

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.19.006

SOD 融合蛋白降低阿尔兹海默症小鼠脑内氧化水平及改善认知功能 *

程 艳¹ 李 扬¹ 郭建伟¹ 朱 婧¹ 李思远² 薛荣亮^{2Δ}

(1 陕西省人民医院麻醉科 陕西 西安 710068; 2 西安国际医学中心医院麻醉与舒适化医疗中心 陕西 西安 710100)

摘要 目的:观察 SOD 融合蛋白对阿尔兹海默症(Alzheimer's Disease, AD)小鼠学习记忆能力及大脑氧化应激水平影响,探究小鼠行为改变与脑内氧化应激水平之间的关系。**方法:**选用 32 只 KM 雄性小鼠,适应性饲养 7 天后,随机分为 4 组:假手术组(S 组),模型组(M 组),SOD 干预模型组(SM 组)和 SOD 融合蛋白干预模型组(PM 组)。实验第 8 天进行 Y 迷宫和黑白箱测试,9-23 天,通过小鼠连续腹腔内注射等量生理盐水(S 和 M 组)、6 mg/kg SOD(SM 组)或 6 mg/kg SOD 融合蛋白(PM 组)进行预防干预。其中,实验第 16 天,通过 5 μ L 微量注射器将生理盐水(S 组,2 μ L/只)及 A β 1-42 寡聚体(M 组、SM 组及 PM 组,2 μ L/只)注射于小鼠右侧脑室,制备 AD 动物模型。第 24 天及 31 天进行 Y 迷宫和黑白箱测试。行为学测试结束后,随机选取一侧大脑半球用 ELISA 法测定脑组织匀浆中的 SOD 和 MDA 水平。**结果:**1)行为学测试:第 8 天,各处理组间差异无统计学意义,第 24 及第 31 天,与 S 组相比,M 组小鼠 Y 迷宫新颖臂探索距离、探索次数及探索时间及黑白箱测试白箱探索距离、探索次数及探索时间均明显增加($P<0.05$);与 M 组相比,PM 组小鼠 Y 迷宫新颖臂探索距离、探索次数及探索时间及白箱探索距离、探索次数及探索时间均明显减少($P<0.05$);SM 组与 M 组相比差异无统计学意义。2)小鼠脑组织匀浆中 SOD 和 MDA 测定:与 S 组相比,M 组 SOD 活性明显下降而 MDA 表达明显升高($P<0.05$),与 M 组相比,PM 组 SOD 活性明显增加而 MDA 表达明显下降($P<0.05$),SM 组与 M 组相比差异无统计学意义。3)SOD 活性与 Y 迷宫新颖臂探索距离、探索次数和探索时间以及黑白箱中白箱探索距离、探索次数和探索时间呈负相关,而 MDA 表达与 Y 迷宫新颖臂探索距离、探索次数和探索时间以及黑白箱中白箱探索距离、探索次数和探索时间呈正相关。**结论:**SOD 融合蛋白腹腔内注射可明显减轻 A β 1-42 诱导的氧化应激及改善 AD 小鼠的行为恶化。SOD 融合蛋白的抗氧化功能可能是预防 AD 的有效方法。

关键词:AD; SOD; MDA; 行为学测试

中图分类号:R74; R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)19-3634-06

P-SOD Reduces the Level of Oxidation in the Brain and Improves Cognitive Function in AD Mice*

CHENG Yan¹, LI Yang¹, GUO Jian-wei¹, ZHU Jing¹, LI Si-yuan², XUE Rong-liang^{2Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Anesthesia & Comfort Health Center, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the P-SOD's effects on behavior and cerebral oxidative stress in AD mice, and to analyze the relationship between changes in mouse behavior and levels of brain oxidation and antioxidant. **Methods:** 32 KM male mice were used for adaptive breeding for 7 days. The mice were randomly divided into 4 groups: sham operation group (group S), model group (group M), SOD intervention model group (group SM), and P-SOD intervention model group (group PM). After 7 days normal feeding for adaptation, mice from these four groups were intraperitoneally injected daily for 14 days: group S and M with normal saline; group SM with 6 mg/kg SOD, group PM with 6 mg/kg pET16b-PTD4-Cu, Zn-SOD. On the 8th day of intraperitoneal injection, after locating the right lateral ventricle of mice by the stereotaxic apparatus, 2 μ L of normal saline was injected into lateral ventricle in mice from group S, whereas 2 μ L of A β 1-42 oligomer (1 μ g/mL) was injected into lateral ventricle in mice from other groups. The Y-maze and the light-dark box test performed on the 8th, 24th and 31st day respectively. After the behavior test, animals were sacrificed and the fresh tissue of one cerebral hemisphere was taken for SOD and MDA determination. **Results:** 1) Behavioral tests: There was no statistical difference in distance, duration and numbers of visits in novel arm of Y-maze test and in light box of Light-dark box test between mice from different groups on the 8th day. However, on the 24th and 31th day, mice in group M showed significantly increased with those above when compared with the group S ($P<0.05$). Differently, mice in group PM showed significantly decreased with those above when compared with those from group M ($P<0.05$). 2) Compared with group M, mice in group S and PM showed significantly higher SOD but lower MDA levels in brain tissue ($P<0.05$). 3) Correlation analysis between SOD/MDA expression and behavioral performance showed

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81471131)

作者简介:程艳(1993-),女,硕士研究生,主要研究方向:神经发育与认知, E-mail: anesthesial2138@163.com

Δ 通讯作者:薛荣亮(1960-),男,硕士生导师,教授,主要研究方向:神经发育与认知, E-mail: xuerl299@163.com

(收稿日期:2022-03-07 接受日期:2022-03-31)

SOD levels negatively, whereas MDA positively correlated with visiting distance, number and duration in Y-maze novel arm and light box. **Conclusion:** P-SOD intraperitoneal injection can alleviate A β ⁺-induced oxidative stress and improve behavioral deterioration in AD mice. The antioxidant function of P-SOD may be an effective method to prevent AD.

