

重, Wnt1、Wnt3a、Cyclin D1 的表达水平也随之升高, Wnt1、Wnt3a、Cyclin D1 的过度表达可能与胃黏膜癌变倾向呈正相关。维酶素组及胃炎 I 号组 Wnt1、Wnt3、Cyclin D1 的表达水平均有不同程度下降, 并以胃炎 I 号组疗效最佳。另外, 我们发现治疗组上皮细胞 wnt1、wnt3a 蛋白阳性染色面积较染色强度下降更显著, 这可能也是光密度均值无统计学意义的原因。综上所述, 健脾化痰解毒复方胃炎 I 号能下调 Wnt1、Wnt3a、Cyclin D1 的异常表达, 阻断 Wnt 信号通路的异常活化, 进而抑制胃黏膜上皮细胞的恶性转变, 从而起到防治胃癌前病变的作用。

参考文献:

- [1] 刘友章, 姬爱冬. 胃炎 I 号对萎缩性胃炎患者胃黏膜影响的电镜观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(6): 461-464.
- [2] 韦玉娜, 覃潇, 郭亚蕾, 等. 胃炎 I 号对慢性萎缩性胃炎的疗效及其分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 276-279.
- [3] 韦玉娜, 张伦, 刘友章. 胃炎 I 号含药血清对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖及凋亡的作用 [J]. 广东医学, 2012, 33(19): 2888-2889.
- [4] 陈小野, 邹世洁, 樊雅莉, 等. 大鼠慢性萎缩性胃炎证病结合模型胃黏膜病理研究 [J]. 上海实验动物科学, 2002, 22(1): 35-38.
- [5] Sabatini E, Bisgaard K, Ascani S, et al. The EnVision™ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate™, CSA, LABC, and SABC techniques [J]. Journal of Clinical Pathology, 1998, 51 (7): 506-511.
- [6] Johnson ML, Rajamannan N. Diseases of Wnt signaling [J]. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, 2006, 7(1-2): 41-49.
- [7] Polakis P. Wnt signaling in cancer [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, 4(5): 1-13.
- [8] Polakis P. Wnt signaling and cancer [J]. Genes & development, 2000, 14 (15): 1837-1851.
- [9] Katoh M. Expression and regulation of WNT1 in human cancer: up-regulation of WNT1 by beta-estradiol in MCF-7 cells [J]. International Journal of Oncology, 2003, 22(1): 209-212.
- [10] Zhang H, Xue Y. Wnt pathway is involved in advanced gastric carcinoma [J]. Hepato-gastroenterology, 2008, 55(84): 1126-1130.
- [11] 官文华, 杨堃, 赵文君, 等. Wnt3、Wnt3a 在胃癌组织中的表达及意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(7): 624-628.
- [12] Takasu S, Tsukamoto T, Ushijima T, et al. Cyclin D1 overexpression in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat gastric adenocarcinomas [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2007, 59 (3-4): 171-175.
- [13] Arici DS, Tuncer E, Ozer H, et al. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma [J]. Neoplasma, 2009, 56 (1): 63-67.
- [14] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. Annual review of Cell and Developmental Biology, 2004, 20: 781-810.
- [15] 蓝惠玲, 刘友章, Thongdavanh S. 胃炎 I 号方治疗慢性萎缩性胃炎 30 例疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 170-173, 178.

(编辑: 邓响潮)

β -细辛醚与冰片对 $A\beta_{1-42}$ 损伤 PC12 细胞自噬相关蛋白 LC3 和线粒体功能的影响

薛中峰^{1,2}, 何玉萍¹, 方永奇¹ (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 三亚市中医院, 海南 三亚 572000)

摘要: **目的** 观察 β -细辛醚与冰片对 β -淀粉样蛋白₁₋₄₂($A\beta_{1-42}$)诱导 PC12 细胞损伤自噬相关蛋白轻链 3(LC3)的作用, 以及对细胞内钙离子浓度和线粒体膜电位(MMP)的影响。 **方法** 体外培养 PC12 细胞, β -细辛醚与冰片预处理, 用终浓度为 $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{1-42}$ 诱导细胞产生自噬, 光镜观察细胞形态, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐比色法(MTT 法)检测细胞活力, 流式细胞仪检测 LC3 蛋白的表达、细胞内钙离子浓度及 MMP, 电镜观察细胞超微结构。 **结果** 与模型组比较, β -细辛醚组、冰片组及其 β -细辛醚+冰片组能提高细胞活力($P < 0.05$), 升高 LC3 蛋白的含量($P < 0.05$), 降低细胞内钙离子浓度及升高 MMP($P < 0.05$), 减

