

脑血管内皮细胞线粒体原位结构分析 体系建立与应用

王雪 南希 杜星月 刘玉峰 李霞 张云峰

【摘要】 目的 旨在建立脑组织样本神经血管单元中内皮细胞线粒体快速可视化分割的方法和应用。**方法** 取假手术组纹状体和缺血再灌注纹状体半暗区组织,采用钨-硫代碳酰肼-钨制样技术(Osmium-thiocarbohydrazide-osmium,OTO)包埋前块染色技术,结合聚焦离子束扫描电子显微镜(Focused ion beam scanning electron microscope,FIB/SEM)和人工智能可视化图像分析软件(Artificial intelligence-visualization-image analysis,AIVIA)机器学习图像分割技术,对神经血管单元中内皮细胞线粒体进行大尺度成像和快速分割分析。**结果** 本研究成功建立基于OTO-FIB/SEM-AIVIA(OFA)的脑组织块样本线粒体快速分割流程,实现微米级神经血管单元中特定细胞类型线粒体纳米级分辨率的快速可视化;该流程可以提供脑组织样本线粒体数量和形态变化的准确信息;同时,训练出的模型可以拓展应用于相同图像采集参数的不同样本数据,提高图像分割速度和数据处理效率;基于这一方法,本研究发现相较于假手术组,脑缺血再灌注纹状体半暗区内神经血管单元完整线粒体的平均体积变小且形态变圆;本研究还进一步提取并三维重建了内皮细胞中的线粒体并发现其形态和数量的改变。**结论** OFA流程可以快速获取神经血管单元或其中某个特定细胞类型,提供内皮细胞完整线粒体数量和体积的准确信息,为功能研究提供更准确全面的结构学证据。

【关键词】 神经血管单元 线粒体 超微结构 聚焦离子束扫描电镜成像 机器学习

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)05-0482-08

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.05.011

大脑作为人体耗能最高的组织器官,其复杂的神经活动对能量有极高的需求。为了适应脑组织对能量的特殊需求,以脑血管为中心的神经血管单元概念日益受到重视^[1-2]。血脑屏障是神经血管单元表现出的一部分功能表型^[3]。单元中多种细胞组分相互协同,共同维持能量稳态和血脑屏障的完整性^[3-4]。作为主要的产能来源,神经血管单元中的血管内皮细胞以及血脑屏障周围的星形胶质细胞、小胶质细胞和神经元中的线粒体为血脑屏障的维持提供能量保证。越来越多的研究表明,神经血管单元中不同组分线粒体的结构和功能改变在缺血性脑卒中的发生发展中发挥了重要作用,成为重要的治疗靶点^[5-7]。作为血脑屏障的核心组分,内皮细胞是血液组分进入脑组织的第一道屏障,具有低水平的跨

细胞内吞和高表达的细胞间紧密连接特征,成为血脑屏障领域的1个研究热点^[8-9]。除了这些特征,内皮细胞的线粒体研究对于血脑屏障的正常功能维持也非常重要^[10]。

以往研究中线粒体超微结构研究一般采用化学固定后对包埋块进行超薄切片和透射电镜观察,由于超薄切片厚度为50~90 nm,不足以获取线粒体的三维结构信息。超分辨光学成像技术的发展使得显微水平的线粒体图像采集分辨率不断提升,但超微水平线粒体的高分辨图像采集仍是难点^[11-12]。近年来随着三维大尺度电镜技术的不断进步,包括钨-硫代碳酰肼-钨制样技术(Osmium-thiocarbohydrazide-osmium,OTO)和系列块表面连续扫描电镜成像技术(Serial block-face scanning electron microscopy,SBF/SEM)、聚焦离子束扫描电子显微镜(Focused ion beam scanning electron microscope,FIB/SEM)技术在内的多种电镜成像技术,不仅实现组织样本中高分辨率的完整线粒体三维图像采集,还可以提供更加全面的线粒体结构及其互作细胞器的空间分布信息^[13-14]。线粒体三维图像的分割和数据分析帮助研究者以更加直观的方式展示线粒体结

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81870941);南通市社会民生面上项目(MS22022058);南通市基础研究和民生科技计划指导性项目(JCZ2110T)

作者单位:226000 南通大学特种医学研究院,南通大学附属医院卒中中心(王雪);徕卡显微系统(上海)贸易有限公司(南希);南通大学特种医学研究院[杜星月 李霞(通信作者)];南通市第二人民医院(刘玉峰);南通大学附属医院卒中中心[张云峰(通信作者)]

构,同时量化线粒体结构变化的形态参数。但是,由于线粒体超微结构复杂且形态多变,研究者需要手动描绘,费时费力。因此,如何提升这类图像的分割渲染和数据分析效率成为领域内亟待解决的难题。

近年来,卷积神经网络的深度学习被广泛应用于二维或三维图像的分析^[15],本研究将采用人工智能可视化图像分析软件(Artificial intelligence-visualization-image analysis, AIVIA),以 OTO 法制备的神经血管单元图像为例,对 FIB/SEM 获取的神经血管单元中线粒体总数量和形态进行分析和特征数据提取,建立快速三维重建神经血管单元中线粒体网络的方法,本研究将这种方法命名为 OTO-FIB/SEM-AIVIA,即 OFA 法;同时,本研究将此方法应用于研究脑缺血再灌注损伤后神经血管单元中线粒体数量和体积变化的测量,并以微血管内皮细胞为例,对线粒体数量、体积和分布信息进行特征数据提取和可视化,为神经血管单元的线粒体三维网络的快速重构提供可行性方案。

