

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00940

· 论 著 ·

血管性痴呆大鼠海马 CA1 区自噬及微管相关蛋白 1 轻链 3 的表达

刘斌*, 唐静, 袁敏, 李世英

河北联合大学附属医院神经内一科, 唐山 063000

[摘要] **目的** 观察血管性痴呆(vascular dementia, VD)模型大鼠海马 CA1 区自噬及微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3, LC3) 的表达, 探讨自噬在血管性痴呆发病中的可能作用。**方法** 大鼠随机分为假手术组(sham 组)、血管性痴呆模型组(VD 组)和 Wortmannin 自噬抑制剂组(WM 组), 每组又随机分为模型制备后 1、2、4、8、12 周 5 个亚组。采用四血管阻断法制作血管性痴呆模型, Morris 水迷宫法检测学习记忆能力, 透射电镜观察自噬体的形成, 蛋白质印迹法检测 LC3 II/LC3 I 的比值作为自噬活性的指标。**结果** 与假手术组相比, VD 组大鼠平均逃避潜伏期延长($P < 0.05$ 或 0.01), 穿越平台次数减少($P < 0.05$ 或 0.01); 与 VD 组比较, WM 组大鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.05$ 或 0.01), 穿越平台次数增加($P < 0.05$ 或 0.01)。VD 组大鼠海马 CA1 区 1 周时神经细胞核膜凹陷, 胞核浓缩, 线粒体肿胀, 可见自噬体、溶酶体; 4 周时自噬体、溶酶体数量显著增多; 12 周时仍可见自噬体。WM 组神经元损伤较 VD 组减轻, 自噬体数量减少。VD 组大鼠海马 CA1 区 LC3 II/LC3 I 比值在 1 周时升高, 4 周时达到高峰, 8 周时开始下降, 12 周时仍较高。WM 组各时间点 LC3 II/LC3 I 比值较 VD 组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。**结论** 血管性痴呆大鼠海马 CA1 区自噬活性被激活, 可能参与了血管性痴呆的发生发展。

[关键词] 血管性痴呆; 海马; 自噬; 微管相关蛋白 1 轻链 3

[中图分类号] R 749.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)09-0940-06

Expression of autophagy and microtubule-associated protein 1 light chain 3 in hippocampus CA1 area of vascular dementia rats

LIU Bin*, TANG Jing, YUAN Min, LI Shi-ying

First Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of autophagy and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in hippocampus CA1 area of vascular dementia rats, so as to explore the role of autophagy in the pathogenesis of vascular dementia. **Methods** The rats were randomly divided into sham operation group, vascular dementia model group (VD group) and Wortmannin autophagy inhibitor group (WM group). Each group was further divided into 1, 2, 4, 8 and 12 week subgroups after the successful model preparation ($n = 6$). Vascular dementia rat models were established by blocking four vessels. The learning and memory abilities were examined by Morris water maze, autophagy was observed by transmission electron microscope, and the ratio of autophagy-associated protein LC3 II/LC3 I was obtained by Western blotting analysis. **Results** Compared with the sham operation group, the escape latency was significantly increased in the VD group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the times of traversing terrace were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the VD group, the escape latency was significantly decreased and the times of traversing terrace was significantly increased in WM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the hippocampus CA1 area of VD group, the nuclear membrane of neurons was sagged, the nuclei was condensed, mitochondria were swollen, and autophagosomes and lysosomes were observed in week 1; the autophagosomes and lysosomes were increased in week 4, and they could still be found in week 12. The neuronal damage was slighter and the autophagosomes were reduced in WM group compared with VD group. In CA1 area of hippocampus of VD group, the LC3 II/LC3 I ratio was increased in week 1, peaked in week 4, began to decline in week 8, and still kept at a high level in week 12. Compared with the VD group, the LC3 II/LC3 I ratio was significantly decreased in WM group at all time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

[收稿日期] 2013-01-14 **[接受日期]** 2013-06-23

[基金项目] 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZH2012046). Supported by Key Science and Technology Research Project of Higher Education of Hebei Province (ZH2012046).

[作者简介] 刘斌, 硕士, 教授、主任医师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0315-3725963, E-mail: liubintsh@126.com

$P < 0.01$). **Conclusion** Autophagy is activated in CA1 area of hippocampus of VD rats, and may play an important role in the pathogenesis of VD.

