

不同时间氧糖剥夺再灌注对 SH-SY5Y 细胞线粒体自噬及功能的影响*

刘雨霞^{1,2**}, 郑菊^{1,2}, 张文萍^{1,2}, 李毅^{1,2}, 吴昌学^{1,2}, 齐晓岚^{1,2}, 官志忠^{1,2}, 肖雁^{1,2***}

(1. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨不同时间点氧糖剥夺再灌注(OGD/R)后人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞线粒体自噬及功能改变。方法: 利用无糖 DMEM 及三气培养箱对 SH-SY5Y 细胞进行 OGD/R, 根据 OGD/R 不同时间将细胞分为 control 组、3 h/12 h 组、3 h/24 h 组、6 h/12 h 组及 6 h/24 h 组, OGD/R 后采用流式细胞术检测细胞线粒体膜电位及活性氧(ROS)含量, 采用 Western blot 法检测线粒体蛋白 Beclin1 及 P62 表达。结果: 与 control 组比较, OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位发生去极化($P < 0.01$)、胞内 ROS 含量升高($P < 0.01$)、3 h/24 h 组、6 h/12 h 组及 6 h/24 h 组线粒体 Beclin1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)、3 h/12 h、6 h/24 h 组线粒体 P62 蛋白表达升高($P < 0.05$); OGD/R 各组间比较, 3 h/24 h 组线粒体去极化程度、胞内 ROS 含量及线粒体 Beclin1 蛋白表达水平均较 3 h/12 h 组显著升高($P < 0.01$), 且 6 h/24 h 组 ROS 含量最高($P < 0.01$)。结论: SH-SY5Y 细胞 OGD/R 后线粒体功能受损且线粒体自噬活性升高, 且随着缺血时间及再灌注时间增加线粒体受损加重, 线粒体自噬也增加。

[关键词] SH-SY5Y; 再灌注; 流式细胞术; 活性氧; 线粒体膜电位; 线粒体自噬; 氧糖剥夺

[中图分类号] R743; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)04-0399-07

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.005

The Effect of Oxygen Glucose Deprivation Reperfusion on Mitochondrial Function and Mitophagy in SH-SY5Y Cells at Different Time Points

LIU Yuxia^{1,2}, ZHENG Ju^{1,2}, ZHANG Wenping^{1,2}, LI Yi^{1,2}, WU Changxue^{1,2},
QI Xiaolan^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2}, XIAO Yan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mitochondrial function and mitophagy in SH-SY5Y cells at different time points after oxygen glucose deprivation (OGD)/reperfusion (R). **Methods:** SH-SY5Y cells were subjected to OGD by using sugar-free DMEM and three-gas incubator. After deprivation in the corresponding time, reperfusion (R) was performed. The cells were divided into the control group, the 3 h/12 h group, the 3 h/24 h group, the 6 h/12 h group and the 6 h/24 h group according to OGD/R time. The mitochondrial membrane potential changes and reactive oxygen species (ROS) levels were detected by flow cytometry. The expression of mitochondrial proteins Beclin1 and P62 was detected by Western blot. **Results:** Compared with the controls, the mitochondrial membrane potential of

*[基金项目] 国家自然科学基金(81660207); 贵州省科技厅重大专项[黔科合重大专项字(2014)6008]; 贵州省科技厅基金项目[黔科合基础(2017)1149]、[黔科合平台人才(2016)5612]; 教育部创新团队(IRT13058)

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: xiaoyanhanon@hotmail.com

网络出版时间: 2019-04-26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190425.2119.005.html>

SH-SY5Y cells was depolarized and the intracellular ROS content increased after OGD/R. The expression of Beclin1 in mitochondrial proteins was observed in 3 h/24 h, 6 h/12 h and 6 h/24 h. The expression of P62 in mitochondrial protein increased in the 3 h/12 h group and 3 h/24 h group. Compared with the OGD/R group, the mitochondrial depolarization increased and the expression of Beclin1 was higher in 3 h/24 h than in 3 h/12 h. The ROS content was the highest in the 6 h/24 h group.

Conclusion: After OGD/R in SH-SY5Y cells, mitochondrial function is impaired and mitochondrial autophagy activity increases, and mitochondrial damage increases with the increase of ischemia time and reperfusion time, and the mitochondrial autophagy also increases.

