

## 神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001468

# 自噬相关基因 Atg12 和 LC3-Ⅱ 在脑缺血再灌注 大脑表达的实验研究

杜晓薇<sup>1</sup>, 韩瑞祎<sup>1</sup>, 闵鹤鸣<sup>2</sup>, 李丹丹<sup>2</sup>, 肖学进<sup>2</sup>, 包翠芬<sup>3</sup>, 包翠芳<sup>4</sup>

(锦州医科大学 1. 基础医学院; 2. 细胞生物学教研室; 3. 基础医学实验教学中心; 4. 锦州市中心医院神经内科, 锦州 121000)

**【摘要】目的:**探讨局灶性脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIR)时大脑皮质自噬相关蛋白-12(autophagy related protein-12, Atg12)和自噬微管相关蛋白轻链 3 抗体 Ⅱ (autophagy microtubule-associated protein light chain 3 antibody Ⅱ, LC3-Ⅱ)的激活规律,在此基础上探讨其对脑组织自噬的影响。**方法:**实验分为假手术组(sham 组)和缺血再灌注组(CIR 组),且 CIR 组下设 CIR 0、6、12、24、48、72h 共 6 个亚组。除 sham 组和 CIR 24h 组为每组 20 只外(其中 10 只用于模型鉴定),其余为每组 10 只。采用大脑中动脉栓塞术制备局灶性脑缺血再灌注模型,再灌注 24 h 后采用神经功能评分、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色、脑组织含水量来鉴定脑缺血模型是否成功。采用免疫组化和免疫印迹方法检测大脑皮质 Atg12 和 LC3-Ⅱ 的表达规律。**结果:**与 sham 组比较, CIR 24h 组可见明显的神经功能缺损、脑梗死和明显的脑水肿。免疫组化结果显示, Atg12 和 LC3-Ⅱ 在大鼠脑缺血再灌注 6 h 开始表达[阳性率分别为(15.49 ± 4.18)%、(18.54 ± 3.62)%],在 24~48 h 达高峰[(33.63 ± 3.26)%、(29.62 ± 1.73)%], 72 h 之后逐渐减弱[(24.90 ± 3.96)%、(20.36 ± 3.51)%]。免疫印迹结果显示, Atg12 和 LC3-Ⅱ 在大鼠脑缺血再灌注 6 h 开始表达[表达量为(0.372 3 ± 0.076 5)、(0.148 4 ± 0.011 5)],在 24~48 h 达高峰[(0.741 7 ± 0.071 8)、(0.451 3 ± 0.019 0)], 72 h 之后逐渐减弱[(0.365 0 ± 0.042 0)、(0.245 1 ± 0.030 3)]。**结论:**脑缺血时 Atg12 和 LC3-Ⅱ 在调节脑缺血的脑组织自噬方式中具有重要的作用。

**【关键词】**自噬; 脑缺血再灌注; 自噬相关蛋白-12; 自噬微管相关蛋白轻链 3 抗体 Ⅱ**【中图分类号】**R320.54**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-10-20

## Expression of Atg12 and LC3-Ⅱ in the cerebral cortex during focal cerebral ischemia-reperfusion injury

Du Xiaowei<sup>1</sup>, Han Ruiyi<sup>1</sup>, Min Heming<sup>2</sup>, Li Dandan<sup>2</sup>, Xiao Xuejin<sup>2</sup>, Bao Cuifen<sup>3</sup>, Bao Cuifang<sup>4</sup>

(1. Basic Medical College, Jinzhou Medical University; 2. Department of Cell Biology, Jinzhou Medical University; 3. Experimental Teaching Center of Basic Medicine, Jinzhou Medical University; 4. Department of Neurology, Jinzhou Central Hospital)

**【Abstract】Objective:** To investigate the activation law of autophagy related protein-12(Atg12) and autophagy microtubule-associated protein light chain 3 antibody Ⅱ (LC3-Ⅱ) in the cerebral cortex during focal cerebral ischemia-reperfusion injury(CIR), and to further explore its influence on brain autophagy on this basis. **Methods:** The rats were divided into sham operation group (sham group) and ischemia reperfusion group(CIR group), and the CIR group was subdivided into six subgroups: CIR 0, 6, 12, 24, 48h and 72 h. Except that sham group and CIR 24h group had 20 rats in each group (10 were used for model identification), there were 10 rats in

other groups, respectively. Focal CIR model was established by middle cerebral artery occlusion. CIR model was identified by neurological score, 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, and brain water content 24 h later. The expression pattern of Atg12 and LC3-Ⅱ in cerebral cortex was detected by immunohistochemistry methods and Western blot techniques. **Results:** Compared with sham group, there were obvious neurological deficit symptoms, cerebral infarction and cerebral edema in CIR 24h group. The results of immunohistochemistry showed that the positive rates of Atg12 and LC3-Ⅱ appeared in rat

