

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.17.007

大豆异黄酮基于 RhoA/ROCK2 信号通路改善 MCAO 大鼠神经功能损伤 *

单海雷 焦光美 程 曦 马 征 高燕军 杨 宁 窦志杰 赵 亮[△]

(承德医学院附属医院 河北 承德 076020)

摘要 目的:探讨大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠 RhoA/ROCK2 信号通路介导的氧化应激反应和神经元凋亡的影响。**方法:**60 只 SD 大鼠随机分为 3 组,对照组、模型组、大豆异黄酮组。连续给药 7 天后,给药剂量 200 mg/kg。应用中动脉栓塞再灌注模型致大鼠缺血损伤。24 h 后评价大鼠神经功能,TTC 染色检测脑梗死体积,试剂盒检测脑中氧化因子含量,免疫组化检测神经元损伤,Western Blotting 检测 RhoA / ROCK2 相关蛋白含量。**结果:**与对照组比较,模型组大鼠神经功能评分降低($P<0.05$),脑梗死体积增加($P<0.05$),氧化因子含量增加($P<0.05$),神经元凋亡显著($P<0.05$),RhoA/ROCK2 蛋白表达增加($P<0.05$)。与模型组相比,大豆异黄酮升高了大鼠神经功能评分($P<0.05$),减少的脑梗死体积($P<0.05$),降低脑中氧化因子含量($P<0.05$),抑制了神经元凋亡($P<0.05$),抑制了 RhoA/ROCK2 蛋白表达($P<0.05$)。**结论:**大豆异黄酮可以缓解脑缺血再灌注损伤介导的氧化应激及细胞凋亡,进而减轻神经功能障碍,其机制可能与抑制 RhoA / ROCK2 信号通路相关。

关键词:大豆异黄酮;脑缺血再灌注;氧化因子;神经元凋亡;RhoA/ROCK2

中图分类号:R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)17-3233-06

Soybean Isoflavones Improve Neurological Damage in MCAO Rats Based on RhoA/ROCK2 Signaling Pathway*

SHAN Hai-lei, JIAO Guang-mei, CHENG Xi, MA Zheng, GAO Yan-jun, YANG Ning, DOU Zhi-jie, ZHAO Liang[△]

(Chengde Medical College Affiliated Hospital, Chengde, Hebei, 076020, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of soybean isoflavones on oxidative stress and neuronal apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion through RhoA / ROCK2 signaling pathway. **Methods:** Sixty SD rats were randomly divided into three groups: Control group, Model group and Soybean isoflavone group. After continuous administration of Soybean isoflavone for 7 days, the cerebral ischemia / reperfusion operations were performed for neurologic deficit in rats. 24 hours later, the neurological function of rats were evaluated. The cerebral infarct size was assessed through TTC staining. The content of oxidative factor in the brain was detected through elisa kit. And neuronal damage was detected through Immunohistochemistry. **Results:** Compared with Control group, the neurological function score of Model group significantly decreased ($P<0.05$), the cerebral infarct size increased ($P<0.05$), the content of oxidizing factor increased ($P<0.05$), and neuronal apoptosis was increased ($P<0.05$), furthermore, RhoA/ROCK2 protein expression raised ($P<0.05$). Compared with Model group, soy isoflavones improved the neurological function ($P<0.05$), reduced cerebral infarction volume ($P<0.05$), lower down the content of oxidative factors in the brain($P<0.05$), and inhibited neuronal apoptosis($P<0.05$) and decreased RhoA/ROCK2 protein expression ($P<0.05$). **Conclusion:** Soybean isoflavone can alleviate oxidative factors and neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion, and further reverse neurological dysfunction which is related to the inhibition of RhoA/ROCK2 signaling pathway.

Key words: Soybean isoflavone; Cerebral ischemia-reperfusion; Oxidation factor; Neuronal apoptosis; RhoA / ROCK2

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)17-3233-06

前言

缺血性脑卒中是由于脑部血管血液供应不足出现的一种高发疾病,主要发病人群为 60 岁以上老年人^[1]。临床上针对缺血性脑卒中的治疗方式主要为溶栓,但缺血区的血供恢复往往会介导一系列炎症反应和氧化应激反应,造成脑组织再次损伤,影响患者后期神经功能恢复,因此需要密切关注^[2]。研究证

实,脑卒中患者脑中 ROCK2 表达升高与氧化应激诱导的神经元凋亡密切相关^[3]。大豆异黄酮(Soybean Isoflavone, SI)是大豆生长过程中形成的一类具有生物活性的黄酮类化合物代谢产物,又称植物雌激素,具有广泛抗炎^[4]、抗氧化作用^[5],且具有一定的神经保护作用^[6],但大豆异黄酮是否可以减轻脑缺血再灌注后氧化应激反应及其机制仍有待研究。本研究拟通过脑缺血再灌注大鼠模型的建立,探究大豆异黄酮对缺血性脑卒中再灌注的

