

薛威,唐虹,孙雨倩,等. 二苯乙炔苷抑制 NADPH 氧化酶对小鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 208-214.

Xue W, Tang H, Sun YQ, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting expression of NADPH oxidase in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 208-214.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.013

二苯乙炔苷抑制 NADPH 氧化酶对小鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用

薛威¹,唐虹¹,孙雨倩²,江勤¹,黄大可³,董六一^{1*}

(1. 安徽医科大学药理学教研室 抗炎免疫药理学教育部重点实验室 国家中医药管理局中药药理三级实验室;
2. 安徽医科大学临床医学院; 3. 安徽医科大学基础医学院,合肥 230032)

【摘要】 目的 探讨二苯乙炔苷(TSG)抑制 NADPH 氧化酶对小鼠脑缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法 将 100 只实验小鼠随机分成 5 组:假手术组、模型组、TSG 低剂量组(3 mg/kg)、TSG 中剂量组(6 mg/kg)、TSG 高剂量组(12 mg/kg),每组 20 只。通过双侧颈总动脉结扎造成小鼠脑缺血 2 h,再灌注 24 h 后处死小鼠。采用 HE 染色法对小鼠脑组织进行病理学检测,采用 DHE 染色法和 ESR 波谱仪检测脑组织中活性氧(ROS)水平,采用 Western blot 法检测脑组织中 NOX4 和 cleaved caspase-3/9 蛋白的表达。结果 小鼠脑缺血再灌注后,缺血区皮层脑组织出现严重的病理性损伤,其 ROS 水平显著升高,脑组织中 NOX4 蛋白表达显著上调,凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3/9 蛋白表达量显著增加。TSG 可以显著减轻小鼠缺血再灌注脑组织的病理性损伤,抑制 ROS 的产生,显著下调氧化应激蛋白 NOX4 的表达,并显著抑制凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3/9 蛋白的表达。结论 TSG 可通过抑制脑组织氧化应激蛋白 NOX4 的表达,减少活性氧的生成,并抑制凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3/9 过度表达,对小鼠脑缺血再灌注损伤起保护作用。

【关键词】 二苯乙炔苷;脑缺血再灌注;NADPH 氧化酶;活性氧;凋亡;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0208-07

Tetrahydroxystilbene glucoside protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting expression of NADPH oxidase in mice

XUE Wei¹, TANG Hong¹, SUN Yuqian², JIANG Qin¹, HUANG Dake³, DONG Liuyi^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immunopharmacology, Ministry of Education; Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, State Administration of TCM, Anhui Medical University; 2. Clinic Medical College of Anhui Medical University; 3. Basic Medical School of Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Corresponding author: DONG Liuyi. E-mail: dongly@ahmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside (TSG) on cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in mice. **Methods** One-hundred mice were divided randomly into five groups of 20

[基金项目] 安徽省自然科学基金(1408085MH174)。

Funded by Natural Science Foundation of Anhui(1408085MH174).

[作者简介] 薛威(1993—)男,硕士研究生。Email: 358812566@qq.com

[通信作者] 董六一(1973—)男,教授,研究方向为心脑血管药理学。Email: dongly@ahmu.edu.cn

mice each: sham, I/R group, and low TSG (3 mg/kg), medium TSG (6 mg/kg) and high TSG (12 mg/kg) groups. The mice underwent cerebral ischemia for 2 h by ligation of bilateral common carotid arteries, and were sacrificed 24 h after reperfusion. Pathology of the brain tissues was assessed by hematoxylin and eosin (H&E) staining. Reactive oxygen species (ROS) levels in brain tissues were measured by dihydroethidium staining and electron spin resonance spectroscopy. Expression of the proteins of NADPH oxidase (NOX) 4 and cleaved caspase (CC)-3 and CC-9 in brain tissues were detected by Western blot. **Results** Compared with the sham group, there was deformation and swelling of neurons, pyknosis and anachromasis of nuclei as well as shrunken cell bodies in the I/R group. ROS levels were increased significantly, and expression of NOX4, CC-3 and CC-9 was up-regulated significantly in the I/R group. Compared with the I/R group, TSG expression reduced markedly the pathological damages in brain tissues after cerebral I/R. TSG down-regulated the protein level of NOX4 significantly according to the Western blot. Dihydroethidium staining indicated that TSG decreased ROS levels and inhibited the activity of CC-3 and CC-9 in the ischemic cortex after reperfusion. **Conclusions** TSG has neuroprotective effects on cerebral I/R injury in mice. TSG may be associated with inhibiting expression of NOX4 protein, thereby reducing ROS levels, and inhibiting overexpression of the apoptosis-related proteins CC-3 and CC-9.

