葛根素对阿尔茨海默病细胞模型 Aβ 蛋白的抑制作用

梅峥嵘,谭湘萍*,黄汉辉,曾晓敏(广州医科大学附属第三医院,广东 510150)

摘要:目的 在过表达 β 淀粉样前体蛋白的 SH-SY5Y 细胞上(SH-SY5Y/APP695)观察葛根素对 β 淀粉样蛋白(β-amyloid protein, Aβ)生成的作用,探讨其防治阿尔茨海默病的机制。方法 葛根素 2.5,5 和 10 µmol·L⁻¹处理 SH-SY5Y/APP 细胞 24 h, MTT 法检测细胞活力, ELISA 试剂盒测定细胞外 A $\beta_{1.40}$ 和 A $\beta_{1.42}$ 水平; Western blot 蛋白质印迹法检测 APP 及 β-分泌酶的蛋白表达变化;荧光法测 β-分泌酶的活性; RT-PCR 法检测 β-分泌酶转录的变化。结果 葛根素可剂量依赖性 的减少 SH-SY5Y/APP695 细胞外 A $\beta_{1.40}$ 、A $\beta_{1.42}$ 的水平;酶活性分析显示 2.5,5 和 10 µmol·L⁻¹ 的葛根素分别抑制了 15%, 30%和 40%β-分泌酶的活性。Western blot 印迹结果显示,葛根素能剂量依赖性抑制 β-分泌酶蛋白表达,2.5,5 和 10 µmol·L⁻¹ 的葛根素使 β-分泌酶的蛋白表达分别减少至 82%,71%和 45%,与空白对照组比较差异均具有统计学意义(P<0.05)。结论 葛根素通过下调 β-分泌酶蛋白的表达、抑制 β-分泌酶的活性减少 Aβ 的形成,这可能是葛根素防治阿尔茨海默病作用的 重要机制之一。

关键词: 阿尔茨海默病; 葛根素; β淀粉样蛋白
 中图分类号: R285.5
 文献标志码: A
 DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.002

文章编号: 1007-7693(2015)01-0005-05

Puerarin Against Alzheimer's Disease by Inhibition β-amyloid Protein

MEI Zhengrong, TAN Xiangping^{*}, HUANG Hanhui, ZENG Xiaomin(*The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of puerarin on β -amyloid precursor protein (APP) processing on SH-SY5Y cells transfected with human APP695 cDNAs and to explore the mechanism of puerarin on Alzheimer's disease(AD). **METHODS** SH-SY5Y cells transfected with human APP695 cDNAs were cultured with 2.5, 5, 10 µmol·L⁻¹ puerarin, and cell survival was detected by MTT assay. The levels of A $\beta_{1.40}$ and A $\beta_{1.42}$ in conditioned were measured medium by using ELISA kit. The expressions of APP and β -secretase were detected by Western blot. The activity of secretase were measured by using a fluorescence spectrophotometer, the mRNA transcription of β -secretase were detected by RT-PCR. **RESULTS** Puerarin could dose-dependently reduce the levels of extracellular A $\beta_{1.40}$ or A $\beta_{1.42}$. After treatment with 2.5, 5 and 10 µmol·L⁻¹ puerarin for 24 h, the activity of β -secretase was decreased 15%, 30% and 40%, respectively(P<0.05). Compared with control group, puerarin 2.5, 5 and 10 µmol·L⁻¹ decreased β -secretase protein express to 82%, 71% and 45%, respectively(P<0.05). **CONCLUSION** Puerarin decreases A β levels by inhibit β -secretase expression and β -secretase activity, which may account for molecular mechanisms underlying the therapeutic efficacy of puerarin in AD patients. **KEY WORDS**: Alzheimer's disease; puerarin; amyloid

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性的神经退行性疾病,其临床症状主要表现为记忆与认知能力的逐步丧失^[1]。越来越多的研究表明,β淀粉样蛋白(β-amyloid protein, Aβ)是AD发病的重要原因^[2]。Aβ具有神经毒性,是AD各种病理及临床改变的始发因素。由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的过度产生与异常裂解而导致的Aβ生成增多是AD发病的主要机制。因此,通过抑制APP的淀粉样代谢途径的药物可能用来治疗AD。目前AD治疗仍缺乏有效

