

阿尔茨海默病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001762

柚皮素通过激活 mTOR/p70S6K 信号通路减轻胰岛素抵抗并改善 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤

成建璋, 茶 喆, 向 辉, 余华荣

(重庆医科大学基础医学院生理教研室、神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察柚皮素(naringenin, NAR)对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的影响,并探索其机制。**方法:**通过 CCK-8 检测细胞存活率,筛选出 H₂O₂ 的半数致死浓度,用该浓度 H₂O₂ 同时加入 20、40、80 μmol/L 柚皮素处理 SH-SY5Y 细胞 4 h,通过 CCK-8 检测细胞存活率,选择适宜柚皮素浓度。按所选 H₂O₂ 和柚皮素浓度进行后续实验。将实验分为 3 组。control 组:细胞不进行任何干预处理;H₂O₂ 组:只加入 600 μmol/L H₂O₂;H₂O₂+NAR 组:同时加入 600 μmol/L H₂O₂ 与 40 μmol/L 柚皮素。4 h 后,通过 ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率,DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS),Western blot 检测哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、核糖体蛋白 S6 激酶(p70 ribosomal S6 kinase, p70S6K),以及各自磷酸化形式蛋白[p-mTOR(Ser2448)、p-p70S6K(Thr389)],用胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate 1, IRS1)及其丝氨酸 636+639 位点磷酸化[p-IRS1(Ser636+Ser639)]蛋白的表达来观察胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)。**结果:**H₂O₂ 降低 SH-SY5Y 细胞的存活率,呈剂量依赖性,600 μmol/L 浓度为半数致死剂量。柚皮素明显降低了 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞死亡,最适剂量为 40 μmol/L。与 control 组比, H₂O₂ 明显增加了细胞凋亡率、胞内 ROS 的产生,降低了 p-mTOR(Ser2448)、p-p70S6K(Thr389)的表达,增加了 p-IRS1(Ser636+Ser639)蛋白的表达($P<0.05$);加入柚皮素后,相对于 H₂O₂ 组,上述作用明显减弱($P<0.05$)。**结论:**在体外氧化应激模型中,柚皮素能明显降低细胞内 ROS 的积累,提高细胞的存活率。其机制可能与激活 mTOR/p70S6K 信号通路、改善 IR 有关。

【关键词】柚皮素;氧化应激;胰岛素抵抗;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

【中图分类号】R741.02

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-14

Naringenin alleviated the SH-SY5Y cells death and insulin resistance by activating mTOR/p70S6K signalling pathway in oxidative stress induced by H₂O₂

Cheng Jianzhang, Cha Zhe, Xiang Hui, Yu Huarong

(Research Center of Neuroscience, Teaching and Research Section of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of naringenin on SH-SY5Y cells of neuroblastoma in oxidative stress induced by H₂O₂ and the possible mechanism. **Methods:** Firstly, a concentration of H₂O₂ that caused half cells death was chosen by CCK-8 assay. Three concentrations of naringenin (20, 40, 80 μmol/L) were added into H₂O₂-treated media, and cells survival rates were tested by CCK-8 assay after 4 hours. An optimal concentration of naringenin was chosen for the next experiment in naringenin group. Next, three groups were chosen for the next experiment (control group: cells without any treatment; H₂O₂ group: cells with 600 μmol/L H₂O₂; H₂O₂+NAR group: cells with 600 μmol/L H₂O₂ and 40 μmol/L NAR simultaneously). The apoptosis rate was measured by Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit, intercellular reactive oxygen species (ROS) was measured by fluorescent probe through flow cytometry, and mTOR/p70S6K signalling pathway-related protein [mTOR, p-mTOR (Ser2448), p70S6K, p-p70S6K (Thr389)] were tested by Western

blot. Finally, insulin resistance-related protein insulin receptor substrate 1 (IRS1) and phosphorylated IRS1 in serine 636 and serine 639 [p-IRS1 (Ser636+Ser639)] were detected by Western blot as well. **Results:** H₂O₂ significantly increased the SH-SY5Y cells death, apoptosis, intercellular ROS and p-IRS1 (Ser636+Ser639), and decreased the protein expression of p-mTOR (Ser2448) and p-p70S6K (Thr389) compared with control group

