

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.07.0852

硫化氢对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的小鼠 Neuro-2a 细胞自噬的影响

高 丹,柯 莉,赵丰丽,乔沛丰,晏 勇*
重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨硫化氢(H₂S)对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的小鼠神经细胞瘤细胞 Neuro-2a 自噬的影响及其潜在机制。**方法** 将 Neuro-2a 细胞随机分为空白对照组、Aβ₂₅₋₃₅ 处理组、Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS 组、Aβ₂₅₋₃₅ + 3-甲基腺嘌呤(3-MA)组、NaHS 组及 Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS + LY294002 组。Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS 组和 Aβ₂₅₋₃₅ + 3-MA 组细胞分别用 NaHS 和 3-MA 预处理 2 h 后均加用 Aβ₂₅₋₃₅ 继续处理 24 h;Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS + LY294002 组除加入 NaHS 预处理外需在 Aβ₂₅₋₃₅ 处理前 0.5 h 加入特异性 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002。采用 MTT 法观察各组细胞存活率,蛋白质印迹法检测自噬蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白(LC3)及 P62 的表达,免疫荧光法检测 LC3 的表达及分布,透射电镜法观察自噬体的形成。**结果** (1)与空白对照组相比,Aβ₂₅₋₃₅ 作用细胞后细胞存活率降低($P<0.05$),Beclin-1 及 LC3-II 表达增加,P62 表达降低($P<0.05$),荧光显微镜及电镜下可见细胞自噬体明显增多。(2)与 Aβ₂₅₋₃₅ 组相比,Aβ₂₅₋₃₅ + 3-MA 组和 Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS 组细胞存活率均增高($P<0.05$),Beclin-1 及 LC3-II 表达降低,P62 表达增高($P<0.05$),自噬体减少。(3)Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS 组 p-Akt 和 p-mTOR 的表达高于 Aβ₂₅₋₃₅ 组($P<0.05$),而加入 LY294002 后,Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS + LY294002 组细胞 p-Akt 和 p-mTOR 表达与 Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS 组相比降低($P<0.05$)。**结论** 外源性 H₂S 能对抗 Aβ₂₅₋₃₅ 的细胞毒性,可能与活化 PI3K/Akt/mTOR 途径抑制 Aβ₂₅₋₃₅ 引起的细胞自噬相关。

[关键词] 阿尔茨海默病;硫化氢;自噬;β 淀粉样蛋白;PI3K/Akt/mTOR 通路

[中图分类号] R 749.16 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)07-0852-06

Effect of hydrogen sulfide on Aβ₂₅₋₃₅-induced autophagy in mouse Neuro-2a cells

GAO Dan, KE Li, ZHAO Feng-li, QIAO Pei-feng, YAN Yong*
Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of exogenous hydrogen sulfide on Aβ₂₅₋₃₅-induced autophagy in mouse Neuro-2a cells and the underlying mechanism. **Methods** The Neuro-2a cells were randomly divided into control group, Aβ₂₅₋₃₅ treatment group, Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS group, Aβ₂₅₋₃₅ + 3-MA (3-methyl adenine) group, NaHS group and Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS + LY294002 group. In Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS group and Aβ₂₅₋₃₅ + 3-MA group, NaHS and 3-MA were used for pretreatment for 2 h, which was followed by 24 h co-incubation with Aβ₂₅₋₃₅; in Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS + LY294002 group, after pretreatment with NaHS, LY294002 was administered for 0.5 h before Aβ₂₅₋₃₅ was given. MTT assay was used to detect the viability of Neuro-2a cells. The expression of the autophagy related proteins including Beclin-1, LC3 and P62 was measured by Western blotting analysis. Immunofluorescence was used to detect the expression and distribution of LC3. The formation of autophagosomes was determined by transmission electron microscopy (TEM). **Results** (1) Compared with control group, Aβ₂₅₋₃₅ group had significantly declined cell viability ($P<0.05$), significantly increased expression of Beclin-1 and LC3-II and decreased P62 expression ($P<0.05$), accompanied by increased autophagosomes under fluorescence microscope and electron microscope. (2) Compared with Aβ₂₅₋₃₅ group, the cell viability was significantly increased in Aβ₂₅₋₃₅ + 3-MA and Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS groups ($P<0.05$), and expression of Beclin-1 and LC3-II was decreased and expression of P62 was increased ($P<0.05$), accompanied by reduced autophagosomes. (3) The expression of p-Akt and p-mTOR in Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS group was significantly higher than that in Aβ₂₅₋₃₅ group ($P<0.05$); however, the expression of p-Akt and p-mTOR was significantly reduced after given the specific PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002 compared with Aβ₂₅₋₃₅ + NaHS group ($P<0.05$). **Conclusion** The exogenous H₂S can protect against Aβ₂₅₋₃₅-induced cytotoxicity, which is probably related to the activation of PI3K/Akt/mTOR pathways and the inhibition of Aβ₂₅₋₃₅-induced cell autophagy.

