

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.010

Che-1 通过抑制自噬减轻氧糖剥夺所致神经元损伤的研究 *

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:研究 Che-1 蛋白对氧糖剥夺(Oxygen glucose deprivation, OGD)所致神经元损伤的保护作用及机制。**方法:**OGD 处理神经元后,采用免疫荧光染色和免疫印迹法检测 Che-1 蛋白的表达;慢病毒转染神经元实现 Che-1 过表达,检测乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)释放量和流式细胞术检测神经元凋亡反映 OGD 所致神经元损伤程度,采用免疫荧光染色和免疫印迹法检测神经元自噬;使用自噬激动剂雷帕霉素(Rapamycin)处理神经元,并通过检测 LDH 释放量和流式细胞术研究自噬在 Che-1 保护作用中的作用。**结果:**免疫荧光结果显示,OGD 后神经元 Che-1 蛋白表达明显增高;免疫印迹结果显示,OGD 后 6 至 48 h 神经元 Che-1 蛋白表达明显增高;慢病毒转染过表达 Che-1 蛋白后,OGD 所致神经元 LDH 释放量明显减低,且 OGD 所致神经元凋亡明显减少;过表达 Che-1 蛋白可显著减少 OGD 所致神经元 Beclin1 和 LC3II 的表达;自噬激动剂 Rapamycin 可逆转 Che-1 对 OGD 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 OGD 所致神经元损伤发挥保护作用。

关键词:Che-1;神经元;氧糖剥夺;自噬;神经保护

中图分类号:R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)15-2850-06

Study on Che-1-induced Attenuation of Neuronal Injury through Inhibiting Autophagy after Oxygen Glucose Deprivation in Neurons*

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 investigate the protective effect of Che-1 on neuronal injury induced by oxygen glucose deprivation (OGD) and the potential underlying mechanisms. **Methods:** After treatment with OGD, 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 OGD. **Results:** The results of immunostaining showed that OGD significantly increased the expression of Che-1 in cortical neurons. The results of western blot showed that OGD significantly increased the expression of Che-1 from 6 to 48 h. Overexpression of Che-1 alleviated the OGD-induced LDH release and apoptotic neuronal death. Overexpression of Che-1 significantly decreased the expression of Beclin1 and LC3II in neurons. The autophagy activator rapamycin partially prevented the Che-1-induced protection against OGD in neurons. **Conclusions:** Overexpression of Che-1 could exert protective effect against OGD-induced neuronal injury through activating autophagy in cortical neurons.

Key words: Che-1; Neuron; Oxygen glucose deprivation; Autophagy; Neuroprotection

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

Article ID: 1673-6273(2019)15-2850-06

前言

近三十年来,随着医疗技术的进步,脑卒中患者的死亡率下降了约 37%,但在世界范围内,脑卒中仍是致死、致残的主要病因之一^[1,2]。研究发现脑卒中中仍是仅次于缺血性心脏病的第二位死亡原因^[3]但脑卒中后缺血性神经元损伤机制不清是造成目前疗效不令人满意的主要原因之一。Che-1 又叫做抗凋亡转录

因子(Anti-apoptotic transcription factor, AATF),它是一种 RNA 聚合酶 II 结合蛋白,可通过调控多种基因的转录参与胚胎发生、细胞分化等众多病理生理过程^[4]。Che-1 具有很强的抗凋亡活性,当细胞凋亡时,Che-1 可与鼠双微体同源物 2(Mouse double minute 2 homolog, MDM)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)相互作用而发生降解,致其表达降

* 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:2018-12-08 接受日期:2018-12-31)

