

HT22、SY5Y 细胞在 L-谷氨酸损伤模型中的应用

吕彩珍 吴燕川 孔玲 王晓珍 赵志炜 张旭 康美美 王蓉

100053 首都医科大学宣武医院中心实验室 北京市老年病医疗研究中心 国家老年病临床医学研究中心 北京脑重大疾病研究院阿尔茨海默病研究所 神经变性病教育部重点实验室

通信作者: 王蓉, Email: rong_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.04.008

【摘要】目的 探讨不同处理时间及浓度下 L-谷氨酸对 HT22、SY5Y 两种细胞活性和细胞形态的影响, 为构建 L-谷氨酸诱导细胞损伤模型提供参考。**方法** 以 0、0.25、0.5、1、2、5、10、15、20、25 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 HT22、SY5Y 两种细胞, 24 h 后采用 MTT、CCK8 法检测两种细胞活性, 检测细胞培养液中乳酸脱氢酶漏出率来观察细胞死亡情况; 选取 10 和 5 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 SY5Y 细胞和 HT22 细胞 0、2、4、8、12、18、24、36、48 h, 采用 MTT、CCK8 法观察不同时间下 L-谷氨酸对两种细胞活性影响的差异, 并用显微镜观察其对细胞形态的损伤。**结果** L-谷氨酸浓度为 1、2、5、10、15、20、25 mmol/L 时的 SY5Y、HT22 细胞活性低于 0 mmol/L, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 使用 10、5 mmol/L 的 L-谷氨酸分别处理 SY5Y、HT22 细胞, 4、8、12、18、24、36、48 h 两种细胞的活性低于 0 h, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。2、10、15、20、25 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 SY5Y 细胞 24 h, 乳酸脱氢酶漏出率高于 0 mmol/L, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 1、2、5、20、25 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 HT22 细胞 24 h 的乳酸脱氢酶漏出率高于 0 mmol/L, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。采用 10 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 SY5Y 细胞 24 h 后, MTT 法检测细胞活性为 $(82.80 \pm 9.71)\%$, 细胞形态表现为轻度损伤; 采用 5 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 HT22 细胞 24 h 后, MTT 法检测细胞活性为 $(72.01 \pm 5.33)\%$, 细胞形态表现为轻度损伤。**结论** 采用 5 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 HT22 细胞 24 h 为 HT22 细胞理想的造模条件, 采用 10 mmol/L 的 L-谷氨酸处理 SY5Y 细胞 24 h 为 SY5Y 细胞的理想造模条件, 为应用 L-谷氨酸损伤细胞模型研究神经系统疾病的发病机制提供了实验条件参考。

【关键词】 L-谷氨酸; HT22 细胞; SY5Y 细胞; 细胞活性; 细胞形态

基金项目: 2020 年度首都卫生发展科研专项资助项目(首发 2020-2Z-1034); 国家重点研发计划专项资助项目(2018YFA0108503)

Application of HT22 and SY5Y cells in L-glutamate acid induced-injury model Lyu Caizhen, Wu Yanchuan, Kong Ling, Wang Xiaozhen, Zhao Zhuwei, Zhang Xu, Kang Meimei, Wang Rong
Central Laboratory of Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing Medical Research Center for Geriatrics, National Geriatric Disease Clinical Medical Research Center, Alzheimer's Disease Research Institute, Beijing Institute of Major brain Diseases, Key Laboratory of Neurodegenerative Ministry of Education, Beijing 100053, China

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong_wang72@aliyun.com

【Abstract】Objective To compare the effects of L-glutamic acid on cell viability and cell morphology of HT22 and SY5Y with different treatment times and concentration, so as to provide reference for the construction of cell injury model induced by L-glutamate. **Methods** HT22 and SY5Y cells were treated with 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L L-glutamate. After 24 hours, MTT and CCK8 methods were used to detect the activity of the two cells, and the leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell culture medium was detected to observe the cell death. SY5Y cells and HT22 cells were treated with L-glutamate at different concentrations of 10 mmol/L and 5 mmol/L for 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36 and 48 hours. The effects of L-glutamate on the activity of SY5Y cells and HT22 cells at different incubation times were studied by MTT and CCK8 methods, and the morphological damage of L-glutamate was observed by the microscope. **Results** When the concentration of L-glutamate was 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mmol/L, the activity of SY5Y and HT22 cells was lower than 0 mmol/L ($P < 0.05$); SY5Y and HT22 cells were treated with 10 and 5 mmol/L L-glutamate respectively. The activity of the two cells was lower than 0 h at 4, 8, 12, 18, 24, 36 and 48 h ($P < 0.05$).

