DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230726.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20230726.1131.002

BMSCs移植通过激活AMPK/mTOR信号通路介导的自噬抑制大鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡

崔彩玲[1],许心语[1],张 豫[1],崔博文[1],胡艾蕙[1],刘俊杰[1,2],李建民[1,2]✉
(1.华北理工大学临床医学院,河北 唐山 063000;2.华北理工大学附属医院神经外科,河北 唐山 063000)

[摘要] **目的**:探究大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后骨髓间充质干细胞(BMSCs)的干预对神经细胞凋亡和自噬的作用及其过程。**方法**:将48只Sprague-Dawley(SD)大鼠(雄性)随机分为:假手术(Sham)组、模型(SAH)组、模型组+骨髓间充质干细胞(BMSCs)组、模型组+BMSCs+AMPK抑制剂(Compound C)组,共4组,每组12只。除Sham组外,其他组通过造模形成具有血管内点的SAH样本,Compound C组、BMSCs组分别将Compound C和10 μL生理盐水在模型制作前30 min,用大鼠大脑立体定位器经左侧脑室注入大鼠,造模成功后将2 μL浓度为1×10^8/mL的细胞悬液于大鼠造模后1 h经脑室注入。观察大鼠脑组织水肿程度;用Garcia评分量表测试大鼠的神经功能,TUNEL染色监测大鼠海马回的神经元凋亡情况;免疫组化反映大鼠海马回LC3-Ⅱ与Beclin-1两种蛋白表达;应用Western blot检测Beclin-1,LC3-Ⅱ以及AMPK通路中的p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR等蛋白的暴露量。**结果**:与Sham组相比,SAH组大鼠脑水肿加重,神经元凋亡率增高,神经功能减弱,蛋白质颗粒降低($P<0.05$),p-AMPK及其相关蛋白的暴露率降低($P<0.05$);与SAH组相比,BMSCs组脑水肿减轻,神经元凋亡率下降,且LC3-Ⅱ、Beclin-1及p-AMPK蛋白明显增加,p-mTOR蛋白明显减少($P<0.05$);与BMSCs组相比,Compound C组大鼠脑组织水肿加重,神经凋亡率上升,神经功能减弱($P<0.05$),LC3-Ⅱ、Beclin-1、p-AMPK蛋白表达含量降低,p-mTOR蛋白含量升高($P<0.05$)。**结论**:BMSCs移植可减轻SAH后的神经元凋亡;其原理可能是激活AMPK/mTOR通路,加强神经元的自噬,从而抑制其向凋亡的转化。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;蛛网膜下腔出血;AMPK/mTOR;自噬
[中图分类号] R743.35 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)21-1607-07

BMSCs transplantation inhibits neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats through activation of AMPK/mTOR signaling pathway-mediated autophagy

CUI Cai-ling[1], XU Xin-yu[1], ZHANG Yu[1], CUI Bo-wen[1], HU Ai-hui[1], LIU Jun-jie[1,2], LI Jian-min[1,2]✉
(1. *College of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan* 063000, *China*; 2. *Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan* 063000, *China*)

[*Foundation Project*]: *Tangshan Science, Technology and Development Plan Project* (21130224C); *Hebei Province* 2022 *Medical Science Research Project Plan* (20221533); *College Student Innovation Training Program* (R2022166)

[*Author*]: *CUI Cai-ling*, *E-mail*: 1661848053@qq.com.
[*Correspondence to*]: *LI Jian-min*, *Professor*, *Chief Physician*, *Master's Supervisor*, *E-mail*: *lijianmin*6207@126.com.

Received: 2023-05-10 *Revised*: 2023-07-21 *JHMU*, 2023;29(21):1607-1613

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To explore the impacts of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) intervention on the neuronal withering and autophagy in rats after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats and its process. **Methods**: Forty-eight male SD rats, were randomly assigned to the followings groups: Sham surgery (Sham) group, modeling (SAH) group, modeling group

[基金项目] 唐山市科学技术与发展计划项目(21130224C);河北省2022年度医学科学研究课题计划(20221533);大学生创新训练计划(R2022166)

[作者简介] 崔彩玲,E-mail:1661848053@qq.com。
[通讯作者] 李建民,教授,主任医师,硕士生导师,E-mail:lijianmin6207@126.com。

