

硒代蛋氨酸对A β ₁₋₄₂诱导N2a细胞损伤的保护作用

温 蕾¹ 陈 琛¹ 石庆学¹ 张中豪¹ 应 明¹ 宋国丽^{1*} 杨思林² 宋 云²

(¹深圳大学生命科学学院, 深圳 518060; ²华信生物药业股份有限公司, 界首 236500)

摘要 探索硒代蛋氨酸(Se-Met)的早期干预对A β ₁₋₄₂诱导的Neuro-2A(N2a)细胞损伤的保护作用。将N2a细胞分为对照组、A β ₁₋₄₂诱导损伤组、Se-Met组和Se-Met预处理的A β ₁₋₄₂组, CCK-8法检测显示不同浓度Se-Met对N2a细胞活力的影响不同, 且Se-Met能减弱A β ₁₋₄₂诱导N2a细胞活力的降低($P < 0.01$); DCFH-DA标记检测可见Se-Met预处理明显抑制A β ₁₋₄₂引起的N2a细胞内总活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增高, A β ₁₋₄₂作用24 h组效果更显著($P < 0.05$); Western blot检测发现, Se-Met可显著回升A β ₁₋₄₂引起的N2a细胞synaptophysin和PSD95水平的降低($P < 0.05$; $P < 0.05$); 同时, Se-Met可显著降低A β ₁₋₄₂引起的N2a细胞内LC3-II/LC3-I水平的升高($P < 0.05$)。因此, Se-Met在一定作用时间和浓度下可以提高N2a细胞的活力, 对A β ₁₋₄₂引起的N2a细胞ROS水平增高、自噬均有抑制作用, 同时缓解A β ₁₋₄₂引起的突触损伤; Se-Met对A β ₁₋₄₂诱导N2a细胞损伤具有较好的保护作用。

关键词 阿尔茨海默病; 硒代蛋氨酸; N2a; A β ₁₋₄₂; 突触相关蛋白; 自噬

Neuroprotective Effect of Selenomethionine Against Injury Induced by A β ₁₋₄₂ in N2a Cells

Wen Lei¹, Chen Chen¹, Shi Qingxue¹, Zhang Zhonghao¹, Ying Ming¹, Song Guoli^{1*}, Yang Silin², Song Yun²

(¹College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

²Huaxin Bio-pharmaceutical Co. Ltd., Jiesshou 236500, China)

Abstract To investigate the effect of Selenomethionine (Se-Met) on amyloid beta peptide (A β)₁₋₄₂-induced neurotoxicity in Neuro-2A (N2a) cells, N2a cells were divided into 4 subgroups: control, A β ₁₋₄₂ model, Se-Met-treated and Se-Met-preincubated A β ₁₋₄₂ model group. Cell viability was evaluated by CCK-8 kit and the result showed that different concentrations of Se-Met had different effect on N2a cell viability. A β ₁₋₄₂ treatment significantly decreased cell viability compared to the control group, while Se-Met preincubation attenuated A β ₁₋₄₂-induced cell viability loss ($P < 0.05$). Levels of ROS (reactive oxygen species) were measured by DCFH-DA probe kit. Pretreatment with Se-Met significantly decreased the level of ROS in A β ₁₋₄₂ treated cells ($P < 0.05$). Meanwhile, Se-Met pretreatment significantly restored the levels of synaptophysin and PSD95 and inhibited A β ₁₋₄₂-induced increase in the level of LC3-II/LC3-I ($P < 0.05$). These data suggested that Se-Met could increase N2a cell viability at a certain concentration and a period of time, inhibit the increase of ROS generation and autophagy, and ameliorate the synaptic loss induced by A β ₁₋₄₂. Thus, Se-Met plays an important role in neuroprotection of A β -induced neuronal toxicity.

