

文章编号:1003-2754(2019)10-0890-06

美金刚调控 Limk 抑制 MCAO 大鼠 Cofilin Rod 生成从而减轻脑缺血损伤

陈斌, 高兆鹤, 游小芳, 林晗莹, 王晶, 林万庆

摘要: **目的** 探讨美金刚(Memantine)对缺血性脑卒中的神经保护作用与潜在分子机制。**方法** 将36只雄性SD大鼠随机分为假手术组(Sham)、生理盐水组(Saline)及美金刚(MEM)组,采用Zea Longa法制备大鼠局灶性脑缺血模型,通过神经功能缺损得分和脑梗死体积明确Memantine对脑缺血大鼠的神经保护作用,使用Cofilin免疫荧光染色法观察Memantine对皮质梗死区Rod生成的影响,应用Western blot检测缺血侧皮质中p-Limk/Limk、p-p38/p38蛋白表达情况。**结果** Memantine干预可明显改善脑缺血大鼠的神经缺损症状和脑梗死体积;抑制皮质梗死区Rod的形成;促进皮质梗死区p-Limk的表达水平;降低p-p38的活性。**结论** Memantine可通过调控脑缺血皮质区p-Limk的表达,抑制Cofilin Rod的形成,降低p-p38的表达,从而改善脑缺血大鼠的神经功能缺损症状和脑梗死体积。

关键词: 美金刚; 脑缺血; 丝切蛋白

中图分类号: R743.3 **文献标识码:** A

Memantine reduces cofilin rod formation and ischemic brain injury via regulation of Limk in focal cerebral ischemic rats CHEN Bin, GAO Zhaohe, YOU Xiaofang, et al. (Department of Rehabilitation, The Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China)

Abstract: Objective To investigate the neuroprotective effects and possible molecular mechanism of memantine on treatment of ischemic stroke. **Methods** Thirty-six male adult SD rats were randomly divided into sham operation control group (Sham), Saline group (Saline) and the Memantine group (MEM). Zea Longa method was employed to establish the rat model of focal cerebral ischemia. The neuroprotective effects of memantine on ischemic rats were evaluated by neurological deficit scores and cerebral infarct volumes. The effects of memantine on rod formation in the cortical infarct area was observed by cofilin immunofluorescence staining. The expression levels of p-Limk/Limk and p-p38/p38 in ischemic cortex were detected by Western blot.

Results Memantine could significantly reduce the neurological deficit, cerebral infarct volume and rod formation after ischemic stroke. Furthermore, Western blot analysis showed that the down-regulation of p-limk and up-regulation of p-p38 induced by ischemia were remarkably suppressed in memantine treated rats. **Conclusion** These results suggested that treatment with memantine significantly inhibited cofilin rod formation by regulating the activity of p-Limk in ischemic cortex, and by reducing the expression of p-p38 to ameliorate the neurological deficit and cerebral infarct volume in MCAO rats.

Key words: Memantine; Ischemic stroke; Cofilin

目前,中国每年新发脑卒中患者已有250万人^[1]。缺血性卒中(ischemic stroke)约占全部脑卒中的80%^[2,3]。2014年我国的脑梗死住院费用为470.35亿元^[4]。脑卒中不仅严重危害人类的生命健康,而且给社会造成巨大的经济负担。因此,缺血性脑卒中的有效治疗仍然是目前医疗领域研究急需探索的重点项目之一。美金刚(Memantine)是一种具有电压依赖性、中等程度亲和力的非竞争性NMDA受体拮抗剂^[5]。较其他的非竞争性NMDA受体拮抗剂,如地卓亚平马来酸盐(dizocilpine maleate)具有更快的脱靶率,且对NMDA受体亲和力低,具有更快的阻滞/解离药物动力学特点,以及类似于Mg²⁺对NMDAR生理学阻滞作用的电压依赖性的特点,这些阻滞特点使Memantine主要对病理性升高的NMDAR发生阻滞,而不影响NMDAR的正常生理功能^[6]。近来的研究表明,Memantine不仅在AD、血管性痴呆、帕金森病和神经性疼痛等神经系

统性疾病的基础和临床研究中显示出明显的神经保护作用,而且在脑卒中的基础研究中也显示出良好的效果^[7,8]。同时,Memantine治疗缺血性卒中的临床试验目前也正在进行中(clinical trials. gov identifier: NCT02144584)。但Memantine治疗脑缺血损伤的主要分子机制尚不明确,有待进一步阐明。故本研究选用大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,探讨Memantine对

