

谷氧还蛋白 rbGrx 可延缓 CL4176 秀丽隐杆线虫中 β 淀粉样蛋白诱导的毒性

李芳^{1),3)}, 崔晓东¹⁾, 马晓丽²⁾, 李娇²⁾, 王转花^{1), 2)}*

(¹⁾ 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 太原 030006;

²⁾ 山西大学 生命科学院 生物工程系, 太原 030006; ³⁾ 山西医学科学院 山西大医院 肿瘤内科, 太原 030032)

摘要 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与衰老相关的神经退行性疾病, 其中 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 诱导的细胞毒性被认为是其发病的主要原因。本文以 A β 转基因秀丽隐杆线虫 CL4176 为模型, 研究了重组荞麦谷氧还蛋白 (recombinant buckwheat glutaredoxin, rbGrx) 对 A β 诱导的毒性和氧化应激的影响。结果显示, 4 μ mol/L rbGrx 可以延长 CL4176 线虫平均寿命达 20% 左右, 并增加衰老虫体运动能力约 43.6%, 延迟产卵高峰期 1 d, 同时可以有效延缓 A β 毒性诱导的瘫痪表型。进一步研究发现, 在正常条件和 A β 诱导毒性时, rbGrx 均能降低 CL4176 线虫体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 并上调 SOD 活性和 GSH 含量。另外, rbGrx 下调 A β mRNA 水平 44.1%, 减少 A β 沉积量, 并且明显上调热激因子 1 *hsf-1* (2.01 倍) 和 *hsp-16.2* (2.65 倍) mRNA 表达水平。这表明, rbGrx 通过降低 CL4176 线虫体内的 ROS 水平和上调热激蛋白质的转录表达水平, 降低 CL4176 秀丽隐杆线虫中 A β 诱导的毒性。结果提示, rbGrx 可能具有预防 AD 的潜力。

关键词 重组荞麦谷氧还蛋白; β -淀粉样蛋白; AD 模型秀丽隐杆线虫; 热激因子 1

中图分类号 Q599

Glutaredoxin Delays the Toxicity Induced by β -amyloid in AD Transgenic *C. elegans*

LI Fang^{1),3)}, CUI Xiao-Dong¹⁾, MA Xiao-Li²⁾, LI Jiao²⁾, WANG Zhuan-Hua^{1), 2)}*

(¹⁾ Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; ²⁾ College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

³⁾ Shanxi Academy of Medical Sciences, Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan 030032, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease, of which β -amyloid (A β) induced toxicity was suggested as a main cause. We investigated the effects of recombinant buckwheat glutaredoxin (rbGrx) on A β -induced toxicity and oxidative stress in a transgenic AD *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model. Our study showed that rbGrx not only increased the lifespan and locomotion by 20% and 43.6% respectively, but also delayed spawning peak for 1 day and A β -induced paralysis in the transgenic model as compared with control group. Further study indicated that rbGrx upregulated the SOD activity for 2.5-fold and the GSH content for 2.19-fold, leading to a low intracellular level of reactive oxygen species (ROS) in AD transgenic *C. elegans* in both normal and A β -

收稿日期: 2018-03-12; 修回日期: 2018-05-16; 接受日期: 2018-05-27

国家自然科学基金项目 (No. 31600631, No. 31300653) 和山西省青年科技研究基金 (No. 201601D202102) 资助

* 通讯作者 Tel: 0351-7011499; E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

Received: March 12, 2018; Revised: May 16, 2018; Accepted: May 27, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31600631 and No. 31300653) and Natural Science Foundation for Young Scientists of Shanxi Province (No. 201601D202102)

* Corresponding author Tel: 0351-7011499; E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

induced paralysis condition. Moreover, rbGrx down-regulated $A\beta$ mRNA level by 44.1% and decreased the amount of $A\beta$ deposits. rbGrx also significantly increased the mRNA expression levels of *hsf-1* and *hsp-16.2* by 2.01-fold and 2.65-fold, respectively. Taken together, these results suggested that rbGrx reduces $A\beta$ -induced toxicity in transgenic *C. elegans* by decreasing ROS levels and upregulating the expression of heat shock proteins, implying that rbGrx may have the potential to prevent AD.

Key words recombinant buckwheat glutaredoxin(rbGrx); β -amyloid($A\beta$); AD transgenic *C. elegans*; heat shock factor 1(HSF-1)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病,60岁以上人群患病率为5%,其发病风险随着年龄的增长而增加^[1]。全球人口平均寿命日益增长,AD已成为全社会的沉重负担,尤其在人口老龄化问题严重的国家^[2]。2006年,全球约有2 660万人患有AD。到2050年,这一数字可能会达到1亿,相当于每86人中有1人患有AD^[3]。关于AD的病因当前仍不清楚,但最被广泛接受的是“淀粉样蛋白假说”,它揭示了 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)神经毒性在AD的发病机制中发挥重要作用^[4]。 $A\beta$ 肽具有38~43个氨基酸残基,均由大淀粉样蛋白前体(APP)通过 β -和 γ -分泌酶的连续切割衍生而来。单体 $A\beta$ 在水溶液中不稳定,趋于形成低聚物,对细胞具有毒性作用^[5]。 $A\beta$ 毒性模型可用于研究AD生物学机制。作为神经学研究的经典模式生物^[6],表达人 $A\beta$ 肽的转基因秀丽隐杆线虫近年已被用作研究 $A\beta$ 毒性机制,以及评估抗AD药物的疗效^[7, 8]。目前,有效治疗AD的药物数量非常有限,仅有少数几种美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的药物,比如乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)抑制剂和N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂美金刚^[9, 10]。然而,这些药物仅适用于一些轻度至中度的AD患者,只能在短时间内缓解症状,而且其副作用较明显^[11]。因此,迫切需要找到更加安全有效的手段对抗AD。大量研究报道,天然植物提取物替代药物治疗,比如银杏、咖啡提取物和大豆异黄酮已被证明对AD有缓解作用^[7, 12, 13]。

荞麦是一种药食同源的小杂粮作物,富含蛋白质、氨基酸和维生素B1和B2,膳食纤维和矿物质等^[14]。因其独特的营养价值,荞麦已被用作功能性食品^[15, 16]。在荞麦种子中,已发现一些小分子活性物质具有多种功能。本课题组前期研究表明,荞麦种子的胰蛋白酶抑制剂rBTI不仅能够抑制实体瘤细胞增殖,例如EC9706, HepG2和HeLa细胞^[17, 18],而且以一种DAF-16依赖性的方式延长秀丽隐杆线

