

雷帕霉素改善血管性痴呆小鼠认知功能的机制^{*}

陈丽, 杨帆, 赵志红, 秦洁^{**}

(天津市环湖医院 神经内科, 天津 300060)

[摘要] **目的:** 探讨雷帕霉素对 VaD 大鼠海马区 M1/M2(前炎状态/抗炎状态)的影响表型标志产物基因(*CD16*、*iNOS* 及 *TNF- α*)及 M2 表型标志产物基因(*IL-10*、*TGF- β* 及 *Arg1*)的表达。**方法:** 20 只雄性 C57BL/6J 小鼠采用双侧颈总动脉缩窄(BCAS)制备 VaD 模型,造模 2 周后随机分为雷帕霉素治疗组(2.24 mg/kg 的雷帕霉素灌胃 4 周)及 BCAS 组(同体积的 PBS 灌胃 4 周);于灌胃 4 周后采用 Morris 水迷宫行为学实验观察小鼠学习记忆能力,证实造模成功;处死小鼠取海马组织,采用 HE 及 Tunnel 染色观察海马区组织结构及神经细胞凋亡,采用逆转录实时定量荧光 PCR(RT-qPCR)法检测小胶质细胞 M1 表型标志产物基因 *CD16*、*iNOS* 及 *TNF- α* 及 M2 表型标志产物基因 *IL-10*、*TGF- β* 及 *Arg1* 表达,采用 Western blot 检测海马区 mTOR 通路的 P-Akt 及 P-p70S6k 蛋白表达。**结果:** 雷帕霉素显著提高了小鼠学习和记忆能力。HE 染色可见治疗组海马区细胞层数及数量减少、细胞排列紊乱、神经细胞呈缺血样改变,核固缩、深染,胞浆内容物减少、结构疏松等情况较 BCAS 组有明显改善,Tunnel 阳性细胞数明显减少($P < 0.05$);*CD16*、*iNOS* 及 *TNF- α* 相对表达量明显下调,*IL-10*、*TGF- β* 及 *Arg1* 相对表达量明显上调($P < 0.05$);mTOR 通路 P-Akt 蛋白表达水平显著增加、P-p70s6k 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。**结论:** 雷帕霉素可改善 VaD 模型鼠学习记忆功能,其机制可能与下调 M1 表型标志产物基因 *CD16*、*iNOS* 及 *TNF- α* 和上调 M2 表型标志产物基因 *IL-10*、*TGF- β* 及 *Arg1* 表达有关。

[关键词] 缺血性脑血管病; 认知功能障碍; mTOR 通路; M1/M2 平衡; 雷帕霉素; 小胶质细胞

[中图分类号] R749.13; R743.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)03-0292-06

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.03.009

The Effect of Rapamycin on Cognitive Function of Mice with Vascular Dementia and its Mechanism

CHEN Li, YANG Fan, ZHAO Zhihong, QIN Jie

(Department of Neurology, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the effect of rapamycin on the marker expression levels of M1/M2 (pro-inflammatory/anti-inflammatory state) in hippocampus of VaD mice. In this study, analyzed M1 markers included *CD16*, *iNOS* and *TNF- α* , and analyzed M2 markers were *IL-10*, *TGF- β* and *Arg1*. **Methods:** Twenty male C57BL/6J mice were given bilateral common carotid artery stenosis (BCAS) to establish VaD model. After 2 weeks of modeling, they were randomly divided into rapamycin group given by gavage with 2.24 mg/kg rapamycin and BCAS group given with the same volume of PBS for 4 weeks. Morris water maze was used to observe the learning and memory ability of mice after 4 weeks of gavage. HE and Tunnel staining were used to observe the hippocampal tissue structure and neuronal apoptosis. Reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect mRNA levels of *CD16*, *iNOS*, *TNF- α* , *IL-10*, *TGF- β* and *Arg1*. P-Akt and P-p70S6k were detected by western blot. **Results:** The rapamycin significantly improved learning and memory of VaD mice. HE staining showed that reduced neuronal changes in the hippocampus compared to the BCAS group.

