

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.010

芍药苷对局灶性大鼠脑缺血再灌注脑组织中 SOD、Nrf2 表达的影响及神经保护作用

何锦悦, 饶梦琳, 唐 蜜, 董 志

(重庆医科大学药学院生物化学与分子药理学实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究芍药苷(paeoniflorin, PF)对局灶性大鼠脑缺血再灌注模型脑组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)在各时间点的表达情况及其神经保护作用。**方法:**将 108 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、给药组, 每组在 3、6、12、24、48、72 h 进行神经功能评分, 黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, RT-PCR、Western blot 技术测定 Nrf2 mRNA、蛋白分子的表达。**结果:**与假手术组相比, 模型组的神经功能评分明显升高, SOD 活性明显下降, Nrf2 的表达有所增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 与模型组相比, 给予 PF (20 mg/kg) 能使模型组的神经功能评分降低, SOD 活性有所升高, Nrf2 的表达持续上调, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**PF 能通过提高机体消除自由基能力和增加 Nrf2 表达来减轻局灶性脑缺血再灌注损伤后自由基引起的氧化损伤作用, 从而对缺血性脑组织起到脑保护作用。

【关键词】大脑中动脉闭塞模型; 芍药苷; 超氧化物歧化酶; 核因子 E2 相关因子 2; 抗氧化

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-03

Effect of paeoniflorin on superoxide dismutase and nuclear factor E2-related factor 2 expression in brain tissues of rats with middle cerebral artery occlusion and its neuroprotection

He Jinyue, Rao Menglin, Tang Mi, Dong Zhi

(Medical Biochemistry and Molecular Pharmacology Laboratory, School of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of paeoniflorin (PF) on superoxide dismutase (SOD) and nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in brain tissue of rats with middle cerebral artery occlusion at each time point and its neuroprotection. **Methods:** Totally 108 healthy adult male SD rats were randomized into sham operation group, model group, experimental group. Modified neurological severity score was detected at 3, 6, 12, 24, 48, 72 h. Activity of SOD was detected by xanthine oxidase technique. Nrf2 mRNA and protein expression was detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Compared with those in sham operation group, the modified neurological severity score was significantly higher, SOD activity was significantly decreased and Nrf2 expression was increased in model group with statistically differences ($P<0.05$). Compared with those in model group, giving paeoniflorin (20 mg/kg) can make the modified neurological severity score decrease, SOD activity increase, Nrf2 expression increase with statistically differences ($P<0.05$). **Conclusion:** Paeoniflorin can reduce the oxidative damage in brain tissues of rats with middle cerebral artery occlusion caused by free radicals by improving the capacity of body eliminating free radicals and increasing the expression of Nrf2.

【Key words】middle cerebral artery occlusion model; paeoniflorin; superoxide dismutase; nuclear factor E2-related factor 2; antioxidation

脑缺血再灌注损伤机制包括相互承启、交互作用的数个机制, 而内源性和外源性的亲电子物质引

起的氧化应激和细胞毒损伤是脑缺血继发性脑损伤的重要机制之一^[1]。脑缺血发生后细胞内许多氧化物质增多, 使活性氧簇生成急剧增加, 大量自由基的产生导致超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性下降, SOD 活性大小间接反映了机体清除氧自由基的能力, 所以测定 SOD 活性可以反映机体

作者介绍: 何锦悦, Email: hejinyue1990@163.com,

研究方向: 神经药理学。

通信作者: 董 志, Email: zhidong073@hotmail.com。

基金项目: 重庆自然科学基金资助项目 (编号: 2009BA5086)。

过氧化化的程度^[2]。在创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)中,已发现 Keap1-Nrf2/ARE 通路是细胞内重要的抗氧化及细胞毒防御机制之一^[3]。上调此信号通路可诱导多种抗氧化酶及解毒酶,加速酶促反应,提高谷胱甘肽及 SOD 等抗氧化物质的表达水平,清除自由基等氧化物质,维持细胞内的正常电位水平,发挥细胞保护作用^[4]。本实验将对局灶性大鼠脑缺血再灌注模型脑组织中的 SOD、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)的表达进行测定,验证芍药苷(paeoniflorin, PF)能否通过提高机体清除自由基能力和增加 Nrf2 表达来减轻自由基引起的氧化损伤作用,从而对缺血性脑组织有脑保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级成年健康全雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 108 只,体质量为 280~300 mg,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂及仪器