Key words Alzheimer's disease; selenomethionine; N2a; A β ₁₋₄₂; synaptophysin; PSD 95; autophagy

收稿日期: 2013-07-24 接受日期: 2013-11-13

深圳市科技研发资金基础研究项目(批准号: JC201005280537A)和深圳市战略性新兴产业发展专项资金(批准号: JCYJ20120817163755064)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0755-26534152, E-mail: lilys@szu.edu.cn

Received: July 24, 2013 Accepted: November 13, 2013

This work was supported by the Grants of Shenzhen Municipal Science and Technology Industry and Information Technology Commission Research (Grant No. JC201005280537A, JCYJ20120817163755064)

*Corresponding author. Tel: +86-755-26534152, E-mail: lilys@szu.edu.cn

网络出版时间: 2014-01-15 14:00 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0225.html>

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)俗称老年痴呆,是一种多发于老年人的神经退行性疾病,其主要病理特征之一是脑内形成老年斑(senile plaque, SP)^[1]。 β 淀粉样多肽(amyloid β -protein, A β)是SP的核心成分,经 β 分泌酶途径异常降解形成,在脑内主要有A β_{1-42} 和A β_{1-40} 两种形式。寡聚A β 可以诱导细胞内总活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高,神经突触损伤,最终导致神经细胞凋亡,是造成认知障碍和学习记忆能力减退的主要途径之一^[2];近年的研究发现,A β 还可以诱导细胞内自噬水平升高,在AD患者或动物模型的脑切片中皆有大量自噬小泡积累^[3],氧化应激反应在此系列过程中也扮演了重要的角色^[4]。

硒是一种具有强抗氧化性的微量元素,在生物体内主要通过含硒酶或硒蛋白发挥作用。有文献报导,无机硒可减少脑内氧化应激损伤^[5],缓解转基因动物脑中tau蛋白磷酸化^[6]。本实验通过硒代蛋氨酸(Selenomethionine, Se-Met)预处理N2a细胞,从细胞活力、ROS水平、突触相关蛋白以及自噬水平等方面,观察Se-Met对A β_{1-42} 诱导的细胞损伤的保护能力,探索硒代蛋氨酸在AD治疗中的应用潜力。

1 材料与方 法

1.1 细胞系

小鼠脑神经瘤细胞系(N2a细胞系),购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.2 主要试剂

DMEM培养基、Opti-MEM培养基和胎牛血清购自Gibco公司;A β_{1-42} 购自苏州强耀公司;Se-Met购自Sigma公司;胰蛋白酶、Annexin V FITC/PI凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司;总蛋白裂解液试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒和细胞活性氧ROS检测试剂盒购自上海碧云天公司;LC3B一抗、 α -Tublin一抗购自Abcam公司;突触素蛋白(synaptophysin)、突触后致密区蛋白95(post-synaptic density 95, PSD95)购自上海基因有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG二抗购自欣博盛公司。

1.3 方 法

1.3.1 A β_{1-42} 和Se-Met的溶解 1 mg A β_{1-42} 在44 μ L DMSO中溶解后,用PBS稀释成2 mmol/L溶液短期储存于4 $^{\circ}$ C冰箱,使用时再用培养基稀释至10 μ mol/L。

Se-Met用超纯水溶解成1 mmol/L溶液,使用时稀释至1 μ mol/L。

1.3.2 细胞培养 N2a细胞采用含5%胎牛血清、1%双抗、49% DMEM、45% Opti-MEM的混合培养基培养,按实验需要分别以 5×10^3 /mL、 2×10^5 /mL、 5×10^5 /mL密度一一对应接种于96、12和6孔板,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖 (1)Se-Met对N2a细胞活力的影响。将N2a细胞以 5×10^3 /mL的密度接种于96孔板,加入Se-Met,使其终浓度分别为0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μ mol/L,每个浓度设3个以上复孔,培养12, 24, 48 h后,CCK-8试剂盒检测Se-Met对细胞增殖的影响,酶标仪于450 nm测定吸光度值(D)。(2)A β_{1-42} 对细胞活力影响及Se-Met预处理对其作用的影响。将N2a细胞以 5×10^3 /mL密度接种于96孔板,将细胞分为对照组、A β (10 μ mol/L)诱导损伤组及A β +Se-Met组。其中,A β +Se-Met组是指N2a细胞以1 μ mol/L Se-Met预处理24 h后,再加入10 μ mol/L A β_{1-42} 。每组设3个复孔,A β_{1-42} 作用6, 12, 24 h后,用CCK-8试剂盒检测细胞活力。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞ROS水平 用1.3.3中所述方法接种细胞和设置分组,增加DMSO组和阳性对照(Positive)组。DMSO组:培养液中加入与A β_{1-42} 组等量的DMSO。Positive组:在流式细胞仪检测细胞ROS水平时用试剂盒中阳性参照Rosup刺激细胞所得的阳性对照组。6, 24 h后采用ROS检测试剂盒来检测各组细胞内的ROS水平。

