

· 论著 ·

〔文章编号〕 1007-0893(2022)18-0001-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.18.001

柴胡疏肝散调节自噬-溶酶体途径抑制 Aβ 诱导的神经毒性

曾 媵^{1,2,3} 李新萍^{1,2} 李利民¹ 吴正治^{1,2*}

(1. 深圳大学第一附属医院 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035; 2. 深圳市老年医学研究所, 广东 深圳 518035; 3. 中山大学附属第八医院, 广东 深圳 518033)

〔摘要〕 目的: 探讨柴胡疏肝散(CSS)通过调节自噬-溶酶体途径抑制β-淀粉样蛋白(Aβ)诱导神经毒性的作用机制。方法: 选取大鼠PC12嗜铬细胞瘤细胞分化的类神经元细胞为研究对象,以Aβ诱导神经毒性为模型,采用噻唑蓝(MTT)法和乳酸脱氢酶(LDH)释放实验检测神经细胞毒性,采用单丹磺酰尸胺(MDC)染色和LysoTracker荧光探针染色观察细胞自噬,采用Western blot测定自噬-溶酶体途径相关蛋白的表达情况。结果: Aβ在0.125~2.0 μmol·L⁻¹范围内呈浓度和时间依赖性抑制PC12细胞活力,而CSS在剂量250 μg·mL⁻¹、500 μg·mL⁻¹均明显抑制Aβ诱导的细胞活力下降及乳酸脱氢酶释放(P<0.05);荧光染色结果显示CSS激活Aβ诱导的细胞自噬和溶酶体活性;CSS可抑制细胞mTOR磷酸化和增加LC3-II/LC3-I水平,促进自噬体形成。结论: CSS抑制Aβ诱导的神经毒性,可能与其调节自噬-溶酶体途径有关。

〔关键词〕 柴胡疏肝散; 阿尔茨海默病; 神经毒性; 自噬-溶酶体

〔中图分类号〕 R 289 〔文献标识码〕 A

Chaihu Shugan San Inhibits Aβ-induced Neurotoxicity by Regulating Autophagy-lysosome Pathway

ZENG Qiang^{1,2,3}, LI Xin-ping^{1,2}, LI Li-min¹, WU Zheng-zhi^{1,2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035; 2. Shenzhen Institute of Geriatrics, Guangdong Shenzhen 518035; 3. The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Shenzhen 518033)

〔Abstract〕 Objective To explore the mechanism of Chaihu Shugan San (CSS) inhibits β-amyloid (Aβ)-induced neurotoxicity via regulating autophagy-lysosomal pathway. Methods The neuron-like cells differentiated from rat PC12 pheochromocytoma cells were selected as the research object, and the neurotoxicity induced by Aβ was used as the model. The cytotoxicity of nerve cells was detected by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay and lactate dehydrogenase (LDH) release assay. Monodansylcadaverine (MDC) staining and LysoTracker fluorescent probe staining were used to observe autophagy, and Western blot was used to detect the expression of autophagy-lysosome pathway-related proteins. Results Aβ inhibited the viability of PC12 cells in a concentration and time-dependent manner within the range of 0.125-2.0 μmol·L⁻¹, while CSS at 250 μg·mL⁻¹ and 500 μg·mL⁻¹ significantly inhibited Aβ-induced decrease in cell viability and lactate dehydrogenase release (P<0.05). Fluorescence staining showed that CSS activated Aβ-induced autophagy and lysosomal activity. CSS can inhibit the phosphorylation of mTOR and increase the level of LC3-II/LC3-I, and promote the formation of autophagosome. Conclusion CSS inhibited Aβ-induced neurotoxicity probably by regulating autophagy-lysosomal pathway.

