

[文章编号] 1000-4718(2019)11-2020-08

乙酰左旋肉碱减轻 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤*

沈娟^{1,2}, 高枫¹, 郝琴¹, 赵琳^{1,2}, 杨彦玲^{1,2Δ}
(¹延安大学医学院, ²延安市神经科学重点实验室, 陕西 延安 716000)

[摘要] 目的: 探索乙酰左旋肉碱(ALC)对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的作用及其可能的机制。方法: 采用 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞造成中度氧化损伤细胞模型, 将不同浓度(100、200 和 400 μmol/L)的 ALC 作用于体外培养的 PC12 细胞, CCK8 法检测细胞的活力。实验分为: 正常对照(control)组, 模型(H₂O₂)组, 低、中、高浓度 ALC 药物预处理(ALC + H₂O₂)组, 共 5 组。流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测 Nrf2 和 cleaved caspase-3 的蛋白水平; 免疫荧光染色法检测 Nrf2 的核转位情况。结果: 不同浓度(100、200 和 400 μmol/L)的 ALC 可显著抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡, 以中浓度组效果最佳。与模型组相比, 低、中、高浓度 ALC 组均可显著提高 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞活力, 抑制细胞凋亡($P < 0.05$), 显著下调 cleaved caspase-3 的蛋白水平($P < 0.05$), 上调 Nrf2 的表达水平($P < 0.05$), 促进胞浆的 Nrf2 向核内转移。结论: 乙酰左旋肉碱对 H₂O₂ 诱导氧化损伤的 PC12 细胞具有保护作用, 抑制细胞凋亡从而提高其活力, 其机制可能与激活 Nrf2 信号通路有关。

[关键词] 乙酰左旋肉碱; 氧化应激; 细胞凋亡; Nrf2 信号通路; PC12 细胞

[中图分类号] R363.2; R329.2+5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.11.015

Acetyl-L-carnitine attenuates H₂O₂-induced oxidative damage of PC12 cells

SHEN Juan^{1,2}, GAO Feng¹, HAO Qin¹, ZHAO lin^{1,2}, YANG Yan-ling^{1,2}

(¹Medical College of Yan'an University, ²Key Laboratory of Neuroscience in Yan'an City, Yan'an 716000, China. E-mail: yangyanling8889@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of acetyl-L-carnitine (ALC) on H₂O₂-induced oxidative damage in PC12 cells and its possible mechanism. **METHODS:** A moderate oxidative damage PC12 cell model was induced by exposure of the PC12 cells to H₂O₂. ALC at different concentrations (100, 200 and 400 μmol/L) was applied to the PC12 cells cultured *in vitro*, and CCK8 assay was used to detect the cell viability. The cells were divided into control group, H₂O₂ group, and low-ALC, medium-ALC and high-ALC groups. The apoptosis of the cells was analyzed by flow cytometry. The protein levels of Nrf2 and cleaved caspase-3 were determined by Western blot. The nuclear translocation of Nrf2 was observed by immunofluorescence staining. **RESULTS:** ALC at different concentrations (100, 200 and 400 μmol/L) significantly inhibited H₂O₂-induced PC12 cell apoptosis, and the medium concentration group had the best effect. Compared with H₂O₂ group, low, medium and high concentrations of ALC significantly increased the viability of the PC12 cells induced by H₂O₂, inhibit cell apoptosis ($P < 0.05$), significantly down-regulated the protein level of cleaved caspase-3 ($P < 0.05$), up-regulated the protein level of Nrf2 ($P < 0.05$), and promoted the translocation of Nrf2 from the cytoplasm to the nucleus. **CONCLUSION:** Acetyl-L-carnitine attenuates H₂O₂-induced oxidative damage of PC12 cells, inhibits the apoptosis and increases the viability, which is related to the activation of Nrf2 signaling pathway.

[KEY WORDS] Acetyl-L-carnitine; Oxidative stress; Apoptosis; Nrf2 signaling pathway; PC12 cells

氧化应激是指在体内有害因素刺激下, 体内成核酸、蛋白质和脂质等生物分子的损伤^[1]。近年来, 氧化应激已经成为导致脑血管疾病、创伤性疾

[收稿日期] 2019-01-02 [修回日期] 2019-06-18

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81760235); 陕西省教育厅自然科学基金资助项目(No. 17JK0863)

Δ通讯作者 Tel: 13891184889; E-mail: yangyanling8889@163.com

病、阿尔茨海默症和帕金森氏症等神经系统退行性疾病发生和发展中的重要病理因素^[2-4]。PC12 细胞株来自大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,但因其可分化为具有交感神经元特性的细胞,常用于神经系统疾病的相关研究^[5-6];乙酰左旋肉碱(acetyl-L-carnitine, ALC)为左旋肉碱的酯化物,是一种强抗氧化剂,具有抗氧化、抗凋亡和抗炎等广泛的药理作用而备受学者们关注^[7-8],且极易通过血脑屏障到达中枢神经^[9],具有明显的神经保护作用^[10],且 ALC 在提高男性生育能力方面的应用已得到公认。

本研究通过 H₂O₂ 建立 PC12 细胞氧化损伤模型,采用 ALC 预处理 PC12 细胞,观察其对氧化损伤模型细胞活力及凋亡的影响,探讨 ALC 对 PC12 细胞氧化损伤的作用。同时,通过检测 cleaved caspase-3 和核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 的蛋白水平以及对 Nrf2 核转位的影响,探讨该药物对 PC12 细胞氧化损伤的可能机制,为临床应用 ALC 治疗神经系统退行性疾病提供理论和实验依据。

