

二苯乙烯苷对脑缺血再灌注大鼠神经保护的作用机制

杨杰, 周芝文, 杨期东, 郑丽君, 曾进

(中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410078)

[摘要] 目的:探讨二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)对脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用机制。方法:雄性SD大鼠96只,随机分为4组:对照组,模型组,小剂量[60 mg/(kg·d)]TSG组,大剂量[120 mg/(kg·d)]TSG组,每组24只。TSG或生理盐水灌胃7d后应用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型,术后6,24,48h及7d观察动物神经行为学变化并评分,免疫组织化学法检测神经生长因子(NGF)、生长相关蛋白(GAP)-43和蛋白激酶A催化亚基(PKA α)蛋白的表达。结果:神经功能评分显示模型组各时间点均有明显的神经功能缺损症状,除6h时间点外,两个剂量TSG治疗组其余各时间点神经功能评分明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,两个剂量TSG组各时间点NGF, GAP-43及PKA α 蛋白表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。NGF, GAP-43及PKA α 蛋白表达两两之间呈正相关。结论:TSG可能通过诱导大鼠脑缺血-再灌注损伤后NGF蛋白表达上调,激活PKA通路,增加轴突再生标志物GAP-43蛋白的表达,从而起到神经保护作用。

[关键词] 二苯乙烯苷; 脑缺血再灌注; 神经生长因子; 生长相关蛋白-43; 蛋白激酶A催化亚基

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.04.007

Neuroprotective mechanism of tetrahydroxystilbene glucoside on rats after cerebral ischemia-reperfusion

YANG Jie, ZHOU Zhiwen, YANG Qidong, ZHENG Lijun, ZENG Jin

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To investigate the neuroprotective mechanism of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG), a Chinese medicine, on rats after cerebral ischemia-reperfusion. **Methods** A total of 96 Sprague-Dawley male rats were divided into 4 groups ($n = 24$): a control group, an ischemia-reperfusion (I/R) model group, a low dose TSG [60 mg/(kg·d)] group, and a high dose TSG [120 mg/(kg·d)] group. After 6 days intragastric (ig) administration of TSG or natural saline (I/R group), reversible middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by intraluminal suture technique. The rats of control group were operated on while the middle cerebral artery was not blocked. At 6 h, 24 h, 48 h, and 7 d after the reperfusion, behavior test was used to evaluate the neurological deficiency of each group. The protein expressions of nerve growth factor (NGF), growth associated protein (GAP)-43, and protein kinase A catalytic subunit (PKA α) in

收稿日期 (Date of reception) 2009-09-04

作者简介 (Biography) 杨杰, 博士, 副教授, 主要从事脑血管疾病研究。

通信作者 (Corresponding author) 杨杰, E-mail: yangjie6523@163.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省自然科学基金(08JJ3083)。 This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China(08JJ3083)。

the cortex were measured by immunohistochemical method. **Results** Compared with the I/R group, the neurological defect scores of the 2 TSG groups were significantly lower except at 6 h after the reperfusion. Compared with the I/R group, the protein expression of NGF, GAP-43, and PKAc after the reperfusion of the 2 TSG groups increased significantly. **Conclusion** The protein expression of NGF may increase when treated with TSG after cerebral ischemia-reperfusion, which activates the PKA pathway and increases the protein expression of GAP-43 that protects the neuron.

Key words: TSG; cerebral ischemia-reperfusion injury; NGF; GAP-43; PKAc

二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG, 化学名为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷)是传统中药何首乌的药效成分之一。现代药理学研究^[1-6]证明:TSG有抗氧化、抗衰老、增强免疫、调节血脂、抗动脉粥样硬化、提高学习记忆能力、抗炎抗肿瘤及护肝、刺激黑色素合成以及诱导阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)小鼠内源性神经生长因子(nerve growth factor, NGF)增加的作用。近年来的研究^[7-8]发现TSG对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,但其具体机制不明。本研究对脑缺血/再灌注损伤模型大鼠,用60和120 mg/(kg·d)两组剂量TSG为干预手段,动态观察大鼠局灶性脑缺血再灌注后缺血半暗带NGF、蛋白激酶A催化亚基(protein kinase A catalytic subunit, PKAc)及生长相关蛋白-43(growth associated protein, GAP-43)蛋白的表达,探讨TSG神经保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与给药

