

# 转基因鼠在脑缺血氧化应激研究中的应用

王译晗, 张霞, 张婷慧, 张予阳

(沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

**【摘要】** 活性氧自由基作为脑内一类重要的病理因素直接或间接地参与脑缺血/再灌注的损伤过程。氧自由基不仅受到脑内促氧化酶与抗氧化酶间平衡的调节,同时也参与了细胞内信号转导通路,在神经元死亡中发挥着决定性作用。近年来,转基因及基因敲除鼠已广泛应用于这些影响活性氧自由基的形成和清除过程的酶类物质及各种介导细胞死亡与凋亡过程的蛋白质的研究中,为脑缺血/再灌注损伤治疗的基础及应用提供了必要条件。

**【关键词】** 转基因鼠; 脑缺血; 氧化应激

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0045-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.003.010

## Application of Transgenic Mice to Studies on Oxidative Stress Mechanism of Cerebral Ischemia

WANG Yi-han, ZHANG Xia, ZHANG Ting-hui, ZHANG Yu-yang

(School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**【Abstract】** Reactive oxygen species are important factors, which directly or indirectly involve in the process of cerebral ischemia and reperfusion injury. They are not only regulated by the balance between prooxidant and antioxidant enzymes in brain, but also participate in the various molecular signal pathway in cells. Therefore, they play an important role in the course of neuronal death events. In recent years, transgenic and gene-knockout mice have been widely used in research of the enzymes which influence the formation and elimination of reactive oxygen species, And they also are utilized in the study of the proteins which mediate a variety of cell death and apoptosis. The animals provide necessary conditions for researchers to conduct the fundamental and applied studies on treatment of cerebral ischemia or reperfusion injury.

**【Key words】** Transgenic mice; Cerebral ischemia; Oxidative stress

氧化应激是指活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 过量超出了细胞对 ROS 清除的能力, 最终引发疾病<sup>[1]</sup>。ROS 通过氧化反应破坏脂质、蛋白质和 DNA 等大分子物质, 也参与炎症细胞的激活及其信号的级联放大过程, 导致细胞损伤甚至死亡, 它还介导脑缺血再灌注损伤<sup>[2]</sup>。脑缺血时, ROS 的产生和清除平衡遭到破坏, 抗氧化酶与促氧化酶的数量及功能平衡失调, 它们可做为细胞内信号参与

细胞死亡信号通路的传递, 最终导致细胞损伤乃至死亡。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 是脑缺血氧化应激中具有抗氧化作用的主要酶之一, 它能催化歧化超氧阴离子生成  $H_2O_2$ , 而后经谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 或过氧化氢酶 (catalase, CAT) 催化生成水。一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 则可催化 NO 的生成, 后者与超氧阴离子反应

[作者简介] 王译晗 (1987 -), 女, 硕士生, 研究方向: 脑血管药理, E-mail: wangyihan0812@126.com。

[通讯作者] 张予阳 (1962 -), 女, 博士, 教授, 研究方向: 脑血管药理, E-mail: yuyangzhang2003@yahoo.com.cn。

形成过氧化亚硝酸盐,过量的 NO 和过氧化亚硝酸盐对缺血脑组织均可造成损害。

应用转基因技术可获得基因嵌合小鼠,嵌合小鼠与野生小鼠进行交配产生杂合(+/-)后代,杂合小鼠繁殖可产生纯合小鼠(+/+为高表达,-/-为基因敲除)<sup>[3]</sup>。这些转基因及基因敲除鼠发育正常,无明显病理变化,可用于研究缺血性脑损伤的机制及药物的作用。近年来,转基因技术的发展使 ROS 在脑缺血中的致病机制变得更易准确定位。

