

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.011

Che-1 通过 mTOR 通路调控自噬在谷氨酸所致神经元损伤中的作用研究 *

郭生龙¹ 朱 洁^{1,2} 谢 瑱¹ 李 鹏¹ 费裕朗¹ 杨 谦¹

(1 陕西省人民医院神经内二科 陕西 西安 710061; 2 安徽医科大学无锡临床学院解放军第 904 医院神经外科 江苏 无锡 214044)

摘要 目的:观察谷氨酸 (glutamate, Glu) 对神经元 Che-1 蛋白表达的影响, 研究过表达 Che-1 对 Glu 所致神经元氧化应激性损伤的作用, 并以 mTOR 调控的细胞自噬通路为靶点, 探讨 Che-1 在 Glu 所致神经元损伤中发挥作用的分子机制。**方法:**用 Glu 损伤神经元后, 采用免疫学及分子生物学等方法检测 Che-1 蛋白的表达; 用慢病毒转染神经元增加 Che-1 表达, 用乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 释放量和流式细胞术等方法检测神经元凋亡程度, 采用免疫荧光染色和免疫印迹法检测神经元自噬关键蛋白表达水平; 使用 mTOR 特异性抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin) 提高神经元自噬水平, 并通过检测 LDH 释放量和流式细胞术研究自噬在神经元转归中的作用。**结果:**Glu 可显著增加神经元 Che-1 蛋白表达; 过表达 Che-1 可减轻 Glu 所致神经元损伤, 并减轻 Glu 所致神经元自噬; 通过 Rapamycin 激活自噬可逆转 Che-1 对 Glu 所致神经元损伤的保护作用。**结论:**过表达 Che-1 蛋白可通过抑制神经元自噬对 Glu 所致神经元损伤发挥保护作用。

关键词:Che-1; 神经元; 自噬; 神经保护

中图分类号:R-33; R741.02; R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-3456-05

Study on the Effect of Che-1 on Glutamate-induced Neuronal Injury Via mTOR Regulated Autophagy Pathways*

GUO Sheng-long¹, ZHU Jie^{1,2}, XIE Zhen¹, LI Peng¹, FEI Yu-lang¹, YANG Qian¹

(1 Department of Neurology, Shaanxi People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710061, China; 2 Department of Neurosurgery, The 904th Hospital of PLA, School of Medicine, Anhui Medical University, Wuxi, Jiangsu, 214044, China)

ABSTRACT Objective: The aim of the present study was to observe the effect of glutamic acid (Glu) on the expression of Che-1 in cortical neurons, to investigate the effect of Che-1 overexpression on Glu-induced neuronal injury, and to elucidate the potential mechanism of Che-1-induced neuroprotection focusing on autophagy. **Methods:** After treatment with Glu, immunostaining and western blot were performed to detect the expression of Che-1 in neurons. Transfection with lentivirus was used to overexpress Che-1, and lactate dehydrogenase (LDH) release and flow cytometry were performed to measure neuronal injury. Immunostaining and western blot were used to determine autophagy in neurons. After treatment with the autophagy activator rapamycin, LDH release and flow cytometry were performed to investigate the protective effect of Che-1 against Glu. **Results:** Glu significantly increased the expression of Che-1 in cortical neurons. Overexpression of Che-1 alleviated the Glu-induced neuronal injury and reduced autophagy in neurons. The autophagy activator Che-1 partially prevented the protective effect of Che-1 against Glu in neurons. **Conclusions:** Overexpression of Che-1 could exert protective effect against Glu-induced neuronal injury through activating autophagy in cortical neurons.

Key words: Che-1; Neuron; Autophagy; Neuroprotection

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R741.02; R743 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2019)18-3456-05

前言

脑卒中是全球范围内致死的第二大病因, 在我国, 已成为威胁国人生命健康的第一大杀手^[1]。临床上将脑卒中分为缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 和出血性脑卒中 (hemorrhagic stroke, HS), 其中 IS 约占有卒中的 87%^[2], 其发病率高, 死亡率高的特点, 为社会和个人带来沉重的负担。IS 的有效治疗有赖于血管的及时再通, 尽快恢复脑组织血供, 然而, 在我国目前仅有 10-20% 的 IS 患者在发病 3 小时内能够到达医院。谷氨酸

等兴奋性神经递质过度释放造成的氧化应激性损伤是 IS 后继发性神经损伤的主要机制之一, 然而目前针对这一机制设计的药物并没有达到预期的疗效。因此, 寻找 IS 后能够有效保护脑组织损伤的手段将成为提高 IS 救治成功率的突破点。

自噬是一个进化保守的细胞内物质降解过程, 可以通过回收利用细胞内受损的细胞器及细胞碎片为细胞代谢提供能量以及细胞器的更新提供原料, 以维持细胞内环境的稳定^[3]。在应激状态, 如营养剥夺或生长因子缺乏等状态下, mTOR 活性受到抑制, 从而激活自噬以维持细胞内代谢平衡以及细胞活力^[4]。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81601719)

