

人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡及 FZD1、PIWIL1、FOXMI 表达的影响

杨军华, 郝彦超, 朱杰

(开封市中心医院神经内科, 河南省开封市 475000)

[关键词] 人参皂苷 Rg1; 脑缺血再灌注; 神经功能缺损; 大鼠

[摘要] **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 (GsRg1) 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能的改善作用, 并探讨其作用机制。**方法** 缺血再灌注损伤 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型对照组、依达拉奉组 (3.2 mg/kg)、GsRg1 低 (10 mg/kg)、中 (20 mg/kg)、高 (50 mg/kg) 剂量组 6 组。给药后 1 d、7 d 和 14 d 采用改良 m-NSS 法进行神经功能缺损评分, 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色测定脑梗死体积; 采用原位 TUNEL 方法检测脑组织神经细胞凋亡; 采用免疫组化法检测 NF- κ B、GAPF 蛋白水平; 采用 RT-PCR 法、Western Blot 法分别检测 FZD1、PIWIL1、FOXMI mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与模型对照组比较, GsRg1 低剂量组大鼠神经缺损评分明显降低 ($P < 0.05$), GsRg1 中、高剂量组大鼠神经缺损评分明显降低 ($P < 0.01$); GsRg1 低、中、高剂量组神经凋亡细胞明显减少 ($P < 0.01$), 脑梗死体积显著缩小 ($P < 0.01$), 大鼠脑组织 NF- κ B、GAPF 表达显著降低 ($P < 0.01$), FZD1、FOXMI mRNA 及蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.01$), PIWIL1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 且呈现一定的剂量依赖性。**结论** GsRg1 能够显著改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能, 其可能是通过调控 FZD1、PIWIL1、FOXMI 相关基因及蛋白的表达实现的。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Ginsenoside Rg1 on apoptosis of nerve cells and expression of FZD1, PIWIL1 and FOXMI in cerebral ischemia reperfusion rats

YANG Junhua, HAO Yanchao, ZHU Jie

(Department of Neurology, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China)

[KEY WORDS] Ginsenoside Rg1; Cerebral ischemia reperfusion; neurologic impairment; rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Ginsenoside Rg1 on the improvement of nerve function in rats with Cerebral ischemia reperfusion and its mechanism. **Methods** Wistar rats with ischemia reperfusion injury were randomly divided into sham group, model group, edaravone group (3.2 mg/kg), low (10 mg), medium (20 mg) and high (50 mg) dose groups. At 1 d, 7 d and 14 d after administration, modified m-nss method was used to score neurological defects, and triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to determine the volume of cerebral infarction. TUNEL assay In situ was used to detect neuronal apoptosis in brain tissue. Immunohistochemistry was used to detect the levels of NF- κ B and GAPF. The expression levels of FZD1, PIWIL1, FOXMI mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western Blot. **Results** Compared with model control group, the m-NSS were significantly decreased in low dose ginsenoside Rg1 group ($P < 0.05$); the m-NSS were significantly decreased in medium and high dose groups ($P < 0.01$); in low, medium and high dose ginsenoside Rg1 groups, the nerve apoptosis cells were significantly decreased ($P < 0.01$), brain infarct volume were significantly reduced ($P < 0.01$), the expression of NF- κ B and GAPF were significantly decreased ($P < 0.01$); The mRNA and protein expressions of FZD1, FOXMI were significantly increased ($P < 0.01$); The mRNA and protein expressions of PIWIL1 were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** Ginsenoside Rg1 can significantly improve the neural function of rats with Cerebral ischemia reperfusion. It may be achieved by regulating the expression of FZD1, PIWIL1, FOXMI genes and proteins.

缺血性脑卒中是当前社会发病率较高的一种疾病,病死率和致残率居高不下,脑部缺血后,大量神经细胞凋亡,导致脑功能损伤,使患者出现神经功能缺损症状,甚者瘫痪、死亡等,给患者生活带来很大危害^[1]。人参皂苷对脑神经功能有一定的保护作用,但其作用机制比较复杂,人参皂苷 Rg1(Ginsenoside Rg1, GsRg1)是近年来研究较多的一种人参皂苷,其主要的靶器官是中枢神经系统^[2]。有研究显示,GsRg1可通过增加细胞膜流动性或选择性降低异常升高的胞内游离钙离子浓度来降低神经细胞凋亡,达到保护神经功能的作用^[3],但GsRg1对缺血神经细胞的保护机制尚未明确,需要进一步探索。本研究拟探讨大鼠脑缺血再灌注损伤后,GsRg1对神经细胞的保护作用及其对FZD1、PIWIL1、FOXM1表达的影响,为缺血性脑卒中治疗寻找新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 动物、主要药品、试剂及仪器