* 基金项目:河北省卫生健康委员会 2018 年度指导性项目(20181160)

作者简介:单海雷(1968-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑血管病

[△] 通讯作者:赵亮(1968-),男,硕士研究生,主要研究方向:脑血管病,E-mail: hailex@163.vip.com,电话:15633142910

(收稿日期:2020-02-28 接受日期:2020-03-23)

保护作用与机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆异黄酮(天津尖峰天然产物有限公司);圆头尼龙线栓(广州佳灵生物科技有限公司);2,3,5-三苯基氯化铵(TTC);水合氯醛(阿拉丁生物科技有限公司);HE(苏木精-伊红)染色试剂盒(索莱宝有限公司);RIPA裂解液、BCA试剂盒、 β -actin抗体(碧云天生物公司);TUNEL染色试剂盒(美国罗氏公司);8-oxo-dG抗体(美国 abcam 公司);RhoA 抗体、ROCK2 抗体(武汉博士德生物公司);Cleaved-Caspase-3 抗体、Caspase-3 抗体(沈阳万类生物公司);Bcl-2 抗体、Bax 抗体(美国 CST 生物公司)。

1.2 实验动物与分组

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 220-230 g,由湖南省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(湘)2016-002,随机分为对照组(Control)、模型组(Model)、大豆异黄酮组(SI),每组 20 只。饲养条件为 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 50%-60%,正常日夜节律,自由饮食饮水。

1.3 实验给药与造模

大豆异黄酮组手术前 7 天持续灌胃给药 200 mg/kg 大豆异黄酮溶液,最后一次给药时间为手术前 2 h,其余各组给予生理盐水。造模参考文献中动脉缺血法^[7]制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型。使用水合氯醛麻醉大鼠,仰卧位固定于操作台上,颈部皮肤消毒。颈部正中切开皮肤,钝性分离出各血管,结扎颈外动脉,暂时性封闭颈总与颈内动脉。颈外动脉开口插入圆头线栓,前进至颈内动脉,圆头距离分叉处 18 mm 为终点,固定线栓。90 min 后退出线栓并进行 24 h 再灌注。

1.4 神经功能检测

脑缺血再灌注 24 h 后,采用 18 分标准法^[8]来评估脑缺血再灌注后大鼠神经功能损伤。评分基于以下六项测试:(1)将大鼠放入鼠笼中观察 5 min 内自发运动(0~3 分);(2)提起尾部悬空,观察四肢状态(0~3 分);(3)提起后肢悬空,前肢移向桌子,使之仅靠前肢行走,观察前肢伸展运动(0~3 分);(4)网屏实验观察攀爬能力(1~3 分);(5)两侧身体触觉反射(1~3 分);(6)两侧触须触觉反射(1~3 分)。最高得分 18 分,最低得分 3 分

1.5 TTC 染色

神经功能检测结束后,各组随机挑选 4 只大鼠,水合氯醛深度麻醉。取出全脑组织,于 -20°C 条件下冰冻 10 min,将脑组织连续切成 4 个连续厚度为 1 mm 的冠状切片,在 2% 2,3,5-三苯基氯化铵(TTC)中,于 37°C 水浴中孵育 15 min。转移脑组织至 4% 多聚甲醛中固定。梗死区域 TTC 染色后呈白色,未梗死区域呈红色。

1.6 脑组织切片

神经功能检测结束后,各组随机挑选 4 只大鼠,水合氯醛深度麻醉,打开胸腔,自心尖推注 PBS 溶液,自心耳流出至液体无血色,序贯推注 4% 多聚甲醛溶液固定,取出脑组织,浸入 4% 多聚甲醛溶液中 4°C 条件下过夜。冰乙醇梯度脱水后透明、浸蜡、透明石蜡包埋,切片机切成 $5\sim 8\ \mu\text{m}$ 冠状切片。

1.7 8-oxo-dG 染色

石蜡切片经脱蜡、水化处理后,置于抗原修复盒中,滴加 5% BSA 溶液封闭。30 min 后洗净 BSA 溶液,在 4°C 条件下与

8-oxo-dG 一抗稀释液孵育过夜,次日使用 HRP 标记的二抗稀释液孵育 30 min,最后滴加 DAB 溶液进行染色,再滴加苏木素进行复染并使用中性树胶封片,光学显微镜收集图像。

1.8 TUNEL 染色

石蜡切片脱蜡水化后,置于 3% 过氧化氢甲醇中浸泡 10-15 min,用蛋白酶 K 室温孵育 15~30 min,PBS 溶液洗涤,滴加 TUNEL 反应混合液,湿盒中孵育 60 min,PBS 洗涤后滴加 DAB 溶液染色,再以苏木精复染,中性树胶封片。

