

淫羊藿中不同部位及单体化合物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的影响李 英^{1,2}, 王俨如^{1,2}, 张小强^{1,2}, 吴 云^{1,2}, 丁 岗^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: **目的** 通过比较淫羊藿 *Epimedium brevicornum* 不同洗脱部位及其单体化合物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞损伤的保护作用, 筛选淫羊藿活性部位和活性成分。 **方法** 淫羊藿提取物经大孔树脂柱、硅胶柱、Sephadex LH-20 及制备液相的分离纯化, 得到不同洗脱部位和单体化合物。运用 $A\beta_{25-35}$ 体外诱导的神经细胞损伤模型, 采用 Hoechst 33342 和 PI 双染法, 对淫羊藿的不同洗脱部位和成分进行活性筛选。 **结果** 与模型组比较, 除淫羊藿 95%乙醇部位外, 所有洗脱部位及其中的单体化合物山柰酚-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-半乳糖苷]-7-*O*- α -L-鼠李糖苷、淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B 均对 $A\beta_{25-35}$ 所致 SH-SY5Y 细胞损伤有显著保护作用。 **结论** 淫羊藿对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤具有保护作用, 其二氯甲烷-甲醇 (5:1) 部位作用最强, 其次是 30%乙醇部位、50%乙醇部位。

关键词: 淫羊藿; $A\beta_{25-35}$; 神经保护; 山柰酚-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-半乳糖苷]-7-*O*- α -L-鼠李糖苷; 淫羊藿苷; 朝藿定 A; 朝藿定 B

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)24-5206-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.023

Effect of *Epimedium brevicornum* on $A\beta_{25-35}$ induced SH-SY5Y cells injuryLI Ying^{1,2}, WANG Yan-ru^{1,2}, ZHANG Xiao-qiang^{1,2}, WU Yun^{1,2}, DING Gang^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** To compare the neuroprotective effect of different elution fractions and compounds of *Epimedium brevicornum* on SH-SY5Y cells injury induced by $A\beta_{25-35}$ so as to screen pharmacologically fraction and compounds. **Methods** The isolation and purification of extract from *E. brevicornum* were performed on D101 macroporous resin column chromatography, silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and preparative liquid chromatography. Hoechst 33342/PI double staining method was used to screen neuroprotective fractions and components. **Results** Compared to model group, all fractions and kaempferol-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galactoside]-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside, icariin, epimedin A, and epimedin B from *E. brevicornum* could significantly increase the cells viability, except of 95% ethanol fraction. **Conclusion** *E. brevicornum* show some protective effect against $A\beta_{25-35}$ induced SH-SY5Y cells injury. The CH_2Cl_2 -MeOH (5:1) extract from *E. brevicornum* has the most pharmacologically activity, followed by 30% ethanol and 50% ethanol extracts from *E. brevicornum*.

Key words: *Epimedium brevicornum* Maxim.; $A\beta_{25-35}$; neuroprotective; kaempferol-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galactoside]-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside; icariin; epimedin A; epimedin B

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥叶, 为我国传统常用中药。近年来大量研究表明, 淫羊藿具有较强的雌激素样活性, 雌激素除在生殖系统具有重要作用外,

在神经保护方面也起着重要的作用^[1-5]。已有文献表明, 淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷及其衍生物淫羊藿素对神经元损伤具有保护作用^[6-7], 但其活性部位尚不明确。小檗碱是我国传统药物的主要成分, 临床上

收稿日期: 2017-06-07

基金项目: 科技部重大新药创制项目: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 李 英 (1987—), 女, 助理研究员, 研究方向为中药新药研发。Tel: 15250997231 E-mail: liying726@yeah.net

*通信作者 萧 伟 (1959—), 男, 研究员级高级工程师, 博士生导师, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionlunwen@163.com

