

白振军,张慧宇,郭敏芳. 毛蕊异黄酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 H₂O₂ 导致的 SH-SY5Y 细胞损伤[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 37-43.

Bai ZJ, Zhang HY, Guo MF. Calycosin attenuates damage induced by H₂O₂ in SH-SY5Y cells by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 37-43.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.10.006

毛蕊异黄酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路 减轻 H₂O₂ 导致的 SH-SY5Y 细胞损伤

白振军¹, 张慧宇¹, 郭敏芳^{2*}

(1.山西大同大学中医药健康服务学院,山西大同 037009; 2.山西大同大学医学院,山西大同 037009)

【摘要】 目的 探讨毛蕊异黄酮对 H₂O₂ 刺激的 SY5Y 细胞氧化应激损伤的调控作用及其机制。方法 MTT 法检测毛蕊异黄酮对 SY5Y 细胞活性的影响以筛选合适的药物干预浓度;实验分 PBS 对照组, H₂O₂ (250 μmol/L) 模型组和 H₂O₂ (250 μmol/L) + 毛蕊异黄酮 (0.035 μmol/mL) 干预组;试剂盒检测 MDA 的含量和 SOD 的活性;免疫荧光染色检测 Nrf2 的核内转移情况及 HO-1 的表达,免疫印迹法检测总 Nrf2、核内 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白水平。**结果** 与 PBS 对照组比较, H₂O₂ 组 SY5Y 细胞活性降低,毛蕊异黄酮可以改善 H₂O₂ 诱导的细胞损伤,降低 MDA 的含量,增加 SOD 的活性。同时,毛蕊异黄酮能够激活 Nrf2 并促进其向核内转位,明显上调 H₂O₂ 损伤后细胞总 Nrf2、核内 Nrf2、NQO1 和 HO-1 的水平。**结论** 毛蕊异黄酮可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导的 SY5Y 细胞氧化应激损伤。

【关键词】 毛蕊异黄酮;核因子 E2 相关因子 2;血红素加氧酶 1;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 10-0037-07

Calycosin attenuates damage induced by H₂O₂ in SH-SY5Y cells by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway

BAI Zhenjun¹, ZHANG Huiyu¹, GUO Minfang^{2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine Health Service, Shanxi Datong University, Datong 037009, China.

2. Medical College, Shanxi Datong University, Datong 037009)

【Abstract】 **Objective** To explore the regulatory effect and mechanism of calycosin on oxidative stress injury of SY5Y cells induced by H₂O₂. **Methods** MTT assays were used to assess the effect of calycosin on the activity of SY5Y cells to screen for the appropriate drug concentration; The experiment included a PBS control group, H₂O₂ (250 μmol/L) model group, and H₂O₂ (250 μmol/L) + calycosin (0.035 μmol/mL) intervention group. Kits were used to detect MDA content and SOD activity. Immunofluorescence staining was used to detect nuclear transfer of Nrf2 and expression of HO-1. Western blotting detected the levels of total Nrf2, nuclear Nrf2, NQO1, and HO-1 proteins. **Results** Compared with the PBS control group, the activity of SY5Y cells in the H₂O₂ group was reduced and calycosin improved H₂O₂-induced cell damage, reduced the level of MDA, and increased the activity of SOD. Calycosin also activated Nrf2 and promote its translocation into the nucleus, which significantly upregulated the levels of total Nrf2, nuclear Nrf2, NQO1, and HO-1

【基金项目】 山西省平台基地专项(201805D111009);山西省高等学校科技创新项目(2020L0484);2019年神经炎症及变性疾病基础与应用研究山西省重点实验室开放课题(KF2019007)。

【作者简介】 白振军(1982—),男,讲师,研究方向:中医临床。E-mail: snowstom12@163.com

【通信作者】 郭敏芳(1980—),女,副教授,研究方向:神经免疫。E-mail: guominfang103@163.com

after H_2O_2 injury. **Conclusions** Calycosin inhibited H_2O_2 -induced oxidative stress injury in SY5Y cells by activating Nrf2/HO-1 signaling.

