

外审专家一审稿意见:

本文探讨自噬调控蛋白磷脂酶 D1 抑制后对缺血性脑卒中神经功能恢复的影响。具体意见如下:

1. 文章描述内容不清楚, 具体见审回批注稿;
2. 文字描述存在不规范, 请仔细核对修改。
3. 请确认提供的伦理审查项目名称与文章内容的相关性。
4. 建议修改后发表。

外审专家二审稿意见:

本文借助缺血性脑卒中梗死面积测量、造模动物行为学观察和目标蛋白相对表达水平检测的方法, 对缺血性脑卒中发生后不同时期自噬的特点以及 PLD1 和缺血性脑卒中后自噬的关系进行了观察和探讨。本文具有一定科学意义, 对其他科学研究者具有参考价值, 但还存在一定问题, 建议根据之后的修改情况, 再决定是否录用刊登。

1 实验方面

(1) LC3 磷脂酰乙醇胺结合物 (LC3-II) LC3-II 是细胞溶质形式的 LC3 (LC3-I) 与磷脂酰乙醇胺结合而形成。蛋白免疫印迹实验中显示自噬相关蛋白 LC3-II 的表达水平会在不同点发生变化, 给予 PLD1 的抑制剂 FIPI 后也能明显抑制缺血性脑卒中后病灶组织中 LC3-II 蛋白相对表达水平。但是蛋白免疫印迹实验结果中也显示有 LC3-I 的表达条带, 请问在相关实验中, LC3-I 蛋白相对表达水平是否也有变化? LC3-II 的蛋白相对含量下降, 是否是 LC3-I 蛋白相对含量下降后的继发效应? 请提供相应证据说明。

(2) 由于 PLD1 是本文的研究对象, 本文所使用的 PLD1 抑制剂 FIPI 是否为专一性抑制 PLD1? 对其异构体 PLD2 是否有抑制作用? 使用 FIPI 后的行为表现与 PLD2 是否也有一定关系? 请提供相应证据说明。

2 文字等其他方面:

(1) 缺少缺血性脑卒中后, 已有文章对 PLD1 在自噬中作用机制研究中作用的描述。并需要增加此次研究与以前研究不同之处的描述。

例如: 陶少鑫, 朱彦兵, 于山平等, 小鼠缺血性脑卒中后磷脂酶 D1 在自噬和神经损伤中的作用 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019(4) 18:790-794.

(2) 缺少对部分实验结果的讨论: 使用 PLD1 的抑制剂 FIPI 后, 为什么只显著改善其在贴片去除实验中的行为表现, 而没有显著改善造模小鼠在触须诱发前肢放置实验中的行为表现?

(3) 1.1 中: FIPI 试剂信息格式请格式与其他试剂信息保持一致, 并缺货号。

(4) 图 4B 请完整显示图片。图 5F 中 Y 轴的每小格数值设置请与 E 轴统一, 并且图 F 中 Y 轴的标题注释有误。

作者修回说明:

非常感谢专家和编辑对投稿文章的审稿, 点对点修稿如下:

外审专家审稿意见汇总如下:

专家一: 本文探讨自噬调控蛋白磷脂酶 D1 抑制后对缺血性脑卒中神经功能恢复的影响。具体意见如下:

回复: 非常感谢专家对文章给予的宝贵建议, 您的意见对我们非常重要, 下面是点对点的审稿意见回复。

1. 文章描述内容不清楚 (见上传附件);

回复: 非常感谢专家的问题, 已经对描述内容不清楚的地方进行全面修改, 请见修改稿红

字部分。

2. 文字描述存在不规范，请仔细核对。

回复：非常感谢专家的问题，已经对文字描述不规范的地方进行修改，请见修改稿红字部分。

3.请确认附件的伦理审查项目名称与文章内容的相关性。

回复：非常感谢专家的审稿建议，已经确认了伦理审查项目。

建议修改后发表。

专家二：本文借助缺血性脑卒中梗死面积测量、造模动物行为学观察和目标蛋白相对表达水平检测的方法，对缺血性脑卒中发生后不同时期自噬的特点以及 PLD1 和缺血性脑卒中后自噬的关系进行了观察和探讨。本文具有一定科学意义，对其他科学研究者具有参考价值，但由于还存在一定问题，建议根据之后的修改文稿，再决定是否录用刊登。文中几点问题：

