

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.006

NOX2 在黄连素减轻 A β 所致神经元氧化应激损伤中的作用 *

鲍和¹ 王晨^{2 Δ} 张源源³ 杨珊¹ 郭琪⁴ 王志刚⁵

(1 西安交通大学第二附属医院药学部 陕西 西安 710004; 2 空军军医大学第二附属医院药剂科 陕西 西安 710038;

3 南部战区总医院干部病房一科 广东 广州 510010; 4 西安交通大学附属广仁医院药剂科 陕西 西安 710004;

5 西安交通大学第一附属医院肾内科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨还原型辅酶氧化酶 II (NADPH oxidase II, NOX2) 是否参与了黄连素(Berberine, BBR)对 β 淀粉样蛋白(β Amyloid, A β) 诱导的神经元损伤的保护作用。**方法:**将 HT22 神经元细胞分为 5 组, 分别为正常培养的 Control 组、10 μ M 的 A β 损伤组 (A β)、1 μ M 的 BBR 保护组 (BBR+A β)、NOX2-siRNA 干扰组 (NOX2-siRNA+BBR+A β) 和乱序 siRNA 处理组 (SC-siRNA+BBR+A β), 孵育 24 h 后, 采用噻唑蓝法(Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium, MTT)检测细胞活力, 试剂盒检测培养基内乳酸脱氢酶(Lactic Dehydrogenase, LDH)水平, Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-3 和 NOX2 蛋白表达、试剂盒检测细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)和戊二醛(Malondialdehyde, MDA)水平。**结果:**与 Control 组相比, 10 μ M 的 A β 可显著下调 HT22 细胞活力, 增加 LDH 释放和细胞内 ROS 及 MDA 水平, 上调 Cleaved caspase-3 和 NOX2 蛋白表达 ($P < 0.05$); 1 μ M 的 BBR 可显著抑制 A β 对神经元细胞产生的上述氧化损伤作用 ($P < 0.05$), 而 NOX2-siRNA 显著逆转了 BBR 对 A β 诱导的 HT22 神经元细胞的保护作用 ($P < 0.05$), 而 SC-siRNA 未对 BBR 的上述细胞保护作用产生显著影响 ($P > 0.05$)。**结论:**NOX2 蛋白介导了 BBR 对暴露于 A β 中的神经元细胞的保护作用。

关键词:黄连素; 阿尔兹海默症; β 淀粉样蛋白; 还原型辅酶氧化酶 II; 神经保护

中图分类号:R-33; R338.1; R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2632-06

NOX2 Mediates Berberine-induced Neuroprotection on HT22 Neuronal Cells Exposed to β Amyloid*

BAO He¹, WANG Chen^{2 Δ} , ZHANG Yuan-yuan³, YANG Shan¹, GUO Qi⁴, WANG Zhi-gang⁵

(1 Department of Pharmacology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of Pharmacology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

3 Department of 1st Geriatrics, Southern Theatre Command, Guangzhou, Guangdong, 510010, China;

4 Department of Pharmacology, Guangren Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

5 Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To determine whether NADPH oxidase II (NOX2) is associated in berberine (BBR)-induced protection on HT22 neuronal cells exposed to β amyloid (A β). **Methods:** HT22 neuronal cells were divided into five groups, including the normal cultured Control group, 10 μ M A β exposure group (A β), 1 μ M BBR plus 10 μ M A β treatment group (BBR+A β), NOX2-siRNA treatment group (NOX2-siRNA+BBR+A β) and scrambled (SC)-siRNA group (SC-siRNA+BBR+A β), after an incubation for 24 h, methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium (MTT) was used to assess cell viability, lactic dehydrogenase (LDH) reagent kit was used to evaluate the LDH release in the medium, Western blot was taken to evaluate the apoptosis-associated protein Cleaved caspase-3 and NOX2 expressions, reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) reagent kits were used to assess the intracellular ROS and MDA levels respectively. **Results:** Compared with the control group, 10 μ M A β reduced the viability of HT22 cells, increased LDH activity, intracellular ROS and MDA levels, upregulated cleaved caspase-3 and NOX2 expressions ($P < 0.05$), and 1 μ M BBR treatment significantly inhibited the A β -induced injury and oxidative effects mentioned above ($P < 0.05$). However, NOX2-siRNA treatment obviously abrogated BBR-induced neuroprotection and anti-oxidative effects ($P < 0.05$), and SC-siRNA showed no significant effect on BBR-mediated neuroprotective effects ($P > 0.05$). **Conclusion:** NOX2 may mediate BBR-induced neuroprotective effects on the HT22 neuronal cells exposed to A β .