〔Keywords〕 Chaihu Shugan San; Alzheimer's disease; Neurotoxicity; Autophagy-lysosomal

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是常见的影响到大脑皮质和海马区的神经退行性疾病^[1],以进行性记忆丧失和认知功能障碍,并伴有间歇性情绪变化为特征^[2]。AD的发生率逐年上升,随年龄增长而加剧,且

农村地区的AD发病率明显高于城市地区^[3]。据估计,到2050年全球罹患AD人数将超过1.5亿人^[4]。生活质量下降和高昂的医疗护理费用给AD患者及家人带来沉重经济负担和心理负担^[5-6]。然而,目前尚无有效手段可

〔收稿日期〕 2022-07-18

〔基金项目〕 广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515010758); 深圳市基础研究专项(自然科学基金)基础研究项目(JCYJ20190812171611467); 深圳市福田区卫生健康系统科研项目(FTWS2022034)

〔作者简介〕 曾媵,女,助理研究员,主要研究方向是中医药防治老年疾病。

〔*通信作者〕 吴正治(E-mail: szwzz001@email.szu.edu.cn)

在临床阻止或逆转 AD 恶性进展, 探索和开发 AD 防治药物已成为临床医学的重要课题。

柴胡疏肝散 (Chaihu Shugan San, CSS) 是经典的中药方剂, 已被广泛应用于治疗各类疾病如抑郁症、慢性胃炎、乳腺增生等。前期研究发现, CSS 可以改善痴呆并发肝郁症模型大鼠的抑郁症状并增强其认知能力^[7], 但其潜在机制尚未被阐明。AD 患者脑中病理特征包括不溶性的 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积和微管蛋白 tau 聚集形成神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)。其中, A β 沉积引起明显的神经毒性, 导致线粒体损伤、细胞骨架解体、突触功能障碍以及神经元死亡^[8-9]。本研究将应用 A β 诱导类神经元细胞毒性, 构建体外神经毒性模型; 拟比较不同剂量的 CSS 对 A β 诱导神经毒性的影响, 采用噻唑蓝 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 实验和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放实验评估 CSS 对神经细胞毒性的抑制作用, 采用单丹磺酰尸胺 (monodansyl cadaverine, MDC) 染色和 LysoTracker 荧光探针染色观察细胞自噬, 采用 Western blot 测定自噬-溶酶体途径相关蛋白的表达情况。

1 材料和方法

1.1 CSS 提取物制备和化学分析

柴胡疏肝散由柴胡、陈皮、白芍、川芎、香附、枳壳、甘草组成, 原药材购自同仁堂 (中国北京)。药材剪碎后, 加入蒸馏水 (1:10, w/v) 回流提取 2 次, 每次 2 h。所得水提取物 (Chaihu Shugan San water extract, CSSW) 减压过滤, 合并滤液后, 旋蒸浓缩。提取物冻干并于 4 °C 保存备用。CSSW 的化学成分分析采用 Shimadzu LC-20A 高效液相色谱系统 (HPLC, 日本岛津公司) 进行。依据 2015 年版《中国药典》, 柴胡、白芍、甘草、川芎、陈皮分别以柴胡皂苷 B1、芍药苷、甘草苷、阿魏酸和橙皮苷为标志物。将标准品溶于甲醇配成 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 将样品溶于双蒸水配成 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样。柴胡皂苷 B1 的分析条件为: 安捷伦 Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 按乙腈 (A)-0.2% 磷酸 (B) 溶液梯度洗脱 (A: 15%~60%, 0~30 min; A: 60%~15%, 30~31 min; A: 15%, 31~35 min), 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30 °C, UV 检测器 (SPD-20A, 日本岛津公司), 在 254 nm 的波长下进行检测。芍药苷、甘草苷、阿魏酸和橙皮苷的分析条件为: 洗脱流动相为甲醇和 0.5% 乙酸, 比例为 40:60 (V/V), 流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 其他参数与柴胡皂苷 B1 分析条件相同。

1.2 细胞培养和凝聚态 A β 1-40 制备

PC12 大鼠嗜铬细胞瘤细胞采用含 10% 马血清和 5%

胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 并含有 100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素及 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 神经生长因子, 37 °C、5% CO_2 条件下培养。A β 1-40 (美国 Sigma 公司) 溶于无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, 配成 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液, 密封后 37 °C 恒温老化处理 7 d, 即成凝聚态 A β 。4 °C 贮存备用, 用时稀释至 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 MTT 法检测细胞活力

