

罗思维, 李作孝. 青蒿琥酯对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的神经保护作用及细胞自噬的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 64 – 68.

Luo SW, Li ZX. Neuroprotective effect of artesunate on experimental autoimmune encephalomyelitis and on autophagy in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 64 – 68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.011

青蒿琥酯对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的神经保护作用及细胞自噬的影响

罗思维, 李作孝*

(西南医科大学附属医院神经内科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨青蒿琥酯对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠神经保护作用及细胞自噬影响。方法 选择 48 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、青蒿琥酯低剂量组、高剂量组共 4 组, 每组 12 只。采用 MOG35-55 多肽制备 EAE 模型, 青蒿琥酯低剂量组、高剂量组分别予以青蒿琥酯(10 mg/(kg·d), 50 mg/(kg·d))腹腔注射, 连续 10 d, 观察小鼠发病情况。脑组织行 luxol fast blue(LFB)染色观察脱髓鞘情况, 采用 Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3-I、LC3-II 的表达。结果 空白组小鼠均未发病, 模型组、青蒿琥酯各剂量组发病小鼠出现不同程度的尾部下垂、行走不稳、后肢无力等。青蒿琥酯各剂量组较模型组相比, 发病潜伏期、高峰期延迟、神经功能评分减低, 高剂量组较低剂量组作用明显($P<0.05$), 低剂量组和高剂量组发病高峰期比较无统计学意义($P>0.05$)。②LFB 染色见模型组脑组织髓鞘排列疏松、紊乱、低染, 青蒿琥酯各剂量组髓鞘染色情况好转。③Western blot 检测模型组与空白组相比, LC3-I、LC3-II 条带光密度值及 LC3-II/LC3-I 比值均增加($P<0.01$); 青蒿琥酯各剂量组较模型组相比, LC3-I、LC3-II 条带光密度值及 LC3-II/LC3-I 比值均减小($P<0.01$), 高剂量组较低剂量组作用明显($P<0.05$)。结论 青蒿琥酯对 EAE 小鼠具有神经保护作用, 减轻脑组织脱髓鞘情况, 且作用机制可能与通过下调 LC3-I、LC3-II 和 LC3-II/LC3-I 减轻细胞自噬有关。

【关键词】 青蒿琥酯; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 自噬; LC3-II/LC3-I 比值; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 04-0064-05

Neuroprotective effect of artesunate on experimental autoimmune encephalomyelitis and on autophagy in mice

LUO Siwei, LI Zuoxiao*

(Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effects of artesunate on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and on autophagy in mice. **Methods** Forty-eight female C57BL/6 mice were randomly divided into four groups; control group, model group, and artesunate low- and high-dose groups, with 12 mice in each group. The EAE model was induced by MOG35-55 peptide. The mice in the low- and high-dose groups were intraperitoneally injected with artesunate (10 or 50 mg/(kg·d)) for 10 consecutive days. The symptoms of the mice in each group were observed. Demyelination lesions in the brain tissues were observed by luxol fast blue (LFB) staining. The expression levels of autophagy protein markers LC3-I and LC3-II were detected through western blot analysis. **Results** ①The mice in the

[作者简介] 罗思维(1993—)女, 硕士研究生, 研究方向: 神经免疫。E-mail: 1164776564@qq.com

[通信作者] 李作孝(1964—)男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 神经免疫。E-mail: lzx3235@sina.com

control group did not develop neurological symptoms. The mice in the model group and artesunate groups developed to varying degrees of gait instability, hindlimb weakness, and paralysis. Compared with the model group, the latent period and peak period were delayed and neurofunctional deficiency scores were decreased in the artesunate groups. The effects in the high-dose group were more pronounced than those in the low-dose group ($P < 0.05$). There was no significant difference in peak period between the low- and high-dose artesunate groups ($P > 0.05$). ② LFB staining showed that the myelin sheath of brain tissue in the model group was loose, disordered, and had low staining intensity, while these findings were improved in the artesunate groups. ③ Western blot analysis showed that the optical density values of LC3-I, LC3-II, and LC3-II/LC3-I in the model group were higher than those in the control group ($P < 0.01$). These values were lower in the artesunate groups than in the model group ($P < 0.01$), and the findings in the high-dose artesunate group were more pronounced than those in the low-dose artesunate group ($P < 0.05$). **Conclusions** Artesunate has neuroprotective effects on EAE mice and can reduce demyelination in brain tissue. The mechanism involved may be related to the alleviation of autophagy by downregulation of LC3-I, LC3-II, and LC3-II/LC3-I expressions.