1.3.5 Western blot检测突触相关蛋白及自噬蛋白水平 将N2a细胞以 5×10^5 /mL密度种植于6孔板,将实验组分为Control组、DMSO组、A β (10 μ mol/L)诱导损伤组、Se-Met组和A β +Se-Met组。加入1/100体积的蛋白酶抑制剂和1/200体积的磷酸酶抑制剂提取各组细胞蛋白,BCA试剂盒蛋白定量后,每组取20 μ g蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白以100 mA恒流转印至PVDF膜上;5%脱脂奶室温封闭1 h,分别加入抗LC3B、synaptophysin、PSD95、 α -tublin的抗体,置4 $^{\circ}$ C孵育过夜,后加入1:5 000稀释的HRP标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗室温孵育1 h。化学发光法显影,Image Station 4000MM仪成像,Quantity One软件定量分析。

1.3.6 统计分析 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较用独立样本t检验,所有数据用GraphPad

Prism 5作图并分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

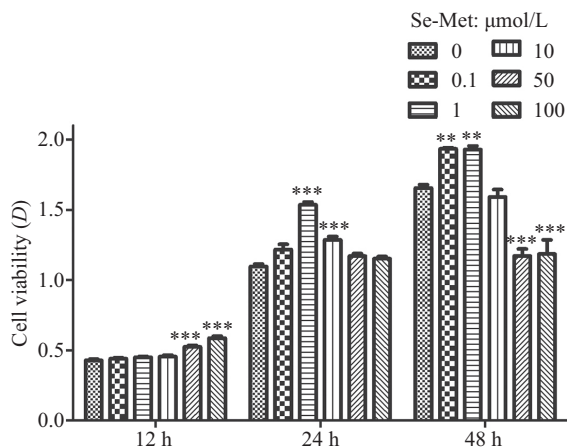
2.1 细胞增殖活力的变化

CCK-8检测发现, Se-Met对N2a细胞的活力影响存在与时间相关的剂量效应, 作用12 h时, 随着Se-Met浓度升高, 细胞活力逐渐增强, 高浓度组(50, 100 $\mu\text{mol/L}$)表现出显著效应($P < 0.001$); 作用24 h后, 低浓度(0.1~10 $\mu\text{mol/L}$) Se-Met表现为促进增殖作用, 其中1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 促增殖作用显著($P < 0.001$), 而高浓度组无明显变化; 作用时间延长至48 h时, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 的Se-Met对N2a细胞仍然表现出显著的促进增殖作用($P < 0.01$), 相反, 高浓度(50, 100 $\mu\text{mol/L}$)的Se-Met则显著抑制N2a细胞增殖($P < 0.001$), 即48 h时Se-Met对N2a细胞的增殖具有“低促高抑”作用(图1)。

根据上述实验的结果, 我们采用1 $\mu\text{mol/L}$ Se-Met预处理N2a细胞24 h后, 加入A β_{1-42} 作用6, 12, 24 h。检测发现, A β_{1-42} 作用6, 12, 24 h对N2a细胞增殖有明显抑制作用($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$); 而Se-Met预处理能一定程度减轻A β_{1-42} 对N2a增殖的抑制作用, 尤其对A β_{1-42} 作用24 h的细胞效应最为显著($P < 0.01$ vs A β 组)(图2)。

2.2 Se-Met预处理显著降低A β_{1-42} 引起的细胞ROS水平的增高

如图3所示, A β_{1-42} 处理6 h、24 h后N2a细胞ROS



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 对照组(Se-Met 0 $\mu\text{mol/L}$), $n = 3$ 。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (Se-Met 0 $\mu\text{mol/L}$), $n = 3$ 。

