

洛伐他汀对抗 A β O_s 引起的 SH-SY5Y 细胞毒性作用*

谭龙春^{1,2}, 吴昌学^{1,2}, 赵 亮³, 董阳婷^{1,2,4}, 刘仙红^{1,2}, 官志忠^{1,2,4} **

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察洛伐他汀对抗 A β 寡聚体(A β O_s)引起的 SH-SY5Y 细胞毒性作用。方法: 生长至 80% ~ 90% 并用无血清培养基培养 12 h 的 SH-SY5Y 细胞分为对照组、洛伐他汀处理组(0.1 μ mol/L 洛伐他汀处理 24 h)、A β O_s 处理组(0.5 μ mol/L A β O_s 处理 48 h)和洛伐他汀加 A β O_s 处理组(0.1 μ mol/L 洛伐他汀处理 24 h, 再加入 0.5 μ mol/L A β O_s 继续处理 48 h), 采用 CCK-8 法检测各组细胞活性, 使用相应的试剂盒检测细胞超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、丙二醛(MDA)含量。结果: 0.5 μ mol/L A β O_s 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后, 与对照组相比, SH-SY5Y 细胞活性、SOD 及 GSH-Px 活性显著降低, MDA 含量明显增加($P < 0.05$); 在 0.5 μ mol/L A β O_s 处理 SH-SY5Y 细胞前, 先用 0.1 μ mol/L 洛伐他汀处理细胞 24 h, 可减弱 A β O_s 引起的细胞活性、SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 含量的改变($P < 0.05$)。结论: 洛伐他汀可对抗 A β O_s 引起的 SH-SY5Y 细胞毒性作用, 其保护机制可能与抑制氧化应激有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 洛伐他汀; A β 寡聚体; 细胞毒性; 氧化应激; SH-SY5Y 细胞

[中图分类号] R741; R961 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)06-0650-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.06.007

Antagonism of Lovastatin on Cytotoxicity in SH-SY5Y Cells Induced by β -Amyloid Peptide Oligomers

TAN Longchun^{1,2}, WU Changxue^{1,2}, ZHAO Liang³, DONG Yangting^{1,2,4},
LIU Xianhong^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2,4}

(1. The Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Guizhou Medical University, Ministry of Education of P. R. China, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Microbiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of lovastatin on cytotoxicity in SH-SY5Y cells induced by β -Amyloid peptide oligomers (A β O_s). **Methods:** When SH-SY5Y cells were grown to 80% ~ 90% and cultured in serum-free medium for 12 h, they were divided into control group, lovastatin group (0.1 μ mol/L lovastatin for 24 h), A β O_s group (0.5 μ mol/L β O_s for 48 h) and lovastatin + A β O_s group (0.1 μ mol/L lovastatin treated with for 24 h, and then treated with 0.5 μ mol/L A β O_s for 48 h). The cell viability was measured by CCK-8 assay, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) activities and malondialdehyde (MDA) content were measured by appropriate biochemical methods. **Results:** As compared with control group, the cell viability, SOD and GSH-PX activities were significant decreased, while MDA content was significantly increased after SH-SY5Y cells treated with 0.5 μ mol/L A β O_s for 48 h ($P < 0.05$). When SH-SY5Y cells were treated

*[基金项目] 国家自然科学基金(81260173); 教育部“长江学者和创新团队发展计划资助”(IRT13058); 贵州省科技计划[黔科合重大专项(2014)6008号]; 贵州省创新计划项目[黔教合协同创新中心(2014)06]

** 通信作者 E-mail: 1457658298@qq.com

网络出版时间: 2017-6-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170617.2320.007.html>

with 0.1 μmol/L lovastatin for 24 h before treatments of AβOs, these cytotoxicity resulted by AβOs indicated as cell viability, SOD and GSH-PX activity and MDA content were all significantly attenuated ($P < 0.05$). **Conclusions:** Lovastatin could antagonize the cytotoxicity in SH-SY5Y cells caused by AβOs, and the mechanism might relate to the inhibition of oxidative stress.

