

·基础研究·

紫云英苷诱导自噬减轻APP/PS1转基因小鼠皮质内神经元损伤及老年斑沉积

杨翠珠, 张润恒, 王姝涵, 蒋裕芸, 刘靖, 李国营, 马宇昕
(广东药科大学生命科学与生物制药学院人体解剖与组织胚胎学系, 广东广州510006)

摘要:【目的】探讨紫云英苷(AST)对APP/PS1转基因小鼠脑皮质神经元及A β 斑块的影响。【方法】将24只8月龄雄性APP/PS1转基因小鼠随机分为APP/PS1组、10 mg/kg AST(APP/PS1+AST 10)组、20 mg/kg AST(APP/PS1+AST 20)组、40 mg/kg AST(APP/PS1+AST 40)组, 每组各6只。6只同月龄C57BL/6雄性小鼠作为对照组(WT组)。AST药物连续腹腔注射一个月后, 采用免疫荧光染色法观察小鼠脑皮质内A β 斑块沉积情况, 尼氏染色法观察皮质内神经元数量及形态变化, 免疫荧光多重染色法观察小鼠脑皮质内LC3B、p62分别与NeuN共表达情况。Western blot法检测皮质中NeuN、LC3B及p62蛋白表达情况。【结果】免疫荧光染色法表明, 20、40 mg/kg AST均可减少APP/PS1转基因小鼠脑皮质内A β 斑块沉积($P < 0.0001$; $P < 0.0001$)。Western blot结果表明, 20、40 mg/kg AST均可增加APP/PS1转基因小鼠脑皮质内NeuN蛋白表达量($P = 0.0121$; $P < 0.0001$)。免疫荧光多重染色结果揭示APP/PS1转基因小鼠脑皮质内LC3B、p62与NeuN均存在共表达现象。Western blot结果表明, AST增加APP/PS1转基因小鼠脑皮质内LC3B表达量($P = 0.007$, $P < 0.0001$), 减少p62表达量($P < 0.0001$, $P < 0.0001$)。【结论】AST通过激活自噬减轻APP/PS1转基因小鼠脑皮质内神经元损伤及A β 斑块沉积。

关键词:紫云英苷; APP/PS1转基因小鼠; 自噬; 神经元损伤; A β 斑块沉积

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2022)02-0238-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0209

Astragalín Alleviates Neuronal Damage and Senile Plaque Deposition via Activating Autophagy in the Cortex of APP/PS1 Transgenic Mice

YANG Cui-zhu, ZHANG Run-heng, WANG Shu-han, JIANG Yu-yun,
LIU Jing, LI Guo-ying, MA Yu-xin

(Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, School of Life Sciences and Biopharmaceutics,

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: MA Yu-xin; E-mail: mayuxin@gdpu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To explore the effect of astragalín (AST) on neurons and A β plaques in the cortex of APP/PS1 transgenic mice. 【Methods】 Twenty-four 8-month-old male APP/PS1 transgenic mice were randomly divided into APP/PS1 group, 10 mg/kg AST (APP/PS1+AST 10) group, and 20 mg/kg AST (APP/PS1+AST 20) group, 40 mg/kg AST (APP/PS1+AST 40) group, with 6 mice in each group. Six C57BL/6 male mice of the same age served as the control group (WT group). AST drugs were continuously injected intraperitoneally for one month. Then Immunofluorescent staining was used to observe the deposition of A β plaques in the cortex. Nissl staining was used to observe the number and morphologi-

收稿日期: 2021-10-10

基金项目: 广东省自然科学基金(2018A0303130073); 广东省医学科学基金(2018464); 广州市科技计划项目科技创新人才专项-珠江科技新星(201710010002)

作者简介: 杨翠珠, 硕士生, 研究方向: 神经退行性疾病机制研究, E-mail: ycz0288@163.com; 马宇昕, 通信作者, 高级实验师, 硕士生导师, E-mail: mayuxin@gdpu.edu.cn

cal changes of neurons in the cortex, and immunofluorescent multiple staining methods were used to observe the co-expression of LC3B, p62 and NeuN in the cortex. Then the expressions of NeuN, LC3B, and p62 protein were detected by Western blot method.【Results】Immunofluorescent staining results showed 20 mg/kg and 40 mg/kg AST reduced A β plaques deposition in the cortex of APP/PS1 mice ($P < 0.000 1$; $P < 0.000 1$). Western blot analysis showed both 20 and 40 mg/kg AST increased the expression of NeuN protein in the cortex of APP/PS1 mice ($P = 0.012 1$; $P < 0.000 1$). Immunofluorescent multiplex staining showed co-expression of LC3B, p62, and NeuN in the cortex of APP/PS1 mice. Western blot analysis showed AST increased the expression of LC3B ($P = 0.007$, $P < 0.000 1$) and decreased the expression of p62 ($P < 0.000 1$, $P < 0.000 1$) in the cortex of APP/PS1 mice.【Conclusions】AST reduces neuronal damage and A β plaques deposition in the cortex of APP/PS1 mice by activating autophagy.