Key words: Berberine; Alzheimer's disease; β Amyloid; NOX2; Neuroprotection

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338.1; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2632-06

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81700644)

作者简介: 鲍和(1985-), 男, 硕士, 主管药师, 主要研究方向: 神经保护药物, E-mail: baohexjtu@163.com

Δ 通讯作者: 王晨, 女, 主管药师, 主要研究方向: 神经损伤机制, E-mail: fox911@163.com, 电话: 13991291955

(收稿日期: 2018-12-28 接受日期: 2019-01-23)

引言

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是老年痴呆最为常见的一种类型,我国罹患老年痴呆的患者数量在2010年就已达世界首位^[1]。因此,AD对我国的危害超过世界上其他任何一个国家。脑内的 β 淀粉样蛋白(β Amyloid, $A\beta$)的大量沉积可能通过促进神经细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的生成^[2-6],继而引起细胞发生损伤和凋亡^[7]。因此,抑制 $A\beta$ 引起神经细胞氧化应激损伤被认为是防治AD的有效手段之一。

黄连素(Berberine, BBR)常被用于治疗细菌性胃肠炎症^[8]。研究表明BBR可减轻 $A\beta$ 产生的神经毒性,但其机制尚不明确^[9-12]。还原型辅酶氧化酶II(NADPH oxidase II, NOX2)可通过产生过量ROS损伤神经细胞,被认为在神经元氧化损伤中起重要作用^[13-15]。在本研究中,我们使用 $A\beta$ 诱导HT22神经细胞模拟神经元氧化损伤,观察BBR对其保护作用,并探讨了NOX2分子是否介导了BBR对 $A\beta$ 诱导的神经元细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HT22小鼠海马神经细胞系获赠于徐州医科大学附属医院,黄连素(BBR)、 β 淀粉样蛋白1-42肽段($A\beta$)、DMEM培养基、胎牛血清(Fatal Bovine Serum, FBS)和噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium, MTT)购自美国Sigma-Aldrich公司,兔抗小鼠NOX2的gp91和 β -actin一抗购自英国Abcam公司,活性氧(ROS)检测试剂盒购自中国碧云天(Beyotime)公司,LDH和MDA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,青链霉素混合溶液购自中国索莱宝公司。

1.2 细胞培养

细胞培养于DMEM培养基,培养基含10%的FBS、10 U/mL的青霉素和10 μ g/mL的链霉素,细胞培养箱环境为37 $^{\circ}$ C,箱内气体含95%的 O_2 和5%的 CO_2 ,细胞培养基每2-3天更换一次,细胞每周传代2次。

1.3 细胞分组及处理

为寻找适宜BBR浓度,将细胞分为5组,分别为正常培养的Control组、10 μ M的 $A\beta$ 暴露组和不同浓度(0.1 μ M、1 μ M和5 μ M)的BBR与10 μ M的 $A\beta$ 结合的3个保护组,37 $^{\circ}$ C孵育24 h后,进行检测。

随后,为验证NOX2在BBR保护机制中的作用,将细胞分为5组,分别为正常培养的Control组、10 μ M的 $A\beta$ 暴露组、BBR处理组(培养基含1 μ M的BBR与10 μ M的 $A\beta$)、NOX2-siRNA干扰组(细胞经NOX2-siRNA处理后,使用含1 μ M的BBR与10 μ M的 $A\beta$ 的培养基处理)和乱序siRNA处理组(细胞经乱序siRNA处理后,使用含1 μ M的BBR与10 μ M的 $A\beta$ 的培养基处理),在37 $^{\circ}$ C孵育24 h后,进行检测。

1.4 MTT 检测

将细胞接种于96孔板,密度为 1×10^5 个/孔,各组细胞处理完毕后,每孔加入浓度为5 μ g/mL的MTT溶液20 μ L,在37 $^{\circ}$ C孵育6 h后,吸取上层培养基后,每孔加入二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)150 μ L,震荡混匀后,使用分光光

度计(TECAN,瑞士)在490 nm波长检测各孔吸光度,采用去离子水调零。

1.5 LDH 释放量和胞内MDA检测

将细胞接种于24孔细胞培养板,密度为 5×10^5 个/孔,各组细胞处理完毕后,分别收集细胞上层培养基和下层细胞,根据试剂盒说明书要求,分别检测培养基LDH活力和胞内MDA水平。

1.6 细胞内ROS含量检测

将细胞接种于24孔细胞培养板,密度为 2×10^5 个/孔,各组细胞处理完毕后,细胞在含10 μ M的2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)的无血清培养基中常温孵育10 min后,使用磷酸盐缓冲液(PBS)避光清洗3次后,再使用荧光显微镜(Leica DMI6000B,德国)拍照,并计算各组荧光强度。