图1 不同浓度的Se-Met对N2a细胞活力的影响

Fig.1 The effects of different concentrations of Se-Met on N2a cell viability

水平均显著增高($P < 0.01$ vs DMSO组), 而经过Se-Met预处理后, A β +Se-Met组ROS均显著降低($P < 0.05$ vs A β 组)。

2.3 Se-Met预处理显著回升A β_{1-42} 引起的细胞synaptophysin水平降低

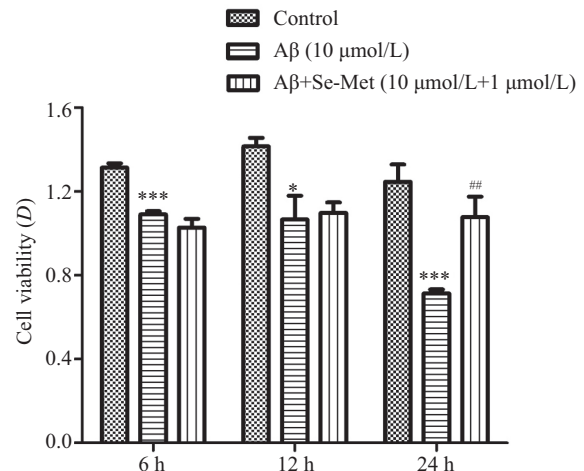
如图4所示, A β_{1-42} 作用于N2a细胞6 h后, synaptophysin蛋白水平略有下降, 而A β +Se-Met组蛋白水平较A β 组无明显变化。A β_{1-42} 作用N2a细胞24 h后, synaptophysin蛋白水平显著降低($P < 0.05$ vs DMSO组), 而A β +Se-Met组蛋白水平显著回升($P < 0.05$ vs A β 组)。

2.4 Se-Met预处理显著回升A β_{1-42} 引起的细胞PSD95水平降低

如图5所示, A β_{1-42} 作用N2a细胞6 h后, PSD95蛋白较对照组显著下降($P < 0.05$ vs DMSO), A β +Se-Met组蛋白水平显著高于A β 组($P < 0.01$ vs A β 组)。A β_{1-42} 作用N2a细胞24 h后, PSD95蛋白水平下降, 而A β +Se-Met组蛋白水平略高于A β 组。

2.5 Se-Met预处理显著降低A β_{1-42} 引起的细胞LC3-II/LC3-I增高

如图6所示, 在各组泳道中上下两条带分别为LC3-I和LC3-II, 分子大小分别为18 kDa和16 kDa; LC3-II/LC3-I的比值则反映出细胞的自噬水平, 比值越大, 自噬水平越高。A β_{1-42} 作用于N2a细胞6 h、24 h后, LC3-II/LC3-I较对照组均显著增高($P < 0.05$ vs DMSO); 而经Se-Met预处理后, A β +Se-Met组LC3-II/

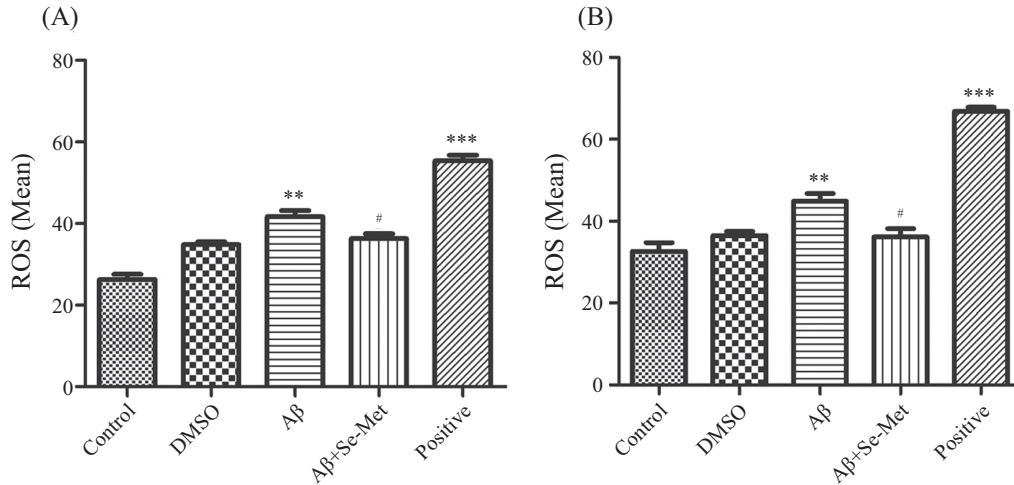


* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 对照组; # $P < 0.01$ vs A β 组; $n = 3$ 。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.01$ vs A β group; $n = 3$ 。

