

# 自噬干预在永久性和短暂性脑缺血中作用的比较分析

郭涛 何红云 董玲玲 任璐 邓仪昊\*

(昆明理工大学医学院基础医学系形态学教研室, 神经生物学实验室, 昆明 650500)

**摘要** 近年来, 缺血性脑卒中一直是学者们的研究热点, 根据临床上大脑中动脉缺血病人存在未得到再通血和实现再通血的情况, 将其分为永久性脑缺血和短暂性脑缺血。大量文献报道了自噬在两类脑缺血动物或细胞模型中发挥的作用, 但由于自噬和脑缺血复杂的病理因素的影响使得结论各有不同, 并且始终没有统一的归纳整理。如何运用自噬水平的检测和调控方法进行干预, 使自噬在缺血性脑卒中的双重作用最终从损伤走向单一的神经保护功能, 通过比较二者的异同, 并分析其原因, 针对性地对影响因素做适当的调节, 从而为基础和临床研究中自噬干预治疗永久性和短暂性脑缺血提供有价值的参考。因此, 该文做一综述。

**关键词** 自噬; 永久性脑缺血; 短暂性脑缺血; 作用; 比较

## Comparative Analysis of the Role of Autophagy Intervention in Permanent and Transient Cerebral Ischemia

Guo Tao, He Hongyun, Dong Lingling, Ren Lu, Deng Yihao\*

(Department of Morphology, Department of Basic Medicine, Faculty of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Neurobiology Laboratory, Kunming 650500, China)

**Abstract** In recent years, ischemic stroke has been a hot topic for researchers. According to the clinical situation of patients with middle cerebral artery ischemia who do not get recanalization and achieve recanalization, it is divided into permanent cerebral ischemia and transient cerebral ischemia. A large number of literatures have reported the role of autophagy in two kinds of ischemic animals or cell models. However, due to the influence of complex pathological factors of autophagy and cerebral ischemia, the conclusions are different, and there is no unified summary. So this paper, through comparing the similarities and differences between the two, appropriately adjusting the influence factors as well as analyzing the causes, we want to use the detection and regulation methods of autophagy level to intervene, so that the dual role of autophagy in ischemic stroke will eventually change from injury to a single neuroprotective function effect. All the studies are aimed at providing a valuable reference for the treatment of permanent and transient cerebral ischemia in autophagy interventions in basic and clinical studies. Therefore, this article makes a review.

**Keywords** autophagy; permanent cerebral ischemia; transient cerebral ischemia; role; comparison

脑卒中(cerebral stroke)是一种急性脑血管疾病, 是人类残疾和死亡的主要因素之一。据临床统计表

明, 大约80%的脑卒中患者是由脑缺血造成的, 其引起脑动脉闭塞, 导致严重的认知和运动功能障碍<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2018-08-10 接受日期: 2018-11-21

国家自然科学基金(批准号: 81660383、81860411)、云南省科技厅应用基础研究基金(批准号: 2017FB113)和云南省教育厅科学研究基金(批准号: 2018JS016)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18487174860, E-mail: deng13032871868@163.com

Received: August 10, 2018 Accepted: November 21, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660383, 81860411), Applied Basic Research Fund of Yunnan Provincial Department of Science and Technology (Grant No.2017FB113) and Science Research Fund of Yunnan Provincial Department of Education(Grant No.2018JS016)

\*Corresponding author. Tel: +86-18487174860, E-mail: deng13032871868@163.com

网络出版时间: 2019-05-10 14:01:29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1047.008.html>

目前,使用纤维组织酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)仍然是缺血性脑卒中的唯一有效治疗药物,但由于安全性和小于4.5小时的狭窄治疗时间,仅有4%的脑卒中患者可以从中受益<sup>[2]</sup>。因此,迫切需要明确缺血性脑卒中的发病机制,探索治疗脑缺血新的靶向策略。脑缺血发生后血液供应中断,缺血核心中的神经元在数分钟内迅速死亡。然而,在相当长时间内,缺血核心的外围(缺血半影区)组织损伤传播速度较慢,并且该区域中的大量细胞遭受自噬<sup>[3]</sup>。由于自噬性损伤是一种可逆性细胞损伤,因此,缺血半影区中的自噬细胞的救援越来越受到研究者的重视。

