

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.006

圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制*

顾婷¹ 徐占玲¹ 曹玲¹ 雷霞³ 刘海洋³ 耿放^{2Δ} 刘国良³ 张宁^{3,4Δ}

(1 黑龙江中医药大学药学院 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 哈尔滨师范大学 黑龙江 哈尔滨 150025;

3 黑龙江中医药大学佳木斯学院 黑龙江 佳木斯 154007;

4 黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的: 探讨圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制。**方法:** 采用 MTT 法筛选圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损伤的有效保护浓度,进一步采用流式细胞术检测圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的凋亡率的影响,并通过试剂盒检测圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞胆碱能系统受体活性的影响。**结果:** MTT 结果显示 $2 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 圣草酚可显著促进 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞增殖 ($P < 0.05$)。流式细胞术结果显示 $2 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ 圣草酚和雌二醇均可以显著抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡 ($P < 0.05$),提高其乙酰胆碱及乙酰胆碱转移酶活性并且降低乙酰胆碱酯酶的活性 ($P < 0.05$),且二者的作用相当,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 圣草酚可能通过提高 Ach 及 ChAT 的含量,降低 AchE 的含量,调节胆碱能系统相关酶的活性,发挥对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的保护作用。

关键词: 圣草酚; $A\beta_{25-35}$; PC12 细胞; 胆碱能系统

中图分类号: R-33; R741.02; R749.16 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)07-1230-04

Effect of Eriodictyol on the Cholinergic System in $A\beta_{25-35}$ -induced PC12 Cells and Its Mechanism*

GU Ting¹, XU Zhan-ling¹, CAO Ling¹, LEI Xia³, LIU Hai-yang³, GENG Fang^{2Δ}, LIU Guo-liang³, ZHANG Ning^{3,4Δ}

(1 College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China; 2 Harbin Normal

University, Harbin, Heilongjiang, 150025, China; 3 College of Jiamusi, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi,

Heilongjiang, 154007, China; 4 Key Laboratory of Ministry of education, Department of pharmacy foundation research and Application,

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT Objective: To observe the protection effects and its mechanism of eriodictyol on PC12 cell injury induced by $A\beta_{25-35}$.

Methods: MTT assay was used to choose the effective concentration of eriodictyol to $A\beta_{25-35}$ injured PC12 cells, furthermore, flow cytometry was used to detect the effect of eriodictyol on the apoptosis rate of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$. The effect of eriodictyol on the activity of cholinergic receptor in PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ was detected by Kit. **Results:** MTT results showed that $2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ could significantly promote the proliferation of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that $2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ eriodictyol and estradiol can significantly inhibit the apoptosis of PC12 cell induced by $A\beta_{25-35}$ ($P < 0.05$), improve the transferase activity and decreased the activity of acetylcholinesterase and the acetylcholine acetylcholine ($P < 0.05$), and two of us, there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** The eriodictyol can protect the PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ through increasing the content of Ach and ChAT, decreasing the content of AchE, regulating the activity of related enzymes in cholinergic system has obvious protective effects on PC12 cell injury induced by $A\beta_{25-35}$, and its mechanism may be related to the cholinergic system.

Key words: Eriodictyol; $A\beta_{25-35}$; PC12 cells; Cholinergic system

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R741.02; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)07-1230-04

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以渐进性记

忆障碍、认知功能障碍、行为异常等为特点的中枢神经系统退行性疾病^[1]。老年痴呆中 AD 占较大比例,是继肿瘤、中风和心血管疾病之后的又一致死疾病^[2],已经成为不可忽视的全球性

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81673581);哈尔滨市科技创新人才研究专项资金(2016RQYXJ012);

黑龙江中医药大学新药研究基金项目(2015xy04)

作者简介:顾婷(1993-),女,硕士研究生,主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究,电话:13504697603, E-mail: 1415777924@qq.com

Δ 通讯作者:张宁,中药学博士,研究员,硕士生导师,主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究,

电话:(0454)6050350, E-mail: zhangning0454@163.com;

耿放,中药学博士,副教授,硕士生导师,从事天然药物活性成分研究,电话:(0451) 82475863, E-mail: gengfang1980@163.com

(收稿日期:2017-10-16 接受日期:2017-10-31)