作者简介: 郭生龙 (1977-), 副主任医师, 主要研究方向: 脑缺血再灌注损伤, E-mail: xijiaoda_gsl@163.com, 电话: 029-85251331

(收稿日期: 2019-05-10 接受日期: 2019-06-04)

然而,过度自噬可以导致神经元死亡,造成损伤^[5]。Che-1,即抗凋亡转录因子(Anti-apoptotic transcription factor, AATF),可以通过与RNA聚合酶II结合,从而参与调控多种基因的转录,在胚胎早期的增殖和分化等过程中发挥重要的作用^[6]。近期的研究发现,在能量应激状态下,Che-1可以通过Redd1和Deptor调控mTOR信号途径介导的细胞自噬^[7]。Che-1通过促进细胞周期,抑制凋亡和自噬等在细胞存活的过程中发挥了重要的作用^[8]。此外,在DNA发生损伤时,Che-1磷酸化激活后与TP53等连接,促进后者的转录,从而修复损伤的DNA^[9]。然而,Che-1在缺血性脑卒中后神经元损伤中的作用及其具体的作用机制,目前仍缺乏研究。在本研究中,我们利用谷氨酸所致神经元损伤模拟体外缺血性脑卒中损伤,观察了Glu对神经元Che-1蛋白表达的影响,研究了过表达Che-1对Glu所致神经元损伤的作用,并以mTOR信号通路介导的自噬为靶点探讨了Che-1在Glu所致神经元损伤中发挥保护作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

孕13-15天C57BL/6J小鼠由第四军医大学动物实验中心提供。动物饲养于22℃,12小时光照/黑暗循环的环境中,给予充足的标准饮食。动物处理流程严格按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)的指南制定,并获得第四军医大学实验动物饲养与使用委员会批准。胎牛血清购自美国Gibico公司;Neurobasal培养基、B-27、L-谷氨酸均购自美国Sigma公司;LDH检测试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、凋亡检测试剂盒、细胞培养皿和细胞培养板均购自武汉博士德生物工程有限公司;免疫共沉淀试剂盒购自美国Bioworld公司;LC3、mTOR、Che-1、p-Che-1、S6K、p-S6K、 β -actin抗体和对应二抗均购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 原代神经元培养 小鼠原代皮层神经元培养按照已往的实验步骤进行^[10],主要步骤为常规处死小鼠后,在无菌状态下取出胎鼠及胎盘,在冰上分离出胚胎皮层脑组织,用剪刀剪碎后加入m-HBSS溶液反复吹打,1000 rpm转速下离心5分钟后移除上清,加入12 mL胰蛋白酶消化20-25分钟,终止消化后,加入DNA酶和MgSO₄震荡后静止5分钟,离心后移除上清,加入神经元培养基重悬细胞后计数。依照实验要求分别接种于60 mm细胞培养皿、96孔细胞培养板和10 mm细胞培养玻片上,置于37℃含5%CO₂,湿度为90%的培养箱中常规培养1周后用于后续实验。

1.2.2 Glu损伤模型建立 皮层原代神经元培养1周后,加入100 μ M Glu后,置于37℃含5%CO₂,湿度为90%的培养箱中继续培养24小时,收集细胞用于后续各项检测。

1.2.3 神经元 siRNA 转染 用阳离子脂质体(Lipofectamine 2000)转染的方法将目标siRNA转导至神经元中。转染前24小时,更换含有10%FBS和1%青-链霉素的Neuron Basal培养基。选择脂质体2000体积/DNA质量为1:2进行细胞转染,转染48小时后,观察实验结果并检测转染效率。

1.2.4 LDH 释放量检测 LDH释放量使用商品化试剂盒检测。将HL-60细胞接种于60 mm细胞培养皿中,按实验设计的

浓度及时间加入大蒜素、necrostatin-1、SP600125等试剂处理细胞。每个样品取50 μ L培养基,加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide-adenine dinucleotide, NADH)和丙酮酸盐,在37℃含5%CO₂湿度为90%的培养箱中培养。15 min后取出细胞,加入氢氧化钠终止反应,在酶联免疫检测仪上检测各样本的吸光值,LDH释放量以对照组吸光值为1倍计算。

1.2.5 流式细胞术检测神经元凋亡 细胞增殖能力采用MTT法检测。将HL-60细胞接种于96孔细胞培养板中,按实验设计的浓度及时间加入大蒜素、z-vad-fmk、SP600125等试剂处理细胞。在每孔中加入10 μ L浓度为0.5 mg/mL的MTT染色试剂,置于37℃含5%CO₂湿度为90%的培养箱中培养。4 h后取出细胞,每孔中加入100 μ L溶解试剂,置于摇床上低速振荡,直至紫色晶体完全溶解。在酶联免疫检测仪上检测各样本的吸光值,细胞活力以对照组吸光值为100%计算。