【**Keywords**】 artesunate; experimental autoimmune encephalomyelitis; autophagy; LC3-II/LC3-I ratio; mice

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统慢性炎症脱髓鞘疾病,其病因及发病机制尚未完全明确,可能与遗传、免疫、炎症、环境因素等多因素有关^[1]。对 MS 的治疗主要以激素冲击或丙种球蛋白为主,且治疗价格昂贵,不良反应较多。但许多研究证据表明 MS 的病因和治疗目标并不是单一的,MS 中不仅仅存在免疫系统的异常,还与自噬、凋亡、氧化应激、线粒体损伤、能量衰竭等有关^[2]。青蒿琥酯是青蒿素的一种半合成衍生物,对疟疾的治疗有显著效果,能够有效的透过血脑屏障^[3]。青蒿琥酯除治疗疟疾外,对重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、免疫性肝炎等自身免疫性疾病也有治疗作用^[4-7]。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是目前研究 MS 最常用的动物模型。已有研究发现,青蒿琥酯能够改善 EAE 大鼠临床症状,抑制 PGE₂ 的表达,防止 EAE 发病^[8]。青蒿琥酯还能抑制白细胞向中枢神经系统迁移,改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠症状^[9]。但目前国内外尚未发现青蒿琥酯对 EAE 动物模型细胞自噬的研究报道。因此本研究旨在通过青蒿琥酯干预 EAE 小鼠,进一步探讨对 EAE 小鼠细胞自噬作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 8 周龄 48 只雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠(18~20 g),均购于重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司[SCXK(渝)2017-0001],饲养于西南医科大学忠山动物房内[SYXK(川)2013-185],保持实验前适应性饲养 1 周,保持室温 24℃ 左右的恒温环

境,每 12 h 维持昼夜交替,保持小鼠生长环境清洁,整个实验过程符合《实验动物饲养和使用条例》,且经西南医科大学动物保护与使用机构委员会批准。

1.2 主要试剂

注射用青蒿琥酯(桂林南药股份有限公司),MOG35-55 多肽(上海吉尔生化有限公司),完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司),百日咳毒素(美国 Sigma 公司),兔抗小鼠多克隆微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC2B)抗体(Abcam 公司),山羊抗兔 HRP(Aspen 公司),luxol fast blue(LFB)染液试剂盒(Aspen 公司),卡介苗冻干粉(上海嘉楚生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组和 EAE 模型制作

将 48 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、青蒿琥酯低剂量组、高剂量组共 4 组,每组 12 只。参照 Feng 等^[10]和许梦雪等^[11]方法进行 EAE 造模,将 5 mg MOG35-55 溶于 1 mL 生理盐水中,卡介苗溶于完全弗氏佐剂中,浓度为 10 g/L。将上述 2 种液体 1:1 混合成诱导乳化剂。用 1 mL 注射器分别在模型组、低剂量组、高剂量组小鼠背部皮下注射诱导乳化剂 0.1 mL(左右背侧各 0.05 mL)制作 EAE 模型,空白组注射等量生理盐水。在造模当日及 2 d 后,于造模小鼠分别腹腔注射 0.5 mL 百日咳菌稀释液增强免疫,空白组注射等量生理盐水。造模后根据小鼠的一般情况观察及神经功能评分增加判断 EAE 模型建立成功^[12]。根据小鼠发病情况将造模成功小鼠纳入了实验^[13]。

1.3.2 药物干预方法

低剂量组和高剂量组从造模当日开始分别腹腔注射剂量为 10 mg/(kg·d)、50 mg/(kg·d)的青蒿琥酯,每日 1 次,连续 10 d。空白组和模型组每日腹