社会问题。因此,加大对阿尔茨海默病的研究力度,开发有效的防治 AD 药物尤为重要。

圣草酚(3',5,4',7- 四羟基黄酮烷,Eriodictyol)是广泛分布于水果和蔬菜^[3]中的多酚黄酮类化合物,主要存在于柠檬和花生中^[4]。黄酮类化合物种类繁多,圣草酚作为黄酮类化合物是一种天然植物雌激素成分。植物雌激素可有效预防早老性痴呆,还能影响和提高认知功能^[5-9]。在 AD 众多假说中,胆碱能神经丢失学说对于 AD 的发病机制被人们认可^[10]。因此,本研究主要探讨了圣草酚对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞胆碱能系统的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

PC12 细胞(高分化,货号:ZQ0150)购于上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂

圣草酚(纯度 98%,批号 MUST-15051213)购于北京百灵威科技有限公司; β - 雌二醇(E2,纯度 98%,批号 E2758)购于 SIG-MA-ALDRICH;DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)和双抗购于 Hyclone 公司;二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)购于 Sigma 公司;磷酸盐缓冲液(PBS,批号 P1010-2L)购于 Solarbio 公司;A β ₂₅₋₃₅(批号 Y-0044)购于北京博奥森生物技术有限公司;乙酰胆碱 (ACH) 测定试剂盒 (批号 A105-1)、乙酰胆碱酯酶 (A-CHE)测试盒(批号 A024)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)测定试剂盒 (批号 A079-1), 购于南京建成生物工程研究所;Annexin-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1063),购于碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

HF90 型 - 二氧化碳培养箱 - 中国 - 上海智城分析仪器有限公司,BCM-1000A 型 - 生物洁净工作台 - 中国 - 苏州安泰技术公司,IX-71-21PH 型 -Olympus 倒置显微镜 - 日本 - 日本 Olympus 株式会社,MK3 型 - 酶标仪 - 中国 - 上海热电仪器有限公司,LDZX-4DSBI 型 - 自动电热压力蒸汽灭菌器 - 中国 - 上海申安医疗器械厂,Research UV UF 型 - 超纯水制备系统 - 中国 - 上海和泰仪器公司,8-5K 型 - 离心机 - 中国 - 上海安亭科学仪器厂,HPC-150 个人型便携式流式细胞仪购于 Handyem 公司。

1.4 方法

1.4.1 分组及给药 将对数期生长的 HDF 以 4000/ 孔接种到 96 孔板中,37℃、5% CO₂ 培养。实验分为空白组(正常 PC12 细胞)、模型组、阳性对照组(雌二醇组)及给药组。空白组(DMEM 培养液 4 mL,培养 24 h);模型组(DMEM 培养液 3 mL,培养 2 h,给予 20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅,培养 24 h);阳性对照组(浓度为 10⁻⁹ mol/L 雌二醇的 DMEM 培养液,培养 2 h,给予 20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅,培养 24 h);给药组(浓度分别为 2 $\times$ 10⁻⁷ μ mol/L、2 $\times$ 10⁻⁶ μ mol/L、2 $\times$ 10⁻⁵ μ mol/L、2 $\times$ 10⁻⁴ μ mol/L、2 $\times$ 10⁻³ μ mol/L 圣草酚的 DMEM 培养液,培养 2 h,给予 20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅,培养 24 h)。每组均设 6 个复孔。

1.4.2 MTT 检测 将浓度为 5 g/L 的 MTT 以 20 μ L 每孔加入到 96 孔板中,培养 4 h 后弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO 溶解,置于 37℃ 恒温震荡培养器内震荡 10 min 酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度。

1.4.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 将 PC12 细胞接种在 6 孔板中,培养 24 h 后,给药组加 2 $\times$ 10⁻³ μ mol/L 圣草酚,阳性对照加 1.0 $\times$ 10⁻⁹ mol/L 雌二醇,空白组和 A β 组加等量的培养液。4 h 后给药组、雌二醇组和 A β 组加 20 μ mol/L 的 A β ,空白组加等量的培养液,继续培养 22 h,收集细胞。加 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,并加 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L propidium iodide(PI)染色液,于暗处孵育 15 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4.4 PC12 细胞中 Ach、AchE、ChAT 的活力检测 完成加药孵育 24 h 后,采用细胞刮彻底收集细胞,超声破碎细胞,4℃ 下 2500 r/min 离心 10 min,收集上清液按照试剂盒方法测定细胞中 Ach、AchE、ChAT 的活力。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,实验数据均用 $\bar{x} \pm S$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 SNK-q 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 圣草酚保护 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞损伤的有效浓度

采用不同浓度的圣草酚处理 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞,如表 1 所示,2 $\times$ 10⁻³ μ mol/L 的圣草酚处理 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞后,其细胞增殖率显著升高。因此,本实验中选择 2 $\times$ 10⁻³ μ mol/L 的圣草酚进行后续的实验研究。