Key words: AD; SOD; MDA; Behavioral Test

Chinese Library Classification(CLC): R74; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)19-3634-06

前言

阿尔茨海默症(Alzheimer's Disease, AD)是一种以神经退行性变为特征的、进行性发展的、起病较隐匿的神经系统疾病,临床上以记忆力减退、思维能力下降以及主要人格改变为特征。证据表明,包括 β -淀粉样蛋白(β -amyloid Protein, A β)在内的许多生物标志物在 AD 临床症状出现前 20 至 30 年已在脑组织中异常增加,这些升高的 A β (例如 A β 1-40 和 A β 1-42)水平与 AD 患者海马和皮层的氧化产物水平呈正相关,表明 A β 可能导致脑组织的氧化应激^[1,2]。此外,已经发现脑中增加的氧化应激可促进脑中 A β 沉积,表明在 AD 发生和发展过程中 A β 沉积与氧化应激之间存在密切关系^[3]。氧化应激的重要特征之一是由于线粒体中的氧化磷酸化过程障碍,大量的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)因此而产生^[4,5]。超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SODs)是针对 ROS 的主要抗氧化剂防御系统,但 SOD 分子量巨大且缺乏特异性受体,难以穿过血脑屏障及细胞膜进入脑内发挥作用^[6-8]。本课题组前期构建了 pET16b-PTD4-Cu, Zn-SOD 重组表达载体并进行优化,其表达蛋白(SOD 融合蛋白)表现出特定的跨膜能力,可以进入体外培养的人星形胶质细胞^[9-12]。

因此,本课题根据 AD 发展进程,模拟人类 30-40 岁之间,通过 3-4 月龄小鼠 A β 1-42 侧脑室单次注射,建立 AD 小鼠模型,使用 SOD 融合蛋白进行干预治疗,观察小鼠行为学表现,测定大脑组织匀浆中 SOD 活力和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)表达。分析小鼠行为改变与脑内氧化和抗氧化水平之间的关系,试图为 AD 治疗提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 动物实验及分组

购买雄性昆明小鼠 32 只,适应环境 7 天。随机分为 4 组:假手术组(S 组)、模型组(M 组)、SOD 干预模型组(SM 组)、SOD 融合蛋白干预模型组(PM 组)。在实验 10-23 天进行药物干预,即 S 组等量生理盐水 IP、M 组等量生理盐水 IP、SM 组 SOD 试剂 6 mg/kg IP、PM 组 SOD 融合蛋白 6 mg/kg IP,实验 16 天造模,即 S 组生理盐水 2 μ L/只 ICV,其余各组以 A β 1-42 2 μ g/只 ICV,实验第 8、24、31 天分别进行 Y 迷宫测试和黑白箱测试,行为学测试结束后,取一侧大脑半球新鲜组织进行 SOD 和 MDA 检测。实验每只小鼠皆用苦味酸标记,且饮水与摄食均不受限制,每日定时观察小鼠的状态。饲养环境温度保持在 20-25 $^{\circ}$ C,相对湿度为 50%左右。所有实验均根据卫生研究院实验动物护理和使用指南,并经过西安交通大学动物实验伦理审查标准。

1.2 立体定位脑室内 A β 1-42 输注^[13]

4%的水合氯醛(300-350 mg/kg)腹腔注射麻醉昆明小鼠,将其背位固定于脑立体定位仪(SR-5; Narishige, Tokyo, Japan)上。参考 George Paxinos 和 Keith B.J. Franklin 所编著的《小鼠脑立体定位图谱[2001]》(图 1),选定并标记小鼠右侧脑室的进针点,即由前囟向后 0.45 mm、矢状缝向右侧 1.0 mm 的位置,在标记的进针点处进行颅骨钻孔,将 5 μ L 微量注射器自硬膜下垂直进针 2.0 mm,缓慢注射 2 μ g A β 1-42 寡聚体(GL Biochem, Ltd)于侧脑室中,注射完毕后,留针 20 min 后缓慢拔出微量注射器,缝合头顶皮肤,再次消毒手术区域后,每只小鼠肌注青霉素约 2 万单位,小鼠归笼,严密监测小鼠的呼吸是否正常。