图2 Se-Met预处理对A β_{1-42} 损伤的N2a细胞增殖的影响

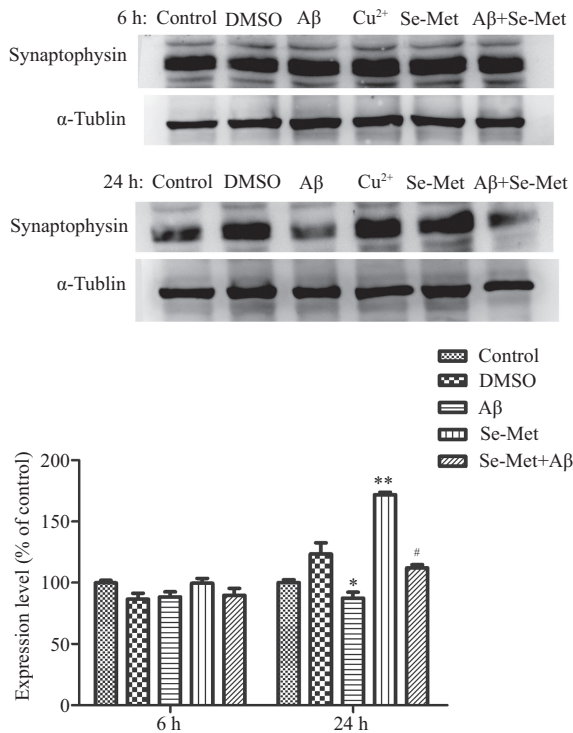
Fig.2 The effect of Se-Met pretreatment on A β_{1-42} -induced cell viability loss of N2a cells



A: Aβ₁₋₄₂处理细胞6 h; B: Aβ₁₋₄₂处理细胞24 h。 ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs实验对照组(DMSO); #*P*<0.05 vs Aβ组; *n*=3。
 A: treated with Aβ₁₋₄₂ for 6 h; B: treated with Aβ₁₋₄₂ for 24 h. ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs vehicle control (DMSO). #*P*<0.05 vs Aβ group; *n*=3.

图3 Se-Met、Aβ₁₋₄₂对N2a细胞ROS的影响

Fig.3 The effect of Se-Met pretreatment on Aβ₁₋₄₂-induced increase of ROS in N2a cells



P*<0.05, *P*<0.001 vs 实验对照组(DMSO); #*P*<0.05 vs Aβ组, *n*=3。
 P*<0.05, *P*<0.001 vs vehicle control (DMSO); #*P*<0.05 vs Aβ group, *n*=3.

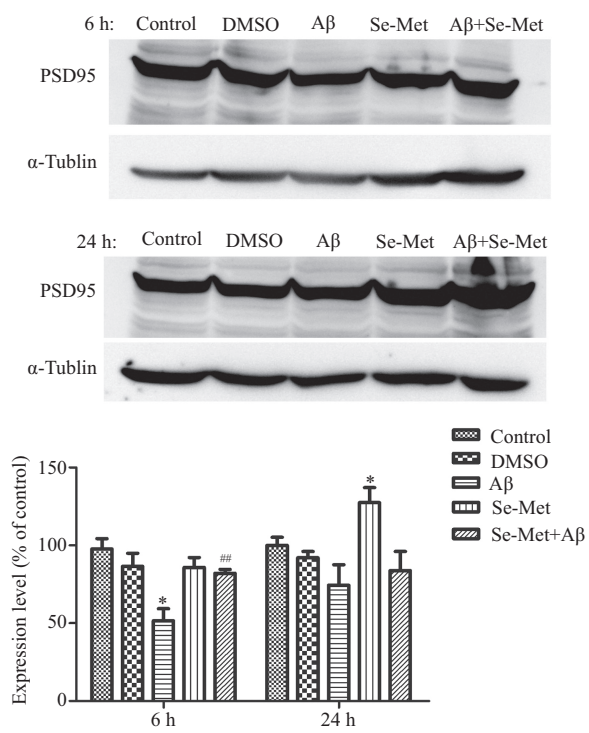
图4 Se-Met、Aβ₁₋₄₂对synaptophysin水平影响

Fig.4 Effects of Aβ₁₋₄₂ or Se-Met pretreatment on the expression level of synaptophysin in N2a cells

