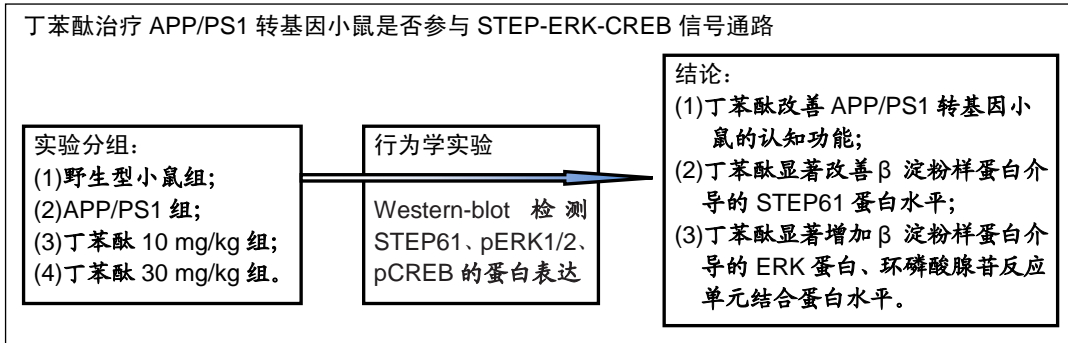


丁苯酞干预APP/PS1转基因小鼠(阿尔兹海默病模型)的认知功能

张琳¹, 刘金洁¹, 赵艳², 刘毅¹, 蔺建文¹ (¹大连医科大学附属大连市中心医院神经内科, 辽宁省大连市 116000; ²锦州医科大学生命科学研究所以, 辽宁省锦州市 121001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1182 ORCID: 0000-0002-5799-8479(张琳)

文章快速阅读:



张琳, 1976 年生, 山东省荣成市人, 汉族, 2013 年中国医科大学毕业, 博士, 主任医师, 主要从事神经内科临床与科研及教学工作。

通讯作者: 张琳, 博士, 主任医师, 大连医科大学附属大连市中心医院神经内科, 辽宁省大连市 116000

文献标识码:B

稿件接受: 2018-12-27



文题释义:

β -淀粉样蛋白(amyloid- β , A β): 是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -和 γ -分泌酶的蛋白水解作用而产生的含有 39-43 个氨基酸的多肽。它可由多种细胞产生, 循环于血液、脑脊液和脑间质液中, 大多与伴侣蛋白分子结合, 少数以游离状态存在。人体内 A β 最常见的亚型是 A β 1-40 和 A β 1-42。在人脑脊液和血中, A β 1-40 分别比 A β 1-42 的含量水平高 10 倍和 1.5 倍, A β 1-42 具有更强的毒性, 且更容易聚集, 从而形成 A β 沉淀的核心, 引发神经毒性作用。

环磷酸腺苷反应单元结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB): 是真核生物细胞核内一种重要的核蛋白, 属于结构相关转录因子 CREB 家族成员之一, 它的功能是调节基因转录, 因此被称为调节转录的核因子。CREB 在一些神经心理活动中如神经元的发育、再生、突触形成、学习记忆及细胞的修复等起着关键性的作用, 是细胞内多种信号通路的一种关键成分。

摘要

背景: β 淀粉样蛋白被认为是阿尔茨海默病发病的关键因素, 抗脑缺血药物丁苯酞(NBP)是治疗血管性痴呆的一种关键药物。

目的: 分析丁苯酞治疗 APP/PS1 转基因小鼠是否参与 STEP-ERK-CREB 信号通路的机制。

方法: SPF 级雄性 APP/PS1 转基因小鼠(阿尔茨海默病模型小鼠)30 只, 12 月龄, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; SPF 级 C57BL/6 野生型小鼠 10 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物分 4 组, 每组 10 只: C57BL/6 野生型小鼠组; APP/PS1 组; 丁苯酞 10 mg/kg 组和 30 mg/kg 组(分别每日灌胃丁苯酞 10 mg/kg 和丁苯酞 30 mg/kg); 野生型小鼠组和 APP/PS1 组小鼠每日灌胃等量植物油。连续灌胃 17 d, 第 9-16 天进行行为学实验, 在水迷宫训练前 40 min 给予丁苯酞; 第 17 天处死小鼠, Western-blot 检测小鼠皮质 STEP61、pERK1/2、pCREB 的蛋白表达。

