

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.20.004

星形胶质细胞糖原动员改善大脑缺血再灌注损伤的研究*

王 漠¹ 雷 莉² 毋 琳³ 张盛夏² 郭海云⁴ 才延辉^{2Δ}

(1 空军军医大学基础医学院学员一大队 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学第一附属医院心身科 陕西 西安 710032;
3 空军军医大学军事医学心理学系 陕西 西安 710032; 4 空军军医大学第一附属医院麻醉与围术期医学科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨星形胶质细胞糖原动员是否对大脑缺血再灌注损伤有神经保护作用。**方法:**研究构建了星形胶质细胞特异性糖原分解代谢关键酶糖原磷酸化酶(Glycogen phosphorylase, GP)过表达转基因小鼠(GFAP-GP),并通过免疫荧光染色对 GP 的含量进行验证。在小鼠大脑中动脉梗死/再通模型中,利用 GFAP-GP 小鼠促进再灌注后累积糖原的分解(糖原动员),通过三苯基氯化四氮唑(Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色分析再灌注后 GFAP-GP 小鼠的脑梗死面积,Corner test 和 Grid-walking test 检测再灌注后 GFAP-GP 小鼠的神经行为学功能。**结果:**GFAP-GP 小鼠中 GP 的含量发生了明显的增加,再灌注后 GFAP-GP 小鼠与野生型小鼠相比,脑糖原含量明显降低,梗死明显减少,肢体感觉与运动功能明显改善。**结论:**星形胶质细胞糖原动员可改善大脑缺血再灌注损伤。

关键词:星形胶质细胞;糖原动员;缺血再灌注损伤;神经保护

中图分类号:R-33;R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)20-3822-05

Experimental Study of Glycogen Mobilization Mediated Neuroprotection on Cerebral Ischemia/reperfusion Injury*

WANG Mo¹, LEI Li², WU Lin³, ZHANG Sheng-xia², GUO Hai-yun⁴, CAI Yan-hui^{2Δ}

(1 The First Brigade of Basic Medical College, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Psychiatry, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Military Medical Psychology, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

4 Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether astrocytic glycogen mobilization mediates neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury. **Methods:** This study constructed the astrocyte-specific glycogen phosphorylase (GP) transgenic mice (GFAP-GP), which was verified by immunofluorescence. Using GFAP-GP as a model of glycogen mobilization, the infarct volumes of GFAP-GP were analyzed by TTC staining and the neurobehavioral function was analyzed by Corner test and Grid-walking test after cerebral middle artery occlusion/reperfusion. **Results:** The GP expression was upregulated in GFAP-GP mice. The glycogen level was down-regulated, the infarct volume was decreased and the neurobehavior performance was improved in the GFAP-GP mice compared with the wild-type mice. **Conclusions:** Astrocytic glycogen mobilization has neuroprotective effects on ischemia/reperfusion injury.

Key words: Astrocyte; Glycogen mobilization; Ischemia/reperfusion; Neuroprotection

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R743.3 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)20-3822-05

前言

以血管再通为目的的溶栓或者血栓切除术是目前治疗缺血性脑中风的主要手段,而血管再通后,会引起缺血再灌注(Ischemia/reperfusion, I/R)损伤,加重原本缺血区域的损伤^[1-3]。目前,如何有效减少再灌注损伤,挽救大脑缺血半暗带区的神经细胞,是神经保护领域的重要难题。大脑占全身 2% 的重量,却消耗了全身 20% 的能量^[4]。脑糖原作为大脑重要的内源性能量物质可以在血管阻闭时快速分解,为大脑提供额外的能量

支持^[5-7]。大脑中糖原主要存在于星形胶质细胞中,神经元中几乎不含有糖原^[8,9]。既往研究发现 I/R 中星形胶质细胞糖原发生了大量累积^[10-12]。进一步深入机制研究发现,星形胶质细胞糖原分解代谢中的关键酶糖原磷酸化酶(Glycogen phosphorylase, GP)的功能异常是引起再灌注损伤中糖原累积的重要原因^[12]。然而,在 I/R 损伤中促进累积糖原分解(糖原动员)是否可以改善再灌注损伤,尚不得而知。因此,本研究构建了星形胶质细胞特异性 GP 过表达转基因小鼠(GFAP-GP),利用形态学和神经行为学等方法,研究星形胶质细胞糖原动员对再灌注损伤是否

