



白藜叶总多酚对 $A\beta_{25-35}$ 与 AAPH 诱导的 PC12 细胞氧化损伤和衰老的保护作用

俞佳妮¹,冯彩霞¹,刘向前²,李小军³,张晓丹¹

(1. 浙江理工大学, a. 生命科学与医药学院; b. 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 杭州 310018;

2. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 3. 赣南医学院药学院, 江西赣州 341000)

摘要: 为探究中药白藜(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.) 能否作为高效、低毒的防治阿尔茨海默病的天然药物原料, 选用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 作为神经细胞模型, 建立 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型, 测定白藜叶总多酚干预 24 h 后 PC12 细胞存活率; 通过 AAPH 诱导的 PC12 细胞衰老模型和 β -半乳糖苷酶活性染色法评估 PC12 细胞衰老情况。结果表明: 与仅损伤处理组相比, 5~60 mg/L 的白藜叶总多酚能够显著提高($p < 0.05$)经 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化损伤的 PC12 细胞的存活率, 且能够降低 AAPH 诱导的细胞衰老模型中的 β -半乳糖苷酶活性, 表明白藜叶总多酚对 PC12 细胞具有显著的保护作用, 能有效缓解 PC12 细胞氧化损伤与衰老。该研究为寻找有效防治阿尔茨海默病的天然药物的鉴定与筛选提供理论依据。

关键词: 白藜叶; 总多酚; 抗衰老; PC12 细胞; 体外细胞实验

中图分类号: TS195.644

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2023)05-0353-06

引文格式: 俞佳妮, 冯彩霞, 刘向前, 等. 白藜叶总多酚对 $A\beta_{25-35}$ 与 AAPH 诱导的 PC12 细胞氧化损伤和衰老的保护作用[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2023, 49(3): 353-358.

Reference Format: YU Jiani, FENG Caixia, LIU Xiangqian, et al. Protective effects of total polyphenols from *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. on $A\beta_{25-35}$ -induced oxidative damage and AAPH-induced aging models in PC12 cells[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2023, 49(3): 353-358.

Protective effects of total polyphenols from *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. on $A\beta_{25-35}$ -induced oxidative damage and AAPH-induced aging models in PC12 cells

YU Jiani¹, FENG Caixia¹, LIU Xiangqian², LI Xiaojun³, ZHANG Xiaodan¹

(1a. College of Life Sciences and Medicine; 1b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Secondary Metabolic Regulation, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. School of Pharmacy, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

Abstract: In order to explore the possibility of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. as a highly effective and low toxic agent for the prevention and treatment of Alzheimer's disease, PC12, a rat adrenal pheochromocytoma cell line, was selected as the nerve cell model, the oxidative damage model of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ was established, and the survival rate of PC12 cells was measured after 24 hours of intervention of total polyphenols of *A. trifoliatum*. AAPH-induced aging model of PC12 cells and SA- β -Gal staining was used to evaluate the senescence of PC12 cells. The results show that, compared with the injury treated group, the survival rate of PC12 cells is significantly improved by adding 5~60 mg/L total polyphenols of *A. trifoliatum* (L.) Merr. and the β -Galactosidase activity of PC12 cells is also reduced,

收稿日期: 2022-08-02 网络出版日期: 2022-10-08

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGN22H280004)

作者简介: 俞佳妮(1998—), 女, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事药用植物方面的研究。

通信作者: 张晓丹, E-mail: zhangxiaodanzstu@163.com

indicating that total polyphenols of *A trifoliatum* (L.) Merr. has a significant protective effect on PC12 cells and can effectively alleviate the oxidative damage and aging of PC12 cells. The results of this paper provide a theoretical basis for the identification and screening of natural medicines that can effectively prevent and treat Alzheimer's disease.