结果与结论: ①连续给予 10 和 30 mg/kg 丁苯酞药物治疗 16 d: 可明显改善 APP/PS1 转基因小鼠 Morris 水迷宫任务中的空间学习缺陷, 减轻其工作记忆障碍; ②Western-blot 检测显示: 丁苯酞部分降低了活化的 STEP61 蛋白水平, 抑制 ERK 和 CREB 的磷酸化; ③结果说明: 丁苯酞对 APP/PS1 转基因小鼠具有抗 β 淀粉样蛋白诱导的神经变性和认知功能减退的保护作用, 其可能具有治疗阿尔茨海默病的潜力。

关键词:

丁苯酞; 阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; 水迷宫; 行为学实验; 神经变性; 认知障碍

主题词:

阿尔茨海默病; 淀粉样蛋白; 认知

中图分类号: R496; R318

基金资助:

大连市医学科学研究计划项目(171102), 项目负责人: 张琳

Zhang Lin, MD, Chief physician, Department of Neurology, Dalian Central Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

Corresponding author:

Zhang Lin, Department of Neurology, Dalian Central Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China

N-butylphthalide affects cognitive function of APP/PS1 transgenic mice (Alzheimer's disease model)

Zhang Lin¹, Liu Jinjie¹, Zhao Yan², Liu Yi¹, Lin Jianwen¹ (¹Department of Neurology, Dalian Central Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China; ²Life Science Institute of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Amyloid- β protein is a key factor of pathogenesis of Alzheimer's disease. N-butylphthalide, an anti-cerebral ischemia drug, has been shown to have therapeutic effects in vascular dementia.

OBJECTIVE: To investigate whether N-butylphthalide treating APP/PS1 transgenic mice via the SPEP-ERK-CREB signaling pathway.

METHODS: Thirty male APP/PS1 transgenic mice (mouse model of Alzheimer's disease), SPF grade, aged 12 months were provided by Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd., and 10 C57BL/6 wild-type mice, SPF grade, were provided by Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd. The animals were divided into four groups ($n=10$ /group): C57BL/6 wild-type mice group, APP/PS1 group, and 10 and 30 mg/kg N-butylphthalide groups. The former two groups were given same volume of vegetable oil via gavage, for 17 consecutive days. The behavioral test was performed at 9–16 days. N-butylphthalide was given 40 minutes prior to Morris water maze task. The mice were killed at 17 days, and the proteins levels of STEP61, pERK1/2 and pCREB in brain cortex were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Consecutive 16-day 10 and 30 mg/kg N-butylphthalide could significantly improve spatial learning disability and working memory disorder of APP/PS1 transgenic mice in Morris water maze test. (2) N-butylphthalide partly reduced the level of activated STEP61, and inhibited the dephosphorylation of ERK and CREB. (3) These results suggest that N-butylphthalide protects against amyloid- β -induced neurodegeneration and cognitive decline in APP/PS1 transgenic mice, which may be potential for Alzheimer's disease.

Subject headings: Alzheimer Disease; Amyloid; Cognition

Funding: the Medical Science Research Program of Dalian, No. 171102 (to ZL)

0 引言 Introduction

阿尔茨海默病是一种不可逆转的进行性神经退行性疾病,其病理特征是胞外 β -淀粉样蛋白斑块和胞内神经原纤维缠结^[1-3],但目前其发病机制尚不清楚。越来越多的证据表明,在阿尔茨海默病的早期就有 β -淀粉样蛋白沉积,并引发或加速其他病理事件^[4]。另外,在阿尔茨海默病患者大脑中发现可溶性 β -淀粉样蛋白寡聚体,并与痴呆和突触丢失的严重程度相关^[5-6]。在阿尔茨海默病转基因小鼠模型中,认知障碍和突触功能障碍与可溶性淀粉样蛋白寡聚体有关,并在斑块形成之前发生^[7-10]。作者之前的研究表明,STEP61负性调控 β -淀粉样蛋白介导的ERK-CREB信号通路,为STEP61成为阿尔茨海默病有效的新的靶点提供理论依据^[11]。合成的DL-3-丁基苯酞(DL-NBP)是一种水性化合物,含有L和D异构体,并于2002年获得国家食品药品监督管理局批准,用于脑卒中患者的临床应用^[12]。研究表明,丁苯酞能显著改善软脑膜小动脉的直径和血流速度^[13-15],减少脑梗死面积,抑制血小板聚集^[16-18]。此外,在大鼠大脑中动脉闭塞模型中,丁苯酞还通过改善线粒体功能发挥了强大的神经保护作用^[19-21],减少氧化损伤^[22],减少神经元凋亡^[23],抑制炎症反应^[24-25],减轻慢性脑低灌注所致大鼠学习记忆障碍^[26-27]。研究进一步探讨丁苯酞治疗APP/PS1转基因小鼠是否参与STEP-ERK-CREB信号通路的机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分组对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年1月至9月在锦州医科大学生命科学研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级APP/PS1转基因小鼠(阿尔茨海默病模型小鼠)30只:12月龄、雄性、体质量(10.0 \pm 0.5)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2014-0004;SPF级C57BL/6野生型小鼠10只:SCXK(京)2016-0006,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

