

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.011

Nrf2 对缺氧 / 复氧诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体分裂的影响 *

黄 林¹ 刘茂东² 李 瑜² 王亚楠¹ 王士雷^{2Δ}

(1 青岛大学 山东 青岛 266003; 2 青岛大学附属医院麻醉科 山东 青岛 266555)

摘要 目的:通过体外模拟脑缺血再灌注损伤的细胞模型,探究核转录相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)与线粒体分裂是否存在调控关系。**方法:**通过三气培养箱和无糖培养基模拟氧糖剥夺 / 复氧 (Oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 的条件,将 OGD4 h、6 h、8 h 和 10 h 与 R0 h、6 h、12 h、18 h、24 h 多个时间点组合,通过 CCK8 试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK8) 检测细胞的存活率,最终以细胞凋亡明显但仍有半数存活的 OGD4 h/恢复 R18 h 为条件建立细胞 OGD/R 模型;用 Nrf2 激动剂叔丁基对苯二酚 (Tert-butylhydroquinone, tBHQ) 和抑制剂鸢尾素 (Brusatol, Bru) 对细胞进行干预处理;蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 法检测 Nrf2、动力相关蛋白 1 (Dynamin-related protein 1, Drp1) 的表达量;制备细胞沉淀的切片,通过电镜观察细胞内线粒体的形态。**结果:**OGD/R+tBHQ 组 Nrf2 蛋白的表达明显高于 OGD/R 组,且 OGD/R+tBHQ 组 Drp1 蛋白的表达则低于 OGD/R 组 ($P<0.05$),而 OGD/R+Bru 组 Nrf2 蛋白的表达低于 OGD/R 组,且 OGD/R+Bru 组 Drp1 蛋白的表达高于 OGD/R 组 ($P<0.05$);电镜观察结果显示 OGD/R+tBHQ 组线粒体分裂的程度和比例较 OGD/R 组有所减少,而在 OGD/R+Bru 组有增多 ($P<0.05$)。**结论:**Nrf2 对线粒体分裂有负向调控作用,可能机制是经由 Drp1 蛋白发挥作用。

关键词:Nrf2;线粒体分裂;Drp1;脑缺血再灌注损伤

中图分类号:R-33;R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)11-2056-05

Regulation of Nrf2 on the Mitochondrial Division of SH-SY5Y Cell under Ischemia-reperfusion Condition*

HUANG Lin¹, LIU Mao-dong², LI Yu², WANG Ya-nan¹, WANG Shi-lei^{2Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Faculty of Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China;

2 Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266555, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between Nrf2 and mitochondrial division by establishing a cell model of cerebral ischemia-reperfusion injury in vitro. **Methods:** A cell model of oxygen glucose deprivation/recovery was created by a three-gas incubator, sugar-free medium and normal medium. OGD4 h, 6 h, 8 h, and 10 h were matched with R0 h, 6 h, 12 h, 18 h, and 24 h to set up various time combinations. Then cell viability was determined by Cell Counting Kit-8 (CCK8 kit). Finally OGD4 h/R18 h under which condition cells showed obvious apoptosis but still had half of the survival. Tert-butylhydroquinone (tBHQ) and Brusatol (Bru) were chosen as the agonist and inhibitor respectively to deal with cells. Western blot was applied to measure the expression of proteins Nrf2 and Drp1. Meanwhile the morphology of mitochondria in the same batch of cells was observed by the electron microscopy. **Results:** Western blot showed that the expression of Nrf2 in OGD/R+tBHQ group was significantly higher than that in OGD/R group, and the expression of Drp1 in OGD/R+tBHQ group was lower than that in OGD/R group ($P<0.05$). Also the expression of Nrf2 in OGD/R+Bru group was lower than that in OGD/R group, and the expression of Drp1 in OGD/R+Bru group was higher than that in OGD/R group ($P<0.05$). The results of electron microscopy showed that the degree and proportion of mitochondrial division in the OGD/R+tBHQ group were decreased compared with the OGD/R group, but increased in the OGD/R+Bru group. **Conclusion:** Nrf2 may negatively regulate the mitochondrial division via Drp1.