[**Key words**] SH-SY5Y; reperfusion; flow cytometry; reactive oxygen species; mitochondrial membrane potential; mitophagy; oxygen and glucose deprivation

血管性痴呆 (VaD) 被广泛认为是除阿尔茨海默病外的第二种痴呆类型,其临床表现主要为神经认知障碍,包括行为症状和运动异常^[1]。缺血再灌注所致神经元损伤是引起 VaD 的主要原因,其机制主要包括炎症反应及氧化应激。线粒体作为细胞呼吸和能量产生的中心细胞器,也是缺血再灌注损伤的靶细胞器^[2],众多研究表明当缺血再灌注发生时,神经元细胞内线粒体功能受到损伤^[3-4],因此及时消除受损或功能失调的线粒体被认为是在氧糖剥夺再灌注 (oxygen and glucose deprivation, OGD/R) 中保护细胞免受缺血应激的必要条件^[5]。线粒体自噬是由自噬选择性清除线粒体的过程,线粒体自噬可以识别并去除异常线粒体,维持线粒体的内稳态,线粒体蛋白中 Beclin1、P62 的表达水平能很好地反应胞内线粒体自噬的活性^[6]。本研究对人神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞体外构建不同时间的 OGD/R 模型,观察 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量、线粒体蛋白 Beclin1 及 P62 表达变化,探讨不同时间 OGD/R 对 SH-SY5Y 细胞线粒体自噬及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂及仪器

1.1.1 细胞及试剂 SH-SY5Y 细胞购自美国典型菌种保藏库 (american type culture collection, ATCC, 货号 ATCC® CRL-2266™)。试剂 DMEM/F12 (1:1) 完全培养基、无糖 DMEM、澳洲胎牛血清、0.25% 胰酶消化液 (购自美国 Gibco 公司), Beclin1 抗体购自美国 Abcam 公司, SQSTM1/P62 抗体购自美国 CST 公司, COX IV 抗体购自美国 CST 公司, HRP 标记的抗兔二抗购自美国 CST 公司, BCA 蛋白定量试剂、ECL-Plus 发光液购自美国

Thermo Fisher Scientific 公司, ROS 检测试剂盒购自北京贝博公司, JC-1 流式试剂盒购自美国 BD 公司, 细胞线粒体提取分离试剂盒购自碧云天生物试剂公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.1.2 仪器 ELX800UV 酶标仪 (美国 Bio-Tec 公司), Western blot 跑胶装置电源 (北京百晶科技公司), Varioskan LUX 多通道酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), GeneGnome XRQ 化学发光成像仪 (英国 SYNGENE 公司), FACS Verse 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y 细胞培养及分组 将完全培养基、血清及双抗按 89:10:1 的比例制成工作培养基, 取冻存 SH-SY5Y 细胞悬液 1 mL、工作培养基 10 mL 加入透气盖培养瓶中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中正常培养, 次日换液。培养 3~5 d 时进行传代, 待第二代细胞均匀铺满瓶底的 80% 时, 取 1.5×10^6 /孔细胞于 6 孔板中; 待第三代 SH-SY5Y 细胞处于对数生长期时对细胞进行 OGD/R。根据剥夺及再灌注的时间不同, 将细胞分为 5 组: control 组 (不作 OGD/R)、3 h/12 h 组 (氧糖剥夺 3 h 后再灌注 12 h)、3 h/24 h 组 (氧糖剥夺 3 h 后再灌注 24 h)、6 h/12 h 组 (氧糖剥夺 6 h 后再灌注 12 h)、6 h/24 h 组 (氧糖剥夺 6 h 后再灌注 24 h)。

1.2.2 SH-SY5Y 细胞 OGD/R 模型的制备 每 99 mL 无糖 DMEM 中加入 1 mL 双抗, 制成 1% 双抗的无糖培养基。取处于对数生长期 SH-SY5Y 细胞进行氧糖剥夺: 弃去板内工作培养基, 1 × PBS 洗 3 次 (1 min/次), 每孔加入无糖培养基 2 mL, 将六孔板置于 37 °C、5% CO₂、94% N₂、1% O₂ 的三气培养箱中进行氧糖剥夺 (对照组与 3 h/24 h 组共同换液, 每次换液后用 1 × PBS 洗后每孔加入工作培养基 2 mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养), 剥夺