所有动物实验均按照“中华人民共和国卫生部(1998)”

和“中国医科大学实验动物伦理标准指南”的“医学实验动物的护理和使用”要求进行。

1.3.2 试剂 丁苯酞(纯度>98%)购自石家庄市恩帕尔制药有限公司石材医药集团。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及处理 动物分4组,每组10只:C57BL/6组;APP/PS1组;药物处理组2组:分别为丁苯酞10mg/kg组和30 mg/kg组,自实验第1天开始分别给予APP/PS1小鼠每日灌胃丁苯酞10 mg/kg或丁苯酞30 mg/kg;C57BL/6组;APP/PS1组小鼠灌胃等量植物油。连续灌胃17 d,第9–16天进行行为学实验。在水迷宫训练前40 min给予丁苯酞,第17天开始处死小鼠取材,进行组织学检查。

1.4.2 水迷宫实验 利用Morris水迷宫来评估海马依赖的空间学习和记忆功能^[28]。容器是一个圆形水桶(直径120 cm,50 cm高)。桶中水加入白色粉末使其呈不透明,水温保持在(23 \pm 1) $^{\circ}$ C。

(1)定位航行实验:实验历时7 d。第1天为可视平台训练实验:无色透明平台固定于第三象限中心,露出水面1.5 cm。每个象限相对应的桶壁的中心有4个不同的标识:●,▲,◆,■,以便小鼠记忆平台的位置。将小鼠分别从4个象限贴壁放入水中,如果小鼠在60 s未找到平台,则由实验者用手牵引其到平台上,让小鼠停留30 s,再放回笼中。每只小鼠共游8次,每次间隔15 min,每个象限入水2次。第2天仍为可视平台,不过只从第一象限入水,每只小鼠3次,间隔15 min。将小鼠贴壁放入水中的同时用电脑影像跟踪系统记录实验过程中小鼠的运动行为,包括在60 s内找到平台的时间(逃避潜伏期)及所经过的路程。如果小鼠在60 s未找到平台,则记录为60 s。第3–7天为隐蔽平台实验:用白色食用色素把水染成白色混浊状,大体看不清水下平台。实验过程中平台位于水下1 cm。操作过程同第2天。

(2)空间探索实验:由于小鼠在搜索隐蔽平台过程中,可能由于偶然性碰到平台而上台,为消除这种随机性,第8天将平台从水中移走,从第一象限入水点将小鼠贴壁放入水中,让小鼠在水池内搜索平台60 s,观察小鼠跨过平

台相应位置的次数,以此作为评价小鼠空间认知和记忆能力的指标。

1.4.3 取材及处理 将取毕血清的APP/PS1转基因小鼠和C57BL/6野生型小鼠断头处死,快速取出左侧皮质和海马,剥离白色物质,称质量,匀浆,加10倍体积的0.32 mol/L蔗糖(此蔗糖溶液用KOH调节pH值至7.4,其中包括5 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA)。用玻璃匀浆器匀浆,1 000×g离心10 min,留上清,弃沉淀,沉淀为细胞核及细胞碎屑。将上清转移至一新的离心管中,17 000×g离心15 min,弃上清,留沉淀(上清中为微粒体及核糖体等)。在沉淀中加入上述匀浆液,将其置入由0.8 mol/L和1.2 mol/L的蔗糖溶液组成的不连续梯度溶液中,82 500×g密度梯度离心60 min。在0.8 mol/L和1.2 mol/L的蔗糖界面吸出突触小体后,计算体积,溶于10倍体积的冰预冷的0.32 mol/L蔗糖中,2 000×g离心10 min,沉淀即为突触体。以上操作均在4 °C完成,尽量避免蛋白质的降解^[29]。