## 1 基于转基因鼠对一氧化氮合酶 NOS 的研究

在哺乳动物脑内,NOS 有三种亚型,即神经型 NOS(neuronal NOS, nNOS)、诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS)及内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)。Ito 等<sup>[4]</sup>利用脑缺血后 nNOS(-/-)小鼠和 eNOS(-/-)小鼠对比发现,nNOS(-/-)小鼠的脑血流量高于野生型小鼠,eNOS(-/-)小鼠的平均动脉压高于野生型小鼠,这说明 nNOS 可能在缺血再灌注过程中对控制脑血流量发挥着重要作用,由 nNOS 催化产生的 NO 与超氧自由基形成过氧化亚硝酸盐而产生神经毒性作用,并加重缺血性损伤<sup>[5]</sup>,相反,由 eNOS 催化产生的 NO 是维持血管张力和功能<sup>[6]</sup>及增加脑血流量的重要决定因素。另外,缺血再灌注后,eNOS(-/-)和 nNOS(-/-)小鼠纹状体处的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>水平与野生型小鼠相比显著减少,这提示在缺血再灌注过程中有些脑区产生的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>与 nNOS 和 eNOS 二者的活性密切相关。此外,缺血再灌注后,nNOS(-/-)小鼠脑中 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的含量明显低于 eNOS(-/-)小鼠,进一步表明脑缺血后 nNOS 催化产生的 NO 占主导地位<sup>[4]</sup>。用 eNOS(-/-)小鼠制备大脑中动脉闭塞的局灶脑缺血模型,与野生型小鼠相比,可造成较高的死亡率和严重的神经学症状,并降低了动脉生成<sup>[7]</sup>,提示 eNOS 可介导缺血大脑的动脉生成,并与中风后的功能恢复密切相关。

Atochin 等<sup>[8]</sup>发现,将内源性 eNOS 的丝氨酸 1179 位点磷酸化可影响血管的反应性并决定脑梗死范围的大小,表达丝氨酸 1179 磷酸化 eNOS(S1179D)的转基因小鼠与表达丝氨酸 1179 非磷酸化 eNOS(S1179A)的转基因小鼠相比,血管反应性增加,大脑中动脉闭塞后的脑血流量也明显增加。此外,将 eNOS(-/-)小鼠与 S1179A 和 S1179D 的转基因小鼠交配,产生以 eNOS(-/-)小鼠为背景

的 S1179D/eNOS 敲除小鼠和 S1179A/eNOS 敲除小鼠,发现 eNOS(-/-)小鼠及 S1179A/eNOS 基因敲除小鼠均比野生型小鼠及 S1179D/eNOS 基因敲除小鼠不能耐受缺血性脑损伤,局灶脑缺血后脑梗死范围增加,提示 eNOS 或将 eNOS 修改为 S1179D 均对脑缺血损伤具有保护作用。Pruss 等<sup>[9]</sup>研究发现 iNOS(-/-)小鼠局灶脑缺血后梗死范围增加。Luo 等<sup>[10]</sup>利用基因敲除小鼠研究发现,iNOS 是脑缺血后诱导齿状回细胞形成的重要因素。而 nNOS 对小鼠脑的细胞形成起着相反作用,抑制 nNOS 能促进齿状回细胞形成。

在缺血预处理阶段,nNOS(-/-)小鼠与 eNOS(-/-)小鼠均没有表现出缺血耐受性<sup>[11]</sup>,然而 Cho 等<sup>[12]</sup>利用 iNOS(-/-)小鼠进行研究则发现,iNOS 可加强小鼠的缺血耐受性,对随后的脑缺血损害起到一定保护作用。此外,Kawano 等<sup>[13]</sup>人分别利用缺乏 NADPH 氧化酶(NOX)的 Nox2 亚基的小鼠和缺少 iNOS 的转基因小鼠进行研究发现,iNOS 催化产生的 NO 若要在缺血预处理阶段发挥神经保护作用,与 NADPH 氧化酶催化产生的超氧化物所形成的过氧化亚硝酸盐形成复合物是必要条件,此研究结果提示,过氧化亚硝酸盐除了具有众所周知的加重脑缺血损伤及神经退行性病变作用,在缺血预处理阶段还能间接起到保护脑缺血的有益作用。

## 2 基于转基因鼠对超氧化物歧化酶 SOD 的研究

SOD 有三种同功酶,包括胞质酶 CuZnSOD(SOD<sub>1</sub>)、线粒体酶 MnSOD(SOD<sub>2</sub>)和细胞外酶 ECSOD(SOD<sub>3</sub>),它们分别存在于细胞的不同部位,为 ROS 引起的脑缺血损伤提供保护作用。许多研究已证明了它们对脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用确切的。