## 1 自噬在脑缺血中作用的概述

自噬(autophagy)是一种细胞内的回收过程,通过该过程的长寿命蛋白质、受损细胞器和可溶性大分子被递送至溶酶体用于分解和再循环,维持细胞内的动态平衡<sup>[4]</sup>。它涉及多种病理生理情况,包括炎症、细胞凋亡、恶性肿瘤和脑缺血损伤。在多种不同的脑缺血动物模型中常常会发现,自噬被显著激活,并且自噬机制参与脑缺血损伤过程中调节神经元命运的作用。与凋亡和坏死使不可分裂的神经元走向死亡的命运不同,自噬可以使神经元重获新生。正常情况下,自噬的表达水平很低,但是当神经元受到过度的外部刺激时,基础自噬被转化为诱导自噬。大量基础和临床研究表明,轻度或中度激活的自噬可以分解利用陈旧的蛋白质,从而保护神经元免受损伤,有益于神经功能恢复<sup>[5]</sup>。然而,过度活化的自噬启动细胞主动性的II型细胞死亡程序,可以扰乱神经元的正常代谢,诱导神经元发生凋亡和坏死,以及脑缺血组织和器官的严重损伤<sup>[6]</sup>(图1)。因此,自

噬在脑缺血中的确切作用仍然存在争议,并被认为是一把双刃剑<sup>[7-8]</sup>。

## 2 脑缺血后自噬的干预方法

目前,越来越多的药物被发现其作用机制与自噬相关,但是自噬的激活或抑制是否可以在神经保护中发挥积极作用或负面作用仍然存有争议。因此,如何根据研究对象选择合适的研究方法,检测自噬的表达水平并对其调控干预,进而使自噬在脑缺血中发挥保护作用,势必对自噬机制及其临床意义的深入探讨具有十分重要的影响。

### 2.1 自噬水平的检测

自噬首先根据细胞内含物运送至溶酶体腔内被降解方式的不同分为巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperon-mediated autophagy, CMA),而研究中常说的自噬是指巨自噬。自噬过程是动态变化的,自噬流(autophagic flux)从自噬膜的诱导、自噬体的形成、自噬性底物向溶酶体的运输以及在溶酶体内降解的整个过程中都将被检测到,是一个高度调控的多步骤过程,可采用直接和间接方法对自噬的发生周期进行检测。

自噬最先是在透射电子显微镜下形态学观察到的,一直以来电子显微镜是检测自噬发生的金指标。依据后期自噬体与溶酶体融合的酸性性质,可以采用直接染色法用嗜酸性染料单丹磺酰戊二胺(monodansylcadaverin, MDC)、吖啶橙(acridine orange, AO)、LysoSensor Blue和LysoTracker Red标记自噬溶酶体,可以较好地观察自噬的发生过程。此外,采用分子生物学间接手段(聚合酶链式反应、蛋白免疫印迹、免疫组化、免疫荧光和免疫共沉淀),

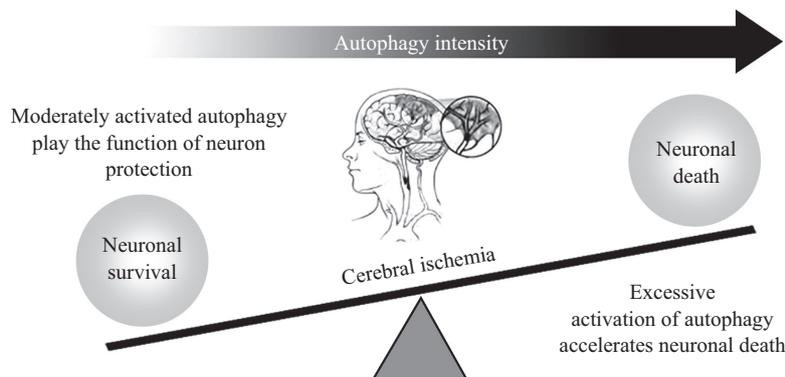


图1 自噬调节脑缺血后损伤神经元的死亡与存活之间的平衡

Fig.1 Autophagy regulates the balance between death and survival of injured neurons after cerebral ischemia

