

百日咳毒素减轻脑缺血后神经元钙内流的实验研究

周菲惠, 李智高, 王进昆, 张申, 刘畅, 陈雪菲, 汤志伟

昆明医科大学第一附属医院神经外科, 云南省昆明市 650032

摘要: **目的** 探讨百日咳毒素 (PTx) 对缺血性脑卒中后神经元的保护作用及其可能的机制。 **方法** 将 C57BL/6 小鼠用大脑中动脉闭塞 (MCAO) 法建立卒中模型, 随机分为两组, 每组 12 只鼠。实验组卒中后予 PTx 1000 ng 溶于 1 ml 生理盐水腹腔注射干预; 对照组予 1 ml 生理盐水腹腔注射。24 h 后行 TTC 染色检测梗死面积, 并行免疫组化检测细胞凋亡。在体外培养原代神经元, 用谷氨酸兴奋刺激模拟卒中后神经元损伤模型。用 MTT 及乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验检测 PTx 对谷氨酸兴奋刺激后神经元的存活和损伤情况。然后, 检测 PTx 对谷氨酸诱导神经元钙离子内流的影响。 **结果** PTx 治疗可减小卒中后小鼠脑梗死面积, 使之由 $(51 \pm 11)\%$ 降至 $(34 \pm 8)\%$ ($P < 0.05$)。免疫组化发现 PTx 可使脑内 Caspase-3 阳性细胞数由 (677.7 ± 117.8) 个/ mm^2 减少至 (297.5 ± 83.6) 个/ mm^2 ($P < 0.05$), 且较少细胞凋亡。体外结果提示, PTx 可增加谷氨酸刺激后神经元的存活率, 使 MTT 吸光值由 (0.618 ± 0.06) 提升至 (1.1 ± 0.12) ($P < 0.05$); 同时, PTx 还可减少 LDH 的释放, 使吸光值由 (1.31 ± 0.11) 降低至 (0.76 ± 0.08) ($P < 0.05$)。PTx 可减缓和减少钙离子进入神经元, 经 PTx 治疗后钙内流可由基础值的 5 倍降低至基础值的 2~3 倍, 且钙离子内流达到半峰值浓度的时间也由 (18.5 ± 2.5) s 延长至 (85.4 ± 10.2) s。 **结论** 百日咳毒素可减少卒中后钙离子内流到神经元, 继而减少神经元损伤, 减小梗死面积。

关键词: 缺血性脑卒中; 百日咳毒素; 钙内流; 小鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.04.007

Pertussis toxin alleviates neuronal calcium influx after ischemic stroke: An experimental study

ZHOU Fei-Hui, LI Zhi-Gao, WANG Jin-Kun, ZHANG Shen, LIU Chang, CHEN Xue-Fei, TANG Zhi-Wei. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of pertussis toxin (PTx) on neurons after ischemic stroke and possible mechanisms. **Methods** C57BL/6 mice were used to establish a model of stroke by middle cerebral artery occlusion (MCAO) and were then randomly divided into experimental group and control group, with 12 mice in each group. The mice in the experimental group were given intraperitoneal injection of PTx 1000 ng dissolved in 1 ml normal saline after stroke, and those in the control group were given intraperitoneal injection of 1 ml normal saline. TTC staining was performed 24 hours later to measure infarct area, and immunohistochemistry was used to measure neuronal apoptosis. Primary neurons were cultured in vitro and glutamate stimulation was performed to mimic neuronal injury after stroke. MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) release assay were used to observe the influence of PTx on the survival and injury of neurons after glutamate stimulation, and then the influence of PTx on glutamate-induced neuronal calcium influx was examined. **Results** PTx treatment reduced cerebral infarct area from $51\% \pm 11\%$ to $34\% \pm 8\%$ in mice after stroke ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that PTx reduced the number of caspase-3-positive cells from 677.7 ± 117.8 cells/ mm^2 in the control group to 297.5 ± 83.6 cells/ mm^2 in the experimental group ($P < 0.05$) and reduced cell apoptosis. In vitro results showed that PTx increased the viability of neurons after glutamate stimulation, and MTT absorbance was increased from 0.618 ± 0.06 to 1.1 ± 0.12 ($P < 0.05$); at the same time, PTx reduced the release of LDH, and the absorbance of LDH was reduced from 1.31 ± 0.11 to 0.76 ± 0.08 ($P < 0.05$). PTx slowed down and reduced calcium influx into neurons, and after PTx treatment, calcium influx was reduced from 5 times to 2–3 times of the baseline value; the time to half-peak concentration was increased from 18.5 ± 2.5 s to $85.4 \pm$