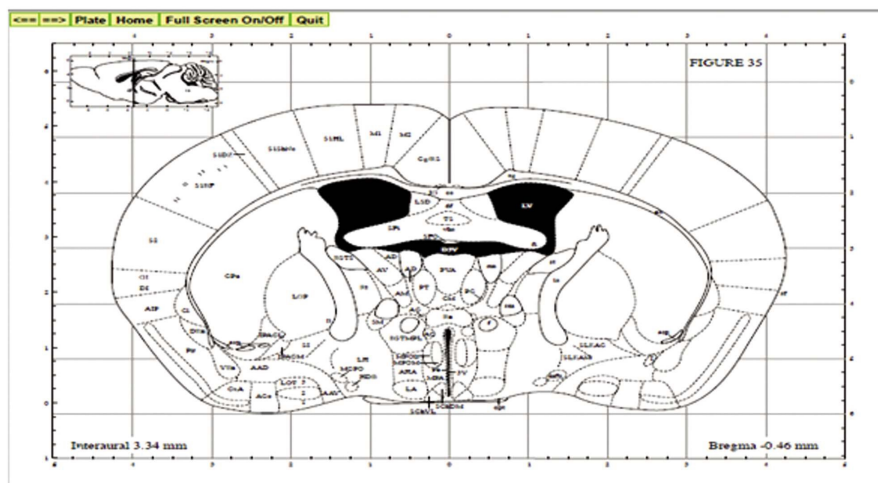


图 1 小鼠侧脑室(LV)的平面位置

Fig. 1 Planar position of mouse lateral ventricle (LV)

1.3 小鼠行为学测试

1.3.1 Y 迷宫测试 实验所用 Y 型迷宫由灰色有机塑料制成,由三个臂组成,相邻臂之间的角度为 120° ,每个臂为 $8\text{ cm} \times 30\text{ cm} \times 15\text{ cm}$ (宽 $\times$ 长 $\times$ 高),计算机可根据迷宫正中心上方的摄像头自动追踪并记录小鼠的探索过程。随机指定三个相同的臂:(1)起始臂,小鼠开始探索(始终打开);(2)新颖臂,在第一次试验期间被阻塞,但在第二次试验期间打开;(3)其他臂(始终打开)。关闭新颖臂,将小鼠背向迷宫中心置入起始臂中,允许其在起始臂和其他臂中定向探索 15 min。定向探索结束 1 h 后,打开新颖臂,将小鼠背向迷宫中心置入起始臂中,允许小鼠在三个臂中自由探索 10 min。通过使用安装迷宫正中上方的相

机,所有试验都记录在录像机上。随后分析视频记录,并分析新颖臂中的探索距离、探索次数和探索时间^[4]。

1.3.2 黑白箱测试 实验所用黑白箱分为两个大小相同的部分,一半为白色不透光场所(白箱),一半为黑色不透光场所(黑箱),中间开口允许小鼠从一个隔间自由移动到另一个隔间,计算机可根据迷宫正中心上方的摄像头自动追踪并记录小鼠的探索过程。将小鼠背对开口放置在白箱的中心,允许其在箱中自由探索 10 min,通过使用安装迷宫正中上方的相机,所有试验都记录在录像机上。随后分析视频记录,并分析白箱中的探索距离和探索时间^[45]。行为学测试如图 2 所示:

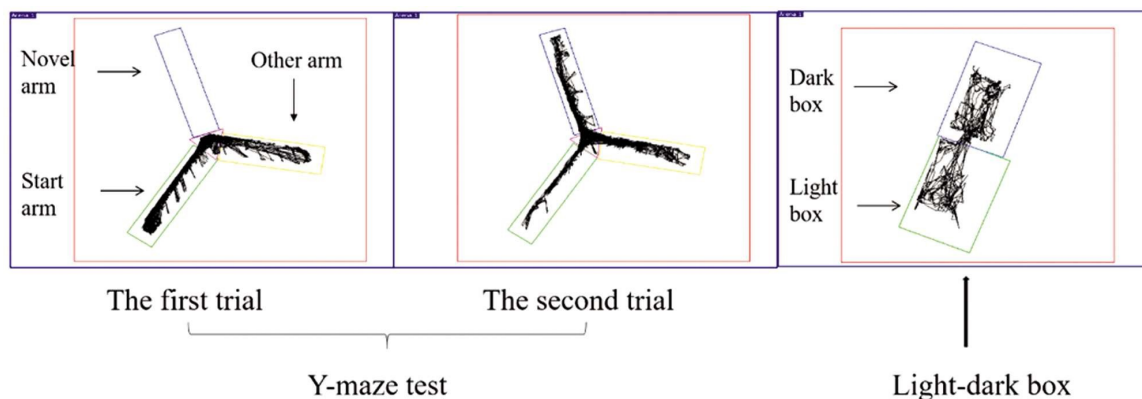


图 2 Y 迷宫及黑白箱行为学测试示意图

Fig. 2 Schematic diagram of Y-maze and light-dark box behavioral test

1.4 大脑组织匀浆 SOD 和 MDA 检测

将新鲜的大脑半球组织以 1:10(m/v)加入 RIPA 裂解液,用机械研磨与超声破碎仪打碎组织,制备 10%的组织匀浆,高速离心后,取上清液,按照试剂盒说明书所示,进行 SOD 和 MDA 检测。

1.5 统计学分析

实验数据使用 SPSS23.0 进行统计分析。首先对各组数据进行正态性检验,若满足正态性则用参数检验,若不满足正态性则用非参数检验(秩次检验);参数检验使用单因素方差分析(ANOVA),在参数检验之前检验数据的方差齐性,当满足方差齐性时应用 LSD-t 检验,而方差不齐时应用 Dunnett-t 检验。 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验期间小鼠体重分析

选取实验第 8 天、24 天及 31 天小鼠体重,进行统计分析,如图 3 所示,各处理组实验期间的体重差异无统计学意义。

2.2 SOD 融合蛋白外源性补充改善 AD 小鼠行为学恶化

如图 4 所示,Y 迷宫测试,第 8 天,各处理组间差异无统计学意义,第 24 及第 31 天,与 S 组相比,M 组小鼠新颖臂探索距离、探索次数及探索时间明显增加,与 M 组相比,PM 组小鼠新颖臂探索距离、探索次数及探索时间明显减少。实验结果提示 SOD 融合蛋白连续 14 天腹腔干预可以改善由 A β 1-42 所致的小鼠空间学习及记忆能力减退。如图 5 所示,黑白箱测试,第 8 天,各组间差异无统计学意义,第 24 及第 31 天,与 S 组相比,