Key words: astragalín; APP/PS1 transgenic mice; autophagy; neuronal damage; A β deposition

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(2): 238-246]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的与年龄相关的神经退行性疾病,其典型特征是进行性认知能力减退。据AD协会最新统计,AD导致患者死亡人数已超过乳腺癌和前列腺癌患者人数的总和,居世界第一位^[1]。而在中国 ≥ 60 岁老年人中,约有983万人患AD^[2]。尽管AD发病机制尚未完全明确,但目前大部分研究表明自噬参与了AD的发生与发展。自噬是溶酶体介导的细胞自我处理系统,能够清除衰老或异常聚集蛋白,对维持细胞稳态具有重要作用。既往研究表明在AD发病早期自噬被激活,进而抑制神经细胞损伤来改善AD症状,但随着AD病程的发展,自噬功能逐渐降低^[3]。紫云英苷(astragalín, AST)作为一种天然小分子黄酮类化合物^[4],能够通过调节自噬发挥抗炎^[5]、抗癌^[6]、抗氧化^[7]作用,但AST是否能够通过调节自噬来改善痴呆这类神经系统方面的疾病尚未见相关体内实验报道。因此,本实验将APP/PS1转基因小鼠作为研究对象,探究AST对APP/PS1转基因小鼠脑皮质内神经元损伤的作用及机制,为AST作为治疗AD潜在药物提供动物实验依据和理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和饲养

24只8月龄SPF级APP/PS1 (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})雄性转基因小鼠,及6只同品系同月龄SPF级C57BL/6雄性小鼠,均购自广东省实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2018-0002。动物均饲养于SPF级屏障环境内:将APP/PS1转基因小鼠单

笼单只饲养,12 h光照循环,饮水进食自由,室温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(55 \pm 5)%。广东药科大学动物护理伦理和使用委员会批准(批准使用号为:SPF2017356)并通过本实验所有动物实验操作。

1.2 主要试剂与仪器

99.02%紫云英苷(wkq20032506)购于四川省维克奇生物科技有限公司,羧甲基纤维素钠(MB1731)购于美仑生物技术有限公司,NeuN抗体(ab104224)、LC3B抗体(ab51520)、SQSTM1/p62抗体(ab91526)、荧光兔二抗(ab150077)、荧光小鼠二抗(ab150116)、HRP兔二抗(ab205718)、均购自于Abcam公司,Beta amyloid(GT622)购于GeneTex公司, β -actin(ac026)购于Abclonal公司,HRP小鼠二抗(E030110-02)购于EarthOx公司。化学发光成像与分析系统Tanon-5200购于上海天能科技有限公司,光学显微镜及成像系统AX-10购于德国ZEISS生物公司。

1.3 实验动物分组及给药

实验动物适应环境一周后,将8月龄雄性APP/PS1转基因小鼠随机分为:APP/PS1组、10 mg/kg AST (APP/PS1+AST 10)组、20 mg/kg AST (APP/PS1+AST 20)组、40 mg/kg AST (APP/PS1+AST 40)组。另将C57BL/6小鼠设为WT组。将AST溶于0.5%羧甲基纤维素钠溶液中制成10、20、40 mg/kg浓度的混悬液^[5]。AST药物处理组小鼠腹腔注射不同剂量的AST混悬液,WT组和APP/PS1组小鼠给予等量0.5%羧甲基纤维素钠溶液,每日给药1次,连续给药1个月。

1.4 尼氏染色

每组选取3只小鼠麻醉后,断头处死取出完整

的大脑,于40 g/L多聚甲醛溶液固定,组织脱水浸蜡后进行包埋,制作石蜡切片。选取小鼠脑组织切片,常规脱蜡脱水后,将切片完全浸入甲苯胺蓝工作液中,于56℃恒温干燥箱中染色45 min,之后进行梯度乙醇脱水及二甲苯透明,中性树胶封片,自然风干后于显微镜下观察并拍照。

1.5 免疫荧光单标染色方法

选取各组小鼠脑组织切片,常规脱蜡脱水后,进行中高火微波抗原修复,切片冷却至室温后,滴加免疫染色封闭液,37℃封闭20 min后,滴加小鼠抗A β 1-42(1:300)后4℃孵育过夜;复温30 min后,PBST清洗后,滴加Alexa Flour® 594标记的山羊抗小鼠IgG(1:800)于37℃下孵育1 h;PBST清洗后滴加含DAPI的抗荧光淬灭剂,封片;利用光学显微镜观察图像并拍照。

1.6 免疫荧光多重染色方法

选取各组小鼠脑组织切片,常规脱蜡脱水后,进行中高火微波抗原修复,切片冷却至室温后,滴加免疫染色封闭液,37℃封闭20 min后,滴加兔抗LC3B(1:600)和小鼠抗NeuN(1:500),兔抗p62(1:100)和小鼠抗NeuN(1:500)后4℃孵育过夜;复温30 min后,PBS清洗后,加入Alexa Flour® 488标记的山羊抗兔IgG(1:800)和Alexa Flour® 594标记的山羊抗小鼠IgG(1:800)于37℃下孵育1 h;PBST清洗后滴加含DAPI的抗荧光淬灭剂,封片;利用光学显微镜观察图像并拍照。

1.7 Western blot法

每组选取3只小鼠麻醉后,断头取出皮质组织放于含有苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA裂解液中,

