

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.19.012

ω -3 多不饱和脂肪酸对大鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡和自噬的影响*

胡 炜,王 沛,王 刚,金海涛,吕建萌,雷 琦,刘建敏,党星波[△]

(陕西省人民医院急诊外科,西安 710000)

[摘要] **目的** 探讨 ω -3 多不饱和脂肪酸对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后神经元凋亡和自噬的影响。**方法** 选取雄性 C57BL/6J 小鼠 48 只,将其随机分为 4 组($n=12$):假手术组(Sham 组)、假手术+ ω -3 多不饱和脂肪酸组(Sham+ ω -3 组)、SAH 组、SAH+ ω -3 多不饱和脂肪酸组(SAH+ ω -3 组)。采用血管内穿刺法制备大鼠实验性蛛网膜下腔出血(eSAH)模型。Sham 组和 Sham+ ω -3 组仅在手术操作中将尼龙线头端送至右颈内动脉,但不刺破动脉管壁;SAH 组和 SAH+ ω -3 组制备 eSAH 模型。Sham+ ω -3 组和 SAH+ ω -3 组分别于模型制备后即刻、12 h、24 h、36 h、48 h 于腹腔注射 ω -3 多不饱和脂肪酸 30 mg/kg(溶于 2 mL 1% DMSO)。采用 Garcia 评分法评估神经功能;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测损伤侧脑皮层 ATG-3、ATG-7、Beclin-1、LC3-II、SIRT1、Cleaved caspase-3 的蛋白表达;TUNEL 法检测凋亡指数;免疫组织化学染色法检测脑皮层 SIRT1 表达。**结果** 与 Sham 组和 Sham+ ω -3 组比较,SAH 组的 Garcia 评分显著下降($P<0.05$),ATG-3、ATG-7、LC3-II、SIRT1 蛋白表达有所增加($P<0.05$),Cleaved caspase-3 蛋白表达和凋亡指数均显著增加($P<0.05$);而与 SAH 组小鼠比较,SAH+ ω -3 组 Garcia 评分显著改善($P<0.05$),ATG-3、ATG-7、LC3-II、SIRT1 蛋白表达明显增加($P<0.05$),Cleaved caspase-3 蛋白表达和凋亡指数显著减少($P<0.05$)。**结论** ω -3 多不饱和脂肪酸可通过促进自噬活性减轻大鼠 SAH 后细胞凋亡及神经功能损伤。

[关键词] ω -3 多不饱和脂肪酸;蛛网膜下腔出血;自噬;细胞凋亡**[中图分类号]** R743.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)19-3195-06

Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on neuronal apoptosis and autophagy after subarachnoid hemorrhage in rats*

HU Wei, WANG Pei, WANG Gang, JIN Haitao, LYU Jianmeng, LEI Qi, LIU Jianmin, DANG Xingbo[△]

(Department of Emergency Surgery, Shaanxi Provincial People's

Hospital, Xi'an, Shaanxi 710000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on neuronal apoptosis and autophagy after subarachnoid hemorrhage in rats. **Methods** Forty-eight male C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups ($n=12$): sham operation group (Sham group), sham operation + omega-3 polyunsaturated fatty acid group (Sham + ω -3 group), subarachnoid hemorrhage group (SAH group), subarachnoid hemorrhage + omega-3 polyunsaturated fatty acid group (SAH + omega-3 group). An experimental subarachnoid hemorrhage (eSAH) model was established by an intravascular puncture. In the Sham group and the Sham+ ω -3 group, the nylon thread end was sent to the right internal carotid artery, but the arterial wall was not punctured; the eSAH model was performed in the SAH group and the SAH+ ω -3 group. The Sham+ ω -3 group and the SAH+ ω -3 group were intraperitoneally injected with 30 mg/kg of omega-3 polyunsaturated fatty acid immediately, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h after SAH. The protein expression of ATG-3, ATG-7, Beclin-1, LC3-II, SIRT1, and Cleaved caspase-3 in the injured lateral cortex was detected by Western blot. The apoptosis index was detected by TUNEL assays. Histochemical staining was used to determine the expression of SIRT1 in the cortex. **Results** Compared with the Sham group and the Sham+ ω -3 group, the Garcia score of the SAH group was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of ATG-3, ATG-7, LC3-II and SIRT1 protein was increased ($P<0.05$), and the protein expression of Cleaved caspase-3 and the apoptotic index were significantly elevated ($P<0.05$); compared with the SAH group, the Garcia score of SAH+ ω -3 group was significantly improved ($P<0.05$), ATG-3, ATG-7, LC3-II, SIRT1 protein expression