收稿日期: 2013-10-27

作者简介: 薛中峰, 男, 博士, 研究方向: 中医药治疗脑病及其作用机理研究。Email: xuezhongfeng@foxmail.com。通讯作者: 方永奇, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中医药治疗脑病及其作用机理研究。Email: fangyq2@163.com。

基金项目: 广东省科学技术厅、广东省中医药科学院联合科研专项(2012A032400006)。

少自噬体, 保护线粒体形态结构。**结论** β -细辛醚与冰片及其配伍对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞损伤有保护作用。

关键词: β -细辛醚; 冰片; LC3; 自噬; 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; 线粒体

中图分类号: 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0401-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.004

Effects of β -asarone and Borneol on Autophagy-related Protein LC3 and Mitochondrial Function in PC12 Cells with Injury Induced by $A\beta_{1-42}$

XUE Zhongfeng^{1,2}, HE Yuping¹, FANG Yongqi¹ (1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Sanya Traditional Chinese Medicine Hospital, Sanya 572000 Hainan, China)

Abstract: Objective To observe effects of β -asarone and borneol on autophagy-related protein light chain 3 (LC3), calcium concentration and mitochondrial membrane potential (MMP) in PC12 cells with injury induced by amyloid β -protein ($A\beta_{1-42}$). **Methods** PC12 cells were cultured in vitro and pretreated by β -asarone and borneol. Autophagy was induced by $A\beta_{1-42}$ at the final concentration of $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Cell morphology was observed under an inverted microscope. Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. LC3 expression, intracellular calcium concentration and MMP were measured by flow cytometry. Ultrastructural morphology of PC12 cells was observed by transmission electron microscope. **Results** β -asarone, borneol and their combination increased cell viability and LC3 expression ($P < 0.05$), decreased intracellular calcium concentration ($P < 0.05$), increased MMP ($P < 0.05$), reduced autophagosome, and protected mitochondrial morphology. **Conclusion** β -asarone, borneol and their combination have protective effect on cell injury induced by $A\beta_{1-42}$.

Keywords: β -asarone; Borneol; Autophagy-related protein light chain 3; Autophagy; Alzheimer's disease; Amyloid β -protein; Mitochondria

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性认知能力下降和智力减退为主要临床表现的中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 退行性病变。 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -protein, $A\beta$) 在 AD 发病过程中起了主要作用^[1]。自噬 (Autophagy) 是一种自降解过程, 参与了绝大多数长半衰期蛋白质和受损细胞器的降解^[2], 自噬相关蛋白轻链 3 (Light chain 3, LC3) 参与了自噬过程^[3]。自噬与 AD 之间关系密切, $A\beta_{1-42}$ 可以诱导自噬性细胞死亡^[4]。同时, $A\beta$ 还能引起大量 Ca^{2+} 内流入细胞, 并使线粒体内 Ca^{2+} 超载^[5], 线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP) 降低^[6]。研究表明, 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高和 MMP 的降低可能会引起自噬^[7]。石菖蒲是治疗痴呆的核心药物之一^[8], 有开窍豁痰、醒神益智之功效, 冰片芳香走窜, 功能开窍醒神。许多治疗脑病和 CNS 疾病的中成药中均含有石菖蒲和冰片。本研究石菖蒲有效成分 β -细辛醚与冰片对

$A\beta_{1-42}$ 诱导 PC12 细胞损伤的细胞活力, 自噬相关蛋白 LC3 的作用, 及对细胞内钙离子浓度, MMP, 自噬体、线粒体形态的影响, 为其配伍使用治疗 AD 提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 石菖蒲药材, 购自广州中医药大学第一附属医院中药房, 经鉴定为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎; 冰片, 广州市黄埔化工厂, 批号: 120116; PC12 细胞, 中国科学院上海细胞生物研究所; $A\beta_{1-42}$, 中国上海吉尔生化有限公司; 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT), 美国 Sigma 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司; Triton X-100, 美国 Amresco 公司; DMEM 高糖培养基、马血清、胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 小鼠抗大鼠 LC3 单克隆抗体, 日本 MBL 公司; PE 标记羊抗小鼠二抗, 美国 Santa