Key words: Nrf2; Mitochondrial fission; Drp1; Cerebral ischemia reperfusion injury

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

Article ID: 1673-6273(2019)11-2056-05

前言

缺血性脑病(如脑卒中)是临床上的常见病,在恢复血供时

易引起脑组织的缺血再灌注损伤^[1],减轻脑缺血再灌注损伤 (Cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)对改善临床上缺血性脑病的预后具有重要意义。Nrf2 是内源性抗氧化应激的核转录

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81771415)

作者简介:黄林(1992-),硕士研究生,主要研究方向:麻醉与器官保护, E-mail: 794209186@qq.com

Δ 通讯作者:王士雷(1967-),博士生导师,教授,主要研究方向:脑保护, E-mail: wshlei@aliyun.com, 电话:18661806773

(收稿日期:2019-02-06 接受日期:2019-02-28)

因子,在CIRI时Nrf2转移到细胞核内和抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)结合^[2],可激活下游通路表达翻译超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)、血红素加氧酶1(Heme oxygenase-1,HO-1)和氧化还原酶-1(NAD(P)H oxidoreductase,NQO1)等发挥保护作用^[3]。有研究表明在大鼠大脑中动脉栓塞(Middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型中,侧脑室、腹腔内注射Nrf2激动剂tBHQ可以降低运动、感觉功能和缺血后的梗死面积^[4],但其具体保护机制尚未完全阐明。抑制线粒体分裂是近年来的干预CIRI的研究热点^[5,6],而其上游机制不甚清楚。本研究采用药物干预Nrf2并同时观察线粒体形态及相关蛋白表达以探究二者是否存在调节关系,以期治疗CIRI的提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y细胞)、肾上腺嗜铬细胞瘤(PC-12细胞)购自中科院上海细胞所;tBHQ购自河北亚信生物科技有限公司;Earle's平衡盐溶液(Earle's balanced salt solution,EBSS)、MEM/EBSS培养基(Minimum essential medium/Earle's balanced salt solution,MEM/EBSS)、F-12 HAM'S培养基(Ham's F-12 Nutrient Mix,F-12 HAM'S)和RPMI 1640培养基(RPMI Medium 1640CAS;RPMI 1640,1640)购自美国HyClone公司;胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)和0.25%胰酶购自美国Gibco公司;兔抗人Nrf2、鼠抗人Drp1蛋白和羊抗兔、羊抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)二抗购自英国Abcam公司;CCK8试剂盒购自上海七海复泰生物公司;鸭胆子苦醇、二喹啉甲酸(Bicinchoninic,BCA)蛋白定量试剂盒、RIPA组织/细胞裂解液(RIPA Lysis Buffer,RIPA)、WB转膜液、磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline,PBS)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel,PAGE)快速制备试剂盒(含钠十二烷基硫酸盐(Sodium dodecyl sulphate,SDS))购自上海雅酶生物科技有限公司;聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene difluoride,PVDF)膜和电化学发光(Electrochemiluminescence,ECL)化学发光试剂购自美国Millipore公司;鸭胆子苦醇和tBHQ用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)稀释,浓度分别为 $1 \times 10^5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,使用时用纯水梯度稀释再加入培养基中稀释,使得DMSO终浓度小于0.1%。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取对数生长期的SH-SY5Y细胞用含10%FBS、44%MEM/EBSS、44%F-12HAM'S、1%青霉素-链霉素(双抗)和1%丙酮酸钠($100 \times$)培养基,置于 37°C 、含5% CO_2 的细胞培养箱中无菌培养,每2~3天传代1次,镜下观察细胞贴壁达85%以上时,以0.25%胰蛋白酶消化传代;取对数生长期的PC-12细胞用含10%FBS和1%双抗的RPMI1640培养基,置于相同条件下培养,以同样标准处理。

1.2.2 细胞缺血再灌注损伤模型(OGD/R)的建立 查阅相关参考文献,确定常用的OGD/R模型的时间范围,选取缺血缺氧(OGD)4、6、8、10(h)和复灌(R)0、6、12、18、24(h)为实验时间点,排列组合后构成不同的OGD/R时间模型,将8000细胞接种于

96孔板中,稳定一天后,按不同的时间模型换不含糖的EBSS培养基并放入氧含量低于2%(5% CO_2 ,94% N_2)的环境中培养,在相应时间结束后,换成普通培养基并转移至正常含氧的培养箱中培养,待时间结束用CCK8试剂盒检测正常对照、空白对照和实验组的细胞存活率,描绘存活率曲线,选择细胞复灌后存活率下降最明显的时间点作为OGD/R模型的标准。