冰上充分研磨后,转移至离心管中,4℃高速离心后取上清。用BCA蛋白定量试剂盒测定每组组织的蛋白含量,接着进行电泳,转膜,封闭后分别加入下述一抗:兔抗LC3B(1:3 000),兔抗p62(1:1 000),兔抗 β -actin(1:3 000),4℃过夜孵育。复温20 min,于室温下用TBST洗膜3次后,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:10 000)或HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:3 000)室温下孵育80 min,于室温下用TBST洗膜3次。将ECL超敏发光液滴加到膜上,于1~2 min进行显影曝光成像。采用Image J图像分析系统对蛋白条带进行灰度测定分析。

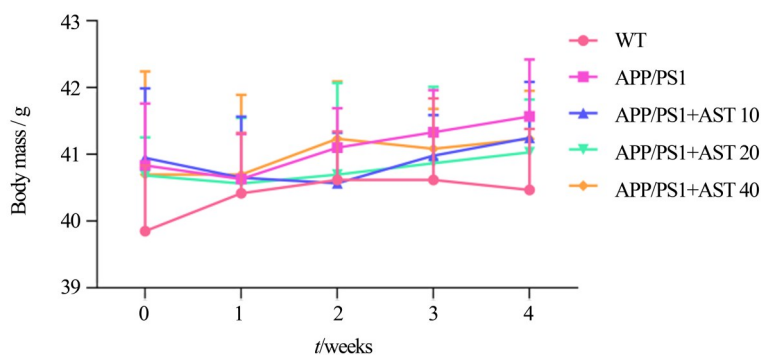
1.8 统计学分析

采用Graphpad Prism 8.0分析数据,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;所有定量资料满足正态分布,且通过方差齐性检验后采用单因素方差分析(one way-ANOVA),组间两两进行比较采用Turkey法。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 紫云英苷对APP/PS1转基因小鼠体质量的影响

为了观察紫云英苷对APP/PS1转基因小鼠体质量变化的影响,在造模期间称重并记录小鼠的体质量。经过10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg AST药物处理后,各组小鼠体质量与APP/PS1转基因小鼠相比均无统计学意义($P = 0.889 8$; $P = 0.634 7$; $P = 0.991 8$,图1)。上述结果表明,本实验中不同给药浓度的AST均未对小鼠体质量造成明显影响。



All the data are analyzed by Turkey's multiple comparisons test after one-way ANOVA. $n = 6$, $F = 2.697$, $P = 0.033 1$.

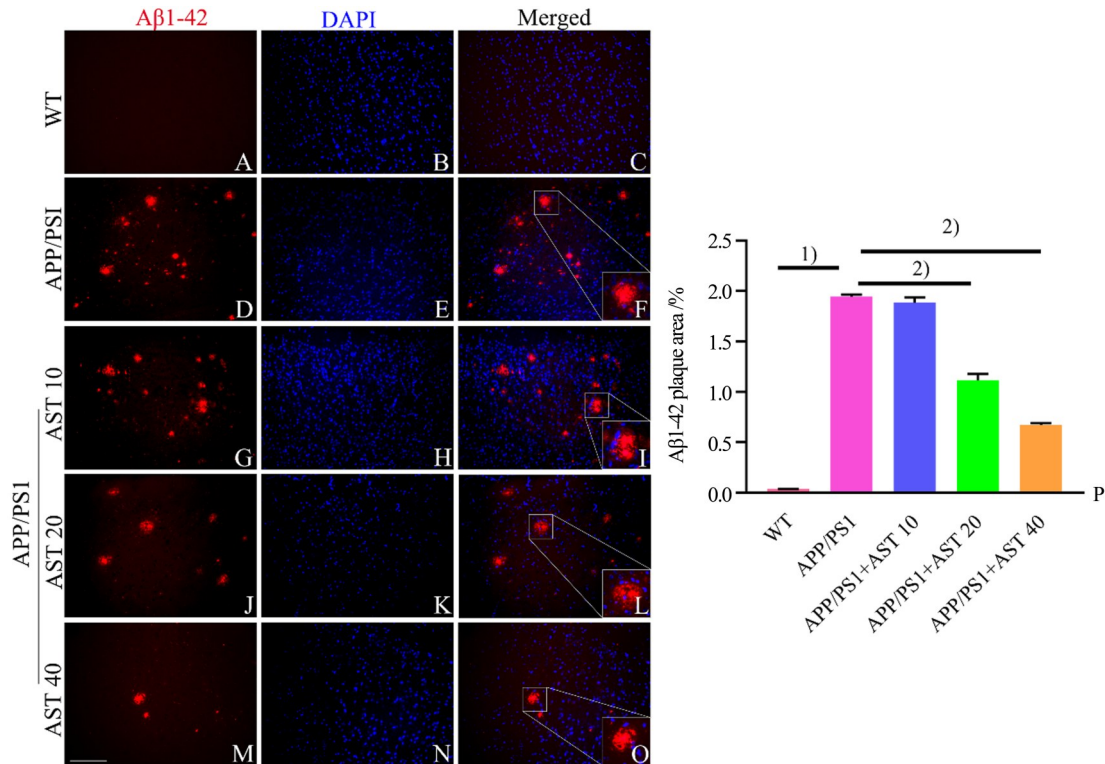
图1 不同浓度的紫云英苷对APP/PS1转基因小鼠体质量的影响

Fig. 1 Effects of astragaloside at different concentrations on body weight of APP/PS1 mice

