

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.19.001

丹参酮 II A 对髓母细胞瘤的增殖 凋亡及自噬的影响*

项 荣, 邹 剑

(成都市第五人民医院药剂科 611130)

[摘要] **目的** 探究丹参酮 II A 对髓母细胞瘤 D341 细胞的增殖、凋亡及自噬的影响。**方法** 用不同浓度丹参酮 II A (0、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/L) 处理 D341 细胞, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测丹参酮 II A 对 D341 细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测丹参酮 II A 对 D341 细胞凋亡的影响; 透射电镜技术观察丹参酮 II A 对 D341 细胞自噬的影响; Western blot 技术检测 D341 细胞一抗兔抗人雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、一抗兔抗人微管蛋白 1 轻链 3-I/II (LC3-I/II) 和 Beclin1 蛋白表达变化。**结果** MTT 结果显示, 随着给药浓度的增加, 丹参酮 II A 对 D341 细胞增殖的抑制作用不断增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同一浓度下, 随着时间延长, D341 细胞增殖抑制率亦逐渐增加。流式细胞仪结果显示, 丹参酮 II A 可显著诱导 D341 细胞凋亡 ($P < 0.05$), 随着给药浓度的增加, D341 细胞凋亡率不断增加 ($P < 0.05$)。透射电镜结果显示, 对照组 D341 细胞膜完整, 染色质呈均匀分布; 5.0 mg/L 丹参酮 II A 处理 72 h 后发现, 细胞核染色质浓缩、边缘化, 一些细胞明显裂解。Western blot 结果显示, 随着丹参酮 II A 浓度的增加, D341 细胞中 mTOR 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p-mTOR 和 VEGF 水平逐渐降低 ($P < 0.05$), LC3-I 水平逐渐降低 ($P < 0.05$), LC3-II 水平逐渐升高 ($P < 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平逐渐升高 ($P < 0.05$)。**结论** 丹参酮 II A 可抑制髓母细胞瘤 D341 细胞增殖, 诱导 D341 细胞凋亡, 促进 D341 细胞自噬。

[关键词] 丹参酮; 髓母细胞瘤; 增殖; 凋亡; 自噬**[中图分类号]** R739.41**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)19-2525-04

Effect of tanshinone II A on proliferation, apoptosis and autophagy of medulloblastoma*

XIANG Rong, ZOU Jian

(Department of Pharmacy, Chengdu Municipal Fifth People's Hospital, Chengdu, Sichuan 611130, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of tanshinone II A on the proliferation, apoptosis and autophagy of medulloblastoma D341 cells. **Methods** D341 cells were treated with different concentrations of tanshinone II A (0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L). The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the effect of tanshinone II A on the proliferation of D341 cells; the effect of tanshinone II A on the apoptosis of D341 cells was detected by flow cytometry; the transmission electron microscopy was used to observe the influence of tanshinone II A on autophagy in D341 cells; the expressions of mTOR, p-mTOR, VEGF, LC3-I/II and Beclin1 protein in D341 cells were detected by Western blot. **Results** The MTT results showed that the inhibitory effect of tanshinone II A on the proliferation of D341 cells was continuously increased with the increase of the drug concentration, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); at the same concentration, the inhibition rate of D341 cell proliferation was increased with time elapse. The flow cytometry results showed that tanshinone II A could significantly induce apoptosis of D341 cells ($P < 0.05$), and the apoptosis rate of D341 cells was constantly increased with the increase of concentration ($P < 0.05$). The transmission electron microscopic results showed that the D341 cell membrane was intact and the chromatin was evenly distributed in the control group; after 5 mg/L tanshinone II A treatment for 72 h, the chromatin of the nucleus was concentrated and marginalized, and some of the cells were markedly cleaved. The Western blot results showed that with the increase of tanshinone II A concentration, the difference of mTOR level in D341 cells had no statistical difference ($P > 0.05$), the levels of p-mTOR and VEGF were decreased gradually ($P < 0.05$), the LC3-I level was decreased gradually ($P < 0.05$), LC3-II level increased gradually ($P < 0.05$), and the Beclin1 level was increased gradually ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone II A can inhibit the proliferation of medulloblastoma D341 cells, induces the apoptosis of D341 cells, and promotes the autophagy of D341 cells.

