

柯诺辛碱 B 对百草枯诱导 SH-SY5Y 细胞自噬与异常聚集 TDP-43 影响

姚鲁清, 崔宝龙, 何晓燕, 赵芳, 周畅

(青岛大学附属医院神经内科, 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的 观察柯诺辛碱 B(Cory B)对百草枯(PQ)诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬的调节作用及异常聚集 TDP-43 的影响。方法 实验分为正常对照组、模型组和 Cory B 干预组。用 PQ 诱导氧化应激细胞损伤模型。采用 CCK8 法检测细胞存活率,免疫荧光染色检测自噬标记物 LC3B 点状聚集物的形成,免疫印迹法(Western blot)检测自噬标志物 LC3 的转换变化(LC3-II/LC3-I)以及 TDP-43 蛋白的表达改变。结果 CCK8 法检测结果显示,PQ 降低了 SH-SY5Y 细胞存活率,Cory B 对细胞没有明显的毒性,并且可以提高 PQ 诱导细胞的存活率。免疫荧光染色结果显示,经 Cory B 处理的细胞内 LC3B 点状聚集物明显增多。Western blot 检测结果显示,与模型组相比较,Cory B 干预组 LC3-II/LC3-I 比值升高,异常聚集的 TDP-43 蛋白表达水平降低。结论 Cory B 能促进 PQ 诱导 SH-SY5Y 细胞的自噬反应,并降低异常聚集的 TDP-43 蛋白的表达,表明 Cory B 可能通过诱导细胞自噬发挥神经保护作用。

[关键词] 钩藤属;百草枯;肌萎缩侧索硬化;自噬;神经保护;TDP-43 蛋白

[中图分类号] R746.4;R392.3

[文献标志码] A

[文章编号] 2096-5532(2022)01-0051-06

doi: 10.11712/jms.2096-5532.2022.58.022

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20220224.1552.001.html>; 2022-02-28 10:22:51

EFFECT OF CORYNOXINE B ON PARAQUAT-INDUCED CELL AUTOPHAGY AND ABNORMAL AGGREGATION OF TDP-43 IN SH-SY5Y CELLS YAO Luqing, CUI Baolong, HE Xiaoyan, ZHAO Fang, ZHOU Chang (Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the regulatory effect of corynoxine B (Cory B) on paraquat (PQ)-induced autophagy of SH-SY5Y cells and its effect on abnormal aggregation of TDP-43. **Methods** The SH-SY5Y cells were divided into normal control group, model group, and Cory B intervention group. PQ was used to establish an oxidative stress-induced cell damage model. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was performed to determine the cell viability. Immunofluorescence staining was used to detect the formation of autophagy maker LC3B punctate aggregates. Western blot was used to measure the conversion of autophagy maker LC3 (LC3-II/LC3-I) and the expression of TDP-43 protein. **Results** The results of CCK-8 assay showed that PQ reduced the viability of SH-SY5Y cells; Cory B showed no obvious toxicity to cells, and could increase the viability of cells induced by PQ. Immunofluorescence staining showed that intracellular LC3B punctate aggregates were significantly increased after Cory B treatment. Western blot analysis showed that compared with the model group, the Cory B intervention group had a higher LC3-II/LC3-I ratio and a lower expression level of abnormally aggregated TDP-43 protein. **Conclusion** Cory B can promote PQ-induced autophagic response in SH-SY5Y cells, and reduce the expression of abnormally aggregated TDP-43 protein, indicating that Cory B may exert neuroprotective effects by inducing cell autophagy.