1.4.4 Western-blot 检测 APP/PS1转基因小鼠和C57BL/6野生型小鼠大脑皮质和海马突触体分别称质量,小剪刀剪碎样品(冰上操作),按1:5比例加入蛋白裂解液,超声粉碎,4 °C裂解过夜,4 °C 12 000×g低温离心30 min,取上清,BCA法进行蛋白定量,每管60 μg蛋白分装,-80 °C冻存待用。接下来进行灌胶,加样,电泳,转膜,封闭,并配制一抗稀释液STEP(1:300),pERK1/2(1:500),pCREB(1:500),β-actin(1:500),将条带用TTBS略加清洗后分别放入一抗稀释液中,4 °C冰箱内摇床上孵育过夜,TTBS清洗10 min,3次,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000)室温下孵育2 h。ECL发光,检测小鼠皮质突触体STEP61、pERK1/2、pCREB的蛋白表达,采用ImageJ软件包分析。所有的实验保证至少重复3次。

1.5 主要观察指标 Western-blot检测小鼠皮质STEP61、pERK1/2、pCREB的蛋白表达。

1.6 统计学分析 应用SPSS 18.0软件处理实验数据,数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。对数据进行one-way ANOVA或two-way ANOVA方差分析,两组间比较采用LSD and Student-Newman-Keuls post hoc test, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义; $P < 0.01$ 认为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用APP/PS1转基因小鼠30只,C57BL/6野生型小鼠10只,实验过程无脱失,全部进入结果分析。

2.2 丁苯酞可显著改善阿尔茨海默病转基因小鼠空间学习记忆能力 见图1。

在定位航行实验中,APP转基因小鼠寻找平台的潜伏期明显增加,与同龄野生型小鼠相比较有显著性差异,结果表明APP转基因小鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力明显受损,见图1A, B。而两者的平均游泳速度没有明显差

异,这表明APP转基因小鼠没有运动能力的缺损,图1E-H。

在空间探索实验中,APP转基因小鼠花费在目标象限的时间明显减少,与同龄野生型小鼠相比较有显著性差异,表明APP转基因小鼠对水迷宫空间认知和记忆能力明显受损。在隐蔽平台实验中,APP/PS1转基因小鼠比野生型小鼠有更长的逃避潜伏期。而两者花费在目标象限的时间在可视平台实验中没有明显的差别,这表明APP转基因小鼠没有视觉能力的缺损。总的来说12月龄APP转基因小鼠表现出明显的海马依赖的学习和记忆能力的缺损,见图1E, F。最后1次训练的24 h后转基因小鼠与野生型相比在目标象限中花费的时间更少。每天给予10和30 mg/kg丁苯酞可以明显改善APP/PS1转基因小鼠学习记忆的缺损。

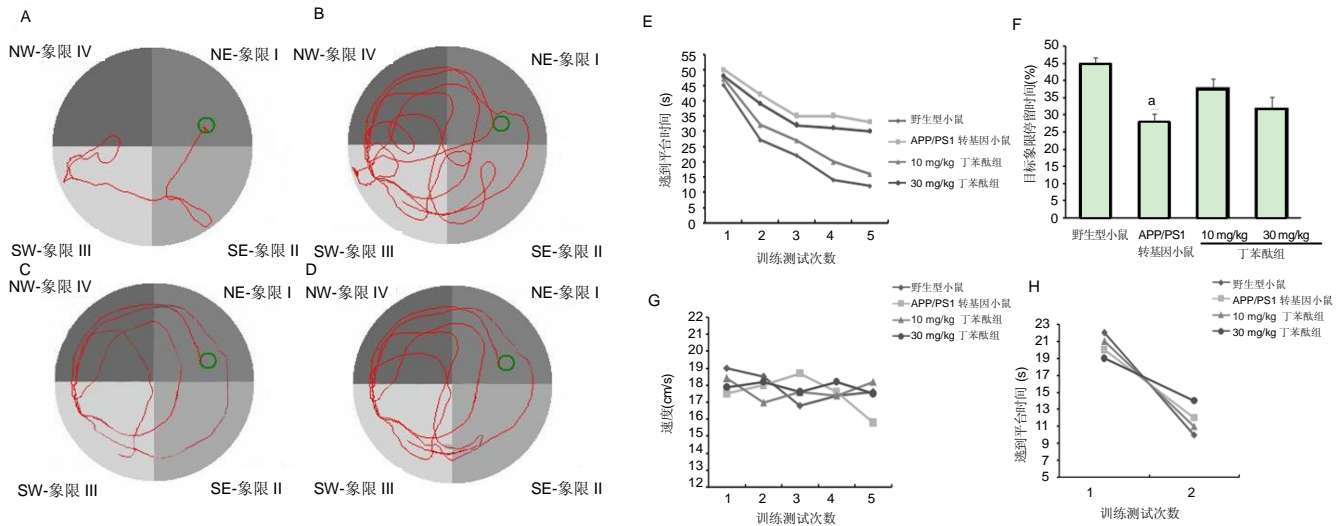
由于有非常显著的药物效应,对逃避潜伏期数据进行了分析。首先,与C57BL/6小鼠相比,APP/PS1小鼠的逃避潜伏期明显受损($P < 0.001$),说明APP/PS1小鼠存在明显学习记忆缺陷;同时,发现10 mg/kg丁苯酞处理的APP/PS1小鼠与C57BL/6小鼠相比,在逃避潜伏期上无显著差异($P < 0.05$;见图1F)。说明每天给药10 mg/kg或30 mg/kg丁苯酞可明显减轻APP/PS1所致的学习障碍。