[收稿日期] 2023-05-10 [修回日期] 2023-07-21 网络出版时间:2023-07-26 14:50:47

+ bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) group, the modeling group + BMSCs + AMPK inhibitor (Compound C) group, with twelve rats in each group. Except Sham group, other groups formed SAH samples with intravascular points. Compound C and 10 μL of normal saline were injected into the left lateral ventricle of rats using a stereoscope brain machine 30 minutes before modeling in compound C and BMSCs groups, respectively. And 2 μL of cell suspension at a concentration of 1×10^8/mL was injected into the ventricles of the brain 1 hour after the model was established. The severity of brain swelling in rats was observed. Garcia were used to test the neural function of rats. TUNEL staining was used to monitor neuronal apoptosis in the rat hippocampal gyrus. Immunohistochemical fluorescence reflected the expression of two proteins, LC3-II and Beclin-1, in rat hippocampal gyrus. Western blotting was applied to measure the expressions of autophagy-associated proteins in the AMPK pathway. **Results**: Compared with the group undergoing sham-surgery, brain edema worsened in the model group; neuronal apoptosis rate was increased; neural function was weakened. Protein granules decreased ($P<0.05$) and expression levels of p-AMPK and other proteins decreased ($P<0.05$); brain swelling and neuronal apoptosis were reduced in the BMSCs group by comparison with the modeling group's, with substantial elevation in the expression of proteins comprising LC3-Ⅱ, Beclin-1, and p-AMPK. And the standard of p-mTOR protein expression was considerably lessened ($P<0.05$); rats belonging to group compound C showed increased brain swelling which is relative to that of BMSCs group, increased neuronal apoptosis, decreased neuronal function ($P<0.05$), increased p-AMPK protein expression, and decreased LC3-Ⅱ, Beclin-1, and p-mTOR protein expression ($P<0.05$). **Conclusion**: BMSCs transplantation can reduce neuronal apoptosis after SAH; its principle may be to activate AMPK/mTOR pathway, strengthen autophagy of neurons, and thus inhibit their transformation to apoptosis.

[KEYWORDS] Bone marrow mesenchymal stem cells; Subarachnoid hemorrhage; AMPK/mTOR; Autophagy

蛛网膜下腔出血(SAH)是由脑实质中的浅表血管破裂和血液灌入蛛网膜下腔引起的一种临床综合征,在临床上具有极高的病死率和残疾率。余志强等[1]认为,发生SAH后,神经小胶质细胞受到刺激、免疫细胞发生聚集,引起微循环障碍,进而血脑屏障被破坏,进而导致神经元直接或间接凋亡。因此,神经元凋亡在早期脑损伤(EBI)的病理生理过程中被认为具有重要的作用[2-4]。细胞自噬是依赖溶酶体内的异常蛋白,以及受损的细胞器所产生或暴露的蛋白的一个重要分解途径。其中,磷酸腺苷活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)通路是自噬上游的一条关键途径。当机体能量供应充足时,mTORC1使ULK1发生磷酸化,进而阻断其与AMPK作用激活,从而抑制细胞自噬启动[5]。当机体处于能量不足时,AMPK使Raptor磷酸化并被抑制,从而下调mTORC1的活性。另外,ULK1也可被磷酸化激活,引发自噬级联的启动[6];已有研究表明,蛛网膜下腔出血后,AMPK/mTOR和PI3K-Akt/mTOR通路对自噬强度的调节可对神经元起保护作用[7],这些实验均表明,在SAH后神经元凋亡及自噬过程的调控中,AMPK/mTOR通路可能扮演着不可或缺的角色。骨髓间充质干细胞(BMSCs)具有穿越血脑屏障、迁移到中枢神经系统的能力,并在移植后分化为神经细胞。目前已有研究表明骨髓间充质干细胞移植治疗可能有促进脑出血(ICH)大鼠神经系统功能恢复的作用,一方面移植干细胞能够减轻神经元的凋亡,加强损伤后的组织修复,改善损伤处内环境,起到保护血肿周围组织的作用[8-10];另一方面ICH后,出血灶周围的脑组织内可检测到PI3K-Akt-mTOR相关通路的激活;进行BMSCs治疗后,此通路激活程度加强,细胞自噬与轴突再生也同时增强[11]。然而,BMSCs移植能否通过AMPK/mTOR通路引起自噬从而减轻SAH后的神经元凋亡却鲜有报道。因此,本实验欲建立SAH大鼠模型,探究BMSCs移植治疗通过AMPK/mTOR通路诱导SAH后神经元自噬与凋亡的程度和可能机制,旨在为其它相关研究提供更好的实验基础,为SAH的临床诊治及药物开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体重280~300 g。实验组大鼠于华北理工大学动物实验基地进行人工饲养,每天给予大鼠自由进食,其饮水及所处环境通风情况良好。实验开始之前,对大鼠进行适应性喂养1周。