1.2.3 实验分组 采用随机数字表法分为6组(1)SH-SY5Y细胞正常组:正常培养,不作任何其他处理;(2)PC-12细胞正常组:正常培养,不作任何其他处理;(3)OGD/R组:SH-SY5Y细胞照前述处理OGD4h/R18h;(4)OGD/R+tBHQ组:SH-SY5Y细胞换含有tBHQ的正常培养基(终浓度 $25 \mu\text{M}$ ^[7])预处理4h,然后进行OGD/R操作;(5)OGD/R+Bru组:正常培养,换混有鸭胆子苦醇(Brusatol)的培养基(终浓度 100 nM ^[8])处理4h,然后进行OGD/R操作;(6)OGD/R+Veh组:细胞换含有DMAO的正常培养基(含量0.1%)预处理4h,然后进行OGD/R操作。

1.2.4 Western blot 检测 不同组的细胞在处理完后,用RIPA裂解细胞后离心,取上清液,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。在SDS-PAGE凝胶中,每个泳道加入 $20 \mu\text{g}$ 的蛋白样品, 80 V (30 min)及 110 V (1 h)电泳分离蛋白,电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1h,然后将条带分别加入Nrf2、Drp1和GAPDH一抗液中, 4°C 孵育过夜,吐温Tris盐缓冲液(Tween Tris buffered saline,TBST)洗膜3次($3 \times 15 \text{ min}$),二抗 37°C 孵育1h,TBST洗膜3次($3 \times 15 \text{ min}$),ECL显影。运用Image J软件分析目的蛋白条带与GAPDH灰度比值,计算相对表达比。

1.2.5 电镜观察线粒体形态 各组细胞处理完毕后,胰酶消化离心收集到米粒大小的细胞团,加入丙二醇 4°C 固定过夜,第二天送样,切片、制片后进行观察。

1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0和Graphpad prism7数据统计软件进行分析处理,计量数据均以表示,两组间差异比较采用t检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SH-SY5Y细胞和PC-12细胞中Nrf2、Drp1蛋白的表达

正常情况下,SH-SY5Y细胞和PC-12细胞中Nrf2蛋白的表达均适中,SH-SY5Y细胞中但Drp1蛋白表达较少,而PC-12细胞中Drp1蛋白表达相对较多,见图1。

2.2 tBHQ和Brusatol对SH-SY5Y细胞OGD/R模型Nrf2和Drp1表达的影响

tBHQ处理后,SH-SY5Y细胞中Nrf2的表达显著增加,同时Drp1的表达降低;Brusatol处理后,SH-SY5Y细胞中Nrf2的表达明显降低,Drp1的表达升高,见图2、图3。

2.3 tBHQ对SH-SY5Y细胞OGD/R模型线粒体形态的影响

加入tBHQ后,SH-SY5Y细胞中线粒体分裂相较未加药组减少;加入Brusatol后,细胞中线粒体分裂相较未加药组增加($P < 0.05$),见图4、图5。

3 讨论

脑卒中在致死、致残的疾病中排第二位^[9],而缺血性卒中的发病率在卒中中居首位^[10]。对于急性脑梗死的治疗,无论是机

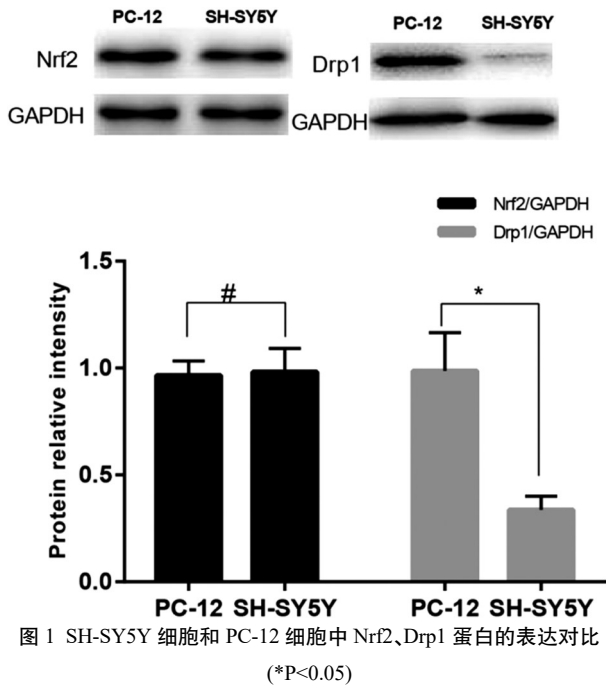


图1 SH-SY5Y 细胞和 PC-12 细胞中 Nrf2、Drp1 蛋白的表达对比 (*P<0.05)