【Keywords】 TSG; cerebral ischemia reperfusion; NADPH oxidase; ROS; apoptosis; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑卒中是具有高发病率和死亡率的神经系统疾病之一,严重威胁人类健康,80%的脑卒中是缺血性的^[1-2]。脑缺血后,再灌注会进一步加重脑组织损伤,据报道,缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤的一个关键机制是氧化应激^[3-4]。氧化应激的主要原因是 ROS 的积累,过度的 ROS 诱导细胞膜和线粒体膜的损伤,以及 DNA 的降解,最终促使细胞凋亡^[5]。NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)是脑 I/R 损伤中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源。中枢神经系统表达的 NOX 有 NOX1、NOX2、NOX4,而 NOX4 在脑 I/R 损伤中扮演着最为重要的角色^[6]。参与氧化应激的主要 ROS 包括超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基,而 NOX4 主要产生过氧化氢^[7]。因此,降低 NOX4 的水平对于脑 I/R 损伤具有很大的治疗意义。

二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是中药何首乌中特有的具有显著药理活性的水溶性有效成分,研究表明其具有抑制粥样硬化、防治老年性痴呆、抗肿瘤、保护脑组织等多种功能^[8-10]。吴晓玲等^[11]研究发现:TSG 可以提高大鼠体内 SOD 含量和降低 MDA 含量减轻脑组织氧化应激损伤。梅劲春等^[12]发现:用 TSG 治疗大鼠糖尿病肾病后,氧化应激指标 ROS 及 MDA 水平降低, SOD 水平升高,肾间质纤维化减轻。这些研究结果提示, TSG 可清除氧自由基,可有效对抗氧化应激损伤,具体的作用机制有待进一步阐明。本研究主要探讨 TSG 是否通过抑制 NOX4 的活性从而减轻小鼠脑 I/R 后的氧化应激损伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

5 周龄 SPF 级雄性 KM 小鼠,体重 22 ~ 24 g,购于安徽医科大学省级实验动物中心【SCXK(皖)2011-002】,饲养与实验均在安徽医科大学实验动物中心屏障环境中进行【SYXK(皖)2011-007】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。温度范围 22 ± 3℃,湿度范围:40% ~ 70%,照明周期:12 h 明/12 h 暗,自由摄水进食。

1.1.2 药品与试剂

二苯乙烯苷(纯度:98%,批号:20170502,南京道斯夫生物科技有限公司,中国),水合氯醛(批号:T20150610,国药集团化学试剂有限公司,中国),0.9%氯化钠注射液(批号:170705074,上海华源制药股份有限公司,中国),RIPA 蛋白裂解液(Beyotime Institute of Biotechnology,中国),PMSF(Sigma 公司,美国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology,中国),SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology,中国),预染蛋白 marker(Thermo Fisher Scientific 公司,美国),兔来源 NOX4 一抗、兔来源 cleaved caspase-3/9 一抗、内参 β -actin(CST 公司,美国),辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗和山羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,中国),SuperSignal West Femto 高灵敏度发光试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,美国)。

1.1.3 仪器设备

超低温冰箱(Sanyo Electric CO. Ltd, 日本), TGL-16H 高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司产品, 中国), DIAX-900 内切式组织匀浆机(Heidolph 公司, 德国), TE300 型倒置显微镜(Nikon 公司, 日本), SpectraMax190 酶标仪(Molecular Devices, USA), 石蜡切片机(Leica, 德国), WD-9405B 水平摇床(北京市六一仪器厂, 中国), Bioshine ChemiQ4600 荧光及化学发光成像系统(上海欧翔科学仪器公司, 中国), JES-FA20000 spectrometer(JEOL)型 ESR 波谱仪(日本电子, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠急性脑缺血再灌注损伤模型建立