测定自噬组成蛋白和信号通路蛋白, 将是较为可靠的检测方法。在自噬体的形成过程中有自噬相关基因(*autophagy associated gene, Atg*)的参与, 它们的高表达促进了自噬的激活, 倘若将*Atg*敲除, 则自噬将不再发生<sup>[9]</sup>。微管相关蛋白轻链3(*microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3*)是酵母自噬基因(*Atg7/Atg8*)在哺乳动物中的同源物质。作为自噬体形成的标记蛋白, 其存在于两种形式的胞浆型(LC3-I)和膜型(LC3-II)的细胞中, 用Western blot技术检测LC3-II/I灰度值的比值可以评价自噬水平高低。Beclin1是酵母*Atg6*的同源物, 被认为是自噬启动的标志。P62是一个泛素结合蛋白, 是蛋白聚集体的组成成分, 其水平的增加表示自噬/溶酶体降解途径被抑制, 呈负相关。另外, 组织蛋白酶(*cathepsin B、D、L*)的蛋白表达和活性影响自噬溶酶体的形成。两种溶酶体相关蛋白(LAMP-1、LAMP-2)参与被降解物质转运到溶酶体腔中降解的过程。

## 2.2 自噬水平的调控

自噬研究中常常需要借助其靶向工具药物, 这些化合物能够快速、可控地激活或者抑制自噬, 并且在治疗脑缺血中同时具有作用全面、疗效明确、毒副作用小的优点。正常细胞内自噬活性较低, 很难对其进行观察, 因此, 需要对自噬活性进行广泛的人工干预来调控, 常用的工具药物如下。

抑制自噬的靶向干预药物根据自噬形成的进程, 被分为不同的阶段。(1)自噬体形成的抑制剂, 如3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)是一种选择性III型磷脂酰肌醇3-激酶(*phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K*)抑制剂, 阻断早期自噬过程, 已被广泛用作自噬抑制剂; 渥曼青霉素(*wortmannin*)同样通过抑制PI3K而抑制自噬的发生; LY294002与ATP的结构相似, 能完全阻止S6的磷酸化; 放线菌酮(*cycloheximide*)作为转肽酶抑制剂能够强烈抑制蛋白质的生物合成。(2)自噬体和溶酶体融合阶段的抑制, 如巴伐洛霉素(*bafilomycin*)是一种大环内酯类抗生素, 主要通过三磷酸腺苷酶的作用, 降低酸性环境, 来影响自噬溶酶体形成; 长春碱抑制微管蛋白的聚合。(3)对溶酶体内降解阶段的抑制, 如弱碱性氨: 氯喹、中性红、NH<sub>4</sub>CL以及氨水能够升高溶酶体的PH值, 使溶酶体酶失去活性; 蛋白酶抑制剂: E64d、Pepstatin A以及亮抑酶肽可明显抑制溶酶体的降解进而

阻止自噬的进展。(4)随着转基因技术的成熟, 可以用反义RNA或siRNA等方法抑制自噬活性, 使得*Atg*表达敲除或沉默, 获得自噬缺陷型的动物或细胞模型。

常用激活自噬的药物: 雷帕霉素(*rapamycin, RAP*)通过模拟氨基酸, 抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(*mammalian target of rapamycin, mTOR*)的活性, 有助于*Atg13*的去磷酸化并诱导自噬的发生<sup>[10]</sup>。不同于RAP, 海藻糖(*trehalose*)和钙蛋白酶抑制蛋白(*calpastatin*)是不依赖mTOR的自噬激活因子, 钙蛋白酶抑制蛋白是一种*calpain*的抑制剂, 它们与RAP联合使用具有明显的自噬激活的累加效应。Bredeldin A可以模拟内质网应激, 从而激活自噬进行消化降解。N-Acetyl-D-sphingosine是I型PI3K通路的抑制剂, 增强自噬的表达。

