

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002173

Sestrin2 在大鼠局灶性缺血性脑损伤中的神经保护作用及机制

汪 鹏, 李怡心, 张 徽

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究应激诱导蛋白 Sestrin2 在大鼠局灶性缺血性脑损伤后的神经保护作用及机制。**方法:**采用与接近临床的光化学栓塞法建立 SD(sprague - dawley)大鼠局灶性缺血性脑损伤模型,实验分为对照组、模型组、阴性病毒组和 Sesn2 过表达组共 4 组。应用基因过表达技术上调 Sestrin2 的表达,采用 Longa 改良神经评分系统对各组大鼠神经功能缺损进行评分,TTC 染色法检测脑梗死体积,尼氏(Nissl)染色评估神经元损伤情况,Western blot 检测 Sesn2 和 VEGF 蛋白表达。**结果:**神经功能学评分结果显示,与模型组(3.200 ± 0.789)、阴性病毒组(3.200 ± 0.632)相比较,Sesn2 过表达组(2.100 ± 0.738)神经功能评分明显降低($P < 0.05$)。TTC 染色结果显示,Sesn2 过表达组(0.034 ± 0.004)梗死面积均较模型组(0.072 ± 0.003)、阴性病毒组(0.069 ± 0.003)明显减少($P < 0.05$)。Nissl 染色结果显示 Sesn2 过表达组(334.300 ± 21.550)、阳性神经元数量均较模型组(122.000 ± 17.000)、阴性病毒组(137.700 ± 16.070)明显增多($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,Sesn2 过表达组中 Sesn2 蛋白的表达高于模型组(0.542 ± 0.035)、阴性病毒组(0.578 ± 0.052)($P < 0.05$);Sesn2 过表达组 VEGF 蛋白表达较模型组(1.074 ± 0.094)、阴性病毒组(1.196 ± 0.167)明显增多($P < 0.05$)。**结论:**Sesn2 的过表达改善了神经功能缺损,减少了脑梗死,减轻神经元损伤。这种保护作用可能是通过上调 VEGF 促进脑缺血区域的微血管再生来实现。

【关键词】局灶性缺血性脑损伤;Sestrin2;VEGF**【中图分类号】**R743.33**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-10-12

Neuroprotective effect and mechanism of Sestrin2 in focal ischemic cerebral injury in rats

Wang Peng, Li Yixin, Zhang Hui

(Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine, Center for Molecular Medicine and Cancer Research, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the neuroprotective effect and mechanism of the stress-induced protein Sestrin2 in focal ischemic cerebral injury in rats. **Methods:** A clinically relevant Sprague-Dawley rat model of focal ischemic brain injury was established by photochemical embolization. Rats were divided into control group, model group, negative virus group, and Sesn2 overexpression group. Sestrin2 expression was upregulated using gene overexpression technique. The neurological deficits of each group were scored according to the modified Longa's neurological scoring system. Cerebral infarction volume and neuronal injury were measured by TTC and Nissl staining, respectively. Sesn2 and VEGF protein expression was measured by Western blot. **Results:** Neurological function scores were significantly decreased in the Sesn2 overexpression group (2.100 ± 0.738) than in the model group (3.200 ± 0.789) and negative virus group (3.200 ± 0.632) (both $P < 0.05$). TTC staining showed that cerebral infarction volume was significantly smaller in the Sesn2 overexpression group (0.034 ± 0.004) than in the model group (0.072 ± 0.003) and negative virus group (0.069 ± 0.003) (both $P < 0.05$). In addition, Nissl staining showed that the number of intact neurons was significantly higher in the Sesn2 overexpression group (334.300 ± 21.550) than in the model group (122.000 ± 17.000) and negative virus group (137.700 ± 16.070) (both $P < 0.05$). Western blot analysis indicated that Sesn2 and VEGF protein expression was significantly upregulated in the Sesn2 overexpression group than in the model group (0.542 ± 0.035 and 1.074 ± 0.094 , respectively) and negative virus group (0.578 ± 0.052 and $1.196 \pm$

0.167 , respectively) (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Sesn2 overexpression improves neurological deficit, decreases cerebral infarction, and reduces neuronal damage. This protective effect may be mediated by upregulating VEGF and promoting microvascular regeneration in areas of cerebral ischemia.

