

丁苯酞对睡眠剥夺大鼠脑额叶 HMGB1 和 RAGE 表达的影响*

杨滢霞¹, 郭育芬², 黄红红¹, 王凌星^{1△}

(1. 福建医科大学附属第二医院神经内科, 泉州 362000; 2. 厦门市湖里区妇幼保健院健康教育科, 厦门 361000)

【摘要】 目的: 探讨丁苯酞对睡眠剥夺大鼠脑额叶高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 和晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 表达的影响。**方法:** 建立 Sprague Dawley (SD) 大鼠慢性睡眠剥夺和丁苯酞干预模型, 共分为 3 组 ($n=6$): 大平台对照组、慢性睡眠剥夺组、慢性睡眠剥夺+丁苯酞组, 慢性睡眠剥夺组采用睡眠剥夺箱对大鼠进行 28 d, 18 h/d 的睡眠剥夺, 慢性睡眠剥夺+丁苯酞组在睡眠剥夺 28 d 后腹腔注射丁苯酞 100 mg/(kg·d), 共 14 d。各组大鼠取脑部标本, 免疫组化检测额叶高迁移率族蛋白 1 (HMGB1)、核转录因子 κ B (NF- κ B) p65 表达, Western blot 检测大鼠额叶 HMGB1、沉默信息调节因子 1 (SIRT1)、晚期糖基化终产物 (RAGE)、NF- κ B 表达。**结果:** 与大平台对照组比较, 慢性睡眠剥夺组大鼠额叶 HMGB1、RAGE、细胞核 NF- κ Bp65 表达显著增多 (P 均 <0.05), 而 SIRT1 表达显著减少 ($P < 0.05$); 与慢性睡眠剥夺组比较, 慢性睡眠剥夺+丁苯酞组大鼠额叶 HMGB1、RAGE、细胞核 NF- κ Bp65 表达显著减少 (P 均 <0.05), 而 SIRT1 表达显著增加 ($P < 0.05$)。**结论:** 丁苯酞可通过改变慢性睡眠剥夺大鼠额叶 HMGB1 和 RAGE 表达, 减少 NF- κ Bp65 的核转移, 抑制额叶 HMGB1/RAGE/NF- κ B 信号通路。

【关键词】 慢性睡眠剥夺; 丁苯酞; 高迁移率族蛋白; 晚期糖基化终产物; 大鼠

【中图分类号】 R741.02

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-096-005

【DOI】 10.12047/j.cjap.6269.2022.090

Effects of Butylphthalide on the expressions of HMGB1 and RAGE in frontal lobe of rats after chronic sleep deprivation

YANG Ying-xia¹, GUO Yu-fen², HUANG Hong-hong¹, WANG Ling-xing^{1△}

(1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000; 2. Department of Health Education, XiamenHuli District Maternity and Child Care Hospital, Xiamen 361000, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects of Butylphthalide on the expressions of HMGB1 and RAGE in frontal lobe of rats after chronic sleep deprivation. **Methods:** Chronic sleep deprivation and butylphthalide treatment was performed in Sprague Dawley (SD) rats and the rats were divided into three groups ($n=6$): platform control group, chronic sleep deprivation group and chronic sleep deprivation + butylphthalide intervention group. Rats suffering chronic sleep deprivation were put in multiple platforms box for 18 h per day and sleep deprivation lasted for 28 days. Rats in butylphthalide intervention group were intraperitoneally injected with butylphthalide 100 mg/(kg·d) for 14 days after sleep deprivation. After collecting brains, high-mobility group box (HMGB1) and nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) p65 were detected by immunohistochemistry. The expression of HMGB1, silent information regulator of transcription 1 (SIRT1), receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and NF- κ B in frontal lobe were determined by Western blot. **Results:** Compared with platform control group, the expression levels of HMGB1, RAGE and nuclear NF- κ B p65 were increased significantly, while the expression of SIRT1 was decreased significantly in frontal lobe of chronic sleep deprivation group (all $P < 0.05$). Compared with chronic sleep deprivation group, the expression levels of HMGB1, RAGE and nuclear NF- κ B p65 were decreased significantly, while the expression of SIRT1 was increased significantly in chronic sleep deprivation + butylphthalide intervention group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Butylphthalide can inhibit HMGB1/RAGE/NF- κ B pathway in frontal lobe of rats after chronic sleep deprivation by changing the expression of HMGB1 and RAGE, and reducing the nuclear translocation of NF- κ Bp65.