健康雄性 Wistar 大鼠 150 只,SPF 级,体质量 240~260 g,由青岛市药物检验所实验动物中心提供[SCXK(鲁)20030010]。

GsRg1(南京春秋生物工程有限公司,纯度 \geq 98%);依达拉奉注射液(国药集团国瑞药业有限公司,国药准字 H20080056,规格 20 mL:30 mg);2,3,5-三苯基氯化三苯基四氮唑(TCC)(美国 Sigma 公司);TUNEL 凋亡试剂盒(美国 Roche 公司);反转录试剂盒(TransGen 公司);NF- κ B、GAFP、FZD1、PIWIL1、FOXM1 一抗、 β -actin 一抗(英国 Abcam 公司);RT-PCR 试剂盒、Western blot 试剂盒(北京 TransGen 公司);HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗、HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗(美国 Santa Cruz 公司)。

超低温冰箱(日本 SANYO 公司,型号 MDF-382E);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);荧光倒置显微镜(日本 SANYO 公司,型号 MDF-382E);电子分析天平(上海精密科学仪器公司);IQ5 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);Western blot 蛋白显影仪(美国 Protein Simple 公司)。

1.2 分组及给药

随机选 20 只大鼠为假手术组。余 130 只大鼠进行缺血再灌注损伤模型制备,成功造模 106 只,取 100 只随机分为 5 组,每组 20 只,分别为模型对照组、依达拉奉组(Edaravone)、Gs Rg1 低、中、高剂量

组,各组大鼠于再灌注 24 h 后开始给药,Gs Rg1 组分别灌胃给予 Gs Rg1 10 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg,依达拉奉组腹腔注射依达拉奉 3.2 mg/kg,假手术组及模型对照组给予等量生理盐水,每天 1 次,连续给药 2 周。

1.3 脑缺血再灌注损伤模型制备

参照 Longa 等^[4]提出的大鼠中动脉栓塞线栓法,制备脑缺血再灌注模型。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,仰卧位固定,颈部备皮,碘伏消毒,铺无菌洞巾,取颈部正中切口,分离左侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,结扎并游离颈外动脉主干,在颈外动脉剪一小口,由切口向颈内动脉插入,直至有轻微阻力感时停止,固定线栓,扎紧动脉残端,缺血 2 h,然后将线栓轻轻拔出。假手术组(20 只)除不插线栓外,其余步骤同模型对照组。

模型标准参照 Zea-Longa^[4]的 5 分制法:0 分无任何神经缺损症状;1 分右前肢不能完全伸直;2 分向右旋转;3 分向右侧倾倒;4 分不能行走或昏迷。分值越高,说明大鼠行为障碍越严重,1~3 分为成功模型,其余剔除。

1.4 改良 mNSS 法评价行为学变化

分别在给药 1、7、14 d,将各组大鼠放于地面,观察大鼠的活动状况。参考改良大鼠神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)^[5],从感觉、生理反射、平衡能力及运动等对大鼠各项生理功能进行评分,正常为 0 分,有缺损者根据与量表匹配的严重程度记 1~6 分,各项累加,总分最高 18 分,分值越大表明神经功能损伤越严重。

1.5 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定脑梗死体积

末次给药 2 h 后,每组取 5 只大鼠,以 10% 水合氯醛 0.3 mL 腹腔注射麻醉,断头取脑,自前向后将脑组织连续切成 2 mm 厚的冠状切片,置于 2% 氯化三苯基四氮唑(TTC)磷酸盐缓冲液中,37℃ 下避光染色 10 min,含 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液固定,正常脑组织为红色,梗死组织为白色,逐层拍照,用 Adobe photoshop CS 计算各层面梗死面积,乘以层面,为脑梗死体积。

1.6 脑组织取材

余大鼠末次给药 2 h 后,以 10% 水合氯醛 0.3 mL 腹腔注射麻醉,常规胸腹联合切口,经左心室插管,分别用生理盐水、含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液灌注固定,迅速断头,取双侧脑组织。