1.7 Western blot 分析

将细胞接种于6孔细胞培养板,密度为 5×10^6 个/孔,各组细胞处理完毕后,吸取上层培养基后,每孔加入500 μ L细胞裂解液,在冰上裂解5 min后,使用细胞刮轻轻刮下各孔细胞,将细胞收集于离心管内,在4 $^{\circ}$ C离心10 min后,收集管内的细胞蛋白上清液,弃去下层细胞碎片,采用Bradford法对各组细胞进行蛋白定量。随后,使用聚丙烯酰胺凝胶对蛋白液电泳后,将其转移至聚偏氟乙烯膜上,使用浓度为5%的脱脂奶粉封闭非特异性抗原,在4 $^{\circ}$ C过夜孵育。随后,加入兔抗小鼠一抗(NOX2和 β -actin,1:500稀释),随后,在37 $^{\circ}$ C孵育6 h,再加入二抗(山羊抗兔,1:500稀释,世纪康为),在4 $^{\circ}$ C孵育12 h后,采用化学发光法显色,使用Bio-Rad凝胶成像系统(美国)分别量化各条带灰度值,采用 β 肌动蛋白(β -actin)作为各组内参。

1.8 siRNA 干扰

将HT22细胞接种于6孔细胞培养板,密度为 10^6 个/孔,24 h后,待细胞完全贴壁,每孔分别加入1 μ g的NOX2-siRNA(5'AGAGUUUGGAAGAGCAUAAUUUAGA3')或SC-siRNA(TriFECTa Dicer-Substrate),在37 $^{\circ}$ C孵育24 h后,采用Western blot检测NOX2的gp91蛋白表达,评价干扰效果, β -actin作为内参。

1.9 统计学分析

采用SPSS20.0(SPSS,美国)进行数据分析,所有数据采用均数标准差(Means SD)表示,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)中的Tukey多重比较(Tukey's Multiple Comparison)进行分析, $P < 0.05$ 被认为具有显著统计学差异。

2 结果

2.1 黄连素可提高 $A\beta$ 诱导的HT22神经元的活力并减少LDH释放

为观察黄连素(BBR)对暴露于 $A\beta$ 的神经元的保护作用,我们将细胞分为5组,分别为正常培养的Control组、10 μ M的 $A\beta$ 损伤组和不同浓度BBR(0.1 μ M、1 μ M和5 μ M)与10 μ M的 $A\beta$ 联合处理的3个保护组,培养24 h后,采用MTT法检测细胞活力,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测培养基内LDH水平(图1)。结果显示:与Control组相比, $A\beta$ 可显著降低HT22神经元的活力,并增加培养基内LDH水平($P < 0.05$),而1 μ M

和 5 μM 的 BBR 可显著恢复 HT22 神经元细胞活力, 并降低 LDH 释放量 ($P<0.05$), 0.1 μM 的 BBR 未对 $\text{A}\beta$ 产生的细胞活

力下降造成明显影响($P>0.05$)。因此, 本实验采用 1 μM 的 BBR 进行后续研究。

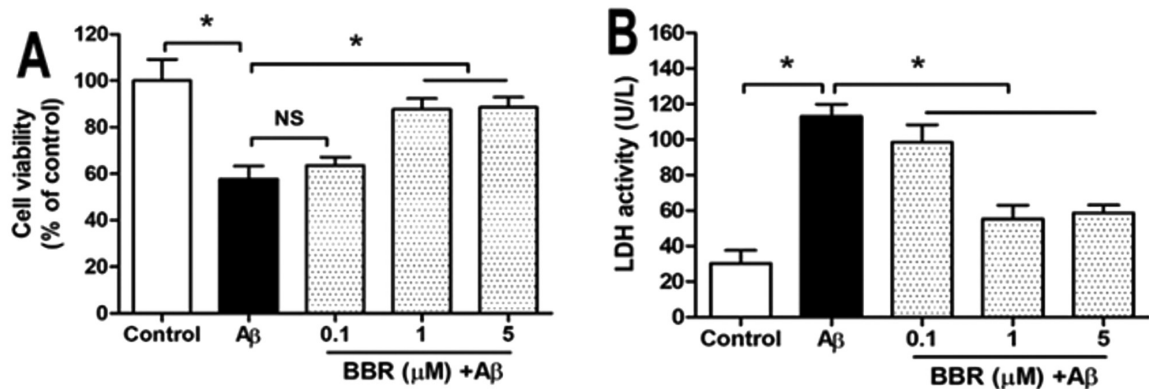


图 1 BBR 对 $\text{A}\beta$ 诱导的 HT22 神经元细胞活力和 LDH 释放的影响

Fig.1 Effects of berberine on the cell viability and LDH release in $\text{A}\beta$ -treated HT22 neuronal cells

Note: A: Effect of berberine on cell viability, $n=8$; B: Effect of berberine on LDH release, $n=8$; Data are expressed as means $\pm$ SD. * $P<0.05$.