**作者介绍:**杜晓薇, Email: 1807728487@qq.com,

研究方向: 脑缺血疾病基础研究

**通信作者:**包翠芬, Email: 736466881@qq.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号: 81774116); 辽宁省科技厅资助项目(编号: 2015020696, 20170540378); 辽宁省教育厅一般资助项目(编号: L2015324); 辽宁省 2015 年国家级大学生创新创业训练计划资助项目(编号: 201510160000003)。

**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.0950.002.html>  
(2018-01-09)

CIR 6 h [(15.49 ± 4.18)%, (18.54 ± 3.62)%], and peaked at 24 to 48 h [(33.63 ± 3.26)%, (29.62 ± 1.73)%], then the expression gradually decreased 72 h later [(24.90 ± 3.96)%, (20.36 ± 3.51)%]. The results of Western blot showed that the expression of Atg12 and LC3-II appeared in rat CIR 6 h [(0.372 3 ± 0.076 5), (0.148 4 ± 0.011 5)], and peaked at 24 to 48 h [(0.741 7 ± 0.071 8), (0.451 3 ± 0.019 0)], then the expression gradually decreased 72 h later [(0.365 0 ± 0.042 0), (0.245 1 ± 0.030 3)]. **Conclusion:** The expression of Atg12 and LC3-II plays an important role in the regulation of brain autophagy during the CIR.

【Key words】autophagy; cerebral ischemia-reperfusion; autophagy related protein-12; autophagy microtubule-associated protein light chain 3 antibody II

缺血性脑血管疾病,是由于各种原因导致的脑组织血液供应障碍,引起脑组织缺血(氧)性病变,表现为猝然昏倒、口眼歪斜、言语不利、半身不遂等神经功能缺失症状,严重危害人类健康,影响生活质量<sup>[1]</sup>。目前,针对该病的治疗原则主要是活血化瘀、疏通血管。但是在血管疏通后部分患者反而出现更为严重的症状——脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIR)<sup>[2]</sup>。最新研究显示, CIR 时存在细胞自噬现象,但机制不清<sup>[3-4]</sup>。探讨 CIR 过程中自噬的调控机制,对于今后临床干预措施的提出有着重要的理论意义。本课题拟探讨局灶性 CIR 损伤大鼠自噬相关基因自噬相关蛋白-12 (autophagy related protein-12, Atg12)、自噬微管相关蛋白轻链 3 抗体 II (autophagy microtubule-associated protein light chain 3 antibody II, LC3-II) 的表达情况,以进一步阐明 CIR 中自噬的调控机制,为 CIR 的防治提供可靠的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体质量(250 ± 50) g [北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证:SCXK(京)2012-0001]; 兔抗鼠 Atg12、LC3-II 单克隆抗体(Cell Signalling 公司); Marker、PVDF 膜(碧云天公司); 二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 实验分为假手术组(sham 组)和缺血再灌注组(CIR 组),且 CIR 组下设 CIR 0h 组、6h 组、12h 组、24h 组、48h 组、72h 组共 6 个亚组。除 sham 组和 CIR 24h 组为每组 20 只外(其中 10 只用于模型鉴定),其余为每组 10 只。

1.2.2 模型制备及鉴定 CIR 组采用 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠后,沿颈部旁正中 3 cm 切口。麻醉后采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlud-

ing, MCAO)制备局灶性脑缺血模型。于线栓 2 h 后缓慢将插线拔出颅外,制成再灌注模型。sham 组操作步骤除不插入线栓外其余均同 CIR 组。大鼠苏醒后采用 Zea Longa 的 5 分制方法进行神经功能缺损鉴定<sup>[5]</sup>; 于 CIR 24 h 后采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC)来进行脑梗死染色,利用 Image-J 图像分析软件测量梗死区占同侧大脑半球的百分比;采用干湿重法检测脑组织含水量。