基金项目: 国家自然科学基金 (81760220); 云南省科技厅项目 (2017FE467-135; 2017NS057; 2017FB111)

收稿日期: 2018-02-22; **修回日期:** 2018-04-18

作者简介: 周菲惠 (1992-), 女, 硕士, 主要从事脑血管病的研究。

李智高 (1974-), 男, 学士, 副主任医师, 主要从事脑血管病的研究。与周菲惠为共同第一作者。

通信作者: 汤志伟 (1980-), 男, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事脑血管病和脑肿瘤的研究。E-mail: tangzhiwei7755@hotmail.com。

10.2 s. **Conclusions** PTx can reduce calcium influx into neurons after stroke and thus alleviate neuronal injury and reduce infarct area.

Key words: ischemic stroke; pertussis toxin; calcium influx; mouse

缺血性脑卒中已超过心脏疾病,成为我国人民致死和致残的首位原因^[1]。每年约有150~200万新发脑卒中病例,现存脑血管病患者700余万人,脑卒中后约一半的幸存者留有明显的功能残疾,很多都需要在医院和养老院等医疗机构度过余生^[2]。目前缺血性脑卒中的治疗是医学的一大挑战,高死亡率和致残率仍是该病特点,探寻更多有效的治疗方法或药物具有重大的临床意义和实用价值^[3-5]。

急性脑缺氧缺血所导致的脑细胞内钙超载被认为是神经元死亡的关键环节,细胞内快速而持续的钙离子浓度升高是细胞凋亡较早发生改变的生化指标之一。细胞内钙超载影响线粒体功能,使细胞供能受阻和代谢障碍。同时,胞内高钙的环境,还会导致一些钙依赖性酶的激活,产生大量自由基,进一步加重细胞损伤,最终多重伤害导致细胞死亡^[6]。

百日咳毒素(pertussistoxin, PTx)是百日咳鲍特氏杆菌产生的一种外毒素。PTx常用于制作小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型^[7]。我们的前期工作发现,大剂量的PTx可减轻EAE模型的神经元凋亡,而文献提示PTx可减少HEK293细胞系的钙离子内流^[8]。为此,我们提出假设,PTx能减少卒中后神经元钙离子内流,从而减轻卒中后神经元损伤。

1 材料与方法

1.1 卒中模型的建立

采用大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)建立缺血性脑卒中模型。选择20~25 g雄性成年小鼠,腹腔注射复合麻醉药(氯胺酮1 mg + 甲苯噻嗪0.5 mg)溶解于1 ml生理盐水中,注射剂量为0.01 ml/g)进行麻醉。固定于手术台上,颈部消毒,置于手术显微镜下操作,沿颈正中中线剪开皮肤,钝性剥离皮下组织,暴露右侧颈内、颈外和颈总动脉,在颈总动脉上剪一小口,以栓塞线沿颈内动脉进入约10 mm或有轻微阻力,停止进线,清理术野、止血后,恢复颈部解剖结构,间断缝合皮肤切口,根据术中出血情况予腹腔注射生理盐水补液。术后放入动物饲养恒温箱保暖,单独饲养,每日两次腹腔注射生理盐水1 ml,采用Longa评分法进行动物行为学评分,以确定是否造模成功^[5,9,10]。