Fig.1 Comparison of the protein expression of Nrf2 and Drp1 in the PC-12 and SH-SY5Y cell lines (*P<0.05)

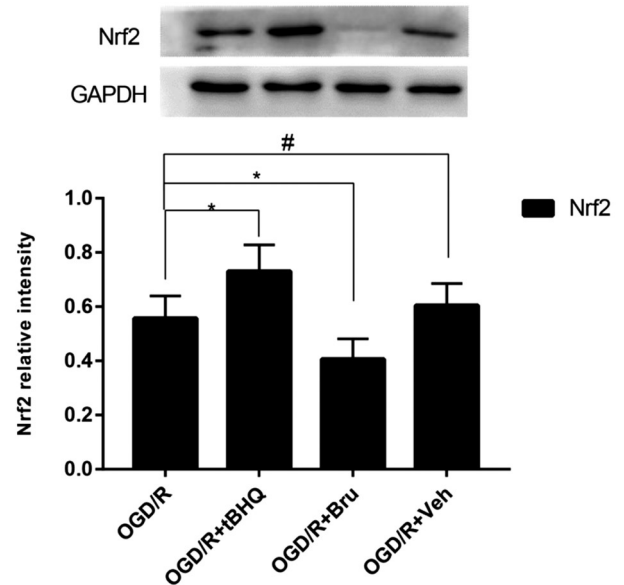


图2 tBHQ 和 Brusatol 处理对 SH-SY5Y 细胞 Nrf2 蛋白表达的影响 (*P<0.05)

Fig.2 Effect of tBHQ or Brusatol treatment on the protein expression of Nrf2 in the SH-SY5Y cell line (*P<0.05)

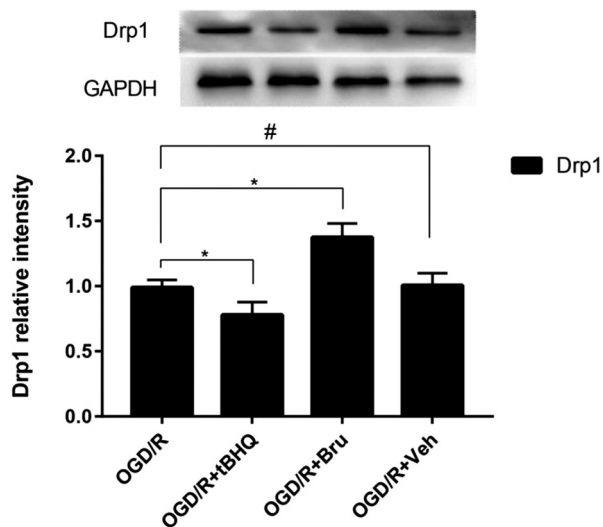


图3 tBHQ 和 Brusatol 处理对 SH-SY5Y 细胞 Drp1 蛋白表达的影响 (*P<0.05)

Fig.3 Effect of tBHQ or Brusatol treatment on the protein expression of Drp1 in the SH-SY5Y cell line (*P<0.05)

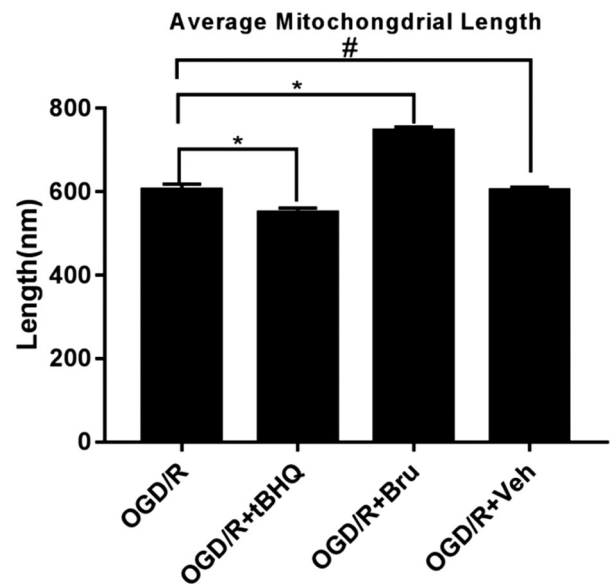


图4 电镜下不同组别的线粒体长度统计表(n=20)

