

瑞香素对阿尔茨海默病模型小鼠自噬的影响

梅峥嵘, 洪晔, 袁中文, 曾晓敏, 司徒冰* (广州医科大学附属第三医院药学部, 广东省产科重大疾病重点实验室, 广州 510510)

摘要: 目的 探讨瑞香素对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)自噬的影响以及对 AD 神经保护的作用机制。方法 选用 APP/PS1 双转基因模型小鼠, 3 个月龄后开始灌胃给药。药物治疗 3 个月后, 通过 Morris 水迷宫试验观察瑞香素对 AD 模型小鼠空间探索和记忆能力的影响; 采用 ELISA 试剂盒检测 AD 模型小鼠海马组织 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 水平; 利用 Western blotting 检测瑞香素对 AD 模型小鼠海马组织微管相关蛋白轻链 3 II(microtubule-associated proteins light chain 3 II, LC3-II)、beclin-1 及 p62 表达水平的影响。结果 Morris 水迷宫试验显示, APP/PS1 双转基因模型小鼠逃避潜伏期较对照组明显延长, 原象限停留时间明显缩短; 瑞香素组小鼠逃避潜伏期较模型组明显缩短, 原象限停留时间明显延长。与对照组比较, APP/PS1 双转基因模型小鼠脑组织中 $A\beta$ 水平增多, 而瑞香素减少模型小鼠 $A\beta$ 水平; Western blotting 结果显示 AD 模型小鼠海马区 LC3-II 及 beclin-1 显著降低, p62 显著增加, 而瑞香素可上调 APP/PS1 双转基因模型小鼠 LC3-II 及 beclin-1 表达并抑制 p62 的蛋白表达。结论 瑞香素通过上调 LC3II 和 beclin-1 自噬相关蛋白增强自噬, 改善 AD 模型小鼠的学习记忆功能。

关键词: 阿尔茨海默病; 瑞香素; 自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)17-2198-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.17.005

引用本文: 梅峥嵘, 洪晔, 袁中文, 等. 瑞香素对阿尔茨海默病模型小鼠自噬的影响[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2198-2203.

Effect of Daphnetin on Autophagy in Alzheimer's Disease Model Mice

MEI Zhengrong, HONG Ye, YUAN Zhongwen, ZENG Xiaomin, SITU Bing* (Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Guangzhou 510150, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of daphnetin on autophagy in Alzheimer's disease(AD) and its mechanism of neuroprotection in AD. **METHODS** Drugs were administered to 3-month old APP/PS1 double transgenic mice. After 3 months of drug treatment, the effect of daphnetin on spatial exploration and memory in AD model mice was observed by Morris water maze test; ELISA kits were used to detect the levels of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ in the hippocampus of AD model mice. Western blotting was used to detect the effect of daphnetin on microtubule-associated protein light chain 3 II(LC3-II), beclin-1 and the effect of p62 expression level. **RESULTS** Morris water maze test showed that the escape latency of APP/PS1 double transgenic mice was significantly longer than that of the control group, and the residence time of the original quadrant was significantly shorter. The escape latency of daphnetin group was significantly shorter and the residence time of the original quadrant was prolonged compared with the model group. Compared with the control group, the levels of $A\beta$ in the brain of APP/PS1 double transgenic mice were increased, and the levels of $A\beta$ in daphnetin group were significantly decreased. Western blotting results showed that LC3-II and beclin-1 in hippocampus of AD model mice decreased significantly, daphnetin increased the expression of LC3-II and beclin-1 and inhibited the protein expression of p62. **CONCLUSION** Daphnetin enhances autophagy by up regulating LC3-II and beclin-1 proteins and improves the learning and memory function of AD mice.