M 组小鼠白箱探索距离、探索次数及探索时间明显增加,与 M 组相比,PM 组小鼠白箱探索距离、探索次数及探索时间明显减少。实验结果提示 SOD 融合蛋白连续 14 天腹腔干预可以改善由 A β 1-42 所致的小鼠焦虑样情绪。

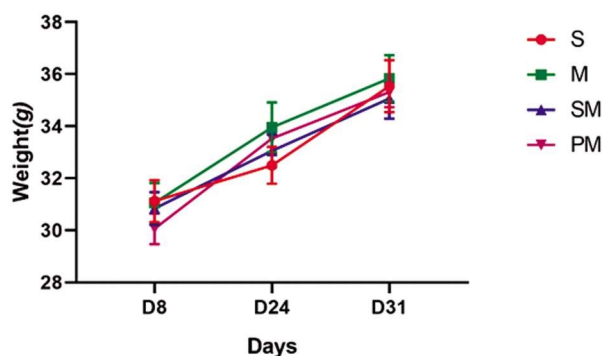


图 3 不同处理组实验期间体重比较(mean $\pm$ SEM)

Fig. 3 Body weight comparison of different treatment groups during the experiment (mean $\pm$ SEM)

2.3 SOD 融合蛋白改变 AD 小鼠脑内氧化及抗氧化水平

2.3.1 SOD 融合蛋白外源性补充改变脑组织匀浆 SOD 活力及 MDA 表达 如图 6A 所示,与 S 组相比,M 组 SOD 活性明显下降,与 M 组相比,PM 组 SOD 活性明显增加;如图 6B 所示,与 S 组相比,M 组 MDA 表达明显升高,与 M 组相比,PM 组 MDA 表达明显下降。说明 AD 小鼠脑内脂质过氧化程度增加而抗氧化能力下降,而 SOD 外源性补充可以降低 AD 小鼠脑内脂质过氧化水平增加脑内抗氧化能力。

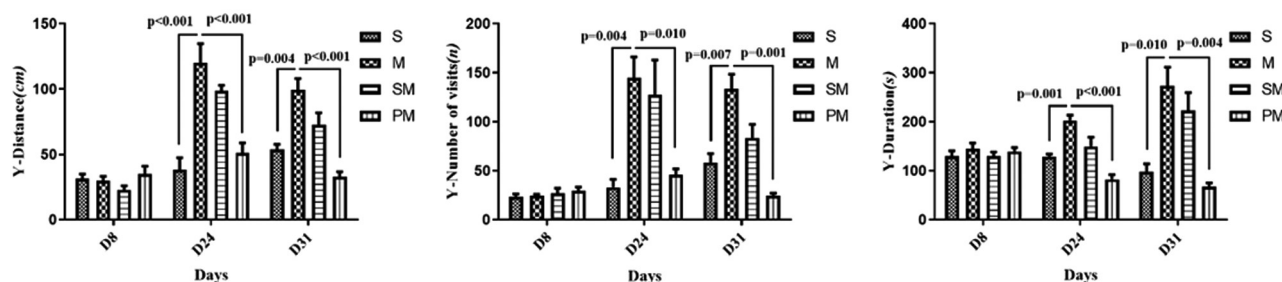


图 4 不同处理组 Y 迷宫探索结果(mean± SEM)

Fig. 4 Y-maze exploration results in different treatment groups (mean± SEM)

注: Y-Distance: Y 迷宫新臂探索距离; Y-Number of visits: Y 迷宫新臂探索次数; Y-Duration: Y 迷宫新臂探索时间

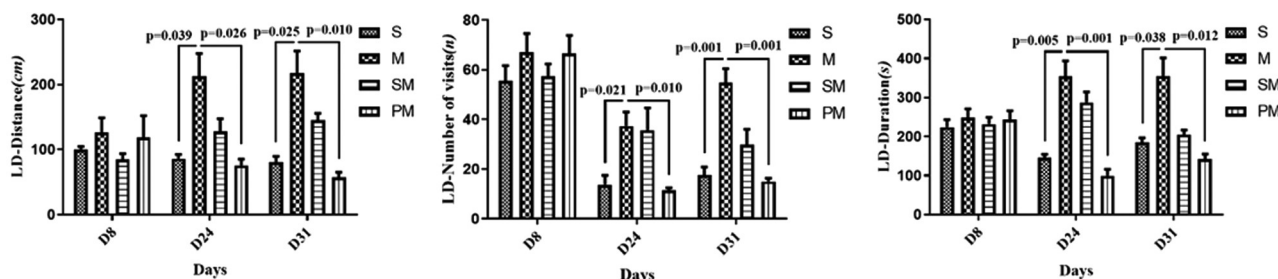


图 5 不同处理组黑白箱 - 白箱探索结果(mean± SEM)

Fig. 5 Light box exploration results of light-dark box test in different treatment groups (mean± SEM)