1.1.2 实验试剂与仪器 AMPK抑制剂Compound C于美国Sigma公司购入,抗Beclin-1单克隆抗体、抗LC3-Ⅱ多克隆抗体、抗GAPDH单克隆抗体于Proteintech公司购入;二抗及显色用品于美国KPL公司购入;抗p-mTOR单克隆抗体、抗mTOR多克隆抗体、抗p-AMPKα单克隆抗体、抗AMPKα单克隆抗体均于美国Cell Signaling Technology购入。TP-1型摊片机(湖北康强医疗设备有限公司),820-Ⅱ切片机(德国LEICA公司),大鼠脑立体定位仪(上海宇燕科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型构建 采用随机数字方法，将48只SD大鼠（雄性）按如下方式分组：假手术（Sham）组、模型（SAH）组、模型组＋骨髓间充质干细胞（BMSCs）组、模型组＋BMSCs＋AMPK抑制剂（Compound C）组，每组各12只。在模型制作之前，所有动物12 h内禁食，4 h内禁水。参考文献[12]所述，建立SAH大鼠模型，采用血管穿刺技术，术后24 h取材，SAH手术模型制作成功的临床表现指证为蛛网膜下腔内出现血凝块；若不合格则剔除实验[13]。假手术组不扎穿血管壁，其他术式无明显差异。Compound C组、BMSCs组分别在造模前30 min将Compound C（100 nmol溶于10 μL生理盐水）和10 μL生理盐水（2 μL二甲基亚砜溶于8 μL 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液）使用大鼠脑立体定位仪注入左侧侧脑室（前囟后1 mm、旁开1.5 mm、深3.5 mm）注射。在造模成功后1 h，将2 μL浓度的1×10^8/mL的细胞悬液通过脑室注射。

1.2.2 大鼠神经功能评估 造模成功之后24 h，以Garcia评分表[14]为依据随机评估每组6只大鼠的神经系统缺陷，包括自主活动、肢体运动、前肢伸展和攀登以及对躯干和肢体触摸的反应。其中自主活动、肢体运动对称性和前肢伸展各0～3分；攀爬、对躯干触摸的反应和对轴向奔跑的反应各1～3分。计算总分，分数越低表示神经系统损伤越严重。

1.2.3 大鼠脑含水量检测 每组大鼠各取6只进行造模，成功后继续喂养24 h。将SAH的模型大鼠用水合氯醛进行麻醉并将其颈椎脱臼处死取脑，将两侧海马组织快速剥除。取200 mg大脑皮质，放置于电子天平，记录湿重（精确到1 mg），然后恒温干燥48 h，直至恒重。称取干重量，并根据Elliott公式分析各组脑组织水含量：脑含水量（%）＝（烘干前质量-烘干后质量）/烘干前质量×100%。对四组大鼠的脑组织含水量进行测定和比较。

1.2.4 大鼠神经元凋亡情况 用4%多聚甲醛固定部分海马组织，采用石蜡包埋并执行连续分片。切片经常规脱蜡、洗涤等处理后，滴加过氧化氢排除过氧化酶活性，并在20～25 ℃室温下浸润25～30 min；完成后洗涤标本，根据TUNEL染色试剂盒上的指示对标本进行处理与染色。显微镜下观察凋亡细胞的数量并摄片，在每个切片中随机选择海马CA1区的5个像场进行计数，并取其平均值作为凋亡细胞数。

1.2.5 免疫组织化学染色 常规脱蜡，避光条件下用过氧化氢加热10 min，用胰蛋白酶校正抗原20 min，于湿器中滴加抗体LC3-Ⅱ（稀释度1∶300）和抗体Beclin-1（稀释度1∶200），4 ℃过夜孵育。然后加入二抗溶液，室温下孵育半小时。之后用PBS洗涤，二氨基联苯胺染色，脱水，透明，覆盖玻片。本实验用PBS替代一抗做对照组。光镜下观测海马CA1区域内的阳性细胞，并在每个切片内随机选择5个不同的视野，计算阳性细胞平均数量[15]。

1.2.6 大鼠海马组织中相关蛋白表达水平 取大鼠海马组织，4 ℃条件下加入RIPA裂解液研磨裂解组织，离心分离提取蛋白。取制备的蛋白提取液，上样量30 μg蛋白，经聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至PVDF膜上。将PVDF膜置于孵育盒内加入5%脱脂奶粉，室温下封闭2 h。封闭结束后利用TBST洗膜，分别加入不同比例稀释的一抗1∶500稀释的AMPKα；1∶1 000稀释的LC3-Ⅱ、Beclin-1、p-AMPKα、mTOR、p-mTOR；1∶1 500稀释的GAPDH稀释液，4 ℃过夜。完成后室温下使用TBST洗涤，后加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育2 h，孵育完毕后再用TBST洗涤。滴入ECL超敏发光液显影。采用Image J对蛋白质条带进行光密度值测定和量化分析。