LC3-I较Aβ组均明显降低, 24 h时显著降低(*P*<0.05 vs Aβ组)。

3 讨论

目前, 在AD病理损害机制的研究中居于主流地

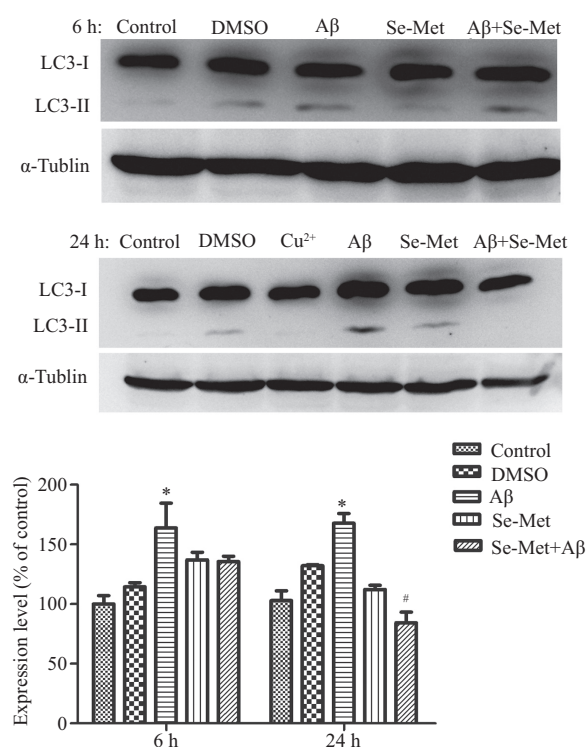


**P*<0.05 vs 实验对照组(DMSO); ##*P*<0.01 vs Aβ组; *n*=3。
 **P*<0.05 vs vehicle control (DMSO); ##*P*<0.01 vs Aβ group; *n*=3.

图5 Se-Met、Aβ₁₋₄₂对PSD95的水平影响

Fig.5 Effects of Aβ₁₋₄₂ or Se-Met pretreatment on the expression level of PSD95 in N2a cells

位的依然是Aβ假说。Aβ在脑内异常积聚引起神经突触受损^[7-8]、产生多余氧自由基和提高细胞内氧化应激水平、细胞线粒体损伤、最终导致神经元大量丢失^[9], 病人表现为学习记忆能力减退和进行性的认知功能障碍。在N2a细胞(Neuro-2A)中加入Aβ₁₋₄₂诱导损



* $P < 0.05$ vs 实验对照组(DMSO); # $P < 0.01$ vs A β 组; $n = 3$ 。

* $P < 0.05$ vs vehicle control (DMSO); # $P < 0.05$ vs A β group, $n = 3$ 。

图6 Se-Met、A β_{1-42} 对LC3-II/LC3-I的水平影响

Fig.6 Effects of A β_{1-42} or Se-Met pretreatment on the expression level of LC3-II/LC3-I in N2a cells

伤, 再结合Se-Met的药物预处理并检测相关指标, 是良好而稳定的病理损伤及早期干预的实验模型, 可以为探索AD病理损伤及治疗机制提供有效参考数据。

越来越多的证据表明, 氧化应激在神经退行性疾病如AD中具有重要影响^[10]。AD患者脑中ROS水平显著升高^[11], 炎症反应增强, 大量自由基和超氧化物累积造成细胞线粒体损伤, 细胞代谢出现障碍, 诱导神经突触相关蛋白水平降低, 最终神经细胞死亡。硒是人体必需的微量元素, Se-Met是生物通过饮食摄入硒的主要形式, 体内参与合成各种硒蛋白和含硒酶, 能提高神经细胞中氧化酶活性, 降低胞内活性氧水平, 增强细胞活力, 保护机体功能免受损伤^[12-13]。相较于无机硒而言, Se-Met生物利用率高、毒性小^[13-14]。有研究表明, Se-Met对原代大鼠海马神经元有抗氧化、清除自由基、提高存活率等的保护作用, 且可以提高谷胱甘肽过氧化物酶的活性水平^[15], 在AD及其他神经退行性疾病预防及治疗上有一定的潜力。

