

独活不同提取部位抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

胡昱, 赵丹, 张晓丹, 孙东, 郝海光, 杨静娴*
(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:通过比较独活不同提取物对 H₂O₂ 致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用,筛选药理活性最强的提取部位 方法:以回流提取,溶剂萃取及硅胶柱层析方法得到独活不同提取部位预保护 6 h 后与 250 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 共同作用于人神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y) 24 h,MTT 检测细胞活力,并试剂盒法测定细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,以及免疫荧光细胞化学法检测脑源性神经营养因子(BDNF)和神经因子-3(NT-3)的表达量 结果:独活各提取物除石油醚萃取物外均能救护 H₂O₂ 所致 SH-SY5Y 细胞活力降低,且有明显的量效关系;4 种提取物均能增强 SOD 活性,降低 MDA 含量,不同提取部位抗氧化作用无差异;石油醚-乙酸乙酯组显著增强 BDNF、NT-3 蛋白表达(与正常组比较,分别为 94.5% 和 97.5%),其神经营养作用强于其余提取物。结论:独活不同提取部位均可不同程度保护 H₂O₂ 损伤 SH-SY5Y 细胞,其中石油醚-乙酸乙酯组作用最强。

[关键词] 独活; SH-SY5Y 细胞; H₂O₂; 抗氧化; 神经营养

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0184-05

[doi] 10.11653/syfy2013240184

Different Extracts of *Angelica pubescens* Inhibit H₂O₂-induced SH-SY5Y Cells Injury

HU Yu, ZHAO Dan, ZHANG Xiao-dan, SUN Dong, HAO Hai-guang, YANG Jing-xian*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[收稿日期] 20130404(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173580);辽宁省自然科学基金项目(201102144);沈阳市科技专项资金项目(F11-264-1-42)

[第一作者] 胡昱, 硕士在读, Tel:0411-87586009, E-mail: cynthiafishu@gmail.com

[通讯作者] * 杨静娴, 博士, 教授, 从事神经药理学研究, Tel:0411-87586009, E-mail: jingxianyang@yahoo.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:1166.
- [2] 仇锦春, 廖清船, 张永, 等. 香丹注射液对急性血瘀模型大鼠血液流变性及血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):137.
- [3] 时晶, 田金洲, 王永炎, 等. 血瘀证的生物学基础研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(6):363.
- [4] 潘洪平, 杨嘉珍, 李吕力, 等. 葛根素注射液对急性血瘀模型大鼠血液流变性改善作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12):1178.
- [5] 吴国新. α 颗粒膜蛋白研究进展[J]. 中华血液学杂志, 1994, 15(3):162.
- [6] 吴国新, 阮长耿. 检测体外血小板活化程度时 4 种血小板表面活化标志蛋白的比较[J]. 苏州医学院学报, 1993, 13(4):263.
- [7] 石志芸, 施赛珠, 陈剑秋, 等. 活化血小板 α 颗粒膜蛋白在中医血瘀证中的意义[J]. 中医研究, 1995, 8(5):12.
- [8] 施赛珠, 石志芸, 陈剑秋, 等. 血瘀证与血小板活化的关连研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1996, 1(4):22.
- [9] 石志芸, 李晓明, 陈剑秋. 血小板 α 颗粒膜蛋白 140 检测在“病”与“证”的特异性联系[J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3(1):35.
- [10] 朱宏勋, 曹锐, 胡文忠, 等. 急性脑梗死患者血浆 PAI、D-二聚体、TM 与痰证、血瘀证的线性回归分析[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(12):862.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To compare the neuroprotective effect of different extracts of *Angelica pubescens* on SH-SY5Y cells injury induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) so as to screen the most pharmacologically active extracts. **Method:** Different extracts were obtained by means of reflux extraction, solvents extraction or silica gel column chromatography. Pro-incubation of different extracts on SH-SY5Y cells for 6 h prior to co-treat with 250 μmol·L⁻¹ H₂O₂ for 24 h, the cell viability were observed by MTT assay. Meanwhile, the activity of superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA) was determined. The expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve factor-3 (NT-3) by immunofluorescence was measured. **Result:** All extracts showed the protective effect against decrease of cell viability induced by H₂O₂ and there was dose-effect relationship except the extract of petroleum ether (PE) These extracts enhanced SOD activity and lowered H₂O₂-induced MDA release. Therefore, they exhibited the similar effect of anti-oxidation; According to increasing the level of BDNF and NT-3 (94.5% and 97.5% vs. control, relatively), we found that the PE-EtOAc extract was better neuroprotective than others. **Conclusion:** The different extracts of *A. pubescens* show some protective effect on H₂O₂ induced SH-SY5Y cells injury and the PE-EtOAc extract has the most pharmacologically activity.