1.9 Western Blotting 检测

取剩余大鼠,水合氯醛麻醉后,取大脑组织,镊取缺血区前额皮层组织,加入 RIPA 裂解液,裂解 30 min 后,匀浆并离心取上清液,BCA 试剂盒检测蛋白浓度。加入 $5\times$ 上样缓冲液,沸水浴 10 min 使蛋白变性。震荡混匀后等量蛋白上样,进行 SDS 凝胶电泳,结束后半干法转膜将蛋白转移至 PVDF 膜上。使用脱脂牛奶封闭两小时,洗净牛奶后一抗稀释液孵育过夜,次日 PBS 洗净一抗稀释液,二抗稀释液孵育 2 h,显影仪下显影。

1.10 氧化应激因子检测

取缺血侧脑组织,加入等体积 PBS 溶液,匀浆后离心取上清液,BCA 测蛋白浓度,根据 MDA、SOD、ROS、GSH 等试剂盒说明书检测大鼠脑中氧化因子水平。

1.11 数据统计学

各组实验数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理,所有实验数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组之间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),两组之间比较采用独立样本 t 检验分析。

2 结果

2.1 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠神经功能评分影响

本研究利用 18 分标准法对脑缺血再灌注大鼠进行神经功能评分,如图 1 所示,与对照组相比,模型组大鼠神经功能评分显著降低($P<0.05$),多数大鼠表现出自发活动减少,提起后一侧前爪无法完全伸展,且前肢运动困难,爬笼抓力不足的现象。与模型组相比,大豆异黄酮显著增加了大鼠行为学评分($P<0.05$),大鼠自主运动增加,虽然多数大鼠前爪仍无法伸展,但提起后肢,多数大鼠可利用前肢向前运动,且部分大鼠有爬笼现象。

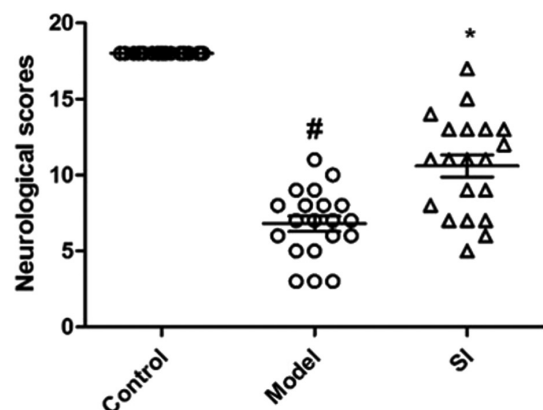


图 1 各组大鼠神经功能评分(与 Control 组相比: * $P<0.05$,与 Model 组相比: # $P<0.05$)

Fig.1 Neurological scores of rats in each group (* $P<0.05$ vs. Control group, # $P<0.05$ vs. Model group)

2.2 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑中梗死面积的影响

TTC 染色反映了脑缺血再灌注后脑中梗死面积。如图 2 所示,对照组大鼠脑中未出现梗死,模型组大鼠脑中出现显著的

梗死,大豆异黄酮的干预则显著减少了大鼠脑中梗死面积($P<0.05$)。

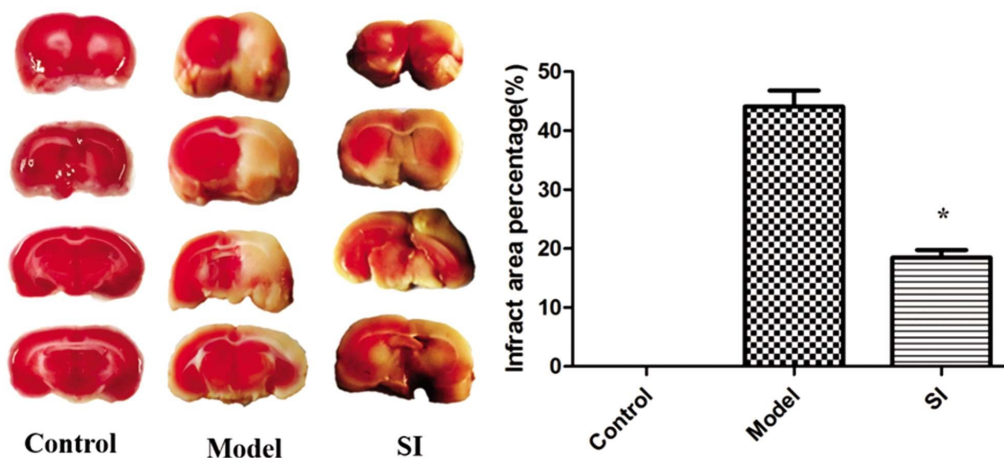


图 2 各组大鼠脑组织梗死面积及量化统计(与 Control 组相比: * $P<0.05$,与 Model 组相比: # $P<0.05$)