收稿日期:2019-06-08;修订日期:2019-07-29

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No. 81804175);福建省自然科学基金项目(No. 2019J01497);福建省教育厅中青年骨干教师教育科研项目(No. JT180216)

作者单位:(福建中医药大学附属人民医院康复科,福建福州350004)

通讯作者:林万庆, E-mail: 13960829639@139.com

MCAO 大鼠可能的神经保护机制,为 Memantine 的临床治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 选取体重为(260 ± 15) g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只(上海斯莱克实验动物责任有限公司),饲养于福建中医药大学动物实验中心,恒温恒湿控制,12 h ~ 12 h 昼夜循环光照,并且给予自由饮食与饮水。使用随机数字表将其分为:假手术组(Sham)、生理盐水组(Saline)及美金刚组(MEM),每组 12 只。所有试验均按照国际动物保护和指南的相关规定严格实施。

1.2 主要试剂和仪器 BCA 试剂盒(Thermo Fisher,23227),ECL 试剂盒(Thermo Fisher,32109)。一抗:MAP2(Sigma,M4403),Cofilin(Cytoskeleton,ACFL02),GAPDH(Gene Tex,GTX100118),Limk(CST,3842),p-Limk(CST,3841S),p38(Santa cruz,sc-7973),p-p38(Santa cruz,sc-535)。二抗:Alexa Fluor 555 anti-mouse IgG(A31570),Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG(A21206)均购于 Invitrogen 公司。仪器:SMZ445 体视显微镜(Nikon,Japan),LDF100C 激光多普勒(Biopac Systems,USA),CM1950 冰冻切片(Leica,Germany),BX58 正置荧光显微镜(Olympus,Japan),A1R 激光共聚焦系统(Nikon,Japan)。

1.3 动物模型制备 大鼠 MCAO 模型参考 Zea Longa 法制备^[9],具体方法如下:SD 大鼠术前均禁食但不禁水 8 h,在 22 °C 室温下,2% 异氟烷对大鼠进行麻醉,置于俯卧位行固定、消毒后,分离软组织暴露颅骨。应用激光多普勒(LDF100C,Biopac Systems,Goleta,CA)检测脑血流,待血流值稳定后,记录 5 min,作为血流基准值。然后,在显微镜下分离左侧颈总动脉(common carotid artery,CCA)、颈内动脉(internal carotid artery,ICA)及颈外动脉(external carotid artery,ECA)(见图 1A)。依次结扎 CCA 近心端、以及 ECA 与 ICA 远心端,并在 ECA 上近分叉处约 2 mm 处剪一“V”型小口,将已消毒好的尼龙线栓(硅胶包被)经 ECA 插入 ICA,直至有少许阻力感时,从 ECA 与 ICA 分叉处起计算插入 17 ~ 17.5 mm,若脑血流降低 80% 以上,则表明尼龙线栓成功地阻断了大脑中动脉的血流(见图 1B、C)。随后伤口常规缝合与消毒,待缺血 1 h 后拔出尼龙线栓,使血流再通。试验过程和动物苏醒期间使用恒温加热垫进行保温,维持肛温在 37 °C 左右。假手术组大鼠只分离动脉,不结扎和插栓。

1.4 药物干预措施 (1)美金刚(Memantine)组:分别于术后 5 min 给予腹腔注射 20 mg/kg 的 Memantine 药物(4 ml/kg),12 h 后再给予 1 mg/kg 的 Memantine 以维持脑内 1 ~ 10 μmol 的浓度,24 h 后处死动物取材;(2)生理盐水(Saline)组:药物对照组则注射同等剂量的生理盐水,其余与 Meman-