1 材料与方法

1.1 小鼠脑缺血再灌注模型及脑组织块电镜样本制备

选用体重 24~30 g 的雄性 ICR(Institute of cancer research)小鼠建立局灶性大脑中动脉栓塞再灌注(Transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型^[16];在异氟醚(R510-22-8,瑞沃德)麻醉下将具有硅涂层尖端的管腔内细丝(6023PK5Re, Doccol 公司)通过右颈外动脉进入颈内动脉,直到其在起源处闭塞大脑中动脉;20 min 后抽出细丝予以再灌注;再灌注 4 h 后小鼠通过腹腔注射 2.5%阿佛丁(2,2,2-tribromoethanol, Avertin)麻醉后用生理盐水经心脏灌注,待肝脏变白后换 4%多聚甲醛灌注,待小鼠尾部弯曲翘起,停止灌注;取全脑后并将全脑切割成 1 mm 的冠状位切片,放入 2.5%戊二醛和 4%多聚甲醛的混合固定液,待组织变黄后进行 OTO 制样^[17];第 2d 参考相邻脑片的微管相关蛋白 2(Microtubule associated protein 2, MAP2)染色^[17],将纹状体缺血半暗区修成 1 mm³大小,用 2.5%戊二醛和 4%多聚甲醛的混合固定液继续固定 24 h;用 0.1 M 磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)冲洗 3 次,每次 15 min 后将组织块放入锇酸固定液(2%锇酸;3%亚铁氰化钾=1:1)在 4℃下避光固定 2 h 后用蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min;

然后将组织块放入 1%硫代卡巴肼避光染色 20 min 后用蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min;再将组织块放入锇酸固定液常温下避光固定 30 min 后用蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min;之后将组织块放入 1%醋酸双氧铀溶液 4℃过夜后用蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min;之后放入 0.66%硝酸铅溶液(pH 值调至 5.2)中隔绝空气在 60℃下烘箱加热 30 min;用蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min;后用梯度乙醇(30、50、70、90 和 100%)处理样品,各 30 min,以脱水;然后用无水乙醇和丙酮(1:1)的混合物处理 30 min;然后将样品用纯丙酮处理 20 min 后再用纯丙酮处理 20 min,第 2 次纯丙酮处理一定要确保不能有水进入;然后将组织块放入包埋树脂(Epon812 试剂盒, Electron microscopy science, USA)和丙酮(7:3)的混合物 4℃避光过夜,后再放入丙酮和树脂(3:7)混合物 4℃避光过夜;之后将组织块放入纯树脂处理 4℃避光过夜;之后更换新鲜的纯树脂再处理 48 h;后将样品置于新鲜的纯树脂中,并转移到新的包埋模具中,在 45~60℃下渗透 3~5 h。

1.2 基于 FIB/SEM 的神经血管单元图像采集

图像采集参考前期工作^[17];使用研磨修块机(EM TXP, Leica)打磨树脂块,直至看到黑色组织块的表面;采用离子溅射镀膜法喷金,增加样品导电性;再使用双束扫描电子显微镜(FIB Helios G3 UC, Thermo Fisher)选择微血管(直径 8~10 μm 的血管)进行成像;连续图像采集时的离子减薄参数:减薄厚度, 8 nm;离子减薄的束流大小, 30 keV, 0.79 nA;图像采集用二次电子(Elstar in-column SE detector, ICD)检测器,在背散射模式(Back-scattered electron, BSE)下以 2 kV 加速电压和 0.2 nA 电流对每个连续面进行成像;图像存储分辨率设置:3072×2048 像素,驻留时间:15 μs/pixel 和 4.25 nm/pixel;共收集约 1000 张图像^[17];1 个完整的神经血管单元包含在长约 17 μm,宽约 14 μm,高约 8 μm 的图像堆栈中。

1.3 AIVIA 图像分割

首先,使用 AIVIA 软件(Version 11.1, Leica)的 Pixel classifier 对图像进行初步重构和处理。具体分为三步:(1)原始电镜数据导入(File-open-设置单位)。将原始的电镜 tif 图像统一导入软件中,注意修改单位设置为 nm;此步骤可保存文件格式为 save as aivia. tif,即将所有电镜图像保存在 1 个工程文件中,以便后续处理;(2)勾画出感兴趣的部分