【Key words】 focal ischemic cerebral injury; Sestrin2; vascular endothelial growth factor

作者介绍: 汪 鹏, Email: 540816101@qq.com,

研究方向: 脑血管疾病。

通信作者: 张 徽, Email: zhanghui200157@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81771261); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号: 81701165)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190522.0842.004.html>
(2019-05-22)

缺血性脑血管病是一种严重影响人类健康的常见疾病,约占脑血管疾病的 80%,其发病率、死亡率和致残率都很高,给家庭和社会带来沉重负担。因此,缺血性脑卒中的研究一直是神经科学领域的热点和焦点之一。缺血性脑卒中病理生理反应比较复杂,其中脑组织“微循环障碍”是缺血性脑损伤一系列病理生理发生的始动因素^[1-2]。微循环障碍可导致缺血性脑组织低血流灌注,导致神经细胞死亡,最终导致神经组织大量坏死。因此,如何在脑缺血后更快更有效地促进微血管形成(即血管生成),并恢复缺血区域的血液供应,改善脑组织的微循环,挽救濒临死亡的神经细胞,促进神经细胞再生,是预防和治疗脑缺血的重要策略。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)由血管内皮细胞的邻近细胞产生,并通过旁分泌机制特异性结合血管内皮细胞上的受体。其生理作用主要是促进新生血管形成和增强血管通透性。VEGF 在脑缺血中的作用一直受到关注,据报道大鼠脑缺血后 VEGF 在缺血脑组织中的表达明显增加^[3]。应用 VEGF 后,脑缺血的体积明显减少^[4]。Sestrin2(Sesn2)可能是 VEGF 重要的上游调控因子,Sesn2 是一高度保守的蛋白分子,是 Sestrin 家族中的重要成员。在机体受到应激,如 DNA 损伤、氧化应激、缺血缺氧等情况下诱导产生。研究证实 Sesn2 是体内重要的抗氧化蛋白^[5]。研究发现 Sesn2 在神经退行性疾病中具有神经保护作用^[6]。本课题组前期研究也发现 Sesn2 在脑缺血再灌注损伤中具有一定的神经保护作用。干扰 Sesn2 后,脑梗死体积明显增大^[7]。由于目前 Sesn2 的神经保护作用 and 机制尚未明确,本文探讨 Sesn2 可能通过上调 VEGF 的表达,促进血管再生,从而抑制脑损伤的进展。它将有助于为预防和治疗缺血性中风提供新的方向和策略。

1 材料和方法

1.1 材料

选择体质量 220~280 g 的 80 只 SPF sprague-dawley(SD)大鼠,随机分为对照组($n=10$)、模型组($n=20$)、阴性病毒组($n=25$)和 Sesn2 过表达组($n=25$)。实验动物均由重庆医科大学实验动物中心提供[SYXK(渝)2012-0001]。本研究符合作者单位动物伦理委员会制定的伦理标准。

1.2 主要试剂和仪器

玫瑰红(美国 Sigma 公司);水合氯醛(美国 Sigma 公司);多聚甲醛(美国 Sigma 公司);激光仪(深圳瑞沃德);立体定位仪(深圳瑞沃德);Hamilton 微量注射器(瑞士 Hamilton 公司);低温高速离心(美国 Bio-Rad 公司);成年大鼠脑基质(深圳瑞沃德);Sesn2 过表达腺相关病毒(上海和元生物);2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC,美国 Sigma 公司);Sesn2、VEGF、 β -actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司);CellDoc200 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术研究);ECL 显色液(美国 Milipore 公司)。