[Keywords] calycosin; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; hemoxygenase-1; oxidative stress

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病,随着世界人口老龄化的到来,AD 的发病率持续升高,导致了巨大的社会和经济负担^[1]。由于到目前为止 AD 确切的发病机制还不清楚,因此临床上常用的治疗仍然是一些对症治疗,没有有效的病因疗法^[2]。氧化应激是由于细胞过度暴露于活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等自由基引起的,是 ROS 的形成与抗氧化防御能力之间出现不平衡的结果,ROS 会引发细胞内信号传导级联的氧化爆发,并且参与神经元的死亡^[3-4]。众所周知,大脑是最易受氧化损伤的区域,因为它耗氧量高并且抗氧化剂系统相对较弱^[5],因此,氧化应激在 AD 的病理过程中发挥关键作用^[6]。这些研究证明抗氧化疗法是氧化应激相关疾病例如 AD 的最有前途的治疗选择之一。

有证据表明,体内排毒系统通过激活核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路来对抗氧化剂的损伤而发挥神经保护作用^[7]。Nrf2 是重要的氧化还原调节转录因子,激活的 Nrf2 从细胞质转移到细胞核,激活其下游一系列内源性氧化还原调节酶如血红素加氧酶 1 (hemoxygenase - 1, HO-1), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和 NADPH 醌氧化还原酶 1 (NADPH: quinone oxidoreductase 1, NQO1) 来触发细胞保护作用^[8-9],且最新研究表明 Nrf2 激活不足与 AD 密切相关^[10]。

毛蕊异黄酮是从黄芪中分离出来的有活性的黄酮类单体成分,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和神经保护作用^[11]。有研究表明,毛蕊异黄酮可以减轻 AD 的氧化应激和炎症反应,改善 AD 的认知缺陷^[12]。为了进一步研究毛蕊异黄酮的抗氧化应激和神经保护作用,本实验以人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为研究对象,用 H_2O_2 构建氧化应激细胞模型,研究毛蕊异黄酮的抗氧化保护作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人源神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株由军事医学研究院军事认知与脑科学研究所提供。

1.2 主要试剂与仪器

毛蕊异黄酮 (B9938)、牛血清白蛋白 (B2064) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国); 胎牛血清 (16140063)、青霉素-链霉素混合液 (15140163) 和高糖 DMEM (21013024) 购自 Gibco 公司 (美国); 兔抗 Nrf2 抗体 (ab62352)、兔抗 NQO1 抗体 (ab80588)、兔抗 HO-1 抗体 (ab13243)、Alex Flour® 488 (ab150077) 和 Alex Flour® 594 (ab150080) 标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (ab205718) 均购自 Abcam 公司 (美国); RIPA 裂解液 (P0013B)、细胞核蛋白和细胞浆蛋白抽提试剂盒 (P0027)、4-甲基偶氮唑蓝 (MTT) 检测试剂盒 (ST316)、SOD 活性检测试剂盒 (S0103) 和丙二醛 (MDA) 检测试剂 (S0131M) 均购自碧云天生物技术有限公司 (中国,上海)。

HERAcell 240i 二氧化碳培养箱购自美国 Thermo 公司; LA2-5A1 型生物安全柜购自新加坡 ESCO 公司; BX51 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; H1M 多功能酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司; SYSTEM GelDoc XR+ 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

SY5Y 细胞用高糖 DMEM 基础培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素混合液), 置于 5% CO_2 、37℃ 的 CO_2 培养箱中进行培养,当细胞生长达 80% 的时候进行传代。

1.3.2 毛蕊异黄酮浓度筛选

将指数生长期的 SY5Y 细胞以每毫升 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后加入不同终浓度的毛蕊异黄酮 (0、0.035、0.070、0.140、0.281 $\mu\text{mol/mL}$), 每个浓度设 6 个复孔。24 h 后每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液 (0.012 mol/L), 37℃ 继续孵育 3~4 h 后离心弃上清液,每孔加入 150 μL 的 DMSO, 震荡 5 min 使结晶溶解,酶标仪检测 490 nm 波长各孔的光密度值。细胞的存活率 (%) = (加药孔-调零孔)/(对照孔-调零孔) $\times 100\%$ 。选取可以增加细胞活性或者对细胞活性无明显影响的毛蕊异黄酮浓度作为后续实验的使用浓度。