及除该部分以外的背景(Analysis tools-pixel classifier-drawing-want&background)。用画笔直接框出线粒体或用魔术笔利用图片对比度框出线粒体,尽量多框出几个,将框出来的部分加入 Want 模块及圈出线粒体以外的背景部分加入 Background 模块以产生区别,以便于软件后续进行自主学习;框出的区域越具体越精确,后续软件自主学习也会相应的精准;当全部完成圈选后保存两种形式的文件(File-save as-save as aivia. tif/export annotations as tif),即生成 Want&Background 各模块的工程文件;此步骤每隔一定张数选取 20 张重复上述操作(每隔多少张和选取多少张视原始图像的总张数而定,间隔张数越少,选取处理的图像越多,后续软件自主学习的越精准);(3)利用人工智能深度学习创建模型(Analysis-deep learning processor-create job-training),将原始图像和框出线粒体后处理过图像分别导入创建深度学习程序;待模型创建好后应用到所有数据中即第一步的工程文件(File-import-选择想要训练的原始电镜数据),以构建所有电镜图像的三维结构(Analysis tools-recipe console-start);其次,初步重构和处理结束后进入 Object classifier 对重构好的三维结构进行颜色、透明度、角度等参数的调整后导出数据。具体分为三步:(1)将训练好的电镜数据导入(File-open-image. aivia. tif);(2)进入三维视图 Switch to 3D view,对训练好的三维结构进行数据分析(Analysis tools-recipe console-3D object analysis/meshed),并根据自己最后展示的目的调整想要的参数(Color、transparency 等),可针对每 1 个结构进行单独调整,且不会对最终导出的数据产生影响;(3)对重构出的线粒体数量、面积、体积等参数进行分析(Spreadsheet-opens the export to excel dialog)并导出三维图像和三维分析数据(File-save as)。

1.4 Image J 线粒体面积计算

每隔 100 张电镜图像共选取 13 张图片导入 Image J 软件,将图片格式改为 8 bit(Image-type-8 bit),后由于线粒体颜色较其他结构比较深,对比度比较大,通过调整阈值(Image-adjust-threshold)选出图片内所有线粒体,后计算线粒体面积(Analyze-set measurement-area-measure),导出数据。

1.5 统计学处理

AIVIA 11.1 中导出的数据以均数 \pm 标准误(means \pm S. E. M)表示,采用 Prism 软件进行统计

分析,2 组比较采用独立样本 t 检验或者配对 t 检验,当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 运用 OFA 法的图像深度学习功能实现线粒体快速可视化