[Key words] *Angelica pubescens*; SH-SY5Y cells; hydrogen peroxide; anti-oxidation; neuroprotective

独活为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根,始载于《神农本草经》,味辛,苦,性微温。归肝,膀胱经。具有祛风除湿,填精益髓的作用。现代药理学研究报道,独活具有抗炎、镇痛、镇静、抗血小板聚集、抗肿瘤、抗氧化、抗神经细胞凋亡等作用^[1-4]。近年来已有报道证实独活及其醇提物能够防治阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)^[5-6],抗氧化应激损伤是其治疗 AD 的可能机制之一。本研究采用不同方法提取独活,观察 95% 乙醇提取,石油醚萃取,乙酸乙酯萃取及石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱硅胶柱层析得到的不同提取物对过氧化氢(H₂O₂)所致人神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y)损伤的影响^[7]。

1 材料

1.1 药材 独活购自安徽亳州药材市场,经本院中药学教研室翟延君教授鉴定为伞形科植物重齿毛当归的干燥根(*Angelicae Pubescentis Radix*),属正品独活,粉碎成粗粉,过 20 目筛,备用。

1.2 细胞株 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株购买自首都医科大学。常规培养于含 10% 胎牛血清(FBS),100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 mg·L⁻¹ 链霉素(1% P/S)的 DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/F12) 培养基中(Gibco 公司)。于 37 ℃,5% CO₂-95% 空气培养箱中培养。每 3 d 换液 1 次,待细胞生长至 75% 融合度时胰蛋白酶消化,传代,选取对数生长期细胞进行实验。

1.3 试剂及仪器 试剂批号 95% 乙醇(20120112),石油醚(60~90 ℃)(20120225),乙酸乙酯(110801),甲醇(20111103) 100~200 目硅胶,

200-300 目硅胶; MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, 美国); SOD、MDA 试剂盒(南京建成生物研究所,中国);抗脑源神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(NT-3)抗体,CyTM3-conjugated goat anti-chicken 免疫球蛋白 G (IgG, Jackson, 美国)。NU-4750E 二氧化碳培养箱(美国 Nuair); NIB-100F 倒置荧光生物显微镜(宁波永新); MR-96A 酶标仪(深圳迈瑞)。

2 方法

2.1 独活不同提取部位的制备 独活粗粉 2 kg 用 95% 乙醇回流提取 3 次,95% 乙醇用量分别为 10, 8, 8 倍,时间为 2, 1.5, 1 h。合并滤液,得到 95% 乙醇提取液。减压回收 95% 乙醇,得浸膏 A (1 g 干浸膏相当于 1.9 g 生药)。浸膏 A 用蒸馏水混悬,得到混悬液。两份混悬液分别用石油醚和乙酸乙酯等量萃取 3 次,至无色。合并萃取液,各部分减压回收溶剂,得石油醚萃取浸膏 B (1 g 干浸膏相当于 4.3 g 生药)、乙酸乙酯萃取浸膏 C (1 g 干浸膏相当于 5.9 g 生药)。合并石油醚与乙酸乙酯部位,进行硅胶柱层析。石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,薄层色谱检识,在(12:1)(10:1)(8:1)(4:1)的洗脱部位分别得到粗膏状物,经反复重结晶,合并得到淡黄色混合物(1 g 混合物相当于 15.7 g 生药)^[8]。