低^[56]。以往研究表明,在应激因素作用时,Che-1 可对多种细胞损伤发挥保护作用。当 DNA 损伤时,Che-1 可被多种蛋白激酶磷酸化,被募集至 P53 基因启动子区域,进而激活 P53 基因的转录与翻译,引起 P53 蛋白表达增加^[7]。最近的一项研究显示,Che-1 可维持突变型 P53 基因在人类肿瘤细胞中的表达,而干涉 Che-1 的表达可引起 DNA 损伤,激活 P73 基因转录而导致细胞凋亡^[8]。更重要的是,Che-1 可在内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ER stress)的状态下发挥抗凋亡作用^[9]。但是,Che-1 在脑卒中后缺血性神经元损伤中的作用,及其在神经细胞中发挥抗凋亡作用的机制,目前尚不清楚。因此,在本实验中,我们利用神经元氧糖剥夺(Oxygen glucose deprivation, OGD)模型模拟缺血性神经元损伤,观察 OGD 对神经 Che-1 蛋白表达的影响,研究过表达 Che-1 对 OGD 所致神经元损伤的作用,并以自噬为靶点探讨 Che-1 在 OGD 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 14 天 BALB/c 小鼠购自西安交通大学动物实验中心;DMEM 培养基、神经专用培养基、B27、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素、二脒基苯基吲哚(Diamidino-phenyl-indole, DAPI)均购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒和蛋白定量试剂盒均购自美国 Promega 公司;流式细胞术试剂盒购自美国罗氏公司;Che-1 一抗(货号:sc-81225)、Beclin1 一抗(货号:sc-48341)、LC3II 一抗(货号:sc-28266)、 β -actin 一抗(货号:sc-376421)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 原代神经元按如下方法培养^[10]:孕 14 天 BALB/c 小鼠断头处死,取出子鼠,分离双侧大脑半球皮层,眼科剪剪碎后以蛋白酶处理 5 min,加入 DNA 消化酶后以 1000 r/min 离心 3 min。获得的神经元加入 10%胎牛血清,以 1×10^6 个/皿密度接种于多聚赖氨酸预包被的 6 cm 培养皿中,次日将培养基更换为含有 2% B27、0.2 mM L-谷氨酰胺和 1%青霉素/链霉素的神经专用培养基。每 3 日更换一次培养基,神经元培养 12-14 天用于后续实验。

1.2.2 OGD 模型建立 使用原代培养神经元 OGD 模型模拟离体条件下缺血缺氧性神经损伤^[11]。移除神经元培养基后,以 PBS 轻柔洗涤三次,加入无糖 DMEM 后置于含 5%二氧化碳、95%氮气的 37℃培养箱中继续培养。2 h 后弃去培养基,更换为神经专用培养基,并将神经元置于常规培养箱中继续培养。

1.2.3 LDH 释放量检测 神经元损伤程度通过检测 LDH 释放量进行评估。LDH 是神经元胞浆中存在的一种酶,在胞膜受损时释放至细胞外,是细胞膜完整性的衡量指标。LDH 释放量使用商品化试剂盒按厂家说明书进行检测。

1.2.4 流式细胞术检测神经元凋亡 使用异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 Annexin V 和碘化丙啶(Propidium iodide, PI)对神经元进行双标染色,然后以流式细胞仪检测神经元凋亡。样品由 FACSscan flow cytometer(Becton Dickinson, Bedford, MA)进行分析,每个样品分析最少使用 $1 \times$

10^5 个神经元,计数 Annexin V 和 PI 阳性细胞数。以 Annexin V+/+ 且 PI+ 细胞记为凋亡细胞,细胞凋亡率以细胞总数的百分比表示。

1.2.5 神经元免疫荧光染色 将原代培养神经元接种于 1.5 cm 神经元培养玻片上,慢病毒转染后 72 h 给予 OGD 处理,24 h 后弃去培养基,以多聚甲醛固定 15 min,予磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)冲洗 3 遍。加入 Che-1 的一抗(1:200)、LC3II 的一抗(1:100)和 5 μ g/mL 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)在 37℃孵育过夜。次日,弃去一抗孵育液后,加入对应二抗在室温下孵育 4 h,封片后置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.6 Western blot 检测 在预制的各时间点终止神经元培养,常规方法提取总蛋白并定量,取 80 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至膜上后,以脱脂奶粉封闭非特异性位点,持续 2 h。PBS 洗涤 3 次后,加入 Che-1 (1:500)、Beclin1 (1:1000)和 β -actin (1:2000)一抗及对应二抗,采用化学发光法检测各蛋白表达。

1.3 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示,统计学分析使用 SPSS 16.0 软件进行,两组数据间比较采用 t 检验,多组数据间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的比较标准。