作者介绍:成建璋, Email: jianzhangcheng93@163.com,

研究方向:阿尔茨海默病的研究与治疗。

通信作者:余华荣, Email: huarongyu2003@163.com。

基金项目:重庆市科委前沿与应用基础研究资助项目(编号:cstc2014jcyjA10014)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180530.1701.016.html>
(2018-05-31)

($P < 0.05$). These effects were attenuated after NAR treatment, compared with H_2O_2 group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Naringenin reduced the ROS accumulation and the SH-SY5Y cells death. The activation of mTOR/p70S6K signalling pathway and decreasing of insulin resistance may be involved in naringenin-induced antioxidative effects.

[Key words] naringenin; oxidative stress; insulin resistance; mammalian target of rapamycin

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生在老年期的一种神经退行性疾病, 临床表现为认知功能逐渐退化, 已成为困扰老年人生活的首要难题^[1-2]。目前, AD 的发病机制众说纷纭, 其中 β 淀粉样蛋白 (amyloid beta, $A\beta$) 学说与氧化应激学说得到学者们的广泛认可^[3], $A\beta$ 沉积引起氧化应激^[3], 氧化应激进一步加重 $A\beta$ 的积累^[4]。因此氧化应激对于 AD 的发生发展起着至关重要的作用。近年来, 越来越多的研究表明 2 型糖尿病与 AD 关系密切^[5], 而将两者密切联系在一起的原因为胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[5-6], IR 可引起细胞对胰岛素的不敏感, 导致更多葡萄糖在体内积累, 引起氧化应激的发生^[7]。因此有效改善 IR 成为治疗 AD 的新思路。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种丝氨酸、苏氨酸激酶, 由其参与的信号通路近年来成为生命科学领域研究的热点。mTOR 信号通路在细胞生长、增殖、分化、蛋白质合成、细胞骨架形成以及突触可塑性方面发挥着重要作用^[8]。研究表明, mTOR 信号通路异常与神经系统退行性疾病尤其是 AD 有密切联系^[9-10]。

柚皮素是一种天然的黄酮类成分, 广泛存在于柑橘类水果中, 作为过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 激动剂^[11], 具有很强的抗氧化功能^[12]。本课题组前期研究表明, 柚皮素对 AD 模型鼠有改善其学习记忆的能力^[13-14], 但其机制仍不清楚。本实验选取 SH-SY5Y 细胞作为研究对象, 通过 H_2O_2 构建氧化应激体外模型, 观察柚皮素对细胞的保护作用, 并进一步探索其可能的机制, 以期对 AD 的防治提供新的依据和思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 由重庆医科大学贺桂琼教授课题组馈赠。

1.1.2 实验试剂 30% 的 H_2O_2 购自重庆川东化工有限公司,

柚皮素 (纯度大于 98%) 购自北京索莱宝科技有限公司, DMEM/F12 培养基购自美国 HyClone 公司, 0.25% 胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司, 胎牛血清购自阿根廷 NATOCOR 公司, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自上海毕傲图生物科技有限公司, ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物公司, 活性氧检测试剂盒、RIPA 裂解液、超敏 ECL 化学发光试剂盒均购自碧云天公司, mTOR、p-mTOR (Ser2448)、p70S6K、p-p70S6K (Thr389) 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 抗体购自 Abcam 公司, 胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate 1, IRS1) 抗体购自碧云天公司, p-IRS1 (Ser636 + Ser639) 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG 均购自博士德生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SH-SY5Y 细胞的培养 SH-SY5Y 细胞培养于含 10% 胎牛血清以及 100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素混合液的 DMEM/F12 培养基中, 在含 5% CO_2 的 37 °C 恒温孵箱中培养, 待其生长至对数生长期 (细胞密度约为 80%) 进行传代及后续处理。

