

自噬对慢性神经病理性疼痛大鼠 N-甲基-D-天冬氨酸受体和痛敏的影响

田礼华¹ 张杨² 谢克亮² 陈红光²

¹天津市武清区中医医院疼痛科 301700; ²天津医科大学总医院麻醉科 300054

通信作者: 谢克亮, Email: daguang521521@163.com

【摘要】 目的 探讨细胞自噬对神经病理性疼痛(NP)大鼠 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体及其亚基 NR2B 和行为学的调控作用。**方法** 将雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术(Sham)组、NP 组、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)预处理组(3-MA+NP 组)和自噬激动剂雷帕霉素(Rap)预处理组(Rap+NP 组),每组 22 只。采用结扎坐骨神经的方法制备 NP 动物模型; Sham 组仅暴露坐骨神经但不结扎。两个预处理组分别于术前 1 h 腹腔注射 3-MA 15 mg/kg 或 Rap 10 mg/kg。各组大鼠于术前及术后 1、3、7、14 d 检测行为学指标机械缩足反应阈(MWT)和热缩足潜伏期(TWL)。各组于术后 1 d、7 d 取脊髓组织,透射电镜下观察自噬体形成情况;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3-II)、Beclin1 以及 NMDA 和 NR2B 亚基的表达;采用免疫荧光法检测 LC3 的阳性表达。**结果** 与 Sham 组比较, NP 组大鼠 MWT 随术后时间延长逐渐下降, TWL 逐渐缩短;且 1 d 时自噬体及脊髓背角 LC3-II、Beclin1、NMDA、NR2B 蛋白表达和 LC3 阳性表达即明显增加,并持续至 7 d,说明 NP 可导致痛敏发生并激活自噬活性。给予 3-MA 预处理可使 NP 大鼠 MWT 进一步降低、TWL 进一步缩短,自噬体减少,脊髓背角 LC3-II、Beclin1 表达下降, NMDA、NR2B 表达进一步增加,术后 1 d 与 NP 组比较差异即有统计学意义[MWT(g): 29.4 ± 2.4 比 42.5 ± 6.6 , TWL(s): 7.2 ± 1.0 比 8.8 ± 1.1 , LC3-II/ β -actin: 0.38 ± 0.03 比 0.52 ± 0.07 , Beclin1/ β -actin: 0.29 ± 0.06 比 0.59 ± 0.05 , NMDA/ β -actin: 0.62 ± 0.06 比 0.50 ± 0.06 , NR2B/ β -actin: 0.57 ± 0.03 比 0.46 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$],且免疫荧光染色证实 LC3 阳性表达明显减少;而给予 Rap 预处理可使 NP 大鼠 MWT 增加、TWL 延长,自噬体增加,脊髓背角 LC3-II、Beclin1 表达增加, NMDA、NR2B 表达下降,也于术后 1 d 与 NP 组比较即表现出统计学差异[MWT(g): 49.4 ± 4.4 比 42.5 ± 6.6 , TWL(s): 10.5 ± 1.2 比 8.8 ± 1.1 , LC3-II/ β -actin: 0.67 ± 0.09 比 0.52 ± 0.07 , Beclin1/ β -actin: 0.71 ± 0.08 比 0.59 ± 0.05 , NMDA/ β -actin: 0.40 ± 0.05 比 0.50 ± 0.06 , NR2B/ β -actin: 0.34 ± 0.04 比 0.46 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$],且免疫荧光显示 LC3 阳性表达增加,并持续至 7 d。说明 Rap 可以增加自噬的活性,减少痛敏的发生,抑制 NMDA 受体及其 NR2B 亚基的表达。**结论** NP 可以诱发细胞自噬的增加,且通过自噬可以调控 NMDA 受体及其亚基的表达和痛敏的变化。

【关键词】 神经痛; 自噬; N-甲基-D-天冬氨酸

基金项目: 国家自然科学基金(81601667)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.016

Effect of autophagy on N-methyl-D-aspartate receptor and hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain

Tian Lihua¹, Zhang Yang², Xie Keliang², Chen Hongguang²

¹Department of Pain, Tianjin Wujing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301700, China; ²Department of Anesthesiology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300054, China

Corresponding author: Xie Keliang, Email: daguang521521@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of autophagy on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and its subunit NR2B and behavioral test in a rat model of neuropathic pain (NP). **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into sham group, NP group, autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) pretreatment group (3-MA+NP group) and autophagy inducer rapamycin (Rap) group (Rap+NP group) by random number table with 22 rats in each group. NP animal model was reproduced by ligating sciatic nerve, while sciatic nerve of the rats in the sham group were only exposed but not ligated. The rats in two pretreatment groups were intraperitoneally challenged with 3-MA 15 mg/kg or Rap 10 mg/kg injection 1 hour before operation. Mechanical paw withdrawal threshold (MWT) and thermal paw withdrawal latency (TWL) were measured before and 1, 3, 7, 14 days after operation in each group. Spinal cord tissues were harvested at 1 day and 7 days after operation for autophagosome observation by electron microscope. The expressions of autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II), Beclin1, and NMDA, NR2B were determined by Western Blot. The positive expression of LC3 was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with sham group, the MWT and TWL of rats in NP group were decreased gradually with the prolongation of operation time, the number of autophagosome, the expressions of LC3-II, Beclin1, NMDA, NR2B, and the positive expression of LC3 in spinal cord were significantly increased at 1 day after operation and till 7 days, which indicated that NP led to hyperpathia and autophagy activation. Compared with NP group, MWT was significantly further decreased, TWL was further shortened, the number of autophagosome was decreased, the expressions of LC3-II and Beclin1 in

spinal cord were decreased, and NMDA and NR2B expressions were further increased after 3-MA pretreatment, with significant differences at 1 day after operation [MWT (g): 29.4 ± 2.4 vs. 42.5 ± 6.6 , TWL (s): 7.2 ± 1.0 vs. 8.8 ± 1.1 , LC3-II/ β -actin: 0.38 ± 0.03 vs. 0.52 ± 0.07 , Beclin1/ β -actin: 0.29 ± 0.06 vs. 0.59 ± 0.05 , NMDA/ β -actin: 0.62 ± 0.06 vs. 0.50 ± 0.06 , NR2B/ β -actin: 0.57 ± 0.03 vs. 0.46 ± 0.03 , all $P < 0.05$]. Immunofluorescence staining confirmed that the positive expression of LC3 was significantly decreased. Rap pretreatment could increase MWT, TWL and the number of autophagosome, increase LC3-II and Beclin1 expressions in spinal cord, and decrease NMDA and NR2B expressions in NP rats, and significant differences at 1 day after operation were found as compared with those in NP group [MWT (g): 49.4 ± 4.4 vs. 42.5 ± 6.6 , TWL (s): 10.5 ± 1.2 vs. 8.8 ± 1.1 , LC3-II/ β -actin: 0.67 ± 0.09 vs. 0.52 ± 0.07 , Beclin1/ β -actin: 0.71 ± 0.08 vs. 0.59 ± 0.05 , NMDA/ β -actin: 0.40 ± 0.05 vs. 0.50 ± 0.06 , NR2B/ β -actin: 0.34 ± 0.04 vs. 0.46 ± 0.03 , all $P < 0.05$], and immunofluorescence showed that the positive expression of LC3 was increased and lasted for 7 days. It indicated that Rap could increase the activity of autophagy, alleviate the occurrence of hyperalgesia, and reduce the expressions of NMDA receptor and its NR2B subunit. **Conclusion** NP could regulate the variety of NMDA/NR2B and hyperalgesia via increasing autophagy.