相应时间(3 h 或 6 h)后弃去无糖培养基,1 × PBS 洗 3 次(1 min/次),换工作培养基 2 mL,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中正常培养进行再灌注,时间分别为 12 h 或 24 h。

1.2.3 细胞线粒体膜电位检测 采用流式细胞术,每只 JC-1 冻干粉加入 DMSO 溶解 125 μL 成 JC-1 储存液,JC-1 储存液与 1 × Assay Buffer 按 99:1 的比例配置 JC-1 工作液;阳性对照用 CCCP 稀释 1 000 倍处理细胞 20 min。OGD/R 后用 0.25% 不含 EDTA 的胰酶消化、收集细胞,每孔取 1 × 10⁶ 个细胞,1 × PBS 洗 1 次,用 JC-1 工作液 0.5 mL 悬浮细胞,放入 37 °C、5% 培养箱中孵育 15 min,孵育完毕后加入 1 × Assay Buffer 2 mL 洗涤,1 500 r/min 离心 5 min,1 × Assay Buffer 洗涤 2 次后去除多余探针,将细胞沉淀重悬于 0.5 mL 的 1 × Assay Buffer 中,吹打重悬细胞,用 40 μm 过滤网筛除去细胞团块及 JC-1 颗粒物质,上机检测。

1.2.4 细胞 ROS 含量测定 采用流式细胞术,用完全培养基按 1:1 000 比例稀释 DCFH-DA 探针,OGD/R 后的细胞用不含 EDTA 胰酶消化、离心收集细胞,1 × PBS 洗涤细胞,阴性对照(blank)直接用 0.5 mL 完全培养基重悬细胞,其余组将细胞沉淀重悬于 1 mL 稀释的 DCFH-DA 探针中,放入 37 °C、5% 培养箱中孵育 20 min(为使探针与细胞更好接触,每 4 min 颠倒混匀 1 次);用 1 mL 完全培养基洗 3 次(分别 1 500 r/min 离心 5 min),充分去除未进入细胞的探针。最终用完全培养基 0.5 mL 吹打重悬细胞,用 40 μm 过滤网筛除去细胞团块及 JC-1 颗粒物质,即刻上机检测,平均荧光强度表示 ROS 含量。

1.2.5 SH-SY5Y 细胞线粒体中 Beclin1、P62 蛋白表达 采用 Western blot 方法,OGD/R 后的细胞用 0.25% 胰酶消化,离心收集细胞,冰浴 1 × PBS 洗 1 次,2 000 r/min,4 °C 离心 5 min,每管细胞加入 500 μL 分离试剂(每 1 mL 线粒体分离试剂临用前加入 PMSF 10 μL),冰浴 15 min 后玻璃匀浆器匀浆 30 次,2 700 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清 9 000 r/min,4 °C 离心 10 min,弃上清,每管沉淀加入线粒体裂解液 100 μL(100 μL 线粒体裂解液临用前加入 PMSF 1 μL),冰上放置 20 min(每 5 min 旋涡混匀 1 次),12 000 r/min,4 °C 离心 10 min,收集上清即为线粒体蛋白。BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,每孔取 20 μg 线粒体蛋白(20 μL)上样于 12% 的 SDS-PAGE 凝胶后进行电泳分离,于 Gene

Gnome XRQ 中曝光。COX IV 作为内参。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行数据分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 后线粒体膜电位

