

糖皮质激素促进 β -淀粉样蛋白对海马神经元损伤的研究

徐东芳^a, 刘东梅^b, 吴庆四^a, 李卫平^b, 姚余有^a (安徽医科大学, a. 公共卫生学院检验医学系, b. 基础医学院药理学教研室, 合肥 230032)

摘要:目的 在体外实验条件下, 观察糖皮质激素是否促进 β -淀粉样蛋白的神经元毒性作用。方法 通过 LDH 释放率法检测细胞活力、TUNEL 法测细胞凋亡以及 LSCM 测胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。结果 单独的地塞米松 (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol·L⁻¹) 组或 $\text{A}\beta_{25-35}$ ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组分别作用海马神经元后, 细胞活力变化不明显 ($P > 0.05$); 但与同剂量的 DEX、 $\text{A}\beta_{25-35}$ 组相比, DEX + $\text{A}\beta_{25-35}$ 组的细胞活力明显降低 ($P < 0.05$), 同时胞内 Ca^{2+} 显著上升 ($P < 0.05$), 神经元的凋亡率增加明显, 细胞内出现凋亡的典型形态学特征。结论 糖皮质激素可能通过促进 $\text{A}\beta$ 引起海马神经元胞内 Ca^{2+} 升高增加神经元毒性作用。

关键词: 糖皮质激素; β -淀粉样蛋白; 海马神经元; 胞内 Ca^{2+} ; 凋亡

中图分类号: R917.794 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)06-0435-04

Glucocorticoids Potentiates β -amyloid Protein-induced Hippocampal Neurons Damage

XU Dong-fang^a, LIU Dong-mei^b, WU Qing-si^a, LI Wei-ping^b, YAO Yu-you^a (a. Department of Laboratory Medicine, b. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of glucocorticoids on β -amyloid protein-induced hippocampal neurons toxicity *in vitro*. **METHODS** Cell viability was measured by rate of LDH release, and apoptotic cells were assessed using TUNEL staining. Intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was investigated with a confocal laser microscope using fluo-3/acetoxymethyl ester (AM) as a fluorescent dye. **RESULTS** Treatment with DEX ($0.01 \sim 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 48 h or $\text{A}\beta_{25-35}$ ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) alone for 24 h did not cause a significant increase in LDH, compared with vehicle-treated control cultures, but a 24 h preincubation with DEX ($0.01 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) further decreased the viability of hippocampal neuronal with $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{25-35}$. $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX or $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ alone failed to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the number of cells stained positively for TUNEL in the hippocampal neurons, but pretreatment with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX significantly prompted intracellular calcium and apoptotic cells death in hippocampal neurons treated with $\text{A}\beta$. **CONCLUSION** Glucocorticoids may potentiate the $\text{A}\beta$ mediated neurotoxic action causing further increasing the level of intracellular Ca^{2+} .

KEY WORDS: glucocorticoids; amyloid β -peptide protein; hippocampal neurons; intracellular calcium; apoptosis

随着人口的老龄化, 衰老及早发性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 等中枢神经系统退行性疾病成为威胁人类健康的主要疾病之一, 临床上表现为缓慢进行性记忆力和认知能力的下降等。在 AD 患者脑内有老年斑沉积, 而 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid β -peptide protein, $\text{A}\beta$) 是构成老年斑或淀粉样斑块的主要成分, 在 AD 的发病和进展中起关键作用^[1]。但另有一些研究发现, 脑内出现大量 $\text{A}\beta$ 聚集, 并没有引起明显的痴呆症状, 可能是其他因素单独或参与了 $\text{A}\beta$ 的神经元毒性作用^[2]。糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 是机体生理性应激激素, 参与体内多种代谢过程和中枢神经系统功能的调节, Landfield 在 20 世纪 70 年代末首先提出 CGs 脑老化学说, 认为脑老化是血浆中 CGs 含量增高所致, 但近年来相应的抗炎治疗研究也进展迅速, GCs 在 AD 中是保护因子还是

致病因子尚存有争议。本研究通过海马神经元原代培养, 旨在观察体外 GCs 是否促进 $\text{A}\beta$ 对海马神经元毒性作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雌雄, 体重 250 ~ 300 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供 (皖医实动准第 01 号)。

