

黄芩素-7-甲醚对缺氧致 PC12 细胞损伤的保护作用

景临林, 杨颖, 武柠子, 马慧萍*, 贾正平(兰州总医院药剂科, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 兰州 730050)

摘要: 目的 研究黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞的保护作用。方法 将 PC12 细胞分为正常对照组、缺氧模型组、芦丁组和黄芩素-7-甲醚组, 培养 24 h 后, MTT 法检测黄芩素-7-甲醚对细胞活力的影响; 酶标仪法检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性以及细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)水平; 2',7'-二氯荧光素探针法检测细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)和血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的 mRNA 和蛋白的表达。结果 与正常对照组相比, 缺氧导致 PC12 细胞活力显著降低, LDH、MDA 和 ROS 水平显著升高, 抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活力显著降低。黄芩素-7-甲醚预处理能够逆转这些变化。此外, 缺氧能够诱导细胞内 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达增加, 而黄芩素-7-甲醚能够进一步提高 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达。结论 黄芩素-7-甲醚对缺氧致 PC12 细胞损伤有一定的保护作用, 其作用机制可能与激活 Nrf2/HO-1 通路, 抑制氧化应激损伤有关。

关键词: 黄芩素-7-甲醚; 缺氧; PC12 细胞; 氧化应激; 活性氧; Nrf2/HO-1 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)06-0787-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.001

引用本文: 景临林, 杨颖, 武柠子, 等. 黄芩素-7-甲醚对缺氧致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 787-792.

Protective Effect of Negletein Against Hypoxia Induced Injury on PC12 Cells

JING Linlin, YANG Ying, WU Ningzi, MA Huiping*, JIA Zhengping(Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Key Lab of PLA for Prevention and Treatment of Injuries Induced by High Altitude, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of negletein against hypoxia induced injury on PC12 cells. **METHODS** The PC12 cells were divided into four groups, including normal control group, hypoxia model group, rutin group and negletein group. Cell viability was detected using MTT assay. Lactate dehydrogenase(LDH), malondialdehyde(MDA), catalase(CAT) and superoxide dismutase(SOD) in cell culture supernatant were evaluated by enzyme labeling method. Reactive oxygen species(ROS) level was evaluated by DCFH-DA. The expression of mRNA and protein of Nrf2 and heme oxygenase-1(HO-1) were assessed with RT-PCR analysis and Western blot. **RESULTS** Compared with normal control group, the viability as well as the activity of antioxidant enzyme such as SOD and CAT were reduced and the level of LDH, MDA and ROS were increased treated with hypoxia in PC12 cells. These changes were reversed with the pretreatment of negletein. Moreover, the expression of Nrf2 and HO-1 mRNA and proteins were also increased induced by hypoxia, even further upregulated by negletein pretreatment. **CONCLUSION** The results indicate that negletein can suppress the hypoxia-induced damage on PC12 cells by activating of the Nrf2/HO-1 pathway and alleviation of oxidative stress.

KEY WORDS: negletein; hypoxia; PC12 cell; oxidant stress; reactive oxygen species; Nrf2/HO-1 pathway

黄酮类化合物在天然产物中分布广泛, 是植物体内非常重要的次级代谢产物, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗动脉粥样硬化以及降压等多种生理活性^[1-4]。黄芩素-7-甲醚(化学名: 5,6-二羟基-7-甲氧基黄酮; 英文名: negletein)

是黄芩素的七位羟基甲基化产物, 具有与黄芩素相同的生物活性, 但其代谢稳定性和水溶性等药动学参数均较黄芩素有所提高^[5]。

研究表明, 黄芩素-7-甲醚具有抗炎^[6]和神经保护^[7]的作用。本课题组前期从大苞雪莲提取分离

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202458); 全军医药卫生科研基金(C LZ12JA04); 中国博士后科学基金(2012M521926); 甘肃省省青年科技基金计划项目(1308RJYA061)

