

宋加兴,张清秀,何磊,等. 美金刚通过调节 ERK、CREB 信号通路及突触可塑性保护脑缺血再灌注小鼠的作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 1 - 7.

Song JX,Zhang QX,He L, et al. Protective effect of memantine on cerebral ischemia-reperfusion mice via regulation of ERK/CREB signaling and synaptic plasticity [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 1 - 7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.001

美金刚通过调节 ERK、CREB 信号通路及突触可塑性保护脑缺血再灌注小鼠的作用研究

宋加兴¹,张清秀²,何磊¹,魏秀娥^{2*}

(1.徐州医科大学,江苏 徐州 221004;2.徐州医科大学第二附属医院神经内科,江苏 徐州 221006)

【摘要】目的 研究美金刚对脑缺血再灌注小鼠模型 ERK、CREB 信号通路及突触可塑性的作用机制。**方法** 60 只小鼠随机分为假手术组(Sham),模型组(MCAO),美金刚 20 mg/kg 组(M20),美金刚 4 mg/kg 组(M4),生理盐水组(NS),除假手术组外,其余 4 组均使用线栓法建立小鼠大脑中动脉梗死模型,观察小鼠的体重变化及神经功能缺损程度,甲酚紫染色观察小鼠脑萎缩体积,粘附物去除实验观察缺血小鼠的运动及感觉功能变化,Morris 水迷宫检测小鼠的认知记忆功能,Western Blot 检测 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB、PSD-95、Synaptophysin 等蛋白的表达情况。**结果** 与模型组(MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组(M4)及生理盐水组(NS)相比,美金刚 20 mg/kg 组的小鼠体重下降程度减小,神经功能缺损评分下降,脑萎缩体积减轻,小鼠感觉运动功能出现改善,水迷宫实验结果提示学习记忆损伤程度减轻,p-ERK1/2、p-CREB、PSD-95、synaptophysin 等蛋白表达升高。**结论** 小鼠脑缺血后持续给予美金刚 20 mg/kg 治疗,可以提高小鼠的神经功能恢复,改善小鼠的学习记忆功能,改善了大脑的突触可塑性。

【关键词】 脑缺血;美金刚;认知功能;突触可塑性;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0001-07

Protective effect of memantine on cerebral ischemia-reperfusion mice via regulation of ERK/CREB signaling and synaptic plasticity

SONG Jiaying¹, ZHANG Qingxiu², HE Lei¹, WEI Xiu'e^{2*}

(1. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China. 2. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006)

【Abstract】Objective To investigate the mechanism of memantine on ERK/CREB signaling and synaptic plasticity in a mouse model of cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** Sixty mice were randomly divided into a sham operation group (Sham), middle cerebral artery occlusion model group (MCAO), 20 mg/kg memantine group (M20), 4 mg/kg memantine group (M4), and saline group (NS). With the exception of the Sham group, ischemia-reperfusion was established in groups using a suture to achieve MCAO. Changes in body weight and degree of neurological deficits were observed in the mice. Brain atrophy volume was measured using cresyl violet staining, while sensorimotor function was observed by an adhesive removal test and cognitive function was detected by Morris water maze. Expression of ERK1/2,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671149), 国家自然科学基金青年基金项目(81301120)。

[作者简介] 宋加兴(1990—)男,硕士研究生在读,专业:神经病学。E-mail: shinonsoong@163.com

[通信作者] 魏秀娥(1968—)女,副教授,主任医师,研究方向:缺血性脑血管病基础研究。E-mail: weixiue1@126.com

phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), CREB, p-CREB, postsynaptic density protein 95 (PSD-95) and synaptophysin were detected by western blot assay. **Results** Compared with MCAO, M4, and NS groups, the M20 group exhibited reduced weight loss, decreased neurological severity scores, decreased volume of brain atrophy, and improved sensorimotor function. In addition, the results of water maze testing showed that the degree of learning and memory impairment was reduced in the M20 group. Expression of p-ERK1/2, p-CREB, PSD-95, and synaptophysin proteins were increased in the M20 group compared with other groups. **Conclusions** Continuous treatment with memantine (20 mg/kg) after cerebral ischemia in mice can improve the recovery of neurological function, ameliorate deficits in learning and memory, and improve synaptic plasticity of the brain.

