

木犀草素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经元损伤的保护作用

王秋月, 高卫真*

(天津医科大学 药理教研室, 天津 300070)

[摘要] **目的:**研究木犀草素对 β 淀粉样肽 ($A\beta_{25-35}$) 损伤神经元的保护作用及其机制。**方法:**从 BALB/c 乳鼠大脑皮层培养原代神经元, 实验设计为对照组, 模型组 ($7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$), 不同木犀草素给药治疗组 ($10 \sim 90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 孵育 12 h, 水溶性四氢唑盐 (WST-1) 法检测细胞存活率, Hoechst 33258/碘化丙啶 (PI) 双染检测细胞凋亡, Western blot 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 蛋白的表达, 荧光酶标仪检测细胞内活性氧簇 (ROS) 水平, ELISA 法检测细胞上清中白介素 (IL)-10 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。**结果:**模型组细胞存活率为 48.5%, 与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$)。10, 30, 60, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素给药组细胞存活率分别为 60.8%, 62.4%, 71.7%, 73.6%, 选取 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素为后续实验浓度。60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素可以明显提高 $A\beta_{25-35}$ 损伤神经元的细胞活力, 由 48.5% 增至 71.7% ($P < 0.01$), 并且能抑制神经元的凋亡。与模型组相比较, 降低凋亡蛋白 Caspase-3 的过表达 ($P < 0.01$); 降低细胞内 ROS, 由模型组 100.4% 降至 64.2% ($P < 0.01$)。与模型组相比, 调节抗炎因子 IL-10, 给药组 IL-10 上调至 634.8 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 下调促炎因子 TNF- α 至 176.7 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$)。**结论:**木犀草素对 $A\beta_{25-35}$ 损伤神经元具有保护作用, 其机制可能是抑制 ROS 水平, 调节炎症因子从而达到抗凋亡作用。

[关键词] 木犀草素; 神经元; β 淀粉样肽 25-35; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0170-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090170

Neuroprotection of Luteolin Against $A\beta_{25-35}$ Induced Neural Damage WANG Qiu-yue, GAO Wei-zhen*
(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the neuroprotective effects and mechanism of luteolin against β -amyloid 25-35 ($A\beta_{25-35}$) induced neural damage. **Method:** Primary neurons were isolated and purified from cerebral cortex of suckling mouse of BALB/c. The experiment was assigned three groups. The control group, the model group (neurons were co-cultured with $A\beta_{25-35}$ incubation for 12 h and luteolin administration (neurons were co-cultured with $A\beta_{25-35}$ and luteolin incubation for 12 h). water soluble tetrazolium salt (WST-1) method was used to test cell viability. The apoptosis was examined by Hoechst 33258/propidium iodide (PI) double staining. The expression of Caspase-3 was analyzed by the Western bolt; reactive oxygen species (ROS) was examined by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. The productions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) were measured using enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) kits. **Result:** WST-1 assay results displayed that the cellular viability of model group was 48.5% and had significant differences compared to control group. Cellular viability of $A\beta_{25-35}$ -induced cells exposed to 10, 30, 60, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of luteolin was 60.8%, 62.4%, 71.7%, 73.6% and then 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of luteolin was choose for the next experiments. 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of luteolin obviously increased cell viability to 71.7%; Hoechst 33258 nuclear staining and PI double staining showed that luteolin could significantly decrease apoptotic rate compared with the $A\beta_{25-35}$ treated group; luteolin inhibited Caspase-3 and ROS of neurons induced by $A\beta_{25-35}$. Compared with model group, luteolin also decreased the productions of TNF- α to 176.7 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and increased IL-10 to 634.8 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). **Conclusion:** Luteolin possesses the neuroprotective effects on $A\beta_{25-35}$ damaged neurons, which may be associated with inhibition of ROS, up-regulation of anti-inflammatory cytokine IL-10, down-regulating of Caspase-3 and TNF- α to against neurons apoptosis.

[Key words] luteolin; neurons; β -amyloid 25-35; apoptosis

[收稿日期] 20150108(010)