1.2.6 神经元免疫荧光染色 将HL-60细胞接种于10 mm细胞培养玻片上,按实验设计的浓度及时间加入大蒜素、z-vad-fmk、SP600125等试剂处理细胞。弃去培养基,使用4%多聚甲醛固定细胞,加入10 μ g/mL的Hoechst和10 μ g/mL的PI在37℃染色10 min。样品置于倒置荧光显微镜下观察,计数PI染色阳性细胞数,并计算PI染色阳性细胞比例。

1.2.7 Western blot 检测 蛋白提取、定量和Western blot检测均采用以往文献中报道的方法进行^[11]。简而言之,用预冷的PBS洗去培养基后,加入含有RIPA的细胞裂解液,收集裂解后的蛋白,用BCA定量试剂盒测定蛋白含量后进行SDS-PAGE电泳、转膜。将硝酸纤维素膜用脱脂奶粉封闭非特异性结合位点后,分别加入LC-3、Che-1、mTOR、或 β -actin一抗在4℃孵育过夜,对应二抗在37℃染色1 h,采用化学发光法检测各蛋白表达。

1.3 统计学分析

实验数据表示为均数 $\pm$ 标准差,统计学分析使用GraphPad Prism 8软件进行,组间数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为组间差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 谷氨酸诱导神经元自噬和Che-1表达

为了观察神经元受谷氨酸损伤后Che-1表达的变化,我们按照以往的文献报道,分别用1、3、5、10 mM Glu处理原代培养皮层神经元24小时后^[12],采用免疫荧光染色的方法观察Che-1表达的时间和空间变化。结果显示,与Control组相比,Glu损伤组神经元红色荧光强度及数量显著增加,提示Che-1蛋白表达增高(图1A)。为进一步定量检测Che-1蛋白表达变化,我们分别收集了不同浓度Glu损伤后24小时的神经元蛋白,并采用western blot对不同浓度损伤后的Che-1蛋白表达进行半定量。发现与Control组相比,1、3、5、10 mM Glu损伤后神经元中Che-1表达逐渐增高($P < 0.05$),并呈现出剂量依赖性的关系(图1B),同时,选用5 mM Glu损伤为后续实验的处理条件。此外,通过western blot还发现,自噬的标记分子LC3-II/LC3-I比值也随着谷氨酸浓度增加而不断提高(图1B),提示Glu能够诱导神经元自噬,并且与损伤的程度相关。