2.2 紫云英苷对APP/PS1转基因小鼠脑皮质内老年斑的影响

免疫荧光组织化学结果显示(图2):A β 斑块主要分布在APP/PS1转基因小鼠脑皮质内,形状多呈椭圆形或不规则形。与WT组小鼠相比,APP/PS1

转基因小鼠皮质内A β 斑块数量增多,且差异具有统计学意义($P < 0.0001$)。而经20 mg/kg、40 mg/kg AST药物处理后,APP/PS1转基因小鼠皮质内A β 斑块数量明显减少,且差异均具有统计学意义($P < 0.0001$; $P < 0.0001$)。



The scale shown in A-O is 100 μ m. P: Statistics of A β 1-42 plaque area. Data are represented as mean \pm SD and are analyzed using one-way ANOVA of variance followed by Turkey test ($F = 1369$, $P < 0.0001$). $n = 3/\text{group}$. 1) $P < 0.001$ compared with WT group; 2) $P < 0.001$ compared with the APP/PS1 group.

图2 免疫荧光检测各组大鼠脑皮质内A β 1-42表达情况

Fig. 2 Detection of A β 1-42 in the cortex among groups by immunofluorescent method

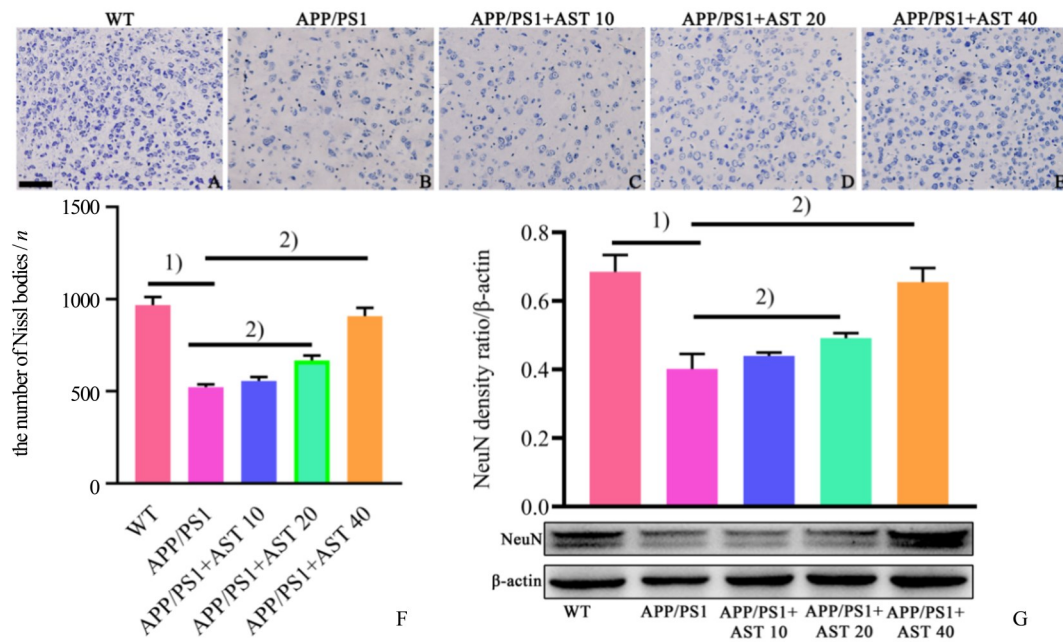
2.3 紫云英苷对APP/PS1转基因小鼠脑皮质内神经元的影响

尼氏染色结果显示(图3A-F),WT组小鼠尼氏体结构清晰,染色均匀;APP/PS1组小鼠皮质内神经元形态清晰,与WT组小鼠尼氏体数量相比,差异具有统计学意义($P < 0.0001$);与APP/PS1组相比,20、40 mg/kg AST药物处理后尼氏体数量增多($P < 0.0001$; $P < 0.0001$)。进一步通过Western blot(图3G)检测NeuN蛋白的表达情况发现,与WT组小鼠相比,APP/PS1组小鼠皮质中NeuN蛋白表达量降低,差异具有统计学意义($P < 0.0001$)。而给予20、40 mg/kg AST药物处理后,APP/PS1转基因小鼠皮质中的NeuN蛋白含量均明显升高,差异

均具有统计学意义($P = 0.0121$; $P < 0.0001$)。

2.4 紫云英苷对APP/PS1转基因小鼠脑皮质内LCB和p62的影响

免疫荧光多重标记染色结果显示:WT组小鼠和APP/PS1组小鼠脑内皮质中均可检测到LC3B和p62阳性细胞,且主要表达于小鼠脑皮质神经元的胞膜和胞质中(图4-5)。与WT组小鼠相比,APP/PS1组小鼠皮质中LC3B阳性细胞较少(图4),p62阳性细胞数较多(图5);与APP/PS1组小鼠相比,经10、20、40 mg/kg AST药物处理后,LC3B阳性细胞呈剂量依赖性增加,而p62阳性细胞呈剂量依赖性减少。Western blot实验进一步证实了上述取得的免疫荧光染色结果:LC3B、p62条带分析结果显示



The scale shown in A–E is 10 μm ; F: Statistics of Nissl bodies. Data are represented as mean \pm SD and are analyzed using one-way ANOVA of variance followed by Turkey test ($F = 234.1, P < 0.0001$). $n = 3/\text{group}$. 1) $P < 0.001$ compared with WT group; 2) $P < 0.001$ compared with the APP/PS1 group. G: The protein band and statistics of NeuN ($F = 98.29, P < 0.0001$). $n = 3/\text{group}$. 1) $P < 0.01$ compared with WT group; 2) $P < 0.05$ compared with the APP/PS1 group. All the data are analyzed using one-way ANOVA of variance followed by Turkey test.