2.2 黄连素可降低 $\text{A}\beta$ 诱导的神经元 HT22 神经元细胞 ROS 水平、NOX2 表达和 MDA 含量

为探讨 BBR 的保护作用机制, 我们进一步采用荧光显微镜观察并测量细胞内 ROS 水平、Western blot 检测细胞 NOX2 蛋白表达水平和试剂盒检测细胞内脂质氧化代谢产物戊二醛 (MDA) 含量。结果显示: 与 Control 组相比, $\text{A}\beta$ 可显著增加

HT22 神经元内 ROS 水平(绿色), 上调 NOX2 的 gp91 序列蛋白表达及细胞内 MDA 含量 ($P<0.05$), 而 1 μM 和 5 μM 的 BBR 可显著降低细胞内 ROS 含量, 并下调细胞 NOX2 的 gp91 蛋白序列表达和胞内 MDA 水平, 以上结果表明 BBR 可显著降低 $\text{A}\beta$ 所致神经元细胞的氧化应激损伤。

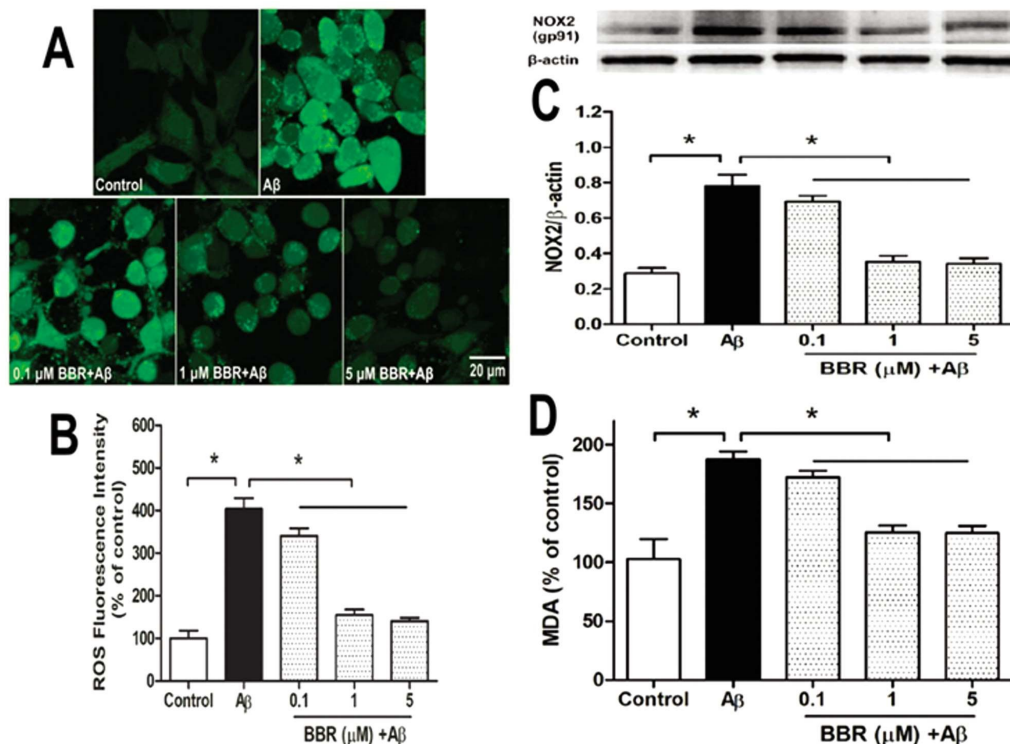


图 2 BBR 对 $\text{A}\beta$ 诱导的 HT22 神经元内 ROS 水平、NOX2 表达和 MDA 含量的影响

Fig.2 Effect of berberine on the ROS, NOX2 expression and MDA level in $\text{A}\beta$ -treated neuronal cells

Note: A: Fluorescence staining results of neuronal cells; B: Berberine reduced intracellular ROS in $\text{A}\beta$ -treated neuronal cells, $n=6$; C: Berberine reduced NOX2 gp91 protein expression in $\text{A}\beta$ -treated neuronal cells, $n=4$; D: Berberine reduced MDA level in $\text{A}\beta$ -treated neuronal cells, $n=8$;

Data are expressed as means $\pm$ SD. * $P<0.05$.