1.2.2 CCK-8 测量细胞的存活率 将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞按 1×10^6 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L (10^5 个细胞), 待其生长 24 h 后, 按如下处理。control 组: 只加培养基, 不加任何药物; 各浓度 H_2O_2 组: 分别加入 50、100、200、400、600、800 μ mol/L 浓度的 H_2O_2 , 处理 4 h 后加入 CCK-8, 在 450 nm 处测量其吸光度。然后选出半数致死剂量浓度, 作为后续 H_2O_2 的浓度, 在培养基中同时加入 H_2O_2 和 20、40、80 μ mol/L 3 种浓度的柚皮素作用 4 h, 在 450 nm 处测量其吸光度, 根据细胞活性选择最适柚皮素浓度。

1.2.3 实验分组 根据 CCK-8 实验, 选择 H_2O_2 浓度为 600 μ mol/L, 柚皮素浓度为 40 μ mol/L。后续实验分为 3 组。control 组: 细胞不进行任何干预处理; H_2O_2 组: 只加 600 μ mol/L H_2O_2 ; H_2O_2 +NAR 组: 同时加入 600 μ mol/L H_2O_2 与 40 μ mol/L 柚皮素。以上各组均反应 4 h, 随后进行后续实验。

1.2.4 ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率 将对数生长期的细胞按 1×10^6 个/mL 的密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 每瓶 3 mL (3×10^6 个细胞), 24 h 后按上述方法分组处理, 随后用胰酶消化细胞, 收集细胞悬液, 加入 ANNEXIN V-FITC/PI 混合液, 室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测。

1.2.5 ROS 试剂盒测量细胞内活性氧 SH-SY5Y 细胞经过

H₂O₂ 及柚皮素处理后,用胰酶消化细胞,收集细胞悬液,加入 DCFH-DA 探针 37 ℃避光孵育 20 min,用流式细胞仪进行检测。

1.2.6 Western blot 检测相应蛋白表达 SH-SY5Y 细胞经过 H₂O₂ 及柚皮素处理后用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,将蛋白用 SDS-PAGE 电泳,完成后用湿法将蛋白转至聚偏氟乙稀(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,分别孵育相应的一抗(抗 mTOR:1:1 000,抗 p-mTOR(Ser2448):1:1 000,抗 p70S6K:1:1 000,抗 p-p70S6K(Thr389):1:1 000,抗 IRS1:1:500,抗 p-IRS1(Ser636 + Ser639):1:300,抗 β -actin:1:1 000)以及一抗来源相匹配的二抗(1:5 000),完成后加入 ECL 发光液显像。

1.3 统计学处理

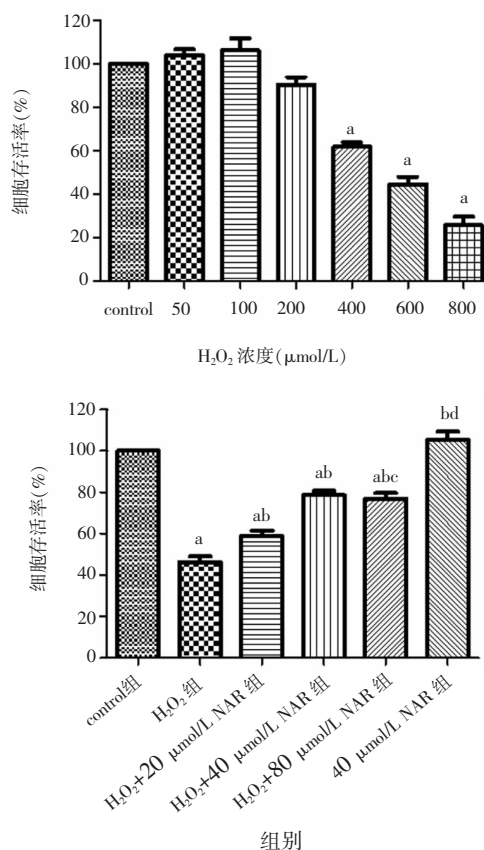
各组实验数据均采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,各组数据用算数均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,组间分析采用单因素方差分析,组间多重比较用图基检验(Tukey test),检验水准 $\alpha=0.05$ 。图片用 Graphpad Prism 5.3 软件绘制。