Fig.4 Comparison of the mitochondrial average length in different groups (n=20)

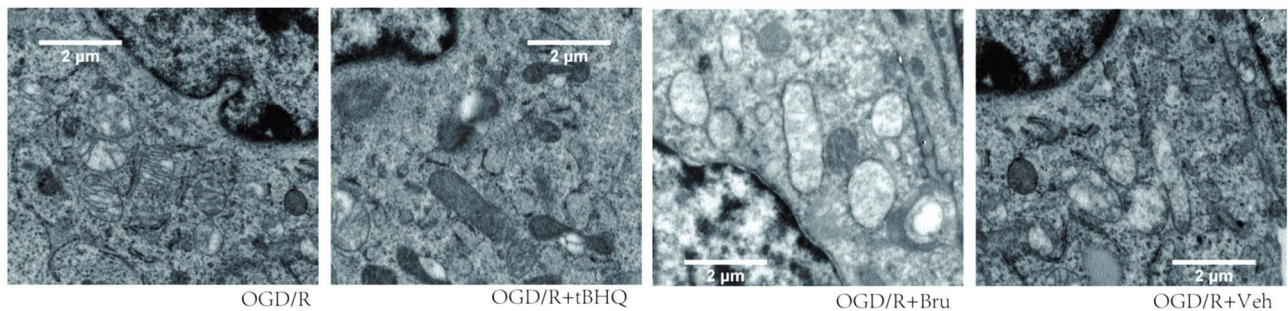


图5 电镜下不同组别的线粒体形态对比典型图

Fig.5 Comparison of mitochondrial morphology in different groups under electron microscope

械取栓还是药物溶栓,其治疗目的都是恢复灌注,但由此又可能会诱发脑缺血再灌注损伤,因此缺血性卒中的治疗策略为恢

复缺血组织灌注的同时尽可能减少缺血再灌注损伤。目前研究认为缺血再灌注损伤的重要发病环节与自由基损伤、细胞内钙

超载、白细胞与微血管障碍有关^[11]。

自由基的主要来源之一是线粒体电子传递链,钙超载又与线粒体障碍互为因果。缺血时,细胞 ATP 减少, Ca^{2+} 进入线粒体增多,细胞色素氧化酶系统功能失调,电子传递链受损,以致进入细胞内的氧经单电子还原而形成的活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多,加上 Ca^{2+} 本身也会影响 ROS 的清除,进一步加重了 ROS 的蓄积;灌注时 PH 恢复、 Ca^{2+} 浓度升高及 ROS 激活了线粒体的渗透性钙转运孔道 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的开放,大量 Ca^{2+} 进入线粒体,线粒体内钙超载,消耗大量 ATP 并影响其生成,使细胞总体能量供应下降,线粒体离子稳态破坏,引起线粒体、细胞肿胀,细胞坏死^[12]。线粒体不仅细胞内的能量工厂还是感受细胞变化做出相应调整的感受器、效应器^[13]。在缺血再灌注损伤中,线粒体动力学变化贯穿始终^[14]。线粒体分裂增加预示着细胞损伤加重^[15],而线粒体片段化成为细胞凋亡的先兆^[16]。Drp1 是线粒体分裂动力蛋白,它可以被锚定于线粒体外膜上的线粒体分裂 1 蛋白(mitochondrial 1 protein, Fis1) 招募到线粒体表面从而使线粒体分裂^[17],既往研究表明 Drp1 在缺血再灌注损伤引起的线粒体分裂中变化显著^[18]。更多研究显示通过干预 Drp1 可以有效抑制线粒体分裂并减轻脑缺血再灌注损伤^[19-21],提示 Drp1 在 CIRI 引起的线粒体变化中起关键性作用^[22]。