1.3 方法

1.3.1 Sesn2 过表达腺相关病毒施用 用 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg,腹腔内)麻醉大鼠,并在立体定位仪中固定。在前囟后 1.0 mm,中线外侧 2.0 mm,颅骨表面 3.5 mm 腹侧处使用 Hamilton 微量注射器持续缓慢注入 5 μ L Sesn2 过表达腺相关病毒(10 μ g/ μ L)到右侧脑室内,注射速率为 0.5 μ L/min。注射完成后,将针留在原位并固定 5 min,然后在 2 min 内小心地慢慢取出。在注射过表达 Sesn2 腺相关病毒后两周,进行光化学脑缺血模型建立。

1.3.2 光化学脑缺血模型 选择 SPF 成年雄性 SD 大鼠麻醉并固定头部于脑立体定位仪,暴露颅骨冠状面和矢状中线、前囟点,波长为 561 nm 直径为 4 mm 的激光束立体定向定位在颅骨 AP:0.5 mm、ML:3.5 mm 表面。颅骨被照射 20 min。在照射前 2 min,经股静脉预留导管缓慢注入玫瑰红(0.133 mL/kg 体质量,10 mg/mL 生理盐水)到股静脉。注射后,拔出导管,缝合皮肤,然后放入保温箱中。用直肠探针监测核心体温,并在整个过程中保持在 37 $^{\circ}$ C。

1.3.3 实验分组 对照组:常规条件下与其他组相同时间饲养。模型组:饲养到所需体质量后建立光化学脑缺血模型,建模后常规条件下继续饲养 7 d。阴性病毒组:于建模 2 周前施用 Sesn2 过表达腺相关病毒阴性病毒,建模后常规条件下继续饲养 7 d。Sesn2 过表达组:于建模 2 周前施用 Sesn2 过表达腺相关病毒,建模后常规条件下继续饲养 7 d。其余饲养条件均相同。

1.3.4 评估神经缺陷 在建立光化学脑缺血模型后 7 d,通过实验组的未知形式检查者评估神经功能缺损评分。根据 Longa 等^[18]开发的改良评分系统对这些缺陷进行评分如下:0,无神经功能缺损;1,未能充分延伸右前爪;2,向右转;3,落到右边;4,没有自发行走,意识水平低下。神经功能缺损评分越高,神经损伤越严重。

1.3.5 评估梗死体积 在建立光化学脑缺血模型后 7 d,首先将大鼠麻醉,然后断头并迅速取出脑。在成年大鼠脑基质

中将其切成 2 mm 厚的冠状切片。之后将切片用 2% 的 2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC)在 37 ℃ 黑暗环境中染色 20 min。之后用生理盐水洗涤,然后在 4 ℃ 下在 4% 多聚甲醛中固定 24 h。正常组织染成红色并且梗死的组织未染色(白色)。用数码相机(Nikon,D5100)拍摄每片,并使用 Image J(ver1.37c, NIH)分析。

1.3.6 组织准备和组织学评估 在建立光化学脑缺血模型后 7 d,首先用 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠。完全麻醉后,用 0.9% 氯化钠和 4% 多聚甲醛经心脏灌注。断头之后,将脑取出并浸入多聚甲醛中并浸泡 24 h。之后,将脑用自动组织脱水机脱水并进行石蜡包埋。然后,根据标准方案,用 0.1% 甲酚紫(Nissl 染色)将前脑前 1.20 mm 和后 3.6 mm 的 5 μ m 冠状切片染色,并准备用于随后的显微观察。在光学显微镜下(50 $\times$)在每个切片的十个区域中计数完整的神经元。从同一组获得围绕缺血核心的边界区中的细胞计数,取平均数并表示为细胞数/mm²。