Key words: *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.; total polyphenols; anti-aging; PC12 cells; in vitro cell experiment

0 引言

白筋(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.)为五加科(Araliaceae)五加属(*Acanthopanax*)攀援状灌木,又被称为禾掌筋、三叶五加、三加皮等,广泛分布于中国的中部和南部,是一种民间常用的草药;味苦、涩、微寒,具有祛风除湿、舒筋活血、消肿解毒的功效,用于治疗感冒、咳嗽、风湿和坐骨神经痛等症^[1]。白筋叶中富含皂苷^[2]、三萜羧酸^[3]、黄酮^[4]、糖苷^[5]等多种化学成分。

白筋总多酚具有良好的抗氧化作用,张元等^[6]通过 DPPH, ABTS 和 ORAC 测定了经优化后的提取工艺提取所得白筋总多酚的抗氧化活性,发现白筋总多酚具有与 Trolox 相近的较高的抗氧化活性。Hamid 等^[7]通过建立小鼠炎症模型发现了白筋叶具有良好的抗炎效果,为白筋叶资源的深入利用和高价值的产品开发提供了理论依据。咖啡酰奎宁酸类总多酚是白筋叶的有效成分群之一,具有多种不同的生物活性,能够有效地抑制血小板聚集,并在抗血栓、抗氧化和自由基损伤和防治阿尔茨海默病^[8]等方面发挥作用。盛艳梅等^[9]通过建立大鼠脑缺血再灌注的损伤模型,探讨了 3,5-二咖啡酰奎宁酸对于脑神经的保护作用。咖啡酰奎宁酸类化合物在大鼠模型中,能够有效改善其神经行为,进而使得脑梗死的比率显著下降^[10]。

阿尔茨海默病是由大脑病理性变化引起的神经退行性疾病,表现为患者认知功能与学习功能下降,记忆功能出现障碍,且症状随患病时间加长而逐渐恶化^[11]。目前阿尔茨海默病的发病机制尚未明确,市面上用于治疗阿尔茨海默病的药物大多通过抑制乙酰胆碱酶活性来减缓症状,少数药物通过靶向清除 A β 减缓病症的恶化^[12]。能够低毒、高效地治疗阿尔茨海默病的药物仍待进一步找寻。

白筋叶富含咖啡酰奎宁酸类多酚,可能对脑神经具有较好的保护作用,有关白筋叶药理活性及在抗氧化、保护神经细胞方面的研究仍为空白。为了探究白筋叶总多酚是否具有保护神经细胞的作用,以及成为

治疗阿尔茨海默病的药物的可能性,本文通过建立 A β_{25-35} 诱导的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 氧化损伤模型以及 AAPH 诱导的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 衰老模型,加入乙醇提取、大孔树脂纯化后的白筋叶总多酚进行干预,利用 MTT 法检测细胞存活率,分析观察大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 的衰老情况,探究白筋叶总多酚是否对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 的氧化损伤与衰老具有保护作用,为研究白筋叶总多酚是否具有保护神经效果、寻找有效治疗阿尔茨海默病的药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白筋(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.)采集于广东省凤凰山,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 购自中国科学院上海细胞库, RPMI-1640 细胞培养基和胎牛血清购自 GE 医疗生命科学,胰蛋白酶和青链霉素混合液购自上海碧云天生物技术有限公司,二甲基亚砜购自吉诺生物医药技术公司,噻唑蓝购自上海宝曼生物科技有限公司, β -半乳糖苷酶染色试剂盒购自美国 Cell Signaling Technology 公司, A β_{25-35} 和 AAPH 购自美国 Sigma 公司, DMSO、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,乙醇和浓盐酸购自杭州高晶精细化工有限公司。

1.2 仪器设备

MCO-18AIC 型二氧化碳培养箱(日本三洋公司)、Synergy H4 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)、GL124-1SCN 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)和 MF53 型荧光倒置显微镜(明美光电技术有限公司)。

1.3 试剂的配制

1.3.1 RPMI-1640 完全培养基的配制

在超净工作台中,向 RPMI-1640 培养液中加入 10% 的胎牛血清,充分混匀后加入 1% 的青链霉素混合液,摇匀即为完全培养基,于 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 PBS 缓冲液的配制

分别称取 0.24 g 磷酸二氢钾、1.44 g 磷酸氢二

钠、8.00 g 氯化钠和 0.20 g 氯化钾至烧杯中,加入 800 mL 蒸馏水,玻璃棒充分搅拌使之溶解,用浓盐酸调至 pH 值为 7.2,最后在容量瓶中加水定容至 1000 mL。将配制好的 PBS 灭菌(121 °C, 20 min)后,置于 4 °C 冰箱保存。