[第一作者] 王秋月, 药师, 从事中药药理研究, E-mail: yueyue-cc@163.com

[通讯作者] * 高卫真, 教授, 硕士生导师, 从事心血管药理研究, E-mail: weizhengao33@163.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 为一种常见的神经退行性疾病, 临床表现为认知功能下降。 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, A β) 的生成、积聚及毒性作用被认为是 AD 主要病理机制。A β 的聚积会激活小胶质细胞和星形胶质细胞, 造成机体氧化应激反应, 产生大量的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮自由基 (reactive nitrogen species, RNS), ROS 和 RNS 是活泼的过氧化物, 大量的积聚会造成神经元氧化系统和抗氧化系统的失衡, 并能诱导炎症介质释放增加, 进一步导致细胞损伤, 在神经元凋亡过程中起到重要作用。目前文献报道抑制神经元的氧化应激损伤, 主要是集中在抑制过量一氧化氮 (NO) 生成和促进抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等活性方面而达到抑制神经元凋亡作用^[1-3], 在抑制过量 ROS 生成和调节炎症介质方面的研究相对较少。木犀草素是一种黄酮类化合物, 广泛存在于许多植物和食物中, 如甜菜、白菜、花椰菜、芹菜、茶等^[4]。木犀草素显著的抗炎、抗氧化, 清除自由基, 抗凋亡作用已经得到证实^[5-10], 但尚未见木犀草素神经保护方面的相关研究。本研究从抑制过量 ROS 和调节炎症细胞因子角度, 探讨木犀草素对 β -淀粉样肽 25-35 (A β_{25-35}) 导致的乳鼠原代神经元损伤的保护作用及其可能机制, 为木犀草素治疗阿尔茨海默疾病提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 出生 1 d 的 BALB/c 乳鼠, 购自天津医科大学实验动物中心。合格证号 SCXK (津) 2011-0021。

1.2 试剂 β 淀粉样蛋白 (A β_{25-35} , 批号 919437), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, 批号 1886001), Hoechst 33258 (批号 861405), 阿糖胞苷 (批号 366272), 多聚赖氨酸 (批号 GUC0066), 以上购自 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (Gibco 公司, 批号 121005, 31800); NF-M (Rabbit polyclonal IgG, Stem-Cell Technologies, 批号 20130913); FITC 羊抗兔 IgG (Jackson Immuno Research, 批号 PA516758); 水溶性四氮唑盐法 (WST-1) 试剂盒 (碧云天公司, 批号 20130210); 二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (DCFH-DA, Sigma 公司, 批号 CR167813); 大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒 (批号 EK130610), 大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 EK130810, 武汉博士德生物工程有限公司),

Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天公司, 批号 20131015), β -actin (mouse monoclonal IgG, Santa Cruz 公司, 批号 SC-32377-26); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3, 批号 CST-9662, Rabbit polyclonal IgG, Cell Signaling), 木犀草素 (纯度 > 97%, 批号 111520-200504, 中国食品药品检定研究院), 电化学发光免疫分析 (ECL) 发光试剂盒 (批号 C1001-25, 美国 Pierce 公司)。

1.3 仪器 ELX800 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), BX61 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 神经元原代培养 分离新生乳鼠大脑皮层, 剪碎、消化、过 70 μ m 细胞筛网、洗涤; 加入含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U \cdot mL⁻¹)、链霉素 (100 mg \cdot L⁻¹) 的 DMEM 高糖培养基中, 96 孔板中, 调整细胞密度为 1 \times 10⁴/孔, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养, 隔 2 d 换液; 第 5 天时加入终浓度为 2.5 μ mol \cdot L⁻¹ 阿糖胞苷, 培育 48 h, 目的抑制胶质细胞生长^[11], 第 12 天开始实验。

2.2 神经元鉴定 原代培养的神经元以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% Triton X-100 通透 15 min; 加入一抗 (NF-M, 1:100) 4 $^{\circ}$ C 过夜; 次日加入 FITC 标记二抗 (1:200) 室温孵育 60 min, PBS 洗涤、封片, 倒置荧光显微镜下观察拍照。

2.3 WST-1 法检测细胞活力 神经元培养至第 12 天成熟时, 加入 A β_{25-35} (终浓度为 7 μ mol \cdot L⁻¹) 制备神经元损伤模型, 同时加入不同浓度木犀草素 (终浓度为 10, 30, 60, 90 μ mol \cdot L⁻¹), 共同孵育 12 h, 终止培养。每孔加入 WST-1 试剂 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 在 490 nm 处测定吸光度 (A)。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白对照组}} \times 100\%$$

2.4 Hoechst 33258/PI 双染检测细胞凋亡 采用 Hoechst 33258 进行细胞核染色, 可以显示细胞核的变化和凋亡小体。成熟神经元经过 A β_{25-35} (终浓度为 7 μ mol \cdot L⁻¹) 和木犀草素 (终浓度为 60 μ mol \cdot L⁻¹) 处理, 共同孵育 12 h 后, 细胞用 PBS 洗 3 遍, 4% 多聚甲醛固定, 0.3% Triton X-100 通透, 再加入 Hoechst 33258 (0.5 mg \cdot L⁻¹, pH 7.4) 室温下避光 3 min, PBS 洗涤 2 遍, 加入 5 μ L PI 染液, 室温避光放置 5 min, PBS 洗涤, 封片, 倒置荧光显微镜下拍照, 以皱缩、蓝色明亮特征的为凋亡细胞, 红色细胞核为晚期凋亡细胞, 每组随机选取 5 个视野, 计算细胞总数和凋亡细胞, 计算细胞凋亡率。