腔注射等剂量生理盐水。由于目前国内外在青蒿琥酯对 EAE 的作用机制研究较少,本实验低浓度、高浓度标准基于黄蕾等^[8]和 Thome 等^[9]研究,参照青蒿琥酯对类风湿性关节炎、自身免疫性肝炎的影响标准设立。

1.3.3 小鼠一般情况观察

造模当日起由每天早上 8:00 对各组小鼠进行观察,遵循双盲原则,记录小鼠发病潜伏期、进展期、高峰期、体重变化、毛发光泽及根据 Weaver's¹⁵ 分评分法^[14]进行神经功能评分。评分细则如下:尾巴无症状计 0 分,尾巴张力减低或尾巴远端瘫痪计 1 分,尾巴全瘫计 2 分;四肢无症状计 0 分,步态不稳计 1 分,肢体轻瘫、行走时肢体摇曳计 2 分,肢体全瘫、行走时肢体外翻计 3 分;尾部和四肢的评分相加得总分,若出现死亡计 15 分。

1.3.4 动物处死及标本采集

各组于发病高峰期处死(神经功能评分连续三天无变化为高峰期)^[15],空白组观察至 28 d^[16]。取小鼠脑组织、颈膨大、腰膨大放入-80℃冰箱保存备用。制作病理切片的小鼠,经麻醉后,固定四肢,暴露心脏,剪开右心耳,将注射器针头置于左心室中,缓慢灌注生理盐水至肝脏发白,然后灌注 4%多聚甲醛进行内固定,致小鼠全身僵硬时取出脑组织置于 4%多聚甲醛中 24 h 进行外固定。

1.3.5 LFB 染色

取脑组织侧脑室周围组织常规石蜡切片,片厚 6 μm,将石蜡切片脱蜡,放入 95%乙醇中 5 min 进行醇化,然后放入 LFB 染液中 60℃水浴 24 h,分化,封片。

1.3.6 Western blot 检测 LC3-I、LC3-II 表达情况

将脑白质、颈膨大、腰膨大加入裂解液提取总蛋白,BCA 法定定蛋白浓度,经过 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后,加入 LC3、GAPDH 一抗 4℃过夜,回收已稀释的一抗,用 TBST 洗三次,每次 5 min,加入

山羊抗兔二抗,室温孵育 30 min,用 TBST 在室温下摇床上洗四次,每次 5 min,滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液到膜的蛋白面侧,暗室中曝光,根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影,采用 AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用完全随机设计资料的方差分析比较,两两比较采用 *t* 检验,发病率比较采用卡方检验,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠发病情况

2.1.1 小鼠一般情况

EAE 小鼠造模成功表现为精神萎靡、饮食活动减少、毛发光泽度降低、体重减轻,此后逐渐加重出现尾部下垂、步态不稳、后肢行走无力、甚至瘫痪,神经功能评分大于 0 分。

空白组小鼠未见发病。模型组、青蒿琥酯低剂量组、高剂量组小鼠中出现不同严重程度的尾部下垂、步态不稳、后肢行走无力、甚至瘫痪,神经功能评分增加,发病率分别为 83.3%,83.3%,75%,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。各组均未出现小鼠死亡。

2.1.2 发病潜伏期、高峰期及神经功能评分比较

青蒿琥酯各剂量组发病潜伏期、高峰期较模型组均有延长(*P*<0.01);高剂量组小鼠潜伏期较低剂量组延长(*P*<0.01);高剂量组小鼠高峰期较低剂量组延长,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。青蒿琥酯各剂量组发病高峰期神经功能评分均低于模型组(*P*<0.01),高剂量组评分低于低剂量组(*P*<0.05)。(如表 1 所示)