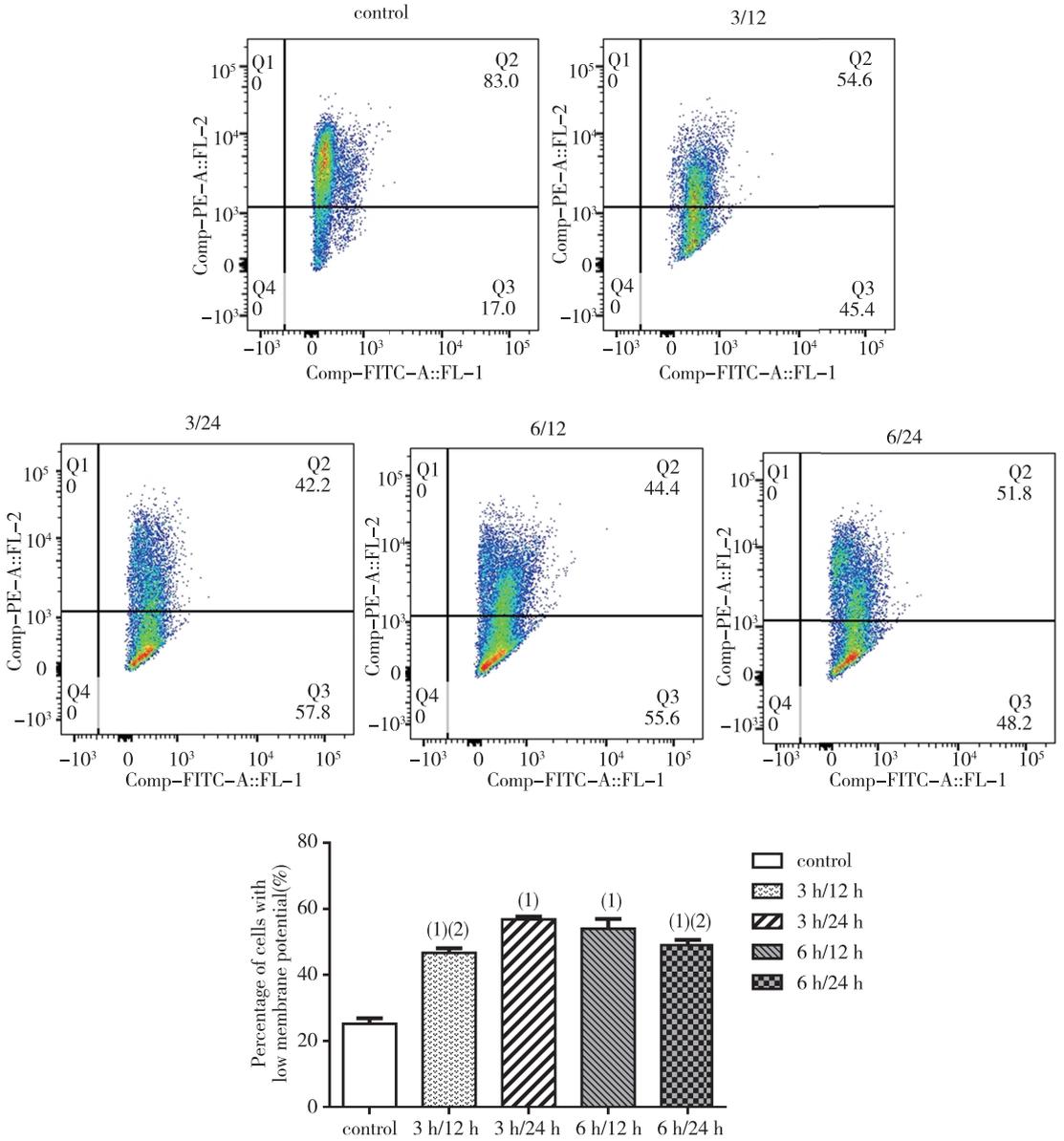
细胞 OGD/R 相应时间后,用 JC-1 染料标记,流式细胞术评估 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位(MMP, $\Delta\psi_m$)变化。如图 1 所示,JC-1 在正常线粒体内形成聚集体,在 Q2 象限中显示红色荧光;当线粒体发生去极化时,JC-1 以单体形式存在,表现为 Q3 象限的绿色荧光。OGD/R 后,Q3 象限中细胞的比例增加,JC-1 分裂成绿色荧光单体,表现为低膜电位(绿色荧光)的细胞百分比增加(可反映线粒体膜电位的去极化程度);半定量分析结果显示,与 control 组比较,SH-SY5Y 细胞 OGD/R 后线粒体膜电位均发生去极化($P < 0.01$),且 3 h/24 h 组的线粒体膜电位去极化程度最高。