E-mail: meizhengrong@126.com ^{*}通信作者: 谭湘萍, 女, 硕士,

的药物,胆碱脂酶抑制剂和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体拮抗剂是当 前临床上常用的主要治疗药物,虽能不同程度地 改善 AD 患者的认知和记忆功能,一定程度地提高 患者的生活质量,但无法有效地阻止 AD 病理发展 的进程和延缓患者病情的进展。所以,寻找理想 的 AD 治疗药物,延缓或逆转 AD 的病理改变进程, 是 AD 研究的难点和热点问题。β-分泌酶为 APP 裂解的限速酶,在减少 Aβ 产生的众多方法中,最 便捷的就是通过直接抑制β-分泌酶来减少 Aβ 的生

基金项目: 广东省中医药强省基金项目(20111257)

作者简介:
 梅峥嵘,女,博士,副主任药师
 Tel: (020)81292709

 副主任药师
 Tel: (020)81292702
 E-mail: ping_txp@126.com

成。因此, β -分泌酶已成为设计 AD 治疗药物的重 要靶点^[3]。

葛根素为葛根中提取的一种异黄酮类化合物,具有扩张冠脉和脑血管、降低心肌耗氧量、 改善心肌收缩功能、促进血液循环等作用,临床 上广泛用于冠心病、心绞痛、缺血性心脑血管病 等疾病的治疗^[4]。已有研究证实葛根素具有神经保 护作用,并可改善 AD 模型大鼠的学习记忆功能 ^[5-6]。有学者利用豚鼠模型研究发现葛根素能增加 海马胆碱乙酰转移酶的活性和表达^[7]。这些研究均 提示葛根素可能用于治疗 AD,但葛根素对于引起 AD 发病的主要原因 Aβ 是否有作用,目前尚无研 究。本实验以过表达 APP695 的 SH-SY5Y 细胞为 模型,观察葛根素对 Aβ 生成的影响,探讨葛根素 防治 AD 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

胰蛋白酶、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四 氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和葛根素(批 号:82435)购于美国 Sigma 公司;胎牛血清(杭州 四季青生物工程材料有限公司);pEGFP-N3 质粒 由本室保存,pcDNA3.1-APP695 质粒由匹兹堡大 学医学院药学部 LEFTEROV 教授惠赠;Aβ40、 Aβ42 ELISA 检测试剂盒(美国 Biosource 公司,批 号:KHB3841,KHB3544);β-分泌酶活性检测试 剂盒(美国 R&D Systems 公司,批号:DCATB0); β-分泌酶抗体(美国 Santa Cruz 公司);Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂、DMEM 及 APP 抗体购于美国 Invitrogen 公司;HRP标记的兔抗羊、羊抗兔、羊 抗小鼠二抗购于美国 Santa Cruz 公司;RT-PCR 试 剂盒(大连宝生物公司,批号:2180)。

1.2 细胞培养

将人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞(中山大学 中山医学院细胞中心)培养在含 10%胎牛血清、 100 U·mL⁻¹ 氨苄青霉素及 100 U·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 ℃、饱和湿度、5%CO₂ 浓度下培养, 2~3 d 换液 1 次。实验均取对数生长 期细胞。

1.3 MTT 比色法检测 SH-SY5Y 细胞活性

用 96 孔板培养 SH-SY5Y 细胞, 细胞培养第 2 天按实验分组分别加入 2.5, 5, 10, 20, 40 μmol·L⁻¹ 葛根素, 在 37 ℃、含 5%CO₂的培养箱内孵育 20 h, 加入 10 μL 终浓度为 0.5 g·L⁻¹的 MTT, 孵育 4 h 后,吸弃上清液,每孔加入150 μL DMSO,室温振荡10 min,待紫色结晶物充分溶解,用全自动酶标 仪读取570 nm 处光密度值(*A*),每组重复3孔。细 胞存活率=(检测孔的*A*值/对照孔的*A*值)×100%。

