

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.02.004

连翘酯苷 A 通过 Akt/Nrf2 信号通路发挥抗脑缺血氧化损伤作用研究 *

马忠英 张 迪 孙 金 牛 静 任 茜 吴倩雯 王婧雯[△]

(空军军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究连翘酯苷 A(Forsythiaside A, FA)对缺血再灌注引起的脑细胞损伤的保护作用及机制。**方法:**采用 PC12 细胞缺氧再复氧模型(OGD/R),细胞分组为正常组,模型组,FA 处理组(1.25, 2.5 和 5 $\mu\text{mol/L}$),测定细胞存活率、凋亡率、ROS、MDA 以及抗氧化酶水平。采用 Western blotting 测定对 Akt 和 Nrf2 蛋白的影响,采用 Akt 抑制 LY294002 验证 FA 的调节作用。**结果:**FA 能够有效抑制 OGD/R 引起的存活率下降和凋亡率增加,同时可以抑制细胞内 ROS 和 MDA 水平,升高细胞内抗氧化酶(SOD、GSH、GSH-Px 和 CAT)水平。FA 处理能够增加 Akt 磷酸化水平以及 Nrf2 及其下游蛋白 HO-1 蛋白表达。进一步采用 LY294002 验证发现 FA 通过 Akt 调控 Nrf2 发挥抗氧化作用从而抑制脑细胞损伤。**结论:**FA 能够抑制缺血再灌注引起的脑细胞损伤,其作用机制可能是通过促进 Akt 磷酸化,调控 Nrf2 下游抗氧化酶表达,抑制氧化应激,从而保护脑细胞。

关键词:连翘酯苷 A;脑缺血;氧化损伤;Akt/Nrf2

中图分类号:R-33;R743;R285.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)02-214-05

Forsythiaside A Inhibited Cerebral Ischemic Induced Oxidative Damage through Akt/Nrf2 Signaling Pathway*

MA Zhong-ying, ZHANG Di, SUN Jin, NIU Jing, REN Qian, WU Qian-wen, WANG Jing-wen[△]

(Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the protective effect and mechanism of forsythiaside A (FA) on brain cell damage caused by ischemia/reperfusion. **Methods:** Oxygen Glucose Deprivation/reoxygenation (OGD/R) model was induced in PC12 cell and divided into normal group, model group, and FA treatment group (1.25, 2.5, and 5 $\mu\text{mol/L}$). Cell survival rate, apoptosis rate, ROS, MDA and antioxidant enzyme levels were measured. Western blotting was used to determine the effect of FA on Akt and Nrf2, and Akt inhibition of LY294002 was used to verify the regulation effects of FA. **Results:** FA inhibited the decline of survival rate and the increase of apoptosis rate caused by OGD/R. We also found that FA inhibited the levels of ROS and MDA, and increased the antioxidant proteins (SOD, GSH, GSH-Px and CAT). FA treatment increased the phosphorylation level of Akt and the expression of Nrf2 and its downstream protein HO-1. Further verification using LY294002 found that FA regulated Nrf2 through Akt to inhibit oxidative induced brain cell damages. **Conclusion:** FA can inhibit brain cell damage caused by ischemia/reperfusion, and its mechanism may be through promoting Akt phosphorylation, regulating the expression of Nrf2 and its downstream antioxidant enzymes, thus inhibits oxidative stress and protects brain cells.

Key words: Forsythiaside A; Cerebral ischemia; Oxidative damage; Akt / Nrf2

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)02-214-05

前言

连翘酯苷是中药连翘中主要的苯乙醇苷类化合物,是连翘中的特征性成分,在抵抗细菌感染、抗病毒、抑制炎症反应等方面发挥重要作用^[1]。近年来,研究发现,连翘脂苷具有很好的抗氧化作用。在 D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型中,研究者们发现连翘酯苷可有效增加组织中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量,增强机体总抗氧化能力(T-AOC),抑制丙二醛(MDA)含量,表现出很好的抗氧化能力^[2]。