2 结果

2.1 OGD 增加神经 Che-1 表达

为了观察 OGD 对 Che-1 表达的影响,我们给予原代培养皮层神经元 OGD 处理,在处理后的 24 h 使用 Che-1 一抗进行免疫荧光染色,以 DAPI 衬染细胞核。结果显示,与 Control 组对比,OGD 组神经元红色荧光强度明显增高,提示 Che-1 蛋白表达明显增高,结果详见图 1A。为进一步对 Che-1 蛋白表达进行定量,我们在 OGD 后的 6、12、24 和 48 h 分别收集神经元并提取总蛋白,采用 western blot 的方法检测各时间点 Che-1 蛋白表达量的变化。结果显示,与 Control 组对比,OGD 后 6、12、24 和 48 h 神经 Che-1 蛋白表达明显增高($P < 0.05$),结果详见图 1B。

2.2 过表达 Che-1 减轻 OGD 所致神经元损伤

为了进一步研究 Che-1 在 OGD 所致神经元损伤中的作用,我们采用慢病毒转染的方法在原代培养神经元中过表达 Che-1 蛋白。我们使用 Che-1 的特异性过表达载体(LV-Che-1)和对照载体(LV-Control)分别转染神经元,在 72 h 后收集神经元并提取总蛋白,进行 western blot 检测。结果显示,与 Control 组对比,LV-Control 组神经元 Che-1 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$);与 LV-Control 组对比,LV-Che-1 组神经元 Che-1 蛋白表达明显增加($P < 0.05$),结果详见图 2A。神经元受损后,细胞内的 LDH 通过破坏的细胞膜释放到细胞外是其特性改变之一。因此,我们在载体转染神经元基础上进行 OGD 损伤,24 h 后通过检测细胞外 LDH 的量来评估神经元损伤程度。结果显示,OGD 可显著增加神经元 LDH 的释放;与 OGD 组对比,LV-Control 组神经元 LDH 释放量无明显变化($P > 0.05$);与 LV-Control 组对比,LV-Che-1 组神经元 LDH 释放量明显减少($P < 0.05$),结果详见图 2B。同时我们采用流式细胞术的方法检

测了神经元的凋亡,早期凋亡细胞(Annexin V 阳性,PI 阴性)与晚期凋亡细胞(Annexin V 阳性,PI 阳性)合计为凋亡细胞。结果显示,OGD 可显著增加神经元凋亡 ($23.1 \pm 3.6\%$ vs $3.3 \pm 1.8\%$, $P < 0.05$);与 OGD 组对比,LV-Control 组神经元凋亡无明显

变化($24.7 \pm 4.5\%$ vs $23.3 \pm 3.6\%$, $P > 0.05$);与 LV-Control 组对比,LV-Che-1 组神经元凋亡明显减少($14.6 \pm 2.7\%$ vs $24.7 \pm 4.5\%$, $P < 0.05$),结果详见图 2C。