2.2 OGD/R 后细胞内 ROS 含量

利用 DCFH-DA 探针标记处理相应时间的 SH-SY5Y 细胞,流式细胞术检测细胞内 ROS 含量。如图 2 所示,在胞内 DCFH-DA 被活性氧氧化生成荧光物质 DCF,OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞荧光增多,表示 OGD/R 后细胞内 ROS 含量增高,用 ROS 荧光强度表示胞内 ROS 相对含量;半定量结果显示,与与 control 组比较,细胞 OGD/R 后胞内 ROS 含量增高($P < 0.01$),且再灌注 24 h 组 ROS 含量较剥夺相同时间再灌注 12 h 组高($P < 0.01$),且 6 h/24 h 组 ROS 含量最高($P < 0.01$)。

2.3 SH-SY5Y 细胞线粒体中 Beclin1 及 P62 蛋白表达

用线粒体蛋白 COX IV 做内参,Western bolt 检测各组细胞线粒体中 Beclin1 及 P62 蛋白表达,以对照组细胞线粒体中 Beclin1 及 P62 蛋白表达量为对照,观察各 OGD/R 组细胞线粒体蛋白的相对表达量。如图 3 所示:与 control 组比较,3 h/24 h 组、6 h/12 h 组及 6 h/24 h 组线粒体中 Beclin1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),且 3 h/24 h 组较 3 h/12 h 组更高($P < 0.01$);各组 P62 蛋白表达比较,3 h/12 h 组、3 h/24 h 组 P62 蛋白表达与对照组比较显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



(¹)与 control 组比较 $P < 0.01$; (²)与 3 h/24 h 组比较 $P < 0.01$

图 1 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的变化情况

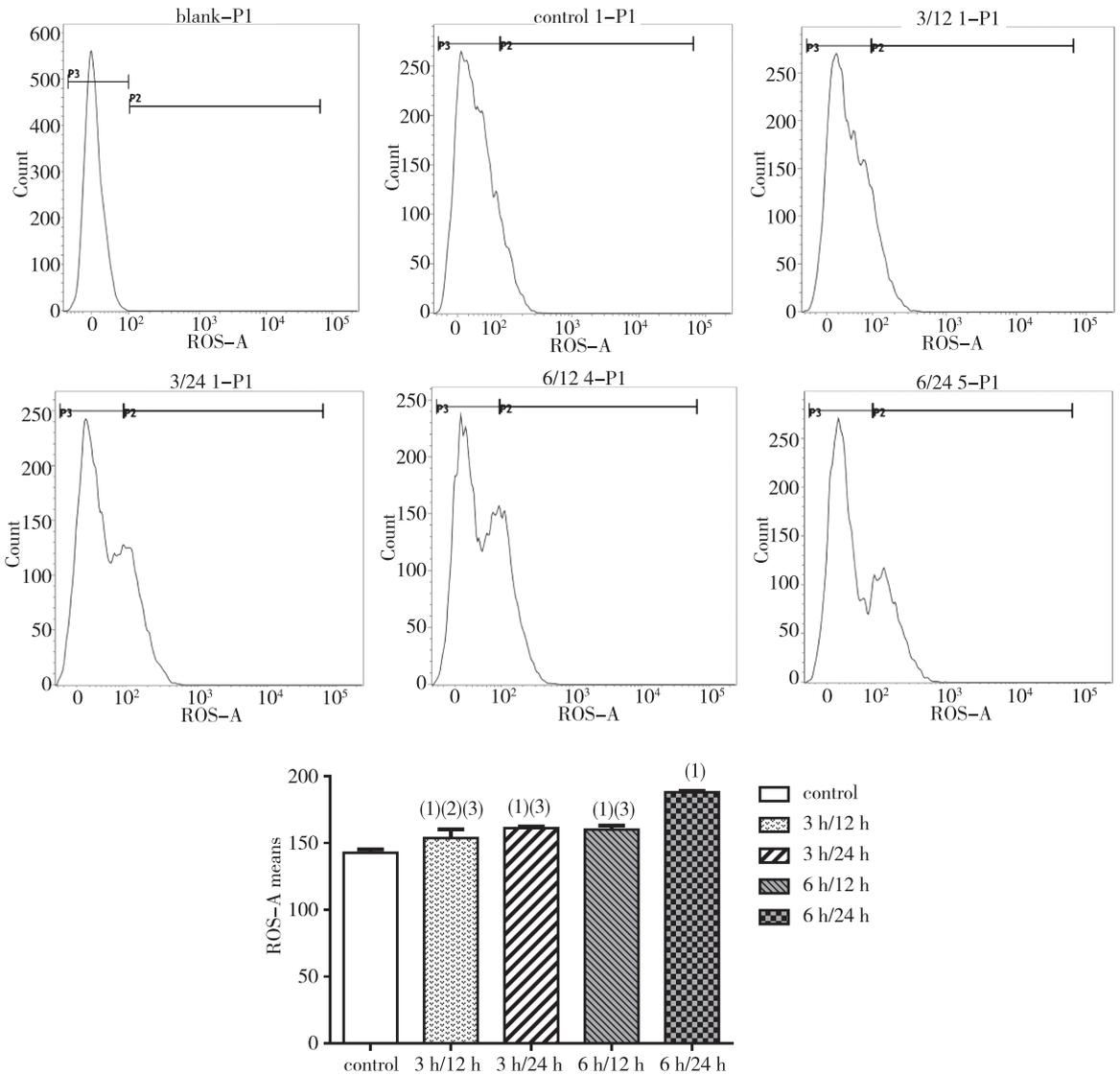
Fig. 1 Changes of mitochondrial membrane potential in SH - SY5Y cells after OGD/R