^{*}[基金项目]天津市科技计划项目(16ZXMJSY00010)

^{**}通信作者 E-mail:clhalo1987@163.com

Rapamycin significantly reduced the number of Tunnel positive cells ($P < 0.05$), and remarkably downregulated M1 markers, but upregulated M2 markers. The Western blot showed that the Rapamycin upregulated P-Akt, while downregulated P-p70S6k ($P < 0.05$). **Conclusion:** Rapamycin can improve the learning and memory function of VaD mice. The mechanism may be related to downregulating the M1 markers and upregulating the M2 markers.

[**Key words**] ischemic cerebrovascular disease; cognitive dysfunction; mTOR pathway; M1/M2 balance; rapamycin; microglia

研究发现,慢性缺血缺氧、低灌注是血管性痴呆(vascular dementia, VaD)的最主要的原因。长期的慢性低灌注改变了脑内的微环境,导致小胶质细胞的激活,一项全基因组关联研究(GWAS)进一步确定了小胶质细胞状态与痴呆的新关联^[1-3],提出小胶质细胞导致脑内微环境功能失调可能是痴呆病理生理学基础。在慢性缺血老化的脑组织中,小胶质细胞可表现出多种表型,在维持脑内环境稳态中发挥着双重作用^[4-5]。小胶质细胞可以极化成 M1 前炎症状态,释放前炎症因子如白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α);亦可呈 M2 抗炎状态,通过 IL-4、精氨酸 1(arginine-1, Arg-1)、IL-10 和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)缓解炎症和组织修复。雷帕霉素(rapamycin)为免疫抑制剂,可通过抑制 mTOR 通路达到控制免疫反应的作用,研究表明 mTOR 可以改变免疫细胞的活化及分化^[6-8]。本研究采用双侧颈总动脉缩窄(bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)法制作 VaD 模型,采用雷帕霉素治疗,探讨雷帕霉素是否可以通过调节长期慢性低灌注脑组织中 M1/M2 的平衡、重建脑内微环境的稳态,改善认知功能,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20 只成年健康雄性 C57BL/6J 小鼠,12 周龄,体质量 30 ~ 35 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。该研究方案提交医学伦理部门审核,符合相关伦理学要求。

1.1.2 主要试剂和耗材 CD16/32 一抗购自美国 Abcam 公司, Iba1 一抗购自美国 Abcam 公司, CD206 一抗购自 Millipore 公司, 荧光标记抗兔二抗购自美国 Abcam 公司, 抗羊二抗购自 Invitrogen

公司, DAB 显色剂购自北京中衫金桥生物技术有限公司, 枸橼酸盐缓冲液购自北京中衫金桥生物技术有限公司, 4% 多聚甲醛购自武汉博士德生物技术有限公司, 牛血清白蛋白购自美国 Sigma 公司, 10% 水合氯醛购自天津医药集团上海化学试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 实验模型制备 20 只小鼠采用 BCAS 制作 VaD 模型,用 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射将小鼠麻醉,仰卧位,将其固定在解剖手术台上,备皮、消毒;行颈部前正中切口,钝性分离组织,保护迷走神经,暴露两侧颈总动脉,采用内径为 0.18 mm 微线圈进行 BCAS^[9],确认无渗血,缝合切口,并消毒;术后注意保温,待动物苏醒后单笼饲养,流质饮食,密切观察。

1.2.2 VaD 模型入选标准 考虑到手术本身对小鼠的影响,本研究在预实验中选用成年健康雄性 C57BL/6J 小鼠两侧颈总动脉进行仅穿线不结扎处理作为假手术组,对假手术组和 VaD 组存活的小鼠进行水迷宫测试,参考文献[10]观察造模情况。结果显示,假手术组小鼠平台逃避潜伏期在第 3 天 ~ 第 5 天较 VaD 组明显缩短($P < 0.05$),提示 VaD 模型小鼠有认知功能障碍,模型制备成功。