主要用于治疗胃肠道疾病。近年来研究表明,小檗碱也可用于神经退行性疾病及精神疾病等中枢神经系统疾病的治疗。小檗碱能透过血脑屏障直接作用于皮层神经元和海马^[8],可抑制 Tau 蛋白过度磷酸化、抑制 A β 的产生、抑制阿尔茨海默病(AD)发病过程中的 4 种关键酶^[9]、抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)途径实现对 A β 诱导的神经元的保护^[10]。故本研究以小檗碱为阳性药,筛选淫羊藿经提取和分离纯化得到的不同部位及其化合物对 A β_{25-35} 所致 SH-SY5Y 细胞损伤的影响,确定其活性部位,为其进一步研究利用提供科学依据。

1 材料

1.1 药材

实验用淫羊藿药材购自精华制药亳州康普有限公司,由连云港市康济大药房吴舟主任药师鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶。

1.2 细胞

神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自于南京凯基生物科技发展有限公司,细胞株在 15~35 代进行实验。

1.3 药品与试剂

RPMI 1640 培养基(南京凯基生物科技发展有限公司);小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);0.25%胰酶(碧云天生物技术研究);DMSO、A β_{25-35} 、Hoechst33342、Propidium iodide (PI, Sigma 公司,美国);小檗碱(质量分数 86.7%,中国食品药品检定研究院,批号 110713-201212)。

1.4 仪器

SW-CJ-2F 型超净工作台(上海博迅实业有限公司);Thermo 3111 型 CO₂ 细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific, 美国);XDS-1B 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂);移液枪(Eppendorf 公司);countess 型细胞自动计数仪(Invitrogen, 美国);ImageXpress Micro 型高内涵细胞分析仪(MD, 美国)。

2 方法

2.1 淫羊藿不同提取部位和单体化合物的分离与制备^[11]

取干燥淫羊藿叶 2.5 kg,粉碎后加 20 倍量的水提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液、减压浓缩得浓缩液;将浓缩液加入乙醇,室温静置过夜,取上清液,减压浓缩,回收乙醇得干膏;向干膏中加入纯化水使溶解,室温静置,取上清液过 D101 型

大孔树脂柱,以 4 倍柱体积的纯化水洗脱,弃去水洗脱液,再以 4 倍柱体积的 85%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩、干燥得到淫羊藿总黄酮提取物 240.7 g^[11]。总黄酮提取物经大孔树脂柱分离,依次用不同体积分数(10%→95%)的乙醇梯度洗脱,得到 10 个洗脱部位。根据筛选的结果,将 30%乙醇部位过硅胶柱,依次用不同浓度的二氯甲烷-甲醇(20:1→0:1)梯度洗脱,得到 5 个洗脱部位。二氯甲烷-甲醇(5:1)再经凝胶柱和制备液相分离纯化得到 11 个化合物,分别鉴定为 hexandraside E (1)、柔藿苷(2)、diphyllside B (3)、山柰酚-3,7-O- α -L-二鼠李糖苷(4)、kaempferol 3-O-rhamnoprinosyl-(1→2)-rhamnopyranoside (5)、rhamnocitrin-3-O- β -neohesperidoside (6)、anhydroicaritin-3-O-glucoside-7-O-glucoside (7)、sagittasine C (8)、山柰酚-3-O-[α -L-鼠李糖基(1→6)- β -D-半乳糖苷]-7-O- α -L-鼠李糖苷(9)、槲皮素-3,7-二氧- α -L-双鼠李糖苷(10)、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖-7-O-[α -L-鼠李糖基(1→2)- β -D-葡萄糖]苷(11)。50%乙醇部位分离纯化得到 4 个化合物,分别鉴定为淫羊藿苷(12)、朝藿定 A (13)、朝藿定 B (14)、朝藿定 C (15)。不同提取部位样品均用 DMSO 溶解,不同洗脱部位配成 200 mg/mL 母液,化合物样品(自制,质量分数 $\geq$ 98%)配成 100 mmol/L 溶液, -20 °C 保存。

2.2 试剂的配制

Hoechst33342 溶液:100 mg Hoechst33342 溶于 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中,配成 10 mg/mL 母液, -20 °C 保存;PI 溶液:250 mg Propidium iodide 溶于 12.5 mL DMSO 中,配成 20 mg/mL 母液, -20 °C 保存。