材 料 和 方 法

1 实验材料

大鼠嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞株购自中科院上海细胞库。乙酰左旋肉碱和 0.25% 胰酶购自 Sigma;30% 的 H₂O₂ 购自天津化学试剂有限公司;RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco;CCK8 购自索莱宝公司;细胞裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒和细胞核蛋白/胞浆蛋白提取试剂盒购自上海生工;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自 Thermo;抗 Nrf2、cleaved caspase-3、GAPDH 和 Lamin B1 抗体购自 CST。酶标仪购自 TECAN;凝胶成像系统购自 Bio-Rad。

2 方法

2.1 细胞的培养 PC12 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁生长铺满整个瓶底时,加入 0.25% 胰酶消化、传代,继续培养,传代严格控制在 3~4 代以内,取生长状态良好的对数期细胞用于后续实验。

2.2 CCK8 法检测不同浓度 H₂O₂ 作用下的细胞活力 收集对数期的 PC12 细胞,将 1 × 10⁹/L 的细胞悬液种于 96 孔板上,待细胞生长至对数期,加入不同浓度(50、100、200、300、400 和 500 μmol/L)的

H₂O₂ 分别作用细胞 2 h、4 h 和 6 h,每组设置 3 个孔,以未加 H₂O₂ 的孔作为对照,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中作用不同时间(2 h、4 h 和 6 h);用 1 × PBS 清洗 2 遍,加入 100 μL RPMI-1640 完全培养基和 10 μL CCK8 检测液,37 °C 孵育 4 h,酶标仪检测每孔在波长 450 nm 处的吸光度,最后进行分析计算。以半数抑制浓度^[11](细胞活力下降 50% 左右)作为模型制备的最佳损伤条件^[12],造成细胞中度氧化损伤模型^[13]。

2.3 ALC 对细胞活力的影响 收集对数生长期的 PC12 细胞,将 1 × 10⁹/L 的细胞悬液种于 96 孔板上,待细胞生长至对数期,加入不同浓度(50、100、200、300、400 和 500 μmol/L)的 ALC 培养 24 h,用 CCK8 法检测细胞活力,方法同 2.2。筛选出 ALC 药物的安全浓度。根据上述结果,选择 3 个不同浓度作为 ALC 低、中、高浓度组进行后续实验。

2.4 ALC 对 H₂O₂ 刺激的细胞活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平的影响 取对数生长期的 PC12 细胞,药物组加入 ALC 预处理 24 h 后,吸弃原液,药物组和模型组中均加入 H₂O₂ 作用 2 h,用无血清培养基冲洗细胞 1 次,加入荧光探针 DCFH-DA 10 μmol/L,37 °C 孵育 1 h。流式细胞仪上机检测细胞荧光,重复 3 次。

2.5 ALC 对 H₂O₂ 刺激的细胞凋亡的影响 根据 CCK8 结果选取 ALC 浓度为 100、200 和 400 μmol/L 分别作为低、中、高浓度组。取对数生长期的 PC12 细胞,药物组加入不同浓度 ALC 预处理 24 h 后,和模型组中均加入 H₂O₂,作用同样时间,正常对照组不加 H₂O₂,弃掉培养液,加入 10 μL annexin V-FITC 和 5 μL PI,4 °C 染色 30 min,流式细胞术分析细胞的凋亡率。

2.6 ALC 对细胞凋亡蛋白以及 Nrf2 信号通路蛋白水平的影响 按照前面的培养条件,药物预处理后再加入 H₂O₂ 作用一定时间,收集各组细胞,洗涤、离心后,加入含 PMSF 的细胞裂解液,冰上裂解 30 min,离心吸取上清液为提取的总蛋白,细胞核蛋白/胞浆蛋白提取按照试剂盒说明书进行,BCA 法检测蛋白浓度后稀释至一定浓度,-20 °C 保存。洗净、晾干玻璃板,灌入 15% 的分离胶至预定高度,并加入双蒸水液封,室温下静置 1 h。配制 5% 浓缩胶,弃去双蒸水,加入浓缩胶,插入梳子,室温静置 30 min。将配置好的凝胶板置于电泳槽中,加入电泳液;将蛋白样品与 6 × 样品缓冲液混合,100 °C 煮沸 5 min,每孔加

入 15 μL 样品,进行电泳;浓缩胶电压调至 80 V,分离胶电压为 120 V,电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。采用转膜电流 300 mA,电流转膜 60~90 min,将凝胶中的蛋白转移至 PDVF 膜。加入 5% 脱脂奶粉封闭 2 h;加入 I 抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;加入 II 抗稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;曝光、显影、显色,凝胶成像系统测定其灰度值,分析目的蛋白与内参照 GAPDH 的灰度值比值,实验重复 3 次,取平均值。