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82001384);空军军医大学第一附属医院学科助推项目(XJZT18MJ19)

作者简介:王漠(2000-),女,临床本科生,主要研究方向:神经保护, E-mail: wangqing@126.com

Δ 通讯作者:才延辉(1990-),男,博士,主治医师,讲师,主要研究方向:神经保护, E-mail: MD_CAI@163.com, 电话: 18220865143

(收稿日期:2020-03-28 接受日期:2020-04-23)

具有神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,1 天的新生鼠和孕 15-16 天的孕鼠购买于空军军医大学实验动物中心。动物饲养在标准的鼠笼中,饲养温度为 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度为 40%-70%,日照时间(12 h light/dark cycle, light-dark: 08:00-20:00 h)。星形胶质细胞特异性 GP 过表达转基因小鼠(GFAP-GP)购买自广州赛业生物技术有限公司。所有的动物实验都经过空军军医大学伦理委员会的批准,并严格按照伦理委员会的要求执行。

动物分组:实验动物一共四批,第一批分组为野生型小鼠(WT)8 只,GFAP-GP 小鼠 8 只,用于验证 GFAP-GP 小鼠模型;第二批分组为 WT 小鼠 8 只,WT 小鼠 +I/R 造模 8 只,GFAP 小鼠 +I/R 造模 8 只,用于测定 I/R 后小鼠半暗带区糖原含量;第三批分组为 WT 小鼠 +I/R 造模 8 只,GFAP 小鼠 +I/R 造模 8 只,用于测定 I/R 后小鼠脑梗死面积;第四批分组为 WT 小鼠 +I/R 造模 8 只,GFAP 小鼠 +I/R 造模 8 只,用于测定 I/R 后小鼠行为学功能。本次实验共用 WT 小鼠 40 只,GFAP-GP 小鼠 32 只。

1.2 小鼠 I/R 模型

本研究利用小鼠大脑中动脉梗死/再通(Middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型来模拟缺血再灌注损伤。8 周龄 C57BL/6J 小鼠(术前 12 h 禁食)接受 1.4%的异氟烷持续麻醉,并腹部朝上固定于 37°C 恒温板上,维持小鼠体温恒定。在外科显微镜下,消毒并剪开颈部皮肤,分离皮下组织、筋膜,暴露颈总动脉,颈内动脉和颈外动脉,将颈外动脉近心端和远心端结扎。在颈外动脉靠近心端用显微剪剪一小口,线栓(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)通过该切口进入颈内动脉,继续延伸约 9 mm 进入大脑中动脉开口处,微感有阻力时停止。固定线栓及结扎颈外动脉,缝合皮肤,将小鼠停止麻醉,放入恒温箱中观察其生命体征。60 min 后,将小鼠麻醉,拔出线栓,缝合皮肤,放入恒温箱中,待小鼠完全清醒后放入鼠笼中饲养。

1.3 免疫荧光染色

小鼠做断头处死,迅速将脑组织取出,放入 4%多聚甲醛中固定 24 h。换成 20%蔗糖溶液脱水 24 h,至脑沉底,再换成 30%的蔗糖溶液脱水 24 h,至脑沉底。OCT 包埋,做冠状切面。切片厚度为 $12\ \mu\text{m}$,平放在载玻片上,放于 -20°C 保存。冰冻切片从 -20°C 冰箱取出后,常温放置 1 h,充分晾干,PBS 缓冲液漂洗切片 3 次,每次 5 min。滴加羊血清室温封闭 1 h。玻片晾干后滴加已经配好的一抗,放入湿盒中, 4°C 过夜。去除一抗,用 PBS 缓冲液漂洗切片 3 次,每次 5 min,滴加稀释好的荧光二抗,放入湿盒中,避光室温孵育 2 h。去除二抗,用 PBS 缓冲液漂洗切片 5 min。4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 300 nM, Gene Copoeia)衬染 5 min, PBS 缓冲液漂洗三遍。玻片晾干,将 $15\ \mu\text{L}$ 的抗荧光衰减封片剂滴加在载玻片上,盖上盖玻片,避免气泡产生。利用荧光显微镜采集免疫荧光照片,并利用 ImageJ 软件分析荧光强度。免疫荧光染色所使用的抗体及浓度:鼠抗 GFAP 抗体(1:100, Abcam, 美国),兔抗 S100 β 抗体(1:100, Abcam, 美国),兔抗 Flag 抗体(1:500, Abcam, 美国),兔抗 GP 抗体