A β_{25-35} 溶液:1 mg A β_{25-35} 溶于 943 μ L 无菌超纯水中,配成 1 mmol/L 的母液,放于 37 °C 培养箱中老化 7 d, -20 °C 保存备用;阳性药小檗碱,称取一定量的样品粉末,用 DMSO 溶解为 100 mg/mL 母液, -20 °C 保存备用。

2.3 分组及给药^[12]

实验设 DMSO 组、模型组、阳性药组(小檗碱)和受试样品组,每组设 3 个复孔。取对数生长期 SH-SY5Y 细胞,调整细胞密度约为 6×10^4 /mL,按照每孔 100 μ L 接种于 96 孔细胞培养板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 18~20 h。20 h 后吸弃旧培养基, DMSO 组和模型组加入 100 μ L 含 0.1% DMSO 的空白培养基(90% RPMI 1640 培养基+

10%小牛血清);阳性药组加入100 μL 含25 $\mu\text{g/mL}$ 小檗碱的培养基;样品组加入100 μL 含10 $\mu\text{g/mL}$ 不同洗脱部位样品的培养基;不同化合物样品给药时,样品组加入100 μL 含100 $\mu\text{mol/L}$ 不同化合物的培养基。药物作用4 h后,DMSO组加入100 μL 空白培养基,模型组、阳性药组和各样品组均加入100 μL 含20 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 培养基(终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$),孔中总体积为200 μL ,继续孵育48 h。

2.4 Hoechst33342和PI双染

$\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤细胞48 h后,1 500 r/min离心5 min,每孔小心弃掉150 μL 培养基,再加入50 μL 染液(Hoechst33342和PI用无血清培养基按1:500比例稀释混匀),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min后,立即用高内涵细胞分析仪进行细胞成像,放大倍数为10倍物镜。

2.5 细胞成像分析

根据高内涵细胞分析仪成像结果计算阳性率和细胞保护率。

阳性率=PI染色细胞数/Hoechst33342染色细胞数

细胞保护率=(模型组阳性率-给药组阳性率)/(模型组阳性率-DMSO组阳性率)

2.6 统计学分析

实验数据采用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 模型评价

$\text{A}\beta_{25-35}$ 导致SH-SY5Y细胞PI阳性细胞数增加,引起细胞损伤,阳性药小檗碱对细胞的损伤有明显的抑制作用($P<0.01$),该模型可用于药物筛选。结果见表1。

3.2 不同洗脱部位样品对神经细胞损伤的保护作用

应用模型对10个乙醇洗脱部位进行筛选,结

表1 小檗碱的神经保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Neuroprotective effects of berberine ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%
对照	—	2.52 $\pm$ 0.23	—
模型	—	48.79 $\pm$ 3.16 ^{##}	—
小檗碱	25	7.13 $\pm$ 0.24 ^{**}	90.04

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$, 下表同

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below table

果显示,与模型组相比,10%~80%乙醇部位对神经细胞损伤均具有明显的保护作用($P<0.01$),其中保护率高于85%的洗脱部位有2个,即30%乙醇部位和50%乙醇部位,结果见表2。

将淫羊藿30%乙醇部位过硅胶柱,用不同比例二氯甲烷-甲醇梯度洗脱。对不同洗脱部位进行筛选,与模型组比较,二氯甲烷-甲醇5个洗脱部位均具有显著性($P<0.01$),其中二氯甲烷-甲醇(5:1)部位保护率最优,高达90.06%,结果见表3。

3.3 单体化合物对神经细胞损伤的保护作用

对分离得到的单体化合物进行体外神经保护作用筛选,与模型组比较,化合物山柰酚-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-半乳糖苷]-7-*O*- α -L-鼠李糖苷(9)、淫羊藿苷(12)、朝藿定A(13)、朝藿定B(14)对神经细胞损伤有明显保护作用($P<0.05$ 、0.01),结果见表4。

4 讨论

从淫羊藿中分离鉴定的化学成分已达200多种,目前淫羊藿的神经保护研究主要集中在淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷。近年来的研究显示,淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的PD模型小鼠黑质纹状体系统多巴胺(DA)神经元具有明显的神经保护作用,淫羊

