

镇肝熄风汤预处理对 MCAO 大鼠脑组织病理学变化和神经元凋亡的影响

吴艳霞^{1*}, 吴婷玉¹, 叶红¹, 付雷²

(1. 武汉第一医院老年病科, 武汉 430022; 2. 武汉第一医院中心实验室, 武汉 430022)

[摘要] 目的: 研究镇肝熄风汤对大鼠中动脉梗死(MCAO)大鼠脑组织的病理学变化和神经元凋亡的影响。方法: MCAO术前给予高、低剂量镇肝熄风汤(15, 30 g·kg⁻¹)灌胃14 d, 采用线栓法制备MCAO。术后6 h称重法检测脑水肿程度, TTC染色观察脑梗死范围、HE染色观察缺血组织病理形态和海马神经元密度, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)及Western bolt检测凋亡效应蛋白半胱氨酸蛋白酶蛋白(Caspase 3)和聚ADP核糖聚合酶(PARP)表达情况。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠出现行为障碍, 梗死面积及缺血侧脑组织含水量显著增加, 海马CA1区神经元密度明显降低。与模型组比较, 镇肝熄风汤高、低剂量均能有效改善大鼠行为学积分, 可明显改善MCAO大鼠缺血侧脑组织含水量, 减少梗死面积, 改善局灶性脑缺血引起的海马CA1区神经元密度降低。镇肝熄风汤预处理后, 明显减少MCAO大鼠缺血侧脑组织神经元细胞凋亡率, 明显降低缺血侧脑组织活化Caspase-3和PARP蛋白表达量。结论: 镇肝熄风汤可能通过影响神经细胞凋亡, 发挥保护缺血大鼠脑组织的作用。

[关键词] 镇肝熄风汤; 大鼠中动脉梗死; 缺口末端标记法; Caspase-3; 聚ADP核糖聚合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)09-0224-05

[doi] 10.11653/syjf2013090224

Effect of Zhengan Xifeng Decoction Pretreatment on Pathological Changes and Neuron Apoptosis of Cerebral Tissue in Rat

WU Yan-xia^{1*}, WU Ting-yu¹, YE Hong¹, FU Lei²

(1. Department of Senile Disease, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China;

2. Center of Experimental Medicine, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Zhengan Xifeng decoction (ZGXFD) on pathological changes and neuron apoptosis in cerebral tissue in of middle cerebral artery occlusion (MACO) in rats. The effect of ZGXFD on the behavior obstacle in rats was observed. **Method:** The model of focal cerebral ischemia in rats was established with the suture-occluded method and was used to intervene with different dose of ZGXFD (15, 30 g ·

[收稿日期] 20120913(014)

[基金项目] 湖北省科技厅科技攻关计划(2007AA301B09-3)

[通讯作者] * 吴艳霞, 博士, 副主任医师, 从事老年心脑血管疾病研究, Tel: 13871557955, E-mail: spring_w @ 126.com

[12] Cohen G M. Caspases: the executioners of apoptosis

[J]. Bio Chem J, 1997, 326: 1.

[13] Stennicke H R, Salvesen G S. Caspases-controlling

intracellular signals by protease zymogen activation[J].

Biochim Biophys Acta, 2000, 1477: 99.

[14] Prez-Galn P, Marzo I, Giraldo P, et al. Role of

caspases and apoptosis-inducing factor (AIF) in

cladribine-induced apoptosis of B cell chronic

lymphocytic leukemia [J]. Leukemia, 2002,

16: 2106.

[15] Desagher S, Martinou J C. Mitochondria as the central

control point of apoptosis [J]. Trends Cell Bio, 2000

(10):369.

[16] Suzanne C, Jerry M A. The Bcl-2 family: regulates of

the cellular life-or-death switch [J]. Nature, 2002,

2: 647.