虫的寿命,缓解AD模型秀丽隐杆线虫 $A\beta$ 诱导的毒性^[19, 20]。近期,本课题组通过基因重组获得一种新型的荞麦谷氧还蛋白(recombinant buckwheat glutaredoxin, rbGrx),并通过X射线衍射揭示出rbGrx的晶体结构^[21]。该荞麦谷氧还蛋白rbGrx由124个氨基酸残基组成,分子量为13.5 kD,其中C39残基在谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx)与谷胱甘肽(glutathione, GSH)结合及调节其活性中发挥关键作用。Morita等^[22]曾报道,来自水稻中的一种Grx具有抗氧化防御功能,他们提出,Grxs作为氢供体在清除细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)和修复脂质、蛋白质的氧化损伤中发挥重要作用。

目前,对谷氧还蛋白的研究多集中在抗氧化应激方面,而对抗衰老的影响,报道相对较少。氧化应激状态被证实与许多衰老相关疾病的发生发展密切相关^[23-26]。因此,抗氧化应激作用可能对衰老相关疾病的发生发展起到关键作用。AD作为最被关注的衰老相关疾病,已成为日趋严重的社会问题,如果能够通过食物达到延缓AD的目的,对老龄化人口的健康具有重要意义。国内外研究中,用于衰老研究的生物模型主要以果蝇和小鼠为主,近年来秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)作为一种热点模式生物,因其生命周期短、个体小、易于培养^[27],且在衰老进程方面,线虫与脊椎动物有保守一致的特点等^[28],已成为衰老研究中的首选模型^[29]。本室前期的研究发现,rbGrx以热激因子1(heat shock factor 1, HSF-1)依赖性的方式延长野生型秀丽隐杆线虫N2的寿命,其抗衰老活性归因于直接的ROS清除活性和间接的自由基清除活性^[30]。

为了深入研究特色植物荞麦中的谷氧还蛋白rbGrx在衰老相关疾病中的生物学功能,本文以在肌肉组织中表达 $A\beta_{3-42}$ 的转基因AD模型秀丽隐杆线虫CL4176为研究对象,探讨rbGrx对AD的预防作用。在此AD模型中,温度升高可诱导CL4176线虫在体壁肌肉中高度表达人 $A\beta_{3-42}$,并聚集导致CL4176线虫出现瘫痪表型,所以很容易

通过观察瘫痪表型变化判断药物的有效性^[31]。本研究为首次报道谷氧还蛋白 rbGrx 在缓解 A β 毒性方面的作用,可为深入研究其相关的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

rbGrx 由本实验室克隆表达和纯化^[21];ROS、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽和 BCA 检测试剂盒均购自上海碧云天生物公司;Trizol 试剂和 SuperScript III 第一链试剂盒购自 TaKaRa 生物公司;QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司;其他实验室试剂均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 菌株和线虫培养

本研究中使用的 *C. elegans* 株为 CL4176 (smg-1 (cc546)I; dIs27X) 转基因线虫、OP50 (尿嘧啶渗漏突变型) 大肠埃希菌均购自美国线虫中心 (Caenorhabditis Genetics Center)。CL4176 线虫接种于线虫生长培养基 (nematode growth medium, NGM) 琼脂平板上,16℃ 恒温培养,灭活的大肠杆菌 OP50 作为食物来源。大肠杆菌 OP50 通过热处理 (65℃, 30 min) 灭活。

1.3 线虫的同期化

CL4176 线虫复苏不可立即用于实验,需传代 4 ~ 5 次,使用其后代进行试验。实验过程中的 CL4176 线虫必须进行同期化处理,使所有 CL4176 线虫同步生长。为确保 CL4176 线虫同期化更加精确,本文采用两步法进行 CL4176 线虫的同期化。将 30 条左右处于产卵期的成虫转移至新培养板产卵,2 h 后,将平板中 CL4176 线虫挑出。待平板中的受精卵培养至产卵期后,按上述方法再次进行同期化,平板中的受精卵则处于同一发育时期,这一过程为同期化。挑取 CL4176 线虫的步骤在超净工作台内完成。

1.4 寿命分析

当同步化的 CL4176 线虫长到 L4 期,转移到分别含有 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 和 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 突变体的 NGM 培养基中,每个培养皿中含有 60 条左右 CL4176 线虫。每隔 1 d,统计每个培养皿中存活 CL4176 线虫数目,同时将不符合标准的虫体剔除。每隔 2 d 换 1 次培养皿,直至所有虫体死亡。剔除的标准是:1) 逃离至皿壁或盖上而干死的虫体;2) 虫卵在体内孵化而成袋样虫;3) 钻入琼脂中的

虫体。

1.5 运动能力检测

与寿命检测处理相似,将发育至 L4 期的同步化 CL4176 线虫,转移到分别含有 0 $\mu\text{mol/L}$ 和 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 的 NGM 培养基中,每隔 2 d 换 1 次培养皿。待虫体长至 10 d,加入适量 M9 缓冲溶液,显微镜下检测 30 s 内虫体做正弦运动的次数,每个皿分别检测 20 条 CL4176 线虫,确定 CL4176 线虫的运动能力变化。

1.6 生殖力检测

每组挑取未开始产卵的 L4 期 CL4176 秀丽隐杆线虫 3 条,单独饲养。即每组 10 个平行板,此时记为生殖实验第 1 d。每 24 h 将其移至新板中,直至线虫生殖能力丧失。16℃ 下孵育产卵板,48 h 后计数子代数 (本实验以子代 CL4176 线虫数,间接反映 CL4176 线虫的产卵数)。

1.7 瘫痪分析

将同步化生长至 L3 期的 CL4176 线虫转移至 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 处理和未处理的平板。16℃ 恒温孵育 24 h,依次将温度升高至 25℃,培养 24 h 刺激肌肉细胞表达 A β , A β 聚集可导致 CL4176 线虫瘫痪。如果 CL4176 线虫在观察期间未能移动,并且在头部周围显示清除的细菌 (指示身体运动不足以进入食物),或者卵积聚在身体附近,或者如果用铂丝刺激时不能完成完整正弦运动,则判断为线虫瘫痪。瘫痪 CL4176 线虫的数量每 12 h 记录 1 次。所有瘫痪分析做 3 次平行。

1.8 体内 ROS 水平检测

利用 H2DCF-DA 作为分子探针,测定 CL4176 秀丽隐杆线虫细胞内 ROS 水平。同步化处理后,分别检测正常培养条件和 A β 诱导条件的 ROS 水平,将同期化的线虫转移到分别含有 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 的 NGM 培养基中,培养 48 h。对于 CL4176 线虫僵化后的 ROS 检测,16℃ 培养 48 h 后升温至 25℃,培养 48 h 和 72 h。在规定的处理时间结束时,收集所有 CL4176 线虫, M9 缓冲液洗涤 3 次,将 CL4176 线虫研磨处理并转移到 96 孔微量滴定板的孔中 (每组平行 3 孔)。随后,向各孔中加入 50 μL H2DCF-DA,使 H2DCF-DA 终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。使用荧光酶标法 (激发波长 485 nm,发射波长 525 nm) 测定 DCF 的荧光强度,进而确定 ROS 的浓度。实验重复 3 次。