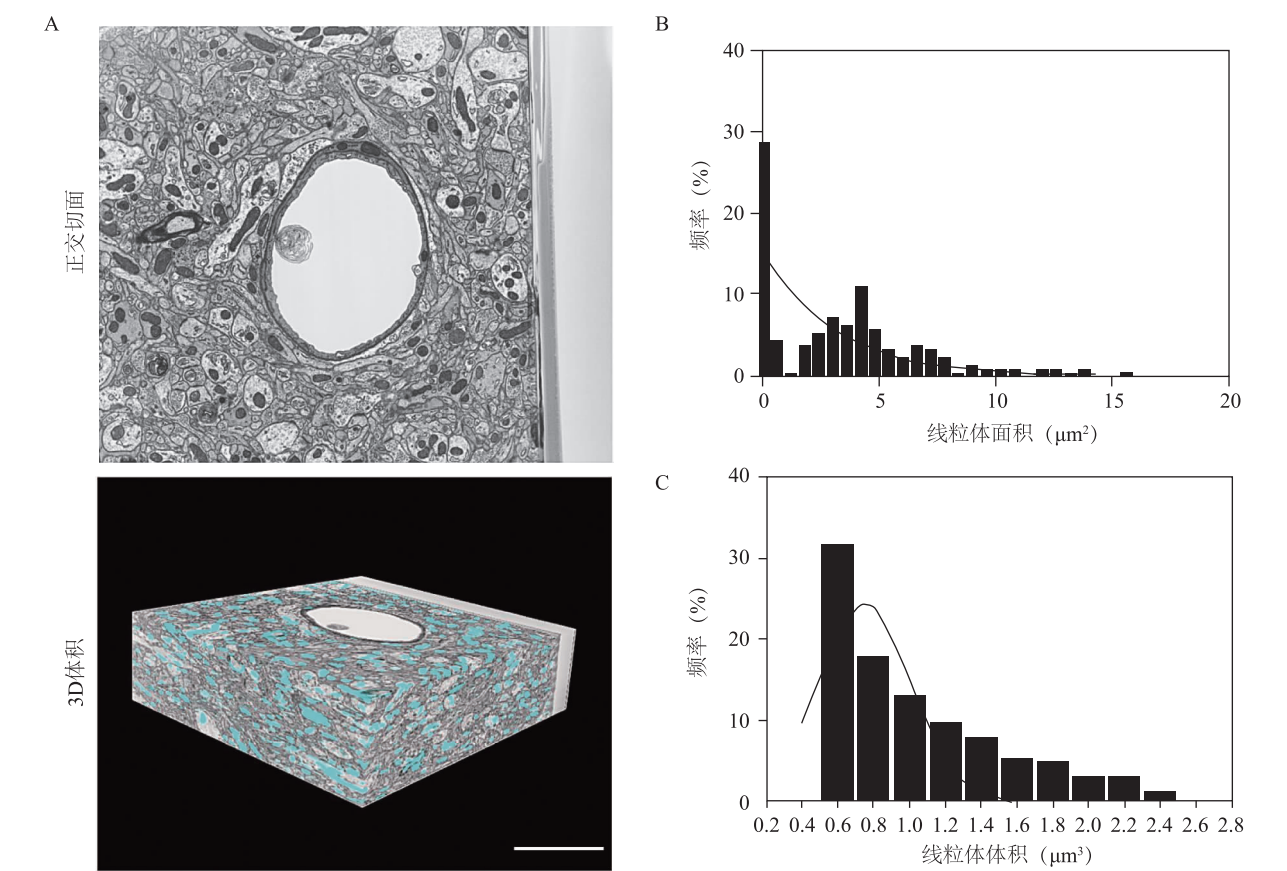
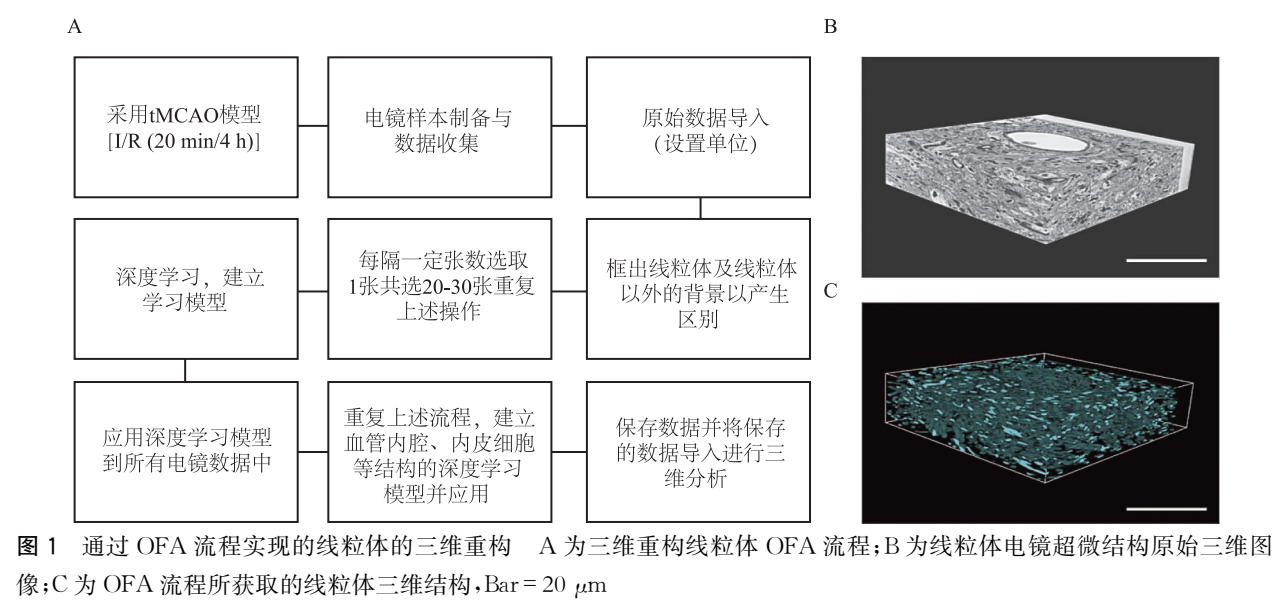
为了实现线粒体快速可视化,本研究采用 OFA 的脑组织线粒体快速分割流程,对假手术组和脑缺血再灌注组进行电镜样本的采集及数据收集。相较于之前很多需要大量人工参与的三维重构软件,本研究使用 AIVIA 深度学习软件,利用人工智能的深度学习模块来实现线粒体的快速可视化(图 1)。将 1253 张原始电镜图像(图 1)导入 AIVIA,每间隔 40~60 张挑选 1 张进行线粒体重构,通过 Pixel classifier 模块画出所有线粒体并将其与背景分开,如此重复 20~30 张后进行人工智能深度学习,建立线粒体深度学习模型并应用到 1253 张电镜图像中;应用结束后进入 Object classifier 模块进行线粒体三维图像呈现及分析,即可实现线粒体快速可视化(图 1)。

2.2 OFA 法提供脑组织样本中完整线粒体的准确数量和体积

通过对 OFA 获取的线粒体进行三维分析,并与二维图像进行对比(图 2)绘制线粒体面积和体积的频率直方图(图 2);通过二维图像模拟的线粒体面积计算发现线粒体的面积集中在 0~0.6 和 2.4~4.2 μm^2 ,而三维分析显示线粒体体积集中在 0.5~0.7 μm^3 ,并且从数量方面本研究使用 ImageJ 软件随机每间隔 100 张随机选取 13 张电镜二维图像计算出的平均线粒体个数在 220 个,这种传统的二维统计方法可能会造成同一线粒体在不同层面被重复计算而引起误差,而使用 AIVIA 软件实际重构出的线粒体真实个数为 2086 个,即三维计算可以获取线粒体的准确数量和体积大小,这提供了线粒体数量和三维形态变化更加精确和直观的信息。

2.3 脑缺血再灌注对纹状体缺血半暗区线粒体三维结构的影响

在重构了假手术组的线粒体三维结构后本研究想要探究脑缺血再灌注对纹状体缺血半暗区线粒体结构的影响。因为 AIVIA 的深度学习功能不仅仅只适用于同一套数据,也可以适用于不同组别的数据。对于对比度和图像清晰度较接近的数据来说,AIVIA 深度学习出的线粒体程序可以直接应用,无