【KEY WORDS】 chronic sleep deprivation; butylphthalide; HMGB1; RAGE; rats

高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box, HMGB1) 是危险信号分子家族的成员^[1], 是一种非组蛋白结合蛋白。在正常生理条件下, HMGB1 位于多种细胞的细胞核内, 与 DNA 结合, 稳定染色体结

构, 调节转录和翻译^[2]。在应激情况下, HMGB1 的赖氨酸残基被乙酰化, 并从细胞核转移到细胞外空间, 可与跨膜受体晚期糖基化终产物 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) 受体结合^[3]。RAGE 受体是第一个被发现的 HMGB1 受体, HMGB1 与 RAGE 受体结合后可触发核转录因子 κ B (nuclear transcription factor κ B, NF- κ B) 通路^[4], 引起炎症反应。HMGB1 已被证实与脑缺血

*【基金项目】福建省自然科学基金项目(2019J01471); 泉州市高层次人才创新创业项目(2018C050R); 福建省卫生健康青年科研课题(2020QN030)

【收稿日期】2022-02-14 【修回日期】2022-08-14

△【通讯作者】Tel: 18965610722; E-mail: lxing502@fjmu.edu.cn

缺氧、癫痫等多种疾病相关^[5,6],可导致神经炎症的级联反应。丁苯酞与芹菜籽中提取的左旋芹菜甲素结构相同,具有广泛的化学作用,本课题组的前期研究表明,丁苯酞可抑制慢性睡眠剥夺导致的大鼠额叶小胶质细胞活化和炎症因子生成^[7],丁苯酞也可抑制脑缺血时 NF- κ B 表达^[8],但丁苯酞对慢性睡眠剥夺后脑部 HMGB1 和 NF- κ B 的影响尚不明确。基于 HMGB1 在神经炎症中的作用,推测慢性睡眠剥夺可能影响大鼠额叶 HMGB1 表达。本研究拟通过动物实验探讨丁苯酞对慢性睡眠剥夺大鼠脑部额叶 HMGB1 及信号通路的影响,为今后治疗措施的提出提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 18 只,购自上海斯莱克动物公司,许可证号为 SCXK 沪 2012—0002。大鼠饲养的室温为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,每日 12 h 光照,可自由获得水和食物。SD 大鼠共分为 3 组:大平台对照组、慢性睡眠剥夺组、慢性睡眠剥夺+丁苯酞组,每组 6 只。

1.2 试剂

细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(碧云天生物技术公司,产品编号 P0027);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术公司,产品编号 P0009);HMGB1 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,产品编号 bs-55098R);沉默信息调节因子 1(silent information regulator of transcription 1, SIRT1)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,产品编号 bs-0291R);RAGE 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,产品编号 bs-4999R);NF- κ B p65 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,产品编号 bsm-33117M);肌动蛋白多克隆一抗(actin,北京博奥森生物技术有限公司,产品编号 bs-10966R);核纤层蛋白 B 多克隆一抗(Lamin B,碧云天生物技术公司,产品编号 AF1408);二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(碧云天生物技术公司,产品编号 P0202);辣根过氧化物酶标记多克隆二抗(北京博奥森生物技术有限公司,产品编号 bs-40295G-HRP);超敏电化学发光(Electro-Chemi-Luminescence, ECL)底物试剂盒(碧云天生物技术公司,产品编号 P0018AS)。

