

论著

染料木黄酮对 β 淀粉样肽介导的脑血管内皮细胞损伤的保护作用研究

韩静, 席元第, 肖荣, 张丹娣, 刘金萌, 余焕玲

(首都医科大学公共卫生学院 环境毒理学北京市重点实验室, 北京 100069)

摘要:目的 研究染料木黄酮(Gen)对 β 淀粉样肽 25-35(A β 25-35)介导的脑血管内皮细胞损伤的调节作用。方法 脑血管内皮细胞(bEnd.3 细胞系)传代 48 h 后,分为 4 组(对照组、A β 组、Gen 组、Gen + A β 组)。Gen 预处理 2 h 后,A β 25-35 染毒建立细胞损伤模型;24 h 后收集细胞进行指标检测。采用 ELISA 法检测脑血管内皮细胞 8-OHdG 水平;酶法试剂盒检测 GSH-Px 水平;RT-PCR 和 Western blot 法检测 *Bcl-2*、*Bax* 基因和蛋白表达的改变。结果 与对照组比较,A β 组 8-OHdG 水平明显升高,GSH-Px 活性明显下降,且差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 A β 组比较,Gen 组和 Gen + A β 组 8-OHdG 水平明显下降,GSH-Px 活性明显升高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$);同时,A β 组 *Bcl-2* 基因和蛋白表达水平较对照组明显下调,*Bax* 基因和蛋白表达水平明显上调,且差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 A β 组比较,Gen + A β 组和 Gen 组 *Bcl-2* 基因和蛋白表达水平明显上调,*Bax* 基因和蛋白表达水平明显下调,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Gen 可能通过拮抗 A β 25-35 介导的脑血管内皮细胞氧化损伤,进而发挥对脑血管的保护作用。

关键词:染料木黄酮; β 淀粉样肽 25-35;脑血管内皮细胞;氧化损伤;保护作用;抗氧化

中图分类号:R155; O622.4; Q344⁺.13 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)01-0001-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.01.001

The protective effects of genistein on A β induced damage in brain vascular endothelial cells

HAN Jing, XI Yuan-di, XIAO Rong, ZHANG Dan-di, LIU Jin-meng, YU Huan-ling

(School of Public Health, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of

Environmental Toxicology, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of genistein on A β 25-35 induced damage in brain vascular endothelial cells. **Methods** Cell line of bEnd.3 was cultured for 48 h. Four groups were the following: control group, A β group, Gen group and Gen + A β group. A β 25-35 was used to establish cell damage model. Gen was applied 2 hours prior to the addition of A β 25-35. Cells were harvested for measurement after 24 hours. The level of 8-OHdG and GSH-Px were tested by ELISA and enzyme assay kit; the expression of *Bcl-2* and *Bax* mRNA and protein were tested by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with control group, the level of 8-OHdG and GSH-Px in A β group was significantly increased and decreased respectively ($P < 0.05$); compared with A β group, Gen group, Gen + A β group had reverse results ($P < 0.05$). Compared with control group, the mRNA and protein expression of *Bcl-2* were significantly down-regulated in A β group ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression of *Bax* were significantly up-regulated in A β group ($P < 0.05$). Compared with A β group, the mRNA and protein expression of *Bcl-2* were significantly up-regulated in Gen group and Gen treatment group ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression of *Bax* were significantly down-regulated in Gen group and Gen treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** Gen could exert a protective effect on A β induced oxidative damage in brain vascular endothelial cells.

Key words: Genistein; β -amyloid peptide 25-35; brain vascular endothelial cells; oxidative stress; protective effect; antioxidation

脑血管因素在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发生发展中扮演着重要的角色,且 AD 患者存在多种脑血管病理改变,如毛细血管萎

缩、退变及脑淀粉样病变等^[1]。脑内 β 淀粉样肽(β -amyloid, A β)异常增多可诱发脑血管内皮细胞氧化损伤^[2]。研究证实细胞凋亡的发生发展与氧化损伤密切相关^[3]。在 AD 患者及 AD 的动物及相关细胞模型中均发现有神经细胞凋亡现象,该过程可能与 A β 过量沉积引起细胞膜脂质过氧化并激活半胱天冬酶(caspase)家族等凋亡途径有关^[4]。因此,在研究脑血管内皮细胞氧化损伤与细胞凋亡的发生发展对于探索如何防止脑血管病变的发生,延缓

