

槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷对 SH-SY5Y 细胞分化神经元损伤的保护作用研究

付洋洋^{1,3}, 马筱², 胡娜¹, 王洪伦^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810008;

²西安交通大学第一附属医院转化医学中心, 西安 710048; ³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:本研究将人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 诱导分化为成熟的神经元细胞, 进一步利用冈田酸(OA)建立 Tau 蛋白过度磷酸化的细胞模型, 探讨槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的神经保护作用。通过 MTT 法检测细胞活力, Giemsa 染色法观察细胞形态的变化, Western blot 检测 Tau 蛋白(Ser³⁹⁶和 Ser²⁶²位点)磷酸化的程度, DCFH-DA 检测细胞内 ROS 的水平, 化学发光法检测 ATP 的含量。实验结果表明槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷可能通过降低细胞内 ROS 的产生, 提高 ATP 的含量, 从而抑制 Tau 过度磷酸化, 同时发现槲皮素的保护作用强于槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。

关键词:槲皮素; 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; SH-SY5Y; Tau 蛋白磷酸化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0032-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.005

Protective effects of quercetin and quercetin-3-O-β-D-glucuronide on okadaic acid induced neuron injury of differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells

FU Yang-yang^{1,3}, MA Xiao², HU Na¹, WANG Hong-lun^{1*}

¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

²Translational Medicine Center of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710048, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Human neuroblastoma SH-SY5Y was induced to differentiate into mature neuronal cells, and the cell model of Tau hyperphosphorylation was further established by okadaic acid (OA) to investigate the protective effect of quercetin and quercetin-3-O-β-D-glucuronide. The cell viability was measured by MTT. Morphological changes of SH-SY5Y cells were observed by Giemsa staining. The degree of phosphorylation of Tau protein (Ser³⁹⁶, Ser²⁶²) was detected by Western blot. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in cells were measured by flow cytometry. The variations of ATP content in cells were detected by chemiluminescence. The results showed quercetin and quercetin-3-O-β-D-glucuronide decreased intracellular ROS production and increased ATP content, leading to attenuate Tau hyperphosphorylation. In addition, the neuroprotective effect of quercetin exhibited stronger than that of quercetin-3-O-β-D-glucuronide.

Key words: quercetin; quercetin-3-O-β-D-glucuronide; SH-SY5Y cells; Tau phosphorylation

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆, 是以行动障碍为临床特征的神经退行性疾病。AD 的病理学特征主要为 Tau 过度磷酸化形成的神经纤维缠结、Aβ 沉积形成的斑块^[1-3]。Tau

是一种微管结合蛋白, 主要分布于神经轴突, 其主要功能是微管自聚集, 稳定微管结构, 维持神经功能^[4]。Tau 蛋白过度磷酸化是蛋白激酶和蛋白磷酸化酶调节失衡的结果^[5], 过度磷酸化的 Tau 聚集会导致神经纤维缠结的形成。黄酮类化合物是一类在自然界广泛存在、具有 2-苯基色原酮结构的次级代谢产物, 研究表明黄酮类化合物具有神经保护作

收稿日期: 2021-01-13 接受日期: 2021-01-28

基金项目: 青海省自然科学基金面上项目 (2020-ZJ-905); 青海省创新平台专项 (2021-ZJ-T05)

* 通信作者 E-mail: hlwang@nwipb.cas.cn

用^[6,7]。Qiu 等^[8]认为柚皮素可能是通过激活 ERK 及 PI3K/Akt 信号通路降低 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞中 ROS, MDA 含量及 p-Tau/t-Tau 表达、促进 SOD 活性来实现其保护作用。Luo 等^[9]发现橙皮苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤的 PC12 细胞具有保护作用,可能是通过抑制 $A\beta_{25-35}$ 的细胞毒性作用和凋亡实现的。