[**Key words**] Alzheimer disease; lovastatin; β-amyloid peptide oligomers; cytotoxicity; oxidative stress; SH-SY5Y cells

2011 年的流行病学调查显示,全球老年痴呆症的患病率高达 2 400 万^[1]。阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,是老年痴呆最常见的类型之一^[2],占全部痴呆病例的 60% ~ 80%^[3]。AD 主要病理学特征包括细胞外 β 淀粉样肽(β-amyloid peptide, Aβ)沉积导致的老年斑(senile plaques, NPs)、细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)、神经元和突触丢失等^[4], Aβ 是 AD 的重要致病因子之一,研究发现 Aβ 的积累增加了氧化应激反应,导致线粒体功能障碍^[5]。神经元的能量主要来源于氧化磷酸化产生的 ATP,而线粒体又是细胞产生 ATP 的主要场所,因此线粒体功能障碍可引起神经元的损伤及死亡,与 AD 的发生发展密切相关^[6]。有报道指出胆固醇的增加也是引起 Aβ 生成的重要原因^[7],他汀类药物是胆固醇合成的限速酶羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA reductase)抑制剂,能抑制胆固醇的合成,降低 Aβ 的生成^[8];他汀类药物不仅可以减少血液中胆固醇水平,还可以对细胞凋亡及氧化应激反应等过程产生拮抗作用^[9]。Aβ 寡聚体(β-Amyloid peptide oligomers, AβOs)是产生神经毒性的主要 Aβ 形式,细胞和动物模型实验结果表明,与单体和纤维体相比, AβOs 的毒性更强^[10]。本研究采用洛伐他汀及 AβOs 联合处理人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y),测定细胞活性、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、氧自由基(OH⁻、H₂O₂、O₂^{·-})水平的变化,探讨洛伐他汀对抗 AβOs 细胞毒性的作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂

实验细胞为人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y (由课题组保存),主要试剂有胎牛血清(美国 Gibco 公司),洛伐他汀、Aβ1-42 和六氟异丙醇(美国 Sigma 公司),DMEM-F12 培养基、胰蛋白酶、青霉

素及链霉素(上海 Hyclone 公司),CCK-8 试剂盒(日本 Dojindo 公司),ECL 试剂盒(美国 Millipore 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗鼠二抗(美国 Cell Signaling 公司),鼠抗 Aβ 多克隆抗体 6E10(美国 Covance 公司),SOD、GSH-Px 及 MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y 细胞的培养 从液氮罐中取出冻存的 SH-SY5Y 细胞,快速放入 37 ℃ 水浴箱中摇动 1 ~ 2 min 使其快速融化,迅速转入含 10 mL 培养液的 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素 100 000 U/L,链霉素 100 000 U/L)的 DMEM-F12 培养基,用滴管轻轻吹打,使细胞重悬,然后把细胞悬液转入底面积为 25 cm² (T25) 的细胞培养瓶中,并放入 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞贴壁生长到 80% ~ 90% 后用胰蛋白酶消化传代。另外,用细胞冻存液(90% 胎牛血清,10% DMSO,现用现配)置于细胞梯度冻存盒内,放至 -80 ℃ 过夜,次日转入 -196 ℃ 液氮中保存。

1.2.2 AβOs 的制备 参考文献[11]中的方法制备 AβOs。Aβ1-42 粉末溶于六氟异丙醇中,使其终浓度为 0.1 mmol/L,将其等量分装至 1.5 mL 离心管内,通风厨内室温过夜风干,待六氟异丙醇完全挥发后离心(管底部可见清晰透明的薄膜),将其放置 -80 ℃ 冰箱内保存备用。需要使用前加入少量 DMSO 充分溶解,并用不含酚红的 DMEM-F12 培养基稀释使其终浓度为 10 μmol/L。4 ℃ 孵育 24 h,然后用 4 ℃ 高速冷冻离心机 14 000 r/min 离心 10 min,取上清,即得 AβOs。

