ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินต่อความเป็นพิษของเบตาอะไมลอยด์ที่มีต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาว

นางสาวสดุดี รัตนจรัสโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2690-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF QUERCITRIN ON β-AMYLOID-INDUCED NEUROTOXICITY IN RAT HIPPOCAMPAL NEURONAL CULTURES

Miss Sadudee Rattanajarasroj

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biopharmaceutical Sciences

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

Academic Year 2006
ISBN 974-14-2690-9

Copyright of Chulalongkorn University

490085

Thesis Title	Neuroprotective Effects of Quercitrin on β-amyloid-induced Neurotoxicity in Rat Hippocampal Neuronal Cultures
By	Miss Sadudee Rattanajarasroj
Field of study	Biopharmaceutical Sciences
Thesis Advisor	Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

....Chairman
(Assistant Professor Rubporn Kittivachra)

....Thesis Advisor
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

....Member
(Associate Professor Yupin Sanvarinda, Ph.D.)

....Member
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)

....Member
(Assistant Professor Thongchai Sooksawate, Ph.D.)

สดุดี รัตนจรัสโรจน์ : ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินต่อความเป็นพิษของเบตาอะไมลอยด์ที่มีต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาว (NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF QUERCITRIN ON β-AMYLOID-INDUCED NEUROTOXICITY IN RAT HIPPOCAMPAL NEURONAL CULTURES) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุรชัย อัญเชิญ 151 หน้า. ISBN 974-14-2690-9

วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยนี้ ได้แก่ (1) การแสดงลักษณะแบบจำลองภาวะประสาทเสื่อมสลายนอกร่างกายโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและการสัมผัสกับเบตาอะไมลอยด์ (2) การศึกษาผลปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินต่อความเป็นพิษจากเบตาอะไมลอยด์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และ (3) การศึกษาหากลไกปกป้องเซลล์ประสาทที่เป็นไปได้ของเควอซิตรินในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

การวิจัยครั้งนี้ใช้เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสซึ่งกำลังเจริญสัมผัสกับ $A\beta_{25-35}$ ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นแบบจำลองภาวะประสาทเสื่อมสลายนอกร่างกาย วัดการบาดเจ็บและตายของเซลล์ด้วยการวิเคราะห์ MTT reduction และ LDH release ใช้การผลิต ROS ระดับ lipid peroxidation, ระดับ GSH ภายในเซลล์, สมรรถนะของ SOD และ GPx เป็นตัวชี้วัดส่วนร่วมของกลไก prooxidant และ antioxidant ในการเกิดพิษต่อเซลล์ประสาทของ $A\beta_{25-35}$ ใช้สมรรถนะของ Caspase-3, ปริมาณโปรตีน Bcl-2 และ Bax และการปลดปล่อย cytochrome c เป็นตัวชี้วัดส่วนร่วมของการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยทดสอบผลปกป้องเซลล์ประสาทที่น่าจะเป็นของเควอซิตรินซึ่งเป็นอนุพันธุ์ในกลุ่มสาร phytoestrogens ด้วยแบบจำลองนี้ นอกจากนั้นยังใช้ estrogen receptor antagonist, MEK และ PI3K inhibitors เป็นเครื่องมือสืบหาแนวทางการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่เป็นไปได้