1.3 大鼠慢性睡眠剥夺和丁苯酞干预模型的建立

参照既往方法^[9]建立大鼠慢性睡眠剥夺模型。睡眠剥夺箱中有 8 个圆柱状小平台,小平台的直径

为 6.5 cm,高度为 8.0 cm,小平台间的距离为 15 cm,箱内注满水,水面位于平台下 1.5 cm 处。从每日 16:00 至次日 10:00 将大鼠放入睡眠剥夺箱内,大鼠可在小平台上摄取水和食物,并可在小平台间活动,当大鼠进入睡眠时会因为肌肉松弛跌入水中而清醒,从而达到睡眠剥夺的目的,每日余下的 6 h 将大鼠放回饲养笼中休息,共进行 28 d 的睡眠剥夺。大平台对照组所使用的大平台箱和睡眠剥夺箱类似,但在小平台间有细密的铁丝网,避免大鼠睡眠时落入水中,大鼠位于大平台箱的时间和睡眠剥夺组相同。慢性睡眠剥夺+丁苯酞组大鼠在睡眠剥夺 28 d 后腹腔注射丁苯酞 100 mg/(kg·d)^[10],共 14 d。慢性睡眠剥夺组和大平台对照组为腹腔注射同等量的生理盐水。

1.4 取材

各组大鼠于干预结束后随机选取 3 只,麻醉后迅速取新鲜额叶脑组织,用于 Western blot 检测,余下 3 只于麻醉后中性甲醛心脏灌注,取脑后石蜡包埋。

1.5 免疫组化检测大鼠额叶 HMGB1、NF- κ B p65 表达

大鼠额叶蜡块切成 4 μm 厚度,烘烤脱蜡后行抗原修复并对内源性酶进行灭活,分别与 1:200 的多克隆 HMGB1 或 1:400 的多克隆 NF- κ B p65 一抗孵育过夜,冲洗后与 1:1 000 的多克隆二抗孵育,DAB 显色后封片。显微镜下观察 HMGB1、NF- κ B 表达,阳性细胞呈棕黄色,每张切片于 400 倍下随机选取额叶的 3 个视野,拍照后对 HMGB1 阳性信号采用 Image-Pro Plus 5.0 软件分析累积光密度(integrated optical density, IOD),而对 NF- κ B p65 阳性细胞,则计数每个视野的细胞核 NF- κ B p65 阳性细胞数并取其平均值。

1.6 Western blot 检测大鼠额叶 HMGB1、SIRT1、RAGE、NF- κ B 表达

取部分新鲜大鼠额叶脑组织,按细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书操作,即新鲜组织切成细小碎片后,加入配制好的组织匀浆液,混合并在低温下充分匀浆,冰浴静置后低温离心,分离上清液和沉淀,在沉淀中按说明要求先后加入细胞浆蛋白抽提试剂、细胞核蛋白抽提试剂,并多次剧烈振荡、低温离心后得到细胞浆和细胞核蛋白,并进行蛋白定量后用于检测 NF- κ B 表达。其他新鲜额叶组织于低温下提取总蛋白。使用 BCA 法对细胞核、浆蛋白及总蛋白进行浓度测定。在蛋白样品中加适量的上样缓冲液后,使用配制好的聚丙烯酰胺凝胶进行

电泳分离,随后将蛋白印迹转移到硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭。含有核、浆蛋白的膜与NF- κ B(1:800)一抗或Lamin一抗(1:1000),含总蛋白的膜与HMGB1(1:800)、SIRT1(1:500)、RAGE(1:500)或Actin(1:1000)一抗低温孵育过夜后,与稀释后的辣根过氧化物酶标记二抗孵育后ECL显影,凝胶成像系统分析条带灰度。以目的条带与相应内参的灰度比为目的蛋白的表达量。

