Nrf2-ARE 信号通路参与姜黄素对 Aβ 诱导细胞氧化损伤和凋亡的抑制作用研究

黄汉昌[1,2]，路书彦[1,2]，常平[1,2]，郑博闻[1,2]，张练[2]，姜招峰[1,2]
（1.北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室，北京 100191）
（2.北京联合大学应用文理学院，北京 100191）

摘要：本文研究了 Nrf2-ARE 通路在姜黄素介导的抑制 β-淀粉样蛋白 (Aβ) 诱导 SH-SY5Y 细胞氧化损伤及细胞凋亡过程中的作用。在没有/含有姜黄素预先保护情况下，10 μM Aβ 培养细胞 24 h，观察细胞形态的变化，测定细胞存活率、细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放水平，评价细胞培养液中 H2O2 及胞内活性氧水平，SDS-PAGE 酶联免疫法测定 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平。结果表明，与对照组相比，Aβ 损伤组细胞突起变少、变短，胞体变圆，细胞存活能力降低、释放 LDH 的水平明显增加、氧化应激水平明显上升。与 Aβ 损伤组相比，姜黄素保护组细胞胞体突起较多、较长，细胞存活能力明显升高、释放 LDH 的水平明显降低、氧化应激水平也明显降低。姜黄素增强了 Nrf2 的表达，降低了 Aβ 诱导的 Nrf2 Ser-40 磷酸化及 HO-1 的相对表达水平。以上结果提示，姜黄素能够削弱 Aβ 诱导的氧化损伤和细胞凋亡作用，这可能与姜黄素对 Nrf2-ARE 通路的活性调节相关。

关键词：阿尔茨海默病；β-淀粉样蛋白；氧化损伤；细胞凋亡；姜黄素；Nrf2-ARE 通路
文章篇号：1673-9078(2015)6-1-5 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.001

Participation of Nrf2-ARE Signaling in Curcumin Inhibition of Amyloid-β-induced Cellular Oxidative Stress and Cell Apoptosis

HUANG Han-chang[1,2], LU Shu-yan[1,2], CHANG Ping[1,2], ZHENG Bo-wen[1,2], ZHANG Lian[1], JIANG Zhao-feng[1,2]
(1.Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191, China) (2.College of Arts and Science of Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: This study investigated the protective effects of curcumin on cellular oxidative damage and cell apoptosis induced by amyloid-β (Aβ) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and discussed the role of the Nrf2-antioxidant response element (ARE) pathway in this protective effect. Cells were treated with 10 μM Aβ1-40 at 37 ℃ for 24 h with or without curcumin pre-treatment. The changes in morphology were observed under the microscope, and the MTT colorimetric assay was used to assess cell viability. Lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium was determined to evaluate cell membrane damage. The relative levels of H_2O_2 in the culture medium and intracellular reactive oxygen species (ROS) were assessed. In addition, the protein expressions of Nrf2 and HO-1 were detected by western blot analysis. Compared with the vehicle-only control group, cell bodies in the Aβ-damaged group became rounded, with fewer and shorter protuberances. Cell viability decreased, and the level of released LDH increased, while the oxidative stress level was significantly elevated. Compared with the Aβ-damaged group, curcumin treatment promoted cell growth and the protuberances became longer; cell viability increased while released LDH decreased, and the level of oxidative stress also decreased significantly. Notably, curcumin promoted Nrf2 expression and attenuated Aβ-induced up-regulation of phosphorylated Nrf2 at Ser-40 as well as HO-1 expression. Curcumin attenuated cellular oxidative damage and cell apoptosis induced by Aβ, which might be linked to the regulation of the Nrf2-ARE pathway by curcumin.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid-β peptide; curcumin; oxidative damage; cell apoptosis; Nrf2-antioxidant response element pathway

---

收稿日期：2014-09-22
基金项目：国家自然科学基金资助项目(31471587)；北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目(CIT&TCD201504034)；北京联合大学“启明星”大学生科技创新项目(201511417015)
作者简介：黄汉昌（1975-），男，博士，副教授，研究方向：生物活性物质的制备及生理功能研究
通讯作者：姜招峰（1956-），男，博士，教授，研究方向：神经退行性变机理及抗氧化生物活性物质筛选研究

尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经系统退行性疾病。AD 的病理特征表现为细胞外间隙 β-淀粉样蛋白(Amyloid-β peptide, Aβ)沉积所形成的老年斑、细胞内异常磷酸化的微管相关蛋白 tau 聚集所形成的神经纤维缠结以及神经元的丢失[1]。Aβ 是由淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)分解产生的含 39~43 个氨基酸残基的多肽[2]，在老年斑中常见的残基亚型为 Aβ1-40 和 Aβ1-42，其中 Aβ1-40 含量最为丰富。

Aβ 可以导致神经元的氧化损伤并导致神经元细胞的死亡[3]，但 Aβ 神经毒性的作用机制还有待进一步的研究。核转录因子 NF-E2 相关因子 2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)是一种内源性的抗氧化应激调节因子[4]。Nrf2 定位于细胞浆，与胞质接头蛋白 Keap-l(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap-l)形成复合物；当细胞接收到激活信号时，Keap-1 或 Nrf2 分子发生磷酸化，Nrf2 与 Keap1 解聚后转位至细胞核[5]。进入细胞核的 Nrf2 与抗氧化反应元件(Antioxidani response element, ARE)结合，调节众多抗氧化相关的酶基因的表达[6]，如，血红素加氧酶 1（Heme Oxygenase l, HO-1）及超氧化物歧化酶 1(Superoxide dismutase 1, SOD1)等。Nrf2-ARE 通路是细胞抵御氧化应激等外界刺激的重要途径。敲除 Nrf2 基因的大鼠对毒性物质和致癌物的抵抗力急剧下降[7]。有研究发现，AD 患者中细胞核内的 Nrf2 含量比正常年龄组低[5]。海马区双侧注射转染 Nrf2 基因的慢病毒后提高了转 APP/早老素 1(Presenilin 1, PS1)基因 AD 模型小鼠在水迷宫实验中的空间学习能力。过量表达 Nrf2 对 AD 模型小鼠大脑中 Aβ 的生成和沉积并没有影响，但是降低了大脑中星形胶质细胞的活化及诱导了受 Nrf2 调节 HO-1 基因的表达[8]。这些实验结果提示，Nrf2-ARE 通路可能是个潜在的 AD 治疗靶点。

近年来姜黄素(Curcumin)对 AD 的预防及治疗作用受到极大的关注[9]。流行病学研究显示，亚洲人群 AD 的发病率低于欧美国家。老年人群咖喱饮食与认识能力关系的研究显示，偶尔食用咖喱(<1 次/月)和经常食用咖喱(每月 1 次以上)认知功能好于那些从不食用咖喱或很少使用咖喱者[10]。姜黄素能改善 AD 模型大鼠的行为能力[11]，姜黄素不仅可以使实验鼠大脑中的淀粉样蛋白分解，还能预防这种蛋白的生成[12]，体外实验研究也显示，姜黄素能与寡聚及纤维态 Aβ 结合[13]。本课题组的前期研究也表明，姜黄素能够抑制 Aβ 诱导的神经元凋亡及 tau 蛋白过磷酸化作用[14~15]。

本实验采用 A$\beta_{1\text{-}40}$ 作用于 SH-SY5Y 细胞建立神经元损伤模型，在细胞水平上探讨了 Nrf2-ARE 通路在姜黄素介导的抑制 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导细胞氧化损伤及凋亡过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

SH-SY5SY 细胞购自中国医学科学院，姜黄素（95% HPLC）临用时用 DMSO 溶解成 10 mM 的储备液。化学合成的 A$\beta_{1\text{-}40}$ (95% HPLC)临用时将 2.0 mg A$\beta_{1\text{-}40}$ 溶解于 1800 μL 水中，加入 200 μL 的 PBS 溶液，37 ℃孵育 24 h。PRMI1640 培养基、胎牛血清（Gibco 公司），链霉素—青霉素、四甲基偶氮唑盐（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）（美国 Amresco 公司），MTT 染料（Invitrogen 公司），细胞裂解液（含蛋白酶抑制剂），乳酸脱氢酶活性测剂盒（碧云天公司）。

1.2 SH-SY5Y 细胞培养及分组

SH-SY5Y 细胞复苏后置于 37 ℃含 5 %的 CO_2 培养箱中传代培养培养 (PRMI 1640 培养基+10%胎牛血清+1%链霉素-青霉素溶液)，每 3~4 天传代一次，当加药培养时换成不含血清的培养液培养。