Fig.2 Infarct area and quantitation of brains in each group (* $P<0.05$ vs. Control group, # $P<0.05$ vs. Model group)

2.3 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠大脑皮层神经元的影响

脑缺血再灌注往往会造成大鼠脑中出现显著的神经元凋亡现象。如图 3 所示,对照组大鼠皮层中细胞众多,细胞染色较浅,神经元轮廓清晰,界限分明,细胞呈椭圆或圆形分布。与对

照组相比,模型组大鼠脑中大量神经元细胞膜破裂,轮廓模糊不清,细胞核皱缩且染色较深。与模型组相比,大豆异黄酮干预后大鼠脑中仍有不少神经元有细胞膜破裂现象,但多数细胞呈现出椭圆或圆形分布,轮廓清晰且染色较浅。

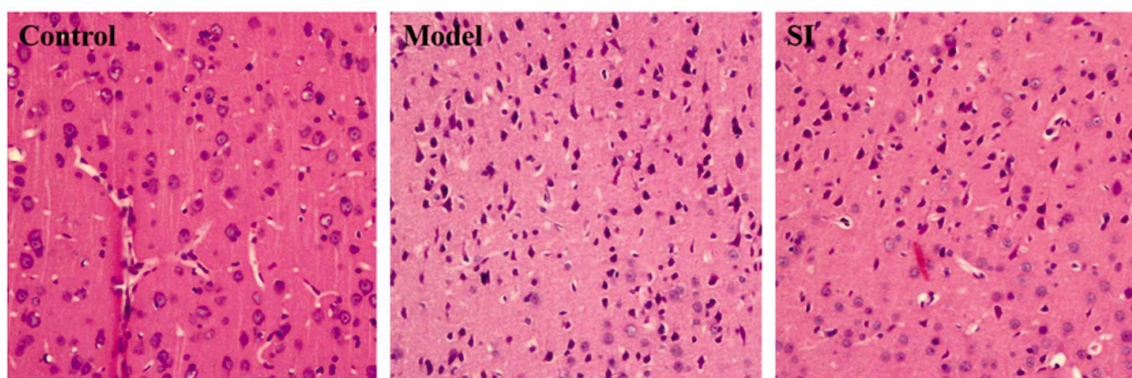


图 3 各组大鼠脑中神经元状态

Fig.3 The state of neurons in the brains of rats in each group

2.4 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑中氧化应激反应的影响

氧化因子与抗氧化因子的含量反映了各组大鼠脑中氧化应激水平。与对照组相比,模型组大鼠脑中抗氧化因子超氧歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)含量显著降低($P<0.05$),氧化因

子丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)含量显著增加($P<0.05$),大豆异黄酮显著逆转了脑缺血造成的抗氧化因子含量降低($P<0.05$),氧化因子含量升高($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠脑中 SOD、GSH、MDA、ROS 含量

Table 1 SOD, GSH, MDA, ROS content in the brain of rats in each group

	Control	Model	SI
MDA(nmol/mg)	9.38± 2.27	38.29± 11.37*	21.87± 5.84#
ROS(nmol/mg)	4.27± 0.64	10.25± 1.37*	6.41± 0.75#
SOD(U/mg)	299.28± 44.43	118.75± 33.76*	265.11± 35.41#
GSH(nmol/mg)	7.76± 1.81	2.69± 0.80*	5.19± 1.39#

Note: * $P<0.05$ vs. Control group, # $P<0.05$ vs. Model group.

2.5 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑中 8-oxo-dG 的影响

8- 羟基 - 脱氧鸟苷(8-oxo-dG)氧化应激反应诱导 DNA 损

伤的标记。如图 4 所示,与对照组相比,模型组大鼠脑中 8-oxo-dG 表达显著升高($P<0.05$),与模型组相比,大豆异黄酮显著降低

了脑中 8-oxo-dG 表达。

2.6 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑中神经元凋亡的影响

TUNEL 染色反映了神经元凋亡情况。如图 5 所示,与对照

组相比,模型组大鼠脑中 TUNEL 染色阳性细胞数显著增加 ($P<0.05$),与模型组相比,大豆异黄酮显著降低了模型组大鼠脑中 TUNEL 染色阳性细胞数($P<0.05$)。