大量研究表明,SOD<sub>1</sub>转基因小鼠及大鼠具有抵抗脑缺血损伤的能力<sup>[14]</sup>,纯合的 SOD<sub>1</sub>(-/-)小鼠在局灶性脑缺血后,脑梗死范围增加,脑水肿程度加重<sup>[15]</sup>,暂时性全脑缺血后,神经元死亡数增加,尤其是海马 CA<sub>1</sub> 区的神经元损伤更明显<sup>[16]</sup>。但有文献报道,在新生小鼠的大脑中,SOD<sub>1</sub>高度表达却可使神经元死亡数增加。显然,在特定情况下,SOD<sub>1</sub>的作用未必与我们在成年鼠上获得的结果相同。而 GSH-Px 高表达则可对抗新生鼠的脑缺血缺氧损伤<sup>[3]</sup>。这可能是由于在 SOD<sub>1</sub>转基因鼠脑内有较多的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 蓄积,而新生鼠的大脑却没有足够的下游

酶对抗  $H_2O_2$  的蓄积<sup>[3]</sup>。该研究进一步表明了中枢神经系统中抗氧化体系中各种酶之间相互协调的重要性。

此外,  $SOD_1$  还参与调节脑缺血后线粒体功能障碍, 并参与调节氧化应激状态对神经元的影响过程。研究发现,  $SOD_1$  高表达可减少早期的细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 及次生半胱天冬酶线粒体源激活剂 (second mitochondria-derived activator of caspase, Smac) 从线粒体向胞质释放, 减少 caspases-3 的激活<sup>[17]</sup>, 并加强凋亡蛋白 X 染色质联结的凋亡抑制剂 (x chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 与 caspase-9 的相互作用, 从而抑制内源性凋亡 caspases 通路的启动<sup>[18]</sup>, 抑制细胞凋亡的线粒体信号途径, 对脑缺血后的神经元损伤起到保护作用。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (蛋白激酶 B, PKB, Akt) 活化作为防止细胞凋亡的重要因素之一, 与暂时性局灶脑缺血后的细胞存活涉及的信号转导途径有关。暂时性局灶脑缺血 30 min 后, 加强 Akt 的磷酸化可减少超氧化物的产生及增加  $SOD_1$  的表达, 研究结果显示, 与野生型小鼠相比,  $SOD_1$  转基因小鼠的尾壳核及缺血皮质脑区中 Akt 的磷酸化程度有所增加<sup>[19]</sup>。在脑缺血时, 暂时性局灶脑缺血引起的氧化应激可增加 NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) 的含量, 触发其相应的细胞信号转导通路, 使神经元受损,  $SOD_1$  高表达鼠, 氧化应激状态减轻, 可加强与 NF- $\kappa$ B 相关的快速防卫机制, 从而防止脑缺血诱导的氧化应激所致的大脑损伤<sup>[20]</sup>。显然, 抗氧化应激作用可通过活化 Akt 和抑制 NF- $\kappa$ B 相关的信号通路, 减轻神经元的受损程度。

众所周知, 脑缺血后的再灌注阶段尤其易引发氧化应激性损伤, 而  $SOD_1$  高表达能降低神经元对此过程中各种有害因子的敏感性。与维持细胞存活的信号途径相反, 局灶性脑缺血后促凋亡基因 p53 上调,  $SOD_1$  高表达后这种上调受到抑制<sup>[21]</sup>。此外, p53 上调细胞凋亡调控因子 (the p53 upregulated modulator of apoptosis, PUMA) 也受 p53 诱导, 产生后与 Bcl-2 凋亡调控家族相互作用, 致 Cyt C 向胞质释放增多<sup>[22]</sup>, 然而暂时性全脑缺血后 PUMA 的上调, 在  $SOD_1$  高表达动物中却明显受到抑制<sup>[23]</sup>。这些基于转基因动物的研究结果提示,  $SOD_1$  可通过多种相互关联的细胞信号途径, 抑制脑缺血或缺血再灌注中 ROS 对组织细胞的有害作用。