【Keywords】 cerebral ischemia; memantine; cognitive function; synaptic plasticity; mice

缺血性脑卒中作为主要的脑血病事件,其危害主要表现为致死率、致残率高,患者预后较差,给家庭和社会带来了沉重负担^[1]。尽管对于缺血性脑卒中有大量的研究,但目前有效的治疗手段仍较为局限。NMDA 受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor) 即 N-甲基-D-天冬氨酸受体,是离子型谷氨酸受体的一个亚型,对神经元及神经元的轴突和树突的结构具有调节作用,并且参与了突触可塑性形成^[2]。研究表明,在发生缺血性卒中后,细胞外谷氨酸的大量上升,使细胞外的 NMDA 受体过度刺激,引起兴奋性氨基酸毒性,使脑组织神经元损伤和神经元可塑性发生改变^[3]。美金刚作为一种非竞争性,低亲和力的 NMDA 受体拮抗剂,目前在临床上主要应用于阿尔茨海默病的治疗。López-Valdés 等人^[4]实验显示,在缺血性卒中发生后给予美金刚药物时,实验模型的急性缺血脑损伤可以减轻。这可能与抑制兴奋性氨基酸毒性作用有关。上述实验给药时间主要在缺血前预处理给药,或者急性期缺血后短时间内给药,主要关注的时间点均为脑缺血急性期的变化。目前尚不清楚在脑缺血急性期后的恢复期给予美金刚,对缺血损伤的作用和相关机制。细胞外信号调节酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 和其下游的环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB), 是 NMDA 受体下游信号通路分子,参与细胞编码相关基因和细胞信号转导,与神经系统的功能有关^[5]。本实验在小鼠脑缺血后 24 h 后给予美金刚干预,研究美金刚对于脑缺血急性期后恢复期的相关作用和可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 SPF 级 8~10 周龄 C57/BL6J 雄性小鼠 60 只,体重 23~26 g,实验动物购自济南朋悦实验动物

繁育有限公司[SCXK(鲁) 2014-0007]。动物饲养于徐州医科大学动物中心屏障系统[SYXK(苏) 2016-0028],温度 25℃,相对湿度 50%,维持正常昼夜节律。动物自由进食进水。实验经徐州医科大学实验动物伦理委员会审查批准(IACUC: 2018051803)。实验动物在使用中遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

甲酚紫染料(美国 Solarbio 公司),MCAO 硅胶线栓(中国广州佳灵生物技术有限公司,型号 1800/1900),美金刚试剂(中国 MedChemExpress 有限公司),戊巴比妥钠试剂(上海容创生物技术有限公司),OCT 冰冻切片包埋剂(美国 Sakura 公司),其中兔抗多克隆 ERK、p-ERK 抗体和兔抗多克隆 CREB、p-CREB 抗体(美国 CST 公司),兔抗多克隆 PSD-95 和 Synaptophysin 抗体(中国 Proteintech 公司),兔二抗及 ECL 发光液(中国碧云天公司)。

冰冻切片机(莱卡 CM1950),光学显微镜(奥林巴斯 BX43),体视显微镜(中国 Motic 公司),Western Blot 相关设备(美国 Bio-Rad 公司),动物行为学设备(中国瑞沃德有限公司),动物行为学分析软件(美国 Harvard Apparatus 公司),小鼠激光多普勒血流仪(中国武汉优尔生生命科学装备有限公司)

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与给药

按照随机数字法将 60 只 C57/BL6J 雄性小鼠随机分组为假手术组(Sham)、模型组(MCAO)、美金刚 20 mg/kg 组(M20)、美金刚 4 mg/kg 组(M4)及生理盐水组(NS),每组 12 只。美金刚药物浓度参考 Culmsee 等人实验^[6-7]。给药方式为腹腔注射,首次给药时间点在缺血再灌注 24 h 后给药,其后每天固定时间点腹腔给药 1 次,持续给药 4 周。

1.3.2 小鼠脑缺血再灌注模型

2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠后,仰卧位固

定行颈部正中切口,使用血管镊钝性分离出右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉分支,使用 7-0 缝合线在颈总动脉及颈外动脉处打活结备用,并用动脉夹暂时夹闭颈内动脉,用血管剪在颈外动脉处剪一小缺口,将硅胶线栓自颈外动脉缺口处插入,此时松开动脉夹,线栓顺势缓慢插入颈内动脉,当线栓插入深度距颈动脉分叉处 8.5 mm 左右感到轻微阻力时停止进栓,并用预留缝合线固定线栓,将小鼠放入 37℃ 恒温箱中保温,缺血 60 min 后,拔出线栓,结扎血管,缝合皮肤,放入恒温箱中直至小鼠完全苏醒,放入饲养箱中。假手术组仅钝性分离各个血管。为了保证造模成功率,在手术前,术中和复灌后使用激光多普勒血流测量法测量局部脑血流量。术中脑血流下降至基线 80% 以下,复灌后脑血流上升至 80% 以上为造模成功。复灌后模型组小鼠死亡 2 只,美金刚 20 mg/kg 组 (M20) 死亡 3 只、美金刚 4 mg/kg 组 (M4) 死亡 3 只及生理盐水组 (NS) 死亡 3 只,后续补充造模至每组 12 只样本。