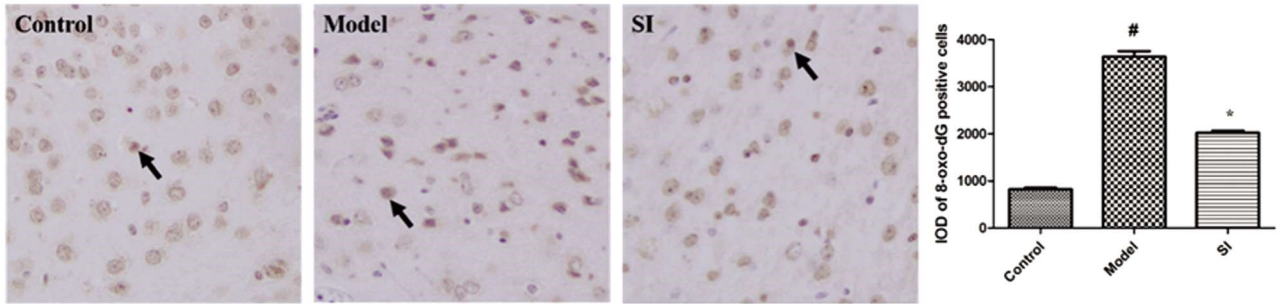


图 4 各组大鼠脑中 8-oxo-dG 表达及量化统计(与 Control 组相比: $*P<0.05$,与 Model 组相比: $^{\#}P<0.05$)

Fig.4 8-oxo-dG expression and quantitation in the brains of rats in each group ($*P<0.05$ vs. Control group, $^{\#}P<0.05$ vs. Model group)

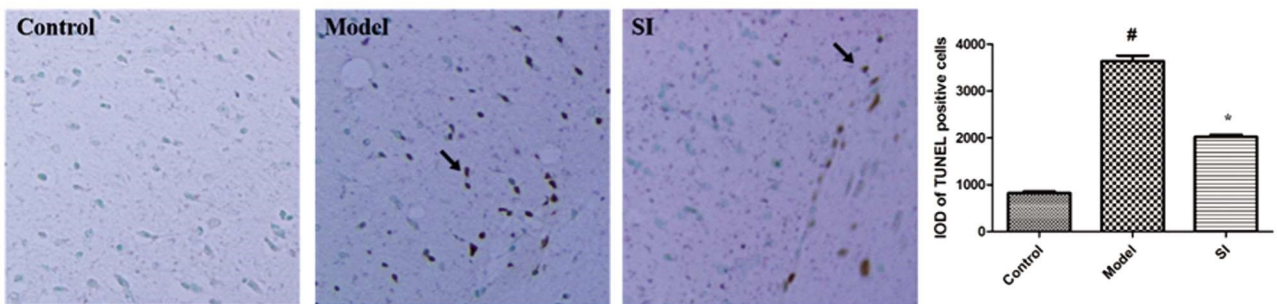


图 5 各组大鼠脑中 TUNEL 染色及量化统计(与 Control 组相比: $*P<0.05$,与 Model 组相比: $^{\#}P<0.05$)

Fig.5 TUNEL staining and quantitation in the brains of rats in each group ($*P<0.05$ vs. Control group, $^{\#}P<0.05$ vs. Model group)

2.7 大豆异黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑中 RhoA/ROCK2 相关蛋白的影响

如图 6 所示,与对照组相比,模型组大鼠脑中 RhoA 蛋白、ROCK2 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$),Caspase-3 蛋白剪切显著升高($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达显著降低($P<$

0.05),促凋亡蛋白 Bax 蛋白表达显著升高。与模型组相比,大豆异黄酮显著降低了大鼠脑中 RhoA 蛋白、ROCK2 蛋白表达 ($P<0.05$),增加了 Caspase-3 蛋白剪切($P<0.05$),升高 Bcl-2 蛋白表达水平($P<0.05$),降低 Bax 蛋白表达($P<0.05$)。