[Key words] tanshinone; medulloblastoma; proliferation; apoptosis; autophagy

髓母细胞瘤是儿童最为常见的颅内肿瘤,占儿童颅内肿瘤总数的 12%~25%,一般认为髓母细胞瘤起源于原始神经胚胎残余上皮细胞,恶性程度非常高,为 WHO 中枢神经系统 IV 级肿瘤^[1-2]。髓母细胞瘤侵袭、转移性很强,易通过脑脊液侵袭至软脑膜,手术切除后易复发,且对放化疗不敏感,预后极差,因此寻找治疗髓母细胞瘤的新药物尤为重要^[3]。丹参酮 II A 为中药丹参的重要活性成分,是由乙醇或乙醚从丹参根中提取出的樱红色针状结晶,临床主要用于心血管疾病的治疗^[4]。近年研究发现,丹参酮 II A 还具有抗肿瘤的功效,其对肺癌、肝癌、白血病、乳腺癌等各类肿瘤细胞均具有毒性作用,能够抑制癌细胞增殖,促进癌细胞分化、凋亡,抑制癌细胞侵袭、转移,其作用机制可能与 DNA 合成被抑制、原癌和凋亡基因表达异常等有关^[5-6]。丹参酮 II A 对髓母细胞瘤细胞增殖和凋亡的作用还少见报道。本研究旨在探究丹参酮 II A 对人髓母细胞瘤 D341 细胞增殖、凋亡及自噬的影响,并检测凋亡与自噬相关蛋白的表达变化,探讨丹参酮 II A 治疗髓母细胞瘤的潜在价值,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂与仪器

人 D341 细胞株购自北京协和医院细胞库;丹参酮 II A 磺酸钠注射液(规格:2 mL:10 mg,批准文号:国药准字 H31022558)购自上海第一生化药业有限公司;RPMI-1640 培养基、0.25%胰蛋白酶及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自成都艾特姆生物科技有限公司;四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒购自上海歌凡生物科技有限公司;一抗兔抗人雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多克隆抗体均购自 Bioworld 生物科技有限公司;一抗兔抗人微管蛋白 1 轻链 3-I/II(microtubule associated protein 1 light chain 3-I/II, LC3-I/II)、Beclin1 多克隆抗体及二抗辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司;透射电子显微镜购自日本 JEM-1011 公司;EP-ICSXL 流式细胞仪购自美国 Beckman Couhe 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将适量 D341 细胞置入含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素)中,并在 37℃、5% CO₂、湿度饱和的恒温箱中培养。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖

将 D341 细胞用培养基调整为 5×10^7 /L,按每孔 200 μ L 细胞悬液接种至 96 孔板中,培养 24 h 后加入丹参酮 II A,终浓度依次为 0、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/L,设置 6 个复孔,以不加丹参酮 II A 的孔作为空白对照;分别在培养 24、48、72 h 后,向每孔加入 20 μ L MTT 液[5 mg/mL,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解],在 37℃、5% CO₂ 恒温箱中

继续培养 4 h 后,小心弃去上清液,向每孔加入 150 μ L 二甲亚砜(DMSO),摇床振荡 10 min 充分溶解结晶;用酶标分析仪测定 450 nm 波长处各孔的吸光度(A)值,每组重复测定 3 次,求取均值。细胞增殖抑制率=(空白对照组 A_{450 nm} - 给药组 A_{450 nm})/空白对照组 A_{450 nm} × 100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 D341 细胞调整为 5×10^7 /L,按每孔 200 μ L 悬液接种至 96 孔板,培养 24 h 后加入丹参酮 II A,终浓度依次为 0、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/L,设置 6 个复孔;在培养 72 h 后,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 遍后,收集细胞;用 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞,接着加入 5 μ L Annexin V-FITC,混匀后避光孵育 15 min;用 EPICSXL 流式细胞仪采集数据,并用 Cell Quest 软件分析凋亡细胞百分率。

1.2.4 透射电镜观察细胞自噬

将培养的 D341 细胞分为空白对照组和 5.0 mg/L 丹参酮 II A;在培养 72 h 后,收集细胞;固定于含 2.5%戊二醛、2%多聚甲醛的 PBS 中 2 h 以上;0.1 mol/L PBS 洗涤;梯度乙醇脱水;丙酮包埋液包埋;先后置于 37、45、60℃烘箱中固化;以 50~60 nm 厚度超薄切片;最后在透射电镜下观察并拍照。