1.2.3 形态学指标检测 ①光镜标本的制备:各组大鼠麻醉后采用 4%多聚甲醛固定液行全身灌注固定后,取出完整大脑后留取视交叉后部脑组织继续固定 24 h 左右。常规制备成石蜡标本,切片厚度 5 μm。②焦油紫染色:取上述制成的石蜡切片,经 1%焦油紫染液染色 30 min 后,置于 80%乙醇脱水,60 °C 恒温箱内烘干 10 min,二甲苯透明,中性树胶封片后,光学显微镜下观察脑组织内神经元的形态变化及计数每个视野下正常神经元数量。③免疫组化检测及图像分析:取上述已制备切片经常规脱蜡至水,采用微波修复以恢复抗原活性。将切片浸泡于 3%过氧化氢液中 10 min 左右以去除内源性过氧化物酶;滴加 1:200 稀释的兔抗大鼠 Atg 12 抗体,4 °C 孵育过夜;然后滴加辣根过氧化物酶标记的抗兔多聚体,37 °C 孵育 30 min;DAB 显色,苏木精染液复染,中性树胶封片。同时采用 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)替代一抗作为阴性对照。LC3-II 的染色方法同上。采用细胞图像分析仪分析每高倍视野下 Atg 12 和 LC3-II 的阳性率。

1.2.4 免疫印迹检测及分析 各组大鼠麻醉后迅速断头取出大脑皮质,匀浆。二喹啉甲酸法测定蛋白质含量后将样品制备成贮备液。常规免疫印迹检测,上样,电泳,转膜,转印。5%脱脂奶粉室温封闭 1~2 h 后。滴加一抗(兔抗鼠 Atg 12, 稀释度为 1:1 000)4 °C 孵育过夜, TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min;辣根酶标记的羊抗兔 IgG 抗体室温下继续孵育 1 h 左右,含吐温 20 的 Tris-盐酸缓冲液(tris buffered saline with Tween-20, TBST)缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min;采用 ECL 发光显色。内参采用 β-actin 代替一抗。LC3-II 的方法同上。显色后采用图像分析软件分析各蛋白质电泳目的条带的吸光度。根据目的条带与内参条带吸光度的比值比较各组样本蛋白质含量的高低。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件分析,所有数据均用均数 ± 标准差

( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间样本比较采用  $t$  检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD- $t$  法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

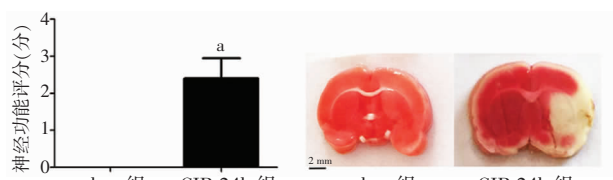
### 2.1 模型鉴定结果

与 sham 组比较,CIR 24 h 组可见明显的神经功能缺损症状,脑梗死染色(TTC 染色)可见明显的脑梗死现象,脑组织含水量显示明显的脑水肿,此结果提示脑缺血再灌注模型的成功制备(表 1,图 1)。

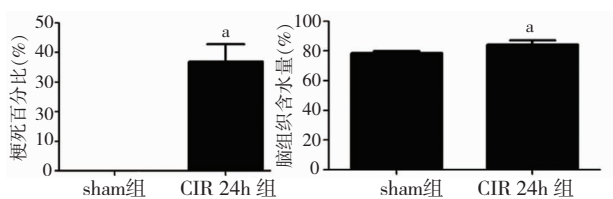
表 1 大鼠神经功能评分、TTC 染色、脑组织含水量比较( $n=5$ )

Tab.1 Comparison of rat neurological score, TTC staining, brain tissue water content( $n=5$ )

| 组别        | 神经功能评分          | TTC 染色百分比 (%)    | 脑组织含水量 (%)       |
|-----------|-----------------|------------------|------------------|
| sham 组    | 0.00 $\pm$ 0.00 | 0.00 $\pm$ 0.00  | 78.56 $\pm$ 1.30 |
| CIR 24h 组 | 2.40 $\pm$ 0.55 | 36.97 $\pm$ 5.82 | 84.36 $\pm$ 2.78 |
| $t$ 值     | -9.798          | -14.211          | -4.225           |
| $P$ 值     | 0.000           | 0.000            | 0.003            |