1.3.3 小鼠脑萎缩体积测定

参考 Cai 等人^[8]方法,脑组织冰冻切片,每隔 0.4 mm 一片脑片贴于载玻片上(前囟 1.3 ~ -2.7 mm 之间),将贴好的玻片放入浓度 0.1% 的甲酚紫溶液中 15 min,放入去离子水中 1 h 后晾干,显微镜下拍照,用 Image J 软件计算小鼠脑萎缩体积,将脑片正常侧面积减去梗死侧的面积,即萎缩面积,脑萎缩体积计算公式为 $V = 1/3 \times h \times (S1 + S2 + \sqrt{S1 \times S2})$, 其中 h 为相邻两片脑片的间隔,此处 h 为 0.4 mm。

1.3.4 小鼠体重变化

术前及术后 1~5 周时间点称量小鼠体重,并与术前体重进行比较。体重变化 = 术后各时间点体重 - 术前体重,记录相应数值。操作采用单盲方法,即评估者对动物分组不知情。

1.3.5 改良神经功能缺损评分 (mNSS)

参考 Choi 等人^[9]方法,在术前及术后的 1~5 周时间点进行神经功能评分,评估内容包括小鼠的运动,反射与平衡功能,评分结果在 0~14 分之间,分数越高,则表明动物损伤越严重。操作采用单盲方法,即评估者对动物分组不知情。

1.3.6 粘附物去除实验 (Adhesive removal test)

参考 Ma 等人^[10]方法,用粘附物去除实验评估动物的感觉和运动功能变化。实验时将小鼠左前爪无毛区域覆盖一 3 mm×4 mm 大小的胶带,每只

小鼠粘贴的力度和方式应保持一致。贴完后将小鼠放入饲养笼中,观察并记录小鼠接触胶带和撕去胶带的时间,观察时长为 120 s,实验重复三次,取结果的平均值。在小鼠手术前,应提前每天训练 1 次,持续 3 d,然后在手术后的 1~5 周进行实验。接触的定义为小鼠爪子出现摇晃或用嘴触碰胶带。

1.3.7 小鼠 Morris 水迷宫试验 (Morris water maze)

在术后的第 5 周时,提前将小鼠转移至水迷宫房间适应环境,水迷宫水池直径 121 cm,深度为 45 cm,直径 10 cm 的平台在水下深度为 1 cm,池水温度保持在 21℃ ~ 22℃ 之间。(1) 定位航行实验:每只小鼠每天训练 4 次,共训练 4 d。第 1 天训练时,将小鼠面向池壁沿水面放入水池中,4 个象限各放入一次,开始记录小鼠找到隐藏在水下平台的时间,即逃避潜伏期;如果 60 s 内小鼠未找到平台,则将小鼠引导至平台,并使其在平台停留 10 s 学习记忆平台所在位置,结束后将小鼠移走,进行下一只实验动物。第 2~4 天的操作过程同第 1 天。(2) 空间探索实验:在第 5 天时,撤掉位于水下的平台,将小鼠面朝池壁,从平台所在对侧象限放入水中,行为学软件记录 1 min 内小鼠在平台所在象限时间,穿台次数和空间探索实验仅进行一次。

1.3.8 蛋白印迹实验 (Western blot)

每组取 4 只样本,术后 5 周时间点处死小鼠,提取缺血侧脑组织匀浆后,加入细胞裂解液,蛋白溶解酶抑制剂裂解,置于 4℃ 离心机 12 000 r/min,离心 10 min,移取上清液获取蛋白。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性、上样、进行凝胶电泳、转膜 (湿转法)。一抗孵育,4℃ 过夜;二抗室温孵育 1~2 h,配制 ECL 发光液发光、显影,然后用 Image J 软件进行蛋白条带分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),方差齐时多重比较采用 LSD- t 法,方差不齐时采用 Dunnett- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 美金刚对脑缺血小鼠体重与神经功能评分的影响

术后小鼠体重变化结果提示,在第 4~5 周时,与模型组 (MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组 (M4) 和生理