When SY5Y cells were treated with 2, 10, 15, 20 and 25 mmol/L L-glutamate for 24 hours, the leakage rate of LDH was higher than 0 mmol/L ($P < 0.05$); The leakage rate of LDH in HT22 cells treated with 1, 2, 5, 20 and 25 mmol/L L-glutamate for 24 hours was higher than 0 mmol/L ($P < 0.05$). The cell activity of SY5Y cells treated with 10 mmol/L L-glutamate for 24 hours was $(82.80 \pm 9.71)\%$ by MTT assay, and the cell morphology showed mild damage. After HT22 cells were treated with 5 mmol/L L-glutamate for 24 hours, the cell activity was $(72.01 \pm 5.33)\%$, and the cell morphology showed mild damage. **Conclusions** Treating HT22 cells with 5 mmol/L L-glutamate for 24 hours is an ideal modeling condition for HT22 cells, and treating SY5Y cells with 10 mmol/L L-glutamate for 24 hours is the ideal condition for SY5Y cells, which provides an experimental condition reference for the application of L-glutamate injury cell model to study the pathogenesis of nervous system diseases.

【Key words】 L-glutamate acid; HT22 cells; SY5Y cells; Cell viability; Cell morphology

Fund programs: The 2020 Capital Health Development Research Special Funding Project (First Issue 2020-2Z-1034); National Key Research and Development Program Special Funding Project (2018YFA0108503)

谷氨酸是哺乳动物脑和脊髓中含量丰富的内源性神经递质,其在神经的发育、分化与迁移过程中发挥重要的作用^[1],同时也与突触发生、发展、可塑性及学习记忆过程息息相关^[2]。生理情况下,谷氨酸与突触后膜的谷氨酸受体(glutamate receptor, GluR)结合,维持神经细胞的正常生理活动。但在某些病理刺激下,细胞外谷氨酸浓度过高,钙离子内流过多,神经元持续去极化,突触后膜GluR被过度激活,引发兴奋性毒性、凋亡、氧化应激等反应,导致神经元变性死亡^[3]。近年来的研究显示,许多神经精神疾病诸如AD、PD、脑缺血缺氧、亨廷顿病、精神分裂症等与细胞外谷氨酸浓度过高密切相关^[4]。

HT22细胞系是一种来自缺乏离子型GluR的小鼠海马神经元的永生细胞系^[5],具有神经元的形态和功能,是近年来通过暴露于高浓度谷氨酸,形成氧化应激、兴奋性毒性、凋亡常用的细胞模型,广泛应用于神经系统相关疾病的研究^[6]。生理状态下,细胞贴壁良好,胞体呈多角梭形,具有良好的折光性,细胞之间有着紧密且多样的突触联系。

人神经母细胞瘤SH-SY5Y分化细胞系来源于骨髓,是一种常用的研究氧化应激致神经元死亡的细胞模型。该细胞系是SK-N-SH细胞系的一个亚系,SK-N-SH细胞系于1970年从1例患有转移性神经母细胞瘤的4岁女童骨髓组织活检中分离,经过3轮克隆选择所得^[7]。正常条件下,该细胞繁殖快,性状稳定且持久。因该细胞的形态、生理、生化性质与神经元相似,故被广泛应用于神经系统疾病的研究^[8]。

SH-SY5Y细胞系和HT22细胞系是研究神经退行性病变的两种常用细胞系,在不同疾病中有着不同的研究目的。即便是同一种疾病,由于研究靶点和目的的不同,采用的药物作用浓度也是各异的。诸多研究仅集中于研究一种细胞,有关HT22、SH-SY5Y细胞在L-谷氨酸损伤模型中应用的优劣比较

的研究较少。因次,本研究就同一条件下用不同浓度的L-谷氨酸分别处理两种细胞,通过比较细胞活性和形态,为构建L-谷氨酸诱导细胞损伤模型提供参考。

一、材料与方法

1. 研究材料及仪器: (1) 细胞。SH-SY5Y细胞系由瑞典卡罗琳斯卡研究所的Winblad教授和裴进京博士惠赠; HT22细胞株由首都医科大学宣武医院王玉平教授团队惠赠。(2) 主要药物与试剂。包括DMEM高糖培养基和胎牛血清(康宁公司)、L-谷氨酸(美国Sigma公司)、MTT细胞增殖及毒性检测试剂盒(Elabscience公司)、CCK8(日本同仁化学研究所)、LDH(南京建成生物工程研究所)。(3) 仪器。全波长酶标仪(美国Thermo公司)、倒置相差显微镜(美国Olympus公司)。