Nrf2 信号通路作为机体抵抗氧化应激的最重要经典途径之一被广泛研究^[23,24]。一般认为,基础状态下 Nrf2 已有足量表达,但大部分 Nrf2 被胞质伴侣蛋白(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 介导的泛素化途径所降解;ROS 增多时,Keap1 构象改变,Nrf2 脱落进入细胞核,发挥转录活性^[25]。针对该通路的干预靶点也被广泛研究,但仍有下游机制不清的问题存在。鉴于该信号通路和线粒体存在着作用交叉,已有研究试图探寻二者之间关系,但都是经由与二者共同相关的分子,例如 HO-1 和 P62 等^[26],也有研究提示二者之间可能经由作用于 Drp1 的蛋白酶体有着更为直接的作用关系^[27]。本研究通过直接的激动剂与抑制剂探寻 Nrf2 信号通路和线粒体分裂在脑缺血再灌注损伤中的联动关系。

本实验预选常用的两种神经细胞模型细胞系:PC-12 和 SH-SY5Y,我们以目标蛋白 Nrf2 和 Drp1 表达作为参考,最终选取 SH-SY5Y 细胞系作为实验细胞系。为了更好地建立缺血再灌注损伤模型,经文献检索查到 SH-SY5Y 细胞系建立缺血再灌注损伤的常用模型,然而,各文献中缺血缺氧和复氧处理的时间并不一致^[28-31],因此如前文所述建立不同时间点的模型进行观察,最终选定 OGD4h/R18h 作为实验模型的条件。结果显示 Nrf2 蛋白和 Drp1 蛋白呈现明显联动变化,即 Nrf2 蛋白增多时 Drp1 蛋白减少,反之亦然,相应线粒体的变化也相符,由此我们推测 Nrf2 可能经由 Drp1 蛋白对线粒体的形态变化起到调控作用。

综上所述,本研究结果表明 Nrf2 对线粒体分裂有负向调控作用,可能机制通过调控 Drp1 蛋白影响线粒体分裂,也可能同时伴随信号通路中多种其他蛋白的参与,具体相互直接作用机制仍待进一步研究,以期为寻找脑缺血再灌注损伤治疗靶点提供更多的理论依据。

参考文献(References)

- [1] 毕伟. 针对缺血再灌注损伤发展新的治疗策略探索性实验研究[D]. 郑州大学外科学, 2014
- [2] Zhang F, Wang S, Zhang M, et al. Pharmacological induction of heme oxygenase-1 by a triterpenoid protects neurons against ischemic injury [J]. *Stroke*, 2012, 43(5): 1390-1397
- [3] 吴国振. 天然产物 Britanin 的靶标发现及神经保护作用研究[D]. 第二军医大学, 2017
- [4] 杨杨. 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠行为学及神经血管再生机制的研究[D]. 北京协和医学院, 2016
- [5] Anzell A R, Maizy R, Przyklenk K, et al. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2547-2564
- [6] Sharp W W, Fang Y H, Han M, et al. Dynamin-related protein1 (Drp1) -mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission[J]. *FASEB J*, 2014, 28(1): 316-326
- [7] Ye F, Li X, Li L, et al. t-BHQ Provides Protection against Lead Neurotoxicity via Nrf2/HO-1 Pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 2075915
- [8] Sun X, Wang Q, Wang Y, et al. Brusatol Enhances the Radiosensitivity of A549 Cells by Promoting ROS Production and Enhancing DNA Damage[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 997-1000
- [9] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1459-1544
- [10] 孙海欣, 王文志. 中国 60 万人群脑血管病流行病学抽样调查报告 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2018, 18(02): 83-88
- [11] Inserte J, Barrabé s JA, Hernando V, et al. Orphan targets for reperfusion injury[J]. *Cardiovasc. Res*, 2009, 83(2): 169-178
- [12] Perrelli M G, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species[J]. *World J Cardiol*, 2011, 3(6): 186-200
- [13] Anzell A R, Maizy R, Przyklenk K, et al. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2547-2564
- [14] Sanderson T H, Raghunayakula S, Kunar R. Neuronal hypoxia disrupts mitochondrial fusion[J]. *Neuroscience*, 2015, 301: 71-78
- [15] Flippo K H, Strack S. Mitochondrial dynamics in neuronal injury, development and plasticity[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(4): 671-681
- [16] Kumar R, Bukowski M J, Wider J M, et al. Mitochondrial Dynamics Following Global Cerebral Ischemia[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 76: 68-75
- [17] 黄凯欣, 熊艳, 郑乐藏, 等. 线粒体融合与分裂的分子机制及相关疾病的研究进展[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2019, 40(02): 333-337
- [18] Manechote C, Palee S, Chattipakorn S C, et al. Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 2643-2653
- [19] Yang X, Wang H, Ni H M, et al. Inhibition of Drp1 protects against senecionine-induced mitochondria-mediated apoptosis in primary hepatocytes and in mice[J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 264-273

