

酪氨酸氧化产物诱导大鼠空间学习记忆损伤

冉玉梅¹, 李竹青¹, 丁寅翼¹, 赵琪¹, 施用晖^{1,2}, 乐国伟^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 探究长期摄入酪氨酸氧化产物对大鼠空间学习记忆及其对海马组织的影响。采用 4 周龄清洁级 SD 大鼠 40 只, 随机分为 Control 组(正常日粮)、Tyr 组(添加 0.44%酪氨酸)、TOP1 组(添加 0.22 %酪氨酸氧化产物)、TOP2 组(添加 0.44%酪氨酸氧化产物)。饲喂 24 周后, 用 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习与记忆能力, 测定海马组织中蛋白质和脂质氧化产物的含量, 用 RT-PCR 检测海马组织抗氧化和炎症相关基因的表达。结果显示, 饲喂 24 周后, 与 Control 组和 Tyr 组相比, TOP1 组和 TOP2 组大鼠出现空间学习与记忆障碍; 海马组织中 MDA、4-HNE、Dityr、3-NT、A β 40 含量都显著升高($p<0.05$); Nrf2、NF- κ B 和 iNOS 的 mRNA 表达也显著上调($p<0.05$)。因此, 酪氨酸氧化产物导致大鼠海马组织氧化损伤, 蛋白质和脂质氧化产物积累, 造成大鼠空间学习记忆能力受损。

关键词: 酪氨酸氧化产物; 氧化应激; 海马; 学习记忆; Morris 水迷宫

中图分类号: Q 517; R 151.3 文章编号: 1673-1689(2019)02-0001-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.001

Tyrosine Oxidation Products Induce Spatial Learning and Memory Impairments in Rats

RAN Yumei¹, LI Zhuqing¹, DING Yinyi¹, ZHAO Qi¹, SHI Yonghui^{1,2}, LE Guowei^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To explore the effects of tyrosine oxidation products (TOP) on the spatial learning and memory of rats and hippocampus. 40 SD rats are divided into four groups: Control (normal diet), Tyr group (add 0.44% Tyr), TOP1 group (add 0.22% tyrosine oxidation products) and TOP2 group (add 0.44% tyrosine oxidation products). After 24-week feeding, Morris water maze is used to test the spatial learning and memory of rats. Protein and lipid oxidation products in hippocampus are measured. Expressions of antioxidation- and inflammation- related genes are detected using RT-PCR. The results show that, after 24-week feeding, compared with Control and Tyr group mice, TOP1 and TOP2 group rats showed impaired spatial learning and memory in Morris water maze; hippocampal MDA, 4-HNE, Dityr, 3-NT and A β 40 are significantly increased ($p<0.05$); expressions of Nrf2, NF- κ B and iNOS were significantly up-regulated ($p<0.05$). Thus, tyrosine oxidation

收稿日期: 2016-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571841); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室开放课题(SKLF-ZZB-201609)。

* 通信作者: 乐国伟(1956—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事营养代谢与调控研究。E-mail: lgw@jiangnan.edu.cn

引用本文: 冉玉梅, 李竹青, 丁寅翼, 等. 酪氨酸氧化产物诱导大鼠空间学习记忆损伤[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 01-07.

products induce oxidative damage to rats hippocampus, accumulation of lipid and protein oxidation products in hippocampus, and impair the spatial learning and memory of rats.

Keywords: tyrosine oxidation products, oxidative stress, hippocampus, leaning and memory, Morris water maze

食品中的蛋白质在加工、储存及运输过程中,不可避免的会受到高温、挤压、剪切力等物化因素的作用,或者在自由基和脂质过氧化物的存在下发生氧化修饰^[1-2]。蛋白质氧化修饰不仅降低食品的感官品质和营养价值,其氧化产物可能危害人体健康。在肉制品和奶制品的加工过程中都会发生蛋白质氧化修饰^[3-4]。动物实验表明,摄入氧化蛋白质会导致小鼠血液和组织中自由基水平显著升高,丙二醛含量显著增加,抗氧化酶活性下降^[5]。