1.2.3 给药方法 本研究于建立模型后 2 周将 VaD 小鼠随机分成 VaD 组及治疗组,每组 10 只,参考文献[11]治疗组给予 2.24 mg/kg 的雷帕霉素灌胃, VaD 组分别给予与治疗组相同体积的 PBS 灌胃,治疗 4 周。

1.2.4 Morris 水迷宫行为学实验 于灌胃 4 周时,利用 Morris 水迷宫检测 VaD 组及治疗组小鼠空间记忆能力。(1)定位航行试验:将小鼠于第 1 象限入点处面向池壁放入水中,记录小鼠在 120 s 内寻找并爬上平台的时间,即逃避潜伏期,之后分别从其他 3 个象限入水点将鼠放入水中,连续训练 5 d。(2)空间探索试验:于第 6 天撤去平台,在第

1 象限入点处将小鼠放入水中,记录小鼠在 60 s 内的运动轨迹,计算其在原平台象限游泳时间占总游泳时间的百分比及通过目标象限的次数。

1.2.5 组织学观察 Morris 水迷宫结束后,麻醉处死小鼠,获得海马组织标本,常规固定、洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋,冠状切片,再脱蜡、水化;苏木素染色 5 min,自来水冲洗 2 min,盐酸乙醇酸化 30 s(提插数下),自来水浸泡 15 min 或温水(约 50 ℃)5 min,置伊红液染色 2 min,常规脱水,透明,封片,观察其组织学改变。

1.2.6 脑组织切片 Tunnel 染色 脱蜡、水化,用 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)至 95 ℃ 加热 20 min 进行抗原修复,置于冰丙酮溶液中固定破膜 7 min,用 PBS 洗 5 min × 3 次,滴加 Tunnel 反应混合物 50 μL,在湿盒中 4 ℃ 孵育 60 min,洗脱,使用 DAB 显色套装进行显色,观察 Tunnel 阳性细胞数量。

1.2.7 小胶质细胞表型标志性产物基因表达水平 采用逆转录实时定量荧光 PCR(RT-qPCR)检测小胶质细胞 M1 表型标志性产物基因(*CD16*、*iNOS* 及 *TNF-α*)及 M2 表型标志性产物基因(*IL-10*、*TGF-β* 及 *Arg1*)的表达,引物由上海生工生物技术有限公司合成(引物序列见表 1),根据操作说明方法用 Trizol 提取海马组织总 RNA,然后用定量逆转录试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)合成 cDNA,用 Syber Green 荧光定量 PCR 检测,反应总体系

20 μL,PCR 热循环参数为 96 ℃ 4 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s,行 40 个循环。以 β-actin 为内参照基因,得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值),将 RQ 值统计分析。

1.2.8 海马 mTORC1 通路相关蛋白 P-Akt 和 P-p70s6k 表达 采用 Western blot 法检测,称取海马标本 200 mg,按 1 mg:10 μg 的比例加入样本和蛋白裂解液,用匀浆 30 s、共 3 次,冰上静置裂解 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,留取上清进行蛋白定量;其余上样、电泳、转膜,用膜封闭液 P-p70S6k(1:1 000)、p-Akt(1:1 000 及 β-actin(1:5 000)一抗,4℃轻摇过夜。用 TBST 按照 1:5 000 稀释相应的二抗,以 β-actin 作为内参照检测 P-Akt 和 P-p70 S6k 表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学实验

结果显示,治疗组小鼠第 3~5 天的逃避潜伏期时间较 VaD 组显著缩短,差异有统计学意义(*P* < 0.05),提示雷帕霉素可改善长期慢性脑缺血引起的认知障碍,具有神经保护作用。第 6 天空间探索实验结果显示,治疗组小鼠穿过目标象限时间及通过目标象限次数显著高于 VaD 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),提示雷帕霉素对 VaD 的认知功能具有改善作用。见图 1。