2 结果

2.1 柚皮素减轻 H₂O₂ 导致的细胞死亡

SH-SY5Y 细胞活性经 CCK-8 检测后,图 1 左图可见 H₂O₂ 诱导的细胞死亡呈剂量依赖性,随着 H₂O₂ 浓度增加,SH-SY5Y 细胞活性逐渐降低。与 control 组比($F=88.116$, $P=0.000$),50、100、200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 组细胞存活率依次为:(103.88 ± 6.09)%($P=0.983$),(106.16 ± 12.48)%($P=0.859$),(90.32 ± 7.84)%($P=0.438$),(61.71 ± 4.50)%($P=0.000$),(44.49 ± 7.45)%($P=0.000$),(25.57 ± 8.98)%($P=0.000$)。半数致死浓度约为 600 $\mu\text{mol/L}$,后续实验 H₂O₂ 组均采用该浓度。加入柚皮素后,细胞存活率的变化如图 1 右图所示,相较 control 组($F=71.132$),H₂O₂ 组细胞存活率为(46.20 ± 6.47)%($P=0.000$),H₂O₂+20 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组存活率为(58.85 ± 6.11)%($P=0.000$),H₂O₂+40 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组存活率为(78.64 ± 4.62)%($P=0.000$),H₂O₂+80 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组存活率为(76.88 ± 6.12)%($P=0.000$),40 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组存活率为(105.31 ± 9.05)%($P=0.734$)。40 $\mu\text{mol/L}$ 与 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度剂量柚皮素明显减

轻了 H₂O₂ 导致的细胞死亡,且彼此间无统计学意义($P=0.997$)。单独使用柚皮素对细胞活性无明显影响。因此,后续实验柚皮素治疗组选用 40 $\mu\text{mol/L}$ 。



a: 与 control 组比, $P=0.000$; b: 与 H₂O₂ 组比, $P<0.05$; c: 与 H₂O₂+40 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组比, $P=0.997$; d: 与 control 组比, $P=0.734$

图 1 不同浓度 H₂O₂ 及柚皮素对 SH-SY5Y 细胞活性的影响 ($n=5$)

2.2 柚皮素减轻 H₂O₂ 所致的细胞形态学改变

SH-SY5Y 细胞在经过上述处理后,在荧光倒置显微镜下观察细胞形态变化如图 2 所示。相较于 control 组,SH-SY5Y 细胞在加入 H₂O₂ 后细胞明显变小变圆,突起消失,成团漂浮在培养基中。加入柚皮素后,H₂O₂ 引起的细胞形态改变明显减轻,仍可见部分正常形态的细胞存在。

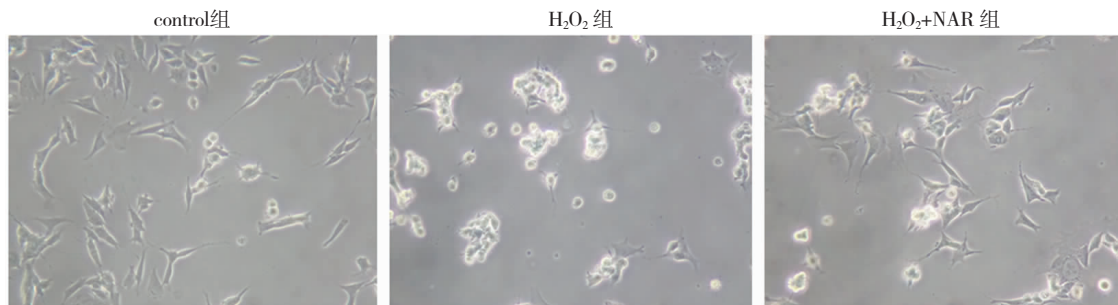


图 2 SH-SY5Y 细胞形态学 (100 $\times$)

2.3 柚皮素降低 H_2O_2 所致的细胞凋亡

SH-SY5Y 细胞在经过上述处理后,用流式细胞术检测细胞凋亡率(图 3)。右下象限(Q1-LR)与右上象限(Q1-UR)分别表示早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞,两者相加表示总凋亡细胞数。其中,control 组为 $(5.31 \pm 1.83)\%$; H_2O_2 组为 $(51.36 \pm 3.51)\%$; H_2O_2 +NAR 组为 $(22.67 \pm 1.42)\%$ 。用方差分析各组凋亡率,差异有统计学意义($F=274.769, P=0.000$),其中 H_2O_2 组凋亡率明显高于 control 组($P=0.000$); H_2O_2 +NAR 组凋亡率较 H_2O_2 组明显降低($P=0.000$)。