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 是一种生理生化及形态类似正常,且分化程度低,生长繁殖快的肿瘤细胞,在神经疾病方面有广泛的应用^[10]。SH-SY5Y 可以被维甲酸(retinoic acid, RA)、佛波酯(phorbol esters)、脑源性神经生长因子(BDNF)等物质诱导分化成多种成熟神经元,RA 可以将 SH-SY5Y 诱导成多巴胺能神经元^[11]。冈田酸(okadaic acid, OA)来源于冈田海绵,属于腹泻性贝类毒素,是一种丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 1 和 2A 的抑制剂,诱导 Tau 蛋白过度磷酸化^[12]。实验室前期从小叶金露梅中分离纯化得到槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,两者都是黄酮醇类化合物,具有相同的母核。与槲皮素相比,槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的 3 位连接了一个葡萄糖醛酸苷,结构上存在差异。因此本研究利用全反式维甲酸(ATRA)将 SH-SY5Y 细胞分化成成熟神经元细胞,进一步 OA 诱导神经元细胞 Tau 过度磷酸化建立细胞损伤模型,探讨槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷是否可以通过抑制 Tau 过度磷酸化起到保护作用,并比较两者的作用效果,为槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷治疗阿尔兹海默症提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞(SCSP-5014)购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。SH-SY5Y 细胞以含 10% 胎牛血清(FBS),1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,待细胞长到 80% ~ 90%,用含 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,选用对数生长期的细胞进行实验。

1.1.2 黄酮类化合物的配制

槲皮素(queretin, Que)、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(queretin-3-O-β-D-glucuronide, Q3G)用 DMSO 配制成 100 mM,置于 -20 °C 备用。使用时,以完全培养基稀释至不同浓度。

1.2 试 剂

全反式维甲酸(ATRA)、DMSO 和 MTT(北京索

莱宝科技有限公司);冈田酸(OA)、DCFH-DA、磷酸酶抑制剂 II 和磷酸酶抑制剂 III(Sigma-Aldrich 公司);DMEM 培养基(Gibco);ATP 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Tau 蛋白一抗(磷酸化位点 Ser³⁹⁶、Ser²⁶² 和 Tau 5)(Abcam);兔二抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

1.3 仪 器

ICP500 二氧化碳培养箱(Memmert);Epoch2 型微孔板分光光度计(BioTek);DMI1 倒置显微镜(Leica);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);金属浴(生工生物工程股份有限公司);Eppendorf 5430R 型高速冷冻离心机(Eppendorf);SW-CJ-1C 型超净工作台(上海沪净医疗器械有限公司);WD-9405D 型脱色摇床(北京市六一仪器厂);EB-9010 型微孔板孵育振荡器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);FACSMelody 型流式细胞分选仪(BD)。

2 实验方 法

2.1 Tau 过度磷酸化细胞模型建立及实验分组

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 1.5×10^4 个/mL 的密度铺于 6 孔板,加入含 2% FBS、5 μM ATRA 诱导 4 天,并隔天换液。加入含 2% FBS、40 nM OA 处理 6 h,建立 Tau 蛋白过度磷酸化的体外细胞模型^[13]。实验分为对照组(ATRA 处理组)、模型组(OA 处理组)、化合物处理组(OA + 化合物共孵育组)。

2.2 MTT 检测化合物的细胞活力

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 5×10^4 个/mL 的密度铺于 96 孔板,每孔 150 μL,孵育 48 h,加入不同浓度(0、5、10、20、50 和 100 μM)的 Que 和 Q3G 培养 24 h,加入 10% 的 5 mg/mL MTT,孵育 4 h,倒掉培养液,加入 150 μL DMSO 溶解甲瓩,于 490 nm 下测定吸光度值。细胞活力的计算方法如下。

$$\text{细胞活力} = (OD_{\text{测定孔}} - OD_{\text{对照孔}}) / OD_{\text{对照孔}} \times 100\%$$

2.3 Giemsa 染色观察细胞形态

按方法“2.1”所述,将 SH-SY5Y 细胞分化成成熟神经元细胞。加入含 2% FBS、40 nM OA 和终浓度分别为 10、20 μM 的 Que 和 Q3G 共孵育 6 h。PBS 清洗两遍,用 4% 的多聚甲醛固定 15 min, Giemsa 工作液清洗两遍,每孔加入 Giemsa 染色液染色 5 ~ 10 min,用工作液清洗掉未结合的染料,显微镜下观察拍照。

2.4 化学发光法检测细胞内 ATP 的含量

按方法“2.1”所述,将 SH-SY5Y 细胞分化成成

熟神经元细胞。加入含 2% FBS、40 nM OA 和终浓度分别为 10、20 μM 的 Que 和 Q3G 共孵育 6 h。用冷的 PBS 清洗 2 遍,加入细胞裂解液裂解 2 min,用刮棒将细胞刮下,放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min,以 14 000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,取上清液按照 ATP 检测试剂盒测定 ATP 含量。