1.9 体内抗氧化物的活性检测

将同步化的 CL4176 线虫转移到分别含有

rbGrx 和不含 rbGrx 的 NGM 培养基中,分别在 16℃ 和 25℃ 培养 48 h,研磨处理后评估各组 CL4176 线虫提取物的抗氧化酶活性。分别采用超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒和还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒,通过分光光度法测定 SOD 活性和 GSH 含量。利用 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。

1.10 RNA 提取及实时荧光定量 PCR

收集 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 处理 2 d 的虫体,Trizol 法提取虫体总 RNA,primer 5 设计相关基因引物 (Table 1)。用 SYBR 为 DNA 荧光染料,Real-time PCR Machine 7500 Fast 进行相对定量 qRT-PCR,分析相关基因转录水平变化。

Table 1 Primer sequences

Gene	Primers
$A\beta$	5'-CTTTCTGGCACCAGCAGGTAC-3'
	5'-CTTGCAGACTTCTCGCTGCTAG-3'
sod-3	5'-CCAACCAGCGCTGAAATTCATGG-3'
	5'-GGAACCGAAGTCGCGCTTAATAGT-3'
hsp-16.2	5'-TATGGCTCTGATGGAACG-3'
	5'-GATTGATAGCGTACGACC-3'
hsf-1	5'-TTGACGACGACAAGCTTCCAGT-3'
	5'-AAAGCTTGCACCAGAATCATCCC-3'
daf-16	5'-CCAGACGGAAGGCTTAAACT-3'
	5'-ATTGCGATGAAACGAGAATG-3'

1.11 硫磺素 S 染色

将 16℃ 同步化生长至 L3 期的 CL4176 线虫,分别转移至含有和不含 rbGrx 的涂布有 *E. coil* OP50 的 NGM 中,25℃ 培养 24 h,M9 缓冲液收集、清洗虫体,4% 的多聚甲醛固定 24 h,2 mg/mL 胶原酶室温孵育 1 ~ 1.5 h,溶解 CL4176 线虫角质层后,1% TritonX-100 通透处理 24 h,漂洗 3 ~ 5 次,0.125% 硫磺素 S (50% 乙醇配制)室温孵育染色 2 min,除去染液,50% 乙醇室温孵育脱色 2 min,荧光显微镜

下进行成像分析^[32]。
1.12 统计学方法
采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,数据呈正态分布,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rbGrx 延长 CL4176 线虫寿命

前期研究表明,rbGrx 可明显延长野生型秀丽隐杆线虫 N2 的寿命。据报道,大部分有延寿作用的物质都具有保护对抗 AD 的作用^[31]。因此,本研究首先检测 rbGrx 对 CL4176 线虫寿命的作用。结果显示,rbGrx 能够明显延长 CL4176 线虫的寿命,且在 0 ~ 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 范围内具有浓度依赖性 (Fig. 1)。和对照组相比,1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 rbGrx 处理虫体后,平均寿命分别延长 6.1% ($P < 0.05$)、13.9% ($P < 0.05$) 和 20% ($P < 0.01$),而 rbGrx 突变体对 CL4176 线虫寿命无明显延长效果 (Table 2)。本实验证明,4 $\mu\text{mol/L}$ 为 rbGrx 最佳作用浓度,该结果和 N2 野生型中相似^[30]。

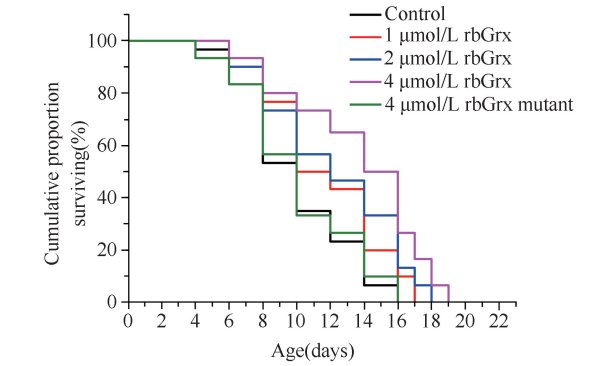


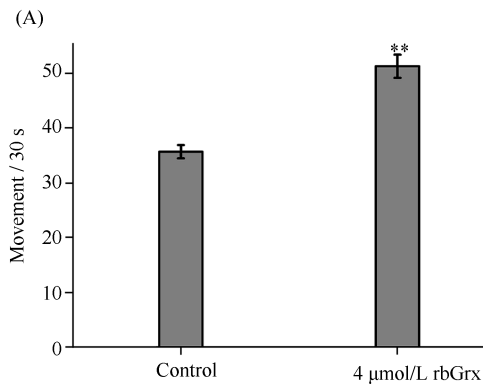
Fig. 1 Lifespan analysis of transgenic *C. elegans* strain CL4176 After hatching age-synchronized, CL4176 worms were plated on fresh NGM. The NGM contains 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) or 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx and 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx mutant. Plots are representative of three independent experiments

Table 2 Lifespan assay and statistical analyses

Strain (solvent)	Maximum lifespan (d)	Mean lifespan (d) ($\bar{x} \pm SEM$)	n	P value versus control
Control	17	11.5 \pm 0.3	3	
1 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx	18	12.2 \pm 0.2	3	<0.05
2 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx	19	13.1 \pm 0.3	3	<0.05
4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx	20	13.8 \pm 0.3	3	<0.01
4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx mutant	17	11.6 \pm 0.2	3	n. s. (3.321)

2.2 rbGrx 增强 CL4176 衰老虫体的运动能力且延迟其繁殖高峰期

除寿命以外,进一步检测 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 对其他衰老相关生理标志的影响,包括运动能力和繁殖能力。有研究报道,线虫从 8 d 开始运动能力明显下降^[33]。本研究检测 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 对 10 d 的 CL4176 线虫(衰老虫体)运动能力的影响。结果显示,与对照组相比,4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 处理组虫体每 30 s 内,做正弦运动次数增加 43.6% ($P < 0.01$) (Fig. 2A)。表明 rbGrx 能明显增强衰老 CL4176 线虫运动能力,延长其健康寿命。