表 1 不同浓度圣草酚对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm SD$,n=6)

Table 1 Effect of different concentrations of eriodictyol on the proliferation rate of PC12 cells induced by A β ₂₅₋₃₅($\bar{x} \pm SD$,n=6)

Groups	Concentration(μ mol/L)	OD value	proliferation/%
Control Group	-	0.445 $\pm$ 0.105	100
Model Group	20	0.330 $\pm$ 0.066*	74 $\pm$ 2.073*
	2 $\times$ 10 ⁻⁷	0.325 $\pm$ 0.116	73 $\pm$ 1.837
	2 $\times$ 10 ⁻⁶	0.342 $\pm$ 0.076	76 $\pm$ 3.264
Eriodictyol +A β ₂₅₋₃₅ Group	2 $\times$ 10 ⁻⁵	0.361 $\pm$ 0.063	81 $\pm$ 4.215
	2 $\times$ 10 ⁻⁴	0.364 $\pm$ 0.018	81 $\pm$ 2.369
	2 $\times$ 10 ⁻³	0.433 $\pm$ 0.084 [#]	97 $\pm$ 3.492 [#]

Note: *P<0.05, compared with the control group; [#]P<0.05, compared with the model group.

2.2 圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡率的影响

如表 2 所示,与空白组相比, $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞(模型组)细胞凋亡率显著升高($P<0.01$);与模型组相比,圣草酚和 E2 处理均可显著降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡率($P<0.01$),而两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这些结果表明圣草酚可以抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡,作用与 E2 相当。

表 2 圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm SD, n=3$)

Table 2 Effect of eriodictyol on the apoptosis rate of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm SD, n=3$)

Groups	Apoptosis Rate
Control Group	8.716 $\pm$ 0.920
Model Group	16.633 $\pm$ 0.529**
E ₂ + $A\beta_{25-35}$ Group	10.546 $\pm$ 0.869 ^{##}
Eriodictyol + $A\beta_{25-35}$ Group	8.820 $\pm$ 0.792 ^{##}

Note: ** $P<0.01$, compared with the control group; ^{##} $P<0.01$, compared with the model group.

2.3 圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞中 Ach、AchE、ChAT

活性的影响

如表 3 所示,与空白组相比,模型组 Ach、ChAT 的活性显著降低,AchE 的活性显著提高 ($P<0.01$);与模型组比较,E2+ $A\beta_{25-35}$ 组和圣草酚 + $A\beta_{25-35}$ 组 Ach、ChAT 的活性显著升高,AchE 的活性显著降低($P<0.01$),而两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这说明圣草酚可以提高 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞中 Ach、ChAT 的活性并且降低 AchE 的活性,作用与 E2 相当。

3 讨论

流行病学调查显示目前全世界已有 1.5 亿 AD 患者,世界卫生组织估计全球 60 岁以上老年人群中 AD 的平均发病率约为 3.4%,85 岁以上人群中的平均发病率约为 30%^[11]。预计 2050 年,全球 AD 患者将达到 11.4 亿^[12]。AD 的主要临床表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状,严重影响社交、职业与生活功能,最终造成患者 3 至 10 年内死亡,已经成为继心血管疾病、肿瘤、中风后的第四大死亡病因。我国正快速进入老龄化社会,AD 患病率有每年增长 1 倍的趋势,将成为我国最重要的公共健康问题。

表 3 圣草酚对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞中 Ach、AchE、ChAT 活性的影响($\bar{x} \pm SD, n=3$)

Table 3 Effects of eriodictyol on the activity of Ach, AchE and ChAT in PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm SD, n=3$)

Groups	Ach ($\mu\text{g}/\text{mgprot}$)	ChAT (U/mg)	AchE (U/mgprot)
Control Group	14.823 $\pm$ 0.811	0.863 $\pm$ 0.065	1.943 $\pm$ 0.391
Model Group	9.426 $\pm$ 0.818**	0.332 $\pm$ 0.070**	6.654 $\pm$ 0.923**
E ₂ + $A\beta_{25-35}$ Group	17.451 $\pm$ 0.798 ^{##}	0.687 $\pm$ 0.055 ^{##}	2.617 $\pm$ 0.662 ^{##}
Eriodictyol + $A\beta_{25-35}$	14.508 $\pm$ 1.195 ^{##}	0.791 $\pm$ 0.052 ^{##}	2.364 $\pm$ 0.622 ^{##}

Note: ** $P<0.01$, compared with the control group; ^{##} $P<0.01$, compared with the model group.