* 基金项目:陕西省自然科学基金面上项目(2019JM529)。 作者简介:胡炜(1975-),副主任医师,硕士,主要从事急诊神经外科研究。

[△] 通信作者, E-mail: dangxb2006@163.com。

were significantly augmented ($P < 0.05$), the protein expression Cleaved caspase-3 and the apoptosis index were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate apoptosis and neurological damage after subarachnoid hemorrhage in rats by promoting autophagy activity.

[Key words] omega-3 polyunsaturated fatty acid; subarachnoid hemorrhage; autophagy; apoptosis

蛛网膜下腔出血(SAH)主要是由颅内动脉瘤破裂引起的一种灾难性脑血管疾病^[1]。虽然 SAH 只占所有卒中患者的 5% 左右,但病死率和残疾率高达 50%^[1-2]。早期脑损伤定义为 SAH 发病后 72 h 内发生的脑损伤,在患者的预后中起重要作用^[3]。神经元的凋亡是 SAH 后早期脑损伤的重要机制^[4]。自噬是一种保守的溶酶体降解途径,对消除细胞内陈旧蛋白和受损细胞器及维持细胞内稳态起重要作用^[5]。研究发现,神经元中的自噬活性在 SAH 后显著增加,并可持续在整个早期脑损伤阶段^[6]。这种自噬活性的增强被认为是一种保护机制,可抑制 SAH 后早期脑损伤中神经细胞的凋亡。因此,促进 SAH 后自噬可能是改善 SAH 后细胞凋亡及继发性脑损伤的有效策略。

ω -3 多不饱和脂肪酸是一种具有抗氧化、抗炎作用的生物活性化合物,在阿尔茨海默病^[7]、帕金森病^[8]、脑缺血^[9]等多种模型中有脑保护作用。有研究证实, ω -3 多不饱和脂肪酸可抑制神经细胞凋亡和神经炎症反应^[10-11]。而最新研究发现, ω -3 多不饱和脂肪酸可通过上调 SIRT1 促进神经元的自噬活性以减轻创伤性脑损伤所致神经元凋亡^[12]。因此,本研究拟探讨 ω -3 多不饱和脂肪酸对大鼠 SAH 后神经元凋亡和自噬的影响,为治疗 SAH 的研究提供新的方向和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 C57BL/6J 雄性小鼠 48 只,体重 23~25 g,购自西安交通大学医学院实验动物中心,于 22~24 °C 的温房中饲养,自由进食饮水。采用随机数字表法将小鼠分为假手术(Sham)组、假手术+ ω -3 多不饱和脂肪酸(Sham+ ω -3)组、SAH 组、SAH+ ω -3 多不饱和脂肪酸(SAH+ ω -3)组,每组各 12 只。

1.2 主要试剂

ω -3 多不饱和脂肪酸购自美国 Sigma 公司;SIRT1、LC3- I / II 抗体购自美国 Abcam 公司;ATG-3、ATG-7、Beclin-1、Cleaved caspase-3 抗体购自美国 Cell Signaling 公司; β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,TUNEL 凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司;SABC 免疫组织化学试剂盒及 DAB 染色液购自武汉博士德生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 造模及实验方法