清洁级雄性SD(Sprague-Dawley)成年大鼠96只,体质量200~300 g(购自湖南农业大学实验动物中心)。随机分为对照组、模型组、小剂量TSG组、大剂量TSG组,每组24只。各组按再灌注后处死的时间分为6,24,48 h和7 d共4个亚组,每个亚组各6只。对照组:进行各项手术操作,但栓线仅进入8~10 mm;模型组:造模手术前7 d开始灌胃生理盐水5 mL/(kg·d),第7天灌胃后1 h造模,以后每天定时灌胃直至处死;小、大剂量TSG组:造模手术前7天开始灌胃TSG 60或120 mg/(kg·d)^[3,5,9],第7天灌胃后1 h造

模,以后每天定时灌胃直至处死。TSG由湖南中医研究所制剂室提供,经高效液相色谱法提取分离纯化,测定其纯度为70%,4℃冰箱保存,临时制备成12和24 mg/mL的溶液备用。

1.2 模型制作

以10%的水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,按照Longa^[10]线栓法制备大脑中动脉栓塞模型,栓线采用0.234 mm单丝尼龙钓鱼线。直视下将尼龙线自颈总动脉切口处插入约(18±5) mm阻塞右侧大脑中动脉入口,尼龙线保留2 h后拔出,形成再灌注。手术过程中予以照射灯保持体温在(37.0±0.5)℃,并监测肛温、呼吸及心率。手术结束后将动物单独置于笼中,直至苏醒后予以评分。对照组插线深度为8~10 mm,其余操作同模型组。

1.3 神经功能评分

根据Longa^[10]5级评分标准,动物苏醒后开始首次评分,直至动物死亡或被处死。0分:正常,未见任何神经功能缺损表现;1分:垂直提尾时对侧前爪不能伸直;2分:行走时身体向对侧转圈;3分:行走时身体向对侧跌倒;4分:不能自发行走或意识丧失。首次评分为0分或4分、有呼吸困难、提前死亡及处死时发现蛛网膜下腔出血的动物均弃之不用。此外对于手术中出血过多的动物也弃去。

1.4 免疫组织化学染色

应用SABC法进行NGF, GAP-43和PKAc的免疫组织化学染色。具体步骤:切片晾干后用PBS(0.01 mmol/L, pH 7.2~7.4)漂洗;滴加新鲜配制的3% H₂O₂,室温下静置10 min以灭活内源性过氧化物酶;0.03% Triton-100 PBS溶液室温下静置30 min;滴加10%正常山羊血清37℃孵育20 min封闭抗原,依据所检测蛋白不同分别加入

0.01 mmol/L PBS 稀释的兔抗大鼠 NGF 多克隆抗体 (Millipore 公司, 1:1 000)、GAP-43 多克隆抗体 (Millipore 公司, 1:1 000) 及 PKAc 多克隆抗体 (武汉博士德, 1:100) 4 °C 放置 24 h。PBS 漂洗后滴加生物素化山羊抗兔 IgG 抗体 (武汉博士德, 1:100), 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗后滴加 SABC 复合物 (武汉博士德, 1:100 新鲜配制), 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗后滴加 DAB (北京中杉金桥) 显色 (暗室操作, 镜下控制反应时间), 蒸馏水终止反应。阴性对照采用 PBS 代替一抗, 余同上述操作。

1.5 结果观察

光学显微镜下胞浆中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。采用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像分析系统 (武大影像工程公司) 对切片进行图像分析。每个时间点每只大鼠每个指标随机选取 4 张切片, 每张切片随机选取顶叶缺血半暗带 5 个不重复视野, 高倍镜下 ($\times 400$) 观察计数每个视野中阳性细胞数, 取均数作为各时间点该指标阳性细胞数。

1.6 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理。数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较用 ANOVA 及 Newman-Student 多重比较 t 检验分析, 两指标间相关分析采用双尾 Pearson's 相关检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSG 对大鼠脑缺血再灌注后神经功能缺损的影响

大鼠右侧大脑中动脉阻塞 2 h 后再灌注, 各缺血组动物均出现神经功能缺损的症状, 主要表现为提尾悬空时, 对侧肩部内旋受限, 前肢屈曲、

内收, 肌力下降。单纯缺血再灌注模型组尤为显著; 大、小剂量 TSG 组神经功能缺损都有改善, 肌力明显增强, 有些动物提尾悬空时两前肢近对称的伸向地面, 行为接近正常, 除 6 h 时间点体征不稳定外, 其余各时间点行为学评分均较模型组降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两个剂量 TSG 组间差异不明显 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 缺血各组大鼠神经功能评分的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$, 分)

Tab. 1 Comparison of the scores of neurological function of ischemic rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$, scores)

组别	神经功能评分			
	6 h	24 h	48 h	7 d
模型组	2.00 \pm 0.89	2.67 \pm 0.52	2.33 \pm 0.52	1.50 \pm 0.55
小剂量组	2.00 \pm 0.63	1.67 \pm 0.52 *	1.33 \pm 0.52 *	0.83 \pm 0.43 *
大剂量组	1.67 \pm 0.82	1.33 \pm 0.52 *	1.17 \pm 0.41 *	0.67 \pm 0.52 *

与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 TSG 对大鼠脑缺血再灌注后缺血周边区顶叶皮质 NGF 蛋白表达的影响

缺血再灌注后 6 h 缺血周边区顶叶皮质神经元 NGF 蛋白阳性表达增加, 24 h 表达达高峰 (阳性细胞计数明显增高), 48 h 表达有所下降, 7 d 仍见表达。形态学上多数阳性细胞体积较大, 典型神经元形态, 细胞轮廓清晰, 膜、浆、核内均可出现阳性表达, 但主要为胞浆着色, 呈棕黄色。与对照组比, 缺血各组再灌注后各时间点 NGF 蛋白表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, TSG 治疗组再灌注各时间点阳性表达的细胞数量均明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 两个剂量 TSG 治疗组间无明显差异 ($P > 0.05$, 表 2, 图 1)。

表 2 各组大鼠缺血侧顶叶皮质 NGF 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$, 个阳性细胞)

Tab. 2 Comparison of NGF positive neurons in ischemic cortex of parietal lobe of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$, numbers of positive cells)

组别	NGF 蛋白表达			
	6 h	24 h	48 h	7 d
对照组	0.68 \pm 0.17	0.76 \pm 0.24	0.71 \pm 0.20	0.65 \pm 0.19
模型组	16.47 \pm 1.54 **	27.02 \pm 3.58 **	20.72 \pm 1.58 **	13.53 \pm 0.89 **
小剂量组	27.12 \pm 1.13 ***	44.57 \pm 3.25 ***	31.33 \pm 1.21 ***	22.12 \pm 0.75 ***
大剂量组	26.60 \pm 1.75 ***	42.85 \pm 3.41 ***	30.37 \pm 1.28 ***	21.23 \pm 0.64 ***

与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, *** $P < 0.01$ 。

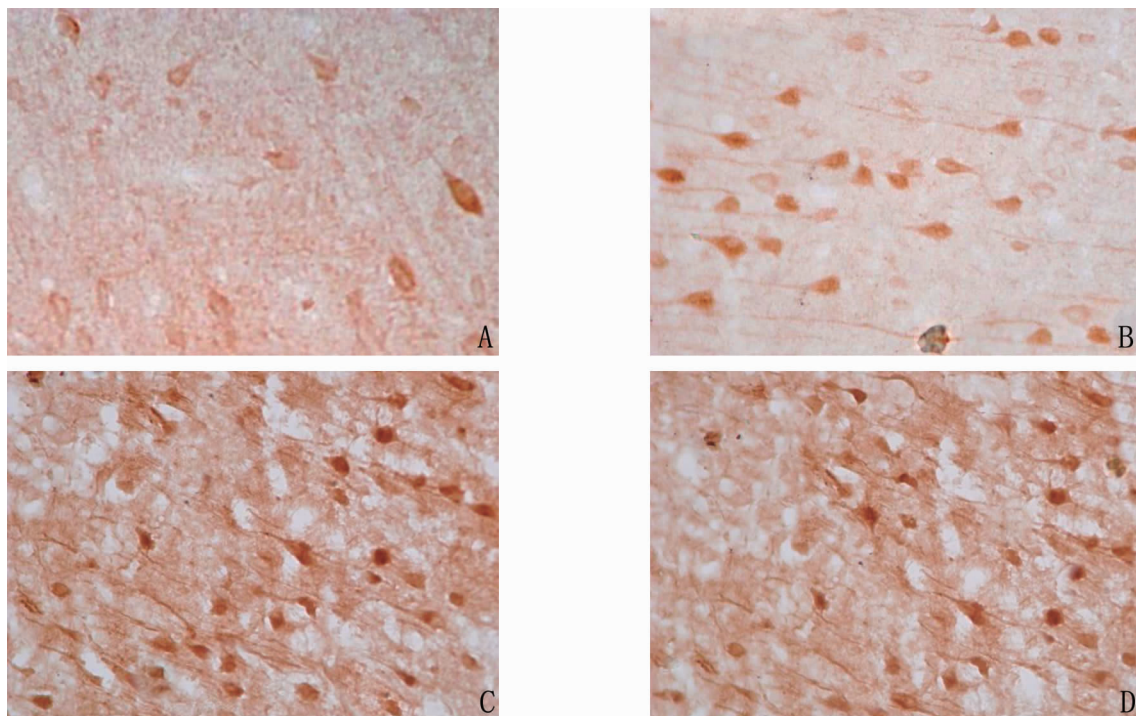


图1 免疫组织化学示大鼠缺血再灌注24 h后缺血周边区顶叶皮质神经元 NGF 蛋白的表达($\times 400$)。A:对照组;B:模型组;C:小剂量 TSG 组;D:大剂量 TSG 组。

Fig. 1 Immunohistochemical labeling of NGF in the ischemic cortex of parietal lobe at 24 h after ischemia-reperfusion ($\times 400$). A:Control group; B:Ischemia-reperfusion(I/R) model group; C:Low dose TSG group; D:High dose TSG group.

2.3 TSG 对大鼠脑缺血再灌注后缺血周边区顶叶皮质 GAP-43 蛋白表达的影响

缺血再灌注后 6 h 模型组缺血周边区顶叶皮质神经元 GAP-43 蛋白阳性表达与对照组相似, 24 h 阳性表达增加, 48 h 表达达高峰, 7 d 仍有较多量表达。GAP-43 蛋白阳性神经元主要为胞浆着色, 胞体周边及主树突可以淡染呈淡棕色。

与对照组比, 除模型组 6 h 外, 余缺血各组再灌注各时间点表达增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比, TSG 治疗组再灌注各时间点阳性表达细胞数量均明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 两个剂量 TSG 治疗组间无明显差异($P > 0.05$, 表 3, 图 2)。

表 3 各组大鼠缺血侧顶叶皮质 GAP-43 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=6$, 个阳性细胞)

Tab. 3 Comparison of GAP-43 positive neurons in ischemic cortex of parietal lobe of rats($\bar{x} \pm s, n=6$, numbers of positive cells)

组别	GAP-43 蛋白表达			
	6 h	24 h	48 h	7 d
对照组	9.65 \pm 1.38	9.70 \pm 1.40	9.72 \pm 1.51	9.68 \pm 1.43
模型组	10.20 \pm 1.46	17.00 \pm 1.43 **	19.98 \pm 1.73 **	16.75 \pm 1.13 **
小剂量组	13.58 \pm 1.32 ***	23.08 \pm 1.00 ***	33.35 \pm 1.93 ***	28.20 \pm 0.93 ***
大剂量组	13.65 \pm 1.33 ***	22.83 \pm 1.33 ***	33.08 \pm 1.62 ***	28.28 \pm 0.93 ***

与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, *** $P < 0.01$ 。

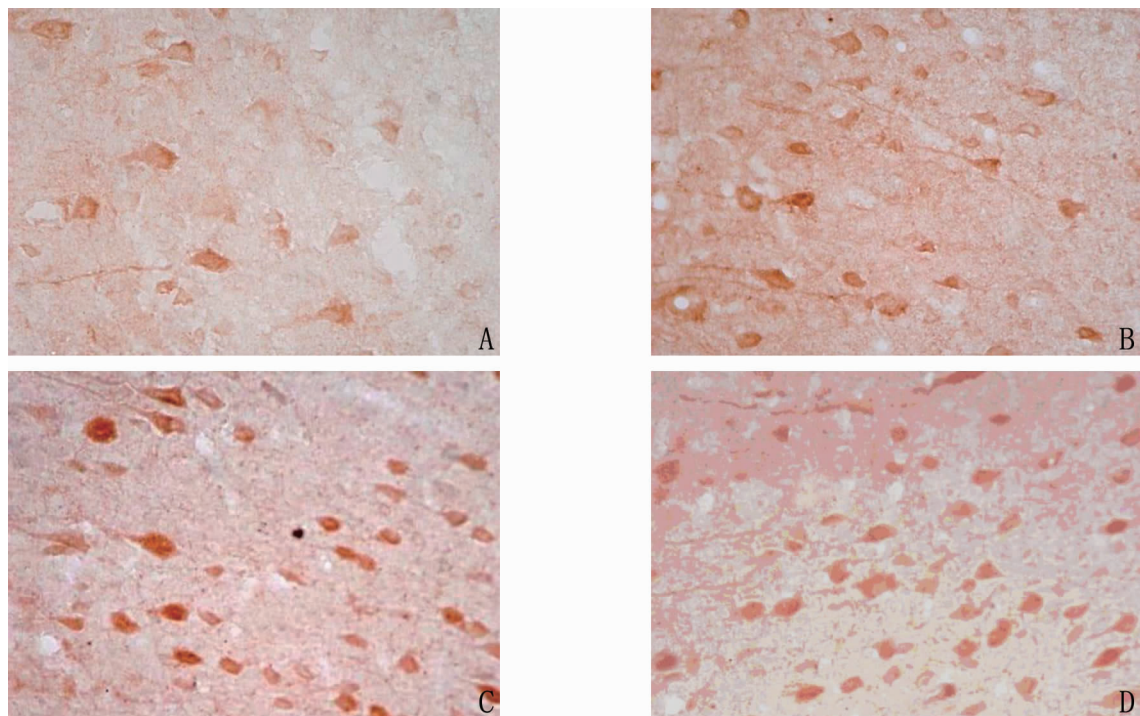


图2 免疫组织化学示大鼠缺血再灌注24 h后缺血周边区顶叶皮质神经元GAP-43蛋白的表达($\times 400$)。A:对照组;B:模型组;C:小剂量TSG组;D:大剂量TSG组。

Fig. 2 Immunohistochemical labeling of GAP-43 in the ischemic cortex of parietal lobe at 24 h after ischemia-reperfusion ($\times 400$). A:Control group; B:Ischemia-reperfusion(I/R) model group; C:Low dose TSG group; D:High dose TSG group.

2.4 TSG对大鼠脑缺血再灌注后缺血周边区顶叶皮质PKAc蛋白表达的影响

缺血再灌注后6h缺血周边区顶叶皮质神经元PKAc蛋白阳性表达较正常组增加,24 h表达达高峰,48 h表达有所下降,7 d仅见少量表达。PKAc蛋白在胞体和突起内表达,形态学上多数阳性细胞体积较大,典型神经元形态,胞体和突起呈棕黄色。与对照组比,缺血各组再灌注各时间点表达均相应增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比,TSG治疗组再灌注各时间点阳性表达细胞数量均明显增多,差异有统计学意

义($P < 0.01$),两个剂量TSG治疗组间无明显差异($P > 0.05$,表4,图3)。

2.5 相关性分析

取模型组、两个剂量TSG组再灌注后各时间点蛋白阳性细胞数分别对应进行双尾Pearson's相关检验,其中NGF与PKAc蛋白表达之间的相关系数为0.923($P < 0.01$),两者呈显著正相关性;PKAc与GAP-43蛋白表达之间的相关系数为0.589($P < 0.01$),两者正相关;NGF与GAP-43蛋白表达之间的相关系数为0.570($P < 0.01$),两者正相关(图4)。

表4 各组大鼠缺血侧顶叶皮质PKAc蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=6$,个阳性细胞)

Tab. 4 Comparison of PKAc positive neurons in ischemic cortex of parietal lobe of rats($\bar{x} \pm s, n=6$, numbers of positive cells)

组别	PKAc 蛋白表达			
	6 h	24 h	48 h	7 d
对照组	4.12 ± 1.00	4.53 ± 1.06	4.23 ± 0.98	4.05 ± 1.18
模型组	8.28 ± 1.17**	15.90 ± 1.82**	12.27 ± 1.62**	15.75 ± 0.68**
小剂量组	17.03 ± 1.39***	25.68 ± 2.10***	19.35 ± 1.40***	15.75 ± 0.68***
大剂量组	17.08 ± 1.48***	25.78 ± 2.13***	19.17 ± 1.06***	15.83 ± 0.75***

与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,### $P < 0.01$ 。

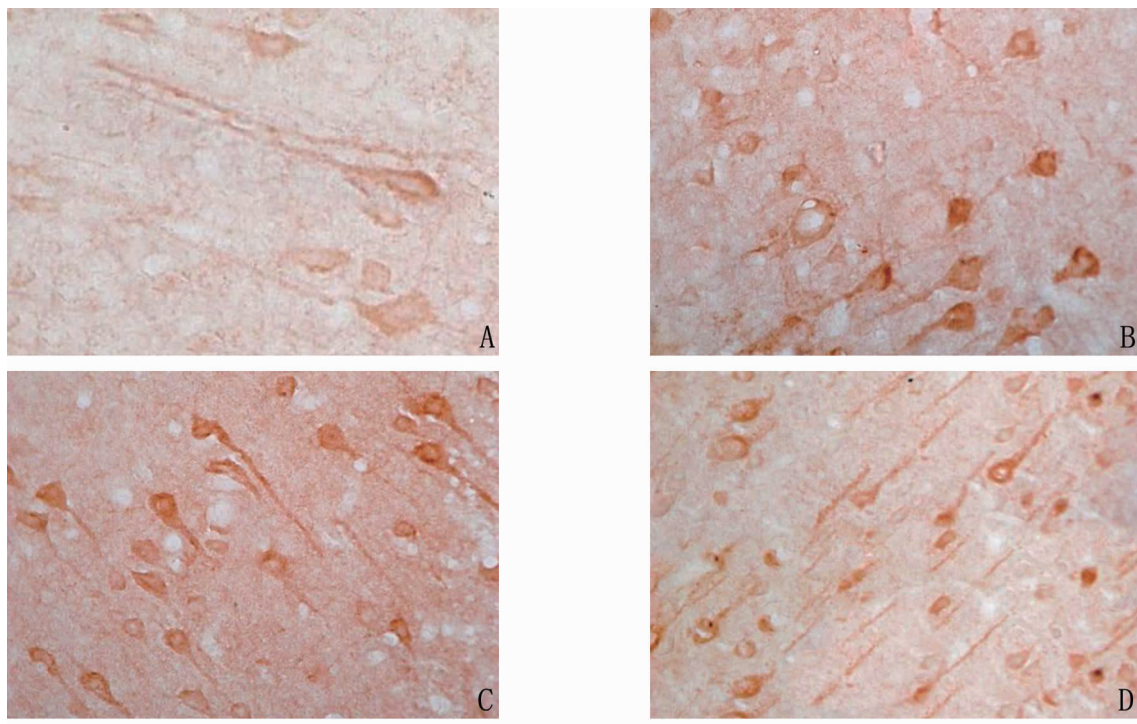


图3 免疫组织化学示大鼠缺血再灌注 24 h 后缺血周边区顶叶皮质神经元 PKAc 蛋白的表达 (×400)。A: 对照组; B: 模型组; C: 小剂量 TSG 组; D: 大剂量 TSG 组。

Fig. 3 Immunohistochemical labeling of PKAc in the ischemic cortex of parietal lobe at 24 h after ischemia-reperfusion (×400). A: Control group; B: Ischemia-reperfusion(I/R) model group; C: Low dose TSG group; D: High dose TSG group.

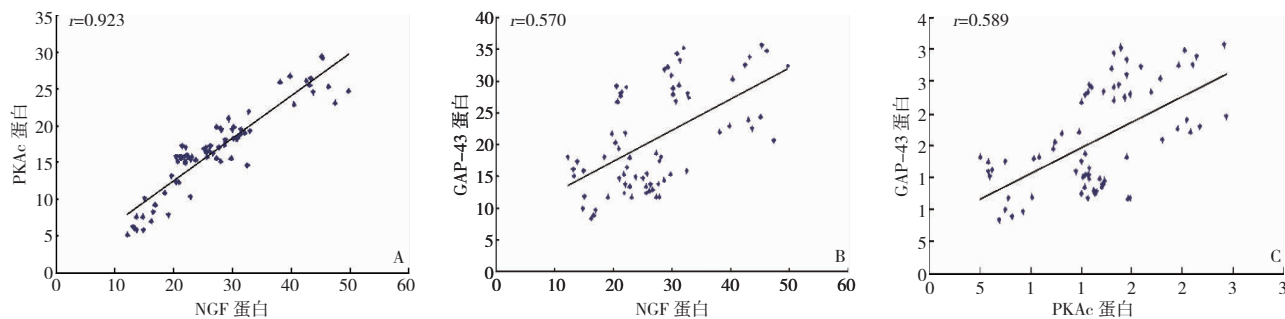


图4 NGF,PKAc 和 GAP-43 蛋白表达的直线相关分析。A: NGF 与 PKAc; B:NGF 与 GAP-43; C:PKAc 与 GAP-43。

Fig. 4 The linear correlation among NGF, PKAc, and GAP-43. A: NGF and PKAc; B:NGF and GAP-43; C:PKAc and GAP-43.

3 讨 论

NGF 是一种经典的神经营养因子,其与中枢神经系统疾病的关系日益受到重视。脑内 NGF 主要来源于神经元。在脑缺血性损伤中,NGF 对减轻神经元损伤、提高存活率和修复损伤都有重要作用^[11]。脑缺血或出血损伤发生早期即出现 NGF 反应性表达,并发挥神经元保护作用。一般缺血再灌注后 6 h 即出现 NGF 蛋白表达,脑缺血

程度与 NGF 表达时间呈正相关,但大多较早地恢复到正常水平,维持时间较短,难以对缺血损伤的神经元起到全面而持久的保护作用。因此,采用可持续促进 NGF 表达的治疗措施,对脑缺血后神经元损伤的保护具有重要的意义。本实验结果显示:缺血再灌注 6 h 后,缺血侧顶叶皮质可见 NGF 阳性表达,与模型组相比,两个剂量 TSG 组显著增强了缺血再灌注后 NGF 的阳性表达。说明 TSG 可以使内源性 NGF 在脑缺血再灌注时产生量增加,这对于缺血损伤的神经元,尤其是

缺血半暗带内的神经元具有重要的保护作用。既往的研究^[12]表明:NGF可能通过抗自由基、减少细胞内钙超载和兴奋性氨基酸,从而减轻缺血神经元的损伤;还有研究显示:NGF能够促进脑缺血再灌注后轴突再生标志物 GAP-43 蛋白表达增加,且环磷酸腺苷-蛋白激酶 A (cAMP-PKA) 信号途径在这个过程中起重要作用。

80 年代初,Skene 等^[13]人由兔再生外周神经等组织中获得一种神经组织特异性磷酸蛋白质即 GAP-43。GAP-43 为神经组织所固有,只分布于神经元及部分胚胎的胶质细胞和雪旺氏细胞,其免疫组织化学染色阳性细胞主要为胞浆着色,胞体和突起可以淡染。GAP-43 对神经纤维生长、发育、再生以及突触功能维持和递质释放都起重要作用。它作为轴突再生的标志物,在神经元发育和轴突生长时高水平表达,它的表达增加意味着轴突的发芽增加。cAMP-PKA 信号途径在轴突的生长和诱导过程中起重要作用,PKA 分子由两个调节亚基 (PKAr, Protein kinase A regulative subunit) 和两个催化亚基 (PKAc) 组成,每个调节亚基 R 上有两个 cAMP 结合位点,PKAr 与 cAMP 结合后释放出具有催化活性的 PKAc,催化亚基 PKAc 通过催化底物蛋白质某些特定丝/苏氨酸残基磷酸化来调控细胞反应。常丽英等^[14]应用脑室注射 NGF 的实验方法,研究 NGF 促进脑缺血再灌注大鼠轴突再生与 cAMP-PKA 信号途径的关系后发现,NGF 能够促进脑缺血再灌注后轴突再生标志物 GAP-43 的表达增加,从而起到神经保护作用,且 cAMP-PKA 信号途径在这个过程中起重要作用,是 NGF 促进脑缺血后神经再生的重要信号通路之一。此外,大量的体外实验^[15-19]发现 cAMP-PKA 通路在 NGF 神经保护过程起重要作用。其中,有学者应用辣椒素联合 NGF 诱导 PC12 细胞(嗜铬细胞瘤细胞)向神经元分化,并促使其轴突再生的实验中,应用 PKA 抑制剂后,NGF 促轴突再生的作用受到抑制,应用福斯高林 (PKA 激动剂)后,其促轴突再生作用明显增强。本实验结果显示:与模型组相比,两个剂量 TSG 组各时间点 NGF,PKAc 及 GAP-43 蛋白阳性表达均显著增加,且通过对三者之间两两进行双尾 Pearson's 相关检验,发现均存在正相关关系。结合上述文献研究,笔者推测 TSG 可能通过诱导脑缺血再灌注损伤大鼠内源性 NGF 表达增加,激活 PKA 通路,促进轴突再生标志物 GAP-43 蛋白表

达,起到神经保护作用。

TSG 作为尚待开发的新药,其量效关系不十分明确。研究指出,在动脉粥样硬化大鼠模型中,用 60 mg/(kg·d) 的 TSG 灌胃具有降血脂效应,30 mg/(kg·d) 则降血脂作用不明显^[20];在大鼠老年性痴呆模型中,大剂量的 [120 mg/(kg·d)] 对动物痴呆症状的改善并不优于小剂量 [60 mg/(kg·d)],且大剂量对中枢兴奋能力还有一定的抑制作用^[21]。本研究中采用 60 和 120 mg/(kg·d) 两组剂量干预,结果显示,两组剂量作用差异不明显 ($P > 0.05$)。考虑这可能与两组剂量之间剂距设计过窄有关,选择的两个剂量均位于该药物的治疗剂量范围之内,难以观察到明确的量效关系。因此 TSG 作为脑保护剂的量效关系还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zhang W, Xu X L, Wang Y Q, et al. Effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-beta-D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic diet rats [J]. *Planta Med*, 2009, 75 (11): 1209-1214.
- [2] Zhang Y Z, Shen J F, Xu J Y, et al. Inhibitory effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9 (35): 355-363.
- [3] Wang X, Zhao L, Han T, et al. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb, on experimental colitis in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578 (2-3): 339-348.
- [4] Guan S, Su W, Wng N, et al. A potent tyrosinase activator from *Radix Polygoni multiflori* and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells [J]. *Phytother Res*, 2008, 22 (5): 660-663.
- [5] 楚晋,叶崔飞,李林,等. 二苯乙烯苷对 D-半乳糖致脑老化小鼠学习记忆及神经营养因子的影响 [J]. *中国药房*, 2005, 16 (1): 13-15.
CHU Jin, YE Cuifei, LI Lin, et al. Effects of stilbene-glycoside on learning and memory ability and neurotrophic factor of brain aging model mice induced by D-galactose [J]. *Journal of China Pharmacy*, 2005, 16 (1): 13-15.
- [6] 侯德仁,王艳,薛俐,等. 何首乌对 $A\beta$ 1-40 诱导的 AD 大鼠海马线粒体膜流动性及 COX 活性的影响 [J]. *中南大学学报:医学版*, 2008, 33 (11): 987-992.
HOU Deren, WANG Yan, XUE Li, et al. Effect of *Polygonum multiple* on the fluidity of the mitochondria membrane and activity of COX in the hippocampus of rats with $A\beta$ 1-

- 40-induced Alzheimer's disease [J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2008, 33(11): 987-992.
- [7] 张媛英, 翟静, 孙凌云, 等. 何首乌提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(33): 86-87.
ZHANG Yuanying, DI Jing, SUN Lingyun, et al. Protective effects of tuber fleeceflower root extract on cerebral ischemic reperfusion injury in rats[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2005, 9(33): 86-87.
- [8] Wang T, Gu J, Wu P F, et al. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: involvement of JNK, SIRT1, and NF-kappaB pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(3): 229-240.
- [9] Yang P Y, Almofti M R, Lu L, et al. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in form cells by a water-soluble fraction of polygonum multiflorum [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99(3): 294-300.
- [10] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] 贺双腾, 黎杏群. 缺血性脑损伤时神经生长因子的表达[J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 1998, 1(6): 13-17.
HE Shuangteng, LI Xingqun. Expression of NGF in brain ischemic injury [J]. *Cerebrovascular Disease Foreign Medical Sciences*, 1998, 1(6): 13-17.
- [12] Guegan C, Ceballos-Picot I, Chevalier E, et al. Reduction of ischemia damage in NGF-transgenic mice: correlation enhancement of antioxidant enzyme activities [J]. *Neurobiol Dis*, 1999, 6(3): 180-189.
- [13] Skene J H, Jacobson R D, Snipes G J, et al. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes [J]. *Science*, 1986, 233(4765): 783-786.
- [14] 常丽英, 许予明, 张苏明, 等. 环磷酸腺苷-蛋白激酶 A 信号系统参与神经生长因子促进脑缺血再灌注大鼠轴突再生[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2006, 8(5): 350-353.
CHANG Liying, XU Yuming, ZHANG Suming, et al. cAMP-PKA signal pathway mediates the promotive effect of NGF on axon regeneration in cerebral ischemia-reperfusion rats [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2006, 8(5): 350-353.
- [15] Yang Y J, Lee H J, Choi D H, et al. Effect of scopolamine on neurite outgrowth in PC12 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 440(1): 14-18.
- [16] Yang Y J, Park J I, Lee H J, et al. Effects of (+)-eudesmin from the stem bark of magnolia kobus DC. var. borealis Sarg. on neurite outgrowth in PC12 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(12): 1114-1118.
- [17] Park S Y, Lee J Y, Choi J Y, et al. Nerve growth factor activates brain-derived neurotrophic factor promoter IV via extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 in PC12 cells [J]. *Mol Cells*, 2006, 21(2): 237-243.
- [18] Tsang C K, Ina A, Goto T, et al. Sargachromenol, a novel nerve growth factor-potentiating substance isolated from *Sargassum macrocarpum*, promotes neurite outgrowth and survival via distinct signaling pathways in PC12D cells [J]. *Neuroscience*, 2005, 132(2): 633-643.
- [19] Obara Y, Labudda K, Dillon T J, et al. PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(25): 6085-6094.
- [20] 张伟, 李峰, 王玉琴, 等. 二苯乙烯苷对实验性动脉粥样硬化大鼠血脂和炎症因子的调节作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(5): 516-519.
ZHANG Wei, LI Feng, WANG Yuqin, et al. Effect of tetrahydroxystilbene-glucoside on lipid and inflammatory factor levels of experimental atherosclerosis in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2007, 12(5): 516-519.
- [21] 叶翠飞, 张兰, 李斌, 等. 二苯乙烯苷对胆碱能损伤拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能和兴奋性的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2003, 10(9): 593-595.
YE Cuifei, ZHANG Lan, LI Bin, et al. Effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside, on learning and memory function and excitability in Alzheimer's disease rat induced by model cholinergic damage [J]. *Chin J Rehabil Theory Practice*, 2003, 10(9): 593-595.

(本文编辑 郭征)