1.3.3 $A\beta_{25-35}$ 母液配制

取 1 mg $A\beta_{25-35}$ 于 471.5 μ L ddH₂O 溶解,配制成 2 mmol/L 的母液,小管分装,避免反复冻融,在 -20 °C 冰箱保存备用。使用前将分装的 $A\beta_{25-35}$ 母液于 37 °C 的恒温培养箱中孵育约 7 d,增加 $A\beta_{25-35}$ 的神经毒性。

1.3.4 MTT 溶液的配制

称取 MTT 粉末 500 mg 于烧杯,加入 100 mL 配置完成的 PBS 缓冲液,完全溶解后,在超净工作台中用 0.22 μ m 滤膜过滤,即为质量浓度 5 mg/mL 的 MTT。MTT 需现配现用,过滤除菌后将其放在 4 °C 冰箱避光保存。

1.4 样品的制备

白藜叶总多酚的提取方法:将烘干至恒重后的白藜叶粉碎,取 1 kg 粉末,加入 70% 的乙醇,超声提取 4 次,每次 2 h,将提取液合并浓缩,干燥后加水溶解,用石油醚萃取 4 次去脂,取水相浓缩干燥,得到总多酚粗提物粉末^[13]。白藜叶总多酚的纯化方法:称取 100 g D101 大孔树脂,加入 500 mL 95% 的乙醇,将其充分浸泡 24 h,倒入层析柱后去除杂质,然后进行酸洗和碱洗,用蒸馏水浸泡备用;称取 2.8 g 总多酚粗提物,配置成 200 mL 样品,将大孔树脂于水中湿法上柱,加入样品进行吸附,控制流速收集流出液,收集并浓缩洗脱液总多酚流段,冷冻干燥后获得白藜叶总多酚^[14]。

1.5 MTT 法检测细胞存活率

白藜叶总多酚处理 24 h 后,向每个孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液,置于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养 4 h。取出 96 孔板,沿着培养液上部用移液枪小心吸取上清液,充分弃去 MTT。每孔加 150 μ L 的 DMSO 溶解结晶,轻轻振摇 15 min。使用酶标仪,在 490 nm 波长处检测各孔的吸光度,即 OD 值,计算不同质量浓度下药物对细胞增殖的抑制率,抑制率用细胞存活率表示,计算公式为:

$$\text{细胞存活率} / \% = \frac{OD_{\text{加药孔}} - OD_{\text{调零孔}}}{OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{调零孔}}} \times 100。$$

1.6 白藜叶总多酚对 PC12 细胞的细胞毒性

当细胞处于对数生长期时,弃培养液,用配制好的 PBS 洗两次,加入 1 mL 的胰酶使贴壁细胞分散,

消化完全后,加入培养液使贴壁细胞悬浮起来,800 r/min 离心 3 min 以充分去除胰酶。离心后保留细胞沉淀,加入 1 mL 完全培养基,用吸管轻轻吹打,吹散细胞使细胞飘浮起来,制成悬液。用血球计数板进行细胞计数,最终向 96 孔板每孔中加入 100 μ L 的细胞悬液(约 5000 个细胞),将不含细胞的 100 μ L 完全培养基作为空白孔,在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养过夜,使之贴壁。将白藜叶总多酚用无血清培养基配制成 240.000、120.000、60.000、30.000、15.000、7.500、3.750 mg/L 和 1.875 mg/L 共 8 个质量浓度梯度的白藜叶总多酚药物组,每组分别设 4 个复孔。加药后将 96 孔板置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱继续培养 24 h 后,采用 MTT 法检测细胞存活率。

1.7 白藜叶总多酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

1.7.1 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤浓度的确定

将悬浮的 PC12 细胞用血球计数板进行计数,最终向 96 孔板每孔中加入 100 μ L 细胞悬液(约 5000 个细胞),空白对照加 100 μ L 完全培养基,放在含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养过夜,使之贴壁。将孵育 7 d 后的 $A\beta_{25-35}$ 用培养基稀释,分别稀释为 10、8、7、6、5、4、2 μ mol/L 和 1 μ mol/L,向 $A\beta_{25-35}$ 损伤组中加入 10 μ L 上述不同浓度的 $A\beta_{25-35}$,不加 $A\beta_{25-35}$ 为阴性对照组,加入 10 μ L 无血清 RPMI-1640 培养液。每组分别设置 4~6 个孔,重复 3 次。在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱继续培养 24 h 后用 MTT 法检测细胞存活率,用 GraphPad Prism 7 软件计算 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞的 IC₅₀ 值确定诱导浓度,具体方法参考文献[15]。