[Key words] vascular dementia; hippocampus; autophagy; microtubule-associated protein 1 light chain 3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(9): 940-945]

自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是真核细胞特有的生命现象^[1]。自噬是一种高度调控的细胞内成分降解方式,一方面能够清除细胞内受损的细胞器如线粒体等,在维持神经细胞稳定方面发挥着重要作用;另一方面,过度激活可以导致神经细胞死亡,被称为自噬性细胞死亡^[2]。自噬的不同作用可能取决于细胞受损伤的程度、自噬激活的程度和病理因素的持续存在与否。研究表明,自噬与衰老、肿瘤、感染、心脏疾病、神经变性疾病、肌肉疾病和脑血管病等多种疾病相关^[3-5],从而对这些疾病的发病机制起着重要的作用^[6-9]。但是目前对血管性痴呆(vascular dementia, VD)发病过程中自噬的作用研究较少,自噬对血管性痴呆患者神经细胞的作用尚未明确。本研究旨在观察血管性痴呆模型大鼠海马CA1区自噬及微管相关蛋白1轻链3(LC3) II/LC3 I比值的表达与变化,探讨自噬在血管性痴呆发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 Anti-LC3 单抗、DTT、HRP 偶联的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG、RIPA 组织细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、渥曼青霉素(Wortmannin),均购于北京碧云天生物技术公司。Morris 水迷宫由淮北正华生物仪器设备有限公司提供,电凝仪器由张家港市航天医疗电器有限公司提供,透射电子显微镜由日本 Hitachi 公司提供。

1.2 实验动物及分组 健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 90 只,体质量 250~280 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0013。在河北联合大学屏障环境动物实验室自由进食喂养,室温控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,自然光照,实验前适应喂养 2 周。动物分组:实验大鼠随机分为假手术组(sham 组)、血管性痴呆模型组(VD 组)和 Wortmannin 自噬抑制剂组(WM 组),每组又随机分为模型制备后 1、2、4、8、12 周 5 个亚组($n=6$)。

1.3 大鼠血管性痴呆模型的制备 采用改良 Pulsinelli 四血管阻断(4-VO)法制作血管性痴呆大鼠模型^[10]。大鼠于术前禁食 12 h,用 10%的水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉后,背侧颈正中切口,暴露

双侧第 1 颈椎横突小孔,用直径 0.5 mm 电凝针插入双侧翼小孔烧灼双侧椎动脉,造成永久性闭塞。再将大鼠仰卧固定,同时行腹侧颈正中切口,分离双侧颈总动脉,以 4 号丝线穿线备用。24 h 后用微动脉夹夹闭双侧动脉 5 min,共夹闭 3 次,每次间隔 1 h。术后手术部位施以庆大霉素喷洒处理以抗感染,然后缝合,常规饲养观察。自噬抑制剂(WM)组腹腔注射 Wortmannin(0.5 mg/kg),注药 1 h 后再按上述方法制作模型。假手术组步骤同上,但不做缺血处理。术后大鼠均连续 3 d 给予庆大霉素,预防感染。

1.4 大鼠学习记忆能力测试 采用 Morris 水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力^[11],包括:定位航行实验和空间探索实验。

1.5 大鼠海马组织超微结构的观察 用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)对大鼠进行深度麻醉,以 4%多聚甲醛-2.5%戊二醛混合灌流液灌注固定,迅速断头取脑,冠状切取海马段脑组织(1 mm³)数块,放入 2.5%戊二醛中固定,制成超薄切片,在透射电镜下观察超微结构变化。

1.6 蛋白质印迹测定蛋白表达 用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)对大鼠进行深度麻醉。断头后于冰上开颅取脑,用冷的 PBS 漂洗残余血,立即分离出新鲜海马,将海马组织置于 15 mL 离心管中,组织匀浆机 12 000 r/min ($r=3$ cm)匀浆 15 s,加入 4℃预冷的组织裂解液,振荡混匀,4℃作用 30 min,细胞悬液 4℃低温 12 000×g 离心 10 min,留取上清液 4℃保存。经蛋白定量后分装,用 4℃预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)调蛋白浓度至一致(750 μg/mL),加入等体积的上样缓冲液,沸水中煮至少 5 min。