作者简介: 景临林, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0931)8994671 E-mail: lfjinglinlin@163.com *通信作者: 马慧萍, 女, 博士, 主任药师 Tel: (0931)8994671 E-mail: huipingmacyk@163.com

得到黄芩素-7-甲醚, 体外活性筛选实验结果表明黄芩素-7-甲醚对缺氧损伤所致的 PC12 细胞活力下降和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)漏出均有明显的抑制作用^[8]。本研究进一步探讨黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞的保护作用及机制, 为黄芩素-7-甲醚的缺氧损伤防治研究提供理论和实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

MCO-15AC 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Revco 公司); Spectramax i3 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); JY92-2D 超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); BP210S 电子天平(荷兰赛多利斯有限公司); TH4-200 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); ABI 7300 实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems)。

1.2 细胞株

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤单克隆细胞系 PC12 细胞购自上海中科院细胞库。

1.3 药物与试剂

黄芩素-7-甲醚按照本实验室报道的方法制备^[8]; 芦丁(陕西慈缘生物技术有限公司, 批号: 20121106); MTT(批号: 20130301)和 ECL 超敏发光液(批号: 20170705)购自 Sigma 公司; 活性氧(reactive oxygen species, ROS, 批号: 20130902)、LDH(批号: 20130619)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, 批号: 20130625)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号: 20130705)和过氧化氢酶(catalase, CAT, 批号: 20131112)检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; RNAiso Plus(批号: AK8303)、PrimeScript™ RT reagent Kit(批号: DRR037A)、SYBR Premix EX Taq(Perfect Real time)(批号: AK4401)以及 Nrf2、血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和 GAPDH 引物均由宝生物工程(大连)有限公司提供; Nrf-2(批号: 170114)和 HO-1(批号: GR123437-12)兔单克隆抗体购自 Abcam 公司; β -actin 小鼠单克隆抗体(批号: 170114)、山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记抗体(批号: 171792)和辣根标记山羊抗兔 IgG(批号: 171651)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 PC12 细胞的培养

采用含有 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 U·mL⁻¹硫酸链霉素的 DMEM 培养基, 于 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 条件下在三气培养箱中培养, 每隔 48 h 更换新的培养液。细胞大约铺满 80%皿底后传代。

2.2 MTT 测定细胞活力

将对数生长期的 PC12 细胞接种于 96 孔板中, 计数后将接种密度调整为 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 100 μL , 置于三气培养箱中正常培养 24 h。更换培养基, 加入 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩素-7-甲醚预处理细胞 1 h, 每个浓度设 6 个复孔, 分别在常氧, 5% CO₂ 和 95% N₂ 的缺氧条件下培养 48 h, 弃上清, 用无菌的 PBS 漂洗 1 次, 每孔加入 20 μL MTT(终浓度为 0.5 g·L⁻¹), 继续培养 4 h 后每孔加入 100 μL DMSO, 振荡 10 min 至蓝色晶体完全溶解, 在 570 nm 波长下测定吸光度(λ), 筛选黄芩素-7-甲醚的最佳药物浓度。

2.3 LDH、MDA 和抗氧化酶活力测定

细胞接种于 90 mm 培养皿中, 随机分为正常对照组、缺氧模型组、芦丁组和黄芩素-7-甲醚组, 缺氧处理同“2.2”项下方法。实验结束后, 收集 100 μL 培养基上清液, 根据 LDH 试剂盒说明书测定 LDH 活性。然后弃去培养基, 并用冷的 PBS 漂洗 1 次, 1 000×g 离心 5 min 收集细胞, 加入 0.5 mL PBS 进行匀浆, 将匀浆 8 000×g 低温(4 °C)离心 15 min 后取上清, 根据试剂盒说明书测定 MDA、SOD 和 CAT 水平。

2.4 细胞内 ROS 测定

将对数生成期的 PC12 细胞接种于 96 孔板中, 缺氧处理结束后, 弃掉培养基, 用无菌的 PBS 清洗一遍, 加入含有 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 无血清培养基, 37 °C 下孵育 30 min, 预先原位装载 DCFH 探针, 采用酶标仪以 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 检测各孔荧光值。胞内 ROS 水平用正常对照组百分比表示。