1.2.7 统计学分析 所有数据均使用Excel建立数据库，应用SPSS 23.0和GraphPad Prism 8.0统计分析软件对数据进行处理，并绘制图形。所有数值均以（$\bar{x}\pm s$）表示。采用单向方差分析比较多个样本，采用t检验比较两组间数据。$P<0.05$差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺陷评分比较

与SAH组大鼠相比，Sham组大鼠Garcia评分高（$P<0.05$），神经功能正常，而BMSCs组Garcia评分低，神经功能缺陷明显（$P<0.05$）。与BMSCs组相比，Compound C组神经功能则进一步降低（$P<0.05$），见表1。

2.2 各组大鼠脑含水量比较

与Sham组相比，SAH组大鼠的脑组织含水量显著增加（$P<0.05$）。与SAH组相比，BMSCs组降低了大鼠脑含水量（$P<0.05$）。与BMSCs组比较，Compound C组则略微升高（$P<0.05$）；而Sham组与BMSCs组对比差异无统计学意义（$P>0.05$）。在实验过程中，可以观察到各组不同程度的水肿现象。结果见表2。

2.3 各组大鼠海马组织神经元凋亡情况

借助TUNEL染色来观察大鼠海马组织切片的结果：与Sham组比较，SAH组大鼠神经元凋亡程度

表1 各组大鼠神经功能评分(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The results of the neurological score content in each group of rats (n=6,$\bar{x}\pm s$)

分组	神经功能评分(分)
Sham组	17.61±0.49
SAH组	12.17±1.40[a]
BMSCs组	14.88±0.72[b]
Compound C组	12.63±0.59[c]
F	74.88
P	<0.05

注:神经功能评分为Garcia评分;与Sham组相比,[a]P<0.05;与SAH组相比,[b]P<0.05;与BMSCs组相比,[c]P<0.05。

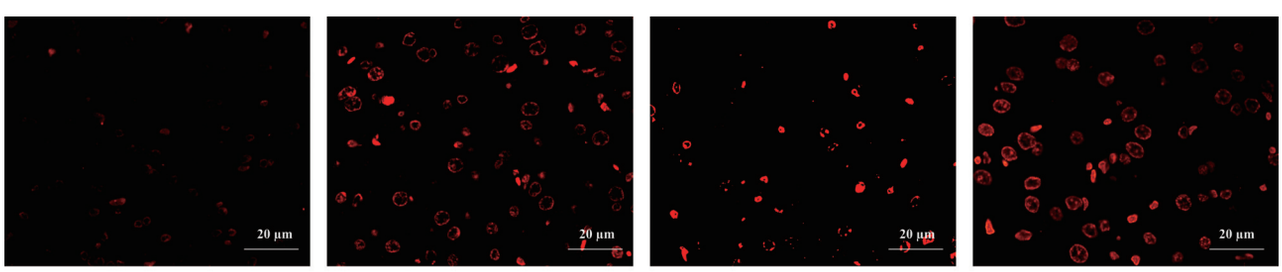
表2 各组大鼠脑组织含水量(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The results of brain water content in each group of rats (n=6,$\bar{x}\pm s$)

分组	脑组织含水量(%)
Sham组	78.8±0.1
SAH组	81.5±0.5[a]
BMSCs组	79.3±0.1[b]
Compound C组	80.2±0.1[c]
F	3.140
P	<0.05

注:与Sham组相比,[a]P<0.05;与SAH组相比,[b]P<0.05;与BMSCs组相比,[c]P<0.05。

更大,凋亡率明显升高(P<0.05);与SAH组比较,BMSCs组大鼠神经细胞凋亡显著降低(P<0.05);与BMSCs组比较,Compound C组大鼠中海马区的神经元凋亡率则呈现相对上升的趋势(P<0.05),结果见表3、图1。



Sham组 SAH组 BMSCs组 Compound C组

图1 TUNEL染色(×400)

Fig 1 TUNEL staining (×400)

表3 各组大鼠神经细胞凋亡数(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The number of neuronal apoptosis in rats in each group(n=6,$\bar{x}\pm s$)