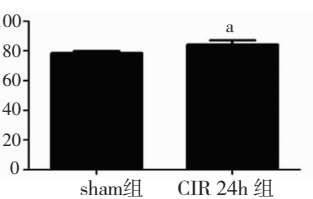
a: 与 sham 组比较,  $P < 0.05$   
A. 神经功能评分柱状图



a: 与 sham 组比较,  $P < 0.05$   
C. 脑梗死体积柱状图



B. 脑梗死染色图



a: 与 sham 组比较,  $P < 0.05$   
D. 脑组织含水量柱状图

图 1 大鼠神经功能评分、TTC 染色、脑组织含水量

Fig.1 Rat neurological score, TTC staining, brain tissue water content

### 2.2 焦油紫染色结果

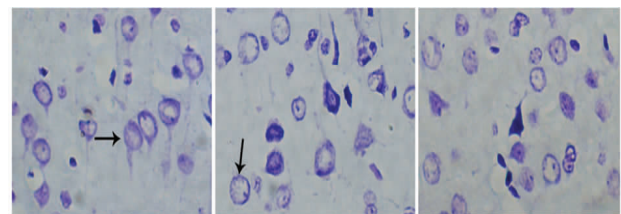
焦油紫染色可见假手术组右侧大脑皮质细胞排列规律,细胞质中可见染成蓝紫色的尼氏体,分布均匀,着色较浅,为正常神经元形态;CIR 0h 组细胞排列较规律,正常神经元数量减少,可见少量细胞呈三角形,着色较深;随着再灌注时间的延长,正常细胞数量明显减少,细胞排列紊乱,结构不清(表 2,图 2)。

表 2 大脑皮质神经元计数、Atg12、LC3-Ⅱ 表达阳性率( $n=10$ )

Tab.2 The positive rate of Atg12 and LC3-Ⅱ in the cerebral cortex neurons( $n=10$ )

| 组别        | 神经元计数                              | Atg12 阳性率                         | LC3-Ⅱ 阳性率                         |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| sham 组    | 71.00 $\pm$ 3.53 <sup>bcdefg</sup> | 6.61 $\pm$ 2.01 <sup>abefg</sup>  | 7.37 $\pm$ 3.21 <sup>cdhfg</sup>  |
| CIR 0h 组  | 59.60 $\pm$ 7.99 <sup>acdefg</sup> | 6.68 $\pm$ 2.08 <sup>cdhfg</sup>  | 7.38 $\pm$ 2.72 <sup>cdhfg</sup>  |
| CIR 6h 组  | 53.40 $\pm$ 7.90 <sup>abdef</sup>  | 15.49 $\pm$ 4.18 <sup>abefg</sup> | 18.54 $\pm$ 3.62 <sup>abef</sup>  |
| CIR 12h 组 | 49.80 $\pm$ 4.02 <sup>abefg</sup>  | 20.15 $\pm$ 3.11 <sup>abefg</sup> | 19.69 $\pm$ 4.18 <sup>abef</sup>  |
| CIR 24h 组 | 44.00 $\pm$ 6.16 <sup>abcd</sup>   | 33.63 $\pm$ 3.26 <sup>abefg</sup> | 29.62 $\pm$ 1.73 <sup>abefg</sup> |
| CIR 48h 组 | 42.20 $\pm$ 5.25 <sup>abcd</sup>   | 29.03 $\pm$ 3.06 <sup>abefg</sup> | 24.82 $\pm$ 2.61 <sup>abefg</sup> |
| CIR 72h 组 | 43.70 $\pm$ 5.14 <sup>abcd</sup>   | 24.90 $\pm$ 3.96 <sup>abefg</sup> | 20.36 $\pm$ 3.51 <sup>abef</sup>  |
| $F$ 值     | 30.926                             | 109.202                           | 68.932                            |
| $P$ 值     | 0.000                              | 0.000                             | 0.000                             |