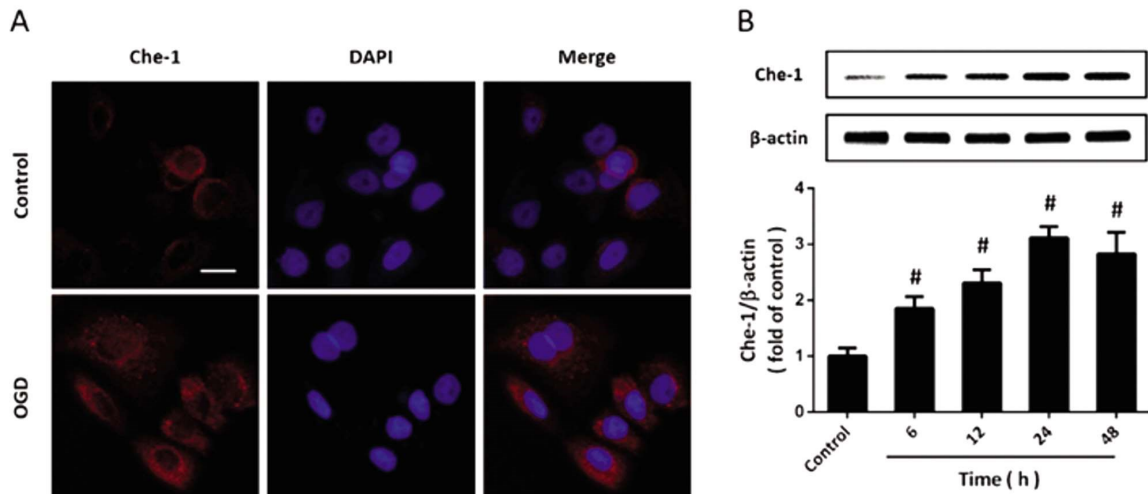


图 1 OGD 增加神经元 Che-1 的表达

Fig.1 OGD increases the expression of Che-1 in cortical neurons

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

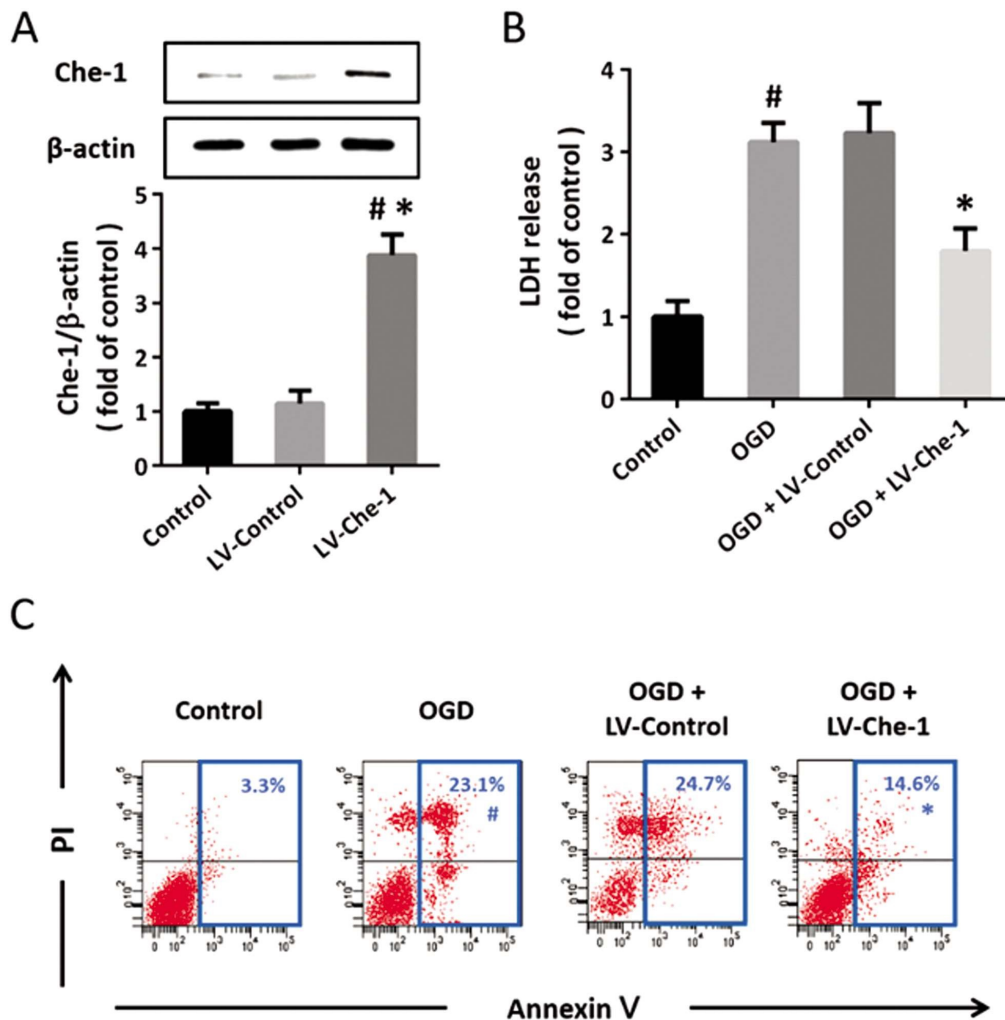


图 2 过表达 Che-1 减轻 OGD 所致神经元损伤

Fig.2 Overexpression of Che-1 alleviates OGD-induced neuronal injury

Note: # $P < 0.05$ vs. Control group. * $P < 0.05$ vs. LV-Control group.