AD 的病因及发病机制尚未阐明,目前主要存在 $A\beta$ 瀑布假说、胆碱能损伤假说、钙离子超载的假说等。近年来,人们对于 AD 的发病机制比较认可胆碱能神经丢失学说^[13]。胆碱能系统功能缺陷是学术界公认的 AD 的可能病因之一^[13]。Ach 是中枢胆碱能神经系统参与记忆形成的必需神经递质,也是长期记忆的生理学基础,增加 Ach 合成或减少 Ach 的分解可影响学习记忆功能。有研究表明给予染料木素后,前脑皮层 AchE 活力下降,ChAT 活力升高,推测染料木素抑制了去除卵巢大鼠脑皮质 AchE 活力,提高了 ChAT 活力,使 Ach 的分解减少,合成增多,从而改善了大鼠的学习记忆能力^[14],这与本实验结果一致。目前,国内外鲜有对圣草酚生物活性及药理活性的研究报道。目前研究表明圣草酚具有抗氧化、抗炎、镇痛、改善糖尿病及糖尿病并发症的作用^[15]。本研究探讨了 PC12 细胞中 Ach、ChAT 和 AchE 的活性,结果显示 $A\beta_{25-35}$ 所致 PC12 损伤的 Ach 含量及 ChAT 活性明显降低,AchE 活性明显升高,这一趋势与 AD 的胆碱能学说相符。

既往研究表明有很多中药对 Ach 合成酶及水解酶均有影响。三七总皂苷通过提高 ChAT 的含量和活性,从而保护和改善中枢胆碱能系统的功能^[16]。涤痰汤能明显提高中枢胆碱能系统 Ach 和 ChAT 的活性,降低 AchE 的活性,对 AD 引起的中枢胆碱能系统损伤有保护作用^[17]。当归芍药散能提高 ChAT、

AchE 活性,促进 Ach 合成,从而改善痴呆患者的学习记忆功能^[18]。黑豆汁制首乌均明显降低脑组织中的 AchE 活性,提示其抗衰老作用与降低 AchE 活性、改善中枢胆碱能系统有关^[19]。葛根醇提物及总黄酮能拮抗东莨菪碱所致小鼠大脑皮质和海马区 Ach 及 ChAT 的活性降低^[20]。5-去甲基川陈皮素增强突触乙酰胆碱水平和烟碱型乙酰胆碱受体的活动^[21]。有文献报道突触前膜受体在神经肌肉接头发育过程中调节乙酰胆碱释放、轴突竞争和突触消除^[22]。本研究结果显示圣草酚可提高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞中 ChAT 的活性,抑制 AchE 的活性,促进 Ach 的合成,抑制 Ach 的分解,增加组织中 Ach 含量,表明圣草酚可减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞胆碱能损伤。

综上所述,圣草酚可能通过提高 Ach 及 ChAT 的含量,降低 AchE 的含量,调节胆碱能系统相关酶的活性,发挥对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的保护作用,这为临床采用圣草酚治疗 AD 提供了一定的实验依据。

参考文献(References)

- [1] Finder VH. Alzheimer's disease: A general introduction and pathomechanism[J]. Alzheimers Dis, 2010, 22 (S3): 5-19
- [2] Chan K Y, Wang W, Wu J J, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dem entia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023