酪氨酸广泛存在于蛋白质含量丰富的食品中,在加工过程中,容易被氧化修饰成双酪氨酸和 3-硝基酪氨酸,双酪氨酸与多种神经退行性疾病密切相关,双酪氨酸会促进 β -淀粉样蛋白的形成和核突触蛋白聚集,它们分别是阿尔茨海默病脑部老年斑和帕金森患者路易小体的主要成分,具有神经毒性^[6-7]。3-硝基酪氨酸也具有神经毒性,会损伤多巴胺神经元,造成神经功能障碍^[8]。

前期研究表明氧化酪蛋白和酪氨酸氧化产物会造成动物机体组织出现氧化损伤^[9-10]。食入酪氨酸氧化产物是否会在脑组织中积累尚不清楚。本文作者在探讨食源性酪氨酸氧化产物对大鼠脑部氧化还原状态及空间学习记忆的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

酪氨酸氧化产物 (TOP, tyrosine oxidation products): 实验室自制^[10]; Trizol 裂解液: 美国 Biomiga 公司; 荧光染料 SBY: 南京诺唯赞生物科技有限公司; M-MLV 逆转录酶: 美国 Promega 公司; DEPC、基因引物: 上海捷瑞生物工程有限公司。3-硝基酪氨酸(3-NT)、双酪氨酸(Dityr)和 β -淀粉样蛋白(A β 40)试剂盒: 厦门慧嘉生物科技有限公司; 丙二醛(MDA)和 4-羟基壬烯醛(4-HNE)试剂盒: 南京建成生物工程研究所。

1.2 实验仪器

ANY-maze 动物行为学视频分析系统: 美国

Stoeling 公司; 动物行为学实验装置: 上海欣软信息科技有限公司; 7900HT Fast 实时荧光定量 PCR 系统: 美国 ABI 公司; 5804R 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司; 超低温冷冻冰箱: 美国 INVETRO 公司; One drop: 上海天美科学仪器有限公司; PCR 基因扩增仪: 美国 MJ 公司。

1.3 动物实验

4 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分成 4 组: Control 组(正常日粮, $n=10$)、Tyr 组(添加 0.44% 酪氨酸, $n=10$)、TOP1 组(添加 0.22% 酪氨酸氧化产物, $n=10$)、TOP2 组(添加 0.44% 酪氨酸氧化产物, $n=10$)。饲养环境: 温度为 23 ± 2 °C, 湿度为 60%, 采用 12/12 h 循环光照。饲养期间大鼠可自由采食和饮水。饲养 24 周后进行 Morris 水迷宫实验。

1.4 实验方法

1.4.1 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫 (Morris water maze) 是 1981 年由 Richard G. Morris 建立, 主要用于测试动物海马依赖性空间学习与记忆能力。实验强迫动物游泳并学会寻找隐藏在水中的平台, 以测试实验动物对空间位置觉和方向觉的学习与记忆能力^[11]。

水迷宫装置是一个圆形塑料游泳池, 直径 180 cm。如图 1 所示。水温保持在 25 ± 0.5 °C。游泳池分为 4 个象限, 分别标记为 North, South, East 和 West。实验中所用的逃生平台直径为 12 cm。整个实验过程中, 保持环境安静, 房间内物件摆放要给动物提供空间线索。

经典的 Morris 水迷宫分为定位航行实验 (Place Navigation) 和空间探索实验 (Probe Trial) 两部分。

1) 定位航行实验。定位航行实验是将平台没于水面下 1 cm, 并用白色无毒染料将水染成白色不透明状, 保证不能从水面直接看到隐藏在水下的平台。该实验用于训练大鼠学会寻找隐藏在水面下的平台。定位航行实验历时 4 d, 训练时由实验者将大鼠面向池壁轻轻地放入水池中让其自由游泳。每只大鼠每天训练 4 次(分别从 4 个象限放入水中), 每

次时间间隔不得少于 30 min。记录大鼠寻找到隐藏在水面下平台的时间,即逃避潜伏期(Escape latency),并让其在平台上熟悉记忆周围环境 15 s。最大游泳时间限度为 60 s,若大鼠在 60 s 内未能找到平台,由实验者引导大鼠爬上平台并让其熟悉记忆周围环境 20 s。实验结束后,用干净的毛巾将大鼠擦干并让其待在温暖的地方。