盐水组(NS)相比,美金刚 20 mg/kg 组(M20)的小鼠体重明显增加,并且差异具有统计学意义($P<0.05$)。术后小鼠神经功能缺损评分提示,在第 3~5 周时,与模型组(MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组(M4)和生理盐水组(NS)相比,美金刚 20 mg/kg 组(M20)小鼠神经功能缺损程度明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(见图 1)

2.2 美金刚对脑缺血小鼠脑萎缩体积的影响

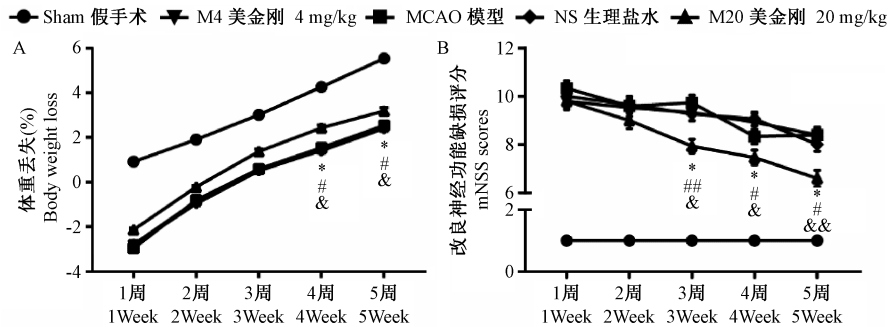
脑组织冰冻切片甲酚紫染色结果提示,与模型组(MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组(M4)和生理盐水组(NS)相比,美金刚 20 mg/kg 组(M20)小鼠脑萎缩体积较其他组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(见图 2)

2.3 美金刚对脑缺血小鼠粘附物去除实验结果的影响

术后小鼠粘附物去除实验结果提示,在第 3~5 周时,与模型组(MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组(M4)和生理盐水组(NS)相比,美金刚 20 mg/kg 组(M20)小鼠开始接触胶带与去除胶带的时间均出现明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。(见图 3)

2.4 美金刚对于脑缺血小鼠 Morris 水迷宫实验结果的影响

术后第 5 周开始进行水迷宫实验,空间探索实验结果提示,在实验开始的第 2~4 天,美金刚 20 mg/kg 组小鼠可以更快的找到隐藏在水下的平台,表现为平台潜伏期明显下降,与其他三组相比,差异具有

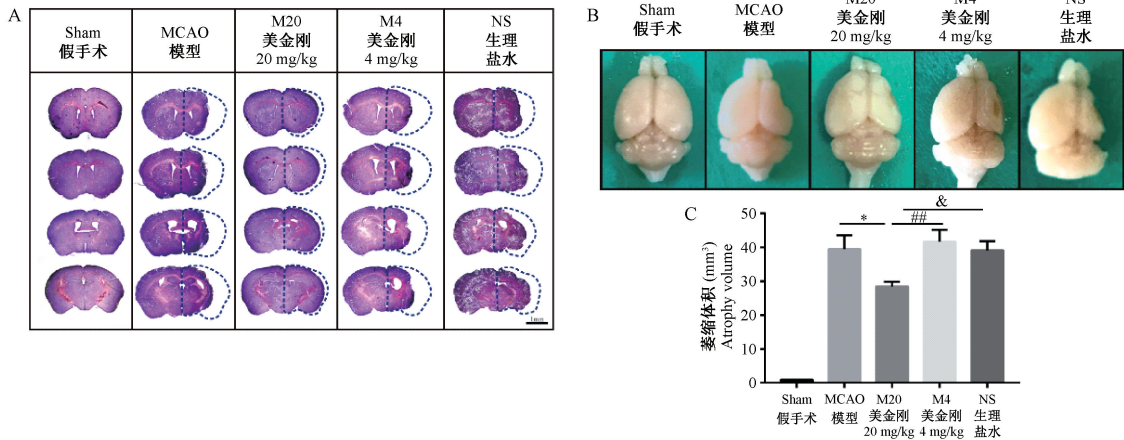


注:美金刚 20 mg/kg 组(M20)与模型组(MCAO)相比, * $P<0.05$;美金刚 20 mg/kg 组(M20)与美金刚 4 mg/kg 组(M4)相比, # $P<0.05$;美金刚 20 mg/kg 组(M20)与生理盐水组(NS)相比, & $P<0.05$ 。

图 1 小鼠体重变化和小鼠 mNSS 评分变化($n=12$)

Note. M20 group compared with MCAO group , * $P<0.05$. M20 group compared with M4 group , # $P<0.05$. M20 group compared with NS group, & $P<0.05$.