参照文献^[13],采用血管内穿刺法建立大鼠实验性蛛网膜下腔出血(eSAH)模型。水合氯醛麻醉大鼠后,分离右颈总动脉、右颈外动脉和右颈内动脉。在右颈外动脉远侧作一切口,将 4-0 单丝尼龙缝合线经残端置入,引入颈内动脉直至感觉到阻力,此时距颈总动脉分叉处约 20 mm。继续将缝合线推进约 3 mm,穿透大脑中动脉分叉处的颈内动脉,后立即撤回缝合线,允许颈内动脉再灌注以制成 eSAH 模型。Sham 组和 Sham+ ω -3 组仅在手术操作中將尼龙线头端送至右颈内动脉,但不刺破动脉管壁;SAH 组和 SAH+ ω -3 组制备 eSAH 模型。Sham+ ω -3 组和 SAH+ ω -3 组分别于模型制备后即刻、12 h、24 h、36 h、48 h 腹腔注射 30 mg/kg 的 ω -3 多不饱和脂肪酸(溶于 2 mL 1% DMSO)^[12];Sham 组和 SAH 组分别在模型制备后即刻、12 h、24 h、36 h、48 h 于腹腔注射 2 mL 1% DMSO 溶液。

1.3.2 Garcia 神经功能评分

术后 72 h,采用 Garcia 评分行神经功能评价^[14-15],主要包括 6 个部分:(1)自发性活动;(2)四肢对称性运动;(3)前爪伸展实验;(4)攀爬实验;(5)本体感受实验;(6)触须接触反应;前 3 项得分为 0~3 分,最后 3 项得分为 1~3 分,最低得分为 3 分,最高得分为 18 分。

1.3.3 Western blot 检测

本研究通过检测自噬标志物 ATG-3、ATG-7、Beclin-1、LC3- II 的蛋白表达反应自噬活性^[16]。术后 72 h,各组取 6 只大鼠,腹腔注射致死剂量的戊巴比妥钠(80 mg/kg)处死,取右脑半球皮质,称重后充分匀浆并离心。BCA 蛋白质检测试剂盒测定蛋白质含量后,将等量的蛋白质重悬于上样缓冲液中。蛋白标本变性后,聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至 0.45 μ m 孔径的 PVDF 膜上。5% 的脱脂牛奶中室温封闭后,加入一抗(ATG-3 抗体,1:1 000;ATG-7 抗体,1:1 000;Beclin-1 抗体,1:1 000;Cleaved caspase-3 抗体,1:400;LC3- I / II 抗体,1:500;SIRT1 抗体,1:500; β -actin 抗体,1:400)4 °C 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的生物二抗室温反应 2 h,后行 ECL 显影并拍照。采用 Quantity One 软件行图像分析。蛋白表达水平以目标蛋白灰度值/ β -actin 灰度值表示。

1.3.4 TUNEL 法凋亡检测及 SIRT1 免疫组织化学染色

术后 72 h, 各组取 6 只大鼠, 腹腔注射致死剂量的戊巴比妥钠(80 mg/kg)处死, 并用 4 °C、4%多聚甲醛心内灌注。分离脑组织, 在 4%多聚甲醛中后固定 6 h, 石蜡包埋后切成约 5 μm 厚的切片。用 0.1% Triton X-100 透化 2 min, 封闭 30 min 后, 根据厂商的说明书进行 TUNEL 染色, 并用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)行核复染。荧光显微镜 400 倍镜下观察损伤侧大脑皮层并摄片, DAPI 染色细胞核呈蓝色荧光, TUNEL 阳性细胞核呈红色荧光。计算凋亡指数 = TUNEL 阳性凋亡细胞数/DAPI 有核细胞总数 × 100%。

将切片在 4 °C 下与 SIRT1 一抗(1 : 200)孵育 24 h。第 2 天, 用 PBS 洗涤切片, 室温下依次加入二抗和 SABC 反应液。0.05% DAB 染色液显色 2~8 min, 苏木素复染细胞核, 梯度酒精脱水、二甲苯透明和中性树脂封片。光镜 400 倍镜下观察并摄片, 运用 Image-Pro Plus 5.0 软件系统测定视野下 SIRT1 阳性染色的光密度值, 结果以实验组光密度值/Sham 组平均光密度值 × 100% 表示。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间及组内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 小鼠脑组织标本观察及神经功能评分