tine 组一样;(3)假手术(Sham)组:注射同等剂量的生理盐水,不予其他任何干预措施。

1.5 检测方法及指标 (1)神经行为学评分:采用 Zea Longa 神经功能评分方法^[9],具体评分标准为:0 分,无神经功能缺损体征;1 分,提尾时偏瘫侧前肢不能完全伸展;2 分,向偏瘫侧转圈;3 分,行走时向偏瘫侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失;5 分,死亡。若伴下列情形之一者将不纳入最终的统计分析:①未到取材时间点便死亡者;②取脑时若观察到蛛网膜下腔出血者;③脑组织形态学检测未发现缺血性病理改变者。(2)免疫荧光染色法(immunofluorescence):干预结束后,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠,经左心室依次灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛(PFA)溶液各 200 ml,使动物呈现出四肢僵硬状态,随后取脑浸泡于 4% PFA 中进行后固定。12 h 后使用不同梯度的蔗糖进行脱水,包埋,切片。染片前,将冰冻切片于室温放置 30 ~ 45 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;然后,使用 98% 甲醇(预冷)破膜 3 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;接着,10% 驴血清行封闭 60 min;一抗 4 °C 冰箱过夜,复温后 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;二抗(10% 驴血清稀释)Alexa Fluor 555/488 室温,湿盒中避光室温孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;ProLong gold antifade reagent 抗荧光淬灭剂封片凝固后,拍摄分析。(3)蛋白免疫印迹法(Western blot):干预结束后,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠,将脑组织按照一定部位分离,于液氮内低温保存,以备后续提取蛋白。将脑组织从 -80 °C 冰箱取出后,按照 350 μl / 10 mg 的比例添加裂解液提取蛋白质。BCA 法测定所提出的蛋白质浓度,95 °C 加热变性,每次取 30 μg 组织样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和转膜。室温条件下,5% 的脱脂牛奶封闭 60 min,一抗 4 °C 过夜孵育,TBS 洗涤 5 次,每次 10 min;辣根过氧化物标记的二抗振荡孵育 2 h,TBS 洗涤 5 次,每次 10 min;ECL 化学发光法显色,并采用 Bio-Image Analysis System (Bio-Rad,Hercules,CA,USA)显影成像与分析。

1.6 统计学分析 本文数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理分析,各组别之间的显著性差异采用双侧 *t* 检验(Student's *t*-test)或者单因素方差分析(one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test)进行检测,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性的意义。

2 结果

2.1 美金刚改善脑缺血大鼠的神经缺损症状 为了确定 Memantine 对缺血性卒中的神经保护作用,在缺血性卒中后 24 h 测量 MCAO 大鼠神经功能缺损得分和脑梗死体积。检测结果显示,Saline 组和 Memantine 组的神经功能缺损得分分别为(2.2 ± 0.2) ($n = 12$)和(1.7 ± 0.1) ($n = 12$),表明 Meman-

tine 显著改善 MCAO 模型的神经系统行为学症状 ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.2 美金刚减小脑缺血大鼠的脑梗死体积
微管相关蛋白 (Microtubule associated protein, MAP2) 主要在神经元细胞树突和胞体中表达, 可以用来评价脑缺血中神经元损伤的程度, 在受缺血影响的脑区观察到 MAP2 的表达量明显减少^[10]。用 Memantine (20 mg/kg, ip) 处理的 MCAO 大鼠的脑梗死体积从 Saline 组 (生理盐水处理) 的 $(49.9 \pm 4.3)\%$ ($n = 5$) 显著降低至 $(35.5 \pm 2.5)\%$ ($n = 6$) ($P < 0.05$)。梗死体积的减少与 MCAO 后 24 h 的神经学改善密切相关。与以前的报道一致^[11~14], 这些数据表明 Memantine 对体内缺血性卒中的治疗有一定的功效 (见图 3)。

2.3 美金刚抑制脑缺血大鼠皮质梗死区 Rod 的形成
丝切蛋白 (Cofilin) 是中枢神经系统肌动蛋白解聚因子家族重要成员之一, 负责调控肌动蛋白丝的动力学和重组^[15]。在之前的研究中, 我们已经观察到在 MCAO 大鼠的梗死皮质中有 Cofilin 与 Actin 共同形成的 Rod 棒状结构, 其逐渐诱导微管相关蛋白-2 (MAP2) 降解和细胞凋亡。我们使用 Cofilin 的特异性抗体对脑组织切片进行免疫荧光染色, 其实验结果表明, 电针治疗可以部分抑制皮质缺血区中 Rod 结构的形成 (Area 2: Saline: $122.5 \pm 44.5/\text{mm}^2$, MEM: $11.7 \pm 4.6/\text{mm}^2$, $P < 0.01$; Area 3: Saline: $275.6 \pm 86.7/\text{mm}^2$, MEM: $47.2 \pm 12.7/\text{mm}^2$, $P < 0.01$; Area 4: Saline: $325 \pm 68.5/\text{mm}^2$, MEM: $108.1 \pm 8.7/\text{mm}^2$, $P < 0.05$; Area 5: Saline: $432.1 \pm 49.3/\text{mm}^2$, MEM: $205.1 \pm 51/\text{mm}^2$, $P < 0.05$; Area 6: Saline: $445.1 \pm 43.7/\text{mm}^2$, MEM: $258.5 \pm 51/\text{mm}^2$, $P < 0.05$), 但对核心区 (Area 7 和 8) 并没有影响 (见图 4)。