1.2.3 AβOs 的鉴定 采用蛋白印迹法(Western blot)鉴定,使用 4% ~ 12% 的 Bis-Tris 预制梯度胶,将制备好的 AβOs 与含还原剂的上样缓冲液混合后,70 ℃ 加热 10 min,然后加入至预制胶孔中进行电泳,电泳结束后,取出凝胶,用 0.22 μm 的 PVDF 膜转膜,以 120 V 稳压,冰上转膜约 120 min。转膜结束后,TBST 洗膜 3 次 × 5 min,封闭液封闭 2 h,

加入小鼠抗 A β 6E10 抗体,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次 \times 5 min,加入辣根过氧化酶标记的抗小鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次 \times 5 min,最后用 ECL 发光试剂观察 A β O s 表达。

1.2.4 SH-SY5Y 细胞活性测定 采用 CCK-8 法,SH-SY5Y 细胞以 1×10^8 个/L 浓度接种于 96 孔板中,不同浓度药物处理细胞,每个浓度设 5 个复孔,每孔加细胞悬液 100 μ L,培养至计划时间后,将每孔原始培养基取出,置换为不含血清及药物的纯培养基 100 μ L,空白对照组加入无细胞纯培养基 100 μ L,于每孔中加入 CCK-8 试剂 10 μ L,37 ℃ 孵育 2 h,450 nm 波长测定吸光度值,计算 SH-SY5Y 细胞活性。

1.2.5 实验分组 SH-SY5Y 细胞以 5×10^8 个/L 接种于 6 孔细胞培养板中培养,细胞生长至 80% ~ 90%,更换成无血清培养基培养 12 h,根据处理方式不同将细胞分为 4 组:对照组、洛伐他汀处理组(0.1 μ mol/L 洛伐他汀处理 24 h)、A β O s 处理组(0.5 μ mol/L A β O s 处理 48 h)和洛伐他汀加 A β O s 处理组(0.1 μ mol/L 洛伐他汀处理 24 h,再加入 0.5 μ mol/L A β O s 继续处理 48 h)。

1.2.6 SOD、GSH-PX 活性及 MDA 含量 取 1.2.5 项下培养的 SH-SY5Y 细胞,弃上清液后 PBS 缓冲液洗 3 次,加入预冷 PBS,刮下细胞,4 ℃ 温度下 14 000 r/min 离心 10 min,收集细胞沉淀,加入 PBS,并用匀浆器破碎细胞,置于冰上备用。采用羟胺法检测 SOD 活性,过氧化氢酶活性法检测 GSH-PX 活性,硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量。按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A β O s 鉴定

Western Blot 结果显示,A β O s 有未聚合的单体(4 kDa);有聚合好的 A β O s ,含有低分子量的 A β O s ,包括二聚体(8 kDa)、三聚体(12 kDa)及四聚体(16 kDa),也有高分子量的 A β O s ,包括九聚体(36 kDa)、十二聚体(48 kDa)等。见图 1。

2.2 洛伐他汀及 A β O s 作用浓度的选择

CCK-8 试验结果显示,1 μ mol/L 洛伐他汀作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,细胞存活率显著低于对照组($P < 0.01$),而 0.1 μ mol/L 洛伐他汀作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h 后细胞存活率与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.01$);0.5 μ mol/L A β O s 作用于 SH-SY5Y 细胞 48 h,细胞存活率显著低于对照组($P < 0.01$),所以,后续研究中,选择 0.1 μ mol/L 洛伐他汀或(和)0.5 μ mol/L A β O s 处理细胞。见图 2。

