

# 大鼠脑缺血后海马 CA2 区 FLVCR 和 BCRP 的表达及 益气活血法干预

廖君, 陈懿, 夏兴, 罗琳, 石咏梅, 余清平, 葛金文

(湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410208)

[关键词] 猫白血病 C 亚类病毒受体; 胸腺癌抵抗蛋白; 脑泰方提取物; 脑缺血

[摘要] **目的** 研究脑缺血后血红素铁转运蛋白人类猫白血病 C 亚类病毒受体 (feline leukemia virus subgroup C receptor, FLVCR) 及胸腺癌抵抗蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) 随时间表达及益气活血法脑泰方 (黄芪、川芎、地龙、僵蚕) 提取物干预对 FLVCR 及 BCRP 表达的影响。**方法** 实验分两步进行, 第一部分实验: 随机将 SD 大鼠分为 2 h、6 h、12 h、24 h、72 h 组, 采用大脑中动脉栓塞法 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 行大鼠局灶性脑缺血模型制备, 分别在术后 2 h、6 h、12 h、24 h、72 h 各时间点取材, 通过免疫组织化学及 RT-PCR 检测 FLVCR 和 BCRP 及 FLVCR mRNA 和 BCRP mRNA 随时间表达的变化。第二部分实验, 随机将 SD 大鼠分为假手术组、模型组、脑泰方低、中、高剂量组 (3、9、27 g/kg)。各组大鼠预处理藻胃给药连续 3 天, MCAO 模型制备术后连续藻胃给药 3 天, 每日 1 次。术后 3 天取材, 电镜检测海马神经元内铁样颗粒分布, 免疫组织化学及 RT-PCR 检测 FLVCR 和 BCRP 及 FLVCR mRNA 和 BCRP mRNA 表达。**结果** 72 h 组 FLVCR 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), BCRP 的表达 2 h、6 h 较高, 12 h、24 h、72 h 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 电镜下脑泰方各剂量组神经元内铁样颗粒聚集较模型组减少。脑泰方高剂量组 FLVCR 及 FLVCR mRNA 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), BCRP 表达无明显改变。**结论** 大鼠脑缺血后第 72 h FLVCR 表达下降, 益气活血中药脑泰方提取物干预可增加脑缺血后 FLVCR 的表达, 促进血红素铁的外排, 可能是治疗脑缺血损伤的新机制。

[中图分类号] R255

[文献标识码] A

## Research on Expression of FLVCR and BCRP in Hippocamp CA2 of Rats Subjected to Cerebral Ischemia and Traditional Chinese Medicine of Supplementing Qi and Activating Blood Circulation Intervention Effects

LIAO Jun, CHEN Yi, XIA Xing, LUO Lin, SHI Yong-Mei, YU Qing-Ping, and GE Jin-Wen

(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] Feline Leukemia Virus Subgroup C-receptor; Breast Cancer Resistance Protein; Naotai Formula Extract; Cerebral Ischemia

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of FLVCR and BCRP at different time points and effects of traditional herbal medicines NTE (extract of HuangQi, Chuan Xiong, Di Long, Jiang Can) on FLVCR and BCRP after Focal Cerebral Ischemia in rats. **Methods** The experiment is carried out by two steps. Firstly, SD rats were randomly divided into 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h groups, after operation of middle cerebral artery occlusion (MCAO), FLVCR, BCRP and FLVCR-mRNA, BCRP-mRNA expressions were detected by immunohistochemistry and RT-PCR just at 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h time points. Secondly, The rats were randomly allotted 5 groups as following: sham operation group, model group, low dose group of NTE (3 g/kg), medial dose group of NTE (9 g/kg), large dose group of NTE (27 g/kg). After 3 days of corresponding therapy by in-

[收稿日期] 2014-01-14

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (81303078); 湖南省自然科学基金 (12JJ6076); 湖南省自然科学基金 (13JJ3100); 湖南省中医药管理局基金 (201240); 湖南省教育厅项目基金 (12C0269); “中西医结合基础”湖南省“十二五”重点学科资助; “中医药防治心脑血管疾病基础研究”湖南省自然科学基金创新群体基金资助; “中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究”湖南省高校科技创新团队资助