[责任编辑 聂淑琴]

kg⁻¹, respectively) before MCAO. The effect of ZGXFD on the behavior obstacle in rats was observed, the infarct size and the pathological change were observed by TTC staining, and HE dyeing, respectively. TUNEL was used to evaluate the apoptosis of neurons, and Western blot was used to observe the expression of Caspase 3 and poly ADP-ribose polymerase (PARP). **Result:** After modeling, behavior obstacle with different degree appeared in all rats. The infarct size could be observed in all groups except sham group. The nerve cell apoptosis could be found in all rats after 6 h of MCAO. The result showed that the ZGXFT improved the behavior obstacle, reduced the infarct size and cerebral edema obviously; and the AI and apoptosis of Caspase-3 and PARP were decreased significantly after 6 h MCAO. **Conclusion:** ZGXFD pretreatment has obvious protective effects on the focal cerebral ischemia in rats.

[**Key words**] Zhengan Xifeng decoction (ZGXFD); middle cerebral artery occlusion (MCAO); TUNEL; Caspase-3; PARP

镇肝熄风汤是治疗中风的常用方剂,临床上也常用于高血压病属肝肾阴亏、肝阳上亢者,在治疗高血压病及缺血性脑卒中方面有着确切的疗效。我们对镇肝熄风汤的前期研究结果显示,该方具有减轻原发性高血压大鼠脑皮质神经元损伤的作用^[1]。推测应用镇肝熄风汤对缺血性脑卒中个体进行早期干预,可能会有着较好的治疗效果。本实验采用线栓法阻断大鼠大脑中动脉,制作局灶性脑缺血模型,研究了镇肝熄风汤对局部脑缺血后行为学障碍、脑梗死范围、脑水肿程度及缺血组织病理形态的作用。同时采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL), Western bolt 检测凋亡效应蛋白表达情况,以研究镇肝熄风汤预处理对大鼠局灶性脑缺血后细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 动物 实验动物清洁级 Wistar 大鼠 120 只,体重 260 ~ 300 g,雌雄不限,由华中科技大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(鄂) 201130002。

1.2 试剂 1% 氯化三苯四氮唑磷酸盐(2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride TTC, Sigma), 苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin HE, Sigma), TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(Roche, German), 兔抗大鼠半胱氨酸蛋白酶蛋白 3(Caspase-3)、聚 ADP 核糖聚合酶(PARP) 抗体(Santa Cruz, US), 蛋白杂交膜(Schleicher and Schuell), 台盼蓝、化学发光试剂(Sigma, US)。

1.3 仪器 PM-10AD 显微摄影装置(Olympus, Japan), 蛋白电泳装置(Bio-Rad, US), MR23i 超速冷冻离心机(Journ, France), AEG-220 型电子分析天平(Shimadzu, Japan), JYY-III 恒压恒流电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.4 镇肝熄风汤及制备 怀牛膝 30 g, 代赭石

30 g, 生龙骨 15 g, 生牡蛎 15 g, 生龟甲 15 g, 生杭芍 15 g, 玄参 15 g, 天冬 15 g, 川楝子 6 g, 生麦芽 6 g, 茵陈 6 g, 甘草 4.5 g 组成。药物由湖北中医学院中药系提供,代赭石、生龙骨、生牡蛎、生龟板先煎 2 h, 然后和其余药物用 8 倍蒸馏水常规煎煮 3 次, 过滤, 浓缩至生药 1.5, 3.0 g·mL⁻¹, 4 °C 储存备用。

2 方法

2.1 模型制作与分组 模型制作参照 Pantoni 的线栓法制备大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型^[2]。大鼠用 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉(40 mg·kg⁻¹), 背位固定于大鼠手术台, 颈部正中切口 2 ~ 2.5 cm, 分离二侧甲状腺, 颈上交感神经及位于深层的颈内动脉最下端分支-翼腭动脉并于分支前 1 mm 处结扎。在颈外动脉距颈总动脉分支约 3 mm 处剪一小口, 插入栓塞线, 同时将颈外动脉端牵向外下方, 使之与颈内动脉呈平行走向, 拉直与颈内动脉的夹角, 将栓塞线(日本制尼龙线, 直径 0.205 mm) 缓缓推入至大脑中脑动脉口, 与颈外动脉同时结扎以固定栓塞线。近心端用另一根缝线结扎, 取下动脉夹, 逐层缝合。术中用白炽灯加热, 维持大鼠肛温 37 °C 左右。假手术(Sham)组除仅分离颈内外动脉, 不闭塞大脑中动脉, 其余手术步骤同模型组。将实验大鼠随机分为 4 组, 每组 30 只: ①A 组: 假手术组; ②B 组: 模型组; ③C 组: 低剂量镇肝熄风汤干预组(15 g·kg⁻¹, 相当于成人用量的 4 倍); ④D 组: 高剂量镇肝熄风汤干预组(30 g·kg⁻¹, 相当于成人用量的 8 倍)。其中 C、D 组大鼠于 MCAO 术前 14 d 给予不同剂量镇肝熄风汤 ig, A、B 组大鼠 ig 给予蒸馏水。10 mL·kg⁻¹, 1 日 2 次, 共 14 d(图 1)。