2.3 过表达 Che-1 抑制 OGD 后神经元自噬

神经元转染慢病毒载体后, 给予 OGD 处理, 24 h 后采用 western blot 的方法检测 Beclin1 蛋白的表达。结果显示, OGD 可显著增加神经元 Beclin1 蛋白的表达; 与 OGD 组对比, LV-Control 组神经元 Beclin1 蛋白的表达无明显变化 ($P>0.05$); 与 LV-Control 组对比, LV-Che-1 组神经元 Beclin1 蛋白的

表达明显降低 ($P<0.05$), 结果详见图 3A。同时, 我们使用 LC3II 一抗进行免疫荧光染色, 以 DAPI 衬染细胞核。结果显示, 与 Control 组对比, OGD 组神经元 LC3II 阳性点数量明显增多; 与 OGD 组对比, LV-Control 组神经元 LC3II 阳性点数量无明显变化 ($P>0.05$); 与 LV-Control 组对比, LV-Che-1 组神经元 LC3II 阳性点数量明显减少 ($P<0.05$), 结果详见图 3B。

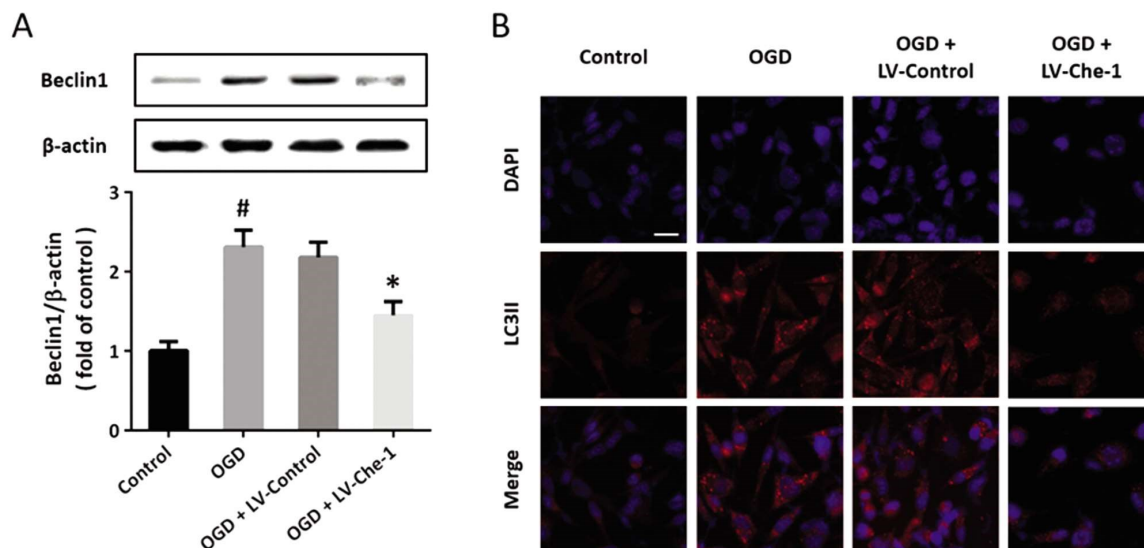


图3 过表达 Che-1 抑制 OGD 后神经元自噬

Fig.3 Overexpression of Che-1 inhibits autophagy after OGD in cortical neurons

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

2.4 激活自噬部分逆转 Che-1 过表达对 OGD 的保护作用

为进一步验证自噬介导了 Che-1 对 OGD 所致神经元损伤保护作用, 我们在病毒转染神经元后, 使用自噬激动剂雷帕霉素 (Rapamycin) 处理神经元, 并给予 OGD 损伤。24 h 后检测 LDH 释放量, 结果显示, 与 LV-Che-1 组对比, 联合使用雷帕霉素组 LDH 释放量明显增加 ($P<0.05$), 提示雷帕霉素逆转了

