

20-羟基蜕皮甾酮通过 Akt/NF- κ B 通路调节小胶质细胞活化

胡 军 张彦海 潘 娜 张 佳 程 妮 迟丽屹

摘 要 目的 观察 20-羟基蜕皮甾酮对脂多糖诱导的体外原代培养小胶质细胞活化的影响,并探讨其相关机制。方法 脂多糖处理原代培养的 SD 大鼠小胶质细胞,构建其活化模型。实验分为正常组,脂多糖处理组和脂多糖+20-羟基蜕皮甾酮组。酶联免疫法测定各组细胞培养基中 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度,Western blot 法检测各组细胞胞质内 p-I κ B α 、细胞核内 p-NF- κ B 以及细胞内 p-Akt 水平。结果 10ng/ml LPS 孵育小胶质细胞 8h,细胞培养基中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度分别从 33.73 ± 6.42 pg/ml 和 43.67 ± 7.17 pg/ml 上升至 87.16 ± 12.78 pg/ml 和 96.55 ± 13.76 pg/ml ($P < 0.01$)。50 μ mol/L 20-羟基蜕皮甾酮和 LPS 一起处理细胞 8h 后,笔者观察到细胞上清中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度分别降低至 59.37 ± 9.24 和 72.81 ± 12.69 pg/ml ($P < 0.05$)。进一步增加 20-羟基蜕皮甾酮浓度至 100 μ mol/L,细胞上清中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度进一步降低至 48.11 ± 8.42 pg/ml 和 61.44 ± 9.38 pg/ml ($P < 0.01$)。此外,脂多糖导致小胶质细胞胞质内 p-I κ B α 、细胞核内 p-NF- κ B 和细胞内 p-Akt 水平明显升高 ($P < 0.01$),20-羟基蜕皮甾酮抑制上述蛋白水平的升高。结论 20-羟基蜕皮甾酮经 Akt 信号通路,失活 NF- κ B,抑制 LPS 诱导的小胶质细胞 IL-1 β 和 TNF- α 分泌,最终改善小胶质细胞介导的炎症。

关键词 20-羟基蜕皮甾酮 小胶质细胞 炎症 NF- κ B Akt

中图分类号 R33;R743.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.10.022

20-Hydroxyecdysone Inhibits Akt-Mediated NF- κ B Activation in LPS-treated Microglial Cells. Hu Jun, Zhang Yanhai, Pan Na, et al. Department of Neurology, Shaanxi People's Hospital, Shaanxi 710068, China

Abstract Objective To investigate the effects of 20-hydroxyecdysone on microglial activation and the related mechanisms in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglial cells. **Methods** A model of activation of microglia was established by LPS in the primary cultured SD rat microglia. The experiment was divided into control group, LPS-treated group and LPS+20-hydroxyecdysone treated group. The concentration of IL-1 β and TNF- α in the culture supernatant of microglia cells were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the experimental group. The levels of p-I κ B α in the cytoplasm, p-NF- κ B in the nucleus and p-Akt in cell were detected by Western blot. **Results** The concentration of IL-1 β and TNF- α in the culture supernatant of microglia cells were increased from 33.73 ± 6.42 pg/ml and 43.67 ± 7.17 pg/ml up to 87.16 ± 12.78 pg/ml and 96.55 ± 13.76 pg/ml respectively after the microglia cells were treated by 10ng/ml LPS for 8 hours ($P < 0.01$). We observed that the concentration of IL-1 β and TNF- α in the culture supernatant of microglia cells were reduced to 59.37 ± 9.24 and 72.81 ± 12.69 pg/ml after the microglia cells were treated by 50 μ mol/L 20-hydroxyecdysone and LPS for 8 hours ($P < 0.05$). The concentration of IL-1 β and TNF- α in the culture supernatant of microglia cells were further decreased to 48.11 ± 8.42 pg/ml and 61.44 ± 9.38 pg/ml respectively when The concentration of 20-hydroxyecdysone was increased to 100 μ mol/L ($P < 0.01$). In addition, the levels of p-I κ B α in the cytoplasm, p-NF- κ B in the nucleus and p-Akt in cell were increased significantly in LPS-treated microglia cells, which were inhibited by 20-hydroxyecdysone. **Conclusion** 20-hydroxyecdysone caused inactivation of NF- κ B via Akt signaling pathway, further inhibited the secretion of IL-1 β and TNF- α of microglia and finally ameliorated the inflammatory responses of microglia induced by LPS.