分组	CA1区
Sham组	1.61±0.22
SAH组	45.25±3.79[a]
BMSCs组	29.47±1.52[b]
Compound C组	39.38±1.72[c]
F	17.44
P	<0.05

注:与Sham组相比,[a]P<0.05;与SAH组相比,[b]P<0.05;与BMSCs组相比,[c]P<0.05。

表4 各组海马组织Beclin-1和LC3-Ⅱ的阳性细胞数(n=6,$\bar{x}\pm s$)

Tab 4 The number of positive cells of Beclin-1 and LC3-Ⅱ in hippocampal tissue of different groups(n=6,$\bar{x}\pm s$)

分组	Beclin-1	LC3-Ⅱ
Sham组	20.70±2.77	19.27±2.41
SAH组	16.41±4.96[a]	15.82±4.67[a]
BMSCs组	53.75±3.34[b]	48.73±5.04[b]
Compound C组	45.83±3.97[c]	38.85±4.67[c]
F	61.02	65.37
P	<0.001	<0.001

注:与Sham组相比,[a]P<0.05;与SAH组相比,[b]P<0.05;与BMSCs组相比,[c]P<0.05。

2.4 各组大鼠海马组织中Beclin-1与LC3-Ⅱ蛋白表达水平

研究大鼠海马组织中Beclin-1和LC3-Ⅱ蛋白的表达水平,发现SAH组与Sham组比较,大鼠自噬蛋白表达水平降低;BMSCs组与SAH组大鼠比较,大鼠自噬蛋白表达水平显著升高;Compound C组与BMSCs组比较,自噬蛋白水平则有所下降。以上均具有统计学差异(P<0.05)。结果见表4、图2、3。

2.5 各组大鼠AMPK通路相关蛋白的变化

Western blot检测AMPK通路蛋白显示:与Sham组相比,SAH组中p-AMPK与AMPK的比值降低,p-mTOR与mTOR的比值增高(P<0.05);与SAH组相比,BMSCs组p-AMPK与AMPK比值增加,p-mTOR与mTOR的比值降低(P<0.05)。与BMSCs组相比,Compound C组则p-AMPK与AMPK的比值下调,p-mTOR与mTOR的比值上调

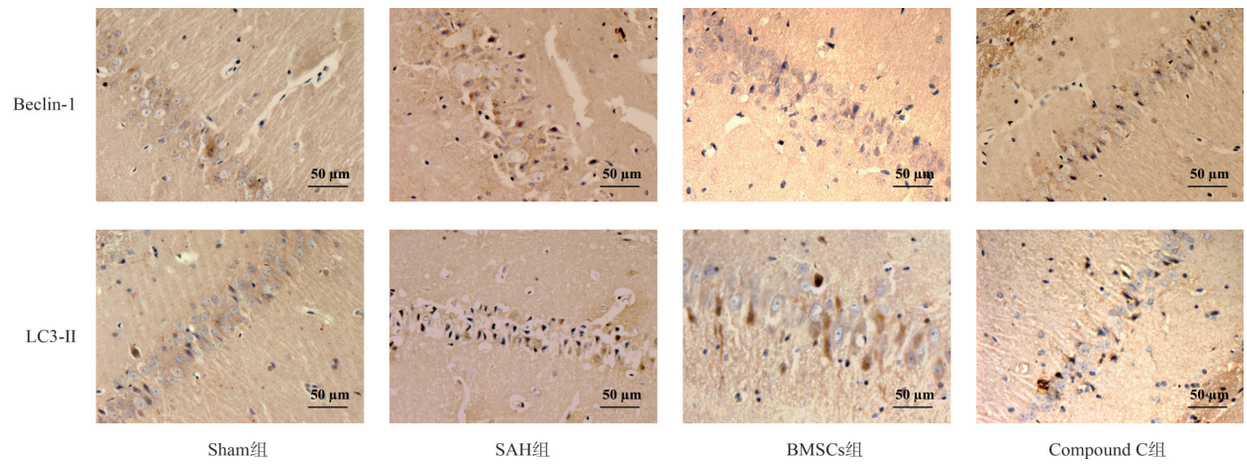
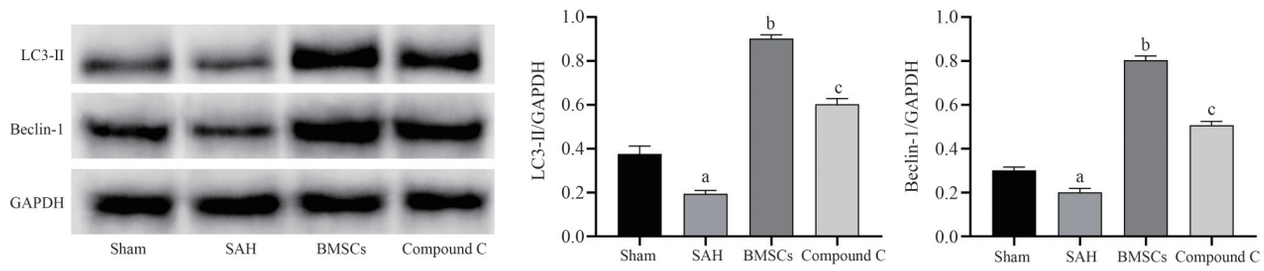


