

本文引用格式:王雪芹,郭小凤,杨培源.亚低温对OGD/R模型新生大鼠海马神经元损伤的保护分子机制研究[J].安徽医学,2023,44(6):629-634.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.06.002

亚低温对 OGD/R 模型新生大鼠海马神经元损伤的保护分子机制研究

王雪芹 郭小凤 杨培源

[摘要] **目的** 观察亚低温(MH)对新生大鼠海马神经元氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)损伤的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 体外培养新生大鼠海马神经元,将实验细胞随机分为对照组、OGD/R组、OGD/R+MH组和OGD/R+MH+Chl组;OGD/R组神经元给予OGD处理6 h,再于37℃复糖复氧处理24 h建立OGD/R模型。OGD/R+MH组和OGD/R+MH+Chl组神经元均给予OGD处理6 h,再分别于32℃不加或加氯喹(Chl)条件下复糖复氧处理24 h。收集各组复糖复氧处理24 h后的细胞及细胞培养上清液;采用电镜观察神经元超微结构变化,MTT法检测神经元活力,ELISA法检测乳酸脱氢酶(LDH)漏出率,TUENL染色法检测神经元凋亡情况,Western blot检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3剪切体(Cleaved caspase-3)、聚ADP核糖聚合酶剪切体(Cleaved PARP)、溶酶体相关膜蛋白2(LAMP2)、泛素结合蛋白P62、微管相关蛋白1轻链3-II(LC3 II)表达水平。**结果** 与对照组比较,OGD/R组出现明显的细胞器损伤、降解、线粒体肿胀等神经元损伤表现,神经元活力下降、LDH漏出率增加、凋亡神经元增多($P<0.05$),凋亡标志物Cleaved caspase-3、Cleaved PARP表达升高($P<0.05$),LAMP2、P62蛋白表达降低,LC3 II蛋白表达升高($P<0.05$)。MH干预后,OGD/R+MH组较OGD/R组细胞器损伤减轻,神经元活力升高、LDH漏出率减少、凋亡神经元减少($P<0.05$),凋亡标志物Cleaved caspase-3、Cleaved PARP表达降低($P<0.05$),LAMP2蛋白表达升高,P62、LC3 II蛋白表达降低($P<0.05$)。而OGD/R+MH+Chl组同时给予MH和自噬通量抑制剂Chl干预后,MH的上述作用被逆转($P<0.05$)。**结论** MH可能通过改善自噬通量、增加海马神经元自噬活性,从而减轻OGD/R所致的神经损伤。

[关键词] 海马神经元;新生大鼠;氧糖剥夺/复糖复氧;亚低温;自噬通量

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.06.002

Molecular mechanism of protective effects of mild hypothermia on hippocampal neuron damage in OGD/R model newborn rats

WANG Xueqin, GUO Xiaofeng, YANG Peiyuan

Department of Neonatology, Kaifeng Children's Hospital, Kaifeng 475000, China

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of mild hypothermia (MH) against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury of hippocampal neurons in neonatal rats, and to explore its action mechanism. **Methods** The hippocampal neurons of neonatal rats were cultured in vitro, and then they were randomly divided into control group, OGD/R group, OGD/R+MH group and OGD/R+MH+Chl group. The neurons in OGD/R group were treated with OGD for 6 h, and then treated with reoxygenation for 24 h under 37℃ to construct OGD/R models. The neurons in the OGD/R+MH group and OGD/R+MH+Chl group were treated with OGD for 6 h, and then treated with reoxygenation without or with chloroquine (Chl) for 24 h under 32℃, respectively. The cells and cell supernatants after 24 h of reoxygenation in each group were collected. The ultrastructural changes of neurons were observed by electron microscope. The activity of neurons was detected by MTT. The leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH) was detected by ELISA. Neuronal apoptosis was detected by TUENL staining. The expression levels of cleaved cysteine proteinase 3 (Cleaved caspase-3), cleaved poly ADP-ribose polymerase (Cleaved PARP), lysosome-associated membranes protein 2 (LAMP2), ubiquitin-binding protein P62 and microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3II) were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, there were obvious neuron injuries (organelle damage, degradation, mitochondrial swelling), declined neurons activity, increased leakage rate of LDH and apoptotic neurons in OGD/R group ($P<0.05$), the expressions of Cleaved caspase-3 and Cleaved PARP increased ($P<0.05$), the expressions of LAMP2 and P62 decreased, and LC3II increased ($P<0.05$). Compared with the OGD/R group, organelle damage was reduced, neuron activity increased, the leakage rate of LDH and apoptotic neurons decreased in the OGD/R+MH group ($P<0.05$), the expressions of Cleaved caspase-3 and Cleaved PARP decreased ($P<0.05$), LAMP2 increased, and P62 and LC3II decreased ($P<0.05$). However, in the OGD/R+MH+Chl group, the above-mentioned effects of MH were significantly reversed ($P<0.05$). **Conclusions** MH may alleviate OGD/R-induced nerve injury by improving autophagic flux and increasing autophagic activ-

