

# 洛伐他汀对抗 A $\beta$ O<sub>s</sub> 引起的 SH-SY5Y 细胞毒性作用\*

谭龙春<sup>1,2</sup>, 吴昌学<sup>1,2</sup>, 赵亮<sup>3</sup>, 董阳婷<sup>1,2,4</sup>, 刘仙红<sup>1,2</sup>, 官志忠<sup>1,2,4</sup> \*\*

(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 $\beta$  寡聚体 (A $\beta$ O<sub>s</sub>) 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  $\mu$ mol/L 洛伐他汀处理 24 h)、A $\beta$ O<sub>s</sub> 处理组 (0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O<sub>s</sub> 处理 48 h) 和洛伐他汀加 A $\beta$ O<sub>s</sub> 处理组 (0.1  $\mu$ mol/L 洛伐他汀处理 24 h, 再加入 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O<sub>s</sub> 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  $\mu$ mol/L A $\beta$ O<sub>s</sub> 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  $\mu$ mol/L A $\beta$ O<sub>s</sub> 处理 SH-SY5Y 细胞前, 预先用 0.1  $\mu$ mol/L 洛伐他汀处理细胞 24 h, 可减弱 A $\beta$ O<sub>s</sub> 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 $\beta$ O<sub>s</sub> 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 $\beta$  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 $\beta$ -Amyloid Peptide Oligomers

TAN Longchun<sup>1,2</sup>, WU Changxue<sup>1,2</sup>, ZHAO Liang<sup>3</sup>, DONG Yangting<sup>1,2,4</sup>,  
LIU Xianhong<sup>1,2</sup>, GUAN Zhizhong<sup>1,2,4</sup>

(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  $\beta$ -Amyloid peptide oligomers (A $\beta$ O<sub>s</sub>). **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  $\mu$ mol/L lovastatin for 24 h), A $\beta$ O<sub>s</sub> group (0.5  $\mu$ mol/L  $\beta$ O<sub>s</sub> for 48 h) and lovastatin + A $\beta$ O<sub>s</sub> group (0.1  $\mu$ mol/L lovastatin treated with for 24 h, and then treated with 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O<sub>s</sub> 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  $\mu$ mol/L A $\beta$ O<sub>s</sub> 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 [黔科合重大专项字 (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  $\mu\text{mol/L}$  lovastatin for 24 h before treatments of A $\beta$ O<sub>s</sub>, these cytotoxicity resulted by A $\beta$ O<sub>s</sub> 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 A $\beta$ O<sub>s</sub>, and the mechanism might relate to the inhibition of oxidative stress.

[**Key words**] Alzheimer disease; lovastatin;  $\beta$ -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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>,占全部痴呆病例的 60% ~ 80%<sup>[3]</sup>。AD 主要病理学特征包括细胞外  $\beta$  淀粉样肽 ( $\beta$ -amyloid peptide, A $\beta$ ) 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<sup>[4]</sup>, A $\beta$  是 AD 的重要致病因子之一,研究发现 A $\beta$  的积累增加了氧化应激反应,导致线粒体功能障碍<sup>[5]</sup>。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<sup>[6]</sup>。有报道指出胆固醇的增加也是引起 A $\beta$  生成的重要原因<sup>[7]</sup>,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 A $\beta$  的生成<sup>[8]</sup>;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<sup>[9]</sup>。A $\beta$  寡聚体 ( $\beta$ -Amyloid peptide oligomers, A $\beta$ O<sub>s</sub>) 是产生神经毒性的主要 A $\beta$  形式,细胞和动物模型实验结果表明,与单体和纤维体相比, A $\beta$ O<sub>s</sub> 的毒性更强<sup>[10]</sup>。本研究采用洛伐他汀及 A $\beta$ O<sub>s</sub> 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 ( $\text{OH}^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) 水平的变化,探讨洛伐他汀对抗 A $\beta$ O<sub>s</sub> 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、A $\beta$ 1-42 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 A $\beta$  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  $^{\circ}\text{C}$  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  $\text{cm}^2$  (T25) 的细胞培养瓶中,并放入 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  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  $^{\circ}\text{C}$  过夜,次日转入 -196  $^{\circ}\text{C}$  液氮中保存。

**1.2.2 A $\beta$ O<sub>s</sub> 的制备** 参考文献 [11] 中的方法制备 A $\beta$ O<sub>s</sub>。A $\beta$ 1-42 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  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{mol/L}$ 。4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 h,然后用 4  $^{\circ}\text{C}$  高速冷冻离心机 14 000 r/min 离心 10 min,取上清,即得 A $\beta$ O<sub>s</sub>。

**1.2.3 A $\beta$ O<sub>s</sub> 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 A $\beta$ O<sub>s</sub> 与含还原剂的上样缓冲液混合后,70  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\times$  5 min,封闭液封闭 2 h,

加入小鼠抗 A $\beta$  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 $\beta$ 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  $1 \times 10^8$  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  $\mu$ 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  $\mu$ L, 空白对照组加入无细胞纯培养基 100  $\mu$ L, 于每孔中加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ 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  $5 \times 10^8$  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  $\mu$ mol/L 洛伐他汀处理 24 h)、A $\beta$ O $_s$  处理组 (0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O $_s$  处理 48 h) 和洛伐他汀加 A $\beta$ O $_s$  处理组 (0.1  $\mu$ mol/L 洛伐他汀处理 24 h, 再加入 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ 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 $\beta$ O $_s$ 鉴定

Western Blot 结果显示, A $\beta$ O $_s$  有未聚合的单体 (4 kDa); 有聚合好的 A $\beta$ O $_s$ , 含有低分子量的 A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ O $_s$ 作用浓度的选择