2.4 美金刚促进脑缺血大鼠皮质梗死区 p-Limk 的表达
Cofilin Rod 的形成主要是由于去磷酸化的 Cofilin 含量增加引起的, Cofilin 的去磷酸化是其活化形式, 而磷酸化的 Cofilin 则是其失活形式。Cofilin 主要受到 Limk 介导的磷酸化调节而失活^[16,17]。为了进一步明确 Cofilin 参与 Memantine 诱导的神经保护作用, 本研究接下来检测 p-Limk/Limk 在脑缺血皮质中的表达情况。Western blot 数据显示: 与假手术组相比, 在 MCAO 大鼠缺血皮质中 Limk 的表达无显著性差异, p-Limk 的表达则下调 [Sham: $(100 \pm 13.5)\%$, $n = 6$; Saline: $(24.6 \pm 3.2)\%$, $n = 6$; $P < 0.01$]。然而, Memantine 干预显著促进 MCAO 大鼠缺血皮质中 p-Limk 的表达 [MEM: $(92 \pm 22.3)\%$, $n = 6$; Saline: $(24.6 \pm 3.2)\%$, $n = 6$; $P < 0.05$], 从而抑制 Cofilin Rod 的生成。由此证明 Memantine 在调节缺血性卒中后的 Cofilin 去磷酸化方面起重要作用 (见图 5)。

2.5 美金刚抑制脑缺血大鼠皮质梗死区 p-p38 的表达
P38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinase, p38 MAPK) 作为众多信号传导通路的中转站, 其激活在细胞凋亡等过程中扮演着重要的角色。本研究通过 Western blot 检测 p-p38/p38 在脑缺血皮质中的表达情况。统计分析结果显示: 与假手术组相比, 在 MCAO 大鼠缺血皮质中 p38 的表达无显著性差异, p-p38 的表达则显著升高 [Sham: $(100 \pm 9.52)\%$, $n = 6$; Saline: $(297.17 \pm 8.25)\%$, $n = 6$; $P < 0.001$]。然而, Memantine 干预显著降低 MCAO 大鼠缺血皮质中 p-p38 的表达 [MEM: $(163.39 \pm 11.91)\%$, $n = 6$; Saline: $(297.17 \pm 8.25)\%$, $n = 6$; $P < 0.001$]。由此提示 Memantine 干预可通过调控缺血性卒中后 p38 的磷酸化, 从而减轻 MCAO 大鼠脑损伤 (见图 6)。

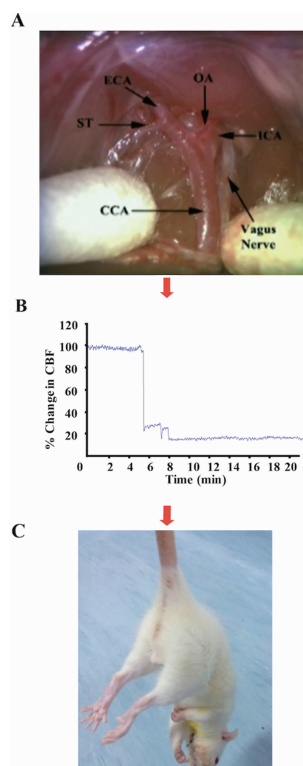
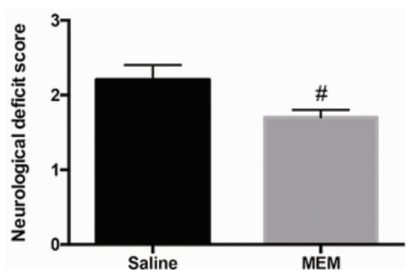
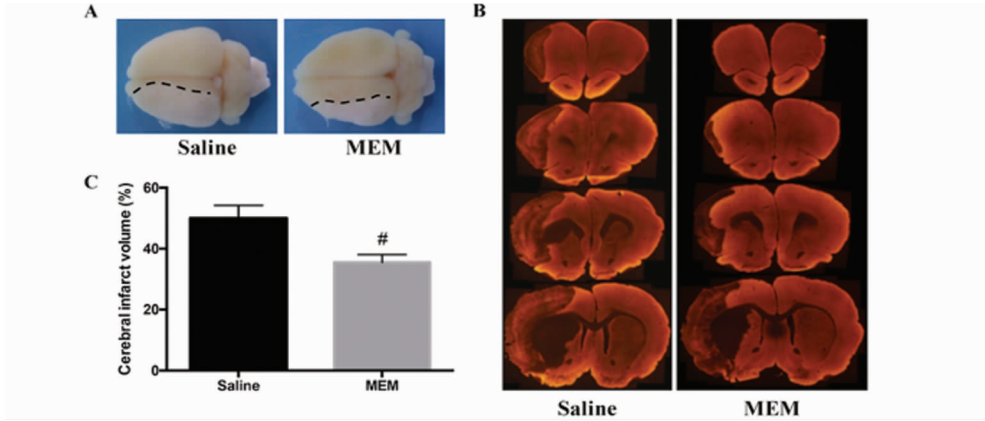