3 讨论

VaD 作为最常见的老年期痴呆之一, 患病人数占有老年痴呆人数的 15%, 其发病率随中国人口老龄化而逐年升高^[7]。脑卒中后缺血缺氧是 VaD 的常见诱因之一, 缺氧导致氧化应激和引发炎症反应, 氧化应激使血管内皮细胞, 胶质细胞和神经元细胞受损, 这些病理变化发生在大脑并导致 VaD, 其中神经元细胞的损伤是最主要诱因之

一^[8]。对 SH-SY5Y 细胞系进行 OGD/R 作为缺血性神经元损伤快速且灵敏的体外模型已被广泛用作潜在神经保护剂开发^[9-10]。

线粒体是一种重要的细胞器, 在活细胞中主要负责能量代谢和 ROS 生成。在脑卒中后的慢性低灌注可引发神经系统中神经元细胞内线粒体发生功能障碍^[11]。缺血再灌注可以阻断 ROS 产生与细胞抗氧化酶的解毒和清除能力之间的稳态, 这将引起脑组织内线粒体氧化应激激活并进一步加重缺血引起的组织损伤^[12-13]。同时线粒体膜通透



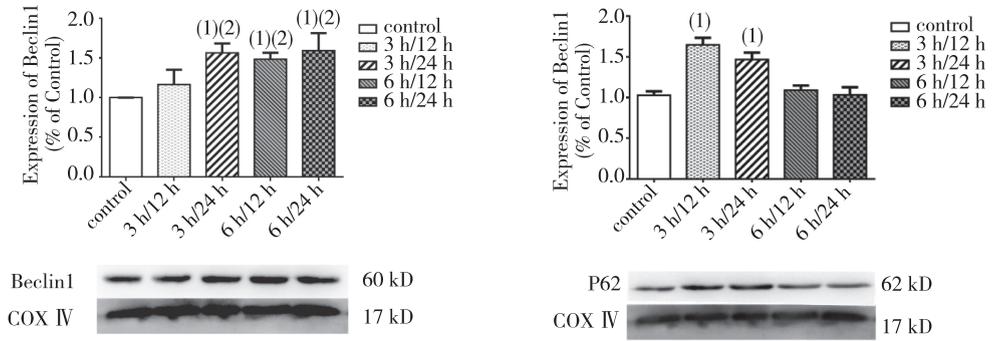
(¹) 与 control 组比较, $P < 0.01$; (²) 与 3 h/24 h 组比较, $P < 0.01$; (³) 与 6 h/24 h 组比较, $P < 0.01$