2)空间探索实验。定位航行实验结束后,撤出平台,让大鼠自由探索 60 s。记录其在 60 s 内在各个象限中的停留时间,以及穿越原平台所在象限的次数及在该象限中的游泳路程。该实验用于检测大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置的记忆能力。

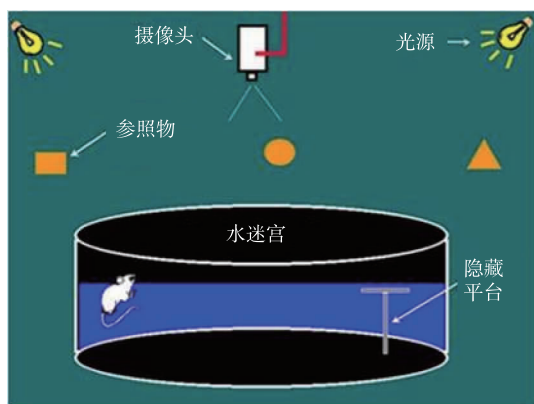


图 1 Morris 水迷宫装置示意图

Fig. 1 Diagram of Morris water maze

1.4.2 组织取样和处理 行为学结束后,处死大鼠,解剖取海马组织。其中一半的海马组织用生理盐水按重量体积比为 1:10 制成组织匀浆液,4 ℃,4 000 r/min 离心 10 min,取上清,-80 ℃保存。另一半海马组织按 50 mg 组织加入 1 mL Trizol 的比例加入 Trizol 溶液,匀浆,-80 ℃保存,用于提取 RNA。

1.4.3 海马组织各生化指标的测定 Dityr、3-NT、Aβ40、MDA、4-HNE 均严格按照说明书操作,蛋白含量以牛血清蛋白为标准品,采用 Bradford 法测定^[12]。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 分析 采用 Trizol 法提取海马组织中总的 RNA,用 One drop 测定 RNA 的 260 nm/280 nm 吸光度比值(1.8~2.0 表示纯度符合要求)。逆转录成 cDNA,以 β-actin 为内参,用实时荧光定量 PCR 检测目的基因的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

基因名称	基因序列(5' - 3')
Nrf2	上游引物 TCTTGGAGTAAGTCGAGAAAGTGT
	下游引物 GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC
NF-κB	上游引物 ATGGCAGACGATGATCCCTAC
	下游引物 TGTTGACACTGCTATTTCTGGTG
iNOS	上游引物 GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA
	下游引物 GTGGACGGGTCGATGTCAC
β-actin	上游引物 GGCTGTATTCCCTCCATCG
	下游引物 CCAGTTGCTAACAATGCCATGT

1.5 数据统计与分析

实验数据用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析和图形绘制。结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。运用单/双因素方差分析(ANOVA),Turkey 检验进行组间比较,显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 实验结果