2.5 Caspase-3 蛋白表达检测 成熟神经元经过

$A\beta_{25-35}$ (终浓度为 $7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和木犀草素 (终浓度为 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理, 每组 6 个复孔, 孵育 12 h 后, 收集各组细胞, PBS 洗两次, 用蛋白裂解液提取蛋白, 冰上裂解 30 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000 \times g$ 离心 20 min, 取上清用 Bradford 法测定蛋白的量, 配平各组蛋白浓度, $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 蛋白变性。每孔 $30 \mu\text{g}$ 上样蛋白, SDS-PAGE 电泳后转膜至 NC 膜上, 5% BSA 封闭 2 h, Caspase-3 鼠单抗 (1:1 500) $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, TBST 清洗 $5 \text{ min} \times 4$ 次, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 $5 \text{ min} \times 4$ 次, ECL 系统显影。采用 β -actin 作为内参, Image J 软件采集条带灰度, 以目标条带与内参比值作为相对表达量。

2.6 胞内 ROS 水平检测 无血清培养液稀释 DCFH-DA 染料, 使其终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。吸去细胞培养液, 加入 $100 \mu\text{L}$ DCFH-DA 稀释液体, 置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 20 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 充分去残留细胞外的荧光探针。采用荧光酶标仪检测各组之间 ROS 的水平, 488 nm 为激发波长, 525 nm 为发射波长。

2.7 炎症因子检测 参照 IL-10 和 TNF- α 试剂盒说明, 采用 ELISA 法检测细胞上清 IL-10 和 TNF- α 。

2.8 统计学处理 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 神经元鉴定 原代神经元细胞培养至第 12 天时, 神经元已呈成熟状态, 免疫荧光化学染色显示, NF-M 阳性细胞数占总数 90% 以上。见图 1。

3.2 对神经元存活率的影响 WST-1 法检测结果显示, 与对照组相比, 模型组的细胞存活率降低至 48.5%, 而不同浓度木犀草素能不同程度提高细胞存活率, 呈现一定的量效关系。其中 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 使

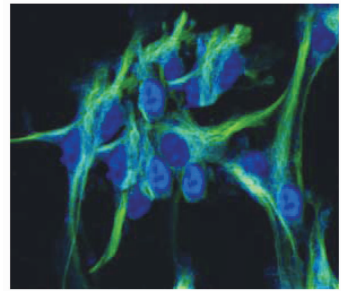


图 1 神经元鉴定 (绿色. NF-M⁺; 蓝色. DAPI + 细胞核; $\times 40$)

Fig.1 Identification of neuron (green. NF-M⁺; blue. DAPI⁺ nuclear; $\times 40$)

细胞活力达 71.7%, 显著高于模型组 ($P < 0.01$), 见表 1。由于 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的木犀草素与 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素作用效果无显著差异, 因此选择 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素为接下来实验浓度。

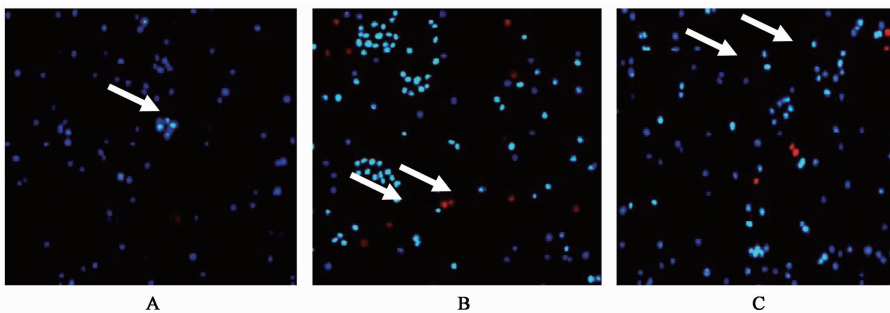
表 1 木犀草素抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经元凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Luteolin inhibited $A\beta_{25-35}$ -induced apoptosis of neurons ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%
对照	-	100.2 \pm 2.1
模型	-	48.5 \pm 2.3 ¹⁾
木犀草素	10	60.8 \pm 3.6
	30	62.4 \pm 4.3
	60	71.7 \pm 5.1 ²⁾
	90	73.6 \pm 1.6 ²⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经元凋亡的影响 Hoechst 33258/PI 双染色结果显示, 对照组凋亡细胞比例为 (3.7 \pm 3.1)%。模型组凋亡细胞比例为 (55.6 \pm 1.5)%, 与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$); 而 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素治疗组, 凋亡率为 (41 \pm 3.2)%, 与模型组比较, 具有显著性差异 ($P <$



