

人参总蛋白对A β ₂₅₋₃₅诱导SH-SY5Y细胞凋亡的机制研究

郑丽娜,赵大庆,赵文学,乔巨慧,刘颖,刘美辰*

(长春中医药大学 吉林省人参科学研究院,吉林 长春 130117)

摘要: 对人参水溶性总蛋白对 β -淀粉样蛋白所致人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 损伤的影响及其作用机制进行研究。使用 25 $\mu\text{mol/L}$ 老化后 A β ₂₅₋₃₅ 处理 SH-SY5Y 细胞建立阿尔兹海默病体外模型; 用人参水溶性总蛋白(6.25、12.5、25 $\mu\text{g/mL}$)预保护 SH-SY5Y 细胞 12 h, 随后加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 A β ₂₅₋₃₅ 共同孵育 24 h; CCK-8 法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡、抑制活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平和线粒体膜电位变化; 紫外分光光度法检测三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate, ATP)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力; 蛋白免疫印迹法检测细胞色素 C 释放以及凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)表达。结果显示 SH-SY5Y 细胞经 A β ₂₅₋₃₅ 诱导后, 细胞活力显著降低, 凋亡程度严重增加($P<0.0001$); 不同浓度的人参总蛋白可以挽救 A β ₂₅₋₃₅ 诱导所致细胞活力降低和凋亡程度增加, 并呈现浓度依赖性; 人参总蛋白预处理可以降低 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的线粒体超氧化物升高, ROS 产生, 显著抑制 A β ₂₅₋₃₅ 损伤导致的线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)降低和三磷酸腺苷水平的下降; 人参总蛋白可抑制 A β ₂₅₋₃₅ 所致的细胞色素 C 向胞质的释放, 下调 Bax 表达、上调 Bcl-2 表达。

关键词: 人参; 阿尔兹海默病; 细胞凋亡; β -淀粉样蛋白; 线粒体

Mechanism of Ginseng Total Protein on Apoptosis of SH-SY5Y Cells Induced by A β ₂₅₋₃₅

ZHENG Li-na, ZHAO Da-qing, ZHAO Wen-xue, QIAO Ju-hui, LIU Ying, LIU Mei-chen*

(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China)

Abstract: The effects of ginseng water-soluble total protein on the damage of SH-SY5Y induced by amyloid β in human neuroblastoma were studied. *In vitro* model of Alzheimer's disease was established by treatment of SH-SY5Y cells with 25 $\mu\text{mol/L}$ aging A β ₂₅₋₃₅. SH-SY5Y cells were pre-protected with ginseng water-soluble total protein (6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$) for 12 h. 25 $\mu\text{mol/L}$ of A β ₂₅₋₃₅ was added for 24 h. Cell viability was detected by CCK-8 method. Flow cytometry for apoptosis, reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. Ultraviolet spectrophotometric determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activity. Western blotting was used to detect cytochrome C release and apoptosis-related protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) expression. The results showed that the cell viability was significantly decreased and the degree of apoptosis was significantly increased in SH-SY5Y cells induced by A β ₂₅₋₃₅ ($P<0.0001$). Different concentrations of ginseng total protein could reduce the decrease of cell viability and the degree of apoptosis induced by A β ₂₅₋₃₅, and it was concentration dependent. Pretreatment with ginseng total protein could reduce the increase of mitochondrial superoxide induced by A β ₂₅₋₃₅, inhibit the production of ROS, and significantly inhibit the decrease of mitochondrial membrane potential (MMP) induced by A β ₂₅₋₃₅ injury, and decrease in the level of adenosine-triphosphate (ATP). Ginseng total protein inhibited the release of Cytochrome C to cytoplasm induced

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81703663);国家重点研发计划(2017YFC1703100)

作者简介:郑丽娜(1993—),女(汉),硕士研究生,研究方向:中药生物技术专业。

* 通信作者:刘美辰(1987—),女(汉),助理研究员,博士,研究方向:主要从事中药有效成分及其传统功效研究。

by $A\beta_{25-35}$, down-regulated Bax expression and up-regulated Bcl-2 expression.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey; Alzheimer's disease; apoptosis; amyloid β ; mitochondria