[KEY WORDS] uncaria; paraquat; amyotrophic lateral sclerosis; autophagy; neuroprotection; TDP-43 protein

肌萎缩侧索硬化(ALS)是一种累及上、下运动神经元的进行性神经系统变性病^[1],可以导致延髓、躯体部肌肉萎缩^[2-3]。约 90% 的 ALS 病例是散发性的,只有 10% 的 ALS 病例为家族性的^[4-5]。目前还没有有效的治疗方法可以阻止疾病进展。美国食

品药品监督管理局(FDA)目前仅批准利鲁唑和依达拉奉作为有效延缓病程的药物^[6]。有研究证实,家族性 ALS 中部分病人的发病与超氧化物歧化酶 1(SOD1)基因突变有关^[5,7],还有一部分病人发病与 TARDBP 基因突变有关。目前认为 TARDBP 基因的突变可以导致异常 TDP-43 蛋白聚集而致病^[7-9]。最新研究表明,TDP-43 是 ALS 的病理性标志物。BRETTSCHEIDER 等^[10-11]发现,异常聚集 TDP-43 在体内沉积具有病理特征性,从而提出 4

[收稿日期] 2020-07-01; **[修订日期]** 2021-06-30

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(ZR2014HM064)

[第一作者] 姚鲁清(1994-),男,硕士研究生。

[通信作者] 周畅(1971-),女,博士,主任医师,硕士生导师。E-mail:zhch0532@sina.com。

阶段分期,进一步突出了 TDP-43 在疾病进展中的作用。研究表明,百草枯(PQ)可以诱导 SH-SY5Y 细胞产生异常聚集的 TDP-43 蛋白^[12]。

自噬是一种细胞进行自我吞噬的过程,更是清除细胞错误折叠蛋白质的关键机制。影响细胞自噬机制的主要是饥饿状态^[13]、细胞凋亡^[14]和某些药物^[15]等。细胞自噬异常,可使异常或错误折叠的蛋白质聚集在细胞质、细胞核中,从而导致细胞器损伤及神经元功能障碍^[16]。通过调节自噬可以减少神经变性病中的异常蛋白质聚集。天然小分子生物碱的调节自噬作用已经被广泛探究^[15]。柯诺辛碱 B (Cory B)作为一种天然小分子生物碱在帕金森病模型中可激活自噬、减少 α 突触核蛋白的表达^[17]。但是,Cory B 在 ALS 模型中的作用尚无明确的研究。故本研究用 PQ 处理细胞制备 ALS 模型,探讨 Cory B 是否可以通过调节自噬而发挥神经保护作用,以期治疗 ALS 提供新方向和新思路。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

所用 Cory B 购于 MCE 公司;PQ 购于 Sigma-Aldrich 公司;SH-SY5Y 细胞购于 American Type Culture Collection 公司;细胞培养耗材购于 Corning 公司;胎牛血清购于 BI 公司;所有抗体均购于 Cell Signaling Technology 公司;LC3B 购于 Abcam 公司。

1.2 细胞培养

取回细胞后先复苏细胞,再以 800 r/min 离心 5 min,弃去上清液。用含体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬细胞,转移至培养瓶中,置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中培养。每 3~4 d 按 1:6 比例进行传代。根据细胞密度,将细胞接种于 6 孔板内,并用血细胞计数板计数,置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中培养。

1.3 实验分组及处理

实验分为正常对照组(Control 组)、模型组(PQ 组)和 Cory B 干预组(PQ+Cory B 组)。Control 组:用加入 PBS 缓冲液 200 μ L 的培养液培养细胞 24 h;PQ 组:用加入 PBS 缓冲液 100 μ L 和 1 mmol/L 的 PQ 100 μ L 的培养液培养细胞 24 h;PQ+Cory B 组:用加入设定浓度 Cory B 100 μ L 的培养液预处理细胞 12 h,再加入 1 mmol/L 的 PQ 100 μ L 处理细胞 12 h。在设定的时间点终止培养,进行下一

步实验。

1.4 CCK8 法检测细胞存活率

收集各组细胞,培养 24 h 后接种于 96 孔板中。按 1:10 的体积比加入 CCK8 试剂,37 ℃ 孵育 1 h 后,于酶标仪上测 560 nm 波长处光密度(OD)值。计算细胞存活率,细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。进行 3 次独立实验,结果取平均值。