图2　各组海马组织Beclin-1和LC3-Ⅱ染色(DAB，×400)

Fig 2　Beclin-1 and LC3-Ⅱ staining of hippocampal tissue in different groups (DAB, ×400)

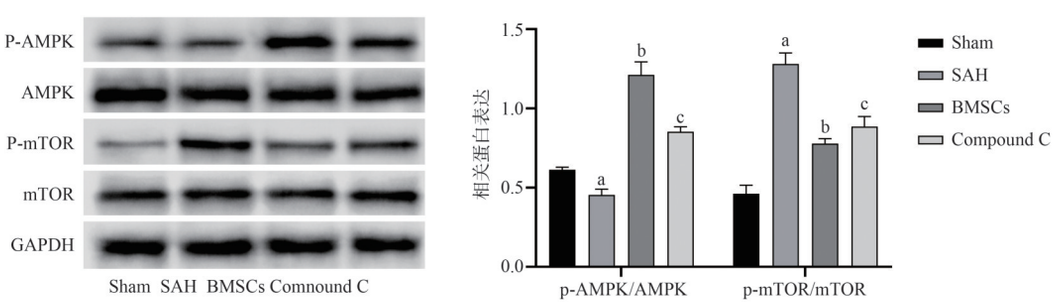


与Sham组相比，$^{a}P<0.05$；与SAH组相比，$^{b}P<0.05$；与BMSCs组相比，$^{c}P<0.05$

图3　各组大鼠自噬蛋白表达水平

Fig 3　Expression levels of autophagy-related proteins in different groups of rats

($P<0.05$)。提示BMSCs可能对AMPK/mTOR通路具有激活作用，见图4。



与Sham组相比，$^{a}P<0.05$；与SAH组相比，$^{b}P<0.05$；与BMSCs组相比，$^{c}P<0.05$

图4　各组大鼠AMPK信号通路相关蛋白表达水平

Fig 4　Expression levels of proteins associated with the AMPK signaling pathway in different groups of rats

3　讨论

自噬是指通过消化和降解破坏的细胞器、病原体等来维持细胞内环境的一种现象。自噬对SAH后神经细胞凋亡的影响和作用机理已成为当前研究的一个重要热点。李小亮等[16]研究证实，如果通过AMPK/mTOR信号通路诱导大鼠凋亡，则大鼠BMSCs合成可能影响神经细胞自噬。适当的自噬帮助细胞排出毒素和损伤物质，增加存活的神经元，抑制细胞走向凋亡。大量的实验研究表明，SAH后神经元的自相位可能被激活，并进一步诱发自噬，加强自噬可以降低SAH后的神经细胞凋亡，使神经功能损害得到缓解。在自噬体形成过程中，LC3-Ⅱ是其自噬体膜上形成和定位的标志性蛋白[17]。本实验研究发现，在对自噬因子LC3-Ⅱ和Beclin-1蛋白的测定实验中，发现与SAH组相比较，BMSCs组大鼠海马组织内蛋白表达水平显著增强，

通过观察大鼠海马回神经凋亡情况发现SAH组TUNEL阳性细胞数显著上升，假手术组则不显著；BMSCs组的TUNEL阳性细胞数比SAH组显著降低，表明神经元细胞凋亡水平降低。实验研究表明，通过骨髓间充质干细胞移植可改善SAH大鼠的自噬神经元程度及克制其凋亡，同时可加强修复大鼠神经功能及改善脑水肿。这些结果表明BMSCs可能是通过增加自噬从而抑制SAH后早期神经元凋亡。但是目前SAH试验后BMSCs抑制低振幅神经元凋亡的潜在机制尚未得到完全证实。