引文格式:

郑丽娜,赵大庆,赵文学,等.人参总蛋白对 $A\beta_{25-35}$ 诱导SH-SY5Y细胞凋亡的机制研究[J].食品研究与开发,2019,40(5):6-11

ZHENG Lina, ZHAO Daqing, ZHAO Wenxue, et al. Mechanism of Ginseng Total Protein on Apoptosis of SH-SY5Y Cells Induced by $A\beta_{25-35}$ [J]. Food Research and Development, 2019, 40(5): 6-11

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发病率最高的神经退行性疾病,以其在老年人群中的高发性和对社会的危害性而备受关注^[1]。随着社会人口老龄化的进程,AD有效预防和治疗手段的研发迫在眉睫。AD的发病机制复杂, β -淀粉样蛋白(amyloid β , $A\beta$)沉积形成的老年斑及神经原纤维缠结形成是AD典型病理特征^[2]。研究表明 $A\beta$ 可直接或间接对线粒体结构及功能造成损伤,进而诱发氧化应激、激活凋亡信号通路等级联反应^[3];另一方面可促进 $A\beta$ 生成,进一步加重线粒体损伤,从而形成恶性循环,导致神经元变性凋亡。因此,抑制 $A\beta$ 诱导的线粒体损伤对减轻AD病理损害具有重要意义^[4-5]。

天然药物对疾病的干预具有多靶点、低毒性和整体调节的作用优势,已被越来越多的研究人员所关注。其中,人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为“百草之王”,具有“调神益智”的传统功效,同时现代药理研究也证明了人参中多种活性成分在AD的预防和治疗中具有良好的作用效应^[6-10],但其保护作用机制尚不明确。因此,本研究选择人参中主要活性成分——人参水溶性总蛋白,以 $A\beta_{25-35}$ 诱导SH-SY5Y细胞凋亡作为神经元损伤的体外模型,从细胞水平考察人参水溶性总蛋白对神经元的保护作用;进而利用分子生物学相关实验技术从线粒体功能维系的角度阐明人参总蛋白参与的细胞内调控途径,为研制更为有效的抗AD药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

人参水溶性总蛋白(ginseng water soluble total protein, GTP):长春中医药大学中医药大健康创新中心提供,批号2018030701,总蛋白质量分数为83.25%; $A\beta_{25-35}$:Sigma公司;CCK-8试剂盒:博士德生物有限公司;细胞凋亡检测试剂盒:BD Pharmingen™;ROS检测试剂盒:Thermo Fisher Scientific;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力、丙二醛(malondi-

aldehyde, MDA)含量检测试剂盒:南京建成生物工程研究所;ATP检测试剂盒、罗丹明123、BCA蛋白浓度检测试剂盒、Beta-Tubulin内参抗体(β -tubulin rabbit monoclonal antibody, β -tubulin)和细胞色素C抗体(cytochrome C rabbit monoclonal antibody, Cyto C):碧云天生物有限公司;COX IV线粒体内参抗体(Anti-COX IV antibody, COX IV):爱必信生物科技有限公司;B淋巴细胞瘤-2基因抗体(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白抗体(Bcl-2 associated X protein, Bax)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH):abcam公司(美国)司;磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS):Hyclone生物有限公司;DMEM/F12培养基:BI公司;胎牛血清:Gibco公司。

1.2 主要仪器

Infinite M200PRO全自动酶标仪:Tecan公司;Flow Sight多维全景流式细胞仪:Amnis公司;Mini Protean蛋白电泳仪(PowerPac™HC):Bio-rad公司;371细胞培养箱:Thermo公司。

1.3 细胞培养

人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y):中国科学院上海细胞库。SH-SY5Y细胞于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液,37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.4 AD细胞模型的建立