药物分组：(i)正常对照组：加入 0.1%的 DMSO 作溶剂对照；(ii)A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组：A$\beta_{1\text{-}40}$ 经 37 ℃孵育 24 h 后，加入到培养的细胞中，最终浓度 10 μM，作用细胞 24 h。(iii)姜黄素保护组：姜黄素(1 μM、10 μM)预先加入到细胞中，作用 4 h 后，加入经 37 ℃孵育 24 h 的 A$\beta_{1\text{-}40}$，继续孵育细胞 24 h。(iv)姜黄素对照组：细胞培养于含 10 μM 姜黄素的培养基中。

1.3 细胞存活力实验

采用 MTT 测定法测定细胞的生存能力。细胞按 1×10^4 个细胞/孔的密度培养于 96 孔板中，加药培养后，每孔加入 MTT 溶液（终浓度为 0.5 mg/mL），置于 37 ℃含 5% CO_2 的培养箱继续培养 4 h。将细胞培养板配平，放置于冰冻离心机内 4 ℃ 1000 r/min，离心 10 min。小心吸掉上清液，加入 DMSO 150 μL，用移液器轻轻吹打，充分溶解结晶。在酶标仪上选定波长 570 nm(参比波长 630 nm)，测定每孔 OD 值。

1.4 乳酸脱氢酶（LDH）活性检测

细胞按 1×10^4 个细胞/孔的密度培养于 96 孔板中，加药处理后，测定细胞培养液中 LDH 活性。乳酸脱氢酶是一种糖酵解胞质酶，在细胞膜损伤情况下，乳酸由细胞质被释放到细胞培养液中。乳酸脱氢酶活性检测原理：在乳酸脱氢酶的作用下，将乳酸和 NAD^+

还原生成丙酮酸和 NADH，NADH 和 INT(2-p-iodophenyl-3-nitrophenyl tetrazolium chloride)进一步在硫辛酰胺脱氢酶(diaphorase)作用下被催化反应生成 NAD^+ 和强生色物甲臜(formazan)，生成的甲瓒在 490 nm 波长下产生吸收峰，吸光强度与样品中 LDH 的含量成正比。比较不同处理组间的相对吸光强度。

1.5 过氧化氢及胞内活性氧水平测定

细胞按 1×10^4 个细胞/孔的密度培养于 96 孔板中，加药处理后，培养液通过比色法测定细胞培养液中 H_2O_2 水平，原理如下：细胞外液中 H_2O_2 将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+}，Fe^{3+} 然后与二甲基橙染料在特定的溶液中形成紫色的络合物，从而通过测定络合物的吸光度实现对过氧化氢浓度的测定。通过荧光密度法细胞内 ROS 水平，原理如下：没有荧光性的二氯二氢荧光素二乙酸酯(Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA)可以自由穿过细胞膜，进入细胞内后，可以被细胞内的酯酶水解生成不能通透细胞膜的二氯二氢荧光素(Dichloro-dihydro-fluorescein, DCFH)。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光性的 DCFH 生成有荧光性的二氯荧光素(Dichloro-fluorescein, DCF)，从而通过检测 DCF 的荧光密度测定细胞内活性氧的水平。将细胞接种于 24 孔板，药物处理后，加入 DCFH-DA 探针，其终浓度为 10 μM，孵育半小时然后用 PBS 清洗 3 次，加入无酚红培养液，在荧光显微镜下 485 nm 波长激发，记录 530 nm 处的荧光光密度值，比较不同组相对光密度值。

1.6 Western bolt 分析蛋白表达水平

按 5×10^5 个细胞/孔的密度培养于 6 孔板中，药物处理后收集细胞，用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min，4 ℃ 13000 r/min 离心 10 min，收集上清，BCA 法测量蛋白浓度，1:4 比例加上样缓冲液，100 ℃煮沸样品 10 min。SDS-PAGE 分离不同分子量蛋白质，然后电转膜至 PVDF 膜上，用含 5%脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h，4 ℃一抗孵育过夜，用 PBST 漂洗 2 次，PBS 漂洗 1 次，二抗孵育 2 h，同上漂洗数次后用 ECL 发光液检测目标蛋白条带的光密度，quantity one 4.62 软件分析 Western blot 条带光密度灰度值。