同时,曲欢欢采用 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH)在体外测定了连翘酯苷的清除自由基能力,发现连翘酯苷的清除自由基能力是维生素 C 的 1.7 倍^[3]。这些证据表明,连翘酯苷具有优良的抗氧化能力,是潜在的抗氧化剂。

脑卒中(Stroke)是由于血管闭塞或者出血引起的一类脑血管事件,包括出血性脑卒中和缺血性脑卒中,其中缺血性脑卒中占有所有病例的 80%左右,是我国首要的致死和致残因素^[4,5]。目前,治疗缺血性脑卒中的主要治疗手段是溶栓治疗,但及其

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81774190)

作者简介:马忠英(1978-),女,主管药师,主要研究方向:中药药效物质和作用机制研究, E-mail: mazhongying7@163.com

[△] 通讯作者:王婧雯(1979-),女,副主任药师,主要研究方向:中药药效物质和作用机制研究, E-mail: wangjingwen8021@163.com

(收稿日期:2020-05-25 接受日期:2020-06-21)

严苛的时间窗限制使患者受益率很低^[6]。超时间窗用药虽然可以达到一定的治疗效果但易引起再灌注损伤,但再灌注同时会引起氧自由基爆发,触发多种级联放大反应,最终导致脑组织损伤^[7,8]。因此,减轻氧化损伤,阻断级联反应,对于治疗缺血性脑卒中具有积极意义。

为了研究连翘酯苷的抗氧化作用是否对于减轻缺血性脑卒中具有保护作用,本研究在体外采用 PC12 脑神经元细胞缺氧/再复氧模型模拟脑缺血/再灌注过程,研究连翘酯苷的作用,并在此基础上阐明其主要的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药物和试剂

连翘酯苷 A (Forsythiaside A, FA) 购自北京索莱宝科技有限公司 (SF8080), 胎牛血清 (FBS) 购自美国 GIBICO 公司 (16000-048), DMEM 培养基购自美国 GIBICO 公司 (11965-084), 胰蛋白酶购自美国 GIBICO 公司 (25300-054), SOD、GSH、CAT 和 GSH-Px 测定试剂盒购自南京建成生物科技公司, 凝胶配制试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司, 活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, P-Akt, Akt, Nrf2, HO-1, NQO-1 兔抗大鼠一抗购自美国 SANTA 公司, 羊抗兔二抗购自博士德公司。

1.3 仪器

凝胶电泳系统和化学发光系统 (美国 Bio-Rad 公司), 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司), 全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 采用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 PC12 细胞, 放置于 CO₂ 培养箱, 温度为 37℃, 每隔一天换一次培养基, 细胞融合至 90% 时, 进行传代培养, 待细胞进入对数期生长时, 用于后续实验研究。实验分组: 正常组 (Control, 正常条件培养), 模型组 (Model, 缺氧再复氧培养), 给药组 (1.25, 2.5 和 5 μmol/L, 细胞预处理 24 h 后, 进行缺氧再复氧)。

1.4.2 缺氧再复氧模型 (OGD/R) 根据实验目的将细胞接种于 96 孔板或者 6 孔板中, 在正常条件下培养 24 h, 细胞贴壁且状态较好时, 用药物预处理细胞 24 h, 模型组采用相同培养基处理。将培养基吸弃, 换成缺血液, 在含 95% CO₂ 的缺血小室中培养 4 h (缺氧), 随后模型组换成正常培养基, 药物处理组换成含药培养基, 继续培养 12 h (再复氧), 收集上清液或者细胞用于后续实验。

1.4.3 细胞存活率测定 细胞以 1×10⁴/mL 的密度接种于 96 孔板, 每组设置 5 个复孔, 2 个调零孔, 每孔 100 μL, 培养 24 h 后进行药物处理和 OGD/R, 再复氧结束后, 吸弃培养基, 加入 100 μL 稀释后的 CCK8 溶液, 培养箱中继续培养 3 h。最后, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值。细胞存活率 (%) = [(OD 测定 - OD 测定调零) / (OD 正常 - OD 正常调零)] × 100%。