1.5 细胞免疫荧光染色

实验分组处理 24 h,铺板细胞,待细胞种植 6 孔板贴于玻片后,用 40 g/L 多聚甲醛固定液固定细胞 20 min,PBS 浸洗。接着用 5 g/L TritonX 室温通透 20 min,PBS 浸洗。加入山羊血清封闭 30 min,去除血清封闭液,加入 LC3B 一抗稀释液 4 ℃ 孵育过夜。用 PBS 洗净一抗后,在避光条件下,加入荧光二抗稀释液孵育 1 h。用 PBS 洗净二抗后,加入 DAPI 避光孵育 5 min 复染核,以 PBS 洗净 DAPI,用抗荧光淬灭剂进行封片,观察并收集图像。

1.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测

实验分组处理 24 h,收集细胞,用 RIPA 裂解液、PMFS 和蛋白酶抑制剂配成的试剂提取蛋白。采用 BCA 法测定每组的蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳条件:80 V、40 min,120 V、45 min。电泳完毕,进行转膜,条件为 295 mA 恒流电转 90 min。加入 50 g/L 脱脂奶粉置摇床上常温封闭 1.5 h。去除封闭液,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入按 1:1 000 比例稀释的 TDP-43(兔源)、GADPH(鼠源)、LC3B(兔源)一抗 4 ℃ 过夜。去除一抗,使用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入按 1:5 000 比例稀释的二抗(羊抗鼠和羊抗兔),置摇床上室温孵育 1.5 h。去除二抗,使用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。最后用 ECL 发光液显影,使用 Image J 软件进行图像分析。以 GADPH 作为对照计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

用 Graphpad Prism 8 软件进行数据的统计分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PQ 对 SH-SY5Y 细胞 TDP-43 聚集的影响

根据先前的研究^[18-20],用 1 mmol/L PQ 处理

SH-SY5Y 细胞 12 h, 然后进行 Western blot 检测。结果显示, PQ 组细胞 TDP-43(35 000)蛋白相对表达量为 0.838 ± 0.456 , 较 Control 组(0.600 ± 0.012)的表达量明显增多($n=3, t=8.729, P<0.001$)。见图 1。细胞免疫荧光染色结果显示, PQ 诱导了 SH-SY5Y 细胞胞质内 TDP-43(35 000)的异常聚集, 该结果与 Western blot 检测结果一致。见图 2。

2.2 Cory B 对 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

CCK8 法检测结果显示, Control 组和 PQ 组的细胞存活率分别为 1.070 ± 0.043 和 0.351 ± 0.041 ($n=3$), PQ 组的细胞存活率明显降低($t=20.930, P<0.001$)。PQ+不同浓度 Cory B 组(Cory B 浓度分别为 10、15、20、25、30 $\mu\text{mol/L}$)细胞存活率分别为 0.434 ± 0.046 、 0.517 ± 0.016 、 0.618 ± 0.007 、

0.705 ± 0.010 、 0.634 ± 0.018 ($n=6$), Cory B 在一定浓度范围内, 以剂量依赖的方式提高了 1 mmol/L PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的存活率($F=179.800, P<0.001$), 当 Cory B 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率达到峰值。提示 Cory B 具有神经保护作用, 当 Cory B 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率最高, 因此使用 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cory B 进行后续研究。