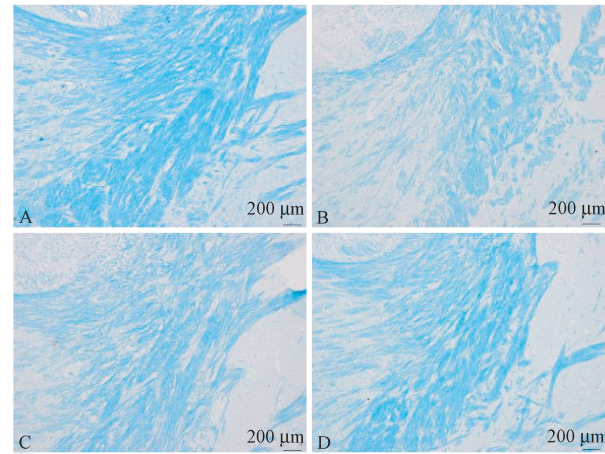
表 1 模型组及各剂量组发病潜伏期、高峰期、高峰期神经功能障碍评分比较

Table 1 Comparison of latent period, peak period, and neurofunctional deficiency scores in the mouse groups				
组别 Groups	样本数 Number of samples	潜伏期(d) Latent period	高峰期(d) Peak period	神经功能障碍评分 Neurodysfunction scores
模型组 Model group	10	9.00±0.67	15.10±0.99	3.80±0.79
低剂量组 Low dose artesunate group	10	13.90±0.88 ^a	18.40±0.97 ^a	2.50±1.08 ^a
高剂量组 High dose artesunate group	9	15.10±0.93 ^{ab}	19.33±1.22 ^a	1.60±0.84 ^{ac}

注:与模型组比较,^a*P*<0.01;发病潜伏期与青蒿琥酯低剂量组比较,^b*P*<0.01;高峰期神经功能障碍评分与青蒿琥酯低剂量组比较,^c*P*<0.05。
Note. Compared with the model group, ^a*P*<0.01. Compared with the low-dose artesunate group in the latent period, ^b*P*<0.01. Compared with the low-dose artesunate group in terms of neurodysfunction scores, ^c*P*<0.05.

2.2 Luxol fast blue (LFB) 染色情况

LFB 染色观察各组小鼠脑组织病理改变情况。空白组小鼠脑组织 LFB 染色髓鞘结构清晰, 未出现脱髓鞘情况(图 1A)。模型组、青蒿琥酯低剂量组、高剂量组小鼠均出现了不同程度的脱髓鞘, 髓鞘结构排列稀疏、紊乱, 可见不同程度低染区域及空泡状结构(图 1B-D), 青蒿琥酯治疗组小鼠脑组织脱髓鞘情况较模型组轻。(如图 1 所示)



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为低剂量组; D 为高剂量组。

图 1 各组小鼠脑组织 LFB 染色情况

Note. A, Control group. B, Model group. C, Low-dose artesunate group. D, high-dose artesunate group.

Figure 1 Demyelization in the brain tissues of mice in different groups (Luxol fast blue staining)

2.3 Western blot 检测结果

模型组较空白组比较, LC3-I、LC3-II 条带光密度值均增加, LC3-II/LC3-I 比值也增加, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 青蒿琥酯各剂量组与模型组比较, LC3-I、LC3-II 条带光密度值均减小, LC3-II/LC3-I 比值也较小, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 高剂量组较低剂量组作用明显, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。(如图 2、表 2 所示)

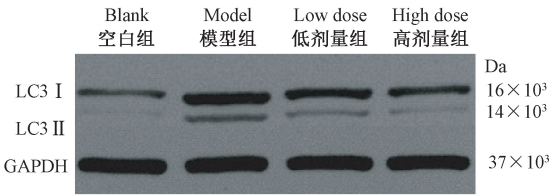


图 2 各组 Western blot 检测 LC3I、LC3II 表达情况

Figure 2 Western blot analysis showing the expressions of LC3-I and LC3-II in the mice

3 讨论

青蒿琥酯是青蒿素的主要衍生物之一, 对于临床各型疟疾的治疗效果显著, 同时也有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗纤维化、免疫调节等作用, 其价格便宜、不良反应轻, 有很多潜在的应用价值^[3]。已有研究发现青蒿琥酯对多种自身免疫性疾病具有治疗作用^[4-7]。但目前青蒿琥酯对 EAE 动物模型的研究较少, 国内外各只有一篇文献报道。黄蕾等^[8]研究发现青蒿琥酯能够改善 EAE 大鼠临床症状, 抑制 PGE₂ 的表达, 防止 EAE 发病。Thome 等^[9]研究发现青蒿琥酯还能抑制白细胞向中枢神经系统迁移。本实验结果显示, 青蒿琥酯对 EAE 小鼠具有神经保护作用, 能够延迟小鼠发病潜伏期、高峰期, 改善神经功能评分, 这与黄蕾等研究结果一致。LFB 染色结果显示青蒿琥酯能够改善脑组织髓鞘脱失情况, 在国内外研究中是首次发现。