1.1.2 主要试剂及其配制 低糖 DMEM, Neurobasal medium, B27 supplement 均购自 Gibco 公司; 地塞米松 (DEX)、L-谷氨酰胺、多聚 L-赖氨酸、 $\text{A}\beta_{25-35}$ 均为 Sigma 公司产品; Fluo-3/AM 和 F127 为 Biotium 公司产品; TUNEL 检测试剂盒由 ROCHE 公司生产; 其余试剂均为国产市售分析纯。DEX 用无水乙醇溶解, Neurobasal 培养液稀释至 10^{-4} mol·L⁻¹, 分装

基金项目: 安徽省高校学术带头人后备人选科学研究资助 (2005hbzl8)

作者简介: 徐东芳, 女, 硕士生

Tel: 13866120975

E-mail: xudongfang310@yahoo.com.cn

后置 - 20℃保存备用; AB_{25-35} 用无菌双蒸水配制成 $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分装后置 - 80℃保存, 使用前放入 37℃温箱孵育 1 h, “老化”为具有神经毒性的聚集状态。

1.1.3 仪器 XDS-1B型倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂); 510META激光共聚焦显微镜(LSCM)(德国 ZEISS 公司); 超净工作台(蚌埠净化仪器厂); MCO-15AC型 CO_2 细胞培养箱(日本 SANYO公司); BTS-310半自动生化分析仪(EU S. A.); DG5030酶联免疫检测仪(华东电子集团医疗装备责任有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 海马神经元的分离与培养^[3] 用乙醚麻醉孕期 18 d 的 SD大鼠, 无菌条件下取出胎鼠, 分离出海马; 将其剪成碎片, 加入终浓度为 0.125% 胰蛋白酶消化 ($\text{pH } 7.2 \sim 7.4$), 37°C , $10 \sim 20\text{ min}$, 加胎牛血清终止消化, 离心弃上清, 再加入含 10% 胎牛血清的 Neurobasal 洗涤 2 次后, $200\text{ }\mu\text{m}$ 不锈钢筛网过滤, 收集滤液离心弃上清; 用 Neurobasal 培养液配制成 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 拟细胞活力测定的标本, 需 $100\text{ }\mu\text{L}$ 孔接种于 96 孔培养板, 拟 TUNEL 和胞内 Ca^{2+} 检测的标本, 需在 24 孔培养板中预先置入包被 L 多聚赖氨酸的盖玻片, 细胞悬液 0.4 mL 孔接种于 24 孔培养板, 置 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 环境下培养, 每周半量换液 2 次, 第 12~14 天神经元生长成熟。

1.2.2 给药及分组 待海马神经元培养第 12 天换液(低糖 DMEM)后, 随机分为 12 组实验, 即空白对照组、DEX(10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , $10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组、 AB_{25-35} 组($10, 5, 1, 0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组、 $10^{-8}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组、 $10^{-7}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组、 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组、乳酸脱氢酶(LDH)释放率法检测细胞活性。

1.2.3 LDH 释放率测定^[4] 吸取全部细胞培养上清液, 用于上清液 LDH 测定(具体操作按照试剂盒说明书进行)。向无上清液的培养孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 0.9% Triton X-100 破坏细胞膜, 45 min 后收集液体, 用于胞内 LDH 测定。结果以 LDH 释放率表示, $\text{LDH 释放率} = \frac{\text{上清中 LDH}}{\text{上清 LDH} + \text{胞内 LDH}} \times 100\%$ 。

1.2.4 TUNEL 染色检测神经元的凋亡 待海马神经元培养至 12 d 时, 随机分组实验, 即空白对照组、 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 组、 $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组和 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组, DEX + AB_{25-35} 组是先加入 DEX 孵育 24 h, 再加入 AB_{25-35} 置 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 环境下作用 24 h, 检测细胞凋亡。凋亡细胞的检测按照 TUNEL 检测试剂盒说明书进行, 用不含 TdT 的标记液代替 TUNEL 混合反应液作阴性对照, 用 DNase I 使之产生 DNA 链缺口作阳性对照, 光学显微镜下观察 TUNEL 染色涂片并拍照。每一涂片计数细胞总数不少于 1 000 个, 计算出细胞凋亡率, $\text{细胞凋亡率} = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{计数的细胞总数}} \times 100\%$ 。

1.2.5 胞内 Ca^{2+} 的测定^[5] 待海马神经元培养至 12 d 时, 随机分组实验, 即空白对照组、 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 组、 $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组和 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