1.3.3 SY5Y 细胞氧化损伤模型的建立及实验分组

采用 H_2O_2 刺激 SY5Y 细胞建立氧化损伤模型。实验分为 3 组: PBS 对照组、 H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$) 模型组、 H_2O_2 (250 $\mu\text{mol/L}$) + 毛蕊异黄酮 (0.035 $\mu\text{mol/mL}$) 干预组。培养 24 h 后, 收集上清并离心, -80°C 冰箱冻存备用。

1.3.4 MTT 法检测毛蕊异黄酮对 SY5Y 细胞的保护作用

药物作用 24 h 后, MTT 法检测各组细胞活性, 评估毛蕊异黄酮对 H_2O_2 致细胞损伤的保护作用。

1.3.5 氧化应激指标的检测

取出冻存备用的细胞上清液, 分别按照试剂盒说明书检测丙二醛 MDA 的水平和超氧化物歧化酶 SOD 的活性。

1.3.6 免疫荧光染色检测 SY5Y 细胞中 Nrf2 的核转位情况和 HO-1 的表达

为检测毛蕊异黄酮干预 SY5Y 细胞是否可以使 Nrf2 表达增加并转移到核内, 采用免疫荧光染色检测细胞中 Nrf2 表达的变化, 同时检测 HO-1 的表达。将细胞接种于放置好细胞爬片的 24 孔板中, 密度为每毫升 4×10^5 个, 各组分别加入 H_2O_2 和毛蕊异黄酮, 培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用含有 0.3% Triton X-100 和 1% BSA 的 PBS 室温下封闭 1 h, 加入兔抗小鼠 Nrf2 或者兔抗小鼠 HO-1 一抗, 4°C 孵育过夜, 加 488 或者 594 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 室温下孵育 2 h, 5% 甘油封片, 荧光显微镜扫描观察。

1.3.7 Western blot 法检测 SY5Y 细胞总 Nrf2、细胞核内 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白水平

药物作用 24 h 后, 用 RIPA 裂解液或者是细胞核蛋白和细胞浆蛋白抽提试剂盒提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量。采用 10% SDS-PAGE 不连续凝胶分离蛋白, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入用封闭液稀释的兔抗小鼠 Nrf2 抗体 (1:500)、兔抗小鼠 NQO1 (1:500) 或兔抗小鼠 HO-1 抗体 (1:500), 4°C 冰箱孵育过夜, 次日加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000), 2 h 后滴 ECL 发光液于膜上, 随后用 Bio-Rad 凝胶成像系统显影并分析。

1.4 统计学方法

计量资料以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 采用 SPSS 15.0 对实验数据进行统计学处理, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛蕊异黄酮浓度筛选

通过 MTT 法检测毛蕊异黄酮对细胞的毒性作用, 筛选合适的药物浓度, 结果显示毛蕊异黄酮终浓度为 0.035 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.070 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.140 $\mu\text{mol/mL}$ 、0.281 $\mu\text{mol/mL}$ 时的细胞活力分别为 $109.83\% \pm 8.57\%$ 、 $100.67\% \pm 11.64\%$ 、 $80.83\% \pm 7.94\%$ 、 $50.33\% \pm 9.22\%$, 与对照孔 $99.33\% \pm 7.34\%$ 相比, 0.035 $\mu\text{mol/mL}$ 毛蕊异黄酮可以增加细胞活性 ($P < 0.05$), 随着药物浓度的增加, 细胞活力随之降低, 0.070 $\mu\text{mol/mL}$ 毛蕊异黄酮处理组的细胞活性和对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 0.140 $\mu\text{mol/mL}$ 毛蕊异黄酮处理组的细胞活性显著降低, 与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1), 因此后期实验毛蕊异黄酮选择 0.035 $\mu\text{mol/mL}$ 作为药物干预浓度。