1.2 PTx 的治疗

在小鼠成功诱导卒中以后,实验组予PTx 1000 ng溶于1 ml生理盐水腹腔注射干预,对照组予1 ml生理盐水腹腔注射。

1.3 原代神经元的培养

取24 h内出生的小鼠,酒精消毒后断头,取出脑组织,在解剖液中分离组织,保留皮质和海马,仔细剥离脑膜(置于冰上)。将脑组织剪碎,静置后去上清。用0.25%胰蛋白酶轻柔混匀,在37℃培养箱中消化10 min,取出,加入2倍体积的终止液,将组织转移至10 cm的无菌培养皿并置于冰袋上,用巴斯德管反复吹打,静置后收集上清液,用70 μm细胞筛网过滤,于血球计数板上计数细胞。调整细胞悬液的密度,接种到多聚赖氨酸包被过的培养皿。放入37℃培养箱培养,4 h后将接种液换为神经元培养液,以后每3天半量换液。

1.4 TTC 染色

将脑组织完整取出置于脑槽内,于-20℃速冻4 min,冠状位从前向后以1 mm厚度切脑,将切好的脑片放置于2% TTC染色液中,放入37℃温箱中避光染色20 min,每隔5 min翻转脑片一次。染色完成后可见梗死灶为白色,正常脑组织为红色。用数码相机采集照片留存。

1.5 MTT 法测定细胞存活率及乳酸脱氢酶的测定

细胞存活率的测定使用MTT细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒,根据试剂盒提供的方法测量细胞存活率,在酶标仪490 nm处测量吸光度。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的测定则使用LDH的CytoTox96-非放射性细胞毒性测定试剂盒,根据试剂盒提供的方法测量谷氨酸兴奋毒性,在酶标仪490 nm处测量吸光度。

1.6 免疫组化

MCAO后24 h,用麻醉使小鼠安乐死。取出鼠脑用4%多聚甲醛固定。将固定的鼠脑用石蜡包埋并切成连续3 μm厚的冠状切片。使用caspase-3抗体进行免疫组织化学染色。使用显微镜观察图像,计数caspase-3的阳性细胞。

1.7 钙显像

将神经元用预热的HBSS洗涤,然后加入Fluo-3/AM工作溶液(3 μM Fluo-3/AM, HBSS)于37℃

孵育 20 min,用 HBSS 再次洗涤并置于激光扫描共聚焦显微镜上,用 488 nm 激发光激发并在 530 nm 处检测。细胞每秒扫描一次,共持续 240 s。在 HBSS 中记录 60 s 作为基线,随后将细胞暴露于加入了谷氨酸的 HBSS 中(50 μ M 谷氨酸 + 10 μ M 甘氨酸),显微镜下记录 180 s。

1.8 统计学分析

上述实验所得数据的记录、处理、运算、作图和统计学分析应用 Microsoft Excel 2016、SPSS 22.0 及 IMAGE J 软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准

差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料两组间比较采用 t 检验或非配对 t 检验。计数资料比较行 χ^2 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ptx 的治疗可减小卒中后脑梗死面积

PTx 治疗后,脑梗死面积较对照组明显减小,由(51 \pm 11)%降至(34 \pm 8)%,说明 PTX 的治疗可以缩小 MACO 后造成的缺血梗死灶,在卒中中起到保护作用。见图 1。

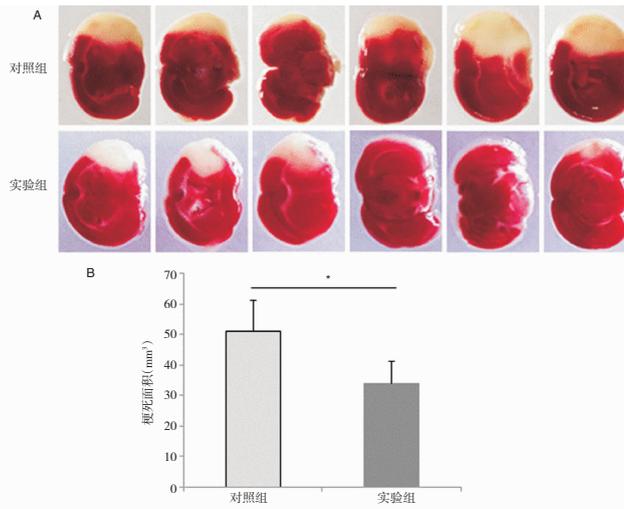


图 1 MACO 后 24 h 小鼠脑梗死面积分析

注:A:实验组与对照组脑切片 TTC 染色,可见实验组脑梗死面积明显减小。B:实验组与对照组脑切片 TTC 染色梗死面积分析柱形图,实验组脑梗面积明显减小。* 为实验组与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 Ptx 在体外能增加卒中后神经元的存活率

