ )。见图 1。

### 2.2 各组 SH-SY5Y 细胞中 ATP 总量比较

Ctrl 组、PD 组、CM 组 SH-SY5Y 中 ATP 总量分别为 0.24±0.04、0.13±0.02、0.27±0.06,组间比较差异有显著性( $F=8.79, P<0.05$ )。其中,PD 组与 Ctrl 组、CM 组与 PD 组细胞的 ATP 总量比较差异均有显著性( $t_{LSD}=4.00、4.02, P<0.05$ ),Ctrl 组与 CM 组细胞的 ATP 总量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 2.3 各组 SH-SY5Y 细胞中线粒体 CI 活性的比较

Ctrl 组、PD 组、CM 组 SH-SY5Y 细胞中线粒体 CI 的活性分别为  $19.40 \pm 1.14$ 、 $10.85 \pm 3.06$ 、 $18.92 \pm 3.06$ ，组间比较差异有显著意义 ( $F = 10.36$ ,  $P < 0.05$ )。其中，PD 组与 Ctrl 组，CM 组与 PD 组细胞线粒体 CI 活性比较差异均有显著意义 ( $t_{LSD} = 4.53, 3.23$ ,  $P < 0.05$ )，Ctrl 组与 CM 组细胞线粒体 CI 活性比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 各组 SH-SY5Y 细胞自噬水平的比较

MDC 荧光染色法观察各组 SH-SY5Y 细胞自噬情况，Ctrl 组、PD 组、CM 组细胞自噬率分别为  $1.00 \pm 0.00$ 、 $0.44 \pm 0.08$ 、 $1.33 \pm 0.31$ ，三组间比较有显著差异 ( $F = 18.21$ ,  $P < 0.05$ )。其中，PD 组与 Ctrl 组、CM 组与 PD 组比较差异均具有显著意义 ( $t_{LSD} = 12.61, 4.88$ ,  $P < 0.05$ )，Ctrl 组较 CM 组细胞自噬率比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

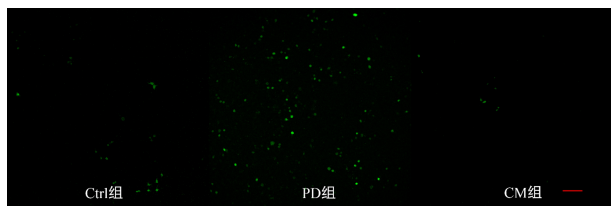


图 1 各组 SH-SY5Y 细胞中 ROS 含量 (DCFH-DA 染色, 400 倍)

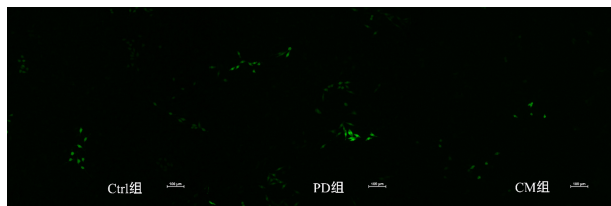


图 2 各组 SH-SY5Y 细胞的细胞自噬率 (MDC 染色, 400 倍)

### 2.5 各组 SH-SY5Y 细胞中 P62、LC3 蛋白相对表达量比较

Western blot 结果显示，Ctrl 组、PD 组、CM 组 SH-SY5Y 细胞中 P62 蛋白相对表达水平为  $1.00 \pm 0.00$ 、 $1.26 \pm 0.05$ 、 $1.10 \pm 0.05$ ，LC3 II / I 蛋白相对表达水平为  $1.00 \pm 0.00$ 、 $0.78 \pm 0.09$ 、 $1.11 \pm 0.05$ ，组间比较差异有显著性 ( $F = 28.61, 28.61$ ,  $P < 0.05$ )；PD 组与 Ctrl 组细胞中 P62、LC3 II / I 蛋白相对表达量比较差异均有显著性 ( $t_{LSD} = 8.78, 4.47$ ,  $P < 0.05$ )，CM 组与 PD 组细胞中 P62、LC3 II / I 蛋白相对表达量比较差异均有显著意义 ( $t_{LSD} = 3.80, 5.96$ ,  $P < 0.05$ )，Ctrl 组与 CM 组细胞中 P62、LC3 II / I 蛋白相对表达量比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

