

·实验研究·

本文引用:易鹏吉,张哲宇,彭伟军. 槲皮素对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(6):821-826.

槲皮素对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究

易鹏吉,张哲宇,彭伟军*

(中南大学湘雅二医院中西医结合科,湖南 长沙 410011)

〔摘要〕 目的 探讨槲皮素对 H₂O₂ 损伤的大鼠嗜铬细胞瘤(PC12)细胞的保护作用及机制。方法 先选取不同浓度 H₂O₂(100、200、300、400、500 μmol/L)干预 PC12 细胞,确定氧化损伤模型的条件,然后将 PC12 细胞分为对照组、模型组和槲皮素(6.25、12.5、25 μmol/L)组。通过 MTS 法、Hoechst 染色法检测细胞存活和凋亡;镜下观察细胞形态;免疫荧光检测 8-羟脱氧鸟苷(8-OHdG);ELISA 法检测丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH);Western blot 法检测 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、蛋白激酶 B(Akt)和磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)表达水平。结果 与对照组相比,模型组用 500 μmol/L H₂O₂ 干预 6 h 后,细胞存活率下降至 50%($P<0.01$),凋亡率上升为 38%($P<0.01$);镜下可见细胞萎缩变圆;8-OHdG 表达增加($P<0.05$);GSH 活性降低,MDA 含量升高($P<0.05$);Bcl-2、Akt、p-Akt 表达减少,Bax 表达增加($P<0.05$)。与模型组相比,槲皮素各浓度组细胞存活率均上升($P<0.05$),凋亡率下降($P<0.01$);细胞突触再现;8-OHdG 表达降低($P<0.05$);GSH 活性升高,MDA 含量下降($P<0.05$);Bcl-2、Akt、p-Akt 蛋白上调,Bax 蛋白下调($P<0.05$)。结论 槲皮素能拮抗 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤,其作用机制可能与 Akt 调控的通路以及抗氧化酶的相关作用有关。

〔关键词〕 槲皮素;PC12 细胞;氧化应激;凋亡;蛋白激酶 B

〔中图分类号〕 R277.7

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.06.001

Protective Effect and Mechanism of Quercetin on H₂O₂-induced PC12 Cell Injury

YI Pengji, ZHANG Zheyu, PENG Weijun*

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, The Second Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the protective effect and its mechanisms of quercetin in rat pheochromocytoma (PC12 cell) cell injury stimulated by H₂O₂. **Methods** Different concentrations of H₂O₂ (100, 200, 300, 400, 500 μmol/L) were used to interfere with PC12 cells to construct oxidative stress model, then the experiments were divided into control group, model group and quercetin group (6.25, 12.5, 25 μmol/L). The cell survival and apoptosis were detected by MTS and Hoechst, respectively. Morphology was observed by microscope, and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) expression was measured by immunofluorescence. Furthermore, the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were assayed by ELISA and the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), protein kinase B (Akt) and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) were evaluated by Western blot. **Results** After constructed via 500 μmol/L H₂O₂ for 6 h, compared with the control group, cell survival rate in model group was decreased to 50% ($P<0.01$), apoptosis rate was increased to 38% ($P<0.01$); microscopically, the cells became round and atrophic; 8-OHdG expression increased ($P<0.05$); GSH activity was reduced, and the content of MDA was increased ($P<0.05$); Bcl-2, Akt and p-Akt expression levels were decreased, and Bax expression was increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the cell survival rate of quercetin groups increased ($P<0.05$) and apoptosis rate decreased ($P<0.01$); cell synapse reappeared; the expression of 8-OHdG decreased ($P<0.05$); the level of GSH increased and the level of MDA decreased ($P<0.05$); the

〔收稿日期〕 2021-03-01

〔基金项目〕 国家自然科学基金面上项目(81873169);湖南省自然科学基金面上项目(2020JJ4803);湖南省中医药科研计划项目(201225)。

〔作者简介〕 易鹏吉,女,在读硕士研究生,研究方向:神经退行性疾病的防治。

〔通信作者〕 *彭伟军,男,副研究员,博士研究生导师,E-mail: pengweijun87@csu.edu.cn。

expression levels of Bcl-2, Akt and p-Akt were up-regulated, and the expression of Bax was down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** Quercetin could relieve oxidative damage of PC12 cells induced by H_2O_2 . Its mechanism may be related to Akt regulated pathway and the related effects of antioxidant enzymes.