配制 $A\beta_{25-35}$ 母液,浓度为500 μ mol/L,于37℃孵育7d以形成聚集形式,即为老化的 $A\beta_{25-35}$ 。用DMEM/F12全培养基将老化的 $A\beta_{25-35}$ 稀释至25 μ mol/L,加入至细胞中培养24 h,即获得AD细胞模型。

1.5 实验分组

对照组:DMEM/F12完全培养基正常培养;模型组:加入终浓度为25 μ mol/L老化的 $A\beta_{25-35}$ 培养SH-SY5Y细胞24 h;药物干预组:利用不同浓度的人参水溶性总蛋白(6.25、12.5、25 μ g/mL)预保护SH-SY5Y细胞12 h,随后加入25 μ mol/L的 $A\beta_{25-35}$ 共同孵育24 h。

1.6 CCK-8 法检测细胞活力

SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔培养板,按照实验分组干预处理后每孔加入 CCK-8 溶液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 继续孵育 1 h,终止培养,设置空白孔调零,酶标仪上震荡 3 min 后在 450 nm 波长处检测各孔 OD 值,记录并计算细胞存活率。

1.7 细胞凋亡检测

SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔培养板,按照实验 2 分组干预处理后收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 3 次,1 200 r/min 离心 5 min,加入 200 μ L 1 $\times$ Binding buffer 悬浮细胞,之后加入 5 μ L Annexin V-EGFP 混匀后,加入 5 μ L Propidium Iodide 混匀,室温避光反应 15 min,用流式细胞仪检测,激发波长 $E_x=488$ nm,发射波长 $E_m=530$ nm。Annexin V-EGFP 的绿色荧光通过 FITC 通道检测,PI 红色荧光通过 PI 通道检测。荧光补偿调节使用未经凋亡诱导处理的正常细胞作为对照进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置。

1.8 胞内 ROS 水平检测

用无血清 DMEM/F12 培养基稀释 DCFH-DA,终浓度为 10 μ mol/L。细胞培养结束后,弃掉培养液,每孔加入 100 μ L 稀释好的 DCFH-DA,在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱内孵育 20 min。用无血清 DMEM/F12 培养液轻轻洗涤细胞 3 次,去除未进入细胞内的 DCFH-DA,注意不要将细胞吸出。使用流式细胞仪检测。使用激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,检测药物作用前后荧光的强弱。

1.9 SOD 活力和 MDA 含量检测

将各组细胞匀浆后置于冰上裂解,离心收集上清,使用 SOD 活力检测试剂盒进行 SOD 活力检测,MDA 含量检测试剂盒测定 MDA 含量。

1.10 ATP 含量检测

SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔培养板,按照实验分组干预处理后严格按 ATP 含量测试盒说明书进行操作,利用紫外分光光度计检测各孔吸光度值,记录并计算 ATP 含量。

1.11 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 分析

SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔培养板,按照实验分组干预处理后收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入罗丹明 123 使其终浓度为 2 μ mol/L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 PBS 洗涤细胞 3 次,最后加入 200 μ L PBS 重悬细胞,使用流式细胞仪检测,激发波长 507 nm,最大发射波长 529 nm,

检测药物作用前后荧光强弱。

1.12 蛋白提取和 Western blot

SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔培养板,按照实验分组处理后收集细胞,PBS 洗涤 3 次,加入细胞裂解液裂解细胞,使用 BCA 试剂盒测定蛋白含量,制样。SDS-PAGE 凝胶配制,上样,70 V 30 min,140 V 50 min 电泳后使用 NC 膜 18 V 350 mA 半湿法转膜 20 min,5 % PBS 奶粉封闭 30 min,PBST 洗涤膜片 3 次,每次 5 min,切膜,4 $^{\circ}$ C 一抗孵育过夜(β -Tubulin 按 1:1 000 稀释,COX IV 及 cyt-c 按 1:500 稀释),收集一抗,用 1 % PBS 奶粉稀释二抗,二抗孵育 1 h,显色处理,避光。

