

## 酒大黄对动脉粥样硬化兔 PAI-1 及其基因的调节作用

陈俊荣<sup>1</sup>, 陈俊红<sup>2\*</sup>, 宋翠荣<sup>1</sup>, 梁金环<sup>1</sup>, 王梅<sup>1</sup>, 牟兆新<sup>1</sup>

(1. 沧州医学高等专科学校, 河北 沧州 061001;

2. 中国石油天然气集团公司中心医院, 河北 廊坊 065000)

[摘要] 目的: 研究酒大黄对实验性动脉粥样硬化(AS)兔纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)及其基因的调节作用, 探讨酒大黄抗 AS 机制。方法: 将健康雄性新西兰兔 32 只随机分为 4 组( $n=8$ ): 空白对照组(N组)、AS 模型组(M组)、酒大黄低剂量组(L组)和酒大黄高剂量组(H组), 常规高脂饮食构建动脉粥样硬化模型。治疗给药 12 周, 免疫组织化学法检测主动脉组织 PAI-1 蛋白表达, 半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测兔主动脉组织 PAI-1 mRNA 的表达。结果: 与模型组相比, 酒大黄低剂量组能显著抑制主动脉组织 PAI-1 mRNA 以及蛋白的表达( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 酒大黄高剂量组显著上调主动脉组织 PAI-1 mRNA 和蛋白的表达( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论: 酒大黄对 AS 兔 PAI-1 蛋白及其 mRNA 表达的调节作用呈现剂量双重性。

[关键词] 酒大黄; 动脉粥样硬化; 纤溶酶原激活物抑制物-1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0206-05

## Regulation of Radix et Rhizoma Rhei Prepared with Wine on Expression of PAI-1 mRNA in Aorta in Atherosclerotic Rabbits

CHEN Jun-rong<sup>1</sup>, CHEN Jun-hong<sup>2\*</sup>, SONG Cui-rong<sup>1</sup>, LIANG Jin-huan<sup>1</sup>, WANG Mei<sup>1</sup>, MU Zhao-xin<sup>1</sup>

(1. Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China;

2. China National Petroleum Corporation Central Hospital, Langfang 065000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate possible mechanisms of the beneficial effects of Radix et Rhizoma Rhei prepared with wine on the contents and expressions of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in atherosclerotic (AS) rabbits induced by high lipid diet. **Method:** Thirty-two healthy male New-Zealand rabbits were randomly divided into four groups ( $n=8$  each): Normal control group (N), AS model group (M), low dose (L) and high dose (H) Radix et Rhizoma Rhei prepared with wine groups. After 12-weeks treatment, the protein of PAI-1 was observed by immunohistochemistry method, and PAI-1 mRNA in aortic tissue were detected by RT-PCR method. **Result:** In low dose group, the expression of PAI-1 mRNA and protein in aortic tissue decreased significantly compared with AS model group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). In high dose group, the expression of PAI-1 mRNA and protein in aortic tissue were significantly increased compared with the other three groups. ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Radix et Rhizoma Rhei prepared with wine may play a dual role in controlling of PAI-1 gene expression.

[Key words] Radix et Rhizoma Rhei prepared with wine; atherosclerosis; plasminogen activator inhibitor type-1

[收稿日期] 20100811(004)

[基金项目] 河北省科技攻关计划项目(07276423)

[第一作者] 陈俊荣, 医学硕士, 教授, 现从事中药抗动脉硬化研究, Tel: 0317-5507813, E-mail: czyzkkk@yahoo.com.cn

[通讯作者] \* 陈俊红, Tel: 0316-2073864, E-mail: zkbcjh@126.com

纤溶酶原激活物抑制物-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 是组织型纤溶酶原激活物 (tPA) 的生理性抑制剂, 是纤溶系统的主要抑制因子。近年来 PAI-1 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的关系日益受到关注。目前认为, 血管内皮细胞是血浆中 PAI-1 产生的主要场所, 血管损伤处及血浆中 PAI-1 增多是 AS 血管、血栓性疾病发生的主要原因之一, 纤溶失衡有助于 AS 的发生和发展<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外对中药大黄, 尤其是其有效成分和复方制剂在抗 AS 方面的作用研究日趋深入<sup>[2]</sup>, 而对动脉粥样硬化动物实验模型中与内皮功能关系密切的 PAI-1 表达干预作用的研究尚未见报道。本研究通过建立家兔 AS 模型, 观察酒大黄对 PAI-1 及其基因的调节作用, 探讨其抗 AS 作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性新西兰兔 32 只, 3~4 月龄, 体重 (1.5 ± 0.5) kg, 由河北医科大学实验动物中心提供 (合格证号 803036)。