[作者简介] 廖君, 讲师, 博士, 从事脑血管病的中医药防治研究, E-mail 为 84085006@QQ.com。通讯作者葛金文, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 40831556@QQ.com。

tragastric administration once every day, the regional cerebral ischemia model was reproduced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with suture method. Following 3 days, the rats were treated with previous method. On the third day, The iron particles of neurons were observed by Electron microscopic. FLVCR and BCRP in hippocampal CA2 region were measured by immunohistochemical method and FLVCR-mRNA and BCRP-mRNA were detected by RT-PCR with marketable kit. **Results** Expression of FLVCR in hippocamp CA2 descend at the point of 72nd hour after operation ( $P < 0.05$ ), and expression of BCRP decreased at 12 h after operation, and at 24 h and 72 h maintained low level ( $P < 0.05$ ); each dose group of NTE showed less iron particles of neuron in the electron microscope scanning; expression of the FLVCR and FLVCR-mRNA increased in each NTE dose group ( $P < 0.05$ ), the expression of BCRP had no obvious change. **Conclusion** Expression of FLVCR in hippocamp CA2 descend at the point of 72 hour after operation, the large dose group of NTE can increase the expression of FLVCR and FLVCR-mRNA after cerebral ischemia. Increased expression of FLVCR and excessive iron efflux, may be the mechanism of Yiqihuoxue Naotai formula extract for treatment of cerebral ischemic injury.

脑部动脉因痉挛或栓塞导致该动脉供血区的血流减少称为脑缺血。脑缺血后无氧代谢, ATP 生成减少, 乳酸生成, 及兴奋性氨基酸生成增多等原因导致局部脑组织及其功能损害<sup>[1]</sup>。铁是人体内必需的化学元素之一, 是神经递质及髓鞘蛋白合成的重要酶的辅基。近年来, 研究发现血红素铁聚集与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中 $\beta$ 淀粉样蛋白沉积的发病机理相关联<sup>[2-3]</sup>。人类猫白血病 C 亚类病毒受体(feline leukemia virus subgroup C receptor, FLVCR)和胸腺癌抵抗蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)为两种血红素铁输出蛋白。本实验通过观察脑缺血后不同时间点 FLVCR 和 BCRP 的表达, 及脑泰方提取物(naotai formula extract, NTE)干预对 FLVCR 和 BCRP 的影响, 研究血红素铁作为导致脑缺血损伤发生的机制, 及益气活血脑泰方提取物干预治疗脑缺血的新机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

100 只 SD 雄性大鼠, 体重 250 ~ 280 g。由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(湘)2009-0004, 符合清洁级实验动物标准。

### 1.2 药物

脑泰方提取物分别为黄芪、川芎、地龙、僵蚕四味药, 按照 8:2:3:3 比例组成, 经水煎、醇提后制成浸膏粉(由湖南中医学院药学院制剂教研室提取), 1 g 浸膏粉含 4 g 生药粉。临用时以生理盐水调成所需浓度。

### 1.3 试剂与仪器

FLVCR 多克隆抗体(SANTA CLUZ); BCRP 多克隆抗体(Proteintech); RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒; TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒;  $2 \times$  Taq PCR MasterMix(合成染料); TRIzol-in-vitrogen(Invitrogen); 马头牌 GPS 型双极电凝器(上

海医用激光仪器厂生产); 彩色图像分析系统(Optimas, 美国); Eppendorf PCR 仪; Eppendorf PCR 仪; HT7700 型透射电镜(日立)。

### 1.4 分组及给药方法

第一部分实验: SD 大鼠 50 只, 随机分 5 组, 每组 10 只, 分别为 2 h、6 h、12 h、24 h 和 72 h 组。按照 MCAO 造模后 2 h、6 h、12 h、24 h 和 72 h 时间点取材分组。第二部分实验: SD 大鼠 50 只, 随机分 5 组, 每组 10 只, 分别为高剂量脑泰方组(27 g/kg), 中剂量脑泰方组(9 g/kg), 低剂量脑泰方组(3 g/kg), 假手术组, 模型组。药物剂量按大鼠体表面积折算等效比率计量表, 计算出大鼠的等效剂量。模型组予生理盐水, 治疗组分别给予相应药物术前灌胃 3 天, 术后灌胃 3 天, 每日 1 次。