2. 细胞培养: SY5Y和HT22细胞均用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,在37℃、5% CO₂培养箱培养,取对数期生长的细胞,以 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板,待细胞贴壁后进行后续实验。

3. L-谷氨酸溶解和处理: (1) 溶解方法。在1 mmol/L的盐酸溶液中L-谷氨酸最大溶解度为100 mg/mL,而相关文献表明,如果将其溶于盐酸溶液,会对后续细胞活性等一些实验指标产生影响^[9],故以最大溶解量将其溶于无血清DMEM培养液配成浓度为25 mmol/L的母液,4℃保存备用。(2) 处理方法。Terzioğlu Bebitoğlu等^[10]的研究结果显示,15 mmol/L的L-谷氨酸处理SY5Y细胞24 h,细胞活力下降20%左右,为合适的谷氨酸模型处理条件;另外,Chu等^[11]的研究显示,25 mmol/L的L-谷氨酸处理HT22细胞24 h,细胞活力下降40%左右,为合适的造模浓度。综合以上2项研究结果以及L-谷氨酸自身药物特性方面的因素,最终确立L-谷氨酸的最大造模浓度为25 mmol/L,设置终浓度为0、0.25、0.5、1、2、5、10、15、20、25 mmol/L的无血清培养基等量替代原培养基,培养0、2、4、8、12、18、24、

36、48 h后进行下一步检测。

4. MTT法检测细胞相对活性:依照MTT检测法说明书,向每孔加入50 μ L 1 \times 的MTT工作液,继续培养4 h,使MTT还原为甲臜,弃去培养上清,每孔加入150 μ L的二甲基亚砜,振荡摇匀,使甲臜全部溶解,在570 nm波长处检测各孔吸光度值。每板设置空白组(只加培养基)、对照组(L-谷氨酸含量为0)、不同浓度/时间处理组。细胞活性计算公式:细胞活性=(L-谷氨酸处理组吸光度-空白吸光度)/(对照组吸光度-空白吸光度)。

5. CCK8法检测细胞相对活性:依照试剂盒说明书,每孔加入10 μ L的CCK8工作液,培养2 h,用酶标仪在450 nm波长下检测吸光度值。组别设置和细胞活性计算同MTT法。

6. ELISA法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性:依据试剂盒说明书进行处理,在450 nm波长下检测各孔吸光度值。LDH漏出率计算公式:细胞上清LDH活性(U/L)=(测定吸光度-对照吸光度)/(标准吸光度-空白吸光度) \times 标准品浓度 \times 1 000。

7. 倒置显微镜观察细胞形态:用倒置相差显微镜放大200倍拍摄,观察胞体大小和形态、轴突数目以及长度变化。根据MTT法检测细胞活力、镜下细胞状态2个实验判别细胞损伤程度,如轻度损伤组的选取依据为:(1)MTT法检测细胞活性百分比为75%~95%;(2)可见镜下大部分细胞轴突变短,胞体面积变小,突起减少,与正常细胞比较,细胞状态有变化,定为轻度损伤。

8. 统计学方法:所有数据采用SPSS 20.0统计分析软件进行分析。计数资料采用频数表示;正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。采用Graph Pad Prism 8.0绘制统计图。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. MTT、CCK8法检测不同浓度L-谷氨酸处理下的SY5Y、HT22细胞活性比较:L-谷氨酸浓度为1、2、5、10、15、20、25 mmol/L时的SY5Y细胞活性均低于L-谷氨酸浓度为0 mmol/L时,差异有统计学意义($t=5.194$ 、 4.794 、 4.462 、 3.966 、 7.649 、 4.783 、 23.559 , $P < 0.05$)。其中,采用10 mmol/L的L-谷氨酸处理时,细胞活力为(82.80 \pm 9.71)%,暂定为SY5Y细胞的造模浓度;L-谷氨酸浓度为1、2、5、10、15、20、25 mmol/L时的HT22细胞活性低于L-谷氨酸浓度为0 mmol/L时,差异有统计学意义($t=2.688$ 、 2.314 、 7.489 、 15.916 、 24.242 、 24.613 、 24.409 , $P < 0.05$)。