已有研究表明，SAH后可通过激活自噬一定程度上对SAH后大鼠神经元的保护[18]。本实验通过采用孙新刚等[12]颈动脉穿刺法制作蛛网膜下腔出血的大鼠模型研究后发现，SAH大鼠海马组织中神经元凋亡情况严重，神经功能评分显著降低；加入BMSCs后，大鼠神经功能评分相对上升，提示在一定程度上恢复了感觉和运动功能。目前已有研究表明，骨髓间充质干细胞能促进SAH大鼠受损神经细胞的恢复[19]，且BMSCs可以通过PI3K-Akt/mTOR通路来影响SAH的自噬[11]。mTOR是调控自噬的关键物质，其上游调控通路主要包括PI3K/Alt和LKBl/AMPK，通过mTOR的激活来抑制神经元自噬。作为mTOR的负调控因子，AMPK的激活可促进自噬[20]。AMPK是关键的细胞能量传感器，激活后通过调节合成代谢和分解代谢并诱导自噬，维持细胞能量平衡，促进细胞生存[21]。

AMPK/mTOR途径是最重要的自相位控制途径之一。其中，AMPK被磷酸化为p-AMPK，进一步抑制mTOR激酶的磷酸化，最终引发自噬[22,23]。实验研究结果显示，发现加入BMSCs可显著升高p-AMPK的水平，同时降低SAH后大鼠海马组织p-mTOR的表达水平，说明BMSCs移植后激活了AMPK/mTOR信号通路。同时，用AMPK抑制剂（Compound C）进行干预，Compound C组的p-AMPK活性在几乎所有时期都显著低于BMSCs组，而mTOR蛋白活性则高于BMSCs组，并且增加了p-mTOR表达。因此猜测通过BMSCs移植后的大鼠SAH，可能是通过调控AMPK/mTOR通路来加强影响大鼠海马回神经元自噬，从而减轻其向细胞凋亡的转归。

综上所述，BMSCs可能是通过促进AMPK/mTOR通路活化打开细胞自噬，来实现抑制神经元凋亡的效果。SAH大鼠受损海马组织中的神经细胞存在自噬及AMPK/mTOR通路的激活；移植BMSCs治疗可以进一步激活AMPK/mTOR通路，并增强受损组织内的细胞自噬，神经元凋亡受到抑制，进而使SAH大鼠神经功能损伤得到改善，这为BMSCs移植治疗SAH后神经损伤提供了新的参考依据。然而，本研究尚未阐明BMSCs在调节AMPK/mTOR途径中的具体作用，需在后期进行深入研究与叙述。

作者贡献度说明：

崔彩玲：实验设计，实验实施，分析数据，撰写论文；许心语、张豫：协助实验设计，分析数据，撰写论文；崔博文、胡艾蕙：实验实施，搜集数据；刘俊杰、李建民：设计实验，指导写作。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 余志强，赵金兵，周新建，等. 蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的研究进展[J]. 临床神经外科杂志，2022，19(1)：117-120.

2 Sehba FA，Hou J，Pluta RM，et al. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol，2012，97(1)：14-37.

3 Neulen A，Meyer S，Kramer A，et al. Large vessel vasospasm is not associated with cerebral cortical hypoperfusion in a murine model of subarachnoid hemorrhage [J]. Transl Stroke Res，2018，10(3)：319-326.

4 Fujii M，Yan J，Rolland WB，et al. Early brain injury，an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research [J]. Transl Stroke Res，2013，4(4)：432-446.

5 Saxton RA，Sabatini DM. mTOR signaling in growth，metabolism，and disease[J]. Cell，2017，168(6)：960-976.

6 Garcia D，Shaw RJ. AMPK：Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. Mol Cell，2017，66(6)：789-800.

7 李朝晖，王冠，谭诚. 自噬在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用研究进展[J]. 中华实验外科杂志，2020，37(8)：1581-1584.

8 Lee ST，Chu K，Jung KH，et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in hemorrhagic stroke[J]. Brain，2008，131(Pt 3)：616-629.

9 Nagai A，Kim WK，Lee HJ，et al. Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow[J]. PLoS One，2007，2(12)：e1272.

10 Lapergue B，Mohammad A，Shuaib A. Endothelial progenitor cells and cerebrovascular diseases[J]. Prog Neurobiol，2007，83(6)：349-362.

11 崔昌萌. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脑出血及调控自噬流和轴突再生的机制研究[D]：河北医科大学，2017.

12 孙新刚，侯亚芝，马乾，等. 血管内穿刺法建立大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤模型[J]. 临床医药实践，2017，26(3)：211-213.

13 刘乙璇，龚泽华，冯思国，等. 头孢曲松对大鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障及神经细胞凋亡的影响[J]. 新疆医科大学学报，2021，44(7)：777-781.

