

乌头碱抑制 GSK-3 β 对抗 β 淀粉样蛋白诱导的神经细胞损伤

卫智权^{1#}, 包传红^{2#}, 陈仪新², 阎莉^{3*}

¹广西中医药大学 广西中医基础重点实验室; ²广西中医药大学 广西中药药效重点实验室;

³广西中医药大学壮医药学院, 南宁 530200

摘要:本研究旨在探讨乌头碱抑制糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 对抗 β 淀粉样蛋白片段 1-40 ($A\beta_{1-40}$) 诱导的神经细胞损伤的药理作用。基于细胞安全性测试设置 5 nmol/L 为后续实验的乌头碱适宜浓度。以 20 μ mol/L 的 $A\beta_{1-40}$ 孵育 24 h 建立 SH-SY5Y 神经细胞损伤细胞模型。设置 3 个实验分组: 正常对照组、 $A\beta_{1-40}$ 细胞损伤模型对照组、乌头碱干预组, 后者以 5 nmol/L 的乌头碱预孵育 12 h。ELISA 检测细胞培养上清液乳酸脱氢酶 (LDH), 流式细胞术分析细胞凋亡与坏死, Western blotting 检测细胞 GSK-3 β 磷酸化水平。结果显示, 乌头碱干预组细胞培养上清液 LDH 水平、细胞凋亡率与坏死率以及细胞的 GSK-3 β 磷酸化水平均显著低于模型对照组, 提示乌头碱可显著减轻 $A\beta_{1-40}$ 导致的细胞损伤, 此作用可能与其抑制 GSK-3 β 过磷酸化有关。

关键词: 乌头碱; 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; 糖原合成酶激酶 3 β ; 神经细胞损伤

中图分类号: R966; R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2021) 5-0831-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.5.015

Aconitine attenuates neuronal damage induced by β -amyloid via inhibition of GSK-3 β

WEI Zhi-quan^{1#}, BAO Chuan-hong^{2#}, CHEN Yi-xin², YAN Li^{3*}

¹Guangxi Key Laboratory of Chinese Medicine Foundation Research, Guangxi University of Chinese Medicine;

²Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine;

³Zhuang Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: This research was designed to investigate the pharmacological effects of aconitine on attenuating neuronal damage induced by amyloid β protein fragment 1-40 ($A\beta_{1-40}$) via inhibition of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). Based on cell safety tests, 5 nmol/L was set as the appropriate concentration of aconitine used in following experiments. A cell-damage model was established by incubating SH-SY5Y cells with $A\beta_{1-40}$ (20 μ mol/L) for 24 hours. 3 experimental groups were set up: the normal control, $A\beta_{1-40}$ -damaged cell model control and aconitine-treated group, while the last group was pre-treated with aconitine (5 nmol/L) for 12 hours. The lactate dehydrogenase (LDH) in cell culture supernatant was measured using ELISA. The apoptosis and necrosis were analyzed by flow cytometry. The cell GSK-3 β protein phosphorylation was detected by Western blotting. Compared with the Model, the significantly lower LDH in cell culture supernatant, cell apoptosis or necrosis rate and phosphorylated GSK-3 β levels were detected in the aconitine-treated group. These data suggested that aconitine can substantially alleviate the neuronal damage caused by $A\beta_{1-40}$, and the benefit may be related to the inhibition of GSK-3 β hyper-phosphorylation by aconitine.

Key words: aconitine; Alzheimer's disease; β -amyloid protein; glycogen synthase kinase-3 β ; neuronal damage

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最

主要的中枢神经退行性疾病之一, 以进行性认知功能障碍和行为损害为特征, 伴随社会老龄化程度的逐渐加深, 已经成为全球性的公共卫生问题^[1]。国际阿尔茨海默病协会发布的世界阿尔茨海默病报告的数据显示, 全球共有约 5 000 万 AD 患者, 预计到

收稿日期: 2020-08-03 接受日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金 (81573938); 广西中医基础重点实验室开放课题 (16-380-58-09, K201137907)