2.5 Western blot 检测蛋白的表达水平

按方法“2.1”所述,将 SH-SY5Y 细胞分化成成熟神经元细胞。加入含 2% FBS、40 nM OA 和终浓度分别为 10、20 μM 的 Que 和 Q3G 共孵育 6 h。用冷的 PBS 清洗 2 遍,加入细胞裂解液裂解 2 min,用刮棒将细胞刮下,放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min,以 14 000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。取上清液加入 $5 \times$ Loading buffer,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min,SDS-PAGE 凝胶电泳并转 PVDF 膜,5% 的 BSA 室温封闭 1 h,分别使用 Ser³⁹⁶、Ser²⁶² 和 Tau 等一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 快洗 3 次,室温孵育二抗 1 h,TBST 快洗 3 次,ECL 化学发光法显影。

2.6 流式细胞术检测细胞内活性氧

按方法“2.1”所述,将 SH-SY5Y 细胞分化成成熟神经元细胞。加入含 2% FBS、40 nM OA 和终浓度分别为 10 μM 、20 μM 的 Que 和 Q3G 共孵育 6 h。用 1 mL PBS 清洗 1 遍,加入终浓度为 10 μM 的 DCFH-DA 孵育 30 min,弃掉旧的培养基,用 1 mL PBS 清洗 1 遍,加入胰蛋白酶消化,PBS 重悬并过 0.45 μm 的尼龙膜,流式细胞仪检测细胞内活性氧。

2.7 统计学处理方法

Western blot 数据采用 Image J 软件采集处理,利用 Graphpad Prism 进行统计学分析,数据用平均数 \pm 标准差表述,各组均数之间的进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 Que 和 Q3G 对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用筛选

Que 和 Q3G 的化学结构式如图 1 所示。MTT 用于检测细胞存活原理是:活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶会将 MTT 还原成水不溶性的甲瓖,而死细胞则不可以。二甲基亚砜(DMSO)能够将水不溶性的甲瓖溶解,于 490 nm 测定吸光度值。利用 MTT 检测不同浓度 Que 和 Q3G 对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用,其结果如图 2 所示,当 Que 和 Q3G 的浓度低于 20 μM 时,对细胞活力基本上无影响(细胞存活率均高于 90%),当 Que 和 Q3G 的浓度高于 20 μM ,SH-SY5Y 细胞存活率低于 80%,故后续实验选择

Que 和 Q3G 的作用浓度为 10 μM 和 20 μM 。

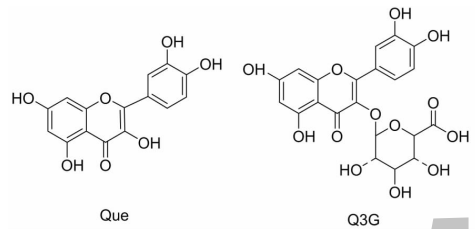


图 1 化合物的结构式

Fig. 1 Structures of the compounds

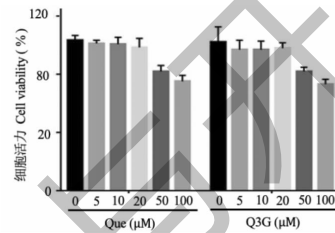


图 2 Que 和 Q3G 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($n = 5$)

Fig. 2 The effect of Que and Q3G on SH-SY5Y cell viability ($n = 5$)

3.2 Que 和 Q3G 对细胞形态的影响

Giemsa 染液是天青色素和伊红的混合物,可以将细胞核染成紫红色或蓝紫色,胞浆染成粉红色,在显微镜下可以观察到清晰的细胞图像。如图 3 所示,Giemsa 染色结果显示,OA 处理细胞变圆,突触与胞体的比值明显缩短 ($P < 0.01$),20 μM 的 Que 可以明显改善 OA 对 SH-SY5Y 造成的突触萎缩 ($P < 0.01$),20 μM 的 Q3G 可以使部分细胞保持一定的细胞形态 ($P < 0.05$),而 10 μM 的 Que 和 Q3G 对缓解 OA 造成的突触萎缩影响不大。