Cruz 公司; Fluo-3/AM 钙离子荧光探针, 美国 Biotium 公司; Rhodamine 123, 美国 Alexis 公司。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; 移液枪, 德国 Eppendorf 公司; TDL-5-A 型低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 电热恒温水浴箱, 上海跃进医疗器械厂; 立式灭菌器, 山东新华医疗器械股份有限公司; IX70 型倒置相差显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; AE-200 型电子分析天平, 瑞士 METTLER 公司; ALTRA 型流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司; H-7650 型透射电镜, 日本 HITACHI 公司。

1.3 β -细辛醚制备及冰片纯度检测 提取石菖蒲挥发油, 精制得到 β -细辛醚, 经广州分析测试中心三大光谱(GC/MS、NMR、IR)检测, 证实其成分为 β -细辛醚, 纯度为 99.55 %。冰片经 GC 检测, 证实其龙脑含量为 97.12 %。药物在使用前用无血清 DMEM 高糖培养基配成所需浓度。

1.4 $A\beta_{1-42}$ 配制 将 $A\beta_{1-42}$ 溶于无菌双去离子水中, 以 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存于无菌 Ep 管中, 使用时取出 1 支置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育 7 d, 进行老化处理, 再用无血清 DMEM 高糖培养基稀释至所需浓度。

1.5 实验分组 随机分为 6 组: 正常对照组, 模型组, β -细辛醚组($36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 冰片组($36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), β -细辛醚 + 冰片组(各 $36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组, 尼莫地平组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.6 $A\beta_{1-42}$ 诱导 PC12 细胞自噬 PC12 细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中, 培养液为含 5 % 马血清、5 % 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO₂ 培养箱中培养。待细胞长满单层, 0.25 % 胰酶消化, 用含血清的 DMEM 培养基终止消化并调细胞密度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种在 96 孔培养板或 24 孔板, 待细胞贴壁生长交叉成网后 (48 h) 用于实验。除正常对照组外, 其余组加入 50 μL 或 0.5 mL 药物预处理 1 h, 模型组用等量基质代替, 再加入含药物并且终浓度为 $1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $A\beta_{1-42}$ 处理 24 h, 维持药物浓度。

1.7 细胞形态观察 细胞直接置于光学显微镜下观察其形态。

1.8 MTT 法测细胞活力 调整细胞密度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL , 细胞经相应的处理后, 每孔加入 MTT ($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 10 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO₂ 下继续培养 4 h。吸弃培养液加入 100 μL DMSO, 置振荡器上振荡 10 min 使结晶充分溶解, 自动免疫酶标仪波长为 570 nm 测吸光度, 每

组 10 孔, 重复实验 3 次, 计算 PC12 细胞的成活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (正常组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.9 流式细胞术定量检测 LC3 蛋白表达 取 PC12 细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞密度为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$, 制成单细胞悬液, 加入 2 % BSA/PBS 室温封闭 30 min, 离心去上清, 2 % 多聚甲醛固定 15 min, 离心去上清, 加入破膜剂 Triton X-100 100 μL , 室温固定 15 min, 2 % BSA/PBS 洗 1 次, 加一抗 100 μL (2 : 100) 室温避光孵育 30 min, 2 % BSA/PBS 洗 1 次, 再加入二抗 100 μL (1 : 100) 避光孵育 30 min, 2 % BSA/PBS 洗 1 次, 剩余样本加入 PBS, 用流式细胞仪检测 LC3 蛋白表达率。

1.10 流式细胞术定量测定 Ca^{2+} 浓度和 MMP 取 PC12 细胞, 用胰酶将细胞消化成单细胞悬液, 离心弃上清, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 液洗涤 1 次, 离心弃上清, 用 PBS 液 0.5 mL 重悬细胞, 加入钙离子荧光探针 -3(Fluo-3/AM), 使其终浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 或加入罗丹明 123(Rhodamine 123), 使其终浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 混匀, 置入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中避光孵育 45 min, 离心弃上清, PBS 液洗涤 1 次, 离心弃上清, PBS 缓冲液 0.5 mL 重悬细胞, 将细胞数调整为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$, 然后在流式细胞仪上进行检测。

