

化痰通络方对急性脑梗死大鼠 rt-PA 溶栓后神经细胞凋亡途径中内质网应激相关基因 GADD153/CHOP 与 JNK1 表达的影响

张琳琳¹, 周震^{1*}, 张玉莲¹, 王雪岩¹, 王坤², 王凯²

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:观察化痰通络方对急性脑梗死大鼠重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA)溶栓后内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)后期神经细胞凋亡途径中生长抑制 DNA 损伤基因 153(C/EBP homologous protein, GADD153/CHOP)和 c-Jun 氨基末端激酶-1(c-Jun NH₂-terminal kinases-1, JNK1)基因表达的影响。方法:将 160 只健康 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,rt-PA 组,化痰通络方联合 rt-PA 组(简称中药组)。采用自身栓子法制备大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO),rt-PA 组与中药组分别给予尾静脉注入 rt-PA(5.67 mg·kg⁻¹)及联合化痰通络中药(7.2 g·kg⁻¹)干预,2 次/d。于 6 h,1,3,7 d 4 个时相分别采用 RT-PCR 检测各组大鼠大脑皮质梗死区组织中 GADD153/CHOP 与 JNK1 mRNA 的表达,采用 TUNEL 法检测各组大鼠大脑神经元的凋亡。结果:与假手术组比较,模型组在 4 个时相中 GADD153/CHOP 与 JNK1 基因表达均明显增高($P < 0.05$),同一时相内与假手术组比较,模型组神经元凋亡显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,rt-PA 组和中药组在 4 个时相中均可降低 JNK1 mRNA 的表达量($P < 0.05$),同时 rt-PA 组在 1 d 时可降低 GADD153/CHOP mRNA 的表达,而中药组可在 6 h 和 1 d 时同时降低其表达,差异显著($P < 0.05$),rt-PA 组在 1 d 和 7 d 时相神经元凋亡明显低于模型组($P < 0.05$),中药组各个时相神经元凋亡均显著降低($P < 0.05$),但 rt-PA 组与中药组之间无明显差异。结论:化痰通络方可通过降低内质网应激后期神经细胞凋亡途径中 GADD153/CHOP 与 JNK1 mRNA 的表达,部分抑制神经细胞的凋亡,从而防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注的发生与发展。

[关键词] 化痰通络方;大鼠重组组织纤溶酶原激活剂;溶栓;急性脑梗死;凋亡途径;生长抑制 DNA 损伤基因 153; c-Jun 氨基末端激酶-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0117-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230117

Effect of Huatan Tongluo Formulae on Expression of GADD153/CHOP and JNK1 Related with Endoplasmic Reticulum Stress in Apoptosis Pathway in Rat Cortex Accepted Thrombolysis Pheryapy After Acute Cerebral Infarction ZHANG Lin-lin¹, ZHOU Zhen^{1*}, ZHANG Yu-lian¹, WANG Xue-yan¹, WANG Kun², WANG Kai² (1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Huatan Tongluo formulae on expression of C/EBP homologous protein (GADD153/CHOP) and C-Jun NH₂-terminal Rinases (JNK1) in apoptosis pathway of endoplasmic reticulum stress in rat reconstructive tissue plasminogen activator (rt-PA) after the acute cerebral infarction. **Method:** The 160 healthy male SD rats were randomly divided into sham group, model group, rt-PA group, rt-PA-Huatan Tongluo group (Chinese medicine group for short). Own embolus method was used to establish rat models of middle cerebral artery embolism (MCAO). The rats in rt-PA group were injected with rt-PA (concentration of 5.67 mg·kg⁻¹), and those of Chinese medicine group were given with rt-PA and Chinese

[收稿日期] 20141017(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273942);天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(12JZDJC25300);天津市教委“十二五”创新团队培养计划项目(TD12-5035)

[第一作者] 张琳琳, 硕士, 医师, 从事中西医结合治疗脑血管病的临床与基础研究, Tel:13682076866, E-mail:13682076866@163.com