1.2.5 Western blot 检测细胞 mTOR、p-mTOR、VEGF、LC3-I/II 和 Beclin1 蛋白表达

将 D341 细胞调整为 5×10^7 /L,向 96 孔板每孔接种 200 μ L 悬液,待细胞贴壁生长后加入丹参酮 II A,终浓度依次为 0、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/L,设置 6 个复孔;在培养 72 h 后,向对应孔加入适量 PMSF 裂解液,常规提取细胞蛋白,用 BCA 法定量蛋白并调好浓度。每组取 50 μ g 蛋白样品与上样缓冲液混合,沸水浴使蛋白变性;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳;转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,置于含 5%脱脂奶粉 TBST 溶液避光封闭 1 h;TBST 漂洗后,将膜置于一抗稀释液(mTOR、p-mTOR、VEGF 均为 1:100,LC3-I/II 为 1:150,Beclin1 为 1:1000)中,4℃孵育过夜;次日早晨 TBST 漂洗后,置于二抗稀释液(1:5000)中,摇床室温孵育 1 h;TBST 漂洗后,发光液均匀加于膜上,5 min 后吸去多余溶液,置于暗盒中曝光、显影、定影。使用 GIS-2020 系统扫描并分析蛋白杂交条带。以 β -actin 为内参蛋白。

1.3 统计学处理

利用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,*t* 检验;计数资料用率描述,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

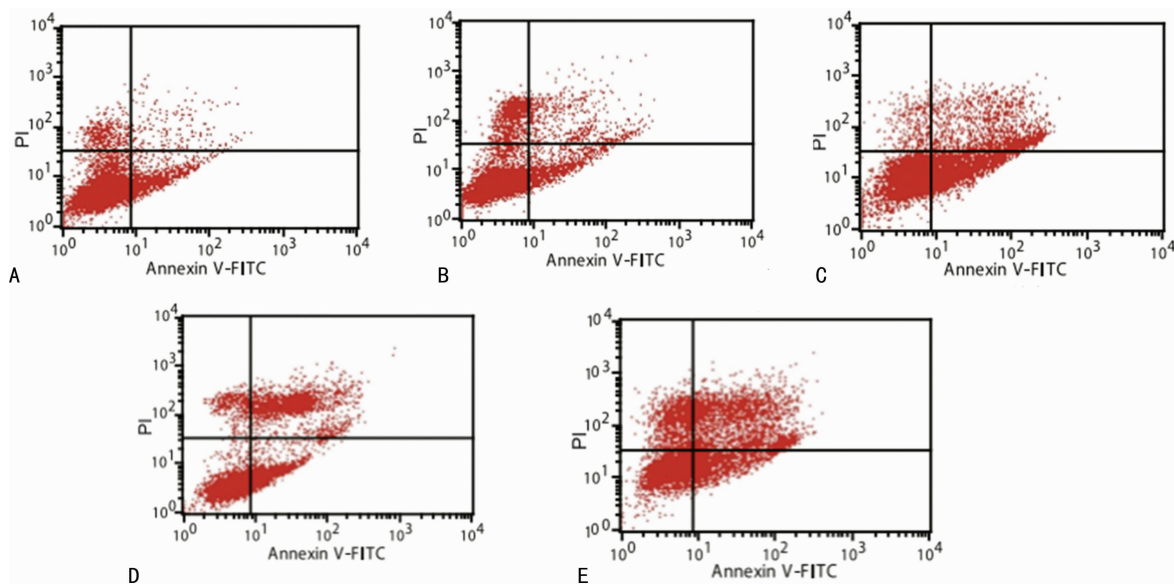
2 结果

2.1 丹参酮 II A 对 D341 细胞增殖的影响

MTT 结果显示,随着给药浓度的增加,丹参酮 II A 对 D341 存活的抑制作用不断增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);同一丹参酮 II A 浓度下,随着作用时间延长,D341 细胞增殖抑制率亦逐渐降低,见表 1。

2.2 丹参酮 II A 对 D341 细胞凋亡的影响

流式细胞仪结果显示,丹参酮 II A 可显著诱导 D341 细胞凋



A:0 mg/L 丹参酮 II A;B:0.5 mg/L 丹参酮 II A;C:1.0 mg/L 丹参酮 II A;D:2.0 mg/L 丹参酮 II A;E:5.0 mg/L 丹参酮 II A