KEYWORDS: Alzheimer's disease; daphnetin; autophagy

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆, 是一种主要表现为记忆、认知、语言和行为障碍为特征的神经系统退行性疾病, 是最常见、对人类健康及生活质量影响最大的痴呆类型^[1]。AD 主要的病理特征包括神经细胞外以 β 淀粉样蛋

白(amyloid-beta protein, $A\beta$)沉积为核心形成的老年斑、细胞内以磷酸化的 Tau 蛋白为核心形成的神经原纤维缠结及神经细胞丢失等^[2-3]。自噬是细胞内的溶酶体降解自身细胞器和大分子的过程, 当细胞在缺乏营养或发生应激反应时可发生自噬。自

基金项目: 广东省中医药局中医药科研项目(20212136)

作者简介: 梅峥嵘, 女, 博士, 副主任药师 E-mail: meizhengrong@126.com *通信作者: 司徒冰, 女, 硕士, 主任药师, 硕士 E-mail: 843234573@qq.com

· 2198 · Chin J Mod Appl Pharm, 2022 September, Vol.39 No.17

中国现代应用药学 2022 年 9 月第 39 卷第 17 期

噬能够清除细胞中错误折叠的蛋白质、受损的细胞器及有害物质,对维持细胞的正常生理功能及生存具有重要意义。近年来,自噬的研究成为AD研究的热点,自噬参与A β 的清除、促进Tau及磷酸化Tau的降解,具有神经保护作用,在AD患者和AD动物模型上发现,在A β 及Tau等病理特征形成以前,AD神经元已出现自噬障碍,当自噬功能出现损伤时,自噬体得以累积,A β 及Tau清除及降解受阻,造成A β 沉积及神经损伤^[4]。因此,提高大脑的自噬水平,改善自噬障碍,从而减少A β 和Tau,可能是一个防治AD的有效策略,有学者利用AD小鼠模型给予雷帕霉素或丙戊酸钠诱导自噬可减少A β 斑块的沉积,改善痴呆小鼠的认知功能^[5]。

瑞香素是一种从瑞香中提取的活性成分,具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等多种药理作用。近年来,有研究发现瑞香素具有神经保护作用,在缺血/再灌注小鼠模型上发现瑞香素通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路发挥神经保护作用^[6];体外研究发现瑞香素通过调节MAPK信号传导和HSP70表达来保护氧化应激诱导的神经元凋亡^[7];Wang等^[8]发现瑞香素通过调节HO-1改善实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠的炎症反应,在体外培养的大鼠皮层神经元中发现瑞香素通过促进脑源性神经营养因子的表达促进神经元生长。有研究发现瑞香素具有胆碱酯酶和BACE1抑制剂的潜力而可能发挥抗AD的作用。中药具有多靶点的作用,在其他疾病上发现瑞香素有诱导自噬的作用,尽管AD病理机制尚不清楚,但自噬障碍与神经系统疾病的发病机制有关。本研究以自噬为靶点观察瑞香素对AD的保护作用,利用APP/PS1双转基因小鼠观察瑞香素对痴呆动物学习记忆及自噬的影响,探讨瑞香素防治AD的机制,为临床AD的防治提供新思路和治疗靶点。

1 材料

1.1 动物

3月龄,♂,健康APP/PS1双转基因小鼠60只,购自南京大学模式动物研究所,动物生产许可证号:SCXK(苏)2005-0002;饲养于广州医科大学SPF级实验动物中心。动物中心温度稳定在25℃,相对湿度为40%~70%,昼夜交替进行光照。所有操作均符合动物伦理学要求。

1.2 试剂

瑞香素(成都曼思特生物有限公司,纯度 \geq 99%;货号:486-35-1);A β ₁₋₄₀A β ₁₋₄₂ELISA试剂盒(货号分别为ml037956、m1001859)均购自上海酶联生物科技有限公司;微管相关蛋白轻链3II(microtubule-associated proteins light chain 3 II, LC3II,货号:ab63817)及beclin-1抗体(货号:ab207612)均购自Abcam公司;HRP标记的兔抗小鼠二抗(货号:sc-358914)、羊抗小鼠二抗(货号:sc-2005)均购自Santa Cruz公司; β -actin抗体(Cell signaling公司,货号:CST-4970);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物科技有限公司,货号:P0010)。