1.13 统计学分析

除特殊说明外,所有研究均进行 3 次生物学重复,数据以 means $\pm$ SD 形式展示。统计学分析应用 Graph-Pad Prism6 软件完成,组间差异分析应用 One-way ANOVA 分析方法完成。

2 结果与分析

2.1 人参水溶性总蛋白对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞的保护作用

GTP 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力和凋亡的影响见图 1。

为了明确 GTP 对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞的影响,首先采用 CCK-8 法检测 GTP 作用前后细胞活力的改变,如图 1A 所示,不同浓度的 GTP 可以减缓 $A\beta$ 诱导所致细胞活力降低,并呈现浓度依赖性。由图 1B 和图 1C 可知,流式细胞术 Annexin V/PI 双染色定量检测细胞凋亡程度,结果显示 GTP 预处理可显著降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡数量,且呈剂量依赖性。

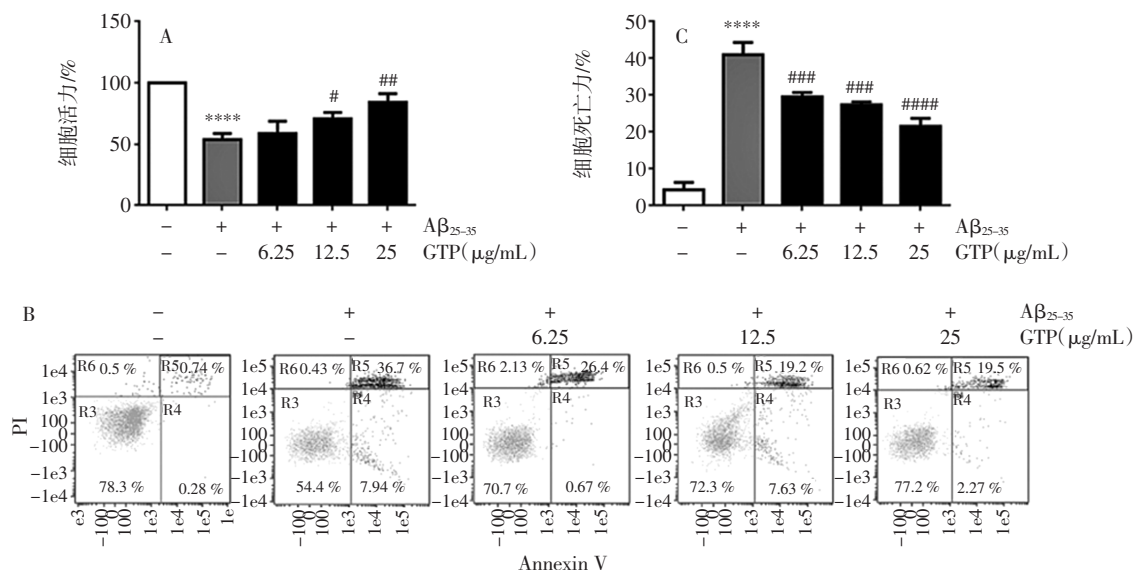
2.2 GTP 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化应激压力的影响

GTP 降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激压力见图 2。

应用 DCFH-DA 荧光探针检测 $A\beta_{25-35}$ 损伤后细胞内 ROS 生成量。结果可见, $A\beta_{25-35}$ 处理可显著增加 SH-SY5Y 胞内 ROS 生成量,给予不同浓度 GTP 预处理,可降低胞内 ROS 水平(图 2A)。同时 GTP 预处理可降低胞内 MDA 含量,增加 SOD 活力(图 2B 和图 2C)。