图 1 丹参酮 II A 处理 D341 细胞 72 h 时流式细胞仪检测结果

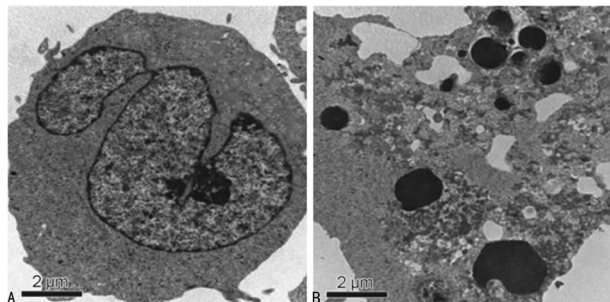
亡($P < 0.05$),随着给药浓度的增加,D341 细胞凋亡率不断增加($P < 0.05$),见图 1。

表 1 不同浓度丹参酮 II A 对 D341 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

| 丹参酮 II A (mg/L) | 24 h | 48 h | 72 h |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 95.86 ± 5.23 | 93.17 ± 4.72 | 91.46 ± 5.64 |
| 0.5 | 85.36 ± 1.97 ^a | 82.94 ± 2.38 ^a | 81.07 ± 3.22 ^a |
| 1.0 | 76.14 ± 2.48 ^a | 73.18 ± 3.05 ^a | 66.45 ± 4.29 ^a |
| 2.0 | 58.51 ± 2.24 ^a | 56.13 ± 2.16 ^a | 49.12 ± 3.07 ^a |
| 5.0 | 48.25 ± 1.35 ^a | 42.84 ± 2.13 ^a | 38.49 ± 4.06 ^a |

^a: $P < 0.05$,与丹参酮 II A 0 mg/L 比较

2.3 丹参酮 II A 对 D341 细胞自噬的影响 透射电镜结果显示,对照组 D341 细胞膜完整,染色质呈均匀分布;5.0 mg/L 丹参酮 II A 处理 72 h 时发现,细胞核染色质浓缩、边缘化,一些细胞明显裂解,细胞质中可见空泡结构,见图 2。



A:0 mg/L 丹参酮 II A;B:5.0 mg/L 丹参酮 II A

图 2 丹参酮 II A 处理 D341 细胞 72 h 时透射电镜检测结果

2.4 丹参酮 II A 对 D341 细胞 mTOR、p-mTOR、VEGF 表达的影响 Western blot 结果显示,随着丹参酮 II A 浓度的增加,D341 细胞中 mTOR 蛋白表达水平变化不明显($P > 0.05$),p-mTOR 和 VEGF 蛋白

表达水平逐渐降低($P < 0.05$),见图 3、表 2。

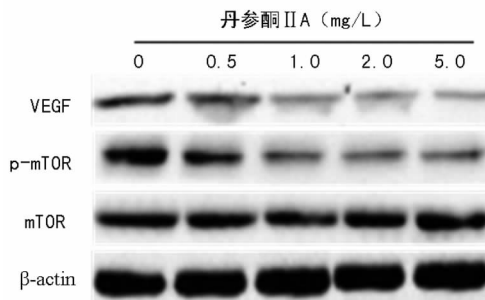


图 3 丹参酮 II A 对 D341 细胞中 mTOR、p-mTOR、VEGF 表达的影响

表 2 D341 细胞中 mTOR、p-mTOR、VEGF 蛋白相对表达灰度值($\bar{x} \pm s$)

| 丹参酮 II A(mg/L) | mTOR | p-mTOR | VEGF |
|----------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | 0.453 ± 0.038 | 0.608 ± 0.034 | 0.364 ± 0.024 |
| 0.5 | 0.396 ± 0.032 | 0.424 ± 0.028 ^a | 0.286 ± 0.020 ^a |
| 1.0 | 0.437 ± 0.045 | 0.217 ± 0.023 ^a | 0.183 ± 0.015 ^a |
| 2.0 | 0.472 ± 0.053 | 0.154 ± 0.017 ^a | 0.106 ± 0.012 ^a |
| 5.0 | 0.481 ± 0.047 | 0.121 ± 0.009 ^a | 0.064 ± 0.008 ^a |

^a: $P < 0.05$,与丹参酮 II A 0 mg/L 比较;以 β -actin 作为内参基因

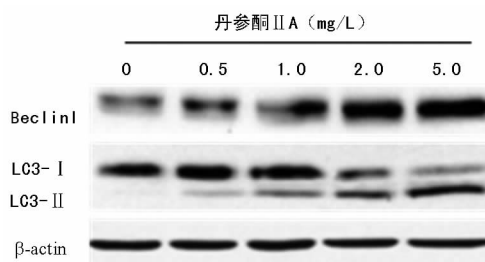


图 4 丹参酮 II A 对 D341 细胞中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3- I / II 表达的影响