采用5 mmol/L的L-谷氨酸处理时,细胞活力为(72.01 \pm 5.33)%,暂定为HT22细胞的造模浓度。CCK8法检测呈现相似的趋势。见图1。

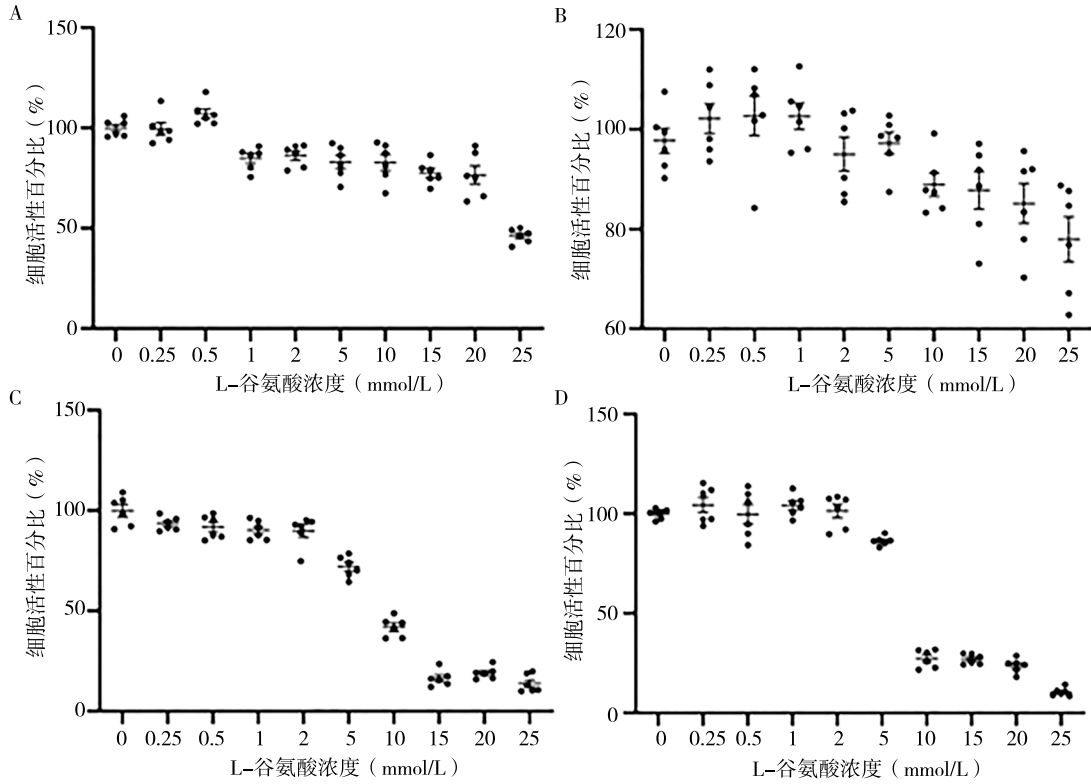
2. MTT、CCK8法检测相同浓度L-谷氨酸不同处理时间的SY5Y、HT22细胞活性比较:采用MTT法检测,L-谷氨酸浓度为10 mmol/L,处理4、8、12、18、24、36、48 h时的SY5Y细胞活性低于0 h,差异有统计学意义($t=6.017$ 、 5.918 、 5.570 、 4.679 、 16.380 、 17.125 、 23.022 , $P < 0.05$);HT22细胞也有类似趋势,选用5 mmol/L的L-谷氨酸处理4、8、12、18、24、36、48 h时的HT22细胞活性低于0 h,差异有统计学意义($t=3.675$ 、 2.901 、 4.675 、 4.360 、 4.437 、 5.579 、 28.936 , $P < 0.05$)。CCK8法检测呈现与MTT法相似的趋势。见图2。

3. ELISA法检测不同浓度L-谷氨酸处理24 h时SY5Y、HT22细胞培养液中LDH漏出率比较:随着L-谷氨酸浓度的增加,SY5Y细胞上清液中LDH漏出率呈现上升趋势,浓度为2、10、15、20、25 mmol/L的L-谷氨酸处理SY5Y细胞24 h的LDH漏出率高于0 mmol/L,差异有统计学意义($t=-2.970$ 、 -5.432 、 -13.897 、 -11.848 、 -9.119 , $P < 0.05$);HT22细胞呈现同样的趋势,浓度为1、2、5、20、25 mmol/L的L-谷氨酸处理HT22细胞24 h的LDH漏出率高于0 mmol/L,差异有统计学意义($t=-5.757$ 、 -8.389 、 -23.286 、 -8.675 、 -34.749 , $P < 0.05$)。见图3。