2.3 丁苯酞显著降低转基因小鼠的STEP61水平 12月龄APP/PS1转基因小鼠的脑皮质突触小体STEP61蛋白水平是同龄野生型小鼠的203%($P < 0.001$)。给予APP/PS1小鼠每天10 mg/kg或30 mg/kg丁苯酞灌胃,可检测到STEP61磷酸化比例在皮质突触小体表达量较APP/PS1小鼠增加,尤其是10 mg/kg丁苯酞处理组($P < 0.01$,见图2)。

2.4 丁苯酞可增加β淀粉样蛋白介导的ERK和CREB磷酸化水平 实验检测到APP/PS1转基因小鼠皮质pERK1/2和pCREB水平较正常小鼠明显减少(61.82%, 30.5%, $P < 0.001$),见图3, 4。给予APP/PS1小鼠每天10 mg/kg或30 mg/kg丁苯酞灌胃后,明显增加了pERKs和pCREB水平,尤其是10 mg/kg丁苯酞处理组($P < 0.05$)。作者之前的结果表明STEP61负性调控了β淀粉样蛋白介导的ERK1/2和CREB磷酸化水平和可能的活性($P < 0.01$),提示丁苯酞可以调控STEP/ERK/CREB通路。

3 讨论 Discussion

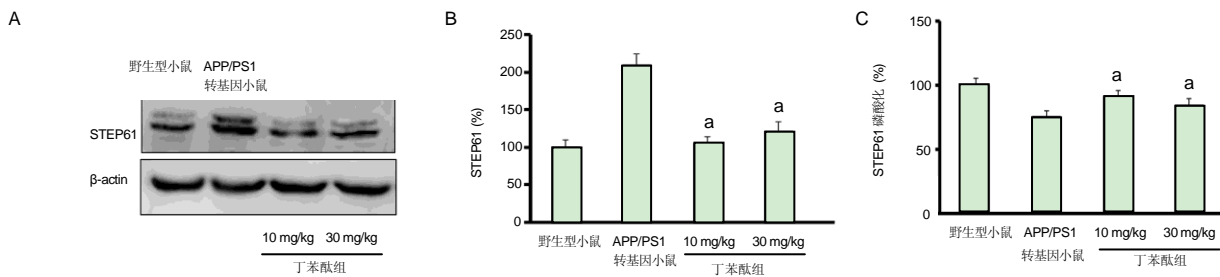
β-淀粉样蛋白被认为是阿尔茨海默病患者神经元损伤和痴呆的关键因素。采用双转染人APP695swe基因和人早老素(presenilin, PS-1)突变基因的阿尔茨海默病模型小鼠Tg-APPswe/PSEN1dE9(APP/PS1),这两种突变都与阿尔茨海默病的早期发病有关^[30],小鼠/人APP695 swe双转基因使小鼠分泌人β-淀粉样蛋白寡肽。在阿尔茨海默病病理生理学早期,可溶性β-淀粉样蛋白寡聚体干扰突触功能^[31-32],可能是通过β-淀粉样蛋白介导的N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的内化作用等^[33]。纹状体富集的酪氨酸磷酸酶(STEP)是一种酪氨酸磷酸酶,调控NMDA受体的内化作用^[33]。