ity of hippocampal neurons.

[Key words] Hippocampal neuron; Neonatal rats; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; Mild hypothermia; Autophagic flux

新生儿缺血缺氧性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是围生期窒息引起的常见脑损伤性疾病^[1],是导致新生儿认知功能障碍的主要原因之一。在存活的 HIE 患儿中,20%~30% 遗留有不同程度的神经功能缺陷^[2-3]。亚低温(mild hypothermia, MH)已被证实是治疗 HIE 的有效方法之一,且无严重的副作用^[4]。MH 对 HIE 的保护机制复杂,研究^[5]发现 MH 通过减少神经元凋亡来改善神经功能损伤。MH 可抑制氧糖剥夺/复糖复氧(oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的大鼠海马神经元中 caspase-3 的激活,然而其潜在的机制尚不清楚^[6]。自噬是维持细胞内稳态的重要机制,在脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤后激活,并发挥神经保护作用,且其作用可被自噬抑制剂阻断^[7]。体内外研究^[8-9]表明, MH 通过自噬途径保护心脏、肝脏等免受 I/R 损伤。此外,自噬与细胞凋亡机制间存在密切联系^[10]。基于此,本研究旨在通过体外构建新生大鼠海马神经元 OGD/R 模型以模拟 I/R 损伤和 HIE,并观察 MH 是否通过调节自噬活性改善 OGD/R 诱导的神经元损伤。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级新生 1~3 日龄乳鼠 9 只,雌雄不限,体质量 12~15 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。

1.2 试剂与仪器 DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazoyl tetrazolium, MTT)、氯喹(chloquinat, Chl)购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自深圳子科生物科技有限公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司;兔抗鼠 β -actin、Cleaved caspase-3、Cleaved PARP、溶酶体相关膜蛋白 2 (lysosome-associated membrane protein 2, LAMP2)、P62 和 LC3 一抗购自美国 Abcam 公司;二抗购自北京索莱宝科技有限公司;Tecnai G2 透射电镜购自荷兰 FEI 公司;全自动酶标免疫分析仪购自美国 Biotex 公司。

1.3 方法

1.3.1 新生大鼠海马神经元的分离、培养与鉴定 将新生大鼠消毒后断头处死,迅速从颅骨中取出大鼠大脑组织,放入含有 4℃ PBS 的培养皿中,于手术显微镜下分离海马组织后放入含有 DMEM/F12 培养基的离心

管中,轻轻吹打分散。1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,使用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F12 培养基重悬细胞。将细胞悬液以 1×10^6 个/皿密度接种于 6 cm 细胞培养皿中,置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。培养 24 h 后,替换为含 2% B27 的培养基继续培养。培养第 3 天,加入终浓度为 5 μ mol/L 的阿糖胞苷作用 24 h,以抑制胶质细胞生长。之后每 3 d 换液继续培养,第 8 天进行 MAP-2 免疫荧光鉴定。

1.3.2 海马神经元 OGD/R 模型的建立与分组 新生大鼠海马神经元 OGD/R 模型建立参照文献^[11]:培养第 8 天,将含海马神经元的培养皿取出后弃去培养基,加入预先配制的无糖 Earle's 液,并将三气培养箱调节为缺氧条件(1% O₂、94% N₂、5%CO₂), 37℃培养 6 h 后,更换含 10% FBS 的 DMEM 培养基,于正常氧条件(21% O₂、74% N₂、5%CO₂)培养 24 h。将培养的海马神经元随机分为对照组、OGD/R 组、OGD/R+MH 组和 OGD/R+MH+Chl 组,对照组神经元于正常培养基和氧条件, 37℃培养箱培养。OGD/R 组神经元 OGD 处理 6 h,再复糖复氧处理 24 h。OGD/R+MH 组和 OGD/R+MH+Chl 组神经元均给予 OGD 处理 6 h,然后分别于 32℃不加或加氯喹条件下复糖复氧处理 24 h。