### 1.5 大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型制备

参照 Garcia 建立的方法<sup>[4]</sup>改进。实验大鼠选用 250 ~ 280 g SD 大鼠, 线栓用直径 0.28 mm 的鱼线, 前端蘸蜡成为光滑膨大的球形。动物用 10% 水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉。仰卧位固定, 颈正中中线切口, 沿胸锁乳突肌内缘分离筋膜和肌肉, 分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA), 在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处挂线备用。用微动脉夹暂时夹闭 ICA, 然后近心端结扎 CCA、ECA。在距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口, 将拴线插入到 ICA。从血管分叉处开始算距离, 当插入深度在 18 mm 时(一定要将血管放松至原来状态, 且保证标记点在分叉处, 由于是黑色标记所以容易看的), 紧紧系牢 CCA 远心端的细线, 此时的关键是动作轻柔, 不要使 ICA 有任何的牵拉, 否则拴线会脱出。血管外的拴线不要留得过长, 不要缝在皮外, 以防大鼠醒来自己拔出。缝合伤口, 单笼饲养观察。

### 1.6 电镜检测

2.5% 的戊二醛, 固定 24 h; 2% 的锇酸固定 2 h;

梯度脱水:50%、70%、90%、100%的丙酮脱水,每级 10 min×3 次;环氧树脂混合液:纯丙酮=1:1,37℃,浸泡 24 h;Epon812 (epoxiaquivalentgewicht 145-160)、DDSA (dodecenylsuccinic anhydride)、MNA (methyl nadic anhydride)、DMP30 (dimethylaminomethyt phenol),60℃,24 h 包埋成块;半薄切片,甲苯氨蓝染色观察,选取所需要的部位;瑞典产 LKB-III 型超薄切片机切片,厚约 500 埃;醋酸铀,硝酸铅双重染色;日立 HT7700 型透射电镜观察、照片。

1.7 免疫组织化学染色

石蜡切片烘烤,脱蜡,蒸馏水冲洗 3 min×2,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 10 min,蒸馏水冲洗 3 min×2,微波修复,PBS 冲洗 5 min×3,加稀释 100 倍的兔抗鼠 FLVCR 及 BCRP 37℃ 2 h,PBS 冲洗 5 min×3,加二抗 PV-600/山羊抗兔 IgG 37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min×3,DAB 显色。阳性细胞浆或细胞核着色呈棕黄色,切片于光镜下 400 倍放大,经图像分析仪每个切片随机选择 5 个视野。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件检测每张图片 IOD 值。

1.8 RT-PCR

提组织总 RNA,将约 100 mg 组织加到 1 mL TRIZOL 中,用组织匀浆机匀浆(加 TRIZOL 的量可为 1 mL/g 组织,样品体积不能超过加 TRIZOL 的 10%);mRNA 逆转录;2X pcr mix: 10 μL,Template: 3 μL,Primer F: 1 μL,Primer R: 1 μL,ddH<sub>2</sub>O: 5 μL,PCR 程序:94℃:4 min,94℃:15 s,56℃:30 s,72℃:30 s,72℃:5 min,28 个循环。

FLVCR 引物设计:Sense 5'-CTCCTGGCTCACA-CACAGAA -3'; Antisense 5'- GGGATGTTTCTGCA-CAGGTT -3'。

BCRP 引物设计: Sense 5'- AGTCCGGA AAA-CAGCTGAGA -3'; Antisense 5'- CCCATCACAA CGT-CATCTTG -3'。

Actin Sense: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'; Actin Antisense: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。

1.9 统计方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学检测海马 CA2 区 FLVCR 和 BCRP 表达

与 12 h 组比较,72 h 组 FLVCR 的积分光密度

值(IOD)较低(*P* < 0.05),2 h、6 h、24 h 组与 12 h 组 IOD 值无明显差异;12 h、24 h、72 h 组 BCRP 的 IOD 值较 2 h、6 h 组显著降低(*P* < 0.05;表 1)。

表 1. 免疫组化检测脑缺血后各时间组 FLVCR 和 BCRP 的 IOD 值( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. IOD of FLVCR and BCRP expression in Hippocampal CA2 area at different time points by immunohistochemical detection