Key words 20-Hydroxyecdysone; Microglia; Inflammation; NF- κ B; Akt

基金项目:陕西省卫生计生科研基金资助项目(2016D061)

作者单位:710068 西安,陕西省人民医院神经内科(胡军);
710054 西安,中国人民解放军第451医院神经内(胡军、潘娜、迟丽屹);
干部病房(张彦海),ICU(张佳);710082 西安市第五医院内一科(程妮)

通讯作者:迟丽屹,电子信箱:chi603@foxmail.com;程妮,电子信箱:chengni1982@163.com

缺血性脑卒中是导致我国国民致死、致残的主要原因之一^[1]。血管再通治疗是当前治疗急性缺血性卒中的首要选择。但是由于其狭窄的治疗时间窗,仅有3%~5%的急性缺血性脑卒中患者能接受此项治疗。神经保护剂由于不受治疗时间窗限制,是治疗急性缺血性脑卒中非常有前景的方法^[2]。20-羟基蜕

皮甾酮(20-hydroxycedysone, 20E)是一种天然甾体类化合物,调节昆虫等无脊椎动物的蜕皮、变态和繁殖^[3]。笔者前期研究发现20E无论是在神经元细胞缺氧模型中,还是在大鼠大脑中动脉闭塞模型中均有显著的神经保护作用,但其神经保护机制尚不清楚^[4,5]。小胶质细胞是脑组织中的免疫细胞,其介导的炎症反应在缺血导致的神经元损伤中起着十分重要的作用^[6]。近期,Zhang等报道20E在关节软骨细胞中具有抗炎效应^[7]。因此,笔者推测20E神经保护机制可能涉及抗炎机制。故本研究旨在探讨20E对脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的小胶质细胞活化的影响以及其通过Akt/NF- κ B通路调节小胶质细胞活化的机制。

材料与方法

1. 试验动物与试剂:实验动物:SD大鼠乳鼠(1~2日龄),由空军军医大学实验动物中心提供。主要药物和试剂:20E购买于上海同田生物科技有限公司。胎牛血清和Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养基购买于Gibco。LY294002购买于美国AbMole公司。IL-1 β 和TNF- α 酶联免疫试剂盒(ELISA)购买于BD Pharmingen。p-Akt抗体和p-NF- κ B(p65)抗体购买于美国Cell Signal Technology公司。p-I κ B α 抗体购买于美国Santa Cruz Biotechnology公司。CD11b抗体购买于英国Abcam公司。

2. 小胶质细胞的培养:取新生SD大鼠乳鼠,埋入冰中5min,冰冻麻醉,75%乙醇泡浸5min,剪开颅骨,迅速取出大脑,冰PBS洗涤,眼科剪除去小脑,沿中线把大脑分为左右半球,切掉嗅球、基底核、海马,分离出皮质,用刀片把皮质切成1mm³左右的小块,加入消化液[13.6ml HBSS, 0.8ml DNase I stock solution (0.2mg/ml)和0.6ml trypsin stock solution (0.25%)] ,37℃孵育15min,加入含20%胎牛血清高糖DMEM终止消化,800r/min离心5min,200目细胞筛过滤,将过滤液移入培养瓶(赖氨酸提前包被)中,放入细胞培养孵箱内培养(培养条件:5% CO₂, 37℃)10天,2~3天换液1次,获得混合胶质细胞。摇床摇晃2h(200r/min),收集细胞培养基,800r/min离心5min,去上清,获得小胶质细胞。用含20%胎牛血清高糖DMEM重悬小胶质细胞,移入新培养瓶(赖氨酸提前包被)中继续培养3天后,进行实验。

3. CD11b免疫荧光染色:首先赖氨酸处理细胞爬片,再将其置于6孔板中,然后将小胶质细胞接种于

6孔板,细胞培养孵箱内培养(培养条件:5% CO₂, 37℃)3天,移除培养基,冰PBS漂洗细胞爬片,室温条件下4%的多聚甲醛固定细胞15min, PBS漂洗细胞爬片,室温条件下分别用Triton X-100(0.5%)孵育细胞15min和山羊血清孵育细胞30min。CD11b抗体(1:200)4℃湿盒孵育过夜, PBS漂洗细胞爬片,室温条件下避光孵育二抗(CY3)2h,染核,封片,激光共聚焦显微镜下观察结果。