[**Keywords**] quercetin; PC12 cell; oxidative stress; apoptosis; Akt

在过去的 100 年里,人类预期寿命的增加使得与年龄相关的神经退行性疾病发病率也随之增加,给社会和公共健康带来巨大的挑战^[1]。研究者们发现,氧化应激是神经病变中的重要参与者^[2]。中枢神经细胞耗氧量大,但本身清除自由基能力较弱^[3];当体内的氧化系统与抗氧化系统失衡时,过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及相关的自由基会直接损伤中枢系统,导致 DNA、脂质、蛋白质等的氧化损伤,从而引起细胞功能异常甚至凋亡^[4-5]。而天然植物的研究发现三七、姜黄素等中药及复方具有抗氧化作用^[6]。因此,寻找天然的抗氧化药物并探索其机制成为神经退行性疾病治疗的研究热点。

槲皮素(quercetin),又名栲精。大量研究^[7-8]表明槲皮素可以通过减少氧化应激、干扰肾素-血管紧张素系统、下调活性氧信号通路等方式发挥抗氧化、抗炎、抗肿瘤等药理作用。Ben Salem 等^[9]发现槲皮素可以保护 HCT116 细胞免受敌敌畏的氧化损伤;Natsumel 等^[10]细胞实验证实槲皮素可以减少 ROS 的产生;李阳等^[11]证明槲皮素可以拮抗糖尿病大鼠的氧化损伤。虽然大量研究资料已证实槲皮素的抗氧化作用,但其在神经系统的抗氧化作用有待进一步阐释。因此,本研究拟通过复制 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤模型,探索槲皮素的抗氧化作用及其可能机制。

1 材料

PC12 细胞株(批号:GDC0006,中国科学院武汉细胞库);30% H_2O_2 试剂(批号:20180611,国药集团有限公司);槲皮素(批号:18112703,成都普菲德生物技术有限公司);胎牛血清(批号:A3160802,美国 Gibco 公司);MTS 试剂[批号:G3580,普洛麦格(北京)生物技术有限公司];凋亡染色试剂(批号:C1022,上海碧云天生物技术公司);丙二醛(MDA)试剂盒(批号:FY8503-13)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)试剂盒(批号:FY3477-13)均购于江苏菲亚生物技术公司;8-OHdG(批号:ab62623,美国 Abcam 公司);Bcl-2(批号:2772S)、Bax(批号:15071S)、Akt(批号:2920S)、p-Akt(批号:12694S)均购于美国 CST 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

PC12 细胞株置于含完全培养基(90% DMEM 培养基+10%的胎牛血清+1%双抗)的培养瓶中,于 37℃、5% CO_2 环境培养。当培养瓶中的细胞密度达到

70%~80%时,传代处理。

2.2 建立 H_2O_2 诱导的氧化损伤模型

将密度为 5×10^4 mL 的细胞接种于 96 孔板中培养。实验设置对照组、模型组(100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2)。按分组培养 6、12、24 h,在设定的时间里,弃去原有的培养基,每孔加入 100 μL 含 20% MTS 试剂的新鲜培养基,在 37℃ 孵育 30 min 后用酶标仪测定 490 nm 处的吸光值(OD),计算细胞存活率。

2.3 槲皮素对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的影响

实验设置对照组(无任何处理)、模型组(500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)、槲皮素组(H_2O_2 +槲皮素,其中槲皮素浓度分别为 6.25、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$),共 6 组。槲皮素组按设置的浓度预处理 2 h;然后模型组加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 ,槲皮素组则加入用 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 配置的不同浓度槲皮素继续培养 6 h;弃去旧培养基,加入 MTS 试剂孵育后测定 OD,计算细胞存活率。