细胞接种于 96 孔板, 加入不同浓度 A β (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 CSS (62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理细胞 24 h、48 h 后, 加入含 MTT 溶液 (5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的培养基孵育 2 h; 弃去上清, 加入 100 μl 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 充分溶解结晶甲瓩, 540 nm 波长下测定吸光度 (optical density, OD), 计算百分比。

1.4 LDH 测定

培养液中 LDH 采用 LDH 释放检测试剂盒 (中国碧云天公司) 测定。细胞分为对照组 (CTL)、A β (250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组、不同浓度 CSS (62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + A β (250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理组, 孵育 24 h 后收集上清, 1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后, 上清转移至 96 孔板, 添加 LDH 检测液 (乳酸、碘硝基氯化四氮唑蓝和硫辛酰胺脱氢酶, 按 1:1:1 配成), 室温避光孵育 30 min, 490 nm 波长下测定吸光值, 计算百分比。

1.5 MDC 染色法检测自噬泡

细胞接种于 8 孔腔室载玻片, 贴壁后, 加入 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β 或 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CSS 处理 4 h; 加入 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MDC 染色, 37 °C 避光孵育 10 min; 去掉培养液, 用 PBS 清洗后, 加入新鲜培养液。倒置荧光显微镜下观察自噬泡, $\lambda_{\text{excitation}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 518 \text{ nm}$ 。用 Image J 软件扫描荧光强度, 每组 5 个视野。3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 是自噬抑制剂, 细胞饥饿 2 h (Earle's 平衡盐溶液代替细胞培养液) 用做阳性对照组。

1.6 LysoTracker 染色检测溶酶体

细胞接种于培养皿, 贴壁后加入 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β 或 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CSS 处理 6 h; 加入 LysoTracker Green DND-26 探针 (终浓度 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 美国 CST 公司) 避光孵育 30 min; Hoechst 33342 (1:2000, 美国 Invitrogen 公司) 复染细胞核 5 min。去掉染液, PBS 清洗细胞 3 次后, 加入新鲜培养液。激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司) 下观察溶酶体, 采集图像, $\lambda_{\text{excitation}} = 504 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 511 \text{ nm}$ 。

1.7 Western blot 法检测蛋白表达

细胞经不同方式处理后, 加入 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液提取总蛋白。提取的

总蛋白经 10%~12% 分离胶和 5% 浓缩胶分离后, 转印至硝酸纤维素膜上。用 TBST (tris-buffered saline with tween 20) 配制的含 5% 脱脂奶粉的溶液, 常温封闭 1 h; TBST 缓冲液清洗 3 次后, 加入 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3I/II、 β -actin 的一抗溶液 (各 1:1000, 美国 CST 公司), 4 °C 孵育过夜。TBST 缓冲液清洗 3 次后, 分别加入相对应二抗溶液 (1:3000), 常温孵育 2 h。TBST 缓冲液洗去未结合的二抗后, 加入现配的增强型发光液 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色, 采用 GeneGnome XRQ 成像系统记录条带。其中, β -actin 作为内参。

1.8 统计分析

研究数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 Bonferroni 检验通过单因素方差分析进行统计分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 CSS 提取物的化学成分

CSS 水提取物的总提取率为 32.5%, 其中柴胡皂苷

B1、芍药苷、甘草苷、阿魏酸和橙皮苷的保留时间分别为 24.6 min、6.2 min、7.8 min、8.9 min、12.2 min, 五种化学成分的含量分别为 0.004%、0.824%、0.059%、0.073%、1.291% (w/w)。