2.2 抑制Che-1表达增加谷氨酸所致神经元自噬和损伤

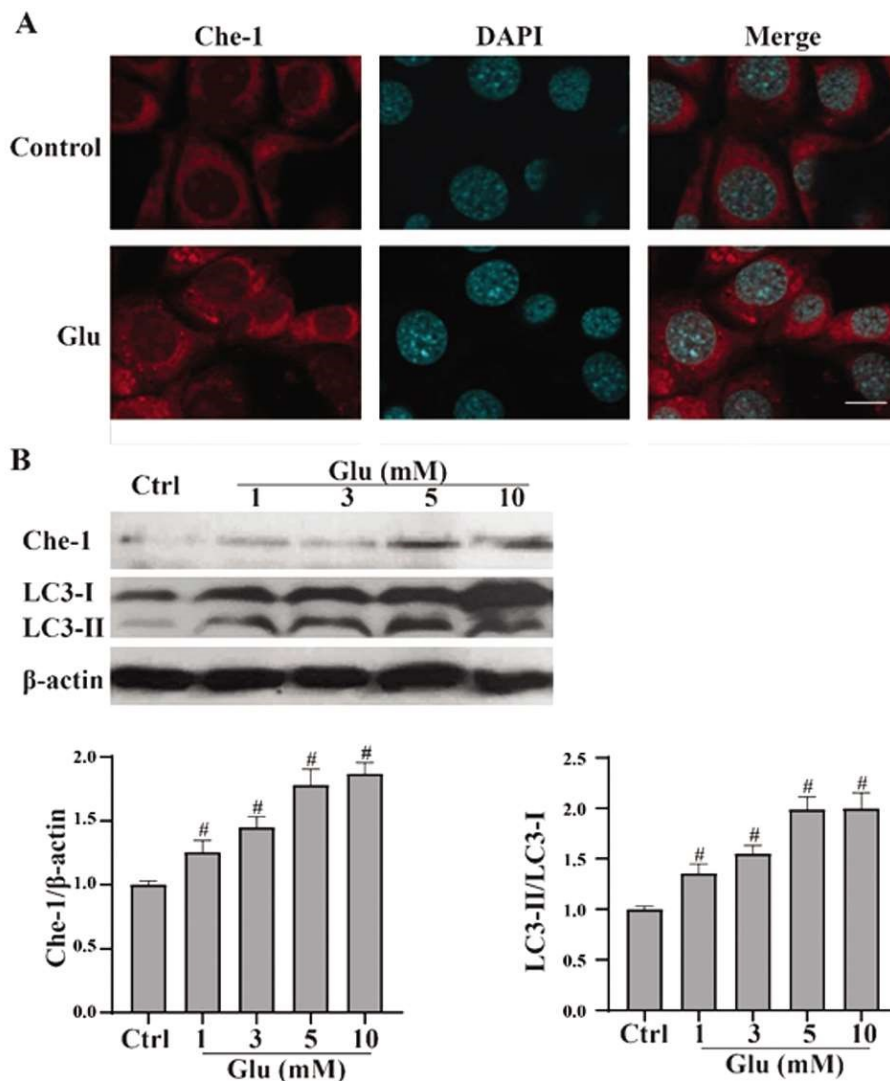


图1 Glu 增加神经元自噬及 Che-1 的表达

Fig.1 Glu increases autophagy and the expression of Che-1 in cortical neurons

Note: [#] $P < 0.05$ vs. Control group. Scale bar, 20 μ M.

为探讨 Che-1 在 Glu 所致神经元损伤中的作用,我们用特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰技术下调神经元中 Che-1 的表达水平。在转染 72 小时后收集细胞并提取蛋白进行 western blot 检测,证实了与 Control 组相比, siRNA-Con 组神经元 Che-1 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$),而 siRNA-Che-1 组神经元中 Che-1 的表达显著降低 ($P < 0.05$,见图 2A)。我们进一步在脂质体转染神经元的基础上进行 Glu 损伤 24 小时后,通过检测细胞外 LDH 的释放量来评估神经元损伤程度。结果显示,神经元 LDH 释放在 Glu 损伤后显著增加,与 Glu 组对比, siRNA-Con 组神经元 LDH 释放量无明显变化 ($P > 0.05$),而 siRNA-Che-1 组神经元 LDH 的释放量比 siRNA-Con 组显著增加 ($P < 0.05$,图 2B),同时,MTT 检测结果也与此一致,抑制 Che-1 表达后,细胞损伤加重 ($P < 0.05$,图 2B),提示 Che-1 可减轻 Glu 处理后神经元损伤。此外,我们还检测了 LC3 的表达变化,发现 LC3-II/LC3-I 的比值在 Glu 组和 siRNA-Con 组没有明显差异 ($P > 0.05$),而与 siRNA-Con 组相比,这一比值在 siRNA-Che-1 组进一步升高 ($P < 0.05$,图 2C),提示敲除 Che-1 可以激活神经元自噬。

2.3 抑制 Che-1 表达通过 mTOR 通路增加神经元自噬

为了进一步探索 Che-1 介导的神经保护作用的相关机制,在用 siRNA 下调 Che-1 表达后,给予 Glu 处理 24 小时,收集细胞提取蛋白后采用 western blot 的方法检测 mTOR 通路相关分子表达水平,发现 Glu 可以显著降低 p-mTOR 的表达,与 Glu 组对比, siRNA-Con 组神经元 p-mTOR 蛋白的表达无明显变化 ($P > 0.05$);而与 siRNA-Con 组对比, siRNA-Che-1 组神经元 p-mTOR 的表达进一步降低 ($P < 0.05$,图 3A)。与此相一致,免疫荧光染色结果显示,与 Control 组对比, Glu 组神经元 LC3II 阳性细胞数显著增加 ($P < 0.05$), siRNA-Con 组神经元中 LC3II 阳性细胞数与 Glu 组相比没有明显改变 ($P > 0.05$),而与 siRNA-Con 组对比, siRNA-Che-1 组神经元 LC3II 阳性细胞数显著增加 ($P < 0.05$,图 3B)。

2.4 Che-1 通过抑制 mTOR 通路介导的自噬发挥神经保护作用

为了验证 mTOR 通路介导的自噬在 Che-1 对 Glu 所致神经元损伤中的作用,我们在 siRNA 调控 Che-1 表达后,使用 mTOR 分子的激动剂 MHY1485 对神经元进行预处理后给予 Glu 损伤。24 小时后通过检测 LDH 释放量发现,与