(1:100, Atlas Antibodies, 瑞典), Fluor488 抗鼠荧光二抗(1:500, Thermo Fisher Scientific, 美国), Fluor488 抗兔荧光二抗(1:500, Thermo Fisher Scientific, 美国), Fluor594 抗兔荧光二抗(1:500, Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.4 大脑糖原测定

小鼠接受断头处死后,迅速将脑缺血半暗带取出,放入液氮中快速冷却,防止糖原降解。细胞或者组织放入 $100\ \mu\text{L}$ 的糖原水解液中,冰上裂解 30 min。 4°C , 12000 rpm 离心 5 min, 取 $50\ \mu\text{L}$ 上清按照糖原定量检测试剂盒(Biovision, 美国)上的方法检测样品在 450 nm 处的吸光度。根据糖原定量标准曲线换算出糖原的含量。另取 $10\ \mu\text{L}$ 上清进行蛋白定量检测,具体检测方法参照蛋白定量检测说明书,用蛋白定量的结果将糖原含量进行标准化。

1.5 三苯基氯化四氮唑(Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色

再灌注后 24 h,小鼠做断头处死,迅速将大脑组织取出。从嗅球开始以 1 mm 的间距做冠状切面。将切好的脑片放入 37°C , 2%的 TTC 缓冲液(MP Biomedicals, 美国)中染色 20 min。对 TTC 染色结果进行分析,未梗死的区域表现为红色,梗死的区域则表现为白色。梗死容积的计算:(左侧半脑正常组织容积 - 右侧半脑非梗死区容积)/左侧半脑正常组织容积 $\times 100\%$ 。

1.6 Corner test

行为学实验小鼠分组为电脑随机分组,操作者和数据处理者不知道动物分组。Corner test 在小鼠 MCAO 手术前三天开始行为学训练,一天一次。在 MCAO/R 后 3 天开始测定,一周三次,持续到第 14 天。训练与测试时,将小鼠轻轻的放在 30 度角的模具里,模具放在一个温度适宜安静的独立房间。观察小鼠走到角落后直立之后转弯的方向(左或右),算一次成功的转弯,每只老鼠统计十次。计算老鼠向右侧的比例。

1.7 Grid-walking test

Grid-walking test 在小鼠 MCAO 手术前三天开始行为学训练,一天一次,在 MCAO/R 后 3 天开始测定,一周三次,持续到第 14 天。Grid-walking test 使用的不锈钢架上有 $2\ \text{cm} \times 2\ \text{cm}$ 的小栅栏,不锈钢架长 40 cm,宽 20 cm,高 50 cm。不锈钢架专门放在一个温度适宜,安静的独立房间里,将摄像头放于不锈钢架前正中地面上,摄像头的倾斜角度为 $20-40^{\circ}$ 。将小鼠轻轻地放在不锈钢架上适应 3 min,随后记录,时间是 1 min。每只小鼠测完后,用 75%的乙醇将不锈钢架消毒,待酒精完全蒸发后进行下一只小鼠的测定。小鼠左前肢和右后肢(或右前肢和左后肢)都先后抬起并落下算是完整的一步,小鼠总步数为 1 min 内左前肢和左后肢一共走的步数,错步的含义是 1 min 内小鼠左前肢或者左后肢掉下网格的次数。错步率 = 错步数 / 总步数 $\times 100\%$ 。

1.8 统计学分析

利用 Prism 7(Graphpad software)进行统计学分析。所有数据均表示为 Mean $\pm$ SEM。Unpaired t-test 用于两组数据之间的比较,One-way ANOVA 用于比较多组数据之间的差异,神经行为学数据用 Two-way repeated measures ANOVA 比较组间差异。 $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

2.1 GFAP-GP 转基因小鼠模型的验证

首先,我们与广州赛业生物技术有限公司合作,利用星形胶质细胞特异性启动子(GFAP),构建了 GFAP-GP 小鼠,并通过免疫荧光染色,发现外源性过表达的 GP(由 Flag 标记)主要

存在于星形胶质细胞中,神经元中几乎没有表达(图 1A)。接下来,利用双重免疫荧光标记方法对 GFAP-GP 小鼠星形胶质细胞中 GP 表达进行了测定,利用 S100 β 蛋白标记星形胶质细胞,再计算 S100 β 阳性的星形胶质细胞中 GP 的表达(图 1B),发现与 WT 相比,GFAP-GP 小鼠星形胶质细胞(S100 β 标记)中 GP 的表达发生了明显的增加(图 1C)。