小鼠脑组织标本观察可见, Sham 组(图 1A)脑表面未见显著出血; SAH 组小鼠脑组织(图 1B)可见 Willis 动脉环区域的蛛网膜下腔存在大量血凝块。与 Sham 组和 Sham + ω-3 组比较, SAH 组 Garcia 评分显著下降($P < 0.05$); 而与 SAH 组小鼠比较, SAH + ω-3 组 Garcia 评分显著改善($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠 SAH 后 Garcia 评分比较

组别	n	Garcia 评分($\bar{x} \pm s$, 分)
Sham 组	12	17.3 ± 3.2
Sham + ω-3 组	12	16.8 ± 4.1
SAH 组	12	8.7 ± 1.0 ^{ab}
SAH + ω-3 组	12	13.6 ± 1.5 ^{ac}

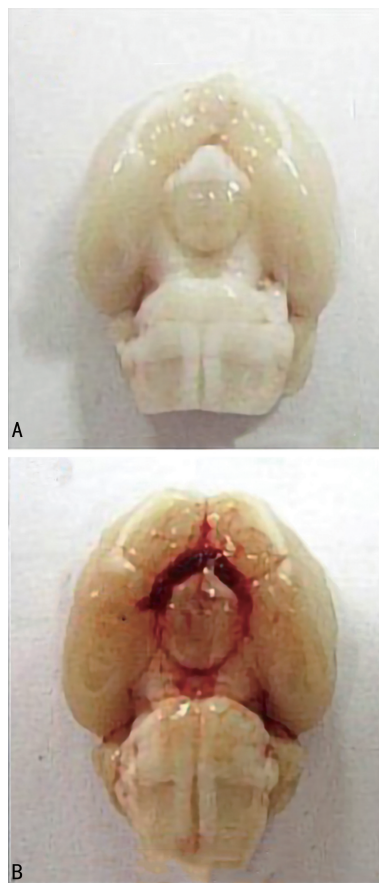
^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。

2.2 各组小鼠 SAH 后皮层自噬标志物蛋白表达水平比较

与 Sham 组比较, SAH 组脑皮层自噬标志物 ATG-3、ATG-7、LC3-II 蛋白表达有所增加($P < 0.05$); 与 SAH 组比较, SAH + ω-3 组脑皮层自噬标志物 ATG-3、ATG-7、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达上调更加明显($P < 0.05$), 见表 2 和图 2。

2.3 各组小鼠 SAH 后皮层 Cleaved caspase-3 和凋亡指数的比较

与 Sham 组比较, SAH 组脑皮层凋亡产物 Cleaved caspase-3 蛋白表达和凋亡指数均显著增加($P < 0.05$); 与 SAH 组比较, SAH + ω-3 组脑皮层 Cleaved caspase-3 蛋白表达和凋亡指数均显著减少($P < 0.05$), 见表 3 和图 3、4。