收稿日期:2014-09-26

基金项目:国家自然科学基金(81172661)

作者简介:韩静 女 硕士生 研究方向为植物化学物与神经保护作用

E-mail:hanjing1989h@163.com

通讯作者:肖荣 女 教授 研究方向为膳食因素与神经退行性疾病

E-mail:xiaor22@ccmu.edu.cn

AD的发病进程具有重要的现实意义。

染料木黄酮(genistein, Gen)是大豆异黄酮的主要活性形式。大量研究均已证实^[5], Gen具有抗氧化、抗炎、调节细胞周期、抑凋亡以及舒张外周血管等多种生理作用。本研究旨在探讨Gen对脑血管内皮细胞氧化应激与凋亡相关基因两方面的关系, 应用A β 25-35建立脑血管内皮细胞(bEnd.3细胞系)损伤模型, 经Gen预处理, 检测脑血管内皮细胞8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-desoxyguanosine, 8-OHdG)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、*Bcl-2*及*Bax*基因和蛋白表达水平。进而从膳食角度, 为早期预防AD中脑血管内皮细胞损伤提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细 胞

bEnd.3细胞为小鼠脑微血管内皮细胞系, 购自美国菌种保藏中心(ATCC)细胞库。

1.1.2 主要仪器与试剂

酶标仪(瑞士 Tecan)、核酸蛋白分析仪(美国 Bio-Rad)、凝胶成像分析系统(FluorChem FC2, 美国 Alpha Innotech)、梯度PCR仪(美国 Bio-Rad)、电泳仪。

Gen、A β 25-35、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国 Sigma, DMEM-F12、胎牛血清均购自美国 Gibco, 8-OHdG ELISA试剂盒(加拿大 HCB), GSH-Px检测试剂盒(碧云天生物技术研究), SV Total RNA Isolation System(美国 Promega), 反转录试剂盒(A3500, 美国 Promega), *Taq* DNA聚合酶(日本 Takara), 细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司), *Bcl-2*兔多克隆抗体、*Bax*兔多克隆抗体均购自英国 Abcam, β -actin兔多克隆抗体(美国 Santa Cruz)。

试剂配制: Gen(经高效液相色谱检测纯度 $\geq 98\%$): 25 mg Gen溶于250 μ l DMSO中配成Gen储备液, 取Gen储备液8 μ l于3 992 μ l DMEM培养基中即为应用液, Gen储备液及应用液均-20 $^{\circ}$ C保存; A β 25-35(经高效液相色谱检测纯度 $\geq 97\%$): 1 mg A β 25-35溶于1 510 μ l无菌去离子水中充分溶解, 37 $^{\circ}$ C老化7 d, 适当分装后-20 $^{\circ}$ C保存。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

bEnd.3细胞使用含10%胎牛血清及1%青链霉素的DMEM-F12培养基, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中培养, 2~3 d换液或传代处理。

1.2.2 细胞分组与处理

细胞分为正常对照组、A β 组、Gen组、Gen + A β 组, bEnd.3细胞系培养传代48 h后, Gen(100 μ mol/L)

预孵育2 h再经A β 25-35(25 μ mol/L)染毒建立脑血管内皮细胞氧化损伤模型^[6]。前期试验采用MTT法检测了不同浓度Gen(25、50、100、200 μ mol/L) + A β 25-35组的细胞活力, 证实Gen 100 μ mol/L + A β 25-35组脑血管内皮细胞活力明显高于其余组, 故确定Gen 100 μ mol/L浓度作为脑血管内皮细胞的保护作用剂量, 用于下一步试验。培养24 h后收集备用, 检测各项指标。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平

收集细胞培养上清液于无菌试管中, 4 $^{\circ}$ C 2 500 r/min离心15 min, 收集上清备用, 于 $\lambda = 450$ nm条件下酶标仪测定吸光度。