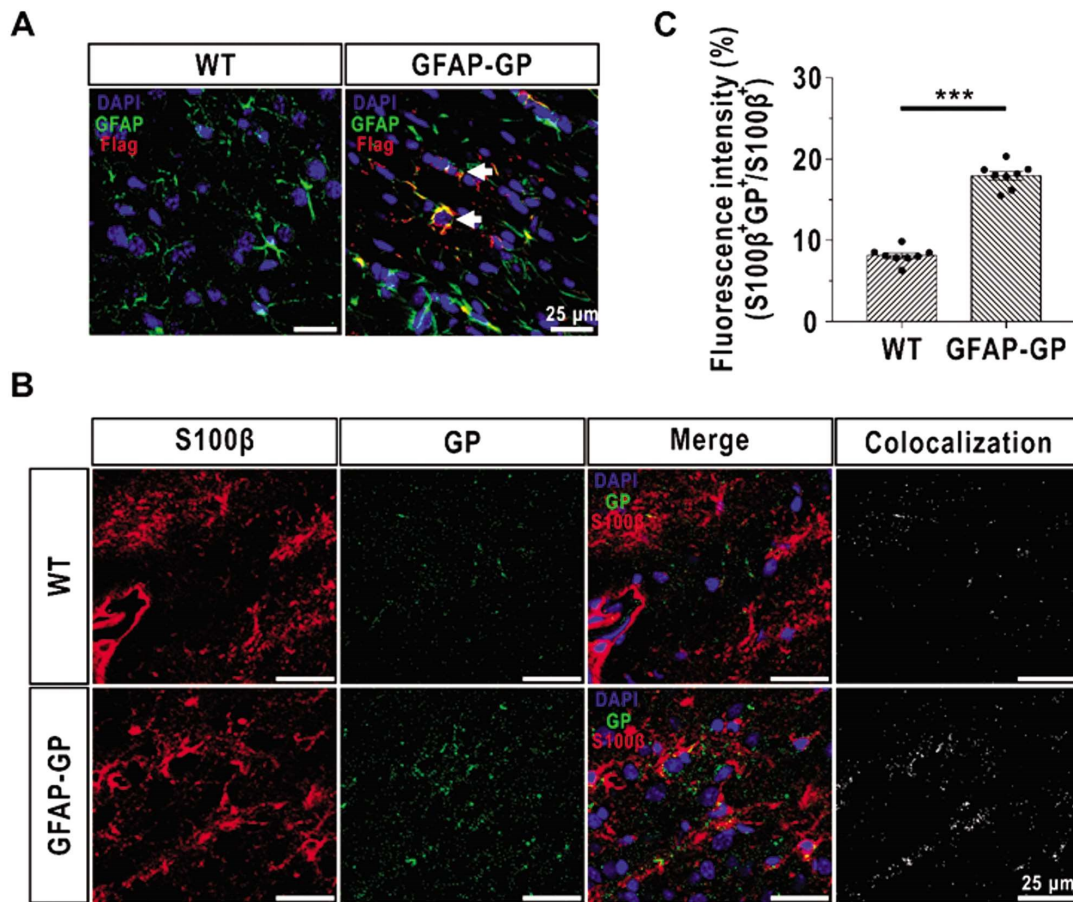


图 1 免疫荧光染色验证 GFAP-GP 小鼠模型的建立

(A)利用免疫荧光染色证明 GFAP-GP 小鼠大脑中外源性过表达的 GP 主要存在于星形胶质细胞(GFAP 标记)中,(B 和 C)利用免疫荧光染色检测 GFAP-GP 小鼠星形胶质细胞(S100 β 标记)中 GP 的含量,免疫荧光染色中 S100 β +GP+ 阳性的区域代表星形胶质细胞中的 GP

Fig.1 Verification of GFAP-GP model using immunofluorescence

(A) Immunofluorescence staining was performed to identify the astrocyte-specific localization of exogenous PYGB in GFAP-GP mice. Astrocytes were marked by GFAP. The arrows represent astrocytes overexpressing the pygb gene followed by a FLAG tag. Scale bars = 25 μ m. (B) Representative immunofluorescence images after staining with an antibody against S100 β and antibody against GP of frontal cortex area 1 in GFAP-GP mice brains. Astrocytes were marked by S100 β . Scale bars = 25 μ m. (C) Quantification of relative fluorescence intensity of GP in B (n=8). The relative fluorescence intensity of GP was calculated as the percentage of fluorescence intensity in the colocalization area (denoted as S100 β and target protein) divided by the fluorescence intensity in the S100 β + area. The data are presented as the mean $\pm$ SEM. *** P <0.001.