在形态学上,除线虫生存寿命外,还能以繁殖能力来评价 rbGrx 延长寿命的影响。线虫一般在 L4 期开始的前 4 d 具有繁殖能力,且随着寿命的增长,繁殖力逐渐降低直至丧失。繁殖能力结果显示,4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 处理组 CL4176 线虫的生殖高峰期较对照组略有延迟 (Fig. 2B)。在对照组中,CL4176 线虫的生育高峰期为第 2 d 至第 4 d,且第 3 d 最多。在 rbGrx 组,CL4176 线虫的生育高峰期为第 3 d 至第 5 d,且第 4 d 最多。rbGrx 组 CL4176 线虫总产卵量与对照组相比无统计学差异。

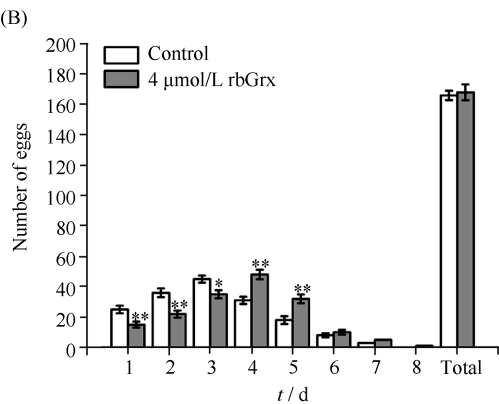


Fig. 2 The effect of rbGrx on the locomotory behavior and reproduction (A) Locomotory behavior analysis of 10-days nematodes. Locomotion rate was measured as number of body bends performed in 30 seconds on NGM which containing 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) or 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx. Only animals that moved for the full 30-seconds were included; $n = 20$ animals; values are given as mean \pm SD. (B) Reproduction analysis. Three L4 nematodes were maintained in each plate and 10 parallel plates for each group. The reproductive rates were recorded from the first day until the nematode reproductive capacity was lost. The number of nematode progeny indirectly reflected the number of eggs. P -value was calculated using Student's t -test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control

2.3 rbGrx 减缓 CL4176 线虫瘫痪

转基因线虫 CL4176 能在体壁肌细胞肌球蛋白启动子的驱动下,在肌肉中特异性表达 $\text{A}\beta_{3-42}$ 。在构建 CL4176 线虫时,同时导入 smg-1 mRNA 温度诱导系统作为监控系统。当 CL4176 线虫在 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养时,smg-1 系统具有活性,能够识别带有错误 3'非编码区的 $\text{A}\beta$ 基因并将其降解。在 CL4176 线虫 L3 期时,把培养温度升高至 25 $^{\circ}\text{C}$,导致 smg-1 系统失活, $\text{A}\beta_{3-42}$ 的 mRNA 能够在突变株肌细胞中表达,并聚集形成 $\text{A}\beta$ 低聚体。随着 $\text{A}\beta$ 聚体的逐渐增多,对肌肉细胞的毒性也逐步增强,进而使 CL4176 线虫逐步失去运动能力,出现瘫痪表型。该实验常用于抑制或缓解 $\text{A}\beta$ 毒性的活性物质筛选。本研究利用 0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 和 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 突变体处理 CL4176 线虫,在 24、36、48、60、72 h 这 5 个时间点,研究 CL4176 秀丽线虫的瘫痪情况。结果显示,rbGrx 能明显缓解 $\text{A}\beta$ 聚集的 CL4176 线虫瘫痪,且

呈正相关影响。而 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx 突变体对 $\text{A}\beta$ 聚集导致的 CL4176 线虫瘫痪无明显缓解作用 (Fig. 3)。这表明,rbGrx 减缓了 $\text{A}\beta$ 毒性诱导的瘫痪表型,具有保护对抗 AD 的潜力。

2.4 rbGrx 清除 CL4176 线虫体内 ROS 且增强了内源性抗氧化酶防御系统

$\text{A}\beta$ 聚集并形成纤维状 $\text{A}\beta$ 的机制与自由基的产生有非常密切的关系。有研究报道, $\text{A}\beta$ 诱导的氧化应激促进了 AD 的发生发展^[4]。为了验证 rbGrx 是否降低 AD 模型线虫中的氧化应激,本文研究了转基因 CL4176 线虫体内的 ROS 水平。结果显示,rbGrx 显著降低体内 ROS 水平,且具有剂量依赖性 (Fig. 4A)。而且,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养的 CL4176 线虫体内 ROS 水平是 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件的 2 倍多 (Fig. 4A)。当温度升高至 25 $^{\circ}\text{C}$,诱导 $\text{A}\beta$ 表达后的 48 h 和 72 h,与对照组相比,rbGrx (4 $\mu\text{mol/L}$) 也显著降低 ROS 水平,分别为 48.7% 和 30.2% (Fig. 4B),表明

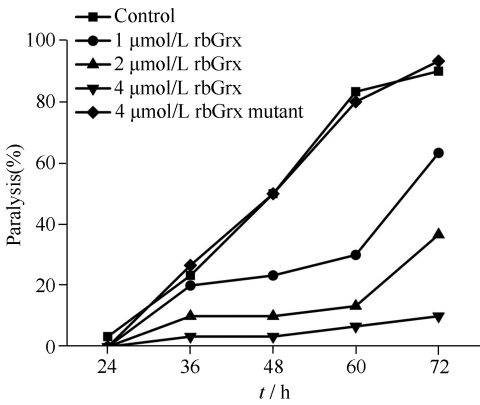


Fig. 3 rbGrx delays the paralysis in transgenic *C. elegans* CL4176 strain Paralysed worms' proportion in transgenic *C. elegans* CL4176 strain with 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) or 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx and 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx mutant for 24, 36, 48, 60, 72 hours at 25 $^{\circ}\text{C}$. Data represent the mean of three independent experiments (30 worms in each group)

rbGrx 降低了 CL4176 线虫的氧化应激压力。

抗氧化应激能力增强及氧化损伤减少一般是机体抗氧化防御系统增强的结果。机体的抗氧化防御系统主要有抗氧化酶系统及抗氧化非酶系统,它们能够系统地对 ROS 进行清除。抗氧化酶系统是机体主要的内源性抗氧化系统,主要包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR),它们分别负责清除不同的 ROS。为了研究 rbGrx 如何降低体内 ROS 水平,本研究用试剂盒分别对 CL4176 线虫内 SOD 活性和 GSH 含量进行了检测。结果发现,在正常状态和 A β 诱导的氧化应激状态下,rbGrx 均能显著增加 SOD 活性和 GSH 含量 ($P < 0.01$) (Fig. 4C 和 4D)。表明 rbGrx 增强 CL4176 线虫内源性抗氧化防御系统,提高其抗氧化应激能力。由此推测,rbGrx 可能通过增强抗氧化酶活性导致细胞内 ROS 水平的降低,进而降低 A β 诱导的氧化应激。