- [20] 张宁, 王士雷, 李淑虹, 等. 线粒体分裂蛋白抑制剂在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用及其机制(英文)[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(18): 3410-3414
- [21] 刘铮, 刘振华, 贾敏, 等. 动力相关蛋白 1 抑制剂减轻糖尿病小鼠心肌缺血 / 再灌注损伤[J]. 心脏杂志, 2018, 30(04): 378-382
- [22] 陈慧娟, 刘金东. 线粒体动力相关蛋白 Drp1 与心肌缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2016, 47(05): 369-374
- [23] Tebay L E, Robertson H, Durant S T, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(00): 108-146
- [24] Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress[J]. J Biol Chem, 2017, 292(41): 16817-16824
- [25] 王朝阳, 荆黎. 核转录因子 E2 相关因子 2 和 Keap1 的分子结构和功能及其信号通路调控分子机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(05): 598-604
- [26] Itoh K, Ye P, Matsumiya T, et al. Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria [J]. J Clin Biochem Nutr, 2015, 56(2): 91-97
- [27] Sabouny R, Erik F, Michèle G, et al. The Keap1-Nrf2 Stress Response Pathway Promotes Mitochondrial Hyperfusion Through Degradation of the Mitochondrial Fission Protein Drp1 [J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2017, 27(18): 254-299
- [28] Shi A, Xiang J, He F, et al. The Phenolic Components of *Gastrodia elata* improve Prognosis in Rats after Cerebral Ischemia/Reperfusion by Enhancing the Endogenous Antioxidant Mechanisms[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7642158
- [29] Xiao B, Chai Y, Lv S, et al. Endothelial cell-derived exosomes protect SH-SY5Y nerve cells against ischemia/reperfusion injury[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(4): 1201-1209
- [30] Chen B, Wu Z, Xu J, et al. Calreticulin Binds to Fas Ligand and Inhibits Neuronal Cell Apoptosis Induced by Ischemia-Reperfusion Injury [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 895284
- [31] Jiang M, Li J, Peng Q, et al. Neuroprotective effects of bilobalide on cerebral ischemia and reperfusion injury are associated with inhibition of pro-inflammatory mediator production and down-regulation of JNK1/2 and p38 MAPK activation [J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 167

(上接第 2080 页)

- [19] Zhu C, Kim K, Wang X, et al. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(468): 10(468)
- [20] Zhang QD, Xu MY, Cai XB, et al. Myofibroblastic transformation of rat hepatic stellate cells: the role of Notch signaling and epithelial-mesenchymal transition regulation [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(21): 4130-4138
- [21] Zhang K, Han X, Zhang Z, et al. The liver-enriched Inc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 144
- [22] Yang C, Lu W, Lin T, et al. Activation of liver FGF21 in hepatocarcinogenesis and during hepatic stress[J]. BMC Gastroenterol, 2013, 13: 67
- [23] Dushay, Chui PC, Gopalakrishnan GS, et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2010, 139(2): 456-463
- [24] Xu P, Zhang Y, Wang W, et al. Long-term administration of fibroblast growth factor 21 prevents chemically-induced hepatocarcinogenesis in mice[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(10): 3032-3043
- [25] Lee KJ, Jang YO, Cha SK, et al. Expression of Fibroblast Growth Factor 21 and β -Klotho Regulates Hepatic Fibrosis through the Nuclear Factor- κ B and c-Jun N-Terminal Kinase Pathways [J]. Gut Liver, 2018, 12(4): 449-456
- [26] So J, Khaliq M, Evason K, et al. Wnt/ β -catenin signaling controls intrahepatic biliary network formation in zebrafish by regulating notch activity[J]. Hepatology, 2018, 67(6): 2352-2366
- [27] Wang Y, Shen RW, Han B, et al. Notch signaling mediated by TGF- β /Smad pathway in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(13): 2330-2336
- [28] Yi-Xiong Chen, Zhi-Hong Weng, Shu-Ling Zhang. Notch3 regulates the activation of hepatic stellate cells[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(12): 1397-403