[Key words] Alzheimer disease; hydrogen sulfide; autophagy; amyloid beta peptide; PI3K/Akt/mTOR pathway
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 852-857]

β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptides, A β)是老年斑的主要成分,具有广泛的细胞毒作用。A β 可调节抗凋亡及促凋亡蛋白的表达,引起细胞凋亡^[1];产生或诱导大量自由基,加剧氧化应激^[2];分泌促炎因子,介导炎症损伤^[3]。近期研究发现自噬也参与了A β 的细胞毒作用^[4]。当自噬溶酶体功能障碍时,A β 降解减少,导致A β 在脑内异常聚集;A β 的异常聚集又进一步加重自噬溶酶体功能障碍,形成恶性循环^[5]。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是一种气体信号分子,可以通过调节多种信号途径对A β 诱导的细胞毒性起到保护作用^[6-8]。然而,H₂S对A β 诱导的自噬是否具有保护作用还未见报道。本实验拟通过使用A β ₂₅₋₃₅及H₂S供体硫氢化钠(NaHS)干预鼠成神经细胞瘤细胞Neuro-2a,观察其对细胞存活率、自噬蛋白表达及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响,从而探讨H₂S对A β ₂₅₋₃₅诱导的Neuro-2a细胞自噬的影响及其潜在机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 MEM、DMEM高糖培养基、10%澳洲胎牛血清及0.5%青霉素、链霉素购自Gibco公司,A β ₂₅₋₃₅购自生工生物工程(上海)股份有限公司。NaHS、LY294002、3-甲基腺嘌呤(3-MA)及抗LC3B抗体购自Sigma公司,抗Beclin-1、P62抗体购自Abcam公司,抗p-Akt、p-mTOR、GAPDH抗体购自CST公司。MTT细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物技术研究。辣根过氧化物标记的二抗及荧光二抗购自武汉博士德生物公司,其余均为国产分析纯试剂。3111型恒温CO₂培养箱购自美国Thermo公司,IX71型倒置相差显微镜购自日本Olympus公司,Axio Observer ZI型荧光显微镜购自德国Carl Zeiss公司,Hitachi-7500透射电镜购自日本Hitachi公司。

1.2 细胞培养、分组及药物处理 鼠神经瘤母细胞株Neuro-2a购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞培养于含10%胎牛血清的MEM+DMEM高糖培养基中,在37℃、5% CO₂培养箱中培养,每2 d更换1次培养基,取对数生长期

细胞用于实验。细胞被分为空白对照组、20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅处理组(A β ₂₅₋₃₅组)、20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅ + 100 μ mol/L NaHS处理组(A β ₂₅₋₃₅ + NaHS组)、20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅ + 5 μ mol/L 3-MA处理组(A β ₂₅₋₃₅ + 3-MA组)、100 μ mol/L NaHS处理组(NaHS组)及20 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅ + 100 μ mol/L NaHS + 20 μ mol/L LY294002处理组(A β ₂₅₋₃₅ + NaHS + LY294002组)。3-MA及NaHS预处理2 h后加用A β ₂₅₋₃₅继续处理24 h,LY294002在A β ₂₅₋₃₅处理前0.5 h加入。A β ₂₅₋₃₅在使用前置于37℃孵箱中孵育7 d,以获得凝聚态A β ₂₅₋₃₅。A β ₂₅₋₃₅及NaHS的合适工作浓度通过参考文献^[8]及前期预实验确定。