分 组	<i>n</i>	FLVCR(IOD 值)	BCRP(IOD 值)
2 h 组	10	567.38 ± 52.57 <sup>b</sup>	1074.32 ± 71.28 <sup>ab</sup>
6 h 组	10	574.03 ± 57.56 <sup>b</sup>	1079.55 ± 65.82 <sup>ab</sup>
12 h 组	10	457.24 ± 33.26 <sup>b</sup>	718.80 ± 61.77
24 h 组	10	485.51 ± 45.78 <sup>b</sup>	650.51 ± 58.31
72 h 组	10	195.95 ± 43.77 <sup>a</sup>	829.11 ± 39.44

a 为 *P* < 0.05,与 12 h 组比较; b 为 *P* < 0.05,与 72 h 组比较。

2.2 RT-PCR 检测海马 CA2 区 FLVCR mRNA 及 BCRP mRNA 表达

72 h 组 FLVCR mRNA 灰度比值较 2 h、6 h、12 h、24 h 组低(*P* < 0.05),2 h、6 h、12 h、24 h 组间无差异;脑缺血后 12 h、24 h、72 h 组较 2 h 及 6 h 组 BCRP mRNA 灰度比值降低(*P* < 0.05),12 h、24 h、72 h 组间差异无显著性(图 1)。

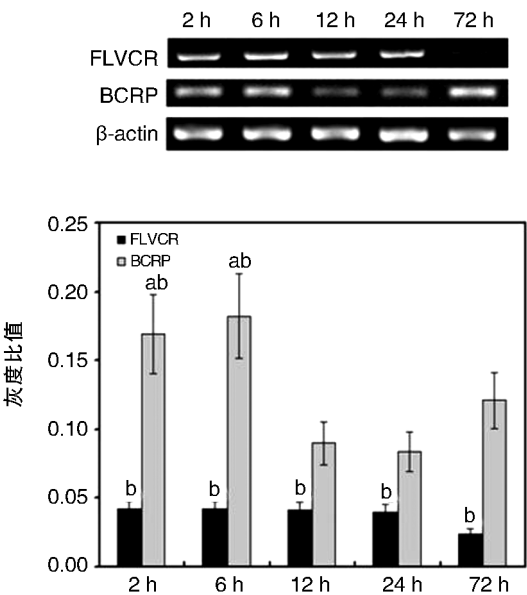


图 1. 各时间组 RT-PCR 检测脑缺血后海马 CA2 区不同时间点 FLVCR mRNA 和 BCRP mRNA 的表达 A 为脑缺血后第 2、6、12、24 和 72 h RT-PCR 结果,B 为脑缺血后不同时间组的 FLVCR/mRNA 和 BCRP/mRNA 灰度比值。a 为 *P* < 0.05,与 12 h 组比较,b 为 *P* < 0.05,与 72 h 组比较。

Figure 1. RT-PCR detection of different time points group



2.3 电镜检测结果

电镜下海马神经元胞体膨大,胞核大而圆<sup>[5]</sup>。假手术组细胞核及细胞器基本正常,无高密度颗粒;模型组细胞胞浆重度水肿,核圆形,裸核,核内及胞浆内聚集铁样高密度颗粒;NTE 高剂量组胞浆内质网扩张,水肿,内有少量铁样高密度颗粒;NTE 中剂量组细胞核及胞浆内少量高密度颗粒,内质网扩张,水肿;NTE 低剂量组核内及胞浆内质网及线粒体高密度颗粒较多,内质网扩张,线粒体水肿(图2)。