1.7 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用SPSS 20.0软件对结果进行统计学分析,对数据进行单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验。

2 结果

2.1 丁苯酞对睡眠剥夺大鼠脑额叶HMGB1表达的影响

HMGB1表达于细胞核和细胞质中,大平台对照组大鼠额叶皮质HMGB1阳性细胞呈淡棕色,数量较少;与大平台对照组比较,慢性睡眠剥夺组HMGB1阳性细胞数量增多,呈深棕色,IOD显著增加($P<0.05$,图1A-C,表1);慢性睡眠剥夺+丁苯酞组大鼠的HMGB1阳性细胞染色较慢性睡眠剥夺组浅,IOD明显减少($P<0.05$,图1A-C,表1)。Western blot检测表明,与大平台对照组比较,慢性睡眠剥夺大鼠额叶HMGB1表达显著增加;而丁苯酞可显著抑制慢性睡眠剥夺引起的HMGB1表达增加(P 均 <0.05 ,图1D,表1)。

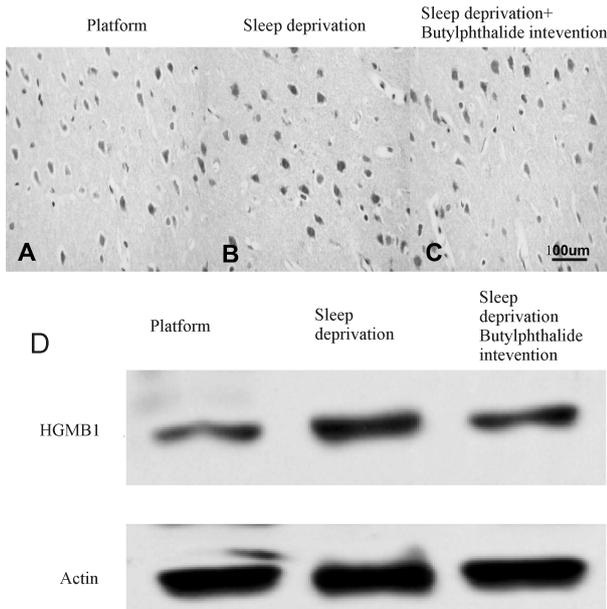


Fig. 1 The expressions of HMGB1 in frontal lobe of rats in three groups by immunohistochemistry (A-C) and Western blot (D)

Tab. 1 Expressions of HMGB in three groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	HMGB IOD	HMGB
Platform	231.80 \pm 14.41	0.20 \pm 0.02
Sleep deprivation	404.91 \pm 12.89*	0.65 \pm 0.02*
Sleep deprivation+butylphthalide intervention	296.81 \pm 5.19**	0.38 \pm 0.03**

* $P<0.05$ vs platform group; ** $P<0.05$ vs sleep deprivation group

2.2 丁苯酞对睡眠剥夺大鼠脑额叶SIRT1、RAGE表达的影响

Western blot检测提示,与大平台对照组比较,慢性睡眠剥夺组大鼠额叶SIRT1表达显著减少,而RAGE表达显著增加($P<0.05$,图2,表2);丁苯酞可逆转慢性睡眠剥夺引起的额叶SIRT1和RAGE表达的改变($P<0.05$,图2,表2)。

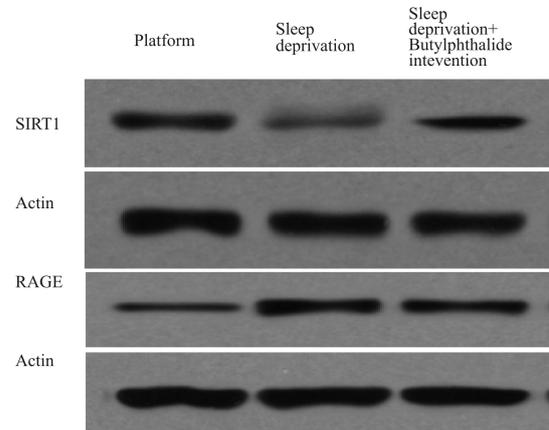


Fig. 2 The expressions of SIRT1 and RAGE in frontal lobe of rats three groups by Western blot