2.3 GTP 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞线粒体功能紊乱的挽救

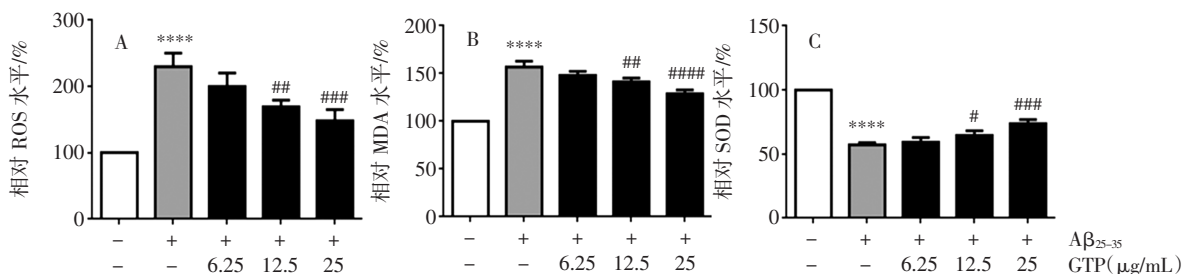
GTP 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞线粒体功能紊乱的挽救见图 3。



与对照组比较: **** $P < 0.0001$, 差异极显著; 与模型组比较, # $P < 0.05$, 有差异; ## $P < 0.01$, 差异显著; ### $P < 0.001$, 差异非常显著; #### $P < 0.0001$, 差异极显著。

图1 GTP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的SH-SY5Y细胞活力和凋亡的影响

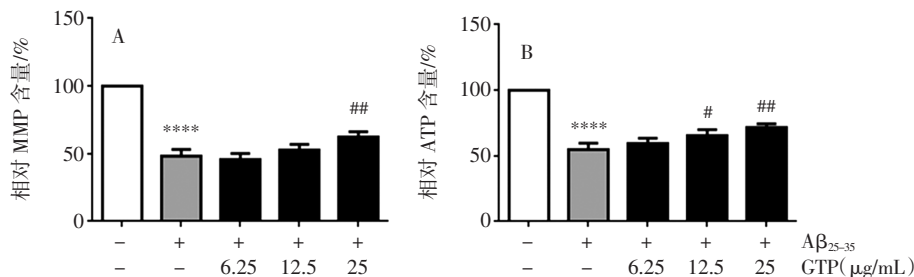
Fig.1 Effect of GTP on $A\beta_{25-35}$ induced SH-SY5Y cell viability and apoptosis



与对照组比较: **** $P < 0.0001$, 差异极显著; 与模型组比较, # $P < 0.05$, 有差异; ## $P < 0.01$, 差异显著; ### $P < 0.001$, 差异非常显著; #### $P < 0.0001$, 差异极显著。

图2 GTP降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的SH-SY5Y细胞氧化应激压力

Fig.2 GTP reduces the oxidative stress induced by $A\beta_{25-35}$ in SH-SY5Y cells



与对照组比较: **** $P < 0.0001$, 差异极显著; 与模型组比较, # $P < 0.05$, 有差异; ## $P < 0.01$, 差异显著。

图3 GTP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导SH-SY5Y细胞线粒体功能紊乱的挽救

Fig.3 GTP rescue of mitochondrial dysfunction induced by $A\beta_{25-35}$ in SH-SY5Y cells

线粒体在细胞凋亡过程中发挥了重要的调控作用,线粒体膜电位和ATP产生量是衡量线粒体功能的关键指标。结果可见 $A\beta_{25-35}$ 处理可导致细胞MMP显著降低,而不同浓度GTP预处理可阻止 $A\beta_{25-35}$ 导致的MMP降低(图3A)。与此同时,GTP预处理可在一定程度上挽救 $A\beta_{25-35}$ 导致的胞内ATP含量降低(图3B)。以

上结果共同证明了GTP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导SH-SY5Y细胞线粒体功能紊乱的挽救作用。