2.3 NOX2-siRNA 显著逆转了 BBR 对 $\text{A}\beta$ 诱导的 HT22 神经元的保护作用

为明确 NOX2 是否介导了 BBR 的神经保护作用, 我们采

用 NOX2-siRNA 干扰 HT22 神经元细胞 NOX2 蛋白表达 (图 3A), Western blot 结果显示 NOX2-siRNA 可显著降低 NOX2 蛋白表达($P<0.05$), 而乱序 siRNA(SC-siRNA)未对细胞 NOX2

蛋白表达产生影响($P>0.05$),表明本实验使用的 NOX2-siRNA 的干扰作用有效。随后,将细胞分为 5 组,分别为正常培养的 Control 组、10 μM 的 $\text{A}\beta$ 损伤组、BBR+ $\text{A}\beta$ 组、NOX2-siRNA+BBR+ $\text{A}\beta$ 组和 SC-siRNA+BBR+ $\text{A}\beta$ 组。与 Control 组相比,10 μM 的 $\text{A}\beta$ 可显著降低细胞活力、增加 LDH 释放和

Cleaved caspase-3 表达 ($P<0.05$),1 μM 的 BBR 可显著恢复细胞活力、降低 LDH 释放和 Cleaved caspase-3 表达($P<0.05$),而 NOX2-siRNA 可显著逆转 BBR 产生的上述保护作用($P<0.05$),SC-siRNA 未对 BBR 的细胞保护作用产生明显影响($P>0.05$)。以上结果表明 NOX2 可能介导了 BBR 的神经保护作用。

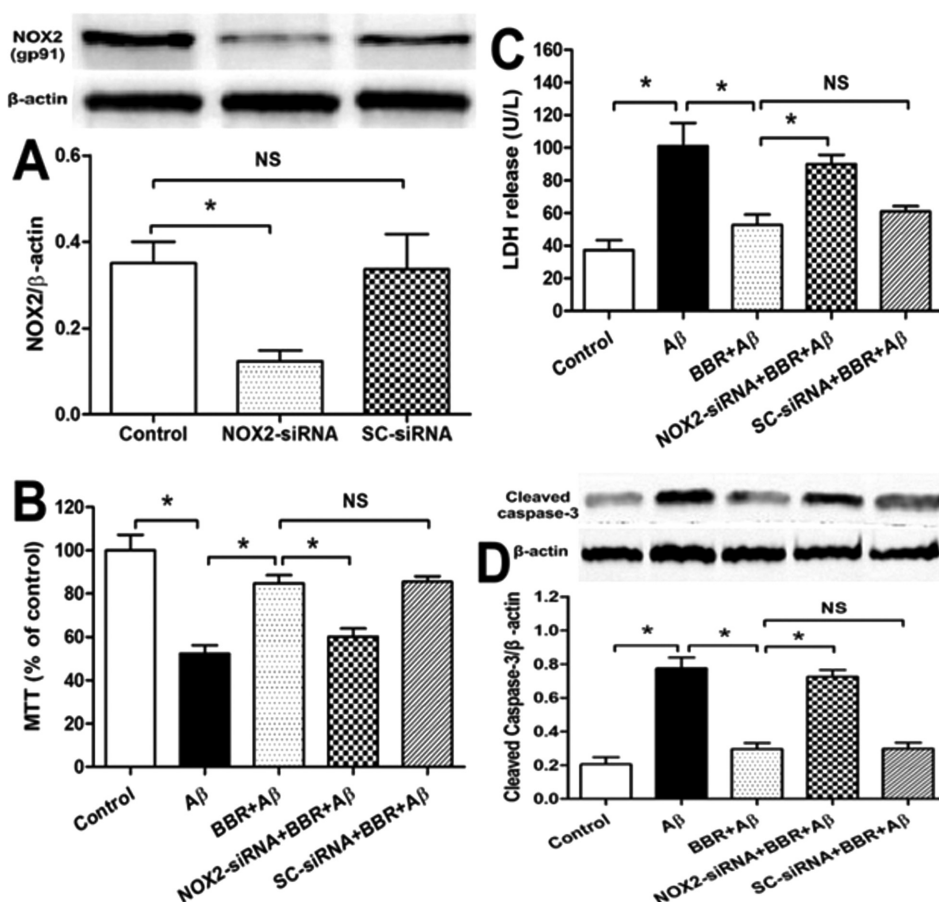


图3 NOX2-siRNA 逆转了 BBR 对 $\text{A}\beta$ 引起神经元损伤的保护作用

Fig.3 NOX2-siRNA reversed berberine-induced protective effects on neurons exposed to $\text{A}\beta$

Note: A: NOX2-siRNA reduced NOX2 expression, $n=4$; B: NOX2-siRNA reversed berberine-induced protective effect on cell viability, $n=8$;

C: NOX2-siRNA reversed berberine-induced effect on LDH release, $n=8$; D: NOX2-siRNA reversed berberine-induced effect on cleaved caspase-3 expression, $n=4$; Data are expressed as means $\pm$ SD. * $P<0.05$; NS no significance.