4 个提取部位用二甲亚砜(DMSO,终浓度 < 0.01%)溶解,用 DMEM/F12 培养液配成各浓度待用,实验所用均为提取物浓度。

2.2 对细胞活力的影响^[9] SH-SY5Y 细胞株用 10% FBS 的 DMEM/F12 培养,贴壁细胞经消化后制备为密度 5 × 10⁵/mL 的单细胞悬液。按每孔

100 μL 接种于 96 孔板,至 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 -95% 空气培养箱中预培养 24 h。次日加药,4 个样品各 5 个浓度,每个浓度 3 个复孔,重复 3 次。

2.2.1 细胞毒性 分组:空白对照组,95% 乙醇组,石油醚组,乙酸乙酯组,石油醚-乙酸乙酯组(10,50,100,250,500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 加药后继续培养 24 h 后,每孔加 10 μL MTT 染料(5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),暗处培养 4 h 后终止培养,吸去培养基,每孔加入 100 μL DMSO,495 nm 处测吸光度(A)。

2.2.2 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 分组:空白对照组, H_2O_2 模型组,95% 乙醇组(H_2O_2 + 95% 乙醇提取物),石油醚组(H_2O_2 + 石油醚萃取物),乙酸乙酯组(H_2O_2 + 乙酸乙酯萃取物),石油醚-乙酸乙酯组(H_2O_2 + 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱混合物),浓度设置同 2.1 中。提前加药 6 h 预保护细胞,6 h 终点时加入 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 后继续共培养 24 h,每孔加 10 μL MTT 染料(5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),暗处培养 4 h 后终止培养,吸去培养基,每孔加入 100 μL DMSO,495 nm 测 A。

2.3 对 H_2O_2 造模的 SH-SY5Y 细胞的抗氧化作用 SH-SY5Y 细胞加入不同提取物,所用浓度为 2.2 方法中筛选结果。药物提前作用 6 h 后,加入 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 共培养 24 h,细胞用胰蛋白酶消化后将胰酶吸出,加入培养基吹打细胞并收集到 EP 管中,离心 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,5 min。用 PBS 洗 3 次,离心同上,弃上清,加入细胞裂解液裂解细胞,按照试剂盒的说明测定 SOD 活性和 MDA 含量。

2.4 各提取物对 H_2O_2 造模的 SH-SY5Y 细胞的抗氧化作用^[10] 96 孔板内细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后用 PBS 清洗,Triton X-100 室温下透化

30 min。固定及透化过的细胞用抗 BDNF 抗体(1:100),抗 NT-3 抗体(1:100)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日洗去一抗后,细胞用 $\text{Cy}^{\text{TM}}3$ (1:200)室温孵育 45 min。以上所有细胞用 Hoechst33258 或 DAPI 核染,mounting media 封片后在倒置荧光显微镜下观察,Image J 用于定量分析。

2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验结果采用 SPSS 软件 11.0 进行 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SH-SY5Y 细胞的毒性的影响 独活各提取物作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h,MTT 检测结果显示 95% 乙醇、石油醚、乙酸乙酯组和石油醚-乙酸乙酯组,与空白组比较均无显著性差异。

3.2 独活各提取物救护 H_2O_2 造模的 SH-SY5Y 细胞活力 如图 1B 所示。独活各提取部位提前作用于 SH-SY5Y 细胞 6 h 后,与 H_2O_2 共同孵育 24 h。MTT 检测细胞活力结果显示,经 H_2O_2 作用后 SH-SY5Y 细胞活力下降。独活 4 种提取物作用后均可增强 H_2O_2 所致 SH-SY5Y 细胞损伤细胞活力。95% 乙醇组与 H_2O_2 组比较, $> 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 均有差异(与模型组比较, $P < 0.05$),500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时恢复至正常水平。石油醚组与 H_2O_2 组比较,各浓度组均无显著差异。乙酸乙酯组与 H_2O_2 组比较,50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 均有差异(与模型组比较, $P < 0.05$),250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时恢复至正常水平。石油醚-乙酸乙酯组与 H_2O_2 组比较,质量浓度 $> 250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有显著性差异且恢复至正常水平。因此,选择 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为 95% 乙醇组和石油醚组的工作浓度,选择 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为乙酸乙酯组和石油醚-乙酸乙酯组的工作浓度。见表 1。