2.2 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导 SY5Y 细胞损伤的保护作用

用 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 SY5Y 细胞, 药物组同时加 0.035 $\mu\text{mol/mL}$ 毛蕊异黄酮进行处理, 药物作用 24 h 后采用 MTT 法检测细胞活性。结果显示, 与对照组相比, H_2O_2 损伤细胞 24 h 后, 细胞活力明显下降 ($P < 0.001$), 而毛蕊异黄酮能够显著抑制 H_2O_2 对 SY5Y 细胞造成的损伤作用, 细胞活力明显增加 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导 SY5Y 产生的 SOD 和 MDA 的影响

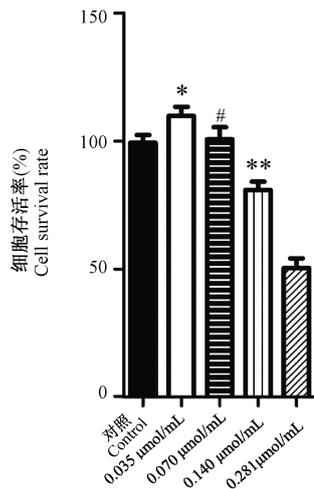
测量自由基的氧化终产物丙二醛 (MDA) 和抗氧化酶 (SOD) 的量能有效的反应细胞的氧化应激状态。与 PBS 对照组比较, H_2O_2 刺激后导致 SY5Y 细胞中 MDA 含量明显升高 ($P < 0.001$), SOD 活性明显降低 ($P < 0.001$)。毛蕊异黄酮能够显著降低 MDA 的水平 ($P < 0.001$), 提高 SOD 的活性 ($P < 0.01$, 图 3), 抑制 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤。

2.4 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导 SY5Y 细胞表达 Nrf2 的影响

为了探讨毛蕊异黄酮抑制 H_2O_2 致 SY5Y 细胞氧化损伤作用的机制, 本研究采用免疫荧光和 Western blot 方法分析了 Nrf2 的表达及其核转位情况。免疫荧光结果显示, PBS 对照组中的 Nrf2 主要分布在细胞质中, 细胞核中的含量较少, 模型组细胞质和细胞核内 Nrf2 含量均有所减少, 而毛蕊异黄

酮作用 24 h 后,细胞核中的 Nrf2 含量明显增加,胞质内 Nrf2 含量减少,说明毛蕊异黄酮可以促进 Nrf2 激活并向核内转位。Western blot 蛋白定量结果发现,与 PBS 对照组比较, H_2O_2 组总的 Nrf2 和细胞核内 Nrf2 表达均降低($P < 0.05$),而毛蕊异黄酮作用后总的 Nrf2 和细胞核内 Nrf2 表达均明显增加($P < 0.001$,图 4)。

2.5 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导的 SY5Y 细胞抗氧

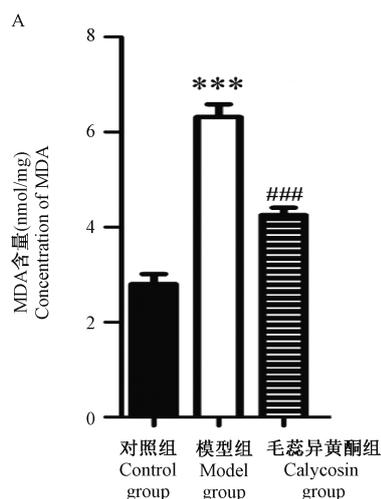


注:与对照孔比较,* $P < 0.05$,# $P > 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度毛蕊异黄酮对 SY5Y 细胞活性的影响

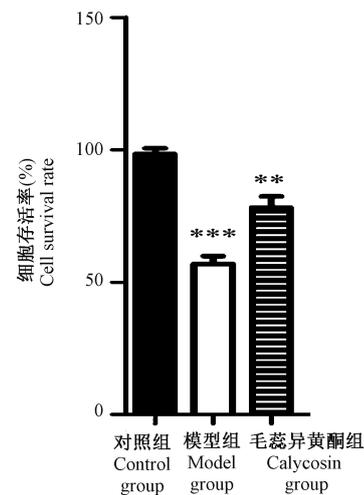
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, # $P > 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of different concentrations of calycosin on the activity of SY5Y cells