AB_{25-35} 组, 加入 DEX 孵育 24 h 后, 分别加入 AB_{25-35} 作用 10, 30 和 60 min 后, 于 37°C 避光条件下用 D-Hank's 液稀释的 Fluor-3/AM(终浓度为 $2\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 内含 0.002% 的 F-127) 荷载, 40 min 后在激发波长 488 nm , 发射波长 533 nm 下, 用 LSCM 测得神经元的荧光强度, 采用 JEDA801 D 形态学图像分析系统分析胞内 Ca^{2+} 荧光强度(F)。

1.2.6 数据处理与统计学检验 各组实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料组间比较采用 Student's t 检验, 统计分析用 SPSS 10.0 软件完成。

2 结果

2.1 DEX, AB_{25-35} 及 DEX + AB_{25-35} 对海马神经元的影响
与对照组相比, $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 组和 $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组的细胞形态无明显异常, LDH 释放率差别无显著性意义 ($P > 0.05$); $10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 组、 AB_{25-35} ($10, 5, 1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的细胞活力降低, LDH 释放率差别有显著性意义 ($P < 0.05$)。且与同剂量的 DEX 组、 AB_{25-35} 组相比, $10^{-8}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组、 $10^{-7}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组、 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组的 LDH 释放率差别有显著性意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 DEX 和 AB_{25-35} 对海马神经元活力的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)
Tab 1 The influence of DEX and AB_{25-35} on viabilities of hippocampal neurons ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组 别	LDH 释放率 /%
正常对照	529.34 ± 1.87
$0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	29.58 ± 2.05
$1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	35.34 ± 1.87 ¹⁾
$5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	42.12 ± 1.62 ¹⁾
$10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	55.31 ± 1.54 ¹⁾
$10^{-8}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX	30.44 ± 3.76
$10^{-7}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX	31.17 ± 3.65
$10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX	31.76 ± 3.14
$10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX	42.12 ± 4.03 ¹⁾
$10^{-8}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	40.77 ± 3.76 ¹⁾²⁾
$10^{-7}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	47.38 ± 3.41 ¹⁾²⁾
$10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35}	51.12 ± 4.53 ¹⁾²⁾

注: 与对照组相比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与同剂量的 DEX, AB 相比较, ²⁾ $P < 0.05$

Note: compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the same dosage DEX, AB alone treated group, ²⁾ $P < 0.05$

2.2 DEX, AB_{25-35} 及 DEX + AB_{25-35} 对海马神经元凋亡的影响
与对照组相比, $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 组或 $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AB_{25-35} 组的海马神经元 TUNEL 染色偶见阳性, DEX + AB_{25-35} 组可见部分海马神经元胞核着棕黄色, 不均匀呈环指样结构, 核外周亦见棕黄色毛刷状结构, 凋亡程度增加。细胞凋亡率分析显示: 与对照组相比, DEX 和 AB_{25-35} 组凋亡率变化不明显 ($P > 0.05$); 但与同剂量的 DEX 和 AB_{25-35} 组相比, DEX + AB_{25-35} 组的凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。见图 1。

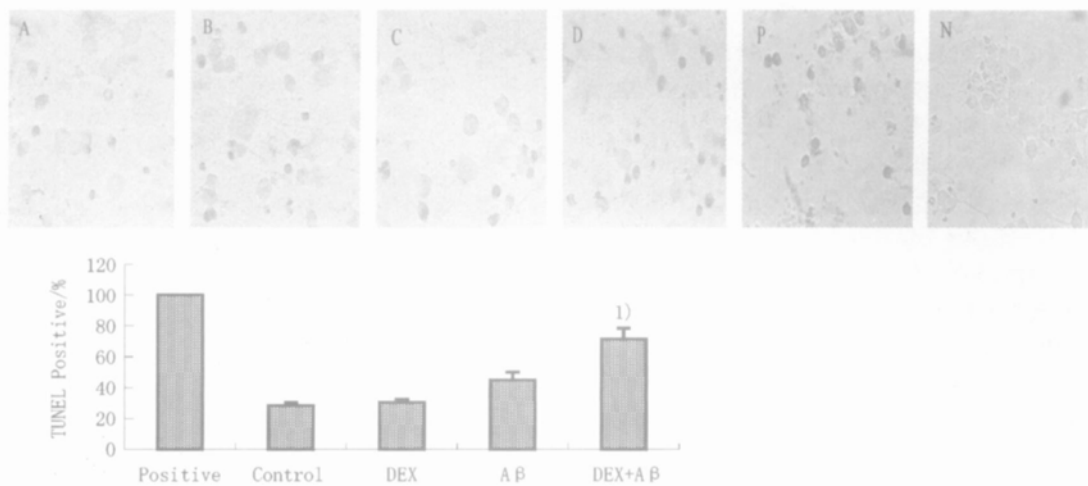


图 1 DEX促进 Aβ引起海马神经元的凋亡增加 (TUNEL法)