## 3 自噬与脑缺血

激活自噬和抑制自噬是治疗缺血性中风的新策略, 针对自噬的一些工具药也开始逐渐从基础走向临床治疗。然而, 由于自噬干预涉及不同的细胞类型, 如神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞、内皮细胞等, 这种复杂的细胞反应产生了更加复杂的分子机制组合, 其中细胞死亡、细胞损伤、应激和修复混杂在一起。因此, 需要动物和细胞模型来分析和阐明哪些分子机制必须被促进或者阻断。对于缺血性脑卒中的研究, 大脑中动脉闭塞(*middle cerebral artery occlusion, MCAO*)是首选的动物在体模型, 而氧和葡萄糖剥夺(*oxygen glucose deprivation, OGD*)作为原代神经元离体培养的细胞模型较为普遍<sup>[11]</sup>。通过是否给予脑缺血再灌注(*ischemia-reperfusion, I/R*)或者复氧复糖(*OGD/R*)可划分为短暂性脑缺血和永久性脑缺血两种相关的损伤模式, 它们被认为是治疗人类临床试验成功的关键。目前存有临床脑缺血患者<sup>[12]</sup>。一是接受及时的溶栓治疗或手术治疗, 其脑血管梗塞获得完全再通, 这类患者与短暂性脑缺血模型相似。二是由于手术困难或客观情况无法完全去除脑梗塞, 这类患者的病理生理过程与永久性脑缺血模型类似。因此, 为了模拟临床脑缺血患者在完全再通和永久闭塞的两个极端条件下的病理过程, 许多科学家通过动物和细胞实验研究了自噬干预与调节在永久性脑缺血和短暂性脑缺血中的作用。

### 3.1 自噬干预在永久性脑缺血中的影响

脑缺血一旦发生,由血管闭塞导致的急性局部缺血在几分钟内很快引起三磷酸腺苷(ATP)的耗竭,导致能量和蛋白质合成障碍,乳酸产生增多,细胞内外酸中毒,细胞膜通透性增加,去极化和大量 $\text{Ca}^{2+}$ 内流失调,引起神经递质(谷氨酸、多巴胺、 $\gamma$ -氨基丁酸、乙酰胆碱和天冬氨酸等)的异常积累,造成兴奋性神经毒性,细胞内外的离子梯度不能正常维持 $\text{K}^{+}$ 外流和 $\text{Na}^{+}$ 内流,引起脑水肿、炎症反应增强,最终可导致神经系统破坏和不可逆的神经组织损伤。

毫无疑问,在永久性脑缺血动物模型中,相对于假手术组,大脑中动脉梗死半影区随着缺血时间的增长,严重的病理损伤会导致自噬失控,过度自噬引起自噬性死亡,促进细胞凋亡产生损害作用,脑损伤一直呈现恶化状态,神经元存活数量减少,脑梗死体积越来越大<sup>[13]</sup>。Zhang等<sup>[14]</sup>采用永久中动脉大脑梗塞(pMCAO)模型,通过3-MA抑制自噬通量来缓解内质网应激,减少大鼠脑梗死体积、脑水肿和行为学损伤。Zhou等<sup>[15]</sup>通过自噬抑制剂药物干预pMCAO和OGD动物和细胞模型,结果发现,3-MA和渥曼青霉素处理逆转了OGD诱导的组织蛋白酶B、L从溶酶体到细胞质的释放以及星形胶质细胞中caspase-3的活化,降低了OGD诱导的溶酶体膜通透性的增加,并增强了OGD诱导的星形胶质细胞中溶酶体热休克蛋白70.1B的上调,自噬的抑制减少了大鼠的梗塞体积并且保护了OGD诱导的星形细胞损伤。Gao等<sup>[16]</sup>认为,在pMCAO模型中,使用自噬抑制剂3-MA可以促进缺血后处理诱导的神经保护作用,而给予自噬激活剂RAP可以将缺血后处理引起的保护作用消除。这些研究都证明,在永久性脑缺血中过度活化的自噬造成神经功能损伤,自噬的激活可能是造成脑缺血后神经细胞死亡的重要原因,而适当的抑制自噬底物在轴突的异常聚集以维持神经元的正常代谢功能,可能是一种内源性神经保护作用。然而也有研究结果显示,应用3-MA或渥曼青霉素抑制自噬只能改善脑缺血后24 h内引起的脑损伤,而对于7天时进行的自噬抑制并不能显著减少脑梗死体积<sup>[17]</sup>,提示针对永久性脑缺血的自噬干预仅仅缓解神经元走向死亡的进程,可以为后续的临床治疗提供较长的时间窗,但是不能改变其最终结局。