1.7 统计学分析

实验结果数据以 Mean±SE 表示，采用 Origin 8.0 软件进行单因素方差分析，组间比较采用 one-way ANOVA 分析，最小显著性差异 $p<0.05$。

2 结果与讨论

2.1 姜黄素对 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的细胞形态的影响

SH-SY5Y 细胞在 10 μM 姜黄素作用下生长良好，并且有较多的细胞突起。而经 10 μM A$\beta_{1\text{-}40}$ 处理 24 h 后，细胞胞体收缩变圆，突起萎缩减少，有的细胞突起断裂。在姜黄素预先处理细胞的保护组中，A$\beta_{1\text{-}40}$ 对细胞的损伤作用比单独 A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组较轻，细胞胞体较完好，细胞突起较多，这提示姜黄素防止了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的细胞损害作用(图 1)。

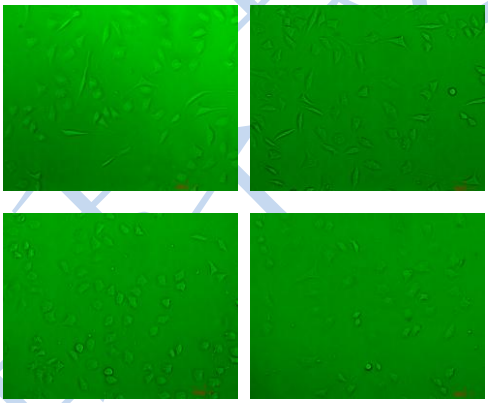


图 1 姜黄素/Aβ 处理前后细胞形态

Fig.1 Morphology of cells treated with curcumin and/or A$\beta_{1\text{-}40}$ for 24 h (100×)

注：姜黄素处理后，细胞生长状态良好；A$\beta_{1\text{-}40}$处理后细胞胞体收缩、突起减少、甚至脱落；姜黄素抑制了A$\beta_{1\text{-}40}$诱导的细胞损伤作用。(a):空白对照组, (b): 10 μM 经黄素, (c): 10 μM A$\beta_{1\text{-}40}$, (d): 10 μM 姜黄素+ 10 μM A$\beta_{1\text{-}40}$。

2.2 细胞外液 LDH 活性

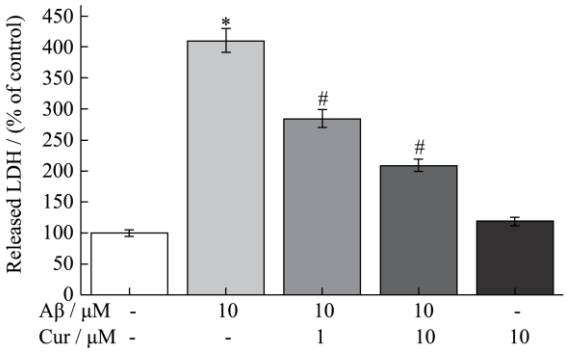


图 2 细胞培养液中 LDH 活性(n=6)

Fig.2 LDH release from cells treated with A$\beta_{1\text{-}40}$ for 24 h in the presence or absence of curcumin

注：A$\beta_{1\text{-}40}$引起LDH释放明显上升，姜黄素抑制了A$\beta_{1\text{-}40}$诱导的LDH释放。* $p<0.05$ 对空白对照组，$^\#$ $p<0.05$ 对 A$\beta_{1\text{-}40}$单独处理组。

10 μM A$\beta_{1\text{-}40}$ 处理细胞后，细胞外液中 LDH 活性与正常对照组相比明显上升，这提示 A$\beta_{1\text{-}40}$ 造成细胞膜损伤，细胞浆蛋白 LDH 释放到细胞外液中；而姜黄素保护组中细胞外液中 LDH 的活性明显比 10 μM A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组明显减小，而姜黄素药物对照组与空白对照组没有显著差异，以上结果提示姜黄素预先保护细胞后，A$\beta_{1\text{-}40}$ 对细胞膜的损伤程度减轻(图 2)。