4. 不同浓度及处理时间L-谷氨酸对SY5Y、HT22细胞形态的影响:正常细胞呈梭形,折光性好,细胞间联系紧密,周边多突起;轻度损伤细胞数量减少,部分细胞轴突变短,胞体面积变小,突起变少;重度损伤细胞形态变圆,细胞间连接松散,细胞密度严重减少,见图4。选用10 mmol/L和5 mmol/L的L-谷氨酸分别处理SY5Y细胞和HT22细胞,随L-谷氨酸处理时间的延长,细胞形态由正常变为轴突变短、胞体变小、折光性变差,胞体渐渐失去正常细胞的饱满与光泽,与细胞代谢检测结果相吻合,见图5。

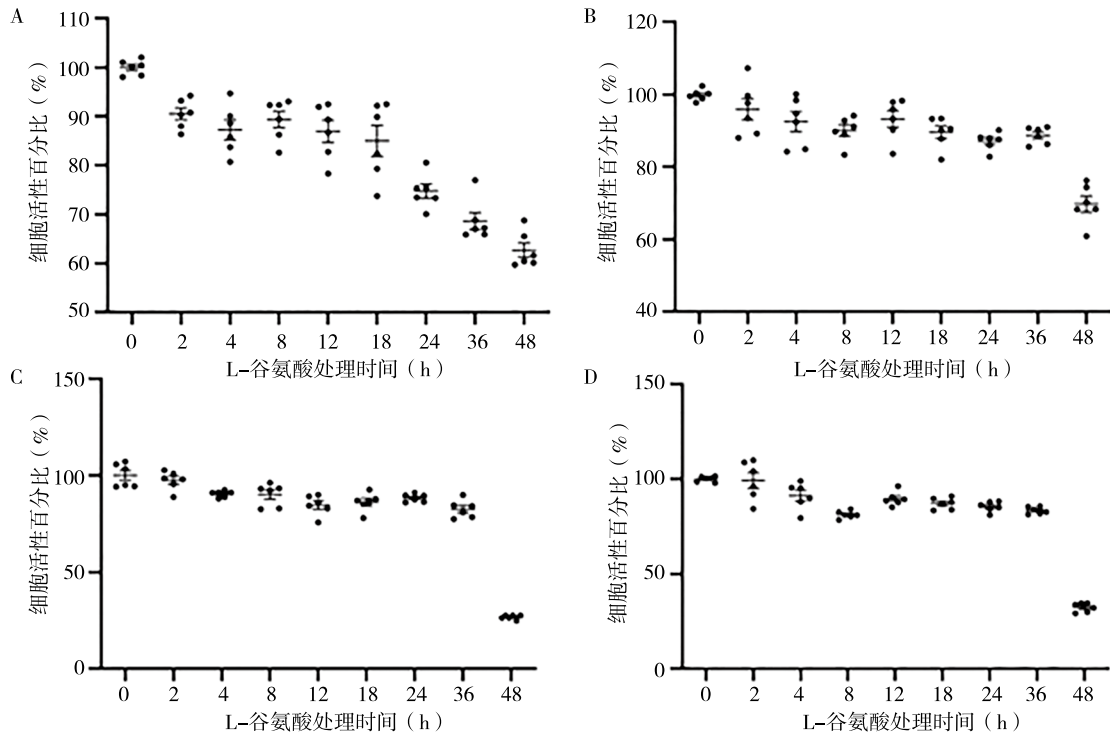
讨论 谷氨酸处理引起细胞毒性是一个多因素的复杂现象,主要取决于细胞外谷氨酸的浓度和处理时间。不同细胞系暴露于谷氨酸时的变化不同:有些细胞系通过离子型谷氨酸产生谷氨酸毒性,而对于缺乏这种受体的细胞,毒性由谷氨酸诱导的氧化应激产生^[3]。谷氨酸处理细胞作为兴奋性毒性^[10,12]、凋亡^[11,13]、氧化应激^[14]损伤的模型,可用于多种神经精神疾病治疗药物疗效机制的研究。