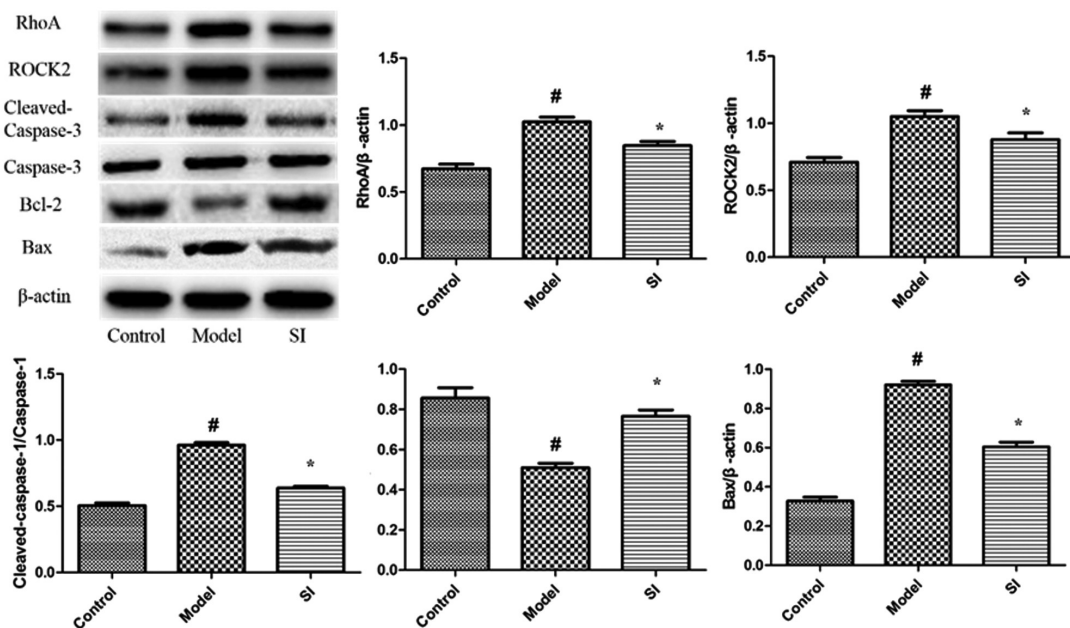


图 6 各组大鼠脑中 RhoA/ROCK2 相关蛋白表达及量化统计(与 Control 组相比: $*P<0.05$,与 Model 组相比: $^{\#}P<0.05$)

Fig.6 RhoA / ROCK2 related protein expression and quantitation in the brains of rats in each group ($*P<0.05$ vs. Control group, $^{\#}P<0.05$ vs. Model group)

3 讨论

缺血性脑卒中会引发患者多种病理级联反应,影响患者的脑中神经元状态,严重情况下会破坏血脑屏障,造成神经、认知功能损伤^[9]。缺血性脑卒中是由多种途径介导的神经、认知功能损伤,患者多以半侧身体瘫痪、思维意识迟缓为主要特征,患者的日常生活受到极大的影响。本研究中,中动脉缺血再灌注成功造成大鼠神经功能评分降低,缺血侧大脑梗死严重,且 HE 染色显示神经元凋亡较多,提示本次实验中大鼠缺血性脑卒中模型造模成功。大豆异黄酮的干预有效改善了大鼠神经功能损伤,提高了大鼠认知功能评分总分,减少了缺血侧大脑梗死面积,改善了皮层中神经元状态,提示大豆异黄酮对于脑缺血再灌注大鼠神经功能损伤具有显著改善功效。

大量研究显示,脑缺血再灌注介导的氧化应激反应和炎症反应在血管性痴呆的病理生理过程中起重要作用^[10,11]。脑缺血再灌注过程中,氧化因子大量产生,如何有效降低或缓解脑缺血再灌注后氧化应激水平,是目前治疗缺血性脑卒中的重点^[12]。ROS 属于脂质氧化过程中间产物,能够破坏细胞膜、损伤核酸、引发 DNA 断裂^[13]等。MDA 为脂质过氧化终产物,会引起蛋白质、核酸等大分子交联聚合、并且具有细胞毒性^[14]。MDA 及 ROS 水平与氧化应激反应呈正相关^[15]。本研究中,脑缺血再灌注成功造成大鼠脑中 ROS 含量、MDA 含量显著升高,提示脑缺血再灌注成功造成大鼠脑中氧化应激反应增加。SOD 是一种源于生命体的重要活性成分,可消除有害物质,维持良好的新陈代谢状态^[16],其水平降低意味着机体抗氧化功能的减弱。GSH 是一种整合解毒、抗氧化的三肽,也是衡量机体抗氧化能力的重要指标^[17]。本研究中,脑缺血再灌注组大鼠脑中 SOD 活性、GSH 含量显著降低,提示大鼠脑中抗氧化因子水平降低。然而,大豆异黄酮显著降低了脑中 ROS、MDA 含量,升高了脑中 SOD 活性与 GSH 含量,提示大豆异黄酮对于脑缺血再灌注大鼠术后脑中氧化应激反应有显著的抑制作用。

脑中过量的氧化因子积累、抗氧化因子水平降低会导致 DNA 片段化和损伤。在氧化损伤过程中,由于羟自由基攻击 DNA,引起鸟嘌呤 8 位羟基化而产生 8-oxo-dG^[18],因此,8-oxo-dG 是 DNA 氧化损伤后产物。TUNEL 染色是基因组 DNA 断裂时,暴露的 3'-OH 在末端脱氧核糖核苷酸转移酶的催化下,dUTP 被荧光素标记显色^[19]。8-oxo-dG 染色与 TUNEL 染色一方面反映了机体脑中神经元凋亡水平,另一方面也反应了机体内氧化应激的真实情况^[20]。本研究中,脑缺血再灌注介导的氧化应激造成大鼠脑中 DNA 断裂增加,神经元凋亡显著,而大豆异黄酮则显著改善了大鼠脑中神经元凋亡。