2.7 免疫荧光染色观察 ALC 对 Nrf2 核转位的影响

细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中,待细胞长到汇合度为 80% 时,胰酶进行消化,血清终止消化后,培养基调整细胞密度为每孔 1×10^4 个细胞,接种于 24 孔板中(含细胞培养爬片),每孔加入 1 mL 培养基。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。ALC 预处理 24 h 后,再加入 H_2O_2 氧化应激造模 2 h,弃掉培养上清;小心取出细胞爬片置于载玻片上,1 \times PBS 轻柔清洗 2 次,用 4% 多聚甲醛 500 μL (以盖住爬片为宜),室温下固定 45 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入 0.3% Triton X-100 的 10% normal goat serum-PBS 溶液 500 μL 室温下封闭 1 h;封闭液按 1:200 稀释 Nrf2 抗体;滴加到细胞爬片上,阴性对照组用 PBS 代替 I 抗,湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,室温复温 45 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加对应 II 抗,室温避光孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加少量 DAPI 染色液,室温放置 5 min,吸去染液,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加抗荧光猝灭封片,注意避免产生气泡。荧光显微镜下观察,随机取 3 个视野,分析蛋白表达情况及核转移水平。

3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理。数据均采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,多组数据间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内多个样本均数之间两两比较用 Tukey 法(Tukey multiple comparison test),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度 H_2O_2 对 PC12 细胞活力的影响

CCK8 实验结果显示,与对照组相比,50~500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用不同时间(2 h、4 h 和 6 h)均显著降低 PC12 细胞活力($P < 0.01$),见图 1。以半数抑制浓度为选取标准,200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 刺激 2 h

和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 刺激 4 h 符合条件。后续实验中我们选取 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 2 h 为建立氧化损伤模型的条件。

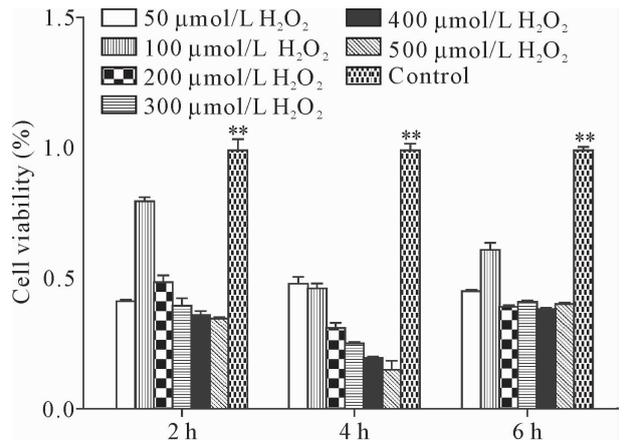


Figure 1. The effect of H_2O_2 at different concentrations on the viability of PC12 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs each H_2O_2 group with different time.

图 1 不同浓度 H_2O_2 对 PC12 细胞活力的影响

2 ALC 对 H_2O_2 刺激的 PC12 细胞活力的影响

同样,CCK8 法检测细胞活力的结果显示,ALC 的处理浓度在 100~500 $\mu\text{mol/L}$ 时不会显著降低细胞活力,而 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度预处理 24 h 时,则显著引起细胞活力降低($P < 0.05$),见图 2A。这说明 ALC 的安全浓度为 100~500 $\mu\text{mol/L}$,因此我们取 100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作为低、中、高浓度组进行后续实验。同样,CCK8 检测结果显示,ALC(100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$) 药物预处理均能明显提高 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞活力($P < 0.01$),见图 2B。

3 ALC 对 H_2O_2 刺激的 PC12 细胞形态的影响

在倒置显微镜下,对照组细胞大小均一,细胞形态呈多边形,细胞饱满,轮廓清晰,边缘有小突起,折光性强,细胞贴壁紧密。模型组中正常细胞数量明显减少,细胞大小不一,并且呈梭形、类圆形,细胞肿胀,细胞边缘毛糙,细胞皱缩,贴壁松弛,折光率较差,部分细胞因坏死或凋亡而脱壁。但在 ALC 预处理组中,低浓度组较模型组,细胞形态明显改善,部分细胞出现多边形,折光率增加;在中、高浓度 ALC 组,正常细胞数量增多,尤其在中浓度 200 $\mu\text{mol/L}$ 组中,正常细胞数量明显增加,细胞形态和折光率与对照组无明显差异,细胞饱满,大多数细胞仍保持多边形小突起形态,见图 3A。对各组受损细胞进行计算分析,与 H_2O_2 组相比,ALC 药物预处理后,受损细胞数目明显减少($P < 0.01$),说明 ALC 能够减少 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损害,见图 3B。