1.3.3 电镜观察海马神经元超微结构 将复糖复氧处理 24 h 后的海马神经元从细胞培养箱中取出,弃去培养液,2% 戊二醛固定 2 h, PBS 清洗,用梯度乙醇脱水。标本脱水后,使用环氧树脂 618 浸润包埋;切取超薄切片,用醋酸铀酰和柠檬酸铅染色后送电镜室观察。

1.3.4 MTT 法检测海马神经元活力 将各组神经元以 10 000 个/孔密度接种于 96 孔板中,并根据 1.3.2 中实验分组给予相应的处理。复糖复氧 24 h 后加入 20 μ L 的 MTT 溶液继续培养 4 h 后弃去 MTT 溶液,并加入 100 μ L DMSO,使用酶标仪测定 490 nm 处各孔的光密度值(OD₄₉₀)。

1.3.5 海马神经元 TUNEL 染色 将经复糖复氧处理 24 h 后的海马神经元接种至 6 孔板中,4% 多聚甲醛固定 20 min,然后加入 0.3% Triton X-100 孵育 10 min,根据 TUNEL 染色检测试剂盒说明书步骤行 TUNEL 染色。用荧光显微镜在 200 倍镜下随机取 5 个视野并拍照,用 ImagePro Plus 6.0 软件计数 TUNEL 阳性细胞。

1.3.6 LDH 漏出率检测 复糖复氧处理 24 h 后,取 50 μ L 神经元培养上清液,用大鼠 LDH ELISA 检测试剂盒测定细胞外 LDH 活性。将含有 Triton-100 细胞裂解液加入培养皿,检测上清液细胞总 LDH 活性。LDH 漏出率=细胞外 LDH 活性/总 LDH 活性 $\times 100\%$ 。

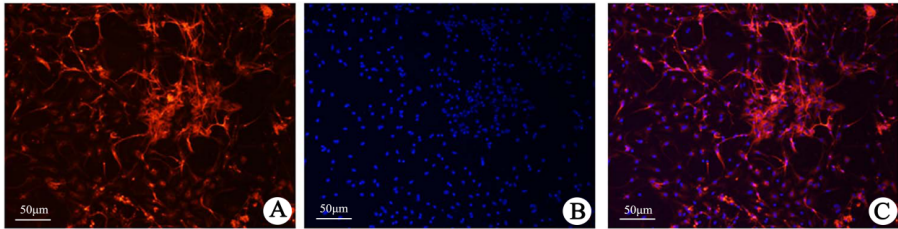
1.3.7 Western blot 检测海马神经元蛋白表达 收集复糖复氧处理 24 h 后各组神经元, PBS 冲洗后使用细胞裂解液冰上充分裂解提取总蛋白。采用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)法对提取蛋白质进行定量后, 取 25 μg 样品蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳转印至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入 β -actin、Cleaved caspase-3、Cleaved PARP、LAMP2、P62 和 LC3 II 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 洗膜后, 加入二抗室温孵育 2 h, ECL 法显色, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 两两比较使用 SNK 法。所有检验均采取双侧检验, α 取 0.05。

2 结果

2.1 新生大鼠海马神经元鉴定 海马神经元的胞浆和轴突经 MAP-2 染色后发出红色荧光, 而所有培养细胞(含胶质细胞)的细胞核经 DAPI 染色后发出蓝色荧光。2 种免疫荧光染色融合后的结果显示海马神经元占有所有培养细胞的 90% 以上。见图 1。