化蛋白 NQO1 和 HO-1 表达的影响

免疫荧光检测 HO-1 的表达,同时利用 Western blot 法检测 NQO1 和 HO-1 的表达。免疫荧光结果显示毛蕊异黄酮可以增加 HO-1 的表达,同时 Western blot 结果显示,与 PBS 对照组相比,模型组细胞 NQO1 和 HO-1 的表达显著降低($P < 0.01$)。与 H_2O_2 组相比,毛蕊异黄酮处理组 NQO1 和 HO-1 表达明显增加($P < 0.05$,图 5)。

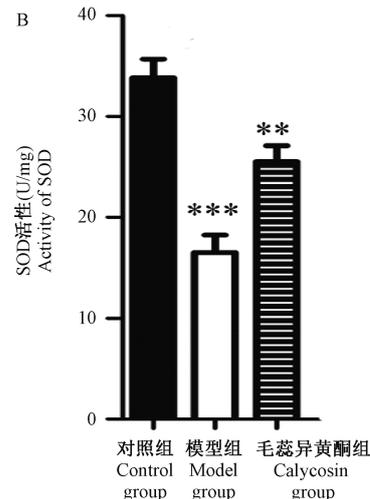


注:与对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图 2 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导 SY5Y 细胞损伤的保护作用

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Protective effect of calycosin on H_2O_2 induced SY5Y cell damage

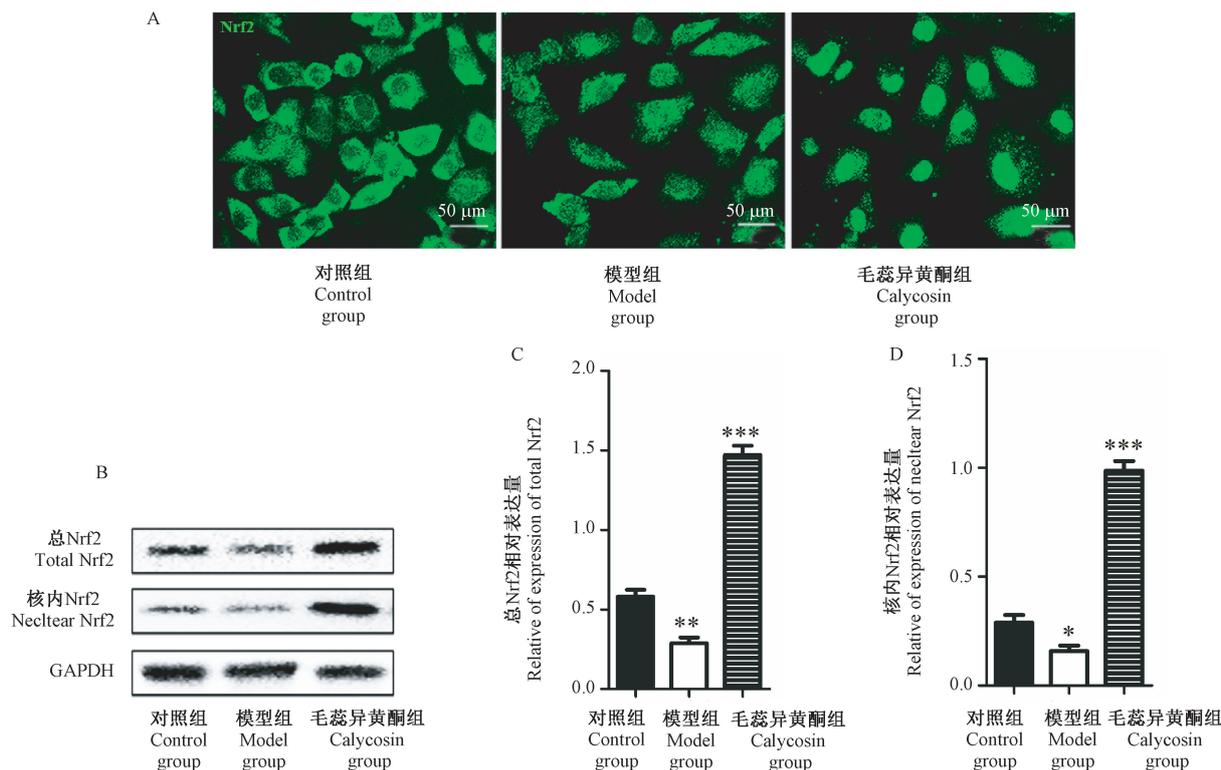


注:A:MDA 含量;B:SOD 活性。与对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,### $P < 0.001$,** $P < 0.01$ 。