表 1 独活不同提取物对 H_2O_2 所致 SH-SY5Y 细胞相对活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

提取物	与正常组比较的细胞相对活力						
	正常组	模型组	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				
			10	50	100	250	500
独活 95% 乙醇提取物	1.00 \pm 0.07	0.72 \pm 0.04 ¹⁾	0.74 \pm 0.01	0.81 \pm 0.01	0.90 \pm 0.02 ²⁾	0.93 \pm 0.03 ³⁾	0.95 \pm 0.05 ³⁾
独活石油醚提取物	1.00 \pm 0.06	0.70 \pm 0.03 ¹⁾	0.69 \pm 0.08	0.73 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03	0.78 \pm 0.04	0.84 \pm 0.5 ²⁾
独活乙酸乙酯提取物	1.00 \pm 0.06	0.59 \pm 0.02 ¹⁾	0.63 \pm 0.01	0.70 \pm 0.01 ²⁾	0.80 \pm 0.02 ³⁾	0.89 \pm 0.04 ³⁾	0.96 \pm 0.01 ³⁾
独活石油醚- 乙酸乙酯提取物	1.00 \pm 0.03	0.78 \pm 0.02 ¹⁾	0.82 \pm 0.10	0.89 \pm 0.10	0.98 \pm 0.1	1.03 \pm 0.07 ²⁾	1.01 \pm 0.06 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 H_2O_2 模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 独活各提取物在 H_2O_2 造模的 SH-SY5Y 细胞中的抗氧化作用 独活各提取部位提前孵育 6 h 并

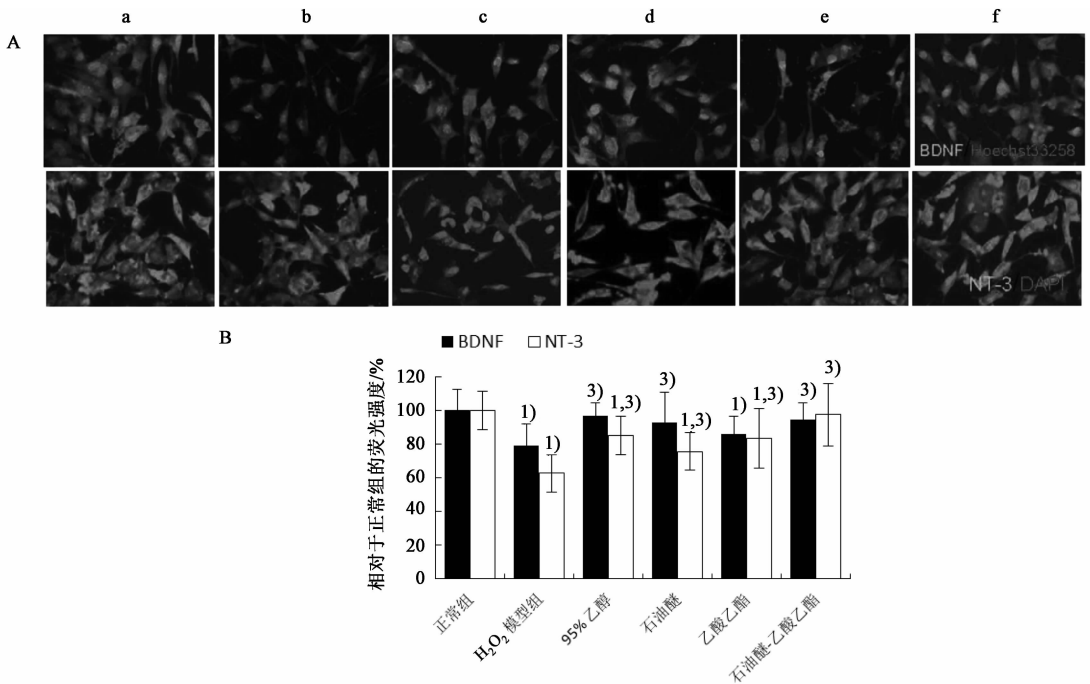
与 H_2O_2 共同作用 24 h 后, H_2O_2 组细胞培养液中的 SOD 活性明显降低,MDA 含量升高。分别加入独活