脑缺血疾病中,RhoA 与其下游效应因子 ROCK2 活性不仅在血管平滑肌和内皮细胞中,而且在炎性细胞和神经元内普遍增加。RhoA/ROCK2 广泛参与调节突触可塑性、神经元凋亡、运动神经、局部血流、学习和记忆等过程,在中枢神经系统中起着重要的生理和病理作用^[21]。RhoA/ROCK2 表达抑制具有维持机体的氧化还原平衡及抗炎的作用,可以减少细胞死亡、蛋白质氧化及脂质过氧化,促进细胞增殖,降低血管性痴呆的发病危险^[22]。RhoA/ROCK2 调节氧化反应机制涉及降低细胞内一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的活

性,减少内源性 NO 生成,抑制血管扩张从而加重脑组织缺血缺氧,造成缺血再灌注后脑中氧化应激反应增加^[23]。此外,ROCK2 激活可以将肌球蛋白轻链酶(MLC)磷酸化而发生肌丝收缩作用,同时增加肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)磷酸化水平,从而使 MLCP 失活,间接促进 MLC 磷酸化从而促进平滑肌收缩介导血管收缩^[24]。因此,脑组织中 ROCK2 表达减少,微细血管扩张有利于调节局部脑组织血供,改善脑组织缺氧,减少氧化应激反应的同时减少脑中神经元凋亡^[25]。本研究中,脑缺血再灌注成功造成大鼠脑中 RhoA/ROCK2 表达活性增加,诱导氧化应激反应增加,此外 RhoA/ROCK2 介导凋亡相关蛋白表达升高,抗凋亡蛋白表达抑制,造成大鼠脑中神经元损伤。而大豆异黄酮有效抑制了脑中 ROCK2 蛋白表达,并逆转了凋亡相关蛋白表达增加。

综上所述,大豆异黄酮介导 RhoA/ROCK2 蛋白表达降低,逆转脑中缺血再灌注诱导的氧化应激反应,减少神经元凋亡,改善大鼠神经功能损伤。

参考文献(References)

- [1] 张双鹤,李春辉.老年脑卒中的康复治疗[J].实用老年医学,2019,(8): 738-740
- [2] Li J, Lv H, Che YQ. Upregulated microRNA-31 inhibits oxidative stress-induced neuronal injury through the JAK/STAT3 pathway by binding to PKD1 in mice with ischemic stroke [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3): 2414-2428
- [3] Shi X, Yu W, Yang T, et al. Panax notoginseng saponins provide neuroprotection by regulating NgR1/RhoA/Rock2 pathway expression, in vitro and in vivo[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 190: 301-312
- [4] Ding BJ, Ma WW, He LL, et al. Soybean isoflavone alleviates β -amyloid 1-42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll-like receptor 4 expression and nuclear factor- κ B activity in rats[J]. Int J Dev Neurosci, 2011, 29(5): 537-542
- [5] Yang Li, Haiyan Zhang. Soybean isoflavones ameliorate ischemic cardiomyopathy by activating Nrf2-mediated antioxidant responses [J]. Food Funct, 2017, 8(8): 2935-2044
- [6] 张珍,韩领,夏晓洋,等.大豆异黄酮神经保护作用的研究进展[J].中国食物与营养,2019,25(1): 53-57
- [7] Wang M, Wang J, Liu Z, et al. Effects of intermedin on autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neuropeptides, 2018, 68: 15-21
- [8] 常江,余华,张晓乐,等.甘草查尔酮 A 对局灶性脑缺血再灌注小鼠 Nrf2/HO-1 信号通路和神经炎症反应的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(12): 2256-2261
- [9] Christoph K, Felix F, Michael S. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [J]. Drug Des Dev Ther, 2015, 9: 3445-3454
- [10] Hiroshi Y, Tetsuro A, Takanari K, et al. NADPH Oxidase-Related Pathophysiology in Experimental Models of Stroke [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2123
- [11] Amantea D, Marrone M C, Nistico, et al. Oxidative stress in stroke pathophysiology validation of hydrogen peroxide metabolism as a pharmacological target to afford neuroprotection[J]. International Rev Neurobiol, 2009, 85(4): 363-374