2.2 I/R 损伤后糖原动员可以促进累积糖原分解,减少小鼠脑梗死面积

既往文献发现在大脑 I/R 损伤中星形胶质细胞糖原含量发生了明显的增加^[10-12]。本研究中,我们也发现在 I/R 损伤 12h,大脑中糖原含量发生了明显的增加(图 2A),而 GFAP-GP 小鼠在再灌注 12 h 时大脑中糖原含量与 WT 小鼠相比发生了明显减低(图 2A)。接下来,我们利用 TTC 染色,发现在再灌注 24h,GFAP-GP 小鼠脑梗死面积与野生型小鼠相比发生了明显的下降(图 2B)。

2.3 I/R 损伤中糖原动员可以明显改善小鼠行为学功能

最后,利用 Corner test 对大脑 I/R 损伤后小鼠运动感觉功能做进一步检测^[13]。我们发现,GFAP-GP 小鼠与 WT 小鼠相比,在再灌注损伤后,运动感觉能力有明显的改善(图 3A)。我们利用 Grid-walking test 对大脑 I/R 损伤后小鼠前肢和后肢的运动能力做进一步分析^[14],发现 GFAP-GP 小鼠与 WT 小鼠相比,在再灌注后总步数有了明显的增加,错步率发生了明显的降低(图 3B),提示 I/R 损伤后糖原动员可以明显改善小鼠行为学功能。

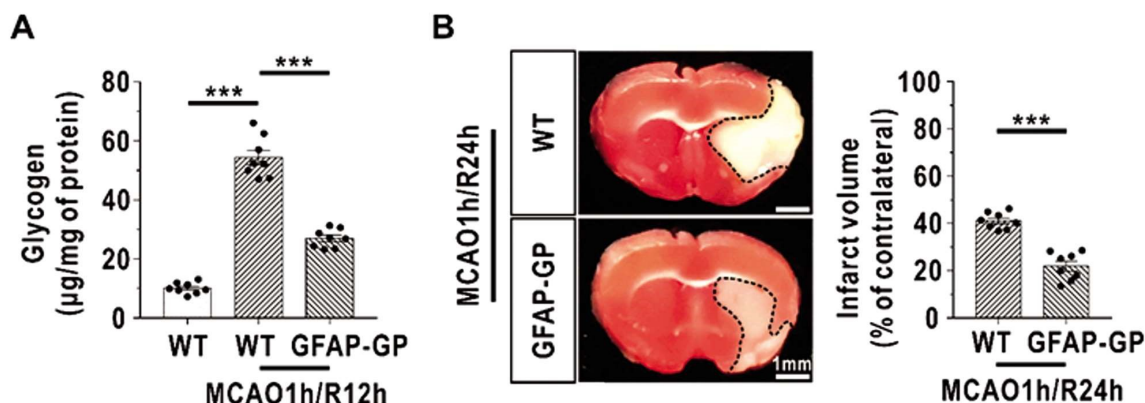


图2 糖原动员可以促进再灌注后累积糖原分解,减少脑梗死面积

(A)利用糖原定量检测试剂盒测定再灌注损伤后 GFAP-GP 小鼠大脑缺血半暗带区糖原的含量,(B)利用 TTC 染色检测再灌注损伤后 GFAP-GP 小鼠大脑梗死面积

Fig.2 Glycogen mobilization enhanced accumulated glycogen degradation and decreased infarct volume after I/R injury

(A) Cerebral glycogen levels in the ischemic penumbra of GFAP-GP mice at 12 h after MCAO/R (n=8). (B) Left panel: Representative brain slice images of TTC staining at 24 h after MCAO/R in GFAP-GP mice. Right panel: The quantified infarct volume of TTC staining (n=8). Scale bars = 1 mm. The data are presented as the mean $\pm$ SEM. *** P <0.001.