采用谷氨酸刺激神经元细胞,以模拟卒中后神经元的损伤模型。运用 PTx 治疗,研究 PTx 对卒中后神经元的保护作用。MTT 结果显示,谷氨酸刺激会使神经元存活率降低,而经过 PTX 治疗后,神经元存活率可由(0.618 \pm 0.06)提高至(1.1 \pm 0.12)($P < 0.05$)。细胞形态观察也得到了相似的结论,谷氨酸刺激后,神经元胞体膨胀、透光性降低,轴突碎裂,部分细胞开始崩解,视野中细胞碎片增多。而经 PTX 治疗后,神经元轴突完整未断裂,视野中细胞碎片明显减少,崩解细胞少见。通过检测 LDH 的含量,来反应细胞存活情况。实验结果显示,谷氨酸刺激后,LDH 含量明显上升,提示细胞损伤严重。而经 PTX 治疗,可逆转谷氨酸使 LDH 升高的这种趋势,使其由(1.31 \pm 0.11)降低至(0.76 \pm 0.08)($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 Ptx 减少卒中后神经元内钙离子

细胞钙显像可直接的反应细胞内钙离子的变化情况,通过实验可观察到,谷氨酸刺激后,神经元内钙离子含量明显的升高,在短时间内达到峰值(约为正常值的 5 倍),并长时间稳定在此水平。经 PTx 治疗后,谷氨酸增加神经元钙离子内流的现象被明显抑制,神经元内钙离子含量缓慢增加,只增至正常含量的 2~3 倍。1/2 峰值时间为细胞内钙浓度达到半峰浓度值所需的时间,可用来表示细胞钙内流的速度。PTx 治疗后,钙内流速度显著下降,T1/2 由(18.5 \pm 2.5)s 延长至(85.4 \pm 10.2)s($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 Ptx 减少卒中后神经元的凋亡

我们采用免疫组化法检测 Caspase-3,以反映神经元在卒中后凋亡的情况。卒中 24 h 后,小鼠脑中 Caspase-3 阳性细胞由(677.7 \pm 117.8)个/ mm^2

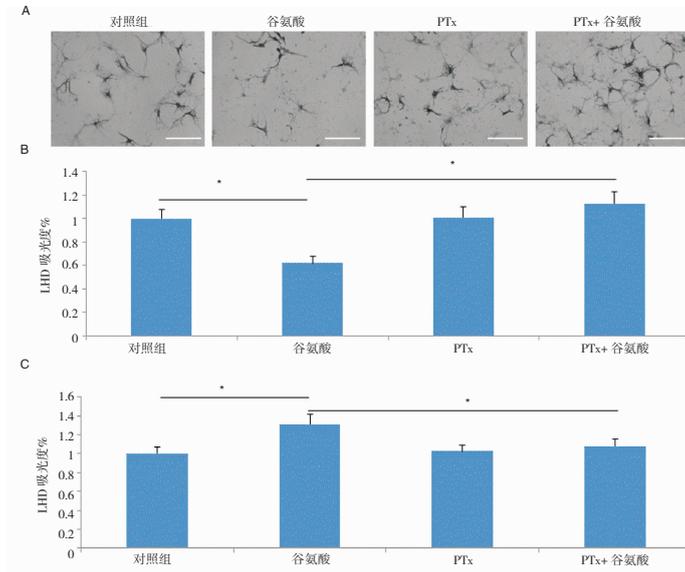


图2 PTx在体外能增加卒中后神经元的存活率

注:A:四组经过不同药物处理的典型神经元图像,谷氨酸可对神经元造成损伤,而PTx能减轻这种损伤。比例尺=50 μm。B:将四组经过不同药物处理的神经元进行MTT检测,统计其吸光值的变化,PTx治疗增加神经元的存活率。C:检测LDH含量,统计其吸光值的变化以评估神经元的受损程度,PTx减轻神经元的损伤。上述数据均将对对照组标准化为1进行比较。