$O^{2-}$  主要来源于线粒体呼吸过程, 而  $SOD_2$  作为

一种线粒体酶, 在正常生理状态下与  $O^{2-}$  的水平密切相关,  $SOD_2$  转基因鼠的研究在脑缺血氧化应激的作用机制探讨中具有重要价值。有报道,  $SOD_2$  (-/-) 小鼠与野生型小鼠相比, 脑缺血后, 线粒体功能紊乱、脑梗死范围、脑水肿及  $O^{2-}$  的产生均有增加<sup>[1]</sup>, 线粒体 Cyt C 向胞质的释放、caspase-9 的激活也有所增加<sup>[24]</sup>。携带人类  $SOD_2$  基因的杂合  $SOD_2$  转基因小鼠, 局灶性脑缺血后, 脑组织损伤减轻, 血管内皮细胞死亡减少, 研究还发现, 信号转导和转录激活子-3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是一种  $SOD_2$  基因表达的转录调控因子, 参与  $SOD_2$  的神经保护过程, 显然此发现作为脑缺血再灌注损伤的治疗提供了新靶点<sup>[25]</sup>。

$SOD_3$  是一种细胞外超氧化物歧化酶, 相对于前述两种超氧化物歧化酶亚型而言, 其含量较低, 但因其所在的细胞外空间较大, 使得它在中枢神经系统内具有相对较高的水平。 $SOD_3$  高表达小鼠在暂时性全脑缺血后, 神经元死亡有所减少<sup>[26]</sup>。与此相反, 纯合的  $SOD_3$  (-/-) 小鼠, 局灶性脑缺血后脑梗死范围有所增加<sup>[27]</sup>。显然, 在脑缺血损伤研究中,  $SOD_3$  转基因鼠具有与  $SOD_2$  转基因鼠同样重要的意义。

转基因和基因敲除鼠为脑缺血的机制研究及治疗脑缺血的药物研究提供了重要条件。目前, 多种模拟 SOD 的化合物和被修饰的 SOD 化合物已经不同程度的得到开发研究, 进一步的数据也已证实, 它们对脑缺血损伤具有明显的保护作用。今后, 在深入研究三种同功酶的协同作用时, 可尝试将两种或三种超氧化物歧化酶亚型同时在实验动物脑中高表达或敲除, 从而更清晰的建立其相互作用及协同作用模式, 为深入探讨这种相互作用或协同作用的精细机制提供必要条件。

### 3 基于转基因鼠对谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px 的研究

GSH-Px 存在于胞质中, 而 CAT 则主要集中于过氧化酶体, 显然, GSH-Px 的普遍存在预示了它对调节过量  $H_2O_2$  具有更重要的作用。利用 GSH-Px 高表达小鼠或 GSH-Px (-/-) 小鼠, 对局灶脑缺血或脑缺血再灌注损伤进行研究, 结果表明, GSH-Px 高表达可减少神经元的坏死和凋亡, 抑制星型胶质细胞的活化及炎细胞的浸润<sup>[28]</sup>, 相反, GSH-Px 敲除可见氧化应激水平增加、脑缺血再灌注损伤明显加

重<sup>[29]</sup>。对于新生小鼠, GSH-Px 的增加具有同样的保护作用, GSH-Px 是一种将  $H_2O_2$  转化为水必不可少的催化酶, 因此与野生型小鼠相比, GSH-Px 转基因新生小鼠脑内蓄积较少的  $H_2O_2$ , GSH-Px 高表达使新生小鼠的脑缺血缺氧损伤明显降低<sup>[30]</sup>。前已述及与成年鼠不同的是, SOD<sub>1</sub> 高表达对新生鼠脑缺血缺氧损伤无明显保护作用, NOS 抑制剂不能使 SOD<sub>1</sub> 对新生鼠脑缺血缺氧损伤产生有益影响, 但 SOD<sub>1</sub> 和 GSH-Px 共同高表达则对新生小鼠脑缺血缺氧损伤呈现有益作用, 在这种转基因新生小鼠中获得神经保护作用优于单独 SOD<sub>1</sub> 高表达的转基因新生小鼠<sup>[30]</sup>。GSH-Px(+/+)小鼠的研究表明, GSH-Px 对  $H_2O_2$  及过氧化脂质造成的氧化应激性脑损伤具有保护作用, 依布硒(一种 GSH-Px 的仿制品)具有神经保护作用的报道<sup>[3]</sup>, 进一步支持了 GSH-Px 对氧化应激性脑损伤具有有益作用的假想。