存活率 $=[(OD_{\text{实验组}}-OD_{\text{空白组}})/(OD_{\text{对照组}}-OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$

2.4 细胞形态观察

将生长期的 PC12 细胞以 1×10^6 mL 密度接种于 6 孔板,每孔 2 mL。实验设置对照组(无任何处理)、模型组(500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)、槲皮素组(H_2O_2 +槲皮素,其中槲皮素浓度分别为 6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$),共 5 个组。槲皮素组按浓度预处理 2 h 后,模型组加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 ,槲皮素组则加入 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 配置的不同浓度槲皮素培养 6 h,用倒置生物显微镜观察细胞形态并采集图像。

2.5 Hoechst 染色检测细胞凋亡

按照“2.4”项方法处理后,使用 PBS 清洗 3 遍,加入 800 μL 的 4%多聚甲醛,室温下固定 20 min,加入 1 mL 的 Hoechst 33342 试剂孵育(37℃,避光,20 min),清洗后采集图像。

2.6 ELISA 法检测相关的氧化指标

按照“2.4”项方法处理后,用细胞刮刀将细胞刮下,转移至 EP 管,冷水浴中超声波破碎 10 min,随后 4℃、12 000 r/min,离心 10 min(离心半径 134 mm),吸取上清备用,按照试剂盒说明书进行 GSH 活性和 MDA 含量的测定。

2.7 免疫荧光检测 8-OHdG 表达

PC12 细胞爬片后,设置 3 个组:对照组(无任何处理)、模型组(500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)、槲皮素组(H_2O_2 +槲皮素,其槲皮素浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$);25 $\mu\text{mol/L}$ 槲

皮素干预 2 h 后,模型组加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 , 槲皮素组则加入含 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素培养 6 h;弃去旧培养基,清洗 3 次,室温下使用 4%多聚甲醛固定;随后清洗 3 遍进行通透(0.1% Triton X-100);再次清洗,加入 5%牛血清白蛋白封闭 1 h(恒温箱 37 $^{\circ}\text{C}$);封闭完成后在一抗(8-OHdG)液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;荧光二抗孵育 1 h(37 $^{\circ}\text{C}$,避光);DAPI 染核,最后采集图像。

2.8 Western blot 法检测凋亡蛋白

按照“2.4”项方法处理后,预冷 PBS 清洗 2 遍,刮下细胞在冰盒上充分裂解,30 min 后离心取上清液,取一部分上清液按照 BCA 法测试蛋白浓度,另一部分则变性后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按照说明书配制 10%的聚丙烯酰胺凝胶,电泳 90 min、转膜 90 min,封闭 1 h(5%脱脂奶粉),一抗稀释液 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,TBST 液清洗 3 遍,二抗稀释液室温孵育 1 h,TBST 液清洗 3 遍后显影成像。

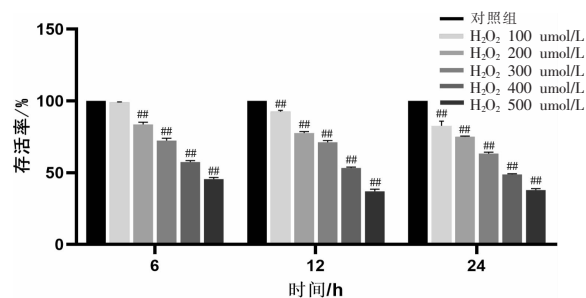
2.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”描述,选用单因素方差分析,方差齐者,多重比较采用 Bonferroni 两两比较,方差不齐者,多重比较采用 Dunnett's T_3 两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的适宜浓度和干预时间