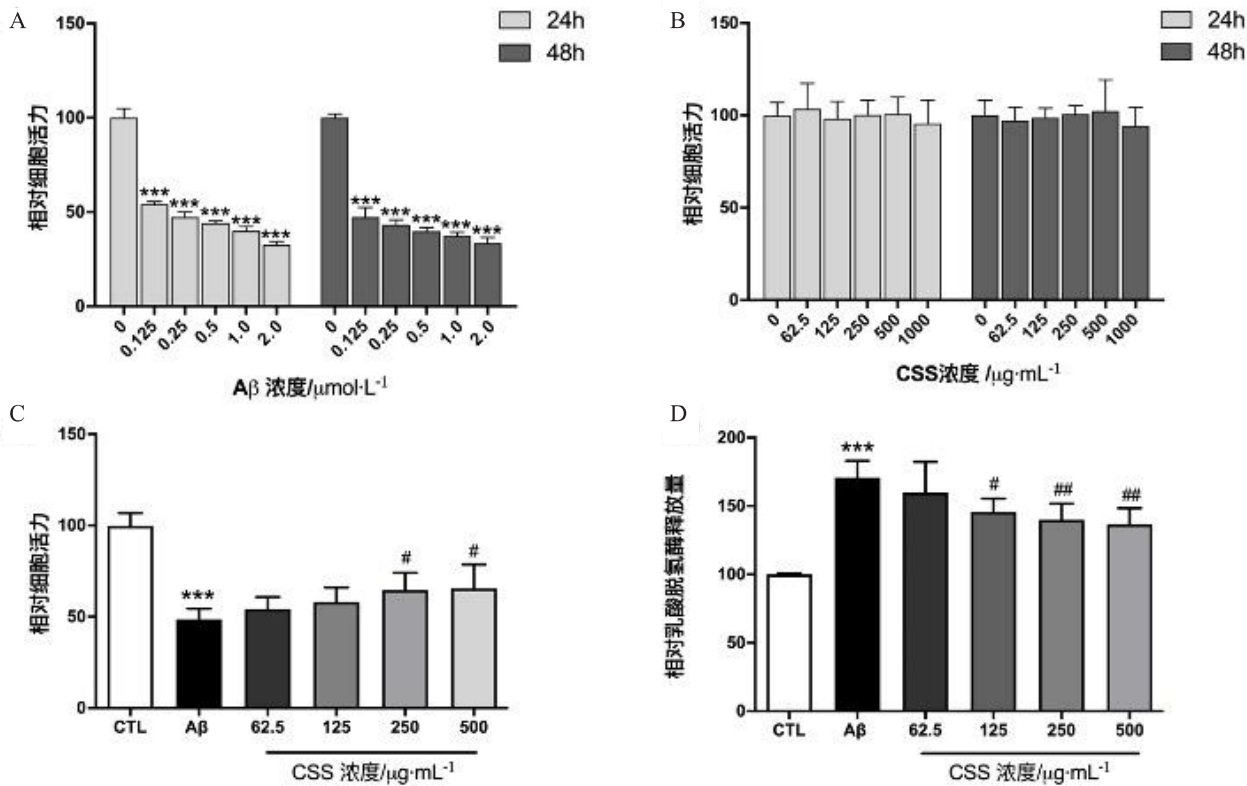
表 1 CSS 提取物的化学成分分析

药材	成分标志物	保留时间 /min	含量 /%
柴胡	柴胡皂苷 B1	24.6	0.004
白芍	芍药苷	6.2	0.824
甘草	甘草苷	7.8	1.291
川芎	阿魏酸	8.9	0.059
陈皮	橙皮苷	12.2	0.073

注: CSS 一柴胡疏肝散。

2.2 CSS 抑制 A β 诱导的神经细胞毒性和 LDH 释放

0.125~2.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β 处理细胞 24 h 或 48 h 均不同程度引起细胞活力下降; 单用 62.5~1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CSS 处理细胞 24 h 或 48 h 均对细胞活力无显著影响。而 CSS 在剂量 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可显著抑制 A β 所致的细胞活力下降。LDH 检测结果显示 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β 显著诱导 LDH 释放; 而 CSS (125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 明显抑制 A β 诱导的 LDH 释放, 见图 1。



注: A. A β 在不同浓度和时间下诱导 PC12 细胞的细胞活力; B. 单用 CSS 在不同浓度和时间下对 PC12 细胞的细胞活力; C. CSS 抑制 A β 诱导的 PC12 细胞毒性; D. CSS 抑制 A β 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放量。以对照组 (CTL) 细胞活力和 LDH 释放量为参照的相对百分比表示。CSS 一柴胡疏肝散; A β 一 β 淀粉样蛋白; LDH 一乳酸脱氢酶。与对照组 (CTL) 比较, *** $P < 0.001$; 与 A β 处理组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 CSS 抑制 A β 诱导的神经细胞毒性和 LDH 释放