2.5 RT-PCR

采用 RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA, 并将其逆转录为 cDNA。然后进行荧光定量 PCR 扩增, 反应体系为 20 μL , 扩增条件为 95 °C 预变性 30 s, 随后进入以下 40 个循环: 95 °C 反应 30 s, 60 °C 退火 31 s。使用 GAPDH 作为内参, 引物序

列如下: Nrf2, Forward 5'-GAGACGGCCATG ACTGAT-3', Reverse 5'-GTGAGGGGATCGATG AGTAA-3'; HO-1, Forward 5'-AGGTGCACATCCG TGCAGAG-3', Reverse 5'-TCCAGGGCCGTATAG ATATGGTACA-3'; GAPDH, Forward 5'-GCACAG TCAAGGCTGAGAATG-3', Reverse 5'-ATGGTGG TGAAGACGCCAGTA-3'。结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

2.6 Western blot

采用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量。蛋白样品中加入 $4\times$ 蛋白上样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沸水煮 15 min,制备好的蛋白样品存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。进行 Western blot 时,取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 样品上样,采用 5% SDS-PAGE 浓缩胶,10% SDS-PAGE 分离胶进行分离,湿法将蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,加入一抗,包括 Nrf2(1:500)、HO-1(1:500)和 β -actin(1:1000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min。加入二抗,除 β -actin 蛋白使用山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记抗体(1:2000 稀释),其余均用辣根标记山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释),室温孵育 2 h,化学发光法显色,Tanon-4200SF 全自动数码凝胶图像分析系统曝光,灰度值用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描测定。

2.7 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用 SPSS 19.0 统计软件对数据中各组之间进行 one-way ANOVA 统计学分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素-7-甲醚对正常 PC12 细胞活力的影响

与正常对照组相比(细胞存活率为 100%),黄芩素-7-甲醚各浓度处理组 PC12 细胞活力差异均无统计学意义,表明黄芩素-7-甲醚在该浓度范围内对 PC12 细胞无毒性作用,结果见图 1A。

3.2 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞活力的影响

与正常对照组相比(细胞存活率为 100%),缺氧模型组 PC12 细胞活力显著下降($P<0.01$),仅为 62.26%,表明缺氧环境明显抑制了 PC12 细胞活力。与缺氧模型组比较,经黄芩素-7-甲醚预处理后,各组活力均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并呈现出一定的剂量依赖性。当黄芩素-7-甲醚终浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率最高,表明在该浓度下,黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞保护作用最强,因此后续实验均在该浓度下进行。结果见图 1B。

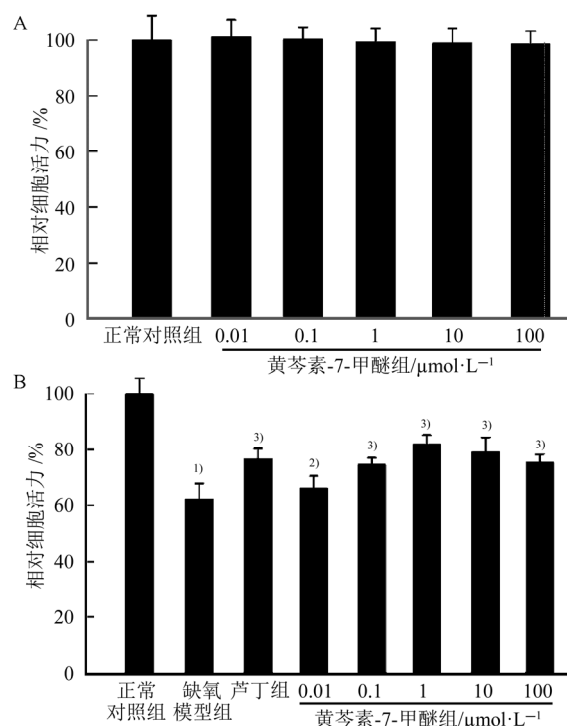


图 1 黄芩素-7-甲醚对正常和缺氧 PC12 细胞活力的影响 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

与正常对照组相比, $^1P<0.01$; 与缺氧模型组相比, $^2P<0.05$, $^3P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of negletein on cell viability of PC12 cell in normoxic and hypoxia condition($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Compared with normal control group, $^1P<0.01$; compared with hypoxia model group, $^2P<0.05$, $^3P<0.01$.