干预 6 h 时,与对照组比较,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 对 PC12 细胞损伤不明显,200~500 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞受到氧化损伤,存活率下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);在 12、24 h 时,相较于对照组,所有 H_2O_2 浓度组的细胞存活率均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),考虑药物可能与 H_2O_2 反应,故选取 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预 6 h 建立损伤模型。见图 1。

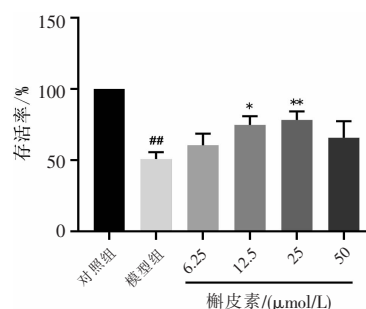


注:与对照组比较,## $P < 0.01$

图 1 H_2O_2 对 PC12 细胞存活的影响

3.2 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞活力的影响

与对照组比较,仅接受 H_2O_2 干预的模型组的细胞存活率降低至 50%($P < 0.01$);相较于模型组,加入槲皮素后细胞的存活率随着槲皮素浓度的增加而逐渐升高,槲皮素 25 $\mu\text{mol/L}$ 组存活率达到最高,差异有统计学意义($P < 0.01$),槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组存活率下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。



注:与对照组相比,## $P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 2 各组 PC12 细胞存活情况

3.3 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞的形态影响

对照组细胞贴壁牢固,细胞胞体饱满,以梭形为主,少数呈圆形、三角形,突起光滑粗大;模型组则脱壁细胞增多,胞体萎缩变圆,突触变短、断裂,甚至消失。而在槲皮素各组,细胞形态得到明显的改善,随着药物浓度的增加,脱壁、萎缩变圆的细胞减少,具有完整结构的细胞增多,突触重新长出。见图 3。

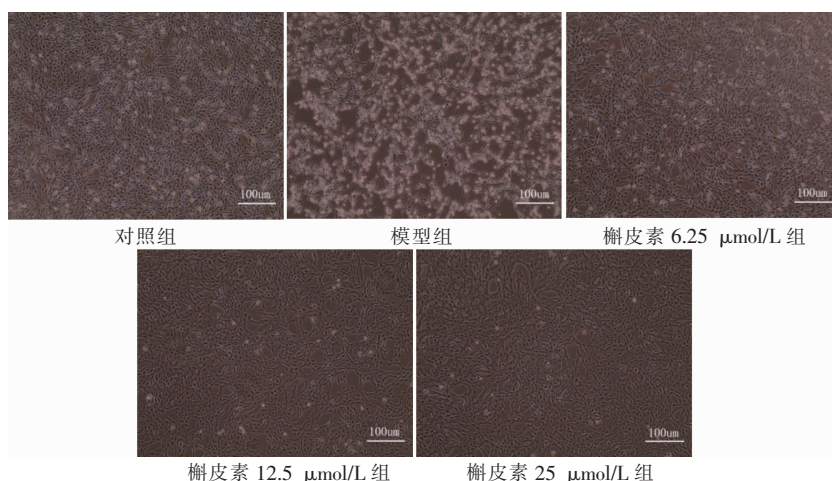


图 3 各组 PC12 细胞形态情况

3.4 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞的凋亡影响

对照组的细胞呈现暗蓝色;模型组呈现蓝白色,细胞核变形,呈现不规则化;槲皮素处理后,随着浓度的增加,细胞的凋亡得到不同程度的缓解。模型组细胞的凋亡率是对照组的 7 倍($P<0.01$)。与模型组比较,槲皮素 6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞凋亡率明显降低,分别为 10.76%、9.67%、7.25%($P<0.01$)。见图 4。

3.5 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞 8-OHdG 表达的影响

相比对照组,8-OHdG 在模型组整体展现出鲜艳的红色荧光信号,有些细胞胞质内具有更强的荧光,量化后为 32.39%,差异有统计学意义($P<0.05$);槲皮素 25 $\mu\text{mol/L}$ 组中,胞质内 8-OHdG 红色荧光信号减弱(22.75%),趋向于对照组(22.04%),与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 5。