4 种不同提取物作用后,可见 SOD 活性均较 H₂O₂ 组明显升高,有显著性差异;各组 MDA 含量较 H₂O₂ 组降低,乙酸乙酯组有差异,其他各组均有显著性差异。见表 2。

表 2 独活不同提取物对 H₂O₂ 损伤 SH-SY5Y 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
正常	-	48.48 ± 5.27	2.60 ± 1.10
H ₂ O ₂ 模型	-	16.07 ± 4.64 ¹⁾	4.37 ± 1.28 ¹⁾
独活 95% 乙醇提取物	500	32.34 ± 5.55 ³⁾	2.81 ± 1.65 ³⁾
独活石油醚提取物	500	29.33 ± 9.61 ³⁾	2.91 ± 0.48 ³⁾
独活乙酸乙酯提取物	250	35.50 ± 8.12 ³⁾	3.05 ± 0.76 ²⁾
独活石油醚-乙酸乙酯提取物	250	34.26 ± 7.96 ³⁾	2.62 ± 0.87 ³⁾

3.4 独活各提取物在 H₂O₂ 造模的 SH-SY5Y 细胞中的神经营养作用 独活各提取物提前孵育 6 h 并与 H₂O₂ 共同作用 24 h 后,模型组细胞培养液中的 BDNF,NT-3 表达明显降低。分别加入独活 4 种不同提取物作用后,95% 乙醇、石油醚和石油醚-乙酸乙酯组与 H₂O₂ 组比较,BDNF 含量均有显著性差异,且能恢复至正常水平(与正常组比较,分别为 96.7%,92.7% 和 94.5%;与 H₂O₂ 模型组, $P < 0.01$),但乙酸乙酯组对 H₂O₂ 所致 SH-SY5Y 细胞模型中的 BDNF 含量无影响。4 组给药组与 H₂O₂ 组比较,NT-3 含量均有显著性差异(与 H₂O₂ 模型组, $P < 0.01$),但仅石油醚-乙酸乙酯组可恢复至正常组水平(与正常组比较,为 97.5%)。综上所述,独活不同提取物中乙酸乙酯组神经保护作用较弱,而石油醚-乙酸乙酯组较强。见图 1。



A. 各组中 BDNF 表达(上图),各组中 NT-3 表达(下图); B. A 中荧光强度定量分析

与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 H₂O₂ 模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$

a. 正常组; b. H₂O₂ 模型组; c. 独活 95% 乙醇提取物 500 mg·L⁻¹组; d. 石油醚提取物 500 mg·L⁻¹组;

e. 乙酸乙酯提取物 250 mg·L⁻¹组; f. 石油醚-乙酸乙酯提取物 250 mg·L⁻¹组

图 1 免疫荧光细胞化学法检测独活不同提取物对 H₂O₂ 损伤 SH-SY5Y 细胞内 BDNF 和 NT-3 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

4 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)严重影响人类晚年的生活质量,已经成为当今社会关注和科学研究的重点疾病之一。目前,淀粉样 β -蛋白(amyloid- β protein, A β)学说已被广泛认可,A β 通过氧化应激参与 AD 发病机制以及抗氧化药物在

AD 治疗中的作用提示干预 A β 氧化应激可能是防治 AD 的一个重要策略^[11-12]。本研究选用过氧化氢(H₂O₂)作用于 SH-SY5Y 细胞,建立氧化应激模型,观察独活不同提取物对 H₂O₂ 所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。

MTT 检测结果证明,95% 乙醇组,石油醚组,乙酸

乙酯组和石油醚-乙酸乙酯组对 SH-SY5Y 细胞均无细胞毒性。各提取物预保护 6 h 后与 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 继续共同作用 24 h, 据 MTT 检测结果, $500 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 95% 乙醇提取物, $250 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸乙酯萃取物和石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱混合物为后续实验的工作浓度。石油醚组虽然未出现阳性结果, 但考虑到 MTT 法检测细胞增殖在灵敏性、稳定性和重复性等方面存在一定局限, 笔者仍选择 $500 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 石油醚萃取物用于后续实验。