2.2 行为学观察 实验动物在术后 6 h 进行行为学检测, 参照 Bederson^[3] 等方法。评分标准: ①提鼠尾观察前肢屈曲情况, 如双侧前肢对称伸向地面, 计



图 1 实验进程示意

为 0 分;如手术的对侧前肢出现腕屈、肘屈曲、肩内旋或既有腕肘屈曲又有肩内旋者,分别计为 1,2,3,4 分。②将动物置于平地上,分别推双肩向对侧移动,检查阻力,如双侧阻力对等且有力,计为 0 分;如向手术的对侧推动时阻力下降者,根据下降程度的不同分为轻、中、重 3 度,分别计为 1,2,3 分。③将动物双前肢置于一金属网上观察双前肢的肌张力,双前肢肌张力对等且有力者计为 0 分;同样根据手术对侧肌张力下降程度不同计为 1,2,3 分。④动物有不停向一侧转圈者,计为 1 分。根据标准评分,满分为 11 分,分数越高,动物行为障碍越严重。

2.3 脑梗死范围检测 实验结束时,各组取 6 只大鼠处死后迅速取脑,额极后 2 mm 连续等距离切取 3 个冠状脑片,2% TTC 缓冲液 (pH 7.4) 37 °C 孵育 30 min,坏死区染为白色,缺血区染为红色,染色结束后用 4% 多聚甲醛固定。分别以缺血对侧脑片的面积减去缺血侧正常区的面积求得脑梗死面积,所有脑片梗死面积之和乘以脑片的厚度即为脑梗死体积,计算脑梗死体积占全脑体积比例 (%)。

2.4 脑组织含水量 各组取 6 只大鼠断头取脑,左右分开,分别称量左右脑湿重。105 °C 烘烤 48 h 至恒重,精确称量干重,计算含水量^[4]。

$$\text{含水量} = (\text{湿重} - \text{干重} / \text{湿重}) \times 100\%$$

2.5 脑组织病理学及海马 CA1 区神经元密度变化 动物经末次行为评分后,每组取 6 只大鼠,从视交叉前方切除部分端脑后置于 4% 多聚甲醛固定液中 4 °C 固定 12 h。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡和包埋后行连续切片,HE 染色。计算正常大鼠双侧海马 CA1 区神经元数目,取其平均值。

$$\text{神经元密度} = \text{CA1 区正常神经元数} / \text{CA1 区总长度} (\text{mm})$$

2.6 细胞凋亡原位检测 试剂盒购自罗氏公司,按说明书操作,荧光显微镜下观察,520 nm 显示为绿色荧光。有绿色荧光者为阳性细胞,即为凋亡细胞,HPIAS-2000 图像分析系统测定细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI)。凋亡细胞半定量分析:根据凋亡阳性细胞分布情况,在 400 倍荧光显微镜视野下,每张切片拍摄 5 个阳性视野,每视野计数 200 个阳性细胞数,以平均计算阳性细胞数所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数。