2.1 酪氨酸氧化产物对大鼠 Morris 水迷宫空间学习记忆的影响

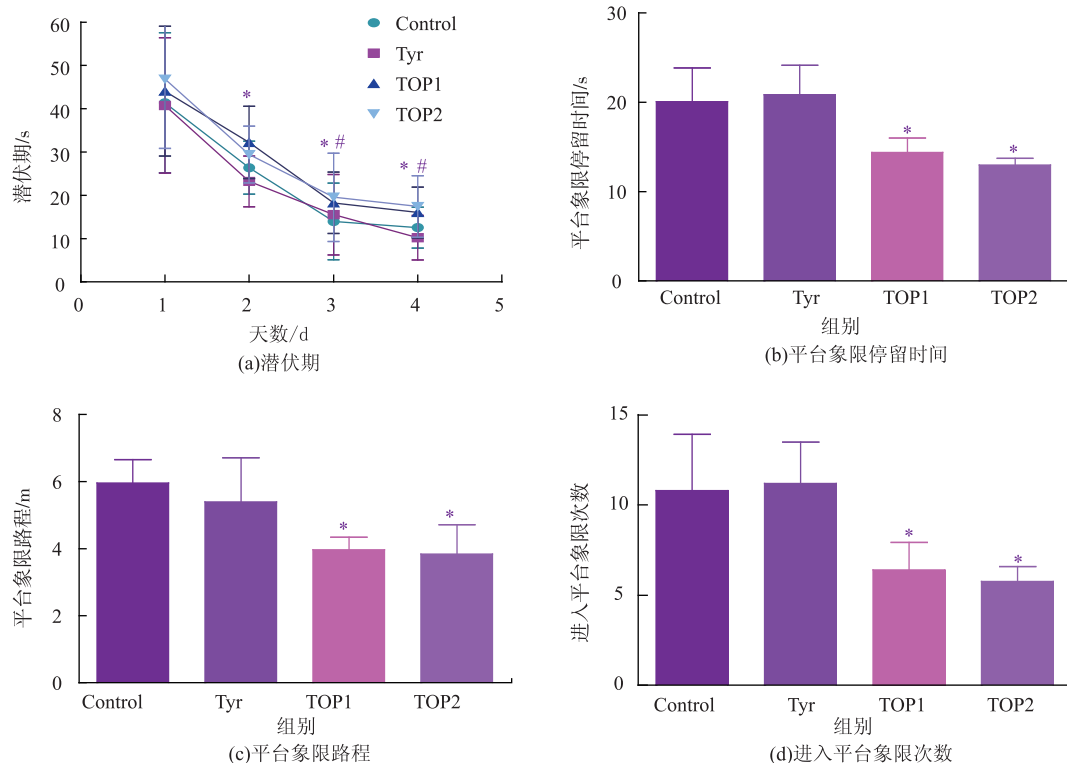
Morris 水迷宫实验用于检测大鼠的空间学习记忆能力。李竹青等人研究发现长期摄食氧化酪蛋白会诱导机体组织产生氧化应激^[9]。长期慢性的氧化应激会损伤脑部,尤其是海马等敏感部位,从而动物的学习记忆^[13]。

由图 1(a)可知,在定位航行实验中,各组大鼠第 1 天的逃避潜伏期没有显著差异($p > 0.05$),但是 TOP1 组(44.08 ± 6.70) s 和 TOP2 组(46.86 ± 7.15) s 高于 Control 组(41.40 ± 7.24) s。Control 组、Tyr 组和 TOP2 组大鼠从第 2 天开始,逃避潜伏期显著低于第 1 天($p < 0.05$),TOP1 组从第 3 天开始潜伏期显著低于第 1 天($p < 0.05$)。第 3 天各组大鼠的逃避潜伏期都显著低于第 1 天($p < 0.05$),组间没有显著性差异($p < 0.05$),TOP1 组(18.28 ± 3.16) s、TOP2 组(19.57 ± 4.56) s 高于 Control 组(14.00 ± 3.96) s 和 Tyr 组(15.56 ± 4.15) s。各组大鼠第 4 天的逃避潜伏期与第 3 天相比都没有显著性差异($p > 0.05$),但是和第 3 天呈现相同的趋势,TOP1 组(16.06 ± 2.62) s、TOP2 组(17.44 ± 3.18) s 高于 Control 组(12.56 ± 2.12) s 和 Tyr 组(10.24 ± 2.89) s。总体来看,经过 4 d 的训练,各组大鼠潜伏期都随着时间的延长显著下降($p < 0.05$)。从第 1 天到第 3 天,下降明

显,从3天到第4天,下降趋势减缓。各组大鼠呈现相似的学习曲线,最终都能够学会寻找逃生平台,但是酪氨酸氧化产物组大鼠潜伏期略高于正常组大鼠,表明酪氨酸氧化产物可能在一定程度上损伤了其空间学习能力。

由图1(b)可知,空间探索实验中,在原平台象限的停留时间, TOP1组和TOP2组显著低于Control组和Tyr组($p<0.05$)。Tyr组与Control组、TOP1组和TOP2组之间都没有显著性差异($p>0.05$)。如图1