图1 大鼠 MCAO 模型示意图



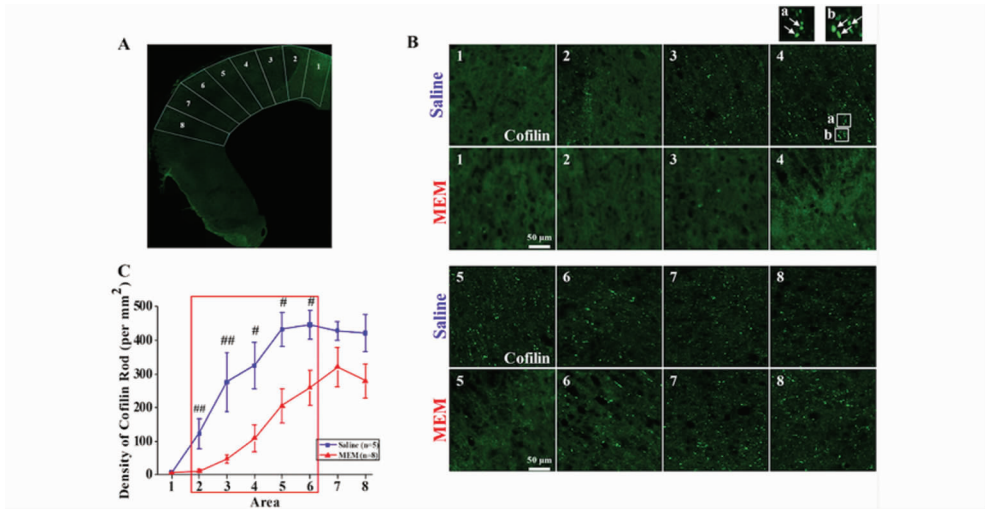
注: Saline: 生理盐水组; MEM: 美金刚组。生理盐水组与美金刚组对比 # $P < 0.05$

图2 美金刚干预 MCAO 大鼠 24 h 后神经功能缺损评分



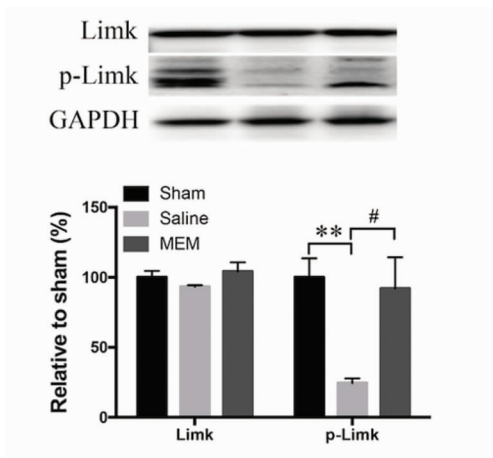
注:A.为MCAO大鼠干预24h后的脑组织,其中黑色虚线表示的是梗死边缘;B.为不同层面脑组织的微管相关蛋白(MAP2)免疫荧光染色;C.为脑梗死体积的百分率统计。生理盐水组与美金刚组对比 $#P < 0.05$