3.3 Que 和 Q3G 对 Tau 磷酸化相关蛋白表达水平的影响

利用 Western blot 检测 Ser³⁹⁶ 和 Ser²⁶² 位点的磷酸化水平,其结果如图 4 所示。OA 处理后 Ser³⁹⁶ 和 Ser²⁶² 位点的磷酸化水平明显升高 ($P < 0.01$)。20 μM 的 Que 会明显降低 Ser³⁹⁶ 和 Ser²⁶² 位点的磷酸化水平 ($P < 0.01$),10 μM 的 Que 也会明显降低 Ser³⁹⁶ 和 Ser²⁶² 位点的磷酸化水平,但与 OA 处理组相比,无显著性差异。10、20 μM 的 Q3G 会显著降低 Ser²⁶² 位点的磷酸化 ($P < 0.01$),20 μM 的 Q3G 会明显降低 Ser³⁹⁶ 位点的磷酸化水平 ($P < 0.01$),10 μM 的 Q3G 对 Ser³⁹⁶ 位点的磷酸化水平基本上无影响。

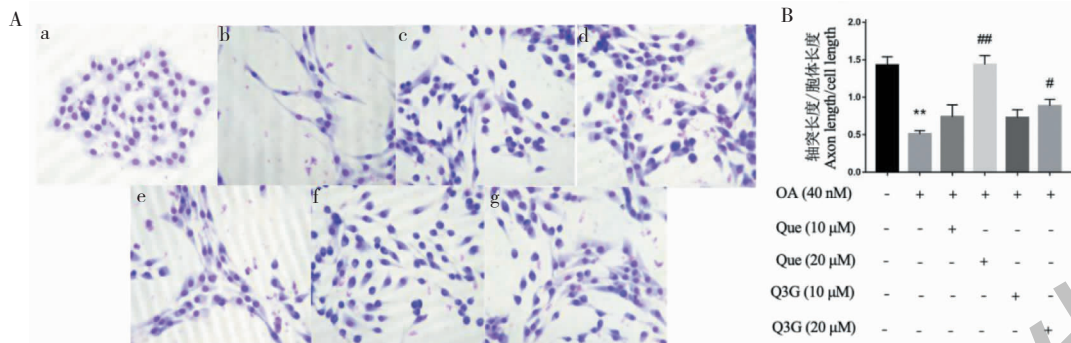


图3 Que 和 Q3G 对 SH-SY5Y 细胞形态的影响 (n = 3, 100 ×)

Fig. 3 The effect of Que and Q3G on morphology of SH-SY5Y cells (n = 3, 100 ×)

注: 与对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与模型组相比, # P < 0.05, ## P < 0.01, 下同。a: ATRA 未处理组; b: ATRA 处理组 (对照组); c: OA 处理组 (模型组); d: 10 μM Que 处理组; e: 20 μM Que 处理组; f: 10 μM Q3G 处理组; g: 20 μM Q3G 处理组。Note: Compared with control, * P < 0.05, ** P < 0.01; Compared with model, # P < 0.05, ## P < 0.01, the same below. a: Without ATRA group; b: ATRA group; c: OA group; d: 10 μM Que group; e: 20 μM Que group; f: 10 μM Q3G group; g: 20 μM Q3G group.

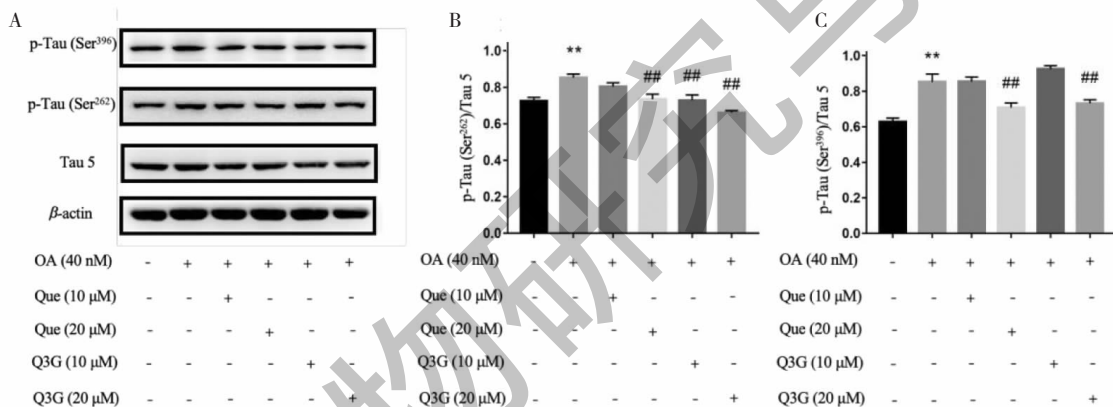


图4 Que 和 Q3G 对 Tau 过度磷酸化的影响 (n = 3)