2.4 GTP对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的SH-SY5Y细胞Bcl-2和Bax表达及细胞色素C释放的影响

GTP对线粒体相关凋亡信号途径关键蛋白表达的影响见图4。

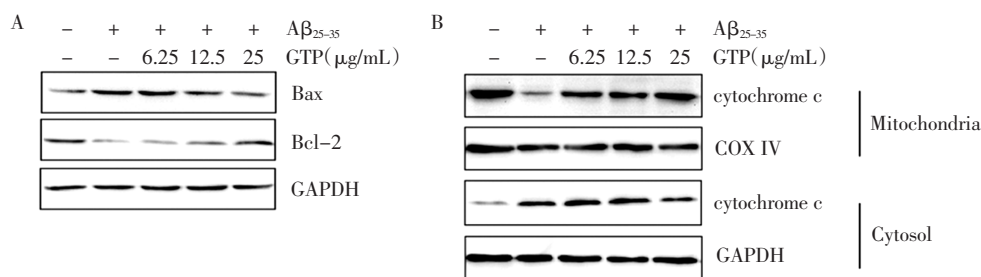


图4 GTP对线粒体相关凋亡信号途径关键蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of GTP on the expression of key proteins in mitochondria-associated apoptotic signaling pathway

与对照组相比, A β_{25-35} 建模细胞 Bcl-2 表达水平显著降低, 同时 Bax 表达上调, 与流式细胞技术定量检测结果相一致。给予不同浓度的 GTP 处理后, Bcl-2 表达水平随着 GTP 浓度的增加逐渐升高, 同时 Bax 表达水平逐渐降低, 证明了 GTP 可通过上调 Bcl-2 表达、抑制 Bax 表达, 从而对 A β_{25-35} 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡起到保护作用 (图 4A)。细胞色素 C 从线粒体释放入细胞质中, 从而诱发细胞凋亡。结果可见, 给予 A β_{25-35} 刺激后, SH-SY5Y 细胞质中 cyto C 含量增加; 不同浓度 GTP 预处理可降低胞质中 cyto C 含量, 证明 GTP 可抑制 cyto C 从线粒体向胞质中的释放 (图 4B)。

3 结论与讨论

A β 是 AD 发病机制的核心参与者, 其中 A β_{25-35} 是由 11 个氨基酸组成的较短毒性片段, 包含完整蛋白质的 β 片层^[11]。使用 A β_{25-35} 处理 SH-SY5Y 细胞, 细胞活力显著降低, 凋亡程度严重增加, 首先证明了 A β_{25-35} 对细胞的毒性作用。用 GTP 预处理则可逆转这些毒性效应, 证明 GTP 对 A β_{25-35} 诱导的细胞毒性具有神经保护作用, 对 AD 可能具有潜在治疗价值。

进一步对 GTP 的神经保护作用机制进行探讨。A β 积聚导致神经元过度凋亡, 与 AD 脑内神经元丢失密切相关^[12]。研究表明, A β_{25-35} 可通过诱发细胞产生过量的 ROS, 增加氧化应激, 进而导致线粒体功能障碍^[13-14]; 同时可促进线粒体释放凋亡相关因子, 诱发线粒体相关凋亡途径, 引起细胞凋亡^[15]。研究结果表明, GTP 可通过抑制 ROS 的产生发挥神经保护作用, 且 GTP 预处理可以降低 A β_{25-35} 诱导的线粒体超氧化物升高, 减少 A β_{25-35} 暴露后的氧化应激压力。为了进一步明确 GTP 对线粒体功能的维系作用, 研究考察 GTP 对 MMP 和 ATP 水平的影响作用, 可见 GTP 能够显著抑制 A β_{25-35} 损伤导致的 MMP 降低, 同时抑制 ATP 水平的下降。这些研究结果证明 GTP 可有效改善 A β_{25-35} 损伤引起的线粒体功能紊乱。Cyto C 是线粒体电子传