3.6 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞的 MDA 含量及 GSH 活性的影响

相比对照组,模型组的 GSH 活性降低,MDA 含量升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);而在槲皮素

组中,不同浓度槲皮素均能改善损伤的 PC12 细胞中的 GSH 和 MDA 表达,与模型组比较,除槲皮素 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 组的 GSH 表达差异没有统计学意义外,其余差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 6。

3.7 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞 Bcl-2、Bax 的影响

与对照组相比,模型组的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下降($P<0.05$),促凋亡 Bax 水平上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。而槲皮素干预后,Bax 表达降低,其中槲皮素 25 $\mu\text{mol/L}$ 组与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,Bcl-2 表达增加,槲皮素 12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 组差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 7。

3.8 槲皮素对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞 Akt、p-Akt 通路蛋白的影响

相比对照组,模型组 Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$);与模型组相比,槲皮素各浓度组 Akt、p-Akt 蛋白表达水平增加,其中槲皮素 25 $\mu\text{mol/L}$ 组差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 8。

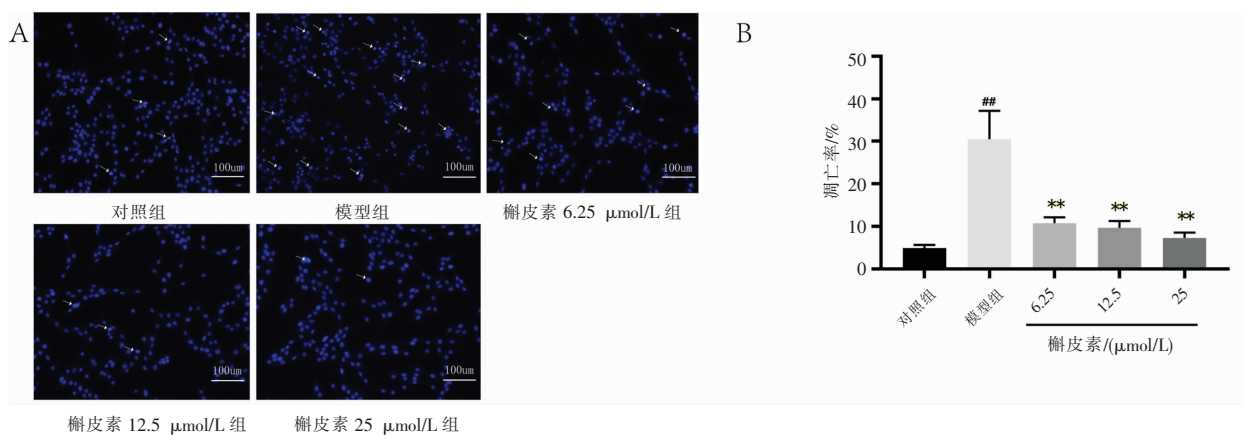


图 4 各组 PC12 细胞凋亡情况

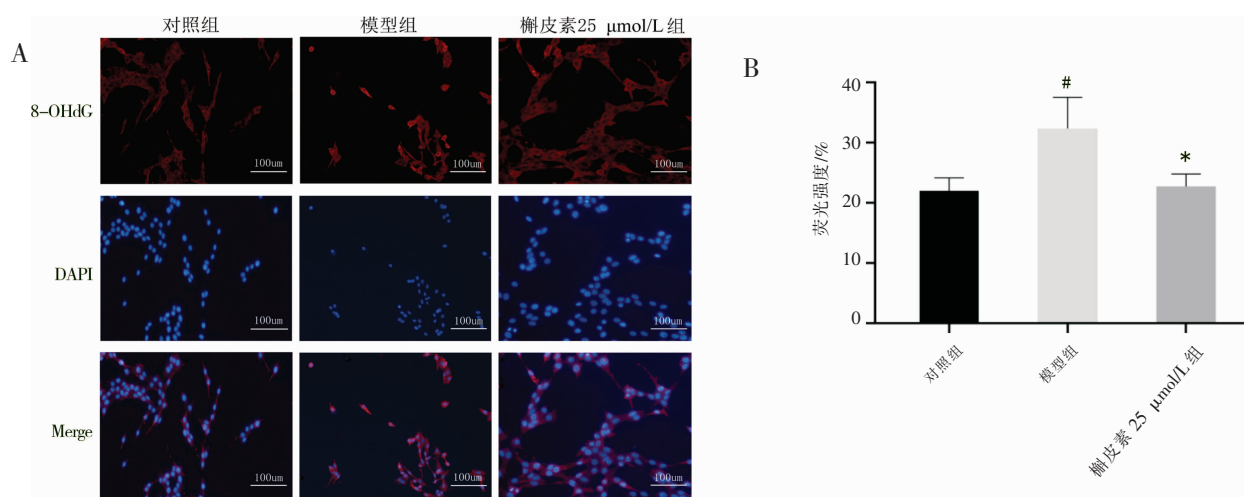
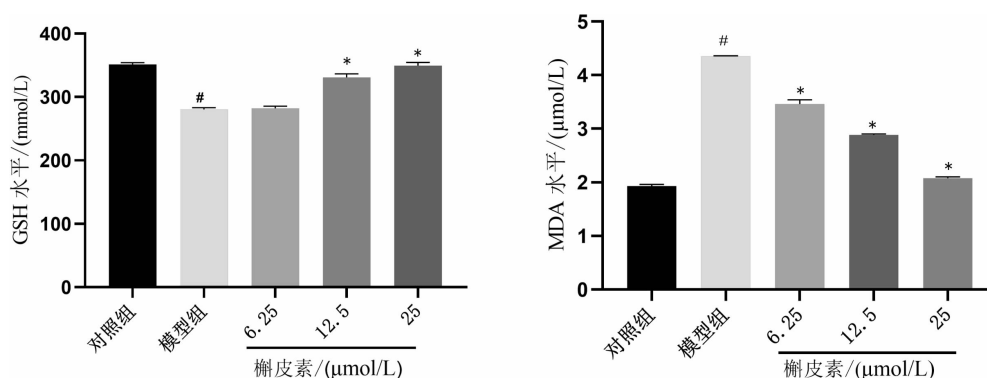
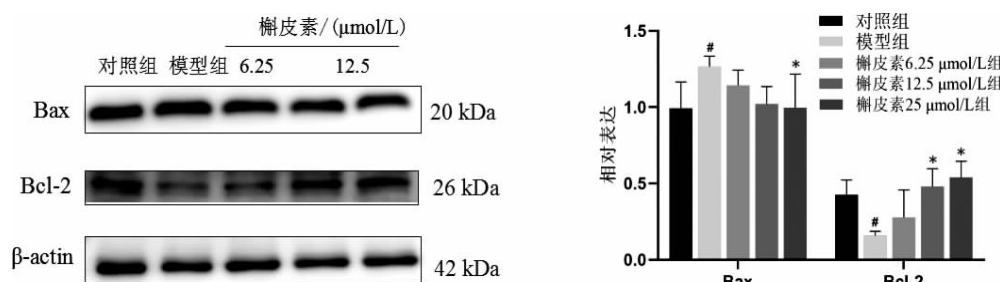


图 5 各组 PC12 细胞 8-OHdG 表达结果



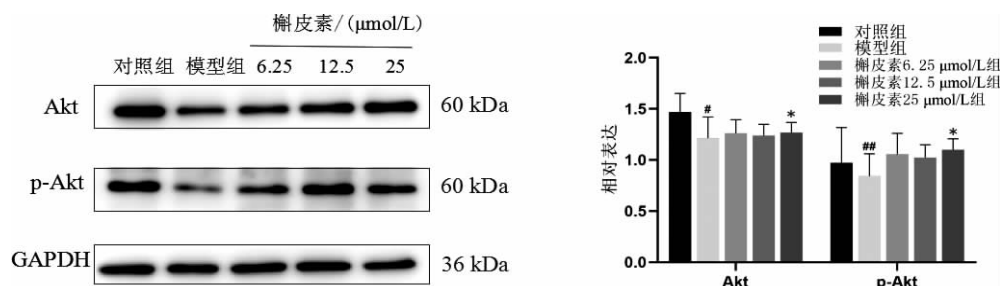
注:与对照组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$