图3 美金刚干预MCAO大鼠24h后脑梗死体积变化情况



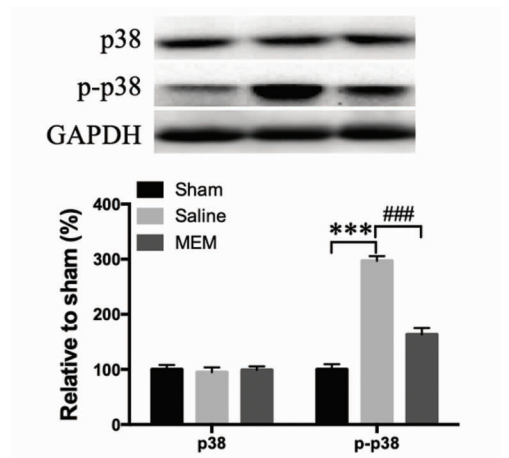
注:A.皮质梗死区Rod分析过程中不同区域(8个)划分示意图;B.不同区域丝切蛋白(Cofilin)免疫荧光染色,其中Rod结构如a和b中白色箭头指示;C.不同区域Rod数量的统计。生理盐水组与美金刚组对比 $#P < 0.05$, $##P < 0.01$

图4 美金刚干预MCAO大鼠24h后皮质梗死区Rod的形成情况



注:Western blot法检测相关蛋白的表达。生理盐水组与假手术组对比 $**P < 0.01$;美金刚组与生理盐水组对比 $#P < 0.05$

图5 美金刚干预MCAO大鼠24h后脑梗死皮质中p-Limk/Limk的蛋白表达情况



注:Western blot法检测相关蛋白的表达。生理盐水组与假手术组对比 $**P < 0.001$;美金刚组与生理盐水组对比 $###P < 0.001$

图6 美金刚干预MCAO大鼠24h后脑梗死皮质中p-p38/p38的蛋白表达情况

3 讨论

NMDA 受体主要由 NR1 (必要组成), NR2 和/或 NR3 亚基组成。其四聚体形式可分为胞外 N 末端, 胞内的 C 末端, 离子通道形成的跨膜段和胞外激动剂结合段 4 个部分。NMDA 受体的内源性激动剂有 Glu 和天冬氨酸, 结合在 NR2 的胞外激动剂结合段, 此外, 还依赖于共同激动剂甘氨酸 (Glycine) 或者丝氨酸 (D-serine), 结合在 NR1 亚基。NMDA 受体的生理功能与其在细胞膜上的分布和定位有着密切的关系。NR2A 亚基主要分布在突触内的 NMDA 受体中, 而 NR2B 主要存在于突触外受体中。有证据表明, 突触外 NR2B 的过度激活可能有助于神经毒性的, 而突触内 NR2A 可能是具有神经保护性的作用。由 NMDA 受体过度活化引起的神经毒性是缺血性卒中后神经元细胞凋亡的主要原因之一。因此, NMDA 受体已被建议作为潜在的治疗靶点^[6,18,19]。虽然已经发现多种 NMDA 受体拮抗剂在脑卒中动物模型中具有神经保护作用^[20-22], 但之前的临床试验所获得的成功却是有限的。主要原因有: 脑卒中狭窄的治疗时间窗口, 临床上不可耐受的副作用, 不严谨的临床试验设计, 甚至是缺乏疗效^[23-25]。

NMDA 受体是配体和电压门控共同调节的双门控离子通道, 对中枢神经系统中生理性和病理性活动都是必需的。之前的 NMDA 受体阻滞剂可能在阻断 Glu 兴奋性毒性作用的同时, 也阻断了其正常生理功能的发挥^[20,26,27], 以致于临床应用的失败^[28]。为了在临床上能够被接受, 抗兴奋性毒性药物必须阻断 NMDA 受体的过度激活, 同时保持正常的突触活性以避免副作用。最近的基础和临床研究数据表明, Memantine 是用于治疗脑卒中, 减轻脑组织损伤的一种有效可行的药物^[29-33]。Memantine 是具有低亲和力/快速解离速率的非竞争性 NMDA 受体拮抗剂, 具有优先阻断高于正常生理水平的病理水平的 Glu 的潜力。此外, Memantine 仅在离子通道开放时选择性地结合到与 NMDA 受体 Mg^{2+} 阻滞位点相重叠的位点, 并且一旦离子通道关闭, 它就迅速从受体中解离^[34-36]。由于这些性质, Memantine 可以阻断过度升高的 NMDA 受体活性, 而不积累在离子通道中以影响 NMDA 受体正常的生理功能, 这可以解释在使用 Memantine 治疗的患者中副作用是有限的^[20,33,37]。在本研究中, 我们采用 Zea Longa 线栓法建立 MCAO 局灶性脑缺血模型, 发现 MCAO 大鼠缺血后立即给予 Memantine 可以明显减轻神经功能缺陷症状和脑梗死体积。此结果与其他实验室的工作是一致的, 包括缺血前给药及缺血后 2 h 内施以 Memantine 药物干预^[11-13,31]。