1.3 MTT法检测细胞存活率 取对数生长期的细胞,以5×10³/孔的密度种植至96孔细胞培养板中,贴壁分化后各组分别加入各试剂孵育,24 h后每孔加入10 μ L的MTT试剂,37℃避光孵育4 h后加入100 μ L DMSO,15 min后于ELx800多功能酶标仪(BioTek)上测定光密度值,设定波长为560 nm。扣除空白孔中本底的光密度值后,以各处理组与空白对照组的比值表示相对细胞存活率。独立实验重复3次。

1.4 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达 取对数生长期的细胞,加入蛋白提取裂解液和蛋白酶抑制剂后,在冰上放置30 min,然后4℃条件下14 000×g离心10 min。BCA法测定蛋白浓度,取等量总蛋白与5×SDS上样缓冲液混合,95℃变性5 min,行SDS-PAGE后将蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1~2 h,膜孵育一抗(1:1 000)4℃过夜。TBST洗涤3次,37℃孵育相应二抗(1:1 000)2 h,于VILBER FUSION FX7 Spectra凝胶成像分析系统上检测并分析蛋白条带。

1.5 免疫荧光检测LC3表达 细胞接种于96孔板,经药物处理24 h后,4%多聚甲醛固定共培养的细胞,PBS冲洗,5%山羊血清封闭30 min,加入抗LC3抗体后4℃孵育过夜。PBS冲洗后,加入荧光二抗,37℃避光孵育2 h,DAPI染色后荧光显微镜下观察。

1.6 透射电镜法观察自噬体的形成 细胞经药物处理后,用胰酶消化并收集细胞,于4℃离心5 min,弃上清,将标本经2.5%戊二醛固定过夜,加入1%四氧化锇后再次固定2 h。乙醇逐级脱水,环氧树脂

包埋。应用切片机切成超薄切片,1%水化醋酸铀和枸橼酸铅染色。于 Hitachi-7500 透射电镜下观察细胞内自噬体的形成及分布。

1.7 统计学处理 所有数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 LSD 法。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 NaHS 对 A β_{25-35} 处理后细胞存活率的影响 细胞活力检测结果(图 1)显示,与空白对照组相比,A β_{25-35} 组细胞存活率降低($P<0.05$);而经自噬抑制剂 3-MA 处理后,细胞存活率增加($P<0.05$),说明自噬可能是 A β_{25-35} 引起细胞损伤的原因之一。NaHS 组细胞存活率与空白对照组相比未见明显差异,而 A β_{25-35} + NaHS 组细胞存活率与 A β_{25-35} 组相比升高($P<0.05$)。表明 100 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 无细胞毒作用,且可以改善 A β_{25-35} 引起的细胞损伤。