需再逐张重构,很大程度上节省了数据分析时间。因此,本研究各选取了 500 张假手术组和缺血再灌注组的电镜样本图像(长约 17 μm ,宽约 14 μm ,高约 4 μm)并同样进行了线粒体三维重构(图 3),发现假手术组共识别到 513 个线粒体,脑缺血再灌注组共识别到 737 个线粒体,而线粒体的长轴长和体积均变小(图 3);本研究绘制了 2 组之间不同体积线粒体占比的频率直方图(图 3),发现假手术组的

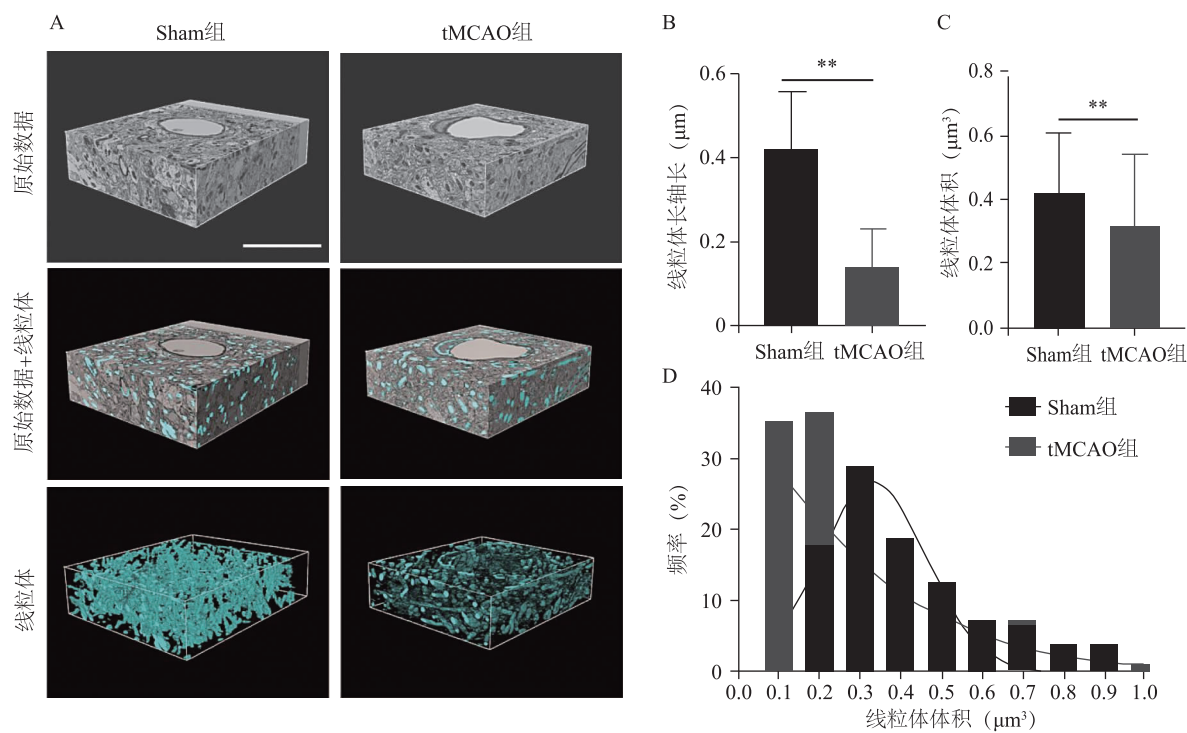


图3 脑缺血再灌注后纹状体缺血半暗区线粒体对比 A 为假手术组和脑缺血再灌注组线粒体三维图像对比图,Bar = 2 μm ,A 中蓝色为线粒体;B 为缺血再灌注对线粒体长轴长的影响($P < 0.0001$);C 为缺血再灌注对线粒体体积的影响($P < 0.0001$);D 为假手术组和缺血再灌注组线粒体体积的频率直方图

线粒体数量主要集中在线粒体体积较大的区间,而缺血再灌注组则集中在体积较小的区间,即在脑缺血再灌注后纹状体缺血半暗区线粒体形态变圆变小,推测线粒体可能发生了分裂。

2.4 OFA 法解析脑缺血再灌注对内皮细胞内完整线粒体三维结构的影响

在通过 OFA 方法计算出纹状体半暗区线粒体三维结构信息后本研究尝试 AIVIA 是否也能快速实现微血管附近特定细胞类型的三维重构以及其细胞内线粒体的三维信息;由于内皮细胞是血脑屏障的重要组成部分,因此本研究选择微血管内皮细胞作为研究对象来进行数据提取和可视化;通过 AIVIA 的深度学习以及内皮细胞形态的特殊性对假手术组的内皮细胞进行重构,随后将该程序应用至缺血再灌注组,之后将重构出的内皮细胞作为 1 个感兴趣的区域 (Region of interest, ROI),快速实现内皮细胞线粒体三维可视化;通过对假手术组和缺血再灌注组的微血管内皮细胞及其线粒体的三维重构 (图 4),发现在缺血再灌注后内皮细胞内线粒体长轴长和体积均变小 (图 4);本研究也绘制了 2 组内皮细胞线粒体的体积和数量的频率直方图 (图 4),