ผลการทดลองแสดงว่าการสัมผัสกับ $A\beta_{25-35}$ ทำให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงบาดเจ็บและตายเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัส ขณะที่การสัมผัสกับเควอซิตรินหรือ 17β-estradiol ความเข้มข้น 0.001-100 μM เป็นเวลา 72 ชั่วโมงไม่ก่อผลพิษใดๆ ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง สารทั้งคู่แสดงผลปกป้องเซลล์ประสาทในระดับหนึ่งซึ่งสนับสนุนด้วยหลักฐานต่อไปนี้: การสัมผัสร่วมระหว่างเควอซิตรินหรือ 17β-estradiol กับ $A\beta_{25-35}$ ปกป้องเซลล์ประสาทด้วยการลดความบาดเจ็บและภาวะเครียดออกซิเดชันจาก $A\beta_{25-35}$; การสัมผัสร่วมกับ 17β-estradiol ต่อต้านการลดปริมาณ GSH ในเซลล์ที่เกิดจาก $A\beta_{25-35}$; ขณะที่การสัมผัสร่วมกับเควอซิตรินต่อต้านการลดสมรรถนะ GPx ที่เกิดจาก $A\beta_{25-35}$ อย่างไรก็ตามสารทั้งคู่ไม่แสดงผลปกป้องต่อสมรรถนะ SOD

ผลปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินและ 17β-estradiol อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis เนื่องจากสารทั้งคู่สามารถลดการเพิ่มการปลดปล่อย cytochrome c, สมรรถนะของ caspase-3, และการแสดงออกของโปรตีน Bax นอกจากนั้นยังต่อต้านการลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 อย่างไรก็ตามผลปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินและ 17β-estradiol อาจไม่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ผ่าน estrogen receptor เนื่องจาก estrogen receptor antagonist ที่จำเพาะเจาะจงไม่สามารถยับยั้งผลดังกล่าวได้ นอกจากนั้นกลไกการปกป้องเซลล์ประสาทอาจไม่อาศัยกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ผ่านระบบ MAPK หรือ PI3K เนื่องจาก MEK หรือ PI3K inhibitor ไม่สามารถยับยั้งผลดังกล่าวได้

โดยสรุป การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกถึงผลปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินในแบบจำลองภาวะประสาทเสื่อมสลายด้วยเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ผลดีเช่นนี้อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ที่เกิดขึ้น กลไกปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินอาจไม่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ผ่าน estrogen receptor แต่เท่าที่ปรากฏอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติ antioxidant และ free radical scavenging อย่างไรก็ตามกลไกที่แน่นอนในการปกป้องเซลล์ประสาทของเควอซิตรินและการประยุกต์ใช้รักษาภาวะประสาทเสื่อมยังไม่เป็นที่ทราบชัด และรอคอยการศึกษาวิจัยขยายความต่อไป

สาขาวิชา....เภสัชศาสตร์ชีวภาพ........... ลายมือชื่อนิสิต....................................

ปีการศึกษา..........2549......................ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา....................................

4476969233 MAJOR : BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES
KEYWORDS: QUERCITRIN / NEUROPROTECTIVE EFFECT / β-AMYLOID / NEUROTOXICITY / HIPPPCAMPAL NEURONAL CULTURE

SADUDEE RATTANAJARASROJ: NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF QUERCITRIN ON β-AMYLOID-INDUCED NEUROTOXICITY IN RAT HIPPOCAMPAL NEURONAL CULTURE THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SURACHAI UNCHERN, Ph.D., 151 pp. ISBN 974-14-2690-9

The main objectives of the present study were to (1) characterize an *in vitro* model of Aβ-induced neurodegeneration in rat primary hippocampal neuronal cultures; (2) investigate the neuroprotective effects of quercitrin on Aβ-induced neurotoxicity in cultured neurons; and (3) elucidate the possible mechanisms of quercitrin that mediate neuroprotection in cultured neurons.

In this connection, immature hippocampal neurons exposed to $A\beta_{25-35}$ in primary culture were employed as the *in vitro* model of neurodegeneration. Neuronal cell injury and death were measured by using MTT reduction and LDH release assays. The production of ROS and lipid peroxidation levels, intracellular GSH levels, SOD and GPx activities were used to investigate the contribution of prooxidant and antioxidant mechanisms in $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity. Caspase-3 activity, Bcl-2 and Bax protein contents, and cytochrome c release were used to investigate the contribution of apoptotic cell death. Quercitrin, a glycosidic member of phytoestrogens, was tested for its potential neuroprotective effects with this *in vitro* neurodegenerative model. Estrogen receptor antagonist, MEK and PI3K inhibitors, were also used to investigate the probable routes of its neuroprotective action.