1.4 细胞转染

在无菌的离心管中准备好 A、B 溶液(A 溶液: 4.0 µg DNA+250 µL 无血清培养液; B 溶液: 4 µL lipofectamine+250 µL 无血清培养液);将 A、B 溶 液轻轻混匀,室温下放置 30 min,使 DNA 与脂质 体形成复合体;用 2 mL 无血清培养液洗涤 6 孔板 中的细胞;往复合体中加入 0.4 mL 无血清培养液 (不含抗菌药物),温和混匀,加入到 1 个孔;将 6 孔板置于 37 ℃,5% CO₂培养箱中,孵育 6 h 后换 无血清培养液,48 h 后分别加入 2.5,5,10,20, 40 µmol·L⁻¹的葛根素,适当时间后收获细胞。

1.5 ELISA 定量检测 SH-SY5Y/APP695 细胞外 Aβ₁₋₄₀ 和 Aβ₁₋₄₂ 水平

采用 Biosource 公司生产的 Human $A\beta_{1.40}$ 和 $A\beta_{1.42}$ ELISA 试剂盒,按照试剂盒说明书操作,检 测细胞培养液中 $A\beta_{1.40}$ 和 $A\beta_{1.42}$ 浓度,结果以每组 药物处理组与空白对照组的比值表示 $A\beta_{1.40}$ 和 $A\beta_{1.42}$ 的相对浓度,每个实验重复 3 次。

1.6 检测 SH-SY5Y/APP695 细胞中 β-分泌酶活性 β-分泌酶活性测定采用酶活性测定试剂盒,按 说明书指导,利用荧光分光光度计检测荧光强度。
1.7 RT-PCR 法检测 SH-SY5Y/APP695 细胞 β-分 泌酶的 mRNA 转录水平变化

按照 Trizol 说明书操作裂解细胞提取总 mRNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明书反转录合成 cDNA 第1链,PCR 反应检测目的基因 β-分泌酶 的表达。扩增片段 β-分泌酶,上游:GCAGACCCA CCATTCCGAACA,下游:GCCACTGTCCACGAT GCTCTT;β-肌动蛋白,上游:AGCCATGTACGTA GCCATCC,下游:CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA, 扩增反应条件:94℃ 解链 2 min;94℃ 变性 30 s, 退火 45 s,72℃延伸 30 s,循环,72℃7 min。扩 增 32 个循环,最后 72℃延伸 10 min,4℃终止反 应,100 V 琼脂糖凝胶电泳 45 min,凝胶成像仪拍 照,以图像分析处理系统进行灰度扫描,并以内 参校正作相对量分析。

1.8 Western 印迹法检测 SH-SY5Y/APP695 细胞 APP 及 β-分泌酶蛋白的表达

SH-SY5Y/APP695 细胞分别经 2.5~10 µmol·L⁻¹

葛根素作用 24 h 后, 检测 APP 及 β-分泌酶蛋白表 达水平,将细胞置于冰盒上,加入裂解液后收集 细胞,进行蛋白定量,蛋白浓度调成一致后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将电泳后分离的蛋白 质电转移至硝酸纤维素膜上,封闭,加入一抗后4 ℃过夜,二抗孵育2h,进行 ECL 化学发光,图像 采集,每个抗体测定时都进行 α 微管蛋白测定, 以校准蛋白上样量的一致性,用LabWork 4.0凝胶 蛋白分析软件对条带进行分析,以每个条带的积 分吸光度值(integrated absorbance, IA)与其对应的 α 微管蛋白的比值表示蛋白的表达水平。每个实验 重复3次。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 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。

2 结果

40

2.1 葛根素对 SH-SY5Y 细胞形态学及细胞活力 的影响

细胞形态学及 MTT 结果显示, 葛根素 $2.5 \sim 40 \text{ µmol·L}^{-1}$ 对细胞存活无影响,本实验采用的 葛根素浓度无细胞毒性作用,结果见图1和图2。







2.2 转染 SH-SY5Y 细胞 APP 基因的鉴定

SH-SY5Y 细胞瞬时转染 APP695, 48 h 后 Western blot 蛋白质印迹结果显示细胞 APP 蛋白表 达明显上调,结果见图3。



图 3 APP695sw 重组质粒对 APP 表达的影响 Fig. 3 Effect of transfection of APP695sw plasmid on APP expression