1.3.7 Western blot 在建立光化学脑缺血模型后 7 d,首先用 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠。待完全麻醉后用 0.9% 氯化钠经心脏灌注。然后快速取出大鼠脑并用 0.9% 生理盐水(4 ℃)洗涤以洗去血液和血凝块。然后将部分皮质在 RIPA 缓冲液中匀浆。将裂解液置于低温离心机中,在 4 ℃ 以 12 000 r/min 离心 20 min,然后收集上清液。然后通过增强的 BCA 蛋白质测定试剂盒进行蛋白质浓度评估。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离等量的蛋白质,然后转移到 PVDF 膜上。将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,然后在 4 ℃ 下与抗 Sesn2 的抗体(1:500),VEGF(1:500)和 β -actin(1:10 000)孵育过夜。之后,在室温下将其与特异性二抗(1:5 000)温育 1 h。印迹的蛋白条带通过增强的化学发光(ECL)显现。对定影后的图像进行灰度分析,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白 β -actin 条带灰度值的比值为目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理

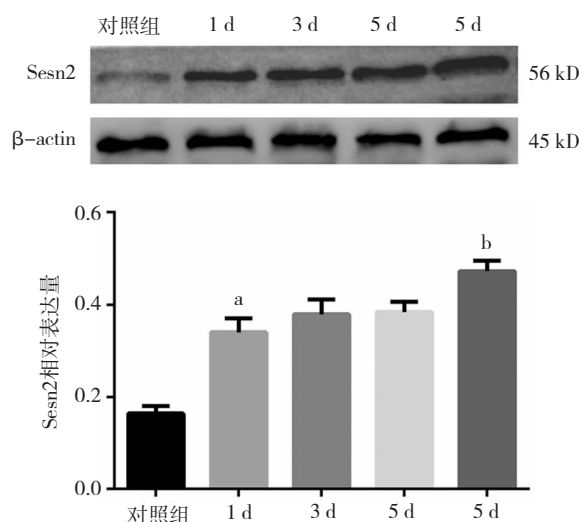
采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行方差齐性分析数据符合正态分布;多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 光化学脑缺血模型中 Sesn2 表达的时间点筛选

以 β -actin 作为内参,使用 NIH Image J 软件定量分析各组中效应蛋白 Sesn2 的表达水平。如图 1 所示:Sesn2 蛋白表达量对照组(0.164 $\pm$ 0.016)、1 d (0.340 $\pm$ 0.030)、3 d (0.379 $\pm$ 0.032)、5 d (0.383 $\pm$ 0.022)、7 d (0.472 $\pm$ 0.023)。方差分析显示各个时间点 Sesn2 蛋白表达的差异具有统计学意义($F=$

60.63, $P=0.000$)。成对比较结果显示,1 d 的 Sesn2 蛋白的表达水平明显高于对照组($P=0.000$);7 d 的 Sesn2 蛋白表达量均较 1、3、5 d 明显增加($P<0.05$)。结合已有文献将时间点定为 7 d。