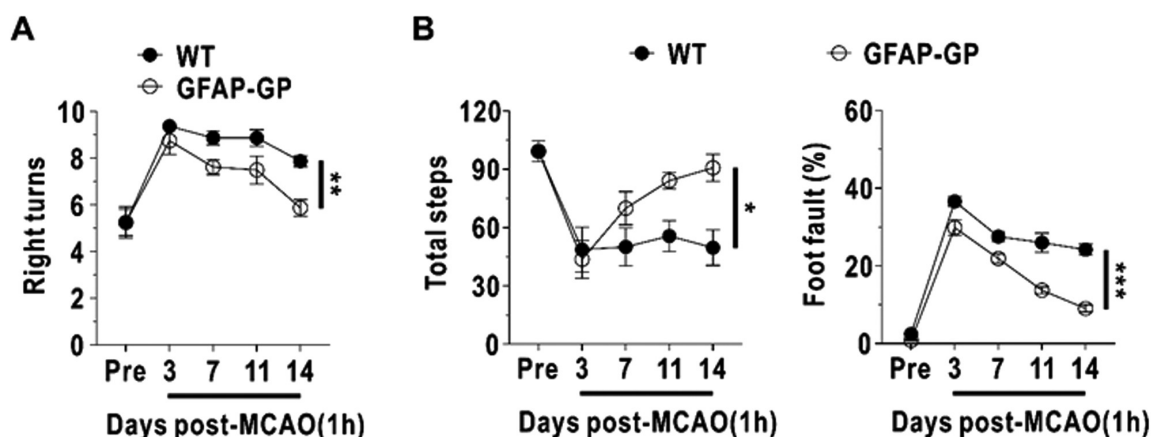


图3 糖原动员可以改善再灌注损伤后小鼠的行为学功能

(A)利用 Corner test 检测再灌注损伤后 GFAP-GP 小鼠运动感觉能力,(B)利用 Grid-walking test 检测再灌注损伤后 GFAP-GP 小鼠前肢和后肢的运动能力

Fig.3 Glycogen mobilization improved neurobehavioral function after reperfusion injury

(A) A corner test was performed to analyze the numbers of right turns in 10 trials before (Pre) and after reperfusion in the mouse model of MCAO (n=8).

(B) A grid-walking test was performed to assess the total steps (left panel) and foot fault ratios (right panel) before (Pre) and after reperfusion in the mouse model of MCAO (n=8). The data are presented as the mean $\pm$ SEM. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

3 讨论

目前临床上对于在治疗窗时间内的缺血性脑中风病人,以血管再通为目的的溶栓、血管内血栓切除术等手段仍然是主要的治疗方式^[15],而血管再通后,会引起再灌注损伤。临床中,缺血性脑中风发生突然,难以预知,很多预处理的手段往往来不及采用,而再灌注损伤是可以预见并有能力进行临床干预的,积极有效的治疗措施可以挽救大脑缺血半暗带的神经细胞,明显改善患者的长期预后和功能恢复。

缺血再灌注损伤的本质,就是由于大脑能量的极度缺乏与再补充交替出现进而引起一系列功能障碍的过程。大脑是一个高耗能的器官,短暂的能量缺乏都可能会对大脑功能产生不可逆的损害^[4,16]。脑糖原是大脑中重要的能量储备物质,在大脑能量缺乏时可以快速分解从而提供额外的能量支持^[17]。近年来大

量研究发现,糖原分解还广泛参与了星形胶质细胞抗氧化应激、谷氨酸再摄取、钾离子重吸收等多种生理活性^[18,19],糖原分解在维持星形胶质细胞代谢稳态中发挥重要作用。既往研究证实,在 I/R 再灌注过程中星形胶质细胞糖原发生了大量累积^[10-12],而 GP 含量和活性的下调介导的糖原分解障碍,是引起再灌注过程中糖原累积的主要原因^[20]。在本研究中,我们发现 I/R 中糖原动员可以明显降低再灌注后脑梗死面积,改善小鼠肢体感觉与运动功能,提示星形胶质细胞糖原动员对再灌注损伤有明确的神经保护作用,GP 可以成为临床上治疗缺血性脑中风血管再灌注后的潜在新靶点。

在本研究中,我们利用星形胶质细胞特异性 GP 过表达转基因小鼠观察 I/R 造模后脑梗死面积和神经行为学功能恢复等指标。与传统的全身非特异性 GP 过表达转基因小鼠相比,星形胶质细胞特异性 GP 过表达小鼠的引入避免了大脑中神