* 通信作者 Tel: 86-013878868617; E-mail: mimaotoo@163.com

共同第一作者

2030 年将达到 8 200 万,到 2050 年将达 1.52 亿。神经组织 β 淀粉样蛋白(beta-amyloid protein, $A\beta$) 异常增加不仅被认为是 AD 的主要病理变化之一,也是导致 AD 神经细胞损伤的重要原因^[2]。关于 $A\beta$ 的神经细胞毒性的研究证据不断累积,然而,已经完成的数个特异性清除 $A\beta$ 的药物临床试验均以失败告终,使得药物研发人员的注意力重新转向增强神经细胞对 $A\beta$ 细胞毒作用的耐受能力,但是目前尚未有商品化的相应新药推出^[3]。

中医药治疗 AD 具有较好的改善患者认知能力的效果。对于 AD 的病因病机的认识,中医扶阳学派认为,“阴化太过,阳化不足,内生浊邪”是 AD 的主要病因病机,“元阳虚衰”、“阳虚阴实”在 AD 的发生发展过程中发挥了主导性的作用^[4]。附子被誉为中药“回阳救逆第一品”,具有显著的补火助阳功效,为中医扶阳学派广泛用于 AD 的临床治疗,创制了五脏温阳化痰汤等一批临床应用疗效较好的复方制剂^[5]。乌头碱(aconitine)为附子的重要活性成分,既有的研究发现乌头碱具有强心、镇痛、抗肿瘤、免疫调节等药理作用,其药理作用机制与激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)有关^[6-8]。糖原合成酶激酶 3β (glycogen synthase kinase- 3β , GSK- 3β)是 PI3K 信号转导途径负调控的重要的下游靶激酶, Tyr216 位点磷酸化的 GSK- 3β 为其活化形式, $A\beta$ 诱导的 GSK- 3β 过度活化被认为是 AD 进程中神经细胞损伤的重要原因之一^[9]。迄今为止,尚无证据表明乌头碱能够减轻 $A\beta$ 介导的 GSK- 3β 过磷酸化而导致的神经细胞损伤。

本研究采用 $A\beta_{1-40}$ 体外诱导 SH-SY5Y 神经细胞损伤的细胞模型,探讨乌头碱是否基于调控 GSK- 3β 的 Tyr216 位点磷酸化水平而发挥神经细胞保护作用,有助于在分子水平理解中药附子用于 AD 临床治疗的分子机制。

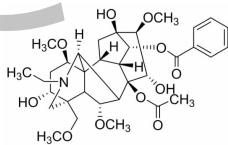


图 1 乌头碱的结构

Fig. 1 Structure of aconitine

1 材料

1.1 实验细胞株

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株,购自中国科

学院昆明细胞库。

1.2 主要试剂

乌头碱(美国 Sigma 公司,批号 16938); $A\beta_{1-40}$ (美国 Sigma 公司,批号 028M4864V); DMEM 高糖细胞培养基(美国 Gibco 公司,批号 1896978); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司,批号 1828728); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(美国 Gibco 公司,批号 8117266); Accutase 胶原酶细胞解离液(美国 eBioscience 公司,批号 E00023-1662); CCK-8 细胞增殖活性检测试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 DV652)。人乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) ELISA 检测试剂盒(武汉华美公司,批号 H05016505); AnnexinV-Alexa Fluor 488/PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝公司,批号 20181219); 组织细胞 RIPA 裂解液(北京索莱宝公司,批号 20190903); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝公司,批号 20190910); 蛋白电泳预制胶(北京索莱宝公司,批号 20190923)。兔抗人 GSK- 3β 单抗(美国 Abcam 公司,批号 GR312697-8); 兔抗人 GSK- 3β (phospho Y216) 单抗(美国 Abcam 公司,批号 GR258576-24); 小鼠抗人 GAPDH 单抗(美国 Abcam 公司,批号 GR202362-1); HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(上海生工公司,批号 F902AA0024); HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体(上海生工公司,批号 E326AA0001)。

1.3 主要仪器

Mini-PROTEAN 型垂直电泳仪和 Mini Trans-blot 型转印仪(美国 Bio-Rad 公司); ChemiDoc 成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Infinite 200 Pro 酶标仪(瑞士 Tecan 公司); LSR Fortessa 多色分析流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 SH-SY5Y 细胞培养