2.5 rbGrx 降低 CL4176 线虫中 A β 聚集

普遍认为,A β 诱导的毒性是 AD 发病的主要原因。大部分的活性物质也是通过降低 A β 的表达或者 A β 的聚集及积累发挥其保护对抗 AD 的作用^[34, 35]。为了检测 rbGrx 是否也是通过相似的作用减缓 A β 诱导的细胞毒性,本研究检测了 rbGrx 对 CL4176 线虫中 A β 转录、聚集及积累的影响。实时定量 PCR 检测结果显示,rbGrx 组的 A β mRNA

水平比对照组降低 44.1% ($P < 0.01$) (Fig. 5A)。硫磺素 S 染色方法观察 CL4176 线虫体内 A β 沉积的变化,结果显示,rbGrx 组的 A β 沉积数量明显减少 (Fig. 5B)。这些数据表明,rbGrx 可能通过下调 A β 转录表达,并且降低 A β 聚集与积累,发挥缓解 A β 毒性作用。

2.6 rbGrx 增强 CL4176 线虫中 HSF-1 的转录活性

我们前期利用野生型秀丽隐杆线虫 N2,研究 rbGrx 对线虫的三大调控细胞内蛋白质稳态的转录因子 DAF-16 (dauer formation abnormal-16), HSF-1 (heat shock factor-1) 和 SKN-1 (skin head-1) 转录水平的影响,以及对 *daf-16*, *hsf-1* 和 *skn-1* 的突变体线虫寿命的影响。结果发现,rbGrx 延长寿命效应与 DAF-16 和 SKN-1 无关,而是由热激因子 HSF-1 介导^[30]。HSF-1 是热激因子家族成员之一,可以感应细胞内外生理和病理性应激刺激,激活细胞内热激蛋白质 (heat shock proteins, HSPs) 表达,后者通过调控细胞内蛋白质折叠,介导变形蛋白质降解和拮抗细胞凋亡通路,而参与细胞内稳定和成活^[30]。HSF-1 通过调节其靶基因,发挥抑制 A β 异常聚集及促进 A β 清除、阻断细胞凋亡途径等作用,从而减轻多种因素造成的神经元损伤,延缓 AD 的病理进程^[36]。A β 是 AD 脑神经元和氧化应激损伤之间的“桥梁分子”。A β 的沉积诱导自由基的产生,自由基增多反过来促进 APP 裂解生成 A β ,使 A β 的沉积增加,二者之间具有相互促进的效应,导致神经细胞受损和功能紊乱的恶性循环^[36]。

为进一步检测 rbGrx 对 CL4176 线虫体内与氧化应激和热应激密切相关的转录因子的影响,本研究利用 qRT-PCR 分析 rbGrx 对 DAF-16 和 HSF-1 的作用。结果显示,与对照组相比,rbGrx 能够上调 *daf-16* 和 *hsf-1* 的转录表达水平,分别为 1.18 倍 ($P > 0.05$) 和 2.01 倍 ($P < 0.01$) (Fig. 6)。随后检测了 *daf-16* 和 *hsf-1* 的靶基因的转录表达水平。结果显示,与对照组相比,rbGrx 能够明显上调 *hsf-1* 的经典靶基因 *hsp-16.2* 的转录水平 2.65 倍 ($P < 0.01$),而对 *daf-16* 的经典靶基因 *sod-3* 的转录水平则无明显影响 ($P > 0.05$)。这表明,rbGrx 上调 CL4176 线虫中抗氧化酶靶基因的表达,特别是 *hsf-1*,这与我们之前在野生型 N2 线虫中的结果一致^[30]。

3 讨论

细胞内氧化还原调控主要是由谷氧还蛋白系统

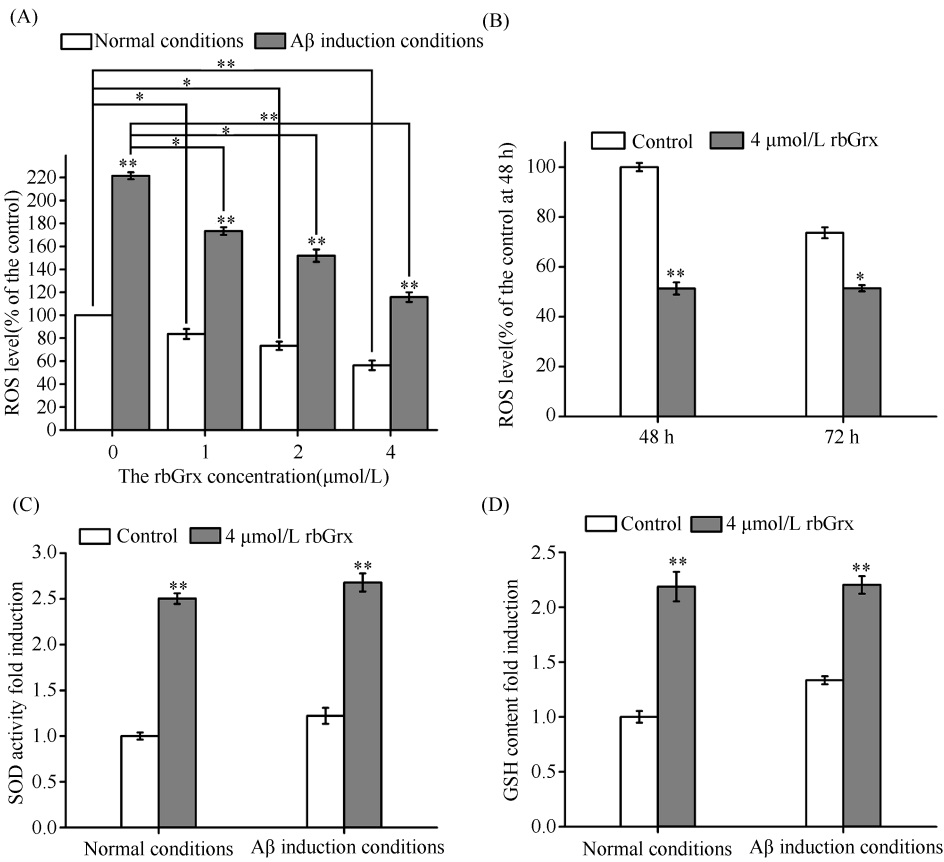


Fig. 4 ROS-scavenging abilities and antioxidant activity of rbGrx *in vivo* (A) ROS-scavenging abilities at 16°C and 25°C. Age-synchronized CL4176 worms were plated on fresh NGM. The NGM contained 0 μmol/L (control) or 1, 2, 4 μmol/L rbGrx. ROS were measured in CL4176 strains using H2DCF-DA. Results are expressed as DCF fluorescence relative to the untreated control. (B) ROS-scavenging abilities at 25°C. The levels of ROS were measured in CL4176 strains for 24 hours and 48 hours after temperature upshift to 25°C. (C) Activity changes of SOD at 16°C and 25°C. (D) Content changes of GSH at 16°C and 25°C. Total nematode lysates were prepared according to the specific protocol for each assay, and the activities and/or contents of SOD and GSH were measured after treatment with 0 and 4 μmol/L rbGrx for two days. All values are presented as means ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01 versus respective controls