PF(纯度≥98%)由陕西森弗高科实业有限公司提供;总 SOD 活性检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;RT-PCR 上下游引物由上海生工生物工程技术有限公司设计及提供;兔抗大鼠 Nrf2 多克隆抗体购自美国 bioworld 公司;Trizol Reagent,兔抗大鼠 β -actin 单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体,超敏 ECL 化学发光试剂盒,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,Western 及 IP 细胞裂解液均购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR 扩增仪,电泳仪及电泳槽和凝胶扫描分析系统采用美国 bio-rad 公司生产;酶标仪(奥地利博塞公司);图像分析系统软件(美国 Imaging 公司)。

1.3 分组及给药

对所有大鼠进行编号,按随机数字表将大鼠随机分为 18 组,分别为 3、6、12、24、48、72 h 假手术组,模型组,给药组[术前 48、24 h 腹腔注射 PF 3 ml(20 mg/kg)再建立中动脉闭塞模型],假手术组和模型组同样时间腹腔注射 3 ml 生理盐水,大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,自组 6 只。

1.4 模型建立

参照 Longa 等^[5]和 Koizumi 等^[6]的线栓法制作大鼠右侧大脑中动脉闭塞模型。使用鱼线制作线栓,线的栓头端用酒精灯火焰烧成球形,线栓长度 40 mm,在 18~24 mm 段用黑色记号笔标出,制作完成后阴干,使用前以 75%酒精消毒,然后置于生理盐水中备用^[6]。大鼠称质量,腹腔注射 3.5%水合氯醛(10 ml/kg)麻醉后,仰卧固定。于颈部正中靠右 0.5 cm 处开口,切口长 1.5~2.0 cm,暴露右侧颈总动脉和颈外动脉。分离与颈总动脉伴行的迷走神经,在距颈总动脉分叉处近端 0.5~0.6 cm 处结扎颈总动脉,在此结扎线与分叉之间,另置未拉紧的丝线备用,结扎颈外动脉。用动脉夹夹闭颈内动脉后,在备用线与颈总动脉结扎线之间剪一小切口,将制备好

的线栓送入切口,向内推至动脉夹处,将备用线扎紧,随即松开动脉夹。将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行插入,直到线栓上的黑色标记超过颈总动脉分叉处停止,即可造成大脑中动脉血供阻断。线栓成功插入后,剪去多余线栓尾部,逐层缝合切口的肌肉及皮肤,外用酒精和碘伏消毒。假手术组除了不插入线栓以外,其他步骤皆相同。各组大鼠手术完成之后,放入洁净饲养笼中,注意为大鼠保温,自由饮水,阻塞缺血 90 min 后,轻轻把线栓拔出进行再灌注,再根据实验计划分别进行处理^[7]。

1.5 神经功能评分

各组大鼠分别在术后 3、6、12、24、48、72 h 进行神经功能评分,采用以下基于 Longa 评分法^[5]改良的 6 分法:0 分,没有神经功能缺损;1 分,对侧(瘫痪侧)前肢不能完全伸展;2 分,对侧(瘫痪侧)前肢不能伸展;3 分,稍往对侧(瘫痪侧)转圈(转大圈);4 分,向对侧(瘫痪侧)明显转圈(转小圈);5 分,行走时大鼠向对侧(瘫痪侧)倾倒。0 分视为假手术,2、3、4 分者视为造模成功,5 分者应剔除,分值越高说明动物行为障碍越严重。

1.6 SOD 活性测定

动物处死后迅速断头取脑,取病变侧,去除小脑和延髓部分,距额极 2.5 mm 后切取约 10 mg 脑组织。称质量后放入-20℃预冷的玻璃匀浆器内,加 9 倍预冷的生理盐水,冰上匀浆到肉眼看不见悬浮物为止,将匀浆液转移至离心管内(10 ml),4℃,3 500 r/min 离心 15 min,吸取上清液待测^[8]。按总 SOD 活性检测试剂盒说明书操作,得到每组样品的吸光度值,结果按公式:SOD 活力(U/mgprot)=(CA-TA)/CA÷50%×反应液中体积/取样量÷TP(mgprot/ml)计算^[8]。