2.3 姜黄素抑制 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的细胞凋亡作用

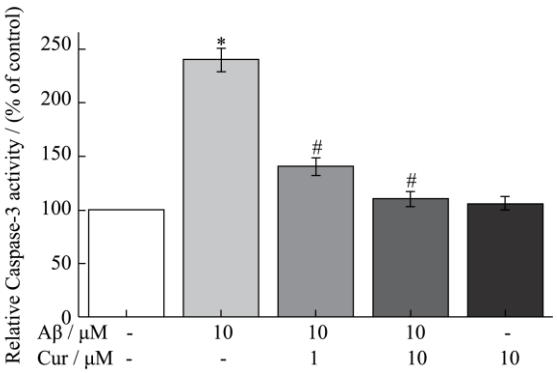


图 3 姜黄素削弱了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的 Caspase-3 活化(n=6)

Fig.3 Curcumin attenuates A$\beta_{1\text{-}40}$-induced activation of caspase-3

注：*p<0.05对空白对照组,#p<0.05对A$\beta_{1\text{-}40}$单独处理组。

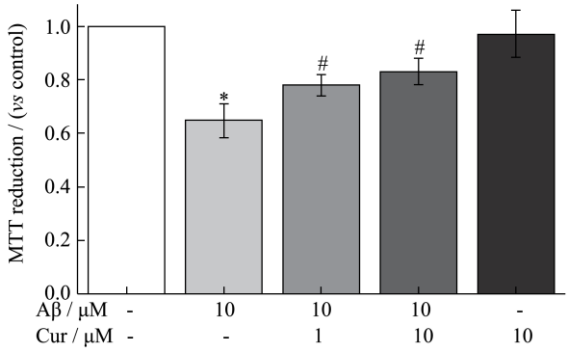


图 4 细胞对 MTT 染料的氧化能力(n=6)

Fig.4 MTT reduction of cells treated with A$\beta_{1\text{-}40}$ for 24 h in the presence or absence of curcumin

注：A$\beta_{1\text{-}40}$降低了线粒体还原MTT染料的能力，姜黄素增强了A$\beta_{1\text{-}40}$处理细胞对MTT染料的还原能力。*p<0.05对空白对照组,#p<0.05对A$\beta_{1\text{-}40}$单独处理组。

与空白对照组相比，A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组细胞中半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-3（Caspase-3）的活性明显增强，而姜黄素保护组细胞Caspase-3活性与A$\beta_{1\text{-}40}$损伤组相比则明显下降 （图 3）。另外，A$\beta_{1\text{-}40}$ 作用细胞后，细胞对 MTT 染料的还原能力降低，提示细胞的线粒体呼吸链琥珀酸脱氢酶生物活性降低，A$\beta_{1\text{-}40}$ 降低了细胞的生存能力；而姜黄素保护组中，细胞对 MTT 染料的还原能力比 A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组明显增强，表明细胞预先经姜黄素保护后，减轻了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 对琥珀酸脱氢酶活性的损伤作用。这提示，细胞经姜黄素预先保护后抑制了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 对细胞凋亡信号的启发和细胞生存能力的损伤作用(图 4)。

2.4 姜黄素降低 Aβ 诱导的细胞氧化应激水平

与空白对照组相比，A$\beta_{1\text{-}40}$ 处理组培养液中的 H_2O_2 含量明显升高（约为空白对照组含量的 3.4 倍），而姜黄素保护组细胞培养液中 H_2O_2 含量与 A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组相比则明显下降（图 5）。相似地，A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组中胞内 ROS 的水平与空白对照组相比明显上升，而姜黄素保护组中胞内 ROS 的水平比 A$\beta_{1\text{-}40}$ 损伤组明显降低(图 6)。这提示细胞经姜黄素预先保护后，削弱了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的细胞氧化应激作用，降低了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 导致的细胞氧化损伤。

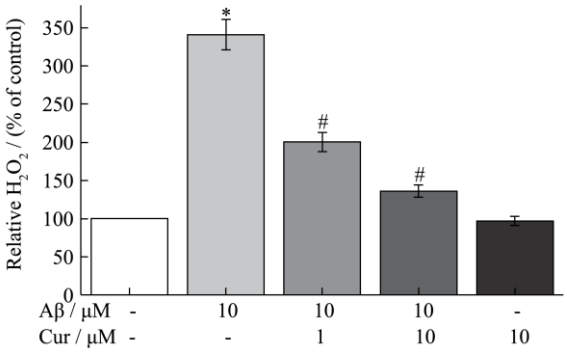


图 5 培养液中 H_2O_2 相对含量(n=6)