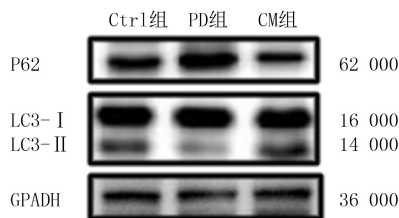


图 3 各组 SH-SY5Y 细胞中 P62、LC3 蛋白表达水平

百万人的身体健康和正常生活。PD 潜在的发病机制和切实有效的治愈方法至今仍不明确，目前的治疗方法也只能缓解患者运动障碍等症状，但不能阻止 PD 进展，也不能延长多巴胺能神经元存活时间。

干细胞移植已经成为治疗 PD 等神经退行性疾病的一项非常有效的方法。最近的证据表明，干细胞移植的治疗机制不是因为其具有直接分化能力，而是因为其分泌的生物活性分子发挥了相应的作用。MSCs 来源的分泌体系在为受损的组织提供再生微环境的同时<sup>[13]</sup>，还可以避免干细胞移植的副作用<sup>[14-15]</sup>。目前干细胞移植中存在的问题主要有移植细胞分化差、植入率和成活率低、有可能激活异体免疫排斥等<sup>[16]</sup>。干细胞所分泌的生物活性分子可以提供再生微环境，缩减损伤区域，建立一个自我调节的再生反应体系<sup>[17-18]</sup>。研究显示，MSCs-CM 对 PD 有刺激神经发生和减少神经炎症的作用。尽管 MSCs-CM 有神经保护作用，但其仍然有其治疗的局限性<sup>[17-18]</sup>。

线粒体功能障碍引起的神经元氧化应激在 PD 的发生中起着至关重要的作用。恢复线粒体功能和抑制氧化应激已成为 PD 受损神经元修复的关键疗法。本研究通过 DCFH-DA 染色方法对各组的 SH-SY5Y 细胞内 ROS 含量进行比较，研究结果表明，与 Ctrl 相比，PD 组细胞的 ROS 含量明显升高，与 PD 相比，CM 组细胞的 ROS 产生量显著降低，提示 ADSCs-CM 可降低 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 ROS 的含量。在应激条件下，有缺陷线粒体数量增加，产生大量活性氧，细胞内 ROS 无法及时清除<sup>[19]</sup>。线粒体是参与 ROS 生成的主要的细胞器<sup>[20]</sup>，ROS 过量的产生使得细胞的抗氧化效率降低从而导致细胞产生氧化应激，对线粒体产生不利的氧化修饰，这种现象在许多涉及线粒体功能障碍的神经退行性疾病当中均可以观察到<sup>[21]</sup>。本研究 ATP 合成测定结果表明，与 Ctrl 组相比，PD 组细胞的 ATP 总量明显降低，与 PD 组相比，CM 组细胞的 ATP 总量明显升高，提示在 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞中，ADSCs-CM 促进了 ATP 的生

## 3 讨 论

PD 作为一种神经退行性疾病，影响着世界上数

成。ROS 的过度积累会导致线粒体通透性转换孔异常开放,线粒体膜电位下降<sup>[22]</sup>。线粒体膜电位是 ATP 合成的驱动力,线粒体膜电位下降会导致细胞内 ATP 总量降低。本研究线粒体 C I 活性测定结果表明,与 Ctrl 组相比,PD 组细胞的线粒体 C I 活性明显降低,与 PD 组相比较,CM 组细胞的线粒体 C I 活性明显升高,提示在 MPP<sup>+</sup> 诱导 SH-SY5Y 中,ADSCs-CM 提升了线粒体 C I 的活性。由于细胞内 ATP 总量与线粒体 C I 的活性相关,那么在 ATP 合成减少的细胞中,线粒体 C I 活性也是降低的。本研究 MDC 荧光染色法结果表明,与 Ctrl 组相比,PD 组细胞的自噬率明显降低,而与 PD 组相比,CM 组细胞的自噬率明显升高。Western blot 结果表明,PD 组与 Ctrl 组、CM 组比较,细胞中 P62 蛋白相对表达量显著升高、LC3 II / I 蛋白相对表达量显著降低。这表明在 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞中,ADSCs-CM 可显著降低细胞自噬水平。自噬作为一个独立的系统,可降解体内受损的蛋白质和细胞器。在正常情况下,自噬处于动态平衡,维持内环境稳态,但在大多数神经退行性疾病中线粒体存在功能受损情况。研究发现,ADSCs-CM 可以导致线粒体自噬,从而清除受损线粒体,在氧化应激相关的 PD 中发挥神经保护作用<sup>[23]</sup>。