图3 尼氏染色及 Western blot 法检测 AST 对脑皮质内神经元的影响

Fig. 3 Nissl staining and Western blot methods to detect the effect of AST on neurons in the cortex

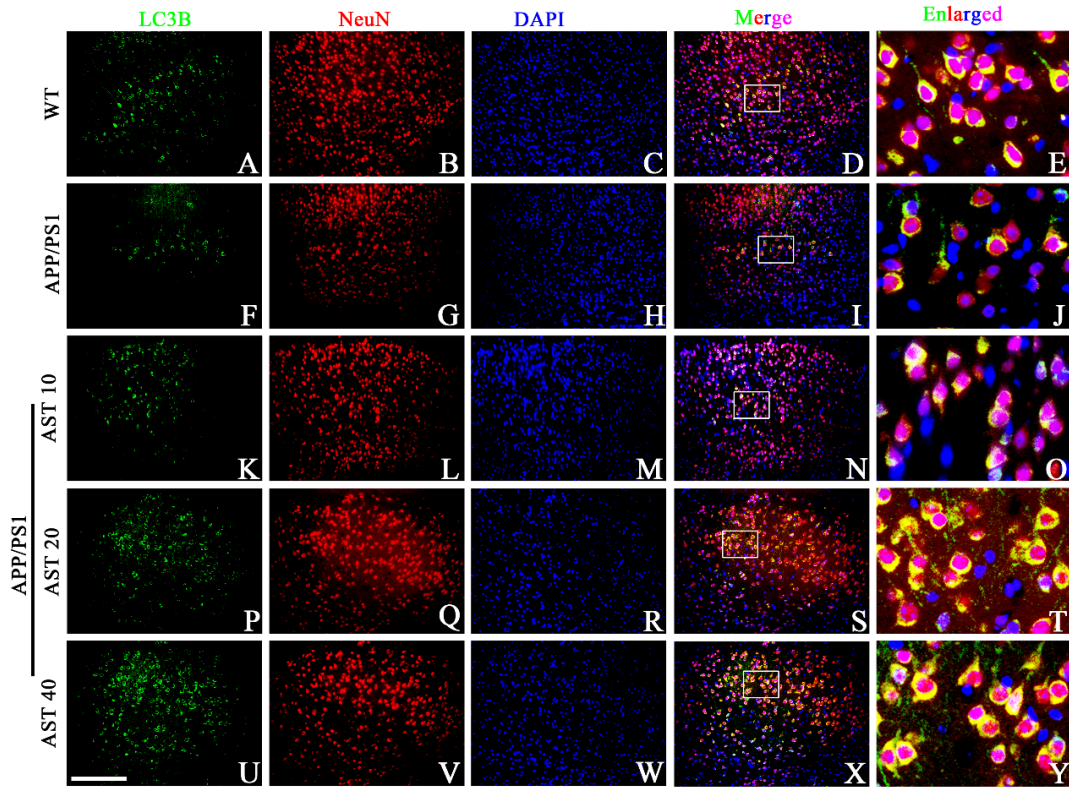
如下(图6),APP/PS1组LC3B和p62蛋白表达量与WT组小鼠相比,差异均具有统计学意义($P < 0.0001$; $P < 0.0001$)。经20、40 mg/kg AST药物处理后,LC3B和p62蛋白表达量与APP/PS1组小鼠差异均具有统计学意义($P = 0.007, P < 0.0001$; $P < 0.0001, P < 0.0001$)。

3 讨论

本研究发现,10、20、40 mg/kg AST药物干预APP/PS1转基因小鼠一个月,各组动物体质量变化并未出现明显的变化,表明AST对动物无明显毒副作用。同时,AST药物干预后可减少APP/PS1转基因小鼠脑皮质内 $\text{A}\beta$ 斑块沉积及减轻神经元损伤,可能是通过促进脑皮质内神经元自噬发挥其神经保护作用。

AD作为一种常见的神经退行性疾病,临床上仍缺乏有效针对其病因进行靶向治疗的药物,因而,根据病因寻找有效预防及治疗AD的药物十分重要。脑内 $\text{A}\beta$ 淀粉样蛋白过度沉积、神经元纤维缠结及神经元损伤是AD重要的病理特征,是导致