(c)所示,统计大鼠在原平台象限的游泳路程, TOP1组、TOP2组显著低于Control组($p<0.05$),但是与Tyr组相比没有显著性差异($p>0.05$)。Tyr组与Control组之间、TOP1组与TOP2组之间都没有显著性差异($p>0.05$)。由图1(d)可知,各组大鼠进入原平台象限的次数呈现与停留时间相同的趋势。结果显示TOP1组和TOP2组大鼠不能准确定位原平台所在位置,表明酪氨酸氧化产物损害了大鼠的空间记忆能力。



注:(a)中*表示Control、Tyr和TOP2组潜伏期与第1天相比 $p<0.05$,#表示TOP1组潜伏期与第1天相比 $p<0.05$;(b)/(c)/(d)中*表示TOP1、TOP2与Control组相比 $p<0.05$

图1 酪氨酸氧化产物对大鼠 Morris 水迷宫中空间学习记忆的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 1 Effects of tyrosine oxidation products on Morris spatial learning and memory of rats

2.2 酪氨酸氧化产物对大鼠海马组织中氧化产物的影响

Dityr 和 3-NT 是蛋白质中酪氨酸残基氧化修饰的产物,它们能特异性的反映蛋白质氧化程度^[14]。A β 的含量与 Dityr 相关。Dityr 在 Cu²⁺的作用下可以促进 A β 的形成,而 A β 是阿尔茨海默病患者老年斑块的主要成分,具有神经毒性^[15]。由图2可知,饲喂酪氨酸氧化产物24周后, TOP1组和TOP2组大鼠海马组织中蛋白质氧化产物 Dityr、3-NT 含量显著高于Control组和Tyr组($p<0.05$),并呈现剂量效

应。同时, TOP1组和TOP2组 A β 40 含量也显著高于Control组和Tyr组($p<0.05$)。

MDA 和 4-HNE 是两个强毒力的脂质过氧化产物,是判断机体脂质过氧化的常用指标^[16]。在组织中积累不仅会直接造成细胞损伤,还会通过与蛋白质、酶等发生交联反应造成蛋白质结构和功能的改变,从而进一步影响组织正常生理功能。由图3可知,酪氨酸氧化产物导致大鼠海马组织中脂质过氧化产物明显积累。TOP1组和TOP2组的MDA、4-HNE含量都显著高于Control组和Tyr组($p<0.05$),

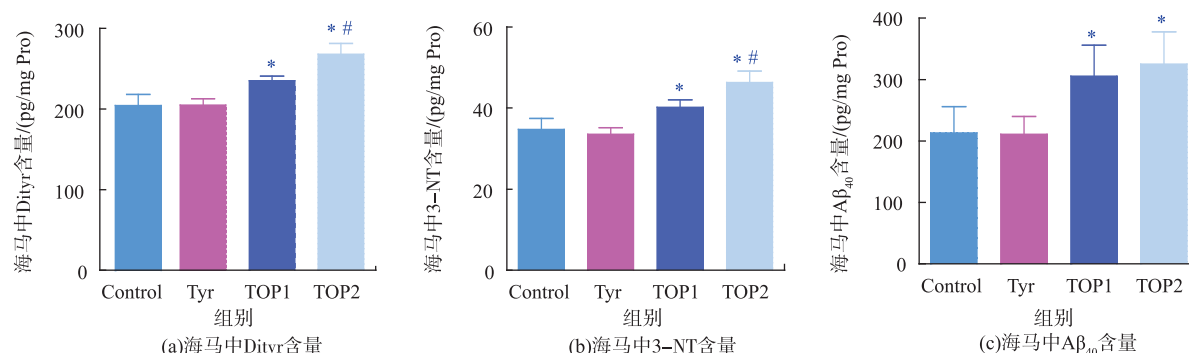


图2 酪氨酸氧化产物对大鼠海马组织中蛋白质氧化产物的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of tyrosine oxidation products on oxidative protein in rat hippocampus