发现假手术组的线粒体数量主要集中在线粒体体积较大的区间,而缺血再灌注组则相反,即在缺血再灌注后内皮细胞内线粒体形态变圆变小,推测线粒体由于损伤可能发生了碎片化。

3 讨论

本研究建立 OFA 法的脑组织块样本线粒体快速分割流程,该方法不仅实现脑组织样本完整线粒体分布的快速可视化,还可以提供在体水平脑血管内皮细胞线粒体三维结构的准确信息。AIVIA 训练出的线粒体模型可以拓展应用于相同图像采集参数的不同样本数据,提高图像分割速度和数据处理效率。通过重构假手术组和缺血再灌注组纹状体半暗区线粒体以及内皮细胞完整线粒体后发现和假手术组比较,缺血再灌注后半暗区线粒体和内皮细胞内线粒体形态均明显变小变圆,提示脑损伤后线粒体发生碎片化。

近年来,利用电镜技术对于线粒体的形态结构和空间分布进行三维分析成为研究的热点。脑内线粒体形态极其多样,无论是超分辨率激光共聚焦显微镜,还是双光子荧光显微镜,都无法为脑组织中

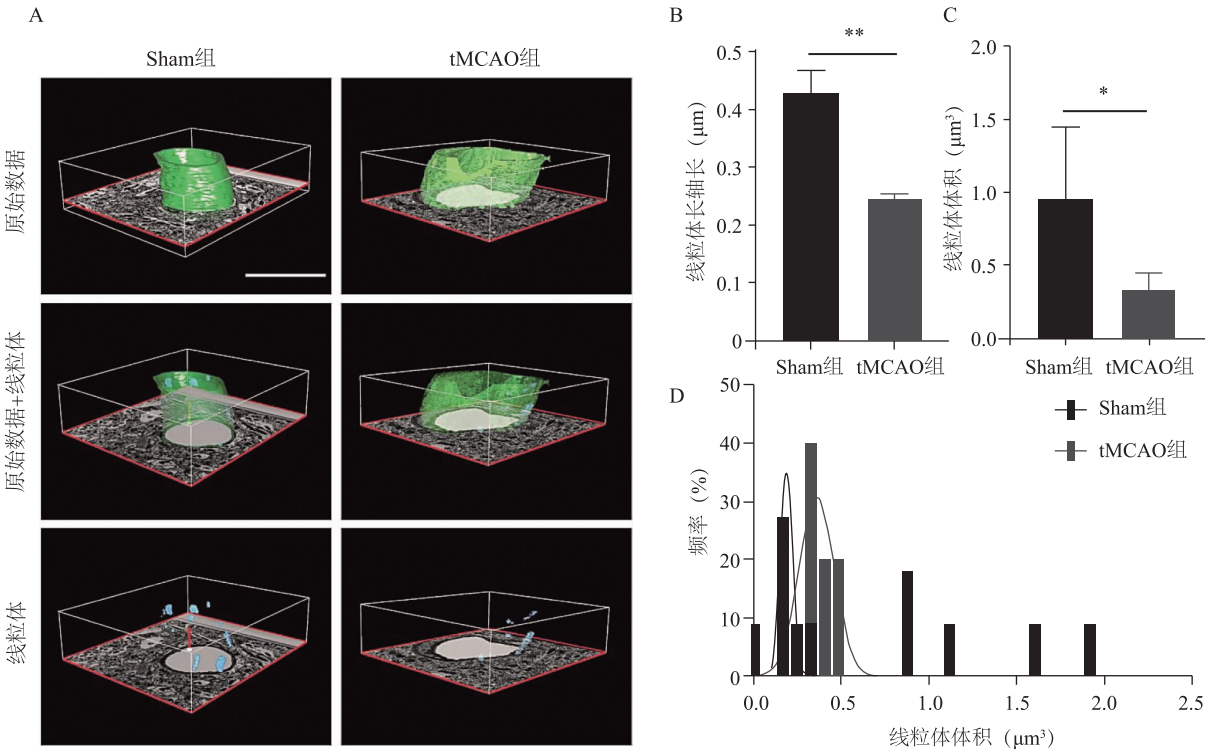


图 4 OFA 流程提供的内皮细胞线粒体超微结构三维信息 A 为假手术组和缺血再灌注组内皮细胞及内皮细胞内线粒体的三维结构图像,Bar = 2 μm,绿色为内皮细胞,蓝色为线粒体;B 为缺血再灌注对微血管内皮细胞线粒体长轴长的影响($P = 0.0005$);C 为缺血再灌注对微血管内皮细胞内线粒体体积的影响($P = 0.0133$);D 为缺血再灌注对微血管内皮细胞内线粒体体积影响的频率直方图

广泛分布的线粒体提供高分辨的结构信息。电子显微镜是唯一可以提供高分辨线粒体结构信息的研究手段,但传统研究中对完整线粒体结构的研究一般采用连续超薄切片结合透射电镜成像技术,通过软件对连续图像进行对齐和三维重构。近年来一系列体电镜技术快速发展,比如基于扫描电镜内置超薄切片技术可以方便地对厚样本进行连续切片和图像采集,XY 轴分辨率为 1 nm,Z 轴分辨率为 30 ~ 50 nm,样本厚度甚至可达 1000 μm^[18]。本研究采用聚焦离子束扫描电镜技术^[19],对 8 μm 厚度的神经血管单元进行连续离子束减薄和图像采集,XY 轴分辨率为 1 nm,Z 轴分辨率提升至 10 nm,可以捕捉到更多的超微结构细节。两种方法都是目前常用的体电镜技术手段,实现大尺度高分辨的数据采集和三维重构;在样本制备时两种方法均需要采用特殊的正染色样本块处理,即 OTO 方法,在样本进行树脂包埋前用重金属反复衬染,以获取足够反差的包埋样本。此外,样本聚合时间和温度也和传统手段略有区别,以满足样本长时间连续切削减薄的需要以及自动化图像采集的要求。和传统序列切片的