2.3 葛根素对 SH-SY5Y/APP695 细胞外 Aβ₁₋₄₀和 Aβ1-42水平的影响

2.5~10 μmol·L⁻¹ 葛根素分别作用于瞬时转染 APP695 的 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 随给药浓度的 增高,细胞外 Aβ1-40 和 Aβ1-42 水平依次降低, 与空 白对照组相比, 葛根素(2.5, 5 和 10 μmol·L⁻¹)处理 SH-SY5Y/APP695 细胞 24 h, Aβ1-40 分别减少至 (95.6±11.3)%、(79.2±8.6)%和(72.3±7.6)%,除 2.5 μmol·L⁻¹ 葛根素处理组外差异均具有统计学意 义(P<0.05); Aβ₁₋₄₂分别减少至(86.8±9.7)%、(73.5 ±7.8)%和(65.9±5.9)%(n=3),差异均具有统计学 意义(P<0.05),该结果提示葛根素可剂量依赖性的 减少细胞 Aβ₁₋₄₀ 和 Aβ₁₋₄₂ 水平,结果见图 4。





与空白对照组(0 umol·L⁻¹ 葛根素)比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 4 Effect of puerarin on A_β level of SH-SY5Y cell transfected APP695(n=3, $\overline{x} \pm s$)

Compared with normal control group(0 μ mol·L⁻¹ puerarin), ¹⁾P<0.05.

2.4 葛根素对 SH-SY5Y/APP695 细胞 β-分泌酶活 性的影响

采用酶活性分析法检测葛根素对 β-分泌酶的 作用,结果显示, 2.5, 5 和 10 μmol·L⁻¹的葛根素 可明显抑制 SH-SY5Y/APP695 细胞的 β-分泌酶活 性,并呈明显浓度依赖性,β-分泌酶活性分别降至 (85.1±10.3)%、(70.6±6.8)%和(60.9±4.9)%,差 异具有统计学意义(P<0.05),结果见图 5。



图 5 葛根素对 SH-SY5Y/APP695 细胞 β-分泌酶活性的影 响(*n*=3, *x*±*s*)

与空白对照组(0 µmol·L⁻¹ 葛根素)比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 5 Effects of puerarin on β -secretase activity of SH-SY5Y cell transfected APP695(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with normal control group(0 µmol·L⁻¹ puerarin), ¹⁾P<0.05.

2.5 葛根素对 SH-SY5Y/APP695 细胞 β-分泌酶 mRNA 及蛋白的影响

葛根素干预过表达 APP695 的 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,各剂量组 β-分泌酶的 mRNA 水平及蛋白 表达均下调, β-分泌酶 mRNA 水平分别减少至 75%,60%和45%,同时β-分泌酶的蛋白表达分别 减少至 82%,71%和45%,与空白对照组比较差 异均具有统计学意义(P<0.05)。结果见图 6 和图 7。

3 讨论

AD 的淀粉样致病假说已被广泛接受,目前认 为Aβ在脑组织中的积聚是各种原因诱发 AD 的共 同通路, 也是 AD 形成和发生的关键因素。一些针 对 Aβ 的治疗方式已经开始研究,包括调节 Aβ 的 产生、增加 Aβ 的降解、抑制 Aβ 的聚集以及靶向 AB 的免疫治疗等,但目前 AD 仍缺乏特效防治措 施,而我国传统中医药在延缓衰老、控制痴呆方 面积累了丰富的经验^[8]。葛根素是中药葛根的提取 物,为异黄酮类化合物,能透过血脑屏障,口服 给药后,在肺、心脏和脑分布较高^[9]。葛根素具有 抑制神经元凋亡和抗氧化应激的作用,在临床上 广泛用于脑血管病的辅助治疗,Li 等^[10]利用帕金 森病大鼠模型发现, 葛根素通过抗氧化能力抑制 神经元变性。有研究发现葛根素通过激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制神经细胞凋亡阻止 Aβ 诱导的神经毒性^[11],并可改善 AD 模型大鼠的学 习记忆功能^[5]。这些研究提示葛根素可能具有治疗 或改善 AD 相关的临床症状或神经病理变化的潜 在应用前景。雌激素治疗可减少 APP/Ar^{+/-} ♀小鼠 脑内 β-分泌酶 mRNA 及蛋白表达^[12], 葛根素是植 物雌激素,有雌激素样作用,推测葛根素可能抑 制 B-分泌酶的活性。本课题通过实验研究观察葛



图 6 葛根素对 SH-SY5Y/APP695 细胞 β-分泌酶 mRNA 的影响(n=3, x±s)

与空白对照组(0 μmol·L⁻¹ 葛根素)比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 6 Effects of puerarin on β -secretase mRNA in SH-SY5Y cell expressing APP695(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with normal control group(0 µmol·L⁻¹ puerarin), ¹⁾P<0.05.