注: LD-Distance: 白箱探索距离; LD-Number of visits: 白箱探索次数; LD-Duration: 白箱探索时间

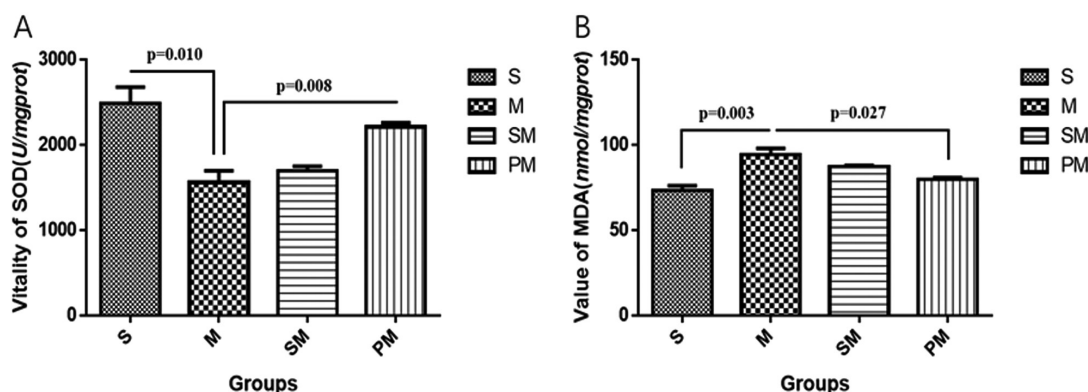


图 6 不同处理组 10% 脑组织匀浆 SOD 活性及 MDA 表达结果(mean± SEM)

注: A: 脑组织匀浆 SOD 活性检测; B: 脑组织匀浆 MDA 表达检测

Fig. 6 The results of SOD activity and MDA expression in 10% brain homogenate in different treatment groups (mean± SEM)

Note: A: Detection of SOD activity in brain tissue homogenate; B: Detection of MDA expression in brain tissue homogenate

2.3.2 行为学测试与脑组织匀浆中 SOD 活性负相关与 MDA 表达正相关 为如图 7 所示, SOD 活性与 Y 迷宫新臂探索距离、探索次数和探索时间以及黑白箱中白箱探索距离、探索次数和探索时间呈负相关。提示脑内抗氧化水平与 AD 行为学损害负相关。如图 8 所示, MDA 表达与 Y 迷宫新臂探索距离、探索次数和探索时间以及黑白箱中白箱探索距离、探索次数和探索时间呈正相关。提示脑内氧化水平与 AD 小鼠行为学损害正相关。

3 讨论

Aβ 沉积是 AD 的经典病理学表现之一, 通过 Aβ1-42 脑室内注射可以诱导有认知功能障碍的 AD 模型鼠^[13], 有研究表明人类 30-40 岁之间, 即出现临床症状前 20 至 30 年, 已出现 Aβ 沉积, 因此本研究使用 3-4 月龄小鼠来模拟 30-40 岁的人类以

构建动物模型^[16]。本实验将 Aβ1-42 寡聚体侧脑室注射以诱导 AD 小鼠模型, 实验结果提示模型鼠空间学习记忆能力降低, 焦虑情绪增加, 符合 AD 行为学表现, 因此认为造模成功。Cheignon 等^[17]提出氧化应激可能是 AD 病因的早期事件, 因为氧化标志物出现在轻度认知障碍脑区, 而 Wang X^[18]等提出氧化应激在 AD 的发病机制中起关键作用并在 AD 的早期发生, 由于 Aβ 沉积的早期性, 推测氧化应激在 AD 发病机制中的作用与 Aβ 的存在有关。在家族性 AD 的多个转基因小鼠模型的胚胎神经元中已经观察到异常的线粒体轴突运输, 并且在淀粉样斑块或记忆障碍发展之前检测到裂变及融合等功能的异常^[19]。综上所述, 在 AD 病程中, 推测氧化应激可能是早期事件, 其发生可能在 Aβ 蛋白沉积之前, 因此本实验设计中抗氧化剂补充在动物模型制作之前, 即在使用 Aβ1-42 寡聚体侧脑室注射诱导 AD 模型前 7 天, 进行抗氧化剂 SOD 融合蛋白外