1.7 RT-PCR 法检测 Nrf2 mRNA 的表达

动物麻醉后,仰躺固定,用生理盐水进行心脏灌流清除血液后,断头取脑,取病变侧,去除小脑和延髓部分,距额极 2.5 mm 后切取约 10 mm 脑组织中病变侧皮层组织 80 mg 样品,在液氮中研磨充分后,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,经过反转录、PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳得到 RT-PCR 结果。Nrf2 上游引物:5'-TTCTCTGCTGCCATTAGTCAGTC-3',下游引物:5'-GCTCTTCCATTTCCGAGTCACTG-3'。 β -actin 上游引物:5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3', β -actin 下游引物:5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'。Nrf2 反应条件为:94℃预变性 5 min,95℃30 s,57℃30 s,72℃30 s,共 35 个循环,72℃延伸 5 min; β -actin 反应条件为:95℃预变性 5 min,95℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环,72℃延伸 5 min。

1.8 Western blot 法检测 Nrf2 蛋白的表达

同样进行心脏灌流清除血液后取 100 mg 样品,按裂解液说明书提取总蛋白,操作过程均在冰上进行。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度,计算得到上样体积,再制备好蛋白上样缓冲液,通过电泳,转膜,封闭,孵一、二抗体,化学发光得到 Western blot 结果。

1.9 数据采集与统计学分析

用 Image Lab 软件处理 RT-PCR、Western blot 结果,采集每个条带的积分吸光(integral absorption, IA)值,用 Nrf2 的

IA 值/ β -actin 的 IA 值来表示 Nrf2 的相对表达量。神经功能评分、SOD 活性、Nrf2 表达的结果均用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学分析,分析方法为单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 法。检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 神经功能评分

假手术组无明显神经功能症状缺损;模型组和给药组各时间点均有明显神经能症状缺损,评分均高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明实验造模成功;模型组随着时间的延长,24 h 达到高峰;给药组与同时时间点模型组相比,明显改善了神经功能缺损症状,评分有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 PF 能明显减轻模型组大鼠的神经功能缺损症状,降低其神经功能评分,减轻脑缺血模型造成的损害,对脑缺血有明显的保护作用,见表 1。

2.2 各组大鼠脑组织 SOD 测定结果

假手术组脑组织中 SOD 活性最高且随着时间的延长,没

有太大变化;模型组脑组织中 SOD 活性均明显低于假手术组,在 3 h 开始显著下降,直到 72 h 开始缓慢回升,差异有统计学意义($P<0.05$);给药组脑组织 SOD 活性在 3 h 与假手术组相比无明显变化,在 6 h 开始显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);与同时点模型组比较 SOD 活性均有不同程度升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 PF 能明显增加 SOD 的活性,减轻脑缺血模型造成的损害,对脑缺血有明显的保护作用,见表 2。

2.3 各组大鼠脑组织中 Nrf2 mRNA 表达的情况

假手术组 Nrf2 mRNA 呈低水平表达且随着时间的延长,没有明显变化;模型组在 3 h 开始升高,6 h 及 72 h 与假手术组无明显差异,12 h 开始显著升高,48 h 达到高峰;给药组各组均明显高于假手术组且随着时间的增加,表达持续升高;与模型组相比,给予 PF 后 Nrf2 mRNA 的表达均有不同程度的升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 PF 能增加 Nrf2 mRNA 的表达,减轻脑缺血模型造成的损害,对脑缺血有明显的保护作用,见表 3,图 1、2。

表 1 各组大鼠的神经功能评分结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Results of modified neurological severity score in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	神经功能评分(分)					
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	0.17 $\pm$ 0.41	0.33 $\pm$ 0.52	0.50 $\pm$ 0.84	1.67 $\pm$ 0.82	1.17 $\pm$ 0.75	0.33 $\pm$ 0.52
模型组	6	3.00 $\pm$ 0.63 ^a	3.67 $\pm$ 0.52 ^a	4.17 $\pm$ 0.75 ^a	4.50 $\pm$ 0.55 ^a	3.83 $\pm$ 0.75 ^a	3.00 $\pm$ 0.63 ^a
给药组	6	2.83 $\pm$ 0.75 ^{ab}	3.17 $\pm$ 0.75 ^{ab}	2.83 $\pm$ 0.75 ^{ab}	3.17 $\pm$ 0.75 ^{ab}	2.50 $\pm$ 1.05 ^{ab}	2.00 $\pm$ 0.89 ^{ab}
F 值		40.147	52.879	33.818	23.587	14.328	22.273
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与假手术组比 $P<0.05$;b,与模型组比 $P<0.05$