和硫氧还蛋白系统完成。谷氧还蛋白属于硫氧还蛋白超家族,广泛分布在各种生物体内^[37]。作为一种重要的巯基转移酶,它能够催化巯基-二硫键交换反应或者还原蛋白质谷胱甘肽二硫化物,在细胞内氧化还原平衡状态的调控及抵抗氧化应激损伤过程中发挥重要作用^[38]。大量研究报道,过氧化物还原酶对于 ROS 应答非常重要,且具有保守的延长寿命作用^[39, 40]。研究揭示酵母硫氧还蛋白同源的过氧化物酶 Prdx1 (TSA1) 通过热量限制延长寿命^[41]。本室前期从荞麦中发现 rbGrx,并利用秀丽隐杆线虫模型研究其功能,发现 rbGrx 具有明显抗氧化和抗衰老作用^[21, 30]。

衰老与阿尔茨海默病(AD)之间有许多相似的表型,例如生理功能、运动能力和记忆力的下降^[34]。本研究以 CL4176 线虫(一种温度诱导型表达 Aβ 的

转基因线虫菌株)作为 AD 活体模型,评价 rbGrx 抗 Aβ 毒性作用,且对其可能的作用机制进行了初步的探索。实验设计依据前人的报道进行^[42, 43],发现在一定浓度范围内,rbGrx 明显延长 CL4176 线虫的寿命,增强衰老 CL4176 线虫运动能力,延缓虫体生殖高峰期,延迟 Aβ 毒性引起的身体瘫痪。

Aβ 诱导的毒性是 AD 病理机制的核心因素。Aβ 沉积导致炎症反应,细胞因子释放,小胶质细胞活化和反应性星形胶质细胞增生,这些过程导致神经元功能障碍,并最终致使细胞大规模死亡^[43]。许多植物如绿茶中的儿茶素通过影响 *daf-2*/胰岛素样信号传导途径抑制秀丽隐杆线虫中的 Aβ 寡聚化^[34]。六味地黄通过上调热激蛋白质,抗氧化活性和降低秀丽隐杆线虫的 ROS 缓解 Aβ 诱导的毒性^[44]。可可肽具有抗氧化活性,能够减少 Aβ 沉

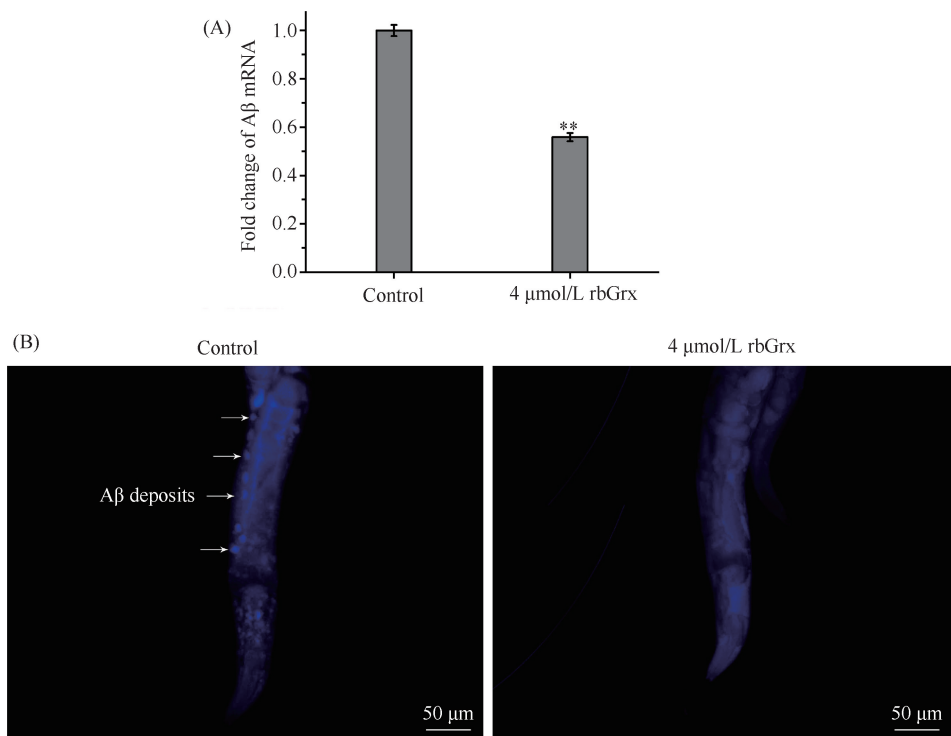


Fig. 5 rbGrx decreases $A\beta$ transgene expression and $A\beta$ deposits in CL4176 worms (A) $A\beta$ mRNA levels were determined by qRT-PCR in CL4176 transgenic worms and normalized to the expression of *act-1*. Synchronized L3 stage larvae were pretreated with 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) or 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, then the temperature was increased to 25 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hours prior to extraction of total RNAs. Data are expressed as means \pm SD. (B) Representative images of CL4176 transgenic worms stained with thioflavin S. Arrows indicated $A\beta$ deposits. Quantification of $A\beta$ deposits in worms was given in the right panel (20 worms were quantified in each group). Data represent the mean of three independent experiments and were expressed as mean \pm SD. ** $P < 0.01$ versus respective controls

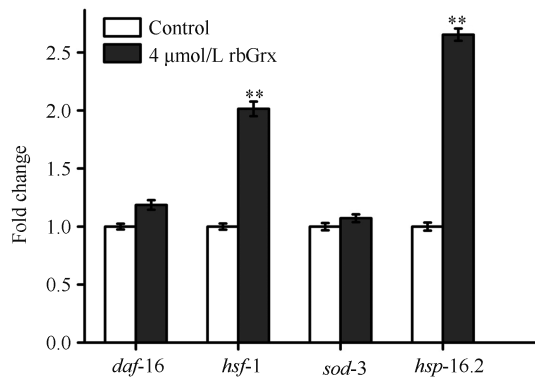


Fig. 6 The effect of rbGrx on the expression of antioxidative stress genes in transgenic strain CL4176 *C. elegans* The mRNA expression levels of *daf-16*, *hsf-1*, *sod-3* and *hsp-16.2*, were determined by qRT-PCR and normalized to the expression of *act-1*. Synchronized L3 stage larvae were pretreated with 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) or 4 $\mu\text{mol/L}$ rbGrx at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hours, then the temperature was upshifted to 25 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hours prior to the extraction of total RNA. Plots are representative of three independent experiments. Relative values (% relative to the control) are depicted and values are presented as means \pm SD. ** $P < 0.01$ versus respective controls