3.3 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞 LDH 漏出的影响

与正常对照组比较,缺氧模型组培养基中 LDH 活性显著升高($P<0.01$)。与缺氧模型组比较,黄芩素-7-甲醚组培养基中 LDH 活性显著降低($P<0.01$),说明黄芩素-7-甲醚能够维持细胞膜的完整性,减轻缺氧对 PC12 细胞的损伤,结果见图 2。

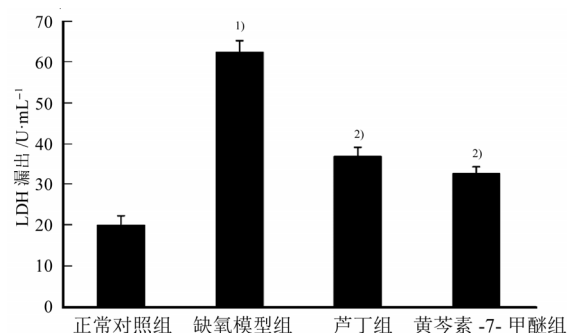


图 2 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞 LDH 漏出的影响 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

与正常对照组相比, $^1P<0.01$; 与缺氧模型组相比, $^2P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of negletein on hypoxia-induced LDH leakage in PC12 cells($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Compared with normal control group, $^1P<0.01$; compared with hypoxia model group, $^2P<0.01$.

3.4 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞 MDA 和 ROS 水平的影响

与正常对照组比较, 缺氧模型组细胞中 MDA 和 ROS 水平显著升高($P<0.01$)。与缺氧模型组相比, 黄芩素-7-甲醚组细胞中 MDA 和 ROS 水平显著降低($P<0.01$), 结果见图 3。

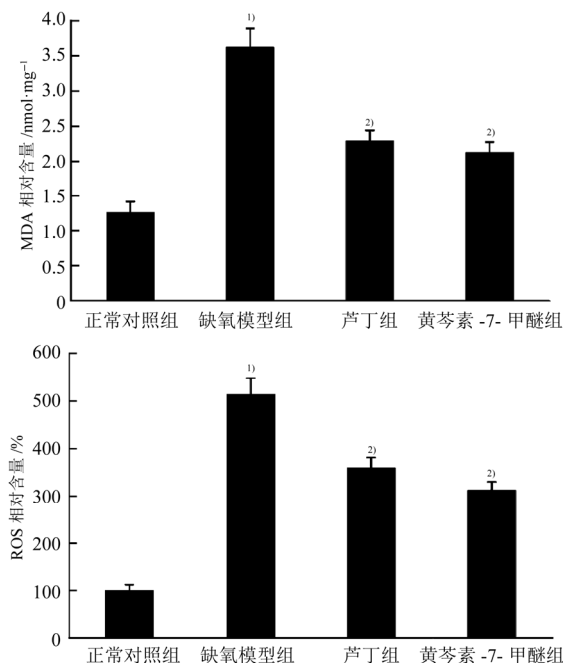


图 3 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞中 MDA 和 ROS 含量的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of negletein on MDA content and ROS level in PC12 cells under hypoxia($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with hypoxia model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.5 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞抗氧化酶活力的影响

与正常对照组比较, 缺氧模型组细胞中 SOD 和 CAT 活性显著降低($P<0.01$), 而黄芩素-7-甲醚预处理能够逆转这些变化, 显著提高抗氧化酶的活力($P<0.01$)。结果见图 4。

3.6 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞内 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达的影响