1.7 总蛋白浓度及 LC3 蛋白表达的测定 按照 BCA 蛋白测定试剂盒操作步骤,依据不同浓度标准蛋白光密度(D)值绘制标准曲线,根据总蛋白不同 D 值测定总蛋白浓度。LC3 蛋白表达水平的测定:等量蛋白样品(每个泳道 50 μg)经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,以湿转法电转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvi-

nylidene fluoride, PVDF)膜上。转移缓冲液(甘氨酸 5.8 g, Tris 2.9 g, SDS 0.37 g, 800 mL 重蒸馏水溶解后加入 200 mL 甲醇)。转移后的 PVDF 膜放入封闭液中封闭,然后加入稀释好的一抗 LC3 (1 : 1 000) 4℃孵育过夜。PBS 洗膜,加入相应稀释好的二抗(羊抗兔, 1 : 2 000), 37℃反应 1 h, 洗膜,以 ECL 显色,胶片曝光显影,结果用 Image J 软件分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组之间均数比较采用 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆行为能力的比较 结果(表 1、表 2)表明:第 1、2 天,各组大鼠寻找平台的时间差异无统计学意义;与假手术组相比,从第 3 天起,VD 组大鼠平均逃避潜伏期延长($P < 0.05$ 或 0.01);与 VD 组相比,从第 3 天起,WM 组大鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.05$ 或 0.01)。与假手术组比较,VD 组大鼠穿越平台次数减少($P < 0.05$ 或 0.01);与 VD 组比较,WM 组大鼠穿越平台次数增加($P < 0.05$ 或 0.01)。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期的比较

Tab 1 Comparison of escape latencies of rats in each group

t/s; n=6, $\bar{x} \pm s$

Group	Time during experiment				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Sham					
1 week	59.40±2.16	44.06±1.21	31.29±3.31	24.00±1.78	13.66±2.63
2 weeks	58.83±2.63	45.83±2.96	31.83±2.48	24.33±2.16	14.16±3.07
4 weeks	58.00±2.89	46.00±2.31	33.16±2.40	26.50±2.58	15.83±1.47
8 weeks	59.33±3.65	47.06±2.28	33.29±2.04	25.33±2.40	15.66±3.18
12 weeks	57.50±2.28	46.66±1.87	30.26±2.42	25.00±1.21	14.66±2.09
VD					
1 week	59.50±3.93	51.00±1.41	45.10±1.72 [△]	35.30±3.44 [△]	26.33±2.73 [△]
2 weeks	59.33±2.58	56.66±2.58	48.16±2.04 [△]	38.16±3.18 [△]	32.50±1.87 [△]
4 weeks	59.00±4.04	53.33±2.94	52.66±2.16 ^{△△}	46.16±2.84 ^{△△}	35.83±3.18 ^{△△}
8 weeks	58.83±2.31	49.83±2.48	46.66±1.86 [△]	40.00±1.78 [△]	32.00±2.09 [△]
12 weeks	57.50±3.72	50.83±3.31	46.50±2.42 [△]	37.66±1.21 [△]	30.50±1.87 [△]
WM					
1 week	57.66±2.42	50.83±2.63	39.50±1.87*	31.33±2.80*	23.00±2.36*
2 weeks	58.00±2.89	50.83±1.16	44.16±2.04*	35.66±2.58*	27.83±3.18*
4 weeks	58.16±3.65	51.83±3.31	48.00±1.67**	38.16±2.40**	29.16±1.47**
8 weeks	57.83±3.43	52.50±2.88	46.16±2.28*	37.83±2.16*	28.16±1.16*
12 weeks	58.50±2.07	52.00±4.28	45.83±3.18*	35.66±1.75*	27.50±5.78*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs VD group at the same time point; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time point.

VD: Vascular dementia; WM: Wortmannin

表 2 各组大鼠穿越平台次数的比较

Tab 2 Times of crossing platform of rats in each group

n=6, $\bar{x} \pm s$

Group	Time after model establishment <i>t</i> /week				
	1	2	4	8	12
Sham	8.33±0.51	8.18±1.41	8.50±1.21	7.83±0.82	8.20±0.75
VD	5.66±1.21 [△]	4.83±1.47 [△]	3.82±0.75 ^{△△}	5.52±0.75 [△]	6.12±0.67 [△]
WM	7.50±0.75*	6.63±0.40*	6.33±0.80**	7.36±0.62*	7.67±0.83*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs VD group at the same time point; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time point.