【Key words】 Neuropathic pain; Autophagy; N-methyl-D-aspartate

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81601667)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.03.016

中枢、外周神经系统损伤或功能障碍产生的神经病理性疼痛(NP),主要是以自发痛、痛觉过敏及超敏为特征的慢性疼痛状态^[1],其发病原因复杂,发病机制至今尚未彻底阐明,已经成为临床医生面临的巨大难题。N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体在慢性疼痛的发生发展和维持中发挥重要作用, NR2B 是 NMDA 受体的一个重要亚基,可调控 NMDA 受体在 NP 发生发展和维持中的作用。自噬通过消除旧物质为真核细胞的生存提供新的物质和能量^[2],是神经细胞维持稳态所必须的过程,神经细胞自噬是应激诱导的,与各种神经病理改变密切相关^[3]。既往报道,自噬在 NP 的发展过程中发挥重要的调节作用^[4]。本实验旨在探讨自噬活性对 NP 大鼠受体 NMDA/NR2B 和行为学的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组:雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,购自解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号: SCXK(军)2012-0004。按照随机数字表法将大鼠分为假手术(Sham)组、NP 组、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)预处理组(3-MA+NP 组)和自噬激动剂雷帕霉素(Rap)预处理组(Rap+NP 组),每组 22 只。

1.2 NP 模型制备:根据文献[5]报道的方法制备 NP 大鼠模型。以 10% 水合氯醛(300 ~ 350 mg/kg)麻醉大鼠并俯卧位固定,切开大腿中后部皮肤,钝性分离肌肉暴露坐骨神经,以 4-0 铬制羊肠线适度结扎暴露的坐骨神经主干(结扎 4 处,间距 1 mm 左右),结扎强度以神经外膜轻度受压为宜,以坐骨神经支配区域肌肉轻度颤动为止,然后用生理盐水冲洗皮肤伤口,逐层缝合,所有手术操作均遵循无菌原则。Sham 组大鼠暴露坐骨神经数分钟,但不结扎。若大

鼠出现后肢瘫痪或者死亡则予以剔除,换用新的大鼠。两个预处理组参考文献[6]及预实验结果,于术前 1 h 经腹腔注射 3-MA 15 mg/kg 或 Rap 10 mg/kg。

本研究经天津医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:2018-3-6),实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 行为学观察

1.3.1 机械痛敏观察:各组大鼠分别于 NP 术前及术后 1、3、7、14 d,在 Von-Frey 纤维丝基础上,以 up-down 法测量机械缩足反应阈(MWT)。

1.3.2 热痛敏观察:各组大鼠分别于 NP 术前及术后 1、3、7、14 d,用热板测试方法测定热痛阈。应用 Planter test 37370 热痛仪(意大利 UGO 公司)检测热缩足潜伏期(TWL)。

1.4 标本收集及准备:各组大鼠于术后 1 d 和 7 d,在 10% 水合氯醛麻醉下取部分脊髓膨大处,固定后用于电镜观察。另取部分脊髓膨大处,固定切片,用于免疫荧光染色;取部分 L4 ~ 6 脊髓组织进行匀浆,分离提取总蛋白溶液,加入 5 $\times$ 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 变性 5 min,置于 -70 $^{\circ}$ C 深低温冰箱备用。

1.5 自噬体形成:取部分脊髓膨大处,用 2% 戊二醛固定后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,乙醇脱水、块染、包埋、切片,透射电镜下观察自噬体形成情况。

1.6 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测蛋白表达:取脊髓组织标本进行蛋白检测,配制分离胶和浓缩胶,上样、电泳、转膜;用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜 3 次,用含 5% 胎牛血清的 TBST 封闭 1 h, TBST 洗 5 次;加入一抗溶液[β -肌动蛋白(β -actin) 1 : 1 000, NMDA 1 : 1 000, NR2B 1 : 1 000, 自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II) 1 : 500, 自噬相关蛋白 Beclin1 1 : 500, 美国

Sigma 公司)4℃过夜;TBST洗膜3次,加二抗(TBST 1:5 000,北京中杉金桥生物工程有限公司)孵育,室温振荡1h,显色、曝光、显影、定影。用Quantity One图像分析软件分析各条带吸光度(A)值,以靶蛋白与 β -actin的A值比值作为目的蛋白表达量。

