

牛膝醇提物促进兔骨关节炎软骨修复的作用及其机制的实验研究

李成付, 王玖忠, 边瑜健, 潘中琰, 王杰, 谢小军, 杨小秋

深圳市南山区西丽人民医院, 广东 深圳 518055

摘要: **目的** 观察牛膝醇提物(AEAB)体内诱导兔骨关节炎(OA)模型软骨修复的作用和对软骨酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(CKIP-1)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)比值、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶(caspase-3)、蛋白激酶 B(Akt)的影响。**方法** 将 42 只实验兔随机分为正常组、模型组、AEAB 治疗组(低剂量、中剂量、高剂量)、硫酸氨基葡萄糖对照组、安必丁对照组 7 个组,每组 6 只。正常组不予处理。其余 6 组采用 Hulth 法制备 OA 模型,造模后,分别灌胃给予蒸馏水,低、中、高剂量的 AEAB,硫酸氨基葡萄糖及安必丁。正常组仅予蒸馏水灌胃。6 周后处死实验兔,取软骨标本进行软骨病理标本大体观察、Pelletier 评分、Mankin's 评分,分别采用免疫组化法和 Western blot 法检测软骨 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达。**结果** Pelletier 评分、Mankin's 评分及免疫组化法 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达,AEAB 治疗组分别与正常组(除外 Bcl-2/Bax)、模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),AEAB 治疗组与硫酸氨基葡萄糖对照组及安必丁对照组比较,上述指标差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);Western blot 法检测结果表明,CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达治疗组分别与正常组、模型组比较,以及治疗组不同剂量亚组间两两比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** 牛膝醇提物能有效刺激软骨细胞增殖,修复软骨损伤,降低软骨 CKIP-1、caspase-3 蛋白表达,提高 Bcl-2/Bax、Akt 蛋白表达,其具体分子网络作用机制尚待进一步探索。

关键词: 牛膝; 醇提物; 软骨; 骨关节炎; 修复

中图分类号: R 684.3 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)07-0844-04

Experimental study on the role of promoting chondral renovation of alcohol extracts of achyranthis bidentatae in rabbits with osteoarthritis and its mechanism

LI Cheng-fu, WANG Jiu-zhong, BIAN Yu-jian, PAN Zhong-ying, WANG Jie, XIE Xiao-jun, YANG Xiao-qiu
Xili People's Hospital, Nanshan District, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: Objective To observe the role of promoting chondral renovation induced by alcohol extracts of achyranthis bidentatae (AEAB) in vivo in rabbits with osteoarthritis and the affect on cartilage casein kinase 2 interacting protein 1 (CKIP-1), the ratio of B cell lymphoma / leukemia -2 (Bcl-2) to Bcl-2 associated X (Bax) (Bcl-2/Bax), cysteine aspartate specific proteinase (Caspase-3) and protein kinase B (Akt). **Methods** Forty-two experimental rabbits were randomly divided into 7 groups ($n=6$ each): normal group, model group, AEAB therapy group (low dose, median dose, high dose), glucosamine sulfate control group, diacerein capsules control group. No treatment was given in normal group. The OA models were established by Hulth method in remainder six groups, and distilled water, AEAB of low, median and high doses, glucosamine sulfate, diacerein capsules were respectively given by lavage after modeling. Distilled water was given by lavage only in normal group. The experimental rabbits were killed six weeks later, and the cartilage samples were taken to perform gross observation, Pelletier score, Mankin's score and measure the expressions of CKIP-1, Bcl-2/Bax, caspase-3 and Akt using immunohistochemistry method and Western blot method, respectively. **Results** Compared AEAB therapy with normal group and model group, respectively, there were significant differences in Pelletier score, Mankin's score, and CKIP-1, Bcl-2/Bax (normal group was excluded), caspase-3, Akt expressions detected by immunohistochemistry method ($P < 0.05$, $P < 0.01$); compared AEAB therapy with glucosamine sulfate control group and diacerein capsules control group, respectively,

there were no significant differences in aforementioned indexes (all $P > 0.05$). Compared AEAB therapy group with normal group and model group and compared between any two subgroups of therapy group, there were all significant differences in CKIP-1, Bcl-2/Bax, caspase-3 and Akt expressions detected by Western blot method (all $P < 0.05$). **Conclusions** AEAB can effectively induce proliferation of chondrocytes and repair the damage of cartilage possibly through inhibiting expressions of CKIP-1 and caspase-3 and increasing Bcl-2/Bax and Akt expressions, but the concrete mechanism of molecular network effect should be further explored.