### 3.2 自噬干预在短暂性脑缺血中的影响

相对于永久性脑缺血,显然及时和完全的再灌

注是保护大脑免受缺血的最有效方式,其实验研究也更加深入。然而,短暂性脑缺血损伤的病理生理机制相比永久性脑缺更加复杂,由脑血管血流恢复引起的损伤引发了各种有害的缺血性中风级联反应,一直是临床上脑缺血患者面临的重要挑战。

脑中风期间,自噬可以保护神经元免受死亡或诱导神经元走向死亡。在短暂性脑缺血模型中,研究表明,自噬的激活和抑制在不同时期表现出不同的神经保护作用,用自噬诱导剂如RAP预处理保护神经元免于死亡,而用自噬抑制剂预处理增强坏死<sup>[18]</sup>。相反,用自噬抑制剂3-MA处理后减少了梗死体积和脑水肿形成<sup>[19]</sup>,治疗前后靶向自噬的不同结果可能反映早期和晚期自噬的不同作用。Chauhan等<sup>[20]</sup>分别建立了大鼠短暂性中动脉大脑梗塞(tMCAO)模型和原代海马神经元OGD/R模型,通过在大鼠缺血后1 h腹腔注射RAP,再到第2 h用核磁共振成像(MRI)检测脑梗死体积,发现脑内丙二醛、过氧化物歧化酶和细胞色素C等的水平有所下降,脑梗死的体积减少,用3-MA抑制自噬后,损伤加重,因此活化自噬对短暂性脑缺血具有改善作用。然而,Puyal等<sup>[21]</sup>采用新生12天大鼠tMCAO模型,发现在再灌注后2~6 h,LC3-II水平开始逐渐升高,24 h时达到峰值,在透射电镜下可见缺血半暗带区域出现大量自噬溶酶体形成,自噬明显激活。然后选用再灌注后的第3和第6 h,侧脑室注射自噬抑制剂3-MA,观察到梗死体积明显减小,神经损伤减轻,说明抑制自噬有利于短暂性脑缺血神经功能的损伤修复。仔细观察发现这些差异的造成可能是因为给药方式和干预时期的不同造成的。此外,对大鼠tMCAO模型使用RAP增强自噬是神经保护作用<sup>[22]</sup>,但一些研究人员发现,3-MA治疗pMCAO模型后,神经功能缺损也有较大的改善,表明缺血激活的自噬导致神经损伤<sup>[23]</sup>。可以看出由于不同类型的实验模型,自噬在脑缺血中发挥不同的作用。

## 4 两类模型比较与分析

在脑缺血的研究中,自噬的诱导通常需要添加自噬抑制剂或激活剂作为实验对比验证。其关键在于自噬的激活程度,适当的激活具有神经保护作用,而过度的激活将促进神经细胞的死亡。对比不难发现,自噬干预在短暂性脑缺血和永久性模型中的作用存在较大差异。总的来说,不论是自噬激活剂还

是自噬抑制剂, 在不同条件下, 自噬药物在脑缺血神经元中发挥不同的作用, 甚至相反的结果。这个结果可能是由很多原因造成的, 包括模型类型<sup>[24]</sup>、脑损伤部位<sup>[25]</sup>、脑缺血持续时间<sup>[26-27]</sup>以及病况发展阶段的不同, 均会对自噬本身的机制存有影响, 这就使得在选择自噬靶向药物时必须考虑这些方面的因素。此外, 自噬靶向药物方面的给药剂量<sup>[28]</sup>、选定的干预时间点<sup>[17]</sup>、给药方式也会影响神经元的存活, 其导致了对于脑卒中后自噬的确切作用的矛盾认识。