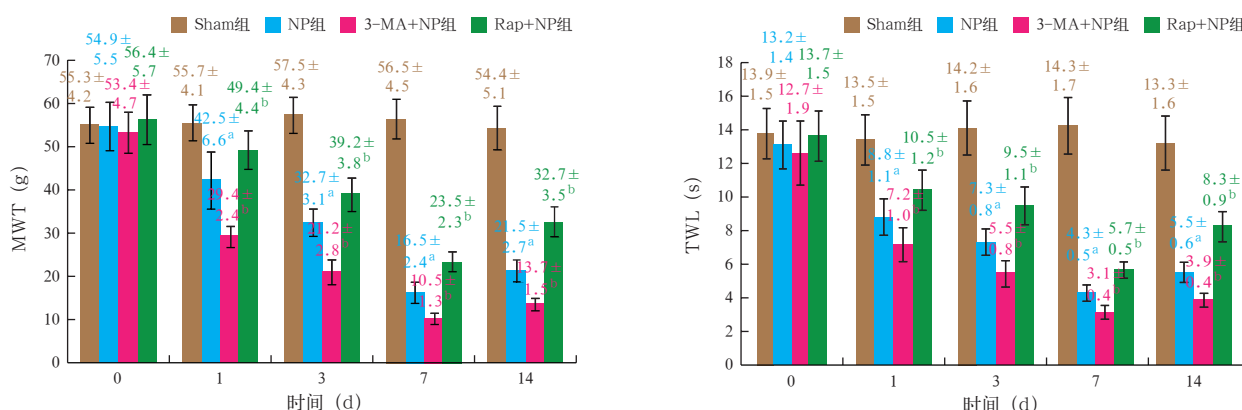
1.7 免疫荧光检测 LC3 表达:取部分脊髓膨大处,固定、切片,置0.25%曲通X-100溶液中,37%温箱孵育30 min。PBS冲洗,山羊血清封闭1h,加一抗LC3(1:200,美国Sigma公司)4℃孵育过夜;室温复温30 min,加二抗IgG(1:500,美国Sigma公司)室温孵育2h, PBS冲洗,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色5 min, PBS冲洗,封片。荧光显微镜下观察细胞染色情况,LC3阳性表达呈红色,细胞核呈蓝色。

1.8 统计学分析:用SPSS 18.0软件处理数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析和LSD检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学变化比较(图1):Sham组制模前后MWT和TWL无明显变化。随制模时间延长, NP组MWT逐渐降低, TWL逐渐缩短,术后各时间点与Sham组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);给予自噬抑制剂3-MA预处理后大鼠MWT较NP组进一步降低, TWL进一步缩短(均 $P<0.05$);而给予自噬激动剂Rap预处理可使MWT增加, TWL延长,术后各时间点与NP组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.2 各组大鼠自噬体形成情况比较(图2):透射电镜下观察显示, Sham组术后各时间点自噬体数量均较少;与Sham组比较, NP组术后1d和7d自噬体数量明显增加;与NP组相比, 3-MA+NP组术后1d和7d自噬体数量减少,而Rap+NP组自噬体数量增加。



注: Sham为假手术, NP为神经病理性疼痛, 3-MA为自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤, Rap为自噬激动剂雷帕霉素, MWT为机械缩足反应阈, TWL为热缩足潜伏期;与Sham组比较, $^aP<0.05$;与NP组比较, $^bP<0.05$