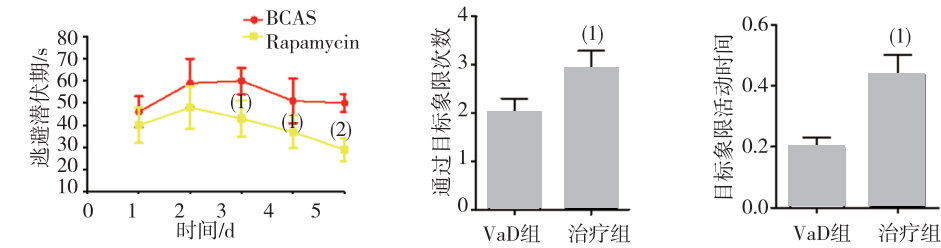
2.2 海马区 HE 及 Tunnel 染色

HE 染色结果显示,VaD 组可见海马区细胞层数及数量减少、细胞排列紊乱、神经细胞呈缺血样改变,可见神经细胞坏死、神经元外形不易辨认,可见核固缩、深染,胞浆内容物减少,结构疏松,伴有细胞坏死及炎性细胞的浸润;治疗组细胞层数及数量基本正常,细胞排列相对清晰,仅少量神经细胞可见核固缩、深染,无明显的空泡样改变;提示雷帕霉素能够改善长期慢性脑缺血引起的脑组织病理变化,对 VaD 有保护作用(图 2A)。Tunnel 结果显示,治疗组 Tunnel 阳性细胞数量较 VaD 组显著下降,差异有统计学意义(*P* < 0.05,图 2B - C),提示雷帕霉素能够明显减少海马区神经细胞的凋亡,可能是改善 VaD 小鼠的认知障碍的机制。

表 1 RT-PCR 目的基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences

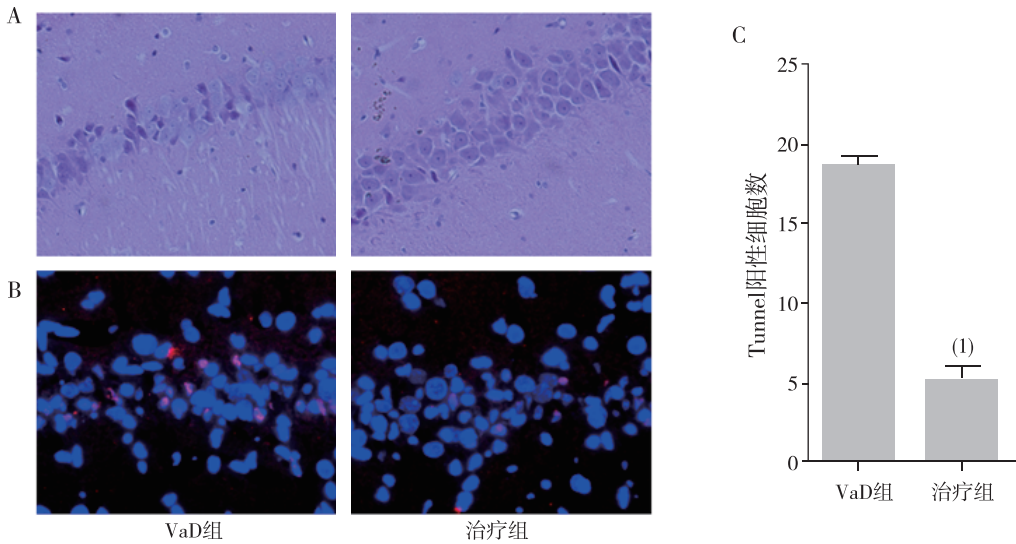
目的基因	引物序列
<i>TNF-α</i>	F: CAAGGGACAAGGCTGCCCCG R: GCAGGGGCTCTTGACGGCAG;
<i>iNOS</i>	F: CAGCTGGGCTGTACAAACCTT R: CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>CD16</i>	F: TTTGGACACCCAGATGTTTCAG R: GTCTTCCTTGAGCACCTGGATC
<i>IL-10</i>	F: GGTGCGCAAGCCTTATCGGA R: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
<i>TGF-β</i>	F: GGAGCCACAAACCCCGCCTC R: CTGAAAGGAGCCCTGTCTTG
<i>Arg1</i>	F: TCACCTGAGCTTTTGATGTCG R: CTGAAAGGAGCCCTGTCTTG
<i>β-actin</i>	F: AGATCCTGACCGAGCGTGCC R: CCAGGGAGGAAGAGGATGCG