注:与同剂量的 DEX, Aβ 相比较, ¹⁾ $P < 0.05$; A:对照组; B: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX组; C: $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅组; D: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅组; P:阳性; N:阴性

Fig 1 Influence of DEX on the number of hippocampal neurons stained positively for TUNEL induced by the Aβ

Note: compared with the same dosage DEX, Aβ₂₅₋₃₅ alone treated group, ¹⁾ $P < 0.05$; A: Control; B: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX; C: $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅; D: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅; P: Positive; N: Negative

2.3 DEX促进的 Aβ₂₅₋₃₅引起海马神经元胞内 Ca²⁺的增加

细胞内 Ca²⁺与 Fluo-3/AM 结合后,采用 LSCM 检测出荧光强度 (F)。与对照组相比, $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX 或 0.5

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅处理的神经元,胞内 Ca²⁺有轻微的升高 ($P < 0.05$);但与同剂量的 DEX 组和 Aβ₂₅₋₃₅组相比, DEX + Aβ₂₅₋₃₅组的胞内 Ca²⁺有显著性差异 ($P < 0.05$)。见图 2。

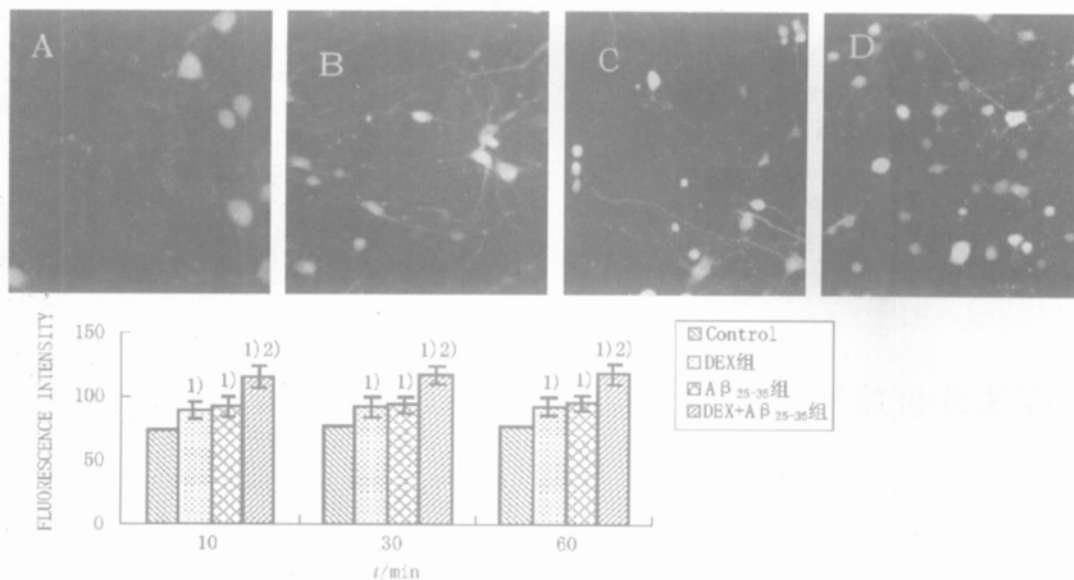


图 2 DEX促进的 Aβ₂₅₋₃₅引起海马神经元胞内 Ca²⁺的增加

注:与对照组相比较, ¹⁾ $P < 0.05$;与同剂量的 DEX, Aβ 相比较, ²⁾ $P < 0.05$

Fig 2 Pretreatment of hippocampal neurons with DEX Enhances intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) induced by Aβ₂₅₋₃₅

Note: compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the same dosage Aβ₂₅₋₃₅, DEX alone treated group, ²⁾ $P < 0.05$

A: Control; B: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX; C: $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅; D: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX + $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aβ₂₅₋₃₅

3 讨论

AD是一种多原因引起的涉及多种病理表现的“多因异质性疾病”,可能与中枢神经系统 Aβ 的聚集、钙自体平衡失调等多种因素有密切关系。Aβ 是淀粉样前体蛋白 (amyloid

precursor peptide, APP)的裂解产物,含有 39 ~ 43 个氨基酸残基的疏水肽,主要有 Aβ₁₋₄₀ 及 Aβ₁₋₄₂ 两种形式,其毒性的必需结构是 25 ~ 35 位的氨基酸序列^[6]。Aβ 的毒性作用可能包括两个方面:一是通过介质其他物质,增强或放大各种