1.2.4 比色法检测细胞谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平

每组细胞加入细胞裂解液, 冰浴40 min后4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min离心15 min, 取上清用于酶活性测定, 于 $\lambda = 340$ nm条件下酶标仪测定吸光度。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分析

NCBI数据库中检索后设计引物, 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行引物合成。*Bcl-2*、*Bax*、 β -actin基因的引物序列、退火温度及片段长度见表1。

表1 *Bcl-2*、*Bax*、 β -actin基因的引物序列、退火温度及片段长度
Table 1 Primers for *Bcl-2*、*Bax*、 β -actin, the annealing temperature and fragment length

基因	引物序列(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	长度/bp
<i>Bcl-2</i>	F:GTCCGTGCTGCATTAG	56	153
	R:ACCGCTTCAGACCTCCAG		
<i>Bax</i>	F:TCATCCAGGATCGAGCAG	54	138
	R:GCTCCATATTGCTGTCCA		
β -actin	F:AGGCCAACCGTGAAGATG	60	186
	R:TGGCGTGAGGAGAGCATAG		

总RNA的提取: 按照SV Total RNA Isolation System说明书进行操作。取1 μ l提取的RNA样品加入299 μ l无核酸酶水, 核酸蛋白分析仪检测浓度和纯度, OD_{260/280}比值在1.8~2.0之间。反转录和扩增: 取1 μ g总RNA, 70 $^{\circ}$ C 10 min后置冰上5 min。配置20 μ l逆转录反应体系, 反转录形成cDNA; 以cDNA为模板进行PCR扩增, PCR程序为94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火30 s(温度见表1), 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。获取PCR扩增产物后, 经2%琼脂糖凝胶电泳(120 V, 30 min); 电泳完毕后, 取出凝胶用凝胶成像系统照相并分析结果, 用目的基因与相应的 β -actin条带平均光密度比值表示目的基因mRNA的相对表达量。

1.2.6 Western blot分析

每组细胞加裂解液提取总蛋白, 二喹啉甲酸

(BCA)法测定蛋白浓度后,加适量 SDS 上样缓冲液煮沸 5 min 变性, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 60 V 湿转 2 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, Bcl-2 抗体 (1:100) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜缓冲液 (TBST) 漂洗 (10 min \times 3), 碱性磷酸酶标记的兔二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 (10 min \times 3), 碱性磷酸酶法显色。内参照 β -actin 蛋白及 Bax 蛋白测定: 一抗分别为 β -actin 抗体 (1:1 000)、Bax 抗体 (1:500); 二抗浓度均为 1:5 000; 其余步骤同 Bcl-2 检测步骤。用凝胶成像分析系统照相并分析结果, 目的蛋白相对表达量为目的条带与内参 β -actin 的光密度比值。

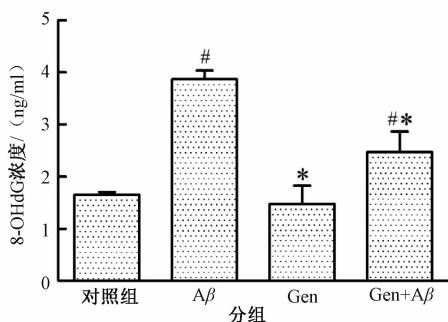
1.3 统计学分析

所有数据均以均数 \pm 标准差表示, SPSS 13.0 进行数据录入及单因素方差分析 (ANOVA), 组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染料木黄酮对 $A\beta_{25-35}$ 介导的脑血管内皮细胞 8-OHdG 水平的影响

由图 1 可知, 与对照组比较, $A\beta$ 组脑血管内皮细胞的 8-OHdG 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 $A\beta$ 组比较, Gen + $A\beta$ 组和 Gen 组脑血管内皮细胞的 8-OHdG 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: #为与对照组比较, $P < 0.05$; *为与 $A\beta$ 组比较, $P < 0.05$