Cofilin 是肌动蛋白结合蛋白, 受 LIMK 介导的磷酸化而失活, Cofilin 的去磷酸化是其活化的形式^[38,39]。越来越多的证据表明, 不同神经毒性刺激,

可通过增加 Cofilin 的去磷酸化 (激活), 抑制 Cofilin 的磷酸化 (失活), 诱导活化的 Cofilin 和 Actin 形成 Rod 结构^[40-44]。有报道表明^[10,42], MAP2 结构的完整性会被 Cofilin Rod 的产生所破坏。为进一步揭示 Memantine 的治疗作用机制, 本研究通过 Cofilin 荧光染色结果显示 (见图 4), Memantine 可明显抑制 MCAO 大鼠脑缺血皮质区 Cofilin Rod 的生成, 尤其是在缺血半暗带。同时, Western blot 数据显示 (见图 5), Memantine 可通过促进 p-Limk 的表达, 抑制 Cofilin 的去磷酸化, 从而减少 Rod 结构的生成。脑缺血损伤会导致 p38 MAPK 的激活, 触发了下游凋亡途径, 引起 Bcl-xL、Bax 和 AIF 等凋亡因子的过度表达, 从而引起缺血神经元细胞的凋亡。而 Jie 等研究指出^[45], 抑制 p38 MAPK 的作用能够有效地保护神经细胞免受缺血再灌注损伤^[46]。另外, 研究报道了谷氨酸介导的神经脑组织的 p38 MAPK 激活, p38 MAPK 信号级联的选择性抑制为脑缺血再灌注损伤提供了一定的神经保护作用^[47]。本研究中, Memantine 是一种非竞争性 NMDA 受体拮抗剂, 抑制谷氨酸能系统过度激活, 从而降低 p38 MAPK 信号通路的活化。

综上所述, NMDA 拮抗剂 Memantine 能够通过调控缺血皮质区 p-Limk 的表达, 抑制 Cofilin Rod 的形成, 降低 p-p38 的表达, 从而改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损症状和脑梗死体积。这些结果为 Memantine 具有减少 Rod 生成和保护缺血后脑损伤的作用提供了一定的分子基础, 表明 Memantine 可能是治疗缺血性卒中的潜在药物^[48], 但我们仍需要更多的研究来证明这一观点。

【参考文献】

- [1] Jia Q, Liu LP, Wang YJ. Stroke in China [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(2): 259-264.
- [2] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update: A report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2017, 135(10): e146-e603.
- [3] Davis SM, Donnan GA. Clinical practice. Secondary prevention after ischemic stroke or transient ischemic attack [J]. N Engl J Med, 2012, 366(20): 1914-1922.
- [4] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2015》概要 [J]. 中国循环杂志, 2016, 31(6): 521-528.
- [5] 雷 曦, 王健辉, 程肖蕊, 等. 防治阿尔茨海默病多靶点药物研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(2): 205-215.
- [6] Wroge CM, Hogins J, Eisenman L, et al. Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death [J]. J Neurosci, 2012, 32(19): 6732-6742.
- [7] Wictorin K, Widner H. Memantine and reduced time with dyskinesia in Parkinson's disease [J]. Acta Neurol Scand, 2016, 133(5): 355-360.
- [8] Stubendorff K, Larsson V, Ballard C, et al. Treatment effect of memantine on survival in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: a prospective study [J]. BMJ Open, 2014, 4(7): e005158.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] Mohan R, John A. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules [J]. IUBMB Life, 2015, 67(6): 395-403.