图 3 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导 SY5Y 细胞产生的 SOD 和 MDA 的影响

Note. A, Concentration of MDA. B, Activity of SOD. Compared with the Control group, *** $P < 0.001$. Compared with the Model group, ### $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of calycosin on the level of SOD and MDA induced by H_2O_2 in SY5Y cells



注:A:免疫荧光染色法检测毛蕊异黄酮促进 Nrf2 向细胞核内转位;B:总 Nrf2 和核内 Nrf2 蛋白免疫印迹条带图;C:总 Nrf2 相对表达量;D:核内 Nrf2 相对表达量。与对照组比较,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;与模型组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 4 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 损伤 SY5Y 细胞 Nrf2 表达的影响

Note. A, Immunofluorescence staining was used to detect calycosin promotes Nrf2 translocation into the nucleus. B, Western blot assay of total Nrf2 and nuclear Nrf2. C, Relative expression of total Nrf2. D, Relative expression of nuclear Nrf2. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Compared with the model group, *** $P < 0.001$.

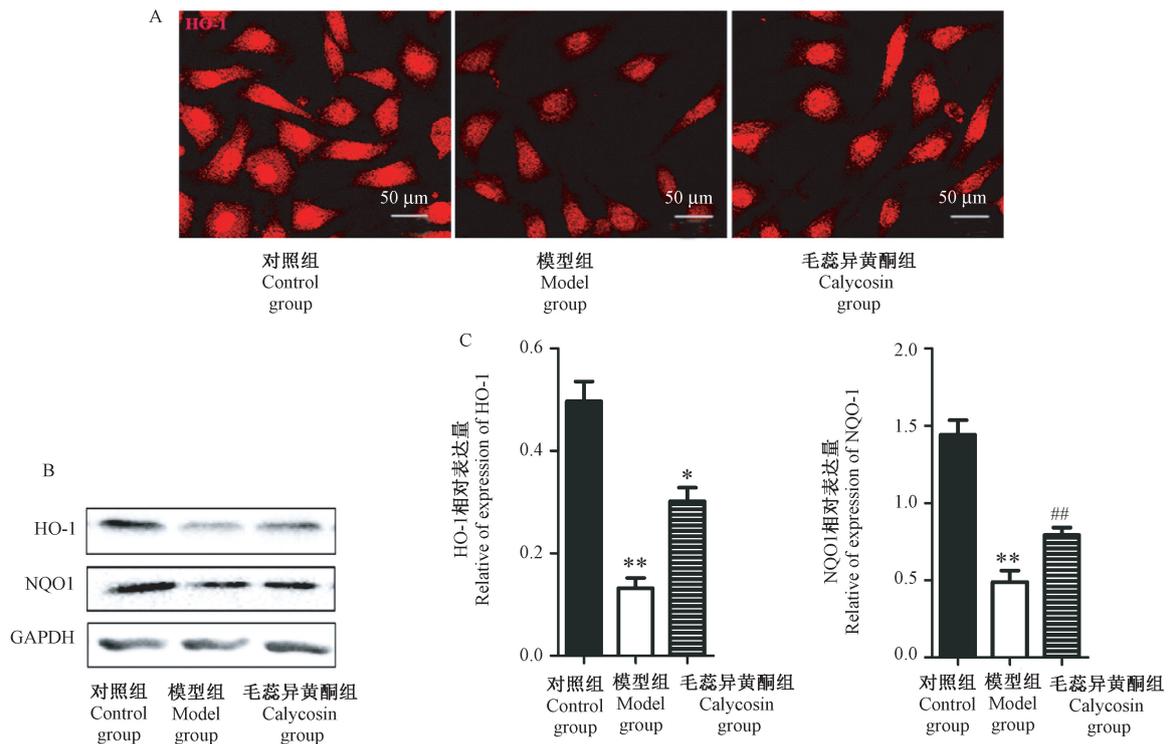
Figure 4 Effect of calycosin on the expression of Nrf2 in SY5Y cells injured by H_2O_2