A. 对照组; B. 模型组; C. 木犀草素 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 2 Hoechst 33258/PI 染色观察神经元凋亡 (红色. PI⁺ 染色; 蓝色. Hoechst 33258⁺ 染色; $\times 10$)

Fig.2 Hoechst 33258/PI double-staining assay (red. PI⁺; blue. Hoechst 33258⁺; $\times 10$)

0.01), 该结果表明木犀草素具有抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经元凋亡的作用, 见图 2。

3.4 对 Caspase-3 蛋白表达的影响 与对照组相比, 模型组明显升高了 Caspase-3 蛋白表达, 增加了 1.6 倍 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 木犀草素 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抑制 Caspase-3 蛋白的表达, 降低至模型的 65%, 差异具有显著性 ($P < 0.01$), 见表 2。

3.5 对胞内 ROS 水平和炎症因子的影响 胞内

ROS 水平对照组的相对值为 3.1%, 与模型组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 木犀草素治疗组 ROS 水平降低, 与模型组相比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 给予 $A\beta_{25-35}$ 预处理能显著增加培养体系中 IL-10 和 TNF- α 的浓度 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 木犀草素治疗后, 显著的升高抗炎因子 IL-10 浓度, 降低炎症因子 TNF- α 浓度 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 木犀草素对 $A\beta_{25-35}$ 处理神经元中 Caspase-3, ROS, IL-10, TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of luteolin on Caspase-3, ROS, IL-10 and TNF- α in neurons ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-3 / β -actin	ROS /%	IL-10 / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
对照	-	1.21 \pm 0.18	3.1 \pm 0.5	102.5 \pm 3.5	120.3 \pm 1.4
模型	-	3.14 \pm 0.16 ¹⁾	100.4 \pm 5.6 ¹⁾	218.7 \pm 6.2 ¹⁾	220.6 \pm 3.5 ¹⁾
木犀草素	60	2.14 \pm 0.19 ²⁾	64.2 \pm 4.9 ²⁾	634.8 \pm 1.8 ²⁾	176.7 \pm 2.9 ²⁾

4 讨论

AD 病因有多种, 包括 $A\beta$ 沉积、氧化应激、炎症反应、Tau 蛋白异常磷酸化以及脂质代谢异常学说等^[12]。研究证明 $A\beta$ 在疾病的形成过程中发挥重要作用。 $A\beta$ 可直接作用于神经元的突触、树突, 引起神经元损伤、凋亡。还可以刺激神经元生成大量的促炎症介质, 包括 ROS, IL-6, COX-2, NO, 和 TNF- α , 而这些神经毒性因子在阿尔茨海默发病早期和晚期均有作用, 既可以单独作用于神经元, 也可以彼此协同作用诱导神经毒性。比如: ROS 在神经炎症和神经变性可以直接损伤神经元, 并能抑制抗炎因子 IL-10 释放, 促进促炎症因子 IL-6 和 TNF- α 释放^[13-14]。因此, 有效抑制过量 ROS 的生成可以减少炎症介质的释放, 而达到抑制神经元凋亡的作用。近年来, 中药中的黄酮类化合物作为天然抗氧化剂在调节机体环境稳态, 保护人体的细胞及组织免受氧化应激损伤、保护心脑血管循环系统、预防神经退行性疾病等已经得到大量的证实。黄酮类化合物抗氧化和清除自由基的能力与其所含羟基的数量和位置有关, 羟基数目与抗氧化能力成正比。木犀草素作为多酚羟基黄酮类化合物, 具有很强的清除自由基的功能^[15-16]。阎高峰等研究发现, 添加 0.02% 木犀草素, 其抗氧化效果与同剂量的抗氧化剂二丁基羟基甲苯 (BHT) 相当, 还原能力和清除自由基能力比同剂量的茶多酚和 BHT 效果好^[17]。

通过 WST-1 法对 $A\beta_{25-35}$ 损伤浓度进行筛选, 7 ~ 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 降低神经元的存活率将近 50%, 在模型浓度对细胞损伤不太严重原则下, 本实