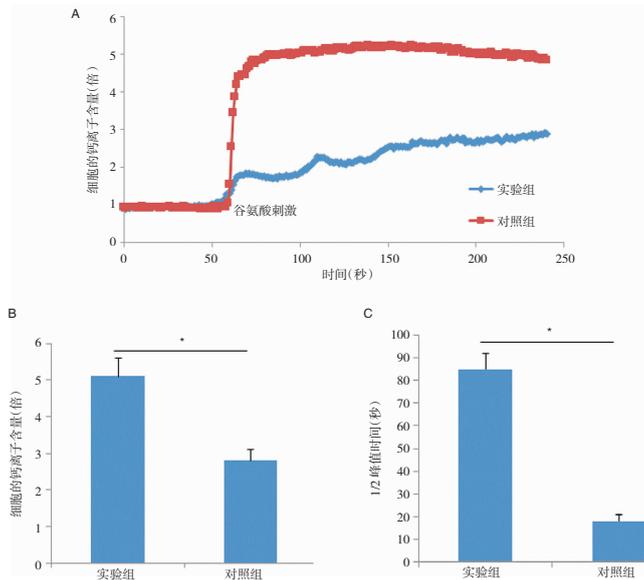


图3 PTx减少卒中后神经元内钙离子

注:A:记录250 s内神经元中的钙内流情况。谷氨酸刺激使神经元钙离子内流迅速达到峰值,而PTx治疗可显著降低内流。B:计算细胞内流钙离子的倍增量,以未加入谷氨酸刺激时钙内流量为基数1,其倍增倍数代表钙内流量。对照组钙内流增加了5倍以上,而PTx治疗组钙内流量却少于3倍。C:记录达到峰值钙浓度一半所需的时间,以评价钙内流的速度。PTx处理显著降低了钙内流的速度。上述数据均以正常神经元标准化为1进行比较。

减少至(297.5 ± 83.6)个/mm² (P < 0.05);将图像进行Caspase-3阳性细胞光密度的半定量分析,结果显示,实验组的小鼠,脑内Caspase-3表达量由

(1.89 ± 0.2)降至(1.36 ± 0.05) (P < 0.05),提示PTx可在卒中后很好的抑制神经元凋亡。见图4。

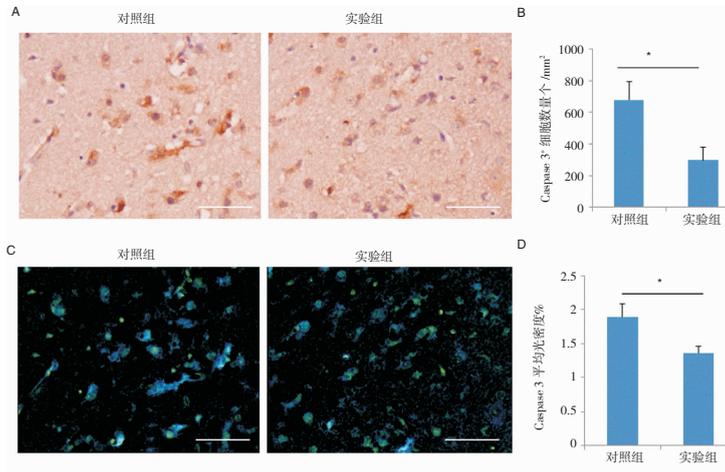


图4 Pt_x减少卒中后神经元的凋亡

注: A: MCAO 后 24 h 在缺血区域用 Caspase-3 抗体染色。比例尺 = 50 μ m。B: Caspase-3 阳性细胞数量的半定量分析。C: 用 Image J 软件反转图像以测量 Caspase-3 阳性细胞的光密度。比例尺 = 50 μ m。D: Caspase-3 阳性细胞的密度的半定量分析。* 为实验组与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺血性脑卒中已超过心脏疾病,成为我国人民致死和致残的首位原因^[1]。如何有效预防或减少半暗带神经元的凋亡是治疗缺血性卒中的有效手段。我们的研究显示 PT_x 可以抑制钙离子内流入神经元,继而减少神经元损伤,减少梗死面积,有神经保护功能。