图 7 葛根素对 SH-SY5Y/APP695 细胞 β-分泌酶蛋白的影 响(*n*=3, *x*±*s*)

与空白对照组(0 μ mol·L⁻¹ 葛根素)比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 7 Effects of puerarin on β-secretase protein expression in SH-SY5Y cell expressing APPs695(n=3, $\overline{x} \pm s$) Compared with normal control group(0 μmol·L⁻¹ puerarin), ¹⁾P<0.05.

根素能否通过调节 β-分泌酶活性,以减少 Aβ 的分泌,缓解或/和减轻 AD 患者的神经病理改变。

APP 加工及代谢的关键酶包括 α、β、γ-分泌 酶。在 AD 发病过程中, APP 的 α-分泌酶途径受 抑制, β-分泌酶途径成为 APP 主导代谢途径, 因 而产生过多的 Aβ。在 AD 患者的脑组织中 β-分泌 酶的表达显著增加^[13]。同时高表达 β-分泌酶和突 变型 APP 的转基因小鼠, 在成年时脑内 Aβ 水平 明显增加,并显著加速 AD 相关的神经病理表型的 变化, 而单纯 β-分泌酶转基因小鼠脑内 Aβ 水平没 有明显异常^[14], 以上提示, β-分泌酶直接参与 APP 剪切形成 Aβ 的过程, 对 Aβ 的产生具有关键性作 用,是 Aβ 生成的限速酶,理论上 β-分泌酶抑制剂 可以减少 AB 的产生。Roberds 等^[15]报道 B-分泌酶 基因剔除鼠的β分泌酶活性丧失,Aβ显著减少, 此时动物发育正常,其组织形态,脑组织化学, 行为及肌肉神经等与野生型幼鼠无明显差异,为B 分泌酶作为 AD 治疗靶点的可行性提供了证据。 Kao 等^[16]利用体外培养原代 AD 转基因鼠的皮层 神经元发现通过 RNA 干扰抑制 β-分泌酶基因, 可 大大减少 AB 的产生, 在体内敲除 B-分泌酶基因的 小鼠,其AB的产生也减少^[17]。研究发现非甾体抗 炎药和他汀类降脂药均可以通过抑制 β-分泌酶的 表达抑制 Aβ 的产生^[18]。一些中药成分如姜黄素、 没食子酸可抑制 Αβ 引起的 β-分泌酶蛋白上调^[19], 在本实验中也发现葛根素剂量依赖性的抑制 β-分 泌酶的活性,证明该药可能是一种 β-分泌酶抑制 剂,可以减少 APP 的淀粉样代谢途径,抑制 AB 的产生,关于葛根素抑制 β-分泌酶的机制,仍需 在今后的研究中做进一步探讨。β-分泌酶的表达受 转录和翻译的调控,其调节受多种因素影响,最 近有研究表明 β-分泌酶基因的启动子包含许多转 录因子结合位点,如NFAT、NF-κB、STAT6, PPARγ 等^[20],而一些传统的中药能通过影响转录因子调 节 β-分泌酶的表达,有研究发现人参皂苷 Rg1 通 过激活 NF-κB, 增加 NF-κB 的核转位抑制 β-分泌 酶 1 的转录和翻译。同时 β-分泌酶的表达也受信 号通路的影响,小檗碱通过活化 ERK1/2 通路抑 β-分泌酶的表达而抑制 Aβ 的产生。葛根素能激活 PI3K 信号通路,可推测葛根素可能通过作用于信 号通路或转录因子而调节β-分泌酶的表达。总之, 葛根素具有神经保护作用,能减少体外 Aβ 的生 成,并改善痴呆模型大鼠的学习记忆功能,这些 证据支持葛根素可能用于治疗 AD。