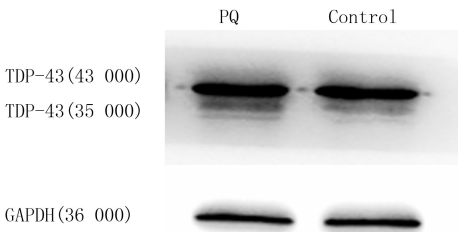
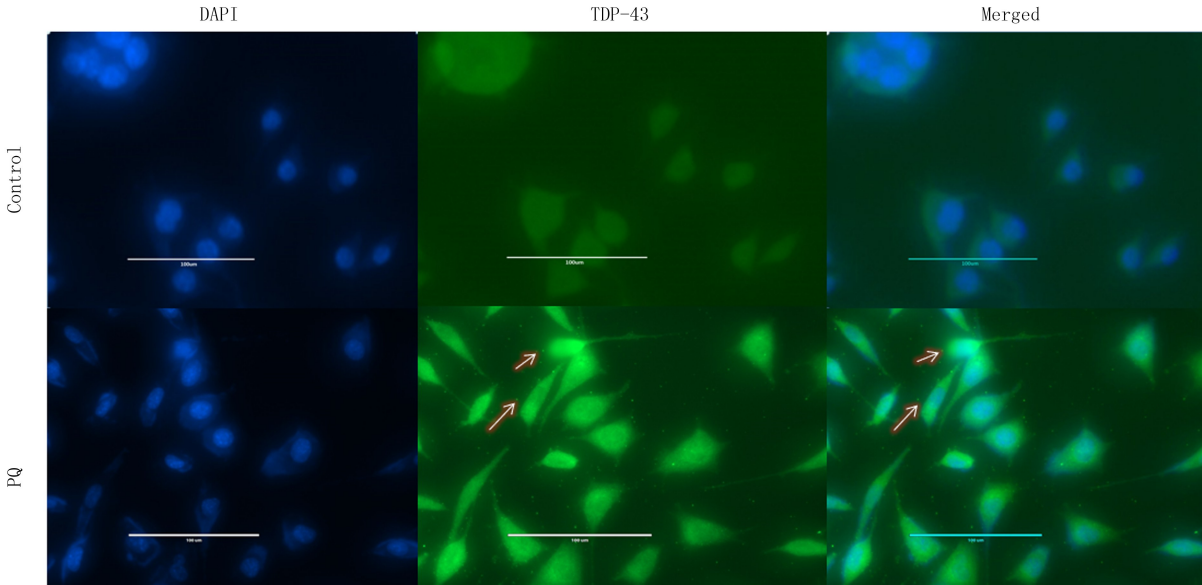


图 1 TDP-43 蛋白表达 Western blot 检测



SH-SY5Y 细胞免疫荧光染色, 箭头(↑)示异常 TDP43 聚集体。Scale bar 为 100 μm 。

图 2 PQ 对 SH-SY5Y 细胞 TDP-43 聚集影响的检测

2.3 Cory B 对 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬的影响

为了研究 Cory B 是否可以诱导细胞自噬, 采用 LC3B 抗体进行细胞免疫荧光染色。荧光显微镜下观察到, Control 组细胞 LC3B 绿色点状荧光在胞质内分布较弥散、不清, 聚集分布不明显; PQ 组细胞 LC3B 在胞质内分布与 Control 组相似; 与 PQ 组和 Control 组细胞相比较, PQ+Cory B 组细胞内呈绿色点状荧光的 LC3B 明显增多。见图 3。Control 组、PQ 组和 PQ+Cory B 组的免疫荧光定量分别为 0.105 ± 0.002 、 0.161 ± 0.002 和 0.089 ± 0.004 ($n=3$), 3 组比较差异有显著性($F=10.809, P<0.001$)。

表明 Cory B 可激活 PQ 诱导的细胞自噬。

LC3 是自噬标志蛋白, 一般分为分子量 16 000 的 LC3-I 和分子量 14 000 的 LC3-II。自噬进行时, LC3-I 会向 LC3-II 转化^[21]。为了进一步验证 Cory B 的自噬诱导作用, 采用 Western blot 方法检测 LC 的表达水平, 并计算 LC3-II/LC3-I 比值。检测结果显示, Control 组、PQ 组、25.0 $\mu\text{mol/L}$ Cory B 组、PQ+12.5 $\mu\text{mol/L}$ Cory B 组和 PQ+25.0 $\mu\text{mol/L}$ Cory B 组的 LC3-II/LC3-I 比值分别为 2.099 ± 0.165 、 0.785 ± 0.049 、 4.212 ± 0.355 、 1.754 ± 0.116 和 5.099 ± 0.472 ($n=5$)。与 PQ 组和 Control 组相比, PQ+25.0 $\mu\text{mol/L}$ Cory B 组 LC3-

II/LC3-I 比值明显升高($F=172.913,P<0.001$)。实验进一步证实了 Cory B 可以促进 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬。见图 4。