2.4 柚皮素降低 SH-SY5Y 细胞内活性氧含量

SH-SY5Y 细胞经过上述处理后,用流式细胞术分析细胞内的活性氧含量(图 4)。横坐标表示 DCFH 荧光强度(其

值越高表示细胞内活性氧含量越高),纵坐标表示细胞数量。相较于 control 组,加入 H_2O_2 后细胞内活性氧含量明显升高。相较于 H_2O_2 组,柚皮素可明显降低细胞内活性氧。

2.5 柚皮素增加 mTOR/p70S6K 信号通路的活性

SH-SY5Y 细胞按上述方法处理后,提取细胞总蛋白,用 Western blot 检测 mTOR、磷酸化 mTOR[p-mTOR(Ser2448)]、p70S6K、磷酸化 p70S6K[p-p70S6K(Thr389)]蛋白的表达(图 5)。p-mTOR(Ser2448)蛋白表达如下($F=23.580, P=0.000$): control 组 0.67 ± 0.04 , H_2O_2 组 0.27 ± 0.09 ($P=0.002$), H_2O_2 +NAR 组 0.63 ± 0.09 ($P=0.841$); p-p70S6K(Thr389)蛋白表达如下($F=8.229$): control 组 0.95 ± 0.16 , H_2O_2 组 0.44 ± 0.09 ($P=0.016$), H_2O_2 +NAR 组 0.76 ± 0.20 ($P=0.355$)。由图 5 可见, H_2O_2 降低了 mTOR、p70S6K 的磷酸化比值,柚皮素有效减轻了这种变化。