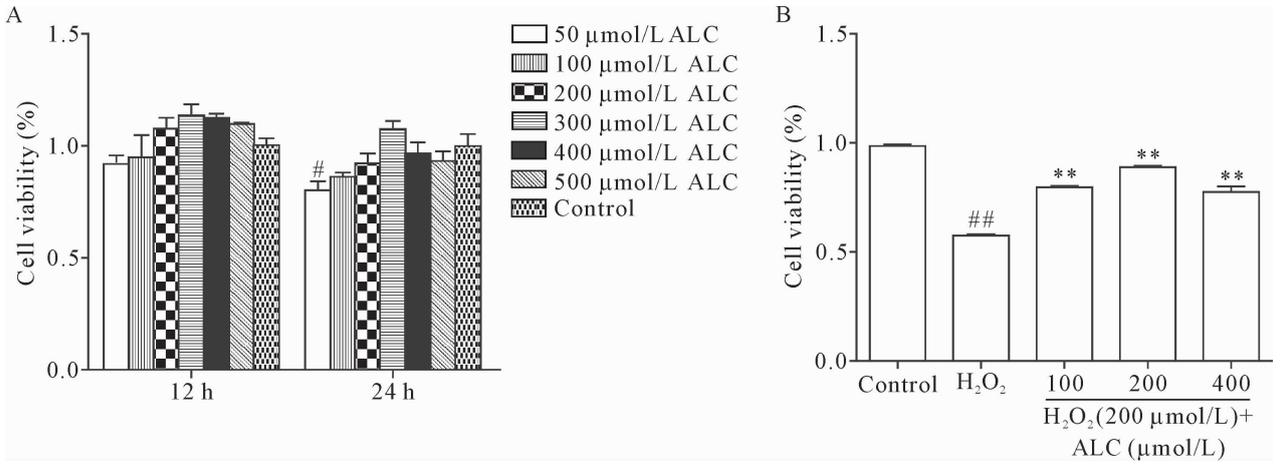


Figure 2. The effect of ALC on the viability of PC12 cells. A; PC12 cells were treated with different concentrations of ALC for 12 h and 24 h; B; PC12 cells were pre-incubated with different concentrations of ALC for 24 h and then cotreated with H₂O₂. Mean \pm SD. $n = 3$. [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs H₂O₂ group.

图2 ALC对H₂O₂介导的PC12细胞活力的影响

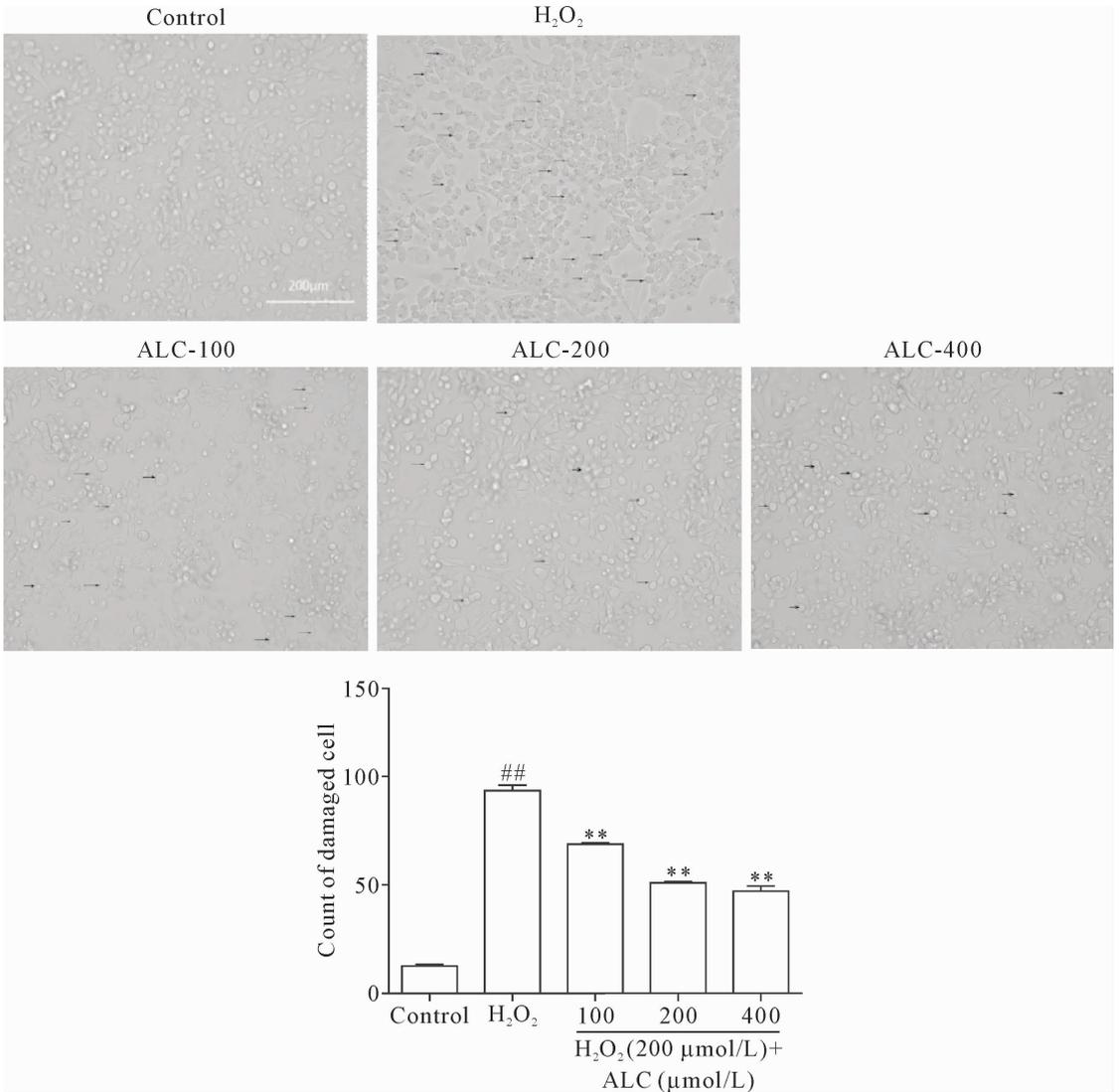


Figure 3. Microscopic observation of cell morphology ($\times 200$) and the count of damaged cells in different groups. Mean \pm SD. $n = 5$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs H₂O₂ group.