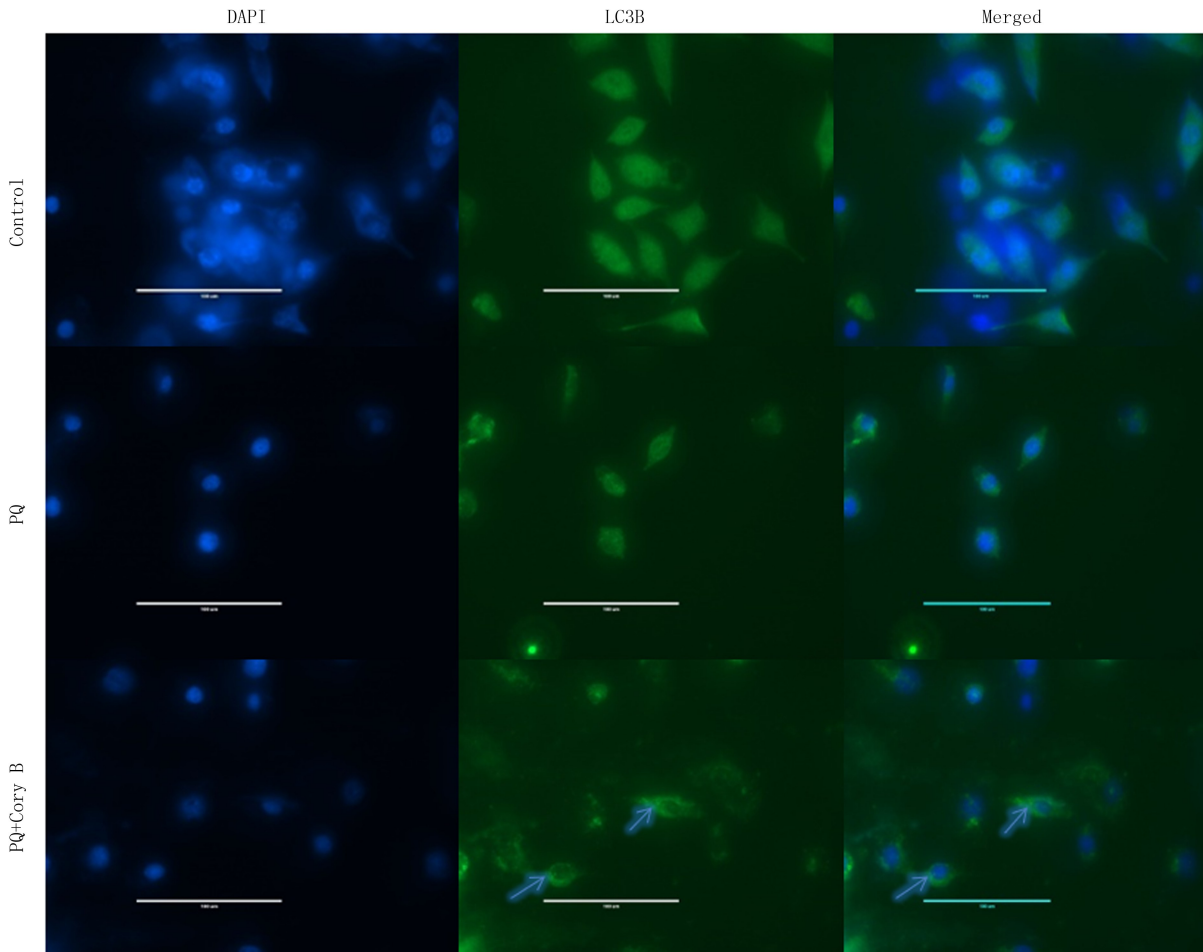
2.4 Cory B 对 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 TDP-43 蛋白表达的影响

为了研究 Cory B 是否可以减少 TDP-43 蛋白异常聚集,采用 Western blot 检测 TDP-43(35 000)蛋白的表达。结果显示,Control 组、PQ 组和 PQ+Cory B 组 TDP-43(35 000)蛋白的相对表达量分别