将 100 只实验小鼠随机分成 5 组:假手术组、模型组、二苯乙烯苷剂量组(3、6、12 mg/kg), 每组 20 只, 给药体积为 0.01 mL/g。适应性喂养 5 d 后, 进行手术造模。所有小鼠术前禁食不禁水 12 h。小鼠放入麻醉箱中给予 1.33% (一个肺泡浓度) 的异氟烷麻醉 15 min 后固定, 分离双侧颈总动脉, 并穿以 6 号线。在结扎之前将给药组小鼠通过尾静脉注射 TSG 一次, 随即结扎双侧颈总动脉 30 min 后再经尾静脉注射给药一次, 结扎 2 h 后, 松开丝线进行再灌, 24 h 后处死小鼠。假手术组仅做颈动脉分离, 不做结扎处理, 且假手术组和模型组仅给予等量的生理盐水。

1.2.2 病理组织学检查

小鼠脑缺血再灌注后, 处死取脑, 每组取 4 个小鼠脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定。经石蜡包埋制成切片, 进行苏木精-伊红(HE)染色, BX-51 型正置显微镜观察小鼠脑组织病理变化。

1.2.3 脑组织氧自由基检测

小鼠造模成功后, 颈椎脱臼处死, 取出大脑(去除小脑和脑干, 每组 8 个小鼠大脑), 迅速将缺血区脑组织装入内径 2 mm 的薄壁聚乙烯塑料管中, 并迅速放入液氮中待测。将 JES-FA20000 spectrometer (JEOL) 型 ESR 波谱仪谐振腔温度调整到 130 K, 从液氮中取出脑组织标本迅速放入 ESR 谐振腔内, 测试 ESR 波谱, 利用专用软件分析氧自由基信号情况。

1.2.4 DHE 染色法检测脑组织中 ROS 水平

实验开始前, 将 -20℃ 保存的染色液(reagent B)放入冰槽里融化, 稀释液(reagent C)置于室温预热。移出 10 μL 染色液(reagent B)到新的 1.5 mL

离心管, 加入 990 μL 稀释液(reagent C), 混匀后, 配成染色工作液, 避光待用。小鼠缺血再灌注后, 断头取脑(每组 4 个小鼠大脑), 用冰冻切片机切制成 10 μm 的冰冻切片, 小心加上 500 μL 预冷的清理液(reagent A), 铺满整个切片表面。移去切片上的清理液(reagent A)后, 加上 200 μL 室温预热的染色工作液, 在 37℃ 湿润培养箱里, 孵育 20 min。避光除去染色工作液后, 在整个切片表面加上 500 μL 清理液(reagent A), 除去切片上的清理液(reagent A)后封片, 即刻在荧光显微镜下观察。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达水平

采用 Western blot 分别检测小鼠缺血侧大脑皮层组织中 NOX4 通路相关蛋白和 caspase-3/9 蛋白表达的变化(每组 4 个小鼠大脑)。利用 Bioshine ChemiQ 4600 荧光及化学发光成像系统显影后, 使用 Image J 分析软件计算蛋白条带灰度值。

1.3 统计与分析

实验数据采用 SPSS 17.0 进行分析, 结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组内和组间数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA)处理, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