图3 显微镜观察细胞形态和各组受损细胞数量的比较

4 ALC 对细胞内活性氧生成的影响

流式细胞术分析结果显示,经过不同浓度的 ALC 预处理后,细胞内 ROS 的水平逐渐降低,与模

型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明 ALC 能够清除 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞内异常增多的 ROS,见图 4。

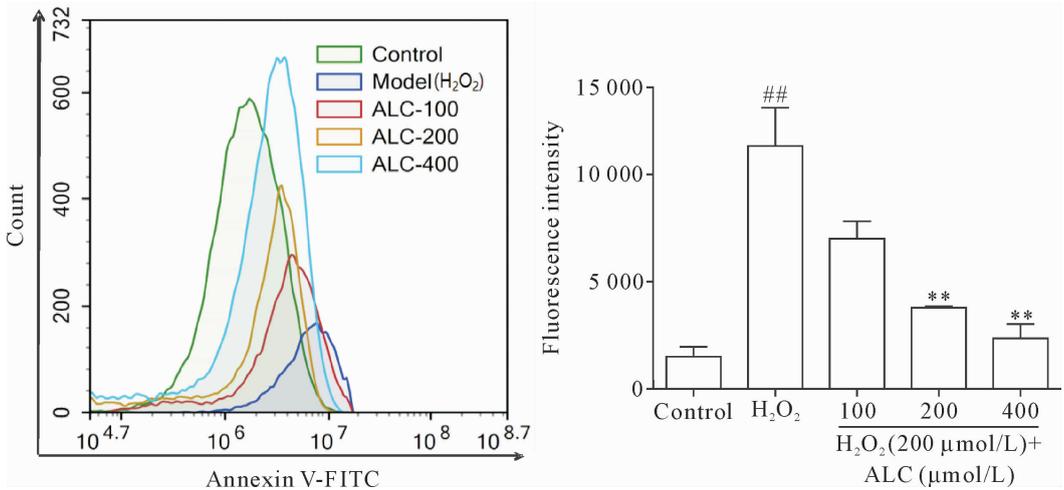


Figure 4. The effect of ALC on H_2O_2 -mediated ROS levels in the PC12 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs H_2O_2 group.

图 4 ALC 对 H_2O_2 介导的 PC12 细胞 ROS 水平的影响

5 ALC 对细胞凋亡的影响

流式细胞术分析结果显示,与模型组相比,不同

浓度的 ALC 均可减轻 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡 ($P < 0.01$),见图 5。

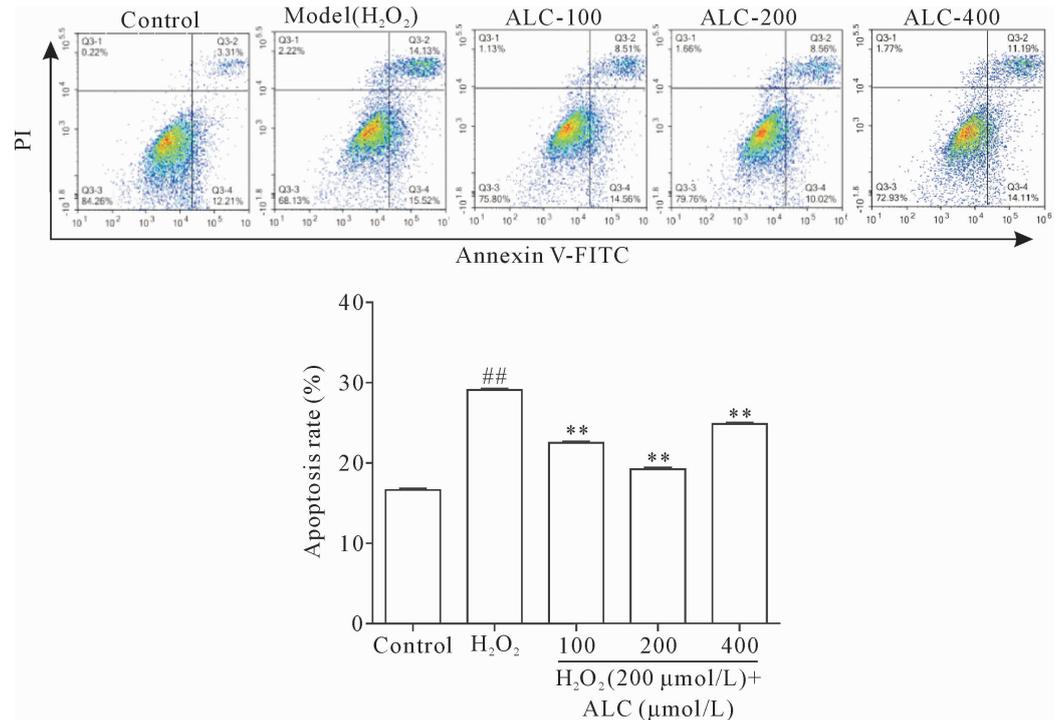


Figure 5. The effect of ALC on the apoptosis of PC12 cells stimulated with H_2O_2 . Mean \pm SD. $n = 3$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs H_2O_2 group.