综上所述,本研究旨在通过 MPP<sup>+</sup> 作用于 SH-SY5Y 细胞构建 PD 细胞模型,检测 ROS 的产生量以评估 MPP<sup>+</sup> 诱导的氧化应激情况,并确定细胞 ATP 的产生和线粒体 C I 的活性以评估线粒体功能。通过分析 P62 和 LC3-II / I 表达以及细胞自噬率来评估 ADSCs-CM 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬的影响。研究数据表明,MPP<sup>+</sup> 诱导 SH-SY5Y 细胞线粒体功能障碍,而 ADSCs-CM 通过线粒体自噬清除受损线粒体,改善 MPP<sup>+</sup> 诱导的线粒体 ATP 合成减少、ROS 和氧化应激增加以及线粒体 C I 活性不足的情况。

总之,本研究表明 ADSCs-CM 通过线粒体自噬的方式改善 MPP<sup>+</sup> 诱导的线粒体功能障碍和体外氧化应激反应,为 PD 的诊断以及治疗提供了新思路。但是 ADSCs-CM 靶向调控 P62/LC3 通路在 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞中发挥神经保护作用的具体机制还需要进一步研究。

作者声明:肖欢欢、尹侃参与了研究设计;肖雨、张峥、侯琳参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] REICH S G, SAVITT J M. Parkinson's disease[J]. *Med Clin N Am*, 2019,103(2):337-350.
- [2] FRIEDENSTEIN A J, CHAILAKHJAN R K, LALYKINA K S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. *Cell Prolif*, 1970,3(4):393-403.
- [3] XUE C L, LI X C, BA L, et al. MSC-derived exosomes can enhance the angiogenesis of human brain MECs and show therapeutic potential in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Aging Dis*, 2021,12(5):1211-1222.
- [4] HUANG F, CHEN M G, CHEN W Q, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells inhibit xeno-graft-versus-host disease via CD39-CD73-adenosine and IDO signals[J]. *Front Immunol*, 2017,8:68.
- [5] LU H Y, WANG F, MEI H, et al. Human adipose mesenchymal stem cells show more efficient angiogenesis promotion on endothelial colony-forming cells than umbilical cord and endometrium[J]. *Stem Cells Int*, 2018,2018:7537589.
- [6] VISHNUBALAJI R, MANIKANDAN M, AL-NBAHEEN M, et al. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells[J]. *BMC Dev Biol*, 2012,12:7.
- [7] GASIŪNIENĖ M, ZENTELYTĖ A, WOJTAS B, et al. DNA methyltransferases inhibitors effectively induce gene expression changes suggestive of cardiomyogenic differentiation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells via chromatin remodeling[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019,13(3):469-481.
- [8] OLIVEIRA M S, BARRETO-FILHO J B. Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges[J]. *World J Stem Cells*, 2015,7(4):769-775.
- [9] TONDREAU T, MEULEMAN N, DELFORGE A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: Proliferation, Oct4 expression, and plasticity[J]. *Stem Cells*, 2005,23(8):1105-1112.
- [10] BRAY G A. Medical consequences of obesity[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004,89(6):2583-2589.
- [11] KATZ A J, THOLPADY A, THOLPADY S S, et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells[J]. *Stem Cells*, 2005,23(3):412-423.
- [12] LIAO Z Z, GONG Z S, WANG Z, et al. The degradation of TMEM166 by autophagy promotes AMPK activation to protect SH-SY5Y cells exposed to MPP[J]. *Cells*, 2022,11(17):2706.
- [13] D'ANGELO M, CIMINI A, CASTELLI V. Insights into the effects of mesenchymal stem cell-derived secretome in Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(15):5241.