同时, 青蒿琥酯还具有调节细胞自噬的作用。自噬紊乱可导致多种神经系统疾病, 包括多发性硬化、阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病和肌萎缩侧索硬化症^[10]。自噬是将细胞内变形、衰老或损伤的蛋白质和细胞器转运到溶酶体腔中进行消化降解的一种普遍存在于真核生物的依赖溶酶体的降解过程, 它实现了细胞内物质和能量的更新, 维持了蛋白质代谢平衡和细胞内环境的稳态^[17-18]。Feng 等^[19]研究显示青蒿琥酯能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路增强类风湿性关节炎大鼠滑膜细胞自噬水平。鲁永玲等^[20]研究发现青蒿琥酯能通过活性氧途径增加小鼠

表 2 各组 LC3I、LC3II、LC3II/LC3I 光密度值比较($n=5$)

Table 2 Comparison of the optical density values of LC3-I, LC3-II, and LC3-II/LC3-I ratios in the groups			
组别 Groups	LC3I	LC3II	LC3II/LC3I
空白组 Control group	0.261±0.058	0.042±0.006	0.163±0.019
模型组 Model group	0.876±0.099 ^a	0.319±0.031 ^a	0.391±0.043 ^a
低剂量组 Low-dose artesunate group	0.631±0.011 ^b	0.161±0.016 ^b	0.255±0.022 ^b
高剂量组 High-dose artesunate group	0.443±0.075 ^{bc}	0.082±0.021 ^{bc}	0.183±0.023 ^{bc}

注: 与空白组比较, ^a $P<0.01$; 与为模型组比较, ^b $P<0.01$; 与青蒿琥酯低剂量组比较, ^c $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.01$. Compared with the model group, ^b $P<0.01$. Compared with the low-dose artesunate group, ^c $P<0.05$.

巨噬细胞的自噬水平进而上调其杀菌活性。青蒿琥酯还能显著抑制 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞的增殖,诱导 Raji 细胞凋亡和自噬^[21]。Chen 等^[22]研究发现青蒿琥酯通过自噬诱导乳腺癌细胞 G2/m 细胞周期阻滞,抑制肿瘤细胞生长。微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 是自噬标志物,分为胞质型 (LC3I 型) 和自噬体膜型 (LC3II 型),LC3I 在自噬相关基因 Atg7、Atg3 的调控下转化为 LC3II,LC3II 直接反应了自噬体的形成,LC3II/LC3I 比例反映了自噬水平情况^[23]。因此 LC3I 向 LC3II 生成障碍及自噬体降解受阻均会降低自噬水平。本实验 Western blot 检测结果与空白组相比,模型组脑脊髓组织 LC3I、LC3II 表达及 LC3II/LC3I 比值均上调,提示 EAE 小鼠脑脊髓组织存在细胞自噬异常。青蒿琥酯各剂量组较模型组相比,LC3I、LC3II 表达及 LC3II/LC3I 比值均下调,高剂量组作用明显,提示青蒿琥酯通过减轻细胞自噬作用发挥对 EAE 小鼠的神经保护作用,在国内外研究中均是首次发现。但本实验不足之处在于未进一步研究青蒿琥酯对于 EAE 小鼠细胞自噬的时序变化以及信号通路的影响,希望后续研究能进一步阐明相关机制,同时未能进一步研究区分神经元及神经胶质细胞的自噬调控。且青蒿琥酯低浓度组和高浓度组发病高峰期数据差异无统计学意义,可能与青蒿琥酯浓度组设置和样本量较少有关。

综上所述,本实验发现青蒿琥酯对 EAE 小鼠具有神经保护作用,其作用机制与下调 LC3II/LC3I 表达减轻细胞自噬有关,有望为临床应用青蒿琥酯治疗 MS 提供实验理论基础。

参考文献:

[1] Yamel R, Ivan TV, Jose F, et al. Epigenetics in multiple sclerosis: Molecular mechanisms and dietary intervention [J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2018,18(1):8-15.