图 5 ALC 对 H_2O_2 介导的 PC12 细胞凋亡的影响

6 ALC 对抗氧化蛋白与凋亡相关蛋白水平的影响

Western blot 条带灰度分析结果显示,ALC 均可显著调节 Nrf2 和 cleaved caspase-3 的表达量。与模型组比较,ALC(100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$)预处理细胞

浆内 Nrf2 表达呈下降趋势 ($P < 0.01$),核内 Nrf2 表达呈上升趋势 ($P < 0.01$);与模型组比较,ALC(100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$)预处理组总 cleaved caspase-3 的蛋白水平下降 ($P < 0.01$),见图 6。

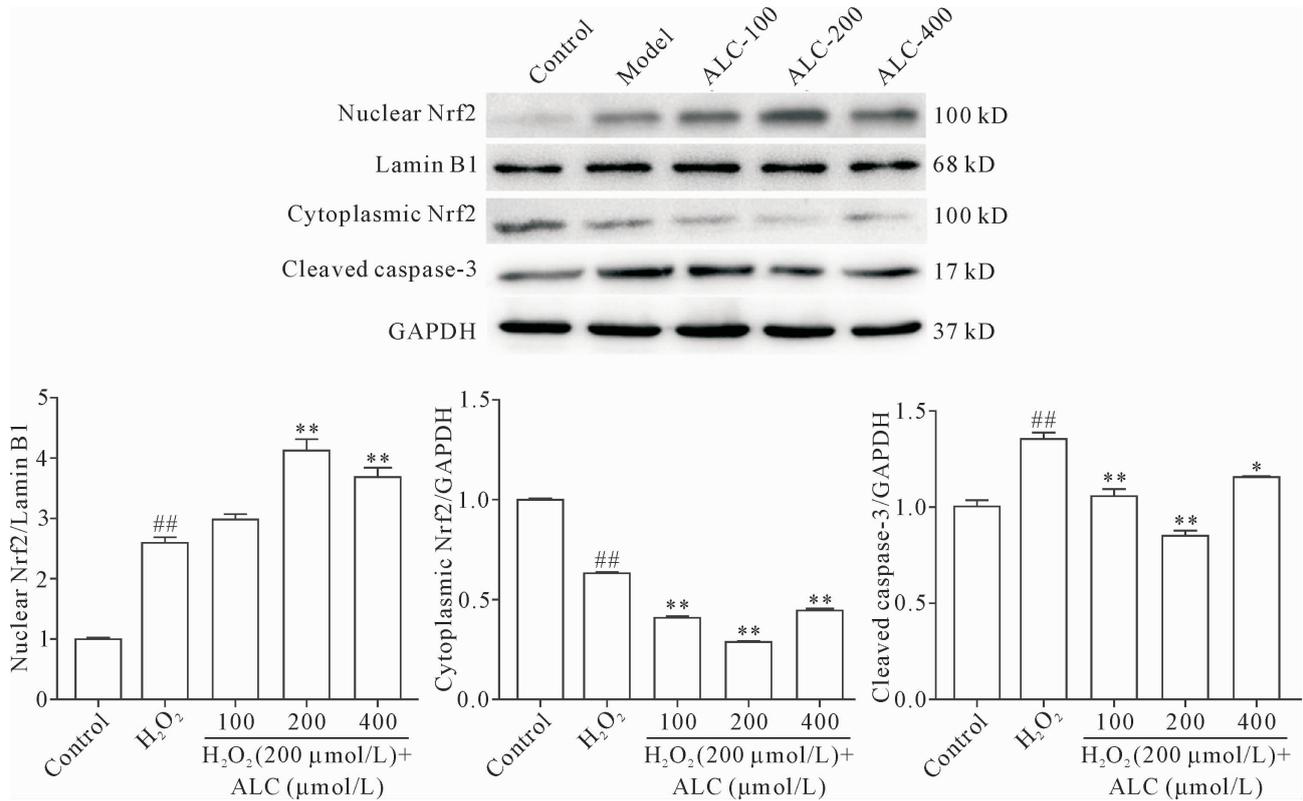


Figure 6. Western blot analysis was used to determine the effect of ALC on the protein levels of Nrf2 and cleaved caspase-3. Mean \pm SD. $n = 3$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs H₂O₂ group.

图6 Western blot 法检测 ALC 对 Nrf2 和 cleaved caspase-3 蛋白水平的影响

7 ALC 对 Nrf2 核转位的影响

免疫荧光染色观察结果显示,正常组 Nrf2 主要在胞浆内表达,模型组与 ALC 药物处理组胞浆和胞核内均有表达,且 ALC 组胞核内表达阳性细胞数增多,见图 7A。核内 Nrf2 表达阳性细胞计数分析结果显示,与模型组比较,ALC 组核内 Nrf2 阳性细胞明显增多,其中 200 μmo/L 组的差异最为显著($P < 0.01$),见图 7B。

讨 论

近年来认识到氧化应激涉及循环、疾病、呼吸、消化、泌尿及生殖等多个系统多种疾病的发生发展^[14]。因此,减缓或抑制氧化应激反应已成为疾病发生机理研究中需要解决的重要问题。本实验研究结果显示,ALC 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞具有显著抑制凋亡,提高细胞活力的作用。Western blot 实验结果提示,ALC 可明显下调激活型 caspase-3 (cleaved caspase-3) 蛋白的水平,而上调 Nrf2 蛋白的水平。因此,ALC 对氧化损伤的细胞模型具有一定的保护作用。