**1.2 动物饲料** 标准饲料由河北医科大学动物实验中心提供。高脂饲料配方: 1% 胆固醇; 15% 蛋黄粉; 5% 猪油; 79% 基础饲料; 胆固醇、蛋黄粉购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

**1.3 药品与试剂** 大黄购于沧州市药材公司, 经鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎, 鉴定人为沧州医学高等专科学校中医教研室马小允教授; 酒大黄: 取大黄净片加黄酒 10% 喷淋均匀, 稍闷后置锅内用文火微炒, 取出晾干用<sup>[3]</sup>。酒大黄经本校药剂教研室打碎过 80 目筛, 呈极细粉末, 与高脂饲料混匀, 制成含药颗粒饲料喂养。含药高脂饲料配制比例: 高脂饲料 (配方同 1.2) 占 90%, 酒大黄粉占 10%。给药量根据成人常用量按体表面积折合成兔用量<sup>[4]</sup>: 酒大黄低剂量组给药量为  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (给含药饲料  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 高剂量组给药为  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (给含药饲料  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。

总胆固醇 (TC) 试剂盒 (批号 011808010)、甘油三脂 (TG) 试剂盒 (批号 015908008)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 试剂盒 (批号 013708010)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 试剂盒 (批号 014808008), 均购自深圳迈瑞公司; 兔 PAI-1 抗体 (批号 20080800), 武汉博士德生物工程有限公司; 兔 SP 检测试剂盒 (批号 K86922E)、DAB 显色试剂盒 (批号

375230AJ), 北京中杉金桥生物技术有限公司; 总 RNA 极速抽提试剂盒 (批号 20080506), 上海飞捷生物技术有限公司; RT-PCR 试剂盒, 杭州博日生物科技公司; PAI-1 及内参照  $\beta$ -actin 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

**1.4 仪器** MINDRAY BS-220 全自动生化分析仪 (深圳迈瑞公司); YD-1508A 冷冻切片机, 浙江金华益迪医疗设备厂; LEICA DFC420 型显微镜、LEICA DM2000 型显微成像系统, 德国莱卡公司; Motic Med 6.0 数码医学分析系统, 麦克奥迪公司; UV-2100 型紫外分光光度计, 上海尤尼柯仪器公司; TC-xp-G 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司; Fine-do X3 Tanon UVP 凝胶成像系统, 上海天能科技公司。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 家兔在实验室适应性饲养 1 周后, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 即: 正常对照组 (N 组) 给予普通颗粒饲料喂养; AS 模型组 (M 组) 给予高脂饲料喂养; 酒大黄低剂量组 (L 组) 喂饲高脂饲料 + 酒大黄粉  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (相当于临床成人口服剂量的 10 倍); 酒大黄高剂量组 (H 组) 喂饲高脂饲料 + 酒大黄粉  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (相当于临床成人口服剂量的 20 倍)。上述各组家兔均分笼饲养, 限食量, 每兔每日 100 g, 分 2 次喂养, 自由饮水, 连续喂养 12 周。酒大黄低、高剂量处理组均于每日分 2 次按计算好的药量喂饲含酒大黄的高脂饲料, 待食完后再给予高脂饲料补足规定食量。每周称体重 1 次调整药量。