Key words: Achyranthis bidentatae; Alcohol extract; Cartilage; Osteoarthritis; Repair

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床常见疾病, 好发于膝关节, 是以关节软骨软化、破溃、脱落为核心病理改变的慢性关节疾病^[1], 据国内外调查, 总患病率约 15%^[2], 致残率高。前期实验提示中药牛膝醇提物 (alcohol extracts of achyranthis bidentatae, AEAB) 能够显著提高兔 OA 模型的软骨细胞数目和增加 II 型胶原表达量, 能够修复急性软骨损伤^[3-4], 而对 AEAB 影响软骨修复的具体作用机制研究还未见报道。故本课题组利用 AEAB 体内干预兔膝 OA 模型, 探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 新西兰健康大白兔雌雄不限 [广东省实验动物中心, 合格: SCXK (粤) 2008-0002], 体重 (2.27 ± 0.62) kg, 兔龄 3 ~ 4 个月, 免疫组化试剂盒 [酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1 (CKIP-1)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 比值、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶 (Caspase-3)、蛋白激酶 B (Akt)], Western blot 试剂盒 (CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt), 怀牛膝 (产地河南) 等。

1.2 AEAB 的制备 依据《中国药典》浸渍法制备^[3]: 1 kg 粉碎的怀牛膝加入 400 ml 50% 乙醇置于有盖容器内, 密盖, 振荡, 浸渍 7 d, 取上清液; 再加入 300 ml 50% 乙醇液, 浸渍 7 d, 再次倾取上清液后加入 300 ml 50% 乙醇液, 依法浸渍 7 d, 最后取出上清液。合并浸出液, 静置 24 h, 过滤, 浓缩, 1 ml/g 原药材。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 42 只实验兔, 普通级, 分笼饲养, 实验动物按随机分组法将动物分配为正常组, 模型组, AEAB 治疗高剂量, 中剂量和低剂量组、硫酸氨基葡萄糖对照组, 安必丁对照组, 共 7 组, 每组 6 只。一兔一笼标准喂养, 兔笼规格 800 mm × 600 mm × 400 mm, 不限制笼内活动。混合饲料喂养, 自由饮水, 每日保证饲养环境清洁。每日观察实验兔的食量、大小便、活动度、步态及精神状况。

1.3.2 Hulth 造模法行动物软骨损伤造模 实验动

物购入后分笼饲养, 室温、安静环境适应性饲养 1 周。实验动物除正常组外其他各组参照 Hulth 法造模: 将受试动物用 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 在右后腿膝关节的内侧作一 2 cm 左右的纵行切口, 暴露关节腔, 切断前后交叉韧带, 完整切除内侧半月板, 清洗术野后逐层关闭伤口敷料包扎。术后肌内注射青霉素 20 万 U/d 共 3 d, 每天两次常规伤口换药, 连续 7 d 预防感染, 术后 2 周拆线。每天记录实验兔伤口愈合情况, 若发现伤口感染予剔除实验。

1.3.3 AEAB 体内干预 治疗组和对照组术后 1 周开始, 参照《药理实验方法学》中药物剂量换算公式: $d \text{ 兔} (\text{g}/\text{kg}) = d \text{ 人} \times R \text{ 兔} / R \text{ 人} \times (W \text{ 人} / W \text{ 兔})^{1/3}$ 设计方案 (d : 每天每 kg 体重的用量; R : 体型系数; W : 体重), 结合体重按相应剂量蒸馏水稀释成 10 ml 后灌服连续 6 周。AEAB 治疗组: 低剂量组 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 中剂量组 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 高剂量组 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 硫酸氨基葡萄糖组: $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 安必丁组: 安必丁 $4.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 每次用蒸馏水配成 10 ml 每天灌胃 2 次。正常组和模型组: 每次用蒸馏水 10 ml 每天灌胃 2 次。

1.3.4 关节软骨的常规病理学检测 实验干预 6 周处死实验兔后立即切开膝关节, 行大体观察, Pelletier 评分^[3]。测量造模膝关节周径, 将股骨下端关节面外侧软骨层用手术刀小心剃下几片移入 EP 管, 置入液氮保存, 用于 Western blot 检测; 切取股骨内髁软骨及胫骨平台处软骨 (用于 HE 染色和免疫组化检测), 修成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的全软骨层标本, 固定, 脱钙, 常规脱水, 石蜡包埋。取切片行 HE 染色光镜观察, 用图像拍摄系统摄片, 每张图片随机选取 5 个视野, 参照 Mankin^[3] 评分系统对软骨结构、软骨细胞和潮线进行半定量评分。