Fig.5 Relative concentration of H_2O_2 in the culture medium

注：*p<0.05对空白对照组,#p<0.05对A$\beta_{1\text{-}40}$单独处理组。

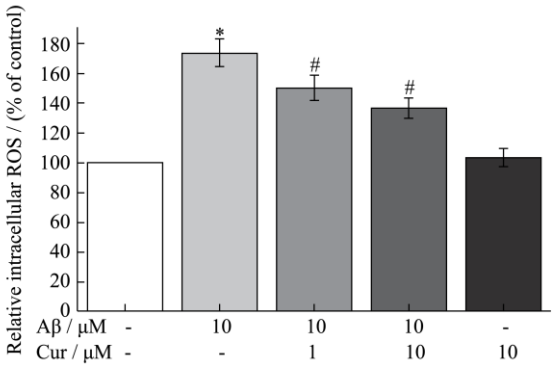


图 6 胞内活性氧相对含量(n=6)

Fig.6 Relative levels of intracellular ROS

注：*p<0.05对空白对照组,#p<0.05对A$\beta_{1\text{-}40}$单独处理组。

2.5 姜黄素削弱了 A$\beta_{1\text{-}40}$ 诱导的 Nrf2-ARE 活化作用

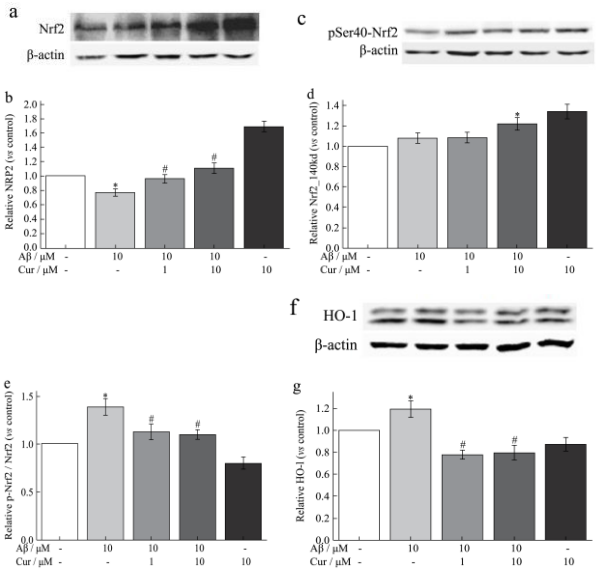


图 7 姜黄素对 Aβ_{1-40}诱导的 Nrf2-ARE 通路活性的影响（n=3）

Fig.7 Effect of curcumin on Aβ_{1-40}-induced activation of Nrf2-ARE

注：*p<0.05对空白对照组,#p<0.05对Aβ_{1-40}单独处理组。

Aβ_{1-40} 处理细胞后，Nrf2 蛋白表达量与空白对照组相比明显降低，但是细胞经姜黄素处理后能明显诱导 Nrf2 的表达，削弱 Aβ_{1-40} 诱导的 Nrf2 表达水平的降低作用（如图 7a、b 所示）。Nrf2 对目标基因的转录活性受 Nrf2 磷酸化水平的调控，Nrf2 磷酸化后转位至细胞核内与目标 DNA 的增强序列结合，增加目标基因的表达。与空白对照组相比，Aβ_{1-40} 损伤组中 Nrf2 的 Ser-40 磷酸化水平（相对 β-actin 内参）与空白对照组相比并没有明显的变化。姜黄素保护组中 Nrf2 的 Ser-40 磷酸化相对水平（相对 β-actin 内参）与 Aβ_{1-40} 损伤组呈上升趋势，10 μM 姜黄素保护条件下显示统计差异。但是，相对于 Nrf2 蛋白本身，Aβ_{1-40} 损伤组中细胞 Ser-40 磷酸化的 Nrf2 含量则明显比空白对照组升高，而姜黄素保护组中磷酸化 Nrf2 的含量与 Aβ_{1-40} 损伤组相比则明显下降。姜黄素对照组中 Ser-40 磷酸化 Nrf2 相对 β-actin 内参水平与空白组相比也明显上升，这可能与经黄素本身能够诱导 Nrf2 高表达有一定的关系；而相对 Nrf2 本身含量，Ser-40 磷酸化 Nrf2 的含量与空白组相比则明显降低，这可能与姜黄素本身具有较强的抗氧化能力作用相关，在姜黄素的抗氧化作用下，细胞不用激发较大的抗氧化防疫系统蛋白的转录表达作用。进一步的 Nrf2 下游调控基因表达产物 HO-1 实验表明，Aβ_{1-40} 处理细胞后 HO-1 表达水平升高，而姜黄素预先保护细胞后，抑制了 Aβ_{1-40} 诱导的 HO-1 表达上升水平。以上实验结果提示，姜黄素削弱了 Aβ_{1-40} 诱导的 Nrf2 对目标 DNA 调控序列的转录活性。