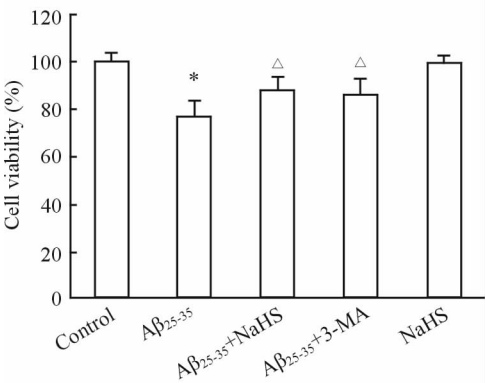


图 1 MTT 法检测 Neuro-2a 细胞活性

Fig 1 Viability of Neuro-2a cells was detected by MTT assay in each group

NaHS: Sodium hydrosulfide; A β_{25-35} : β -Amyloid 25-35; 3-MA: 3-Methyladenine. * $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs A β_{25-35} group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 NaHS 对 A β_{25-35} 引起的自噬的影响 20 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 作用细胞 24 h 后,Beclin-1 的表达及 LC3-II/LC3-I 比值均高于空白对照组,P62 表达低于空白对照组($P<0.05$);加入 3-MA 后 Beclin-1 及 LC3-II 的表达被抑制,表明 A β_{25-35} 能诱导自噬发生;而 NaHS 组与正常对照组相比无明显改变。与 A β_{25-35} 组相比,A β_{25-35} + NaHS 组 Beclin-1 表达及 LC3-II/LC3-I 比值降低,P62 表达增高($P<0.05$,图 2)。上述结果表明外源性 H $_2$ S 可以降低 A β_{25-35} 引起的自噬活性,但其对

自噬的抑制强度弱于 3-MA。

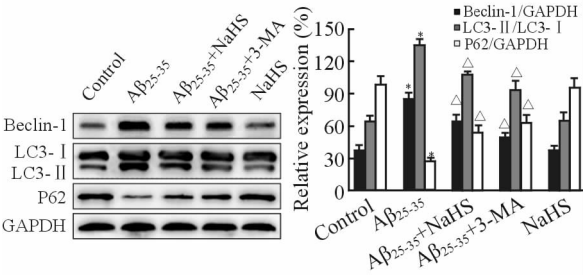


图 2 蛋白质印迹法检测 Beclin-1、LC3 及 P62 的表达

Fig 2 Expression of Beclin-1, LC3 and P62 protein was determined by Western blotting analysis in each group

LC3: Microtubule-associated protein light chain 3; A β_{25-35} : β -Amyloid 25-35; 3-MA: 3-Methyladenine. * $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs A β_{25-35} group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 细胞免疫荧光观察 LC3 的表达和分布 用荧光标记的抗 LC3 抗体染色后,在荧光显微镜下观察代表自噬体的荧光斑点,结果在空白对照组细胞质内可观察到散在斑点状结构(图 3A);A β_{25-35} 作用细胞后,胞质内斑点状结构明显增多,且簇集融合呈斑块状(图 3B),表明自噬体增多;3-MA 抑制自噬后自噬斑点明显减少(图 3C)。而经 NaHS 干预后,胞质中荧光斑点较 A β_{25-35} 组减少(图 3D),说明外源性 H $_2$ S 能抑制 A β_{25-35} 引起的自噬活化。

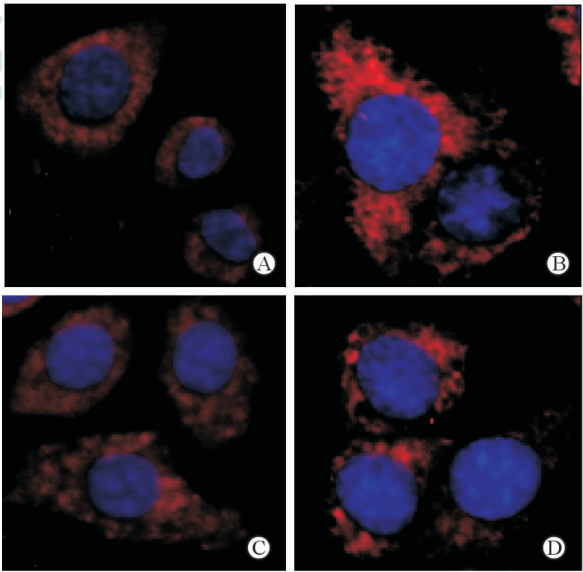


图 3 免疫荧光法观察细胞内 LC3 的表达和分布

Fig 3 Expression and distribution of LC3 by immunofluorescence in cells of each group

A: Control group; B: A β_{25-35} group; C: A β_{25-35} + 3-MA group; D: A β_{25-35} + NaHS group. LC3: Microtubule-associated protein light chain 3; A β_{25-35} : β -Amyloid 25-35; 3-MA: 3-Methyladenine. Original magnification: $\times 400$