上活性物质相似,rbGrx 可以通过下调 $A\beta$ 的转录水平和减少 $A\beta$ 沉积缓解 $A\beta$ 的毒性,表明延迟瘫痪主要是由于 $A\beta$ 水平的降低。

氧化应激是衰老过程中的关键因素,已被证明在 AD 的病理学和生理学中起着至关重要的作用^[46]。研究发现,AD 患者脑组织中的淀粉样斑块附近,常存在氧化应激损伤,如脂质过氧化、线粒体 DNA 过氧化等^[47]。另有研究报道, $A\beta$ 可通过与金属离子结合,破坏细胞内电子传递链,导致线粒体功能障碍,释放大量的 ROS^[48]。由于脑组织的抗氧化能力相对较弱,其中丰富的不饱和脂肪酸,容易被氧化,生成大量脂质氧化产物。在本研究中,我们检测线虫 CL4176 中的 ROS 水平,发现温度升高到 25 $^{\circ}\text{C}$ 时,ROS 水平急剧增加,表明在 $A\beta$ 诱发瘫痪的过程中 ROS 水平显著增加。这个发现与在 AD 患者中观察到的结果一致。Sekler 等^[49] 观察到,氧化应激标志物与 AD 患者的 AD 分期紧密相关。本文进一步验证 rbGrx 清除 CL4176 线虫体内的 ROS 水平是否是 rbGrx 延缓瘫痪的一个潜在的作用机制,结果发现在正常情况和 $A\beta$ 诱导毒性情况下,rbGrx 均能

积,以缓解 $A\beta$ 诱导的毒性^[45]。本研究发现,与以

显著降低体内总 ROS 水平。在秀丽隐杆线虫中, ROS 产生是淀粉样蛋白质积累的典型结果。如此看来, rbGrx 降低 ROS 水平可能是 A β 减少的结果。然而, 由于之前研究已证明 rbGrx 具有抗氧化性, 所以不能排除 rbGrx 能够直接清除 ROS 的可能性^[29]。本文的结果表明, rbGrx 的抗氧化应激活性可能是保护 CL4176 秀丽隐杆线虫免受 A β 毒性的机制之一。

众所周知, DAF-16、SKN-1 和 HSF-1 是调节寿命和改善 A β 毒性的 3 个转录因子^[50]。前期研究表明, rbGrx 通过延长野生型线虫寿命依赖热激转录因子 HSF-1^[29]。HSF-1 作为一种快速应激反应因子, 在非应激状态下, 以无活性的单体形式存在于胞浆中, 在高温、毒物、自由基及感染等应激原作用下, 转化为有活性的三聚体, 移位至胞核内, 使丝氨酸残基磷酸化, 进而结合热激元件, 启动热激蛋白质基因的表达, 加强细胞对抗应激损伤的能力。热激蛋白质 (HSPs) 是具有分子伴侣活性的低分子肽的总称, 能够提高线虫在胁迫下的存活, 并且由 A β 表达诱导^[51]。由于线虫的热激反应是神经元控制的行为, 所以由 A β 诱导产生 HSP-16.2 是对毒性蛋白质异常积累的保护性反应^[52]。有文献^[53]报道, 在秀丽隐杆线虫体内, HSP-16.2 的过度表达抑制 A β 肽的毒性。本研究检测 rbGrx 对 HSF-1 活性的影响, 发现 rbGrx 增强 HSF-1 及其经典靶基因 *hsp-16.2* 的 mRNA 水平, 揭示了 rbGrx 能调节 HSF-1 的转录活性, 这可能促进其对 A β 细胞毒性的减缓作用。

综上所述, 本文主要探究 rbGrx 对 AD 的缓解作用及其初步机制, 首次研究了 rbGrx 对 A β 毒性的减缓作用, 并系统分析 rbGrx 介导的抗 AD 作用。研究结果表明, rbGrx 可以通过降低 A β 的转录水平和减少 A β 沉积来降低 A β 的毒性。同时, rbGrx 的抗氧化能力及增加 HSF-1 转录活性的功能, 可能也是其降低 A β 的毒性的原因。这些发现不仅揭示了 rbGrx 在 AD 预防中的潜在功能, 也为荞麦降低衰老疾病的患病风险提供了理论依据。有关 rbGrx 对 AD 模型小鼠的作用, 有待进一步研究。

参考文献 (References)

[1] Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, *et al.* Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2016, **2016**: 2589276

[2] Mangialasche F, Kivipelto M, Solomon A, *et al.* Dementia prevention: current epidemiological evidence and future perspective [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2012, **4**(1): 6

[3] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, *et al.* Forecasting the global burden of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2007, **3**(3): 186-191

[4] Sambamurti K, Greig NH, Lahiri DK. Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease[J]. *Neuromolecular Med*, 2002, **1**(1): 1-31

[5] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, **297**(5580): 353-356

[6] Maglioni S, Ventura N. *C. elegans* as a model organism for human mitochondrial associated disorders [J]. *Mitochondrion*, 2016, **30**: 117-125

[7] Arya U, Dwivedi H, Subramaniam JR. Reserpine ameliorates A β toxicity in the Alzheimer's disease model in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Exp Gerontol*, 2009, **44**(6-7): 462-466

[8] Ai L, Yang F, Song J, *et al.* Inhibition of Abeta proteotoxicity by Paconiflorin in *Caenorhabditis elegans* through regulation of oxidative and heat shock stress responses [J]. *Rejuvenation Res*, 2017, doi: 10.1089/rej.2017.1966. [Epub ahead of print]

[9] Shinagawa S, Shigeta M. Acetylcholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease [J]. *Brain Nerve*, 2014, **66**(5): 507-516

[10] Folch J, Busquets O, Etcheto M, *et al.* Memantine for the treatment of dementia: A review on its current and future applications[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, **62**(3): 1223-1240

[11] Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future [J]. *Neuropharmacology*, 2014, **76 Pt A**: 27-50

[12] Cheng B, Liu X, Gong H, *et al.* Coffee components inhibit amyloid formation of human islet amyloid polypeptide in vitro: possible link between coffee consumption and diabetes mellitus [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, **59**(24): 13147-13155