A: Sham 组; B: SAH 组。

图 1 小鼠脑组织标本肉眼观

表 2 各组小鼠 SAH 后皮层自噬标志物蛋白表达比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

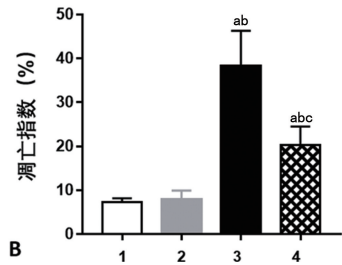
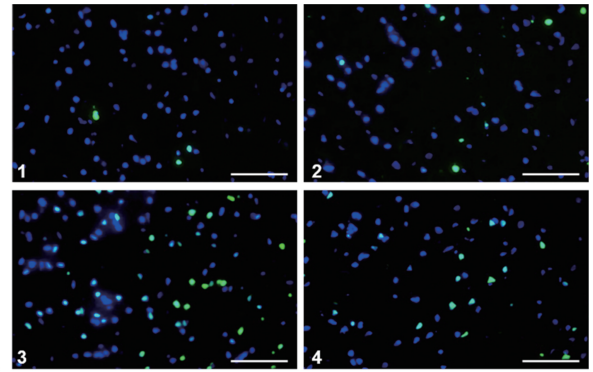
组别	ATG-3	ATG-7	Beclin-1	LC3-II
Sham 组	0.309 ± 0.068	0.248 ± 0.059	0.365 ± 0.129	0.303 ± 0.055
Sham + ω-3 组	0.334 ± 0.023	0.278 ± 0.059	0.269 ± 0.057	0.306 ± 0.036
SAH 组	0.571 ± 0.133 ^{ab}	0.476 ± 0.065 ^{ab}	0.481 ± 0.081 ^b	0.500 ± 0.075 ^{ab}
SAH + ω-3 组	0.897 ± 0.205 ^{abc}	0.798 ± 0.147 ^{abc}	1.003 ± 0.151 ^{abc}	0.574 ± 0.099 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。

表 3 各组小鼠 SAH 后皮层 Cleaved caspase-3 表达和凋亡指数比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Cleaved caspase-3	凋亡指数 (%)
Sham 组	0.136 ± 0.032	7.3 ± 0.8
Sham + ω-3 组	0.226 ± 0.028 ^a	7.9 ± 2.0
SAH 组	0.662 ± 0.143 ^{ab}	38.4 ± 7.9 ^{ab}
SAH + ω-3 组	0.385 ± 0.073 ^{abc}	20.3 ± 4.3 ^{abc}

^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。



A: 各组小鼠凋亡指数的变化; 1: Sham 组; 2: Sham + ω-3 组; 3: SAH 组; 4: SAH + ω-3 组; B: 凋亡指数分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较; 标尺 = 50 μm。

图 4 各组小鼠 SAH 后皮层凋亡指数比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

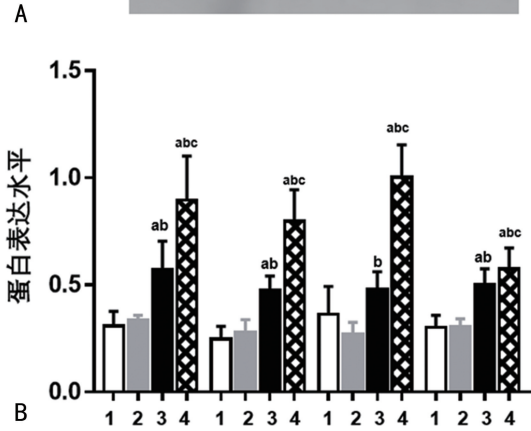
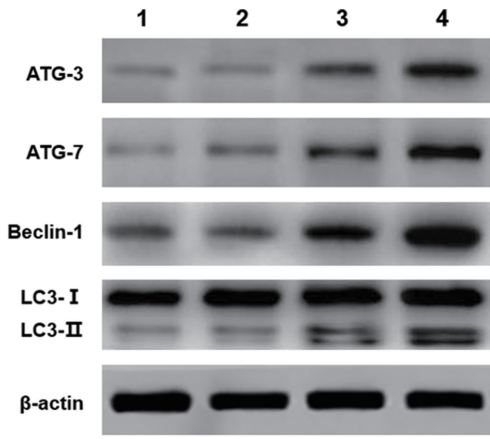
2.4 各组小鼠 SAH 后 SIRT1 蛋白表达和免疫组织化学表达比较

与 Sham 组比较, SAH 组脑皮层 SIRT1 蛋白和免疫组织化学表达均有所增加 ($P < 0.05$); 与 SAH 组比较, SAH + ω-3 组脑皮层 SIRT1 蛋白和免疫组织化学表达显著增加 ($P < 0.05$), 见表 4 和图 5、6。

表 4 各组小鼠 SAH 后 SIRT1 蛋白表达和免疫组织化学表达比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