本实验采用不同浓度的Se-Met处理N2a细胞, 发现一定浓度的Se-Met (1 $\mu\text{mol/L}$)可以促进N2a细胞的增殖活力, 因此我们将该浓度作为后续实验Se-

Met的预处理使用剂量。检测A β_{1-42} 对细胞增殖的影响发现: A β_{1-42} 使细胞活力显著降低, 而Se-Met的预处理可以使细胞活力显著提高(图2); 同时A β_{1-42} 导致N2a细胞ROS水平显著增高, 而Se-Met预处理的实验组(A β +Se-Met)的ROS水平均显著降低(图3)。因此, Se-Met在一定程度上促进了细胞增殖, 增加了细胞代谢和活力; 同时显著降低了A β 诱导产生的ROS水平, 从而减少了N2a细胞损伤。

神经元突触损伤是AD一主要的早期病理学改变^[16]。有研究指出, AD早期记忆、认知等神经功能障碍与神经元突触的丢失、神经网络的破坏密切相关^[17-19]。具体地说, 突触的数量和功能发生改变可引起突触可塑性的改变, 进而影响学习记忆能力^[20]。而这些突触可塑性改变与突触相关蛋白有密切联系, synaptophysin是突触囊泡钙结合蛋白之一, 参与乙酰胆碱、谷氨酸等神经递质的释放过程。突触后致密区是突触后膜细胞骨架纤维特化区域, 该区域可调节细胞黏附性、控件受体聚集和调节受体功能, 是突触后信号转导和整合的结构基础^[21]。PSD95位于突触后致密区, 离突触后膜非常近, 参与胞内信号转导、突触连接等相互作用。本实验结果与众多文献中A β 对突触相关蛋白损伤的结果相吻合^[16,20,22], A β_{1-42} 可以引起神经细胞synaptophysin和PSD95蛋白水平明显降低, 而Se-Met预处理的实验组(A β +Se-Met)的synaptophysin和PSD95蛋白水平都较A β_{1-42} 组明显回升。说明Se-Met能有效提高这两种蛋白水平从而降低A β_{1-42} 对神经突触的损伤(图4和图5)。

自噬(autophagy)是细胞实现自身代谢需要和某些细胞器更新的有效反应, 它可以维持细胞内环境稳定。在正常情况下, 自噬促进细胞的生存; 营养不良、蛋白聚集等应激情况下, 自噬作用可重新分配胞内急需物或加速消除胞内过多积累的有害物质^[25], 比如A β , 但是过度的自噬可能诱导细胞进入第二种程序性死亡^[23-24]。A β_{1-42} 可诱导细胞内自噬体增加, 在AD小鼠脑切片中也观察到比野生型小鼠更多的自噬小泡^[3]。因此, 自噬泡在AD患者脑细胞内增加以清除细胞毒性物质, 但是大量自噬泡积累可能导致与溶酶体结合进程受阻, 无法消化内涵物即其降解通路出现障碍, 最终可能造成轴突和突触损伤, 加速细胞凋亡^[26]。本实验中A β_{1-42} 可以诱导N2a细胞内自噬水平(LC3-II/LC3-I)显著增高, 加入Se-Met早期干预后细胞自噬水平得到降低。这说明Se-Met可以减轻由A β_{1-42} 诱导产

生的自噬积累, 缓解细胞内自噬降解通路的压力。

综上所述, 本实验研究说明, 而Se-Met可以缓解A β ₁₋₄₂诱导的N2a细胞活力降低、胞内ROS水平升高、突触相关蛋白水平下降和自噬水平升高等细胞损伤, 这可能与Se-Met有抗氧化性有关, 说明其对A β ₁₋₄₂诱导神经细胞损伤有保护作用, 在AD病治疗中有一定的应用潜力, 然而此药物更详细的作用机制需进一步研究和探索。