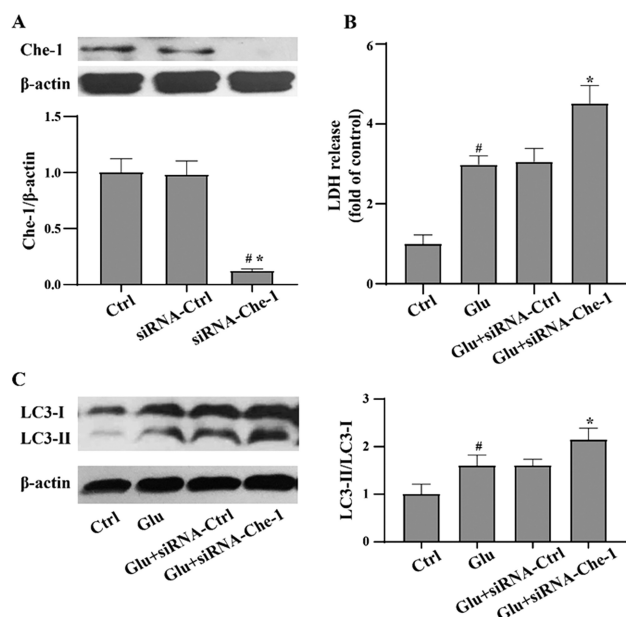


图2 敲除 Che-1 加重 Glu 所致神经元损伤及自噬

Fig.2 Downregulation of Che-1 aggravates Glu-induced neuronal injury and autophagy

Note: [#] $P < 0.05$ vs. Control group. ^{*} $P < 0.05$ vs. siRNA-Control group.

siRNA-Che-1 组对比,联合使用 MHY1485 组神经元 LDH 释放量显著减少 ($P < 0.05$, 图 4A), 提示 MHY1485 能够逆转 siRNA-Che-1 所致的 Glu 后 LDH 释放量进一步增加。此外,我们还采用流式细胞术的方法检测了相应处理后神经元的凋亡状态。结果显示,与 siRNA-Che-1 组对比,联合使用 MHY1485 组神经元凋亡显著减轻 ($43.5 \pm 3.5\%$ vs $28.6 \pm 2.6\%$, $P < 0.05$, 图 4B), 提示 MHY1485 能够减轻 siRNA-Che-1 后神经元凋亡的加重。

3 讨论

IS 是由于大脑动脉循环的急性阻塞所致,是全世界范围内成人死亡的主要原因之一,给社会和家庭带来沉重的精神和经济负担^[13]。IS 可能引起复杂的细胞级联反应,导致神经元坏死和凋亡^[14],然而针对这一过程设计的药物,如 caspase 抑制剂和

抗氧化剂等,在 IS 的临床实验中均未获得理想的疗效^[15]。在本研究中,我们发现 Che-1 蛋白及自噬相关分子在谷氨酸造成的神经元损伤中表达增高,而用 siRNA 抑制 Che-1 表达后,神经元损伤加重,并且自噬增加,进一步机制研究提示 Che-1 可能通过 mTOR 通路抑制自噬,从而在谷氨酸损伤后发挥神经保护作用。

近年来,越来越多的研究表明,抗凋亡转录因子 Che-1 参与调控了细胞凋亡、细胞周期及增殖等多种生理过程^[16]。Che-1 可以与鼠双微体同源物 2 (Mouse double minute 2 homolog, MDM2)及神经生长因子受体作用黑色素瘤抗原基因同源蛋白 (neurotrophin receptor-interacting MAGE homology, NRAGE)相互作用发挥抗凋亡活性^[9,17]。Che-1 的功能障碍于许多疾病的发生发展过程密切相关,包括肿瘤发生及神经性疾病等^[18,19]。在大鼠小脑颗粒神经元中,Che-1 可以与 Tau 蛋白相互作用从而调控神经元凋亡^[20]。此外,Xie 等发现 Che-1 还可以抑制β-淀粉样蛋白造成的神经元凋亡,提示其可能在阿尔兹海默症的病理生理过程中发挥重要的作用^[21]。并且,在脑外伤后 Che-1 的表达显著升高并与神经元凋亡相关^[22]。在本研究中,我们利用神经元谷氨酸损伤模型在体外模拟了缺血再灌注损伤后的神经元病理生理变化过程,并检测了 Che-1 蛋白在损伤后的表达变化,发现 Glu 损伤后 Che-1 表达显著增加,进一步用 siRNA 降低 Che-1 表达后,发现神经元损伤加重,提示 Che-1 可能在 Glu 导致的神经元损伤中发挥了一定的保护作用。

自噬是真核生物体内一种高度保守的细胞代谢过程,可以通过清除受损的细胞器、降解生物大分子等方式维持细胞自身的代谢平衡以及细胞器的更新^[23]。自噬在 IS 中发挥的作用目前仍存有争议。在本研究中,我们发现 Glu 可以造成体外培养原代神经元的过度自噬,而采用药理学方法抑制自噬可减轻神经元损伤,提示 IS 后神经元过度自噬可能是造成继发性神经元损伤的机制之一。mTOR 是一种进化保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,在细胞的合成与分解代谢过程中发挥了维持细胞能量代谢平衡的作用^[24]。在真核生物体内,mTOR 是调控细胞增殖与生长的关键能量信号感受器。研究发现,mTOR 不仅可以调控蛋白合成,还在众多病理生理过程中参与调节细胞内的转录过程^[25]。mTOR 作为自噬通路的负性调控分子目前已经得到公