DMEM 高糖培养基,含 10% FBS、100 IU/mL 的青霉素、100 mg/L 的链霉素,初始细胞浓度 2×10^5 /mL,置于 CO_2 培养箱($37^\circ C$, 5% CO_2 , 饱和湿度)进行培养。细胞长满约 70% 时进行传代。

2.2 乌头碱的细胞安全性测试与 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型的建立

取对数生长期的 SH-SY5Y 神经细胞接种于 96 孔细胞培养板,初始细胞浓度 1×10^5 /mL。设置无药物处理的正常对照组,以及每孔加入乌头碱终浓

度分别为 1、2.5、5、10、20 nmol/L 的乌头碱各浓度处理组,各设置 3 个复孔。细胞培养箱孵育 24 h,加入 CCK8 溶液 10 μ L,继续孵育 2 h。收集培养上清液,以酶标仪于 450 nm 处测定光吸收度。根据细胞安全性测试数据选择后续实验的乌头碱安全浓度。

参考文献报道的方法建立 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型^[10]。取对数生长期的 SH-SY5Y 神经细胞接种于 96 孔细胞培养板,初始细胞浓度 1×10^5 /mL。设置正常对照组(normal)、 $A\beta_{1-40}$ 细胞损伤模型对照组(model),后者加入终浓度 20 μ mol/L 的 $A\beta_{1-40}$ 孵育 24 h 诱导细胞损伤。24 h 后收集培养上清液,严格按照试剂盒说明书以 ELISA 检测培养上清液 LDH 浓度,收集细胞以 AnnexinV-Alexa Fluor 488/PI 法流式细胞术分析细胞凋亡情况,评价建模方法的有效性。

2.3 乌头碱干预 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

取对数生长期的 SH-SY5Y 神经细胞接种于 96 孔细胞培养板,初始细胞浓度 1×10^5 /mL。设置正常对照组(normal)、 $A\beta_{1-40}$ 细胞损伤模型对照组(model)、乌头碱干预组(aconitine),其中的乌头碱干预组以终浓度 5 nmol/L 的乌头碱预孵育 12 h,其它两组不作药物干预。12 h 后, $A\beta_{1-40}$ 细胞损伤模型对照组与乌头碱干预组加入终浓度 20 μ mol/L 的 $A\beta_{1-40}$,诱导细胞损伤^[11]。24 h 后收集细胞培养上清液,ELISA 检测培养上清液 LDH 浓度;收集细胞,部分细胞用于 AnnexinV-Alexa Fluor 488/PI 法流式细胞术分析细胞凋亡情况,其余细胞用于蛋白免疫印迹检测 GSK-3 β 的磷酸化水平。

2.4 流式细胞术分析细胞凋亡与坏死

去除培养容器中的培养基,PBS 洗 3 次,胶原酶细胞解离液消化 10 min,加入适量 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS,1 000 rpm 离心 5 min。小心去除上清,加入约 1 mL 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 重悬细胞。取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 Annexin V-Alexa Fluor 488 溶液 5 μ L,混匀后于室温避光孵育 5 min;加入 10 μ L PI 溶液,并加 400 μ L PBS,上机进行流式检测。

2.5 Western blotting 检测细胞 GSK-3 β 与 Tyr216 位点磷酸化 GSK-3 β

去除培养容器中的培养基,PBS 洗 3 次,胶原酶细胞解离液消化 10 min,加入适量 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS,1 000 rpm 离心 5 min。小心去除上清,加入 10 倍体积裂解液 4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,12 000 rpm 离心 5 min,取上清,蛋白定量。准备蛋白电泳预制胶,蛋白上样

量 20 μ g。垂直电泳条件为恒压 100 V,指示剂泳动至凝胶中下部时停止。采用湿法转膜,封闭,4 $^{\circ}$ C 摇床一抗孵育过夜,GSK-3 β 单抗、GSK-3 β (phospho Y 216)单抗、GAPDH 单抗稀释倍数均为 1:1 200。一抗孵育结束,二抗(1:3 000 稀释)室温孵育 60 min,ECL 超敏化学发光液孵育 3 min,即以 ChemiDoc 成像系统测定并计算目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 条带灰度的比值作为蛋白的相对表达水平。

2.6 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS 12.0 统计软件进行组间均数比较。方差齐性数据采用独立样本 *t* 检验(两组间均数比较)或单因素方差分析 LSD 检验(多组间均数比较),方差不齐数据采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SH-SY5Y 细胞培养与形态观察