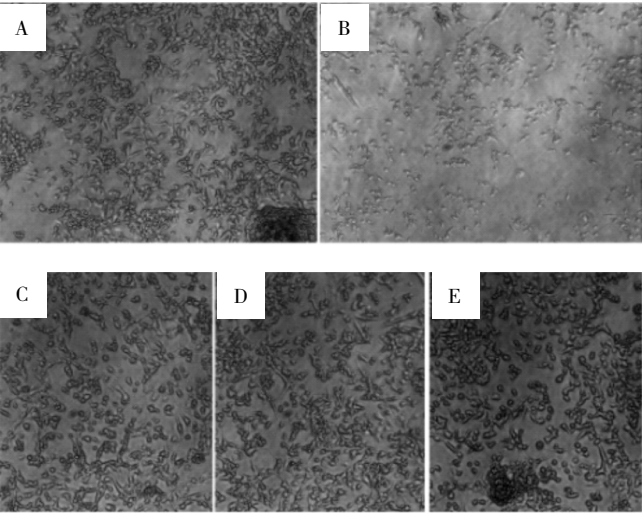
1.11 透射电镜观察 PC12 细胞超微结构 取 PC12 细胞, 离心收集细胞, 置于 2.5 % 的戊二醛, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h, PBS 冲洗 3 次, 1 % 锇酸固定, 丙酮逐级脱水, 环氧树脂 618# 浸透过夜, 包埋, 聚合 24 h, 行醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色后, 透射电镜观察并照相。

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件, 多组间比较采用单因素方差分析, 用 Student-Newman-Keuls 进行两两比较, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态变化 见图 1。正常对照组细胞呈梭形, 密度较大, 胞体饱满, 突起较长, 互相交织呈簇状生长; 模型组细胞形态不规则, 部分细胞损伤呈圆形, 数量显著减少, 胞体略小, 突起缩回; β -细辛醚组细胞呈梭形, 部分胞体略小; 冰片组细胞呈梭形, 胞体略小, 部分突起缩回、聚缩; β -细辛醚与冰片配伍组细胞呈梭形, 部分胞体略小, 部分突起缩回。

2.2 各组细胞活力变化 见表 1。 β -细辛醚组、冰



A. 正常对照组； B. 模型组； C. β -细辛醚组； D. 冰片组； E. β -细辛醚 + 冰片组

图1 各组细胞形态变化($\times 150$)

Figure 1 Changes of cell morphology in different groups ($\times 150$)

表1 β -细辛醚与冰片对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	细胞存活率 /%
正常对照组	100
模型组	$67.7 \pm 5.3^*$
β -细辛醚组	$86.2 \pm 2.4^\Delta$
冰片组	$80.3 \pm 3.8^\Delta$
β -细辛醚 + 冰片组	$83.9 \pm 4.3^\Delta$

注：与正常对照组比较， $^*P < 0.05$ ；与模型组比较， $^\Delta P < 0.05$ 。

片组及 β -细辛醚 + 冰片组均可明显提高细胞活力，与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)；与单用 β -细辛醚或冰片组比较， β -细辛醚 + 冰片组细胞活力高于冰片组，低于 β -细辛醚组。

2.3 各组 LC3 蛋白表达 见表2。 β -细辛醚组、冰片组及 β -细辛醚 + 冰片组均明显提高 LC3 蛋白表达，与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与单用 β -细辛醚组或冰片组比较， β -细辛醚 + 冰片组 LC3 蛋白表达高于冰片组，低于 β -细辛醚组。

2.4 各组 Ca^{2+} 浓度和 MMP 变化 见表3。 β -细辛

表2 各组对 LC3 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LC3 表达 /%
正常对照组	13.6 ± 2.9
模型组	$6.9 \pm 1.9^*$
β -细辛醚组	$22.6 \pm 4.4^\Delta$
冰片组	$18.8 \pm 3.9^\Delta$
β -细辛醚 + 冰片组	$19.9 \pm 3.8^\Delta$

注：与正常对照组比较， $^*P < 0.05$ ；与模型组比较， $^\Delta P < 0.05$ 。

表3 各组对 Ca^{2+} 和 MMP 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Ca^{2+} 浓度(荧光强度)	MMP(荧光强度)
正常对照组	312.6 ± 31.1	700.7 ± 34.3
模型组	$457.7 \pm 26.7^*$	$565.2 \pm 30.7^*$
β -细辛醚组	$324.4 \pm 16.6^\Delta$	$689.9 \pm 13.8^\Delta$
冰片组	$380.2 \pm 34.2^\Delta$	$650.7 \pm 34.7^\Delta$
β -细辛醚 + 冰片组	$357.8 \pm 24.8^\Delta$	$669.2 \pm 50.3^\Delta$
尼莫地平组	$322.8 \pm 18.4^\Delta$	$669.1 \pm 30.1^\Delta$