图1 各组大鼠制模前后机械痛敏MWT和热痛敏TWL的变化比较

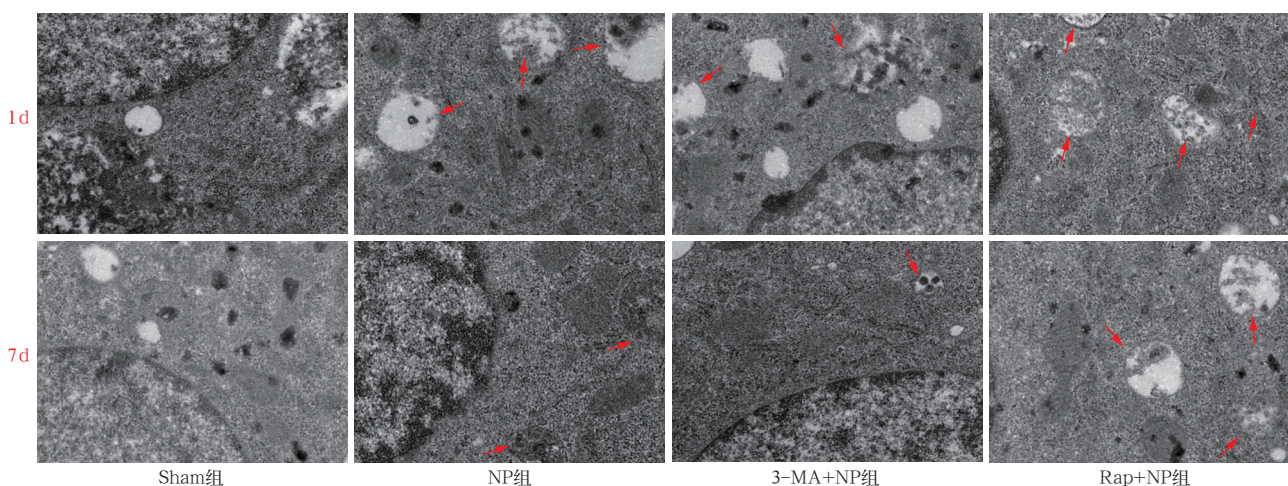
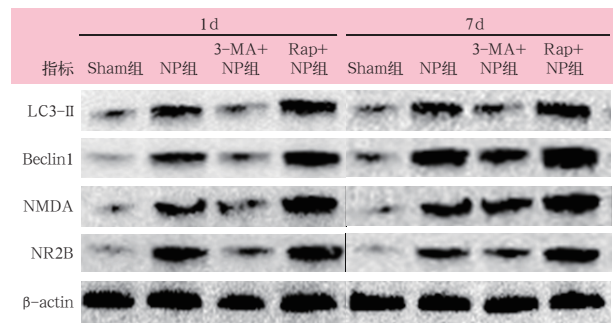


图2 透射电镜下观察各组大鼠术后1d和7d脊髓自噬体形成情况 假手术(Sham)组细胞核结构正常,线粒体、内质网结构清晰,细胞内自噬体少见;神经病理性疼痛(NP)组线粒体嵴肿胀、模糊,内质网扩张,自噬体增多;与NP组比较,自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)预处理组(3-MA+NP组)线粒体嵴肿胀、模糊加重,内质网扩张增多,自噬体减少;自噬激动剂雷帕霉素(Rap)预处理组(Rap+NP组)线粒体嵴肿胀减轻,内质网扩张减少,自噬体增多;箭头所示为自噬体 醋酸铀-枸橼酸铅双染 $\times 20\ 000$

2.3 各组大鼠自噬相关蛋白表达比较(图3;表1):与Sham组比较, NP组术后1 d脊髓背角LC3-II、Beclin1、NMDA及NR2B的蛋白表达即明显增加(均 $P<0.05$), 术后7 d时各蛋白表达均较1 d时呈下降趋势, 但仍显著高于Sham组(均 $P<0.05$)。与NP组相比, 3-MA+NP组术后1 d和7 d脊髓背角LC3-II、Beclin1的蛋白表达明显减少, NMDA、NR2B的蛋白表达明显增加(均 $P<0.05$); 而Rap+NP组术后1 d和7 d脊髓背角LC3-II、Beclin1的蛋白表达明显增加, NMDA、NR2B的蛋白表达明显减少(均 $P<0.05$)。

2.4 各组大鼠LC3阳性表达比较(图4):Sham组术后1 d和7 d LC3阳性表达较少; 与Sham组比较, NP组术后1 d脊髓背角LC3阳性表达即增加, 随后呈减少趋势; 与NP组相比, 3-MA+NP组1 d和7 d脊髓背角LC3阳性表达减少, 而Rap+NP组LC3阳性表达增加。



Sham为假手术, NP为神经病理性疼痛, 3-MA为自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤, Rap为自噬激动剂雷帕霉素, LC3-II为微管相关蛋白1轻链3-II, Beclin1为自噬相关蛋白, NMDA为N-甲基-D-天冬氨酸, NR2B为NMDA亚基, β -actin为 β -肌动蛋白