2.5 丹参酮 II A 对 D341 细胞 LC3- I / II、Beclin1 表达的影响 Western blot 结果显示,随着丹参酮 II A

浓度的增加, D341 细胞中 LC3-I 蛋白表达水平逐渐降低($P < 0.05$), LC3-II 蛋白表达水平逐渐升高($P < 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平逐渐升高($P < 0.05$)。见图 4、表 3。

表 3 D341 细胞中 LC3-I/II、Beclin1 蛋白相对表达灰度值($\bar{x} \pm s$)

| 丹参酮 II A(mg/L) | LC3-I | LC3-II | Beclin1 |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 0.826 \pm 0.037 | 0.043 \pm 0.007 | 0.266 \pm 0.022 |
| 0.5 | 0.755 \pm 0.034 ^a | 0.120 \pm 0.014 ^a | 0.372 \pm 0.026 ^a |
| 1.0 | 0.679 \pm 0.041 ^a | 0.198 \pm 0.025 ^a | 0.493 \pm 0.024 ^a |
| 2.0 | 0.345 \pm 0.025 ^a | 0.387 \pm 0.032 ^a | 0.676 \pm 0.038 ^a |
| 5.0 | 0.186 \pm 0.017 ^a | 0.614 \pm 0.046 ^a | 0.869 \pm 0.045 ^a |

^a: $P < 0.05$, 与丹参酮 II A 0 mg/L 比较; 以 β -actin 作为内参基因

3 讨 论

丹参酮 II A 是从中药丹参中提取出的脂溶性物质, 可抵抗多类肿瘤细胞, 近年该药物的抗癌机制研究成为基础医学领域的研究热点。丹参酮 II A 能够从多方面发挥抑瘤作用: 阻滞肿瘤细胞周期, 抑制肿瘤细胞增殖、转移、侵袭, 诱导肿瘤细胞分化、凋亡, 降低肿瘤细胞黏性, 以及诱导肿瘤细胞自噬, 但其具体调控机制还需深入研究^[7-9]。

本研究结果显示, 随着给药浓度的增加, 丹参酮 II A 对 D341 细胞增殖、凋亡的抑制作用不断增强, 而且同一浓度下, 随着时间延长, D341 细胞增殖、凋亡抑制率亦逐渐增加, 说明丹参酮 II A 可抑制 D341 细胞增殖、诱导 D341 细胞凋亡。mTOR 是最初从酵母中发现的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 随后发现其在哺乳动物中也广泛存在, 有助于细胞检测周围营养物质而调控细胞的增殖、生长和代谢。在人体内, mTOR 作为分子传感器, 使细胞对正常或极端的内环境做出正确应答^[10-12]。有关研究发现, mTOR 信号通路主要调控细胞周期 G₁ 期相关蛋白的合成, 与多类恶性肿瘤的生长、增殖、分化、凋亡等关系密切, 起着重要的调控作用, mTOR 被过度磷酸化激活后可导致癌症发生, 故抑制 mTOR 通路能阻滞细胞周期进展, 从而促进细胞凋亡^[13-14]。本研究 Western blot 结果显示, 随着丹参酮 II A 浓度的增加, D341 细胞中 mTOR 蛋白表达水平变化不明显, mTOR 蛋白的磷酸化水平逐渐降低, 说明丹参酮 II A 对 mTOR 蛋白表达无明显作用, 但可抑制 mTOR 蛋白的磷酸化。肿瘤血管不断新生是肿瘤生长、迁移的关键, VEGF 为很常见的血管生长促进因子^[15-16]。本研究发现, 随着丹参酮 II A 浓度的增加, D341 细胞中 VEGF 蛋白表达水平逐渐降低, 说明丹参酮 II A 可能通过抑制 VEGF 相关通路而促进 D341 细胞凋亡。

自噬能消化构型异常的蛋白质、多余或受损的细胞器为细胞提供养分与能量, 是真核细胞特有的保护机制^[17]。大量研究表明, 自噬与肿瘤、感染、神经退化、炎症等疾病的发生、发展过程有关^[18]。本研究透射电镜结果显示, 对照组 D341 细胞膜完整, 染色质呈