原代细胞存在提取操作难度大、培养条件严苛、批次间性状差异大等缺点,故多采用细胞系进行研究,常用的研究神经系统疾病的细胞系有HT22、



注: A MTT法检测SY5Y细胞活性; B CCK8法检测SY5Y细胞活性; C MTT法检测HT22细胞活性; D CCK8法检测HT22细胞活性

图1 MTT、CCK8法检测不同浓度L-谷氨酸处理下的SY5Y、HT22细胞活性比较

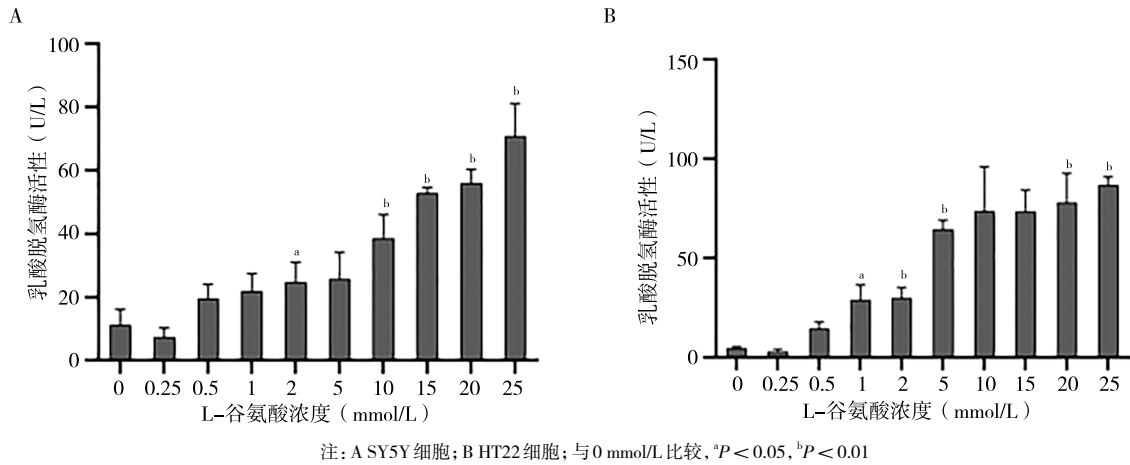


注: A MTT法检测SY5Y细胞活性; B CCK8法检测SY5Y细胞活性; C MTT法检测HT22细胞活性; D CCK8法检测HT22细胞活性

图2 MTT、CCK8法检测相同浓度L-谷氨酸不同处理时间的SY5Y、HT22细胞活性比较

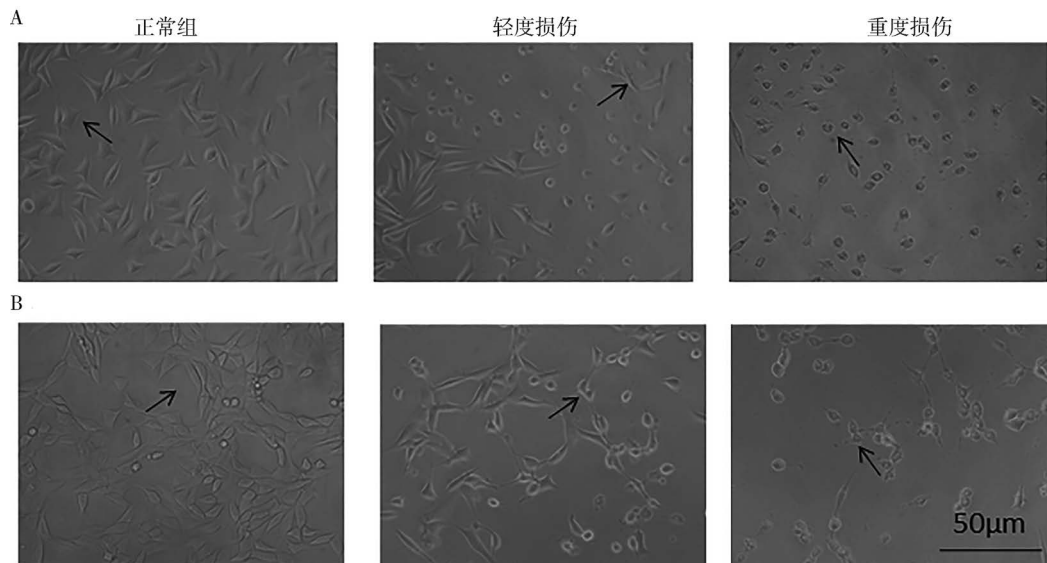
SY5Y、PC12, 本次研究选用HT22和SY5Y细胞。MTT代谢率、CCK8活性可用于反映线粒体活性,是