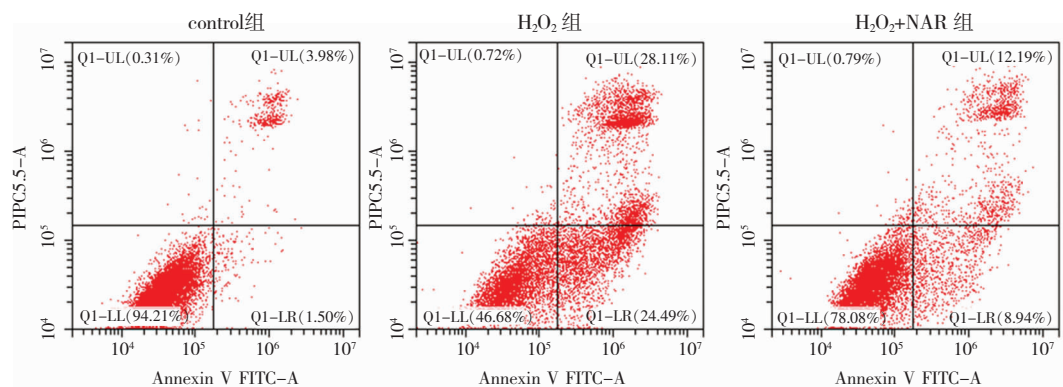


图 3 SH-SY5Y 细胞凋亡率

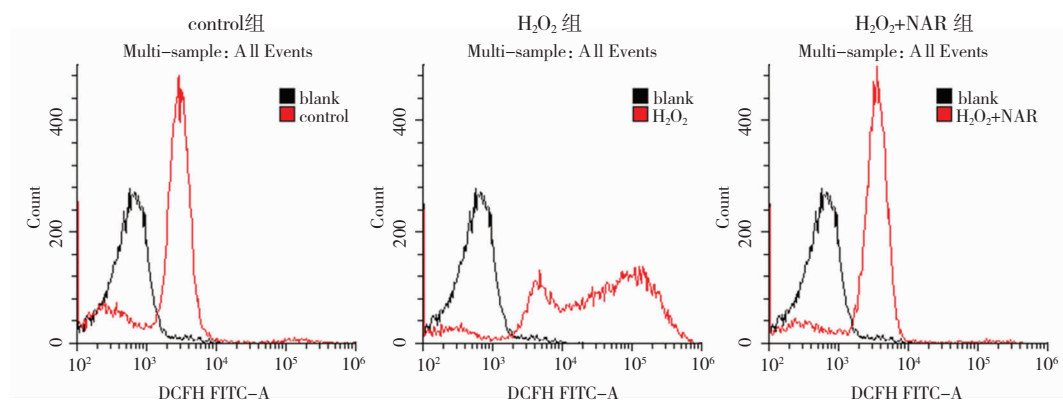
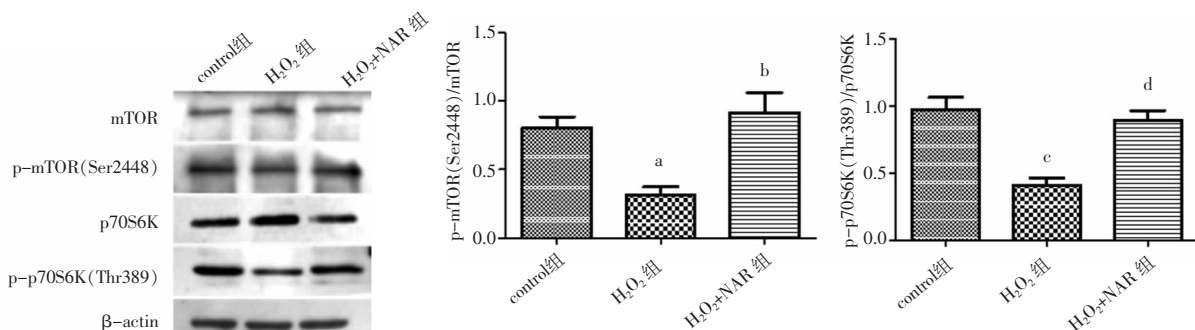


图 4 SH-SY5Y 细胞内活性氧含量

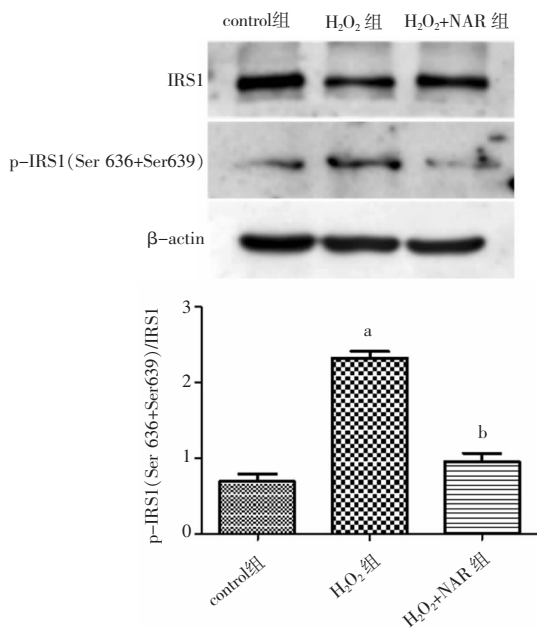


a: 与 control 组比, $P=0.031$ ($F=10.180$); b: 与 H_2O_2 组比, $P=0.013$; c: 与 control 组比, $P=0.003$ ($F=18.072$); d: 与 H_2O_2 组比, $P=0.007$

图 5 mTOR/p70S6K 信号通路相关蛋白表达($n=3$)

2.6 柚皮素减轻胰岛素抵抗

细胞按上述方式处理后,用 Western blot 法检测 IRS1、磷酸化 IRS1 [p-IRS1 (Ser636+Ser639)] (图 6A)。p-IRS1 (Ser636+Ser639) 蛋白表达如下 ($F=96.360$): control 组 0.48 ± 0.06 , H_2O_2 组 0.96 ± 0.06 ($P=0.002$), H_2O_2+NAR 组 0.48 ± 0.00 ($P=0.996$); 由图 6B 可见, H_2O_2 明显升高了 IRS1 磷酸化的比值, 柚皮素有效抑制了这种升高。



a: 与 control 组比, $P=0.000$ ($F=75.295$); b: 与 H_2O_2 组比, $P=0.000$

图 6 IRS1 及其 Ser636+Ser639 位点的磷酸化蛋白表达 ($n=3$)