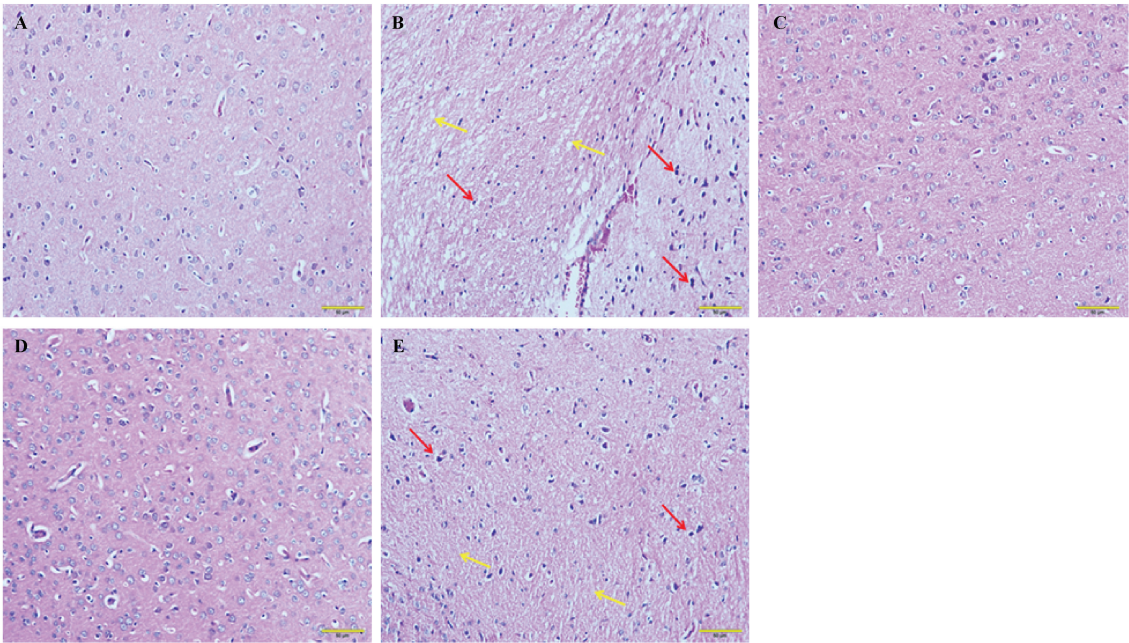
2 结果

2.1 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织病理学变化的影响

在显微镜下观察发现(图 1), 假手术组小鼠脑皮质神经元细胞排列整齐, 形态正常且细胞数较多。模型组小鼠脑皮层神经元细胞数量减少, 疏松呈网状(黄色箭头所示), 胞核深染(红色箭头所示)等病理性改变。TSG 高、中剂量治疗组能够明显减轻小鼠脑皮层神经元的病理性损伤, 增加神经元细胞数量, 改善神经元细胞形态, 减轻核固缩。TSG 低剂量组神经元的病理性损伤未得到明显改善。

2.2 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中氧自由基代谢的影响

结果见表 1, 与假手术组相比, 模型组小鼠脑组织中氧自由基生成明显增加, 其氧自由基信号值与假手术组比较呈显著性差异($P < 0.01$); 与模型组比较, TSG 12.0、6.0、3.0 mg/kg 可显著抑制小鼠脑组织氧自由基生成, 其氧自由基信号值显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。



注: A.假手术组; B. I/R 组; C. TSG (12.0 mg/kg) 组; D. TSG (6.0 mg/kg) 组; E. TSG (3.0 mg/kg) 组。

图 1 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后大脑皮层脑组织病理学损伤的影响 (×200)

Note. A: Sham group. B: I/R group. C: TSG (12.0 mg/kg) group. D: TSG (6.0 mg/kg) group. E: TSG (3.0 mg/kg) group.

Figure 1 Effects of TSG on pathological damages in brain tissues after I/R injury in the mice (×200)

表 1 二苯乙烯苷对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织氧自由基代谢的影响 (x̄ ± s, n = 8)

Table 1 Effects of TSG on metabolism of oxygen free radicals in brain tissue after cerebral I/R injury in the mice (x̄ ± s, n = 8)

组别 Groups	剂量 Doses (mg/kg)	氧自由基 Oxygen free radical (信号值/mg)
假手术组 Sham	—	5.21±0.72
模型组 (I/R) Model	—	7.97±1.95 ^{##}
二苯乙烯苷 TSG	12	5.42±1.03 ^{**}
	6	5.79±1.62 [*]
	3	5.94±1.06 [*]

注: ^{##} $P < 0.01$ vs 假手术组; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs 模型组 (I/R)。
Note. ^{##} $P < 0.01$, vs the sham group. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs the model (I/R) group.

2.3 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中 ROS 水平的影响

DHE 染色结果显示,小鼠脑缺血再灌注后,与假手术组相比,模型组小鼠大脑皮质缺血区 ROS 水平显著增加, TSG (12.0、6.0、3.0 mg/kg) 剂量组小鼠脑皮质缺血区 ROS 水平较模型组显著降低。提示 TSG 可抑制缺血再灌注损伤小鼠大脑皮质 ROS 的生成。(见图 2)