**2.2 标本采集** 实验第 12 周末禁食 12 h, 取各组兔静脉血 2 mL, 分离血清, 用于血脂检测。末次给药后 24 h, 各组动物颈动脉放血致死, 立即剖开胸腔、腹腔, 游离主动脉全长, 剥离外膜脂肪组织, 生理盐水冲洗后纵行剖开, 取靠近主动脉弓处的降主动脉约 1 cm, 迅速液氮冷冻并置于 -70 °C 冰箱保存用于 RNA 提取; 另取一段近主动脉弓处及血管开口处动脉组织约 1 cm, 用 4% 多聚甲醛溶液固定 36 h, 常规乙醇脱水, 石蜡包埋、切片, 分别作 HE 染色和免疫组织化学染色。HE 染色用于观察局部病理改变, 免疫组织化学染色用于检测主动脉组织 PAI-1 蛋白表达情况。

## 2.3 指标检测

**2.3.1 血脂检测** 全自动生化分析仪测定血清中 TC, TG, HDL-C, LDL-C 含量。

**2.3.2 主动脉壁病理形态观察** 主动脉壁 HE 染色切片, 40 倍普通光镜下, 每张切片随机选取 5 个视野, 观察病理形态变化并显微摄像, 利用医学图像分析系统分别测定其主动脉粥样斑块面积、主动脉内膜总面积以及内膜和中膜的厚度, 每个标本取 5 个视野测量的平均值, 并计算 AS 斑块面积/血管内膜面积和主动脉内膜/中膜厚度比值。

**2.3.3 主动脉组织 PAI-1 蛋白表达** 采用免疫组织化学 S-P 法, DAB 显色。染色步骤按照试剂盒说明操作。光镜下观察主动脉组织 PAI-1 蛋白的表达及定位, 棕黄色颗粒为阳性表达。采用 LEICA DM 2000 型显微成像系统分别拍摄各组图片, 使用 Motic Med 6.0 数码医学分析系统分析各组图片 PAI-1 阳性细胞的平均吸光度 ( $A$ ), 以其作为 PAI-1 蛋白的表达强度。

**2.3.4 RT-PCR 方法检测主动脉组织 PAI-1 mRNA 表达** 提取主动脉组织总 RNA, 严格按照试剂盒说明书操作。基因序列查自 GenBank, 应用专业引物软件 Primer Premier 5.0 设计, 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PAI-1 的上游引物序列为: 5'-CACTCCTGCTGCTGGTGAATGCC-3'; 下游引物序列为: 5'-GAGATGGTGCTCCCGTCCGACTT-3', 产物长

度为 112 bp; 内参照  $\beta$ -actin 的上游引物为: 5'-GCGACCTCACCGACTACCTGATG-3'; 下游引物为: 5'-GGCAGCTCGTAGCTCTTCTCCAG-3', 产物长度为 135 bp。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C, 45 s, 54 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 45 s, 共 29 个循环, 结束前 72 $^{\circ}$ C, 5 min, 4 $^{\circ}$ C, 5 min。各取 PAI-1 和内参照  $\beta$ -actin 的 PCR 产物 10  $\mu$ L, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果用计算机扫描分析, 以恒量表达的  $\beta$ -actin mRNA 吸光度  $A$  为内参照进行标准校正, 计算 PAI-1 产物的相对量。计算公式:

PAI-1 相对量 = PAI-1 产物电泳条带  $A$  /  $\beta$ -actin 产物电泳条带  $A$

**2.4 统计学处理** 应用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析 ( $F$  检验), 所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间两两比较采用 SNK- $q$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 血脂检测** 与模型组比较, 酒大黄低、高剂量组血清中 TC, LDL-C 含量均明显减少 ( $P < 0.01$ ), HDL-C 含量均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 以低剂量组 HDL-C 升高明显 ( $P < 0.05$ ), 高剂量组血清中 TG 含量明显减少 ( $P < 0.01$ ), 低剂量组 TG 含量降低, 但无显著性差异。见表 1。