2.4 NOX2-siRNA 显著逆转 BBR 对 $\text{A}\beta$ 诱导的 HT22 神经元内 ROS、NOX2 表达和 MDA 的影响

与 Control 组相比, $\text{A}\beta$ 暴露后可显著上调细胞内 ROS 水平(图 4A-4B)、NOX2 蛋白表达(图 4C)和 MDA 含量(图 4D),而 1 μM 的 BBR 可显著降低胞内 ROS 含量、NOX2 表达和 MDA 水平($P<0.05$),NOX2-siRNA 显著逆转了 BBR 产生的上述作用($P<0.05$),而乱序 RNA(SC-siRNA)未对 BBR 产生可上述抗氧化作用产生明显影响 ($P>0.05$)。以上结果表明 NOX2 介导了 BBR 对 $\text{A}\beta$ 诱导的 HT22 神经元的抗氧化损伤作用。

3 讨论

老年痴呆是全球健康问题,当今全世界老年痴呆患者已超过 4680 万人^[16],预计至 2050 年,该病患者将超过 1.3 亿人^[17]。中国作为世界人口最多的国家之一,人口老龄化程度正在逐渐加剧,而 AD 是最为常见的一种痴呆类型。大量研究显示 AD

患者脑内 $\text{A}\beta$ 有过度沉积,而 $\text{A}\beta$ 的过度沉积可通过增加神经细胞毒性,继而造成神经细胞损伤,最终导致学习和认知功能下降等 AD 症状,给社会和家庭造成了极大负担^[18-20]。最新研究显示 $\text{A}\beta$ 可通过增加神经元细胞内 ROS 水平,产生氧化应激损伤,继而诱导神经细胞凋亡^[21]。因此,通过降低神经元内 ROS 产生可有效降低神经元的氧化应激损伤水平,缓解神经元损伤。NADPH 氧化酶(NOX)是细胞内一种氧化酶家族,最早在免疫细胞中被发现,包括 NOX1-5、双氧化酶 1 (DUOX1)和 DUOX2 等亚型^[22],上述不同 NOX 亚型共同构成了 NOX 的酶家族,其也是细胞生成 ROS 的主要来源。抑制 NOX 蛋白表达可有效降低细胞内 ROS 生成,最终减轻细胞的氧化应激损伤^[23-25]。

BBR 是从传统中药黄连中提取出的一种有效活性成分,中药黄柏和三颗针等亦含有 BBR,最为常见的富含 BBR 的临床用药是盐酸小檗碱,具有缓解细菌性胃肠炎等功效。最近的多项研究表明 BBR 还具有抗肿瘤、抗氧化、抗脑缺血损伤和抑