注：⁽¹⁾与 VaD 组比较， $P < 0.05$ 。

图 1 2 组小鼠水迷宫实验结果

Fig. 1 The effect of rapamycin on behaviors of mice in two groups



注:A 为 HE 染色,B 为 TUNEL 染色,C 为 TUNEL 染色阳性细胞数;⁽¹⁾与 VaD 组比较， $P < 0.01$ 。

图 2 2 组小鼠海马 CA1 区 HE 染色及 TUNEL 染色结果(200 ×)

Fig. 2 The effect of rapamycin on cellular structure and apoptosis in CA1 area of mice in two groups(200 ×)

2.3 小胶质细胞表型标志性产物基因表达

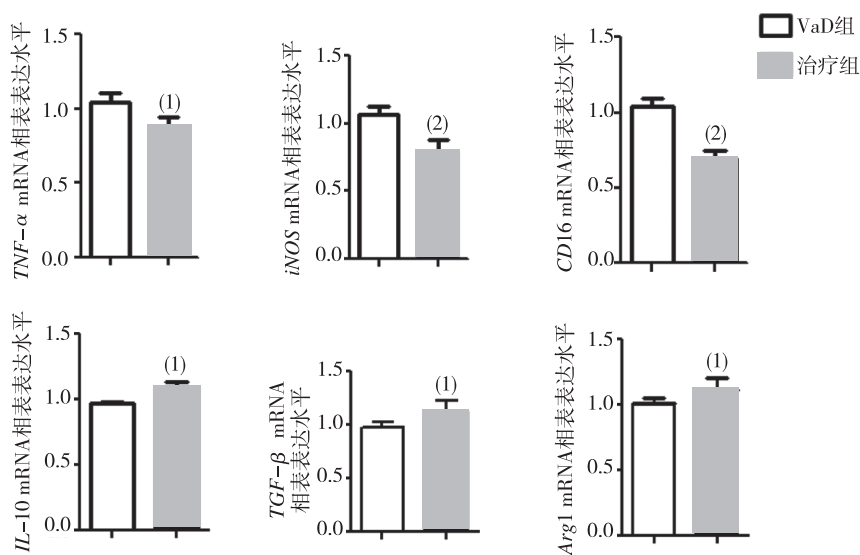
RT-qPCR 结果显示,与 VaD 组比较,治疗组小鼠海马组织 M1 表型标志性产物基因(*CD16*、*iNOS* 及 *TNF-α*)表达显著降低,M2 表型标志性产物基因(*IL-10*、*TGF-β* 及 *Arg1*)表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);提示雷帕霉素抑制了海马组织的前炎症反应,促使海马区炎症因子内环境由 M1 向 M2 转变。见图 3。

2.4 mTORC1 通路相关蛋白表达

Western blot 结果显示,与 VaD 组比较,治疗组小鼠海马区 P-Akt 蛋白的表达水平显著升高、P-p70s6k 蛋白表达水平显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);提示雷帕霉素抑制 P-p70s6k 的表达,同时反馈性地降低了对 P-Akt 的抑制。见图 4。