1.3 仪器

水迷宫自动记录仪(中国医学科学研究院);Multiskan FC多功能酶标仪、SorvallST8冷冻离心机均购自Thenno Scientific公司;Power Pac Basic蛋白免疫印迹系统(Bio-Rad公司);T25机械匀浆器(德国IKA公司)。

2 方法

2.1 动物分组及治疗

选用APP/PS1双转基因小鼠模型,将其随机分为3组,另取同窝阴性小鼠作为对照组,每组动物10只,3个月龄后开始给药。对照组:同窝阴性小鼠,每天灌胃给予等量的10%乙醇;模型组:转基因小鼠,每天灌胃给予等量的10%乙醇;瑞香素组:转基因小鼠,每天腹腔注射给予200 mg·kg⁻¹剂量的瑞香素。每周测体质量,按体质量调整用药剂量,给药3个月后,通过Morris水迷宫试验测试小鼠学习记忆能力的变化。处死小鼠,留取大脑海马组织。应用ELISA试剂盒测定A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂水平;应用Western blotting检测自噬蛋白表达差异。

2.2 Morris水迷宫试验

2.2.1 定位航行试验 动物预先训练2 d,每天3次,每次间隔2 h,训练时将动物随机在不同的象限头朝池壁放入水池,次序每天不同,引导其按直线方向游向平台并在平台上站立20 s,之后开始正式试验。将小鼠面向池壁分别从4个人水点放入水中,自动录像系统记录小鼠找到平台所需时间,即逃避潜伏期,若60 s内未找到平台,则由试验者将其引向平台,则其潜伏期为60 s。每天上午、下午各测试2次,连续测试5 d。

2.2.2 空间探索试验 于定位航行结束后次日上午撤除平台,在原平台象限的对侧象限入水,记录 60 s 的游泳轨迹,测量 60 s 内小鼠在原平台象限停留时间并进行比较分析。数据搜集和处理由 Morris 软件完成。

2.3 ELISA 定量检测小鼠脑组织中的 A β 水平

采用 ELISA 试剂盒检测脑匀浆中 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 的浓度。将提供的标准品做一系列的浓度梯度稀释;每孔加入 50 μ L 标准品或待测样品准备;每孔加入 50 μ L 的抗 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 的一抗(兔源性),室温震荡 3 h;用洗液将 96 孔板清洗 4 次,拍打控干孔内液体;每孔加入 100 μ L 抗兔二抗,室温震荡 30 min;用洗液将 96 孔板清洗 4 次,拍打控干孔内液体;每孔加入 100 μ L 显色液,避光显色 30 min;每孔加入 100 μ L 终止液,用酶标仪 450 nm 检测吸光度。

2.4 Western blotting 检测

按蛋白提取试剂盒说明书提取脑组织蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,海马中加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,匀浆器匀浆后,4 $^{\circ}$ C 10 000 \times g 离心 15 min,取蛋白上清测蛋白浓度后加上样缓冲液,煮沸 5 min 后上样。蛋白上样量 50 μ g,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白条带转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,用一抗孵育,置于 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 1 \times TBST 溶液(20 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris、137 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl、0.1%Tween-20)洗膜,3 \times 15 min,加二抗,孵育 1 h,1 \times TBST 溶液洗膜,3 \times 15 min,加 ECL 试剂后用凝胶成像系统显影,Image J 软件进行灰度分析。

2.5 数据处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件,以多组间方差分析及组间 LSD- t 检验作统计学处理, Morris 水迷宫试验数据采用重复测量数据的方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的影响

采用 Morris 水迷宫试验观察瑞香素是否能改善 AD 模型小鼠的学习和记忆,潜伏期短,表示动物的学习记忆能力好。模型组学习和记忆成绩均低于对照组($P < 0.05$)。瑞香素能缩短小鼠寻找平台潜伏期,与模型组比较差异具有统计学意义

($P < 0.05$)。训练 5 d 后即第 6 天去掉平台,观察各组小鼠的空间探索试验,与对照组相比,模型组在原平台所在象限停留时间明显缩短($P < 0.05$);与模型组相比,瑞香素组小鼠在原平台象限停留时间显著增加($P < 0.05$)。结果见图 1。