2.4 透射电镜下观察自噬体的变化 透射电镜下空白对照组细胞中可见细胞核、线粒体等正常细胞器形态,未见自噬体(图 4A)。A β_{25-35} 组细胞内可见特征性的双层膜结构自噬体,内含待降解细胞器成分(图 4B);而 A β_{25-35} + 3-MA 组及 A β_{25-35} + NaHS 组细胞内自噬体数量较 A β_{25-35} 组明显减少(图 4C、4D)。

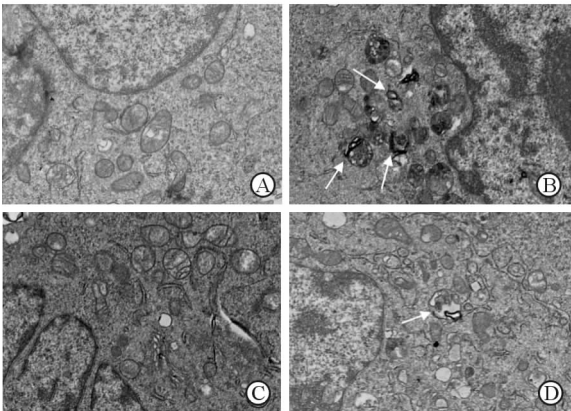


图 4 透射电镜下观察自噬体的形成
Fig 4 Autophosome formation under transmission electron microscope

A: Control group; B: A β_{25-35} group; C: A β_{25-35} + 3-MA group; D: A β_{25-35} + NaHS group. A β_{25-35} : β -Amyloid 25-35; 3-MA: 3-Methyladenine. The arrows indicate autophagosomes. Original magnification: $\times 15\ 000$

2.5 NaHS 对 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响 蛋白质印迹结果表明,与空白对照组相比,A β_{25-35} 组细胞中 p-Akt/Akt 及 p-mTOR/mTOR 比值降低,p-Akt 及 p-mTOR 的表达减少 ($P < 0.05$);而 A β_{25-35} + NaHS 组细胞 p-Akt/Akt 及 p-mTOR/mTOR 比值较 A β_{25-35} 组均升高 ($P < 0.05$),但仍未恢复到正常水平(图 5)。当 A β_{25-35} 、NaHS 与 PI3K/Akt 通路特异抑制剂 LY294002 共孵育细胞时,NaHS 对 p-Akt 及 p-mTOR 的活化作用被 LY294002 抑制 ($P < 0.05$,图 5);而 NaHS 对 LC3-II 表达的降低作用也受到 LY294002 抑制 ($P < 0.05$,图 6)。上述结果提示外源性 H $_2$ S 可能通过活化 PI3K/Akt/mTOR 通路来抑制 A β_{25-35} 引起的自噬。

3 讨论

A β_{25-35} 是 A β_{40} 和 A β_{1-42} 的核心片段,具有片段

小、易合成、毒性强、更容易透过细胞膜等特点^[9],是研究 A β 毒性作用的常用片段。既往研究通过免疫染色法发现,A β 及其产生途径中的关键酶和肽段存在于神经元自噬溶酶体中,提示自噬体可能是 A β 产生的场所^[10]。此外,在早期阿尔茨海默病患者的脑组织中发现 Beclin-1 蛋白的表达是降低的,在体外培养的神经元和小鼠在体实验中,过表达或沉默 Beclin-1 也可引起 A β 表达水平的改变^[11]。这些研究表明,自噬与 A β 的病理作用密切相关。