#### 4 基于转基因鼠对 NADPH 氧化酶 NOX 的研究

NOX 是大脑中的一种促氧化酶, 许多刺激因素可使其活化, 它可诱导 4 种胞质亚基向细胞膜易位, 并与催化亚基融合形成复合体, 这种活化酶复合体可给氧运输电子, 从而生成超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ ), 因此, NOX 在脑缺血和其他与氧化应激相关的疾病中起有害作用。

夹竹桃麻素是目前应用最广泛的 NOX 家族蛋白抑制剂, 脑缺血后给予 Nox2(-/-)小鼠夹竹桃麻素处理, 没有表现出保护脑缺血损伤及减少脑内 ROS 的作用<sup>[31]</sup>。脑缺血再灌注导致血脑屏障破坏进而形成脑水肿, ROS 可破坏血脑屏障, NADPH 氧化酶的 Nox2 亚基催化活性氧的生成, 因此, 这种酶的基因缺失或抑制该酶的活性可保护脑缺血再灌注后的血脑屏障功能。Kahles 等<sup>[32]</sup>利用 Nox2(-/-)小鼠进行研究发现, Nox2 基因缺失可防止早期血脑屏障功能障碍, 预防脑缺血后的脑水肿形成, 夹竹桃麻素因抑制 NOX 的活性从而对维持血脑屏障功能起有益作用。此外, 脑缺血再灌注后 Nox2(-/-)小鼠及给予夹竹桃麻素处理的小鼠均表现出脑梗死范围、4-羟基壬烯酸和丙二醛产物、DNA 氧化损伤及中性粒细胞浸润明显减少<sup>[33]</sup>, 表明了 Nox2 抑制剂具有延迟细胞死亡过程、减少氧自由基生成和脑组织氧化损伤的作用<sup>[34]</sup>。Chen 等<sup>[33]</sup>为了进一步研究促氧化酶 NOX 和抗氧化酶 SOD1 间的相互作用, 将 SOD1(-/-)小鼠与野生型小鼠

进行对此研究, 发现局灶脑缺血后 SOD1(-/-)小鼠脑内的 Nox2 增加了 1.8 ~ 2.8 倍, 但 SOD1 转基因小鼠比野生型小鼠中的 Nox2 上调并不显著, 这表明, NOX 的表达受脑组织的氧化还原状态调节, 氧化应激有助于脑组织中 NOX 的表达上调。

NOX 蛋白家族中的另一种亚基 Nox4 也是脑缺血后参与氧化应激反应的主要成员, 用 Nox4(-/-)小鼠制备大脑中动脉闭塞的脑缺血模型进行研究, 发现 Nox4(-/-)小鼠与野生型小鼠相比脑梗死范围明显减少, 整体神经功能显著改善, 表现出具有更好的基础运动功能和协调能力。此外, 有研究发现, 脑缺血后 Nox4(-/-)小鼠脑梗死范围不随时间而增加, 提示 Nox4 基因缺失对脑缺血的保护作用持续的<sup>[35]</sup>。显然, 这些研究结果均表明, 转基因技术的应用使 NOX 在脑缺血氧化应激中的作用得到了肯定。

#### 5 结语

上述讨论显示, 转基因动物在脑缺血氧化应激相关研究中可以发挥重要作用, 通过转基因技术, 更直接的表达了目标基因在体内脑缺血过程中的作用, 并可以显示出目标基因所涉及的相关机制。然而, 目前转基因鼠的应用尚有需要解决的问题, 需要经过深入研究, 使转基因技术在病理药理学研究中发挥更大的作用。