表 1 第 12 周末各组兔血脂检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

mmol · L $^{-1}$

组别	给药剂量 /g · kg $^{-1}$ · d $^{-1}$	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常	-	2.27 $\pm$ 0.55 <sup>2)</sup>	1.04 $\pm$ 0.32 <sup>2)</sup>	0.78 $\pm$ 0.25	1.01 $\pm$ 0.23 <sup>2)</sup>
AS 模型	-	18.26 $\pm$ 4.36	3.15 $\pm$ 0.94	1.03 $\pm$ 0.37	15.80 $\pm$ 3.61
酒大黄	1	12.79 $\pm$ 2.50 <sup>2)</sup>	2.63 $\pm$ 0.79	3.27 $\pm$ 1.06 <sup>2)</sup>	8.32 $\pm$ 1.18 <sup>2)</sup>
	2	10.37 $\pm$ 2.81 <sup>2)</sup>	1.81 $\pm$ 0.63 <sup>2)</sup>	2.52 $\pm$ 0.83 <sup>2)</sup>	7.03 $\pm$ 1.74 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 各组动物主动脉斑块面积/血管内膜面积和主动脉内膜/中膜厚度比较** 与模型组比较, 酒大黄低、高剂量组主动脉斑块面积/血管内膜面积和主动脉内膜/中膜厚度及主动脉壁胆固醇含量都显著减小, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组动物 AS 斑块面积/血管内膜面积和主动脉内膜/中膜厚度比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	给药剂量 /g · kg $^{-1}$ · d $^{-1}$	AS 斑块面积/ 血管内膜面积	主动脉内膜/ 中膜厚度比值
正常	-	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>2)</sup>	0.12 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
AS 模型	-	0.61 $\pm$ 0.15	0.93 $\pm$ 0.28
酒大黄	1	0.27 $\pm$ 0.95 <sup>2)</sup>	0.39 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup>
	2	0.48 $\pm$ 0.98 <sup>1)</sup>	0.72 $\pm$ 0.18 <sup>1)</sup>

**3.3 各组家兔主动脉组织 PAI-1 蛋白表达的免疫组织化学分析** 正常组内膜和中膜仅见散在棕黄色颗粒状阳性染色物质; 模型组增厚的动脉内膜及中膜内可见大量的棕黄色颗粒状阳性染色物质, 部分融合成片, 尤以内膜明显; 酒大黄低剂量组的阳性染色物质明显低于模型组; 酒大黄高剂量组的阳性染色物质高于模型组。见图 1。

采用图像分析仪定量检测结果表明, 模型组单位面积动脉内膜及中膜 PAI-1 阳性染色标记物的平均吸光度  $A$  明显高于其他 3 组 ( $P < 0.01$ ), 酒大黄低剂量组 PAI-1 蛋白表达较模型组明显降低 ( $P < 0.01$ ); 酒大黄高剂量组 PAI-1 蛋白表达较模型组升高 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

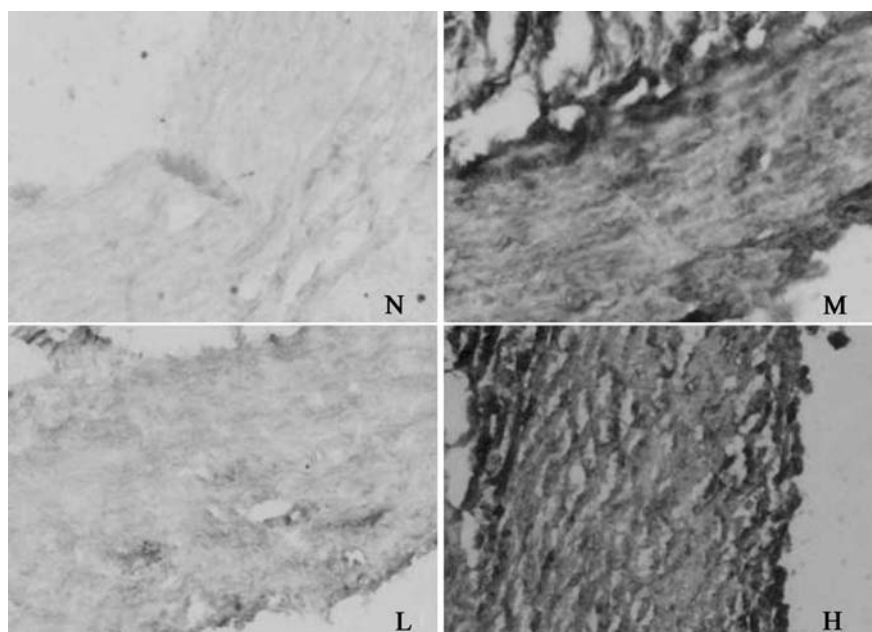


图 1 各组兔主动脉组织 PAI-1 表达的免疫组织化学表现 (S-P 法, DAB 染色, ×400)