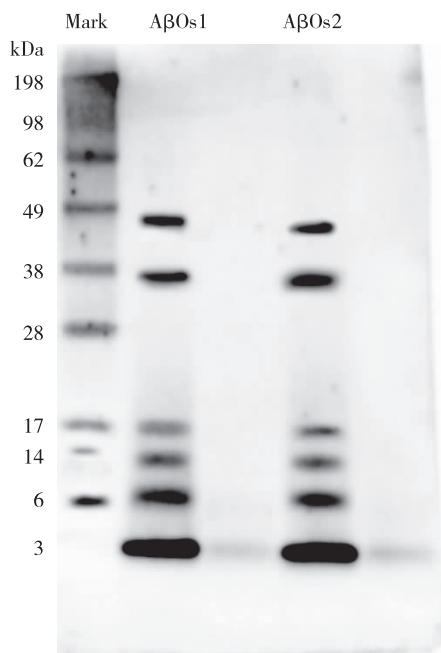


图 1 A β O s 鉴定结果(Western blot)

Fig. 1 Western blotting result showing structural characteristics of A β_{1-42} Oligomers

2.3 洛伐他汀拮抗 A β O s 对细胞活性的影响

CCK-8 试验结果显示,0.5 μ mol/L A β O s 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后,与对照组比较,细胞存活率显著降低($P < 0.01$);用 0.1 μ mol/L 洛伐他汀预处理细胞 24 h 后再加入 0.5 μ mol/L A β O s ,可减轻 A β O s 引起的细胞存活率下降($P < 0.05$),见图 3。

2.4 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量

0.5 μ mol/L A β O s 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后,与对照组相比,SOD 和 GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量明显增加($P < 0.05$);用 0.1 μ mol/L 洛伐他汀预处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后再加入 0.5 μ mol/L A β O s 处理细胞,可减弱 A β O s 引起的

SOD 和 GSH-Px 活性降低及 MDA 含量升高的作

用,见表 1。

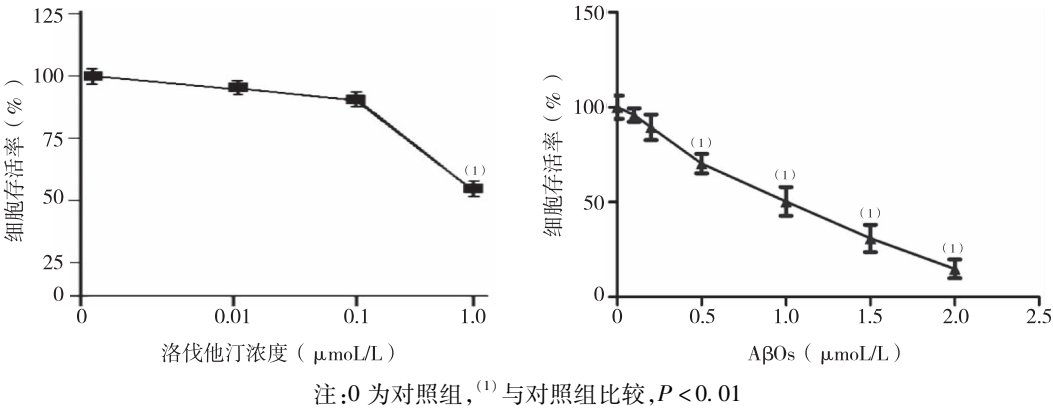


图 2 不同浓度洛伐他汀或 AβOs 对 SH-SY5Y 细胞活性的影响 (CCK-8)

Fig. 2 The effect of lovastatin at different concentrations and AβOs on cell viability of SH-SY5Y cells

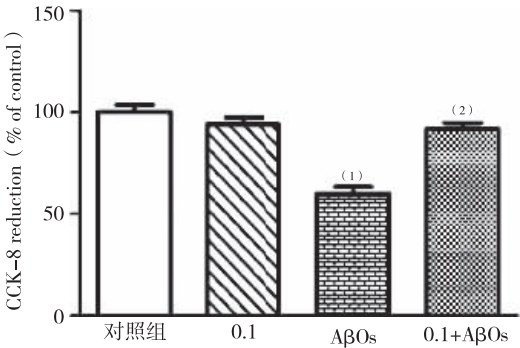


图 3 洛伐他汀拮抗 AβOs 对细胞活性的影响 (CCK-8)