抗氧化剂 SOD 活性和自由基代谢产物 MDA 含量是检测药物抗氧化的两个重要指标。本实验结果表明, 独活不同提取物均能显著提高 H_2O_2 所致损伤的 SH-SY5Y 细胞中 SOD 活性, 有效减少 MDA 含量。说明独活 4 种提取物对 H_2O_2 所致 SH-SY5Y 损伤均有保护作用。

神经营养因子在维持神经系统的功能中有重要作用, 主要的神经营养因子包括神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、脑源神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3 (NT-3) 等。已证实 BDNF 水平在 AD 脑中降低, BDNF 的补充可以改善 AD 症状^[13-14]。为进一步探讨独活对 H_2O_2 所致 SH-SY5Y 损伤细胞的保护作用, 本实验通过免疫荧光细胞化学法观察了不同处理后的 BDNF 和 NT-3 表达量, 结果表明石油醚-乙酸乙酯组能够救护 H_2O_2 所致 SH-SY5Y 损伤中 BDNF 和 NT-3 含量减少, 恢复至正常水平。

综上所述, 独活经 95% 乙醇提取, 石油醚或乙酸乙酯萃取和石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱所得不同提取物均能增强 SH-SY5Y 细胞中 H_2O_2 导致的细胞活力下降, 并并具有抗氧化作用。而各组中, 石油醚-乙酸乙酯组的神经保护作用最强, 其具有保护作用的化学单体有哪些仍有待于进一步筛选, 但为将石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱提取部位用于进一步研究独活防治 AD 的作用及其机制提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 周刚, 马宝花. 中药独活的研究进展[J]. 中国当代医药, 2012, 19 (16): 13.
[2] 李海权, 李德新, 孙松辉. 衰老小鼠脑组织 mtDNA 缺失呼吸链酶复合体活性的变化以及独活作用机制的实验研究[J]. 中医药学刊, 2006, 24 (2): 3.

[3] 裴媛, 李德新, 孙松辉. 独活及其醇提物对自然衰老小鼠脑组织细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25 (8): 1.
[4] 孙文畅, 杨隆河, 邱彦, 等. 独活挥发油对 *N*-脂肪酰基乙醇胺水解酶的抑制作用及抗炎作用研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (22): 3161.
[5] 于兆霞, 钟秀宏. 独活乙醇提取物对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力及相关酶的影响[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2010, 12 (18): 7.
[6] 朱曼迪. 独活对阿尔茨海默病模型大鼠免疫损伤干预作用的实验研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2009.
[7] Kim H S, Lee K, Kang K A, et al. Phloroglucinol exerts protective effects against oxidative stress-induced cell damage in SH-SY5Y cells[J]. J Pharmacol Sci, 2012, 119 (2): 186.
[8] 张国铎. 活性指导下中药独活与延胡索抗肿瘤有效成分的分离及其抑瘤作用研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
[9] Qu Z Q, Zhou Y, Zeng Y S, et al. Protective effects of a *Rhodiola crenulata* extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the rat [J]. PLoS One, 2012, 7 (1): e29641.
[10] Yang J, Bridges K, Chen K Y, et al. Riluzole increases the amount of latent HSF1 for an amplified heat shock response and cytoprotection [J]. PLoS One, 2008, 3 (8): e2864.
[11] Marx J. Neuroscience. New leads on the 'how' of Alzheimer's [J]. Science, 2001, 293 (5538): 2192.
[12] Butterfield D A, Castegna A, Lauderback C M, et al. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death [J]. Neurobiol Aging, 2002, 23 (5): 655.
[13] Zhang W, Wang P J, Li M H, et al. ¹H-MRS Assessment of the therapeutic effect of bilateral intraventricular BDNF infusion into APP/PS1 double transgenic mice [J]. J Mol Neurosci, 2013, 50 (3): 434.
[14] 马新欣, 李玺, 侯吉星, 等. 脑尔康及其拆方组对阿尔茨海默病小鼠模型脑内 BDNF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (22): 6.

[责任编辑 聂淑琴]