表2 淫羊藿不同乙醇洗脱部位的神经保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Neuroprotective effects of different ethanol fractions from *E. brevicornon* on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cell injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%
对照	—	2.40 $\pm$ 0.05	—	淫羊藿40%乙醇部位	10	13.59 $\pm$ 0.25 ^{**}	76.96
模型	—	50.94 $\pm$ 3.43 ^{##}	—	淫羊藿50%乙醇部位	10	9.29 $\pm$ 0.32 ^{**}	85.81
小檗碱	25	7.24 $\pm$ 0.51 ^{**}	90.03	淫羊藿60%乙醇部位	10	12.49 $\pm$ 2.05 ^{**}	79.22
淫羊藿10%乙醇部位	10	33.99 $\pm$ 1.20 ^{**}	34.92	淫羊藿70%乙醇部位	10	11.66 $\pm$ 0.49 ^{**}	80.93
淫羊藿20%乙醇部位	10	21.36 $\pm$ 0.41 ^{**}	60.94	淫羊藿80%乙醇部位	10	34.34 $\pm$ 0.35 ^{**}	34.20
淫羊藿30%乙醇部位	10	8.98 $\pm$ 0.53 ^{**}	86.44	淫羊藿95%乙醇部位	10	60.93 $\pm$ 4.18	-20.59

表 3 淫羊藿二氯甲烷-甲醇部位的神经保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Neuroprotective effects of different CH_2Cl_2 - CH_3OH fractions from *E. brevicornis* on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cell injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%
对照	—	1.81 ± 0.11	—	二氯甲烷-甲醇 10:1	10	$10.50 \pm 0.54^{**}$	79.04
模型	—	$43.29 \pm 2.64^{##}$	—	二氯甲烷-甲醇 5:1	10	$5.93 \pm 0.49^{**}$	90.06
小檗碱	25	$6.17 \pm 0.42^{**}$	89.49	二氯甲烷-甲醇 2:1	10	$10.77 \pm 0.17^{**}$	78.40
二氯甲烷-甲醇 20:1	10	$29.06 \pm 2.01^{**}$	34.30	二氯甲烷-甲醇 0:1	10	$16.02 \pm 0.44^{**}$	65.75

表 4 淫羊藿中分离的单体化合物的神经保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Neuroprotective effects of compounds from *E. brevicornis* on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced SH-SY5Y cell injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%	组别	$C/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	阳性率/%	保护率/%
对照	—	1.95 ± 0.02	—	对照	—	2.19 ± 0.11	—
模型	—	$43.75 \pm 5.22^{##}$	—	模型	—	$49.80 \pm 2.87^{##}$	—
小檗碱	$25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$5.91 \pm 0.55^{**}$	90.53	小檗碱	$25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$6.99 \pm 0.68^{**}$	89.93
1	100	37.75 ± 0.44	14.35	10	100	51.13 ± 3.51	-2.79
2	100	43.21 ± 2.25	1.30	11	100	51.06 ± 2.75	-2.64
3	100	41.80 ± 1.67	4.66	12	100	$19.44 \pm 2.05^{**}$	63.76
4	100	39.16 ± 3.76	10.98	13	100	$41.21 \pm 1.47^*$	18.03
5	100	36.81 ± 1.71	16.61	14	100	$41.98 \pm 2.74^*$	16.42
6	100	39.06 ± 4.48	11.22	15	100	96.75 ± 1.25	-98.61
7	100	39.43 ± 2.77	10.35				
8	100	33.75 ± 3.28	23.98				
9	100	$20.44 \pm 1.79^{**}$	59.61				

与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

藿总黄酮可通过调控 Bcl-2 蛋白的表达, 发挥其抗凋亡作用^[13]。淫羊藿苷的神经保护作用机制可能与 PI3K/Akt 及 MEK/MRK 信号途径的激活^[7,14], JNK/p38 信号通路的抑制^[15-16]有关。活性部位和其他成分的研究甚少。