递链的重要组成^[16]。正常情况下, 其位于线粒体的膜间隙, 在凋亡过程中则从线粒体外膜释放入细胞质中, cyto C 向胞质的释放是引发凋亡的关键步骤^[17]。MMP 降低和 ROS 水平的升高均可通过不同作用途径诱导 cyto C 向胞质的释放^[18]。除此之外, 其向胞质的释放还依赖于线粒体外膜特异性通道的调控, 该通道主要由 Bcl-2 家族成员形成。其中, Bcl-2 (抗凋亡蛋白) 和 Bax (促凋亡蛋白) 是 Bcl-2 家族的核心成员^[19]。Bcl-2 的上调可以稳定线粒体外膜, 阻断 cyto C 自线粒体释放入胞质, 从而抑制细胞凋亡; 而 Bax 的上调则可以促进 cyto C 向胞质的释放, 诱发凋亡^[20]。研究结果显示, 不同浓度的 GTP 预处理不仅可以挽救 A β_{25-35} 诱导导致的 MMP 降低和 ROS 水平升高, 同时可以上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达、抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达, 抑制 cyto C 从线粒体向胞质中的释放, 降低胞质中 cyto C 含量, 降低细胞凋亡, 最终对 A β_{25-35} 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡起到保护作用。

综上, 本研究证明了 GTP 对 A β_{25-35} 诱导 SH-SY5Y 细胞的保护作用效应, 并从线粒体功能维系及线粒体相关凋亡信号途径阐明了作用机制, 为抗 AD 有效药物的研发提供了理论依据。

参考文献:

- [1] H Shah, E Albanese, C Duggan, et al. Research priorities to reduce the global burden of dementia by 2025[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(12): 1285-1294
- [2] S Forner, D Baglietto-Vargas, AC Martini, et al. Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony[J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(6): 347-357
- [3] Leuner K1MW, Reichert AS. From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 46: 186-193
- [4] Rubio-Moscardo FS-SN, Pera M, Bosch-Morató M, et al. Rare variants in calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) found in early onset Alzheimer's disease patients alter calcium homeostasis [J].

- PLoS One, 2013, 8(9): e74203
- [5] Kosenko EAAG, Tikhonova LA, Li Y, et al. Antioxidant status and energy state of erythrocytes in Alzheimer dementia: probing for markers[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11: 926-932
- [6] C Tohda, N Matsumoto, K Zou, et al. A β ₂₅₋₃₅-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by MI, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(5): 860-868
- [7] R J Choi, A Roy, H J Jung, et al. BACE1 molecular docking and anti-Alzheimer's disease activities of ginsenosides[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 190: 219-230
- [8] N Li, L Zhou, W Li, et al. Protective effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 on an Alzheimer's disease mouse model: a metabolomics study[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 985: 54-61
- [9] Y Wang, H. Kan, Y Yin, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on chronic restraint stress induced learning and memory impairments in male mice[J]. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 2014, 120: 73-81
- [10] J Liu, X Yan, L Li, et al. Ginsenoside Rd Improves Learning and Memory Ability in APP Transgenic Mice[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2015, 57(4): 522-528
- [11] Alabi AA, Bahamonde MI, Jung HJ, et al. Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors [J]. Nature, 2007, 450(7168): 370-375
- [12] Migliore L, Fontana I, Colonna R, et al. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases[J]. Neurobiology of Aging, 2005, 26: 587-595
- [13] Guo C, Sun L, Chen X, et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases[J]. Neural Regen Res, 2013, 8: 2003-2014
- [14] Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. Neurol Res, 2017, 39(1): 73-82
- [15] Gibson GE, Starkov A, Blass JP, et al. Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802: 122-134
- [16] Welchen E, Gonzalez DH. Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments[J]. Physiologia Plantarum, 2016, 157(3): 310-321
- [17] Liu X, Kim CN, Yang J. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome C[J]. Cell, 1996, 86(1): 147-57
- [18] Welchen E, Gonzalez DH. Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments[J]. Physiol Plant, 2016, 157(3): 310-321
- [19] Ow YP, Green DR, Hao Z, et al. Cytochrome c: functions beyond respiration[J]. Nature reviews molecular cell biology, 2008, 9(7): 532-542
- [20] 寇玉辉, 张英俊, 谢洪明, 等. Bcl-2 蛋白及其相关药物的研究进展[J]. 系统医学, 2018, 3(13): 193-195

收稿日期: 2018-11-10

人民有信仰，
民族有希望，
国家有力量。