与正常对照组比较, 缺氧模型组细胞中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的表达显著提高($P<0.01$), 而黄芩素-7-甲醚能够进一步提高 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的活性($P<0.01$)。结果见图 5。

3.7 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞内 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 缺氧模型组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达显著提高($P<0.01$), 而黄芩素

-7-甲醚能够进一步提高 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达($P<0.01$)。结果见图 6。

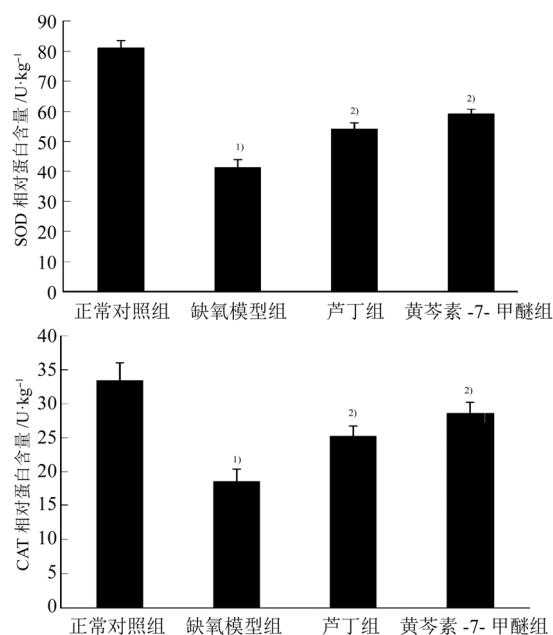


图 4 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞中 SOD 和 CAT 活性的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of negletein on the activity of SOD and CAT in PC12 cells under hypoxia($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with hypoxia model group, ²⁾ $P<0.01$.

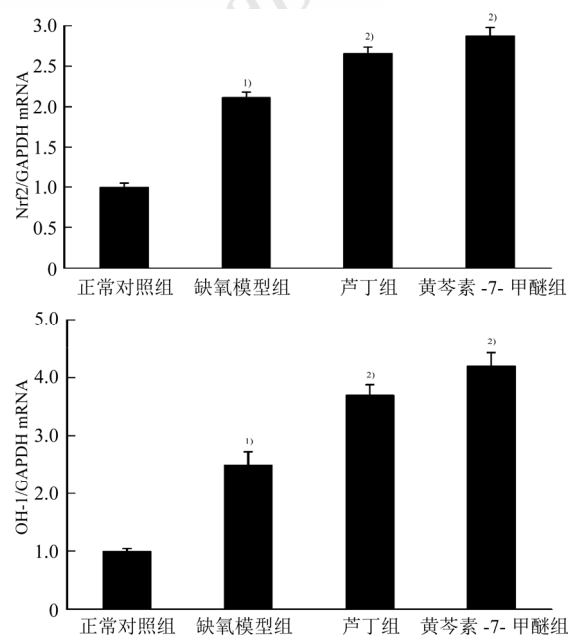


图 5 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of negletein on the mRNA expression of Nrf2 and HO-1 in PC12 cells under hypoxia($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with hypoxia model group, ²⁾ $P<0.01$.

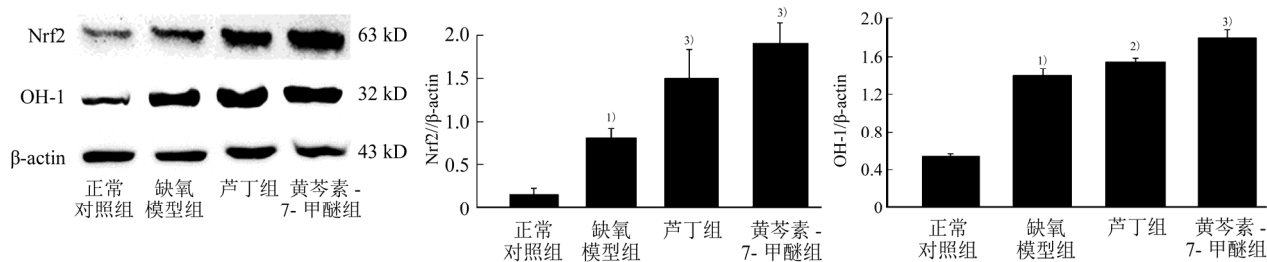


图6 黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞中 Nrf2 和 OH-1 蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effect of negletein on the protein expression of Nrf2 and OH-1 in PC12 cells under hypoxia($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with hypoxia model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