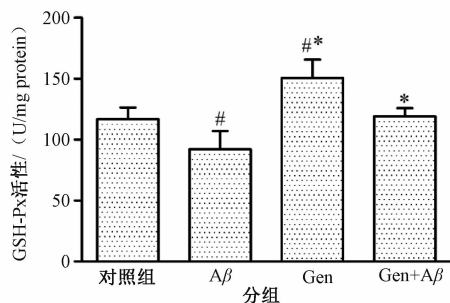
图 1 Gen 对 $A\beta_{25-35}$ 引起的脑血管内皮细胞 8-OHdG 水平的影响

Figure 1 Effect of Gen on 8-OHdG induced by $A\beta_{25-35}$ in bEnd.3 cells

2.2 染料木黄酮对 $A\beta_{25-35}$ 介导的脑血管内皮细胞 GSH-Px 活性的影响

图 2 可见, 与对照组比较, $A\beta$ 组脑血管内皮细胞的 GSH-Px 活性明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 $A\beta$ 组比较, Gen + $A\beta$ 组和 Gen 组脑血管内皮细胞的 GSH-Px 活性明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 染料木黄酮对 $A\beta_{25-35}$ 介导的脑血管内皮细胞 Bcl-2 及 Bax 基因和蛋白表达的影响



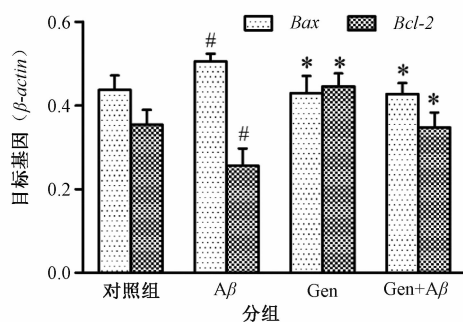
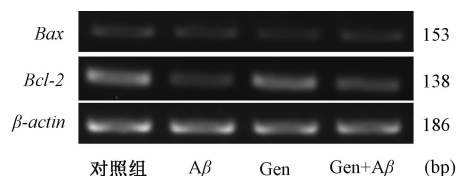
注: #为与对照组比较, $P < 0.05$; *为与 $A\beta$ 组比较, $P < 0.05$

图 2 Gen 对 $A\beta_{25-35}$ 引起的脑血管内皮细胞 GSH-Px 活性的影响

Figure 2 Effect of Gen on GSH-Px induced by $A\beta_{25-35}$ in bEnd.3 cells

2.3.1 Bcl-2 及 Bax 基因表达

由图 3 可知, 与对照组比较, $A\beta$ 组脑血管内皮细胞的 Bcl-2 基因表达水平明显下调, Bax 基因表达水平明显上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 $A\beta$ 组比较, Gen + $A\beta$ 组和 Gen 组脑血管内皮细胞的 Bcl-2 基因表达水平明显上调, Bax 基因表达水平明显下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。



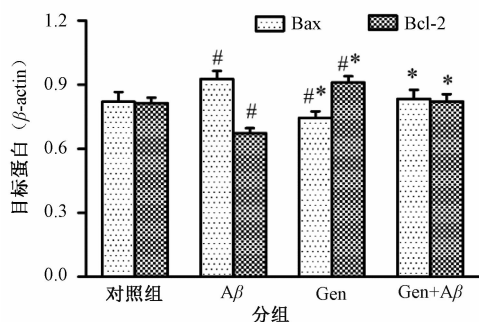
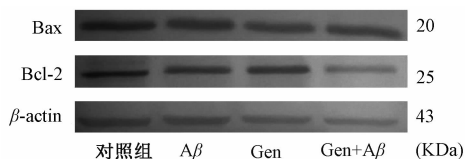
注: #为与对照组比较, $P < 0.05$; *为与 $A\beta$ 组比较, $P < 0.05$

图 3 Gen 对 $A\beta_{25-35}$ 引起的脑血管内皮细胞 Bcl-2 及 Bax 基因表达水平的影响

Figure 3 Effect of Gen on the expression of Bcl-2 and Bax mRNA induced by $A\beta_{25-35}$ in bEnd.3 cells