Fig. 3 Antagonism of lovastatin to influence of AβOs on cell viability in SH-SY5Y cells

表 1 洛伐他汀对 AβOs 处理后 SH-SY5Y 细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响

Tab.1 Influence of lovastatin on SOD and GSH-Px activities and MDA content in AβOs treated SH-SY5Y cells

组别	AβOs 处理后 SH-SY5Y 细胞匀浆		
	SOD (U/mg · prot)	GSH-Px (U/mg · prot)	MDA (μmol/g · prot)
对照组	51.05 ± 8.20	113.42 ± 6.69	20.74 ± 3.61
0.1	22.93 ± 4.64 ⁽¹⁾	67.20 ± 8.51 ⁽¹⁾	30.18 ± 4.32 ⁽¹⁾
AβOs	54.01 ± 7.00	118.04 ± 4.65	17.92 ± 3.71
0.1 + AβOs	48.09 ± 7.29 ⁽²⁾	106.47 ± 6.76 ⁽²⁾	21.55 ± 2.38 ⁽²⁾

注:0.1 表示洛伐他汀浓度为 0.1 μmol/L, AβOs 处理浓度为 0.5 μmol/L; ⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与 AβOs 处理组比较, $P < 0.05$

3 讨论

由于他汀类药物具有抑制羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的活性,通过抑制此酶活性可以阻断胆固醇合成,因此,他汀类药物被用于治疗血脂代谢异常引起的疾病^[12]。除了作为降血脂药物,他汀类药物也被认为是治疗和预防 AD 的潜在药物^[13]。研究表明,胆固醇水平升高和代谢改变与 AD 的发生密切相关^[14]。流行病学研究数据显示,服用他汀类药物治疗高血压和心脏病的老年人,痴呆和认知损害的发生率低于未服药人群,说明他汀类药物能够降低 AD 的发病风险^[15]。他汀类药物在预防 AD 中的作用机制,可能与减少 Aβ、β-位点 APP 切割酶 (β-Site APP-cleaving enzyme 1, BACE1) 水平及氧化应激等有关^[16]。然而,随机临床试验并没有显示他汀类药物对认知功能有任何作用,其在 AD 治疗中的重要性仍需要讨论^[17]。要明确他汀类药物对 AD 治疗是否有效,还需要更多流行病学及临床研究来验证。氧化应激是由机体内氧化还原系统不平衡引起的,包括产生过多的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和抗氧化系统的功能障碍^[18]。体内的抗氧化系统主要有酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统。酶抗氧化系统包括过氧化氢酶 (catalase, CAT)、SOD、GSH-Px 等。非酶抗氧化系统主要包括谷胱甘肽、维生素 C、维生素 E 等。神经退行性疾病如 AD 的病因尚未完全阐明,但氧化应激被认为是神经退行性疾病中潜在的常见病因之一。以往关于 AD 的研究显示, Aβ 可沉积在线粒体中,这可能会影响线粒体

的呼吸功能,增加活性氧的产生,并引起线粒体膜电位的改变^[19-20]。 $A\beta$ 诱导氧化应激反应,引起细胞膜上不饱和脂肪酸的过氧化,进一步破坏膜蛋白的功能,从而改变细胞膜流动性^[21]。