细胞存活的标志; 正常情况下, LDH为细胞内酶, 当受到某些刺激时, LDH会由胞内漏出到细胞液中,



注: A SY5Y 细胞; B HT22 细胞; 与 0 mmol/L 比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图3 酶联接免疫吸附剂测定法检测不同浓度L-谷氨酸处理24 h时SY5Y、HT22细胞的细胞培养液中乳酸脱氢酶漏出率



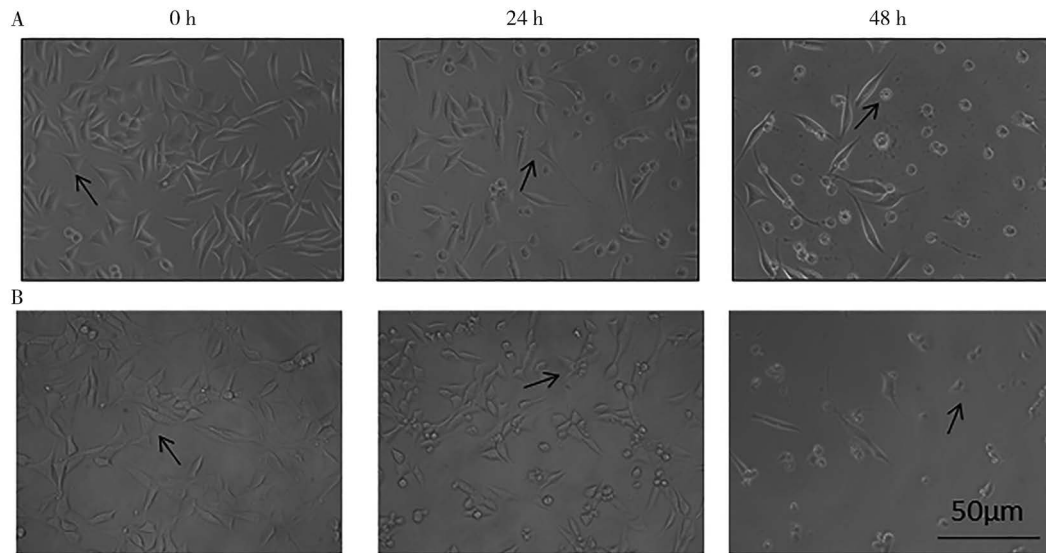
注: A 10 mmol/L L-谷氨酸处理24 h的SY5Y细胞; B 5 mmol/L L-谷氨酸处理24 h的HT22细胞; 箭头所指代表相应类型的典型细胞; 倒置相差显微镜拍摄, 图片放大倍数为200 ×, Bar=50 μm

图4 L-谷氨酸处理24 h的SY5Y、HT22细胞形态

因此如果检测到细胞液中LDH异常增高,则说明细胞死亡数目增加^[15]。本研究选用SY5Y、HT22两种细胞,采用同一条件L-谷氨酸处理,通过比较两种细胞活性、LDH漏出率、细胞形态的改变,比较两者在谷氨酸损伤模型中的应用,为相关研究人员在细胞系选择及谷氨酸损伤条件的摸索提供一定的参考。人神经母细胞瘤细胞系SY5Y细胞性状稳定、易于生长,但小剂量的谷氨酸损伤效果不明显^[10]。本研究采用10 mmol/L的L-谷氨酸处理24 h,检测SY5Y细胞活性约为82%,LDH活性增高,细胞折光性变差,生长速度减缓,轴突变短,说明谷氨酸对细胞造成了一定程度的损伤,是应用SY5Y细胞造谷氨酸细胞毒性模型的理想条件;相较于SY5Y细胞,损伤HT22细胞系的谷氨酸浓度要求更低且状态稳

定,5 mmol/L的L-谷氨酸处理24 h,检测HT22细胞活性约为75%,细胞形态较对照组突触变短,胞体轻微缩小,细胞间联系减少,是应用HT22细胞造谷氨酸损伤模型的理想条件,与Park等^[16]的研究结果一致。