LV-Che-1 所致的 OGD 后 LDH 释放量减少, 结果详见图 4A。同时, 我们采用流式细胞术的方法检测了神经元凋亡。结果显示, 与 LV-Che-1 组对比, 联合使用雷帕霉素组神经元凋亡明显增加 ($P<0.05$), 提示雷帕霉素逆转了 LV-Che-1 的抗凋亡作用, 结果详见图 4B。

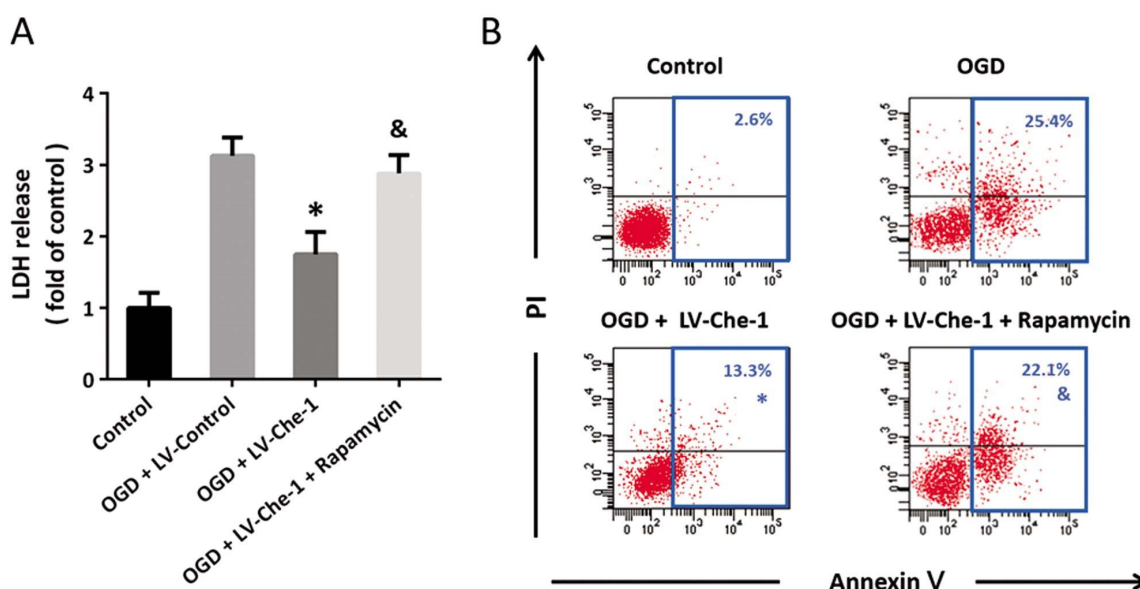


图4 激活自噬部分逆转 Che-1 过表达对 OGD 的保护作用

Fig.4 Activating autophagy partially reverses the protection against OGD induced by Che-1

Note: ^{*} $P<0.05$ vs. LV-Control group. [&] $P<0.05$ vs. LV-Che-1 group.

3 讨论

随着世界范围内的人口老龄化的加剧,缺血性脑卒中发生率逐年增高,成为威胁人类健康的“三大杀手”之一^[12]。以往研究表明,缺血性脑卒中后神经细胞损伤的主要机制包括:兴奋性神经递质释放、钙离子超载、自由基损伤、凋亡信号激活及炎症反应等^[13,14]。目前针对这些机制设计和研制了多种神经保护剂,主要是通过抑制损伤过程中各种有害信号途径的激活,尽可能保护位于缺血半暗带区域中的神经元的功能^[15]。然而,这些脑保护剂在临床试验中均未达到预期的治疗效果,抗血小板药被证实只能作为二级预防药物使用,而 tPA 由于有导致出血的风险也只能使大约 5% 患者从中获益^[16,17]。本研究发现,过表达 Che-1 蛋白可显著减轻 OGD 所致的神经元损伤,提示 Che-1 蛋白很可能成为缺血性脑卒中后神经保护药物研发的新的靶点。