Tab. 2 Expressions of SIRT1 and RAGE in three groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	SIRT1	RAGE
Platform	0.54 \pm 0.03	0.22 \pm 0.01
Sleep deprivation	0.25 \pm 0.04*	0.63 \pm 0.03*
Sleep deprivation+butylphthalide intervention	0.49 \pm 0.02**	0.55 \pm 0.02**

* $P<0.05$ vs platform group; ** $P<0.05$ vs sleep deprivation group

2.3 丁苯酞对睡眠剥夺大鼠脑额叶NF- κ B p65表达的影响

NF- κ B p65在细胞质和细胞核均有表达,呈棕黄色。在大平台对照组,NF- κ B p65主要表达于神经细胞的细胞质,细胞核表达较少(图3A)。与大平台对照组比较,慢性睡眠剥夺组细胞核NF- κ B p65阳性细胞明显增多($P<0.05$,图3B,表3),细胞核染色增强,部分呈棕黑色表达;慢性睡眠剥夺+丁苯酞组细胞核NF- κ B p65阳性细胞较慢性睡眠剥夺组显著减少($P<0.05$,图3C,表3)。

Western blot 检测结果表明,与大平台对照组比较,慢性睡眠剥夺组大鼠额叶细胞核 NF-κB p65 表达显著增加;丁苯酞可抑制慢性睡眠剥夺引起的细胞核 NF-κB p65 表达增加 ($P < 0.05$, 图 3D, 表 3)。与大平台对照组比较,慢性睡眠剥夺组大鼠额叶细胞质 NF-κB p65 表达量显著减少 ($P < 0.05$, 图 3D, 表 3);慢性睡眠剥夺+丁苯酞组细胞质 NF-κB p65 表达量较慢性睡眠剥夺组增加,但差异无统计学意义。

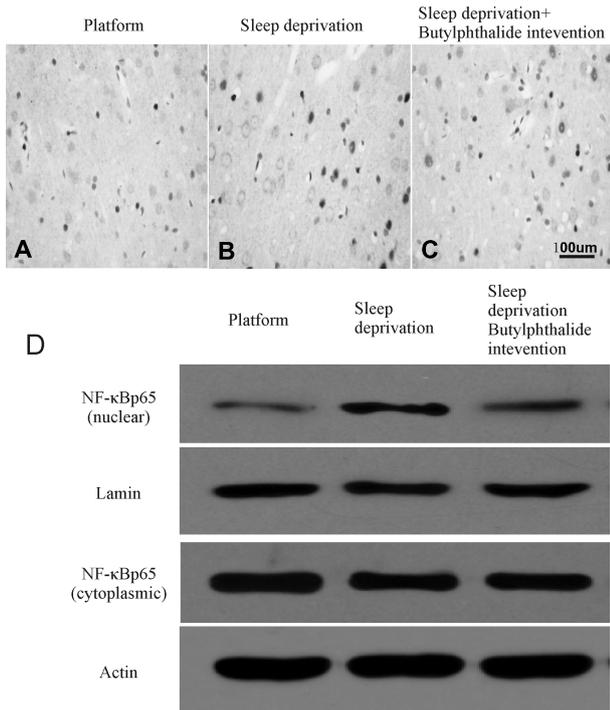


Fig. 3 The expressions of NF-κB p65 in frontal lobe of rats in three groups by immunohistochemistry (A-C) and Western blot (D)