1.3.5 免疫组化检测软骨 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达 取切片用 SABC 法行免疫组化染色, 按照试剂盒说明书操作。在光镜下观察拍照, 每张切片随机选取 5 个不同的视野, 对棕褐色阳性反应区分别进行测定, 然后用 IPP6.0 图像分析软

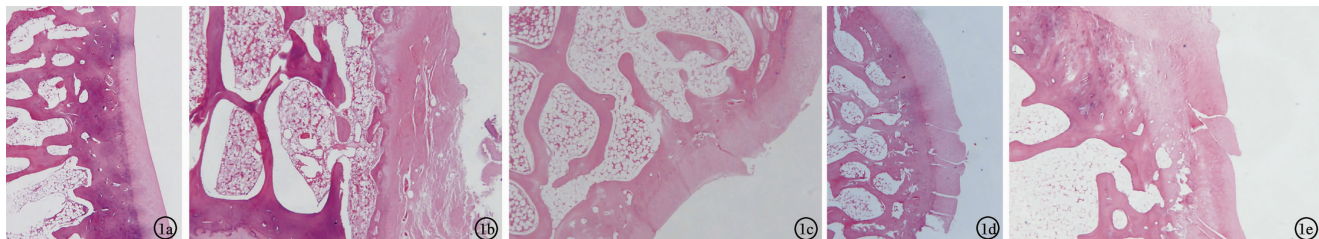
件进行测定其灰度值,累加后取均值。

1.3.6 Westernblot 检测软骨 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达 从液氮中取出软骨组织,按照总蛋白提取试剂盒提取组织总蛋白,用酶标仪测定样品蛋白浓度,将蛋白样品和 $5 \times$ 上样缓冲液按 4:1 体积充分混匀,变性,分装蛋白样品备用,再进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、杂交抗体、显色、曝光、显影、定影,胶片洗涤干燥,拍照扫描记录,通过 Gel-Proanalyzer 4 软件进行 Western-blot 结果分析。

1.4 统计学分析 用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行正态性及方差齐性检验,偏态资料行对数转换为近似正态后,多组间比较采用方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验;检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况 实验兔右膝切口愈合良好,未见



注:1a:正常组;1b:模型组;1c:治疗组;1d:硫酸氨基葡萄糖对照组;1e:安必丁对照组

图 1 各组软骨组织光镜所见(HE, $\times 40$)

表 1 各组 Pelletier 评分和 Mankin's 评分比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	Pelletier 评分	改良 Mankin's 评分
正常组	0.26 \pm 0.32	0.41 \pm 0.65
模型组	3.01 \pm 0.56	8.16 \pm 0.53
治疗组		
低剂量	2.83 \pm 0.51 ^{△*}	7.82 \pm 0.49 ^{△*}
中剂量	2.76 \pm 0.43 ^{△*}	7.52 \pm 0.57 ^{△*}
高剂量	2.64 \pm 0.31 ^{△*}	6.89 \pm 0.71 ^{△*}
对照组		
硫酸氨基葡萄糖	2.86 \pm 0.38 ^{△*}	7.89 \pm 0.63 ^{△*}
安必丁	2.81 \pm 0.35 ^{△*}	7.78 \pm 0.59 ^{△*}

注:与正常组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.01$ 。

表 2 各组免疫组化阳性表达率比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	CKIP-1	Bcl-2/Bax	caspase-3	Akt
正常组	39.24 \pm 11.72	4.25 \pm 1.31	2.21 \pm 0.72	24.14 \pm 9.22
模型组	54.16 \pm 12.81	3.32 \pm 1.87	5.45 \pm 1.62	14.07 \pm 8.41
治疗组				
低剂量	45.31 \pm 13.01 ^{△*}	4.06 \pm 1.12 [*]	4.26 \pm 1.42 ^{△*}	26.81 \pm 11.25 ^{△*}
中剂量	41.47 \pm 11.82 ^{△*}	4.24 \pm 1.01 [*]	3.23 \pm 1.06 ^{△*}	28.26 \pm 8.59 ^{△*}
高剂量	35.01 \pm 12.23 ^{△*}	4.46 \pm 1.27 [*]	2.05 \pm 1.78 ^{△*}	31.42 \pm 9.73 ^{△*}
对照组				
硫酸氨基葡萄糖	42.36 \pm 12.23 [△]	4.11 \pm 1.73 [*]	4.14 \pm 1.37 ^{△*}	28.52 \pm 11.02 ^{△*}
安必丁	43.16 \pm 11.79 [△]	4.21 \pm 1.32 [*]	4.31 \pm 1.62 ^{△*}	28.11 \pm 10.37 ^{△*}