患者学习记忆功能障碍的主要原因^[8-10]。APP/PS1双转基因小鼠在6月龄时脑内会出现 $\text{A}\beta$ 斑块沉积,并可稳定表达定位于神经元的小鼠/人APP和突变的人PS1^[11]。因此,本实验选择8月龄APP/PS1转基因小鼠作为研究对象。AST作为一种新型小分子天然黄酮类药物,对其抗炎、抗癌、抗氧化的生物学功能目前均有研究报道,大多研究主要集中在其抗炎作用方面。Wang等^[12]研究报道在神经病理性大鼠疼痛模型中,AST通过下调P2X4受体,抑制胶质细胞活化,从而减轻模型大鼠的疼痛行为。同时,AST能够抑制NF- κB 通路,降低IL-6、IL-8、TNF- α 的产生,改善小鼠结肠炎^[13]。但AST在阿尔茨海默病此类神经退行性疾病中的作用研究相对较少,且集中在体外细胞层面。Yuan等^[14]在对小叶金露梅中黄酮类化合物药理作用分析时发现,AST能够改善SH-SY5Y细胞损伤。同时,有研究报道AST通过激活ER-P38/MAPK信号通路减少 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤PC12细胞的凋亡来发挥神经保护作用^[15]。在体内AD动物模型中AST是否同样具备神经保护作用尚未有明确报道。因此,本实验将具体研究AST对AD动物模型的作用及机制。



The scale shown in A-D, F-I, K-N, P-S, U-X is 100 μm . $n = 3/\text{group}$.

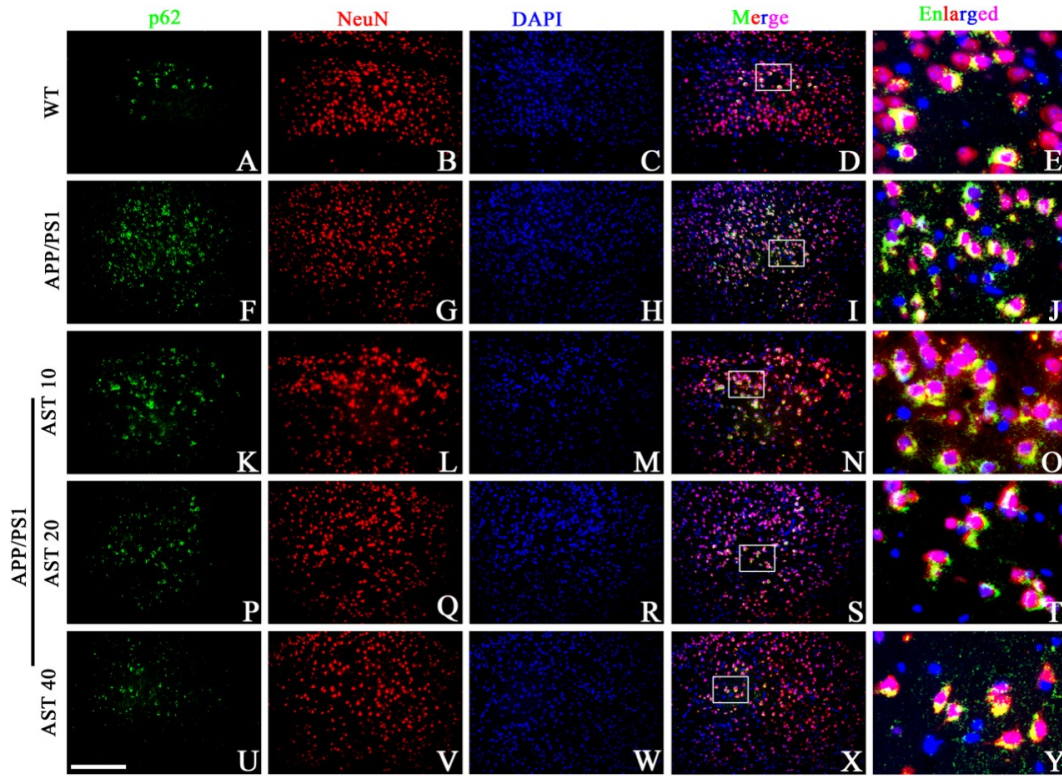
图4 免疫荧光多重染色法检测脑皮质中LC3B和NeuN共表达情况

Fig. 4 Detection of co-expression of LC3B and NeuN in the cortex by immunofluorescent multiple staining

本研究结果发现,在APP/PS1转基因小鼠脑皮质内存在大量 $\text{A}\beta$ 斑块沉积,而在不同浓度AST药物干预后, $\text{A}\beta$ 斑块沉积均有所减少,其中以40mg/kg AST药物处理最为明显。尼氏体是神经元体内嗜碱性颗粒,尼氏体数量减少及形态结构改变是神经元损伤的表现。本研究采用尼氏染色观察各组小鼠脑皮质内尼氏体数量及形态变化,发现WT组小鼠脑皮质内尼氏体结构清晰完整,APP/PS1组小鼠脑皮质内尼氏体数量减少、排列稀疏;但随着AST浓度增加,APP/PS1转基因小鼠脑内尼氏体数量呈剂量依赖性增加,细胞排列紧密。与WT小鼠相比,APP/PS1转基因小鼠脑皮质内NeuN蛋白表达量降低,而AST用药处理后逆转了这一结果。上述结果共同表明,AST可以减轻APP/PS1转基因小鼠脑皮质内 $\text{A}\beta$ 斑块沉积并改善尼氏体丢失和神经元损伤。有研究报道AST通过抑制氧化剂暴露的气道上皮细胞和气管组织中自噬体的形成,有效缓解活性氧促进的支气管纤维化^[16]。同时,通过抑制二氢二醇脱氢酶(DDH)诱导细胞凋亡和自噬,从而增强抗癌效果^[17]。那么,AST改善APP/PS1转基因