[通讯作者] *周震, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中医药治疗脑血管病的临床及机制研究, Tel:13110057681, E-mail:zhouzhen7681@126.com

medicine Huatan Tongluo formulae ($7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 2 times a day. RT-PCR was used in four time phases of 6 hours, 1 day, 3, 7 days to detect the expression of GADD153/CHOP and JNK1 mRNA in cerebral cortex infarction tissues in rats. TUNEL method was used to detect brain neurons apoptosis in rats. **Result:** Compared with sham group, the gene expression of GADD153/CHOP and JNK1 in 4 time phases was significantly higher in model group ($P < 0.05$). Compared with sham group within the same time phase, neurons apoptosis in model group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of JNK1 mRNA was decreased in 4 time phases in both rt-PA group and Chinese medicine group ($P < 0.05$), and rt-PA group could decrease GADD153/CHOP mRNA expression on 1 d while Chinese medicine group could decrease the expression on 6 h and 1 d, with significant difference ($P < 0.05$). Neurons apoptosis in rt-PA group on 1 and 7 d was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$), while Chinese medicine group decreased neurons apoptosis in various time phases ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between rt-PA group and Chinese medicine group. **Conclusion:** Huatan Tongluo formulae can prevent and treat partially reperfusion injury after acute cerebral accepted thrombolysis by reducing GADD153/CHOP and JNK1 mRNA expression in apoptosis pathway of endoplasmic reticulum stress, and partially inhibiting the apoptosis of nerve cells.

[**Key words**] Huatan Tongluo formulae; tissue plasminogen activator; thrombolysis; acute cerebral infarction; apoptosis athway; C/EBP homologous protein; c-Jun NH2-terminal kinases-1

急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤是影响急性脑梗死临床疗效、限制溶栓疗法广泛开展最直接、最主要的原因之一,目前其机制研究备受关注。最新的研究发现,内质网稳态的紊乱,特别是内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)参与了脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的发生,并可能是其中关键因素^[1-2]。在 ERS 后期,神经细胞凋亡通路中生长抑制 DNA 损伤基因 153(C/EBP homologous protein, GADD153/CHOP)和 c-Jun 氨基末端激酶-1(c-Jun NH2-terminal kinases-1, JNK1)基因被激活,从而促进细胞凋亡^[3-4]。前期研究发现化痰通络方具有保护血脑屏障和神经元微观形态的作用^[5-7],因此本研究拟从 ERS 后期抑制神经细胞凋亡的角度,观察化痰通络方对急性脑梗死大鼠大脑皮质梗死区 GADD153/CHOP 与 JNK1 基因表达的影响,以期防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注的发生提供部分实验依据。

1 材料

1.1 动物 实验中采用的健康 SD 大鼠 160 只,清洁级,雌雄各半,体重为 200 ~ 250 g。购自北京大学医学部实验动物科学部,动物合格证号 SZXK(京)2011-0012。

1.2 药物及试剂 化痰通络方组成:天麻 10 g,生半夏 10 g,胆南星 5 g,丹参 30 g,地龙 10 g,川芎 10 g,酒大黄 5 g。将上述药物 5 付(400 g)加入 10 倍水,煎煮 3 次,30 min/次,浓缩至 500 mL,生药浓度为 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,药物制备由天津中医药大学第二

附属医院制剂室完成,于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。注射用重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA,德国勃林格殷格翰公司,批号 005765201304),血栓诱导剂(长春国奥药业有限公司,批号 20081218)。实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂如 Oligo dT, dNTP, RNA 抑制酶(批号 639542, 639548),均购自宝生物工程(大连)有限公司; Go Taq Green Master Mix(美国 Promega 公司,批号 M7122, Quanti Tect™ SYBR Green PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司,批号 208052), GADD153/CHOP, JNK1 和 GAPDH Taqman 引物由上海生物工程有限公司合成, Tunel 试剂盒(碧云天生物试剂有限公司,批号 C1088)。

1.3 仪器 RG-3000 型实时定量 PCR 仪(德国 Qiagen 公司), MR23i 型冷冻离心机(法国 Jouan 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参照李杰等^[8]方法制备血栓,随后参照张新江、刘瑜等^[9-10]方法建立大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO)。假手术组手术方法同模型,只在注射时以 0.9% 生理盐水 0.3 mL 代替栓子溶液。