2.4 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中 NOX4 蛋白表达的影响

小鼠脑缺血再灌注 24 h 后与假手术组相比,模型组小鼠大脑皮质缺血区 NOX4 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), TSG 12.0 mg/kg 和 6.0 mg/kg 可显著抑制小鼠大脑皮质缺血区 NOX4 蛋白的表达,减轻小鼠脑缺血再灌注引起的氧化应激损伤。结果提

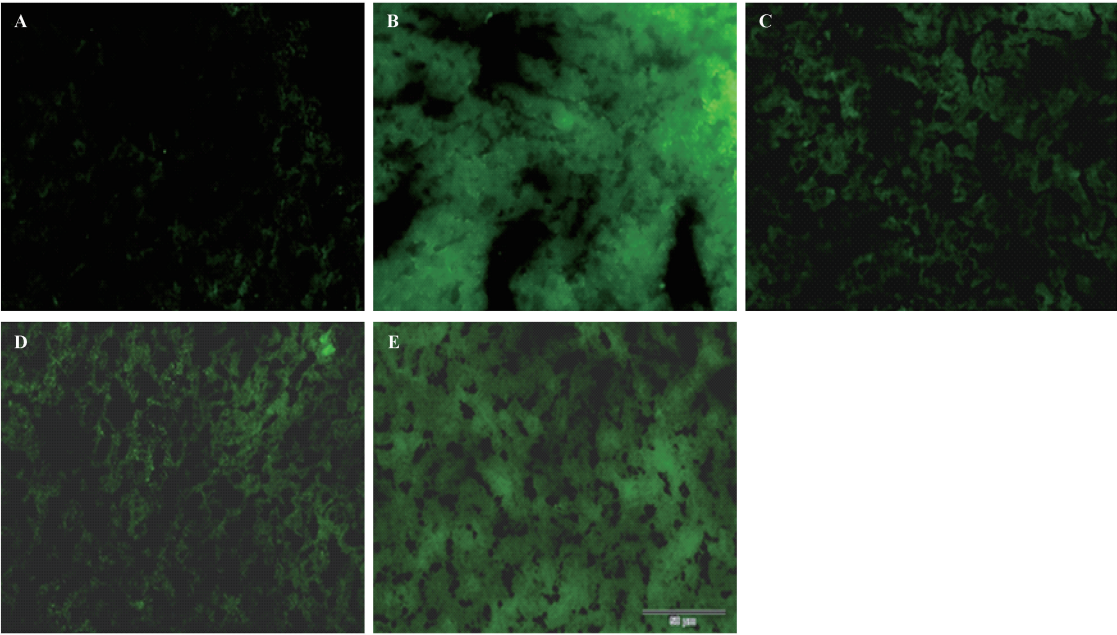
示 TSG 可抑制缺血再灌注损伤小鼠缺血区大脑皮质 NOX4 蛋白表达的增高。(见图 3)

2.5 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中凋亡相关蛋白表达的影响

小鼠脑缺血再灌注 24 h 后,与假手术组相比,模型组小鼠缺血区皮质组织凋亡相关蛋白 caspase-3/9 活化增加,剪切后的 caspase-3/9 蛋白表达显著增多 ($P < 0.01$), TSG 12.0 mg/kg 可显著抑制小鼠缺血区皮质组织凋亡蛋白 caspase-3/9 的活化,从而抑制神经元细胞的凋亡。(见图 4)

3 讨论

二苯乙烯苷 (TSG) 化学名为 2,3,5,4-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷,其结构与白藜芦醇相似,仅二位多一个酚羟基并形成了糖苷,均属于二

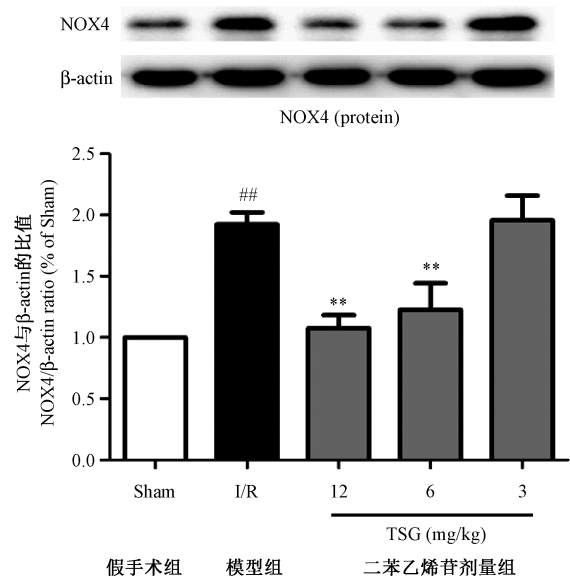


注: A.假手术组; B.I/R 组; C.TSG(12.0 mg/kg)组; D.TSG(6.0 mg/kg)组; E.TSG(3.0 mg/kg)组。

图 2 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中 ROS 水平的影响(×200)