回复：非常感谢专家对文章给予的宝贵建议，您的意见对我们非常重要，下面是点对点的审稿意见回复。

1 实验方面

(1) LC3 磷脂酰乙醇胺结合物 (LC3-II) LC3-II 是细胞溶质形式的 LC3 (LC3-I) 与磷脂酰乙醇胺结合而形成。蛋白免疫印迹实验中显示自噬相关蛋白 LC3-II 的表达水平会在不同点发生变化，如果给与 PLD1 的抑制剂 FIPI 后，也能明显抑制缺血性脑卒中后病灶组织的 LC3-II 的蛋白相对表达水平。蛋白免疫印迹实验结果中也显示有 LC3-I 的表达条带，请问在相关实验中，LC3-I 的蛋白相对表达水平是否也有变化？LC3-II 的蛋白相对含量下降，是否为 LC3-I 的蛋白相对含量下降后的继发效应？请提供相应证据说明。

回复：非常感谢专家对文章给予的宝贵建议，您的意见对我们非常重要，自噬体的形成过程也是细胞胞浆内弥散型 LC3- I 转变为聚集状膜型 LC3- II 的过程，LC3 主要在细胞以 LC3- I 和 LC3- II 两种存在状态，即生理情况下，LC3 以弥散型 LC3- I 存在为主，当自噬增加时，弥散型 LC3- I 逐渐转变为聚集状膜型 LC3- II，即 LC3-聚集状 LC3- II 表达增加提示自噬水平明显上升，所以观察不同形态的转变是检测自噬是否发生的金标准，检测方法主要有两种：

第一种：可以通过电镜或者高倍显微镜下观察 LC3 的分布形态，即镜下显示弥散状 LC3- I 转变为点状聚集状 LC3- II，镜下可以观察到明显的点状聚集物，如我们在已发表在《[临床和实验医学杂志](#)》2019 年第 008 期，790-794 结果所示，缺血性脑卒中发生后弥散状 LC3- I (图 A) 转变为点状聚集状 LC3- II (图 B)；

第二种：另外也可以用 western blot 技术观察 LC3- II 和 LC3- I 的比值变化等实验手段观察自噬的发生情况，相对免疫染色而言，western blot 技术更容易定量，较为容易量化自噬的水平，所以在本研究主要使用 western blot 技术定量自噬水平，统计方式一种是统计 LC3- II /LC3- I 的比值，若 LC3- II/LC3- I 的比值增大说明自噬水平明显上升，另外也有文章统计 LC3- II/ β -actin 的比值^[1]，两种统计方式都是较为常用的统计方式，本研究主要采用统计观察 LC3- II/ β -actin 的比值的方式。

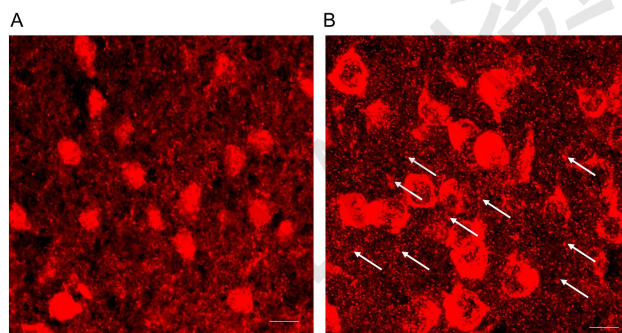


图 1. 缺血性脑卒中发生后弥散状 LC3- I (图 A) 转变为点状聚集状 LC3- II (图 B), 箭头所指为点状聚集状 LC3- II;