[参考文献]

- [1] MINATOGUCHI S. Heart failure and its treatment from the perspective of sympathetic nerve activity[J]. *J Cardiol*, 2022, 79(6):691-697.
- [2] MCMURRAY J J V, DEMETS D L, INZUCCHI S E, et al. The dapagliflozin and prevention of adverse-outcomes in heart failure (DAPA-HF) trial: Baseline characteristics[J]. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21(11):1402-1411.
- [3] JOSHI S S, SINGH T, NEWBY D E, et al. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor therapy: Mechanisms of action in heart failure[J]. *Heart*, 2021, 107(13):1032-1038.
- [4] ZHANG N N, FENG B, MA X X, et al. Dapagliflozin improves left ventricular remodeling and aorta sympathetic tone in a pig model of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18:107.
- [5] ENGELHARDT S, BÖHM M, ERDMANN E, et al. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: Progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 27(1):146-154.
- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4):315-409.
- [7] DEFRONZO R A, HOMPESCH M, KASICHAYANULA S, et al. Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(10):3169-3176.
- [8] WIVIOTT S D, RAZ I, BONACA M P, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(4):347-357.
- [9] 杨一歌, 李鹤, 张秀立, 等. 慢性肾病及相关并发症治疗药物研究进展[J]. *药学报*, 2022, 57(9):2682-2695.
- [10] MATTHEWS V B, ELLIOT R H, RUDNICKA C, et al. Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2[J]. *J Hypertens*, 2017, 35(10):2059-2068.
- [11] POP-BUSUI R, BOULTON A J, FELDMAN E L, et al. Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(1):136-154.
- [12] SCHLAICH M P, KAYE D M, LAMBERT E, et al. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy[J]. *Circulation*, 2003, 108(5):560-565.
- [13] DAVIDSON J A. SGLT2 inhibitors in patients with type 2 diabetes and renal disease: Overview of current evidence [J]. *Postgrad Med*, 2019, 131(4):251-260.
- [14] ALVARSSON A, JIMENEZ-GONZALEZ M, LI R, et al. A 3D atlas of the dynamic and regional variation of pancreatic innervation in diabetes[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(41):eaz9124.
- [15] LYMPEROPOULOS A, BORGES J I, CORA N, et al. Sympatholytic mechanisms for the beneficial cardiovascular effects of SGLT2 inhibitors: A research hypothesis for dapagliflozin's effects in the adrenal gland[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14):7684.
- [16] HAUSBERG M, KOSCH M, HARMELINK P, et al. Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease[J]. *Circulation*, 2002, 106(15):1974-1979.
- [17] CHIU Y C, HUA T E, FU Y Y, et al. 3-D imaging and illustration of the perfusive mouse islet sympathetic innervation and its remodeling in injury[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(12):3252-3261.
- [18] NESPOUX J, VALLON V. SGLT2 inhibition and kidney protection[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(12):1329-1339.
- [19] CAMPBELL-THOMPSON M, BUTTERWORTH E A, BOATWRIGHT J L, et al. Islet sympathetic innervation and islet neuropathology in patients with type 1 diabetes [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):6562. (本文编辑 耿波 厉建强)
- (上接第 222 页)
- [14] FAN X L, ZHANG Y L, LI X, et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(14):2771-2794.
- [15] HARRELL C R, FELLAUBAUM C, JOVICIC N, et al. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome [J]. *Cells*, 2019, 8(5):467.
- [16] KARIMI-HAGHIGHI S, CHAVOSHINEZHAD S, SAFARI A, et al. Preconditioning with secretome of neural crest-derived stem cells enhanced neurotrophic expression in mesenchymal stem cells[J]. *Neurosci Lett*, 2022, 773:136511.
- [17] CAPLAN A I, DENNIS J E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(5):1076-1084.
- [18] CAPLAN A I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2):341-347.
- [19] WANG Y, JASPER H, TOAN S, et al. Mitophagy coordinates the mitochondrial unfolded protein response to attenuate inflammation-mediated myocardial injury [J]. *Redox Biol*, 2021, 45:102049.
- [20] CAI C, GUO Z Z, CHANG X, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK $\alpha$ 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 52:102288.
- [21] CENINI G, LLORET A, CASCELLA R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From a mitochondrial point of view[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:2105607.
- [22] FERNANDEZ-CAGGIANO M, EATON P. Heart failure-emerging roles for the mitochondrial pyruvate carrier[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4):1149-1158.
- [23] CHU C T. Mechanisms of selective autophagy and mitophagy: Implications for neurodegenerative diseases[J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 122:23-34. (本文编辑 耿波 厉建强)