1.4.4 细胞凋亡率测定 细胞凋亡率采用流式 Annexin-FITC /PI 双染法测定。细胞以 5×10⁵/mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔

1.5 mL, 培养 24 h 后进行药物处理和 OGD/R, 再复氧结束后, 吸弃培养基, 胰酶消化收集细胞。加入 100 μL 的 1× Binding buffer 吹散细胞, 加入 5 μL Annexin-FITC 溶液和 5 μL PI 溶液, 混合均匀, 避光孵育 15 min, 补充 400 μL 的 1× Binding buffer, 吹打均匀, 上机测定。

1.4.5 ROS 水平测定 细胞接种于 6 孔板, 细胞经过药物和造模处理后, 胰酶消化, 离心收集细胞。ROS 检测试剂盒中的染料 DCFH-DA 采用无血清培养基细胞室 1000 倍为工作液, 用 DCFH-DA 工作液悬浮细胞, 吹打均匀, 放置于 37℃ 培养箱孵育 20 min, 每 5 min 混匀一次。孵育完成后, 采用 PBS 清洗细胞三次, 去除未结合的 DCFH-DA 溶剂, 用荧光酶标仪测定荧光度值, 计算与正常组荧光度值的比值。

1.4.6 抗氧化酶水平测定 细胞经过药物和 OGD/R 处理后, 收集细胞, 用裂解液充分裂解, 4℃, 12000×g, 离心 10 min, 收集上清液用于测定。SOD、GSH、CAT 和 GSH-Px 含量分别按照 SOD、GSH、CAT 和 GSH-Px 试剂盒说明书进行操作。MDA 含量采用 MDA 测定试剂盒测定。采用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值, 计算每组的酶活力或者含量。

1.4.7 Western blotting 细胞经过药物和 OGD/R 处理后, 收集细胞, 用裂解液充分裂解, 离心收集总蛋白, 用 BCA 蛋白含量测定试剂盒测定每组的蛋白质含量。样品经金属浴变性后, 每孔上样 30 μg, 10% SDS-PAGE 电泳分离, 湿法转膜至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, TBST 洗净后, 孵育一抗 (1:1000 一抗稀释液稀释), 4℃ 过夜。TBST 洗净后, 孵育羊抗兔二抗 (1:5000 稀释), 37℃, 1 h。TBST 洗净残余二抗后, ECL 发光液进行显色, 扫描灰度值, 计算与正常组的比值。内参蛋白为 GAPDH。

1.4.8 数据处理 所有数据采用 Graphpad Prism 9.0 处理, 用均值±标准差 (mean±SD) 表示, 各组间的比较采用单因素方差分析检验, P<0.05 表明差异具有显著性。

2 结果

2.1 FA 对细胞存活率和凋亡率的影响

如图 1A 所示, 与正常组比较, OGD/R 引起细胞存活率显著下降 (P<0.01), 表明 OGD/R 可引起细胞增殖抑制; 与模型组比较, FA 可显著增加细胞存活率, 且呈现剂量依赖关系 (P<0.01), 表明 FA 可降低 OGD/R 对细胞的损伤作用。

如图 1B 所示, OGD/R 使模型组细胞凋亡率显著增加, 与正常组比较具有显著性差异 (P<0.01), 表明 OGD/R 可引起细胞凋亡; 而 FA 可显著降低细胞凋亡率 (P<0.01), 5 μmol/L 干预效果最好, 表明 FA 可抑制细胞凋亡。

2.2 FA 对 ROS 和 MDA 水平的影响

如图 2 所示, OGD/R 引起细胞内 ROS (图 2A) 和 MDA (图 2B) 水平增高, 且与正常组比较具有显著性差异, 表明 OGD/R 引起细胞内氧化损伤。与模型组比较, FA 使 ROS 和 MDA 水平均显著降低, 具有浓度依赖关系, 表明 FA 能够有效的减轻 OGD/R 引起的氧化损伤。