图3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠术后1 d和7 d脊髓自噬相关蛋白表达

3 讨论

本实验采用结扎坐骨神经的方法制备慢性NP大鼠模型。此模型受环境影响小, 疼痛刺激的产生及行为学表现与临床疼痛自发痛、痛觉过敏和痛觉

表1 各组大鼠术后1 d和7 d脊髓自噬相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(只)	LC3-II/ β -actin		Beclin1/ β -actin		NMDA/ β -actin		NR2B/ β -actin	
		1 d	7 d	1 d	7 d	1 d	7 d	1 d	7 d
Sham组	6	0.10 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02
NP组	6	0.52 $\pm$ 0.07 ^a	0.48 $\pm$ 0.04 ^a	0.59 $\pm$ 0.05 ^a	0.38 $\pm$ 0.03 ^a	0.50 $\pm$ 0.06 ^a	0.37 $\pm$ 0.03 ^a	0.46 $\pm$ 0.03 ^a	0.38 $\pm$ 0.04 ^a
3-MA+NP组	6	0.38 $\pm$ 0.03 ^b	0.28 $\pm$ 0.03 ^b	0.29 $\pm$ 0.06 ^b	0.22 $\pm$ 0.02 ^b	0.62 $\pm$ 0.06 ^b	0.46 $\pm$ 0.04 ^b	0.57 $\pm$ 0.03 ^b	0.48 $\pm$ 0.03 ^b
Rap+NP组	6	0.67 $\pm$ 0.09 ^b	0.60 $\pm$ 0.07 ^b	0.71 $\pm$ 0.08 ^b	0.52 $\pm$ 0.06 ^b	0.40 $\pm$ 0.05 ^b	0.33 $\pm$ 0.04 ^b	0.34 $\pm$ 0.04 ^b	0.30 $\pm$ 0.04 ^b

注: Sham为假手术, NP为神经病理性疼痛, 3-MA为自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤, Rap为自噬激动剂雷帕霉素, LC3-II为微管相关蛋白1轻链3-II, β -actin为 β -肌动蛋白, Beclin1为自噬相关蛋白, NMDA为N-甲基-D-天冬氨酸, NR2B为NMDA亚基; 与Sham组比较, ^a $P<0.05$; 与NP组比较, ^b $P<0.05$