2.2 动物分组及处理 采用随机数字表法将 160 只大鼠分为假手术组,模型组, rt-PA 组及化痰通络方联合 rt-PA 组(之后简称中药组),每组选取 6, 24, 72 h 与 7 d 4 个时相取材,每组每个时相选取 10 只大鼠。给药剂量参照文献[11]中“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算,为 $7.2 \text{ g} \cdot$

kg⁻¹。中药组与 rt-PA 组于血栓注入后 3 h 由尾静脉缓慢一次性注入 rt-PA (剂量为 5.67 mg·kg⁻¹)，中药组联合化痰通络中药 *ig* 治疗，2 次/d，模型组与 rt-PA 组给予相同时间点等量生理盐水 *ig*，于不同时相大鼠进行 2% 戊巴比妥钠 (40 mg·kg⁻¹) 腹腔麻醉，取缺血区脑组织以备检测。

2.3 观察指标

2.3.1 检测 GADD153/CHOP 和 JNK 基因的表达
按照 Trizol 试剂盒提取总 RNA，加 DEPC 水 20 μL

溶解。校正每组总 RNA 质量浓度为 1 g·L⁻¹，每 2 μg RNA 加入 Oligo (dT) 181 μL，72 °C 变性 10 min，取出立即置于冰上 2 min。后加入 DEPC 水 11.5 μL，5 × buffer 2.5 μL，dNTP Mixture 0.5 μL，RNase 0.5 μL，M-MLV 0.5 μL，室温静置 10 min。42 °C 水浴 1 h，冰上放置 2 min。在逆转录体系中按试剂盒说明书进行逆转录反应，反应条件为：95 °C，10 min 后；执行 95 °C，15 s，60 °C，1 min，40 cycles，观察荧光定量熔解度。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

基因	引物序列	片段长度/bp
GAPDH	上游 5'-GGCTTCGGGGCACATTTTCATCTG-3'	140
	下游 5'-CATTACACCCATGACCAACA-3'	
GADD153/CHOP	上游 5'-TCTGCCTTTCGCCTTTGAG-3'	220
	下游 5'-GCTTTGGGAGGTGCTTGTG-3'	
JNK1	上游 5'-GACGCCTTACGTGCTAACTCGT-3'	136
	下游 5'-TCCTGGAAAGAGGATTTTGAGGC-3'	

2.3.2 Tunel 法检测神经元凋亡 参照 Tunel 法细胞凋亡检测试剂盒进行检测。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行数据处理，计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组数据间的比较采用 *t* 检验或单因素方差分析方法，其中以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠脑梗死组织 CHOP, JNK1 mRNA 表达的影响 造模结束后使用 Bederson's 评分作为行为学检测方法，前期实验证实该模型造模稳

定^[97]。PCR 结果显示：同一组内，和 6 h 比较，各组的 CHOP 与 JNK1 基因表达量在 1 d 时均达到峰值，差异显著 (*P* < 0.05)，符合脑梗死发展规律。同一时相内，与假手术组比较，模型组在 4 个时相中两种基因表达量均明显增高 (*P* < 0.05)；与模型组比较，rt-PA 组和中药组在 4 个时相中均可明显降低 JNK1 基因表达量 (*P* < 0.05)，同时 rt-PA 组在 1 d 时可降低 CHOP mRNA 表达，而中药组可在 6 h 和 1 d 时同时明显降低其表达 (*P* < 0.05)；但 rt-PA 组与中药组之间无明显差异。见表 2, 3。