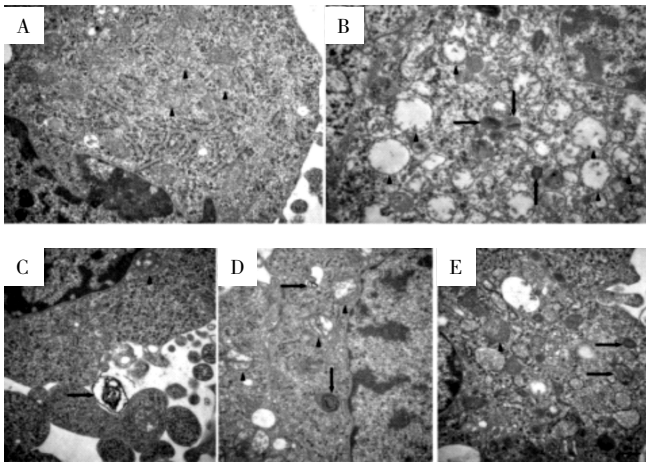
注：与正常对照组比较， $^*P < 0.05$ ；与模型组比较， $^\Delta P < 0.05$ 。

醚组、冰片组及 β -细辛醚 + 冰片组均明显降低 Ca^{2+} 浓度，与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)，与单用 β -细辛醚组或冰片组比较， β -细辛醚 + 冰片组 Ca^{2+} 浓度低于冰片组，高于 β -细辛醚组； β -细辛醚组、冰片组及 β -细辛醚 + 冰片组均明显提高了 MMP，与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，与单用 β -细辛醚组或冰片组比较， β -细辛醚 + 冰片组 MMP 高于冰片组，低于 β -细辛醚组。

2.5 各组 PC12 细胞超微结构变化 见图2。在正常对照组中几乎观察不到自噬体，线粒体形态正常；而在模型组中可以观察到较多自噬体，线粒体变为空泡，嵴变短、减少； β -细辛醚组自噬体减少，线粒体形态良好；冰片组自噬体减少，线粒体嵴变短、减少； β -细辛醚 + 冰片组自噬体减少，线粒体形态较好。

3 讨论

β -细辛醚在体内吸收快、分布快^[9]，分子量小，



A. 正常对照组； B. 模型组； C. β -细辛醚组； D. 冰片组； E. β -细辛醚 + 冰片组。箭头指示为自噬体，三角指示为线粒体；Bar = 500 nm

图2 各组细胞超微结构变化($\times 30000$)

Figure 2 Changes of cell ultrastructure in different groups ($\times 30000$)

高度亲脂性,能快速透过血脑屏障(BBB),在脑干、海马、皮质、小脑广泛分布^[10-11]。其对神经系统疾病疗效确切^[12],能抑制大鼠脑皮质和海马神经细胞凋亡^[13],对谷氨酸所致的 PC12 细胞损伤具有保护作用^[14]。冰片及其配伍能有效保护缺糖缺氧损伤的 PC12 细胞^[15],可升高大鼠下丘脑、脑干 5-羟色胺(5-HT)含量^[16]。石菖蒲或 β -细辛醚与冰片配伍后对缺氧诱导的神经细胞损伤具有保护作用^[17-18],能够降低脑缺血再灌注大鼠脑组织中内皮素含量,并显示量效关系^[19],同时有升高降钙素基因相关肽含量,舒张脑血管、改善脑供血的作用^[20]。

中药在防治 AD 方面具有优势,通过调节自噬干预 AD 可能成为治疗 AD 的一种策略和方法。本实验发现 β -细辛醚、冰片及其配伍均可提高细胞活力及 LC3 蛋白的表达,降低钙离子浓度,提高 MMP,减少自噬体,保护线粒体形态结构。同时证实 β -细辛醚与冰片配伍作用强于单用冰片,但弱于单用 β -细辛醚,三者的药效关系是: β -细辛醚 > β -细辛醚 + 冰片 > 冰片。可见, β -细辛醚的药效强于冰片,但与冰片配伍后反而会降低其作用。 β -细辛醚与龙脑同为小分子脂溶性成分,同浓度的 β -细辛醚与冰片在配伍之后药物浓度比各自单用时扩大了一倍,同时作用于细胞时存在高浓度饱和现象, β -细辛醚与冰片可能是通过主动转运的方式通过细胞膜进入细胞发挥作用,我们推测两者配伍后存在竞争性抑制现象。在前期的 β -细辛醚配伍冰片体外透皮实验中,我们也观察到冰片对 β -细辛醚无促透皮效果^[21]。