图注: 图 A-D 为定位航行实验小鼠运动轨迹: A 为 C57BL/6 野生型小鼠(WT); B 为 APP/PS1 转基因小鼠; C, D 分别为丁苯酞 10 mg/kg 和 30 mg/kg 组; E 为隐蔽平台实验; F 为在探索实验的每一个目标象限停留时间的百分比, 单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls post hoc 实验, 与 C57BL/6 野生型小鼠相比, ^a $P < 0.001$; G 显示每组小鼠的运动功能无差别; H 为在可视平台实验中没有明显的区别($P > 0.05$)。

图 1 丁苯酞明显改善 APP/PS1 转基因小鼠的空间学习记忆能力

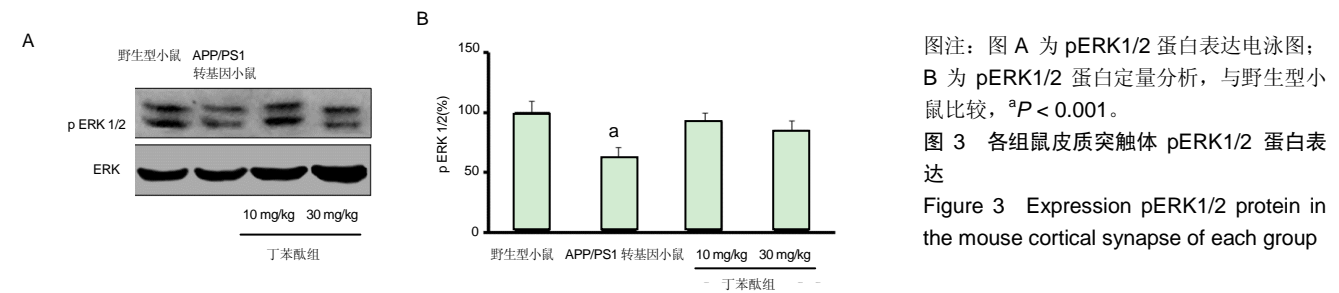
Figure 1 N-butylphthalide significantly improves spatial learning and memory abilities of APP/PS1 transgenic mice



图注: A 为各组 STEP61 表达电泳图; B 为 STEP61 水平定量分析, 与 APP/PS1 小鼠相比, 丁苯酞 10 mg/kg 和 30 mg/kg 组小鼠 STEP61 蛋白表达明显减少, ^a $P < 0.001$; C 为 STEP61 磷酸化比例, 与 APP/PS1 小鼠比较, ^a $P < 0.001$ 。

图 2 各组鼠皮质突触体 STEP61 蛋白表达和 STEP61 脱磷酸化水平

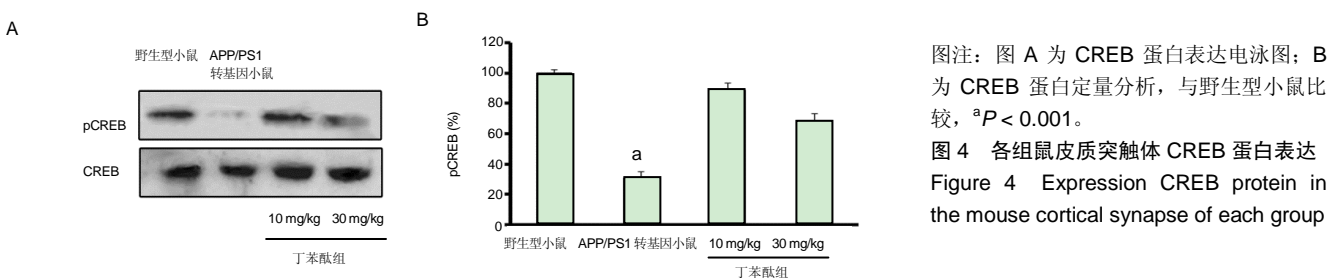
Figure 2 STEP61 protein expression and STEP61 dephosphorylation in the mouse cortical synapse of each group