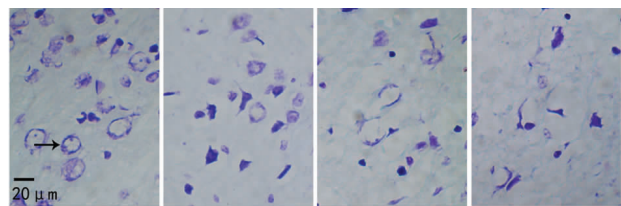
注:与 sham 组比较, a:  $P < 0.05$ ; 与 CIR 0h 组比较, b:  $P < 0.05$ ; 与 CIR 6h 组比较, c:  $P < 0.05$ ; 与 CIR 12h 组比较, d:  $P < 0.05$ ; 与 CIR 24h 组比较, e:  $P < 0.05$ ; 与 CIR 48h 组比较, f:  $P < 0.05$ ; 与 CIR 72h 组比较, g:  $P < 0.05$



A. sham 组

B. CIR 0h 组

C. CIR 6h 组



D. CIR 12h 组

E. CIR 24h 组

F. CIR 48h 组

G. CIR 72h 组

箭头所示为正常神经元

图 2 大脑皮质的神经元的形态学观察

Fig.2 Morphological observation of neurons in the cerebral cortex

### 2.3 免疫组化结果

sham 组偶见阳性表达细胞;CIR 6h 组可见少量的 Atg12、LC3-Ⅱ 阳性表达细胞,随着再灌注时间的延长,阳性表达细胞逐渐增多,待 CIR 24~48 h 时表达细胞数量最多,而 CIR 72 h 之后阳性细胞数量明显减少(图 3,图 4)。

### 2.4 免疫印迹结果

sham 组可见微弱的阳性表达条带;CIR 6h 组可见较弱的 Atg12 阳性表达条带,随着再灌注时间的延长,阳性表达条带逐渐增强,待 CIR 24~48 h 时表达条带最强,而 CIR 72 h 之后阳性表达条带逐渐减弱;LC3-Ⅱ 也呈现同样的表达趋势(表 3,图 5)。

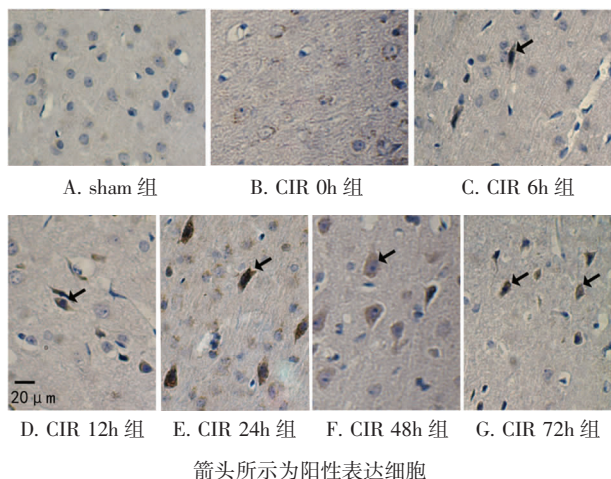


图 3 Atg12 在大鼠大脑皮质的表达

Fig.3 Expression of Atg12 in the rat cerebral cortex

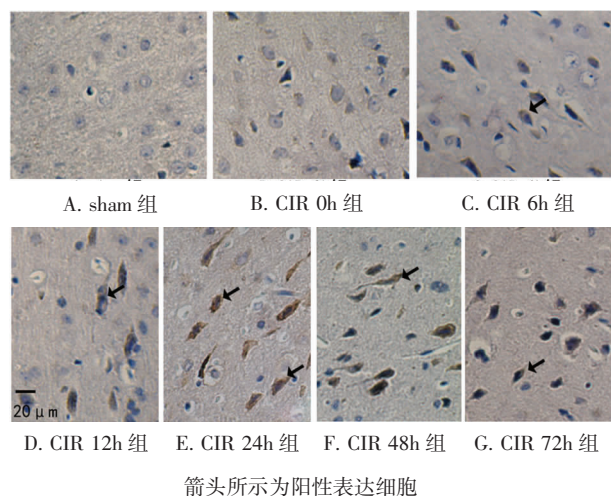


图 4 LC3-II 在大鼠大脑皮质的表达

Fig.4 Expression of LC3-II in the rat cerebral cortex

表 3 各组大鼠大脑皮质 Atg12、LC3-II 表达量比较(n=3)