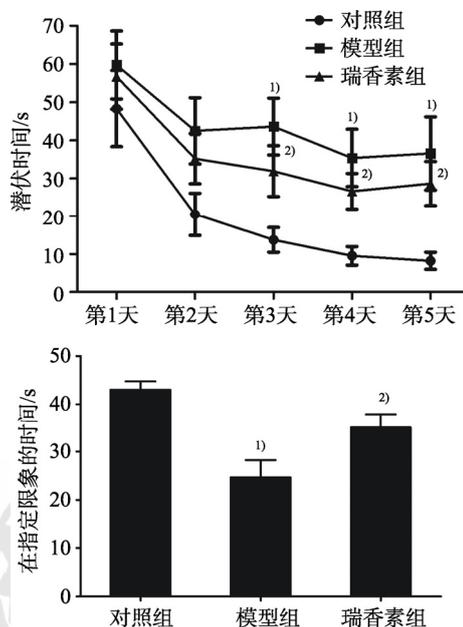


图 1 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的改善作用
与对照组比较, $^1)P < 0.05$; 与模型组比较, $^2)P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effect of daphnetin on learning and memory ability of APP/PS1 double transgenic mice
Compared with control group, $^1)P < 0.05$; compared with model group, $^2)P < 0.05$.

3.2 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 A β 水平的影响

行为学检测结束后处死动物,留取脑组织,采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠海马中 A β_{1-42} 和 A β_{1-40} 的水平,结果显示,与对照组相比,转基因模型小鼠海马的 A β_{1-40} 及 A β_{1-42} 表达水平显著增加($P < 0.05$),而与模型组比较,瑞香素能显著降低 APP/PS1 双转基因小鼠海马 A β_{1-40} 及 A β_{1-42} 水平($P < 0.05$),差异具有统计学意义,结果见图 2。

3.3 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠 LC3-II 蛋白表达的影响

A β 的生成和沉积与自噬功能障碍有关,LC3-II 是自噬标志分子,为进一步探讨瑞香素作用于 AD 的分子机制是否与抑制自噬有关,通过 Western blotting 检测 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织中 LC3-II 蛋白表达的变化。结果显示,同对照组比较,模型组 APP/PS1 双转基因小鼠 LC3-II

蛋白表达下调($P<0.05$), 而与模型组比较, 瑞香素能显著上调 APP/PS1 双转基因小鼠 LC3-II 蛋白表达($P<0.05$), 结果见图 3。

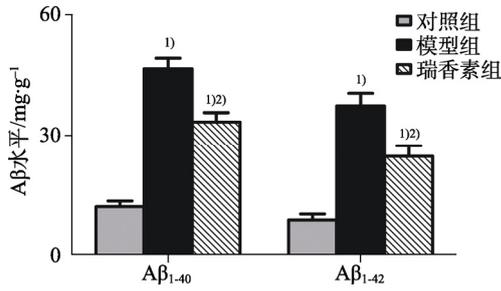


图 2 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 Aβ₁₋₄₀ 及 Aβ₁₋₄₂ 水平的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of daphnetin on levels of Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

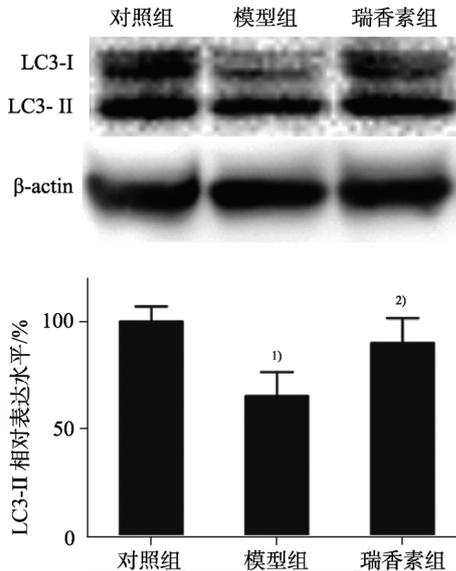


图 3 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织 LC3-II 蛋白表达的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of daphnetin on expression of LC3-II in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