图注: 图 A 为 pERK1/2 蛋白表达电泳图; B 为 pERK1/2 蛋白定量分析, 与野生型小鼠比较, ^a $P < 0.001$ 。

图 3 各组鼠皮质突触体 pERK1/2 蛋白表达

Figure 3 Expression pERK1/2 protein in the mouse cortical synapse of each group



图注: 图 A 为 CREB 蛋白表达电泳图; B 为 CREB 蛋白定量分析, 与野生型小鼠比较, ^a $P < 0.001$ 。

图 4 各组鼠皮质突触体 CREB 蛋白表达

Figure 4 Expression CREB protein in the mouse cortical synapse of each group

左旋丁基苯酞(L-NBP), 芹菜属种子提取物(中国芹菜)。以往的研究表明丁苯酞对脑缺血、血管性痴呆和 β -淀粉样蛋白诱导的大鼠动物模型具有神经保护作用, 机制为抑制氧化应激损伤、神经元凋亡与胶质细胞活化, 调节淀粉样 β 蛋白前体(A β PP)进程并减少 β -淀粉样蛋白生成。DL-3-丁基苯酞增强了局部脑血流量, 左旋丁基苯酞和DL-3-丁基苯酞增加局灶性脑缺血大鼠软脑膜小动脉直径和血流速度^[34], 左旋丁基苯酞改善 β -淀粉样蛋白注模型中空间学习和工作记忆的损害^[35]。然而, 左旋丁基苯酞改善认知功能障碍的具体机制尚不清楚。

STEP是一种脑特异性的蛋白酪氨酸磷酸酶, ERKs是STEP的底物^[36]。STEP结合ERKs在KIM区域^[37], 在KIM区域调控的丝氨酸残基的磷酸化阻止STEP与ERKs相互作用, 同样的丝氨酸残基的脱磷酸化激活STEP。然后, STEP结合并下调ERKs的活性^[37]。CREB的Ser133磷酸化后具有转录因子的功能, CREB是一个下游底物和各种信号转导通路的被作用者, 包括ERK。作者之前的研究显示, 在阿尔茨海默病动物和细胞模型中活化的STEP61影响ERK信号通路^[11]。

此次研究中, pERK1/2和pCREB水平在的动物和细胞模型中显著受到抑制, 同时伴随着STEP61水平和其脱磷酸化水平的增加。然而, 连续给予10 mg/kg或30 mg/kg丁苯酞明显降低STEP61水平, 并增加pERK和pCREB水平, 特别是10 mg/kg丁苯酞处理组($P < 0.05$)。丁苯酞浓度组设置为10 mg/(kg·d)和30 mg/(kg·d)组, 研究结果多为10 mg组有统计学意义, 30 mg无统计学差异, 这个浓度是根据已发表文献而设置, 10 mg组有统计学意义, 30 mg无统计学差异, 可能与药物最佳浓度所致最佳疗效有关。作者得出结论, 新药丁苯酞改善了 β -淀粉样蛋白诱导的学习和记忆缺损, 同时第一次发现丁苯酞降低 β -淀粉样蛋白诱导的STEP61水平, 抑制ERK和CREB磷酸化。结果表明, 丁苯酞作为一个多靶点药物, 具备神经保护作用的潜力。因此, 丁苯酞可能作为阿尔茨海默病的有效治疗药物。这与最近的研究结果吻合, 含有多种功能的化合物可能比单一靶点化合物具有更大的作为神经保护药物的潜力。

致谢: 感谢杨菁, 赵艳老师在我课题完成的整个过程和论文撰写中给我提供的全面技术指导和热心帮助。

作者贡献: 课题/实验设计为第一作者和通讯作者, 第二作者和第三作者在我课题完成的整个过程和论文撰写中给我提供的全面技术指导和热心帮助。

经费支持: 该文章接受了“大连市医学科学研究计划项目(171102)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案中有关动物伦理问题已经锦州医科大学, 大连市中心医院实验动物伦理委员会讨论批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大

限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Dayan AD. Quantitative histological studies on the aged human brain. II. Senile plaques and neurofibrillary tangles in senile dementia (with an appendix on their occurrence in cases of carcinoma). Acta Neuropathol. 1970;16(2):95-102.
- [2] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83:4913-4917.
- [3] Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, et al. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:7247-7251.
- [4] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002;297:353-356.
- [5] Lue LF, Kuo YM, Roher AE, et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. Am J Pathol. 1999;155:853-862.
- [6] McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1999;46(6):860-866.
- [7] Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. J Neurosci. 2000;20:4050-4058.
- [8] Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, et al. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:14675-14680.
- [9] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron. 2003; 39:409-421.
- [10] Billings LM, Oddo S, Green KN, et al. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. Neuron 2005;45: 675-688.
- [11] Zhang L, Xie JW, Yang J, et al. Tyrosine Phosphatase STEP 61 Negatively Regulates Amyloid b-Mediated ERK/CREB Signaling Pathways Via $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. J Neurosci Res. 2013;91:1581-1590.
- [12] Abdoulaye IA, Guo YJ. A Review of Recent Advances in Neuroprotective Potential of 3-N-Butylphthalide and Its Derivatives. Biomed Res Int. 2016;2016:5012341.