1.7 采用原位 TUNEL 方法检测细胞凋亡

大鼠脑组织固定于 4% 多聚甲醛溶液,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切片,厚度 6 μm ,置于多聚赖氨酸处理的载玻片上,脱蜡水化,以 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液浸泡,置于 0.1 mol/L Tris-HCl(含 3% BSA,20% 小牛血清)浸泡,滴加 TUNEL 反应液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h,荧光显微镜下选用蓝色激发光(波长 488 nm),观察有无发出黄绿色荧光(FITC)的凋亡细胞,镜下随机取 4 个视野计数阳性细胞。

1.8 采用免疫组化法检测 NF- κB 、GAPF 表达

大鼠脑组织固定于 4% 多聚甲醛溶液,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,切片,厚度 6 μm ,将切片置于二甲苯 I、II 中各 10 min 脱蜡,梯度乙醇水化,PBS 洗涤 3 次,切片放入柠檬酸缓冲液 20 min (95~98 $^{\circ}\text{C}$),冷却至室温,PBS 洗涤 3 次,3% H_2O_2 浸泡 10 min,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次,DAB 显色,光镜下观察胞质或胞核有棕色颗粒者为阳性细胞。

1.9 RT-PCR 检测大鼠脑组织 FZD1、PIWIL1、FOXMI mRNA 的表达

末次给药 2 h 后,麻醉大鼠,颈动脉处死放干血液后迅速断头取脑,低温取脑组织,提取组织总 RNA,按照反转录试剂盒及 PCR 试剂盒操作步骤,进行反转录及实时荧光定量 PCR 反应。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,45 个循环。每个样本均重复 3 个复孔,取平均值,图像分析仪扫描凝胶密度,分析得到 mRNA 的相对含量。引物序列见表 1。

表 1. RT-PCR 引物序列

Table 1. RT-PCR primer sequence

引物	引物序列
β -actin	5'-GTATACGAGTCTCGTCCAGC-3' 5'-GACATCCATGACGAACCTGGT-3'
FZD1	5'-ATTGCTCTGTGCTGTGCTG-3' 5'-TCATGACGAGCATGGTGCAG-3'
PIWIL1a	5'-TGCCATGAGCAGTTATACGC-3' 5'-TGTCCA GTTCCATGTTCCAG-3'
FOXMI	5'-GAACTCCATCCGCCACAACC-3' 5'-TTGGCACTGGGGTGAATGG-3'

1.10 Western blot 检测大鼠脑组织 FZD1、PIWIL1、FOXMI 蛋白的表达

末次给药 2 h 后,麻醉大鼠,颈动脉处死放干血液后迅速断头取脑,低温取脑组织,蛋白裂解液匀浆脑组织,加蛋白上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min,调

整蛋白浓度后上样,SDS 凝胶电泳,转移到 PVDF 上,5% FBS 室温封闭,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TPBS 清洗,加入抗鼠的 IgG 二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 ECL,在暗室中曝光显影,用 Quantity One 专业灰度分析软件分析自身灰度值,以目的蛋白条带灰度与管家蛋白 β -actin 条带灰度的比值表示蛋白的表达水平。

1.11 统计学分析

数据统计分析采用 SPSS 19.0 软件包,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注模型大鼠行为学的影响

模型对照组大鼠脑神经功能评分显著增加,说明脑缺血再灌注模型制造成功。与模型对照组比较,GsRg1 低剂量组脑神经功能评分均出现下降趋势($P < 0.05$),中、高剂量组脑神经功能评分显著下降($P < 0.01$),呈现一定的剂量依赖性,尤以给药 7 天后下降更为明显(表 2)。

表 2. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑神经功能评分的影响($n=20$)

Table 2. Effects of Gs-Rg1 on mNSS in Cerebral ischemia reperfusion rats($n=20$)

分 组	1 d	7 d	14 d
假手术组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
模型对照组	11.33 \pm 2.25 ^c	9.00 \pm 0.63 ^c	6.83 \pm 0.75 ^c
依达拉奉组	10.01 \pm 1.55 ^d	6.21 \pm 0.89 ^d	4.17 \pm 0.75 ^d
GsRg1 低剂量组	11.01 \pm 1.32 ^b	7.82 \pm 1.07 ^b	5.50 \pm 1.04 ^b
GsRg1 中剂量组	10.76 \pm 1.16 ^b	7.07 \pm 0.82 ^d	4.93 \pm 0.98 ^d
GsRg1 高剂量组	10.24 \pm 1.16 ^b	6.18 \pm 0.82 ^d	3.87 \pm 0.75 ^d

a 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与模型对照组比较。

2.2 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响

假手术组 TTC 染色呈均匀的淡红色,无脑梗死病灶。与假手术组比较,模型对照组脑梗死体积显著变大($P < 0.01$);给予人参皂苷 Rg1 干预处理后脑梗死体积均不同程度地缩小,且呈现一定的剂量依赖性($P < 0.01$,图 1)。

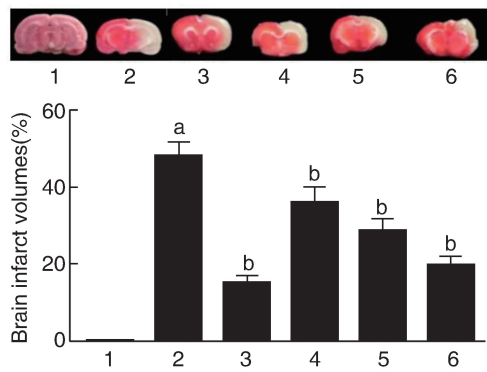


图1. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响($n=20$) 1 为假手术组,2 为模型对照组,3 为依达拉奉组(3.2 mg/kg),4 为 GsRg1 低剂量组(10 mg/kg),5 为 GsRg1 中剂量组(20 mg/kg),6 为 GsRg1 高剂量组(50 mg/kg)。 a 为 $P<0.01$,与假手术组比较;b 为 $P<0.01$,与模型对照组比较。

Figure 1. Effects of Gs-Rg1 on brain infarct volumes in Cerebral ischemia reperfusion rats($n=20$)

2.3 人参皂苷 Rg1 对缺血再灌注大鼠脑组织神经细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测显示凋亡神经细胞呈绿色荧光,假手术组凋亡细胞较少,与假手术组比较,模型对照组凋亡神经细胞数显著增加;与模型对照组比较,GsRg1 组大鼠凋亡神经细胞数目显著减少(图2)。

2.4 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 NF- κ B、GFAP 表达的影响

免疫组化结果显示,假手术组可见极少量浅棕黄色的 NF- κ B 阳性细胞和棕黄色 GFAP 阳性细胞。与假手术组比较,模型对照组 NF- κ B、GFAP 阳性细胞显著增多,OD 值明显升高($P<0.01$);与模型对照组比较,GsRg1 组 NF- κ B、GFAP 表达水平显著降低($P<0.01$,图3)。

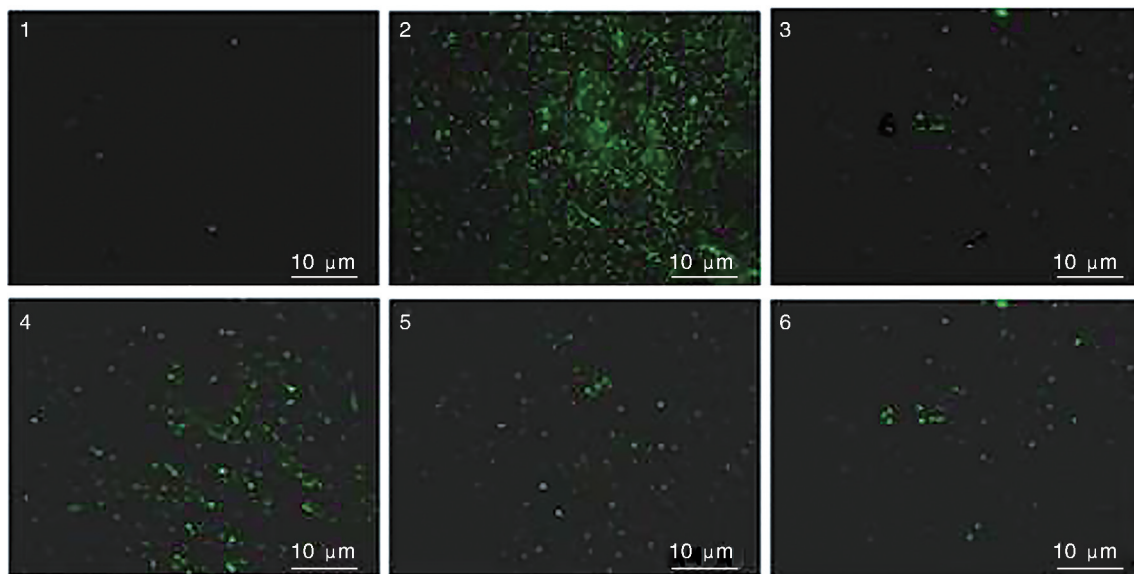


图2. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响($n=20$) 1 为假手术组,2 为模型对照组,3 为依达拉奉组(3.2 mg/kg),4 为 GsRg1 低剂量组(10 mg/kg),5 为 GsRg1 中剂量组(20 mg/kg),6 为 GsRg1 高剂量组(50 mg/kg)。

Figure 2. Effects of Gs-Rg1 on nerve cells apoptosis in Cerebral ischemia reperfusion rats($n=20$)

2.5 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 FZD1、PIWIL1、FOXM1 mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型对照组大鼠脑组织中 FZD1、PIWIL1 mRNA 的表达明显增加,FOXM1 mRNA 的表达明显降低($P<0.01$);与模型对照组比较,GsRg1 各剂量组大鼠脑组织中 FZD1、FOXM1 mRNA 的表达显著升高($P<0.01$),PIWIL1 mRNA 的表达显著降低($P<0.01$,图4)。

2.6 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 FZD1、PIWIL1、FOXM1 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型对照组大鼠脑组织中 FZD1、PIWIL1 蛋白表达明显增加,FOXM1 蛋白表达明显降低($P<0.01$);与模型对照组比较,GsRg1 各剂量组大鼠脑组织中 FZD1、FOXM1 蛋白表达显著升高($P<0.01$),PIWIL1 蛋白表达显著降低($P<0.01$,图5)。

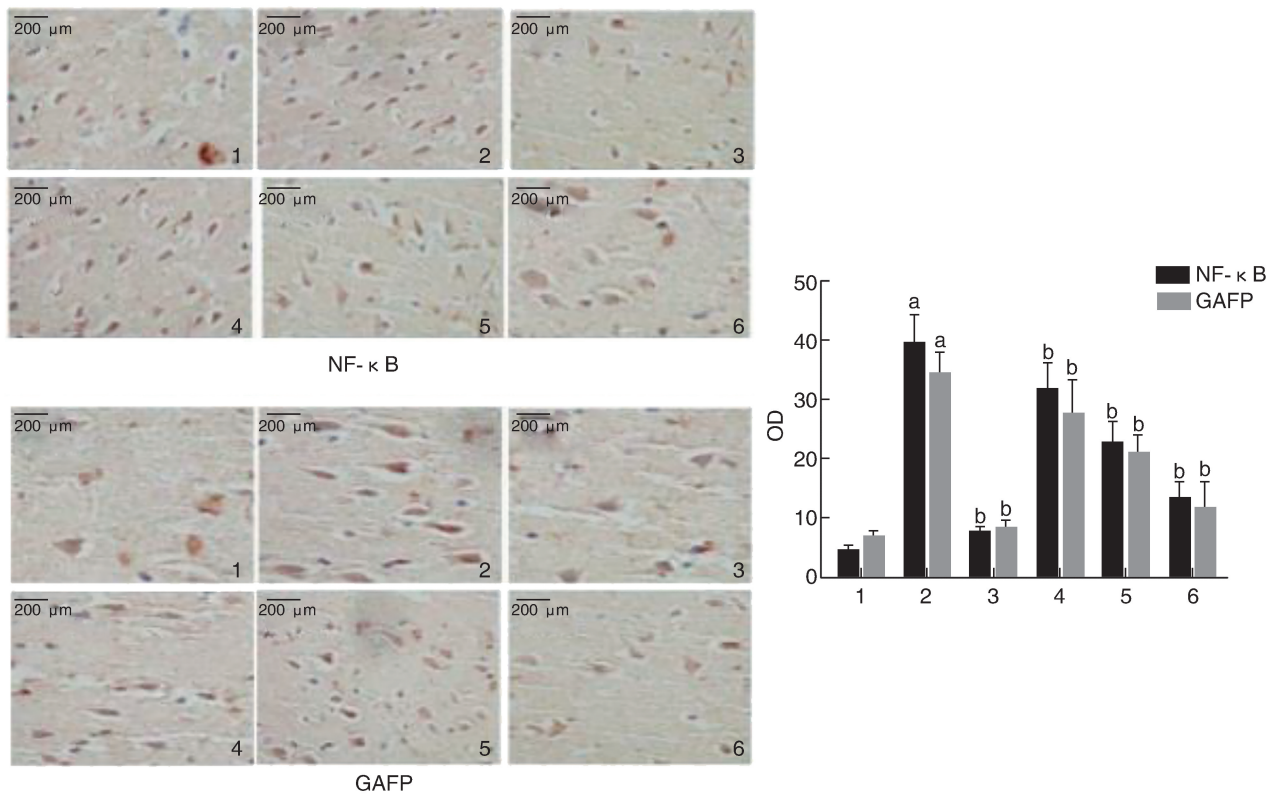


图 3. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 NF-κB/GAFP 表达的影响 (n=20) 1 为假手术组,2 为模型对照组,3 为依达拉奉组(3.2 mg/kg),4 为 GsRg1 低剂量组(10 mg/kg),5 为 GsRg1 中剂量组(20 mg/kg),6 为 GsRg1 高剂量组(50 mg/kg)。a 为 P<0.01,与假手术组比较;b 为 P<0.01,与模型对照组比较。

Figure 3. Effects of Gs-Rg1 on NF-κB/GAFP expression in Cerebral ischemia reperfusion rats(n=20)

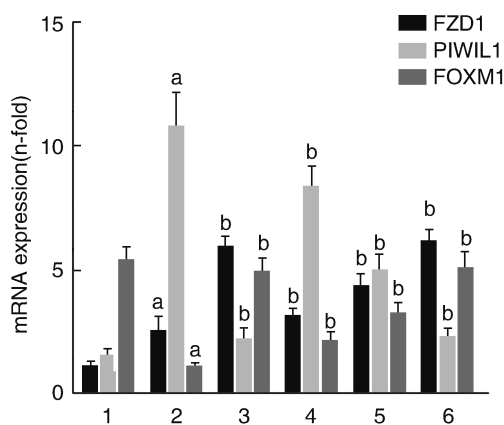


图 4. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 FZD1、PIWIL1 和 FOXM1 mRNA 表达的影响 (n=20) 1 为假手术组,2 为模型对照组,3 为依达拉奉组(3.2 mg/kg),4 为 GsRg1 低剂量组(10 mg/kg),5 为 GsRg1 中剂量组(20 mg/kg),6 为 GsRg1 高剂量组(50 mg/kg)。a 为 P<0.01,与假手术组比较;b 为 P<0.01,与模型对照组比较。

Figure 4. Effects of Gs-Rg1 on FZD1, PIWIL1, FOXM1 mRNA expression in Cerebral ischemia reperfusion rats(n=20)

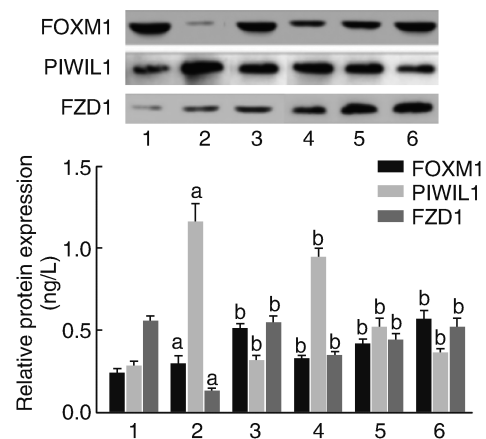


图 5. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 FZD1/PIWIL1/FOXM1 蛋白表达的影响 (n=10) 1 为假手术组,2 为模型对照组,3 为依达拉奉组(3.2 mg/kg),4 为 GsRg1 低剂量组(10 mg/kg),5 为 GsRg1 中剂量组(20 mg/kg),6 为 GsRg1 高剂量组(50 mg/kg)。a 为 P<0.01,与假手术组比较;b 为 P<0.01,与模型对照组比较。

Figure 5. Effects of Gs-Rg1 on FZD1/PIWIL1/FOXM1 protein expression in Cerebral ischemia reperfusion rats(n=10)

3 讨论

Wnt/ β -catenin 通路被激活后,其信号传递到细胞膜,可与跨膜受体 Frizzled 结合,抑制降解复合体,减少 β -catenin 磷酸化,致使大量 β -catenin 在胞质中聚集并进入细胞核内,从而调控神经细胞的增殖与分化^[6-8],Frizzled 蛋白属于 7-跨膜受体,其中跨膜受体卷曲蛋白 1 (FZD1) 处于 Wnt/ β -catenin 信号通路上游,能特异性地结合 Wnt3 蛋白发挥调节保护作用^[9-10]。叉头蛋白 M1 (forkhead box protein M1, FoxM1) 在细胞周期的调节中起着重要作用,在细胞周期的各个时期均有表达^[11-12],FoxM1 可促进 Wnt 通路靶基因启动子招募 β -catenin 而激活 Wnt 信号通路^[13-15],Wnt 通路激活引起的 FoxM1 去泛素化,是调控经典 Wnt 信号通路的重要机制。PIWIL1 基因在干细胞分裂中具有重要调控作用^[16]。有研究表明,PIWIL1 基因可能参与了干细胞增殖,并且其高表达可能引发干细胞的恶性发展^[17],同时 PIWIL1 的过度表达也与多种肿瘤发生有关^[18],但关于 PIWIL1 基因在神经损伤方面的研究较少。脑缺血再灌注后产生的炎症反应和凋亡在病理过程占主导地位,研究表明 NF- κ B 与脑缺血再灌注损伤密切相关^[19],NF- κ B 通过调控多种与凋亡相关的基因表达而造成神经细胞的损伤^[20],胶质细胞浸润和活化也是缺血性脑卒中诱导的炎症反应的特征反应^[21]。研究表明,GsRg1 通过抑制脑内氧化应激水平、炎症反应、凋亡蛋白等发挥神经保护作用^[22]。本研究从 FZD1、PIWIL1、FOXM1 相关蛋白入手探索其作用机制,结果表明,GsRg1 可能是通过调控 FZD1/PIWIL1/FOXM1 相关蛋白来实现其对神经细胞的保护作用。

大鼠在大脑缺血再灌注后,脑组织缺血缺氧、能量代谢衰竭引起神经细胞凋亡,脑组织梗死体积显著增加,大鼠神经功能损伤严重,给予 GsRg1 低、中、高剂量干预 2 周后,模型大鼠凋亡神经细胞显著减少,大鼠脑组织 NF- κ B、GAPF 表达显著降低,说明 GsRg1 治疗能有效改善因缺血缺氧造成的神经功能损伤,进一步通过检测脑组织中 FZD1/PIWIL1/FOXM1 分子生物学的表达,发现与模型对照组比较,FZD1、FOXM1 mRNA 及蛋白表达水平显著增加,PIWIL1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,说明 GsRg1 可能在脑梗死刺激下干预激活上调 FZD1/FOXM1 的表达,激活 Wnt/ β -catenin 通路而促进神经干细胞的增殖分化,降低 PIWIL1 的表达

而抑制脑组织神经细胞凋亡,从而发挥神经功能的保护作用。

综上所述,GsRg1 可以减少脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡,改善其神经功能缺损,可能是通过调节 FZD1/PIWIL1/FOXM1 通路相关蛋白表达来实现的。

[参考文献]

- [1] 曹泽标,周小青,张利美,等. 丹龙醒脑方抗缺血性脑损伤机制的实验研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(4): 59-62.
- [2] 边立功,钟莲梅,艾青龙,等. 人参皂苷 Rg1 调控 Nrf2 在 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤后的抗氧化作用[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(6): 35-38.
- [3] 雷勋明. 人参皂苷 Rg1 对新生鼠缺氧缺血性脑损伤海马神经元凋亡及学习记忆能力的影响[J]. 中国中西医结合儿科学, 2018, 10(4): 277-279.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Luo D, Fan XN, Ma CC, et al. A study on the effect of neurogenesis and regulation of GSK3 β /PP2A expression in acupuncture treatment of neural functional damage caused by focal ischemia in MCAO rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 962343.
- [6] Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G. WNT/Frizzled signalling receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3 [J]. British J Pharm, 2014, 171(5): 1195-1209.
- [7] 陈娉婷,周小青,刘旺华. 丹龙醒脑方对脑缺血再灌注大鼠海马区神经干细胞增殖及 Frizzled1、Dvl1、CyclinD1 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 120-123.
- [8] 张利美,周小青,刘旺华,等. 丹龙醒脑方促进脑缺血再灌注损伤大鼠神经干细胞增殖与 β -catenin、Wnt-3a 表达及其机制的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(1): 7-10.
- [9] P schl J, Grammel D, Dorostkar MM, et al. Constitutive activation of β -Catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system [J]. Dev Biol, 2013, 374(2): 319-332.
- [10] Varela-Nallar L, Grabowski CP, Alfaro IE, et al. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function [J]. Neural Dev, 2009, 41(7): 780-788.

(下转第 795 页)

- [3] 华扬. 颈动脉超声临床研究与应用进展[J]. 中华医学超声杂志(电子版), 2015, 4(5): 256-259.
- [4] 陆柳, 孙立山, 范列英. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者中的临床应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(16): 2247-2249.
- [5] Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH, et al. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease and all-cause death: the cardiovascular health study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(4): 594-599.
- [6] Guo T, Ke L, Qi B, et al. PTX3 is located at the membrane of late apoptotic macrophages and mediates the phagocytosis of macrophages [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(2): 330-339.
- [7] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010 [J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 146-153.
- [8] 任全刚, 崔春燕, 刘岳峰. 脑梗死患者颈动脉彩超诊断颈动脉粥样硬化的临床价值分析 [J]. 北京医学, 2015, 37(7): 716-717.
- [9] 张明明, 梁会泽, 贾化平. 颈部及颅内动脉易损斑块研究进展 [J]. 临床荟萃, 2014, 12(4): 1423-1426.
- [10] 王智明, 李淮玉, 李凤. 颈动脉超声结合脂联素和超敏 C 反应蛋白在动脉粥样硬化脑梗死中的临床研究 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(5): 799-802.
- [11] Kim G, Youn HJ, Choi YS, et al. Is carotid artery evaluation necessary for primary prevention in asymptomatic high-risk patients without atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 10(6): 1111-1119.
- [12] 王晶, 耿清, 刘永泉, 等. 阿托伐他汀对血脂水平正常脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(9): 850-851.
- [13] Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, et al. Pentraxin 3 (PTX3): an endogenous modulator of the inflammatory response [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 4(2): 920517.
- [14] Ryu WS, Kim CK, Kim BJ, et al. Pentraxin 3: a novel and independent prognostic marker in ischemic stroke [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(2): 581-586.
- [15] 李凤, 朱余友, 杨孙凤, 等. 血清五聚素 3、超敏 C 反应蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平以及微栓子信号与大动脉粥样硬化型急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块稳定性的相关研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2016, 29(2): 95-100.
- [16] 陈聪, 张凌宇, 吴冠霖, 等. 脂蛋白磷脂酶 A2 活性与动脉粥样硬化斑块稳定性的相关性研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 7(3): 30-32.
- (此文编辑 曾学清)

(上接第 756 页)

- [11] 李永金, 张谊, 杨开勇. HIF-1 α 、ROCK-2、FoxM1 在醋酸铅诱导 PC12 细胞损伤中的表达变化 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1562-1568.
- [12] Jin B, Wang C, Li J, et al. Anthelmintic niclosamide disrupts the interplay of p65 and FOXM1/beta-catenin and eradicates leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(3): 789-803.
- [13] CHEN Y, LI Y, XUE J, et al. Wnt-induced deubiquitination FoxM1 ensures nucleus b-catenin transactivation [J]. *EMBOJ*, 2016, 35(6): 668-684.
- [14] Chan DW, Yu SY, Chiu PM, et al. Over-expression of FoxM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis [J]. *J Pathol*, 2014, 215(3): 245-252.
- [15] Li Z, Jia Z, Gao Y, et al. Activation of vitamin D receptor signaling downregulates the expression of nuclear FOXM1 protein and suppresses pancreatic cancer cell stemness [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4): 844-853.
- [16] Szakmary A, Cox DN, Wang Z, et al. Regulatory relationship among piwi, pumilio, and bag-of-marbles in *Drosophila* germline stem cell self-renewal and differentiation [J]. *Current Biology CB*, 2005, 15(2): 171.
- [17] Greither T, Koser F, Kappler M, et al. Expression of human piwi-like genes is associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 272.
- [18] 孙倩, 肖玲. 人参皂苷 Rh1 诱导卵巢癌细胞凋亡及对 piwi 基因的表达影响 [M]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(3): 1-5.
- [19] 朱晓颀, 余资江, 孙宝飞, 等. NF- κ B 信号通路在小鼠脑缺血再灌注细胞凋亡中的作用 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2016, 33(6): 486-488.
- [20] 王向慧, 王迪. 尼莫地平对大鼠急性脑缺血再灌注损伤 NF- κ B 和 caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 10-13.
- [21] 余智, 顾苏兵, 于民. [Gly14]-Humanin 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后炎症反应及细胞凋亡的影响 [J]. 浙江医学, 2017, 39(22): 1976-1980.
- [22] Amaro S, Llull L, Renu A, et al. Uric acid improves glucose-driven oxidative stress in human ischemic stroke [J]. *Ann Neurol*, 2015, 77(5): 775-783.
- (此文编辑 朱雯霞)