#### 参考文献:

- [1] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Hai Chen, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2010, 1802:92-99.
- [2] Seo SR, Chong SA, Lee SI, et al.  $Zn^{2+}$ -induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells[J]. *Journal of neurochemistry*, 2001, 78:600-610.
- [3] Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain[J]. *Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2001, 21:2-14.
- [4] Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, et al. Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOS-knockout mice[J]. *Current neurovascular research*, 2010, 7:23-31.
- [5] Huang PL. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency[J]. *Journal of American Society Nephrology; JASN*, 2000, 11:S120-S123.
- [6] Fabian RH, Perez-Polo JR, Kent TA. Perivascular nitric oxide and superoxide in neonatal cerebral hypoxia-ischemia[J].

- American Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology, 2008, 295:H1809 – H1814.
- [ 7 ] Cui X, Chopp M, Zacharek A, et al. Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice [ J ]. Neuroscience, 2009, 159:744 – 750.
- [ 8 ] Atochin DN, Wang A, Liu VW, et al. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo [ J ]. The Journal of clinical investigation, 2007, 117:1961 – 1967.
- [ 9 ] Prüss H, Prass K, Ghaeni L, et al. Inducible nitric oxide synthase does not mediate brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice [ J ]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2008, 28:526 – 539.
- [ 10 ] Luo CX, Zhu XJ, Zhou QG, et al. Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression [ J ]. Journal of neurochemistry, 2007, 103:1872 – 1882.
- [ 11 ] Atochin DN, Clark J, Demchenko IT, et al. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases [ J ]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2003, 34:1299 – 1303.
- [ 12 ] Cho S, Park EM, Zhou P, et al. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning [ J ]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005, 25:493 – 501.
- [ 13 ] Kawano T, Kunz A, Abe T, et al. iNOS-derived NO and Nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite [ J ]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2007, 27:1453 – 1462.
- [ 14 ] Endo H, Nito C, Kamada H, et al. Activation of the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats [ J ]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2006, 26:1479 – 1489.
- [ 15 ] Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, et al. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid; role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption [ J ]. The Journal of neuroscience; the official journal of the Society for Neuroscience, 2003, 23:8733 – 8742.
- [ 16 ] Kawase M, Murakami K, Fujimura M, et al. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency [ J ]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1999, 30:1962 – 1968.
- [ 17 ] Sugawara T, Noshita N, Lewén A, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation [ J ]. The Journal of neuroscience; the official journal of the Society for Neuroscience, 2002, 22:209 – 217.
- [ 18 ] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Oxidative stress is associated with XIAP and Smac/DIABLO signaling pathways in mouse brains after transient focal cerebral ischemia [ J ]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2004, 35:1443 – 1448.
- [ 19 ] Noshita N, Sugawara T, Lewén A, et al. Copper-Zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice [ J ]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2003, 34:1513 – 1518.
- [ 20 ] Song YS, Lee YS, Narasimhan P, et al. Reduced oxidative stress promotes NF- $\kappa$ B-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia; lymphocytotrophic cytokines and antiapoptotic factors [ J ]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2007, 27:764 – 775.
- [ 21 ] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Modulation of p53 degradation via MDM2-mediated ubiquitylation and the ubiquitin-proteasome system during reperfusion after stroke; role of oxidative stress [ J ]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005, 25:267 – 280.
- [ 22 ] Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival [ J ]. Journal of neurochemistry, 2009, 109:133 – 138.
- [ 23 ] Niizuma K, Endo H, Nito C, et al. The potential role of PUMA in delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia [ J ]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2009, 40:618 – 625.
- [ 24 ] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice [ J ]. The Journal of neuroscience; the official journal of the Society for Neuroscience, 1999, 19:3414 – 3422.
- [ 25 ] Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, et al. Regulation of Mn-SOD activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia [ J ]. The Journal of neuroscience; the official journal of the Society for Neuroscience, 2009, 29:7003 – 7014.
- [ 26 ] Sheng H, Kudo M, Mackensen GB, et al. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to global cerebral ischemia [ J ]. Experimental neurology, 2000, 163:392 – 398.
- [ 27 ] Sheng H, Brady TC, Pearlstein RD, et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse [ J ]. Neuroscience letters, 1999, 267:13 – 16.
- [ 28 ] Ishibashi N, Prokopenko O, Weisbrodt-Lefkowitz M, et al. Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke [ J ]. Brain research. Molecular brain research, 2002, 109:34 – 44.