2.3 FA 对抗氧化酶水平的影响

随后, 我们测定了 FA 对细胞内抗氧化酶水平的影响。细胞内 SOD、GSH、CAT 和 GSH-Px 的含量采用试剂盒测定。如

图3所示,模型组细胞内SOD、GSH、CAT和GSH-Px的含量均显著降低,且与正常组比较具有显著性差异($P<0.01$),表明OGD/R引起细胞内抗氧化酶耗竭。而FA处理组,SOD、GSH、

CAT和GSH-Px的含量显著增加,与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$),表明FA能够调节细胞内抗氧化酶水平。

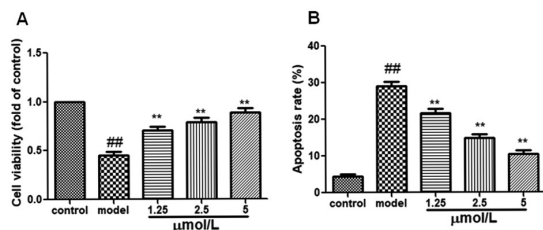


图1 FA减轻OGD/R引起的细胞损伤

A.FA对细胞存活率的影响;B.FA对细胞凋亡率的影响。n=6。^{##} $P<0.01$ vs control group, ^{**} $P<0.01$ vs model group.

Fig.1 Effects of FA on OGD/R induced cell injuries

A. Effects of FA on cell viability; B. Effects of FA on cell apoptosis.n=6.

^{##} $P<0.01$ vs control group, ^{**} $P<0.01$ vs model group.

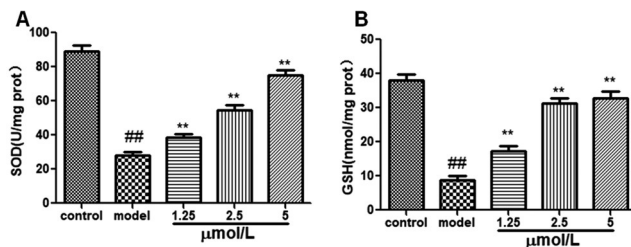


图3 FA对PC12细胞内抗氧化酶水平的影响

A.FA对PC12内SOD含量的影响;B.FA对PC12细胞内GSH含量的影响;C.FA对PC12细胞内CAT含量的影响;D.FA对PC12细胞内GSH-Px含量的影响。n=6。^{##} $P<0.01$ vs control group, ^{**} $P<0.01$ vs model group.

Fig.3 Effects of FA on the antioxidant proteins levels in PC12 cells

A. Effects of FA on the SOD contents; B. Effects of FA on the GSH contents; C. Effects of FA on the CAT contents; D. Effects of FA on the GSH-Px contents.n=6.^{##} $P<0.01$ vs control group, ^{**} $P<0.01$ vs model group.

2.4 FA对Akt/Nrf2通路的影响

Akt/Nrf2信号通路在调控抗氧化酶表达过程中具有重要作用,因此,我们测定了FA对该通路的影响。Western blotting测定了Akt的磷酸化水平,以及Nrf2及其下游HO-1蛋白表达情况(图4)。结果发现,OGD/R使Akt的磷酸化水平显著降低($P<0.01$),Nrf2和HO-1表达有一定程度增加,但差异不明显。FA处理组,Akt磷酸化水平(图4A)以及Nrf2和HO-1蛋白表达水平显著增加(图4B),且与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$),表明FA可调控Akt/Nrf2/HO-1信号通路。

2.5 FA通过Akt调控Nrf2发挥抗氧化作用

为验证FA是否通过Akt调控Nrf2发挥抗氧化作用,采用Akt的特异性抑制剂LY294002抑制Akt的磷酸化水平。结果发现(图5),与FA处理组比较,FA+LY294002处理组,Nrf2和HO-1的蛋白表达水平被显著抑制(图5A),同时,我们还发现,LY294002使FA对ROS的清除能力减弱(图5B),失去对细胞的保护作用(图5C)。