2.3.2 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

由图 4 可知, 与对照组比较, $A\beta$ 组脑血管内皮细胞的 Bcl-2 蛋白表达水平明显下调, Bax 蛋白表达水平明显上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 $A\beta$ 组比较, Gen + $A\beta$ 组和 Gen 组脑血管内皮细胞的 Bcl-2 蛋白表达水平明显上调, 脑血管内皮细胞的 Bax 蛋白表达水平明显下调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: #为与对照组比较, $P < 0.05$; *为与 A β 组比较, $P < 0.05$

图4 Gen对A β 25-35引起的脑血管内皮细胞Bcl-2及Bax蛋白表达水平的影响

Figure 4 Effect of Gen on the expression of Bcl-2 and Bax protein induced by A β 25-35 in bEnd.3 cells

3 讨论

脑血管内皮细胞参与构成血脑屏障,并维持血液流动状态,调节血管张力,调节组织物质交换等。完整的血脑屏障区域的脑血管内皮细胞、神经细胞以及非神经细胞(如血管周细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞等)称为神经血管单元^[7],且其已作为独立的功能单位进行研究。在AD病理模型的神经血管单元中,脑血管表现出内皮退化、淀粉样变,星形胶质细胞及小胶质细胞的激活,血管周围神经细胞和突触连接的损伤^[8]。作为脑内神经细胞与非神经细胞的联系,脑血管内皮细胞的作用日趋显著。近两年研究发现^[9],在AD患者及细胞模型中均有因A β 沉积引起的脑血管内皮细胞氧化损伤及功能障碍。同时有研究者认为^[10]神经细胞的细胞周期异常及凋亡也可能是AD发生的较早事件。因此,控制A β 介导的脑血管内皮细胞氧化损伤及凋亡的开启、进展和终结,就成为早期预防脑血管损伤相关神经退行性疾病的关键所在。

8-OHdG是评价活性氧(ROS)致细胞DNA氧化损伤的敏感标志物。有学者用A β 25-35(20 $\mu\text{mol/L}$)作用于PC12细胞后发现^[11]8-OHdG水平明显上升。Alvarez-Suarez等^[12]的研究中,摄入富含原花青素的抗氧化食物30d后,受试者尿中8-OHdG及血浆丙二醛(MDA)水平明显下降。Gen结构上含有多个酚羟基,具有较强的抗氧化作用。本课题组前期研究结果证明^[13],Gen可减弱A β 25-35引起的星形胶质细胞8-OHdG水平增加。在本研究中,A β 25-35诱导脑血管内皮细胞8-OHdG水平上升($P < 0.05$),而Gen干预

后脑血管内皮细胞8-OHdG水平明显下降($P < 0.05$),与上述研究结果一致。

GSH-Px是体内存在的一种重要的分解过氧化物的酶,可催化还原型谷胱甘肽(GSH)变为氧化型谷胱甘肽(GSSG),清除过氧化自由基中间产物,从而发挥抗氧化作用。与正常人比较,AD患者血清中抗氧化酶过氧化氢酶(CAT)、GSH-Px活性明显减弱^[14]。SD大鼠海马注射A β 1-40后,超氧化物歧化酶(SOD)、GSH-Px活力明显降低,MDA水平明显升高;丁香子酚干预后抗氧化能力明显提高^[15]。本研究发现,A β 组脑血管内皮细胞GSH-Px活力明显下降($P < 0.05$),Gen干预后GSH-Px活力明显上升($P < 0.05$),抗氧化能力提高。上述结果提示Gen可拮抗A β 25-35介导的脑血管内皮细胞氧化损伤,其机制可能与增强抗氧化酶活性,减轻DNA氧化应激有关。