为 0.570 ± 0.330 、 0.953 ± 0.336 、 0.449 ± 0.223 ($n=3$)。与 Control 组相比,PQ 组的 TDP-43(35 000)蛋白表达明显增高,而 PQ+Cory B 组的蛋白表达较 PQ 组明显下降($F=229.791,P<0.001$)。表明 Cory B 可以减少 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞异常的 TDP-43 蛋白聚集。见图 5。

3 讨 论

本研究根据先前的研究通过 PQ 的氧化应激



LC3B 蛋白在 SH-SY5Y 细胞胞质内呈点状聚集,箭头(↑)示自噬体生成。Scale bar 为 100 μm 。

图 3 Cory B 对 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬影响的免疫荧光染色检测

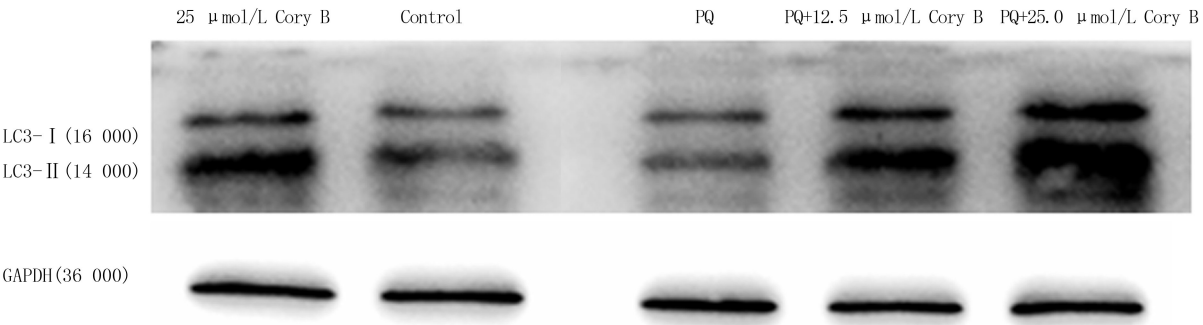


图 4 SH-SY5Y 细胞 LC3 蛋白表达的 Western blot 检测

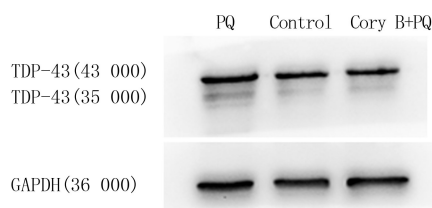


图 5 SH-SY5Y 细胞 TDP-43 蛋白表达的 Western blot 检测

作用诱导细胞产生异常聚集的 TDP-43 蛋白^[12],制备病理性 TDP-43 聚集的 ALS 细胞模型。不仅观察到 Cory B 提高了 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的存活率,还观察到 Cory B 可以激活自噬进程,减少异常聚集 TDP-43(35 000)蛋白的表达。

许多研究认为,帕金森病、阿尔茨海默病、ALS 及亨廷顿病等神经系统变性疾病与自噬途径受损导致的蛋白质的异常聚集有关^[22]。目前,关于通过调节自噬进程治疗神经变性疾病的研究很多,RAVI-KUMAR 等^[23]在亨廷顿病的细胞模型中进行诱导自噬从而治疗疾病的研究;ROSCIC 等^[24]的研究报道了诱导自噬可以减少亨廷顿病模型中蛋白质异常聚集;STEELE 等^[25]也发现一些药物可以通过诱导自噬减少阿尔茨海默病模型中 A β 蛋白的异常聚集^[26];最近的研究发现,p-香豆酸(巴西绿色蜂胶中的活性成分)通过自噬作用在 Neuro2a 细胞中对致病性 SOD1 引起的神经毒性起保护作用^[27]。因此,激活自噬可能是清除神经变性疾病病理性蛋白质聚集的重要途径。