注:a,对照组 vs. 1 d 组, $P<0.05$;b:7 d 组 vs. 1 d 组, $P<0.05$

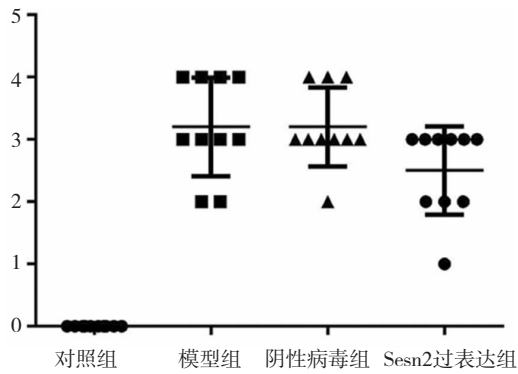
图 1 Western blot 检测大鼠局灶性脑缺血后脑组织

2.2 神经功能评估和 TTC 染色结果

化学脑缺血模型建立 7 d 后评估神经功能(longa 5 分制)。神经功能学评分结果显示对照组(0)、模型组(3.200 $\pm$ 0.789)、阴性病毒组(3.200 $\pm$ 0.632)、Sesn2 过表达组(2.100 $\pm$ 0.738),方差分析的 4 组结果之间差异具有统计学意义($F=58.110$, $P=0.000$)。成对比较结果显示,模型组、阴性病毒组和 Sesn2 过表达组的评分明显高于对照组($P=0.000$);Sesn2 过表达组的评分明显低于模型组和阴性病毒组($P<0.01$);模型组与阴性病毒组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。如图 2A 所示。在光栓建模后 7 d 取脑进行 TTC 染色,TTC 染色结果显示对照组(0)、模型组(0.072 $\pm$ 0.003)、阴性病毒组(0.069 $\pm$ 0.003)、Sesn2 过表达组(0.034 $\pm$ 0.004),4 组方差分析结果的差异具有统计学意义($F=490.600$, $P=0.000$)。成对比较结果显示,与对照组相比,模型组、阴性病毒组和 Sesn2 过表达组的梗死面积明显增加($P=0.000$);Sesn2 过表达组梗死面积均较模型组、阴性病毒组明显减少($P=0.000$);模型组与阴性病毒组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。如图 2B 所示。具体结果见表 1。

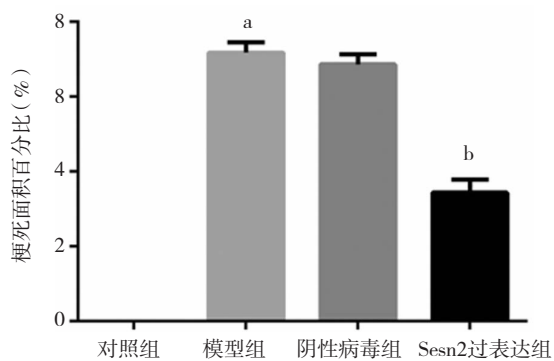
表 1 各组神经功能评分和量化梗死面积比较

组别	神经功能评分	梗死面积
对照组	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000
模型组	3.200 $\pm$ 0.789	0.072 $\pm$ 0.003
阴性病毒组	3.200 $\pm$ 0.632	0.069 $\pm$ 0.003
Sesn2 过表达组	2.100 $\pm$ 0.738	0.034 $\pm$ 0.004
<i>F</i> 值	58.110	490.600
<i>P</i> 值	0.000	0.000



注:模型组 vs. Sesn2 过表达组, $P < 0.05$

A. 大鼠局灶性脑缺血 7 d 后神经功能评分



注:a, 对照组 vs. 模型组, $P < 0.05$; b: 模型组 vs. Sesn2 过表达组, $P < 0.05$

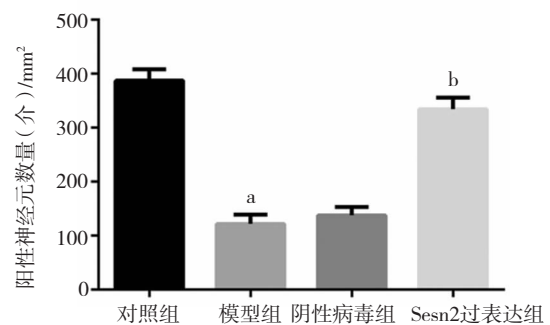
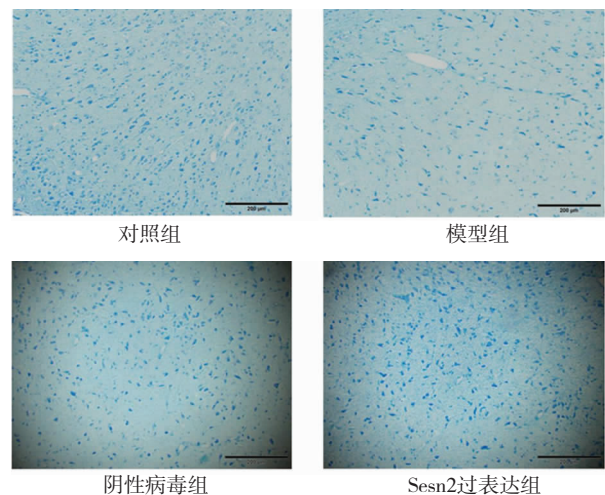
B. TTC 染色显示和量化梗死体积