- [3] Xie G, Meng X, Wang F, et al. Eriodictyol attenuates arsenic trioxide-induced liver injury by activation of Nrf2 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68668-68674
- [4] Wang Z, Lan Y, Chen M, et al. Eriodictyol, Not Its Glucuronide Metabolites, Attenuates Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity [J]. *Mol Pharm*. 2017, 14(9): 2937-2951
- [5] 朱迪娜,王磊,王思彤,等.植物雌激素的研究进展[J].*中草药*, 2012, 43(7): 1422-1429
Zhu Di-na, Wang Lei, Wang Si-tong, et al. Research progress of phytoestrogen[J]. *Chinese medicinal herb*, 2012, 43(7): 1422-1429
- [6] Ichimaru R, Tominari T, Yoshinouchi S, et al. Raloxifene reduces the risk of local alveolar bone destruction in a mouse model of periodontitis combined with systemic postmenopausal osteoporosis [J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 29(85): 98-103
- [7] Li F, Li Q, Huang X, et al. Psoralen stimulates osteoblast proliferation through the activation of nuclear factor- κ B-mitogen-activated protein kinase signaling[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 2385-2391
- [8] Luo G, Li X, Zhang G, et al. Novel SERMs based on 3-aryl-4-aryloxy-2H-chromen-2-one skeleton - A possible way to dual ER α /VEGFR-2 ligands for treatment of breast cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 14(140): 252-273
- [9] Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, et al. Bazedoxifene and raloxifene protect neocortical neurons undergoing hypoxia via targeting ER α and PPAR- γ [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, S0303-7207(17)30450-1
- [10] 王惠国,赵小红,张楠楠,等.阿尔茨海默病发病机制概况[J].*辽宁中医药杂志*, 2016, (10): 2234-2236
Wang Hui-guo, Zhao Xiao-hong, Zhang Nan-nan, et al. Overview of pathogenesis on Alzheimer's disease[J]. *Liaoning journal of traditional chinese medicine*, 2016, (10): 2234-2236
- [11] Chan K Y, Wang W, Wu J J, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis[J]. *Lancet*, 2013, 381(9882): 2016-2023
- [12] Li Hua, Wang Jian, Wang Si-wang. Effects of genistein on learning and memory ability in ovariectomized rats [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(20): 3826-3830
- [13] 张亦凡. 圣草酚的体外抗氧化活性及诱导肝癌细胞凋亡的研究 [D].西北农林科技大学, 2013
Zhang Yi-fan. Study on antioxidant activity and apoptosis of human hepatoma cells induced by thymol in vitro [D]. Northwest A&F University, 2013
- [14] Claudio Bucolo, Gian Marco Leggio, Filippo Drago, et al. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(1): 88-92
- [15] Wei-Yun Zhang, Jung-Jin Lee, Yohan Kim, et al. Effect of Eriodictyol on Glucose Uptake and Insulin Resistance in Vitro [J]. *Agric Food Chem*, 2012, 60(31): 7652-7658
- [16] Kaji I, Akiba Y, Konno K, et al. Neural FFA3 activation inversely regulates anion secretion evoked by nicotinic ACh receptor activation in rat proximal colon[J]. *J Physiol*, 2016, 594(12): 3339-3352
- [17] García-Gómez BE, Fernández-Gómez FJ, Muñoz-Delgado E, et al. MRNA Levels of ACh-Related Enzymes in the Hippocampus of THY-Tau22 Mouse: A Model of Human Tauopathy with No Signs of Motor Disturbance[J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 58(4): 411-415
- [18] Silva B, Molina-Fernández C, Ugalde MB, et al. Muscarinic ACh Receptors Contribute to Aversive Olfactory Learning in *Drosophila* [J]. *Neural Plast*, 2015, 2015: 658918
- [19] Feuerbach D, Pezous N, Weiss M, et al. AQW051, a novel, potent and selective $\alpha 7$ nicotinic ACh receptor partial agonist: pharmacological characterization and phase I evaluation [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(5): 1292-1304
- [20] Trivedi S, Maurya P, Sammi SR, et al. 5-Desmethylnobiletin augments synaptic ACh levels and nicotinic ACh receptor activity: A potential candidate for alleviation of cholinergic dysfunction [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 14(657): 84-90
- [21] Tomás J, García N, Lanuza MA, et al. Presynaptic Membrane Receptors Modulate ACh Release, Axonal Competition and Synapse Elimination during Neuromuscular Junction Development [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 16(10): 132
- [22] Poppi LA, Tabatabaee H, Drury HR, et al. ACh-induced hyperpolarization and decreased resistance in mammalian type II vestibular hair cells[J]. *Neurophysiol*, 2017, Oct 4: jn.00030.2017

(上接第 1247 页)

- [25] Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 170-177
- [26] Sakata K, Kondo T, Mizuno N, et al. Roles of ROS and PKC- β II in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 70: 55-65
- [27] Capitao M, Soares R. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(11): 2443-2453
- [28] Kelly DJ, Edgley AJ, Zhang Y, et al. Protein kinase C- β inhibition attenuates the progression of nephropathy in non-diabetic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(6): 1782-1790
- [29] Hu W, Xu T, Wu P, et al. Luteolin improves cardiac dysfunction in heart failure rats by regulating sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41017
- [30] Ning BB, Zhang Y, Wu DD, et al. Luteolin-7-O-glucuronide attenuates isoproterenol-induced myocardial injury and fibrosis in mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(3): 331-341
- [31] Hu J, Man W, Shen M, et al. Luteolin alleviates post-infarction cardiac dysfunction by up-regulating autophagy through Mst1 inhibition [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(1): 147-156