Nrf2 是近年来新发现的一种核转录因子。在生理状态下,Nrf2 主要存在于细胞质中,与肌动蛋白结合蛋白 Keap1 (Kelch-like ECH-associated pro-

tein 1) 结合,处于相对抑制状态。生理条件下 Keap1 经泛素连接酶 Gul 3,以泛素化底物结合蛋白的形式与 Nrf2 在胞浆结合,因此,Keap1 主导 Nrf2 泛素化降解,维持 Nrf2 于正常水平,从而抑制下游基因的表达。Nrf2-Keap1/ARE 通路是近年来研究最多的内源性抗氧化应激通路^[15],在抗氧化损害方面扮演着重要的角色^[16]。Keap1 是 Nrf2-Keap1/ARE 信号通路的主调节器,可根据细胞内的氧化还原状态打开或关闭 Nrf2-Keap1/ARE^[17]。在氧化应激、炎性损伤等病理状态下,Keap1 的构象通过丝裂原活化蛋白激酶、磷脂肌醇激酶和磷脂肌醇信号等途径发生变化,Nrf2 与 Keap1 发生解离并转移进细胞核内,与 Maf 结合形成异二聚体,识别 ARE 上的结合位点并与之结合,启动下游靶基因抗氧化蛋白和 II 相解毒酶基因等的转录,提高细胞抵抗外源性损伤的能力。研究表明,随着年龄增长脑中 Nrf2 表达下降,导致氧化应激反应失衡^[18]。因此,Nrf2 信号通路可能是治疗神经退行性疾病潜在的研究方向。在 AD 患者脑中 Nrf2 主要定位在海马神经元的细胞质中,细胞核 Nrf2 表达水平较正常对照组明显下降^[19]。在本实验中,免疫荧光染色结果显示,ALC 预处理组核内 Nrf2 表达阳性的细胞数明显多于模型组,也进一步验证了 Western blot 的结果。以

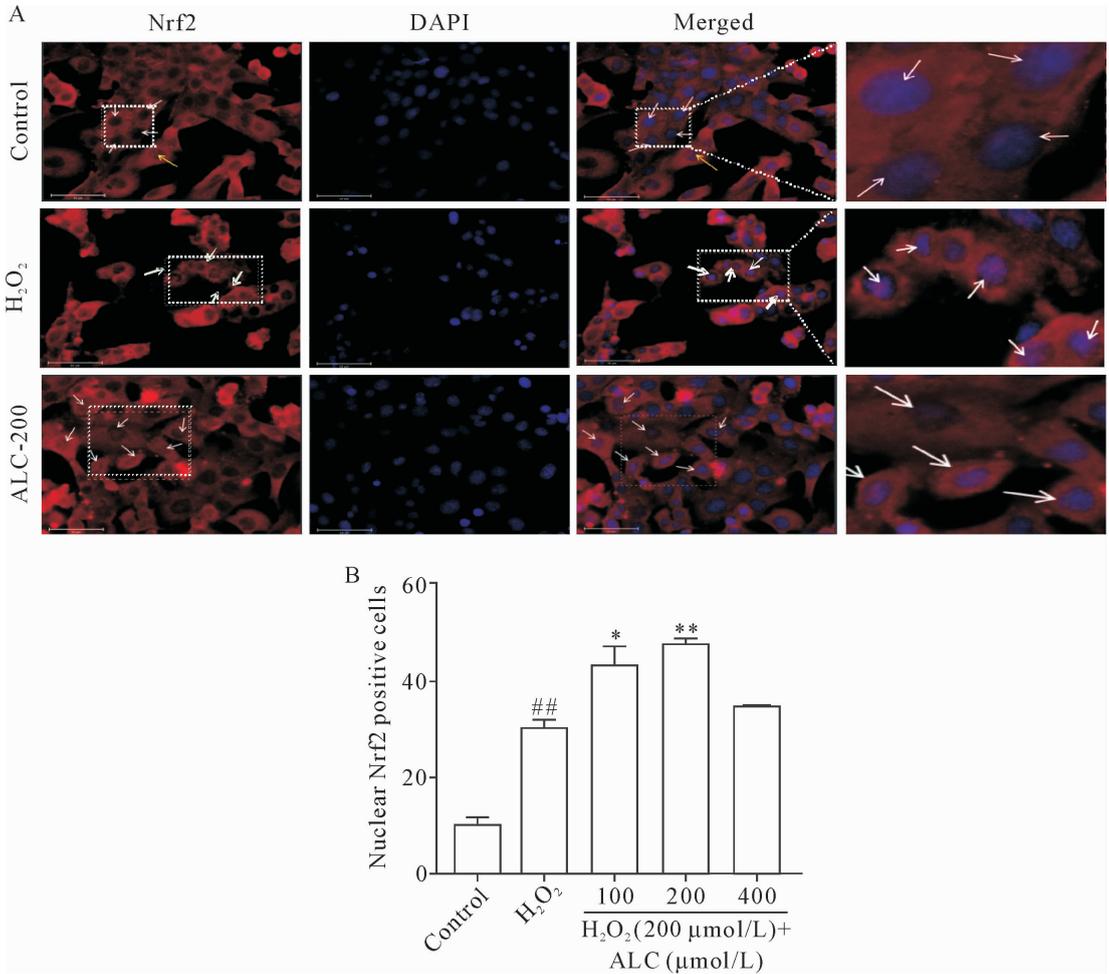


Figure 7. Immunofluorescence staining was used to observe the effect of ALC on Nrf2 nuclear translocation. A: the expression position of Nrf2 (the scale bar = 50 μm); B: the quantitative analysis of nucleus Nrf2 positive cells. Mean ± SD. n = 3. ^{##}P < 0.01 vs control group; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01 vs H₂O₂ group.