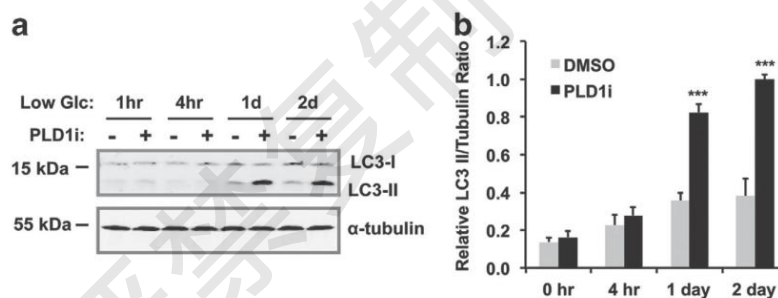


图 2. 通过统计 LC3- II / β -actin 的比值观察自噬水平高低, 该图引自文献^[1].

(2) 由于 PLD1 是本文的研究对象, 本文所使用的 PLD1 抑制剂 FIPI 是否为专一性抑制 PLD1? 对其异构体 PLD2 是否有抑制作用? 使用 FIPI 后的行为表现与 PLD2 是否也有一定关系? 请提供相应证据说明。

回复: 非常感谢专家对文章给予的真诚建议, 您的意见对我们非常重要, 本文所使用的 PLD 抑制剂 FIPI 不是专一的抑制 PLD1, 对其异构体 PLD2 也有一定抑制作用, 使用 FIPI 后的行为学表现是否与同时抑制 PLD2 有关系还需要进一步证实, 本研究从研究自噬角度出发, 研究缺血性脑卒中后病灶组织自噬与 PLD1 的关系, 据多篇文献报道^[1-3], PLD1 和自噬的关系相当密切, 但是同样作为磷脂酶 D 家族的重要成员之一的 PLD2 却鲜有和自噬相关的报道, PLD1 在自噬过程中的主要作用是调控自噬体膜结构的形成, 所以 PLD1 和非常重要的自噬相关蛋白 LC3 共定位, 在细胞胞浆内弥散型 LC3- I 转变为聚集状膜型 LC3- II 的过程中发挥非常关键的调控作用, 但 PLD2 并不和 LC3 共定位, 敲除 PLD2 后并不影响自噬水平, 所以大多数情况下, 通过广谱抑制剂 FIPI 干预 PLD1 活性达到调控自噬的目的。当然也有抑制 PLD2 可以缓解阿尔茨海默病发生过程中 β 样淀粉蛋白对神经元的损伤, 但是具体机制还需要进一步探讨。

本研究中, 主要关注缺血性脑卒中后自噬的规律, 然后观察是否干预自噬的主要调节蛋白 PLD1 能否抑制自噬水平, 促进神经功能恢复, 本研究证实, FIPI 抑制 PLD1 后可以抑制自噬从而促进神经功能恢复, PLD2 是否也改善预后, 还需要进一步通过条件性敲除 PLD2 小鼠证实, 可能 PLD2 通过其他机制影响缺血性脑卒中后神经功能的恢复。

2 文字等其他方面:

(1) 缺少缺血性脑卒中后, 已有文章的相关 PLD1 在自噬中作用机制研究中作用的描述。并需要增加此次研究与以前研究不同之处的描述。

例如: 陶少鑫, 朱彦兵, 于山平等, 小鼠缺血性脑卒中后磷脂酶 D1 在自噬和神经损伤中的作用。临床和实验医学杂志, 2019 (4) 18:790-794.

回复: 非常感谢专家对文章给予的真诚建议, 您的意见对我们完善文章非常重要, 我们已经在修稿文章中进行修改, 请见文章修改部分。

(2) 缺少对部分实验结果的讨论: 使用 PLD1 的抑制剂 FIPI 后, 为什么只显著改善其在贴纸去除实验中的行为表现, 而没有显著改善造模小鼠在触须诱发前肢放置实验中的行为表现?