Note. A: Sham group. B:I/R group. C:TSG(12.0 mg/kg) group. D:TSG(6.0 mg/kg) group. E:TSG(3.0 mg/kg) group.

Figure 2 Effects of TSG on ROS levels in brain tissues after I/R injury in the mice(×200)



注: ^{##}*P* < 0.01 vs 假手术组; ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 vs 模型组(I/R)。

图 3 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中 NOX4 蛋白表达的影响

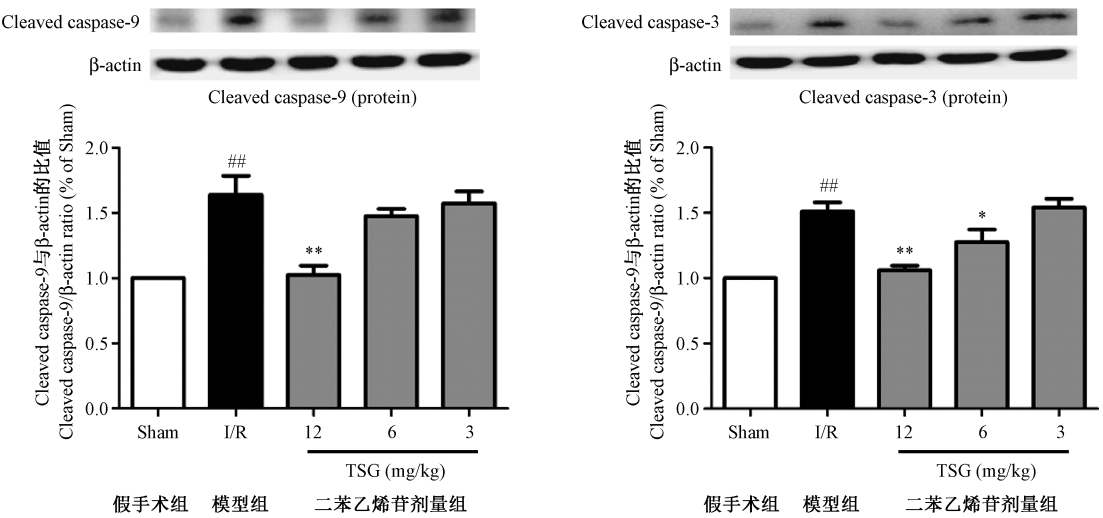
Note. ^{##}*P* < 0.01 vs the sham group. ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 vs the model (I/R) group.

Figure 3 Effects of TSG on the expression of NOX4 protein in brain tissue after I/R injury in the mice

苯乙烯类^[13]。在心脑血管方面,Liu 等^[14]发现 TSG 的酚羟基通过给出氢原子,自身形成二聚体,从而清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基,进而发挥抗氧化作用。此外,TSG 可以抑制脑 I/R 所导致的 NMDA 受体结合力及神经细胞内钙离子浓度的升高,具有脑保护作用。

大量研究表明,脑缺血后再灌注会进一步加重脑组织损伤,抑制再灌注损伤是治疗缺血性脑血管疾病的重要环节^[15-16]。尽管缺血性损伤的病理生理学是复杂且多因素的,但广泛的研究表明氧化应激在 I/R 损伤中起着重要作用。本研究采用小鼠双侧颈动脉结扎模型观察 TSG 对脑 I/R 损伤的作用,结果显示,TSG 可以减轻脑 I/R 造成的脑组织病理损伤,同时可减少脑组织中氧自由基含量,提示 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤有保护作用。