The present study showed that exposure to $A\beta_{25-35}$ induced a concentration- and exposure time-dependent injury and death to cultured hippocampal neurons. Neither exposure to quercitrin nor exposure to 17β-estradiol at a concentration range of 0.001-100 µM for 72 hr induced cytotoxic effects to cultured hippocampal neurons. Instead, both compounds displayed a certain degree of neuroprotective effect as considered from the following evidence. Co-exposure but not pre-exposure with quercitrin or 17β-estradiol (50-100 µM) attenuated $A\beta_{25-35}$ -induced neuronal injury and prooxidative status. Regarding antioxidative status, co-exposure with 17β-estradiol but not quercitrin significantly improved $A\beta_{25-35}$ -induced reduction in cellular GSH content whereas co-exposure with quercitrin but not 17β-estradiol significantly improved $A\beta_{25-35}$ -induced reduction in GPx activity. However, co-exposure to both compounds displayed no effects on SOD activity.

Neuroprotective effects of quercitrin and 17β-estradiol might involve inhibition of apoptotic cell death mechanisms because both compounds could attenuate $A\beta_{25-35}$ -induced increases in cytochrome c release, caspase-3 activity and Bax protein expression. Moreover, both quercitrin and 17β-estradiol could counteract $A\beta_{25-35}$ -induced decrease in Bcl-2 expression. However, neuroprotective effects of quercitrin and 17β-estradiol might not be related to ER-mediated mechanisms because a specific ER receptor antagonist failed to counteract their protective effects. In addition, their neuroprotection might not mediate through MAPK or PI3K signaling pathway because MEK inhibitor and PI3K inhibitor did not prevent quercitrin- and 17β-estradiol-induced neuroprotection.

In conclusion, we firstly illustrate the potential neuroprotective effect of quercitrin on a neuronal cell culture model of neurodegeneration. This beneficial effect may involve inhibition of ongoing processes of apoptotic cell death. The underlying neuroprotective mechanisms of quercitrin may not relate to estrogen receptor-mediated mechanisms but, apparently, may involve with its antioxidant and free radical scavenging properties. Nevertheless, the exact mechanisms of quercitrin-induced neuroprotection and its potential therapeutic applications in neurondegenerative disorders are still unclear and warrant further investigation.

Field of Study: Biopharmaceutical Sciences. Student's Signature........................

Academic Year.................2006................ Advisor's Signature ....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Surachai Unchern, for his invaluable advice, supervision, encouragement, kindness and support throughout my research study which enable me to accomplish this thesis.

My great appreciation is extended to Assistant Professor Rubporn Kittivachra, Associate Professor Yupin Sanvarinda, Associate Professor Duangdeun Meksuriyen and Assistant Professor Thongchai Sooksawate, the committee members, for their useful and worthy comments and suggestions on this thesis.

I would like to express special thanks to the personnel of Department of Pharmacology, Department of Biochemistry as well as Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their friendship and kind assistances during my thesis work.

My special thanks also extend to my dear classmates, all my friends and laboratory members for their help, sincerity, kindness and friendship.

This study was supported partly by the Graduated Research Funds from the Graduate School, Chulalongkorn University.

Finally, I wish to express my deepest appreciation and infinite gratitude to my father, mother, brother and sister for their love, understanding, moral support that inspire me to complete this work.