表 2 化痰通络方对大鼠不同时相脑梗死组织 CHOP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Huatan Tongluo formulae on expression of CHOP mRNA within infarcted tissues of rats on different time phases ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CHOP mRNA			
		6 h	1 d	3 d	7 d
假手术	-	0.80 ± 0.19	0.90 ± 0.20	0.67 ± 0.11	0.60 ± 0.11 ¹⁾
模型	-	1.05 ± 0.20 ²⁾	1.62 ± 0.14 ²⁾	0.86 ± 0.11 ²⁾	0.78 ± 0.05 ^{1,2)}
rt-PA	0.005 67	1.00 ± 0.18	1.08 ± 0.03 ³⁾	0.81 ± 0.40	0.67 ± 0.24 ¹⁾
rt-PA + 化痰通络	0.005 67 + 7.2	0.90 ± 0.07 ³⁾	1.00 ± 0.15 ^{1,3)}	0.77 ± 0.14 ¹⁾	0.66 ± 0.29 ¹⁾

注：同一组内，与 6 h 比较¹⁾ *P* < 0.05；同一时相内，与假手术组比较²⁾ *P* < 0.05，与模型组比较³⁾ *P* < 0.05 (表 3 同)。

3.2 对大鼠海马 CA3 区神经元凋亡的影响 同一组内与 6 h 时比较，各组在 1, 3 d 时神经元凋亡具有显著性差异 (*P* < 0.05)，并以 1 d 时神经元凋亡最多。同一时相内与假手术组比较，模型组神经元凋亡明显升高 (*P* < 0.05)；与模型组比较，rt-PA 组在

1, 7 d 时相神经元凋亡明显低于模型组 (*P* < 0.05)，化痰通络方组各个时相神经元凋亡均明显降低 (*P* < 0.05)。与 rt-PA 组比较，化痰通络方组在 1, 3 d 时相神经元凋亡明显 (*P* < 0.05)，其余时相均有降低的趋势。见图 1，表 4。

表 3 化痰通络方对大鼠不同时相大脑梗死组织 JNK1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of Huatan Tongluo formulae on expression of JNK1 mRNA within infarcted tissues of rats on different time phases ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JNK1 mRNA			
		6 h	1 d	3 d	7 d
假手术	-	0.14 ± 0.02	0.50 ± 0.10 ¹⁾	0.30 ± 0.08	0.25 ± 0.04
模型	-	0.83 ± 0.05 ²⁾	1.00 ± 0.10 ^{1,2)}	0.76 ± 0.03 ²⁾	0.73 ± 0.07 ²⁾
rt-PA	0.005 67	0.58 ± 0.14 ³⁾	0.73 ± 0.20 ^{1,3)}	0.63 ± 0.16 ³⁾	0.47 ± 0.09 ³⁾
rt-PA + 化痰通络	0.005 67 + 7.2	0.34 ± 0.21 ³⁾	0.65 ± 0.07 ^{1,3)}	0.52 ± 0.17 ³⁾	0.46 ± 0.13 ³⁾

表 4 化痰通络方对大鼠海马 CA3 区神经元凋亡计数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Counts of neuronal apoptosis within CA3 area of hippocampus in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CA3/个			
		6 h	1 d	3 d	7 d
假手术	-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
模型	-	11.0 ± 1.4 ²⁾	137.0 ± 12.2 ^{1,2)}	50.0 ± 6.0 ^{1,2)}	24.0 ± 2.0 ^{1,2)}
rt-PA	0.005 67	7.0 ± 1.0	75.0 ± 25.0 ^{1,3)}	42.0 ± 5.0 ¹⁾	11.0 ± 2.0 ³⁾
rt-PA + 化痰通络	0.005 67 + 7.2	5.0 ± 0.8 ³⁾	55.0 ± 11.0 ^{1,3,4)}	27.0 ± 4.0 ^{1,3,4)}	7.0 ± 2.0 ³⁾

注:同一组内与 6 h 时相比较¹⁾ $P < 0.05$;同一时相内与假手术组比较²⁾ $P < 0.05$,与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,与 rt-PA 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