4 讨论

氧气是需氧生物产生能量的物质基础,当氧气供应不足或者不能满足机体需求时就会造成缺氧。大脑是机体耗氧量最大的器官之一,占体质量 2%的大脑,其耗氧量却占了总耗氧量的 23%,这就使中枢神经系统对缺氧极为敏感,是最易遭受缺氧损伤的器官^[9]。PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞,在细胞形态、结构和功能上具有与神经元细胞相似的特性,在体外研究缺氧/缺血诱导神经元损伤方面应用广泛^[10]。芦丁是一种天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗病毒等多种生物活性,课题组前期研究发现,芦丁对缺氧 PC12 细胞具有优异的保护作用^[11]。本实验建立缺氧 PC12 细胞损伤模型,结果显示,缺氧能够显著降低 PC12 细胞活力,使细胞膜的通透性增大、细胞内 LDH 外漏,导致培养基中 LDH 的活性升高。芦丁和黄芩素-7-甲醚预处理能逆转缺氧导致的细胞增殖活性下降,减少 LDH 漏出,维持细胞膜的完整性,对缺氧 PC12 细胞具有明显保护作用。

ROS 和 MDA 是氧化应激的主要产物,是细胞遭受氧化应激损伤的标志物^[12]。实验结果表明,缺氧导致 PC12 细胞内产生大量的 ROS,进而攻击 DNA、脂质和蛋白质等生物大分子,影响细胞的结构和功能;同时与细胞膜中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,升高 MDA 水平。而黄芩素-7-甲醚能够降低 ROS 和 MDA 含量,缓解缺氧对 PC12 细胞的氧化应激损伤,推测黄芩素-7-甲醚的保护作用与缓解机体氧化应激有关。

正常生理状态下,抗氧化酶如 SOD、CAT 等能够有效地清除机体产生的 ROS。SOD 能够通过提供氢原子配体将其还原生成过氧化氢,进而被 CAT 催化还原生成水。二者共同作用维持细胞内

自由基稳态^[13]。缺氧条件下产生大量 ROS 不仅破坏了细胞内的自由基稳态,同时还降低抗氧化酶的活性^[14],进一步加剧细胞损伤。经黄芩素-7-甲醚干预后,缺氧 PC12 细胞中 SOD 和 CAT 活性较缺氧模型组显著升高,提示黄芩素-7-甲醚可能通过提高细胞内抗氧化酶的活性而发挥其抗缺氧作用。

SOD、CAT 等抗氧化酶表达水平主要受到核因子 2(NF-E2)相关因子(Nrf2)的调控^[15]。Nrf2 属于碱性亮氨酸拉链(bZIP)蛋白家族成员,是调节抗氧化应激反应的重要核转录因子。正常情况下, Nrf2 与 keap1 结合,活性较低,氧化应激能够使 Nrf2 与 keap1 解离进入细胞核,通过与抗氧化反应元件(antioxidant response elements, ARE)结合,调控 Nrf2-ARE 信号通路下游抗氧化蛋白(CAT、SOD 和 GSH-Px 等)和 II 相解毒酶[HO-1、醌氧化还原酶 1(NQO1)、谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)等],维持机体细胞内氧化还原状态平衡和降低氧化应激造成的损伤^[16]。HO-1 是由 Nrf2 通路调控的重要抗氧化酶,能够催化血红素降解为胆红素、CO 和铁离子,具有明显的抗炎和抗氧化作用^[17]。为了阐明黄芩素-7-甲醚对抗氧化酶活性调节作用是否与 Nrf2/HO-1 信号通路有关,本研究对 Nrf2 及其下游 HO-1 的表达情况进行了考察。结果发现,缺氧导致 PC12 中 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白的表达显著升高,而黄芩素-7-甲醚预处理可以进一步促进 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白的表达。上述实验证明,黄芩素-7-甲醚提高缺氧 PC12 细胞中抗氧化酶活性是通过激活 Nrf2/HO-1 途径实现的。