- (10):234.
- [36] 蔺心敬, 李吕力, 王铁建等. 血管性痴呆大鼠模型的制备与评价. 中国比较医学杂志, 2006, 16(12):733-735.
- [37] Nanri M, Watanabe H. Availability of 2VO rats as a model for chronic Cerebrovascular disease[J]. Nippon Yakurigaku zasshi, 1999, 113(2):85-95.
- [38] 李国春, 黄新武, 张红等. 不同时点分别结扎左右颈总动脉建立的大鼠血管性痴呆模型血流变学及生化学研究. 现代预防医学, 2011, 38(4):718-720.
- [39] 杨文明, 王时光, 鲍远程等. 智脑胶囊对血管性痴呆模型大鼠行为学及脑组织 NO、ET、CGRP 含量的影响. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(1):29-32.
- [40] 牛文民, 刘智斌, 杨晓航. 针药合用刺激嗅觉系统对血管性痴呆模型大鼠学习记忆及大脑边缘叶 CCK-8 含量的影响. 山东中医药大学学报, 2009, 33(5):425-427.
- [41] 张吉仲, 彭成, 谢晓芳. 益智五海胶囊对大鼠血管性痴呆模型中 ET、CGRP、TXB<sub>2</sub>、6-Keto-PGF<sub>1</sub>α 的影响. 华西药学杂志, 2010, 25(2):242-244.
- [42] 吕翠. 慢性脑供血不足(CCCI)的脑血流灌注成像研究进展[J]. 医学影像学杂志, 2011, 21(7):1083-1085.
- [43] Zaro-Weber O, Moeller-Hartmann W, Heiss WD, et al. MRI perfusion maps in acute stroke validated with Water positron emission tomography[J]. Stroke, 2010, 41:443-449.
- [44] 娄昕, 蔡幼铨, 马林, 等. 动脉自旋标记法磁共振成像在颈动脉狭窄性脑缺血疾病中的初步应用[J]. 中国医学影像学杂志, 2007, 15:88-91.
- [45] 曾贵刚, 李峻, 张申, 等. fMRI 结合神经症状评分评价运动疗法对大鼠局灶性脑缺血模型的疗效. 实验动物与比较医学杂志, 2011, 31(4):236-241.
- [46] 曾贵刚, 张申, 陈国强, 等. 以功能磁共振成像为主评价大鼠局灶性脑缺血模型的研究. 实验动物与比较医学杂志, 2011, 31(3):153-159.
- [47] Shuaib A, Ijaz MS, Miyashita H, et al. GABA and glutamate level in the substantia nigra reticular following repetitive cerebral ischemia in gerbils[J]. Exp Neurol, 1997, 147(2):311.

[修回日期]2011-12-13

## (上接第 49 页)

- [29] Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury[J]. Journal of neurochemistry, 2001, 78:1389-1399.
- [30] Sheldon RA, Christen S, Ferriero DM. Genetic and pharmacologic manipulation of oxidative stress after neonatal hypoxia-ischemia[J]. International journal of developmental neuroscience; the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 2008, 26:87-92.
- [31] Jackman KA, Miller AA, De Silva TM, et al. Reduction of cerebral infarct volume by apocynin requires pretreatment and is absent in Nox2-deficient mice[J]. British journal of pharmacology, 2009, 15:680-688.
- [32] Kahles T, Luedike P, Endres M, et al. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke[J]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2007, 38:3000-3006.
- [33] Chen H, Song YS, Chan PH. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia reperfusion[J]. Journal of cerebral blood flow and metabolism; official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2009, 29:1262-1272.
- [34] Chen H, Kim GS, Okami N, et al. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation[J]. Neurobiology of disease, 2011, 42:341-348.
- [35] Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration[J]. PLOS biology, 2010, 8:e1000479.

[修回日期]2011-12-07