Tab.3 Comparison of expression levels of Atg12 and LC3-II in cerebral cortex of each group(n=3)

| 组别        | Atg12/β-actin OD 值                 | LC3-II/β-actin OD 值                |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|
| sham组     | 0.241 8 ± 0.029 6 <sup>abefg</sup> | 0.095 8 ± 0.022 8 <sup>abefg</sup> |
| CIR 0h 组  | 0.246 9 ± 0.039 9 <sup>abef</sup>  | 0.130 2 ± 0.017 8 <sup>abefg</sup> |
| CIR 6h 组  | 0.372 3 ± 0.076 5 <sup>abef</sup>  | 0.148 4 ± 0.011 5 <sup>abefg</sup> |
| CIR 12h 组 | 0.484 3 ± 0.113 1 <sup>abef</sup>  | 0.245 7 ± 0.038 3 <sup>abef</sup>  |
| CIR 24h 组 | 0.741 7 ± 0.071 8 <sup>abefg</sup> | 0.451 3 ± 0.019 0 <sup>abefg</sup> |
| CIR 48h 组 | 0.629 4 ± 0.069 8 <sup>abefg</sup> | 0.303 4 ± 0.038 8 <sup>abefg</sup> |
| CIR 72h 组 | 0.365 0 ± 0.042 0 <sup>ef</sup>    | 0.245 1 ± 0.030 3 <sup>abef</sup>  |
| F 值       | 22.944                             | 59.962                             |
| P 值       | 0.000                              | 0.000                              |

注:a,与 sham 组比较, $P<0.05$ ;b,与 CIR 0h 组比较, $P<0.05$ ;c,与 CIR 6h 组比较, $P<0.05$ ;d,与 CIR 12h 组比较, $P<0.05$ ;e,与 CIR 24h 组比较, $P<0.05$ ;f,与 CIR 48h 组比较, $P<0.05$ ;g,与 CIR 72h 组比较, $P<0.05$

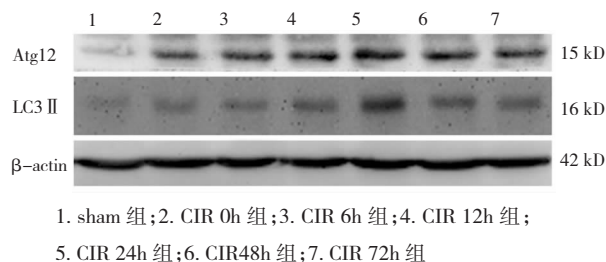


图 5 Atg12、LC3-II 在大鼠大脑皮质的表达

Fig.5 The expression of Atg12 and LC3-II in rat cerebral cortex

### 3 讨 论

自噬是细胞为了维持内环境稳态,利用溶酶体来降解自身受损或衰老的细胞器的过程,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新<sup>[6-7]</sup>。正常情况下,自噬处于较低的水平,当受到氧化应激损伤、电离辐射、饥饿等因素刺激也可导致自噬,在心、肺、肾、脑等多种缺血再灌注损伤中存在细胞自噬现象<sup>[8-9]</sup>。Buckley 等<sup>[10]</sup>采用大脑中动脉模型制备大鼠局灶性脑缺血模型,并采用氯喹来阻断自噬,发现经自噬阻断后大鼠的神经功能缺损症状得到明显改善,并且梗死区面积减少约 30%,提示自噬在脑缺血损伤过程中发挥重要的作用。Shi 等<sup>[11]</sup>采用电镜观察发现原代培养的大脑皮质神经元在缺氧无糖环境下培养 6 h 后可出现自噬现象,进一步采用体内实验发现新生大鼠脑缺氧/缺血 3~7 d 时 LC3 和 Beclin1 的表达增强,提示脑缺血缺氧时存在神经细胞自噬。

自噬的形成过程比较复杂,包括自噬的诱导、自噬体的形成、自噬体的运输和裂解 4 个阶段。自噬的诱导阶段受到哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的调控;自噬体的形成过程包括 Atg12 的结合过程和 LC3 的修饰过程。Atg12 在 Atg7 的作用下发生活化,然后转到 Atg10,最后与 Atg5 结合形成自噬体前体,即 LC3 前体,其经过加工后在细胞质内形成可溶性的 LC3-I, LC3-I 也受到 Atg7 的作用后转运到 Atg3,在此被修饰加工后形成 LC3-II<sup>[12-13]</sup>。而 LC3-II 作为自噬的标志性因子,其含量的多少可以判定细胞的自噬状态<sup>[14-15]</sup>。