4. 小胶质细胞活化模型的建立:依据笔者前期的研究,使用10ng/ml LPS孵育原代培养的SD大鼠小胶质细胞8h,建立小胶质细胞活化模型。

5. 细胞上清IL-1 β 和TNF- α 蛋白含量测定:根据实验所设计的时间点,取各孔细胞上清,离心除去悬浮物,按照IL-1 β 和TNF- α 酶联免疫试剂盒操作手册,检测细胞培养基中IL-1 β 和TNF- α 浓度。

6. Western blot法检测小胶质细胞中p-Akt、p-NF- κ B和p-I κ B α 蛋白的表达:小胶质细胞按实验设计被处理结束后,胰酶消化细胞,获得细胞悬液,800r/min离心5min,获得细胞沉淀,在冰上用含1mmol/L PMSF的RIPA细胞裂解液裂解细胞30min,低温高速(4℃, 14000 $\times g$)离心5min,收集上清于EP管中,-70℃保存待用。按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取细胞核蛋白,并-70℃保存待用。BCA法测定各组提取液蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳,每孔蛋白上样量50 μ g,转膜,室温条件下5%脱脂牛奶孵育1h,一抗孵育过夜(4℃),一抗工作浓度分别为p-Akt (1:1000), p-NF- κ B (1:1000)和p-I κ B α (1:1000)。TBST洗膜,室温条件下二抗孵育2h,化学发光显色后采集图像,测量各蛋白条带灰度值。

7. 统计学方法:采用SPSS 11.0统计学软件进行统计分析,数据表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。单因素方差分析(ANOVA)或Turkey检验法被用于两组间数据比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小胶质细胞的培养和鉴定:如图1A所示,SD大鼠皮质消化细胞培养10天后获得混合胶质细胞,倒置显微镜下可见胶质细胞分层生长,星形胶质细胞位于底层,小胶质细胞和少突胶质细胞折光性强,呈圆形,附着在星型胶质细胞上。摇床振荡2h,将小胶质细胞与星型胶质细胞和少突胶质细胞振荡分离。如图1B所示,获得的小胶质细胞继续培养3天,小胶质细胞贴壁生长,细胞以梭形和多角型为主。免疫荧光

染色显示细胞质表达 CD11b(红色荧光标记),DAPI 染色细胞核(蓝色荧光),计算 CD11b 阳性细胞比例达

95%。上述实验结果提示,从 SD 大鼠皮质分离纯化的细胞为小胶质细胞,可以用于后续研究(图 1C)。

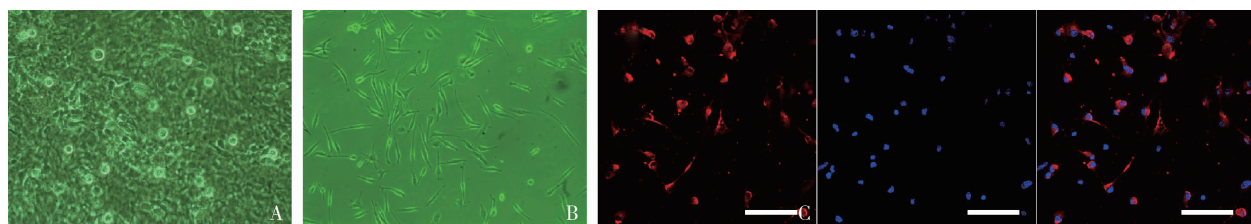


图 1 原代培养 SD 大鼠皮质小胶质细胞和鉴定

A. SD 大鼠皮质消化细胞培养 10 天,细胞分层生长,小胶质细胞折光性强,呈圆形($\times 100$);B. 获得的小胶质细胞培养 3 天后,细胞以梭形和多角型为主($\times 100$);C. CD11b 免疫荧光染色,红色荧光标记 CD11b,蓝色荧光标记细胞核(标尺 $100\mu\text{m}$)