3.4 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠 beclin-1 蛋白表达的影响

beclin-1 水平与神经变性密切相关, 通过 Western blotting 检测 AD 模型小鼠海马组织中 beclin-1 蛋白表达的变化。结果显示, 与对照组比较, 模型组 APP/PS1 双转基因小鼠 beclin-1 蛋白表达下调($P<0.05$), 而与模型组比较, 瑞香素能显著上调 APP/PS1 双转基因小鼠 beclin-1 蛋白表达($P<$

0.05), 结果见图 4。

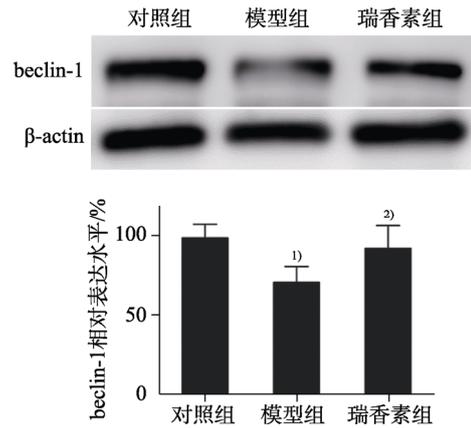


图 4 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织 beclin-1 蛋白表达的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of daphnetin on expression of beclin-1 in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

3.5 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠 p62 蛋白表达的影响

由于 p62 集中在自噬体中, 并且通常在溶酶体融合后降解, 因此它们的积累显示自噬通量受到破坏。通过 Western blotting 检测 AD 模型小鼠海马组织中 p62 蛋白表达的变化。结果显示, 同对照组比较, 模型组 APP/PS1 双转基因小鼠 p62 蛋白表达上调($P<0.05$), 而与模型组比较, 瑞香素能使 APP/PS1 双转基因小鼠 p62 蛋白表达下调($P<0.05$), 结果见图 5。

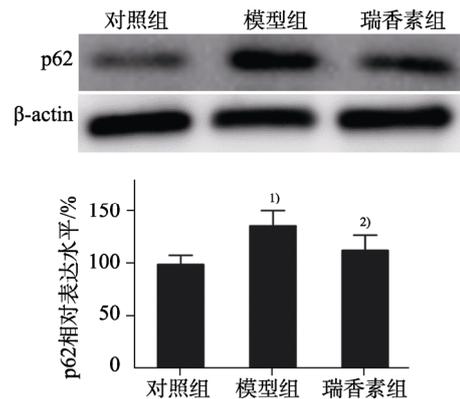


图 5 瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织 p62 蛋白表达的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of daphnetin on expression of p62 in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

4 讨论

AD 是最常见的神经退行性疾病和痴呆最常见的原因。它是一种进行性疾病,会慢慢破坏记忆和认知功能。AD 的病理机制尚不清楚。近来有学者报道,脑内的神经炎症反应和自噬分别在胞外和胞内有吞噬并清除异物的功能,在 AD 的病理进程中也十分重要^[3]。在神经退行性疾病中,自噬功能受损导致无法清除异常沉积或错误折叠的蛋白质。因此,诱导自噬可能是消除 AD 中 A β 的有效方法。本研究利用 APP/PS1 双转基因小鼠以自噬为靶点探讨瑞香素对 AD 的保护作用,结果显示瑞香素使 AD 小鼠海马中 beclin-1 水平升高,而 LC3-II 水平及 p62 蛋白水平降低,表明自噬激活,本研究提示瑞香素可调节 APP/PS1 双转基因小鼠自噬,减少 A β 的水平。

APP/PS1 双转基因小鼠能够较好地模拟类似 AD 的病理特点,是目前常用的研究 AD 的动物模型,该模型小鼠随着年龄的增长脑中 A β 水平不断增加,在 9 个月左右脑内开始出现较多的 β 淀粉样斑块,在 AD 患者和 AD 动物模型上发现在 A β 及 Tau 等病理特征形成以前 AD 神经元已出现自噬障碍^[9]。本研究观察瑞香素对自噬的调节作用,因此选用 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠作为研究对象。