图6 各组PC12细胞MDA、GSH表达结果



注:与对照组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$

图7 各组PC12细胞Bcl-2、Bax表达结果



注:与对照组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$

图8 各组PC12细胞Akt、p-Akt表达结果

4 讨论

氧化应激诱导的神经损伤是神经退行性疾病发生发展的重要原因之一。PC12细胞在形态、结构、功能与神经细胞高度相似,常被用来进行神经退行性疾病的研究^[12]。 H_2O_2 容易穿透细胞膜,形成的自由基会造成细胞损伤、凋亡,是常用的氧化损伤试剂^[13]。本研究采用不同浓度的 H_2O_2 和不同干预时间诱导PC12细胞复制氧化损伤模型,MTS结果显示500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预6 h时细胞存活率下降至对照组的50%左右,考虑到 H_2O_2 可能会与药物存在相互作用,故以此条件开展进一步实验。不同浓度的槲皮素干预后,能够显著提高PC12细胞的存活率,改善PC12细胞损伤的形态,其中25 $\mu\text{mol/L}$ 达到最佳的保护效果。为了对槲皮素保护作用进一步评

估,本研究还检测了氧化指标(MDA、GSH、8-OHdG)和凋亡相关蛋白。

ROS是描述一类由氧的不完全还原而形成的化学物质的总称,它通过激活线粒体通道释放细胞色素C,引起细胞内蛋白和DNA等生物结构的破坏^[14]。氧化应激指标中8-OHdG是内源性的DNA损伤的标记物,MDA、GSH表达水平反应机体氧化的损伤程度^[15-17]。本文结果发现,用 H_2O_2 诱导PC12细胞后,8-OHdG表达增加($P<0.05$),MDA含量显著升高($P<0.05$),GSH的活性下降($P<0.05$)。槲皮素干预后,降低了MDA含量和8-OHdG表达水平($P<0.05$),提高了GSH的活性($P<0.05$)。这与槲皮素在氧化损伤的MODE-K细胞、HUVEC细胞结果一致^[18-19],推断槲皮素可以降低细胞内ROS表达、提高抗氧化酶的活性,从而发挥保护神经细胞的作用。

ROS 引起的损伤最终激活凋亡相关通路,导致细胞死亡。本文结果证实槲皮素预处理后能明显提高 PC12 的存活率,同时 Hoechst 染色也进一步验证了其能有效缓解 H_2O_2 对 PC12 细胞的损伤。抗凋亡基因 Bcl-2 与促凋亡基因 Bax 形成异二聚体可以阻断凋亡信号的传递,而 Bax 自身形成的二聚体可以诱导细胞凋亡^[20]。Akt 是多条调节细胞生长、增殖、凋亡信号的关键环节(例如 MAPK、PI3K/Akt、Jak/Stat 信号通路),并且激活的 Akt 可以调控凋亡的级联反应,抑制 Bax、Caspase-9 表达^[21-22]。与涂鄂文等^[23]研究结果相符,本文结果表明不同浓度的槲皮素均可增加 Akt、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平($P<0.05$),减少 Bax 蛋白水平($P<0.05$),从而抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡。

综上,通过检测氧化指标和凋亡情况,发现槲皮素可以增加细胞存活率、GSH 活性、Akt、p-Akt 和 Bcl-2 蛋白表达,减少 MDA、8-OHdG 和 Bax 的水平,500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 造成细胞的氧化损伤被逆转,而其潜在的作用机制可能与抗氧化酶相关作用以及 Akt 调控的抑制凋亡通路有关,进一步调控机制有待后续深入探索。