石菖蒲、冰片均是芳香开窍药。但冰片芳香走窜,开窍回苏作用较强;石菖蒲则更适用于痰浊阻窍、神识不清、言语不利等症,其开窍回苏作用较弱。两药配伍具有开窍醒脑功效,可减轻脑损害。二者功效相近但又有不同,配伍治疗 AD 时应减少相应剂量才能发挥各自药效作用。有关其具体的作用机理及总 LC3 蛋白含量变化与 AD 的关系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 101-112.
- [2] Rami A. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2009, 35(5): 449-461.
- [3] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [4] Wang H, Ma J, Tan Y, et al. Amyloid-beta₁₋₄₂ induces reactive oxygen species-mediated autophagic cell death in U87 and SH-SY5Y cells[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 21(2): 597-610.
- [5] Sanz-Blasco S, Valero RA, Rodríguez-Crespo I, et al. Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2718.
- [6] Müller WE, Eckert A, Kurz C, et al. Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease—therapeutic aspects[J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 41(2-3): 159-171.
- [7] Mo Z, Fang Y, He Y, et al. Change of Beclin-1 dependent on ATP, [Ca²⁺] (i) and MMP in PC12 cells following oxygen-glucose deprivation-reoxygenation injury[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(11): 1043-1048.
- [8] 吴宏斌, 方永奇. β -细辛醚在大鼠体内的药代动力学[J]. *药学报*, 2004, 39(10): 836-838.
- [9] Liu L, Fang YQ. Analysis of the distribution of β -asarone in rat hippocampus, brainstem, cortex and cerebellum with GC-MS[J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5: 1728-1734.
- [10] Fang YQ, Shi C, Liu L, et al. Analysis of transformation and excretion of β -asarone in rabbits with GC-MS[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37(3): 187-190.
- [11] Fang YQ, Shi C, Liu L, et al. Pharmacokinetics of β -asarone in rabbit blood, hippocampus, cortex, brain stem, thalamus and cerebellum[J]. *Pharmazie*, 2012, 67(2): 120-123.
- [12] 方永奇, 方若鸣, 方更利, 等. β -细辛醚对慢性点燃癫痫大鼠脑组织 c-fos 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(5): 534-536.
- [13] 江湧, 方永奇, 邹衍衍. β -细辛醚对痴呆小鼠学习记忆能力及 SOD、GSH-Px 和 MDA 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(12): 1126-1127.
- [14] 陈奕芝, 方永奇, 梁毅, 等. β -细辛醚对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(6): 22-23.
- [15] 刘岩, 王建, 姚洪武, 等. 开窍药对缺血缺氧损伤 PC12 细胞的影响及其作用机制[J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(4): 35-38.
- [16] 李伟荣, 王宁生, 宓穗卿. 冰片对大鼠不同脑区 5-羟色胺合成及转运的影响[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(2): 270-271.
- [17] 蒋红兰, 匡忠生, 李翎, 等. 石菖蒲冰片对神经细胞缺血性损伤的保护作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2003, 20(1): 63-65.
- [18] 方永奇, 李翎, 吴启端, 等. β -细辛醚和冰片对大鼠缺血再灌注脑损伤的保护作用[J]. *中国中医药科技*, 2005, 11(6): 353-354.
- [19] 王淑英, 吴启端, 李翎, 等. 石菖蒲配伍冰片对缺血再灌注脑损伤大鼠内皮素的影响[J]. *时珍国医国药*, 2003, 14(4): 199-200.
- [20] 王淑英, 陈奕芝, 方若鸣, 等. 石菖蒲配伍冰片对高脂血症大鼠内皮素和降钙素基因相关肽的影响[J]. *实用中医药杂志*, 2003, 19(12): 619-620.
- [21] 方永奇, 陈振权, 吴启端. β -细辛醚体外皮肤渗透动力学研究[J]. *中草药*, 2004, 35(11): 1232-1235.

(编辑: 邓响潮)