小鼠脑皮质内 $\text{A}\beta$ 斑块沉积及神经元损伤,是否通过调控自噬这一途径发挥作用仍需进一步探讨。

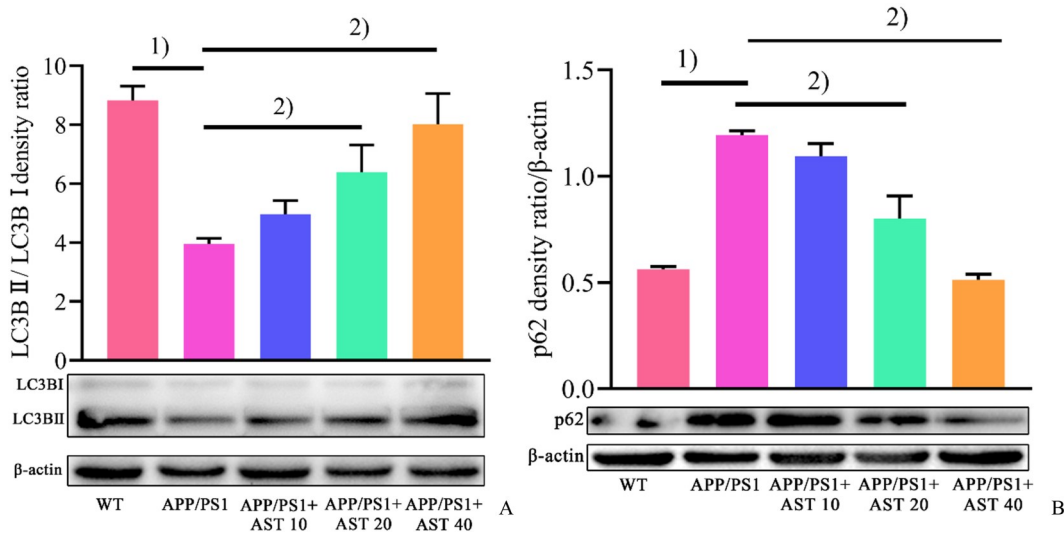
AD病人或相关动物模型脑中,致病性的错误折叠蛋白出现聚集,囤积在细胞质中无法清除,从而对细胞表现出高毒性;而这些蛋白能够很好地被自噬泡所识别,从而通过溶酶体内的酸性水解酶清除。因此,激活自噬可用来抵抗这些聚集蛋白对细胞的毒性。细胞中存在两种形式的LC3B:LC3B-I和LC3B-II。当自噬体形成时,LC3B-I被剪切和泛素化修饰后与磷脂酰胺乙醇胺偶联后转变为LC3B-II,LC3B-II是一种膜结合蛋白,位于自噬体膜^[18]。因此,LC3B-II/LC3B-I的比值大小可用来评判自噬水平的高低^[19-21]。p62/SQSTM1作为自噬选择性底物,在自噬功能正常时可被降解^[22],因此本研究选用LC3 II和p62这两个指标评价自噬功能。自噬功能被抑制可能是AD致病的因素之一^[23-24]。有研究学者检测APP/PS1转基因小鼠脑内自噬相关因子发现LC3 II、Beclin-1蛋白表达量降低,而p62蛋白表达量升高,自噬正常功能被抑制而无法清除脑内的堆积的老年斑^[25]。本研究结



The scale shown in A-D, F-I, K-N, P-S, U-X is 100 μ m. $n = 3$ /group.

图5 免疫荧光多重染色法检测脑皮质中p62和NeuN共表达情况

Fig. 5 Detection of co-expression of p62 and NeuN in the cortex by immunofluorescent multiple staining



Western blot for determining the protein levels of LC3B and p62. $n = 3$ /group, $F = 44.565, P < 0.0001$; $F = 144.560, P < 0.0001$. 1) $P < 0.01$ compared with WT group; 2) $P < 0.01$ compared with the APP/PS1 group. All the data are analyzed using one-way ANOVA of variance followed by Turkey test.

图6 Western blot检测脑皮质中LC3B和p62蛋白表达情况

Fig. 6 The expressions of LC3B and p62 protein in the cortex were detected by Western blot

果发现, APP/PS1转基因小鼠脑皮质内LC3B蛋白的表达量减少, p62蛋白表达量增加, 而AST用药处理能够逆转这一变化, 激活自噬, 尤以40 mg/kg AST药物处理最为明显。以上结果提示, AST能够

激活脑皮质内神经元自噬, 从而减少APP/PS1转基因小鼠脑皮质内A β 沉积及改善神经元损伤。但是, AST能否改善APP/PS1小鼠认知功能障碍, 以及AST通过激活自噬改善APP/PS1小鼠脑皮质内

A β 斑块沉积及神经元损伤相关机制,我们仍需要进行深入研究和探讨。同时,需要根据药物剂量和持续作用时间,对AST临床用药进行安全性评估,以期AST最终成为临床有效候选药提供更多的理论支撑。