2.7 Caspase-3 与 PARP 蛋白表达量 (1)组织蛋白的提取:于 4 °C 取 100 mg 缺血侧脑组织,采用蛋白提取试剂盒提取蛋白质, -70 °C 保存。(2)免疫印迹:2 × SDS 加样缓冲液按 1:1 (V/V) 稀释待测蛋白质样品,于 100 °C 煮沸 3 ~ 5 min,制备 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,垂直电泳分离蛋白质 (层积胶 100 V, 1 h, 分离胶 200 V, 40 min)。将蛋白电转至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上,4 °C 14 V 电转过夜;关闭电源,拆卸转印装置,取转印膜考马斯亮蓝染色确定转移效率。将膜从电转槽中取出,dd H₂O 与 PBST 稍加漂洗,浸没于含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭液中缓慢摇荡 2 h。弃去封闭液后分别按实验需要分别加入兔抗大鼠 Caspase-3, PARP 抗体 (1:400), 兔抗大鼠 β-actin 多克隆抗体 (1:750) 作为内参。4 °C 摇匀过夜后, PBST 溶液于室温下洗膜 4 次,每次 5 ~ 10 min;加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔-IgG 二抗 (1:1 000), 室温轻摇 1 h, 用 PBST 漂洗膜后再浸洗 3 次,每次 5 ~ 10 min。HRP-ECL 发光法显色。按 ECL 试剂说明书 (Sigma Life Science) 将发光液按比例稀释混合,膜用去离子水稍加漂洗,滤纸贴角吸干,反贴法覆于 A、B 混合液滴上,熄灯至可见淡绿色荧光条带 (5 min 左右) 后滤纸贴角吸干,置于保鲜膜内固定于片盒中,迅速盖上胶片,关闭胶盒,根据所见荧光强度曝光。取出胶片立即完全浸入显影液中 1 ~ 2 min,清水漂洗后放在定影液中至底片完全定影,清水冲净晾干后进行分析与扫描。通过 Band Scan 5.0 软件对 Western-blot 杂交图进行分析,以 β-actin 做为定量 Maker, 20 pmol · L⁻¹ 为定量单位。每组实验均重复 3 次以上。

2.8 统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12 统计软件对实验数据进行分析,多组间数据比较采用方差分析,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠行为学检测 结果显示,与模型组相比,高、低剂量镇肝熄风汤预先给药 14 d 均可有效改善大鼠行为学积分 (*P* < 0.05)。见表 1。

3.2 脑梗死面积和脑组织含水量检测 TTC 染色检查脑梗死范围结果显示,模型组和高、低剂量镇肝熄风汤组缺血侧脑组织均有边界清晰、范围较恒定的白色坏死灶。与模型组比较,高、低剂量镇肝熄风汤预先使用均可明显减少 MCAO 大鼠缺血侧脑梗死面积 (*P* < 0.05)。脑组织含水量检测结果显示,模型组大鼠缺血侧脑组织含水量较假手术组大鼠有

非常显著的增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,高、低剂量镇肝熄风汤预先使用均可明显减少 MCAO 大鼠缺血侧脑组织含水量 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 脑组织病理学及海马 CA1 区神经元密度检测

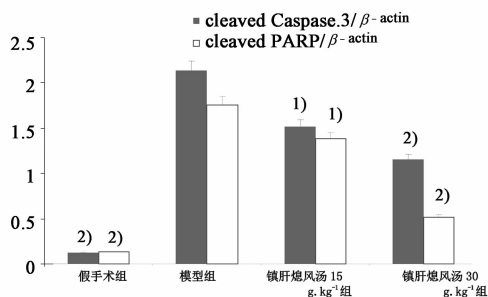
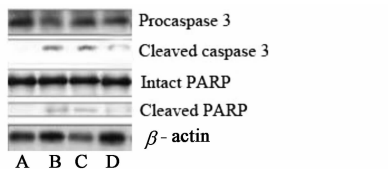
脑组织病理学检测结果显示:①假手术组脑组织未见明显病理学改变;②模型组在行 MCAO 术 6 h 后,缺血侧脑组织出现神经元胞核固缩、溶解及胞体缩小,梗死区周围(半暗带)组织神经元、神经胶质细胞肿胀,部分细胞核固缩、深染,神经细胞及血管周围间隙扩大等组织病理学改变;③高、低剂量镇肝熄风汤组缺血侧脑组织在光镜下可见少量细胞有细胞核固缩、溶解,胞体缩小等组织病理学改变,但程度较模型组为轻。见表 1。