回复: 非常感谢专家对文章给予的真诚建议, 您的意见对我们完善文章非常重要, 我们已经在修稿文章中进行修改,

我们通过贴纸去除实验和触须诱发前肢放置实验来评估缺血性脑卒中后神经功能的恢复情况, 两种行为学得出的结果有差异可能是和我们所用的模型有关系, 我们使用的是大脑中动脉远端结扎模型, 此模型利用了啮齿类动物桶状皮层特征, 胡须神经冲动的传入通过

Whisker-Thalamus-Barrel Cortex 途径的脑区，该模型能够模拟较为精确的点对点方式联系的损伤，所以触须诱发前肢放置实验结果更为准确，还有可能和我们的样本只数有关系，在后续实验中我们将通过增加样本只数更加准确地评估两种行为学的差异。

(3) 1.1 中：FIPI 试剂信息格式请格式与其他试剂信息保持一致，并缺货号。

回复：非常感谢专家对文章给予的真诚建议，您的意见对我们完善文章非常重要，我们已经在修稿文章中进行相应修改。

(4) 图 4B 请完整显示图片。

回复：非常感谢专家对文章给予的真诚建议，您的意见对我们完善文章非常重要，我们已经在修稿文章中进行相应图片修改。

图 5F 中的 Y 轴的每小格数值设置请与 E 轴统一，并且图 F 中 Y 轴的标题注释有误。

回复：非常感谢专家对文章给予的宝贵建议，您的意见对我们完善文章非常重要，我们已经在修稿文章中进行相应图片修改。

三、编辑部意见：有单位介绍信和基金证明和实验动物生产许可证和伦理审批件。但缺另一个基金的证明和实验动物使用许可证扫描件，正文中也应列出三证一表的编号。

回复：非常感谢编辑部对文章给予的宝贵建议，我们在修稿文章中按要求做了相应修改。

综上，附件为两位专家的审回批注稿，请仔细阅读。并以其中一份为基础，综合两位专家的修订及批注意见，以修订格式全部修改。同时提交针对上述专家意见的逐条修回说明，以便编辑审核，谢谢！

- [1] Bae E J, Lee H J, Jang Y H, et al. Phospholipase D1 regulates autophagic flux and clearance of alpha-synuclein aggregates[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(7): 1132-41.
- [2] Dall'Armi C, Hurtado-Lorenzo A, Tian H, et al. The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy[J]. Nat Commun, 2010, 1: 142.
- [3] Yoon M S. Vps34 and PLD1 take center stage in nutrient signaling: their dual roles in regulating autophagy[J]. Cell Commun Signal, 2015, 13: 44.

常务编委一终审意见：

同意外审专家的审稿意见，作者修改和回复的也很认真。总之，本研究实验做的不错，数据分析也不错，就是写的比较啰嗦，文字不够简练。此外文章中还有一些细节需要核对并说明，具体如下。

1、不同实验指标每组动物数量不同，有 3 只的，有 6 只的；实验按照术后时间分组（4hs，8hs.....），给药组不同药物浓度，等等这些划分的依据应该交代清楚；

2、文中撰写专业规范需要修正，如缩写首次应该标注全称，专业词汇格式前后一致且规范。如 C57BL/6，有时写 C57bl/6，western blotting，有时写 Western blotting..。

3、图 3 白色病灶处最好有箭头指示；

4、文本中参考文献未显示正确

常务编委二终审意见：

文章整体质量比较好，只是语言的连贯性需要加强。具体修改请见审回批注稿，重要的地方做了注释。

其中，免疫组化没增补实验；英文摘要需要修改；动物数量需要核对，图 3 是 10 只？

作者再修回说明:

尊敬的编辑和各位专家好:

非常感谢在文章《抑制磷脂酶 D1 促进缺血性脑卒中模型小鼠神经功能恢复的机制研究》中的帮助, 专家们的意见对我们文章的进一步完善非常重要, 我们进行了认真修改, 修改部位在修回稿中进行标红, 点对点修改回复如下。