图 2 神经功能评分和 TTC 染色显示和量化梗死体积

2.3 尼氏(Nissl)染色结果

尼氏(Nissl)染色用于评估建模后 7 d 后神经元的形态变化。在尼氏染色结果显示对照组(387.300 ± 20.600)、模型

组(122.000 ± 17.000)、阴性病毒组(137.700 ± 16.070)、Sesn2 过表达组(334.300 ± 21.550), 方差分析显示, 4 组结果差异有统计学意义($F=152.900, P=0.000$)。成对比较结果显示, 模型组和阴性病毒组阳性神经元数量明显低于对照组($P=0.000$); Sesn2 过表达组的梗死面积明显高于模型组和阴性病毒组($P=0.000$)。模型组与阴性病毒组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。如图 3 所示。



注:a, 对照组 vs. 模型组, $P < 0.05$; b: 模型组 vs. Sesn2 过表达组, $P < 0.05$

图 3 尼氏 (Nissl) 染色评估大鼠局灶性脑缺血 7 d 后的神经元形态学变化

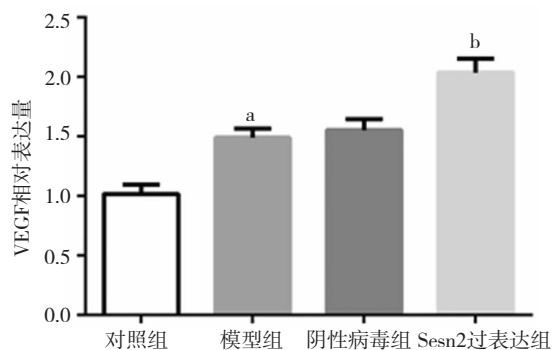
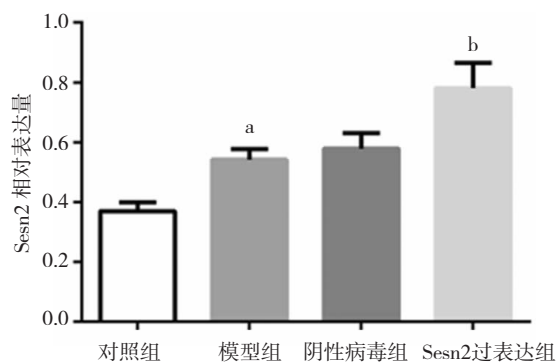
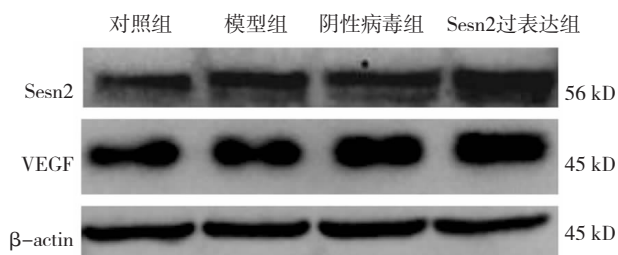
2.4 过表达 Sesn2 后, VEGF 的表达增加

以 β -actin 作为内参, 使用 NIH Image J 软件定量分析各组中效应蛋白 Sesn2 和 VEGF 的表达水平。如图 4 所示: Sesn2 蛋白表达量对照组(0.396 ± 0.013)、模型组(0.542 ± 0.035)、阴性病毒组(0.578 ± 0.052)、Sesn2 过表达组(0.780 ± 0.086), VEGF 蛋白表达量对照组(1.015 ± 0.079)、模型组(1.488 ± 0.076)、阴性病毒组(1.551 ± 0.092)、Sesn2 过表达组(2.034 ± 0.116)。方差分析显示 Sesn2 蛋白表达的差异具有统计学意义($F=26.230, P=0.000$)。成对比较结果显示, 模型组, 阴性病毒组和 Sesn2 过表达组中 Sesn2 蛋白的表达水平明显高于对照组($P < 0.05$); Sesn2 过表达组 Sesn2 蛋白表达量