细胞在 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS)生长速度稍慢,每 5~7 天可以 1:3 传代 1 次。细胞贴壁生长,具有一定程度聚集生长倾向。镜下可见细胞呈不规则多边形,具有数个明显的尖细突起,部分细胞具有较长的类似神经细胞样突触,如图 2。

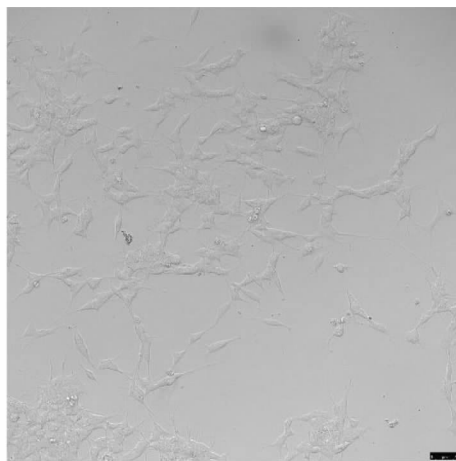


图 2 SH-SY5Y 细胞

Fig. 2 SH-SY5Y cell

3.2 乌头碱对 SH-SY5Y 细胞的安全性测试

与未经药物处理的正常对照组比较,以终浓度为 1、2.5、5 nmol/L 的乌头碱孵育 SH-SY5Y 细胞 24 h,对于细胞的增殖活性无明显影响;以终浓度为 10、20 nmol/L 的乌头碱孵育 SH-SY5Y 细胞 24 h,细胞增殖活性降低,其差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 3。

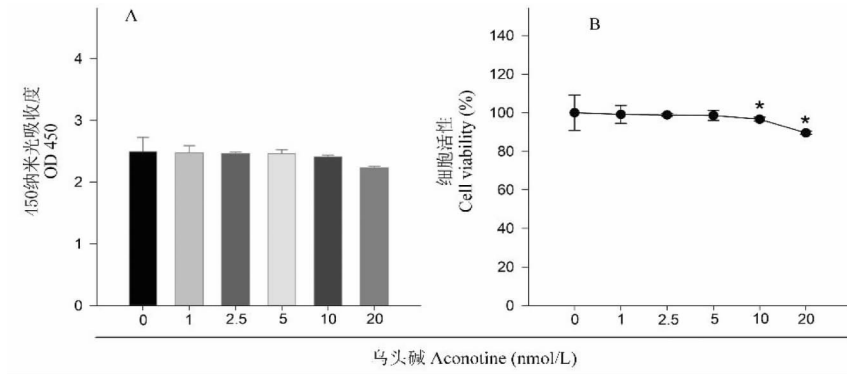


图3 不同浓度乌头碱的细胞安全性

Fig. 3 Cell safety of aconitine at different concentrations

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$ 。Note: Compared with normal control, * $P < 0.01$ 。