表 2 各组大鼠脑组织 SOD 测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Results of SOD activity in brain tissues in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	SOD活性(U/mgprot)					
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	117.19 $\pm$ 3.93	117.34 $\pm$ 0.99	116.05 $\pm$ 3.24	115.82 $\pm$ 1.19	115.85 $\pm$ 1.77	116.38 $\pm$ 1.75
模型组	6	85.93 $\pm$ 3.07 ^a	77.37 $\pm$ 1.29 ^a	72.47 $\pm$ 0.64 ^a	68.80 $\pm$ 1.77 ^a	64.37 $\pm$ 1.18 ^a	68.22 $\pm$ 3.93 ^a
给药组	6	115.01 $\pm$ 2.03 ^b	100.96 $\pm$ 1.54 ^{ab}	99.10 $\pm$ 2.68 ^{ab}	89.15 $\pm$ 5.01 ^{ab}	83.78 $\pm$ 3.58 ^{ab}	78.31 $\pm$ 3.93 ^{ab}
F 值		189.114	1 458.904	480.906	337.802	701.242	341.872
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与假手术组比 $P<0.05$;b,与模型组比 $P<0.05$

表 3 各组大鼠脑组织中 Nrf2 mRNA 表达的半定量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Semi-quantitative analysis of Nrf2 mRNA expression in brain tissues in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	Nrf2 mRNA/ β -actin mRNA					
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	0.22 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.06
模型组	6	0.32 $\pm$ 0.06 ^a	0.26 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.01 ^a	0.46 $\pm$ 0.09 ^a	0.52 $\pm$ 0.06 ^a	0.31 $\pm$ 0.01
给药组	6	0.56 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.62 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.73 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.83 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.94 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.96 $\pm$ 0.01 ^{ab}
F 值		144.470	452.081	1 312.184	162.831	464.495	750.619
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与假手术组比 $P<0.05$;b,与模型组比 $P<0.05$

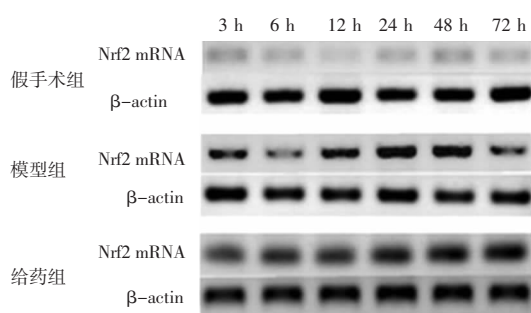


图 1 RT-PCR 法在不同时间点检测到 Nrf2 mRNA 表达的结果

Fig.1 Expression of Nrf2 mRNA at different time points by RT-PCR

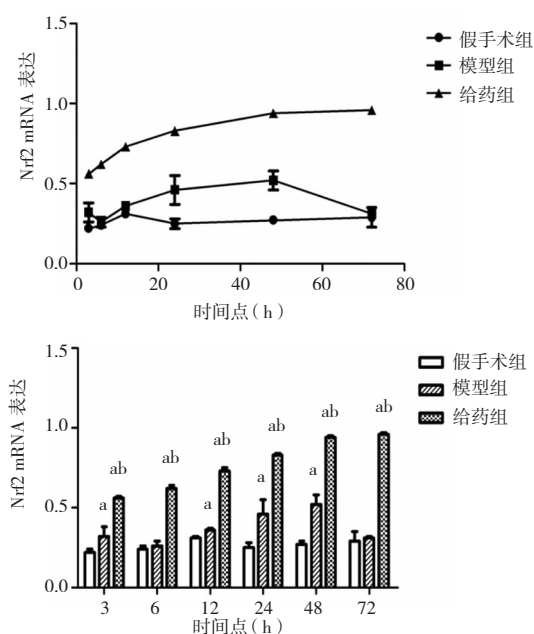
a, 与假手术组比, $P < 0.05$; b, 与模型组比, $P < 0.05$

图 2 各组 Nrf2 mRNA 表达随时间的变化 (左) 及两两之间的比较结果 (右)

Fig.2 Changes in Nrf2 mRNA expression (left) and comparison between two groups (right)

2.4 各组大鼠脑组织中 Nrf2 蛋白的表达情况

假手术组的 Nrf2 蛋白呈低水平表达且随着时间的延长,没有明显变化;与假手术组相比,模型组在 3 h 无明显差异,6 h 明显升高,48 h 达到高峰,72 h 有所回落,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);各给药组均明显高于假手术组,且随着时间

的增加,表达持续升高;与模型组相比,给予 PF 后 Nrf2 蛋白的表达均有不同程度升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 PF 能增加 Nrf2 蛋白的表达,减轻脑缺血模型造成的损害,对脑缺血有明显的保护作用,见表 4,图 2、4。