Fig. 4 The effect of Que 和 Q3G on Tau hyperphosphorylation (n = 3)

3.4 Que 和 Q3G 对细胞内 ROS 产生的影响

2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 是非标记性的氧化敏感的荧光探针, 其本身无荧光, 可穿透细胞膜进入细胞, 被细胞内的酯酶水解成 DCFH, 而 DCFH 不能穿过细胞膜, 从而被装载到细胞, 细胞内的 ROS 会将其氧化成具有荧光强度的 DCF, 且荧光强度与细胞内 ROS 的生成量成正比。利用 DCFH-DA 检测不同时间点, 10、20 μM 的 Que 和 Q3G 对细胞内 ROS 产生的影响。如图 5 所示, OA 处理后细胞内 ROS 水平在 1、3 和 6 h 都会增加 (P < 0.05), 说明 OA 损伤会引起细胞内 ROS 水平改变。10、20 μM 的 Que 都会显著降低细胞内 ROS 的水平 (P < 0.01)。而 10、20 μM 的 Q3G 对 OA 造成的细胞内 ROS 水平作用并不显著, 说明 Que 在抑制细胞内 ROS 生成的作用强于 Q3G。

3.5 Que 和 Q3G 对 ATP 含量的影响

ATP 是生物机体主要的能量物质, 由线粒体内膜氧化磷酸化产生内膜质子梯度, 质子回流时促进 ATP 酶合成 ATP, ATP 的产生能力是线粒体功能的一个主要指标, 如果线粒体内膜损伤产生质子漏或氧化磷酸化受损, ATP 的合成均会受损。利用化学发光法检测细胞内 ATP 的含量, 其结果如图 6 所示。OA 处理后 ATP 的含量下降, 表明线粒体的氧化磷酸化活性下降, 能量代谢过程受到了破坏, 10、20 μM 的 Que 会明显增加细胞内 ATP 的生成 (P < 0.01), 10、20 μM Q3G 会增加细胞内 ATP 的含量 (P < 0.05), 从而改善线粒体功能, 其结果说明 Que 在改善线粒体功能方面的作用强于 Q3G。

4 讨论

阿尔兹海默症 (AD) 是一种以老年人患病居多

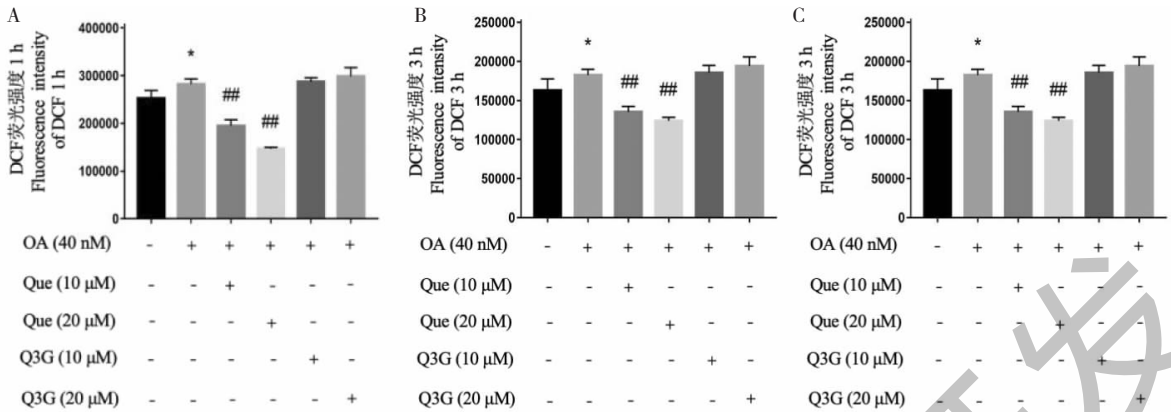


图5 Que 和 Q3G 对细胞内 ROS 水平的影响 ($n=3$)

Fig. 5 The effect of Que and Q3G on intracellular ROS level ($n=3$)