验选用 7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 作为模型损伤浓度。本实验结果表明木犀草素能明显改善 $A\beta_{25-35}$ 损伤神经元的生长状态, 使其存活率显著升高。通过 Hoechst 33258/PI 双染法观察到了木犀草素治疗后的亮蓝色和红色神经元浓缩核明显减少, 荧光强度较弱, 进一步证实了木犀草素可以抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经元凋亡。

Caspase-3 是参与细胞凋亡过程最为重要的蛋白^[18]。文献报道大鼠皮质神经元的原代培养证明 β 淀粉样蛋白可以导致 Caspase-3 含量升高^[19]。因此通过 WB 法检测了 Caspase-3 蛋白表达, 观察木犀草素是否调节 Caspase-3 蛋白表达。结果发现, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素可以显著下调 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经元 Caspase-3 蛋白过表达, 进一步证明了木犀草素可以抑制 AD 细胞模型中神经元的凋亡。

本实验结果显示, 与模型组相比, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素可以显著降低受损神经元中的 ROS。同时, 在 $A\beta_{25-35}$ 诱导损伤细胞模型中, 木犀草素能显著增加抗炎因子 IL-10 的浓度, 同时降低炎症因子 TNF- α 的浓度。因此, 本研究提出木犀草素可以通过抑制 ROS 生成, 下调促炎症因子, 同时上调抗炎因子起到保护神经元的作用。

综上所述, 木犀草素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经元损伤具有保护作用, 其作用机制是通过抑制 ROS 和促炎症因子的生成, 同时促进抗炎因子生成而发挥其影响 Caspase-3 的活性达到抑制神经元凋亡。本研究表明, 木犀草素对 AD 等神经退行性疾病具有潜在的治疗价值。

[参考文献]

- [1] 蔡标,彭代银,汪远金,等.大豆异黄酮对AD大鼠海马 NO-cGMP 信号转导系统的影响[J].中国中药杂志,2011,36(2):220-223.
- [2] 卞慧敏,王灿辉,刘涛,等.三甲散对大鼠中动脉阻断模型的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(2):41-43.
- [3] 张赓,吴金娟,姜森,等.中医药治疗阿尔兹海默病的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(6):217-222.
- [4] Sasaki N L, Toda T, Kaneko T, et al. Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells [J]. Chem Biol Interact,2003, 145(1):101-116.
- [5] Yang Y, Zhang X J, Yin J, et al. Brain damage related to hemorrhagic transformation following cerebral ischemia and the role of K ATP channels [J]. Brain Res, 2008, 19(1241):168-175.
- [6] Cui L, Zhang X, Yang R, et al. Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia;Down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and CPLA2 expression, ameliorated bbb permeability [J]. Brain Res, 2010, 14(1325):164-173.
- [7] Yu L Y, Miao H S, Hou Y N, et al. Neuroprotective effect of A20 on TNF-induced postischemic apoptosis [J]. Neurochem Res, 2006, 31(1):21-32.
- [8] Elmore S. Apoptosis;a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4):495-516.
- [9] Zhang H, Li Q, Li Z, et al. The protection of Bcl-2 overexpression on rat cortical neuronal injury caused by analogous ischemia/reperfusion *in vitro* [J]. Neurosci Res, 2008,62(2):140-146.
- [10] Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases;linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases [J]. Cell, 2004, 117(5):561-574.
- [11] 辛岗,苏芸,王革非,等.新生BALB/c小鼠大脑皮质神经元细胞培养方法的建立[J].生物技术通讯,2011,22(1):85-86.
- [12] 薛小燕,郭小华,李敏,等.阿尔茨海默病发病机理的研究进展[J].神经药理学报,2011,1(6):37-47.
- [13] Liu S, Wang X, Li Y, Necroptosis mediates TNF-induced toxicity of hippocampal neurons [J]. Biomed Res Int, 2014; 2014: 290182. doi: 10. 1155/2014/290182.
- [14] Gubandru M L, Margina D, Tsitsimpikou C. Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers [J]. Food Chem Toxicol, 2013,11(61):209-214.
- [15] Kim S H, Kumar C N, Kim H J, et al. Glucose-containing flavones-their synthesis and antioxidant and neuroprotective activities [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(21):6009-6013.
- [16] Lazaro M L. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin [J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(1):31-35.
- [17] 阎高峰,叶小利,袁吕江,等.天然抗氧化剂木犀草素抗氧化活性的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(8):27-29.
- [18] Dey S, Mactutus C F, Booze R M, et al. Cocaine exposure *in vitro* induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3 apoptotic signaling [J]. Neuroscience, 2007, 144(2):509-521.
- [19] Harada J, Sugimoto M. Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons [J]. Brain Res,1999, 842(2):311-323.

[责任编辑 聂淑琴]