AD 是最常见的神经退行性疾病, 严重危害老年人的生活质量, 已成为当今科学研究的重点疾病之一。此病病因有多种学说, 目前, 淀粉样 β -蛋白 (amyloid- β protein, $\text{A}\beta$) 学说已被广泛认可^[17]。本研究选用 $\text{A}\beta_{25-35}$ 作用于 SH-SY5Y 细胞, 建立神经细胞损伤模型, 采用 Hoechst33342 和 PI 双染法, 观察淫羊藿不同洗脱部位和化合物对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。检测结果表明, 小檗碱对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 所致 SH-SY5Y 细胞损伤具有明显的保护作用, 与文献报道的一致^[10,12]。除 95%乙醇部位外, 淫羊藿不同乙醇洗脱部位 (10%→80%乙醇部位)、不同二氯甲烷-甲醇洗脱部位 (20:1→0:1

部位) 及山柰酚-3-*O*-[α -L-鼠李糖基(1→6)- β -D-半乳糖基]-7-*O*- α -L-鼠李糖苷 (9)、淫羊藿苷 (12)、朝藿定 A (13)、朝藿定 B (14) 均能显著抑制 $\text{A}\beta_{25-35}$ 所致 SH-SY5Y 细胞损伤。其中, 二氯甲烷-甲醇(5:1) 部位神经保护作用最强, 其次是 30%、50%乙醇部位, 且主要成分是黄酮苷类化合物。本研究为将二氯甲烷-甲醇 (5:1) 部位用于进一步研究淫羊藿防治 AD 的作用及其机制提供了一定的理论依据, 从活性部位中分离具有神经保护作用的单体有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Urano T, Tohda C. Icaritin improves memory impairment in Alzheimer's disease model mice (5xFAD) and attenuates amyloid β -induced neurite atrophy [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(11): 1658-1663.
- [2] Wang Z, Zhang X, Wang H, et al. Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced dependent

- pathway [J]. *Neuroscience*, 2007, 145(3): 911-922.
- [3] 宋亚琼, 赵平. 雌激素与神经保护的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(3): 523-526.
- [4] 郭家彬, 铁璐, Diana N Krause, 等. 雌激素神经保护作用机制: 线粒体功能的调节 [J]. 生理科学进展, 2010, 41(3): 165-170.
- [5] 刘兴, 虞乐华. 雌激素神经保护作用及其机制的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2016, 32(11): 1679-1682.
- [6] 李林, 张兰. 中药治疗阿尔茨海默病的作用特点 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(8): 816-828.
- [7] 吴林. 淫羊藿总黄酮及其主要活性成分淫羊藿苷抗帕金森病作用的分子机制研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2013.
- [8] Wang X, Wang R, Xing D, *et al.* Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of *Coptidis Rhizoma* extract [J]. *Life Sci*, 2005, 77(24): 3058-3067.
- [9] 马丽丽, 陈晓红. 小檗碱在神经系统疾病中的应用进展 [J]. 新医学, 2012, 43(7): 437-440.
- [10] 王静, 张艳军, 常亮堂. 小檗碱对 $A\beta_{25-35}$ 损伤大鼠皮层神经元的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 728-733.
- [11] 李英, 张小龙, 杨晶, 等. 淫羊藿中黄酮类成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2057-2061.
- [12] 王俨如, 陶晓倩, 胡玉梅, 等. 基于高内涵技术的20种中药提取物对 β 淀粉样蛋白致SH-SY5Y细胞损伤保护作用研究 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 267-274.
- [13] 吴林, 薛丹丹, 杨晶, 等. 淫羊藿总黄酮对帕金森病模型小鼠多巴胺神经元保护作用 [J]. 青岛大学医学院学报, 2013, 49(1): 4-6.
- [14] Zeng K W, Ko H, Yang H O, *et al.* Icariin attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by inhibition of tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 59(6): 542-550.
- [15] Li W W, Gao X M, Wang X M, *et al.* Icariin inhibits hydrogen peroxide-induced toxicity through inhibition of phosphorylation of JNK/p38 MAPK and p53 activity [J]. *Mut Res*, 2011, 708(1/2): 1-10.
- [16] Liu B, Zhang H, Xu C, *et al.* Neuroprotective effects of icariin on corticosterone-induced apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons [J]. *Brain Res*, 2011, 1375(4): 59-67.
- [17] Butterfield D, Acastegna A, Lauderback C M, *et al.* Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death [J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(5): 655-664.