Figure 1 Changes in body weight and mNSS scores in the mice



注:美金刚 20 mg/kg 组(M20)与模型组(MCAO)相比, * $P<0.05$;美金刚 20 mg/kg 组(M20)与美金刚 4 mg/kg 组(M4)相比, # $P<0.01$;美金刚 20 mg/kg 组(M20)与生理盐水组(NS)相比, & $P<0.05$ 。

图 2 小鼠脑缺血后脑萎缩体积变化(甲酚紫染色)($n=8$)

Note. M20 group compared with MCAO group , * $P<0.05$. M20 group compared with M4 group, # $P<0.05$. M20 group compared with NS group, & $P<0.05$.

Figure 2 Changes of brain atrophy volume after cerebral ischemia in the mice (cresyl violet staining)

统计学意义 ($P<0.05$) ;定位航行实验中:美金刚 20 mg/kg 组小鼠穿台次数较其他三组明显增多,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) ;美金刚 20 mg/kg 组小鼠在平台所在象限停留时间明显多于其他三组小鼠停留时间,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) ,在第 5 天的定位航向实验中,各组小鼠的游泳速度表明各组小鼠游泳能力无差异 ($P>0.05$) ,差异无统计学意义。(见图 4)

2.5 美金刚对于脑缺血小鼠缺血脑组织中 ERK1/2、p-ERK1/2、CREB、p-CREB 蛋白的影响

分别以 p-ERK1/2/ ERK1/2、p-CREB/ CREB 的

比值作为 ERK1/2 与 CREB 活化表达的衡量标准,与模型组 (MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组 (M4) 和生理盐水组 (NS) 相比,美金刚 20 mg/kg 组 (M20) 的磷酸化的 ERK1/2、CREB 的表达明显升高,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) 。(见图 5)

2.6 美金刚对于脑缺血小鼠缺血脑组织中 PSD-95、synaptophysin 蛋白的影响

与模型组 (MCAO)、美金刚 4 mg/kg 组 (M4) 和生理盐水组 (NS) 相比,美金刚 20 mg/kg 组 (M20) 的 PSD-95, synaptophysin 蛋白的表达明显增多,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) 。(见图 6)

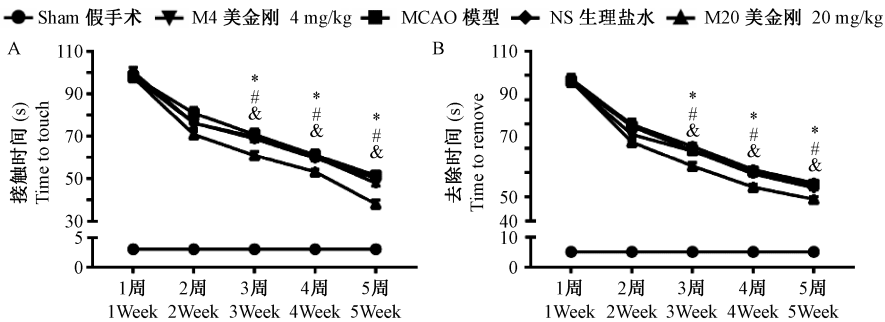


图 3 小鼠粘附物去除实验结果比较 (n = 12)

Note. M20 group compared with MCAO group, * $P<0.05$. M20 group compared with M4 group, # $P<0.05$. M20 group compared with NS group, & $P<0.05$.