脑缺血发生后,诱导细胞凋亡的通路包括内源性和外源性两条^[2,11]。内源性通路主要由钙离子 (Ca^{2+}) 内流增加介导,以线粒体损伤为核心,继而导致凋亡^[12-15]。研究表明,位于神经元上的谷氨酸受体 AMPA 和 NMDA 是脑缺血后介导 Ca^{2+} 内流的重要通道^[16,17]。但目前临床实验表明,现有阻断谷氨酸受体治疗脑缺血效果不佳^[18,19]。继续探索其它可有效阻断谷氨酸功能,减少 Ca^{2+} 内流的方法及药物,具有重要科研和临床价值^[3]。

百日咳毒素 (PT_x) 是百日咳鲍特氏杆菌产生的一种外毒素,是典型的 A/B 型毒素,即由 A、B 两个亚单位组成。既往研究表明,PT_x 能破坏血脑屏障,防止自身反应 T 细胞抗原产生,刺激抗原呈递细胞 (APCs),抑制第二信使和影响信号通路。我们的既往研究显示,PT_x 可以减轻自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型神经元的凋亡,进而改善临床症状^[20]。文献提示,PT_x 可减少 HEK293 细胞系的钙离子内流^[8]。我们的结果首次发现 PT_x 可显著减少神经元的钙离子内流。虽然抑制钙内流的详细发生机制还不清楚,但我们猜测可能是 PT_x 阻断生理

条件下 NMDA 通道开放,减少钙离子通过 NMDA 通道内流^[21,22],或者是抑制电压门控钙通道,使钙内流减少^[23]。无论详细机制如何,钙显像曲线明确显示,卒中后 PT_x 使神经元钙内流明显减弱。

乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种广泛存在于细胞质内的酶,它的释放与细胞损伤和细胞膜崩解相关。在许多关于卒中的研究中,细胞外 LDH 通常用来反应细胞的存活情况^[24,25]。我们的研究显示谷氨酸刺激可增加神经元释放 LDH,而 PT_x 处理可显著降低谷氨酸刺激所致神经元 LDH 的释放。在此基础上,我们 MTT 实验检测了谷氨酸刺激后神经元的活性,结果显示谷氨酸刺激后神经元的活性下降明显,而 PT_x 可以逆转这一损伤,在此验证了 PT_x 有神经保护功能。

在体内研究部分,我们发现,卒中后运用 PT_x 对小鼠进行治疗,小鼠脑梗死面积减小,说明 PT_x 对脑卒中缺血半暗带有保护作用。由于细胞钙超载,使细胞线粒体发生应激,最终启动细胞凋亡程序,发生由 caspase-3 介导的凋亡^[6,26-28]。所以我们检测了 PT_x 对卒中后神经元 caspase-3 的影响。我们的结果显示 PT_x 可明显减弱神经元细胞上 Caspase-3 的表达,也可减少 Caspase-3 阳性细胞,说明 PT_x 的确有减弱卒中后神经元凋亡的能力。