Bcl-2家族蛋白在调控细胞凋亡过程中发挥关键作用,按其作用不同分为抑凋亡蛋白(如Bcl-2、Bcl-xl和Bcl-w等)和促凋亡蛋白(如Bax、Bad和Bak等)。近年来的研究还证实^[16],Bcl-2家族蛋白是氧化应激过程中的重要调控因子。有学者认为^[17]Bcl-2可能作为一种内源抗氧化物在拮抗氧化损伤的同时调节凋亡的过程;给予刚断奶Wistar鼠补充多种维生素后,可明显改善其肠上皮细胞氧化损伤,细胞凋亡率和caspase-3活性降低,Bcl-2蛋白表达水平上调,提示Bcl-2介导的凋亡与氧化损伤之间存在联系。在淀粉样前体蛋白(APP)过表达和早老素蛋白(PS1)缺失的AD细胞模型中,Bax/Bcl-2蛋白表达比值明显上升^[18],提示AD病理过程存在神经细胞的凋亡。Suwanna等^[19]发现,特异性雌激素 β 受体激动剂(DPN)可下调A β 1-42介导的大鼠原代神经细胞ROS水平、Bax及caspase-3蛋白表达水平,同时上调Bcl-2的蛋白表达水平。在大鼠海马注射A β 1-42建立AD模型后^[20],ROS水平升高,抗氧化酶(SOD、CAT、GSH)活力下降;同时促凋亡蛋白p53、Bax的表达水平上升,抑凋亡蛋白Bcl-2的表达下降,说明氧化应激发生的同时也有细胞凋亡的产生。在细胞凋亡过程中,普遍认为氧化应激可能影响线粒体结构及功能,进而引发细胞凋亡相关因子的释放。多种抗氧化物质对细胞凋亡过程具有调控作用。谢朝阳等^[21-22]用A β 25-35作用于PC12细胞后细胞凋亡的比例增加;抗氧化物质原花青素和姜黄素干预后凋亡率明显下降,说明抗氧化干预可调节A β 所致神经细胞细胞周期紊乱及凋亡。月桂叶提取物(富含多酚类物质)可拮抗A β 沉积所致神经细胞和星形胶质细胞ROS、RNS的产生及caspase-3的激活,减少DNA断裂^[23]。在PC12

细胞中,前期研究发现^[24] Gen 可下调促凋亡基因 *caspase-3*、*caspase-9* 和 *Bad* 基因表达,上调抑凋亡基因 *Bcl-xl*、*LRP5* 基因表达,拮抗 $A\beta$ 诱导的神经细胞凋亡。课题组前期研究结果同样证明^[25],大豆异黄酮(SIF)可通过下调促凋亡蛋白 *Bad* 的表达,同时上调抑凋亡蛋白 *Bcl-xl* 的表达来拮抗 $A\beta_{1-42}$ 介导的大鼠脑组织氧化损伤,从而表现神经保护作用。本研究通过对脑血管内皮细胞的研究发现, $A\beta_{25-35}$ 作用于脑血管内皮细胞 24 h 后,*Bcl-2* 基因和蛋白表达水平明显下调,*Bax* 基因和蛋白表达水平明显上调;Gen 干预组,*Bcl-2* 基因和蛋白表达水平明显上调,*Bax* 基因和蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$),与上述研究结果一致。

综上所述,Gen 可能通过调控凋亡相关因子抑制脑血管内皮细胞氧化应激的发生及上调细胞抗氧化因子水平,来发挥拮抗 $A\beta_{25-35}$ 介导的脑血管内皮细胞氧化损伤的作用。