2.3 CSS 促进 Aβ 诱导的自噬作用

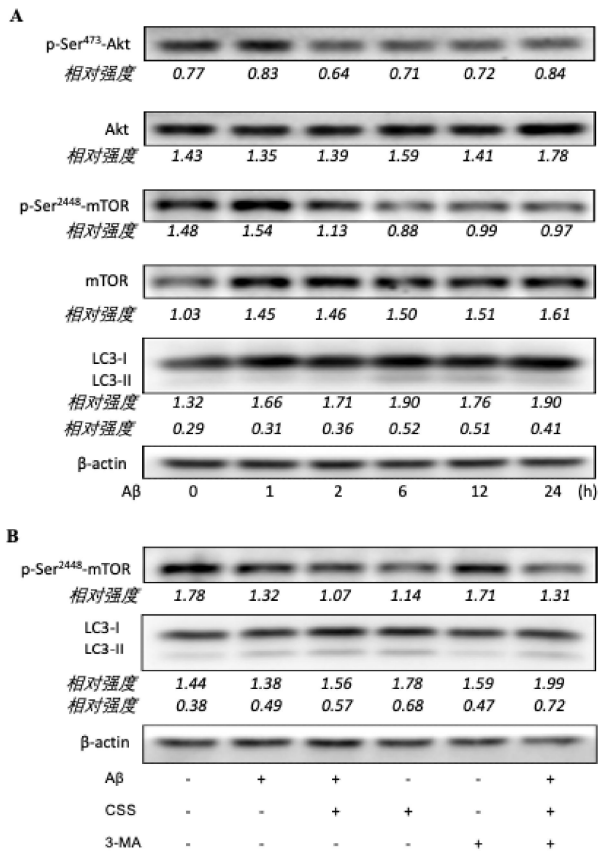
MDC 自噬泡染色常用于检测细胞自噬情况。Aβ 刺激细胞 4 h 后, MDC 荧光强度明显增强, 表明 Aβ 可诱导自噬。Aβ 和 CSS 共刺激 4 h, 进一步增加 MDC 荧光强度; 而添加 3-MA (自噬抑制剂) 后荧光强度明显降低。而单用 CSS 未见细胞的 MDC 强度明显变化, 见封三图 2。

2.4 CSS 增强 Aβ 诱导的溶酶体活性

LysoTracker Green DND-26 探针可穿透细胞膜并选择性标记活细胞的酸性细胞器, 常用于检测胞内溶酶体丰度和功能。Aβ 处理 6 h 后, 细胞胞中溶酶体数目和活性明显增加; 联用 Aβ 和 CSS 处理 6 h 可进一步促进 Aβ 诱导的溶酶体活性, 加速对损伤细胞的清除作用; 添加 3-甲基腺嘌呤 (自噬抑制剂) 后, 溶酶体活性降低, 见封三图 3。该结果提示 CSS 可增强溶酶体功能, 促进对 Aβ 诱导的异常蛋白和损伤细胞的清除作用。

2.5 CSS 调控自噬相关蛋白的表达

如图 4 所示, Aβ 显著抑制 Akt、mTOR 磷酸化, 并增加 LC3-II/LC3-I 水平; 效应呈现时间依赖性, 以 6 h、12 h 作用最为明显, 提示 Aβ 可诱导细胞自噬。单用 CSS 亦可抑制 mTOR 磷酸化和增加 LC3-II/LC3-I 水平; 而 Aβ 和 CSS 联用比单用 Aβ 刺激时 LC3-II/LC3-I 水平进一步增加, 提示 CSS 刺激 6 h 可促进自噬体形成。