3.3 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型的建立

与正常对照组比较,模型对照组细胞培养上清液中的 LDH 水平显著提升,细胞凋亡率与细胞坏死

率亦显著增加,两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图4。

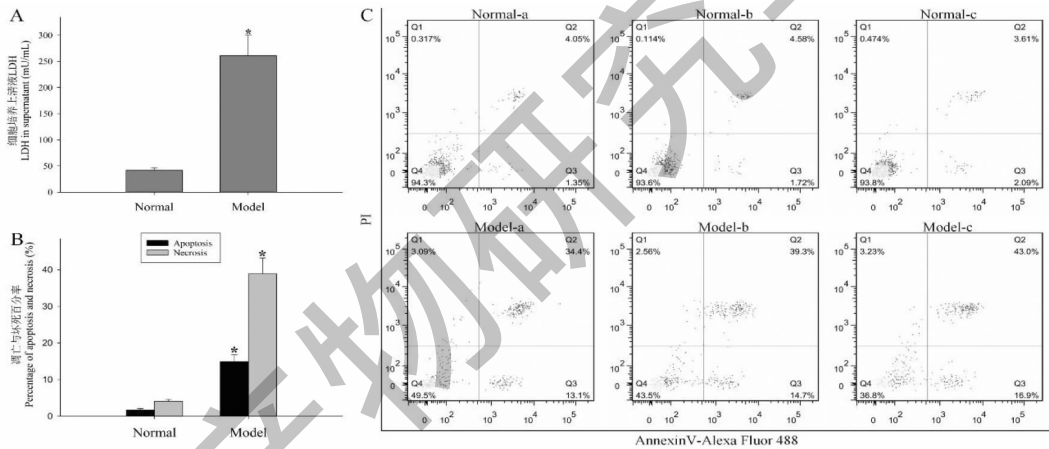


图4 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

Fig. 4 SH-SY5Y cell damage induced by $A\beta_{1-40}$

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$ 。Note: Compared with normal control, * $P < 0.01$ 。

3.4 乌头碱对 $A\beta_{1-40}$ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞培养上清液 LDH 水平、细胞凋亡与坏死的影响

与正常对照组比较,模型对照组细胞培养上清液中的 LDH 水平显著提升,细胞凋亡率与坏死率亦明显增加,两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。以 5 nmol/L 的乌头碱预处理之后,与模型对照组比较,乌头碱干预组细胞培养上清液中的 LDH 水平显著降低,细胞凋亡率与坏死率亦明显下降,两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 5A、B、D。

3.5 乌头碱对 $A\beta_{1-40}$ 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞 GSK-3 β 蛋白 Tyr216 位点磷酸化的影响

与正常对照组比较,模型对照组细胞 GSK-3 β

蛋白磷酸化水平显著提升,两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。以 5 nmol/L 的乌头碱预处理之后,与模型对照组比较,乌头碱干预组细胞 GSK-3 β 蛋白磷酸化水平显著降低,两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 5C、E。

4 讨论

早在典型的认知功能障碍和行为损害等 AD 症状出现之前约 15 ~ 20 年,甚至更早的阶段,对神经细胞具有细胞毒作用的 $A\beta$ 就已经在 AD 患者大脑中发生了病理性聚集,然而此时并无明显的记忆减退症状。 $A\beta$ 对神经细胞具有显著的细胞毒性,不仅可以诱导细胞氧化应激与神经炎症,还能够干扰细