3 讨论

脑组织对氧气极其敏感,脑组织重量虽然只占机体重量的2%,但其耗氧量高达20%,是对氧气最敏感的器官^[9]。高血压、高血脂等慢性疾病引起血栓形成,继而引起血管栓塞,造成组织缺血,缺血不仅造成营养物质不能到达组织细胞,还造成氧

气供应下降甚至是中断。脑组织血流量大,但存储很少,缺血后,脑组织中的氧气和葡萄糖等物质迅速减少,导致严重的脑组织损伤,轻者致残,重者致死^[10]。目前,临床治疗缺血性脑卒中主要手段为血管内溶栓治疗,在0-4.5 h内有效溶栓,能够有效的减轻脑缺血性损伤,患者预后也较好^[11,12]。但由于患者发现较晚,就诊时间较长等因素,绝大部分患者能够溶栓治疗时已严重超出时间窗,超时间窗溶栓虽然能够取得一定的治疗效果,但会引起再灌注损伤,简称脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia/reperfusion injury, CI/RI)^[13]。引起CI/RI的机制包括氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、炎症、凋亡等,其中氧化应激是主要的始发环节^[14,15]。如何减轻氧化应激,阻断脑损伤的级联反应,是广大医药研究者关注的热点和重点方向。

在正常情况下,95%的ROS(例如超氧阴离子和过氧化氢)是线粒体通过氧化磷酸化反应产生ATP的副产物,缺血会导致线粒体膜电位失衡和离子梯度异常,使产生的ROS过多^[16]。ROS可导致线粒体DNA受损,破坏线粒体呼吸链,加剧线粒体能量障碍,使脑细胞供能不足,加速脑组织损伤^[17]。此外,脑组织中脂质含量较高,ROS可导致脂质发生氧化,产生MDA^[18]。细胞OGD/R模型采用不含血清和葡萄糖等物质的缺血和缺氧环境模拟缺血过程,恢复葡萄糖和氧气供应为再灌注过程,可有效模拟缺血再灌注过程,研究药物对细胞的直接保护作用。虽然前期研究表明,连翘酯苷具有抗氧化作用,能够有效保