注: A. Aβ 经不同时间处理后自噬相关蛋白表达水平; B. 添加不同药品处理细胞后自噬相关蛋白表达水平; CSS 柴胡疏肝散; Aβ 一 β 淀粉样蛋白。

图 4 各组自噬相关蛋白表达水平

3 讨论

AD 是一种影响到大脑皮层和海马区的持续性进行性神经退行性疾病, 以记忆力逐渐减退和认知功能退化为主要临床症状。AD 的致病原因和发病机制尚未被完全阐明。目前 AD 发病假说包括胆碱能神经递质功能障碍和谷氨酸兴奋损伤神经元, Aβ 沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化等学说。研究显示: AD 是一种典型的神经变性构象病, 以海马区 Aβ 和 p-tau 蛋白沉积为主要组织病理改变。淀粉样前体蛋白经 β-分泌酶和 γ-分泌酶水解, 生成异常的 Aβ; 异常 Aβ 经自噬-溶酶体途径、泛素-蛋白酶体系统和小胶质细胞吞噬作用清除; 一旦异常 Aβ 不能被及时清除将会聚集形成寡聚体, 进而形成不溶性的老年斑块, 诱发神经毒性^[8-9]。因而, 抑制 Aβ 的产生及促进 Aβ 的清除可能是延缓或逆转 AD 恶性进展的有效策略。

CSS 是经典的中药方剂, 具疏肝理气, 缓解抑郁作用, 已被广泛应用于治疗各类疾病如抑郁症、慢性胃炎、乳腺增生等^[10-12]。近期研究显示 CSS 可通过各种信号途径抑制肝损伤, 减轻慢性炎症, 缓解慢性应激引起的焦虑和抑郁症状, 并具有改善 D-半乳糖和 Aβ₁₋₄₂ 诱导的记忆损伤功能^[13-16]。CSS 可促进神经细胞增殖, 及增加癫痫大鼠海马齿状回中 5-羟色胺受体 1A 的表达^[17], 提示 CSS 对神经疾病有潜在的治疗作用。本研究发现 CSS 可抑制 Aβ 诱导的 PC12 细胞的神经毒性, 可能与 CSS 调控自噬-溶酶体途径有关, 为临床应用 CSS 治疗和缓解阿尔茨海默病提供实验依据。

LDH 是稳定存在于胞浆中的可溶性 LDH。当细胞损伤发生, 胞膜完整性遭到破坏时, LDH 将会被释放到培养液中。因此, 细胞培养液中 LDH 水平可间接反映细胞损伤程度。本研究中 LDH 检测结果显示 0.25 μmol · L⁻¹ Aβ 可诱导 LDH 释放, 造成严重的细胞损伤; 而 CSS (125 ~ 500 μg · mL⁻¹) 明显抑制 Aβ 诱导的 LDH 释放, 提示 Aβ 可诱导明显的神经细胞毒性, 导致神经细胞损伤, 而 CSS 可逆转 Aβ 诱导的神经细胞毒性。

自噬-溶酶体途径是机体清除错误蛋白质的机制之一, 对 AD 脑中 Aβ 清除的关键途径。ALP 的分子过程包括: 吞噬体的成核和吞噬体膜扩展包封形成自噬体、自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体、以及自噬-溶酶体最后降解并清除底物。神经细胞自噬障碍将加剧神经退行性疾病的恶性进展, 而激活自噬过程可抑制 Aβ 诱导的神经元变性, 可见激活自噬-溶酶体活性可能是促进 Aβ 清除和治疗 AD 的可行方法。

研究显示, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (PKB/AKT) / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路在调控细胞自噬过程中发挥重要作用。磷酸化的 Akt 可逆转结节性硬化症复合物 1/2 (TSC1/2) 对下

游 Rheb 和 mTOR 复合物 1 (mTORC1) 的抑制作用, 进而介导 mTOR 活化, 对细胞自噬产生负调控作用^[18]。mTOR 磷酸化增加抑制溶酶体活性和自噬体形成, 并抑制自噬体对 A β 聚集的清除作用, 加重 AD^[19]。本研究中 CSS 可抑制 A β 诱导的神经细胞 mTOR 磷酸化, 促进自噬体形成, 增强溶酶体功能, 提示 CSS 有助于加速 A β 清除降低神经毒性。