分析其原因可以发现, 在永久性脑缺血模型中, 脑部病灶区由于没有再通血, 持续恶化, 神经细胞大多呈现坏死状态, 而且坏死区会随时间延长持续扩大, 自噬的调节将很难对其病理与生理功能发生改变。因此, 在临床上, 我们建议脑缺血病人应给予及时的缺血后再灌注, 并且认为对于永久性脑缺血患者自噬的长期治疗并不是最为恰当的选择。相比之下, 短暂性脑缺血随着为机体恢复供血供氧, 其存在恢复期, 针对短暂性脑缺血的自噬干预较为明显。例如, 一项研究报告显示在28天缺血再灌注组大鼠较永久性缺血大鼠脑水肿明显改善<sup>[29]</sup>, 提示在再灌注救治期间进行自噬药物干预(如自噬激活剂RAP在脑缺血亚急性期的治疗)将是康复治疗中比较有效的方法之一。但值得注意的是短暂性的脑缺血可能导致缺血再灌注冲击性损伤, 涉及几种病理过程, 包括兴奋性毒性、氧化应激、炎症和坏死以及凋亡性细胞死亡<sup>[30]</sup>。因此, 我们迫切需要进一步阐明自噬在脑缺血中的病理机制, 从而为脑缺血患者进行自噬辅助干预和治疗, 以减少脑缺血造成的脑梗死和神经功能损伤。

## 5 小结

综上所述, 缺血性脑损伤是一个复杂的病理生理过程, 自噬、凋亡和坏死错综复杂地参与其损伤进程, 并且充分的证据表明自噬靶向性干预的介入是治疗脑缺血损伤的有效手段。由于自噬本身的双重机制使其在脑缺血中的作用具有显著特异性, 因此, 从临床角度观察, 要想寻求治疗脑缺血损伤的理想方法, 就必须清楚掌握脑缺血疾病的发展状况, 生理上有保护作用的自噬应该保留, 而过度的自噬应该消除。根据其进展的不同阶段及细胞周围环境的变化选择合适的治疗干预措施, 平衡在脑缺血中激

活自噬和抑制自噬的适度表达, 不论临床脑缺血患者是在脑缺血损伤早期基础自噬的促进, 还是随后脑缺血半影区过度自噬性死亡的抑制, 目的都是使自噬可以起到神经保护作用, 从而减少缺血性损伤。为脑缺血病人的预防和治疗提供更加充实的理论依据。

## 参考文献 (References)

- 1 Wang P, Xu TY, Wei K, Guan YF, Wang X, Xu H, *et al.* ARRB1/ beta-arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy* 2014; 10(9): 1535-48.
- 2 Chaucer B, Whelan D, Veys C, Upadhyaya M. Angioedema secondary to IV tissue plasminogen activator administration for treatment of acute ischemic stroke. *Case Rep Crit Care* 2018; 2018: 3257215.
- 3 Jiang Z, Watts LT, Huang S, Shen Q, Rodriguez P, Chen C, *et al.* The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core. *PLoS One* 2015; 10(6): e0131929.
- 4 Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 2018; 104: 485-95.
- 5 Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H. Cell death in the developing brain after hypoxia-ischemia. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 248.
- 6 Sun D, Wang W, Wang X, Wang Y, Xu X, Ping F, *et al.* bFGF plays a neuroprotective role by suppressing excessive autophagy and apoptosis after transient global cerebral ischemia in rats. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 172.
- 7 Wei K, Wang P, Miao CY. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18(11): 879-86.
- 8 Chen W, Sun Y, Liu K, Sun X. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 2014; 9(12): 1210-6.
- 9 Wang S, Li B, Qiao H, Lv X, Liang Q, Shi Z, *et al.* Autophagy-related gene Atg5 is essential for astrocyte differentiation in the developing mouse cortex. *Embo Reports* 2015; 15(10): 1053-61.
- 10 Perez-Alvarez MJ, Villa Gonzalez M, Benito-Cuesta I, Wandosell FG. Role of mTORC1 controlling proteostasis after brain ischemia. *Front Neurosci* 2018; 12: 60.
- 11 Wu JY, Li M, Cao LJ, Sun ML, Chen D, Ren HG, *et al.* Protease Omi cleaving Hax-1 protein contributes to OGD/R-induced mitochondrial damage in neuroblastoma N2a cells and cerebral injury in MCAO mice. *Acta Pharmacol Sin* 2015; 36(9): 1043-52.
- 12 Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, Barrett JR, Kirks R, *et al.* Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Transl Stroke Med* 2014; 6: 8.
- 13 Fei YX, Wang SQ, Yang LJ, Qiu YY, Li YZ, Liu WY, *et al.* Salvia miltiorrhiza Bunge (Danshen) extract attenuates permanent