Cory B 是钩藤中重要活性物质,为吲哚生物碱中的一种。钩藤碱、异钩藤碱、柯诺辛碱及 Cory B 互为同分异构体。钩藤对心血管系统及中枢神经系统均存在广泛的保护作用,在神经系统疾病治疗方面其应用广泛,在心血管系统疾病治疗方面,其用于治疗高血压、心律失常也并不罕见。Cory B 作为一种天然小分子生物碱,具有许多同分异构体,CHEN 等^[28]研究发现,Cory B 的一种同分异构体柯诺辛碱,也可以通过 Akt/mTOR 通路诱导自噬。本文研究结果表明,Cory B 能够减少 PQ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 TDP-43 蛋白的异常聚集,提高暴露于 PQ 的细胞的存活率,发挥神经保护作用。在自噬方面,本研究结果显示,Cory B 可以促使 LC3-I 向 LC3-II 转化,并减少分子量 35 000 的 TDP-43 蛋白的异常聚集,表明 Cory B 可能通过促进自噬,分解异常聚集的蛋白质,发挥神经保护作用。但 Cory B 的具体作用机制目前仍不清楚。

以往的研究证明^[17],Cory B 主要通过 Beclin-1 依赖性途径调节细胞自噬。自噬具有细胞保护作用,但这并不意味着我们可以无限地激活自噬,过度激活自噬可以导致神经元萎缩,同时也能引起细胞死亡^[29-30]。对自噬进行更好的调控,可以使其达到治疗疾病的目的^[31]。钩藤碱各种成分的作用,至今仍不完全清楚,但其对神经系统的保护作用,已经受到了广泛的关注。本文的研究结果表明,对细胞自噬进行调控,可以减少异常的蛋白质聚集,这进一步揭示了神经变性疾病的发生机制。这类天然小分子生物碱的自噬激活作用,虽然在抗肿瘤、抗衰老以及抗感染等方面有着重要作用,但在神经变性疾病治疗方面仍需要不断探索。由于实验条件的限制,本研究并没有进一步探究 Cory B 的自噬通路途径。但本研究结果为今后探讨 Cory B 的自噬激活作用与 ALS 之间的关系提供了参考方向,为治疗 ALS 提供了新思路。

[参考文献]

- [1] KIERNAN M C, VUCIC S, CHEAH B C, et al. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. The Lancet, 2011,377(9769):942-955.
- [2] TAYLOR J P, BROWN R H Jr, CLEVELAND D W. Decoding ALS: from genes to mechanism[J]. Nature, 2016, 539(7628):197-206.
- [3] BROWN R H Jr, AL-CHALABI A. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. The New England Journal of Medicine, 2017, 377(16):1602.
- [4] TURNER M R, HARDIMAN O, BENATAR M, et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis[J]. The Lancet Neurology, 2013,12(3):310-322.
- [5] ANDERSEN P M. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [J]. Supplements to Clinical Neurophysiology, 2004,57:211-227.
- [6] ROTHSTEIN J D. Edaravone: a new drug approved for ALS [J]. Cell, 2017,171(4):725.
- [7] ARAI T, HASEGAWA M, AKIYAMA H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006,351(3):602-611.
- [8] NEUMANN M, SAMPATHU D M, KWONG L K, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis[J]. Science (New York, N Y), 2006,314(5796):130-133.
- [9] WANG I F, WU L S, SHEN C K. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases[J]. Trends in Molecular Medicine, 2008,14(11):479-485.
- [10] BRETTSCHEIDER J, DEL TREDICI K, TOLEDO J B, et