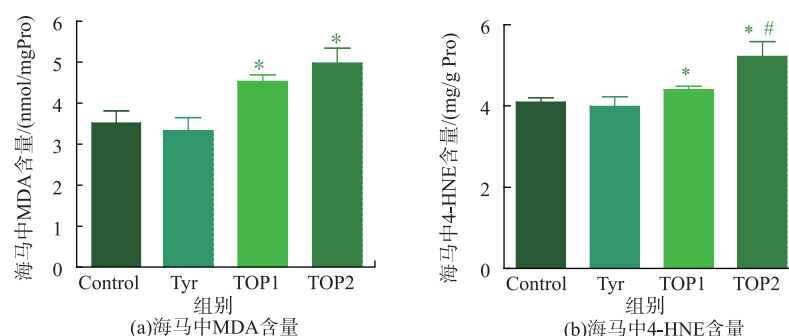


图3 酪氨酸氧化产物对大鼠海马组织中脂质氧化产物的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effects of tyrosine oxidation products on lipid peroxides in rat hippocampus

酪氨酸氧化产物对4-HNE含量的影响呈现剂量效应。

综上,长期摄入酪氨酸氧化产物导致大鼠海马组织氧化还原状态失衡,蛋白质和脂质氧化产物积累,氧化产物的积累会损伤大鼠海马组织细胞功能,从而导致其海马依赖性空间学习记忆障碍。

2.3 酪氨酸氧化产物对大鼠海马组织抗氧化和炎症相关基因的影响

由图4可知,TOP1组和TOP2组大鼠海马组织

中Nrf2的表达较Control组和Tyr组显著上调($p < 0.05$);TOP2组Nrf2的表达较TOP1组也显著上调($p < 0.05$)。Nrf2是细胞氧化应激反应中的关键因子。正常生理条件下,Nrf2与Keap1结合存在于细胞核内。当机体发生氧化应激时,Nrf2从Keap1上解离下来并与抗氧化反应元件ARE结合,调节抗氧化蛋白和II相解毒酶等的表达。Nrf2-ARE是体内抗氧化重要的通路,该通路的激活能够保护神经细胞免受氧化应激损伤^[17]。

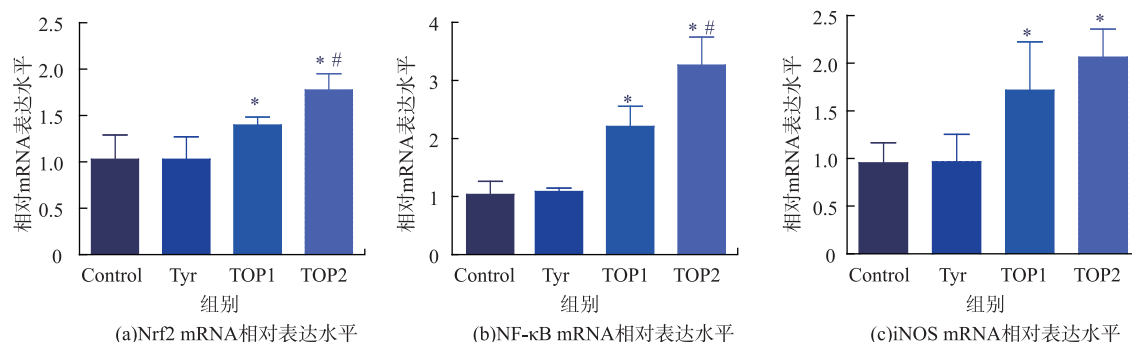


图4 酪氨酸氧化产物对大鼠海马组织抗氧化和炎症相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 4 Effects of tyrosine oxidation products on expression of antioxidant and inflammation related genes in hippocampus

此外, TOP1 组和 TOP2 组海马组织中 NF- κ B 的表达较 Control 组和 Tyr 组显著上调 ($p < 0.05$); 同时 TOP2 组的 NF- κ B 表达较 TOP1 组也显著上调 ($p < 0.05$)。此外, TOP1 组和 TOP2 组的 iNOS 表达也显著高于 Control 组和 Tyr 组 ($p < 0.05$), 但 TOP1 组和 TOP2 组之间没有显著性差异 ($p > 0.05$)。氧化应激除了启动 Nrf2 防御机制外, 还会激活 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 能够诱导促炎因子 iNOS 的过量表达, iNOS 可以持续催化产生大量的一氧化氮 (NO), 过量的 NO 不仅会造成蛋白质硝基化, 还会导致神经细胞凋亡^[18], 从而造成大鼠空间学习记忆障碍。