3 讨论

本研究结果表明,慢性睡眠剥夺可导致大鼠额叶 HMGB1 表达的增加,而丁苯酞可减少该表达。HMGB1 是一种多功能蛋白,不仅可以结合 DNA 并促进转录,还可以作为细胞因子诱导早期炎症反应,并被认为是晚期炎症反应中心组成部分^[11]。HMGB1 的功能受其乙酰化水平调节,乙酰化 HMGB1 可从细胞核释放到细胞质及细胞外,与

RAGE 受体结合,激活 RAGE/NF-κB 信号通路,最终导致神经炎症^[4]。SIRT1 作为一种去乙酰化酶,广泛存在于机体的细胞核内,可以通过促进 HMGB1 的赖氨酸脱乙酰化来抑制 HMGB1 向细胞外的释放^[12, 13]。在本研究中,慢性睡眠剥夺使大鼠额叶 SIRT1 表达减少,可导致 HMGB1 脱乙酰化减少,促进乙酰化的 HMGB1 向细胞外释放,从而激活下游信号通路。已有研究表明,丁苯酞可上调慢性脑部低灌注时 SIRT1 的表达^[8],在本研究中,丁苯酞可抑制慢性睡眠剥夺所致的 SIRT1 表达减少,提示丁苯酞不仅可以减少慢性睡眠剥夺后的 HMGB1 表达,还通过上调慢性睡眠剥夺后的 SIRT1 表达,促进 HMGB1 去乙酰化,减少其释放。不仅如此,SIRT1 还参与各种与维持大脑生理功能相关的过程,包括氧化应激、神经元分化和神经生成^[14],在应激条件和神经损伤时发挥对脑的保护和修复作用,已被认为是神经退行性疾病的潜在的治疗靶点^[15]。据报道,慢性睡眠剥夺与阿尔茨海默病相关^[16],因此,丁苯酞抑制慢性睡眠剥夺所致的 SIRT1 减少,不仅可能减轻慢性睡眠剥夺后的脑部炎症反应,还可能对睡眠剥夺诱发的神经退行性变发挥干预作用。

RAGE 是一种跨膜蛋白,在巨噬细胞、单核细胞和神经细胞等多种细胞的膜上广泛表达。在正常生理情况下,RAGE 在细胞中的表达量较低,本实验中慢性睡眠剥夺可使 RAGE 表达上调,这与既往的研究结果一致^[16]。RAGE 与 HMGB1 的亲和力很高,两者结合后可激活多种通路,包括 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)、PI3K(磷脂酰肌醇 3 激酶)、Akt(蛋白激酶 B)和 ERK 通路的激活^[1],最终导致 NF-κB 活化。NF-κB 是细胞中重要的转录调节因子,通常以 p50-p65 异二聚体的形式存在。在静息的细胞中,NF-κB 与其抑制蛋白(inhibitor kappaB, IκB)形成复合物,以无活性形式存在于胞浆中。当细胞受细胞外信号刺激后,IκB 激酶复合物(IκB kinase, IKK)活化将 IκB 磷酸化,使 NF-κB 暴露核定位位点。游离的 NF-κB,即 p50-p65 异二聚体,迅速移位到细胞核,与特异性 κB 序列结合,诱导相关基因转录^[17]。NF-κB 的核移位后,出现大量炎症细胞因子的表达,

Tab. 3 Expressions of NF-κB p65 in three groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	Nuclear NF-κB p65 positive cells (number/per field)	Nuclear NF-κB p65	Cytoplasmic NF-κB p65
Platform	7.33±1.52	0.30±0.02	0.70±0.01
Sleep deprivation	18.67±2.08*	0.60±0.04*	0.48±0.01*
Sleep deprivation+ butylphthalide intervention	12.67±2.08**	0.49±0.02**	0.53±0.03*

* $P < 0.05$ vs platform group; ** $P < 0.05$ vs sleep deprivation group

以及炎症反应的级联扩增^[18-20]。在本实验中,也观察到慢性睡眠剥夺增加额叶神经细胞核中 NF- κ B p65 的表达,提示 NF- κ B 的核移位,可能是既往实验中观察到的神经炎症的原因^[7],而丁苯酞不仅减少睡眠剥夺所致的 RAGE 上调,而且抑制睡眠剥夺后 NF- κ Bp65 的核内转移。