Figure 3 Results of mouse adhesive removal test

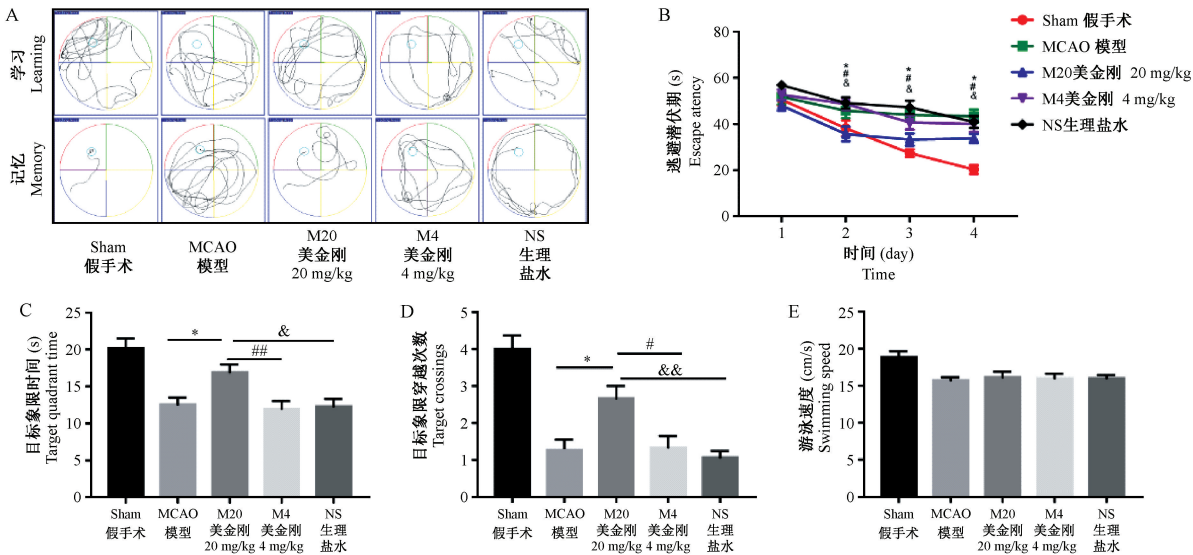


图 4 小鼠 Morris 水迷宫实验结果比较 (n = 12)

Note. M20 group compared with MCAO group, * $P<0.05$. M20 group compared with M4 group, # $P<0.05$. M20 compared with NS group, & $P<0.05$.

Figure 4 Results of mouse Morris water maze test

3 讨论

缺血性卒中起病急,治疗时间窗窄。在脑缺血急性期后,如何最大程度的保护缺血半暗带神经元的存活,提高神经元的可塑性,是目前众多基础研究的方向。本实验采用线栓法构建小鼠局灶性脑缺血再灌注模型,较好的模拟了人类脑缺血发病后静脉溶栓或介入取栓后,脑缺血再灌注损伤的发病过程和损伤机制。

脑缺血再灌注损伤后,突触后膜 NMDA 受体激活,钙离子通道开放,细胞外的钙离子大量进入细胞内,引起兴奋性氨基酸毒性损伤^[11]。美金刚作为 NMDA 受体拮抗剂,可以干预兴奋性氨基酸毒性引起的脑缺血再灌注损伤。小鼠脑缺血急性期给予美金刚预处理,可以减轻脑组织的梗死体积和神经元损伤,减轻细胞凋亡,减轻血管神经单元的损伤^[12]。既往 Wang 等^[7]研究表明,小鼠脑缺血后持

续皮下给予美金刚,小鼠的运动功能损伤改善,小鼠脑组织纹状体萎缩体积下降,脑源性神经生长因子及血管生长因子表达增加。小鼠脑缺血后美金刚口服治疗,小鼠 7 d 内行为学结果及脑梗死体积未出现明显改善;但在持续给予美金刚 28 d 后,小鼠转筒实验及网格实验行为学结果出现改善,脑组织中星形胶质细胞增生减少,新生血管密度增加^[4]。

ERK1/2 与 CREB 是 NMDA 受体下游信号通路的蛋白分子,ERK1/2 在细胞的生长、分化中发挥作用;下游的 CREB 参与认知学习及长时程记忆,参与细胞信号转导,与神经元的生长、发育相关。其中 ERK1/2、CREB 蛋白的生物活性与其磷酸化水平是相关的。脑缺血损伤时,由于兴奋性氨基酸的毒性作用,组织与细胞损伤加重,ERK1/2 活性受到抑制,其下游的 CREB 活性受到抑制,另外其下游的 Bcl-2 及 BDNF 的活性也受到影响,认知学习功能受