VD: Vascular dementia; WM: Wortmannin

2.2 大鼠海马组织电镜观察结果 透射电镜下,假手术组大鼠海马 CA1 区神经细胞核膜完整,染色质

分布均匀,核仁明显,胞质内细胞器丰富,结构完整,线粒体无肿胀,未见自噬体(图1A)。VD组海马CA1区1周时神经细胞胞质电子密度增加,核膜凹陷,胞核浓缩明显,可见有少量正常的线粒体及空泡变的线粒体,粗面内质网扩张,核周见微空泡形成,多聚核糖体解聚,高度肿胀,细胞器稀少,出现自噬体,呈圆形,大多位于细胞核旁,初级溶酶体数量增多(图1B);4周时自噬体、溶酶体数量显著增多,有

时可见自噬体包裹的线粒体残体,并可见到自噬现象正在发生(图1C);12周时仍可见自噬体(图1D)。WM组:1周时海马CA1区神经元损伤较VD组减轻,可见部分细胞器变性,细胞核皱缩不明显,水肿减轻,依然可见肿胀和空泡变的线粒体,可见自噬现象发生,但较VD组明显减少(图1E);12周时神经元内可见较多基本正常的细胞器,如线粒体和粗面内质网,未见到自噬体(图1F)。

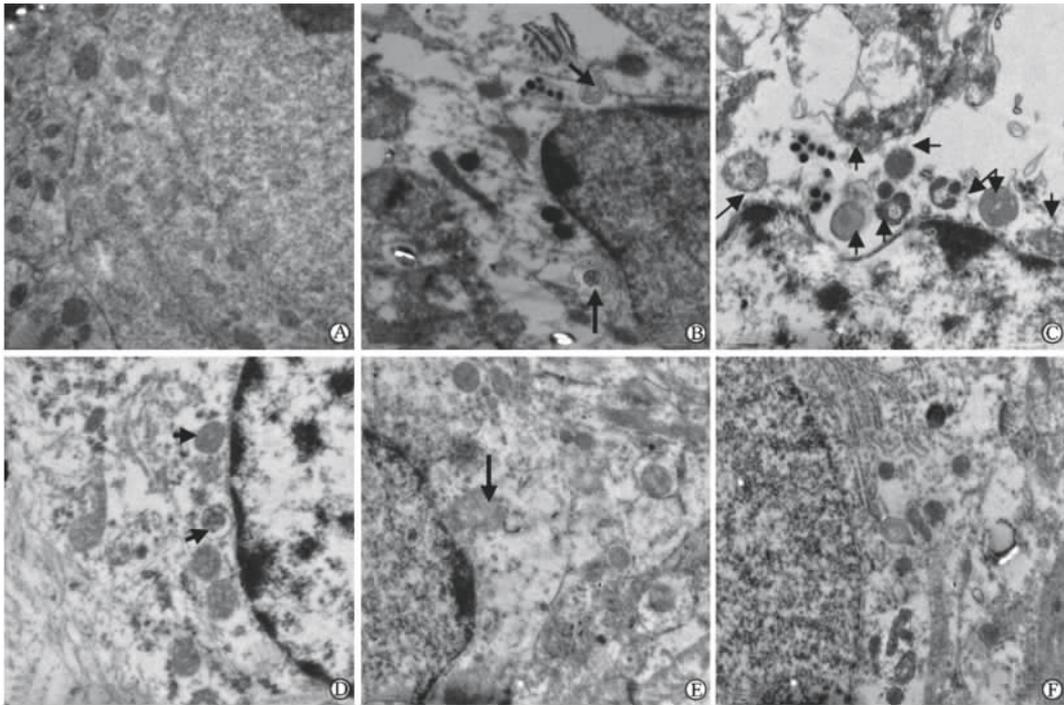


图1 各组大鼠海马组织透射电镜观察图

Fig 1 Rats brain tissue ultrastructure in each group under transmission electron microscope

A: Sham group; B: Week 1 in VD group; C: Week 4 in VD group; D: Week 12 in VD group; E: Week 1 in WM group; F: Week 12 in WM group. Arrows indicated autophagy. Original magnification: $\times 25\ 000$

2.3 大鼠海马组织 LC3 II/LC3 I 的比较 结果(表3、图2)表明:假手术组海马CA1区各时间点仅有少量LC3蛋白表达,LC3II/LC3I比值低。VD组海马CA1区,LC3II/LC3I比值在1周时升高,4周时达到高