- [12] Zhang YY, Zhang YP. lncRNA ZFAS1 Improves Neuronal Injury and Inhibits Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis by Sponging miR-582 and Upregulating NOS3 Expression in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury[J]. *Inflammation*, 2020
- [13] Michael M, Piotr G, Yong S, et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness[J]. *Prog Neuro-psycho*, 2011, 35(3): 676-692
- [14] 张思然, 李成檀, 杨怡, 等. 氧化应激、炎症和自噬在脑缺血损伤中的作用机制及治疗策略 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(8): 651-660
- [15] Sun CH, Pan LH, Yang J, et al. Protective effect of icaritin on focal cerebral ischemic-reperfusion mice [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2018, 10(1): 40-45
- [16] J K Akintunde, A A Farouk, O Mogbojuri, et al. Metabolic treatment of syndrome linked with Parkinson's disease and hypothalamus pituitary gonadal hormones by turmeric curcumin in Bisphenol-A induced neuro-testicular dysfunction of wistar rat[J]. *Biochem Biophys Rep*, 2019, 17: 97-107
- [17] 葛建彬, 卢红建, 宋新建, 等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抗氧化应激的机制研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33(9): 790-794
- [18] Monzo-Beltran L, Vazquez-Tarragón, Antonio, et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy 8-oxo-dG as a clinical marker[J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 389-402
- [19] Gonzalez J C C, Vazquez F J G, Rodriguez L E. Determination of apoptosis in actinic prurigo by TUNEL technique[J]. *Photodermatol Photo*, 2014, 31(2): 115-117
- [20] Wang L, Ren X, Guo W, et al. Oxidative Stress and Apoptosis of *Gaeumannomyces graminis* (Get) Induced by Carabrone [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67(37): 10448-10457
- [21] Herder C, Swiercz JM, Muller C, et al. ArhGEF18 regulates RhoA-Rock2 signaling to maintain neuro-epithelial apico-basal polarity and proliferation[J]. *Development*, 2013, 140(13): 2787-2797
- [22] Jiang CH, Wang YT, Jin QM, et al. Cyclocarya paliurus Triterpenoids Improve Diabetes-Induced Hepatic Inflammation via the Rho-Kinase-Dependent Pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 811
- [23] Takeshita N, Hasegawa M, Sasaki K, et al. In vivo expression and regulation of genes associated with vascularization during early response of sutures to tensile force [J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(1): 40-51
- [24] Ping, Chen, He, et al. Testosterone regulates myosin II isoforms expression and functional activity in the rat prostate [J]. *Prostate*, 2018, 78(16): 1283-1298
- [25] 李亚男, 陈志武, 郭岩. 映山红花总黄酮阻断 Rho 激酶促进大鼠血管舒张作用的机制研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 12: 1253-1357

(上接第 3332 页)

- [15] 艾克热木·玉苏甫, 王海江, 帕尔哈提·沙依木, 等. TFF1 和 TFF3 在结直肠癌中的表达与临床病理特点及预后的关系[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(6): 381-385
- [16] 宋尚晋, 顾允, 王怡超, 等. 基于 GEO 数据库的胃肠上皮化生相关基因与通路的生物信息学分析 [J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(10): 768-774
- [17] 杨青艳, 郑科武, 洪俊强. 结直肠癌患者血清 TFF3 及 TK1 水平及诊断价值研究[J]. *河北医药*, 2019, 41(6): 827-830
- [18] 郭文琦, 杨小娟, 贺巧艳. 三叶因子 3 与慢性肾脏病关系的研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(4): 8-10
- [19] 方琼蕾, 成兴波. 血清三叶因子 3 与 2 型糖尿病性视网膜病变的相关性[J]. *江苏医药*, 2016, 42(3): 287-289
- [20] 范琳玲, 叶红英, 王熠. APPL1 在糖尿病及其并发症中的作用[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2017, 37(3): 199-202
- [21] Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, et al. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(1): 177-185
- [22] Barbieri M, Marfella R, Esposito A, et al. Incretin treatment and atherosclerotic plaque stability: Role of adiponectin/APPL1 signaling pathway[J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31(2): 295-303
- [23] 刘爽, 邵滢, 吴灿, 等. 2 型糖尿病患者血清 APPL1 与尿白蛋白排泄率的相关性研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017, 33(10): 833-837
- [24] Daniele G, Guardado Mendoza R, Winnier D, et al. The inflammatory status score including IL-6, TNF- α , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus [J]. *Acta Diabetol*, 2014, 51(1): 123-131
- [25] Rodrigues KF, Pietrani NT, Bosco AA, et al. IL-6, TNF- α , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2017, 61(5): 438-446
- [26] 姚燕珍, 李翊卫, 鲍舟君, 等. 三叶因子 3 在糖尿病肾病中的研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19(2): 119-123
- [27] 彭鸿, 陈国忠, 方丽娇, 等. NF- κ B 基因沉默对入胃癌 SGC7901 细胞增殖影响及机制探讨 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(10): 92-95
- [28] 陈翠, 申铨. APPL1 与心血管疾病的研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2016, 36(11): 1672-1675
- [29] Rein J, Bader M. Renin-Angiotensin System in Diabetes [J]. *Protein Pept Lett*, 2017, 24(9): 833-840
- [30] Galan-Davila AK, Ryu J, Dong K, et al. Alternative splicing variant of the scaffold protein APPL1 suppresses hepatic adiponectin signaling and function[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(16): 6064-6074