3 讨论

目前, AD 的治疗方法种类繁多, 但 AD 仍未得到有效治疗。因此, 寻找有效可靠的治疗方法是科研工作者努力的方向。柚皮素作为一种天然黄酮类化合物, 广泛存在于柑橘类水果中, 由于其易通过血脑屏障^[13-15], 在抗氧化^[16-17]、抗炎^[18]、抗肿瘤^[19]方面都得到了有效的证实, 所以有望成为治疗 AD 的有效手段。氧化应激是指体内氧化系统与抗氧化系统的失衡, 氧化强于抗氧化, 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生与积累增多, 使线粒体损伤, 抗氧化酶产生减少, 进一步加重了氧化应激的进程, 进而造成细胞死亡, 因此测量细胞内 ROS 的含量, 能有效反映细胞的氧化应激水平。为了探索柚皮素在体外模型的抗氧化效应, 本实验用 H_2O_2 作用 SH-SY5Y 细胞作为氧化应激模型, 发现柚皮素能明显降低 H_2O_2 造成的细胞死亡, 能明显降低细胞

内的 ROS, 说明柚皮素在体外有很强的抗氧化应激效果。

研究表明, mTOR 信号通路因保护细胞免受氧化应激而减缓神经退行性变^[20-21]。在氧化应激过程中存在着 mTOR 信号通路被抑制的现象^[22]。mTOR 丝氨酸 2448 位点易被 PI3K/AKT 等激酶激活而发生磷酸化, 磷酸化后的 mTOR 具有生物活性, 进一步磷酸化下游位点 p70S6K, p70S6K 在苏氨酸 389 位点被磷酸化后而激活, 进一步影响后续的进程。本实验研究发现, H_2O_2 引起 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤, mTOR/p70S6K 磷酸化被抑制, 而柚皮素能够部分恢复 mTOR/p70S6K 的磷酸化程度, 从而逆转 mTOR/p70S6K 信号通路活性, 减轻氧化应激的损伤, 保护细胞。

IRS1 在调控细胞糖代谢中起重要作用。其酪氨酸残基磷酸化后, 增加细胞对胰岛素的敏感性和对葡萄糖的代谢能力。Coppa 和 White^[23]发现 IRS1 经酪氨酸残基被磷酸化后而激活, 可进一步激活 PI3K/AKT 信号通路。而 IRS1 的其他丝氨酸、苏氨酸位点亦可被磷酸化, 如丝氨酸 636、丝氨酸 639 位点的磷酸化, 则可以阻碍 IRS1 酪氨酸残基的磷酸化, 使 IRS1 变成失活形式, 降低细胞对胰岛素的敏感性, IR 形成, 进而降低细胞的葡萄糖代谢能力, 使细胞内葡萄糖大量聚集, 进一步加重氧化应激^[24-25]。大量研究表明, AD 与糖尿病密切相关, 2 型糖尿病患者患 AD 的风险成倍增加^[26-27], 因此 AD 又被称为 3 型糖尿病^[28]。由 IR 引起的糖尿病也成为困扰 AD 治疗的首要难题。本研究表明, 在体外氧化应激模型下, 丝氨酸 636/639 位点磷酸化的 IRS1 表达明显升高, 表明 IR 在体外氧化应激模型中已经形成, 而柚皮素能明显降低丝氨酸 636/639 位点磷酸化的 IRS1, 意味着柚皮素在降低 IR 方面有着显著的疗效。

综上所述, 在 H_2O_2 引起 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤中, 柚皮素能够通过激活 mTOR/p70S6K 信号通路, 改善了 IR, 进而降低了细胞内 ROS 的产生, 减轻了 ROS 积累对细胞的损伤, 降低了细胞的凋亡, 提升了细胞的存活率。柚皮素通过其强大的抗氧化功能有望成为治疗 AD 的药物。

参 考 文 献

- [1] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease[J].