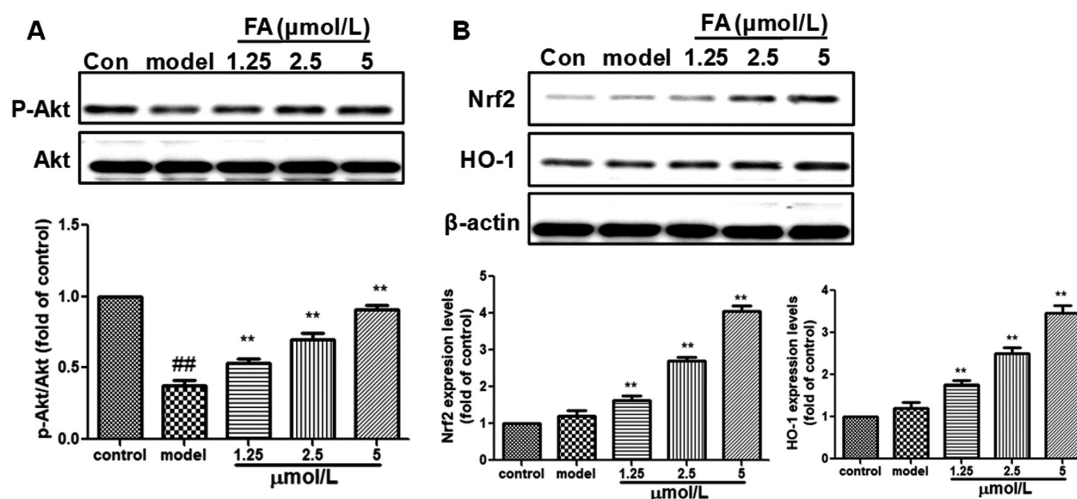


图4 FA对Akt, Nrf2和HO-1的影响

A. FA对Akt磷酸化水平的影响; B. FA对Nrf2和HO-1蛋白表达的影响。n=6。## $P<0.01$ vs control group, ** $P<0.01$ vs model group.

Fig.4 Effects of FA on the expression of Akt, Nrf2 and HO-1

A. Effects of FA on the phosphorylation level of Akt; B. Effects of FA on the expression levels of Nrf2 and HO-1. n=6. ## $P<0.01$ vs control group, ** $P<0.01$ vs model group.

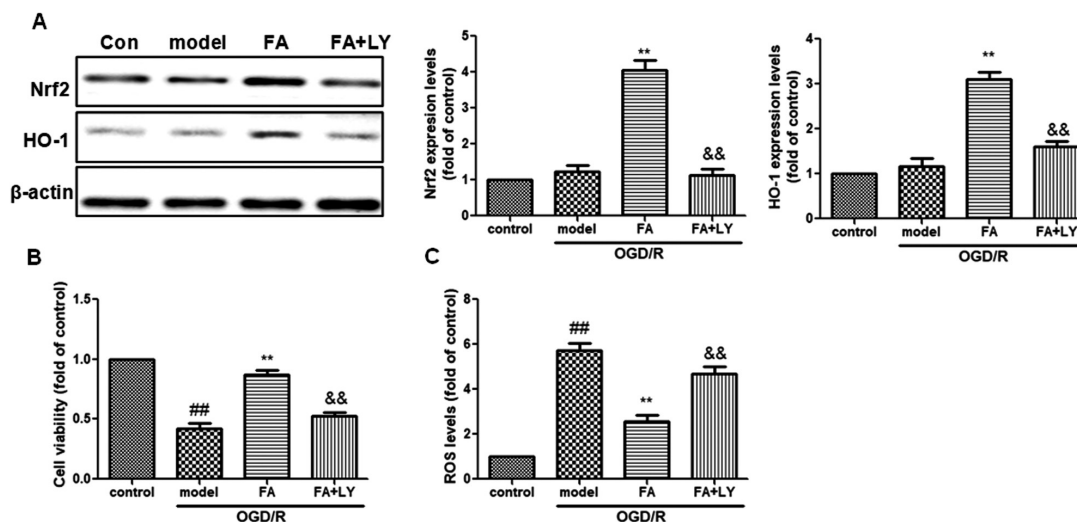


图5 FA通过Akt调控Nrf2发挥抗氧化作用

A. LY294002对FA促Nrf2和HO-1表达作用的影响; B. LY294002减弱FA的细胞存活率保护作用; C. LY294002减弱FA对ROS的抑制作用。n=6。## $P<0.01$ vs control group, ** $P<0.01$ vs model group, && $P<0.01$ vs FA group.

Fig.5 The antioxidative effects of FA was mediated by Akt through Nrf2

A. Effects of LY294002 and FA on the expression levels of Nrf2 and HO-1; B. Effects of LY294002 and FA on the cell viability; C. Effects of LY294002 and FA on the ROS levels. n=6. ## $P<0.01$ vs control group, ** $P<0.01$ vs model group, && $P<0.01$ vs FA group.

护脑损伤,但其是否能够减轻脑缺血引起的氧化应激,从而减轻CI/RI,还没有研究报道。本研究采用PC12体外OGD/R模型模拟在体CI/RI,研究了FA的脑保护作用。结果发现,OGD/R可引起PC12细胞存活率显著下降,凋亡率显著增加,同时脑细胞内ROS和MDA水平显著增加,而与模型组比较,FA处理组细胞存活率增加,凋亡率降低,ROS和MDA水平同样得到有效抑制。这些结果表明,FA可有效减轻OGD/R引起的细胞损伤和氧化应激。