伤害性刺激的产生,二是直接的细胞毒性^[7]。在实验中,使用“老化”1 h的 A β 刺激培养的神经元,结果显示,低浓度(0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)没有改变神经元活性。随剂量的增加,神经元损伤加重(LDH释放率增加),且呈剂量依赖性。

GCs作为一种公认的应激激素,其受体(glucocorticoids Receptor, GR)广泛分布于中枢神经系统,尤其是脑组织的海马。正常浓度下的 GCs不仅能够维持机体正常的生长发育,而且参与中枢神经系统功能的调节,但长期大剂量应用 GCs会引起海马神经元萎缩、丢失甚至死亡^[8]。本研究显示,DEX(10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对体外培养的的海马神经元没有损伤(LDH释放率法),也不引起明显的海马神经元凋亡(TUNEL法)。进一步实验显示,DEX在低糖环境下,可明显促进 A β_{25-35} 引起海马神经元活力下降;应用 TUNEL法对海马神经元进行细胞凋亡原位标记时发现,DEX + A β_{25-35} 组比同剂量的 DEX和 A β_{25-35} 组的凋亡率明显增加,表明 DEX + A β_{25-35} 组细胞中较多 DNA单链及双链断裂,产生大量 3'-OH末端被荧光着色,造成大量细胞凋亡。提示 GCs增强了 A β_{25-35} 诱导的神经毒性可能是引起或加重早老性痴呆的原因之一。

生理性的 Ca^{2+} 浓度是脑细胞维持其正常功能所必需的,但 Ca^{2+} 升高可激活钙依赖性酶(如核酸内切酶)进而使 DNA断裂降解,并使胞浆内蛋白质发生交联,甚至细胞骨架破坏,从而使染色体凝集,细胞皱缩而发生凋亡。本实验中,DEX + A β_{25-35} 组胞内 Ca^{2+} 明显高于同剂量的另外二组。可能原因是 DEX和 A β 同时影响电压依赖性钙通道(VDCC),使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,或者是 DEX抑制海马神经元胞内 Ca^{2+} 外排^[9],从而促进 A β 引起神经元胞内 Ca^{2+} 升高,提示 GCs促进 A β 引起海马神经元凋亡可能与其提高胞内 Ca^{2+} 有关。由于引起海马神经元损伤的原因很多,可能涉及到一系列细胞因子的复杂机制,GCs促进 A β 神经毒性作用机制还有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] RAMALHO R M, RIBEIRO P S, SOLA S, *et al*. Inhibition of the E2F-1/P53/Bax pathway by taurourideoxycholic acid in amyloid beta-peptide-induced apoptosis of PC12 cells[J]. J Neurochem, 2004, 90(3): 567-575.
- [2] LUE L F, KUO Y M, ROHER A E, *et al*. Soluble amyloid { beta } peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease[J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 853-862.
- [3] KIRYUSHKO D, KOFOED T, SKLADCHIKOVA G, *et al*. A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM), C3d, promotes neurogenesis and synaptogenesis and modulates presynaptic function in primary cultures of rat hippocampal neurons[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 12325-12334.
- [4] WILLIAMSON R, SCALES T, CLARK BR, *et al*. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure involvement of src family protein kinases[J]. J Neurosci, 2002, 22(1): 10-20.
- [5] SARNELLI G, BERGHE P V, RAEYMAEKERS P, *et al*. Inhibitory effects of galanin on evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in cultured myenteric neurons[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286: G1009-G1014.
- [6] SIMMONS L K, MAY P C, TOMASELLI K J, *et al*. Secondary structure of amyloid-beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro[J]. Mol Pharmacol, 1994, 45(3): 373-379.
- [7] SISODIA S S, PRICE D L. Role of the β -amyloid protein in Alzheimer's disease[J]. FASEB J, 1995, 9(3): 366.
- [8] MCEWEN B S, MAGARINOS A M. Stress effects on morphology and function of the hippocampus[J]. Ann NY Acad Sci, 1997, 821(1): 271-284.
- [9] ELLIOT E M, SAPOLSKY R M. Corticosterone impairs hippocampal calcium regulation-possible mediating mechanism[J]. Brain Res, 1993, 602(1): 84-90.