均匀分布; 5.0 mg/L 丹参酮 II A 处理 72 h 时发现, 细胞核染色质浓缩、边缘化, 一些细胞明显裂解, 说明丹参酮 II A 可促进 D341 细胞自噬。自噬相关蛋白 LC3 在进化过程中高度保守, 为自噬体产生的标志, 可特定地反映出胞内自噬体的多少。LC3 包括 I 型与 II 型, LC3-I 定位在细胞质内, 其可与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3-II。LC3-II 定位在自噬体膜的表面, 参与自噬体的形成, 常被用于衡量细胞自噬的程度^[19]。Beclin1 是首先被发现促进肿瘤细胞自噬的因子, 在各类恶性肿瘤中 Beclin1 蛋白表达较正常组织下调, 其杂合子的异常缺失也可能为肿瘤恶化的一个重要原因^[20-21]。Western blot 结果显示, 随着丹参酮 II A 浓度的增加, D341 细胞中 LC3-I 蛋白表达水平逐渐降低, LC3-II 蛋白表达水平逐渐升高, Beclin1 蛋白表达水平逐渐升高, 说明丹参酮 II A 可能通过上调 LC3-II、Beclin1 表达和下调 LC3-I 表达来促进 D341 细胞自噬。

综上所述, 本研究发现丹参酮 II A 可抑制髓母细胞瘤 D341 细胞增殖, 诱导 D341 细胞凋亡, 促进 D341 细胞自噬, 且可能与 p-mTOR、VEGF、LC3-I 表达下调及 LC3-II、Beclin1 表达上调有关。然而肿瘤发生、发展的相关影响因素很多, 机制复杂, 丹参酮 II A 对 D341 细胞的抑制作用还需继续深入地探究。

参考文献

- [1] 马磊, 陈维英, 施又丹, 等. 原花青素对髓母细胞瘤 Daoy 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(7): 929-933.
- [2] 侯欣怡, 马丁, 高培毅. 儿童髓母细胞瘤的影像学表现[J]. 放射学实践, 2015, 30(6): 670-672.
- [3] 林瑜亮, 孙红军, 荔志云. 不同联合化疗方式对儿童髓母细胞瘤疗效的系统评价[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43(1): 1-7.
- [4] 祖晓麟, 郭焕伟, 王晓舟, 等. 丹参酮 II A-磺酸钠注射液对心脏 X 综合征患者炎症因子和血管内皮功能的影响[J]. 中国医药导刊, 2012, 14(8): 1388-1389.
- [5] 刘丽璇, 吴灵飞, 邓巍, 等. 丹参酮 II A 对低氧条件下人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及与 HIF-1 α 、VEGF 和野生型 P53 蛋白表达的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(12): 2155-2160.
- [6] 李筱筱, 武雪玲, 贾世亮, 等. 丹参酮 II A 药理作用的研究进展[J]. 生物学杂志, 2016, 33(6): 91-94.
- [7] 王晓露, 解方为, 陈曦, 等. 丹参酮 II A 对大鼠移植性肝癌的抑制作用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(11): 2062-2064.
- [8] 惠文涛, 马小斌, 咎瑛, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对乳腺癌细胞株的作用及其机制研究[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(7): 781-784.
- [9] 赵丕文, 臧金凤, 陶仕英, 等. 丹参酮 II A 抗乳腺癌 T47 D 细胞增殖的 GPER 途径研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(10): 1458-1462.
- [10] CHIARINI F, EVANGELISTI C, MCCUBREY J A, et al. Current treatment strategies for inhibiting(下转第 2533 页)