2.4 海马组织基因表达与相应氧化损伤指标的关联性分析

相关性分析显示, MDA 与 Nrf2 ($r = 0.796, p < 0.05$)、NF- κ B ($r = 0.884, p < 0.05$)、iNOS ($r = 0.763, p < 0.05$) 成显著正相关; HNE 与 Nrf2 ($r = 0.709, p < 0.05$)、NF- κ B ($r = 0.862, p < 0.05$)、iNOS ($r = 0.711, p < 0.05$) 成显著正相关; Dityr 与 Nrf2 ($r = 0.854, p < 0.05$)、NF- κ B ($r = 0.878, p < 0.05$)、iNOS ($r = 0.764, p < 0.05$) 成显著正相关; 3-NT 与 Nrf2 ($r = 0.843, p < 0.05$)、NF- κ B ($r = 0.857, p < 0.05$)、iNOS ($r = 0.764, p < 0.05$) 成显著正相关; 同时 A β 40 与 Dityr ($r = 0.694, p < 0.05$) 也呈现正相关。

3 讨论

酪氨酸广泛存在于富含蛋白质的食品中, 其酚羟基极易受到氧化, 造成酪氨酸氧化产物在食品中积累, 长期食入酪氨酸氧化产物会诱导机体组织出现氧化应激, 氧化产物在组织细胞中积累。氧化应激会造成机体内蛋白质和酶等氧化修饰, 蛋白质氨基酸氧化修饰不仅影响组织细胞正常生理功能, 还会产生很多有害物质, 例如色氨酸氧化形成的犬尿氨酸具有神经毒性, 会损伤小鼠新物体识别记忆并增加其焦虑情绪。而酪氨酸氧化生成双酪氨酸和 3-硝基酪氨酸。3-硝基酪氨酸会造成神经元丢失, 损伤多巴胺神经系统, 它们都与阿尔茨海默病、帕金森病等多种神经退行性疾病相关。前期研究表明, 长期摄食氧化酪蛋白会造成小鼠机体组织氧化应激和学习记忆能力下降。长期摄入酪氨酸氧化产物 (包括双酪氨酸和 3-硝基酪氨酸等) 会造成大鼠肝肾和心肌组织出现氧化损伤。食入酪氨酸氧化产物

是否会在脑组织中积累并影响脑部功能, 尚不清楚。本文通过长期饲喂实验, 初步探讨了酪氨酸氧化产物对大鼠空间学习记忆及海马组织的影响。

酪氨酸氧化产物饲喂 24 周后, 大鼠在 Morris 水迷宫空间的定位航行实验阶段, 寻找隐藏平台的时间比正常组和 Tyr 组大鼠都要长, 表明其空间学习能力可能受到一定程度的损伤。在空间探索实验阶段, 酪氨酸氧化产物组的大鼠穿越原平台所在象限的次数及其在该象限的停留时间均显著低于正常组大鼠, 表明酪氨酸氧化产物损害了大鼠的空间记忆能力。同时酪氨酸氧化产物组大鼠海马组织中脂质过氧化产物及蛋白质氧化产物均出现明显积累, MDA、4-HNE、Dityr、3-NT、A β 40 的含量均显著高于 Control 组, 表明酪氨酸氧化产物诱导大鼠海马组织出现氧化应激。由此推测酪氨酸氧化产物诱导海马组织氧化应激, 造成氧化产物的积累可能是造成大鼠学习与记忆能力减退的重要原因。本文进一步检测了抗氧化关键基因和炎症相关基因的 mRNA 表达水平。结果显示, 酪氨酸氧化产物组大鼠海马组织中 Nrf2、NF- κ B 和 iNOS 的表达较 Control 组都显著上调。Nrf2 是细胞氧化应激反应中的关键因子, Nrf2 的激活可以调控下游抗氧化基因和蛋白的表达, 从而启动机体防御机制以保护细胞免受氧化应激的损伤。氧化应激激活 Nrf2 的同时也激活了 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 进一步激活下游炎症相关基因 iNOS 的表达, 从而诱导细胞损伤或凋亡。酪氨酸氧化产物组大鼠出现空间学习记忆障碍表明机体自身的防御机制不足以抵抗酪氨酸氧化产物导致的氧化损伤。