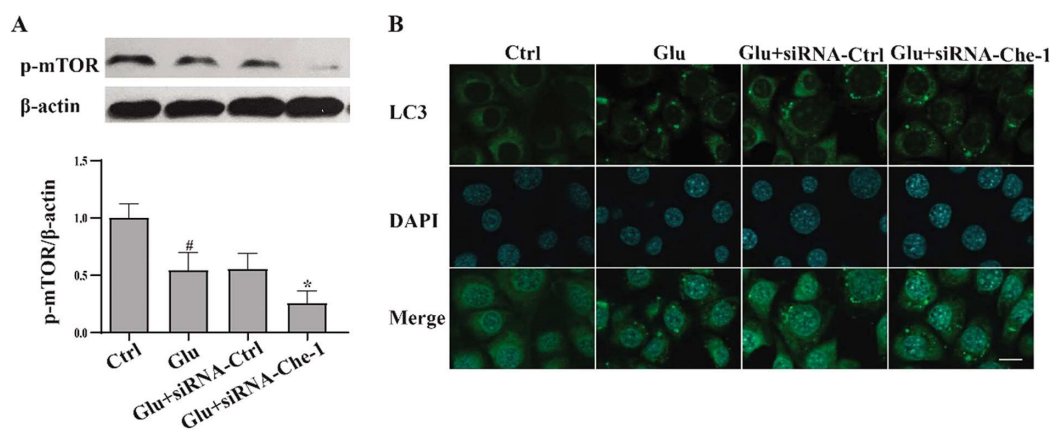


图3 Che-1 通过调控 mTOR 通路增加 Glu 后神经元自噬

Fig.3 Downregulation of Che-1 promotes autophagy via mTOR signaling pathway in cortical neurons

Note: [#] $P < 0.05$ vs. Control group. ^{*} $P < 0.05$ vs. siRNA-Control group. Scale bar, 20 μM.

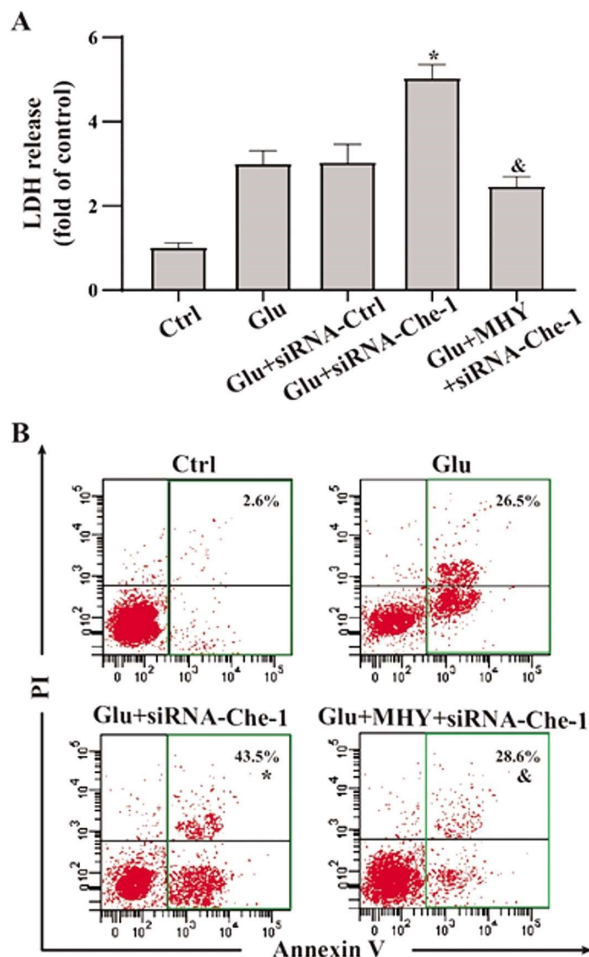


图4 抑制 mTOR 通路介导的自噬部分逆转 Che-1 敲除对 Glu 后神经元损伤的作用

Fig.4 Inhibiting autophagy partially reverses the neuronal injury induced by siRNA-Che-1

Note: * $P < 0.05$ vs. Glu group. & $P < 0.05$ vs. siRNA-Che-1 group.