本研究显示, $A\beta$ Os 的相对分子质量有 4、8、12 和 16 kDa 等形式,这表明 $A\beta$ Os 不仅以单体和纤维状聚合体形式存在,还以二聚体、三聚体和四聚体等寡聚体形式存在^[22]。多种 $A\beta$ 1-42 寡聚体能与非神经元及神经元细胞膜上的多种成分,包括脂类、离子通道、受体等相结合引起一系列复杂的突触、神经元和神经网络功能及结构的异常,导致学习、记忆等行为异常^[23-25]。AD 大鼠动物模型中,向大鼠海马注射 $A\beta$ 1-42 寡聚体可引起学习记忆功能障碍和神经元损伤,其认知功能障碍和神经元损伤密切相关,且 $A\beta$ 1-42 寡聚体毒性比 $A\beta$ 1-42 纤维体更强^[26]。本实验发现 0.5 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ Os 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后,产生明显的细胞毒性和氧化应激反应,包括细胞存活率、SOD 和 GSH-Px 活性明显下降,MDA 含量明显增加,提示 $A\beta$ Os 可引起神经细胞的氧化应激水平升高,这可能是 $A\beta$ 参与 AD 发生发展的重要环节。有趣的是,本实验预先用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,再加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ Os 处理细胞 48 h,可观察到由 $A\beta$ Os 引起的细胞毒性及氧化应激作用被洛伐他汀减弱,与 $A\beta$ Os 处理组相比,细胞存活率、SOD 和 GSH-Px 活性显著上升,MDA 含量明显下降,提示洛伐他汀可缓解 $A\beta$ Os 引起的细胞存活率、SOD 及 GSH-Px 活性、MDA 含量的改变。上述结果提示,洛伐他汀可能具有对抗 $A\beta$ Os 引起的细胞毒性作用,其机制可能是增加细胞存活率及 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量等有关。这为寻找治疗 AD 的药物靶点提供了一定的理论依据。

4 参考文献

- [1] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2011(8): 137-152.
- [2] YG, JD, CB, et al. $A\beta$ 42 oligomers modulate β -secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1 [J]. *Scientific Reports*, 2016(6):186-194.
- [3] Association AS. 2015 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimer's & Dementia the Journal of the Alzheimer's Association*, 2015(3):332-384.
- [4] Vinters HV. Emerging concepts in Alzheimer's disease[J]. *Pathology: Mechanisms of Disease*, 2015(10):291-319.
- [5] Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration [J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2012(3):428010-428030.
- [6] Ankarcrona M, Mangialasche F, Winblad B. Rethinking Alzheimer's disease therapy: are mitochondria the key [J]. *Journal of Alzheimer's Disease* Jad, 2010(suppl 2):579-590.
- [7] Kellick KA, Bottorff M, Toth PP. A clinician's guide to statin drug-drug interactions [J]. *Journal of Clinical Lipidology*, 2014(3):30-46.
- [8] Carlsson CM, Xu G, Wen Z, et al. Effects of atorvastatin on cerebral blood flow in middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease: a pilot study [J]. *Current Alzheimer Research*, 2012(8):990-997.
- [9] Ai H, Araki W, Oda A, et al. Statins reduce amyloid β -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons [J]. *Neurochemical Research*, 2013(3):589-600.
- [10] Neuroscience N. The toxic $A\beta$ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes [J]. *Nature Neuroscience*, 2012(3):349-357.
- [11] Nichols MR, Colvin BA, Hood EA, et al. Biophysical comparison of soluble Amyloid- β (1-42) protofibrils, oligomers, and protofilaments [J]. *Biochemistry*, 2015(13):2193-2204.
- [12] Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006(1):71-105.
- [13] Kandiah N, Feldman HH. Therapeutic potential of statins in Alzheimer's disease [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2009(1-2):230-234.
- [14] Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies [J]. *Archives of Neurology*, 2011(10):1239-1244.
- [15] KR, MS, BF, et al. Statins and cognitive function: a systematic review [J]. *Annals of Internal Medicine*, 2013(10):688-697.
- [16] Barone E, Cenini G, Di DF, et al. Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action [J]. *Pharmacological Research*, 2011(3):172-180.