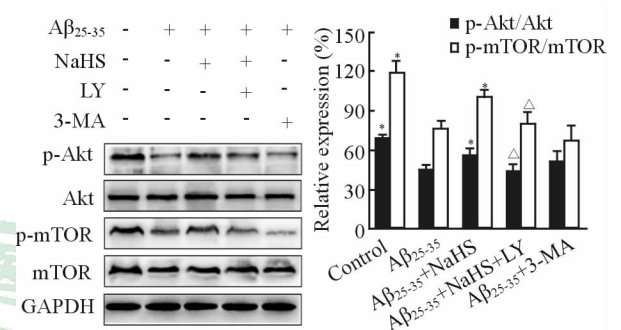


图 5 蛋白质印迹法检测 p-Akt 及 p-mTOR 的表达
Fig 5 Expression of p-Akt and p-mTOR was measured by Western blotting analysis in each group

A β_{25-35} : β -Amyloid 25-35; 3-MA: 3-Methyladenine; p-Akt: Phospho-protein kinase B; p-mTOR: Phospho-mammalian target rapamycin; LY: LY294002. * $P < 0.05$ vs A β_{25-35} group; $\triangle P < 0.05$ vs A β_{25-35} + NaHS group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

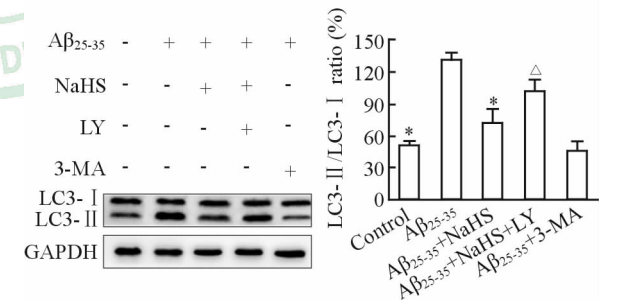


图 6 蛋白质印迹法检测 LC3 的表达
Fig 6 Expression of LC3 was measured by Western blotting analysis in each group

LC3: Microtubule-associated protein light chain 3; A β_{25-35} : β -Amyloid 25-35; 3-MA: 3-Methyladenine; LY: LY294002. * $P < 0.05$ vs A β_{25-35} group; $\triangle P < 0.05$ vs A β_{25-35} + NaHS group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

本实验结果显示,A β_{25-35} 降低了细胞存活率,同时诱导自噬蛋白表达增加;而自噬抑制剂 3-MA 能降低自噬活性,并改善细胞活力,说明 A β_{25-35} 诱导的自噬介导了细胞损伤。有研究者通过向正常小鼠海马中注入 A β_{25-35} ,2 周后通过透射电镜发现大量堆积的自噬囊泡,表明毒性 A β 蛋白可以过度活化自

噬^[12-13],而自噬活性的改变可以损伤溶酶体中底物的降解,引起溶酶体膜通透性增加,组织蛋白酶释放;也可损伤线粒体自噬引起坏死线粒体堆积,线粒体膜通透性增加,最终致神经细胞死亡^[14]。

H₂S 具有重要的生物活性,在体内主要以 H₂S 气体形式和 NaHS 形式存在,并形成动态平衡。而 NaHS 溶液较气体 H₂S 更容易确定浓度,方便实验操作,常作为 H₂S 的供体应用于实验^[15]。体内外研究证实,H₂S 对细胞凋亡^[16]、炎症损伤^[17-18]、氧化应激^[8]等均有调节作用。在一项心肌缺血再灌注损伤的动物模型研究中,研究者发现 H₂S 可以通过重建自噬流保护心肌缺血再灌注损伤^[19]。Zhang 等^[20]研究发现 H₂S 可以抑制自噬活性从而对创伤后的脑损伤起到保护作用,表明 H₂S 可能对自噬具有调节作用。自噬是将细胞内长寿命蛋白、受损细胞器等物质转运到溶酶体进行降解并重新利用的生物过程,它区别于蛋白酶体,后者只能降解蛋白质^[21]。自噬发生时,Becn-1、LC3 及 P62 蛋白分别参与了自噬的起始、延长、降解等阶段。其中,LC3 是自噬活性的标志蛋白,胞质型 LC3-I 经酶解转化为膜型 LC3-II,其转化比值可反映自噬水平。P62 是一种受体蛋白,介导细胞选择性自噬,其表达水平与自噬活性呈负相关^[22]。我们前期实验发现,100 μmol/L 的外源性 H₂S 对细胞保护作用最为明显,这与既往研究报道哺乳动物脑内 H₂S 的生理浓度约为 50~160 μmol/L 相一致^[23]。本实验用 100 μmol/L NaHS 预处理细胞后,Becn-1 表达及 LC3-II/LC3-I 比值降低,P62 表达增高,说明 Aβ₂₅₋₃₅ 引起的自噬活化被抑制。