综上所述,本研究比较了SY5Y、HT22细胞在L-谷氨酸损伤模型中的细胞活性、LDH漏出率、细胞状态变化。确定采用5 mmol/L的L-谷氨酸处理HT22细胞24 h为HT22细胞理想的造模条件;采用10 mmol/L的L-谷氨酸处理SY5Y细胞24 h为SY5Y细胞的理想造模条件。此结果为应用L-谷氨酸损伤细胞模型研究神经系统疾病的发病机制提供了实验参考,但谷氨酸对于两种细胞损伤的详细机制还有待进一步研究。



注: A 10 mmol/L L-谷氨酸处理0、24、48 h的SY5Y细胞; B 5 mmol/L L-谷氨酸处理0、24、48 h的HT22细胞; 箭头所指代表相应类型的典型细胞; 倒置相差显微镜拍摄, 图片放大倍数为200×, Bar=50 μm

图5 L-谷氨酸处理0、24、48 h的SY5Y、HT22细胞形态

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计、论文撰写、获取资助为吕彩珍、王蓉, 研究实施为吕彩珍、张旭, 资料收集为王晓珍、赵志炜, 数据收集为康美美, 数据整理为吕彩珍、吴燕川, 数据分析为吕彩珍、孔玲, 数据解释为吕彩珍

参 考 文 献

- [1] Jantas D, Greda A, Golda S, et al. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor group II and III activators against MPP(+)-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: the impact of cell differentiation state[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 83: 36-53. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.03.019.
- [2] Rupsingh R, Borrie M, Smith M, et al. Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(5): 802-810. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.002.
- [3] Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, et al. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 91. DOI: 10.3389/fncel.2015.00091.
- [4] Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 1999, 81(3): 163-221. DOI: 10.1016/s0163-7258(98)00042-4.
- [5] Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, et al. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress[J]. *Neuron*, 1989, 2(6): 1547-1558. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90043-3.
- [6] Bell KF, Bent RJ, Meese-Tamuri S, et al. Calmodulin kinase IV -dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption[J]. *J Neurochem*, 2013, 126(2): 274-287. DOI: 10.1111/jnc.12176.
- [7] Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, et al. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones[J]. *Cancer Res*, 1978, 38(11 Pt 1): 3751-3757.
- [8] Shi YH, Shi GC, Wan HY, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(13): 1951-1956. DOI: 10.3760/ema.j.issn.0366-6999.2011.13.006.
- [9] Croce N, Bernardini S, Di Cecca S, et al. Hydrochloric acid alters the effect of L-glutamic acid on cell viability in human neuroblastoma cell cultures[J]. *J Neurosci Methods*, 2013, 217(1/2): 26-30. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.04.009.
- [10] Terzioğlu Bebitoğlu B, Oğuz E, Gökçe A. Effect of valproic acid on oxidative stress parameters of glutamate-induced excitotoxicity in SH-SY5Y cells[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1321-1328. DOI: 10.3892/etm.2020.8802.
- [11] Chu Q, Zhu Y, Cao T, et al. Studies on the neuroprotection of osthole on glutamate-induced apoptotic cells and an Alzheimer's disease mouse model via modulation oxidative stress[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190(2): 634-644. DOI: 10.1007/s12010-019-03101-2.
- [12] Krasil'nikova I, Surin A, et al. Insulin protects cortical neurons against glutamate excitotoxicity[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1027. DOI: 10.3389/fnins.2019.01027.
- [13] Hu S, Wang D, Zhang J, et al. Mitochondria related pathway is essential for polysaccharides purified from *Sparassis crispa* mediated neuro-protection against glutamate-induced toxicity in differentiated PC12 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 133. DOI: 10.3390/ijms17020133.
- [14] Lee K, Park C, Oh Y, et al. Antioxidant and neuroprotective effects of N-((3, 4-Dihydro-2H-benzo[h]chromen-2-yl)methyl)-4-methoxyaniline in primary cultured rat cortical cells: involvement of ERK-CREB signaling[J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 669. DOI: 10.3390/molecules23030669.
- [15] Wang P, Jiang S, Cui Y, et al. The n-terminal 5-MER peptide analogue P165 of amyloid precursor protein exerts protective effects on SH-SY5Y cells and rat hippocampus neuronal synapses[J]. *Neuroscience*, 2011, 173: 169-178. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.069.
- [16] Park DH, Park JY, Kang KS, et al. Neuroprotective effect of gallic acid on glutamate-induced oxidative stress in hippocampal HT22 cells[J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1387. DOI: 10.3390/molecules26051387.

(收稿日期: 2021-07-26)

(本文编辑: 赵金鑫)