综上所述,本研究结果表明,丁苯酞可通过抑制慢性睡眠剥夺后大鼠额叶 HMGB1 的表达增加并促进 HMGB1 去乙酰化,及减少睡眠剥夺后的 RAGE 表达上调,从而减少 NF- κ B p65 的核转移,抑制额叶 HMGB1/RAGE/NF- κ B 信号通路。HMGB1/RAGE/NF- κ B 信号通路在神经炎症中具有重要意义,并与多种神经退行性疾病相关,因此本研究可能为丁苯酞治疗慢性睡眠剥夺后脑部的神经病理改变提供依据。

【参考文献】

- [1] Kim SY, Son M, Lee SE, *et al.* High-mobility group Box 1-induced complement activation causes sterile inflammation[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 705-720.
- [2] Avgousti DC, Herrmann C, Kulej K, *et al.* A core viral protein binds host nucleosomes to sequester immune danger signals[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 173-177.
- [3] Okuma Y, Liu K, Wake H, *et al.* Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 85: 18-26.
- [4] Yang H, Wang H, Czura CJ, *et al.* The cytokine activity of HMGB1 [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1): 1-8.
- [5] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, *et al.* Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in icogenesis and can be targeted to reduce seizures [J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 413-419.
- [6] Kim JB, Choi JS, Yu YM, *et al.* HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(24): 6413-6421.
- [7] 王凌星, 洪姗燕, 杨美丽, 等. 丁苯酞对睡眠剥夺大鼠额叶小胶质细胞活化的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(2): 106-110.
- [8] Li M, Meng N, Guo X, *et al.* DL-3-n-butylphthalide promotes remyelination and suppresses inflammation by regulating AMPK/SIRT1 and STAT3/NF- κ B signaling in chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 137-151.
- [9] Youngblood BD, Zhou J, Smagin GN, *et al.* Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory[J]. *Physiol Behav*, 1997, 61(2): 249-256.
- [10] Zhao Y, Lee JH, Chen D, *et al.* DL-3-n-butylphthalide induced neuroprotection, regenerative repair, functional recovery and psychological benefits following traumatic brain injury in mice [J]. *Neurochem Int*, 2017, 111: 82-92.
- [11] Kwak MS, Kim HS, Lee B, *et al.* Immunological significance of HMGB1 post-translational modification and redox biology[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1189-1206.
- [12] Cai Y, Xu L, Xu H, *et al.* SIRT1 and neural cell fate determination [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 2815-2825.
- [13] Godoy JA, Zolezzi JM, Braidy N, *et al.* Role of Sirt1 during the ageing process: relevance to protection of synapses in the brain[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(3): 744-756.
- [14] Chang HM, Wu UI and Lan CT. Melatonin preserves longevity protein (sirtuin 1) expression in the hippocampus of total sleep-deprived rats[J]. *J Pineal Res*, 2009, 47(3): 211-220.
- [15] Paraiso AF, Mendes KL and Santos S. Brain activation of SIRT1: Role in neuropathology [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(3): 681-689.
- [16] Beiyu, Zhao, Peng, *et al.* Chronic sleep restriction induces A β accumulation by disrupting the balance of A β production and clearance in rats [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44: 859-873.
- [17] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 695-708.
- [18] Lv W, Chen N, Lin Y, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes breast cancer metastasis via activation of HMGB1/TLR4/NF kappa B axis [J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2): 245-255.
- [19] Wang Z, Wu L, You W, *et al.* Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway [J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(4): 399-408.
- [20] 姬瑞方, 卞学鹏, 刘蓓蓓, 等. 抗阻运动对胰岛素抵抗小鼠海马内焦亡相关蛋白的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5): 456-461.