Che-1 属于 RNA 聚合酶 II 结合蛋白,在真核生物进化过程中均高度保守,在调节基因转录、细胞增殖、细胞周期、DNA 损伤应答及凋亡等方面扮演着重要作用^[18]。在 DNA 损伤过程中,Che-1 除了可以启动 p53 的转录外,还可以通过共价失调-毛细血管扩张突变基因 (Ataxia telangiectasia-mutated gene, ATM)/细胞周期检测点激酶 2 (Check point kinase 2, Chk-2) 磷酸化 Che-1,进而与 P53 以及抑癌基因乳腺癌 1 号基因 (Breast cancer 1, BRCA1) 直接结合,抑制 P53 介导的细胞凋亡。此外,研究证实,Che-1 在神经保护中也扮演重要角色。在原代培养皮层神经元中,Che-1 具有抗凋亡活性,可保护细胞免受淀粉样 β 肽诱导的神经元损伤。NRAGE 最近被鉴定为细胞死亡诱导剂,在神经元发育凋亡过程扮演重要的角色。Che-1 可与 NRAGE 直接结合,抵抗 NRAGE 介导的神经细胞凋亡^[19]。本研究发现,OGD 可显著增加原代培养皮层神经元 Che-1 蛋白的表达,而通过慢病毒转染的方法过表达 Che-1 可显著减轻 OGD 所致的神经元损伤及凋亡,提示 OGD 后 Che-1 的表达增高可能是机体的一种应激状态下的自我保护机制。

最新研究表明,在缺血缺氧条件下,神经元不仅发生凋亡与坏死,还可发生自噬,影响脑卒中后神经元的结构与功能。自噬是细胞精确调控的自我消化过程,在饥饿、分化及细胞正常生长时通过溶酶体系统吞噬胞质内大分子及细胞器,以维持细胞的生存、分化、生长以及稳定^[20]。生理条件下,自噬处于持续低水平活动状态,其功能主要是清除细胞内受损蛋白,发挥管家作用。应激状态下自噬会过度激活,导致大量胞浆内蛋白降解及线粒体等细胞器的自我消化,从而导致细胞能量代谢障碍,甚至死亡,称为 II 型程序性死亡,与许多疾病的病理机制有关^[21]。与凋亡和坏死不同,自噬在神经元损伤中发挥的作用尚存在争议^[22]。大部分研究表明,神经元在应激因素作用下自噬相关分子过度活化,大量神经元通过自噬的方式死亡;另有研究证实,在缺血再灌注损伤的早期,神经元通过自噬消除功能异常的细胞器,减少能量消耗,发挥神经保护作用^[23-25]。本研究在原代神经元 OGD 模型的基础上,采用免疫荧光和 western blot 的方法检测了自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3II 的表达。结果显示,OGD 后神经元 Beclin1 蛋白表达明显增高,且与 LC3II 抗体结合的荧光点数明显增多,提示 OGD 激活了神经元自噬。

雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素,早期被作为低毒性的抗真菌药物而广泛使用。随后的研究发现,雷帕霉素是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的特异性抑制剂,可通过抑制 mTOR 信号通路而激活细胞自噬^[26,27]。因此,为了进一步验证自噬在 Che-1 神经保护中发挥的作用,我们使用雷帕霉素处理神经元。结果显示,雷帕霉素减轻了 Che-1 过表达所致的 LDH 释放的下降,并且逆转了 LV-Che-1 的抗凋亡作用。以上结果提示,自噬的激活介导了 OGD 所致的神经元损伤,而 Che-1 过表达可通过抑制自噬发挥神经保护作用。

综上所述,本研究在神经元 OGD 模型上证实缺血性损伤可引起 Che-1 蛋白表达增高,过表达 Che-1 蛋白可通过抑制神经元自噬对 OGD 导致的损伤发挥保护作用,Che-1 蛋白可能成为缺血性脑卒中后神经保护药物研发的新靶点。

参考文献 (References)