图 2 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞内 ROS 的变化情况

Fig. 2 Changes of ROS in SH-SY5Y cells after OGD/R

性转换孔 (MPTP) 上的硫醇被氧自由基氧化而诱导开放从而导致线粒体膜电位发生去极化^[14]。有研究发现在 2-VO 大鼠中, 观察到线粒体呼吸链复合酶活性降低, 线粒体膜电位发生去极化, 同时 ROS 含量升高^[15], 本研究通过对 SH-SY5Y 细胞系进行 OGD/R 体外模拟脑卒中患者脑缺血再灌注。通过不同时间的 OGD/R 探索缺血不同时间段下线粒体功能改变及线粒体自噬程度。从实验结果可以看出 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位发生去极化, 且胞内 ROS 含量增加, 提示 SH-SY5Y 细胞 OGD/R 后细胞内线粒体功能受损。与 YU 等^[16]的研究结果, 缺血再灌注与神经元细胞线粒体受损有关, 并能引起神经元线粒体自噬一致。

OGD/R 后, 需要有效的清除机制及时清除受损线粒体以保证细胞状态, 特别是神经元这类细胞线粒体受损可导致细胞死亡的高活力低再生能力的细胞更为重要^[17-18]。自噬是介导功能障碍线粒体去除的关键细胞机制之一, 是一种囊泡介导的用于受损物质的识别、隔离并将其运送至溶酶体进行降解并释放营养物质的胞内分解代谢途径。自噬对受损线粒体的选择性清除被称为线粒体自噬, 其可以识别并去除异常线粒体维持线粒体内稳态^[5]。但目前仍没有统一的系统理论来解释线粒体自噬在脑缺血中的作用, 但可能与脑缺血时间及线粒体自噬程度有关。Beclin1 是自噬标志性蛋白, 在评估自噬发生程度方面有重要作用^[19], P62



(¹) 与 control 组比较, $P < 0.01$; (²) 与 3 h/12 h 组比较, $P < 0.01$

图 3 各组 SH-SY5Y 细胞线粒体中 Beclin1 及 P62 蛋白表达 (Western bolt)

Fig. 3 Expression of Beclin1 and P62 in mitochondria of SH-SY5Y cells in each group

又称为 SQSTM1, 是一种泛素结合蛋白, 介导线粒体与自噬相关蛋白的结合, 从而被选择性的转移到自噬机器中进行降解, 常用来监测自噬的发生、蛋白底物的清除, 以及自噬的抑制等过程^[20]。线粒体蛋白中 Beclin1、P62 的表达量能很好地反应胞内线粒体自噬的活性, 在本研究发现 OGD/R 后 SH-SY5Y 线粒体蛋白中 Beclin1 表达量升高, 3 h/12 h 组及 3 h/24 h 组 P62 表达量升高, 说明 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞线粒体自噬被激活, 发生线粒体自噬, 且 3 h/24 h 组 Beclin1 表达量明显高于 3 h/12 h 组, 说明在某一时间限度内, 神经元线粒体自噬活性随着氧糖剥夺时间及再灌注时间的增加而升高。

综上所述, 当 SH-SY5Y 细胞发生 OGD/R 时, 线粒体功能受到损伤, 当 OGD/R 时间超过 3 h/24 h 时神经细胞发生线粒体自噬, 且在某一时间限度内, 神经元线粒体自噬活性随着氧糖剥夺时间及再灌注时间增加而升高。

4 参考文献

[1] RAJ N, KALARIA. The pathology and pathophysiology of vascular dementia [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134: 226 - 239.

[2] SUN J, LI Y Z, DING Y H, et al. Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions in vitro and cerebral ischemia/reperfusion injury in vivo [J]. *Brain Res*, 2014, 1589: 126 - 139.

[3] LUO Y G, YANG X F, ZHAO S T, et al. Hydrogen sul-

fide prevents OGD/R-induced apoptosis via improving mitochondrial dysfunction and suppressing an ROS-mediated caspase-3 pathway in cortical neurons [J]. *Neurochemistry International*, 2013, 63(8): 826 - 831.

[4] LI Y, ZHANG W T, CHEN C, et al. Inotodiol protects PC12 cells against injury induced by oxygen and glucose deprivation/restoration through inhibiting oxidative stress and apoptosis [J]. *Journal of Applied Biomedicine*, 2017, 16(2): 126 - 132.