3.4 脑组织神经细胞凋亡检测 TUNEL 法检测神

表 1 镇肝熄风汤对各组行为学积分、脑梗死范围、神经元密度、术侧含水量及神经细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	行为学积分 /分	脑梗死范围 /%	海马 CA1 区神经元 /个/mm	缺血侧含水量 /%	凋亡率 /%
假手术	-	0 ± 0 ²⁾	0 ± 0 ²⁾	191.53 ± 15.44 ¹⁾	75.21 ± 0.49 ²⁾	4.89 ± 0.74 ²⁾
模型	-	8.44 ± 2.01	38.64 ± 3.27	68.74 ± 9.39	89.62 ± 0.77	25.72 ± 1.45
镇肝熄风汤	15	6.22 ± 1.42 ¹⁾	30.14 ± 2.53 ¹⁾	126.17 ± 12.61 ¹⁾	82.05 ± 0.64 ¹⁾	16.24 ± 1.32 ²⁾
	30	5.93 ± 2.10 ²⁾	26.92 ± 3.30 ²⁾	163.90 ± 18.03 ¹⁾	80.27 ± 0.75 ¹⁾	12.76 ± 1.06 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 镇肝熄风汤 15 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
D. 镇肝熄风汤 30 $g \cdot kg^{-1}$ 组;与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

图 2 镇肝熄风汤对 MCAO 大鼠缺血侧脑组织 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

栓塞大脑中动脉(MCA)法是目前制作局部脑缺血模型相对较为简便且具有较高重复性的手术方法^[5]。在本次实验中,笔者采用了线栓法阻塞 MCA 的方法制作大鼠局部脑缺血模型,结果显示,阻断

经细胞 AI 结果显示,与假手术组相比,MCAO 模型组大鼠缺血侧脑组织中 AI 显著升高 ($P < 0.01$);镇肝熄风汤高、低剂量干预组 MCAO 大鼠缺血侧脑组织中 AI 下降且与模型组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.5 Caspase-3 与 PARP 蛋白表达量 Western blot 检测结果显示,模型组大鼠缺血侧脑组织处于激活状态的 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达量均较假手术组大鼠有非常显著的增加 ($P < 0.01$);低剂量镇肝熄风汤预先使用可明显降低 MCAO 大鼠 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达量 ($P < 0.05$),高剂量镇肝熄风汤(D 组)作用更为显著 ($P < 0.01$)。见图 2。

MCA 6 h 后,所有动物均出现了程度不同的运动障碍。与假手术组相比,模型组和不同剂量镇肝熄风汤组大鼠行为学积分均有显著增加;与模型组相比,在 MCAO 前预先使用高、低剂量镇肝熄风汤均可有效改善大鼠行为学积分,提示预先使用镇肝熄风汤对局灶性脑缺血引起的中枢神经系统损伤具有一定的改善作用,并且不同剂量镇肝熄风汤的干预,能显著减少梗死面积,改善 MCAO 大鼠脑组织病理学变化。本次实验结果还显示,MCAO 大鼠脑组织含水量缺血侧脑组织含水量较假手术组大鼠有非常显著的增加,但不同剂量的镇肝熄风汤预先使用均可明显减少 MCAO 大鼠缺血侧脑组织含水量。

脑缺血后神经元凋亡是神经元死亡的重要形式^[6],TUNEL 法是检测细胞凋亡的重要技术手段^[7]。既往研究表明脑缺血后,皮层脑区出现大量神经细胞凋亡^[8]。因此,笔者在实验中应用 TUNEL 法对 MCAO 引起的细胞凋亡进行了分析。结果显示,与假手术组相比,MCAO 模型组大鼠缺血侧脑组织中 AI 显著升高,镇肝熄风汤干预后 MCAO 大鼠缺血侧脑组织中 AI 明显下降,提示镇肝熄风汤预先使用具有良好的对抗缺血引起的神经细胞凋亡的作用。