2. 20E 抑制 LPS 诱导的小胶质细胞活化:如图 2 所示,10ng/ml LPS 处理小胶质细胞 8h,细胞上清中 IL-1 β 浓度从 $33.73 \pm 6.42\text{pg/ml}$ 上升至 $87.16 \pm 12.78\text{pg/ml}$ ($P < 0.01$),TNF- α 浓度从 $43.67 \pm 7.17\text{pg/ml}$ 上升至 $96.55 \pm 13.76\text{pg/ml}$ ($P < 0.01$)。为了观察 20E 对小胶质细胞活化的抑制效应,笔者用 LPS(10ng/ml)和 $20\mu\text{mol/L}$ 20E 共同处理小胶质细胞 8h,但细胞上清中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度与 LPS 处理组比较无明显变化($P > 0.05$),于是增加 20E 的浓度,当用 $50\mu\text{mol/L}$ 20E 和 LPS 一起处理细胞 8h 后,观察到细胞上清中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度分别显著降低至 59.37 ± 9.24 和 $72.81 \pm 12.69\text{pg/ml}$ ($P < 0.05$)。进一步增加 20E 浓度至 $100\mu\text{mol/L}$,细胞上清中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度进一步降低至 $48.11 \pm 8.42\text{pg/ml}$ 和 $61.44 \pm 9.38\text{pg/ml}$ ($P < 0.01$)。实验结果提示 20E 抑制 LPS 诱导的小胶质细胞活化,并且其抑制作用具有浓度依耐性。

3. 20E 抑制 LPS 处理小胶质细胞中 NF- κB 的活化:NF- κB 信号通路在调节小胶质细胞介导的炎症反应中扮演着重要的角色^[8]。如图 3 所示,LPS 处理小胶质细胞后,细胞质内 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 和细胞核内 p-NF- κB 水平明显升高($P < 0.01$,与对照组比较)。同样,用 $25\mu\text{mol/L}$ 20E 和 LPS 一起处理小胶质细胞 8h,没有观察到小胶质细胞质内 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 和细胞核内 p-NF- κB 水平显著变化($P > 0.05$,与 LPS 处理组比较)。当把 20E 浓度增至 $100\mu\text{mol/L}$ 时,可以非常显著观察到小胶质细胞质 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 和细胞核内 p-NF- κB 水平显著低于 LPS 处理组($P < 0.01$)。实验结果提示 LPS 导致小胶质细胞中 NF- κB 活化,而 20E 可以抑制其活化。

4. 20E 经 Akt 信号通路调节 LPS 处理的小胶质

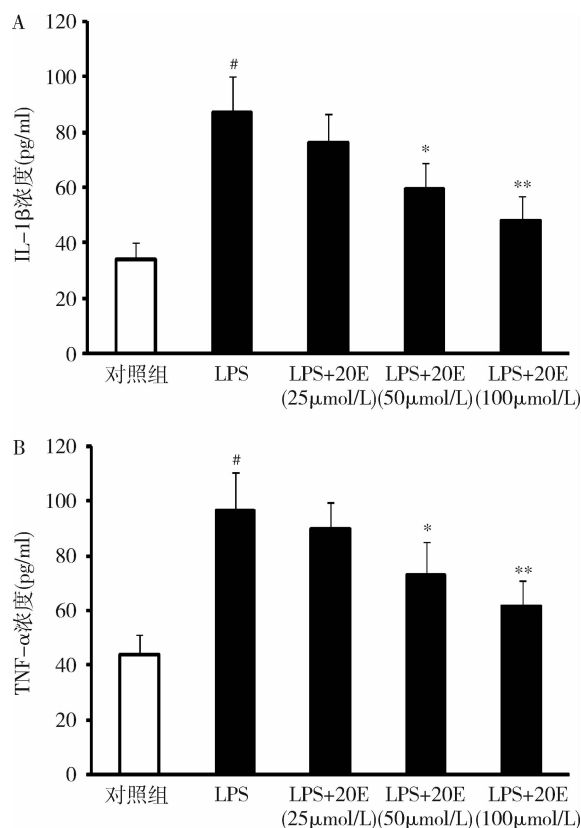


图 2 20E 抑制活化小胶质细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α

A. 酶联免疫法测定各组小胶质细胞培养基中 IL-1 β 的浓度; B. 酶联免疫法测定各组小胶质细胞培养基中 TNF- α 的浓度;与对照组比较,[#] $P < 0.01$;与 LPS 处理组比较,^{*} $P < 0.05$;

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

细胞中 NF- κB 的活化: Akt 是 NF- κB 的上游分子。研究证实在小胶质细胞介导的炎症反应中, Akt 可以调节 NF- κB 的活化^[9]。因此,笔者进一步观察了 20E、Akt 和 NF- κB 三者 in LPS 处理小胶质细胞中的关系。如图 4 所示,LPS 处理小胶质细胞 8h 后,细胞内 p-Akt 水平明显升高($P < 0.01$)。同时,小胶