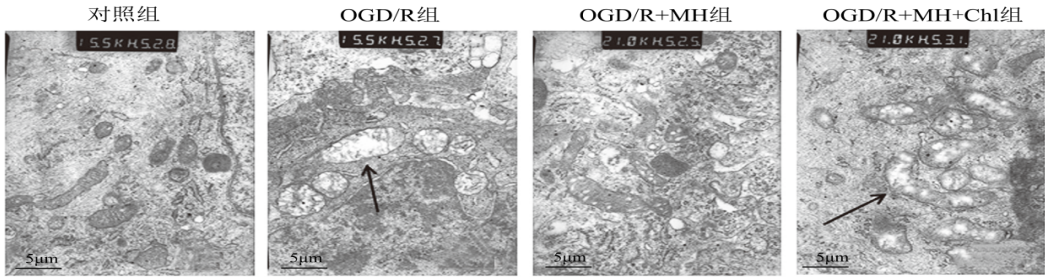


注: A 为 MAP-2 免疫荧光染色结果; B 为 DAPI 染色结果; C 为同一视野 MAP-2 和 DAPI 染色融合结果。

图 1 海马神经元 MAP-2 和 DAPI 染色

2.2 MH 对 OGD/R 所致海马神经元损伤的影响 与对照组比较, OGD/R 组神经元出现明显的细胞器损伤或降解、线粒体肿胀等损伤表现, 神经元活力下降 ($P < 0.05$), LDH 漏出率增加 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+MH 组神经元细胞器损伤减轻, 神经元活力升

高 ($P < 0.05$), LDH 漏出率减少 ($P < 0.05$); 与 OGD/R+MH 组比较, OGD/R+MH+Chl 组神经元细胞器损伤加剧, 神经元活力下降 ($P < 0.05$), LDH 漏出率增加 ($P < 0.05$)。见图 2、表 1。



注: 箭头指示损伤的细胞器。

图 2 海马神经元超微结构

表 1 神经元活力、LDH 漏出率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	神经元活力 (%)	LDH 漏出率 (%)
对照组	6	99.98 $\pm$ 2.75	20.78 $\pm$ 2.77
OGD/R 组	6	48.60 $\pm$ 5.13 ^①	64.55 $\pm$ 5.90 ^①
OGD/R+MH 组	6	70.76 $\pm$ 7.82 ^②	37.15 $\pm$ 3.96 ^②
OGD/R+MH+Chl 组	6	50.18 $\pm$ 5.53 ^③	60.88 $\pm$ 6.04 ^③
F 值		109.799	108.174
P 值		<0.001	<0.001

注: LDH 为乳酸脱氢酶, 与对照组比较, ^① $P < 0.05$; 与 OGD/R 组比较, ^② $P < 0.05$; 与 OGD/R+MH 组比较, ^③ $P < 0.05$ 。

2.3 MH 对 OGD/R 所致海马神经元凋亡的影响 与对照组比较, OGD/R 组凋亡神经元增多 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+MH 组凋亡神经元减少 ($P < 0.05$); 与 OGD/R+MH 组比较, OGD/R+MH+Chl 组凋亡神经元增多 ($P < 0.05$)。见图 3、表 2。

2.4 海马神经元凋亡标志物表达比较 与对照组比较, OGD/R 组凋亡标志物 Cleaved caspase-3、Cleaved PARP 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+MH 组 Cleaved caspase-3、Cleaved PARP 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 与 OGD/R+MH 组比较 OGD/R+

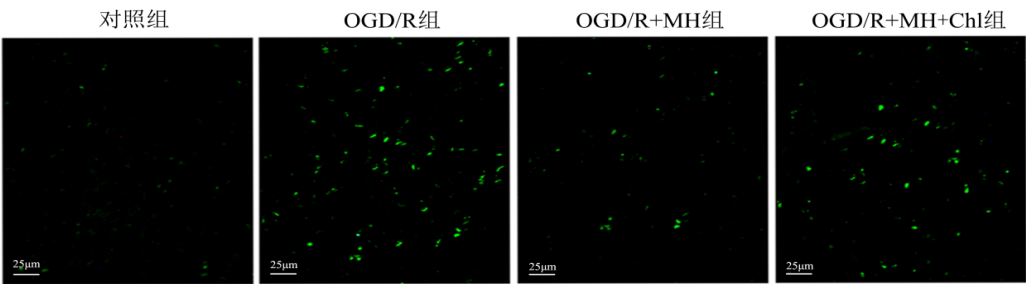


图 3 各组海马神经元 TUNEL 染色情况(TUNEL 染色)