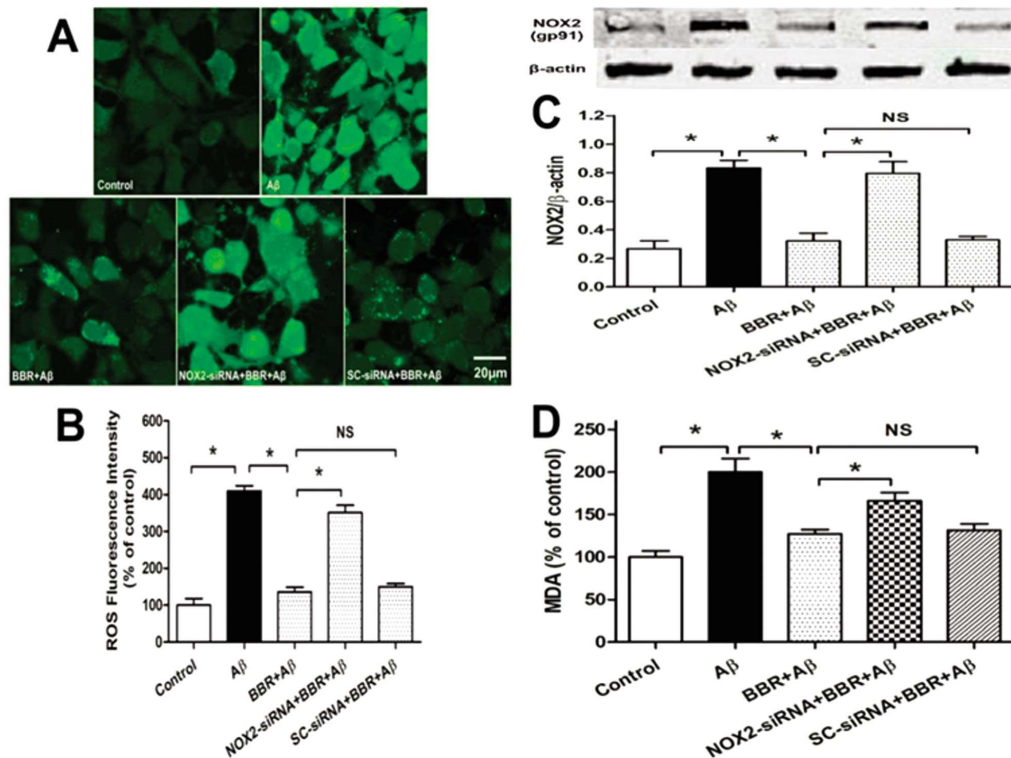


图 4 NOX2-siRNA 逆转了 BBR 对 Aβ 诱导的 HT22 神经元内 ROS 水平、NOX2 表达和 MDA 含量的影响

Fig.4 NOX2-siRNA reversed berberine-induced effects on ROS, NOX2 expression and MDA level in Aβ-treated HT22 neuronal cells

Note: A: Fluorescence staining results of cells; B: NOX2-siRNA reversed berberine-induced effect on ROS level, n=8; C: NOX2-siRNA reversed berberine-induced effect on NOX2 gp91 protein expression, n=4; D: NOX2-siRNA reversed berberine-induced effect on MDA, n=4; Data are expressed as means± SD. *P<0.05; NS no significance.

制神经退行性疾病发展等功效^[26-29]。在本研究中,我们采用 Aβ 家族中毒性最强的 Aβ1-42 肽段模拟 AD 时 Aβ 对神经元细胞的损伤,结果显示 Aβ 暴露可显著对神经元细胞造成氧化应激损伤,而应用 BBR 后,细胞的损伤程度显著减轻、凋亡蛋白表达显著下降,细胞内的 NOX2 表达和 ROS 含量也下降,表明 BBR 显著降低了 Aβ 对神经元的氧化应激损伤。而 NOX2 下调可明显逆转 BBR 对暴露于 Aβ 的神经元细胞的氧化应激损伤,表明 BBR 在神经元细胞产生的保护作用可能通过 NOX2 分子介导。MDA 是细胞脂质氧化代谢产物^[30],而细胞膜的主要成分是脂质分子,因此,BBR 对细胞膜的氧化损伤也可能具有保护作用。在 AD 的发生发展中,NOX 也被证实参与了神经细胞的损伤,包括神经元的损伤和小胶质细胞激活产生的中枢神经系统炎症损伤。有研究显示 NOX2 基因敲除小鼠的脑组织氧化应激损伤程度显著低于野生型小鼠,表明 NOX2 在神经细胞的氧化应激损伤中起到了重要的作用^[31]。NOX 是一个由多种酶分子构成的复合体,包括:p47phox、p67phox、p40phox 和 Rac2 等,其中 NOX 的核心序列是 gp91 和 p22phox2 两个序列。在本研究中,我们检测了 NOX2 蛋白的 gp91 序列表达。

总之,本研究结果表明 NOX2 蛋白介导了 BBR 对暴露于 Aβ 中的神经元细胞的保护作用,为进一步拓展 BBR 的临床应用范围,也为进一步阐明中药提取物 BBR 作用的机制,提供了新证据。然而,本研究也有一些不足,首先,本研究使用的是神经元细胞系,因此,本研所得出的结论,需进一步在原代培养神经元和在体动物实验中进一步验证;其次,本研究探讨了

NOX2 分子在 BBR 神经保护中的作用,其他 NOX 家族的分子,是否参与介导 BBR 产生的上述神经保护作用也有待进一步验证。

参考文献(References)

- [1] Chan KY, Wang W, Wu JJ, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023
- [2] Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders[J]. Lancet Neurol, 2018, 17(11): 1016-1024
- [3] Maneshi MM, Ziegler L, Sachs F, et al. Enantiomeric Aβ peptides inhibit the fluid shear stress response of PIEZO1 [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 14267
- [4] Wang C, Iashchishyn IA, Pansieri J, et al. S100A9-Driven Amyloid-Neuroinflammatory Cascade in Traumatic Brain Injury as a Precursor State for Alzheimer's Disease[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12836
- [5] Wang K, Zhu X, Zhang K, et al. Puerarin inhibits amyloid β-induced NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via suppressing ROS-dependent oxidative and endoplasmic reticulum stresses[J]. Exp Cell Res, 2017, 357(2): 335-340
- [6] Song XM, Yu Q, Dong X, et al. Aldose reductase inhibitors attenuate β-amyloid-induced TNF-α production in microglia via ROS-PKC-mediated NF-κB and MAPK pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 30-37
- [7] Yang L, Han W, Luo Y, et al. Adapentronitrile, a New Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor, Ameliorates Diabetic Neuronal Injury Through Inhibiting Mitochondria-Related Oxidative Stress and Apop-