源性补充治疗。

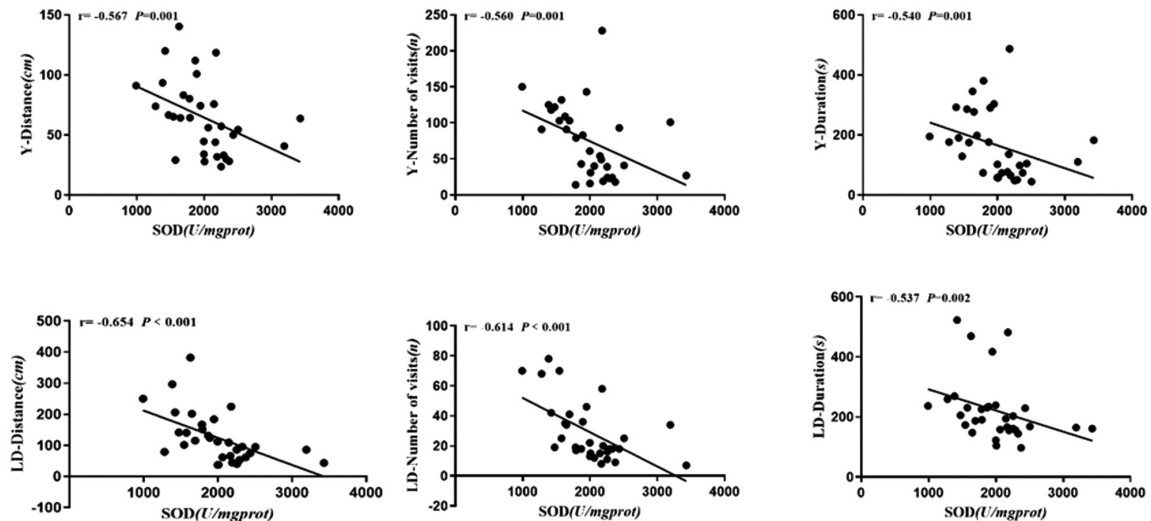


图 7 10%大脑组织匀浆 SOD 活力与行为学测试结果相关分析

Fig.7 Correlation analysis of SOD activity in 10% brain tissue homogenate and behavioral test results

注: Y-Distance: Y 迷宫新颖臂探索距离; Y-Number of visits: Y 迷宫新颖臂探索次数; Y-Duration: Y 迷宫新颖臂探索时间; LD-Distance: 白箱探索距离; LD-Number of visits: 白箱探索次数; LD-Duration: 白箱探索时间; SOD: 脑组织匀浆中 SOD 活力

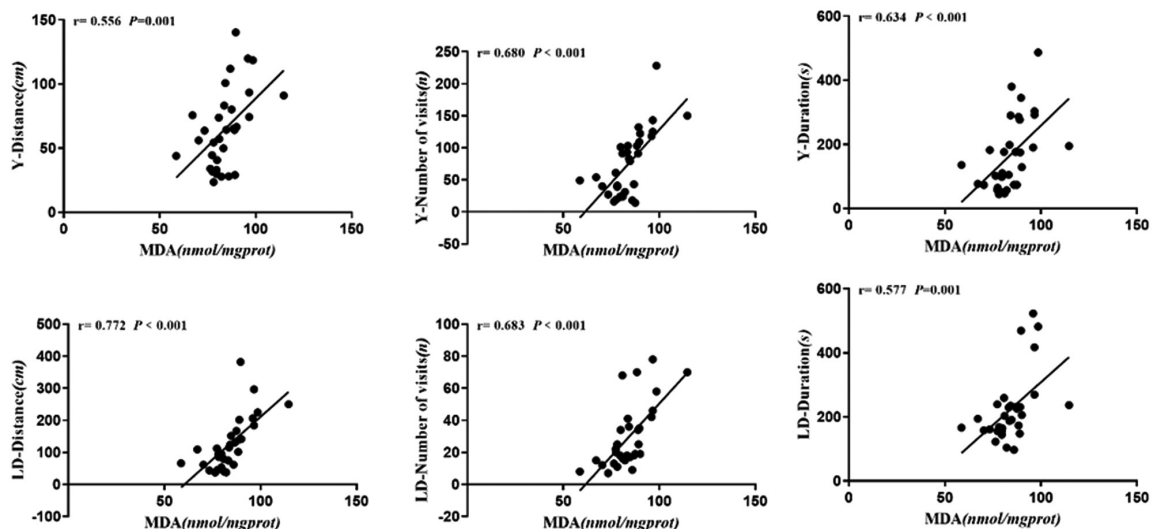


图 8 10%大脑组织匀浆 MDA 表达与行为学测试结果相关分析

Fig. 8 Correlation analysis between MDA expression in 10% brain tissue homogenate and behavioral test results

注: Y-Distance: Y 迷宫新颖臂探索距离; Y-Number of visits: Y 迷宫新颖臂探索次数; Y-Duration: Y 迷宫新颖臂探索时间; LD-Distance: 白箱探索距离; LD-Number of visits: 白箱探索次数; LD-Duration: 白箱探索时间; MDA: 脑组织匀浆中 MDA 表达

AD 中的一个重要特征是神经元脂质和蛋白质中存在氧化损伤,这明显地将氧化应激与 AD 联系起来。线粒体级联学说指出:在散发、迟发的 AD 患者中,线粒体功能障碍与 A β 蛋白的异常积聚有关,线粒体功能障碍在 AD 中发挥着重要作用,线粒体功能障碍已在 AD 中得到充分证实^[20]。据报道,AD 患者海马和皮层中 A β 1-40 和 A β 1-42 的水平升高与蛋白质、脂质和核酸氧化产物的水平升高相关^[21],相反,低 A β 水平(小脑)的大脑区域没有表现出高浓度的氧化应激标记物^[22],表明 AD 中 A β 沉积与氧化应激之间存在关联。在本研究中,我们发现 AD 小鼠脑组织中的 SOD 活力明显降低,但 MDA 含量却增加,这表明 A β 注射诱导的 AD 动物模型出现氧化应激。SOD 水平与学习和记忆能力损害之间呈负相关,而 MDA 含量与行为学损

害间正相关,说明这种氧化应激损害了动物的行为。SOD 融合蛋白连续 14 天腹腔干预可逆转这些变化,包括 SOD/MDA 水平以及动物行为恶化,表明 SOD 融合蛋白可以减弱 A β 沉积诱导的氧化应激。

蛋白质转导结构域 (Protein Transduction Domain, PTD)是一个以肽为载体的能够有效运输各种物质进入细胞和细胞核的系统,能够把生理状态下不能进入细胞发挥生物效应的物质带入细胞的载体工具,它可携带 DNA、蛋白质、多肽等多种物质进行细胞间或细胞内的运输^[23]。大量研究证明,PTD 具有转导能力强、无细胞特异性、能够穿过血脑屏障等特点,其转导的详细机制仍不清楚,但很多研究结果倾向于静电相互作用模式。本实验采用的 PTD-4 结构域的二级结构具有双亲性,即同