透射电镜成像技术和 SBF/SEM 比较,FIB/SEM 不仅样本切削更加精细,图像采集更加稳定,图像质量更高^[20];同时,图像对齐配准更容易,无需经验丰富的切片人员,对新手更加友好。

血脑屏障由微血管内皮细胞组成,充当血液和大脑之间的渗透性屏障,维持中枢神经系统的稳态^[21]。血脑屏障内皮细胞的线粒体是细胞能量的主要来源,其结构和功能对血脑屏障生理功能的维持至关重要^[22]。以往的报道对于脑内皮细胞的特殊结构,其线粒体三维解析较少,尤其在体水平,且在数据处理上存在无法单独重构、数据量大、重构速度慢等问题。本研究前期曾采用 Amira 等软件进行过手动或机器学习的分割,学习难度不等,但对于线粒体而言,需要手动在同一张图像中进行单个的临摹勾画,且需要在每一张图像重复勾画,对于数据量庞大的情况下效率还是偏低,并且分割效果对图像质量要求很高。AIVIA 是基于人工智能的软件架构,构建的 1 个适用于二维至五维图像的可视化、分析与数据诠释平台;它的最大优点是能够在几分钟或者几小时内可靠地处理和重建高度复杂的图

像,图像数据大小不同、时间不等。对于线粒体这类数量多且形态具有明显特征的细胞器学习效果较好,不需要逐张重构,并且对于不同组但图像对比度和质量相似的数据,同样线粒体的程序可以直接应用,不同数据同一结构无需再进行2次重复手动重构,节省大量的人力成本和时间成本的同时也达到了准确的标准,加快大尺度电镜图像数据的处理,用户体验度好,为三维大尺度分析内皮细胞这种重构难度系数大的细胞的线粒体结构研究提供了很好的解决方案。

当然,目前版本的AIVIA软件也存在一些局限性,比如(1)在数据处理方面对电镜数据来说,图片对比度要求较高;对于大内存的数据,应用深度学习模型耗时较长,并且若想应用同1个模型在不同组间的数据内,对于数据间的对比度相似性要求较高;(2)在三维重构方面对于应用深度学习还是单纯的Pixel classifier进行重构需要对数据进行准确判断,对于大数据的三维测量ROI耗时较长;(3)在线粒体测量方面数量、体积、面积、荧光强度等方面的参数是软件自动测量,但长度等其他线粒体重要参数需手动测量,对于线粒体数量多的数据耗时较长;(4)在数据导出方面若想实现不同组间数据同一角度的3D呈现,无法实现XYZ轴上的精确调节。

本研究不仅摸索出适用于微米厚度血脑屏障电镜三维重构的线粒体快速分割和形态分析的OTO-FIB/SEM-AIVIA流程,并命名为OFA法,为血脑屏障微血管附近的线粒体结构进行量化评估,并且还快速实现了特定细胞类型—内皮细胞内线粒体的三维可视化。本研究应用OFA流程对脑缺血再灌注损伤动物模型的线粒体结构分析,说明了对于具有明显形态特征的细胞器,AIVIA可以快速准确地实现不同数据之间同一结构的三维重构;同时在线粒体三维可视化后比较缺血再灌注组和假手术组的线粒体形态变化,发现内皮细胞完整线粒体的形态变圆变小,推测在受到损伤后纹状体缺血半暗区的线粒体发生了碎片化。如今,由线粒体损伤引起的能量代谢障碍已经是缺血性脑卒中、癫痫、阿尔茨海默病、精神疾病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化病等神经系统疾病的重要原因^[23]。除了内皮细胞以外,该方法也可应用于组成神经血管单元的其他不同细胞类型,可以用于原位解析神经系统疾病对神经血管单元各种细胞类型完整线粒体分布和三维形态的影响,为神经系统疾病的线粒体