参考文献

- [1] Tarumi T,ZHANG R. Cerebral hemodynamics of the aging brain: risk of Alzheimer disease and benefit of aerobic exercise [J]. *Front Physiol*,2014,5:6.
- [2] Agyare E K,Leonard S R,Curran G L, et al. Traffic jam at the blood-brain barrier promotes greater accumulation of Alzheimer's disease amyloid- β proteins in the cerebral vasculature [J]. *Mol Pharm*,2013,10(5):1557-1565.
- [3] Amin B,Hajhashemi V,Abnous K, et al. Ceftriaxone, a β -lactam antibiotic, modulates apoptosis pathways and oxidative stress in a rat model of neuropathic pain[J]. *Biomed Res Int*,2014:937568.
- [4] Pereira C, Ferreira E, Cardoso S M, et al. Cell degeneration induced by amyloid-beta peptides: implications for Alzheimer's disease[J]. *J Mol Neurosci*,2004,23(1/2):97-104.
- [5] WANG Q L,GE X Y,TIAN X W, et al. Soy isoflavone:the multipurpose phytochemical (Review)[J]. *Biomed Rep*,2013,1(5):697-701.
- [6] XI Y D, YU H L, DING J, et al. Flavonoids protect cerebrovascular endothelial cells through Nrf2 and PI3K from β -amyloid peptide-induced oxidative damage [J]. *Curr Neurovasc Res*,2012,9(1):32-41.
- [7] LO E H,Dalkara T,Moskowitz M A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke[J]. *Nat Rev Neurosci*,2003,4(5):399-415.
- [8] Zlokovic B V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration[J]. *Trends Neurosci*,2005,28(4):202-208.
- [9] Palmer J C,Taylor H M,Love S. Endothelin-converting enzyme-1 activity, endothelin-1 production, and free radical-dependent vasoconstriction in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*,2013,36(3):577-587.
- [10] Webber K M,Raina A K,Marlatt M W, et al. The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology [J]. *Mech Ageing Dev*,2005,126(10):1019-1025.
- [11] MENG X B,WANG M,SUN G B, et al. Attenuation of $A\beta_{25-35}$ -induced parallel autophagic and apoptotic cell death by gypenoside XVII through the estrogen receptor-dependent activation of Nrf2/ARE pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2014,279(1):63-75.
- [12] Alvarez-Suarez J M, Giampieri F, Tulipani S, et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans [J]. *J Nutr Biochem*,2014,25(3):289-294.
- [13] MA W W, HOU C C, ZHOU X, et al. Genistein alleviates the mitochondria-targeted DNA damage induced by β -amyloid peptides 25-35 in C6 glioma cells[J]. *Neurochem Res*,2013,38(7):1315-1323.
- [14] Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, et al. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease [J]. *Clin Biochem*,2008,41(12):932-936.
- [15] LIU Z B,NIU W M,YANG X H, et al. Effects of combined acupuncture and eugenol on learning-memory ability and antioxidation system of hippocampus in Alzheimer disease rats via olfactory system stimulation [J]. *J Tradit Chin Med*,2013,33(3):399-402.
- [16] Susnow N,ZENG L, Margineantu D, et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress [J]. *Semin Cancer Biol*,2009,19(1):42-49.
- [17] Vijayalakshmi B,Sesikeran B,Udaykumar P, et al. Effects of vitamin restriction and supplementation on rat intestinal epithelial cell apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*,2005,38(12):1614-1624.
- [18] LIU J, CHI N, CHEN H G, et al. Resistin protection against endogenous $A\beta$ neuronal cytotoxicity from mitochondrial pathway [J]. *Brain Res*,2013,1523:77-84.
- [19] Suwanna N,Thangnipon W,Soi-Ampornkul R. Neuroprotective effects of diaryl propionitrile against β -amyloid peptide-induced neurotoxicity in rat cultured cortical neurons[J]. *Neurosci Lett*,2014,578:44-49.
- [20] Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, et al. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in $A\beta$ (1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease[J]. *Free Radic Res*,2014,48(2):146-58.
- [21] 谢朝阳,梅寒芳,祝其锋,等. 原花青素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞周期紊乱的保护作用 [J]. *中国老年学杂志*,2009,29(10):1197-1200.
- [22] 谢朝阳,祝其锋,吴斌华. 姜黄素影响 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞周期变化与细胞凋亡的可能机制 [J]. *中国药理学通报*,2009,25(2):217-221.
- [23] Pacifico S,Gallicchio M,Lorenz P, et al. Neuroprotective potential of *Laurus nobilis* antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts [J]. *Chem Res Toxicol*,2014,27(4):611-626.
- [24] 何玲玲,封锦芳,肖荣,等. 染料木黄酮对 β 淀粉样肽 25-35 介导的 PC12 细胞凋亡过程相关基因表达的影响 [J]. *中国食品卫生杂志*,2011,23(2):100-105.
- [25] FENG J F,HE L L,LI D, et al. Antagonizing effects of soybean isoflavones on β -amyloid peptide-induced oxidative damage in neuron mitochondria of rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*,2012,111(4):248-253.