[5] YU S, ZHENG S, LENG J, et al. Inhibition of mitochondrial calcium uniporter protects neurocytes from ischemia/reperfusion injury via the inhibition of excessive mitophagy [J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 628: 26 - 29.

[6] YOULE R J, NARENDRA D P. Mechanisms of mitophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1): 9 - 14.

[7] JOHN T B, ALAN T. Vascular dementia [J]. *The Lancet*, 2015, 386(10004): 1698 - 1706.

[8] VENKAT P, CHOPP M, CHEN J. Models and mechanisms of vascular dementia [J]. *Experimental Neurology*, 2015, 272: 97 - 108.

[9] MARUTANI E, KOSUGI S, TOKUDA K, et al. A novel hydrogen sulfide-releasing N-methyl-D-aspartate receptor antagonist prevents ischemic neuronal death [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(38): 32124 - 32135.

[10] XIONG S Y, XU Y P, MA M M, et al. Neuroprotective effects of a novel peptide, FK18, under oxygen-glucose deprivation in SH-SY5Y cells and retinal ischemia in rats via the Akt pathway [J]. *Neurochemistry International*, 2017, 108: 78 - 90.

[11] ZHU Q L, LI Y X, ZHOU R, et al. Neuroprotective effects of oxysophocarpine on neonatal rat primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion [J]. *Cell Mol Neurobiol*,

2018,38(2):529-540.

- [12] DOYLE K P, SIMON R P, STENZELPOORE M P. Mechanisms of ischemic brain damage. [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(3):310-318.
- [13] MEHTA S L, MANHAS N, RAGHUBIR R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. *Brain Research Reviews*, 2007, 54(1):34-66.
- [14] BAKTHAVACHALAM P, SHANMUGAM P S T. Mitochondrial dysfunction-silent killer in cerebral ischemia [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2017, 374(15):417-423.
- [15] LI H, LIU Y, LIN L T, et al. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats [J]. *Neurochemistry International*, 2016, 92:35-42.
- [16] YU S, ZHENG S, LENG J, et al. Inhibition of mitochondrial calcium uniporter protects neurocytes from ischemia/reperfusion injury via the inhibition of excessive mitophagy [J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 628(15):24-29.
- [17] LIN M T, BEAL M F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Nature*, 2006, 443(7113):787-795.
- [18] WALLACE D C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine [J]. *Annu Rev Genet*, 2005, 39:359-407.
- [19] 秦正红. 自噬生物学与疾病 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2015:409-437.
- [20] 张坤西, 张洁, 郭艳苏. P62 蛋白的研究 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2016, 24(1):59-61.
(2019-01-03 收稿, 2019-03-23 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 丁廷森
- (上接第 398 页)
- [14] MEHTA S L, MANHAS N, RAGHUBIR R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. *Brain Research Reviews*, 2007, 54(1):34-66.
- [15] BAKTHAVACHALAM P, SHANMUGAM P S T. Mitochondrial dysfunction-silent killer in cerebral ischemia [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2017, 374(15):417-423.
- [16] SANDERSON T H, RAGHUNAYAKULA S, KUMAR R. Neuronal hypoxia disrupts mitochondrial fusion [J]. *Neuroscience*, 2015, 301:71-78.
- [17] HÜTTEMANN M, PECINA P, RAINBOLT M, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(3):369-381.
- [18] OHTA H, NISHIKAWA H, KIMURA H, et al. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats [J]. *Neuroscience*, 1997, 79(4):1039-1050.
- [19] ULRICH P T, KROPPESTEDT S, HEIMANN A, et al. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29(11):2412-2420.
- [20] LUSTIGE S D, SERRA J A, KOHAN S, et al. Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells and serum in demented patients and in aging [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 1993, 115(1):18-25.
- [21] LI H, LIU Y, LIN L T, et al. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats [J]. *Neurochemistry International*, 2016, 92:35-42.
- [22] 田茂, 井沆, 董艳军, 等. 外源性硫化氢对血管性痴呆模型大鼠学习记忆的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2014, 31(11):969-972.
(2019-01-12 收稿, 2019-03-22 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 张启芳