1.7.2 白藜叶总多酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型的作用

将消化后的 PC12 细胞制成细胞悬液进行计数,向每孔加入 90 μ L 细胞悬液(约 5000 个细胞),设置空白组加 90 μ L 完全培养基,放在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养过夜,使之贴壁。在小于白藜叶总多酚的最大安全质量浓度基础上设置加入白藜叶总多酚质量浓度为 5、10、20、30、40、50 mg/L 和 60 mg/L 的白藜叶总多酚实验组, $A\beta_{25-35}$ 模型组与阴性对照组加入 10 μ L 无血清培养基,预处理 30 min,实验组与 $A\beta_{25-35}$ 模型组加入浓度为 4.141 μ mol/L 的 $A\beta_{25-35}$ 溶液 10 μ L,空白对照组和阴性对照组加入 10 μ L 无血清培养基。每组分别设 4 个复孔,实验重复

3次,在5% CO₂、37℃条件下继续培养24 h后,用MTT法检测细胞存活率,具体方法参考文献[16]。

1.8 白藜叶总多酚对AAPH诱导的PC12细胞衰老的抵抗作用

1.8.1 AAPH诱导的衰老模型的建立以及给药

当细胞处于对数生长期时,吸去培养液,用PBS洗两次。加入1 mL胰酶使贴壁细胞分散,消化完全后,加入培养液使贴壁细胞悬浮起来,800 r/min离心3 min以充分去除胰酶。离心后保留细胞沉淀,加入1 mL培养液,用吸管轻轻吹打,使细胞漂浮起来,制成悬液。然后用血球计数板进行细胞计数,最终向每孔加入2 mL细胞悬液(约200000个细胞)到6孔板中,培养过夜使之贴壁。对照组继续培养,PC12细胞加药组和AAPH组均加入终浓度为1 mmol/L的AAPH,加药组分别另外加入15、30 mg/L和60 mg/L的白藜叶总多酚,培养48 h后进行染色并检测,具体方法参考文献[17]。

1.8.2 β -半乳糖苷酶染色

按照试剂盒要求配制染色液,根据白藜叶总多酚对PC12细胞的细胞毒性实验结果,在不显著降低PC12细胞的条件下选取低,中,高共三个浓度梯度进行实验。实验组用15、30 mg/L和60 mg/L的白藜叶总多酚处理后,在超净工作台中弃去旧细胞培养液,每孔加入2 mL的PBS洗涤1次,向每孔加入1 mL预先配制好的固定液,将PC12细胞在室温条件下固定10~15 min;固定后吸去固定液,每孔加入2 mL的PBS洗涤2次以充分去除残留的固定液,每孔加入1 mL染色液进行染色;将6孔板放入干燥的无CO₂的37℃培养箱过夜,在倒置显微镜下观察细胞染色情况。

2 结果与分析

2.1 白藜叶总多酚的细胞毒性检测结果

以白藜叶总多酚加药质量浓度—细胞存活率为横纵坐标作图,结果如图1所示。图1表明:当白藜叶总多酚浓度为60 mg/L以下时,PC12细胞的存活率均大于95%,与空白对照组差异不显著($p > 0.05$),而在质量浓度高于60 mg/L时,细胞存活率明显下降,因此,本文选取干预PC12细胞的白藜叶总多酚最大安全质量浓度为60 mg/L。

2.2 A β_{25-35} 对PC12细胞损伤浓度的确定

本文通过MTT实验测定不同浓度A β_{25-35} 处理24 h后的PC12细胞存活率,结果如图2所示。图2表明:在A β_{25-35} 浓度为1~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,细胞

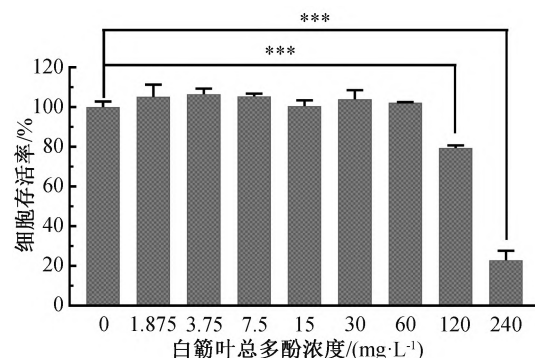


图1 不同浓度白藜叶总多酚处理24 h后的PC12细胞存活率

注:相比空白对照组,*为 $p < 0.05$,**为 $p < 0.01$,***为 $p < 0.001$ 。

损伤率与A β_{25-35} 呈浓度依赖性且为正相关。A β_{25-35} 对PC12细胞的IC₅₀值为4.141 $\mu\text{mol/L}$,确定其使用A β_{25-35} 建立细胞氧化损伤模型的浓度。