综上所述,AST能够升高LC3B的蛋白表达水

平及降低p62蛋白表达水平,诱导APP/PS1转基因小鼠脑皮质内神经元自噬,减少A β 沉积和减轻神经元损伤。本研究为AST通过调控自噬关键环节改善APP/PS1转基因小鼠脑内A β 斑块沉积,进而改善认知功能障碍提供实验依据,为AST将应用于临床AD治疗提供新思路。

参考文献

- [1] 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(3): 327-406.
- [2] Jia L, Du Y, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): e661-e671.
- [3] Lee W, Kim SH. Autophagy at synapses in neurodegenerative diseases [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(5): 407-415.
- [4] Chen X, Cheng C, Zuo X, et al. Astragaloside alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by improving anti-oxidant and anti-inflammatory activities and inhibiting apoptosis pathway in rats [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 120.
- [5] Han XX, Jiang YP, Liu N, et al. Protective effects of Astragaloside on spermatogenesis in streptozotocin-induced diabetes in male mice by improving antioxidant activity and inhibiting inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 561-570.
- [6] Zhu L, Zhu L, Chen J, et al. Astragaloside induced selective kidney cancer cell death and these effects are mediated via mitochondrial mediated cell apoptosis, cell cycle arrest, and modulation of key tumor-suppressive miRNAs [J]. *J BUON*, 2019, 24(3): 1245-1251.
- [7] Vongsak B, Mangmool S, Gritsanapan W. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of moringa oleifera leaf extract [J]. *Planta Med*, 2015, 81(12-13): 1084-1089.
- [8] Eslami M, Sadeghi B, Goshadrou F. Chronic ghrelin administration restores hippocampal long-term potentiation and ameliorates memory impairment in rat model of Alzheimer's disease [J]. *Hippocampus*, 2018, 28(10): 724-734.
- [9] Chen GF, Xu TH, Yan Y, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(9): 1205-1235.
- [10] Castello NA, Green KN, LaFerla FM. Genetic knock-down of brain-derived neurotrophic factor in 3xTg-AD mice does not alter A β or tau pathology [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e39566.
- [11] 侯雪飞,龚仕涛,李锦超,等. APP/PS1转基因AD模型小鼠海马自噬及相关信号通路研究[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2021, 28(1): 53-57.
- [11] Hou XF, Gong ST, Li JT, et al. Hippocampal autophagy and related signaling pathways in APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease model mice [J]. *Chin J Neuroimmunol & Neurol*, 2021, 28(1): 53-57
- [12] Wang M, Cai X, Wang Y, et al. Astragaloside alleviates neuropathic pain by suppressing P2X4-mediated signaling in the dorsal root ganglia of rats [J]. *Front Neurosci*, 2021, 14: 570831.
- [13] Han YM, Koh J, Kim JH, et al. Astragaloside inhibits nuclear factor- κ B signaling in human colonic epithelial cells and attenuates experimental colitis in mice [J]. *Gut Liver*, 2021, 15(1): 100-108.
- [14] Yuan Z, Luan G, Wang Z, et al. Flavonoids from *Potentilla parvifolia* Fisch. and their neuroprotective effects in human neuroblastoma SH-SY5Y cells in vitro [J]. *Chem Biodivers*, 2017, 14(6). doi: 10.1002/cbdv.201600487.
- [15] 崔悦. 骨碎补提取物对两种记忆障碍模型小鼠和A β 损伤PC12细胞的保护作用研究[D]. 佳木斯大学, 2019.
- [15] Cui Y. Protective effects of *Rhizoma Drynariae* extract on mice with two memory impairment models and A β [D]. Jiamusi University, 2019.
- [16] Cho IH, Choi YJ, Gong JH, et al. Astragaloside inhibits

- autophagy-associated airway epithelial fibrosis [J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 51.
- [17] Chiang YY, Wang SL, Yang CL, et al. Extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer induce apoptosis and autophagy by inhibiting dihydrodiol dehydrogenase, thus enhancing anticancer effects [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(3): 577-584.
- [18] 郭曼莉, 高玉元, 张晴曦, 等. A β 1-42寡聚体对 α -syn 过表达 SHSY5YA53T 细胞自噬功能的影响 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2019, 45(7): 422-426.
Guo ML, Gao YY, Zhang QX, et al. Study on the toxic effects of A β 1-42 oligomers in SHSY5Y with human A53T mutant α -synuclein over-expression [J]. *Chin J Nerv Ment Dis*, 2019, 45(7): 422-426.
- [19] Sun C, Qiu X, Wang Y, et al. Long-term oral melatonin alleviates memory deficits, reduces amyloid- β deposition associated with downregulation of BACE1 and mitophagy in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 735: 135192.
- [20] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [21] Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy [J]. *BMB Rep*, 2016, 49(8): 424-430.
- [22] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609-624.
- [23] Hartman NW, Lin TV, Zhang L, et al. mTORC1 targets the translational repressor 4E-BP2, but not S6 kinase 1/2, to regulate neural stem cell self-renewal in vivo [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(2): 433-444.
- [24] Han J, Wang B, Xiao Z, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 39(1): 118-124.
- [25] Zhang Z, Wang X, Zhang D, et al. Geniposide-mediated protection against amyloid deposition and behavioral impairment correlates with downregulation of mTOR signaling and enhanced autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(2): 536-548.

(编辑 孙慧兰)