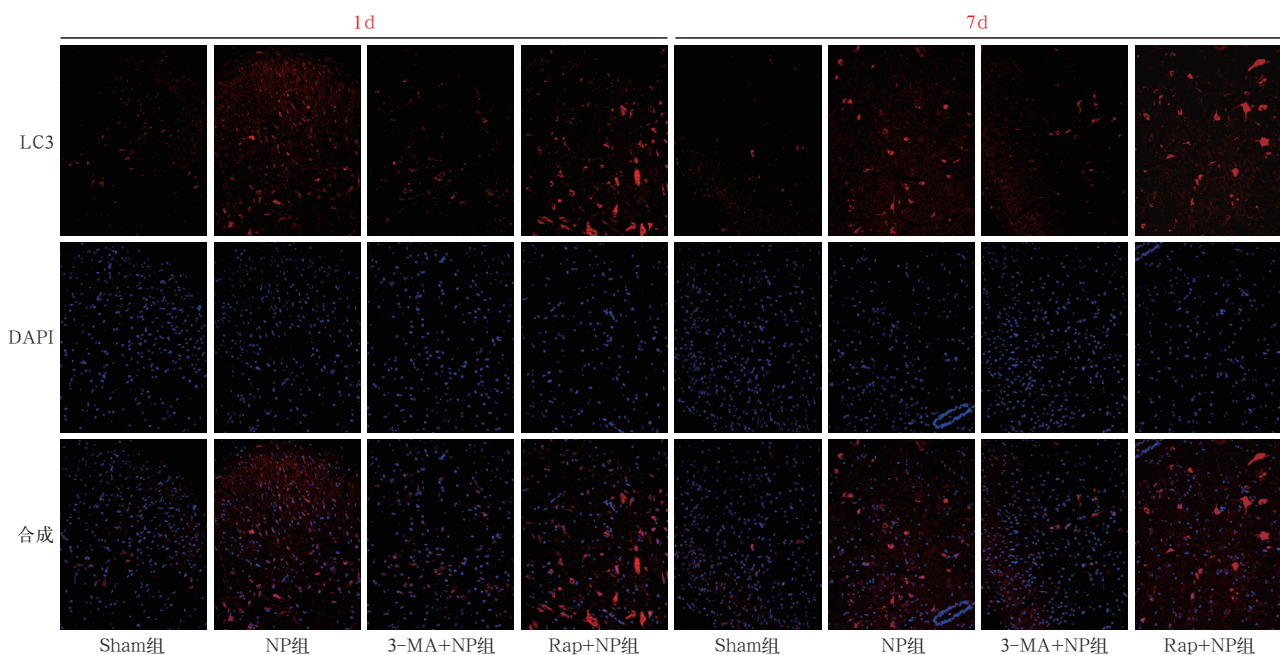


图4 荧光显微镜下观察各组大鼠术后1 d和7 d脊髓背角微管相关蛋白1轻链3(LC3)的表达 LC3阳性表达呈红色, 细胞核呈蓝色。假手术(Sham)组脊髓背角LC3阳性细胞较少; 神经病理性疼痛(NP)组术后1 d LC3阳性细胞即较Sham组增多, 7 d时表达有所减少; 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)预处理组(3-MA+NP组)LC3阳性细胞较NP组相应时间点明显减少; 自噬激动剂雷帕霉素(Rap)预处理组(Rap+NP组)LC3阳性细胞较NP组相应时间点明显增多 免疫荧光染色 中倍放大

超敏等表现相似,被国内外学者广泛应用。本实验结果表明,NP大鼠 MWT降低,TWL缩短,直至 14 d,提示慢性 NP 模型制备成功。

在生理或适度应激状况下,通过与溶酶体融合的途径,自噬对受损细胞质或细胞器进行包裹并降解,降解后的氨基酸可以通过循环再利用的方式来调节细胞对营养缺乏的适应,还可以减少线粒体释放的有害细胞因子并减少细胞凋亡,从而发挥细胞保护作用^[7]。LC3 蛋白是最常用的自噬蛋白标志物,有 I 型与 II 型之分。LC3-II 的数量与自噬体的数量有密切关系,LC3-II 含量或 LC3-II/LC3-I 比值与自噬体数量呈正相关,LC3-II 的表达变化可评估自噬的发生^[8]。Beclin1 是哺乳动物参与自噬体形成的特异性基因。LC3 参与自噬体的形成以及调节其他自噬蛋白的定位,Beclin1 表达水平的变化可以动态监测和判断自噬活动的活性^[9-10]。本实验显示,结扎坐骨神经可诱导 NP 大鼠脊髓背角自噬体增加,LC3-II、Beclin1 表达增加,随时间进展逐渐下降,但术后 7 d 仍高于 Sham 组。说明大鼠受到外周神经损伤后自噬水平升高;在细胞自噬增加的过程中,自噬体释放的细胞器在细胞内循环利用,对损伤神经起到修复作用,从而减少神经受损引起的痛觉过敏等症状。Berliocchi 等^[11-12]研究发现,NP 大鼠 LC3-II 表达明显高于 Sham 组,且损伤侧的 Beclin1 表达明显高于对侧的表达,说明 NP 可以激发自噬蛋白的表达。本实验结果显示,NP 可增加大鼠脊髓背角自噬体的数量及 LC3-II、Beclin1 的表达,表明 NP 可诱发自噬激活;给予自噬抑制剂 3-MA 后,自噬体数量减少,自噬蛋白表达下降,自噬活动被抑制,大鼠痛敏增加,表现为 MWT 减少、TWL 缩短;Rap 促进自噬发生后,自噬体数量增加,自噬蛋白表达增加,自噬活动被增强,大鼠痛敏降低。说明自噬的过程参与 NP 痛敏的发生发展。