既往实验发现,Aβ₂₅₋₃₅ 可以下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路^[24],而 H₂S 可以通过活化 PI3K/Akt 通路减少 Aβ 的产生^[25]。PI3K/Akt 被认为是细胞内最重要的抗凋亡、促存活的信号转导通路。PI3K 家族包括 PI3K-I、-II 和 -III,其中 PI3K-I 和 PI3K-III 分别参与了抑制和促进自噬^[26];mTOR 是自噬调控的关键蛋白,其活化后可以抑制自噬起始分子的功能,从而负性调节自噬的活性;Akt 是 PI3K 的下游效应分子,它的激活可促使 mTOR 活化,可能是联系促细胞生存信号通路与自噬抑制通路的关键蛋白^[27]。Aβ₂₅₋₃₅ 导致 PI3K/Akt/mTOR 通路失活,从而启动自噬过程,改变细胞内的各种能

量代谢过程^[11]。本研究显示外源性 H₂S 能具有上调 p-Akt 和 p-mTOR 的表达,改善 Aβ₂₅₋₃₅ 对 PI3K/Akt/mTOR 通路的抑制作用,而 PI3K/Akt/mTOR 特异抑制剂 LY294002 可以部分地阻断外源性 H₂S 对该通路及自噬活性的调节作用,表明外源性 H₂S 抑制 Aβ₂₅₋₃₅ 引起的自噬性死亡可能与活化 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关。近期一项针对心肌纤维化的动物实验也证实了 H₂S 具有上调 PI3K/Akt 通路抑制自噬的作用^[28]。

本实验探讨了外源性 H₂S 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的自噬性细胞死亡的影响,结果发现 Aβ₂₅₋₃₅ 下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,导致细胞损伤;而外源性 H₂S 通过上调 PI3K/Akt/mTOR 细胞信号通路使自噬保持低水平状态,从而具有细胞保护作用。下一步研究将通过调节内源性 H₂S 表达及在体实验进一步验证上述结果。

[参考文献]

- [1] IVINS K J, BUI E T, COTMAN C W. β-Amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis [J]. *Neurobiol Dis*, 1998, 5: 365-378.
- [2] BUTTERFIELD D A, SWOMLEY A M, SULTANA R. Amyloid β-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 823-835.
- [3] MCGEER P L, MCGEER E G. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126: 479-497.
- [4] ZHENG L, TERMAN A, HALLBECK M, DEHVARI N, COWBURN R F, BENEDIKZ E, et al. Macroautophagy-generated increase of lysosomal amyloid β-protein mediates oxidant-induced apoptosis of cultured neuroblastoma cells [J]. *Autophagy*, 2011, 7: 1528-1545.
- [5] PEREZ S E, HE B, NADEEM M, WUU J, GINSBERG S D, IKONOMOVIC M D, et al. Hippocampal endosomal, lysosomal, and autophagic dysregulation in mild cognitive impairment: correlation with Aβ and tau pathology [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2015, 74: 345-358.
- [6] WEI H J, LI X, TANG X Q. Therapeutic benefits of H₂S in Alzheimer's disease [J]. *J Clin Neurosci*, 2014, 21: 1665-1669.