表 2 TUNEL 阳性海马神经元百分比比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TUNEL 阳性神经元百分比(%)
对照组	6	3.88±0.51
OGD/R 组	6	40.76±5.08 ^①
OGD/R+MH 组	6	10.52±1.73 ^②
OGD/R+MH+Chl 组	6	28.37±4.02 ^③
<i>F</i> 值		217.529
<i>P</i> 值		<0.001

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,^② $P<0.05$;与 OGD/R+MH 组比较,^③ $P<0.05$ 。

MH+Chl 组 Cleaved caspase-3、Cleaved PARP 蛋白表达均升高($P<0.05$)。见图 4、表 3。

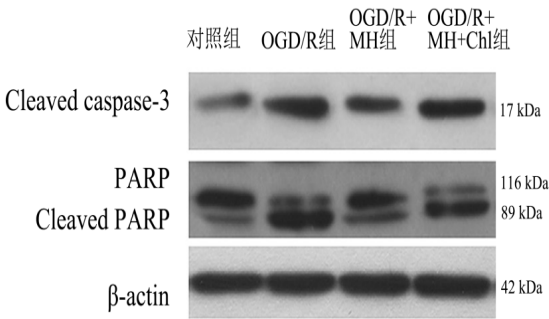


图 4 海马神经元凋亡相关蛋白表达水平

表 3 海马神经元凋亡相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Cleaved caspase-3	Cleaved PARP
对照组	6	0.18±0.03	0.15±0.02
OGD/R 组	6	0.73±0.07 ^①	0.82±0.09 ^①
OGD/R+MH 组	6	0.38±0.04 ^②	0.22±0.03 ^②
OGD/R+MH+Chl 组	6	0.70±0.07 ^③	0.74±0.08 ^③
<i>F</i> 值		136.374	182.114
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: Cleaved caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 剪切体, Cleaved PARP 为聚 ADP 核糖聚合酶剪切体。与对照组比较, ^① $P<0.05$; 与 OGD/R 组比较, ^② $P<0.05$; 与 OGD/R+MH 组比较, ^③ $P<0.05$ 。

2.5 海马神经元溶酶体功能及自噬相关蛋白表达比较 与对照组比较, OGD/R 组 LAMP2、P62 蛋白表达降低($P<0.05$), LC3 II 蛋白表达升高($P<0.05$); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+MH 组 LAMP2 蛋白表达升高($P<0.05$), P62、LC3 II 蛋白表达降低($P<0.05$); 与 OGD/R+MH 组比较, OGD/R+MH+Chl 组 LAMP2 蛋白表达降低($P<0.05$), P62、LC3 II 蛋白表达升高($P<0.05$)。见图 5、表 4。

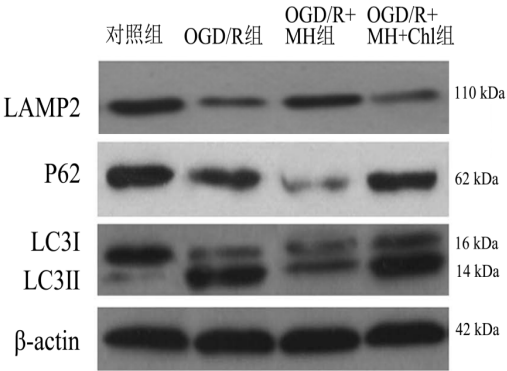


图 5 海马神经元 LAMP2、P62 和 LC3 II 蛋白表达水平

表 4 海马神经元相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	LAMP2	P62	LC3 II
对照组	6	0.49±0.04	0.71±0.07	0.08±0.02
OGD/R 组	6	0.18±0.03 ^①	0.49±0.05 ^①	0.84±0.10 ^①
OGD/R+MH 组	6	0.40±0.05 ^②	0.22±0.03 ^②	0.13±0.03 ^②
OGD/R+MH+Chl 组	6	0.21±0.03 ^③	0.67±0.06 ^③	0.81±0.09 ^③
<i>F</i> 值		90.847	100.487	214.474
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: LAMP2 为溶酶体相关膜蛋白 2, P62 为泛素结合蛋白 P62, LC3 II 为微管相关蛋白 1 轻链 3-II。与对照组比较, ^① $P<0.05$; 与 OGD/R 组比较, ^② $P<0.05$; 与 OGD/R+MH 组比较, ^③ $P<0.05$ 。