N. 为正常对照组; M. 为 AS 模型组; L. 为酒大黄 1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组; H. 为酒大黄 2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组

**3.4 各组家兔主动脉组织 PAI-1 mRNA 表达比较**  
-actin 电泳条带亮度无明显差异, 正常对照组 PAI-1 表达的极少, 模型组 PAI-1 产物电泳条带最强, 产量最高, 与正常组相比, 模型组 PAI-1 基因的表达明显增多 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 酒大黄低剂量组 PAI-1 基因的表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 酒大黄高剂量组 PAI-1 基因的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组兔主动脉 PAI-1 组织化学染色及 PAI-1 mRNA 表达平均吸光度 (̄±s, n=8)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	PAI-1 阳性染色 /A	PAI-1 mRNA / -actin mRNA
正常	-	0.27 ±0.03 <sup>2)</sup>	1.27 ±0.39 <sup>2)</sup>
AS 模型	-	0.41 ±0.04	2.13 ±0.49
酒大黄	1	0.33 ±0.04 <sup>2)</sup>	1.54 ±0.45 <sup>1)</sup>
	2	0.47 ±0.06 <sup>2)</sup>	2.77 ±0.58 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

AS 形成的重要始动环节是内皮细胞损伤和功能紊乱。内皮细胞损伤或功能紊乱可导致血液凝血-纤溶失衡, 机体内纤溶系统的功能减低是导致血栓形成的重要原因之一<sup>[5]</sup>。当 PAI-1 过量时纤溶活性下降, 引起纤维蛋白沉着甚至血栓形成, 血浆脂蛋白渗入内膜, 长期纤维蛋白的慢性沉积会导致血管的反复损伤, 有利于斑块的生长, 这可能是 AS 发展的一个重要原因<sup>[6]</sup>。研究发现<sup>[7]</sup>, 高胰岛素、高血糖、高甘油三酯以及升高的游离脂肪酸可以引起 PAI-1 合成增加。Sobel 等<sup>[8]</sup>报道, 动脉粥样硬化斑块中 PAI-1 mRNA 表达增加, 且 PAI-1 mRNA 水平与

动脉粥样硬化程度呈正相关。

中医学认为 AS 的形成过程可归结为痰瘀交阻、蕴结成毒、损伤脉络。清热解毒、活血祛瘀可能对 AS 发病机制相关靶点和通路有更好的作用, 目前已成为中西医结合治疗 AS 的一个切入点<sup>[9]</sup>。大黄味苦性寒, 归脾、胃、大肠、肝、心经, 具有泻下攻积、清热泻火解毒、活血祛瘀止血等作用。现代研究表明大黄具有抗炎、调节脂质代谢、保护血管内皮细胞、抑制血管平滑肌细胞增殖、抗氧化、抗凝血与抗纤溶作用<sup>[2]</sup>, 但生大黄剧烈泻下、腹痛的副作用也比较突出, 在临床应用时, 有一定的局限性。酒性味辛、大热具行散之功, 酒制大黄缓和生大黄苦寒泻下之性, 免伤脾胃, 减轻了腹痛等副作用, 突出活血祛瘀、清热解毒的功能。

本研究表明, 新西兰白兔喂食高脂饲料 12 周后, 模型组可见主动脉组织 PAI-1 蛋白及其 PAI-1 mRNA 表达增强。酒大黄 1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量喂饲干预可明显减少主动脉组织 PAI-1 mRNA 和蛋白的过度表达, 提示酒大黄低剂量可提高血液纤溶活性, 使血管内皮功能损伤减轻, 纤维蛋白病理性沉积减少, 从而防止动脉壁血栓形成, 可能为 AS 的防治提供一条新途径。