均较模型组、阴性病毒组明显增加 ($P<0.01$); 模型组与阴性病毒组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。方差分析显示, 4 组 VEGF 蛋白表达差异有统计学意义 ($F=61.420, P=0.000$)。两两比较结果显示 Sesn2 过表达组 VEGF 蛋白表达量均较模型组、阴性病毒组明显增加 ($P<0.05$); 模型组与阴性病毒组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。具体数据见表 2。

表 2 各组Sesn2、VEGF比较

组别	Sesn2	VEGF
对照组	0.396 ± 0.013	1.015 ± 0.079
模型组	0.542 ± 0.035	1.488 ± 0.076
阴性病毒组	0.578 ± 0.052	1.551 ± 0.092
Sesn2过表达组	0.780 ± 0.086	2.034 ± 0.116
<i>F</i> 值	26.230	61.420
<i>P</i> 值	0.000	0.000



注: a, 对照组 vs. 模型组, $P<0.05$; b, 模型组 vs. Sesn2 过表达组, $P<0.05$

图 4 Western blot 检测 Sesn2 和 VEGF 的表达量
($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

缺血性中风的病理生理学是复杂的, 涉及代谢紊乱、细胞内钙超载、炎症反应、氧自由基损伤、血脑屏障破坏、酸中毒、兴奋性氨基酸毒性和其他机制。脑组织“微循环”的障碍是影响缺血性脑损伤的一系列病理生理发生的起始因素。促进微血管形成是预防和治疗脑缺血的关键策略^[1-2]。血管内皮生长因子(VEGF)是一种分离自 1983 年的蛋白质因子, Senger 等^[3]从豚鼠癌性腹水和肿瘤细胞培养基中分离出来的。该因子通过促进内皮细胞增殖和迁移诱导血管生长和血管网络形成。VEGF 基因全长约 28 kb, 由 8 个外显子和 7 个内含子交替组成^[8]。VEGF 是一种糖蛋白, 具有很强的生物活性。VEGF 是血小板衍生因子(platelet derived growth factor, PDGF)家族的成员^[9]。VEGF 主要通过血管内皮细胞上的 *fms* 样酪氨酸激酶受体和含有胎肝激酶-1/激酶的插入区受体结合而发挥促血管生成作用。VEGF 特异性结合血管内皮细胞上的受体, 从而引起细胞内激酶结构域中的受体二聚化和构象变化, 导致激酶活性增强。底物蛋白被活性激酶磷酸化, 然后信号转导分支产生级联反应, 其在血管内皮细胞中传递信号, 导致细胞有丝分裂增加。一系列生物学效应, 如血管内皮细胞迁移和变形增加、血管通透性改善, 从而促进微血管再生。VEGF 在脑缺血中具有重要的作用, 据报道在大鼠局灶性脑缺血模型中 VEGF 在缺血脑组织中的表达显著增加^[10]。应用 VEGF 后, 脑梗死体积明显减少, 脑水肿明显减轻^[4]。Sestrins 是一类高度保守的应激诱导蛋白。Sestrins 能够维持体内平衡, 帮助细胞修复, 并消除由于各种损伤导致的有毒代谢物^[11]。Sesn2 也称为缺氧诱导基因-95(Hi95), 是该家族的重要成员, 并且已被证明受到各种损伤上调, 例如 DNA 损伤、氧化应激、缺血和缺氧^[12]。有研究发现 Sesn2 对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用^[13]。最近的研究发现肾缺血再灌注损伤后 Sesn2 表达增加^[14]。研究还发现, Sesn2 对年龄相关的心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[15]。然而, Sesn2 在脑缺血中的保护作用的具体机制尚不清楚。Sesn2 与血管生成之间的关系也不