Morris 水迷宫试验是研究动物空间学习记忆能力的经典方法,主要用于测试实验动物对空间位置觉和方向觉(空间定位)的学习记忆能力。潜伏期是 Morris 水迷宫定位航行阶段的重要指标,是指动物每一次入水后第一次成功找到平台所需的时间,实验动物必须依靠其空间学习记忆能力准确定位水迷宫内水面下不可见的平台,它的长短代表着动物空间学习记忆能力的好坏,潜伏期短,预示着动物的学习记忆能力好。采用 Morris 水迷宫试验观察瑞香素对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆功能的影响,结果发现,APP/PS1 双转基因小鼠寻找平台的潜伏期明显延长,表明 APP/PS1 双转基因小鼠存在学习记忆能力减退,而瑞香素可以使 AD 模型小鼠逃避潜伏期缩短;原平台所在象限停留时间延长,能够明显改善 AD 模型小鼠空间学习记忆能力。近年来,研究发现瑞香素具有神经保护作用,Liao 等^[10]发现瑞香素可改善慢性不可预见应激性模型小鼠的认知缺陷。

自噬在调节细胞生长、存活和死亡以及大分子分解代谢信号传导、衰老、炎症和免疫方面起

着至关重要的生理和病理作用。自噬的基本任务是去除细胞中的异常蛋白,尤其是在疾病状态下形成的异常蛋白。自噬的发生过程可分为 4 个阶段:首先,自噬诱导剂刺激形成吞噬泡;其次,吞噬泡延伸,形成自噬体;然后自噬体与溶酶体融合,形成自噬溶酶体;最后在溶酶体水解酶的作用下降解自噬体。围绕自噬与 AD 的关系已进行了较多的研究,自噬参与 A β 的清除及 Tau 蛋白降解,具有神经保护作用,大量的证据表明在 AD 中发生了自噬失调,在 AD 患者和 AD 动物模型上发现,自噬明显受损^[11]。在自然状态下,动物胞浆中存在着可溶性 LC3-I,当发生自噬时,LC3-I 可以经加工修饰转变为 LC3-II。LC3-II 是自噬标志分子,LC3-II 的量与自噬小体的数量紧密相关,在一定程度上可以反映细胞的自噬活性^[12]。beclin-1 是第 1 个与哺乳动物自噬调节相关的基因,beclin-1 的表达水平与哺乳动物细胞中的自噬密切相关。beclin-1 能启动自噬并控制自噬体的成熟,是自噬形成的重要蛋白,在调控自噬中发挥关键作用。有研究发现,beclin-1 水平与神经变性密切相关,在 AD 中检测到 beclin-1 水平降低^[13]。而过表达 beclin-1 可减少 AD 小鼠模型中 A β 的聚集^[14]。本研究利用 APP/PS1 双转基因小鼠发现小鼠海马组织中 LC3-II 和 beclin-1 蛋白均下调,表明 AD 模型小鼠脑内出现自噬障碍,而瑞香素作用于 APP/PS1 双转基因小鼠后,可上调 beclin-1 的表达,表明在 AD 小鼠模型中瑞香素可诱导自噬发生。中药具有多靶点的作用,在其他的动物模型上显示瑞香素可以调节自噬,Lyu 等^[15]发现瑞香素通过激活自噬对脂多糖诱导的小鼠急性肝衰竭产生保护作用。瑞香素通过增强 mTOR 依赖性自噬途径诱导自噬来预防耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌感染^[16]。

自噬开始于自噬体的形成,然后将这些囊泡与溶酶体融合,随后被溶酶体中的酶降解。作为重要的多功能衔接子分子,p62 是参与自噬-溶酶体降解的关键货物衔接蛋白,通过直接与 LC3 结合而掺入自噬体中,在自噬-溶酶体融合后会被降解^[17]。因此,p62 水平与自噬通量成反比,p62 过度表达可能抑制自噬^[18]。为了确定瑞香素是否可以促进自噬成熟,笔者检测了 p62 的蛋白水平,结果发现与对照组相比,APP/PS1 双转基因小鼠海马组织中 p62 的表达增加,而瑞香素可抑制 APP/PS1 双转基因小鼠海马中 p62 的上调,推测瑞