(下转第 660 页)

增加,分别从 5.085% 增加至 9.861%,19.705% 增加至 29.549%;蒎烯的含量随着时间呈现波动趋势,先增加后减少,提取时间 1 h 的含量为 3.088%,提取时间 5 h 的含量为 4.239%,提取时间 7 h 的含量为 3.112%;1,8-桉叶油醇与松油烯-4-醇随着提取时间的延长,含量明显降低,分别从 4.797% 降至 0.248%,2.391% 降至 0.670%,提示若需将这些不稳定的物质最大化提取出来,需要严格控制提取时间。因此采用稳定的工艺提取的样品进行相关研究和产品的深入研发,具有重要意义。

4 参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵州:贵州科技出版社, 2003:187.
 - [2] 陈训,黄龙华,龙成昌,等. 艳山姜(土砂仁)与几种“砂仁”的鉴别[J]. 贵州科学, 2004(4):53-55.
 - [3] 沈祥春,胡函帅,肖海涛. GC-MS 法分析艳山姜根茎、茎、叶及果实等部位挥发油化学成分[J]. 药物分析杂志, 2010(8):1399-1403.
 - [4] 陶玲,沈祥春,彭佼,等. 艳山姜全果及不同部位挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 中成药, 2009(6):909-911.
 - [5] Tao L, Hu HS, Shen XC. Endothelium-dependent vasodilation effects of the essential oil from Fructus Alpiniae Zerumbet (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings *in vitro* [J]. *Phytomedicine*, 2013(5):387-393.
 - [6] 文波,令狐克刚,徐旖旎,等. 艳山姜挥发油抑制 JNK1/2/3 磷酸化对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015(22):112-115.
 - [7] Chen Y, Li D, Xu Y, et al. Essential oils from Fructus A. zerumbet protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by ox-LDL *in vitro* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014:956824-956833.
 - [8] 张彦燕,文波,陶玲,等. 艳山姜挥发油对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2014(4):66-68.
 - [9] 徐旖旎,姜丰,李守巧. 正交试验法优选大蝎子草总黄酮提取工艺[J]. 贵阳医学院学报, 2016(1):41-44.
 - [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京:中国医药科技出版社, 2015:203.
 - [11] 伍振峰,王赛君,杨明,等. 中药挥发油提取工艺与装备现状及问题分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014(14):224-228.
 - [12] Soichiro M, Koichi O, Takashi M. 1,8-Cineole Ameliorates Steatosis of Pten Liver Specific KO Mice via Akt Inactivation[J]. *Int J Mol Sci*, 2015(16):12051-12063.
 - [13] 张彦燕,令狐克刚,陈妍,等. 正交试验法研究艳山姜挥发油保护脂多糖诱导 HUVEC 损伤的活性组分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014(20):9-12.
 - (2017-02-25 收稿, 2017-05-23 修回)
 - 中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华
-
- (上接第 654 页)
- [17] Butterfield DA, Barone E, Mancuso C. Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders[J]. *Pharmacological Research*, 2011(3):180-186.
 - [18] Ha KG, Kim JE, Jeong RS, et al. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases[M]. Springer New York, 2015:151-167.
 - [19] Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2013(6):316523-316540.
 - [20] Picone P, Nuzzo D, Caruana L, et al. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy[J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2014(2):780179-780192.
 - [21] 赵虹,骆庆和,殷明,等. 氧化应激与阿尔茨海默病[J]. 中国老年学, 2013(16):4090-4093.
 - [22] Larson ME, Lesné SE. Soluble A β oligomer production and toxicity[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2012:125-139.
 - [23] Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior[J]. *Behavioural Brain Research*, 2008(1):106-113.
 - [24] Yankner BA, Lu T. Amyloid β -protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008(8):4755-4759.
 - [25] Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012(7):a6338.
 - [26] 黄海,陈丽君,陈立艺,等. A β 1-42 寡聚体对大鼠认知功能的影响和神经毒性分析[J]. 解剖学杂志, 2015(6):698-701.
 - (2017-02-20 收稿, 2017-05-23 修回)
 - 中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