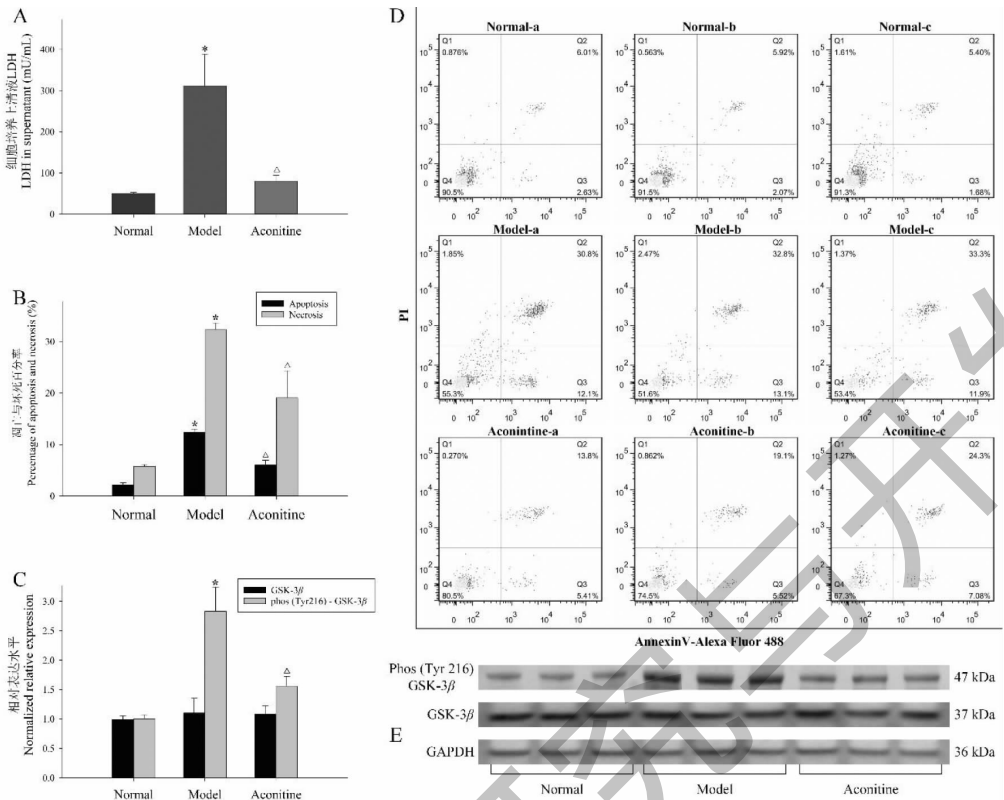


图 5 乌头碱减轻 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤

Fig. 5 Alleviation of aconitine on SH-SY5Y cell damage induced by $A\beta_{1-40}$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$ 。与模型对照组比较, $\Delta P < 0.01$ 。Note:Compared with normal control,* $P < 0.01$ 。Compared with model control, $\Delta P < 0.01$ 。

胞膜离子通道开放进而导致细胞内外离子浓度梯度失衡、细胞膜跨膜电位异常,并直接损伤胆碱能神经传导功能而导致胆碱能神经信号传递障碍,以及直接诱导神经细胞凋亡^[12]。当患者表现出典型的认知与行为能力损害的时候,其大脑的神经细胞已经大量丧失,大脑影像检查已经可以观察到明显的脑萎缩,此时再使用药物来清除 $A\beta$,已经很难获得理想的临床疗效,这也是 AD 自于 1907 年被正式定义以来 AD 的临床治疗困难重重的原因之一^[13]。寻找能够增强神经细胞对 $A\beta$ 细胞毒作用的耐受能力的有效药物,并在 AD 病理进程的早期阶段进行药物干预,是有效阻止 AD 持续进展的药物疗法的重要内容之一。早期开始治疗通常意味着患者需要持续时间漫长的药物治疗,必须谨慎权衡药物治疗的获益与药物安全性的风险。考虑到中药及其有效成分普遍具有较好的安全性,并且其多靶点药效的特点契合 AD 这样的复杂慢性疾病,早期开始中药及其有效成分干预或许是合理的潜在选择^[14,15]。

中医扶阳学派重用附子的温阳化痰治则,在 AD 的临床治疗中获得了较好的认知与行为能力症状改善的疗效^[16,17]。乌头碱既是附子的重要药效物质,也是引起附子中毒的重要原因,因而附子遣方用药的权衡较为复杂,也是选取乌头碱作为研究对象的主导性原因。乌头碱作为附子中的重要生物活性成分,既往研究已经发现其激活 PI3K 的药理活性,而 PI3K 的激活能够负调控 Tyr216 位点磷酸化导致的 GSK-3 β 活化。GSK-3 β 参与 $A\beta$ 的生成、聚集以及后续的神经细胞损伤,而 $A\beta$ 介导的神经炎症和氧化应激也可以诱导 GSK-3 β 的磷酸化激活。此外,过度活化的 GSK-3 β 亦可破坏重要的神经递质乙酰胆碱的活性,并加速神经细胞轴突变性、阻碍轴突运输,进一步加剧认知功能障碍。基于上述研究发现,可以合理推测乌头碱有助于增强神经细胞抵抗 $A\beta$ 的细胞毒作用,并且此有益的药理作用与其抑制 GSK-3 β 在 Tyr216 位点磷酸化而激活有关,然而该推测需要实验证据加以证实。

在本研究中,以 $A\beta_{1-40}$ 孵育 SH-SY5Y 细胞成功

建立细胞损伤模型,表现为细胞培养上清液的 LDH 水平上升,伴随细胞凋亡与坏死率均显著增加。5 nmol/L 的乌头碱并未表现明显的细胞毒性,以其预处理 SH-SY5Y 细胞则可以显著减轻 $A\beta_{1-40}$ 导致的细胞损伤,细胞损伤释放的 LDH 显著减少,细胞凋亡与坏死率均显著降低,与此同时细胞的 Tyr216 位点 GSK-3 β 磷酸化水平显著降低,提示该浓度下乌头碱的细胞安全性是可接受的,并增强细胞抵抗 $A\beta$ 细胞毒作用的能力,而且此作用可能与其抑制 GSK-3 β 在 Tyr216 位点的磷酸化而激活有关。