3 讨论

氧化应激已被认为是 AD 的发病机制之一^[13]。与其他器官相比,由于高氧消耗和缺乏抗氧化酶,神经元更容易受到自由基的破坏^[14]。在 AD 患者的组织样本中明显出现了氧化应激增加的迹象,并在疾病中证明了由 ROS 直接诱导或者是由脂质过氧化产物间接诱导的蛋白质修饰^[15]。有研究发现许多用于 AD 治疗的化合物具有有效的抗氧化特性,例如司立吉林,黄酮类,褪黑素和类胡萝卜素等^[16]。因此本实验研究毛蕊异黄酮的抗氧化应激效果,进一步为黄酮类药物治疗 AD 提供实验依据。

毛蕊异黄酮,从黄芪中分离出来的一种有效成分,它的极性很小,不仅可以去除游离的自由基,而且可以穿透生物膜脂质双层去除结合的活性氧并延迟脂质生物膜的过氧化,从而提高人体的抗氧化应激能力^[17]。且有研究表明,毛蕊异黄酮可以通过

减少氧化应激和炎症反应,并改善 AD 模型小鼠的认知功能,并缓解 AD 的症状^[12]。也有研究显示,毛蕊异黄酮可以减轻缺氧缺糖/复氧复糖导致的 PC12 细胞凋亡,发挥神经保护作用^[18]。然而,关于毛蕊异黄酮抗氧化应激的机制还不十分清楚。SH-SY5Y 是多巴胺能神经元细胞,被广泛用于研究神经退行性疾病如 AD 和 PD 的细胞模型^[19]。因此本实验采用 H_2O_2 刺激 SH-SY5Y 建立氧化应激损伤模型,检测毛蕊异黄酮的抗氧化作用及其可能的机制。实验结果显示毛蕊异黄酮浓度在 $0.035 \mu\text{mol/mL}$ 时,可以增加细胞活性, $0.140 \mu\text{mol/mL}$ 时细胞活性开始降低,因此我们选定 $0.035 \mu\text{mol/mL}$ 为毛蕊异黄酮的干预浓度。同时结果显示, $250 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 SY5Y 细胞可以使其细胞存活率降低,而毛蕊异黄酮可以抑制 H_2O_2 诱导的细胞损伤,使细胞存活率增加,表明毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导的 SY5Y 细胞氧化应激损伤具有保护作用。



注:A:免疫荧光染色法检测 HO-1 的表达;B:HO-1 和 NQO1 蛋白免疫印迹条带图;C:HO-1 相对表达量;D:NQO1 相对表达量。与对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 5 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 损伤 SY5Y 细胞 NQO1 和 HO-1 表达的影响

Note. A, Immunofluorescence staining detect the expression of HO-1. B, Western blot assay of HO-1 and NQO1. C, Relative expression of total HO-1. D, Relative expression of nuclear NQO1. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of calycosin on the expression of NQO1 and HO-1 in SY5Y cells injured by H_2O_2

MDA 是自由基发生脂质过氧化的终产物, SOD 是体内自由基的天然清除剂, 可以保护机体免受氧化损伤, 因此 MDA 和 SOD 是反应氧化应激的两个重要指标^[20]。本研究发现, H_2O_2 可使 SY5Y 细胞 MDA 含量明显升高, SOD 活性明显降低。毛蕊异黄酮处理组 SY5Y 细胞 MDA 含量降低, SOD 活性显著升高。显示毛蕊异黄酮可通过增加抗氧化酶 SOD 的活性来抵抗 H_2O_2 所造成的氧化性损伤, 表明其具有良好的抗氧化应激作用。

Nrf2/HO-1 信号通路是维持细胞氧化还原稳态的关键途径^[21]。Nrf2 激活并从细胞质转移到细胞核, 进而诱导下游保护性靶基因 NQO1 和 HO-1 的表达, 从而维持细胞内稳态^[22]。有研究表明, H_2O_2 刺激 SY5Y 细胞后, Nrf2 的转录活性降低, 细胞核内 Nrf2 及其下游分子 NQO 和 HO-1 的表达明显降低^[23]。本研究结果表明, H_2O_2 刺激细胞后总 Nrf2 及核内 Nrf2 的表达均较对照组减少, 而毛蕊异黄酮干预能够激活 Nrf2 使其表达增加并促使其向核内