图7 免疫荧光染色观察 ALC 对 Nrf2 核转位的影响

上结果说明, ALC 能促进胞浆内 Nrf2 向胞核内转移。大量的实验研究发现, Nrf2 能对抗细胞的氧化应激反应^[20-22]。也有学者在体研究发现, 激活 Nrf2 通路对脊髓损伤具有神经保护作用^[23-24]。除此, 更多研究提示 Nrf2 与炎症^[25-26]、凋亡^[27-28] 和自噬^[29-30] 也存在复杂关系。因此, 如何有效地激活 Nrf2-keap1/ARE 通路已经越来越受到研究者的重视。本研究结果揭示, 乙酰左旋肉碱通过激活 Nrf2 通路抑制氧化应激引起的细胞凋亡, 提高细胞存活率。

【参 考 文 献】

[1] Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review [J]. Eur J Med Chem, 2015, 97:55-74.
 [2] Thornton C, Baburamani AA, Kichev A, et al. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in the development of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury [J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(5):1067-1076.

[3] Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ, Murillo-Cabezas F, et al. Oxidative stress in traumatic brain injury [J]. Curr Med Chem, 2014, 21(10):1201-1211.
 [4] Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, et al. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease [J]. Brain Res Bull, 2017, 133:88-96.
 [5] Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease [J]. J Parkinsons Dis, 2013, 3(4):461-491.
 [6] Kumaran A, Ho CC, Hwang LS. Protective effect of *Nelumbo nucifera* extracts on beta amyloid protein induced apoptosis in PC12 cells, *in vitro* model of Alzheimer's disease [J]. J Food Drug Anal, 2018, 26(1):172-181.
 [7] 张丹, 桑卫国. 红酵母红素对氧化应激细胞 PC12 细胞的保护机制 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(8):120-124.
 [8] 沈娟, 杨彦玲, 赵琳. 乙酰左旋肉碱对急性脊髓损伤的保护作用的研究进 [J]. 医学综述, 2017, 23(11):2225-2229.

- [9] Petruzzella V, Baggetto LG, Penin F, et al. *In vivo* effect of acetyl-L-carnitine on succinate oxidation, adenine nucleotide pool and lipid composition of synaptic and non-synaptic mitochondria from cerebral hemispheres of senescent rats[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 1992, 14(2):131-144.
- [10] Cuevas E, Trickler WJ, Guo X, et al. Acetyl-L-carnitine protects motor neurons and Rohon-Beard sensory neurons against ketamine-induced neurotoxicity in zebrafish embryos[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2013, 39: 69-76.
- [11] Yang X, Peng Q, Liu Q, et al. Antioxidant activity against H₂O₂-induced cytotoxicity of the ethanol extract and compounds from *Pyrola decorata* leaves[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1):1843-1848.
- [12] 郭冰洁, 苑广信, 张静, 等. 鹿骨胶水解物抗氧化活性及对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞保护作用的研究[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(7):193-196.
- [13] 孙月. 不同程度过氧化氢通过线粒体 ROS 调控 PC12 细胞存活与死亡的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016:15-25.
- [14] 杨玲, 许速. 氧化应激与疾病发生的相关性[J]. *西南国防医药*, 2012, 22(11):1268-1270.
- [15] Xia B, Liu H, Xie J, et al. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth via activating the Nrf2/ARE pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5):1426-1432.
- [16] Sakai O, Uchida T, Imai H, et al. Glutathione peroxidase 4 plays an important role in oxidative homeostasis and wound repair in corneal epithelial cells[J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(12):1238-1247.
- [17] Stepkowski TM, Kruszewski MK. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(9): 1186-1195.
- [18] Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(1):H18-H24.
- [19] Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66(1):75-85.
- [20] Xu W, Feng L, Xu Z, et al. Tert-butylhydroquinone protects PC12 cells against ferrous sulfate-induced oxidative and inflammatory injury via the Nrf2/ARE pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 273:28-36.
- [21] Gallorini M, Petzel C, Bolay C, et al. Activation of the Nrf2-regulated antioxidant cell response inhibits HEMA-induced oxidative stress and supports cell viability[J]. *Biomaterials*, 2015, 56:114-128.
- [22] Chiara G, Baniasadi PS, Harris IS, et al. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(8):1529-1544.
- [23] Wang X, de Rivero Vaccari JP, Wang H, et al. Activation of the nuclear factor E2-related factor2/antioxidant response element pathways neuroprotective after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(5):936-945.
- [24] Lv R, Mao N, Wu J, et al. Neuroprotective effect of allixin in a rat model of acute spinal cord injury[J]. *Life Sci*, 2015, 143:114-123.
- [25] Ahmed SM, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(2):585-597.
- [26] Suzuki T, Murakami S, Biswal SS, et al. Systemic activation of NRF2 alleviates lethal autoimmune inflammation in scurfy mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(15): e00063-17.
- [27] Meng QT, Chen R, Chen C, et al. Transcription factors Nrf2 and NF- κ B contribute to inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6):1731-1740.
- [28] Zhao Y, Song W, Wang Z, et al. Resveratrol attenuates testicular apoptosis in type 1 diabetic mice: role of Akt-mediated Nrf2 activation and p62-dependent Keap1 degradation[J]. *Redox Biol*, 2018, 14:609-617.
- [29] Hayashi K, Dan K, Goto F, et al. The autophagy pathway maintained signaling crosstalk with the Keap1-Nrf2 system through p62 in auditory cells under oxidative stress[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(2):382-393.
- [30] Park JS, Kang DH, Lee DH, et al. Concerted action of p62 and Nrf2 protects cells from palmitic acid-induced lipotoxicity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(1):131-137.

(责任编辑: 宋廷君, 罗森)