- tosis[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 214
- [8] Wu X, Li X, Dang Z, et al. Berberine demonstrates anti-inflammatory properties in *Helicobacter pylori*-infected mice with chronic gastritis by attenuating the Th17 response triggered by the B cell-activating factor[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5373-5381
- [9] Cai Z, Wang C, He W, et al. Berberine Alleviates Amyloid-Beta Pathology in the Brain of APP/PS1 Transgenic Mice via Inhibiting β/γ -Secretases Activity and Enhancing α -Secretases [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15(11): 1045-1052
- [10] Xu J, Wu W, Zhang H, et al. Berberine alleviates amyloid β (25-35)-induced inflammatory response in human neuroblastoma cells by inhibiting proinflammatory factors [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4865-4872
- [11] Zhang H, Zhao C, Cao G, et al. Berberine modulates amyloid- β peptide generation by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 125: 408-417
- [12] Scharfner J, Nabers A, Budde B, et al. An ATR-FTIR Sensor Unraveling the Drug Intervention of Methylene Blue, Congo Red, and Berberine on Human Tau and A β [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8(7): 710-714
- [13] Li H, Wang Y, Feng D, et al. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(1): 110-119
- [14] Lou Z, Wang AP, Duan XM, et al. Upregulation of NOX2 and NOX4 Mediated by TGF- β Signaling Pathway Exacerbates Cerebral Ischemia/Reperfusion Oxidative Stress Injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 2103-2113
- [15] Ma MW, Wang J, Dhandapani KM, et al. NADPH oxidases in traumatic brain injury - Promising therapeutic targets? [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 285-293
- [16] Anstey KJ, Peters R, Clare L, et al. Joining forces to prevent dementia: The international research network on dementia prevention (IRNDP)[J]. *Int Psychogeriatr*, 2017, 29(11): 1757-1760
- [17] Quinn JP, Corbett NJ, Kellett KAB, et al. Tau proteolysis in the pathogenesis of tauopathies: neurotoxic fragments and novel biomarkers[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 63(1): 13-33
- [18] Jia J, Wei C, Chen S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491
- [19] Xue H, Zhai J, He R, et al. Moderating role of positive aspects of caregiving in the relationship between depression in persons with Alzheimer's disease and caregiver burden [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 261: 400-405
- [20] Galvin JE, Howard DH, Denny SS, et al. The social and economic burden of frontotemporal degeneration [J]. *Neurology*, 2017, 89(20): 2049-2056
- [21] Shahidi S, Asl SS, Komaki A, et al. The effect of chronic stimulation of serotonin receptor type 7 on recognition, passive avoidance memory, hippocampal long-term potentiation, and neuronal apoptosis in the amyloid β protein treated rat [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2018, 235(5): 1513-1525
- [22] Liu YM, Niu L, Wang LL, et al. Berberine attenuates depressive-like behaviors by suppressing neuro-inflammation in stressed mice [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134: 220-227
- [23] Zhang L, Li Z, Feng D, et al. Involvement of Nox2 and Nox4 NADPH oxidases in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Free Radic Res*, 2017, 51(3): 316-328
- [24] Han Z, Gao LY, Lin YH, et al. Neuroprotection of taurine against reactive oxygen species is associated with inhibiting NADPH oxidases [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 777: 129-135
- [25] Chen XH, Zhou X, Yang XY, et al. Propofol Protects Against H₂O₂-Induced Oxidative Injury in Differentiated PC12 Cells via Inhibition of Ca(2+)-Dependent NADPH Oxidase[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(4): 541-51
- [26] Li D, Zhang Y, Liu K, et al. Berberine inhibits colitis-associated tumorigenesis via suppressing inflammatory responses and the consequent EGFR signaling-involved tumor cell growth [J]. *Lab Invest*, 2017, 97(11): 1343-1353
- [27] Huang SX, Qiu G, Cheng FR, et al. Berberine Protects Secondary Injury in Mice with Traumatic Brain Injury Through Anti-oxidative and Anti-inflammatory Modulation [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(9): 1814-1825
- [28] Lin Y, Sheng M, Ding Y, et al. Berberine protects renal tubular cells against hypoxia/reoxygenation injury via the Sirt1/p53 pathway [J]. *J Nat Med*, 2018, 72(3): 715-723
- [29] Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 181-189
- [30] Steagall RJ, Yao F, Shaikh SR, et al. Estrogen receptor α activation enhances its cell surface localization and improves myocardial redox status in ovariectomized rats[J]. *Life Sci*, 2017, 182: 41-49
- [31] Kuroda J, Ago T, Nishimura A, et al. Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes [J]. *J Vasc Res*, 2014, 51(6): 429-438