- [7] LIU Y Y, BIAN J S. Hydrogen sulfide protects amyloid- β induced cell toxicity in microglia [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 22: 1189-1200.
- [8] TANG X Q, YANG C T, CHEN J, YIN W L, TIAN S W, HU B, et al. Effect of hydrogen sulphide on β -amyloid-induced damage in PC12 cells [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35: 180-186.
- [9] VARADARAJAN S, KANSKI J, AKSENOVA M, LAUDERBACK C, BUTTERFIELD D A. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A β_{1-42} and A β_{25-35} [J]. J Am Chem Soc, 2001, 123: 5625-5631.
- [10] YU W H, CUERVO A M, KUMAR A, PETERHOFF C M, SCHMIDT S D, LEE J H, et al. Macroautophagy—a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease [J]. J Cell Biol, 2005, 171: 87-98.
- [11] PICKFORD F, MASLIAH E, BRITSCHGI M, LUCIN K, NARASIMHAN R, JAEGER P A, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118: 2190-2199.
- [12] FAN S, ZHANG B, LUAN P, GU B, WAN Q, HUANG X, et al. PI3K/AKT/mTOR/p70S6K pathway is involved in A β_{25-35} -induced autophagy [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 161020.
- [13] XUE Z, GUO Y, ZHANG S, HUANG L, HE Y, FANG R, et al. β -Asarone attenuates amyloid β -induced autophagy via Akt/mTOR pathway in PC12 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 741: 195-204.
- [14] GHAVAMI S, SHOJAEI S, YEGANEH B, ANDE S R, JANGAMREDDY J R, MEHRPOUR M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders [J]. Prog Neurobiol, 2014, 112: 24-49.
- [15] ABE K, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator [J]. J Neurosci, 1996, 16: 1066-1071.
- [16] YIN W L, HE J Q, HU B, JIANG Z S, TANG X Q. Hydrogen sulfide inhibits MPP(+)-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Life Sci, 2009, 85: 269-275.
- [17] LIU H, DENG Y, GAO J, LIU Y, LI W, SHI J, et al. Sodium hydrosulfide attenuates β -amyloid-induced cognitive deficits and neuroinflammation via modulation of MAPK/NF- κ B pathway in rats [J]. Curr Alzheimer Res, 2015, 12: 673-683.
- [18] FAN H, GUO Y, LIANG X, YUAN Y, QI X, WANG M, et al. Hydrogen sulfide protects against amyloid β -peptide induced neuronal injury via attenuating inflammatory responses in a rat model [J]. J Biomed Res, 2013, 27: 296-304.
- [19] XIE H, XU Q, JIA J, AO G, SUN Y, HU L, et al. Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458: 632-638.
- [20] ZHANG M, SHAN H, CHANG P, WANG T, DONG W, CHEN X, et al. Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice [J]. PLoS One, 2014, 9: e87241.
- [21] KROEMER G, LEVINE B. Autophagic cell death: the story of a misnomer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9: 1004-1010.
- [22] ESTEBAN-MARTINEZ L, BOYA P. Autophagic flux determination *in vivo* and *ex vivo* [J]. Methods, 2015, 75: 79-86.
- [23] HOSOKI R, MATSUKI N, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237: 527-531.
- [24] JIN Y, FAN Y, YAN E Z, YANG J, ZONG Z H, QI Z M. Amyloid β -protein fragment 25-35 down-regulates PI3K/Akt/p70S6K pathway in rat hippocampus *in vivo* [J]. Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, 2007, 21: 90-98.
- [25] 陈筱山,何选丽,朱丽娟,张华,冯飞,晏勇. 外源性硫化氢对原代神经元早老素1和 β 淀粉样蛋白的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35: 2060-2064.
- [26] HERAS-SANDOVAL D, PÉREZ-ROJAS J M, HERNÁNDEZ-DAMIÁN J, PEDRAZA-CHAVERRI J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. Cell Signal, 2014, 26: 2694-2701.
- [27] RODON J, DIENSTMANN R, SERRA V, TABERNERO J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10: 143-153.
- [28] XIAO T, LUO J, WU Z, LI F, ZENG O, YANG J. Effects of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and PI3K/AKT1-regulated autophagy in diabetic rats [J]. Mol Med Rep, 2016, 13: 1765-1773.