定稿会终审意见汇总如下:

同意之前外审意见, 还有几个小问题需要再修改完善:

1、不同实验指标每组动物数量不同, 有 3 只的, 有 6 只的; 及实验按照术后时间分组 (4hs, 8hs.....); 及给药组不同药物浓度, 等等这些划分的依据应该交代清楚。

回复: 非常感谢专家的意见, 具体分组如下: 18 只 8 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠随机分为六组: 假手术组、缺血性脑卒中组, 缺血性脑卒中组进一步分为: 缺血性脑卒中后 4 小时组、8 小时组、12 小时组、24 小时组和 48 小时组; 36 只 8 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠随机分为六组: 假手术组、缺血性脑卒中后给予生理盐水组, 缺血性脑卒中后给予不同浓度磷脂酶 D 抑制剂 FIPI 组, 不同浓度组分别为: 0.3mg/kg 组、0.9mg/kg 组、1.8mg/kg 组和 3.6mg/kg 组; 36 只 8 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠随机分为六组: 假手术组、术后立即腹腔给予生理盐水组, 术后不同时间腹腔给予 0.9mg/kg FIPI 组, 不同时间分别为: 术后立即给药组、术后 4 小时给药组、术后 8 小时给药组和术后 12 小时给药组。

Western Blotting 实验是 3 个生物学重复, 即每组 3 只小鼠, 行为学检测实验和 TTC 染色实验是 6 个生物学重复, 即每组 6 只小鼠。

文章中用到的 PLD1 抑制剂浓度主要参考 Michael A. Frohman. et al, 2009 和 Karen M. Henkel, et al. 2016 的文章中用到的浓度, 已将该文章补充到参考文献中第 12 篇和 13 篇。

文章中缺血性脑卒中后不同时间点给 FIPI 的主要参考 Xiaoming Hu. et al, 2017 发表的文章, 已将该文章补充到参考文献中第 14 篇。

2、文中撰写专业规范需要修正, 如缩写首次应该标注全称, 专业词汇格式前后一致且规范。如 C57BL/6, 有时写 C57b1/6, western blotting, 有时写 Western blotting..。

回复: 非常感谢专家的意见, 正文中已将 C57B/6 和 Western Blotting 等调整统一。

3、图 3 白色病灶处最好有箭头指示。

回复: 在缺血性脑卒中的相关文章中, 关于 TTC 染色都是红色为正常组织, 白色为缺血脑组织, 颜色对比比较明显, 一般会将脑片切为 7 片, 基本上都不加箭头或者标记, 若全部加上箭头, 图片中箭头会比较多, 这一点和专家商榷一下, 也是可以加上。

4、文本中参考文献未显示正确, 须修改规范。

回复：非常感谢专家的意见，已按杂志要求，正文中修改了参考文献。

5、免疫组化，建议没增补实验；

回复：非常感谢专家的意见，正文增加了缺血性脑卒中发生后弥散状 LC3- I 转变为点状聚集状 LC3-II 的免疫荧光染色图，如图 2。

6、动物数量须核对，图 3 是 10 只？

回复：非常感谢专家的意见，图 3 动物是 6 只，在文章中已修改。

7、请注意语言表达的连贯性，目前有的部分写的比较啰嗦，前后重复，文字不够简练。

回复：非常感谢专家的意见，已修改文章表达不够清晰的地方。

8、对文章整体做了文字修改，具体请见文中修订及批注（DYQ 的部分）。

回复：非常感谢专家的意见，按照提示修改了文章中文字部分。

9、图表中所有内容都需要中英文对照或全英文表达，包括图表中文字和下面注解内容；

回复：非常感谢专家的意见，图表中所有内容都加了中英文表达。

10、参考文献中中文文献也请提供对应的英文。

回复：非常感谢专家的意见，已按要求修改了参考文献。

按要求修改完成后可录用。