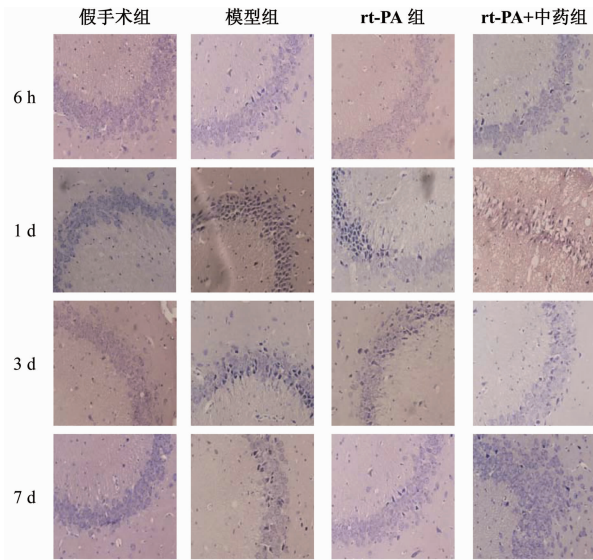


图 1 化痰通络方对大鼠海马 CA3 区神经元凋亡的影响 (TUNEL, × 200)

Fig.1 Effects of Huatan Tongluo formulae on neuronal apoptosis within CA3 area of hippocampus in rats (TUNEL, × 200)

4 讨论

急性脑梗死溶栓后缺血再灌注损伤是在脑缺血基础上溶栓再灌注导致的脑组织进一步损伤,最终会导致神经细胞坏死或凋亡。关于细胞凋亡,内质网应激启动的凋亡途径,是除了死亡受体途径、线粒体途径外,目前较受关注的一种新的诱发凋亡途径^[12]。

其相应凋亡机制主要包括 3 方面,即

GADD153/CHOP 转录激活, JNK 信号途径活化与 Caspase-12 的活化^[13-14]。其中, GADD153/CHOP 与 JNK 是联系 ERS 与细胞凋亡的 2 个重要中间信号分子,二者均可被 ERS 诱导表达,通过调节下游凋亡相关基因的表达继而促进凋亡。GADD153/CHOP 作为一种转录因子通过调节相关基因的表达决定细胞的生与死,其通过诱导靶基因假性激酶 (Tribbles3, TRB3) 表达而抑制蛋白激酶 Akt 活性,促进细胞凋亡^[15]。同时在 ERS 时, c-Jun-N-末端抑制性激酶被活化,激活 JNK,并可使 TNF- α 磷酸化。磷酸化的 TNF- α 与 IRE-1 形成复合物,导致 TNF- α 与 Caspase-12 前体解离并活化 Caspase-12^[16],同时激活凋亡信号激酶 1 (ASK1) 诱导细胞的凋亡^[17]。

脑梗死属祖国医学“中风病”范畴。痰瘀互结、酿生浊毒,阻闭脉络、蕴热扰神是急性缺血性中风的主要病机。风、火、痰、瘀、虚是其常见的证候要素,临床以两、三种证候要素组合为多,急性期以风火痰瘀为主。前期研究结果显示,风痰瘀阻证在缺血性中风急性期起病中占绝大多数^[18]。早期投用化痰泻浊、祛瘀通络方药切中病机。化痰通络法方由 7 味药组成,方中天麻性味甘平,为治风之神药;地龙咸寒,能清热熄风通络;川芎辛散上行,为血中气药,丹参味苦微寒,可凉血活血,二药合用可达行气活血祛瘀之目的;半夏辛温、胆星性苦微辛,具有清热化痰通络之功;酒大黄清热祛瘀泻浊,诸药合用共奏祛

风化痰、清热泻浊、祛瘀通络之功效。前期通过200例急性脑梗死溶栓治疗回顾性研究与60例前瞻性研究发现,化痰通络法可改善脑梗死风痰瘀阻证患者的神经功能,提高患者日常生活能力和社会活动参与能力,改善其认知功能,提升患者生存质量^[19-21],但其作用机制尚不清楚。

本研究结果显示大脑中动脉栓塞模型大鼠梗死区出现明显的神经元凋亡现象,rt-PA溶栓后能够部分抑制凋亡,而加入化痰通络中药后,神经元凋亡明显降低。分子生物学机制研究进一步提示rt-PA联合化痰通络中药可显著降低模型大鼠脑梗死组织中升高的GADD153/CHOP与JNK1基因,并优于单纯的rt-PA溶栓。可见化痰通络方可通过降低内质网应激后期神经细胞凋亡途径中GADD153/CHOP与JNK1基因的表达,部分抑制神经细胞的凋亡,从而防治急性脑梗死溶栓后缺血再灌注的发生与发展。

[参考文献]

[1] Liu C L, He K L, Wang L L. Research of cell protection based on ER stress[J]. Chin Pharmacol Bul, 2011,27(4):455-458.