脑缺血再灌注会引发一系列病理损伤,如兴奋性毒性,炎症反应和氧化应激,最终导致不可逆的神经元损伤^[17],在这些病理事件中,氧化应激已经成为治疗脑血管疾病的主要挑战^[18]。大脑中 ROS 生成涉及许多生物过程,主要来源包括线粒体呼吸链,黄嘌呤氧化酶和环氧合酶,最近的研究表明,NOX 也是重要的 ROS 生产者。Serrano 等^[19]研究发现:NOX 表达和活性在缺血性中风后的神经组织中升高。Qin 等^[20]最近研究发现:NOX 抑制剂可减



注: ^{##} $P < 0.01$ vs 假手术组; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs 模型组(I/R)。

图 4 TSG 对小鼠脑 I/R 损伤后脑组织中 cleaved caspase-3/9 蛋白表达的影响

Note. ^{##} $P < 0.01$ vs the sham group. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs the model (I/R) group.

Figure 4 Effects of TSG on the expressions of cleaved caspase-3/9 proteins in brain tissues after I/R injury in the mice

少缺血区神经元细胞凋亡、缩小梗塞面积、减轻相应区域功能损伤。本研究结果显示,小鼠脑 I/R 后缺血区 NOX4 蛋白表达显著上调,TSG 可显著抑制小鼠大脑皮层缺血区 NOX4 蛋白的表达,减轻小鼠脑 I/R 引起的氧化应激损伤。上述研究结果均提示了 NOX 在脑 I/R 的发病机制中起关键作用,抑制 NOX 活性可能是减轻脑 I/R 的有效途径。

Caspase 蛋白家族是细胞凋亡的重要参与者,其中 caspase-9 是线粒体内源性凋亡途径的启动者,而 caspase-3 是凋亡的最终执行者^[21]。Caspases-9 的活性增高并自我剪切形成 cleaved caspase-9,激活下游的 caspase-3。凋亡早期 caspase-3 活化为 cleaved caspase-3,裂解相应胞质胞核底物,切割核小体间的 DNA,从而诱导细胞凋亡^[22]。本研究结果表明,TSG 可以显著抑制小鼠脑 I/R 引起的 cleaved caspase-3/9 过度表达,其作用机制可能是下调了 NOX4 蛋白的表达,抑制 ROS 爆发性生成,从而抑制线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放和线粒体膜电位(MMP)降低,避免线粒体释放细胞色素 C 等凋亡因子到胞质激活 Caspase 系列蛋白。

总之,NOX4 是脑 I/R 损伤中 ROS 的主要来源,下调 NOX4 可能是预防氧化应激损伤的有效途径。本研究结果显示,TSG 对小鼠脑 I/R 损伤的保护作用可能与下调 NOX4 蛋白的表达有关,具体的作用机制我们将做进一步深入研究。

参 考 文 献(References)

[1] 王陇德,刘建民,杨弋,等.《中国脑卒中防治报告 2017》概

要[J]. 中国脑血管病杂志, 2018,15(11): 611- 617.
Wang LD, Liu JM, Yang Y, et al. Summary of China Stroke Prevention Report 2017 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2018, 15 (11): 611- 617.
[2] 郭丽花,胡如英,龚巍巍,等. 脑卒中危险因素研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 37(17): 4413-4416.
Guo LH, Hu RY, Gong WW, et al. Progress in research on risk factors of stroke [J]. Chin J Geront, 2018, 37 (17): 4413 -4416.
[3] Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10 (10):1713-1765.
[4] 马晓静,王岚,殷小杰,等. 灯盏乙素乙酯对大鼠脑中动脉结扎所致局灶性脑缺血的保护作用及机制研究[J].中国中药杂志, 2017, 42(07): 1350-1357.
Ma XJ, Wang L, Yin XJ, et al. Protective effect and mechanism of scutellarin ethyl ester on focal cerebral ischemia induced by ligation of middle cerebral artery in rats [J]. Chin J Chin Mat Med, 2017, 42(07): 1350-1357.
[5] Luo Y, Yang X, Zhao S, et al. Hydrogen sulfide prevents OGD/R-induced apoptosis via improving mitochondrial dysfunction and suppressing an ROS-mediated caspase - 3 pathway in cortical neurons [J]. Neurochem Int, 2013, 63: 826-831.
[6] Nicholson CK, Calvert JW. Hydrogen sulfide and ischemia reperfusion injury [J]. Pharmacol Res, 2010, 62: 289-297.
[7] Takac I, Schroder K, Zhang L, et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase nox4 [J]. J Biol Chem, 2011, 286(15):13304-13313.
[8] Zhang W, Xu XL, Wang YQ, et al. Effects of 2, 3, 4, 5-tetrahydroxystilbene 2-O - β -D-glucoside on vascular endothelial