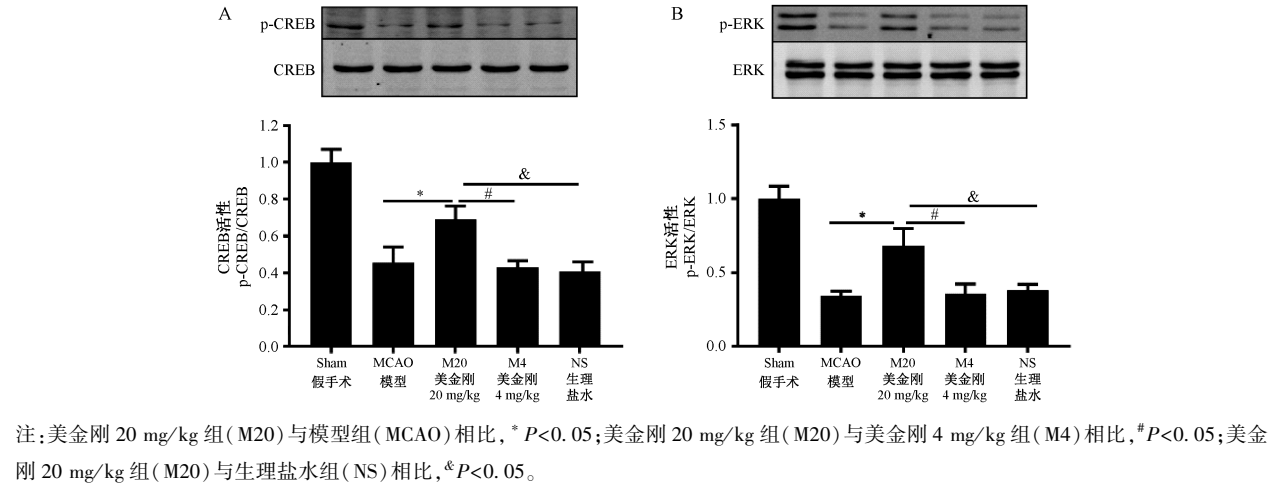


图 5 小鼠脑组织 ERK1/2 与 CREB 蛋白含量比较($n=4$)

Note. M20 group compared with MCAO group, * $P < 0.05$. M20 group compared with M4 group, # $P < 0.05$. M20 group compared with NS group, & $P < 0.05$.

Figure 5 ERK1/2 and CREB protein contents in the mouse brain tissue

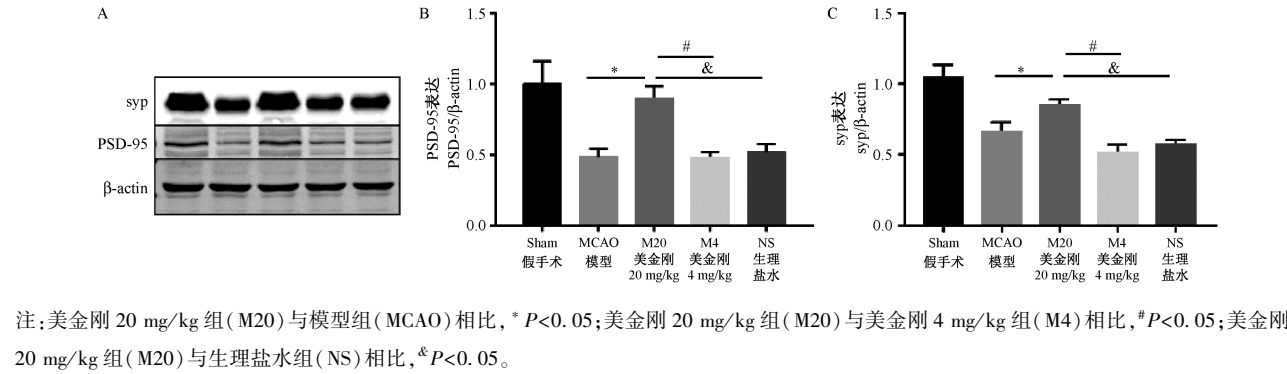


图 6 各组小鼠脑组织 PSD-95 与 synaptophysin 蛋白含量比较($n=4$)

Note. M20 group compared with MCAO group, * $P < 0.05$. M20 group compared with M4 group, # $P < 0.05$. M20 group compared with NS group, & $P < 0.05$.

Figure 6 PSD-95 and synaptophysin protein contents in brain tissue of the mice

损^[13]。小鼠脑缺血损伤后,脑组织中 ERK1/2 和 CREB 活性受到抑制,磷酸化表达水平明显下降;当缺血组织中 ERK1/2 被激活后,可以抑制钙离子内流,抑制 NMDA 活性,下游的 CREB 激活,从而减轻兴奋性氨基酸毒性造成的神经元损伤,减轻了动物的认知记忆功能,改善了突触可塑性^[14-15]。本研究显示,美金刚 20 mg/kg 组干预后,小鼠的缺血侧脑组织中 p-ERK1/2 及 p-CREB 蛋白表达明显升高,而总的 ERK1/2 及 CREB 蛋白含量无明显变化,小鼠 Morris 水迷宫实验提示缺血小鼠的学习记忆功能损伤明显改善。