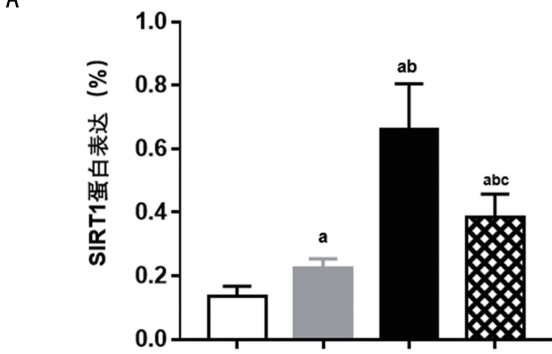
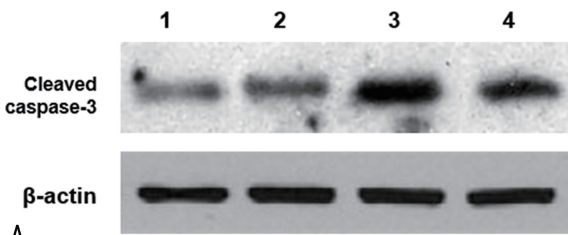
组别	SIRT1 蛋白	SIRT1 免疫 (%)
Sham 组	0.296 ± 0.071	100 ± 24
Sham + ω-3 组	0.368 ± 0.097	110 ± 34
SAH 组	0.709 ± 0.218 ^{ab}	188 ± 40 ^{ab}
SAH + ω-3 组	1.285 ± 0.252 ^{abc}	288 ± 27 ^{abc}

^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。



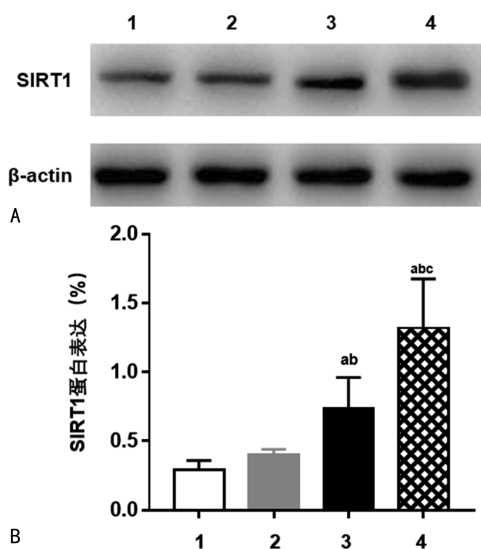
A: 各组小鼠 Western blot 检测自噬标志物在的表达变化; 1: Sham 组; 2: Sham + ω-3 组; 3: SAH 组; 4: SAH + ω-3 组; B: 自噬标志物蛋白半定量分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。

图 2 各组小鼠 SAH 后皮层自噬标志物蛋白表达比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)



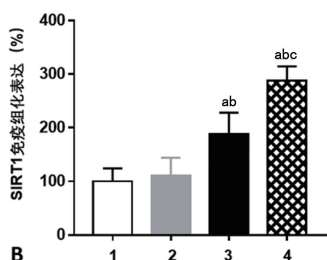
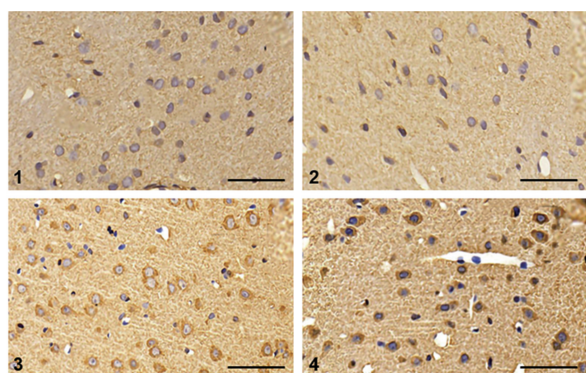
A: 各组小鼠 Western blot 检测 Cleaved caspase-3 蛋白表达变化; 1: Sham 组; 2: Sham + ω-3 组; 3: SAH 组; 4: SAH + ω-3 组; B: Cleaved caspase-3 蛋白表达半定量分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。