[2] Mahfoudh-Boussaid A,Zaouali M A,Hadj-Ayed K, et al. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1alpha in ischemic kidney: the role of nitric oxide[J]. J Biomed Sci, 2012,19:7.

[3] Cheng R, Liu X Q, Zhang L S, et al. Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning[J]. Autophagy, 2012,8(3):310-325.

[4] Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response[J]. J Biol Chem, 2008,283(7):4252-4260.

[5] 周震,王凯,刘爽,等.化痰通络方对急性脑梗死大鼠rt-PA溶栓后不同脑区星形胶质细胞特异性蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(9):184-189.

[6] 张玉莲,周震,宋宛珊,等.化痰通络方对急性脑梗死大鼠溶栓后血脑屏障相关构成蛋白表达的影响[J].中医杂志,2013,54(24):2128-2131,2134.

[7] 周震,宋宛珊,王占奎,等.化痰通络方联合rt-PA对急性脑梗死溶栓后神经功能缺损及皮质神经元微观形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(18):219-222.

[8] 李杰,李光勤.尿激酶溶栓对大脑中动脉血栓栓塞模型大鼠MMP-9、血脑屏障通透性和脑出血的影响

[J].国际脑血管病杂志,2009,17(9):668-672.

[9] 张新江,常丽英,张苏明,等.大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良[J].卒中与神经疾病,2003,10(1):12-15.

[10] 刘瑜,胡文立,宋爱利,等.大鼠脑血栓模型的实验研究[J].实用医学杂志,2005,21(8):1992-1993.

[11] 张玉莲.化痰通络法联合小剂量尿激酶治疗急性脑梗死溶栓的临床与实验研究[D].天津:天津中医药大学,2008.

[12] 刘春蕾,何昆仑,王莉莉.基于内质网应激途径的细胞保护策略的研究进展[J].中国药理学通报,2011,27(4):455-458.

[13] Wu X D, Zhang Z Y, Sun S, et al. Hypoxic preconditioning protects microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury by attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. Apoptosis, 2013,18(1):85-98.

[14] Liu H L, Cui Y S. The activation pathway of caspase-12 in Endoplasmic reticulum stress and its relation with some disease[J]. J Environmental Hygiene Aug, 2011,1(4):41-45.

[15] Diakogiannaki E, Welters H J, Morgan N G. Differential regulation of the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells exposed to long-chain saturated and monounsaturated fatty acids[J]. J Endocrinol, 2008,197(3):553-563.

[16] Zhu H, Zhu H, Xiao S, et al. Activation and crosstalk between the endoplasmic reticulum road and JNK pathway in ischemia reperfusion brain injury[J]. Acta Neurochir (Wien), 2012,154(7):1197-1203.

[17] Liu D H, Yuan F G, Hu S Q, et al. Endogenous nitric oxide induces activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 via S-nitrosylation in rat hippocampus during cerebral ischemia-reperfusion[J]. Neuroscience, 2013,229:36-48.

[18] 黄宇虹.中风病急性期证候学研究[D].天津:天津中医学院,2005:29.

[19] 周震,张玉莲.中药联合尿激酶溶栓治疗急性脑梗死200例回顾分析[J].天津中医药,2009,26(6):449-452.

[20] 张玉莲,周震,王立存,等.化痰通络法结合尿激酶溶栓治疗急性脑梗死临床研究[J].天津中医药,2010,27(1):12-15.

[21] 王立存,张玉莲,郭家奎,等.小剂量尿激酶结合中药治疗急性脑梗死37例[J].河南中医,2008,28(2):52-53.

[责任编辑 周冰冰]