时具有亲水部分和疏水部分,亲水部分中有助于精氨酸的胍基(带正电荷)与细胞表面结构(带正电荷)结合,而由于细胞膜为脂质双分子层,因而其疏水部分易于跨越细胞膜,因此 PTD-4 具有高效且快速的细胞转导能力^[24]。一项研究发现,PTD4 可以协助将特定的蛋白质递送到多种哺乳动物细胞中,以维持基因调控^[25]。本课题组前期研究表明,SOD 融合蛋白可以减轻大鼠的脑缺血/再灌注损伤(Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury, CI/RI),这可能与提高 SOD 活性和清除脑组织中的自由基有关^[26]。本研究发现,SOD 融合蛋白腹腔干预的 AD 小鼠大脑组织中 SOD 水平显著增加,而普通 SOD 腹腔干预的 AD 小鼠中未观察到 SOD 的明显增加,表明 SOD 融合蛋白确实通过了血液脑屏障进入脑内发挥抗氧化作用。

另外有研究发现,AD 等病理状态下产生的大量的 ROS 可以快速活化小胶质细胞,处于活化状态的小胶质细胞可以产生多种神经毒性因子进而参与与神经退行性变相关的炎症反应过程^[27],产生的神经毒性因子包括促炎细胞因子、趋化因子等^[28],这些炎症因子通过激活 RAGE 信号转导,促进 COX-2 表达和血小板活化^[29],COX-2 可以通过形成不同类型的自由基来增强炎症反应,引起磷脂过氧化^[30],血小板活化通过增加谷氨酸盐的释放^[31],以及耦合突触后 NMDA 受体活化,从而增加一氧化氮的产生^[32]和随后的线粒体去极化^[33],这些事件共同促进了活性氧的下游产生,进一步加重了认知功能障碍。另一方面,小胶质细胞参与神经发生,其炎症激活或产生神经毒性因子和细胞因子而破坏神经发生过程^[34]。

因此,SOD 融合蛋白腹腔干预可以减轻 A β 1-42 诱导的氧化应激,从而改善 AD 小鼠的行为学恶化。

参考文献(References)

- [1] Tiwari MK, Kepp KP. beta-Amyloid pathogenesis: Chemical properties versus cellular levels [J]. *Alzheimers & Dementia*, 2016, 12 (2): 184-194
- [2] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(2): 101-112
- [3] Rosales-Corral S, Reiter RJ, Tan D-X, et al. Functional Aspects of Redox Control During Neuroinflammation [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13(2): 193-247
- [4] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs[J]. *Physiological Reviews*, 1979, 59(3): 527-605
- [5] Lass A, Agarwal S, Sohal RS. Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (31): 19199-19204
- [6] Murakami K, Murata N, Noda Y, et al. SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase) Deficiency Drives Amyloid beta Protein Oligomerization and Memory Loss in Mouse Model of Alzheimer Disease [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(52): 44557-44568
- [7] Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2007, 85(14): 3036-3040
- [8] Fischer LR, Glass JD. Oxidative stress induced by loss of Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures[J]. *Acta Neuropathologica*, 2010, 119(2): 249-259
- [9] 党莎杰, 薛荣亮, 孟丽华, 等. PTD4-Cu, Zn-SOD 原核重组表达载体的构建[J]. *中华麻醉学杂志*, 2015, 35(4): 486-489
- [10] 孟丽华, 薛荣亮, 杨毅猛, 等. 蛋白质转导 4 型铜锌超氧化物歧化酶融合蛋白在人星形胶质细胞中穿膜能力和保护作用的研究[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(8): 682-687
- [11] 党莎杰, 卫文博, 韩丽春, 等. PTD4-Cu, Zn-SOD 融合蛋白的制备[J]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(8): 939-942
- [12] 程艳, 万婷婷, 薛荣亮. PTD4-Cu, Zn-SOD 原核重组表达载体优化及蛋白表达[J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(3): 215-221
- [13] Kim TI, Lee YK, Park SG, et al. L-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates beta-amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: Reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF-kappa B pathways [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 47(11): 1601-1610
- [14] Fu Y, Chen Y, Li L, et al. Food restriction affects Y-maze spatial recognition memory in developing mice[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2017, 60: 8-15
- [15] Kuleskaya N, Voikar V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure[J]. *Physiol Behav*, 2014, 133: 30-38
- [16] Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 535-562
- [17] Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 450-464
- [18] Wang X, Wang W, Li L, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(8): 1240-1247
- [19] Kandimalla R, Reddy PH. Multiple faces of dynamin-related protein 1 and its role in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(4): 814-828
- [20] Beal MF. Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment[J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(5): 585-586
- [21] Butterfield DA, Lauderback CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(11): 1050-1060
- [22] Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, et al. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD [J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27 (11): 1564-1576
- [23] Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects[J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(10): 443-448
- [24] Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, et al. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 474-477