细胞凋亡受到多种相关基因的调控,其中半胱天冬酶家族(Caspases)激活是细胞凋亡效应期的中心事件,而 Caspase-3 是凋亡信号传导中的关键效应分子^[9],PARP 是 Caspase-3 的底物,在维持基因组稳定和细胞死亡过程中发挥作用。Caspase-3 的激活将 PARP 裂解为 24,89 kDa 两个活性片段,预示着细胞凋亡的开始。PARP 在细胞损伤过程中起着重要作用,所以 cleaved PARP 片段是检测细胞凋亡非常敏感的指标,检测到 89 kDa 的 cleaved PARP 片段预示 Caspase-3 的活化^[10]。Chaitanya 等^[11]复制缺血再灌注大鼠模型发现,脑皮质 Caspase-3 表达增强和 PARP 裂解增加,导致神经细胞凋亡。赖真等^[12]发现脑缺血再灌注后各时间点脑组织 Caspase-3 表达显著升高,表明 Caspase-3 参与了缺血再灌注后凋亡的发生。为进一步明确镇肝熄风汤改善缺血性脑损伤后细胞凋亡的机制,我们对缺血区域脑组织凋亡效应分子 Caspase-3 与 PARP 蛋白的表达进行了检测,结果显示,模型组大鼠缺血侧脑组织处于激活状态的 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达量均较假手术组大鼠有非常显著的增加,镇肝熄风汤预先使用可明显降低 MCAO 大鼠 cleaved Caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达量,提示镇肝熄风汤对抗缺血引起的神经细胞凋亡的作用主要在于影响依赖于 Caspase 蛋白凋亡途径,并与其调控下游效应蛋白 PARP 密切相关。

镇肝熄风汤出自张锡纯的《医学衷中参西录》,认为镇肝熄风汤对中风病具有预防和治疗作用,充分体现了中医治未病的思想理念^[13]。现代中医中风证候研究结果亦显示,在脑缺血再灌注损伤的早期,中医证候是以阳亢风动为其主要特征,潜阳熄风中药能有效阻止脑缺血凋亡的发生发展^[14]。综上所述,我们实验发现预先使用镇肝熄风汤,通过调控 Caspase-3 的活化和下游效应蛋白 PARP 的裂解,减少缺血区神经细胞凋亡,可达到改善缺血性脑卒中急性期组织病理变化及预后的目的。

[参考文献]

[1] 孟云辉,涂欣,吴艳霞,等.镇肝熄风汤对自发性高血压大鼠脑保护作用的研究[J].北京中医药大学学报,2007,30(2):101.
[2] Pantoni L, Garcia J H, Guitierrez J A. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia [J]. Stroke,

1996, 27(9): 1641.
[3] Slavianka M, Roumen K, Lidia K. Multi-unit activity suppression and sensorimotor deficits after endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion in conscious rats [J]. J Neuro Sci, 2003, 212(1/2): 59.
[4] Amy C Y Lo, Ann Y S Chen, Victor K L Hung, et al. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(8): 998.
[5] Valeriani V, Dewar D, McCulloch J. Quantitative assessment of ischemic pathology in axons, oligodendrocytes, and neurons; attenuation of damage after transient ischemia [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(5): 765.
[6] Kenneth J, Xia Y, Gbbriel G. Mechanism underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis [J]. Prog Neurobiol, 2000, 62(3): 215.
[7] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. Circ Res, 1998, 82(11): 1111.
[8] 贾占红,赵晖.竹节参总皂苷对脑缺血大鼠神经细胞凋亡和即早基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,21(17):168.
[9] Cho B B, Toledo-Pereyra L H. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke [J]. J Invest Surg, 2008, 21(3): 141.
[10] Pieper A, Vema A, Zhang J, et al. Poly (ADP-ribose) Polymerase, nitric oxide and cell death [J]. Trends Pharmacol Sci, 1999, 20(4): 171.
[11] Chaitanya G V, Babu P P. Differential PARP cleavage: An indication of heterogeneous forms of cell death and involvement of multiple proteases in the infarct of focal cerebral ischemia in rat [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(4): 563.
[12] 赖真,李丽珊,程少冰.黄芪加红花对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及半胱氨酸蛋白酶-3 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 15(2): 45.
[13] 武继涛.张锡纯中风学术思想探讨 [J]. 中国医药导报, 2011, 30(8): 120.
[14] 王键,郜岱,胡建鹏.3 种中医治法对脑缺血再灌注损伤大鼠自由基和神经元凋亡的动态比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 5(11): 49.

[责任编辑 聂淑琴]