CONTENTS

Page

ABSTRACT [THAI].. iv

ABSTRACT [ENGLISH].. v

ACKNOWLEDGEMENTS.. vi

CONTENTS.. vii

LIST OF TABLES.. viii

LIST OF FIGURES.. x

LIST OF ABBREVIATIONS.. xii

CHAPTER

I INTRODUCTION.. 1

II LITERATURE REVIEW.. 7

III MATERIALS AND METHODS.. 30

IV RESULTS.. 51

V DISCUSSION AND CONCLUSIONS.. 84

REFERENCES.. 99

APPENDICES.. 130

VITAE.. 151

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Major subclasses of flavonoids. chemical structures and major food sources... 23
2. The percentage of MTT reduction of $A\beta_{25-35}$-induced injury in cultured hippocampal neurons... 142
3. The percentage of % LDH release of $A\beta_{25-35}$-induced cell death in cultured hippocampal neurons. ... 142
4. The percentage of MTT reduction of cultured hippocampal neurons treated with quercetin for 72 hr. ... 143
5. The percentage of MTT reduction of co-exposure with quercetin at various concentrations for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. ... 143
6. The percentage of MTT reduction of cultured hippocampal neurons treated with quercitrin or 17β-estradiol for 72 hr... 144
7. The percentage of MTT reduction of co-exposure with quercitrin at various concentrations for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. ... 144
8. The percentage of MTT reduction of co-exposure with 17β-estradiol at various concentrations for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. ... 145
9. The percentage of LDH release of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons... 145
10. The percentage of MDA level of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. ... 146
11. The percentage of ROS level of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM at various times on $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. ... 146
12. The percentage of GSH content of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons... 147

Table	Page
13. The SOD activity of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.	147
14. The GPx activity of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.	148
15. The percentage of MTT reduction of pre-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.	148
16. The percentage of MTT reduction of ER antagonist (ICI 182,780) on neuroprotective effect of quercitrin or 17β-estradiol on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons	149
17. The percentage of MTT reduction of MEK inhibitor (PD98059)on neuroprotective effect of quercitrin or 17β-estradiol on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons	149
18. The percentage of MTT reduction of PI3K inhibitor (LY294002) on neuroprotective effect of quercitrin or 17β-estradiol on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons	150
19. Absorbance intensity of caspase-3 activity of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol at 50 and 100 μM for 72 hr on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons	150

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Proposed diagram of neuroprotective effect of genistein in Aβ-induced neurotoxicity...	4
2. Basic flavonoid structure..	18
3. Chemical structures of the three major classes of phytoestrogens compared with those of the estrogens..	18
4. Chemical structures of quercetin (3.3',4,5,7-pentahydroxyflavone) and glycoside quercitrin (quercetin 3-O-rhamnoside)................................	24
5. Preparation of rat hippocampal neuronal cultures	34
6. Molecular structure of MTT and their corresponding reaction products......	39
7. The reactions in lactate dehydrogenase (LDH) assay.........................	40
8. The reaction of thiobarbituric acid (TBA) and malondialdehyde (MDA)....	41
9. The reaction of GSH, GSSG and GSH reductase............................	42
10. Cytotoxic effect of $A\beta_{25-35}$ on cultured hippocampal neurons	52
11. Concentration and time courses of hippocampal neuronal injuries induced by $A\beta_{25-35}$..	53
12. Time courses of hippocampal neuronal cell death induced by $A\beta_{25-35}$........	54
13. Time courses of hippocampal neuronal injuries induced by $A\beta_{25-35}$...........	56
14. Time courses of hippocampal neuronal cell death induced by $A\beta_{25-35}$........	57
15. Effect of quercitrin or 17β-estradiol on mitochondrial activity of cultured...	58
16. Effect of co-exposure with quercitrin on $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons...	60
17. Effect of co-exposure with 17β-estradiol on $A\beta_{25-35}$ –induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons..	61
18. Effect of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons................................	63
19. Effect of coexposure with quercitrin or 17β-estradiol on lipid peroxidation level of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......................	66
20. Effect of coexposure with quercitrin or 17β-estradiol on ROS accumulation of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures............	67

Figure **Page**

21. Effect of coexposure with quercitrin or 17β-estradiol on GSH level of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......... 69