3 结论

AD 是一种常见的中枢神经系统退行性疾病，AD 患者脑内 Aβ 的过量产生以及其清除机制的失调可能导致 Aβ 的沉积，Aβ 诱导的氧化应激损伤可能是神经元凋亡的诱导因素。内源性抗氧化应激调节 Nrf2-ARE 信号通路是细胞重要的抵御氧化应激等外界不良环境影响的重要途径。Nrf2 的失调导致肌体自身抗氧化能力的低下可能促进了 AD 的发生发展进程。本研究的实验结果表明，姜黄素削弱了 Aβ_{1-40} 诱导的 SH-SY5Y 细胞氧化损伤和细胞凋亡作用，姜黄素上调了 Nrf2 的表达，这可能与姜黄素抑制 Aβ 的氧化损伤毒性密切相关。因此，姜黄素对 Nrf2-ARE 信号通路的调节作用可能有利于抑制 Aβ 诱导的神经毒性作用。

参考文献

[1] Muramori F, K Kobayashi, I Nakamura. A quantitative study of neurofibrillary tangles, senile plaques and astrocytes in the hippocampal subdivisions and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, normal controls and non-Alzheimer neuropsychiatric diseases [J]. Psychiatry Clin Neurosci, 1998. 52(6): 593-599

[2] Huang H C, Z F Jiang. Amyloid-beta protein precursor family members: a review from homology to biological function [J]. J. Alzheimers Dis., 2011. 26(4): 607-626

[3] Dong S, Y Duan, Y Hu, et al., Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis [J]. Transl Neurodegener, 2012. 1(1): 18, doi: 10.1186/2047-9158-1-18

[4] Pullarkat V, Z Meng, S M Tahara, et al., Proteasome Inhibition Induces Both Antioxidant and Hb F Responses in Sickle Cell Disease Via the Nrf2 Pathway [J]. Hemoglobin, 2014, 38(3):188-195

[5] Ramsey C P, C A Glass, M B Montgomery, et al., Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases [J]. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 2007, 66(1): 75-85

[6] Gao B, A Doan, B M Hybertson. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders [J]. Clin Pharmacol, 2014. 6: 19-34

[7] Zhao F, T Wu, A Lau, et al., Nrf2 promotes neuronal cell differentiation [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2009. 47(6): 867-79

[8] Kanninen K, R Heikkinen, T Malm, et al., Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial

learning in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2009. 106(38): 16505-16510

[9] Hamaguchi T, K Ono, M Yamada. REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease [J]. CNS Neurosci Ther, 2010. 16(5): 285-297

[10] Chandra V, R Pandav, H H Dodge, et al. Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study [J]. Neurology, 2001. 57(6): 985-989

[11] Wang Y, H Yin, L Wang, et al. Curcumin as a potential treatment for Alzheimer's disease: a study of the effects of curcumin on hippocampal expression of glial fibrillary acidic protein [J]. Am. J. Chin. Med., 2013. 41(1): 59-70

[12] Yang F, G P Lim, A N Begum, et al., Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo [J]. J. Biol. Chem., 2005, 280(7): 5892-5901

[13] Yanagisawa D, H Taguchi, A Yamamoto, et al., Curcuminoid binds to amyloid-beta1-42 oligomer and fibril [J]. J. Alzheimers Dis., 2011, 24 Suppl 2: 33-42.

[14] Huang H C, P Chang, X L Dai, et al., Protective effects of curcumin on amyloid-beta-induced neuronal oxidative damage [J]. Neurochem Res., 2012. 37(7): 1584-1597

[15] Huang H C, D Tang, K Xu, et al., Curcumin attenuates amyloid-beta-induced tau hyperphosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells involving PTEN/Akt/GSK-3beta signaling pathway [J]. J. Recept Signal Transduct Res., 2014. 34(1): 26-37

现代食品科技