机制研究提供线索。

参 考 文 献

- [1] Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease[J]. *Neuron*, 2017, 96(1): 17-42.
- [2] Wang LY, Xiong AA, Zhang LY, et al. Neurovascular unit: a critical role in ischemic stroke[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(1): 7-16.
- [3] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier[J]. *Nat Med*, 2013, 19(12): 1584-1596.
- [4] Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, et al. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 21-78.
- [5] Ni XC, Wang HF, Cai YY, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits astrocyte activation and promotes transfer of astrocytic mitochondria to neurons against ischemic stroke[J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102363.
- [6] Hayakawa K, Esposito E, Wang XH, et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke[J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 551-555.
- [7] Lai YX, Lin PQ, Chen ML, et al. Restoration of L-OPA1 alleviates acute ischemic stroke injury in rats via inhibiting neuronal apoptosis and preserving mitochondrial function[J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101503.
- [8] Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(3): C343-C356.
- [9] Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al. Structure and function of the blood-brain barrier[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13-25.
- [10] D'Souza A, Burch A, Dave KM, et al. Microvesicles transfer mitochondria and increase mitochondrial function in brain endothelial cells[J]. *J Control Release*, 2021, 338: 505-526.
- [11] Vangindertael J, Camacho R, Sempels W, et al. An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist[J]. *Methods Appl Fluoresc*, 2018, 6(2): 022003.
- [12] Brown TA, Tkachuk AN, Shtengel G, et al. Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(24): 4994-5010.
- [13] Kizilyaprak C, Stierhof YD, Humbel BM. Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography[J]. *Tissue Cell*, 2019, 57: 123-128.
- [14] Laundon D, Katsamenis OL, Thompson J, et al. Correlative multiscale microCT-SBF-SEM imaging of resin-embedded tissue[J]. *Methods Cell Biol*, 2023, 177: 241-267.
- [15] Elizar E, Zulkifley MA, Muharar R, et al. A review on multi-scale-deep-learning applications[J]. *Sensors (Basel)*, 2022, 22(19): 7384.
- [16] Franke M, Bieber M, Kraft P, et al. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *Brain Behav*

Immun, 2021, 92: 223-233.

[17] Xu XM, Zhu LQ, Xue K, et al. Ultrastructural studies of the neurovascular unit reveal enhanced endothelial transcytosis in hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation after stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(1): 123-133.

[18] Courson JA, Landry PT, Do T, et al. Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) of biological tissue samples [J]. J Vis Exp, 2021(169): 10. 3791/62045.

[19] Kizilyaprak C, Bittermann AG, Daraspe J, et al. FIB-SEM tomography in biology[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1117: 541-558.

[20] Cretoi D. The third dimension of telocytes revealed by FIB-SEM tomography[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 913: 325-334.

[21] Salvador E, Shityakov S, Förster C. Glucocorticoids and endothelial cell barrier function[J]. Cell Tissue Res, 2014, 355(3): 597-605.

[22] Salmina AB, Kharitonova EV, Gorina YV, et al. Blood-brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4661.

[23] 张宝月, 刘艾林, 杜冠华. 能量代谢紊乱对疾病的影响及其潜在药物靶点[J]. 药学报, 2019, 54(8): 1372-1381.

(2024-04-02 收稿)

(上接第 475 页)

[14] Kossoff EH, Zupec-Kania BA, Auvin S, et al. Optimal clinical management of children receiving dietary therapies for epilepsy: Updated recommendations of the International ketogenic diet study group[J]. Epilepsia Open, 2018, 3(2): 175-192.

[15] 刘家雯, 丁鑫, 朱艳伟, 等. 生酮饮食治疗药物难治性 Dravet 综合征的疗效和安全性的前瞻性对照研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019(15): 1160-1165.

[16] IJff DM, Postulart D, Lambrechts DAJE, et al. Cognitive and behavioral impact of the ketogenic diet in children and adolescents with refractory epilepsy: a randomized controlled trial [J]. Epilepsy Behav, 2016, 60: 153-157.

[17] Svedlund A, Hallböök T, Magnusson P, et al. Prospective study of growth and bone mass in Swedish children treated with the modified Atkins diet[J]. Eur J Paediatr Neurol, 2019, 23(4): 629-638.

[18] 中国抗癫痫协会生酮饮食专业委员会. 葡萄糖转运体 1 缺陷综合征的诊断与治疗专家共识[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2022, 37(19): 1452-1457.

[19] 郁莉斐, 张玉琴, 段婧, 等. 葡萄糖转运体 1 缺陷综合征疾病特征及生酮饮食治疗多中心临床研究[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(11): 881-886.

[20] De Amicis R, Leone A, Lessa C, et al. Long-term effects of a classic ketogenic diet on ghrelin and Leptin concentration: a 12-month prospective study in a cohort of Italian children and adults with GLUT1-deficiency syndrome and drug resistant epilepsy[J]. Nutrients, 2019, 11(期缺失): 1716.

[21] 韩彤立, 徐曼婷, 陈春红, 等. 生酮饮食添加治疗儿童癫痫性痉挛临床和随访研究[J]. 中国小儿急救医学, 2016, 23(6): 401-404, 408.

[22] 杨帆. 生酮饮食治疗婴儿痉挛症的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2023, 50(5): 335-339.

[23] Devi N, Madaan P, Kandath N, et al. Efficacy and safety of dietary therapies for childhood drug-resistant epilepsy: a systematic review and network meta-analysis [J]. JAMA Pediatr, 2023, 177(3): 258-266.

[24] Zhang J, Chen GH, Wang J, et al. Efficacy of the ketogenic diet on ACTH- or corticosteroid-resistant infantile spasm: a multicentre prospective control study[J]. Epileptic Disord, 2021, 23(2): 337-345.

[25] Yan N, Xin-Hua W, Lin-Mei Z, et al. Prospective study of the efficacy of a ketogenic diet in 20 patients with Dravet syndrome [J]. Seizure, 2018, 60: 144-148.

[26] Park EG, Lee J, Lee J. The ketogenic diet for super-refractory status epilepticus patients in intensive care units [J]. Brain Dev, 2019, 41(5): 420-427.

[27] 吴松波, 谢旭芳. 生酮饮食在儿童难治性癫痫中的应用进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2019, 26(3): 211-216.

(2024-03-28 收稿)