总的来说,我们的研究结果发现,PT_x 可在抑制卒中后神经元钙离子内流,减少钙超载的发生,使神经元存活率升高,凋亡减少,继而减少梗死面积,具有神经保护的作用。

参 考 文 献

- [1] Liu L, Wang D, Wong KS, et al. Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority [J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3651-3654.
- [2] 杨文. 细胞凋亡线粒体途径相关蛋白 Bad 和 Bcl-xL 参与缺血性脑卒中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2013, 40(3): 270-273.
- [3] 尤晓欣, 裴建. Toll 样受体信号通路和缺血性卒中炎症反应机制的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41(2): 138-141.
- [4] Ismael S, Zhao L, Nasoohi S. Inhibition of the NLRP3-inflammasome as a potential approach for neuroprotection after stroke[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5971.
- [5] Niu RN, Shang XP, Teng JF. Overexpression of Egr2 and Egr4 protects rat brains against ischemic stroke by downregulating JNK signaling pathway[J]. *Biochimie*, 2018, 149: 62-70.
- [6] 陈志强. 缺血性脑血管病的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(07): 159-162.
- [7] Tang Z, Yin JX, Han P, et al. Pertussis toxin attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by upregulating neuronal vascular endothelial growth factor[J]. *Neuroreport*, 2013, 24: 469-475.
- [8] Meucci O, Fatatis A, Simen AA. Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival[J]. *Proc Nati Acad Sci U S A*, 2000, 97(14): 8075-8080.
- [9] Tang Z, Gan Y, Liu Q, et al. CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke [J]. *J Neuroinflamm*, 2014, 11: 26.
- [10] Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, et al. Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation [J]. *Brain Res*, 1997, 48(2): 187-196.
- [11] Cheng CY, Lin JG, Su NY, et al. Electroacupuncture-like stimulation at Baihui and Dazhui acupoints exerts neuroprotective effects through activation of the brain-derived neurotrophic factor-mediated MEK1/2/ERK1/2/p90RSK/bad signaling pathway in mild transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 92.
- [12] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 2009, 40: e331-e339.
- [13] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 231-241.
- [14] Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 1041-1043.
- [15] Morales-Hernandez A, Sanchez-Martin FJ, Hortigon-Vinagre MP, et al. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis by disruption of intracellular calcium homeostasis in human neuronal cell line SHSY5Y [J]. *Apoptosis*, 2012, 17: 1170-1181.
- [16] Micu I, Jiang Q, Coderre E, et al. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia [J]. *Nature*, 2006, 439: 988-992.
- [17] Simard JM, Tarasov KV, Gerzanich V. Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772: 947-957.
- [18] Liu Y, Wong TP, Aarts M, et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo [J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 2846-2857.
- [19] Yin JX, Tang Z, Gan Y, et al. Pertussis toxin modulates microglia and T cell profile to protect experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 81: 1-5.
- [20] 王进昆, 高峰, 谢姝姮, 等. 百日咳毒素减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型炎症反应的机制研究 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43(2): 112-118.
- [21] Olney JW, Collins RC. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage [J]. *Adv Neurol*, 1986, 44: 857-877.
- [22] Haak LL. Metabotropic glutamate receptor modulation of glutamate responses in the suprachiasmatic nucleus [J]. *J Neurophysiol*, 1999, 81(3): 1308-1317.
- [23] Kashiwara T, Nakada T, Shimojo H, et al. Chronic receptor-mediated activation of G_io proteins alters basal t-tubular and sarcolemmal L-type Ca²⁺ channel activity through phosphatases in heart failure [J]. *Am J Physiol*, 2012, 302(8): H1645-H1654.
- [24] Fan W, Li X, Huang L, et al. S-oxiracetam ameliorates ischemic stroke induced neuronal apoptosis through up-regulating $\alpha 7$ nAChR and PI3K/Akt/GSK3 β signal pathway in rats [J]. *Neurochem Int*, 2018, 115: 50-60.
- [25] Song Q, Gou WL. FAM3A Protects Against Glutamate-Induced Toxicity by Preserving Calcium Homeostasis in Differentiated PC12 Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(5): 2029-2041.
- [26] Hara H, Takeda A, Takeuchi M, et al. The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes [J]. *J Immunol*, 2002, 168(5): 2288-2295.
- [27] Céspedes Rubio úE, Pérez-Alvarez MJ, Lapuente Chala C. Sex steroid hormones as neuroprotective elements in ischemia models [J]. *J Endocrinol*, 2018, 237: R65-R81.
- [28] 张秀萍, 翟凤国, 梁启超, 等. 脑缺血时半乳糖凝集素-3 对大鼠脑皮质中 bcl-2, BAX 及 caspase-3 表达的影响 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(4): 375-378.