22. Effect of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on superoxide dismutase activity of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......... 70

23. Effect of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on glutathione peroxidase activity of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures...... 71

24. Effect of pre-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.......... 73

25. Effect of ER antagonist (ICI 182780) on neuroprotective effect of quercitrin or 17β-estradiol against $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.......... 75

26. Effect of MEK inhibitor (PD 98059) on neuroprotective effect of quercitrin or 17β-estradiol against $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.......... 77

27. Effect of PI3K inhibitor (LY 294002) on neuroprotective effect of quercitrin or 17β-estradiol against $A\beta_{25-35}$-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons.......... 78

28. Effect of coexposure with quercitrin or 17β-estradiol on caspase-3 activity of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......... 80

29. Effect of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on Bcl-2 protein levels of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......... 81

30. Effect of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on Bax protein levels of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......... 82

31. Effect of co-exposure with quercitrin or 17β-estradiol on cytochrome c release of $A\beta_{25-35}$-exposed hippocampal neuronal cultures.......... 83

32. Schematic diagram of the possible mechanisms of quercitrin or estradiol-mediated neuroprotection in rat primary hippocampal neuronal cultures..... 86

LIST OF ABBREVIATIONS

α	=	alpha
Aβ	=	amyloid β
Ach	=	acetylcholine
AD	=	Alzheimer's disease
Akt/PKB	=	Akt/protein kinase B
APP	=	amyloid precursor protein
β	=	beta
BSO	=	buthionine sulfoximine
Ca^{2+}	=	calcium ion
$[Ca^{2+}]_I$	=	intracellular free calcium concentration
Cat	=	catalase
CREB	=	cAMP-responsive element binding protein
°C	=	degree celcius
DCF	=	2′,7′-dichlorofluorescein
DCFH-DA	=	2′,7′-dichlorofluorescein diacetate
DNase	=	deoxyribonuclease
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DPBS	=	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTNB	=	5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DTT	=	DL-dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	=	ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′,-tetraacetic acid
ER	=	estrogen receptor
et al.	=	*et alii* (and others)
FALS	=	familial amyotrophic lateral sclerosis

FBS	=	fetal bovine serum
γ	=	gamma
G	=	gram
GPx	=	glutathione peroxidase
GSH	=	glutathione
GSSG	=	glutathione disulfide
HCl	=	hydrochloric acid
H_2O_2	=	hydrogen peroxide
hr	=	hour
HRP	=	horseradish peroxidase
HRT	=	hormone replacement therapy
ICE	=	interleukin 1β-converting enzyme
IgG	=	immunoglobulin
κ	=	kappa
L	=	liter
LDH	=	lactate dehydrogenase
MAPK	=	mitogen activated protein kinase
MDA	=	malondialdehyde
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	mililiter
mm	=	milimeter
mM	=	millimolar
MPTP	=	1-methyl-4-phenyl-1,2,4,6-tetrahydropyridine
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NADP	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	=	nanometer
nM	=	nanomolar
NaOH	=	sodium hydroxide
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
nmole	=	nanomole
NO	=	nitric oxide
$^{\bullet}O_2^-$	=	superoxide
OGD	=	oxygen-glucose deprivation
$^{\bullet}OH$	=	hydroxyl radical
PBS	=	phosphate buffered saline
PI3-K	=	phosphatidylinositol 3-phosphate kinase
PKA	=	protein kinase A
pNA	=	*p*-nitroanilide
PVDF	=	polyvinylidine difluoride
RAGE	=	receptor for advanced glycation end-products
ROS	=	reactive oxygen species
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	=	superoxide dismutase
TBA	=	thiobarbituric acid
TBARS	=	thiobarbituric acid reactive substance
TBST	=	Tris buffered saline-tween 20
TEP	=	1, 1, 3, 3,- tetraethoxypropane
TNB	=	5-thio-2-nitrobenzoate
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume