

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2020.02.011

## 自噬在皮质酮致 HT-22 细胞损伤中的作用

郑 静<sup>1</sup>, 苏 丹<sup>2</sup>, 李绍念<sup>1</sup>, 孙 娟<sup>1</sup>, 潘玉琪<sup>1</sup>, 李 欢<sup>1</sup>, 柳 丽<sup>1</sup>, 宋国强<sup>1</sup>

(1.常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164;2.常州市第二人民医院,江苏 常州 213003)

**摘要:**主要探讨自噬在皮质酮(CORT)诱导小鼠海马神经元 HT-22 细胞损伤中的作用。以不同浓度 CORT (0,50,100,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 HT-22 细胞 24 h 或 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 处理 HT-22 细胞不同时间(0,4,8,12,24,48 h)后,镜下观察细胞形态,MTS 法检测细胞活力,Western blot 检测自噬标志物 LC3 及 p62 蛋白表达;同时进一步考察自噬诱导剂 Rapamycin 和自噬抑制剂 3-Methyladenine(3-MA)对 CORT 神经毒性的影响。结果发现 CORT 可呈剂量和时间依赖性地降低 HT-22 细胞活力并诱导细胞发生明显的形态学变化。与对照组相比,随着 CORT 浓度的增加,自噬体形成标志蛋白 LC3 II/LC3 I 的比值显著升高,自噬底物蛋白 p62 的表达并无明显变化。然而,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 作用于 HT-22 细胞不同时间后,LC3 II/LC3 I 比值均升高,在 48 h 时最为显著( $P < 0.01$ ),同时 p62 的表达呈现先增加后逐步减少趋势。此外,与 CORT 组比,诱导自噬加重了 CORT 对 HT-22 细胞的损伤,而抑制自噬则减轻了 CORT 的细胞毒性。研究表明皮质酮增加了 HT-22 细胞的自噬水平,自噬介导了皮质酮诱导的 HT-22 细胞损伤,抑制自噬可以减轻皮质酮的神经毒性。

**关键词:**皮质酮;自噬;细胞损伤

中图分类号:R 964

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2020)02-0080-07

## Role of Autophagy in Corticosterone-Induced Neurotoxicity in HT-22 Cells

ZHENG Jing<sup>1</sup>, SU Dan<sup>2</sup>, LI Shaonian<sup>1</sup>, SUN Juan<sup>1</sup>, PAN Yuqi<sup>1</sup>,  
LI Huan<sup>1</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, SONG Guoqiang<sup>1</sup>

(1.School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2.Changzhou No.2 People's Hospital, Changzhou 213003, China)

**Abstract:** This article was prompted to evaluate whether autophagy was involved in corticosterone (CORT)-induced HT-22 cells injury. HT-22 cells were treated with different concentrations of CORT (0, 50, 100, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 24 h or 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT for different time (0, 4, 8, 12, 24,

收稿日期:2019-10-19。

基金项目:常州市卫生健康委员会重大项目资助(ZD201911)。

作者简介:郑静(1995—),女,江苏盐城人,硕士生。通信联系人:宋国强(1969—),E-mail: sgq@cczu.edu.cn

引用本文:郑静,苏丹,李绍念,等. 自噬在皮质酮致 HT-22 细胞损伤中的作用[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2020,32(2):80-86.

48 h) respectively. The cell morphologies were observed by inverted microscope, the cell viabilities were detected by MTS assay and the expressions of autophagy markers LC3 and p62 were detected by Western blot. The effects of autophagy on CORT-induced neurotoxicity were also determined after 3-Methyladenine (3-MA) and Rapamycin treatment. CORT had a dose and time dependent effect on cell viabilities and induced obvious morphological changes in cells. Compared with the control group, the ratio of LC3II/LC3I was significantly increased with increasing concentrations of CORT, while p62 expression did not show any significant changes. Additionally, with increasing exposure time of 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT, the ratio of LC3II/LC3I was also significantly increased with the highest level at 48 h after treatment ( $P < 0.01$ ), while p62 expression was increased at 4, 8, 12 h and then gradually decreased at 24 and 48 h. Moreover, co-treatment with autophagy inducer enhanced the neurotoxicity of CORT and co-treatment with autophagy inhibitor alleviated the neurotoxicity of CORT. These results indicated that CORT increased the level of autophagy in HT-22 cells and autophagy mediated the CORT-induced cytotoxicity. Inhibition of autophagy could reduce the neurotoxicity of CORT.

**Key words:** corticosterone; autophagy; cell injury

应激(stress)是指机体受到内外环境因素刺激时做出的非特异性全身性反应,主要表现为下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴的激活及大量应激激素的释放<sup>[1-2]</sup>。其中糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)是主要的应激激素之一,在 HPA 轴的负反馈调控下,适宜的应激即正常浓度的 GCs 有助于机体适应内外环境的变化;而长期应激则将引起 HPA 轴的持续激活和负反馈调控受损,并导致体内 GCs 维持在高水平。研究显示,HPA 轴亢进和高水平 GCs 与多种情绪和认知障碍的发生密切相关<sup>[3-4]</sup>。临床使用类固醇激素常伴随着注意力下降、失眠、紧张等中枢不良反应<sup>[5]</sup>。实验室研究也表明外源性皮质酮(corticosterone, CORT)不仅可以在体外诱导神经细胞损伤,更能诱发动物的焦虑和抑郁样行为<sup>[6-7]</sup>。然而, CORT 诱导神经元损伤的机制尚未完全阐明,可能与内质网应激、氧化应激及神经营养因子减少等有关<sup>[8-10]</sup>。

近年来,自噬(autophagy)在中枢神经系统疾病中的作用受到越来越多的关注<sup>[11-12]</sup>。自噬是一种由溶酶体介导的细胞内分解代谢过程,通过降解及循环利用受损或衰老的细胞器和蛋白质来实现胞内物质的更新,从而维持细胞稳态和能量平衡<sup>[13]</sup>。正常神经细胞内自噬维持在较低的基础水平,以及时清除细胞内的代谢废物,防止有毒物质的异常堆积,并在细胞遭受轻度应激时适度激活,以保护神经细胞免于凋亡和坏死。然而,在严重或持续的伤害性刺激(如饥饿、氧化应激、内质网应激等)下,自噬则被过度激活,降解过多的细胞器或自身蛋白,在超过了自身的代偿范围时则会导致细胞死亡。自噬就像一把双刃剑,正常水平的自噬对神经元起保护作用,而自噬过度或不足都将引起神经元的损伤<sup>[14-16]</sup>。然而, CORT 致神经细胞损伤的过程中是否存在自噬的异常尚无研究报道。

因此,本研究拟采用永生型小鼠海马神经元 HT-22 细胞构建 CORT 损伤模型,并联合自噬诱导剂和抑制剂,探讨自噬在 CORT 致神经细胞损伤中的作用,以进一步完善 CORT 损伤神经元的机制,为应激状态下中枢神经元的保护提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物、试剂及仪器

皮质酮, 3-MA, Rapamycin 购于 sigma 公司;高糖 DMEM, 青霉素/链霉素, 胰酶购于美国 Gibco 公

司;胎牛血清购于 ScienCell 生物公司;WB/IP 裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒,ECL 发光液,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 购自碧云天生物科技研究所;兔抗 LC3 抗体,兔抗 p62 抗体,鼠抗  $\beta$ -actin 抗体购于 Abways 公司;MTS 试剂盒购于贝博生物公司;二氧化碳细胞培养箱购于日本 Sanyo 公司;多功能酶标仪购于美国 BioTek 公司;化学发光成像仪购于 Tannon 公司;倒置显微镜购于 Sony 公司。

## 1.2 细胞培养及分组

小鼠海马神经元 HT-22 细胞由徐州医科大学药学院馈赠。HT-22 细胞用含 10% 胎牛血清和含 1% 的青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养基,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养,隔两天传代一次。为了探讨 CORT 损伤与 CORT 剂量之间的关系,将细胞分为对照组,24 h CORT 处理组(50,100,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ );为了探讨 CORT 损伤与 CORT 作用时间之间的关系,将细胞分为对照组,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 处理组(4,8,12,24,48 h);为了探讨自噬在 CORT 损伤 HT-22 细胞中的作用,将细胞分为对照组,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT,3-MA,Rapamycin,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT + 3-MA,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT+Rapamycin 组,处理时间为 24 h。

## 1.3 倒置显微镜下观察 HT-22 细胞形态

将 HT-22 细胞以  $4 \times 10^4$  个/孔的密度种于 6 孔板内,待细胞生长融合到 80% 左右加入不同浓度 CORT(0,50,100,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 24 h,于倒置显微镜下观察并拍照。

## 1.4 MTS 检测细胞活力

取对数生长期的 HT-22 细胞以  $1.5 \times 10^3$  个/孔的密度种于 96 孔板内,待细胞生长融合到 80% 左右进行药物处理,各组细胞经过相应处理后,弃去旧培养基,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  新鲜高糖 DMEM 培养基及 10  $\mu\text{L}$  MTS 溶液,37 °C 孵育 2~3 h 后在酶标仪上测定波长 490 nm 处的吸光度值。

## 1.5 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达

将 HT-22 细胞以  $4 \times 10^4$  个/孔的密度种于 6 孔板内,待细胞生长融合到 80% 左右进行药物处理。各组细胞经不同浓度和不同时间处理后,使用裂解液裂解细胞,提取总蛋白。BCA 法测定细胞蛋白浓度,每组取 20  $\mu\text{g}$  蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% BSA 室温封闭处理 1.5 h,然后加入 1:1 000 稀释的 p62,LC3, $\beta$ -actin 抗体 4 °C 反应过夜,第 2 d TBST 洗膜 5 次,加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 5 次后进行显影。将显影所得的 p62,LC3 和  $\beta$ -actin 条带通过 ImageJ 软件进行灰度值分析,计算 p62 和 LC3 相对蛋白表达量。本组实验重复 3 次。

## 1.6 统计学处理

采用 Graphpad Prism7 对数据进行统计学分析。实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析或  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结 果

## 2.1 CORT 对 HT-22 细胞形态的影响

以不同浓度 CORT(0,50,100,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )诱导 HT-22 细胞损伤 24 h 后镜下观察细胞形态变

化,图 1(a)显示空白对照组细胞贴壁生长,胞体饱满,胞体呈梭形,有明显的突起。图 1(b)至图 1(d)显示不同剂量 CORT 处理组则可见细胞生长被不同程度抑制,且随着 CORT 剂量的加大,细胞数目减少,细胞间隙增大,胞体变圆,突触减少。

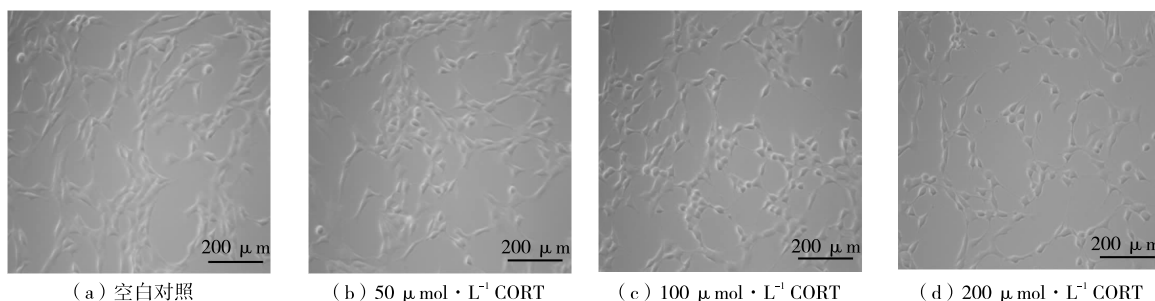


图 1 不同浓度 CORT 诱导 HT-22 细胞 24 h 形态变化

Fig.1 Morphological changes of HT-22 cells induced by different concentrations of CORT for 24 h

## 2.2 CORT 对 HT-22 细胞活力的影响

由图 2(a)可见,与空白对照组相比,HT-22 细胞在 50,100,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 处理 24 h 后,细胞的活力呈剂量依赖性下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );由图 2(b)可见,200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 处理细胞 4,8,12,24,48 h 后,细胞活力同样也呈现时间依赖性下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

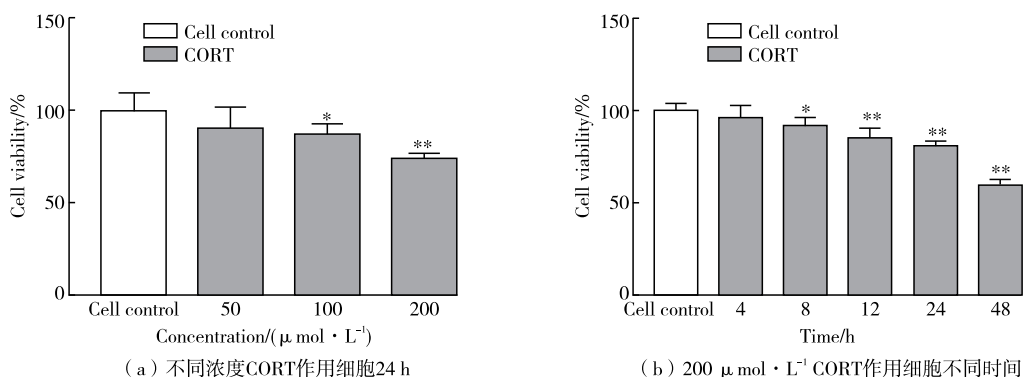


图 2 CORT 对 HT-22 细胞活力的影响

Fig.2 Effect of CORT on the viabilities of HT-22 cells

## 2.3 CORT 对 HT-22 细胞 LC3 和 p62 蛋白表达的影响

为了探讨自噬是否参与了 CORT 诱导的细胞损伤,图 3(a)和图 3(b)运用 Western blot 技术检测在不同浓度 CORT 和单一浓度 CORT 不同时间处理下 HT-22 细胞内 LC3 和 p62 蛋白的表达情况。图 3(c)结果显示,不同剂量 CORT 处理后,HT-22 细胞内 LC3 I 和 LC3 II 的蛋白表达均有所上调,且标志自噬激活的 LC3 II /LC3 I 比值增加极为显著( $P < 0.01$ ),与此同时,图 3(d)结果显示自噬底物蛋白 p62 的表达未有明显改变。而图 3(e)和图 3(f)结果显示在 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 作用于 HT-22 不同时间后,LC3 II /LC3 I 比值与 p62 蛋白均发生了明显改变,主要表现为 LC3 II /LC3 I 比值在 24 h 和 48 h 时显著上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而 p62 蛋白的表达则呈现出早期增加后期减少的现象。

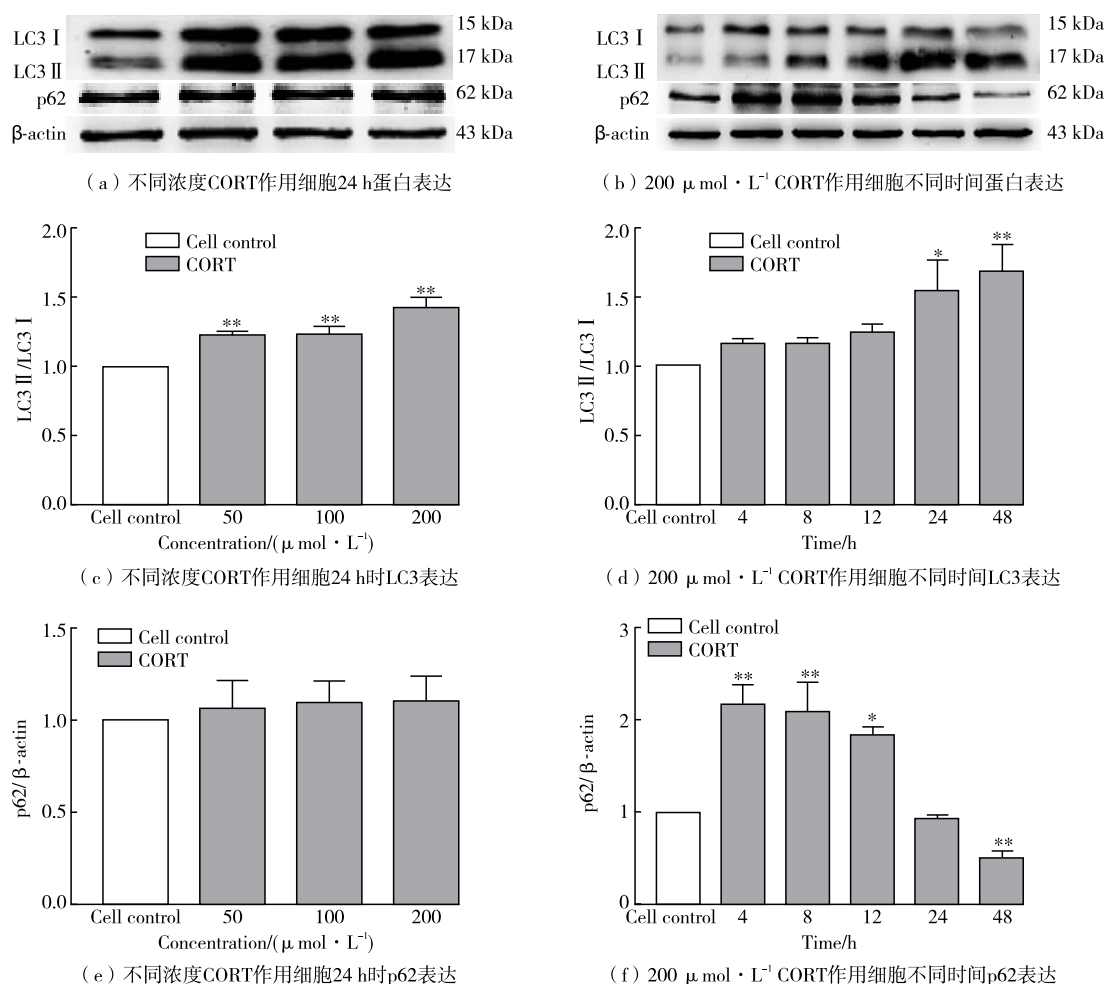


图3 Western blot 检测 CORT 对 HT-22 细胞中 LC3 和 p62 蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of CORT on expression of LC3 and p62 proteins in HT-22 cells detected by Western blot

## 2.4 抑制自噬和诱导自噬对 CORT 致 HT-22 细胞损伤的影响

为了确证自噬在 CORT 损伤细胞中的作用,进一步联合自噬抑制剂 3-MA 或诱导剂 Rapamycin 考察 CORT 对 HT-22 细胞活力的影响。结果显示(图 4),400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Rapamycin 对细胞活力没有影响,但却能加重 CORT 的细胞毒性( $P < 0.05$ );625  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3-MA 同样对细胞活力没有影响,但却能明显减轻 CORT 对 HT-22 细胞的损伤( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

高水平 CORT 是严重或长期应激导致动物出现焦虑、抑郁、认知障碍等行为的重要原因,然而 CORT 损伤中枢神经的机制尚不明确<sup>[17-18]</sup>。自噬是细胞为了维持自身内环境稳定而通过溶酶体降解或清除细胞内错误折叠蛋白以及受损或老化细胞器的过程。目前研究发现,自噬参与了多种中枢神经

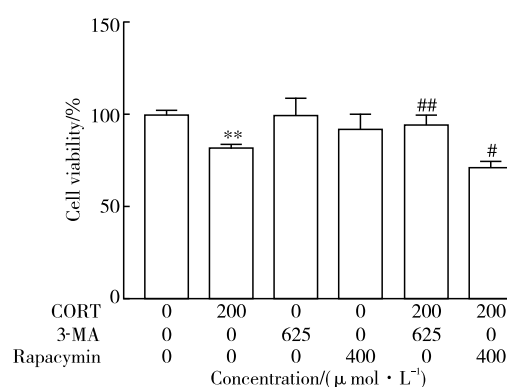


图4 联合自噬抑制剂 3-MA 和诱导剂 Rapamycin 检测 CORT 作用 24 h 对 HT-22 细胞活力的影响

Fig.4 Effect of CORT on the viability of HT-22 cells after 3-MA and Rapamycin intervention for 24 h

系统疾病的发生发展<sup>[19-21]</sup>。但在 CORT 致神经元损伤过程中是否存在自噬的异常及自噬在该过程中的作用还未知。本研究选用小鼠海马神经元 HT-22 细胞作为研究对象,探讨细胞自噬是否参与了 CORT 诱导的神经细胞损伤。

本研究首先观察到 CORT 可呈时间和剂量依赖性地降低 HT-22 细胞的活力,同时引起细胞形态发生显著改变,这与 XU 等研究基本一致<sup>[22]</sup>。已知 LC3(微管相关蛋白 1 轻链 3, microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP-1-LC3)是自噬前体膜延伸和自噬体形成的关键蛋白,LC3 可分为胞浆可溶型的 LC3 I 和膜结合型的 LC3II 两种类型,LC3 I 在 ATG7 的作用下裂解并与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)结合为 LC3II,当自噬体与溶酶体融合后,部分 LC3II 可转化为 LC3I 被循环利用。因此,LC3II 的含量或 LC3 II /LC3 I 的比值是表征自噬的重要指标<sup>[23-24]</sup>。在本研究中,随着 CORT 剂量的增加和作用时间的延长,均可见 LC3 II /LC3 I 比值的显著增加,尤其在  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CORT 作用于 HT-22 细胞 48 h 即细胞受损最严重时 LC3 II /LC3 I 比值最高,这充分说明,在 CORT 损伤神经细胞的过程中存在显著的自噬激活和自噬体增多。

然而,LC3II 表达水平的上调可能是自噬水平增加也可能是自噬体降解障碍所致,因此本研究同时考察了 CORT 诱导细胞损伤过程中另一标志蛋白 p62 的表达情况。p62 蛋白,也称为 SQSTM1 或 Sequestome 1,是一种多功能泛素结合蛋白。p62 通过自身不同的结构域与 LC3 和泛素化蛋白结合并转运到自噬体中,最终经自噬溶酶体通路降解。因此,p62 可以作为自噬流的检测指标,且 p62 的表达减少是自噬溶酶体降解增强的重要标志<sup>[25-26]</sup>。本研究中,不同浓度 CORT 作用于 HT-22 细胞后未见 p62 蛋白出现明显变化,说明随着 CORT 浓度的增加虽然自噬体形成增多但自噬体的降解过程并未受到明显影响。然而,随着 CORT 作用于 HT-22 细胞时间的延长,p62 蛋白表达呈现先增加后逐渐减少的趋势,且在 48 h 显著低于对照,再次说明细胞受损最严重时细胞内的自噬活性最强。

为了探索自噬在 CORT 致小鼠海马神经细胞损伤中的作用,本研究进一步采用自噬抑制剂和诱导剂改变细胞自噬水平,考察其对 CORT 神经毒性的影响。结果显示对细胞活力没有影响的自噬诱导剂 Rapamycin 加重了 CORT 的神经毒性,而自噬抑制剂 3-MA 则明显减轻了 CORT 对 HT-22 细胞的损伤。这些结果再次表明,自噬参与了 CORT 对 HT-22 细胞的损伤,抑制自噬能够对细胞起到保护作用。

## 4 结 论

自噬激活是 CORT 体外损伤小鼠海马神经元的重要机制,抑制自噬能保护中枢神经细胞免受 CORT 的伤害。本研究结果进一步阐明了应激激素诱导中枢神经损伤的机制,并为与应激相关神经精神类疾病的新药开发和临床治疗提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1]SIVAPRIYA R M, CIDLOWSKI J A. Corticosteroids mechanisms of action in health and disease[J]. Rheum Dis Clin N Am, 2016, 42(1):15-31.
- [2]KOOLHAAS J M, BARTOLOMUCCI A, BUWALDA B, et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept[J]. Neurosci Biobehav R, 2011, 35(5):1291-1301.
- [3]TOMOSHIGE K. Stress, glucocorticoid hormones, and hippocampal neural progenitor cells: implications to mood disorders[J]. Front Physiol, 2015, 6:230-239.
- [4]BREMNER J D. Does stress damage the brain[J]. Biol Psychiat, 2005, 45(7): 797-805.
- [5]HOUGARDY D M, PETERSON G M, BLEASEL M D, et al. Is enough attention being given to the adverse effects

- of corticosteroid therapy[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2000, 25(3):227-234.
- [6] NAKATANI Y, TSUJI M, AMANO T, et al. Neuroprotective effect of yokukansan against cytotoxicity induced by corticosterone on mouse hippocampal neurons[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1458-1465.
- [7] DELAIR B, GIVALOIS L, BRUREAU A, et al. Deregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions in an Alzheimer's disease rat model[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(5):1426-1439.
- [8] BRUNDEN K R, IBA M, CARROLL J C, et al. Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(40):14436-14449.
- [9] TAKEDA H, TSUJI M, MATSUMIYA T. Formation mechanisms of stress adaptation: role of functional coupling of glucocorticoids and brain serotonergic nervous system[J]. *J Psychopharmacol*, 2000, 20(3):83-91.
- [10] PATEL N V, FINCH C E. The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging[J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(5):707-717.
- [11] ZHANG Z, MIAH M, CULBRETH M, et al. Autophagy in neurodegenerative diseases and metal neurotoxicity[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(1/2):409-422.
- [12] GUO F, LIU X Y, CAI H B, et al. Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy[J]. *Brain Pathology*, 2017, 28(1):3-13.
- [13] PANTOVIC A, KRSTIC A, JANJETOVIC K, et al. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Bone*, 2013, 52(1):524-531.
- [14] ZHANG J B, CAO R, CAI T J, et al. The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration[J]. *Neurotox Res*, 2013, 24(4):478-490.
- [15] AHMED I, LIANG Y D, SCHOOLS S, et al. Development and characterization of a new Parkinson's disease model resulting from impaired autophagy[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(46):16503-16509.
- [16] LI Z Y, WU Y F, XUX C, et al. Autophagy as a double-edged sword in pulmonary epithelial injury: a review and perspective[J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2017, 313(2):207-217.
- [17] CHEN Y, REX C S, RICE C J, et al. Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(29):13123-13128.
- [18] BO X C, XU Y R, CHENG X R, et al. Effects of 5-h multimodal stress on the molecules and pathways involved in dendritic morphology and cognitive function[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2015, 123:225-238.
- [19] UDDIN M S, STACHOWIAK A, MAMUN A A, et al. Autophagy and Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to therapeutic implications[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10(4):1-18.
- [20] JIA J, LE W D. Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression[J]. *Neurosci Bull*, 2015, 31(4):427-434.
- [21] ZHANG J, CULP M L, CRAVER J G, et al. Mitochondrial function and autophagy: integrating proteotoxic, redox, and metabolic stress in Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2018, 144(6):691-709.
- [22] XU Y, ZHANG C, WANG R, et al. Corticosterone induced morphological changes of hippocampal and amygdaloid cell lines are dependent on 5-HT<sub>7</sub> receptor related signal pathway[J]. *Neuroscience*, 2010, 182(3):71-81.
- [23] POORNIMA P, WENG C F, PADMA V V. Neferine from *Nelumbo nucifera* induces autophagy through the inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and ROS hyper generation in A549 cells[J]. *Food Chem*, 2013, 141(4): 3598-3605.
- [24] ZHANG H N, WU H, YE J, et al. Acute exposure to thimerosal induces antiproliferative properties, apoptosis, and autophagy activation in human Chang conjunctival cells[J]. *Graef Arch Clin Exp*, 2014, 52(2):275-284.
- [25] ERUSTES A G, STEFANI F Y, TERASHIMA J Y, et al. Overexpression of  $\alpha$ -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis[J]. *J Neurosci Res*, 2018, 96(1):160-171.
- [26] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, HAAPASALO A, et al. Emerging role of p62/sequestosome-1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2012, 96(1):90-95.

(责任编辑:殷丽莉)