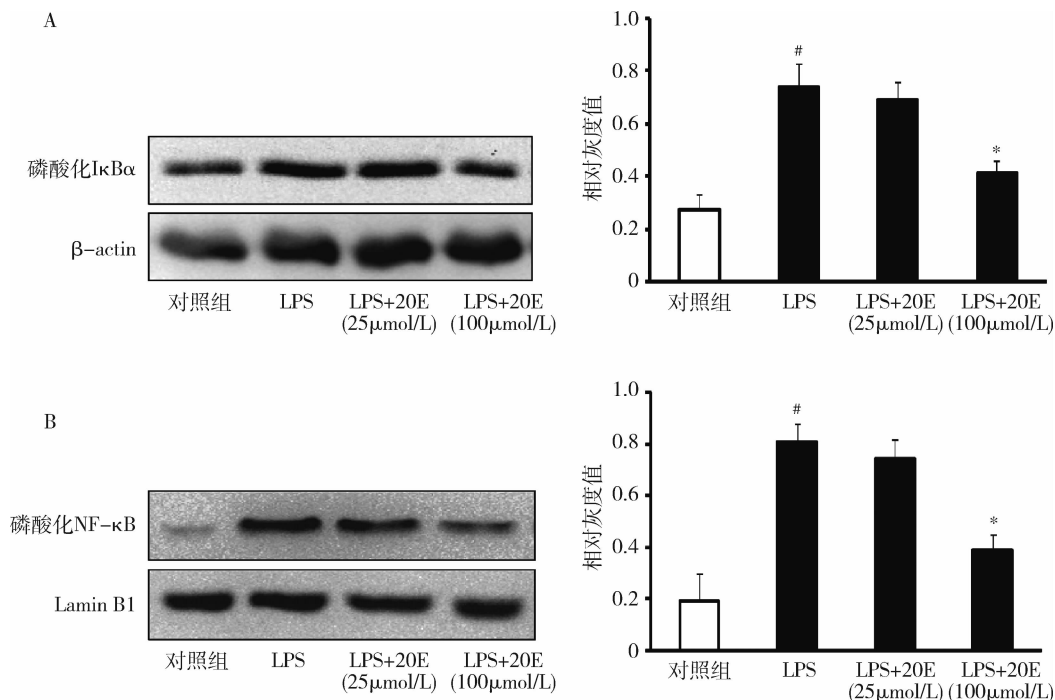


图3 20E 下调 LPS 处理小胶质细胞胞质中 p-IκBα 和细胞核内 p-NF-κB 水平

A. Western blot 法检测小胶质细胞胞质中 p-IκBα 水平; B. Western blot 法检测小胶质细胞细胞核内 p-NF-κB 水平; 与对照组比较, [#] $P < 0.01$; 与 LPS 处理比较, ^{*} $P < 0.01$

质细胞质内 p-IκBα 和细胞核内 p-NF-κB 水平较对照组也明显升高 ($P < 0.01$)。而 20E 下调 LPS 诱导的小胶质细胞内 Akt 的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 进而减少细胞质内 p-IκBα 和细胞核内 p-NF-κB 的水平 ($P < 0.01$)。实验结果提示 20E 通过下调 Akt 的磷酸化水平, 进而使 LPS 诱导的小胶质细胞 NF-κB 失活。

讨 论

20E 是一种昆虫类固醇激素, 具有调节昆虫蜕皮、变态和繁殖的能力, 因此它最早被昆虫学家所发现并在昆虫学领域广泛研究。随着对 20E 研究的深入, 人们发现它也是许多中草药例如牛膝和露水草等的主要活性成分。于是, 20E 在人体的药理特性引起了大家的关注。近年来, 研究发现 20E 具有促进人体蛋白合成, 调节糖代谢和脂代谢, 调节免疫以及促进干细胞分化等功能^[10-12]。2008 年, Liu 等报道 20E 减轻蛛网膜下腔出血后兔的神经损伤, 这使 20E 作为一种潜在的神经保护剂进入我们的视线。在神经元细胞缺氧模型中, 笔者观察到 20E 抑制缺氧导致的神经元细胞活性下降和凋亡^[4]。笔者在大脑中动脉闭塞的大鼠中观察到 20E 肯定、显著的神经保护效应^[5]。加之, 20E 对人体无明显不良反应, 已经