REFERENCES

- [1] MAO Z, ZHOU D S, ZHOU P, et al. Hospital infection situation and pathogen characteristics and drug resistance analysis of three hospitals' Alzheimer's patients in Zhejiang province [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(12): 1359-1363.
- [2] 吴佳莹,羊红玉,赵青威,等.抗阿尔茨海默病的新靶点及 药物研发进展 [J].中国医院药学杂志,2013,33(19): 1615-1618.
- [3] WOO H N, BAIK S H, PARK J S, et al. Secretases as therapeutic targets for Alzheimer's disease [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(1): 10-15.
- [4] ZHANG Q, HUANG W D, LV X Y, et al. Puerarin protects differentiated PC12 cells from H2O2-induced apoptosis through the PI3K/Akt signalling pathway [J]. Cell Biol Int,

2012, 36(5): 419-426.

- [5] LI J, WANG G, LIU J, et al. The Institute Puerarin attenuates amyloid-beta-induced cognitive impairment through suppression of apoptosis in rat hippocampus *in vivo* [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1-3): 195-201.
- [6] LIU C M, ZHENG G H, MING Q L, et al. Protective effect of puerarin on lead-induced mouse cognitive impairment via altering activities of acetyl cholinesterase, monoamine oxidase and nitric oxide synthase [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 35(3): 502-510.
- [7] ZHANG Y, CHEN Y, SHAN Y, et al. Effects of puerarin on cholinergic enzymes in the brain of ovariectomized guinea pigs [J]. Int J Neurosci, 2013, 123(11): 783-791.
- [8] LU Y, JIN Y, SUI H J, et al. Sarsasapogen inhibits amyloid beta protein induced decrease of synaptophysin in hippocampal neurons of neonatal rat via upregulating PI3K/Akt/GSK3 pathway [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国 药理学与毒理学杂志), 2013, 27(4): 635-640.
- [9] PRASAIN J K, PENG N, MOORE R, et al. Tissue distribution of puerarin and its conjugated metabolites in rats assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Phytomedicine, 2009, 16(1): 65-71.
- [10] LI R, ZHENG N, LIANG T, et al. Puerarin attenuates neuronal degeneration and blocks oxidative stress to elicit a neuroprotective effect on substantia nigra injury in 6-OHDA-lesioned rats [J]. Brain Res, 2013(1517): 28-35.
- [11] XING G, DONG M, LI X, et al. Neuroprotective effects of puerarin against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via a PI3K-dependent signaling pathway [J]. Brain Res Bull, 2011, 85(3/4): 212-218.
- [12] LI R, HE P, CUI J, et al. Brain endogenous estrogen levels determine responses to estrogen replacement therapy via regulation of BACE1 and NEP in female Alzheimer's transgenic mice [J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(3): 857-867.
- [13] SATHYA M, PREMKUMAR P, KARTHICK C, et al.
 BACE1 in Alzheimer's disease [J]. Clin Chim Acta, 2012(414): 171-178.
- [14] MOHAJERI M H, SAINI K D, NITSCH R M. Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology [J]. J Neural Transm, 2004, 111(3): 413-425.
- [15] ROBERDS S L, ANDERSON J, BASI G, et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics [J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(12): 1317-1324.
- [16] KAO S C, KRICHEVSKY A M, KOSIK K S, et al. BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons [J]. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1942-1949.
- [17] JOHN V. Human beta-secretase(BACE) and BACE inhibitors: progress report [J]. Curr Top Med Chem, 2006, 6(6): 569-578.
- [18] PARSONS R B, SUBRAMANIAM D, AUSTEN B M. A specific inhibitor of cholesterol biosynthesis, BM15.766, reduces the expression of beta-secretase and the production of amyloid-beta *in vitro* [J]. J Neurochem, 2007, 102(4): 1276-1291.
- [19] SHIMMYO Y, KIHARA T, AKIKE A, et al. Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid betainduced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation [J]. Neuroreport, 2008, 19(13): 1329-1333.
- [20] ROSSNER S, SASTRE M, BOURNE K, et al. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression-implications for Alzheimer's disease [J]. Prog Neurobiol, 2006, 79(2): 95-111.

收稿日期: 2014-01-10

.9.