香素可能通过促进自噬与溶酶体结合诱导自噬。

综上所述, 瑞香素能明显改善 APP/PS1 双转基因小鼠的认知和记忆功能障碍, 减少海马中 A β 的分泌, 上调自噬相关蛋白 LC3-II 和 beclin-1 表达, 抑制 p62 表达, 推测其机制可能与瑞香素增强 APP/PS1 小鼠脑组织中自噬与溶酶体结合, 增加自噬对 A β 的清除有关, 关于瑞香素对 AD 自噬调控的具体机制, 值得进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] TETSUKA S. Depression and dementia in older adults: A neuropsychological review[J]. *Aging Dis*, 2021, 12(8): 1920-1934.
- [2] JIA L F, QUAN M N, FU Y, et al. Dementia in China: Epidemiology, clinical management, and research advances[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 81-92.
- [3] OLIVEIRA J M, HENRIQUES A G, MARTINS F, et al. Amyloid- β modulates both A β PP and tau phosphorylation[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 45(2): 495-507.
- [4] MAIESE K. Addressing Alzheimer's disease and cognitive loss through autophagy[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2020, 17(4): 339-341.
- [5] ZHANG L J, WANG L N, WANG R, et al. Evaluating the effectiveness of GTM-1, rapamycin, and carbamazepine on autophagy and alzheimer disease[J]. *Med Sci Monit*, 2017(23): 801-808.
- [6] ZHI J, DUAN B, PEI J W, et al. Daphnetin protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4132-4139.
- [7] QI Z L, QI S M, GUI L, et al. Daphnetin protects oxidative stress-induced neuronal apoptosis via regulation of MAPK signaling and HSP70 expression[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1959-1964.
- [8] WANG D, LU Z, ZHANG H, et al. Daphnetin alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis via regulating dendritic cell activity[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(7): 558-567.
- [9] VAN GROEN T, KILIAAN A J, KADISH I. Deposition of mouse amyloid beta in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 23(3): 653-662.
- [10] LIAO M J, LIN L F, ZHOU X, et al. Daphnetin prevents chronic unpredictable stress-induced cognitive deficits[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013, 27(5): 510-516.
- [11] REDDY P H, OLIVER D M. Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease[J]. *Cells*, 2019, 8(5): 488.
- [12] ÇELİK H, KARAHAN H, KELICEN-UĞUR P. Effect of atorvastatin on A β 1-42-induced alteration of SESN2, SIRT1, LC3II and TPP1 protein expressions in neuronal cell cultures[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(3): 424-436.
- [13] ESTEVES A R, FILIPE F, MAGALHÃES J D, et al. The role of beclin-1 acetylation on autophagic flux in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(8): 5654-5670.
- [14] JOUNAI N, KOBIYAMA K, SHIINA M, et al. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1[J]. *J Immunol*, 2011, 186(3): 1646-1655.
- [15] LYU H M, FAN X Y, WANG L D, et al. Daphnetin alleviates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure via the inhibition of NLRP3, MAPK and NF- κ B, and the induction of autophagy[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018(119): 240-248.
- [16] ZHANG W, ZHUO S Q, HE L, et al. Daphnetin prevents methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection by inducing autophagic response[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019 (72): 195-203.
- [17] CHAMBRAUD B, DAGUINOT C, GUILLEMEAU K, et al. Decrease of neuronal FKBP4/FKBP52 modulates perinuclear lysosomal positioning and MAPT/Tau behavior during MAPT/Tau-induced proteotoxic stress[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3491-3510.
- [18] RAHMAN M A, CHO Y, HWANG H, et al. Pharmacological inhibition of O-GlcNAc transferase promotes mTOR-dependent autophagy in rat cortical neurons[J]. *Brain Sci*, 2020, 10(12): 958.

收稿日期: 2021-06-09

(本文责编: 沈倩)