- al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Annals of Neurology*, 2013,74(1):20-38.
- [11] BRETTSCHNEIDER J, ARAI K, DEL TREDICI K, et al. TDP-43 pathology and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord[J]. *Acta Neuropathologica*, 2014, 128(3):423-437.
- [12] LEI Y, ZHANG Z F, LEI R X, et al. DJ-1 suppresses cytoplasmic TDP-43 aggregation in oxidative stress-induced cell injury[J]. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 2018,66(3): 1001-1014.
- [13] HE L, ZHANG J, ZHAO J S, et al. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress[J]. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md)*, 2018,9(4):493-504.
- [14] DOHERTY J, BAEHRECKE E H. Life, death and autophagy [J]. *Nature Cell Biology*, 2018,20(10):1110-1117.
- [15] LAW B Y, CHAN W K, XU S W, et al. Natural small-molecule enhancers of autophagy induce autophagic cell death in apoptosis-defective cells[J]. *Scientific Reports*, 2014,4:5510.
- [16] GHAVAMI S, SHOJAEI S, YEGANEH B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. *Progress in Neurobiology*, 2014,112:24-49.
- [17] LU J H, TAN J Q, DURAIRAJAN S S K, et al. Isorhynchophylline, a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein in neuronal cells via inducing autophagy[J]. *Autophagy*, 2012,8(1):98-108.
- [18] PARKER S J, MEYEROWITZ J, JAMES J L, et al. Inhibition of TDP-43 accumulation by bis (thiosemicarbazono)-copper complexes[J]. *PLoS One*, 2012,7(8):e42277. doi:10.1371/journal.pone.0042277.
- [19] GABBIANELLI R, FERRI A, ROTILIO G, et al. Aberrant copper chemistry as a major mediator of oxidative stress in a human cellular model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Journal of Neurochemistry*, 1999,73(3):1175-1180.
- [20] YANG W, TIFFANY-CASTIGLIONI E. The bipyridyl herbicide paraquat produces oxidative stress-mediated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: relevance to the dopaminergic pathogenesis[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2005,68(22):1939-1961.
- [21] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014,20(3):460-473.
- [22] WU H J, CHEN S, AMMAR A B, et al. Crosstalk between macroautophagy and chaperone-mediated autophagy: implications for the treatment of neurological diseases[J]. *Molecular Neurobiology*, 2015,52(3):1284-1296.
- [23] RAVIKUMAR B, VACHER C, BERGER Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease[J]. *Nature Genetics*, 2004,36(6):585-595.
- [24] ROSCIC A, BALDO B, CROCHEMORE C, et al. Induction of autophagy with catalytic mTOR inhibitors reduces huntingtin aggregates in a neuronal cell model[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2011,119(2):398-407.
- [25] STEELE J W, GANDY S. Latrepirdine (Dimebon®), a potential Alzheimer therapeutic, regulates autophagy and neuropathology in an Alzheimer mouse model [J]. *Autophagy*, 2013,9(4):617-618.
- [26] CACCAMO A, MAJUMDER S, RICHARDSON A, et al. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and tau: effects on cognitive impairments[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010,285(17): 13107-13120.
- [27] UEDA T, ITO T, KURITA H, et al. P-coumaric acid has protective effects against mutant copper-zinc superoxide dismutase 1 via the activation of autophagy in N2a cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019,20(12):E2942.
- [28] CHEN L L, SONG J X, LU J H, et al. Corynoxine, a natural autophagy enhancer, promotes the clearance of alpha-synuclein via Akt/mTOR pathway[J]. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2014,9(3):380-387.
- [29] BREDESEN D E, RAO R V, MEHLEN P. Cell death in the nervous system[J]. *Nature*, 2006,443(7113):796-802.
- [30] RAMI A. Review: autophagy in neurodegeneration (firefighter and/or incendiarist)[J]? *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2009,35(5):449-461.
- [31] RUBINSZTEIN D C, GESTWICKI J E, MURPHY L O, et al. Potential therapeutic applications of autophagy[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007,6(4):304-312.

(本文编辑 马伟平)

参考文献类型和文献载体标识代码的标注

为便于文献的统计和期刊评价,确定文献的检索范围,提高检索结果的适用性,文后每篇引用型参考文献应标注其文献类型和(或)文献载体标识代码。按照 GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》的规定:文献类型和标识代码包括专著(M)、会议录(C)、汇编(G)、报纸(N)、期刊(J)、学位论文(D)、报告(R)、标准(S)、专利(P)、数据库(DB)、计算机程序(CP)、电子公告(EB)、档案(A)、舆图(CM)、数据集(DS)和其他(Z)等;电子资源载体和标识代码包括磁带(MT)、磁盘(DK)、光盘(CD)和联机网络(OL)等。请作者来稿时遵照执行。