研究表明,NMDA 受体和 NR2B 亚基主要分布于与伤害性感受传导密切相关的脊髓背角浅层、边缘系统以及前脑,故考虑 NMDA 受体 NR2B 亚基与疼痛的痛觉传导和敏化息息相关^[13]。从本实验结果中可以发现,Rap 可增加自噬,减少 NMDA 受体和 NR2B 亚基表达;而 3-MA 抑制 NP 大鼠脊髓背角的自噬后,NMDA 受体和 NR2B 亚基表达增加,MWT 减少、TWL 缩短,痛敏增加。说明自噬对痛敏的调控是通过突触上 NMDA 受体 NR2B 亚基协助实现的。

综上所述,NP 可以诱发细胞自噬的增加,且通过自噬可以调控 NMDA 受体 NR2B 亚基的表达和痛敏的变化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9 (8): 807-819. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70143-5.
- [2] 王盛标,殷爽,李云峰,等.细胞自噬对脂多糖介导血管通透性增加的作用[J].中华危重病急救医学,2016,28(8):673-677. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.001.
Wang SB, Yin S, Li YF, et al. Effects of autophagy on lipopolysaccharide-induced vascular hyper-permeability [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (8): 673-677. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.001.
- [3] 刘焯,余娇,蔡艳星,等.自噬在炎症性疾病中的研究进展[J].中华危重病急救医学,2015,27(6):527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
Liu Y, Yu J, Cai YX, et al. Research progress regarding autophagy in inflammatory diseases [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- [4] 孙玉红,李锐,张野.自噬在神经病理性疼痛中的角色[J].国际麻醉学与复苏杂志,2018,39(2):161-164. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2018.02.016.
Sun YH, Li R, Zhang Y. The role of autophagy in neuropathic pain [J]. *Int J Anesth Resus*, 2018, 39 (2): 161-164. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2018.02.016.
- [5] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33 (1): 87-107. DOI: 10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- [6] Chen H, Hu Y, Xie K, et al. Effect of autophagy on allodynia, hyperalgesia and astrocyte activation in a rat model of neuropathic pain [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42 (4): 2009-2019. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3763.
- [7] 王欢,蔡珠虹,侯增霞,等.益气活血复方通过自噬调控心力衰竭大鼠心肌能量代谢的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2018,25(5):529-533. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.05.020.
Wang H, Cai ZH, Hou ZX, et al. A study of Yiqi Huoxue compound regulating cardiac energy metabolism in rats with heart failure via autophagy [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2018, 25 (5): 529-533. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.05.020.
- [8] 陈胜利,黄锦达,曾其毅,等.自噬和线粒体辅酶 Q 对急性脓毒症大鼠胰腺外分泌功能的影响[J].中华危重病急救医学,2015,27(2):86-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.002.
Chen SL, Huang JD, Zeng QY, et al. Effect of autophagy and mitochondrial coenzyme Q on exocrine function of pancreas in rats with acute sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (2): 86-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.002.
- [9] Clark RS, Bayir H, Chu CT, et al. Autophagy is increased in mice after traumatic brain injury and is detectable in human brain after trauma and critical illness [J]. *Autophagy*, 2008, 4 (1): 88-90. DOI: 10.4161/auto.5173.
- [10] Itakura E, Kishi C, Inoue K, et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19 (12): 5360-5372. DOI: 10.1091/mbc.E08-01-0080.
- [11] Berliocchi L, Russo R, Maiarù M, et al. Autophagy impairment in a mouse model of neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2011, 7: 83. DOI: 10.1186/1744-8069-7-83.
- [12] Berliocchi L, Maiarù M, Varano GP, et al. Spinal autophagy is differently modulated in distinct mouse models of neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 3. DOI: 10.1186/1744-8069-11-3.
- [13] Boyce S, Wyatt A, Webb JK, et al. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn [J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38 (5): 611-623. DOI: 10.1016/S0028-3908(98)00218-4.

(收稿日期:2018-12-25)