3 讨论

亚低温是一种广泛应用的神经保护策略,已被证明对各种类型的脑损伤有效。炎症介质释放、氧自由基产生、细胞内钙内流和线粒体通透性转变孔的开放等多种机制参与了 I/R 损伤。自噬是一种溶酶体依赖的途径,通常在饥饿、I/R、生长因子缺失或应激等情况下被激活,在细胞生存、分化、发育和内稳态中发挥重要作用。自噬可以更新细胞内环境,在 I/R 损伤后自噬对维持内稳态尤为重要。既往研究发现,促进线粒体自噬对 OGD/R 大鼠海马神经元具有保护作用^[12]。与众多 I/R 损伤模型中自噬小体形成的研究相比,少有研究从自噬通量的整体状态进行系统探讨。本研究发现,OGD/R 可以导致海马神经元自噬通量功能障碍,而 MH 可能通过改善自噬通量、增加海马神经元自噬活性,从而减轻 OGD/R 所致的神经损伤。

OGD/R 诱导的细胞凋亡通路激活是导致海马神经元损伤的重要机制^[13-14]。本研究, TUNEL 染色提示 MH 干预明显抑制了 OGD/R 诱导的海马神经元凋亡,发挥神经保护作用;与此相一致的是, Western blot 实验中, OGD/R 处理后的神经元伴有明显的 Cleaved caspase 3、Cleaved PARP 表达水平上调,而 MH 干预后该指标明显改善。以上这些结果提示, MH 对 OGD/R 诱导的神经损伤的保护作用与抑制凋亡通路有关。本研究进一步评估了 MH 对神经元活力和 LDH 漏出率的影响,结果进一步证实 MH 可以缓解 OGD/R 诱导的神经损伤,而加入自噬抑制剂——Chl 可以阻断这一保护作用,这提示 MH 可能经自噬途径对 OGD/R 诱导的细胞损伤发挥保护作用。

自噬作为一个动态过程,包含了自噬小体形成、自噬体与溶酶体的融合以及细胞内容物在自噬溶酶体中的降解^[15]。有研究^[16]表明,自噬小体与溶酶体的融合受阻,可以引起自噬小体的累积和自噬通量的阻断。溶酶体在自噬通量中起着至关重要的作用,也被称为溶酶体依赖途径,是自噬降解成功的关键细胞器。为了研究 MH 是否通过改善自噬活性来保护海马神经元免受 OGD/R 诱导的神经损伤,本研究通过 Western blot 实验检测了溶酶体功能及自噬相关蛋白表达变化。LAMP2 表达水平是反映溶酶体数量和功能的重要指标。在本研究中,海马神经元在 OGD/R 处理后,溶酶体标记蛋白 LAMP2 表达明显降低,而 MH 处理可以提高溶酶体标记蛋白 LAMP2 表达,然而其作用被 Chl 所阻断;相关研究^[17]显示, Chl 作为一种溶酶体抑制剂,能通过改变溶酶体 PH 值阻断自噬小体与溶酶体的融合。这些结果表明, MH 可改善 OGD/R 损伤后海马神经元的溶酶体功能。此外,本研究评估了 MH 对 OGD/R 损

伤后海马神经元自噬通量的影响。LC3II 是自噬小体膜的关键成分,在自噬小体与溶酶体融合后被降解回收^[18]。由于 P62 通过与 LC3 结合进入自噬体,随后在自噬溶酶体中降解,因此 P62 也被用于评价自噬溶酶体的降解过程,从侧面反映自噬小体的清除水平^[19-20]。在本研究中, OGD/R 后 LC3II 表达增加,而 P62 表达明显减少,表明 OGD/R 损伤后自噬小体形成增加。而在给予 MH 干预后, LC3II 的累积得到明显缓解,同时伴有 P62 水平的显著下降,这一现象在加入 Chl 后被明显抑制。以上结果表明 MH 促进了自噬小体与溶酶体融合以及自噬小体的降解,从而加速了 LC3II 和 P62 的降解,表明 MH 可通过改善自噬通量减轻 OGD/R 诱导的海马神经元损伤。