- [1] Peisker T, Koznar B, Stetkarova I, et al. Acute stroke therapy: A review[J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27(1): 59-66
- [2] Lee JH, Zhang J, Yu SP. Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(3): 341-350
- [3] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2017, 135(10): e146-e603
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Floridi A, Fanciulli M. Che-1: a new effector of checkpoints signaling[J]. Cell Cycle, 2007, 6(7): 804-806
- [7] Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, et al. Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint[J]. Cancer Cell, 2006, 10(6): 473-486
- [8] Bruno T, Desantis A, Bossi G, et al. Che-1 promotes tumor cell survival by sustaining mutant p53 transcription and inhibiting DNA damage response activation[J]. Cancer Cell, 2010, 18(2): 122-134
- [9] Ishigaki S, Fonseca SG, Osowski CM, et al. AATF mediates an anti-apoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(5): 774-786
- [10] Chen T, Fei F, Jiang XF, et al. Down-regulation of Homer1b/c attenuates glutamate-mediated excitotoxicity through endoplasmic reticulum and mitochondria pathways in rat cortical neurons[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(1): 208-217
- [11] Chen T, Liu W, Chao X, et al. Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Neuroscience, 2011, 183: 203-211
- [12] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2014, 129(3): e28-e292
- [13] Griessenauer CJ, Fleming JB, Richards BF, et al. Timing and mechanism of ischemic stroke due to extracranial blunt traumatic cere-

- brovascular injury[J]. J Neurosurg, 2013, 118(2): 397-404
- [14] Chavez JC, Hurko O, Barone FC, et al. Pharmacologic interventions for stroke: looking beyond the thrombolysis time window into the penumbra with biomarkers, not a stopwatch[J]. Stroke, 2009, 40(10): e558-563
- [15] Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke[J]. Nat Med, 2008, 14(5): 497-500
- [16] Amaro S, Chamorro A. Translational stroke research of the combination of thrombolysis and antioxidant therapy [J]. Stroke, 2011, 42(5): 1495-1499
- [17] Fang MC, Cutler DM, Rosen AB. Trends in thrombolytic use for ischemic stroke in the United States [J]. J Hosp Med, 2010, 5 (7): 406-409
- [18] 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
- [19] Di Certo MG, Corbi N, Bruno T, et al. NUAGE 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
- [20] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698): 990-995
- [21] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period [J]. Nature, 2004, 432 (7020): 1032-1036
- [22] Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(10)
- [23] Balduini W, Carloni S, Buonocore G. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25 (Suppl 1): 30-34
- [24] Balduini W, Carloni S, Buonocore G. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury: evidence and speculations [J]. Autophagy, 2009, 5(2): 221-223
- [25] Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury [J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3): 329-339
- [26] Nair S, Ren J. Autophagy and cardiovascular aging: lesson learned from rapamycin[J]. Cell Cycle, 2012, 11(11): 2092-2099
- [27] Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, et al. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 46-56

(上接第 2906 页)

- [13] Bleier Benjamin S, Nocera Angela L, Iqbal Hufsa, et al. P-glycoprotein promotes epithelial T helper 2-associated cytokine secretion in chronic sinusitis with nasal polyps [J]. International forum of allergy & rhinology, 2014, 4(6): 488-494
- [14] Chu H, Hua X, Gao Q, et al. Analysis of the reason that patients with chronic sinusitis having a negative CT manifestation [J]. Journal of Clinical Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2003, 15 (5): 195-196
- [15] Nenad Pandak, Ivana Pajić-Penavić, Alen Sekelj, et al. Bacterial colonization or infection in chronic sinusitis [J]. Wiener klinische Wochenschrift, 2011, 123(23-24): 710-713
- [16] 姜琳.慢性鼻窦炎患者细菌学特征及耐药性分析[J/OL].河南医学研究, 2018, (14): 1-2
- [17] Lusk Rodney. Pediatric chronic rhinosinusitis [J]. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery, 2006, 14(6): 393-396
- [18] Neng Fisheri Kurniati, Gilang Putri Suryani, Joseph Iskendarso Sigit. Vasodilator Effect of Ethanolic Extract of Mulberry Leaves in Rat and Rabbit[J]. Procedia Chemistry, 2014, 13(18): 142-146
- [19] 王克勤,索朗杰布,朱承坡,等.鼻渊汤鼻腔冲洗对慢性鼻 - 鼻窦炎的疗效效果分析[J].四川中医, 2016, 34(08): 209-212
- [20] 龙益兴,陈豪,朱能.鼻渊汤配合西药治疗儿童慢性鼻窦炎疗效观察[J].新中医, 2015, 47(03): 187-188