- [11] Kilic U, Yilmaz B, Reiter RJ, et al. Effects of memantine and melatonin on signal transduction pathways vascular leakage and brain injury after focal cerebral ischemia in mice [J]. *Neuroscience*, 2013, 237 (6):268-276.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 王 枫, 雷 翀, 邓 姣, 等. Memantine 对大鼠局灶性脑缺血损伤的长期神经保护效应 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30 (22):2497-2499.
- [15] Carlier MF, Laurent V, Santolini J, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover; implication in actin-based motility [J]. *J Cell Biol*, 1997, 136 (6):1307-1322.
- [16] Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (2):457-469.
- [17] Nadella KS, Saji M, Jacob NK, et al. Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1 [J]. *EMBO Rep*, 2009, 10 (6):599-605.
- [18] Palmer GC. Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies [J]. *Curr Drug Targets*, 2001, 2 (3):241-271.
- [19] Hoque A, Hossain MI, Ameen SS, et al. A beacon of hope in stroke therapy-Blockade of pathologically activated cellular events in excitotoxic neuronal death as potential neuroprotective strategies [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 160:159-179.
- [20] Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults [J]. *Neuro Rx*, 2004, 1 (1):101-110.
- [21] Domin H, Przykaza L, Jantas D, et al. Neuroprotective potential of the group III mGlu receptor agonist ACPT-I in animal models of ischemic stroke: In vitro and in vivo studies [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 102:276-294.
- [22] Gill R, Foster AC, Woodruff GN. Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil [J]. *J Neurosci*, 1987, 7 (10):3343-3349.
- [23] Grupke S, Hall J, Dobbs M, et al. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: from review to preview [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2015, 129:1-9.
- [24] Neuhaus AA, Rabie T, Sutherland BA, et al. Importance of preclinical research in the development of neuroprotective strategies for ischemic stroke [J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71 (5):634-639.
- [25] Xu SY, Pan SY. The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2013, 19:37-45.
- [26] Lees KR, Asplund K, Carolei A, et al. Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9219):1949-1954.
- [27] Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC, et al. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2001, 285 (13):1719-1728.
- [28] Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury [J]. *Lancet Neurol*, 2002, 1 (6):383-386.
- [29] Kafi H, Salamzadeh J, Beladimoghadam N, et al. Study of the neuroprotective effects of memantine in patients with mild to moderate ischemic stroke [J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13 (2):591-598.
- [30] Wang YC, Sanchez-Mendoza EH, Doepfner 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*, 2016, 37 (3):980-993.
- [31] Trotman M, Vermehren P, Gibson CL, et al. The dichotomy of memantine treatment for ischemic stroke: dose-dependent protective and detrimental effects [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35 (2):230-239.
- [32] Lopez-Valdes HE, Clarkson AN, Ao Y, et al. Memantine enhances recovery from stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45 (7):2093-2100.
- [33] Xia P, Chen HS, Zhang D, et al. Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses [J]. *J Neurosci*, 2010, 30 (33):11246-11250.
- [34] Frankiewicz T, Parsons CG. Memantine restores long term potentiation impaired by tonic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation following reduction of Mg²⁺ in hippocampal slices [J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38 (9):1253-1259.
- [35] Lipton SA, Chen HS. Paradigm shift in NMDA receptor drug development [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2005, 9 (3):427-429.
- [36] Kotermanski SE, Wood JT, Johnson JW. Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping [J]. *J Physiol*, 2009, 587 (19):4589-4604.
- [37] Zhao X, Marszalec W, Toth PT, et al. In vitro galantamine-memantine co-application: mechanism of beneficial action [J]. *Neuropharmacology*, 2006, 51 (7-8):1181-1191.
- [38] Kanellos G, Frame MC. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129 (17):3211-3218.
- [39] Bamburg JR, Bernstein BW. Actin dynamics and cofilin-actin rods in Alzheimer disease [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2016, 73 (9):477-497.
- [40] Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway [J]. *J Neurosci*, 2007, 27 (11):2866-2875.
- [41] Zhao L, Ma QL, Calon F, et al. Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9 (2):234-242.
- [42] Cichon J, Sun C, Chen B, et al. Cofilin aggregation blocks intracellular trafficking and induces synaptic loss in hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (6):3919-3929.
- [43] Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers [J]. *Nature*, 2009, 457 (7233):1128-1132.
- [44] Minamide LS, Striegl AM, Boyle JA, et al. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 (9):628-636.
- [45] Baudry M, Bi X. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of synaptic plasticity and neurodegeneration [J]. *Trends Neurosci*, 2016, 39 (4):235-245.
- [46] Jie P, Hong Z, Tian Y, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 induces apoptosis in hippocampus through downregulating PI3K/Akt and upregulating p38 MAPK signaling pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6:e1775.
- [47] Jie P, Lu Z, Hong Z, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 is involved in neuronal injury in middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (1):8-17.
- [48] De Felice FG, Munoz DP. Opportunities and challenges in developing relevant animal models for Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2016, 26:112-114.