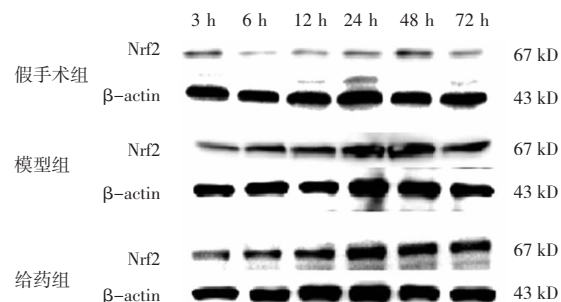


图 3 Western blot 法在不同时间点检测到 Nrf2 的表达结果

Fig.3 Expression of Nrf2 at different time points by Western blot

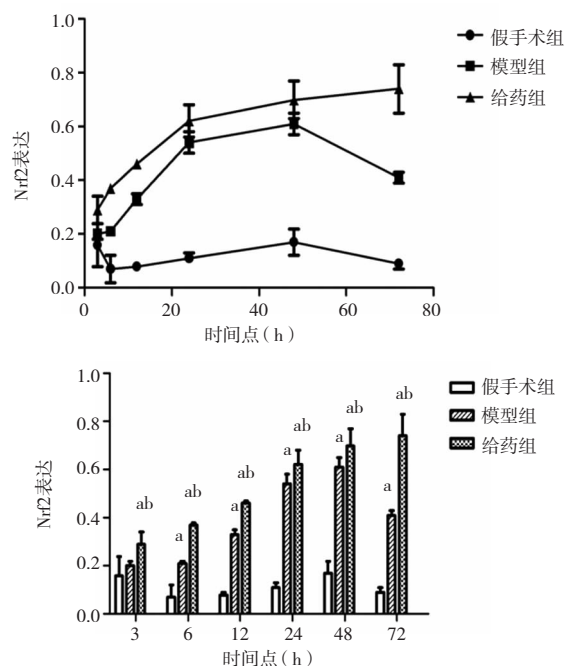
a, 与假手术组比, $P < 0.05$; b, 与模型组比, $P < 0.05$

图 4 各组 Nrf2 蛋白表达随时间的变化 (左) 及两两之间的比较结果 (右)

Fig.4 Changes in Nrf2 protein expression (left) and comparison between two groups (right)

表 4 各组大鼠脑组织中 Nrf2 蛋白表达的半定量分析 ($\bar{x} \pm s$)Tab.4 Semi-quantitative analysis of Nrf2 protein expression in brain tissues in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	Nrf2/β-actin					
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	0.16 ± 0.08	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.09 ± 0.02
模型组	6	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.01 ^a	0.33 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.02 ^a
给药组	6	0.29 ± 0.05 ^{ab}	0.37 ± 0.01 ^{ab}	0.46 ± 0.01 ^{ab}	0.62 ± 0.06 ^{ab}	0.70 ± 0.07 ^{ab}	0.74 ± 0.09 ^{ab}
F 值		8.101	127.855	837.987	225.850	147.826	231.897
P 值		0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 与假手术组比 $P < 0.05$; b, 与模型组比 $P < 0.05$

3 讨 论

Nrf2 分子大小约为 67 kD, 它的细胞质接头蛋白 Keap1 是细胞抗氧化反应的中枢调节者, 通过与抗氧化反应元件 ARE 相互作用, 诱导编码抗氧化蛋白和 II 相解毒酶表达, 它们协同构成多效的细胞内抗氧化及解毒防御体系, 清除氧自由基, 驱除内源性 & 外源性化学物质引起的细胞毒作用, 维持细胞内的氧化还原电位。已有的研究证明在 TBI 中 Keap1-Nrf2/ARE 调节的下游物质有: 血红素加氧酶-1 和 醌氧化还原酶 1, 内源性谷胱甘肽、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 、IL-6、NF- κ B、细胞间黏附分子-1、抗氧化酶和解毒酶谷胱甘肽 S 转移酶 α -1^[9]。芍药苷具有抗自由基损伤, 抑制细胞内钙超载和抗神经毒性等活性, 体内实验证明其有降低血液黏度、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环、抗氧化、抗惊厥等多种生物学效应, 并且毒副作用较小, 但对于其对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用机制和作用路径尚不是很明确^[10]。