图 3 各组小鼠 SAH 后皮层 Cleaved caspase-3 蛋白表达比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)



A: 各组小鼠 Western blot 检测 SIRT1 蛋白表达变化; 1: Sham 组; 2: Sham + ω-3 组; 3: SAH 组; 4: SAH + ω-3 组; B: SIRT1 蛋白表达半定量分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较。

图 5 各组小鼠 SAH 后皮层 SIRT1 蛋白表达比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)



A: 各组小鼠 SIRT1 免疫荧光表达的变化; 1: Sham 组; 2: Sham + ω-3 组; 3: SAH 组; 4: SAH + ω-3 组; B: SIRT1 免疫荧光表达半定量分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAH + ω-3 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 SAH 组比较; 标尺 = 50 μm。

图 6 各组小鼠 SAH 后 SIRT1 免疫荧光表达比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

本研究探讨了 ω-3 多不饱和脂肪酸对大鼠 SAH 后神经元凋亡和自噬的影响。研究结果显示,腹腔多次注射 ω-3 多不饱和脂肪酸能减轻大鼠 SAH 后的神经功能损伤,促进自噬活性并抑制神经元凋亡。

ω-3 多不饱和脂肪酸在人体新陈代谢中起关键作用^[17]。最近的研究表明,ω-3 多不饱和脂肪酸不仅提

供能量,还可调节炎症反应和免疫功能,并具有抗氧化和抗炎作用^[17]。已经在多种中风模型中显示了 ω-3 多不饱和脂肪酸对缺血性脑损伤的神经保护作用^[9,18]。本研究表明,ω-3 多不饱和脂肪酸能改善大鼠 SAH 后的神经功能评分,这说明 ω-3 多不饱和脂肪酸对 SAH 大鼠有脑保护作用。

神经细胞凋亡是 SAH 后早期脑损伤的重要病理机制,可能是由 SAH 后颅内压增高、脑缺血-再灌注损伤和血液分解成分毒性引起的^[4]。神经系统中自噬和细胞凋亡之间的关系非常复杂,尚未完全了解。大量证据表明,自噬可以通过多种机制抑制细胞凋亡,其中包括清除受损的线粒体或失活蛋白^[19]。同时,自噬也可通过整合内质网应激启动子达到减少细胞凋亡的效果^[20]。已有研究表明,ω-3 多不饱和脂肪酸可通过促进自噬活性从而减轻创伤性脑损伤所致的神经细胞凋亡^[12]。与之类似,神经元自噬活性在 SAH 后显著增加,并被认为是一种保护机制,可抑制 SAH 后早期脑损伤中的神经细胞凋亡^[6]。本研究结果表明,ω-3 多不饱和脂肪酸可显著减少 SAH 后脑皮层凋亡产物 Cleaved caspase-3 的表达并降低凋亡指数,提示 ω-3 多不饱和脂肪酸可抑制 SAH 后大脑皮层细胞凋亡。而 ω-3 多不饱和脂肪酸还可在抑制细胞凋亡的同时增加自噬标记物 ATG-3、ATG-7、Beclin-1、LC3-II 的蛋白表达。因此,笔者推测 ω-3 多不饱和脂肪酸可能通过促进神经元自噬活性减轻 SAH 后神经细胞凋亡。

最近的研究表明,SIRT 蛋白家族对自噬相关蛋白 ATG 的去乙酰化是诱导自噬体形成的关键过程^[21]。SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的 III 类组蛋白去乙酰化酶,并已被证明可通过介导 ATG 的脱乙酰化调节自噬^[21]。此外,SIRT1 还可通过介导自噬相关蛋白 Beclin-1 赖氨酸残基去乙酰化影响自噬体成熟^[22]。而进一步研究发现,ω-3 多不饱和脂肪酸可通过激活 SIRT1 信号通路介导 Beclin-1 去乙酰化,从而增加脑创伤后的自噬活性^[12]。与之一致,本研究结果表明,ω-3 多不饱和脂肪酸可上调 SAH 后 SIRT1 信号通路活性,这提示 ω-3 多不饱和脂肪酸上调 SIRT1 可能是其促进 SAH 后自噬活性的重要机制。