- Lancet, 2006, 368(9533): 387–403.
- [2] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2011, 377(9770): 1019–1031.
- [3] Fu QQ, Wei L, Sierra J, et al. Olfactory ensheathing cell-conditioned medium reverts A β 25–35-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells by modulating the mitochondria-mediated apoptotic pathway[J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(6): 1043–1054.
- [4] Jayaraman A, Pike CJ. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: multiple mechanisms contribute to interactions[J]. Curr Diab Rep, 2014, 14(4): 476.
- [5] Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers[J]. J Clin Invest. 2012, 122(4): 1339–1353.
- [6] Talbot K, Wang HY, Kazi H, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline[J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1316–1338.
- [7] Doronzo G, Viretto M, Russo I, et al. Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signalling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells; influence of insulin resistance and oxidative stress[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(1): 44–53.
- [8] Zuo M, Rashid A, Churi C, et al. Novel therapeutic strategy targeting the Hedgehog signalling and mTOR pathways in biliary tract cancer[J]. Br J Cancer, 2015, 112(6): 1042–1051.
- [9] Singh AK, Kashyap MP, Tripathi VK, et al. Neuroprotection through rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against amyloid-beta-induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 5815–5828.
- [10] Di Domenico F, Tramutola A, Foppoli C, et al. mTOR in Down syndrome: role in A β and tau neuropathology and transition to Alzheimer disease-like dementia[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 114: 94–101.
- [11] Assini JM, Mulvihill EE, Burke AC, et al. Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21[J]. Endocrinology, 2015, 156(6): 2087–2102.
- [12] Wang K, Chen Z, Huang J, et al. Naringenin prevents ischaemic stroke damage via anti-apoptotic and anti-oxidant effects[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017, 44(8): 862–871.
- [13] Yang W, Ma J, Liu Z, et al. Effect of naringenin on brain insulin signaling and cognitive functions in ICV-STZ induced dementia model of rats[J]. Neurol Sci, 2014, 35(5): 741–751.
- [14] 马晶, 杨文青, 查何, 等. 柚皮素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中药材, 2013, 36(2): 271–276.
- [15] Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, et al. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease[J]. Free Radic Res, 2005, 39(10): 1119–1125.
- [16] Khan MB, Khan MM, Khan A, et al. Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular-streptozotocin in rat model[J]. Neurochem Int, 2012, 61(7): 1081–1093.
- [17] Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, et al. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease[J]. Free Radic Res, 2005, 39(10): 1119–1125.
- [18] Abaza MS, Orabi KY, Al-Quattan E, et al. Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from Thymus vulgaris, on human breast and colorectal cancer[J]. Cancer Cell Int, 2015, 15: 46.
- [19] Liao AC, Kuo CC, Huang YC, et al. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP2[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3): 1531–1536.
- [20] Chong ZZ, Shang YC, Zhang L, et al. Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(6): 374–391.
- [21] Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, et al. mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system[J]. Trends Mol Med, 2013, 19(1): 51–60.
- [22] Taga M, Mouton-Liger F, Paquet C, et al. Modulation of oxidative stress and tau phosphorylation by the mTOR activator phosphatidic acid in SH-SY5Y cells[J]. FEBS Lett, 2011, 585(12): 1801–1806.
- [23] Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2[J]. Diabetologia, 2012, 55(10): 2565–2582.
- [24] Singh I, Carey AL, Watson N, et al. Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment[J]. Eur J Nutr, 2008, 47(7): 387–392.
- [25] Doronzo G, Viretto M, Russo I, et al. Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signalling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells; influence of insulin resistance and oxidative stress[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(1): 44–53.
- [26] Jayaraman A, Pike CJ. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: multiple mechanisms contribute to interactions[J]. Curr Diab Rep, 2014, 14(4): 476.
- [27] Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies[J]. Prog Neurobiol, 2013, 108: 21–43.
- [28] Steen E, Terry BM, Rivera EJ, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes?[J]. J Alzheimers Dis, 2005, 7(1): 63–80.

(责任编辑:张辉洁)