[2] Haider L. Inflammation, iron, energy failure, and oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis [J]. Oxid med cell Longev, 2015,2015:725370.

[3] 李琛琛,尹昆,闫歌. 抗疟药青蒿素及其衍生物相关药理作用研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(02):185-188.

[4] 张新欣,李晓丽,庄珊. 青蒿琥酯对实验性自身免疫性重症肌无力大鼠的免疫调节作用[J]. 济宁医学院学报,2014,37(03):165-168.

[5] Feng X, Chen W, Xiao L, et al. Artesunate inhibits type I interferon-induced production of macrophage migration inhibitory factor in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2017,26(1):62-72.

[6] Xu H, He Y, Yang X, et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappa B and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes

[J]. Rheumatology (Oxford), 2007,46(6):920-926.

[7] Zhao X, Liu MJ, Li JG, et al. Antimalarial agent artesunate protects concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice by inhibiting inflammatory responses[J]. Chem Biol Interact, 2017, 274:116-123.

[8] 黄蕾,李作孝. 青蒿琥酯对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠脑组织前列腺素 E2 表达的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2015,8(18):18-20.

[9] Thome R, de Carvalho AC, da Costa TA, et al. Artesunate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting leukocyte migration to the central nervous system[J]. CNS Neurosci Ther, 2016,22(8):707-714.

[10] Feng X, Hou H, Zou Y, et al. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2017,17(2):95-103.

[11] 许梦雪,秦新月,冯金洲,等. 自噬在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中的抗炎作用[J]. 第三军医大学学报,2015,37(16):1624-1628.

[12] 张淑江,李作孝. 紫杉醇对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠 CD28、CTLA-4 表达及 BAFF 的影响[J]. 中国比较医学杂志,2017,27(05):71-75.

[13] 关东升,高颖,朱陵群. C57BL/6J 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立及其病理特征[J]. 中国实验动物学报, 2008,16(06):406-409+490.

[14] 童巧文,朱英标,姚苏琴,等. 不同神经功能评分标准在小鼠 EAE 模型评价中的比较[J]. 温州医学院学报,2009,39(03):223-226.

[15] 杨元,袁正洲,吕志宇,等. 血管活性肠肽 (VIP) 对实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 大鼠脑组织 IL-17A 含量的影响[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(10):32-35+68.

[16] Long T, Yang Y, Peng L, et al. Neuroprotective effects of melatonin on experimental allergic encephalomyelitis mice via anti-oxidative stress activity [J]. J Mol Neurosci, 2018,64(2), 233-241.

[17] 赵雅宁,赵旭,郭向飞,等. BQ-123 通过 mTOR-自噬通路对蛛网膜下腔出血大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2016,51(06):704-709.

[18] 杨璟辉,高晓刚,傅志仁. 自噬在肝脏免疫耐受中的作用机制研究进展[J]. 解放军医学杂志,2014,39(6):503-506.

[19] Feng FB, Qiu HY. Effects of artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the pi3k/akt/mtor signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis[J]. Biomed Pharmacother, 2018,102:1209-1220.

[20] 鲁永玲,祝元锋,陈倩,等. 青蒿琥酯通过活性氧自噬途径增加小鼠巨噬细胞杀菌活性[J]. 第三军医大学学报,2017,39(18):1783-1789.

[21] Wang ZC, Liu Y, Wang H, et al. Research on the relationship between artesunate and Raji cell autophagy and apoptosis of Burkitt's lymphoma and its mechanism [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017,21(9):2238-2243.

[22] Chen K, Shou LM, Lin F, et al. Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells [J]. Anticancer Drugs, 2014,25(6):652-662.

[23] 曾思玉,罗家明,余巨明. 自噬在多发硬化中的研究进展[J]. 中国临床神经科学,2016,24(05):574-578.