[13] Gleason CE, Fischer BL, Dowling NM, *et al.* Cognitive effects of Soy Isoflavones in patients with Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, **47**(4): 1009-1019

[14] Skrabanja V, Liljeberg Elmstahl HG, Kreft I, *et al.* Nutritional properties of starch in buckwheat products: studies *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, **49**(1): 490-496

[15] Li WH, Chang CH, Huang CW, *et al.* Selenite enhances immune response against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 via SKN-1 in *Caenorhabditis elegans* [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e105810

[16] Stringer DM, Taylor CG, Appah P, *et al.* Consumption of buckwheat modulates the post-prandial response of selected gastrointestinal satiety hormones in individuals with type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2013, **62**(7): 1021-1031

[17] Li YY, Zhang Z, Wang ZH, *et al.* rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation [J]. *Toxicol Lett*, 2009, **189**(2): 166-175

[18] Wang ZH, Gao L, Li YY, *et al.* Induction of apoptosis by buckwheat trypsin inhibitor in chronic myeloid leukemia K562 cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(4): 783-786

[19] Li J, Cui X, Wang Z, *et al.* rBTI extends *Caenorhabditis elegans* lifespan by mimicking calorie restriction [J]. *Exp Gerontol*, 2015, **67**: 62-71

[20] Li J, Cui X, Ma X, *et al.* rBTI reduced β -amyloid-induced toxicity by promoting autophagy-lysosomal degradation via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. [J]. *Exp Gerontol*, 2017, **89**: 78-86

[21] Zhang X, Wang W, Li C, *et al.* Structural insights into the binding of buckwheat glutaredoxin with GSH and regulation of its catalytic activity[J]. *J Inorg Biochem*, 2017, **173**: 21-27

[22] Morita S, Yamashita Y, Fujiki M, *et al.* Expression of a rice glutaredoxin in aleurone layers of developing and mature seeds: subcellular localization and possible functions in antioxidant defense [J]. *Planta*, 2015, **242**(5): 1195-1206

[23] Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**(3): 205-214

[24] Griffiths HR. ROS as signalling molecules in T cells--evidence

- for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis[J]. Redox Rep, 2005, **10**(6): 273-280
- [25] Schroecksnadel K, Winkler C, Duftner C, *et al.* Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2006, **25**(3): 334-337
- [26] Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, **238**(3): 209-214
- [27] Wang D, Xing X. Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. J Environ Sci(China), 2008, **20**(9): 1132-1137
- [28] Evason K, Huang C, Yamben I, *et al.* Anticonvulsant medications extend worm life-span [J]. Science, 2005, **307**(5707): 258-262
- [29] Johnson TE. *Caenorhabditis elegans* 2007: the premier model for the study of aging[J]. Exp Gerontol, 2008, **43**(1): 1-4
- [30] Li F, Ma X, Cui X, *et al.* Recombinant buckwheat glutaredoxin intake increases lifespan and stress resistance via *hsf-1* upregulation in *Caenorhabditis elegans*[J]. Exp Gerontol, 2018, **104**: 86-97
- [31] Wu Y, Wu Z, Butko P, *et al.* Amyloid- β -induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurosci, 2006, **26**(50): 13102-13113
- [32] Fay DS, Fluet A, Johnson CJ, *et al.* In vivo aggregation of beta-amyloid peptide variants [J]. J Neurochem, 1998, **71**(4): 1616-1625
- [33] Glenn CF, Chow DK, David L, *et al.* Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004, **59**(12): 1251-1260
- [34] Abbas S, Wink M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/ insulin-like signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2010, **17**(11): 902-909
- [35] Dostal V, Link CD. Assaying beta-amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model [J]. J Vis Exp, 2010, (44): pii: 2252
- [36] Zhou KI, Pincus Z, Slack FJ. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Aging (Albany), 2011, **3**(8): 733-753
- [37] 张春晶, 于海涛, 邹朝霞, 等. 谷氧还蛋白的生物学活性及其与人类疾病的关系[J]. 生命的化学(Zhang CJ, Yu HT, Zou CX, *et al.* Biological activity of glutathione and its relationship with human diseases[J]. Chem Life), 2006, **26**(2): 163-165
- [38] Allen EM, Mieyal JJ. Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, **17**(12): 1748-1763
- [39] Olahova M, Veal EA. A peroxiredoxin, PRDX-2, is required for insulin secretion and insulin/IIS- dependent regulation of stress resistance and longevity [J]. Aging Cell, 2015, **14**(4): 558-568
- [40] Lu M, Lee YJ, Park SM, *et al.* Aromatic-participant interactions are essential for disulfide-bond-based trimerization in human heat shock transcription factor 1 [J]. Biochemistry, 2009, **48**(18): 3795-3797
- [41] Chae S, Lee HK, Kim YK, *et al.* Peroxiredoxin1, a novel regulator of pronephros development, influences retinoic acid and Wnt signaling by controlling ROS levels [J]. Sci Rep, 2017, **7**(1): 8874
- [42] McColl G, Killilea DW, Hubbard AE, *et al.* Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Biol Chem, 2008, **283**(1): 350-357
- [43] González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, *et al.* Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective [J]. Front Mol Neurosci, 2017, **10**: 427
- [44] Sangha J S, Sun X, Wally OS, *et al.* Liuwei dihuang (LWDH), a traditional chinese medicinal formula, protects against β -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans* [J]. PLoS One, 2012, **7**(8): e43990
- [45] Martorell P, Bataller E, Llopis S, *et al.* A cocoa peptide protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress and β -amyloid peptide toxicity [J]. PLoS One, 2013, **8**(5): e63283
- [46] Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, **2013**: 316523
- [47] Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, *et al.* Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1995, **45**(8): 1594-1601
- [48] Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, *et al.* Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques [J]. J Neurol Sci, 1998, **158**(1): 47-52
- [49] Sekler A, Jiménez JM, Rojo L, *et al.* Cognitive impairment and Alzheimer's disease: links with oxidative stress and cholesterol metabolism [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2008, **4**(4): 715-722
- [50] Tullet JM, Hertweck M, An JH, *et al.* Direct inhibition of the longevity promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans* [J]. Cell, 2008, **132**(6): 1025-1038
- [51] Guo H, Cao M, Zou S, *et al.* Cranberry extract standardized for proanthocyanidins alleviates β -Amyloid peptide toxicity by improving proteostasis through HSF-1 in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2016, **71**(12): 1564-1573
- [52] Prahla V, Cornelius T, Morimoto RI. Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons [J]. Science, 2008, **320**(5877): 811-814
- [53] Fonte V, Kipp DR, Yerg J 3rd, *et al.* Suppression of in vivo beta-amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein [J]. J Biol Chem, 2008, **283**(2): 784-791