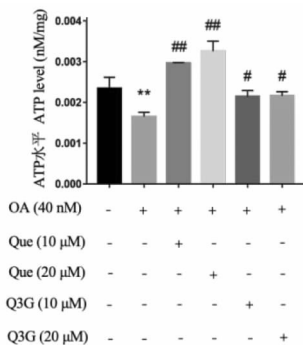


图6 Que 和 Q3G 对 ATP 含量的影响 ($n=3$)

Fig. 6 The effect of Que and Q3G on ATP content ($n=3$)

的疾病,在 AD 病人的脑中,已有 30 多种氨基酸位点的磷酸化被检测到,包括 Ser³⁹⁶、Ser²⁶² 等^[14,15]。蛋白磷酸酶 1/2A (PP1/PP2A) 是一种在所有真核细胞中都较为保守的重要蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,其活性可以被冈田酸(OA)选择性抑制,从而导致 Tau 过度磷酸化并聚集^[11],故 OA 被广泛用于建立 Tau 过度磷酸化的细胞模型^[16,17]。因此该实验以 OA 诱导分化成熟的 SH-SY5Y 细胞建立 Tau 过度磷酸化的细胞模型。

目前,用于改善 AD 的药物有多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏和美金刚,但是还没有任何方法或者疗法可以治愈、预防 AD 或延缓 AD 发展,而且这些药物用于治疗 AD 都具有一定的副作用。石杉碱甲是从中药千层塔中分离出来的,具有特异性乙酰胆碱酯酶抑制活性,在我国用于治疗阿尔兹海默症仅次于多奈哌齐和美金刚^[18]。“九期一”是以海洋褐藻提取物为原料,制备获得的低分子酸性寡糖化合物,是国际首个靶向脑-肠轴的阿尔兹海默症新药,并于

2019 年 11 月 2 日优先在中国大陆上市^[19],说明天然产物在治疗 AD 方面具有较大的潜力。已有研究文献表明黄酮类化合物在治疗阿尔兹海默症具有较好的效果。Wang 等^[20]发现原花青素可以通过抑制 p38 MAPK 信号传导途径从而抑制 Tau 蛋白过度磷酸化,实现其神经保护作用。Ma 等^[21]的研究结果表明,芍药苷通过 Calpain/Akt/GSK-3 β 通路降低冈田酸诱导的 Tau 过度磷酸化。水飞蓟宾可以通过抑制胆碱酯酶、抗炎、抗氧化应激、抗 β 样淀粉蛋白(A β) 形成和聚集等作用多通路治疗阿尔兹海默病^[22]。本研究以槲皮素和槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷为研究对象,发现槲皮素和槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷能够降低 Ser³⁹⁶和 Ser²⁶²位点的磷酸化水平,从而降低 Tau 过度磷酸化,与前期的实验结果一致^[12]。GSK-3 β 是一种广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,同时也是重要的 Tau 蛋白激酶。GSK-3 β 是 PI3K/Akt 细胞生存通路的重要下游组分,当 Akt 被激活时,其下游蛋白 GSK-3 β 也会被激活,从而引起 Tau 过度磷酸化。推测槲皮素和槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷可能会通过 Akt/GSK-3 β 通路降低 Tau 蛋白过度磷酸化,还需要进一步验证。

Tau 蛋白异常磷酸化过程中,线粒体功能受损导致过量的 ROS 生成并聚积,而氧化应激产生的 ROS 也会造成 Tau 蛋白过度磷酸化并聚积形成神经纤维缠结,最终和老年斑一起导致 AD 形成^[23]。槲皮素属于黄酮醇类化合物,其 3 位羟基上结合葡萄糖醛酸即形成槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷。本研究利用 DCFH-DA 测定细胞内 ROS 的变化,发现 OA 处理会加快细胞内 ROS 的产生,而槲皮素和槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷会降低细胞内 ROS 的产

生,且槲皮素比槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的作用更显著。类黄酮化合物中羟基的数量和位置对类黄酮化合物的抗氧化活性有很大影响^[24],两者抗氧化活性之间的差异可能是槲皮素含有 5 个羟基,而槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷有 4 个羟基,且 3 为结合有葡萄糖醛酸,糖苷化可能会降低其生理活性^[25]。