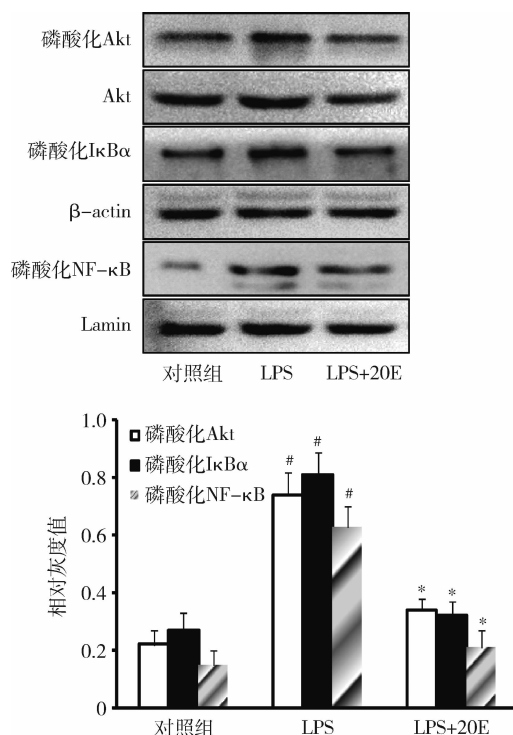


图4 20E 下调 LPS 处理的小胶质细胞中 p-Akt, 胞质内 p-IκBα 和细胞核内 p-NF-κB 的水平

Western blot 法测定小胶质细胞中 p-Akt, 胞质内 p-IκBα 以及细胞核内 p-NF-κB 水平; 与对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 LPS 处理比较, ^{*} $P < 0.01$

作为强壮剂在人体使用^[13]。基于 20E 上述药理特性,有理由相信 20E 是一个非常具有前景的神经保护剂。因此,研究 20E 的神经保护机制将为其临床运用提供理论依据。炎症是脑缺血后神经损伤的重要机制^[14]。因此,本研究利用 LPS 刺激原代培养小胶质细胞建立其活化模型,去观察 20E 抑制小胶质细胞活化的效应和相关机制。笔者发现 20E 通过 Akt 失活 NF- κ B,进而抑制 LPS 处理的小胶质细胞释放 IL-1 β 和 TNF- α 。

中枢神经系统存在 3 种胶质细胞,其中小胶质细胞是免疫细胞。它除了能维持细胞稳态、免疫监视和防御外,也是脑组织炎症重要的调控子。缺血后,中枢神经系统内的小胶质细胞被活化,产生众多神经炎症介质例如促炎细胞因子等,从而导致神经元损伤^[14]。IL-1 是脑缺血后炎症反应重要的促炎细胞因子。IL-1 有两个亚型 IL-1 α 和 IL-1 β ,其中 IL-1 β 在脑缺血炎症损伤中扮演着更为重要的角色。研究发现脑缺血后大鼠血清中 IL-1 β 浓度显著升高。进一步,脑室注射重组 IL-1 β 增加大鼠脑梗死体积,加重脑水肿,而 IL-1 受体拮抗剂显著减轻脑缺血后大鼠神经功能的缺损^[15,16]。TNF- α 是另一个脑缺血后炎症反应重要的促炎细胞因子。临床研究报道急性缺血性脑卒中患者血清和脑脊液中 TNF- α 升高,并且其升高程度与脑梗死体积呈正相关^[17]。在动物实验中,使用抗 TNF- α 抗体拮抗 TNF α 效应,明显减少缺血后脑梗死体积^[18]。本研究发现 LPS 处理小胶质细胞后,IL-1 β 和 TNF- α 分泌增加,而 20E 抑制其分泌增加。这些实验结果提示,20E 抑制小胶质细胞介导的炎症。