一般认为,乌头碱具有心脏毒性,因此以净水浸泡、胆巴炮制、反复蒸煮等方法减少附子中的乌头碱,通过久煎的方法促进乌头碱水解,然而仍然有微量的乌头碱进入人体,并产生相应的药理效应^[18-20]。关于乌头碱通过血脑屏障进入中枢神经系统的机制,有研究报道,一种质子偶联的有机阳离子反向载体参与乌头生物碱的血脑屏障运输^[21]。本研究的结果表明,即使在 5 nmol/L 的极低浓度水平,乌头碱仍然可以发挥神经细胞保护作用,显著增强神经细胞抵御 $A\beta$ 的细胞毒性损伤,提示重用附子的温阳化痰中药复方治疗 AD 的药效与乌头碱增强神经细胞抵抗 $A\beta$ 的细胞毒作用密切相关。鉴于乌头碱的固有心脏毒性,显然需要设计严谨的体内实验研究,在不会造成心脏毒性的安全性前提下,验证乌头碱增强神经细胞抵御 $A\beta$ 的细胞毒性损伤的体内活性。

参考文献

- Gallacher J, de Reydet de Vulpillieres F, Amzal B, et al. Challenges for optimizing real-world evidence in Alzheimer's disease: the roadmap project [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2019, 67:495-501.
- Chen L, Xu S, Wu T, et al. Abnormal platelet amyloid- β precursor protein metabolism in SAMP8 mice: evidence for peripheral marker in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234:23528-23536.
- Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, et al. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014 [J]. *J Intern Med*, 2014, 275:251-283.
- Wang JP, Tang N, Liu BG, et al. Discussion on the etiology, pathogenesis and treatment of dementia based on the chongyang thought in the internal classic [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2016, 27:150-151.
- Wang YQ, Xia M, Tang N. Warming Yang and resolving stasis method used in treating senile dementia [J]. *Acta Chin Med (中医学报)*, 2019, 34:2075-2078.
- Yang H, Wang H, Liu Y, et al. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway plays a role in regulating aconitine-induced autophagy in mouse liver [J]. *Res Vet Sci*, 2019, 124:317-320.
- Xiao S, Zhang Y, Song P, et al. The investigation of allosteric regulation mechanism of analgesic effect using SD rat taste bud tissue biosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 126:815-823.
- Yang X, Li YH, Pang EJ, et al. Screening of antitumor active components and key targets of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Pinelliae Rhizoma based on PI3K/Akt pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25:170-179.
- Paudel P, Seong SH, Zhou Y, et al. Arylbenzofurans from the root bark of morus alba as triple inhibitors of cholinesterase, β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, and glycogen synthase kinase-3 β : relevance to Alzheimer's Disease [J]. *ACS Omega*, 2019, 4:6283-6294.
- Liu YX, Wang JY, Dai XL, et al. Effects of catechin on $A\beta_{1-40}$ induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. *J Biol (生物学杂志)*, 2018, 35:7-10.
- Zhang M, Zheng HX, Gao YY, et al. The influence of schisan-drin B on a model of Alzheimer's disease using β -amyloid protein $A\beta_{1-42}$ -mediated damage in SH-SY5Y neuronal cell line and underlying mechanisms [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2017, 80:1199-1205.
- Huang YR, Liu RT. The toxicity and polymorphism of β -amyloid oligomers [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21:4477-4495.
- Yoshiyama Y, Lee VM, Trojanowski JQ. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration [J]. *J Neurol Neurosurg Ps*, 2013, 84:784-795.
- Wang Y, Wang X, Yu S, et al. Effects of ferulic acid on oxidative stress and apoptosis related proteins in Alzheimer's disease transgenic mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29:762-766.
- Zhang HB, Sun Y. Effect of huperzine A on the expression of amyloid β -protein in transgenic mice brain of Alzheimer's disease [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29:290-293.
- Chen W, Wu L, Hu YQ, et al. Clinical efficacy of Wuzang Wenyang Huayu decoction in treatment of Alzheimer's disease with syndrome of kidney deficiency and blood stasis: an analysis of 30 cases [J]. *Hunan J Tradit Chin Med (湖南中医杂志)*, 2018, 34:4-6.