- dysfunction in atherogenic-diet rats [J]. *Planta Med*, 2009, 75 (11): 1209–1214.
- [9] 王齐, 陈晓宇, 刘梅梅, 等. 二苯乙烯苷对沙鼠脑缺血/再灌注引发海马损伤的保护作用[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2013, 31(2): 180–183.
- Wang Q, Chen XY, Liu MM, et al. Protection and mechanism of tetrahydroxy stilbene glucoside on hippocampal ischemia-reperfusion injury in gerbils [J]. *Chin J Clin Anat*, 2013, 31 (2): 180–183.
- [10] 陈晓宇, 王栋, 刘晓利, 等. 二苯乙烯苷通过调节组蛋白去乙酰化酶 1 水平拮抗沙鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. *解剖学报*, 2013, 44(1): 25–29.
- Chen XY, Wang D, Liu XL, et al. Role of tetrahydroxy stilbene glucoside on histone deacetylase 1 level in cerebral ischemic-reperfusion injury in gerbils [J]. *Acta Anat Sin*, 2013, 44(1): 25–29.
- [11] 吴晓玲, 张贵锋, 刘其礼, 等. 二苯乙烯苷对慢性氟中毒致脑损伤大鼠学习记忆能力、氧化应激的影响[J]. *中国医学创新*, 2017, 14(02): 021–024.
- Wu XL, Zhang GF, Liu QL, et al. Stilbene glucoside on chronic fluorosis induced brain learning and memory in rats, oxidative stress [J]. *Med Innov China*, 2017, 14(02): 021–024
- [12] 梅劲春, 梁碧婵, 侯伟俊, 等. 二苯乙烯苷通过调控 NADPH 氧化酶/氧化应激治疗糖尿病肾病的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(26): 2851–2854.
- Mei JC, Liang BC, Hou WJ, et al. Study on the treatment of diabetic nephropathy with tetrahydroxystilbene by regulating the NADPH oxidase /oxidative stress pathway [J]. *Modern J Integr Tradit Chin Western Med*, 2017, 26(26): 2851–2854.
- [13] 陈冰冰, 姜爱玲, 张岩. 何首乌有效成分二苯乙烯苷的药理活性研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21 (6): 710–715.
- Chen Bb, Jiang Al, Zhang Y. Research progress on pharmacological activities of stilbene glucoside, active component from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2016, 21(6): 710–715.
- [14] Liu Z, Liu Y, Chao Z, et al. In vitro antioxidant activities of Maillard reaction products produced in the steaming process of *Polygonum multiflorum* root [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6 (1): 55–58.
- [15] Wang Y, Zhen Y, Wu X, et al. Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen-activated protein kinase and apoptosis signaling in mice [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(3): 379–384.
- [16] Dong LY, Fan Y, Shao X, et al. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(12): 3211–3216.
- [17] Lou Z, Wang AP, Duan XM, et al. Upregulation of NOX2 and NOX4 mediated by TGF- β signaling pathway exacerbates cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 2103–2113.
- [18] Jiang YF, Liu ZQ, Cui W, et al. Antioxidant effect of salvianolic acid B on hippocampal CA1 neurons in mice with cerebral ischemia and reperfusion injury [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(7): 516–522.
- [19] Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, et al. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain [J]. *Brain Res*, 2003, 988 (1–2): 193–198.
- [20] Qin YY, Li M, Feng X, et al. Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 333–345.
- [21] Ni HM, McGill MR, Chao X, et al. Caspase inhibition prevents tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and promotes necrotic cell death in mouse hepatocytes in vivo and in vitro [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186 (10): 2623–2636.
- [22] 程雪赞, 原大江. 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶参与细胞凋亡的机制与进展[J]. *临床医药实践*, 2018, 27(8): 616–620.
- Cheng XY, Yuan DJ. Mechanism and progress of cysteine-aspartic protease involved in apoptosis [J]. *Proc Clin Med*, 2018, 27(8): 616–620.

[收稿日期] 2018–10–10