NF- κ B 是真核细胞内重要的转录调节因子,由同源或异源二聚体 Rel 蛋白构成。在大多数情况下,NF- κ B 在细胞质中与其抑制性蛋白(inhibitor of NF- κ B,I κ B)结合,处于非活化状态。在各种细胞外信号的诱导下,I κ B 被磷酸化,随之被降解。然后,NF- κ B 二聚体迅速易位到细胞核,与启动子区域的 DNA 序列特异结合,进而激活靶基因的转录^[19]。研究已证实 NF- κ B 是关键性的炎症调控分子,调控小胶质细胞促炎细胞因子的表达^[20]。与这些研究一致,笔者发现 LPS 处理小胶质细胞后,细胞内 NF- κ B 被活化,促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 分泌增加。20E 通过下调 LPS 处理小胶质细胞中 I κ B 磷酸化水平,阻断 NF- κ B 二聚体的核易位,进而失活

NF- κ B,最终实现对小胶质细胞 IL-1 β 和 TNF- α 分泌的抑制效应。NF- κ B 是 Akt 的下游分子,其活性受 Akt 调节。在小胶质细胞中,Akt 磷酸化后,可以激活 I κ B 激酶,使 I κ B 磷酸化,NF- κ B 二聚体核易位,最终调控促炎细胞因子的分泌^[21]。因此,调控 Akt/NF- κ B 信号通路已经成为抑制小胶质细胞活化,减少促炎细胞因子表达的重要靶点^[22]。本研究中笔者发现,20E 下调小胶质细胞 I κ B 的磷酸化水平,进而抑制 NF- κ B 二聚体的核易位。同时,笔者也发现 20E 抑制 LPS 诱导小胶质细胞 Akt 磷酸化。这些实验结果提示,20E 通过 Akt 信号通路失活 NF- κ B,从而抑制小胶质细胞介导的炎症。

综上所述,笔者研究发现 20E 抑制 LPS 处理的小胶质细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α 。20E 经 Akt 信号通路,抑制 NF- κ B 的活化,是其调控小胶质细胞介导的炎症的一个机制。同时,本研究也为阐述 20E 神经保护的抗炎机制提供了理论依据,它的完成深化了对 20E 神经保护效应的认识。

参考文献

- 1 Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2016 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016,133: e38-360
- 2 Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, *et al.* Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility [J]. *Brain*, 2017, 140(8):2079-2092
- 3 Thiem B, Kikowska M, Maliński MP, *et al.* Ecdysteroids: production in plant in vitro cultures [J]. *Phytochem Rev*, 2017,16(4):603-622
- 4 Hu J, Zhao TZ, Chu WH, *et al.* Protective effects of 20-hydroxyecdysone on CoCl₂(2)-induced cell injury in PC12 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010,111(6):1512-1521
- 5 Hu J, Luo CX, Chu WH, *et al.* 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF- κ B and JNK pathways [J]. *PLoS One*, 2012,7(12):e50764
- 6 Vidale S, Consoli A, Arnaboldi M, *et al.* Postischemic Inflammation in Acute Stroke [J]. *J Clin Neurol*, 2017,13(1):1-9
- 7 Zhang X, Xu X, Xu T, *et al.* β -Ecdysterone suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF- κ B signaling pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2014,75(3):195-201
- 8 Kopitar - Jerala N. Innate immune response in brain, NF-Kappa B signaling and cystatins [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8:73-81
- 9 Yin X, Feng C, Han L, *et al.* Diallyl disulfide inhibits the metastasis of type II esophagealgastric junction adenocarcinoma cells via NF- κ B and PI₃K/AKT signaling pathways in vitro [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2):784-794

(下转第 99 页)

- 2 Ziegeler S, Buchinger H, Wilhelm W, *et al.* Impact of deep hypothermic circulatory arrest on the bis index [J]. *J Clin esth*, 2010, 22(5):340–345
- 3 Yan CG, Wang XD, Zuo XN, *et al.* Dpabi: data processing & analysis for (resting – state) brain imaging [J]. *Neuroinformatics*, 2016, 14(3):339–351
- 4 Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. Amsterdam: Boston Elsevier Academic Press, 2005: 51–182
- 5 Tug A, Hanci A, Turk HS, *et al.* Comparison of two different intranasal doses of dexmedetomidine in children for magnetic resonance imaging sedation [J]. *Paediatr Drugs*, 2015, 17(6):479–485
- 6 Zang Y, Jiang T, Lu Y, *et al.* Regional homogeneity approach to fmri data analysis [J]. *NeuroImage*, 2004, 22(1):394–400
- 7 Cao S, Li Y, Deng W, *et al.* Local brain activity differences between herpes zoster and postherpetic neuralgia patients: a resting – state functional MRI study [J]. *Pain Physician*, 2017, 20(5):687–699
- 8 Muzik O, Diwadkar VA. In vivo correlates of thermoregulatory defense in humans: temporal course of sub – cortical and cortical responses assessed with FMRI [J]. *Human Brain Mapping*, 2016, 37(9):3188–3202
- 9 Fehir M, Klega A, Buchholz HG, *et al.* Cortical control of thermo-