当发生氧化应激时,过度的 ROS 积累可导致机体抗氧化系统紊乱,体内氧自由基代谢失衡诱导神经细胞线粒体氧化应激,损伤线粒体,线粒体氧化磷酸化受限,ATP 合成减少,线粒体能量代谢失调^[26,27]。本研究发现 OA 处理后会降低神经元细胞内 ATP 的含量,而槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷处理后,ATP 的含量会升高,且槲皮素比槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的作用更显著。

该实验利用 OA 诱导分化成熟的 SH-SY5Y 细胞建立 Tau 过度磷酸化的细胞模型,探讨槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷的神经保护作用。结果显示,槲皮素和槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷可以改善 OA 造成的突触萎缩,抑制 Ser³⁹⁶ 和 Ser²⁶² 位点的磷酸化水平,降低细胞内 ROS 的产生,提高 ATP 的含量,为治疗阿尔兹海默症提供实验依据。

参考文献

- Hu JJ, Yang Y, Wang ML, et al. Complement C3a receptor antagonist attenuates Tau hyperphosphorylation via glycogen synthase kinase 3β signaling pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 850: 135-140.
- Zhao NN, Sun CX, Zheng M, et al. Amentoflavone suppresses amyloid β₁₋₄₂ neurotoxicity in Alzheimer's disease through the inhibition of pyroptosis[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 117043-117043.
- Kumar K, Kumar A, Keegan RM, et al. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 297-307.
- Liu JY, Fan YH, Kim DH, et al. Neuroprotective effect of catechins derivatives isolated from Anhua dark tea on NMDA-induced excitotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104240.
- Wang PL, Zhao R, Yan WQ, et al. Neuroprotection by new ligustrazine-cinnamoyl acid derivatives on CoCl₂-induced apoptosis in differentiated PC12 cells [J]. *Bioorg Chem*, 2018, 77: 360-369.
- Shi Y, Liang XC. Research progress on the mechanism of quercetin in the prevention and treatment of neurodegenera-

- tive diseases[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*(中国中西医结合杂志), 2012, 32: 1432-1435.
- Wu TY, Chen CP, Jinn TR. Traditional Chinese medicines and Alzheimer's disease[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2011, 50: 131-135.
- Qiu Q, Hu ZH, Xu HD, et al. Effect of naringenin on oxidative stress and Tau protein phosphorylation of Aβ_{25,35}-induced PC12 cell injury[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(21): 92-99.
- Luo XT, Huang Q, Li SM, et al. Effect of hesperidin extraction on cell proliferation and apoptosis of Alzheimer's disease induced by Aβ_{25,35}[C]. 2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics(2010 第三届生物医学工程与信息学国际会议): 2020-2023.
- LH, Peng WN, Deng Y, et al. Action of trichostatin A on Alzheimer's disease-like pathological changes in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15: 293-301.
- Xun ZY, Lee DY, Lim J, et al. Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells[J]. *Mech Ageing Dev*, 2012, 133: 176-185.
- Chen JJ, Deng XY, Liu N, et al. Quercetin attenuates Tau hyperphosphorylation and improves cognitive disorder via suppression of ER stress in a manner dependent on AMPK pathway[J]. *J Funct Foods*, 2016, 22: 463-476.
- Yuan ZZ, Luan GX, Wang ZH, et al. Flavonoids from *Potentilla parvifolia* Fisch. and their neuroprotective effects in human neuroblastoma SH-SY5Y cells *in vitro* [J]. *Chem Biodivers*, 2017, 14(6): e1600487.
- Liu P, Zhao YF, Li YM. Advances in Tau-mediated neurodegeneration and Tau-focused drug for Alzheimer's disease [J]. *Sci China Chem*(中国科学: 化学), 2010, 40: 906-913.
- Duka V, Lee JH, Credle J, et al. Identification of the sites of Tau hyperphosphorylation and activation of Tau kinases in synucleinopathies and Alzheimer's diseases [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75025.
- Chen Z, Chen B, Xu WF, et al. Effects of PTEN inhibition on regulation of Tau phosphorylation in an okadaic acid-induced neurodegeneration model [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2012, 30: 411-419.
- Zhang Z, Simpkins JW. Okadaic acid induces Tau phosphorylation in SH-SY5Y cells in an estrogen-preventable manner [J]. *Brain Res*, 2010, 1345: 176-181.
- Tan HY, Xia WJ. Research of patents about huperzine A [J]. *Guangdong Chem Ind*(广东化工), 2019, 5(46): 150-152.