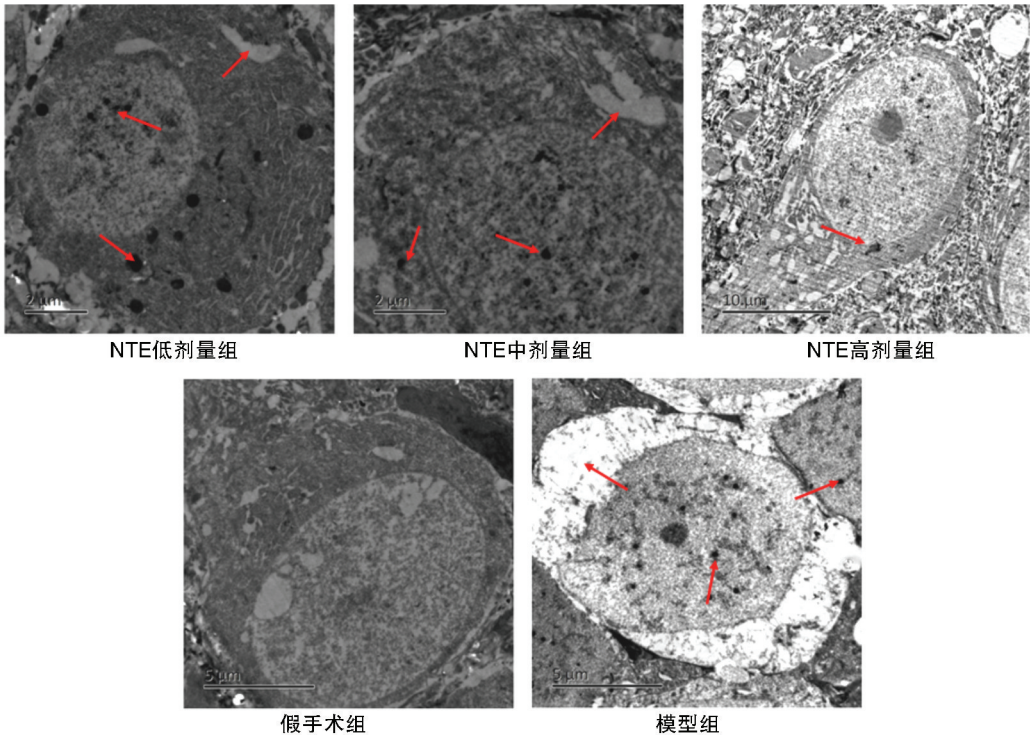


图 2. 电镜检测( ×1000)

Figure 2. electron microscope detection( ×1000)

表 2. 脑缺血后各治疗组 FLVCR 和 BCRP 的 IOD 值( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2. IOD of FLVCR and BCRP expression in Hippocampal CA2 area at different doses by immunohistochemical detection

分 组	n	FLVCR( IOD)	BCRP( IOD)
假手术组	10	2188. 52 ± 206. 65 <sup>a</sup>	1439. 89 ± 95. 94 <sup>a</sup>
模型组	10	377. 09 ± 89. 44 <sup>b</sup>	1089. 28 ± 61. 67 <sup>b</sup>
NTE 低剂量组	10	677. 95 ± 92. 07 <sup>b</sup>	703. 47 ± 63. 74 <sup>b</sup>
NTE 中剂量组	10	820. 39 ± 169. 02 <sup>b</sup>	819. 92 ± 49. 28 <sup>b</sup>
NTE 高剂量组	10	1877. 87 ± 252. 04 <sup>a</sup>	1006. 90 ± 60. 60 <sup>b</sup>

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

2.5 海马 CA2 区 FLVCR 及 BCRP mRNA 表达

与模型组比较,假手术组及 NTE 高、中剂量组 FLVCR mRNA 灰度比值较模型组增加,FLVCR mR-

2.4 海马 CA2 区 FLVCR 和 BCRP 表达

与模型组比较,假手术组及 NTE 高剂量组 FLVCR 的积分光密度值( IOD) 较高 ( $P < 0.05$ ), 与假手术组比较,模型组和 NTE 低、中剂量组 IOD 值明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较,假手术组 BCRP 积分光密度值( IOD) 增高 ( $P < 0.05$ ), 与假手术组比较,其他各组 BCRP 表达的 IOD 均降低 ( $P < 0.05$ ),NTE 各剂量组与模型组 IOD 差异无显著性(表2)。

NA 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ); 各组 BCRP mRNA 灰度比值差异无显著性(图3)。

3 讨 论

铁是人体内必需的化学元素之一,是神经递质及髓鞘蛋白合成重要酶的辅基。铁离子也是一种催化剂,能显著增加活性氧(reactive oxygen species, ROS) 的浓度。因此,组织细胞内的铁聚集会导致氧化损伤。有研究表明 1 天龄 Witer 大鼠发育过程中因脑缺氧导致少突胶质细胞铁聚集,脂质过氧化<sup>[6]</sup>。肾缺血再灌注损伤与促进游离铁生成的血红素氧合酶 1 (Human heme oxygenase, HO-1) 相关联<sup>[7]</sup>。我们在脑缺血前期研究中,通过蛋白芯片技术检测到模型大鼠术后 24 小时内出现血清及脑脊