参考文献 (References)

- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1(1): a006189.
- Ma T, Hoeffler CA, Capetillo-Zarate E, Yu F, Wong H, Lin MT, *et al.* Dysregulation of the mTOR pathway mediates impairment of synaptic plasticity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2010; 5(9): 12845.
- Son SM, Jung ES, Shin HJ, Byun J, Mook-Jung I. A β -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK β -AMPK signaling. *Neurobiol Aging* 2012; 33(5): 1006.e11-23.
- 尤寿江, 石际俊, 张艳林, 刘春风. ROS介导的自噬及其在相关疾病中的作用. *中国病理生理杂志*(You Shoujiang, Shi Jijun, Zhang Yanlin, Liu Chunfeng. ROS-mediated autophagy and its role in the pathogenesis. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2011; 27(1): 187-90, 195.
- Ishrat T, Parveen K, Khan MM, Khuwaja G, Khan MB, Yousuf S, *et al.* Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Brain Res* 2009; 1281: 117-27.
- van Eersel J, Ke YD, Liu X, Delerue F, Kril JJ, Götz J, *et al.* Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(31): 13888-93.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580): 353-6.
- Bate C, Williams A. Amyloid- β -induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *J Biol Chem* 2011; 286(44): 37955-63.
- Allen JW, Eldadah BA, Huang X, Knoblach SM, Faden AI. Multiple caspases are involved in β -amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 2001; 65(1): 45-53.
- Feng Y, Wang X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 472932.
- Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(11): 7124-8.
- 谢慧玲, 张 晨. 硒的生物学功能. *地方病通报*(Xie Huiling, Zhang Chen. The biological functions of selenium. *Endemic Diseases Bulletin*) 2002; 17(3): 75-6.
- Schrauzer GN. Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr* 2000; 130(7): 1653-6.
- Lovell MA, Xiong S, Lyubartseva G, Markesbery WR. Organoselenium (Sel-Plex diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(11): 1527-33.
- Xiong S, Markesbery WR, Shao C, Lovell MA. Seleno-L-methionine protects against β -amyloid and iron/hydrogen peroxide-mediated neuron death. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(4): 457-67.
- 曹 颖, 廖 媛, 肖 雁, 齐晓岚, 官志忠. β -淀粉样肽对人SH-SY5Y细胞突触素、发动蛋白I及衔接蛋白180表达的影响. *中华神经医学杂志*(Cao Ying, Liao Yuan, Xiao Yan, Qi Xiaolan, Guan Zhizhong. Influence of β -amyloid peptide on expressions of synaptophysin, dynamin I and adaptor protein 180 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Chinese Journal of Neuromedicine*) 2011; 10(8): 774-8.
- Pereira C, Ferreira E, Cardoso SM, de Oliveira CR. Cell degeneration induced by amyloid- β peptides. *J Mol Neurosci* 2004; 23(1/2): 97-104.
- Salawu FK, Umar JT, Olokoba AB. Alzheimer's disease: A review of recent developments. *Ann Afr Med* 2011; 10(2): 73-9.
- Yu W, Lu B. Synapses and dendritic spines as pathogenic targets in Alzheimer's disease. *Neural Plast* 2012; 2012: 247150.
- Tampellini D, Capetillo-Zarate E, Dumont M, Huang Z, Yu F, Lin MT, *et al.* Effects of synaptic modulation on β -amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurosci* 2010; 30(43): 14299-304.
- 冯 波, 胡 鹏, 王 蓉. 突触后致密区与突触可塑性. *首都医科大学学报*(Feng Bo, Hu Peng, Wang Rong. Postsynaptic dense area and synaptic plasticity. *Journal of Capital Medical University*) 2010; 31(1): 84-7.
- Nie J, Zhou M, Lü C, Hu X, Wan B, Yang B, *et al.* Effects of trip-tolide on the synaptophysin expression of hippocampal neurons in the AD cellular model. *Int Immunopharmacol* 2012; 13(2): 175-80.
- Nixon RA, Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 2011; 43(1): 38-45.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, *et al.* Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immunoelectron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(2): 113-22.
- Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(10): a008839.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, *et al.* Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* 2012; 123(1): 53-70.