3 讨论

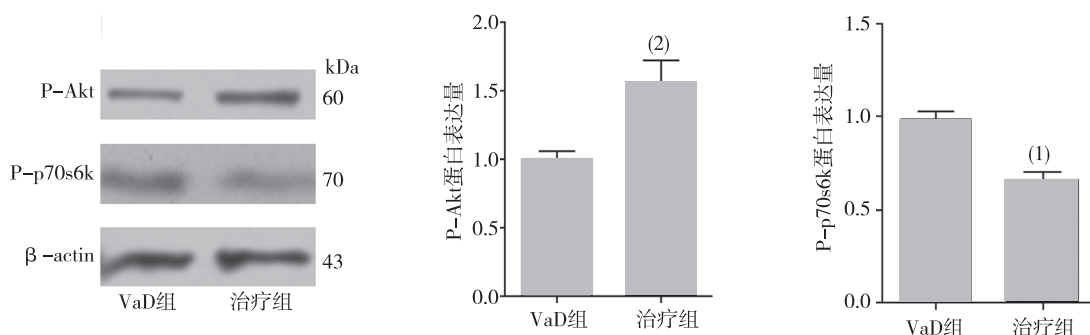
本研究从行为学、形态学和分子生物学 3 个不同角度,验证了雷帕霉素通过减轻微环境中的炎症反应和调节小胶质细胞 M1/M2 的平衡对脑缺血损伤长期慢性低灌注导致 VaD 起保护作用。为了研究认知功能,本研究采用水迷宫试验对 VaD 组及治疗组进行比较,发现雷帕霉素能明显改善 VaD 小鼠的认知功能。研究报道,BCAS 能导致小鼠颅内三分之一的血流量减少^[12],尤其是海马 CA1 区^[13],于是本研究通过 HE 染色观察发现雷帕霉素能够改善长期慢性脑缺血引起的脑组织的病理变化,进一步通过TUNEL染色发现雷帕霉素能够



注:与 VaD 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 2 组小鼠海马区 M1/M2 表型标志性基因表达

Fig. 3 The effect of rapamycin on the mRNA expression levels of M1 and M2 markers of mice in two groups



注:与 VAD 组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 2 组小鼠海马区 mTORC1 通路蛋白表达

Fig. 4 The effect of rapamycin on P-Akt and P-p70S6k expression of mice in two groups

明显减少海马区神经细胞的凋亡,从而改善 VaD 小鼠的认知障碍。VaD 疾病的病理过程极为复杂,其发病机制涉及多个环节,其中小胶质细胞的活化在认知障碍的发病机制中起着越来越重要的作用^[5,14]。小胶质细胞 M1 代表促炎状态,诱导组织内神经元损伤扩大;相反,M2 具有较强的吞噬和清除坏死或凋亡神经元碎片的能力,以避免继发性炎症反应,促进组织再生^[15-16]。于是实验采用 CD16、iNOS 及 TNF- α 作为 M1 标记,用 IL-10、TGF- β 及 Arg1 作为 M2 标记进行研究,结果发现治疗组 M1 炎症标记物产物基因相对表达量较 VaD 组显著下调,M2 炎症标记物产物基因相对表达量显著上调,提示雷帕霉素抑制了海马组织的前炎症反

应,促使海马区炎症因子内环境由 M1 向 M2 转变。小胶质细胞在脑缺血应激的极化分型对减轻 VaD 的炎症反应及促进神经细胞的修复起着重要的作用,适当调控小胶质细胞 M1/M2 的平衡对脑缺血损伤的预后具有保护作用。大量研究表明 mTOR 通路在细胞生长、分化、转移和存活中起着核心地位,对生长因子、营养物质及机体能量状态等产生应答,从而调节细胞生长、增殖、自噬、代谢及调控细胞周期等^[17],此外,mTOR 还具有调节免疫细胞分化、活性和功能的作用^[18-19],抑制 mTOR 通路可以调控小胶质细胞 M1/M2 的极化状态,从而维持内环境的稳态^[7]。雷帕霉素作为 mTOR 的抑制剂,可以延长寿命,减缓许多与衰老相关的疾病,比如

阿尔茨海默病、帕金森病及运动神经元病等^[20-22]。本研究证实了雷帕霉素对 VaD 的发病及进展也具有一定的延缓作用。值得注意的是,有研究表明通过抑制 mTORC1 可以降低 Akt,从而选择性抑制 IRE1 α /JNK/NF- κ B 途径,有效降低炎症反应^[23-25],本研究进一步印证了 mTORC1-Akt 这一反馈环路,雷帕霉素通过抑制 mTOR 信号通路从而降低下游产物 P-p70S6K 的表达,P-p70S6K 的减少又反馈性促进 p-Akt 的激活,从而抑制的炎症,使 M1 向 M2 转化。