- [13] Xu HL, Feng YP. Inhibitory effects of chiral 3-n-butylphthalide on inflammation following focal ischemic brain injury in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2000;21:433-438.
- [14] Liu RZ, Fan CX, Zhang ZL, et al. Effects of DL-3-n-butylphthalide on Cerebral Ischemia Infarction in Rat Model by Mass Spectrometry Imaging. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(11): 2451.
- [15] Li F, Ma Q, Zhao H, et al. L-3-n-Butylphthalide reduces ischemic stroke injury and increases M2 microglial polarization. *Metab Brain Dis.* 2018; 33(6): 1995-2003.
- [16] Peng Y, Zeng X, Feng Y, et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of L-3-n-butylphthalide in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; 43:876-881.
- [17] Peng Y, Xu S, Chen G, et al. l-3-n-Butylphthalide improves cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;321: 902-910.
- [18] Zhang C, Zhao S, Zang Y, et al. The efficacy and safety of DL-3n-butylphthalide on progressive cerebral infarction: A randomized controlled STROBE study. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(30):e7257.
- [19] Lei H, Zhang Y, Huang L, et al. L-3-n-Butylphthalide Regulates Proliferation, Migration, and Differentiation of Neural Stem Cell In Vitro and Promotes Neurogenesis in APP/PS1 Mouse Model by Regulating BDNF/TrkB/CREB/Akt Pathway. *Neurotox Res.* 2018;34(3):477-488.
- [20] Bi MJ, Sun XN, Zou Y, et al. Front Pharmacol. N-Butylphthalide Improves Cognitive Function in Rats after Carbon Monoxide Poisoning. *Front Pharmacol.* 2017;8:64.
- [21] Zhao Y, Lee JH, Chen D, et al. DL-3-n-butylphthalide Induced Neuroprotection, Regenerative Repair, Functional Recovery and Psychological Benefits following Traumatic Brain Injury in Mice. *Neurochem Int. Neurochem Int.* 2017;111:82-92.
- [22] Liu CY, Zhao ZH, Chen ZT, et al. DL-3-n-butylphthalide protects endothelial cells against advanced glycation end product-induced injury by attenuating oxidative stress and inflammation responses. *Exp Ther Med.* 2017; 14(3): 2241-2248.
- [23] Chang Q, Wang XL. Effects of chiral 3-n-butylphthalide on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24:796-804.
- [24] Wang CY, Xu Y, Wang X, et al. DL-3-n-Butylphthalide Inhibits NLRP3 Inflammasome and Mitigates Alzheimer's-Like Pathology via Nrf2-TXNIP-TrX Axis. *Antioxid Redox Signal.* 2018 Apr 25.
- [25] Diao XX, Zhong K, Li XL, et al. Isomer-selective distribution of 3-n-butylphthalide (NBP) hydroxylated metabolites, 3-hydroxy-NBP and 10-hydroxy-NBP, across the rat blood-brain barrier. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(12): 1520-1527.
- [26] Lv C, Ma Q, Han B, et al. Long-Term DL-3-n-Butylphthalide Treatment Alleviates Cognitive Impairment Correlate With Improving Synaptic Plasticity in SAMP8 Mice. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:200.
- [27] González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, et al. Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:427.
- [28] Maurice T, Hippert C, Serratrice N, et al. Cystine accumulation in the CNS results in severe age-related memory deficits. *Neurobiol Aging.* 2009;30(6):987-1000.
- [29] Frank AW, Randy JA, Fengju BA. Proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics.* 2005; 5(8): 2177-2201.
- [30] Ruan L, Kang Z, Pei G, et al. Amyloid deposition and inflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009; 6(6): 531-540.
- [31] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid b protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002;416:535-539.
- [32] Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron.* 2003;37:925-937.
- [33] Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci.* 2005;8: 1051-1058.
- [34] Yan CH, Feng YP, Zhang JT. Effects of dl-3-n-butylphthalide on regional cerebral blood flow in right middle cerebral artery occlusion rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1998;19:117-120.
- [35] Xiang J, Pan J, Chen F, et al. L-3-n-butylphthalide improves cognitive impairment of APP/PS1 mice by BDNF/TrkB/PI3K/AKT pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(7):1706-1713.
- [36] Barr AJ, Knapp S. MAPK-specific tyrosine phosphatases: new targets for drug discovery? *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27: 525-530.
- [37] Paul S, Nairn AC, Wang P, et al. NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nat Neurosci.* 2003;6:34-42.