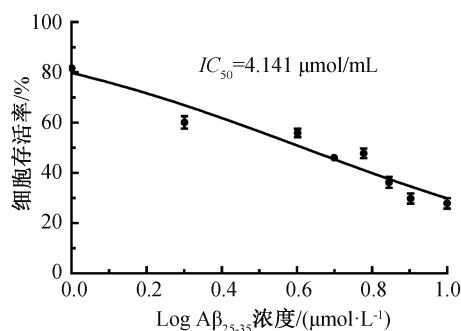


图2 不同浓度A β_{25-35} 处理24 h后的PC12细胞存活率

2.3 白藜叶总多酚对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞氧化损伤模型的保护作用

为了探究白藜叶总多酚对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞氧化损伤模型的作用,以4.141 $\mu\text{mol/L}$ 的A β_{25-35} 诱导PC12的氧化损伤模型。根据白藜叶总多酚对PC12细胞毒性的检测结果,白藜叶总多酚质量浓度小于60 mg/L时,对PC12细胞的增殖无显著影响,因此加入质量浓度为5、10、20、30、40、50 mg/L和60 mg/L的白藜叶总多酚处理,MTT检测细胞存活率结果如图3所示。图3表明:加入质量浓度范围为5~60 mg/L白藜叶总多酚后,PC12细胞存活率显著高于未加入白藜叶总多酚的A β_{25-35} 模型组,通过白藜叶总多酚对该损伤模型的处理,显著提高了细胞的存活率($p < 0.05$);白藜叶总多酚对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞氧化损伤具有显著的保护作用,氧化损伤模型的细胞存活率低于50%,且白藜叶总多酚药物组的质量浓度越高,细胞存活率呈现降低趋势,其原因可能是A β_{25-35} 是一种 β 淀粉样蛋白,活性受温度及孵育时间的影响,较不稳定,导致实验重复性较低。