综上所述,本研究发现,长期慢性缺血缺氧状态下所致的 VaD 小鼠海马区小胶质细胞激活,打破了 M1/M2 平衡,导致大量神经元坏死,从而降低了小鼠的学习和记忆能力,雷帕霉素通过抑制 mTORC1 通路调节 M1/M2 稳态,从而有效减轻慢性脑灌注不足引起的认知功能障碍,这为 VaD 的治疗提供了一定的实验依据。

4 参考文献

- [1] BRADSHAW E M, CHIBNIK L B, KEENAN B T, et al. Cd33 alzheimer's disease locus: Altered monocyte function and amyloid biology [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16 (7): 848 - 850.
- [2] GRICIUC A, SERRANO-POZO A, PAADO A R, et al. Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta [J]. *Neuron*, 2013, 78 (4): 631 - 643.
- [3] LAMBERT J C, IBAHIM-VERBAAS C A, HAROLD D, et al. Meta-analysis of 74 046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for alzheimer's disease [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45 (12): 1452 - 1458.
- [4] HU X, LI P, GUO Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke: a Journal of Cerebral Circulation*, 2012, 43 (11): 3063 - 3070.
- [5] SUENAGA J, HU X, PU H, et al. White matter injury and microglia/macrophage polarization are strongly linked with age-related long-term deficits in neurological function after stroke [J]. *Experimental Neurology*, 2015, 272: 109 - 119.
- [6] SUTO T, KARONITSCH T. The immunobiology of mtor in autoimmunity [J]. *Journal of Autoimmunity*, 2019 (2019): 102373.
- [7] BYLES V, COVARRUBIAS A J, BEN -SAHRA I, et al. The tsc-mtor pathway regulates macrophage polarization [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2834.
- [8] CHI H. Regulation and function of mtor signalling in t cell fate decisions. *Nature reviews [J]. Immunology*, 2012, 12 (5): 325 - 338.
- [9] NISHIO K, IHARA M, YAMASAKI N, et al. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy [J]. *Stroke: a Journal of Cerebral Circulation*, 2010, 41 (6): 1278 - 1284.
- [10] HE X L, WANG Y H, Bi M G, et al. Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 680 (1 - 3): 41 - 48.
- [11] HARRISON D E, STRONG R, SHARP Z D, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice [J]. *Nature*, 2009, 460 (7253): 392 - 395.
- [12] FARKAS E, LUITEN P G, BAN F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [J]. *Brain Research Reviews*, 2007, 54 (1): 162 - 180.
- [13] SUH H W, SONG D K, WIE M B, et al. The reduction of antinociceptive effect of morphine administered intraventricularly is correlated with the decrease of serotonin release from the spinal cord in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *General Pharmacology*, 1996, 27 (3): 445 - 450.
- [14] IADECOLA C. The pathobiology of vascular dementia [J]. *Neuron*, 2013, 80 (4): 844 - 866.
- [15] GORDON S, MARTINEZ F O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions [J]. *Immunity*, 2010, 32 (5): 593 - 604.
- [16] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122 (3): 787 - 795.
- [17] SAXTON R A, SABATINI D M. Mtor signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cells*, 2017, 168 (6): 960 - 976.
- [18] THOMSON A W, TUQRNUIS H R, RAIMONDI G. Immunoregulatory functions of mtor inhibition [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9 (5): 324 - 337.
- [19] WEICHHART T, SAEMANN M D. The multiple facets of mtor in immunity [J]. *Trends in Immunology*, 2009, 30 (5): 218 - 226.
- [20] JOHNSON S C, RABINOVITCH P S, KAEBERLEIN M. Mtor is a key modulator of ageing and age-related disease [J]. *Nature*, 2013, 493 (7432): 338 - 345.

(下转第 303 页)

2003;314-325.