突触后致密物-95 (postsynaptic density-95, PSD-95) 是位于突触后膜的一种脚手架蛋白。突触素 (synaptophysin) 是一种突触囊泡部位钙结合蛋白。正常情况下,PSD-95 与突触素,在突触连接的生成及维持中,在 NMDA 受体信号转导具有重要作用;两者与脑组织的突触可塑性及学习认知功能关系密切^[16-17]。脑缺血损伤时,缺血侧脑组织的 PSD-95 及 synaptophysin 蛋白表达明显下降,而脑缺血损伤得到抑制时,PSD-95 及 synaptophysin 表达上调^[18-19]。本研究显示,脑缺血美金刚 20 mg/kg 组干预后,缺血侧脑组织的 PSD-95、synaptophysin 的蛋白表达明显上升,改善了脑缺血小鼠的突触可塑性及学习认知功能。

综上,脑缺血再灌注后持续美金刚治疗,可以促进小鼠的神经功能损伤的恢复,改善小鼠的认知记忆功能,改善脑组织的突触可塑性表达。这种延迟的神经保护作用,可能与美金刚激活 ERK、CREB 信号通路和上调 PSD-95 及 synaptophysin 蛋白的表达有关。这为临床中缺血后卒中病人认知功能障碍的预后治疗,提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA. Acute stroke intervention; a systematic review [J]. JAMA, 2015, 313(14): 1451-1462.
- [2] Iacobucci GJ, Popescu GK. NMDA receptors; linking physiological output to biophysical operation [J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(4): 236-249.
- [3] Black SA, Stys PK, Zamponi GW, et al. Cellular prion protein and NMDA receptor modulation; protecting against excitotoxicity [J]. Front Cell Dev Biol, 2014, 2: 45.
- [4] López-Valdés HE, Clarkson AN, Ao Y, et al. Memantine enhances recovery from stroke [J]. Stroke, 2014, 45(7): 2093-2100.
- [5] Li Y, Li X, Guo C, et al. Long-term neurocognitive dysfunction in offspring via NGF/ ERK/CREB signaling pathway caused by ketamine exposure during the second trimester of pregnancy in

- rats [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30956-30970.
- [6] Culmsee C, Junker V, Kremers W, et al. Combination therapy in ischemic stroke; synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol [J]. Stroke, 2004, 35(5): 1197-1202.
- [7] Wang YC, Sanchez-Mendoza EH, Doeppner TR, et al. Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling, and contralesional brain plasticity [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(3): 980-993.
- [8] Cai H, Ma Y, Jiang L, et al. Hypoxia response element-regulated MMP-9 promotes neurological recovery via glial scar degradation and angiogenesis in delayed stroke [J]. Mol Ther, 2017, 25(6): 1448-1459.
- [9] Choi I A, Lee C S, Kim H Y, et al. Effect of inhibition of DNA methylation combined with task-specific training on chronic stroke recovery [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): pii:E2019.
- [10] Ma S, Wang J, Wang Y, et al. Diabetes mellitus impairs white matter repair and long-term functional deficits after cerebral ischemia [J]. Stroke, 2018, 49(10): 2453-2463.
- [11] Wikinski SI, Acosta GB. Role of excitatory amino acids in neuropathology [J]. Medicina (B Aires), 1995, 55(4): 355-365.
- [12] Chen ZZ, Yang DD, Zhao Z, et al. Memantine mediates neuroprotection via regulating neurovascular unit in a mouse model of focal cerebral ischemia [J]. Life Sci, 2016, 150: 8-14.
- [13] Liang HM, Geng LJ, Shi XY, et al. By up-regulating mu- and delta-opioid receptors, neuron-restrictive silencer factor knockdown promotes neurological recovery after ischemia [J]. Oncotarget, 2017, 8(60): 101012-101025.
- [14] Zhang X, Zhang Q, Tu J, et al. Prosurvival NMDA 2A receptor signaling mediates postconditioning neuroprotection in the hippocampus [J]. Hippocampus, 2015, 25(3): 286-296.
- [15] Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, et al. PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB [corrected] signaling [J]. J Neurophysiol, 2007, 98(3): 1538-1548.
- [16] Coley AA, Gao WJ. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018, 82: 187-194.
- [17] Osimo EF, Beck K, Reis Marques T, et al. Synaptic loss in schizophrenia; a meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures [J]. Mol Psychiatry, 2019, 24(4): 549-561.
- [18] Wi S, Yu JH, Kim M, et al. In vivo expression of reprogramming factors increases hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity in chronic hypoxic-ischemic brain injury [J]. Neural Plast, 2016, 2016: 2580837.
- [19] Qu H, Zhao M, Zhao S, et al. Forced limb-use enhances brain plasticity through the cAMP/PKA/CREB signal transduction pathway after stroke in adult rats [J]. Restor Neurol Neurosci, 2014, 32(5): 597-609.