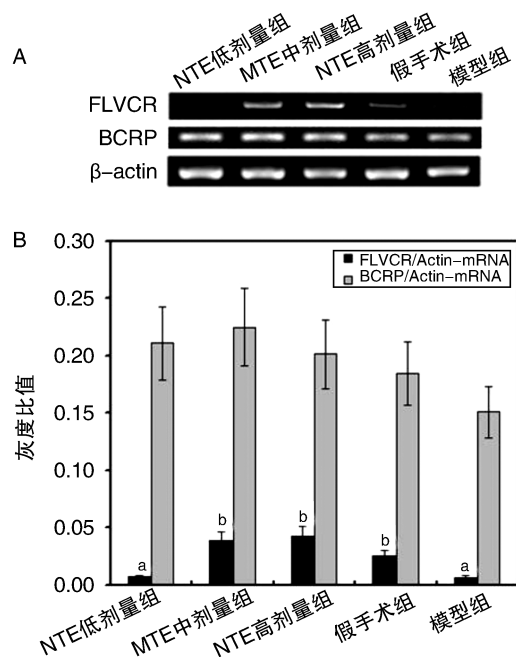


图 3. 各治疗组 RT-PCR 检测脑缺血后不同治疗组 FLVCR 和 BCRP mRNA 的表达 A 为脑缺血后 NTE 低剂量组 (3 g/kg)、中剂量组 (9 g/kg)、高剂量组 (27 g/kg)、假手术组和模型组 RT-PCR 结果;B 为脑缺血后不同治疗组 FLVCR mRNA 和 BCRP mRNA 灰度比值。a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较, b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较。

Figure 3. RT-PCR detection of different treatment group

液中转铁蛋白浓度明显升高,而脑泰方提取物灌胃后人血红素氧合酶表达上调。因此,我们推测铁代谢失衡可能是脑缺血损伤的机制。人体内铁包括非血红素铁与血红素铁两种形式。血红素铁是血红蛋白降解产物,以原卟啉形式聚集于脑组织中,血红素铁是氧化代谢、氧储存和运输,信号传递及药物代谢等生物过程中的重要辅助因子<sup>[8]</sup>。铁聚集后,通过 Fenton 反应大量羟自由基生成,促进膜脂质和活性氧生成,导致细胞毒性损伤<sup>[9-10]</sup>。细胞膜上血红素铁输出蛋白 FLVCR、BCRP 可以起到重要的调节作用<sup>[11]</sup>。FLVCR 为膜转运蛋白超家族,起到输出胞浆血红素,保护细胞免受血红素的毒性作用<sup>[12]</sup>。BCRP 作为另一种血红素铁输出蛋白,在血脑屏障内皮细胞及脑实质细胞上均有表达,临床研究中常作为药物通过血脑屏障的载体<sup>[13]</sup>。近年来,研究发现 BCRP 与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease AD) 中 A $\beta$  肽沉积的发病机理具有关联<sup>[14]</sup>。局部缺血可诱导 BCRP 的表达,并可抑制缺血早期脂肪组织衍生的干细胞死亡<sup>[15]</sup>。细胞缺氧时,缺氧诱导因子 (HIF-1) 上调 BCRP,当 BCRP 与血红素特异性结合后,可清除细胞内血红素和卟啉,抑制活性

氧的产生,提高脑细胞低氧状态的生存率。由此提出假设,血红素铁代谢失调可能是脑缺血病理机制之一,而血红素铁跨膜转运蛋白的研究具有重要意义。本实验通过 SD 大鼠脑缺血后 2 h、6 h、12 h、24 h、72 h 各时间点,观察海马 CA2 缺血区血红素铁跨膜转运蛋白 FLVCR 及 BCRP 的动态变化。研究发现大鼠 MCAO 术后海马 CA2 区 FLVCR 维持高表达,72 h 降低。BCRP 术后 2 h、6 h 表达较高,12 h、24 h、72 h 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。由此推测,脑缺血早期 FLVCR 及 BCRP 的表达增加,促进神经元内血红素铁的输运,缺血后 FLVCR 于 72 h 及 BCRP 于 12 h 开始表达减少,导致神经元内血红素铁聚集,神经元继发损伤。因此,我们证实血红素铁代谢失调可能是导致脑缺血损伤发生的新机制。