综上所述, OGD/R 可以导致海马神经元自噬通量功能障碍,而 MH 可能通过改善自噬通量、增加海马神经元自噬活性,从而减轻 OGD/R 所致的神经损伤。然而 MH 改善自噬通量的机制仍待进一步的研究和完善。

参考文献

- [1] 韦伟, 轩妍, 许文婷, 等. 新生儿缺血缺氧性脑病患儿血清 CCL5 GM-CSF 表达及其与预后相关性[J]. 安徽医学, 2021, 42(1):33-37.
- [2] WALAS W, WILIŃSKA M, BEKIESIŃSKA-FIGATOWSKA M, et al. Methods for assessing the severity of perinatal asphyxia and early prognostic tools in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia[J]. Adv Clin Exp Med, 2020, 29(8):1011-1016.
- [3] BONIFACIO S L, HUTSON S. The term newborn: evaluation for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Clin Perinatol, 2021, 48(3):681-695.
- [4] 杨彦斌, 杨明, 李湘波. 常规治疗联合头部亚低温技术治疗新生儿 HIE 的效果及安全性[J]. 中外医学研究, 2021, 19(22): 163-165.
- [5] 朱光明, 尹琪, 邵东华, 等. 亚低温对脑复苏大鼠神经细胞凋亡和线粒体损伤的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(9):976-980.
- [6] 周天恩, 张萌, 杨正飞, 等. 亚低温减轻氧糖剥夺所致的大鼠海马神经元损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(7):1165-1170.
- [7] CUI D, SHANG H, ZHANG X, et al. Cardiac arrest triggers hippocampal neuronal death through autophagic and apoptotic pathways[J]. Sci Rep, 2016, 6:27642.
- [8] SHEN J, CHEN C, XU J, et al. Reduction of autophagy: another potential mechanism of cardioprotective effect of mild hypothermia? [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(5):4810-4811.
- [9] LIU A, WANG W, LU Z, et al. Mild hypothermia pretreatment

- extenuates liver ischemia-reperfusion injury through Rab7-mediated autophagosomes-lysosomes fusion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 550:15-21.
- [10] 王燕,平锋锋,周丹丽,等. 马赛替尼通过抑制自噬和细胞凋亡减轻脑缺血/再灌注损伤[J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(2):227-235.
- [11] ZHOU T, JIANG J, ZHANG M, et al. Protective effect of mild hypothermia on oxygen-glucose deprivation injury in rat hippocampal neurons after hypoxia[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1859-1864.
- [12] 谭永星,董庆华,吴新伟,等. 氢对氧糖剥夺-复氧复糖损伤大鼠海马神经元保护作用机制:促进线粒体自噬[J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(10):1243-1247.
- [13] DING Y M, LIN J T, FANG L M, et al. The neuroprotective effect of apigenin against OGD/R injury in rat hippocampal neurons[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2020, 33(4):1527-1533.
- [14] 李俊杰,黄亚萍. 大黄酚抑制 ERS 减少 OGD/R 大鼠海马神经元凋亡[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(4):328-332.
- [15] CAO W, LI J, YANG K, et al. An overview of autophagy: mechanism, regulation and research progress[J]. *Bull Cancer*, 2021, 108(3):304-322.
- [16] ZHANG X, WEI M, FAN J, et al. Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons[J]. *Autophagy*, 2021, 17(6):1519-1542.
- [17] CHEN X, CLARK J, WUNDERLICH M. Autophagy is dispensable for Kmt2a/Mll-Mllt3/Alf9 AML maintenance and anti-leukemic effect of chloroquine[J]. *Autophagy*, 2017, 13(5): 955-966.
- [18] ZHAO H Y, CHEN H G, MENG X Y, et al. Autophagy activation improves lung injury and inflammation in sepsis[J]. *Inflammation*, 2019, 42(2):426-439.
- [19] COHEN-KAPLAN V, CIECHANOVER A, LIVNEH I. p62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51):83833-83834.
- [20] KO J H, YOON S O, LEE H J, et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF κ B pathways in autophagy- and p62-dependent manners[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):40817-40831.

(2022-12-01 收稿)

(本文编校:张迪,周雪春)