明确。

本研究证明了局灶性脑缺血损伤后在脑皮质中 Sesn2 表达升高。Sesn2 过表达后可明显改善神经功能缺损,减少脑梗死体积,并减少神经元损伤。为了研究 Sesn2 在该过程中的作用,使用 Western blot 检测血管生成相关蛋白 VEGF 的表达。本研究发现在 Sesn2 过表达后 VEGF 的表达水平上调。Sesn2 可能通过上调 VEGF 促进脑缺血区域的微血管再生来发挥脑保护作用。而 Sesn2 是通过怎样的机制激活 VEGF 的?这也是今后将深入关注并解决的科学问题。

4 结 论

本研究表明,Sesn2 在大脑缺血性损伤中发挥神经保护作用可能是通过促进血管生成达到的。缺血性脑损伤后,Sesn2 可能通过上调 VEGF 的表达发挥神经保护作用。Sesn2 的这些发现可能为缺血性中风提供新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Seto SW, Chang D, Jenkins A, et al. Angiogenesis in ischemic stroke and angiogenic effects of Chinese Herbal Medicine[J]. J Clin Med, 2016, 5(6):56.
- [2] Yin KJ, Hamblin M, Chen YE, et al. Angiogenesis-regulating microRNAs and ischemic stroke[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(3): 352-365.
- [3] Plate KH, Beck H, Danner S, et al. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1999, 58(6):654-656.
- [4] Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, et al. Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarction volume[J]. Acta Neurochir, 2003, 145(1): 49-53.
- [5] Lee JH, Budanov AV, Karin M, et al. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging[J]. Cell Metabolism, 2013, 18(6):792-801.
- [6] Chen Y, Chen S, Wu C, et al. Induction of sestrin2 as an endogenous protective mechanism against amyloid beta-peptide neurotoxicity in primary cortical culture[J]. Experimental Neurology, 2014, 253:63-71.
- [7] Li L, Xiao L, Hou Y, et al. Sestrin2 silencing exacerbates cerebral ischemia/reperfusion injury by decreasing mitochondrial biogenesis through the AMPK/PGC-1 pathway in rats[J]. Scientific Reports, 2016, 6:30272. DOI:10.1038/srep30272.
- [8] Yang ZJ, Bao WL, Qiu MH, et al. Role of vascular endothelial growth factor in neuronal DNA damage and repair in rat brain following a transient cerebral ischemia[J]. J Neurosci Res, 2002, 70(2):144-149.
- [9] Zhang R, Wang L, Zhang L, et al. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat[J]. Circ Res, 2003, 92(3):308-313.
- [10] Jiang MQ, Zhao YY, Cao W, et al. Long-term survival and regeneration of neuronal and vasculature cells inside the core region after ischemic stroke in adult mice[J]. Brain Pathology, 2017, 27(4):480-498.
- [11] Lee JH, Bodmer R, Bier E, et al. Sestrins at the crossroad between stress and aging[J]. Aging (Albany NY), 2010, 2(6):369-374.
- [12] Budanov AV. Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 15(6):1679-1690.
- [13] Hao BB, Pan XX, Fan Y, et al. Oleanolic acid attenuates liver ischemia reperfusion injury by HO-1/Sesn2 signaling pathway[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2016, 15(5):519-524.
- [14] Wang M, Liu J, Qin J, et al. Increased expression of Sestrin2 in human and experimental heart failure[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2016, 9(8):8075-8082.
- [15] Quan N, Sun W, Wang L, et al. Sestrin2 prevents age-related intolerance to ischemia and reperfusion injury by modulating substrate metabolism[J]. FASEB J, 2017, 31(9):4153-4167.

(责任编辑:唐秋姗)