- 报(自然科学版), 2017, 39(S1): 171-172
- [10] 孙丽芳. 口腔种植修复对牙列缺失患者固位功能、咀嚼功能及美观舒适度的影响研究[J]. 中国医学工程, 2020, 28(8): 50-52
- [11] 徐鹏, 李晓东, 裴仲秋, 等. 种植体周围炎导致牙种植早期失败的原因分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1356-1358
- [12] 宋应亮, 张思佳. 对种植体周围炎的认识与预防[J]. 华西口腔医学杂志, 2020, 38(5): 479-483
- [13] Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, et al. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations [J]. J Periodontol, 2018, 89 (Suppl 1): S304-S312
- [14] 张汉超, 耿福能, 沈咏梅, 等. 康复新液药理作用及临床应用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(3): 57-60
- [15] 华江锋. 康复新液辅助补肾固齿汤治疗口腔种植体周围炎临床研究[J]. 新中医, 2020, 52(3): 113-116
- [16] 刘骏, 李桂丛, 李晓光. 康复新液联合裸花紫珠胶囊治疗口腔种植体周围软组织炎临床研究[J]. 陕西中医, 2021, 42(6): 754-756
- [17] 黄涛, 刘琳. 黄连上清软胶囊辅助治疗种植体周围炎的临床观察[J]. 中国药房, 2016, 27(18): 2491-2493
- [18] Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(7): 426-440
- [19] 程志芬, 崔连保, 玄廷花. IL-6 和 Shh 在种植体周围炎龈沟液中的表达及意义[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(1): 87-89
- [20] Gündoğar H, Üstün K, Şenyurt SZ, et al. Gingival crevicular fluid levels of cytokine, chemokine, and growth factors in patients with periodontitis or gingivitis and periodontally healthy subjects: a cross-sectional multiplex study [J]. Cent Eur J Immunol, 2021, 46(4): 474-480
- [21] Nisha KJ, Suresh A, Anilkumar A, et al. MIP-1 α and MCP-1 as salivary biomarkers in periodontal disease [J]. Saudi Dent J, 2018, 30 (4): 292-298
- [22] 陈慧文, 胡苾, 张卫平, 等. 种植体周围炎龈沟液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2020, 40(12): 1632-1636
- [23] 刘雪阳, 刘海江, 荆得宝. 康复新液对种植体周围炎疗效的观察[J]. 口腔材料器械杂志, 2017, 26(3): 159-163
- [24] 刘晓慧, 刘永红, 张晓光. 雌激素结合康复新液对复发性口腔溃疡小鼠组织损伤的作用及相关机制 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(10): 1032-1035
- [25] 康雪. 康复新液对胃溃疡患者氧化应激及细胞免疫状态的影响研究[J]. 中国现代药物应用, 2022, 16(4): 164-167
- [26] 王琳. 康复新液治疗放射性口腔溃疡的疗效及对患者免疫功能 and 炎性因子水平的影响[J]. 中国医药指南, 2021, 19(28): 120-121
- [27] 李娜. 康复新液在肺结核合并糖尿病患者中的应用及对免疫功能的影响分析[J]. 糖尿病新世界, 2020, 23(19): 71-73
- [28] 毛玉丽. 牙痛宁滴丸和黄连上清胶囊联合米诺环素软膏治疗慢性牙周炎的临床效果[J]. 临床医学工程, 2021, 28(9): 1237-1238
- [29] 李丽. 黄连上清胶囊联合米诺环素对慢性牙周炎牙周指标及炎症因子水平的影响[J]. 中国当代医药, 2021, 28(7): 172-175
- [30] 庄凌燕, 蒋辉, 吴玲娣, 等. 慢性牙周炎采用黄连上清胶囊联合米诺环素治疗的临床效果分析[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2018, 5(33): 104-106

(上接第 3639 页)

- [25] Del Guidice T, Lepetit-Stoffaers J-P, Bordeleau L-J, et al. Membrane permeabilizing amphiphilic peptide delivers recombinant transcription factor and CRISPR-Cas9/Cpf1 ribonucleoproteins in hard-to-modify cells[J]. Plos One, 2018, 13(4): e0195558
- [26] 杨毅猛, 薛荣亮, 孟丽华, 等. 蛋白质转导 4 型 - 铜锌超氧化物歧化酶融合蛋白对大鼠脑缺血 / 再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2019, 40(5): 426-431
- [27] Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease [J]. Current Pharmaceutical Design, 2010, 16(25): 2766-2778
- [28] Klegeris A, McGeer PL. Interaction of various intracellular signaling mechanisms involved in mononuclear phagocyte toxicity toward neuronal cells[J]. J Leukoc Biol, 2000, 67(1): 127-133
- [29] Wang M, Norman JE, Srinivasan VJ, et al. Metabolic, inflammatory, and microvascular determinants of white matter disease and cognitive decline[J]. Am J Neurodegener Dis, 2016, 5(5): 171-177
- [30] Jiang J, Borisenko GG, Osipov A, et al. Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells [J]. J Neurochem, 2004, 90 (5): 1036-1049
- [31] Clark GD, Happel LT, Zorumski CF, et al. Enhancement of hippocampal excitatory synaptic transmission by platelet-activating factor[J]. Neuron, 1992, 9(6): 1211-1216
- [32] Xu Y, Tao YX. Involvement of the NMDA receptor/nitric oxide signal pathway in platelet-activating factor-induced neurotoxicity [J]. Neuroreport, 2004, 15(2): 263-266
- [33] Keelan J, Vergun O, Duchon MR. Excitotoxic mitochondrial depolarisation requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons[J]. J Physiol (Lond), 1999, 520 Pt 3: 797-813
- [34] Beumer W, Gibney SM, Drexhage RC, et al. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes[J]. J Leukoc Biol, 2012, 92(5): 959-975