本研究通过采用经典的大脑中动脉栓塞模型

以模拟脑缺血再灌注损伤,并采用神经功能缺损评分、脑梗死染色、脑组织含水量方法来证明模型的成功。在此基础上采用焦油紫染色发现缺血再灌注损伤后正常神经元数量明显减少,且随着再灌注损伤时间的延长,正常神经元的数量减少越明显,至 24~48 h 达到高峰。进一步采用免疫组化和免疫印迹方法检测自噬相关基因 Atg12 和自噬的标志性因子 LC3-II 的表达,发现 CIR 6h 组可见较弱的 Atg12 和 LC3-II 阳性表达,随着再灌注时间的延长,阳性表达逐渐增强,待 CIR 24~48 h 时表达最强,而 CIR 72 h 之后阳性表达逐渐减弱。由上述结果推测,当成功制备缺血模型后,由于局部脑组织血流阻塞,致使此处细胞处于持续缺血缺氧状态,当血液再灌注时,由于血液再通促发一系列酶促反应,引起缺血再灌注损伤。当损伤达到一定程度时,损伤 6 h 左右,机体的自噬功能被启动,一方面 Atg12 被激活,进一步与 Atg10、Atg5 结合参与自噬体的延伸,同时 LC3 通过与 Atg3、Atg7 结合被修饰加工后形成 LC3-II,进一步参与自噬体的延伸,形成自噬体。在此基础上与溶酶体结合形成自噬溶酶体,受损细胞器等物质可在此处降解<sup>[12-13]</sup>。而随着再灌注损伤的加重,Atg12 和 LC3-II 的表达水平逐渐增高,提示自噬的水平也逐渐增高,但是过度的自噬除了清除受损的细胞器外,也可能使正常的蛋白质分子或细胞器被清除,从而加重脑组织的损伤。而自噬水平在 CIR 72 h 后降低,一方面可能是由于再灌注损伤的减轻从而使受损细胞减少,从而自噬也相应减少所致;另一方面也可能是由于随着蛋白质和细胞器的过度消耗引起自噬体形成减少所致。但这一问题仍需进一步验证。本研究虽然证实了缺血再灌注后自噬的变化趋势,为该病的机制研究提供了实验依据,但是关于自噬与凋亡发展趋势的关系如何?采用自噬抑制剂或凋亡抑制剂干预后自噬和凋亡的变化趋势会发生何种变化?尚需要更深入的研究和探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Ham PB, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging[J]. Prog Neurobiol, 2016[Epub ahead of print].
- [2] Chen W, Sun Y, Liu K, et al. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(12): 1210-1216.
- [3] Xu F, Gu JH, Qin ZH. Neuronal autophagy in cerebral ischemia[J]. Neurosci Bull, 2012, 28(5): 658-666.
- [4] Kost A, Kasprowska D, Labuzek K, et al. Autophagy in brain ischemia[J]. Postepy Hig Med Dosw(Online), 2011, 65: 524-533.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Rutton RW, Luo S, Rubinshtein DC. Autophagic activity in neuronal cell death[J]. Neurosci Bull, 2015, 31(4): 382-394.
- [7] Hu Z, Yang B, Mo X, et al. Mechanism and regulation of autophagy and its role in neuronal diseases[J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(3): 1190-1209.
- [8] Li L, Tan J, Miao Y, et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms[J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(5): 615-621.
- [9] Liu K, Sun Y, Gu Z, et al. Mitophagy in ischaemia/reperfusion induced cerebral injury[J]. Neurochem Res, 2013, 38(7): 1295-1300.
- [10] Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, et al. apamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine models of stroke[J]. Exp Transl Stroke Med, 2014, 6: 8.
- [11] Shi R, Weng J, Zhao L, et al. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(3): 250-260.
- [12] Li L, Zhang Q, Tan J, et al. Autophagy and hippocampal neuronal injury[J]. Sleep Breath, 2014, 18(2): 243-249.
- [13] Liu K, Sun Y, Gu Z, et al. Mitophagy in ischaemia/reperfusion induced cerebral injury[J]. Neurochem Res, 2013, 38(7): 1295-1300.
- [14] 张志才, 邵增务. 自噬分子机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 177-179.
- [15] Yuan Y, Zhang X, Zheng Y, et al. Regulation of mitophagy in ischemic brain injury[J]. Neurosci Bull, 2015, 31(4): 395-406.

(责任编辑: 冉明会)