注:与正常组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

感染。

2.2 软骨组织大体观察、Pelletier 评分、HE 染色、Mankin's 评分 正常组 HE 染色软骨表面光滑,软骨细胞数目正常、排列清晰,基质染色呈浅红色,潮线结构稳定。模型组 HE 染色软骨表面可见不规则裂隙达钙化层,软骨细胞数目减少,基质染色呈浅红色,潮线重构。治疗组、硫酸氨基葡萄糖对照组和安必丁对照组 HE 染色局部软骨表面可见不规则裂隙达钙化层,软骨细胞数量增多,基质染色呈浅红色,潮线结构稍正常(图 1)。Pelletier 评分和 Mankin's 评分在正常组及模型组分别与治疗组、对照组组间比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01);在治疗组、对照组之间比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.3 免疫组化检测软骨 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达在正常组(除外 Bcl-2/Bax)、模型组分别与治疗组、对照组比较差异均有统计学意义(P 均 $<$

表 3 各组 Western blot 检测灰度值比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	CKIP-1	Bcl-2/Bax	caspase-3	Akt
正常组	0.21 \pm 0.63	0.21 \pm 0.14	0.06 \pm 0.83	0.69 \pm 0.53
模型组	0.67 \pm 0.35	0.09 \pm 0.87	0.51 \pm 0.73	0.12 \pm 0.35
治疗组				
低剂量	0.42 \pm 0.22 ^{△*}	0.16 \pm 0.09 ^{△*}	0.34 \pm 0.31 ^{△*}	0.66 \pm 0.46 ^{△*}
中剂量	0.37 \pm 0.12 ^{△*}	0.22 \pm 0.10 ^{△*}	0.21 \pm 0.64 ^{△*}	0.72 \pm 0.51 ^{△*}
高剂量	0.21 \pm 0.10 ^{△*}	0.32 \pm 0.12 ^{△*}	0.16 \pm 0.91 ^{△*}	0.81 \pm 0.65 ^{△*}
对照组				
硫酸氨基葡萄糖	0.37 \pm 0.25 ^{△*}	0.14 \pm 0.07 ^{△*}	0.25 \pm 0.36 ^{△*}	0.74 \pm 0.46 ^{△*}
安必丁	0.41 \pm 0.14 ^{△*}	0.16 \pm 0.08 ^{△*}	0.29 \pm 0.81 ^{△*}	0.70 \pm 0.33 ^{△*}

注:与正常组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与低剂量组比较,^a $P < 0.05$;与中剂量组比较,^b $P < 0.05$ 。

0.05);治疗组与对照组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.4 Westernblot 检测软骨 CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达 Western blot 检测灰度值结果,CKIP-1、Bcl-2/Bax、caspase-3、Akt 蛋白表达治疗组分别与正常组、模型组比较,以及治疗组不同剂量亚组间两两比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 3。

3 讨论

OA 是导致老年妇女残疾的首要原因及老年男性行动限制的第二大原因,仅次于心血管病的影响^[5]。随年龄增大,患病率迅速上升。国内的统计资料表明,我国患 OA 的人数占总人口的 3%,其中大部分为膝 OA,55 岁以上人群 X 线有膝 OA 表现者约 60%,65 岁以上老年人 OA 的发病率可达 85%,75 岁以上的老年人中每人都有至少一个关节有 OA 变化。软骨细胞的凋亡是关节软骨退变,导致 OA 发病的重要因素之一。软骨细胞具有合成、分泌并维持细胞外基质的功能,是软骨基质生化代谢的主要来源。软骨基质的主要成分是胶原和蛋白多糖,其中 II 型胶原对维持软骨的生物力学起决定性作用。

CKIP-1 是近年来发现的一种重要分子,在成骨细胞中发挥负调控作用^[6]。CKIP-1 是第一个定位于质膜的 c-Jun/AP-1 结合蛋白,其在细胞凋亡条件下发生切割并移位至胞核,与所有凋亡通路的最终执行因子 caspase-3 形成正反馈环,而 Bcl-2/Bax 蛋白比率是启动细胞凋亡的“分子开关”^[7],从而加速肿瘤坏死因子诱导的细胞凋亡。马钢等^[8]报道, caspase-3 蛋白在 OA 软骨细胞的凋亡过程中扮演着重要的作用。Tokuda 等^[9]研究表明,CKIP-1 可以与存活激酶 Akt 相互作用,并抑制 Akt 的活性。