综上所述,ω-3 多不饱和脂肪酸可通过促进自噬活性减轻大鼠 SAH 后凋亡及神经功能损伤。本研究为临床上治疗 SAH 早期脑损伤提供了一种新的方法和思路。

参考文献

[1] LANTIGUA H, ORTEGA-GUTIERREZ S, SCHMIDT J M, et al. Subarachnoid hemor-

- rhage; who dies, and why? [J]. *Crit Care*, 2015,19;309.
- [2] LUCKE-WOLD B P, LOGSDON A F, MANOR ANJAN B A, et al. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage and neuroinflammation: a comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4):497.
- [3] HELBOK R, SCHIEFECKER A J, BEER R, et al. Early brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a multimodal neuro-monitoring study[J]. *Crit Care*, 2015,19:75.
- [4] HASEGAWA Y, SUZUKI H, SOZEN T, et al. Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011,110(Pt 1):43-48.
- [5] WU J, LIPINSKI M M. Autophagy in Neurotrauma: Good, Bad, or Dysregulated[J]. *Cells*, 2019,8(7):693.
- [6] LEE JY, HE Y, SAGHER O, et al. Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Brain Res*, 2009, 1287: 126-135.
- [7] BARBERGER-GATEAU P, SAMIERI C, FÉART C, et al. Dietary omega 3 polyunsaturated fatty acids and Alzheimer's disease; interaction with apolipoprotein E genotype[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2011,8(5):479-491.
- [8] BOUSQUET M, CALON F, CICCHETTI F. Impact of ω -3 fatty acids in Parkinson's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2011,10(4):453-463.
- [9] ZHANG W, ZHANG H, MU H, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids mitigate blood-brain barrier disruption after hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2016,91:37-46.
- [10] SHI Z, REN H, LUO C, et al. Enriched endogenous omega-3 polyunsaturated fatty acids protect cortical neurons from experimental ischemic injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(9): 6482-6488.
- [11] LUO C, REN H, YAO X, et al. Enriched brain omega-3 polyunsaturated fatty acids confer neuroprotection against microinfarction [J]. *EBioMedicine*, 2018,32:50-61.
- [12] CHEN X, PAN Z, FANG Z, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates traumatic brain injury-induced neuronal apoptosis by inducing autophagy through the upregulation of SIRT1-mediated deacetylation of Beclin-1[J]. *J Neuroinflammation*, 2018,15(1):310.
- [13] BEDERSON J B, GERMANO I M, GUARINO L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat [J]. *Stroke*, 1995,26(6):1086-1091.
- [14] GARCIA J H, WAGNER S, LIU K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation [J]. *Stroke*, 1995,26(4):627-634.
- [15] 黎新慎, 彭建华, 庞金伟, 等. 载脂蛋白 E 拟肽 COG1410 对蛛网膜下腔出血后自噬和凋亡的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(24): 2366-2373.
- [16] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*, 2010,140(3):313-326.
- [17] DENIS I, POTIER B, HEBERDEN C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain aging[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015,18(2):139-146.
- [18] ZENDEDEL A, HABIB P, DANG J, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia[J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 278:200-211.
- [19] LIN C, CHAO H, LI Z, et al. Melatonin attenuates traumatic brain injury-induced inflammation; a possible role for mitophagy[J]. *J Pineal Res*, 2016,61(2):177-186.
- [20] FERNÁNDEZ A, ORDÓÑEZ R, REITER R J, et al. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis[J]. *J Pineal Res*, 2015,59(3):292-307.
- [21] SUZUKI M, BANDOSKI C, BARTLETT J D. Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 369-378.
- [22] SUN T, LI X, ZHANG P, et al. Acetylation of beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth [J]. *Nat Commun*, 2015,6:7215.