作者还发现应用酒大黄 2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量组主动脉组织 PAI-1 mRNA 和蛋白表达升高, 呈现剂量的双重性, 推测酒大黄应用可能存在一个临界剂量, 超过这个剂量, 对 PAI-1 的抑制作用消失, 酒大黄由促进纤溶, 转为促进血栓形成。一方面提示在临床应用酒大黄时要掌握剂量, 不能滥用; 另一方面酒大黄对 PAI-1 的双向调节作用, 也说明了酒大黄在调整机体纤溶系统方面具有独特的优势, 酒大黄是止血与活血并举中药, 其“活血不伤血, 止血不留瘀”的特殊功效在临床心脑血管疾病防治中值得推广研究。

本研究结果显示, 酒大黄 2 个剂量组均可降低动脉粥样硬化兔血清 TC, LDL 含量, 升高 HDL 含量, 明显减少主动脉斑块面积/血管内膜面积和内膜/中膜厚度比值, 其中低剂量组更为明显, 这与酒大黄对 PAI-1 的双向调节作用并不完全一致。AS 的发生是一个复杂的病理生理过程, 抗 AS 药物的作用机制也并非单一, 推测酒大黄可通过影响 PAI-1 以外的其他因素发挥抗 AS 作用, 其作用机制及抗 AS 作用的量效关系有待进一步探索。

[参考文献]

[1] OLEXA P, EXOVA M. Plasminogen activator inhibitor1 (PAI-1), chemi heart disease and diabetes mellitus[ J]. Vnitr Lek, 2003, 49(3):222.

[2] 陈俊荣, 陈俊红, 王国明. 大黄抗动脉粥样硬化作用机制研究概况[ J]. 中国药房, 2008, 19(18):1429.

[3] 陈莉. 生大黄与酒大黄临床功效刍议[ J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(2):157.

[4] 刘福英, 吕占军. 实验动物学[ M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 180.

[5] FAY W P, GARG N, SUNKAR M. Vascular functions of the plasminogen activation system [ J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27:1231.

[6] LIBBY P, AIKAWA M, JAIN M K. Vascular endothelium and atherosclerosis[ J]. Handb Exp Pharmacol,

2006, (176 Pt 2):285.

[7] Iwasaki H, Okamoto R, Kato S, et al. High glucose induces plasminogen activator inhibitor-1 expression through Rho/Rho-kinase-mediated NF-kappaB activation in bovine aortic endothelial cells [ J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1):22.

[8] Sobel B E, Esmon C T, Owen W G, et al. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomyspecimensfrom type 2 diabetic compared with nondiabetic patients [ J]. Circulation, 2005, 97(22):2213.

[9] 李富玉, 李军艳, 许彦来, 等. 解毒活血法治疗颈动脉粥样硬化斑块临床观察[ J]. 山东中医药大学学报, 2010, 34(1):42.

[责任编辑 聂淑琴]

(上接第 205 页)

[3] 陈奇. 中药药理实验方法学[ M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 35.

[4] Zea Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[ J]. Stroke, 1989, 20(1):84.

[5] Shibuta S, Varathan S, Mashimo T. The neuroprotective effect of ONO-1714 on NMDA-mediated cytotoxicity *in vitro*[ J]. J Neurol Sci, 2003, 215(5):31.

[6] Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury [ J]. Pharmacol Rev, 2001, 53(1):135.

[7] Holtz M L, Craddock S D, Pettigrew L C. Rapid expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases during post-ischemic reperfusion in rat brain

[ J]. Brain Res, 2001, 898(1):49.

[8] Kawanma S, Shirasawa M, Fukasawa H, et al. Attenuated neuropathology by nilvadipine after middle cerebral artery occlusion in rats[ J]. Stroke, 1991, 22(1):51.

[9] Tirassa P, Manni L, Aloe L, et al. Cholecystokinin-8 and nerve growth factor: two endogenous molecules working for the upkeep and repair of the nervous system [ J]. Curr Drug Targets CNS Neural Disord, 2002, 1(5):495.

[10] Waltenberger J, Claesson-welsh L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor[ J]. J Biol Chem, 1994, 269(1):88.

[责任编辑 聂淑琴]