有关研究表明,用 AEAB 干预兔 OA 模型 4 周后软骨细胞数量较对照组增多,软骨基质结构纹理变整齐,潮线结构逐渐恢复正常^[3-4],提示 AEAB 能有效刺激软骨细胞增殖,恢复软骨基质成分,稳定潮线结构,能有效缓解 OA 病情,加快软骨病变的修复,但其具体作用机制至今未见报道。中医药治疗 OA 具有巨大的优势,目前已知许多补肾类、活血类中药对 OA 的各期发挥着重要作用,如骨碎补、牛膝、鹿茸、龟板等能够促进软骨的形成、骨细胞的增殖^[10-11]。据统计,在中医药治疗 OA 的药物中牛膝的使用频率最高^[12],它具有活血通经、补肝肾、强筋骨、引血下行的功效。牛膝针对 OA 既能补益肝肾,又能祛瘀滞湿热,即“标本兼治”,还能“引经”促使药物到达膝关节靶点。牛膝的“强筋”功效体现了对关节软骨的防退变、促修复功能,是对 OA“治本”功效的重要体现。

本课题组研究发现,兔 OA 模型用 AEAB 干预后,治疗组软骨细胞数量较对照组增多, Pelletier 评分和改良 Mankin's 评分明显降低,软骨基质结构纹理变整齐,提示能有效促进软骨损伤修复,疗效同临床常用的治疗 OA 的有效药物(硫酸氨基葡萄糖,安必丁)无明显差异。通过免疫学和分子生物学证实

AEAB 能明显降低软骨 CKIP-1、caspase-3 蛋白表达,提高 Bcl-2/Bax、Akt 蛋白表达,与杨安群等^[13]认为牛膝通过影响 PI3K/AKT 通路而降低兔 OA 模型软骨细胞凋亡率相吻合。Shen 等^[14]发现牛膝多糖-4 预处理后的细胞 Bcl-2/Bax 比率增加,抑制 caspase-3 活化,信号通路分析表明牛膝多糖-4 通过激活 Akt/Gsk3 β 信号通路而呈现出抗凋亡的作用,且该作用可通过 PI3K 的抑制而阻断。因此本课题组认为 AEAB 可能通过下调 CKIP-1,干预 PI3K/Akt/Gsk3 β 通路,从而实现软骨细胞增殖,软骨基质表达,修复软骨损伤,其具体分子网络作用机制尚待进一步探索。

参考文献

- [1] 蔡立民,谭志超,张斌山,等. 关节镜清术结合中药治疗早中期膝关节骨性关节炎的疗效研究[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(6): 898-901.
- [2] 李宇华. 中老年人群骨关节炎的流行病学特征[J]. 中国临床康复, 2005, 9(38): 133-135.
- [3] 彭力平,马笃军,林栋栋,等. 牛膝醇提物体内诱导兔骨关节炎模型软骨修复的病理学观察[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(2): 126-129.
- [4] 彭力平,马笃军,裴军宇,等. 牛膝醇提物对急性软骨损伤兔软骨的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(17): 1504-1506, 1526.
- [5] Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2006, 85(11 Suppl): S2-S11.
- [6] Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(6): 507-512.
- [7] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(4): 393-396.
- [8] 马钢,崔珈衍,任明姬. Caspase-3、Caspase-12 与骨性关节炎软骨细胞凋亡的关系[J]. 中国实用医药, 2014, 9(35): 224-225.
- [9] Tokuda E, Fujita N, Oh-hara T, et al. Casein kinase 2-interacting protein-1, a novel Akt pleckstrin homology domain-interacting protein, down-regulates PI3K/Akt signaling and suppresses tumor growth in vivo[J]. Cancer Res, 2007, 67(20): 9666-9676.
- [10] 尚平,贺宪,安耀武,等. 骨碎补总黄酮对骨关节炎兔骨髓间充质干细胞软骨定向分化的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2009, 6(6): 10-13.
- [11] 孙奋勇,潘秋辉,洪岸. 牛膝促进成骨细胞增殖的作用与机理研究[J]. 中药材, 2004, 27(4): 264-266.
- [12] 郭达,张斌山,刘金文. 骨关节炎的古代方药规律研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(9): 2194-2195.
- [13] 杨安群,谢获. 当归-牛膝对兔骨关节炎 PI3K/AKT 通路的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(5): 526-529.
- [14] Shen Y, Zhang Q, Gao X, et al. An active fraction of *Achyranthes bidentata* polypeptides prevents apoptosis induced by serum deprivation in SH-SY5Y cells through activation of PI3K/Akt/Gsk3 β pathways[J]. Neurochem Res, 2011, 36(11): 2186-2194.