综上所述, CSS 可抑制 A β 诱导的神经细胞毒性, 该作用可能与其调控自噬-溶酶体途径有关, 本研究为临床应用 CSS 防治阿尔茨海默病提供实验基础。

[参考文献]

- (1) Masters CL, Bateman R, Blennow K, et al. Alzheimer's disease (J). *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1(10): 15056.
- (2) Wang ZY, Liu JG, Li H, et al. Pharmacological effects of active components of Chinese herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease: a review (J). *Am J Chin Med*, 2016, 44(8): 1525-1541.
- (3) Jia J, Wang F, Wei C, et al. The prevalence of dementia in urban and rural areas of China (J). *Alzheimers Dement*, 2014, 10(1): 1-9.
- (4) Brookmeyer R, Abdalla N, Kawas CH, et al. Forecasting the prevalence of preclinical and clinical Alzheimer's disease in the United States (J). *Alzheimers Dement*, 2018, 14(2): 121-129.
- (5) 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.
- (6) GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 (J). *Lancet Public Health*, 2022, 7(2): e105-e125.
- (7) 禰璇, 戎志斌, 刘纯, 等. 柴胡疏肝散对肝郁型老年性痴呆大鼠模型行为学及海马单胺神经递质的影响. *深圳中西医结合杂志*, 2013, 23(3): 6-9.
- (8) Wang L, Cao J, Shi Z, et al. Experimental study on the neurotoxic effect of beta-amyloid on the cytoskeleton of PC12 cells (J). *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2764-2770.
- (9) Marttinen M, Takalo M, Natunen T, et al. Molecular mechanisms of synaptotoxicity and neuroinflammation in Alzheimer's disease (J). *Front Neurosci*, 2018, 12(12): 963.
- (10) Wang Y, Fan R, Huang X. Meta-analysis of the clinical effectiveness of traditional Chinese medicine formula Chaihu-Shugan-San in depression (J). *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 571-577.
- (11) Qin F, Liu JY, Yuan JH. Chaihu-Shugan-San, an oriental herbal preparation, for the treatment of chronic gastritis: a meta-analysis of randomized controlled trials (J). *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(2): 433-439.
- (12) 何家安. 柴胡疏肝散治疗乳腺增生临床 Meta 分析 (J). *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(3): 185-188.
- (13) Chen XQ, Li CF, Chen SJ, et al. The antidepressant-like effects of Chaihu Shugan San: Dependent on the hippocampal BDNF-TrkB-ERK/Akt signaling activation in perimenopausal depression-like rats (J). *Biomed Pharmacother*, 2018, 37(105): 45-52.
- (14) Liang Y, Zhang Y, Deng Y, et al. Chaihu-Shugan-San Decoction Modulates Intestinal Microbe Dysbiosis and Alleviates Chronic Metabolic Inflammation in NAFLD Rats via the NLRP3 Inflammasome Pathway (J). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 15(7): 9390786.
- (15) 赵唯贤, 李高申, 薛红莉, 等. 柴胡疏肝散对阿尔茨海默病大鼠海马 CA1 区超微结构的影响 (J). *中国中医基础医学杂志*, 2012, 18(6): 621-623.
- (16) 赵唯贤, 李高申, 范新六, 等. 柴胡疏肝散对阿尔茨海默病大鼠记忆功能的相关研究 (J). *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 207-210.
- (17) Yang P, Li L, Liu XJ, et al. Effect of Chaihu-Shugan-San on the mRNA expression of the 5-HT1A receptor and cellular proliferation in the hippocampus of epileptic rats with depression (J). *Exp Ther Med*, 2016, 11(1): 124-130.
- (18) Wang ZY, Liu JY, Yang CB, et al. Neuroprotective Natural Products for the Treatment of Parkinson's Disease by Targeting the Autophagy-Lysosome Pathway: A Systematic Review (J). *Phytother Res*, 2017, 31(8): 1119-1127.
- (19) 肖昊翔, 李天, 彭帆, 等. 自噬在神经退行性疾病中的作用研究进展 (J). *解放军医学杂志*, 2019, 44(4): 341-346.