参考文献

- [1] BURGOS C, MUÑOZ-MINGARRO D, NAVARRO I, et al. Neuroprotective potential of verbascoside isolated from *Acanthus mollis* L. leaves through its enzymatic inhibition and free radical scavenging ability[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(12): E1207.
- [2] SZELIGA M. Peroxiredoxins in neurodegenerative diseases[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(12): E1203.
- [3] JI B S, GAO Y. Protective effect of trihexyphenidyl on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells[J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 437(1): 50-54.
- [4] KAYAMA Y, RAAZ U, JAGGER A, et al. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(10): 25234-25263.
- [5] GIUDETTI A M, SALZET M, CASSANO T. Oxidative stress in aging brain: Nutritional and pharmacological interventions for neurodegenerative disorders[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018: 3416028.
- [6] 刘彩霞,邓常清.中药及复方改善血管内皮细胞氧化应激损伤的研究进展[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(1):151-158.
- [7] SHARMA A, KASHYAP D, SAK K, et al. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: A review of research and patents[J]. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 2018, 7(1): 15-32.
- [8] 杨 颖,王芸芸,蒋琦辰.槲皮素药理作用的研究进展[J].*特种经济动植物*,2020,23(5):24-28.
- [9] BEN SALEM I, BOUSSABBEH M, GRAIET I, et al. Quercetin protects HCT116 cells from Dichlorvos-induced oxidative stress and apoptosis[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2016, 21(1): 179-186.
- [10] NATSUME Y, ITO S, SATSU H, et al. Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells[J]. *Toxicology*, 2009, 258(2/3): 164-175.
- [11] 李 阳,苏艳瑜,李国豪,等.槲皮素通过 Nrf2 通路对糖尿病大鼠胰腺氧化损伤的拮抗作用机制[J].*食品科学*,2021,42(5):208-214.
- [12] 赵立理,张振昶,苏 刚,等.过氧化氢(H_2O_2)对 PC12 细胞的氧化应激损伤的研究[J].*临床医药文献电子杂志*,2017,4(96):18826-18827,18989.
- [13] LI W G, MILLER F J J R, ZHANG H J, et al. H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(31): 29251-29256.
- [14] NAVARRO-YEPES J, ZAVALA-FLORES L, ANANDHAN A, et al. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 142(2): 206-230.
- [15] VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 2009, 27(2): 120-139.
- [16] 邹 娟,盖 茂,陶 杨.核桃多肽对过氧化氢及 β 淀粉样肽 25-35 诱导 PC12 细胞氧化损伤的影响[J].*中国药师*,2019,22(4):619-624.
- [17] DAVIES S M, POLJAK A, DUNCAN M W, et al. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31(2): 181-190.
- [18] 张哲瑞.基于 Nrf2 通路探讨槲皮素对甲基苯丙胺致 MODE-K 细胞氧化损伤的影响[D].昆明:昆明医科大学,2020.
- [19] 江 杨.槲皮素调控非编码 RNA 干预内皮细胞胆固醇损伤的分子机制及其运载体系的构建[D].泰安:山东农业大学,2020.
- [20] 张建军,王 东,尚 峰.依托咪酯对过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤的影响及机制[J].*中华实验外科杂志*,2019,36(1):100-102.
- [21] 闫 斌,王靖博,张 宏,等.槲皮素对高糖培养海马神经元凋亡及 Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].*中国康复理论与实践*,2017,23(12):1390-1396.
- [22] BALZANO D, FAWAL M A, VELÁZQUEZ J V, et al. Alternative activation mechanisms of protein kinase B trigger distinct downstream signaling responses[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(41): 24975-24985.
- [23] 涂鄂文,陈 琼,宁 敏,等.槲皮素对脑出血大鼠神经细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 蛋白表达的作用研究[J].*湖南中医药大学学报*,2020,40(5):555-560.

(本文编辑 匡静之 周 旦)