14 Pan P, Zhang X, Li Q, et al. Cyclosporine a alleviated matrix metalloproteinase 9 associated blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. Neurosci Lett, 2017,649(10):7-13.
15 陈禹廷,刘俊杰,丁家杉,等.抑制JNK通路对蛛网膜下腔出血大鼠海马区神经细胞自噬与学习记忆功能的影响[J].新疆医科大学学报,2017,40(2):196-200,205.
16 李小亮,李林,孙林林,等.纳洛酮腹腔注射对蛛网膜下腔出血大鼠学习记忆能力及海马CA1区神经细胞自噬的改善作用[J].山东医药,2020,60(27):38-42.
17 王懿峥,陈扬,俞立.自噬的前世今生[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(3):229-239.
18 罗焱,张平.姜黄素通过激活AMPK信号通路介导的自噬抑制大鼠蛛网膜下腔出血后神经元凋亡[J].中国免疫学杂志,2021,37(7):807-811,818.
19 李朝晖,索胧胧,蔡志平,等.BrdU标记的BMSCs侧脑室植入后对SAH后CVS大鼠影响的研究[J].包头医学院学报,2017,33(7):87-89,122.
20 Rahman KM, Li Y, Sarkar FH. Inactivation of akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Nutr Cancer, 2004,48(1):84-94.
21 Poels J, Spasić MR, Callaerts P, et al. Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy[J]. Bioessays, 2009,31(9):944-952.
22 Hwang HY, Shim JS, Kim D, et al. Antidepressant drug sertraline modulates AMPK-MTOR signaling-mediated autophagy *via* targeting mitochondrial VDAC1 protein[J]. Autophagy, 2021,17(10):2783-2799.
23 Sharma A, Anand SK, Singh N, et al. Berbamine induced AMPK activation regulates mTOR/SREBP-1c axis and Nrf2/ARE pathway to allay lipid accumulation and oxidative stress in steatotic HepG2 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2020,882(5):173244.

[**本文编辑**] 谭贝加 宋睿璞 朱 昊

(上接第1606页)

9 武雪玲,李筱筱,贾世亮,等.黑果枸杞花青素对Aβ-(42)致痴呆模型大鼠记忆力及抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2017,33(3):29-34.
10 蒙婉莹,刘超宇,夏小燕,等.二苯乙烯苷经GSK-3β途径对干预tau蛋白磷酸化机制研究[J].海南医学院学报,2022,28(14):1059-1067.
11 Peng SY, Wu X, Lu T, et al. Research progress of hydrogen sulfide in Alzheimer's disease from laboratory to hospital: A narrative review[J]. Med Gas Res, 2020,10(3):125-129.
12 Xiong WD, Xu KY, Lu L, et al. Research progress on lncRNAs in alzheimer's disease[J]. Yi Chuan, 2022,44(3):189-197.
13 Zhang H, Zheng Y. Beta amyloid hypothesis in alzheimer's disease: Pathogenesis, prevention, and management[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2019,41(5):702-708.
14 Zhang J, Min R, Le K, et al. The role of MAP2 kinases and p38 kinase in acute murine liver injury models[J]. Cell Death Dis, 2017,8(6):e2903.
15 Yamasaki T, Deki-Arima N, Kaneko A, et al. Age-dependent motor dysfunction due to neuron-specific disruption of stress-activated protein kinase MKK7[J]. Sci Rep, 2017,7(1):7348.
16 Park JG, Aziz N, Cho JY. MKK7, the essential regulator of JNK signaling involved in cancer cell survival: A newly emerging anticancer therapeutic target[J]. Ther Adv Med Oncol, 2019,11(24):432476682.
17 Li S, Cong C, Liu Y, et al. Tiao Geng decoction inhibits tributyltin chloride-induced GT1-7 neuronal apoptosis through ASK1/MKK7/JNK signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021,269(6):113669.
18 Zhao Y, Kuca K, Wu W, et al. Hypothesis: JNK signaling is a therapeutic target of neurodegenerative diseases[J]. Alzheimers Dement, 2022,18(1):152-158.
19 Zhou Z, Zhang D, Du F, et al. Design and synthesis of a mitochondrial-targeted JNK inhibitor and its protective effect on parkinson's disease phenotypes[J]. Chembiochem, 2023,24(13):e202200748.
20 De Los RCT, Losada-Perez M, Casas-Tinto S. JNK pathway in CNS pathologies[J]. Int J Mol Sci, 2021,22(8):3883.

[**本文编辑**] 谭贝加 宋睿璞 朱 昊