本实验主要研究 PF 在脑缺血再灌注损伤中抗氧化应激的作用机制, 通过将 Koizumi 法^[11]和 Longa 法^[12]结合在一起, 严格控制大鼠体质量在 280~300 g 之间, 并全部采用雄性, 以消除性别对本实验的影响, 线栓插入深度 18~24 mm, 线栓头端增粗部直径约 0.26 mm, 使绝大多数动物神经功能缺损评分稳定在 2~4 分, 假手术组无明显神经功能症状缺损, 模型组和给药组各时间点均有明显神经能症状缺损, 说明造模成功, 给予 PF 能明显改善神经功能症状缺损。用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, 假手术组脑组织中 SOD 活性最高且随着时间的延长, 没有太大变化; 模型组脑组织中 SOD 活性较假手术组明显下降, 说明损伤后脑组织大量自由基产生, 引起强烈的脂质过氧化作用及产生大量的脂质过氧化产物, 且在消除自由基过程中消耗了大量 SOD, 随造模时间延长, SOD 活性进一步下降; 给予 PF 后 SOD 活性均有不同程度升高。用 RT-PCR、Western blot 检测 Nrf2 在 mRNA 及蛋白水平的表达, 假手术组呈低水平表达且随着时间的延长, 没有明显变化, 模型组 Nrf2 在 mRNA 及蛋白水平的表达有所增加, 说明损伤后脑组织产生的活性氧或亲电子物质的信号能使 Nrf2 被磷酸化后从复合物中解离, 构成新异二聚体后又与抗氧化反应元件 ARE 上 GCT-GAGTCA 位点结合, 使下游靶基因的表达得以激活, 从而发挥神经细胞保护作用; 给予 PF 后能进一步上调 Nrf2 表达^[13]。

通过本研究, 说明给予 PF 可以明显改善神经功能症状缺损, SOD 活性有所升高, Nrf2 表达的持

续上调, 对局灶性脑缺血损伤有明显的抗氧化应激的保护作用, 其机制是通过增加 SOD 活性和上调 Nrf2/ARE 信号通路来抑制细胞内钙离子超载, 抗自由基, 对缺血、缺氧引起的脑血管缩舒功能障碍有良好的改善作用, 对脑缺血后再灌注期间血脑屏障具有保护作用, 并可促进再灌注早期脑血流的恢复作用。

但本研究还有一定缺陷, 没有对 Nrf2 进行一定干预, 无法证明 SOD 活性的增加与上调 Keap1-Nrf2/ARE 通路之间的相关性或因果性。将进行下一步研究, 通过增加 Nrf2 基因敲除大鼠 (Nrf2^{-/-}) 假手术组、模型组和给药组, 与正常大鼠 (Nrf2^{+/+}) 假手术组、模型组、给药组, 在同时间点用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性和 RT-PCR、Western blot 法检测 Nrf2 的表达, 结果做两两比较和相关性分析, 来探讨 SOD 活性的增加是否是通过 Keap1-Nrf2/ARE 通路的上调来实现和 PF 的抗氧化神经保护作用。而 PF 的其他神经保护作用的机制及作用路径研究尚不明确, 还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 李 敏. Nrf2、HO-1 在实验性大鼠脑缺血再灌注模型中的动态表达及氧化苦参碱的神经保护作用[D]. 河北医科大学, 2009.
- [2] 陈广斌, 陈华萍, 吴 铁, 等. 芍药苷对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织丙二醛、超氧化物歧化酶的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(16): 1272-1273.
- [3] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100-103.
- [4] 李雪丽, 唐 云, 许雪珠, 等. 核转录因子 Nrf2 最新研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4530-4534.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] 杨晨辉. Nrf2 与 HO-1 在实验性脑梗死大鼠脑组织中的动态表达及姜黄素脑保护作用的研究[D]. 河北医科大学, 2009.
- [7] Shah ZA, Li RC, Thimmulappa RK, et al. Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury[J]. Neuroscience, 2007, 147(1): 53-59.
- [8] 陈广斌. 丹参素、芍药苷对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤保护作用的研究[D]. 广东医学院, 2007.
- [9] 王君萍, 韦颖梅, 郭 梅, 等. 芍药苷对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡相关基因的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(3): 310-312.
- [10] 林桂平, 向秋玲, 陈健文, 等. 芍药苷对脑缺血损伤的保护作用及其对脑血管通透性的影响[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(2): 151-154.
- [11] Ren J, Fan C, Chen N, et al. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats[J]. Neurochem Res, 2011, 36(12): 2352-2362.

(责任编辑: 关蕴良)