- cerebral ischemia through inhibiting platelet activation in rats. *J Ethnopharmacol* 2017; 207: 57-66.
- 14 Zhang T, Lu D, Yang W, Shi C, Zang J, Shen L, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors relieve endoplasmic reticulum stress by autophagy inhibition in rats with permanent brain ischemia. *Front Neurosci* 2018; 12: 405.
- 15 Zhou XY, Luo Y, Zhu YM, Liu ZH, Kent TA, Rong JG, *et al.* Inhibition of autophagy blocks cathepsins-tBid-mitochondrial apoptotic signaling pathway via stabilization of lysosomal membrane in ischemic astrocytes. *Cell Death Dis* 2017; 8(2): e2618.
- 16 Gao L, Jiang T, Guo J, Liu Y, Cui G, Gu L, *et al.* Inhibition of autophagy contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *PLoS One* 2012; 7(9): e46092.
- 17 Wang JY, Xia Q, Chu KT, Pan J, Sun LN, Zeng B, *et al.* Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70(4): 314-22.
- 18 Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 2008; 32(3): 329-39.
- 19 Yang Z, Zhong L, Zhong S, Xian R, Yuan B. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. *Exp Mol Pathol* 2015; 98(2): 219-24.
- 20 Chauhan A, Sharma U, Jagannathan NR, Reeta KH, Gupta YK. Rapamycin protects against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2011; 225(2): 603-9.
- 21 Puyal J, Vaslin A, Mottier V, Clarke PG. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol* 2009; 66(3): 378-89.
- 22 Wu M, Zhang H, Kai J, Zhu F, Dong J, Xu Z, *et al.* Rapamycin prevents cerebral stroke by modulating apoptosis and autophagy in penumbra in rats. *Ann Clin Transl Neurol* 2018; 5(2): 138-46.
- 23 Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, Zhang XD, *et al.* Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 2008; 4(6): 762-9.
- 24 Zhang X, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, *et al.* Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* 2013; 9(9): 1321-33.
- 25 Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, *et al.* N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci* 2014; 34(8): 2967-78.
- 26 Zvejniece L, Svalbe B, Liepinsh E, Pulks E, Dambrova M. The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90- and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 2012; 208(2): 197-204.
- 27 Leithner C, Fuchtemeier M, Jorks D, Mueller S, Dirnagl U, Rojl G. Infarct volume prediction by early magnetic resonance imaging in a murine stroke model depends on ischemia duration and time of imaging. *Stroke* 2015; 46(11): 3249-59.
- 28 Wei G, Huang Y, Li F, Zeng F, Li Y, Deng R, *et al.* XingNaoJing, prescription of traditional Chinese medicine, prevents autophagy in experimental stroke by repressing p53-DRAM pathway. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 377.
- 29 Yang Y, Li Q, Ahmad F, Shuaib A. Survival and histological evaluation of therapeutic window of post-ischemia treatment with magnesium sulfate in embolic stroke model of rat. *Neurosci Lett* 2000; 285(2): 119-22.
- 30 Auriel E, Bornstein NM. Neuroprotection in acute ischemic stroke-current status. *J Cell Mol Med* 2010; 14(9): 2200-2.