纵向的研究,同时能针对不同部位造成的认知损害特点进一步研究,为临床提供更多的临床价值。

参考文献

- [1] ADACHI T, KOBAYASHI S, YAMAGUCHI S, et al. MRI findings of small subcortical "lacunar-like" infarction resulting from large vessel disease[J]. *J Neurol*, 2000, 247(4):280-285.
- [2] WEN L, FENG J, ZHENG D. Heterogeneity of single small subcortical infarction can be reflected in lesion location[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(7):1109-1116.
- [3] ROCKWOOD K, WENTZEL C, HACHINSKI V, et al. Prevalence and outcomes of vascular cognitive impairment. Vascular Cognitive Impairment Investigators of the Canadian Study of Health and Aging [J]. *Neurology*, 2000, 54(2):447-451.
- [4] BROOKMEYER R, JOHNSON E, ZIEGLER-GRAHAM K, et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2007, 3(3):186-191.
- [5] DI CARLO A, LAMASSA M, BALDERESCHI M, et al. CIND and MCI in the Italian elderly: frequency, vascular risk factors, progression to dementia. [J]. *Neurology*, 2007, 68(22):1909-1916.
- [6] GORELICK P B, COUNTS S E, NYENHUIS D. Vascular cognitive impairment and dementia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(5):860-868.
- [7] SMITH E E. Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(11):1059-1068.
- [8] GANDY S, BARTFAI T, LEES G V, et al. Midlife interventions are critical in prevention, delay, or improvement of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment and dementia [J]. *F1000Res*, 2017(6):413.
- [9] KIM S H, PARK J S, AHN H J, et al. Voxel-based analysis of diffusion tensor imaging in patients with subcortical vascular cognitive impairment: correlates with cognitive and motor deficits [J]. *J Neuroimaging*, 2011, 21(4):317-324.
- [10] LIU Q, ZHU Z, TEIPEL S J, et al. White Matter Damage in the Cholinergic System Contributes to Cognitive Impairment in Subcortical Vascular Cognitive Impairment, No Dementia [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017(9):47.
- [11] 曾瑞, 李春芳, 刘蕾, 等. 急性缺血性卒中患者血管性认知障碍及其亚型的相关因素分析 [J]. *中国卒中杂志*, 2016, 11(4):255-261.
- [12] GOLD B T, ZHU Z, BROWN C A, et al. White matter integrity is associated with cerebrospinal fluid markers of Alzheimer's disease in normal adults [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(10):2263-2271.
- [13] ATRI A. Imaging of neurodegenerative cognitive and behavioral disorders: practical considerations for dementia clinical practice [J]. *Handb Clin Neurol*, 2016(136):971-984.
- [14] ZHANG Y, SCHUFF N, JAHNG G H, et al. Diffusion tensor imaging of cingulum fibers in mild cognitive impairment and Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2007, 68(1):13-19.
- [15] 孙璇. 轻度脑白质病变结构和功能的损伤与认知功能的相关性研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2014.
- [16] MASCALCHI M, GINESTRONI A, TOSCHI N, et al. The burden of microstructural damage modulates cortical activation in elderly subjects with MCI and leuko-araiosis. A DTI and fMRI study [J]. *Hum Brain Mapp*, 2014, 35(3):819-830.
- [17] WILLIAMSON J B, NYENHUIS D L, PEDELTY L, et al. Baseline differences between vascular cognitive impairment no dementia reverts and non-reverts [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008, 79(11):1208-1214.

(收稿日期:2017-11-20 修回日期:2018-01-23)

(上接第 2528 页)

- mTOR in cancer [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(2):124-135.
- [11] MAIESE K. Targeting molecules to medicine with mTOR, autophagy and neurodegenerative disorders [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 82(5):1245-1266.
- [12] 丁亦含, 李玉峰. mTOR 信号通路自噬, 凋亡之间的相互关系 [J]. *现代医学*, 2015, 43(6):801-804.
- [13] AYLETT C H, SAUER E, IMSENG S, et al. Architecture of human mTOR complex 1 [J]. *Science*, 2016, 351(6268):48-52.
- [14] 陆建国, 俞松. mTOR 信号通路自噬与肿瘤研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(2):199-202.
- [15] ZHAO D, PAN C, SUN J, et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to up-regulate Myc and Sox2 [J]. *Oncogene*, 2015, 34(24):3107-3119.
- [16] LAPEYRE-PROST A, TERME M, PERNOT S, et al. Immunomodulatory activity of VEGF in cancer [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 330(1):295-342.
- [17] MARINO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H. Self-consumption; the interplay of autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2):81-94.
- [18] 李乐兴, 戴汉川. 细胞自噬调控的分子机制研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(2):263-270.
- [19] HUANG R, XU YF, WAN W, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation [J]. *Mol Cell*, 2015, 57(3):456-466.
- [20] 王丽华, 张競, 王亮亮, 等. Beclin 1, LC3-II 及 P62 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及意义 [J]. *中华解剖与临床杂志*, 2014, 19(1):58-61.
- [21] ROHATGI R A, SHAW L M. An autophagy-independent function for Beclin 1 in cancer [J]. *Mol Cell Oncol*, 2016, 3(1):e1030539.

(收稿日期:2017-11-22 修回日期:2018-01-25)