认。有研究表明,在心肌细胞和神经细胞缺血性损伤中,激活 mTOR 通路可以减轻细胞损伤^[26,27]。基于此,我们推测 mTOR 通路介导的自噬在 Glu 导致的神经元损伤中也发挥了重要的作用。通过实验,我们证实了上述推断,发现用 mTOR 分子的激动剂 MHY1485 对神经元进行预处理后, Glu 导致的细胞损伤减轻;并且,我们还发现下调 Che-1 蛋白的表达后, p-mTOR 的表达也随之降低,而自噬增加, MHY1485 则可以逆转下调 Che-1 蛋白导致的这一变化。上述结果提示,自噬的过度激活参与了 Glu 导致的神经元损伤过程,而抑制 Che-1 表达则可以通过进一步增加自噬加重神经元损伤。

综上所述,本研究在体外培养原代神经元 Glu 损伤模型上,证实了缺血缺氧性损伤可以造成 Che-1 蛋白的表达增加,并且, Che-1 蛋白可能通过增加 mTOR 的活性,抑制后者介导的自噬从而减轻 Glu 后神经元的损伤,发挥保护作用。因此, Che-1 蛋白及其调控的自噬通路可能成为 IS 后脑保护药物研发的新靶点。

参考文献(References)

[1] Wu S, Wu B, Liu M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurol*, 2019,

18(4): 394-405

- [2] Zhou Y, Zeng X, Li G, et al. Inactivation of endothelial adenosine receptor 2A protects mice from cerebral ischemia-induced brain injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2019
- [3] Xu S, Sui S, Zhang X, et al. Modulation of autophagy in human diseases strategies to foster strengths and circumvent weaknesses[J]. *Med Res Rev*, 2019[Epub ahead of print]
- [4] Zhou Y, Rucker EB, Zhou BP. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(1): 60-74
- [5] Zhou L, Cheng Y. Alpha-lipoic acid alleviated 6-OHDA-induced cell damage by inhibiting AMPK/mTOR mediated autophagy [J]. *Neuropharmacology*, 2019[Epub ahead of print]
- [6] Passananti C, Floridi A, Fanciulli M. Che-1/AATF, a multivalent adaptor connecting transcriptional regulation, checkpoint control, and apoptosis[J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(4): 477-483
- [7] Zhao Y, Xiong X, Jia L, et al. Targeting Cullin-RING ligases by MLN4924 induces autophagy via modulating the HIF1-REDD1-TSC1-mTORC1-DEPTOR axis[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3: e386
- [8] Bruno T, Iezzi S, De Nicola F, et al. Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 515-520
- [9] Hopker K, Hagmann H, Khurshid S, et al. AATF/Che-1 acts as a phosphorylation-dependent molecular modulator to repress p53-driven apoptosis[J]. *EMBO J*, 2012, 31(20): 3961-3975
- [10] Dai SH, Chen T, Li X, et al. Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 345-353
- [11] Iqbal Z, Tawamie H, Ba W, et al. Loss of function of SVBP leads to autosomal recessive intellectual disability, microcephaly, ataxia, and hypotonia[J]. *Genet Med*, 2019[Epub ahead of print]
- [12] Kim DH, Kim DW, Jung BH, et al. Ginsenoside Rb2 suppresses the glutamate-mediated oxidative stress and neuronal cell death in HT22 cells[J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(2): 326-334
- [13] Guan T, Ma J, Li M, et al. Rapid transitions in the epidemiology of stroke and its risk factors in China from 2002 to 2013 [J]. *Neurology*, 2017, 89(1): 53-61
- [14] Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 469-477
- [15] Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments[J]. *Neuron*, 2010, 67(2): 181-198
- [16] Passananti C, Fanciulli M. The anti-apoptotic factor Che-1/AATF links transcriptional regulation, cell cycle control, and DNA damage response[J]. *Cell Div*, 2007, 2: 21
- [17] Di Certo MG, Corbi N, Bruno T, et al. NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 11): 1852-1858
- [18] Folgiero V, Sorino C, Pallocca M, et al. Che-1 is targeted by c-Myc to sustain proliferation in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(3)
- [19] Welcker D, Jain M, Khurshid S, et al. AATF suppresses apoptosis, promotes proliferation and is critical for Kras-driven lung cancer [J]. *Oncogene*, 2018, 37(11): 1503-1518