综上所述,黄芩素-7-甲醚对缺氧 PC12 细胞具有优异的保护作用,其作用机制与其清除过量

ROS, 抑制脂质过氧化, 通过 Nrf2/HO-1 途径调节抗氧化酶活性, 缓解氧化应激有关。

REFERENCES

- [1] HOSTETLER G L, RALSTON R A, SCHWARTZ S J. Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity [J]. *Adv Nutr*, 2017, 8(3): 423-435.
- [2] HUANG Y T, CHI Z L, WANG S M, et al. Research progress on Licorice flavonoids and their antitumor activities [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2017, 26(13): 1532-1537.
- [3] CHANG S P, YU X, LIANG Z Y, et al. Optimization of extraction technique of total flavonoids in polygonum chinense by response surface methodology [J]. *Pharmacy Today*(今日药学), 2016, 26(1): 36-38.
- [4] FANG H, ZHANG Y, LI J, et al. Protective effect of total flavones from *Salix caprea* flowers against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2016, 25(8): 949-953.
- [5] HE G H, GAO Y, LI C L, et al. A convenient and efficient approach to synthesize negletein from baicalin [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57(18): 2001-2005.
- [6] SINGH B, SIDIQ T, JOSHI P, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory flavones from *Actinocarya tibetica* Benth [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(23): 2227-2230.
- [7] BANERJEE P, SAHOO A, ANAND S, et al. Multiple mechanisms of iron-induced amyloid beta-peptide accumulation in SHSY5Y cells: protective action of negletein [J]. *Neuromol Med*, 2014, 16(4): 787-798.
- [8] JING L L, HE L, FAN P C, et al. Chemical constituents of *saussurea involucrata* with anti-hypoxia activity [J]. *Chem Nat Compound*, 2016, 52(3): 487-489.
- [9] ERECIŃSKA M, SILVER I A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia [J]. *Respir Physiol*, 2001, 128(3): 263-276.
- [10] CHEN P Y, HO Y R, WU M J, et al. Cytoprotective effects of fisetin against hypoxia-induced cell death in PC12 cells [J]. *Food Funct*, 2015, 6(1): 287-296.
- [11] 姚娟. 芦丁的抗缺氧作用及其分子机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- [12] CZERSKA M, MIKOŁAJEWSKA K, ZIELIŃSKI M, et al. Today's oxidative stress markers [J]. *Med Pr*, 2015, 66(3): 393-405.
- [13] DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(1): 47-95.
- [14] YANG B, XU Y, HU Y, et al. Madecassic acid protects against hypoxia-induced oxidative stress in retinal microvascular endothelial cells via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016(84): 845-852.
- [15] SOBOČANEC S, ŠARIĆ A, MAČAK ŠAFRANKO Ž, et al. The role of 17β-estradiol in the regulation of antioxidant enzymes via the Nrf2-Keap1 pathway in the livers of CBA/H mice [J]. *Life Sci*, 2015(130): 57-65.
- [16] WU Z H, MA Y F, ZHAO L, et al. Role of Nrf2-ARE pathway in oxidative stress injury and its relationship with other signaling pathways [J]. *Anim Husb Feed Sci*(畜牧与饲料科学), 2016, 37(3): 42-48.
- [17] MIN K J, LEE J T, JOE E H, et al. An IκBα phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1(HO-1) expression through the activation of reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF-κB-independent mechanism [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(9): 1505-1513.

收稿日期: 2017-09-23
(本文责编: 蔡珊珊)