CCK-8 试验结果显示, 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ mol/L A $\beta$ 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  $\mu$ mol/L 洛伐他汀或 (和) 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O $_s$  处理细胞。见图 2。

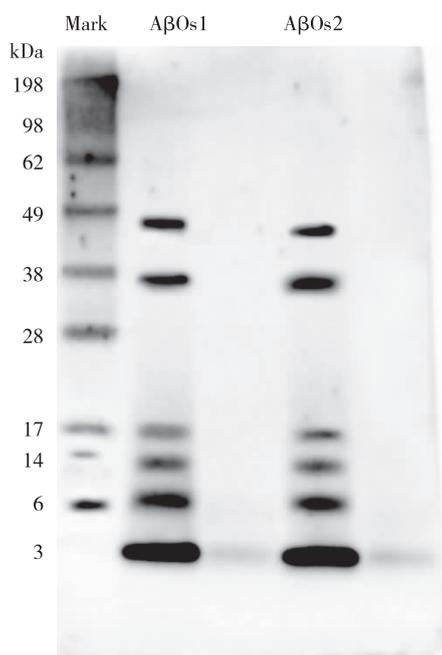


图 1 A $\beta$ O $_s$  鉴定结果 (Western blot)

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

### 2.3 洛伐他汀拮抗 A $\beta$ O $_s$ 对细胞活性的影响

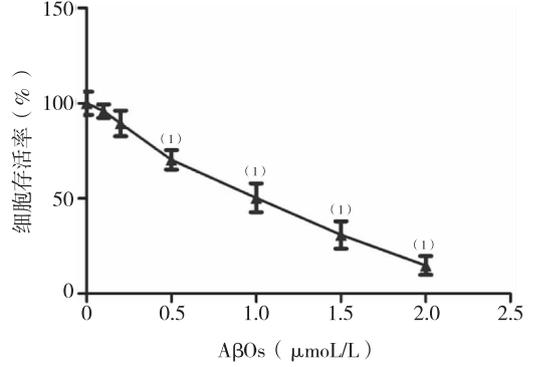
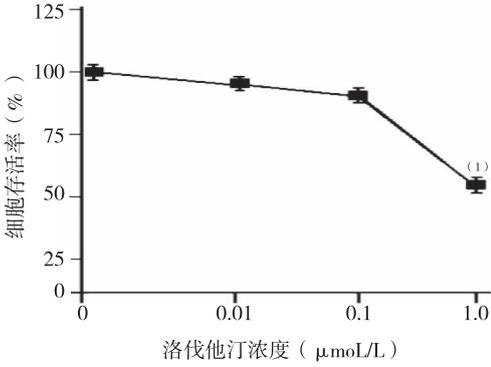
CCK-8 试验结果显示, 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O $_s$  处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后, 与对照组比较, 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ); 用 0.1  $\mu$ mol/L 洛伐他汀预处理细胞 24 h 后再加入 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O $_s$ , 可减轻 A $\beta$ O $_s$  引起的细胞存活率下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 2.4 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量

0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ 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  $\mu$ mol/L 洛伐他汀预处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后再加入 0.5  $\mu$ mol/L A $\beta$ O $_s$  处理细胞, 可减弱 A $\beta$ O $_s$  引起的

SOD 和 GSH-Px 活性降低及 MDA 含量升高的作

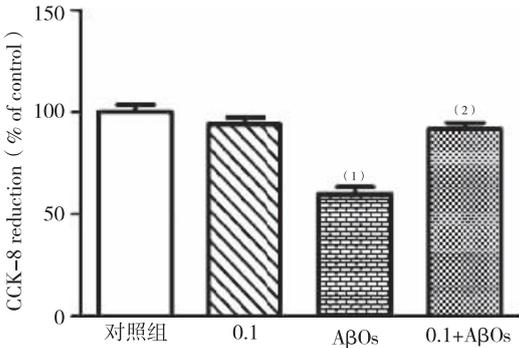
用,见表 1。



注:0 为对照组, <sup>(1)</sup>与对照组比较,  $P < 0.01$

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



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

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 <sup>(1)</sup>	67.20 ± 8.51 <sup>(1)</sup>	30.18 ± 4.32 <sup>(1)</sup>
AβOs	54.01 ± 7.00	118.04 ± 4.65	17.92 ± 3.71
0.1 + AβOs	48.09 ± 7.29 <sup>(2)</sup>	106.47 ± 6.76 <sup>(2)</sup>	21.55 ± 2.38 <sup>(2)</sup>

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; <sup>(1)</sup>与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>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<sup>[12]</sup>。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<sup>[13]</sup>。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<sup>[14]</sup>。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<sup>[15]</sup>。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<sup>[16]</sup>。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<sup>[17]</sup>。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<sup>[18]</sup>。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<sup>[19-20]</sup>。 $A\beta$  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<sup>[21]</sup>。

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<sup>[22]</sup>。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<sup>[23-25]</sup>。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<sup>[26]</sup>。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  $\beta$ -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]. *Alzheimers & Dementia the Journal of the Alzheimers 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] Ankarcona M, Mangialasche F, Winblad B. Rethinking Alzheimer's disease therapy: are mitochondria the key [J]. *Journal of Alzheimers 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  $\beta$ -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- $\beta$ (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%; 萜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 vasodilatation 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 $\beta$  oligomer production and toxicity [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2012:125-139.
- [23] Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid  $\beta$ -protein impair synaptic plasticity and behavior [J]. *Behavioural Brain Research*, 2008(1):106-113.
- [24] Yankner BA, Lu T. Amyloid  $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\beta$ 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