4 结语

酪氨酸氧化产物的长期暴露诱导大鼠海马组织氧化应激、氧化产物在海马组织中积累, 导致大鼠出现空间学习与记忆能力障碍。本文只是初步探讨了酪氨酸氧化产物对大鼠空间学习记忆的影响, 但其具体的损伤机制还有待进一步研究。总之, 食品中蛋白质氨基酸的氧化修饰及其产物对人体健康的影响需要受到更多的关注, 本文为改进蛋白质食品加工条件提供了一定的理论依据, 对人们健康饮食具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: a review [J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2011, 55(1): 83-95.
- [2] ZHANG Yinliang, YANG Hui, AN Qiaoyun. Study of protein oxidation induced by hydroxyl radicals [J]. **Journal of Food Science and Biothchnology**, 2012, 31(3): 313-318. (in Chinese)
- [3] SOLADOYE O P, JUAREZ M L, AALHUS L J, et al. Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2015, 14(2): 106-122.
- [4] MO Li, LE Guowei, SHI Yonghui. Effects of drying methods on oxidation of dairy protein and redox state [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(8): 170-173. (in Chinese)
- [5] 吴秋萍. 氧化大豆蛋白对小鼠氧化还原状态及肝脏基因表达的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [6] AL-HILALY Y K, WILLIAMS T L, STEWART-PARKER M, et al. A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid-beta in Alzheimer's disease[J]. **Acta Neuropathologica Communications**, 2013, 1: 83.
- [7] SOUZA J M, GIASSEN B I, CHEN Q P, et al. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha-synuclein polymers - Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2000, 275(24): 18344-18349.
- [8] BLANCHARD-FILLION B, PROU D, POLYDORO M, et al. Metabolism of 3-nitrotyrosine induces apoptotic death in dopaminergic cells[J]. **Journal of Neuroscience**, 2006, 26(23): 6124-6130.
- [9] 李竹青. 氧化酪蛋白对小鼠氧化还原状态与基因表达的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [10] 赵琪. 酪氨酸氧化产物对大鼠心肌组织氧化损伤影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [11] WANG Weigang, ZHOU Jiabin, ZHU Mingli. Morris water maze in the analysis of mouse phenotype [J]. **Chinese Journal of Cell Biology**, 2011, 33(1): 9-14. (in Chinese)
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.
- [13] FLOYD R A, HENSLEY K. Oxidative stress in brain aging-Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases[J]. **Neurobiology of Aging**, 2002, 23(5): 795-807.
- [14] GIULIVI C, TRAASETH N J, DAVIES K J. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance [J]. **Amino Acids**, 2003, 25(3/4): 227-232.
- [15] SMITH D P, CICCOTOSTO G D, TEW D J, et al. Concentration dependent Cu²⁺ induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide[J]. **Biochemistry**, 2007, 46(10): 2881-2891.
- [16] KANNER J. Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health [J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2007, 51(9): 1094-1101.
- [17] XIONG Zhange, ZHANG Pan, ZHAO Bo. The role of Nrf2-ARE signal pathway in neurodegenerative disease [J]. **Progress in Modern Biomedicine**, 2014, 14(10): 1991-2000. (in Chinese)
- [18] SKURLOVA M, STOFKOVA A, JURCOVICOVA J. Anxiety-like behavior in the elevated-plus maze tests and enhanced IL-1 beta, IL-6, NADPH oxidase-1, and iNOS mRNAs in the hippocampus during early stage of adjuvant arthritis in rats [J]. **Neuroscience Letters**, 2011, 487(2): 250-254.