峰,8周时开始下降,12周时仍较高,与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。WM组各时间点LC3II/LC3I比值较VD组低,与VD组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。

表3 各组大鼠海马组织CA1区微管相关蛋白1轻链3(LC3 II/LC3 I)的比值

Tab 3 Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3 II/LC3 I) ratio in hippocampal CA1 area of each group

$n=6, \bar{x} \pm s$

Group	Time after model establishment <i>t</i> /week				
	1	2	4	8	12
Sham	0.31±0.02	0.32±0.06	0.31±0.05	0.32±0.02	0.32±0.07
VD	0.37±0.04 [△]	0.42±0.03 [△]	0.68±0.06 ^{△△}	0.51±0.05 [△]	0.42±0.04 [△]
WM	0.34±0.03*	0.37±0.01*	0.55±0.04**	0.45±0.07*	0.38±0.06*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs VD group at the same time point; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time point.

VD: Vascular dementia; WM: Wortmannin

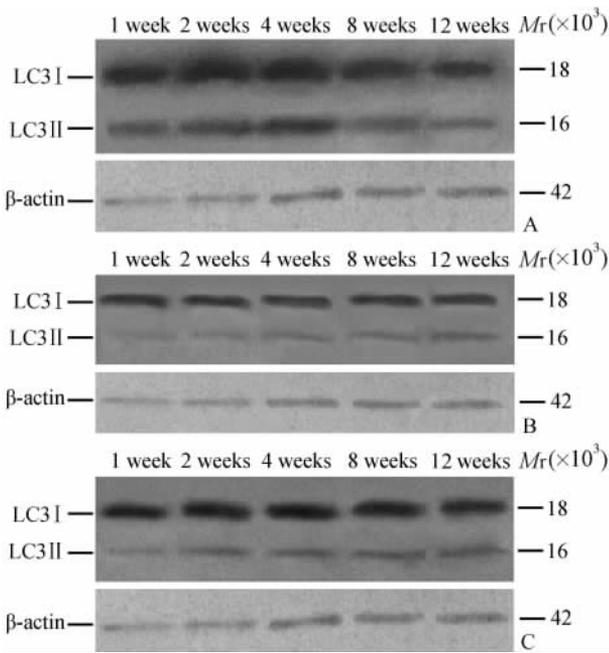


图2 各组大鼠脑组织 LC3 II /LC3 I 的表达

Fig 2 Expression of LC3 II /LC3 I of rat brain in each group
LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3. A: VD group; B: Sham group; C: WM group

3 讨论

血管性痴呆的基础疾病是脑血管疾病,反复脑缺血是血管性痴呆发生的主要原因。本研究采用改良 Pulsinelli 四血管阻断(4-VO)法制备大鼠血管性痴呆模型,很好地模拟了人类血管性痴呆的发病过程,最终导致神经细胞功能下降,学习记忆功能障碍,是较理想的 VD 动物模型。另外,研究发现不同脑组织区域神经对缺血的敏感性不同,海马结构是最敏感的区域,而海马 CA1 区与空间辨别及学习记忆关系最为密切^[12]。本研究应用 Morris 水迷宫实验进行学习记忆能力测试,观察各组大鼠的学习记忆能力。实验结果显示,模型组大鼠平均逃避潜伏时间延长,跨越平台的次数及在原平台象限停留时间明显减少,与假手术组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01),符合 VD 模型判定标准,提示造模成功。应用自噬抑制剂后,WM 组大鼠逃避潜伏时间与 VD 组大鼠逃避潜伏时间比较缩短,穿越平台次数多于 VD 组,提示抑制自噬能够改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力。

自噬现象发生过程中的关键是自噬体的形成,迄今为止,检测自噬体的金标准仍然是电子显微镜^[13]。本研究通过对电镜下各组大鼠海马 CA1 区

神经元超微结构的观察发现,假手术组大鼠神经细胞核膜完整,核大而圆,染色质分布均匀,核仁明显,胞质内细胞器丰富,结构完整,线粒体无肿胀,未见自噬体。模型组 1 周时出现自噬体,呈圆形,大多位于细胞核旁,初级溶酶体数量增多;4 周时自噬体、溶酶体数量显著增多,有时可见自噬体包裹的线粒体残体,并可见到自噬现象正在发生;12 周时仍可见自噬体。WM 组神经元损伤较模型组减轻,可见到自噬体,但较模型组少。这说明血管性痴呆大鼠海马 CA1 区发生明显的神经元超微结构改变,存在自噬现象。