经元、小胶质细胞等 GP 过表达后对实验结果造成的干扰,研究结果更加可靠。其次,在探索糖原动员对再灌注损伤的保护作用时,我们不仅分析了梗死面积的改变,更利用神经行为学方法分析了小鼠再灌注后感觉与运动功能的恢复。既往文献提示,在光栓诱导脑缺血再灌注模型中,小鼠神经行为学恢复与脑梗死面积没有直接的线性关系^[20]。因此,相比于脑梗死容积的变化,我们更加关注小鼠行为学预后,I/R 中糖原动员对行为学的改善也提示其对再灌注损伤有更好治疗效果。

综上所述,本研究利用 GFAP-GP 小鼠,通过免疫荧光染色、TTC 染色和神经行为学等方法,证明 I/R 后糖原动员可以明显减低再灌注后脑梗死面积,改善小鼠肢体感觉与运动功能,是临床上治疗缺血性脑中风血管再通后的潜在新靶点。

参考文献(References)

- [1] GBD 2015 DALYs, HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1603-1658
- [2] GBD 2015 Mortality, Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1459-1544
- [3] Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, et al. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(19): 1795-1803
- [4] Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging[J]. *Neuron*, 2015, 86(4): 883-901
- [5] Bak LK, Walls AB, Schousboe A, et al. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(19): 7108-7116
- [6] Cullen DK, Gordián-Vélez WJ, Struzyna LA, et al. Bundled Three-Dimensional Human Axon Tracts Derived from Brain Organoids [J]. *i-Science*, 2019, 21: 57-67
- [7] Duran J, Gruart A, Varea O, et al. Lack of Neuronal Glycogen Impairs Memory Formation and Learning-Dependent Synaptic Plasticity in Mice[J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2019, 13: 374-374
- [8] Cali C, Tauffenberger A, Magistretti P. The Strategic Location of Glycogen and Lactate: From Body Energy Reserve to Brain Plasticity [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 82
- [9] Brewer MK, Gentry MS. Brain Glycogen Structure and Its Associated Proteins: Past, Present and Future [J]. *Advances in neurobiology*, 2019, 23: 17-81
- [10] Gurer G, Gursoy-Ozdemir Y, Erdemli E, et al. Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis[J]. *Brain Pathol*, 2009, 19(4): 630-641
- [11] Folbergrova J, Katsura KI, Siesjo BK. Glycogen accumulated in the brain following insults is not degraded during a subsequent period of ischemia[J]. *J Neurol Sci*, 1996, 137(1): 7-13
- [12] Hossain MI, Roulston CL, Stapleton DI. Molecular basis of impaired glycogen metabolism during ischemic stroke and hypoxia [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97570
- [13] Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia [J]. *Journal of neuroscience methods*, 2002, 117(2): 207-214
- [14] Horiquni Barbosa E, Vallim JH, Lachat JJ, et al. Assessments of Motor Abnormalities on the Grid-Walking and Foot-Fault Tests From Undernutrition in Wistar Rats[J]. *J Mot Behav*, 2016, 48(1): 5-12
- [15] Hankey GJ. Stroke[J]. *Lancet*, 2017, 389(10069): 641-654
- [16] Dienel GA. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function[J]. *Physiological reviews*, 2019, 99(1): 949-1045
- [17] Coggan JS, Keller D, Cali C, et al. Norepinephrine stimulates glycogenolysis in astrocytes to fuel neurons with lactate [J]. *PLoS Comput Biol*, 2018, 14(8): e1006392
- [18] Dienel GA, Carlson GM. Major Advances in Brain Glycogen Research: Understanding of the Roles of Glycogen Have Evolved from Emergency Fuel Reserve to Dynamic, Regulated Participant in Diverse Brain Functions[J]. *Adv Neurobiol*, 2019, 23: 1-16
- [19] Dienel GA, Rothman DL. Glycogenolysis in Cerebral Cortex During Sensory Stimulation, Acute Hypoglycemia, and Exercise: Impact on Astrocytic Energetics, Aerobic Glycolysis, and Astrocyte-Neuron Interactions[J]. *Advances in neurobiology*, 2019, 23: 209-267
- [20] Choi BI, Park D, Lee SH, et al. Neurobehavioural deficits correlate with the cerebral infarction volume of stroke animals: a comparative study on ischaemia-reperfusion and photothrombosis models[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 33(1): 60-69