转位。同样 Western blot 蛋白定量结果表明, 毛蕊异黄酮干预能够明显增加 H_2O_2 损伤后总 Nrf2 和核内 Nrf2 的表达, 并且能够明显增强 H_2O_2 损伤后 Nrf2 诱导的 II 相辅酶 NQO1 和 HO-1 的表达, 提示毛蕊异黄酮可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路发挥抗氧化应激的保护作用。

综上所述, 毛蕊异黄酮能够抵抗 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 氧化损伤, 其机制可能是激活了 Nrf2, 并促进 Nrf2 向核内转位, 进而上调了其下游抗氧化酶 NQO1 和 HO-1 的表达, 然而毛蕊异黄酮发挥抗氧化损伤和神经保护作用的确切机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(4): 459-509.
- [2] Gao LB, Yu XF, Chen Q, et al. Alzheimer's disease therapeutics: current and future therapies [J]. *Minerva Med*, 2016, 107(2): 108-113.
- [3] Lobo V, Patil A, Phatak A, et al. Free radicals, antioxidants

- and functional foods: Impact on human health [J]. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4(8): 118–126.
- [4] Manczak M, Park BS, Jung Y, et al. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implication for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage [J]. *Neuromolecular Med*, 2004, 5(2): 147–162.
- [5] Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 490–503.
- [6] Lananna BV, Musiek ES. The wrinkling of time: Aging, inflammation, oxidative stress, and the circadian clock in neurodegeneration [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 139: 104832.
- [7] Zhang M, An C, Gao Y, et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 100: 30–47.
- [8] Cao S, Chao D, Zhou H, et al. A novel mechanism for cytoprotection against hypoxic injury: δ -opioid receptor-mediated increase in Nrf2 translocation [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(7): 1869–1881.
- [9] Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Kazantsev AG. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative disease [J]. *FEBS J*, 2018, 285(19): 3576–3590.
- [10] Bahn G, Jo DG. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through modulation of NRF2 [J]. *Neuromolecular Med*, 2019, 21(1): 1–11.
- [11] Li S, Zhou XL, Dang YY, et al. Basal Flt1 tyrosine kinase activity is a positive regulator of endothelial survival and vascularization during zebrafish embryogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(2): 373–384.
- [12] Song L, Li X, Bai XX, et al. Calycosin improves cognitive function in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by activating the protein kinase C pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(11): 1870–1876.
- [13] Jiang T, Sun Q, Chen S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 147: 1–19.
- [14] Monzani E, Nicolis S, Dell'Acqua S, et al. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(20): 6512–6527.
- [15] Kell DB. Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples [J]. *Arch Toxicol*, 2010, 84(11): 825–889.
- [16] Sharma P, Srivastava P, Seth A, et al. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 174: 53–89.
- [17] Zhang Y, Zhang T, Wang SN, et al. Study on pharmacological effects of calycosin in astragali radix [J]. *Medicinal Plant*, 2020, 22(02): 38–40+43.
- [18] 张三宁, 靳晓飞, 唐敬龙, 等. 毛蕊异黄酮减轻缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 41–49.
- [19] Mangieri LR, Mader BJ, Thomas CE, et al. ATP6V0C knockdown in neuroblastomacells alters autophagy-lysosome pathway function and metabolism of proteins that accumulate in neurodegenerative disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93257.
- [20] Shu Q, Fan H, Li SJ, et al. Protective effects of Progranulin against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress and NF- κ B activation in reactive astrocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 6584–6597.
- [21] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 199–218.
- [22] Vriend J, Reiter RJ. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 401: 213–220.
- [23] Wan T, Wang Z, Luo Y et al. FA-97, a new synthetic caffeic acid phenethyl ester derivative, protects against oxidative stress-mediated neuronal cell apoptosis and scopolamine-induced cognitive impairment by activating Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8239642.

[收稿日期] 2020-04-13