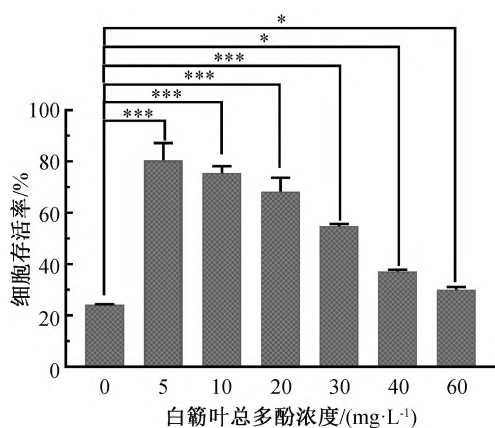


图3 不同质量浓度白藜叶总多酚处理 24 h 后的 PC12 细胞存活率

注:相比 $A\beta_{25-35}$ 模型组, * 为 $p < 0.05$, ** 为 $p < 0.01$, *** 为 $p < 0.001$ 。

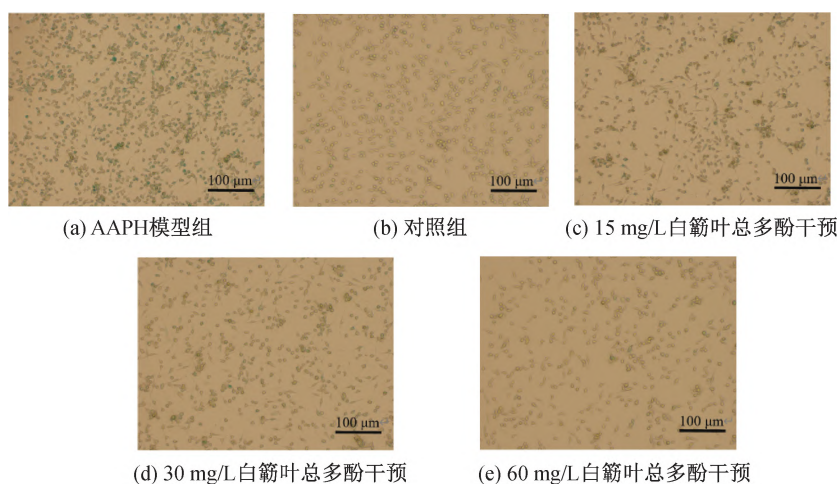


图4 不同质量浓度白藜叶总多酚处理 24 h 后的 PC12 细胞 β -半乳糖苷酶染色结果

3 讨论

$A\beta$ -淀粉样蛋白与阿尔茨海默病的防治息息相关, $A\beta_{25-35}$ 为一种 $A\beta$ 淀粉样蛋白,其聚集在阿尔茨海默病的发生和发展过程中发挥重要作用。 $A\beta$ 蛋白通过减少细胞内的抗凋亡因素加速细胞凋亡,使神经元发生坏死^[18]。王凯等^[19]通过将不同浓度的 β 淀粉样蛋白 $A\beta_{25-35}$ 进行侧脑注射,发现 $A\beta_{25-35}$ 会减退大鼠的记忆能力,损伤大鼠的突出超微结构,使大鼠的海马神经元坏死。付劲静等^[20]发现当阿尔茨海默病患者神经功能障碍与认知功能障碍程度加重时,患者血清中的 $A\beta_{1-42}$ 显著增加,因此通过清除 $A\beta$ -淀粉样蛋白防治阿尔茨海默病是阿尔茨海默病药物的重要研究方向之一。利用 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型寻找防治阿尔茨海默症药物的实验方法的应用较为广泛,王媛等^[21]通过建立该模型探究了雌激素受体介导的柚皮苷抗 $A\beta_{25-35}$

2.4 β -半乳糖苷酶染色结果

为了验证白藜叶总多酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型的作用结果的可靠性,选取 AAPH 对 PC12 细胞进行诱导,将不同质量浓度白藜叶总多酚处理后的损伤 PC12 细胞进行染色,结果如图 4 所示。图 4 表明:AAPH 模型组的大部分细胞被染为蓝色, β -半乳糖苷酶活性较高,细胞处于衰老状态,未经 AAPH 诱导的对照组几乎未见染色阳性细胞,而各质量浓度白藜叶总多酚作用后的细胞染色阳性率均明显小于模型组,且在 15 ~ 60 mg/L 范围内, β -半乳糖苷酶染色阳性率细胞数目随着白藜叶总多酚质量浓度增加而减少,白藜叶总多酚对 PC12 细胞的衰老具有保护作用,且在一定质量浓度范围内随着质量浓度的增加而提高。

损伤 PC12 细胞凋亡作用。AAPH 作为一种自由基诱导剂,是一种含氮的水溶性小分子,在生理温度 (37 °C, pH 值 7.0) 下,能够分解产生自由基。氧气能够快速地和其中含碳的自由基发生反应,生成过氧自由基,且以稳定的速率释放^[22],被广泛运用于构建氧化应激模型。本文通过建立 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 神经细胞损伤模型与 AAPH 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型探究白藜叶总多酚是否能够通过清除 $A\beta_{25-35}$ 与 AAPH 达到对大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株 PC12 细胞的保护效果,结果表明白藜叶总多酚能够有效保护 PC12 细胞不受氧化损伤,白藜叶总多酚在防治阿尔茨海默病上具有巨大潜力。

4 结论

本文通过建立 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 神经细胞损伤模型与 AAPH 诱导的 PC12 神经细胞衰老模型,加入不同质量浓度的白藜叶总多酚后测定细

胞存活率与 β -半乳糖苷酶活性,探究白藜叶总多酚对氧化损伤的PC12细胞的保护作用,主要结论如下:

a)过高质量浓度的白藜叶总多酚对PC12具有毒性。当白藜叶总多酚质量浓度为60 mg/L以下时,PC12细胞的存活率均大于95%,而在质量浓度高于60 mg/L时,细胞存活率明显下降低于95%,因此干预PC12细胞的白藜叶总多酚最大安全质量浓度为60 mg/L。

b) $A\beta_{25-35}$ 能够诱导PC12细胞产生氧化损伤,且氧化损伤程度随着 $A\beta_{25-35}$ 浓度的增加而增加。质量浓度为5~60 mg/L的白藜叶总多酚均可显著提高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的氧化损伤PC12细胞的存活率,对其产生显著的保护作用。

c) AAPH能够诱导PC12细胞的衰老。在15~60 mg/L范围内,白藜叶总多酚对AAPH诱导的PC12细胞的衰老的保护作用随着白藜叶总多酚浓度的增加而提高。