有研究表明黄芪多糖可抑制脑缺血后神经元凋亡<sup>[16]</sup>,阿魏酸通过促进一氧化氮生成起到神经元保护功能<sup>[17]</sup>。前期研究证实益气活血中药 NTE 具有良好的脑缺血治疗的临床效果<sup>[18]</sup>,能提高纤溶酶原激活物 (t-PA) 的活性,保护血管内皮细胞,加强纤溶效应,促进大鼠缺血脑组织的血管新生<sup>[19-20]</sup>;抑制血小板的聚集,舒张血管,增加脑血流量,减轻脑组织的损伤<sup>[21]</sup>。保护血脑屏障,抑制脑水肿<sup>[22]</sup>。本次实验表明, NTE 各剂量组电镜下海马神经元内铁聚集减少,神经元形态较正常。NTE 高剂量组 FLVCR 及 FLVCR-mRNA 的表达明显增高。因此,我们推测,增加 FLVCR 的表达,促进胞内血红素铁的外排,调节铁代谢,可能是益气活血中药 NTE 保护缺血后神经元的新机制。

[参考文献]

[1] Lekic T, Ani C. Posterior circulation stroke: animal models and mechanism of disease [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 587-590.

[2] Abuznait AH, Kaddoumi A. Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease [J]. ACS Chem Neuro sci, 2012, 3(11): 820-831.

[3] Wolf A, Bauer B, Hartz AM. ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma [J]. Front Psychiatry, 2012, 3: 54.

[4] Garcia TH. A reliable method to occlude a middle cerebral in wistar rats [J]. Stroke, 1993, 24(9): 1 423.

[5] 隋竹欣, 刘 昊, 朱玉英, 等. 创伤后应激障碍大鼠海马神经元自噬增强 [J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(3): 325-328.

[6] Rathnasamy G, Ling EA, Kaur C. Iron and iron regulatory proteins in amoeboid microglial cells are linked to oligoden-

- drocyte death in hypoxic neonatal rat periventricular white matter through production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen/nitrogen species[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(49): 17 982-995.
- [7] Ferenbach DA, Kluth DC, Hughes J. Hemeoxygenase-1 and renal ischaemia-reperfusion injury[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2010, 115(3): e33-37.
- [8] Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 181 3(5): 668-682.
- [9] Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria[J]. *Metallomics*, 2011, 3(6): 540-549.
- [10] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*[J]. 2011, 283(2-3): 65-87.
- [11] Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 114(3): 345-358.
- [12] Khan AA, Quigley JG. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 669-682.
- [13] Yasuda K, Cline CB, Vogel P, et al. Drug Transporters on Arachnoid Barrier Cells Contribute to the Blood-cerebrospinal Fluid Barrier[J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(4): 923-931.
- [14] Greenough MA, Camakaris J, Bush AI. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(5): 540-555. .
- [15] van Dijk A, Naaijken BA, Jurgens WJ, et al. The multi-drug resistance protein breast cancer resistance protein (BCRP) protects adipose-derived stem cells against ischemic damage[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2012, 28(5): 303-315.
- [16] Yan L, Zhou QH. Study on neuroprotective effects of astragalin in rats with ischemic brain injury and its mechanisms[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2012, 28(4): 373-377.
- [17] Koh PO. Ferulic acid modulates nitric oxide synthase expression in focal cerebral ischemia[J]. *Lab Anim Res*, 2012, 28(4): 273-278.
- [18] 贺运河, 郝晓元, 葛金文. 脑泰方治疗气虚血瘀证脑梗塞临床研究[J]. *中国中医急症*, 2001, 10(6): 319-321.
- [19] 陈敏, 朱惠斌, 葛金文, 等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠血管新生作用的实验研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2010, 30(1): 12-15.
- [20] 朱惠斌, 陈懿, 谭琥, 等. 脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠 CD34 表达的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(2): 141-144.
- [21] 陈懿, 陈敏, 谭琥, 等. 脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠血浆 TXB2 及 6-Keto-PGF1 $\alpha$  含量的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(3): 316-317.
- [22] 廖君, 张薇, 夏兴, 等. 脑泰方对局灶性脑缺血大鼠脑组织核因子- $\kappa$ B、基质金属蛋白酶 9 及其抑制剂表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(9): 28-30.

(此文编辑 李小玲)