- 2127-2129
- [10] Vanhaverbeke M, Bogaerts K, Sinnaeve PR, et al. Prevention of Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction[J]. *Circulation*, 2019, 139(1): 137-139
- [11] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会, 《中国循环杂志》编辑委员会等. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2001, 29(12): 710-725
- [12] 王琦, 校建波, 李海荣, 等. 急性心肌梗死并发心源性休克与血管紧张素、儿茶酚胺、血管加压素的关系分析[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(10): 1081-1084, 1093
- [13] Wadhwa RK, Joynt Maddox KE, Wasfy JH, et al. Association of the Hospital Readmissions Reduction Program With Mortality Among Medicare Beneficiaries Hospitalized for Heart Failure, Acute Myocardial Infarction, and Pneumonia [J]. *JAMA*, 2018, 320(24): 2542-2552
- [14] Cao Y, Li R, Li Y, et al. Identification of Transcription Factor-Gene Regulatory Network in Acute Myocardial Infarction [J]. *Heart Lung Circ*, 2017, 26(4): 343-353
- [15] Menendez ME, Memtsoudis SG, Oppenheimer M, et al. A nationwide analysis of risk factors for in-hospital myocardial infarction after total joint arthroplasty[J]. *Int Orthop*, 2015, 39(4): 777-786
- [16] Huaman MA, Kryscio RJ, Fichtenbaum CJ, et al. Tuberculosis and risk of acute myocardial infarction: a propensity score-matched analysis[J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145(7): 1363-1367
- [17] 张春燕. 老年住院患者肺部感染死亡危险因素分析 [J]. *中国病案*, 2018, 19(11): 35-37
- [18] Guerin M, Silvain J, Gall J, et al. Association of Serum Cholesterol Efflux Capacity With Mortality in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(25): 3259-3269
- [19] Wang Q, Yang F, Zhu F, et al. A case report of left atrial myxoma-induced acute myocardial infarction and successive stroke [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(51): e13451
- [20] Park JH, Moon SW, Kim TY, et al. Sensitivity, specificity, and predictive value of cardiac symptoms assessed by emergency medical services providers in the diagnosis of acute myocardial infarction: a multi-center observational study[J]. *Clin Exp Emerg Med*, 2018, 5(4): 264-271
- [21] 谢朝云, 覃家露, 熊芸, 等. 呼吸机相关性肺部多耐药菌感染的影响因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(13): 2067-2071
- [22] 倪维, 杨柳, 刘光忠, 等. 中医院艾滋病合并肺部感染患者病原菌分布及耐药性分析[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(21): 155-158
- [23] 张甜嘉, 赵峥嵘, 张卫红, 等. 单间隔离阻断多耐药菌交叉感染的初步研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(20): 3171-3174
- [24] Shahrviri M, Wise E, Resende M, et al. Peripheral Blood Cytokine Levels After Acute Myocardial Infarction: IL-1 β - and IL-6-Related Impairment of Bone Marrow Function [J]. *Circ Res*, 2017, 120(12): 1947-1957
- [25] Kazimierczyk E, Eljaszewicz A, Zembko P, et al. The relationships among monocyte subsets, miRNAs and inflammatory cytokines in patients with acute myocardial infarction[J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 71(1): 73-81
- [26] 贺旭东, 孙明辉, 王志超, 等. 老年急性心肌梗死患者血清白细胞介素-6、心肌肌钙蛋白 I、超敏 C 反应蛋白与肿瘤坏死因子- α 水平的变化及临床意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(6): 1326-1328
- [27] 吴成强, 韦静, 胡益森, 等. 神经调节蛋白-1 对急性心肌梗死大鼠心功能和循环 RAS 活性的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(5): 608-612
- [28] Abela GS, Kalavakunta JK, Janoudi A, et al. Frequency of Cholesterol Crystals in Culprit Coronary Artery Aspirate During Acute Myocardial Infarction and Their Relation to Inflammation and Myocardial Injury[J]. *Am J Cardiol*, 2017, 120(10): 1699-1707
- [29] Hartopo AB, Puspitawati I, Gharini PP, et al. Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction[J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(3): 529-537
- [30] Song PS, Seol SH, Seo GW, et al. Comparative Effectiveness of Angiotensin II Receptor Blockers Versus Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Following Contemporary Treatments in Patients with Acute Myocardial Infarction: Results from the Korean Working Group in Myocardial Infarction (KorMI) Registry [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2015, 15(6): 439-449

(上接第 3460 页)

- [20] Barbato C, Corbi N, Canu N, et al. Rb binding protein Che-1 interacts with Tau in cerebellar granule neurons. Modulation during neuronal apoptosis[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(4): 1038-1050
- [21] Xie J, Guo Q. AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(1): 150-157
- [22] Xu J, Jin W, Wu X, et al. Up-regulation of Che-1 relates to neuronal apoptosis after traumatic brain injury in adult rats [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(1): 85-97
- [23] Li Y, Zhang J, Liu T, et al. Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer[J]. *Am J Med Sci*, 2012, 343(2): 155-161
- [24] Ebrahim N, Ahmed IA, Hussien NI, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorated Diabetic Nephropathy by Autophagy Induction through the mTOR Signaling Pathway[J]. *Cells*, 2018, 7(12) [Epub ahead of print]
- [25] Ilha J, do Espirito-Santo CC, de Freitas GR. mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis: From Training to Aging and Muscle Autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1088: 139-151
- [26] El-Marasy SA, Abdel-Rahman RF, Abd-Elsalam RM. Neuroprotective effect of vildagliptin against cerebral ischemia in rats [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2018, 391(10): 1133-1145
- [27] Li X, Hu X, Wang J, et al. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1917-1924