[10]刘靖芷,郑宝森,史可梅,等. 家兔坐骨神经内注射阿霉素对后肢感觉和运动功能的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2006;12(3):157.

[11]刁志君,姜宏,刘锦涛,等. 多配体蛋白聚糖-4 在椎间盘退变中的作用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(10):87-91.

[12]吴彬彬,刘鸿,占桂平. 针刺、推拿联合治疗神经根型颈椎病的疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2019,26(4):569-570.

[13]张雨桐,王姿雯,杜佳蓉,等. 国内外针灸治疗颈椎病颈痛临床研究概况[J]. 中医药临床杂志, 2018,30(4):591-598.

[14]郭欢欢,王珍,马忠. 颈型颈椎病的中医治疗研究进展[J]. 新疆中医药, 2019,37(5):95-97.

[15]刁志君,姜宏,刘锦涛,等. 炎症因子在椎间盘退变中的作用[J]. 中医正骨, 2018,30(7):32-35.

[16]祝永刚,孙旗,陈江,等. 退变椎间盘生物力学研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2018,26(15):1400-1404.

[17]朱瑞,贾红丽. 青年型颈椎病的 X 线征象特点[J]. 影像研究与医学应用, 2017,1(12):58-59.

[18]孟祥宇,夏建龙. 椎间盘退变的机制及修复[J]. 中国组织工程研究, 2015,19(11):1768-1773.

[19]童通,雷涛,申勇. 椎间盘退行性变中细胞凋亡的分子机制[J]. 中国矫形外科杂志, 2017,25(19):1788-1792.

[20]赵赫,俞兴,唐向盛,等. 炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 与椎间盘退变关系的研究进展[J]. 中国骨伤, 2017,30(9):866-871.

[21]朱宇,陈清汉,张明生,等. 退变性颈椎间盘相关基因和细胞因子的测定分析[J]. 中华实验外科杂志, 2017,34(7):1236-1238.

[22]纪振伟,姚立东,周杰. 颈椎病大鼠模型血清 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2018,38(11):2706-2708.

[23]KANG R,LI H,RICKERS K,et al. Intervertebral disc degenerative changes after intradiscal injection of TNF- α in a porcine mode[J]. European Spine Journal, 2015, 24(9):2010-2016.

[24]孙灰灰,吴小涛. TNF- α 与椎间盘退变关系的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2015,34(3):448-452.

[25]OH J S,CHO I A,KANG K R,et al. Biochanin-A antagonizes the interleukin-1 β -induced catabolic inflammation through the modulation of NF κ B cellular signaling in primary rat chondrocytes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 477(4):723-730.

[26]YOSHIDA T,PARK J S,YOKOSUKA K,et al. Effect of a nonprotein bioactive agent on the reduction of cyclooxygenase -2 and tumor necrosis factor- α in human intervertebral disc cells in vitro[J]. Journal Of Neurosurg Spine, 2008,9(5):411-418.

(2020-01-10 收稿,2020-02-25 修回)
中文编辑: 严 征; 英文编辑: 乐 萍

(上接第 297 页)

[21]MAIESE K, CHONG Z Z, SHANG Y C, et al. Mtor: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system[J]. Trends in Molecular Medicine, 2013, 19(1):51-60.

[22]CAROSI J M, SARGENT T J. Rapamycin and alzheimer disease: a double-edged sword[J]. Autophagy, 2019,15(8):1460-1462.

[23]JIANG H, WESTERTEP M, WANG C, et al. Macrophage mtorc1 disruption reduces inflammation and insulin resistance in obese mice[J]. Diabetologia, 2014, 57(11):2393-2404.

[24]HAN R, GAO J, ZHAI H, et, al. Rad001 (everolimus) attenuates experimental autoimmune neuritis by inhibiting the mtor pathway, elevating akt activity and polarizing m2 macrophages[J]. Experimental Neurology, 2016, 280:106-114.

[25]LI D, WANG C, YAO Y, et al. Mtorc1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from m1 type to m2 type[J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2016, 30(10):3388-3399.

(2020-01-15 收稿,2020-02-27 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