自噬是细胞对内外环境变化所产生应激的适应性反应,相关刺激因子启动自噬基因,引起相关产物表达的增加。这表现为自噬体、溶酶体的形成和自噬溶酶体途径相关蛋白表达的增加。LC3 是在高等真核细胞中发现的第 1 种自噬体膜蛋白。LC3 分为 I 型和 II 型,LC3 I 相对分子质量为 18 000,为可溶性,是发生自噬前 LC3 的表达形式,主要存在于胞质中。LC3 II 相对分子质量为 16 000,是发生自噬时 I 型 LC3 经过遍在蛋白样加工修饰过程,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合而成,定位于前自噬体和自噬体,是自噬体的标志性蛋白。LC3 II 总量或膜结合型 LC3 II 和胞质可溶性 LC3 I 的比例与自噬泡的形成数量相关,采用蛋白质印迹法测定 LC3 II 或 LC3 II 对 LC3 I 的比值是一种评价自噬活性简单并且相对定量的办法^[14-15]。本实验结果显示,血管性痴呆模型组海马 CA1 区,LC3 II /LC3 I 比值在 1 周时升高,4 周时达到高峰,8 周时开始下降,12 周时仍较高。WM 组各时间点 LC3 II /LC3 I 比值较 VD 组低,与 VD 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。结果说明血管性痴呆大鼠缺血损伤后海马区自噬活性被激活,自噬参与了血管性痴呆的发病过程。

自噬抑制剂 WM 是一种霉菌代谢产物,是 PI3K 的特异性抑制剂,通过与 PI3K 的催化亚基 P110 结合,而阻断细胞内 PI3K/Akt 信号转导通路,减少自噬现象的发生^[16-17]。文献报道自噬抑制剂渥曼青霉素可通过抑制大鼠海马自噬活性发挥神经保护作用^[18]。本研究使用 WM 预处理后,WM 可减少血管性痴呆大鼠海马神经元的损伤,增加神经元存活数量,抑制自噬激活。这提示在血管性痴呆的发病过程中过度的自噬激活可导致神经元死亡,加重海马损伤。自噬抑制剂通过抑制自噬活

性减轻血管性痴呆所致的海马损伤,具有神经保护作用,为血管性痴呆的药物治疗提供了新的途径和靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Yorimitsu T, Klionsky D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12: 1542-1552.
- [2] Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo A M. Oxidative stress and autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(1-2):152-162.
- [3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132:27-42.
- [4] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, Klionsky D J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451:1069-1075.
- [5] 左全庭, 吴成翰, 高丽丽. 自噬与卒中[J]. *国际脑血管病杂志*, 2010, 18:548-552.
- [6] Chang S H, Minai-Tehrani A, Shin J Y, Park S, Kim J E, Yu K N, et al. Beclin1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin[J]. *J Radiat Res*, 2012, 53:422-432.
- [7] Lynch-Day M A, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky D J. The role of autophagy in Parkinson's disease[J]. *Cld Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2:a009357.
- [8] Jia L, Gopinathan G, Sukumar J T, Gribben J G. Blocking autophagy prevents bortezomib-induced NF- κ B activation by reducing I- κ B α degradation in lymphoma cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e32584.
- [9] Tung Y T, Wang B J, Hu M K, Hsu W M, Lee H, Huang W P, et al. Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease[J]. *J Biosci*, 2012, 37:157-165.
- [10] Pulsinelli W A, Brierley J B, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia[J]. *Ann Neurol*, 1982, 11:491-498.
- [11] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 8: 55.
- [12] Holscher C. Time, space and hippocampal functions [J]. *Rev Neurosci*, 2003, 14:253.
- [13] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36:2491-2502.
- [14] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36:2503-2518.
- [15] Cherra S J 3rd, Kulich S M, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day B W, et al. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation[J]. *J Cell Biol*, 2010, 190:533-539.
- [16] Wipf P, Halter R J. Chemistry and biology of wortmannin[J]. *Org Biomol Chem*, 2005, 3:2053-2061.
- [17] Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32:329-339.
- [18] 曹丽丽, 董 艳, 徐婧婧, 林幽町, 迟令懿, 迟兆富. Wortmannin 通过抑制癫痫大鼠海马自噬活性发挥神经保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26:1584-1588.

[本文编辑] 贾泽军