- regulatory sympathetic activation [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 31(11):2101–2111
- 10 Craig AD. How do you feel – now? The anterior insula and human awareness [J]. *Nat Reviews Neurosci*, 2009, 10(1):59–70
- 11 Yuan J, Luo Z, Zhang Y, *et al.* Gabaergic ventrolateral preoptic nucleus neurons are involved in the mediation of the anesthetic hypnosis induced by propofol [J]. *Mole Medi Rep*, 2017, 16(3):3179–3186
- 12 Eisenblatter A, Lewis R, Dorfler A, *et al.* Brain mechanisms of abnormal temperature perception in cold allodynia induced by ciguatoxin [J]. *Ann Neurol*, 2017, 81(1):104–116
- 13 Shinohe Y, Higuchi S, Sasaki M, *et al.* Changes in brain activation induced by visual stimulus during and after propofol conscious sedation: a functional MRI study [J]. *Neuroreport*, 2016, 27(17):1256–1260
- 14 Goswami D, McLeod K, Leonard S, *et al.* Static cerebrovascular pressure autoregulation remains intact during deep hypothermia [J]. *Paediat Anaesth*, 2017, 27(9):911–917

(收稿日期:2017–09–21)

(修回日期:2017–10–03)

(上接第 83 页)

- 10 Parr MK, Zhao P, Haupt O, *et al.* Estrogen receptor beta is involved in skeletal muscle hypertrophy induced by the phytoecdysteroid ecdysterone [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(9):1861–72
- 11 Jian CX, Liu XF, Hu J, *et al.* 20 – Hydroxyecdysone – induced bone morphogenetic protein – 2 – dependent osteogenic differentiation through the ERK pathway in human periodontal ligament stem cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1–3):48–56
- 12 Liu Z, Zhu G, Zhang JH, *et al.* Ecdysterone attenuates vasospasm following experimental subarachnoid haemorrhage in rabbits [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 104:297–302
- 13 Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update [J]. *J Insect Sci*, 2003, 3:7–12
- 14 Chen C, Chu SF, Liu DD, *et al.* Chemokines play complex roles in cerebral ischemia [J]. *Neurochem Int*, 2017, S0197–0186(17)30252–30258
- 15 Amantea D, Russo R, Certo M, *et al.* Caspase – 1 – independent maturation of IL – 1 β in ischemic brain injury: is there a role for gelatinases [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(9):729–737
- 16 McCann SK, Cramond F, Macleod MR, *et al.* Systematic review and meta – analysis of the efficacy of interleukin – 1 receptor antagonist in animal models of stroke: an update [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(5):395–406

- 17 Watters O, O'Connor JJ. A role for tumor necrosis factor – α in ischemia and ischemic preconditioning [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 2(8):87–92
- 18 Tuttolomondo A, Pecoraro R, Pinto A. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 7(8):2221–2238
- 19 Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, *et al.* The role of Nuclear Factor – kappa B signaling in human cervical cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 120:141–150
- 20 Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF – kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 18(8):77–83
- 21 Dong L, Li YZ, An HT, *et al.* The E₃ Ubiquitin ligase c – Cbl inhibits microglia – mediated CNS inflammation by regulating PI₃K/Akt/NF – κ B pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(8):661–669
- 22 Huang HY, Chang HF, Tsai MJ, *et al.* 6 – Mercaptopurine attenuates tumor necrosis factor – α production in microglia through Nur77 – mediated transrepression and PI₃K/Akt/mTOR signaling – mediated translational regulation [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):78–82

(收稿日期:2017–12–08)

(修回日期:2017–12–27)