参考文献:

- [1] 郭鑫磊,赵雨晴,徐汉,等. 响应面法优化超声辅助提取白藜多糖工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2020, 36(4):398-403.
- [2] 何冠成,张旭红,周露,等. 白藜粗多糖的脱色纯化及其产物降糖活性研究[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(6):840-845.
- [3] 杨慧文,张旭红,陈健媚,等. 白藜叶不同极性部位的体外抗氧化活性分析[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(3):14-18.
- [4] 许东颖,王玉栋,潘育方,等. 白藜黄酮分离纯化及其体外抗氧化性能的研究[J]. 国际医药卫生导报, 2018, 24(24):3711-3716.
- [5] 朱沅如,刘悦,廖程娟,等. 白藜多糖对1型糖尿病小鼠短链脂肪酸、炎症因子及紧密连接蛋白的影响[J]. 海峡药学, 2022, 34(3):18-23.
- [6] 张元,江森,王真史,等. 响应面优化法提取白藜总多酚及抗氧化研究[J]. 食品工业, 2015, 36(11):118-122.
- [7] Hamid R A, Kee T H, Othman F. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities of *Acanthopanax trifoliatum* (L) Merr leaves[J]. Pharmacognosy research, 2013, 5(2): 129-133.
- [8] 普元柱,苏灿. 灯盏细辛及其活性成分防治阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5650-5657.
- [9] 盛艳梅,唐绍微,张静,等. 3,5-二咖啡酰奎宁酸体外透血脑屏障能力及抗大鼠脑缺血再灌注损伤作用研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6):26-29.
- [10] Hung T M, Na M, Thuong P T, et al. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 108(2): 188-192.
- [11] Cummings J. New approaches to symptomatic treatments for Alzheimer's disease [J]. Molecular Neurodegeneration, 2021, 16(1):2.
- [12] Dhillon S. Aducanumab: First Approval [J]. Drugs, 2021, 81(12):1437-43.
- [13] 潘高红,陈绍宁,许红亮,等. 鸡血藤总黄酮超声辅助提取工艺优化[J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2022, 47(4): 623-628.
- [14] 岑叶盛,李小龙,陈淑娟,等. 大孔吸附树脂纯化白藜叶总多酚的工艺优化[J]. 中草药, 2019, 50(13): 3071-3076.
- [15] 杜艳秋,刘彦宏,武凤,等. 圣草酚对 β -淀粉样蛋白损伤PC12细胞的保护作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(22):3088-3091.
- [16] 陈明惠,郑梅竹,周密,等. 芍药苷对1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导PC12细胞损伤保护作用的机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(6):685-690.
- [17] Huo J Y, Ming Y Z, Li H F, et al. The protective effects of peptides from Chinese baijiu on AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signaling pathway [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6):1527-1538.
- [18] Jeong H, Shin H, Hong S, et al. Physiological Roles of monomeric amyloid-beta and implications for Alzheimer's disease therapeutics [J]. Experimental neurobiology, 2022, 31(2):65-88.
- [19] 王凯,李强,孙伟明,等. 不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 蛋白模拟阿尔茨海默病模型学习记忆的差异[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3):14-19.
- [20] 付劲静,杨月明,周延华,等. 阿尔茨海默症患者血清缓激肽、s100 β 蛋白和 $A\beta_{1-42}$ 表达水平及与患者神经功能、认知功能的关系[J]. 河北医药, 2022, 44(15): 2245-2249.
- [21] 王媛,武凤,熊辉,等. 雌激素受体介导的柚皮苷抗 $A\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞凋亡作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 2(8): 1-13.
- [22] Noguchi N, Yamashita H, Gotoh N, et al. 2, 2'-Azobis (4-methoxy-2, 4-dimethylvaleronitrile), a new lipid-soluble azo initiator: application to oxidations of lipids and low-density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions. Free Radical Biology & Medicine, 1998, 24(2):259-268.

(责任编辑:张会巍)