正常情况下,脑组织中的抗氧化酶和氧自由基水平处于动态平衡状态,缺血再灌注时,ROS爆发性增加,消耗过多的抗氧化酶,致使抗氧化酶不足,从而导致氧化应激^[19]。因此,增加抗氧化酶水平将能够有效清除ROS,减轻氧化应激引起的损伤。SOD、GSH、CAT和GSH-Px是细胞内主要的抗氧化酶,SOD

可以将细胞内超氧阴离子转化为 H_2O_2 ,随后形成的 H_2O_2 被CAT和GSH-Px通过酶促反应清除^[20]。CAT是一种位于过氧化物酶体中的酶,可非常有效地促进 H_2O_2 向 H_2O 和 O_2 的转化^[21]。GSH-Px与GSH协同作用,后者以高浓度存在于细胞中,GSH-Px将过氧化物分解为水,同时氧化GSH^[22,23]。本研究测定了PC12细胞内SOD、GSH、CAT和GSH-Px含量,结果发现,OGD/R使SOD、GSH、CAT和GSH-Px含量显著降低,而FA处理可使SOD、GSH、CAT和GSH-Px含量显著增加,表明FA可有效增加抗氧化酶含量,减少ROS水平。

PI3K/Akt信号通路在细胞的增殖、凋亡和应激反应等过程中具有重要的调控作用^[24]。已有多项研究结果表明,PI3K/Akt信号通路对脑缺血具有明确的保护作用^[25]。在缺血脑组织中,PI3K/Akt的磷酸化水平在缺血后1-4h增加,但再灌注24h后

表达减少^[20]。Akt 可通过促进 PGC-1 α 磷酸化,调节线粒体相关基因转录合成,促进线粒体数量增加,还可以促进线粒体电子传递链相关酶的表达,促进 ATP 产出,以满足机体需要^[27,28]。Nrf2 是一种氧化还原敏感的转录因子,不仅调节亲电试剂诱导的 2 相酶基因表达,而且在调节各种抗氧化基因以应对氧化应激方面也起着关键作用。在正常情况下,Nrf2 与细胞质中的 Keap1 结合,定位于细胞质中。在氧化应激或其他潜在的应激性刺激下,Nrf2 从 Keap1 释放并转运至细胞核,导致抗氧化反应元件(Antioxidant reaction element,ARE)介导的抗氧化基因的转录激活,促进一系列抗氧化蛋白酶表达。磷酸化的 Akt 可促进 Nrf2 核转移,并与 ARE 结合,促进下游抗氧化酶(HO-1 等)表达,从而清除氧自由基^[29]。由此可见,激活 Akt/Nrf2 信号通路可调节抗氧酶水平,清除氧自由基。本研究结果发现,OGD/R 可显著抑制 Akt 的磷酸化水平,而 FA 可剂量依赖性的增加 Akt 磷酸化水平以及 Nrf2 的蛋白表达水平,表明 FA 可激活 Akt/Nrf2 信号通路。为了验证 FA 是否通过该通路发挥细胞保护作用,本研究采用 Akt 的特异性抑制剂 LY294002 抑制 Akt 磷酸化,结果发现 LY294002 不仅使 FA 促 Nrf2 表达作用减弱,同时其细胞保护作用也被显著降低。

综上所述,FA 对 OGD/R 引起的脑细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过调节 Akt/Nrf2 信号通路促进抗氧化酶表达,从而减轻氧化损伤。

参考文献(References)

- [1] 张天锡,史磊,刘雯,等.连翘化学成分、药理活性现代研究[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(12): 222-224
- [2] 颜礼有.连翘苷和连翘酯苷对 D-半乳糖致衰老小鼠保护作用的研究[D].陕西师范大学,2014
- [3] Qu H, Zhang Y, Wang Y, et al. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythiaside and forsythin) isolated from Forsythia suspensa[J]. J PharmaPharmacol, 2010, 60(2): 261-266
- [4] Silver B, Silver RW. Stroke: diagnosis and management of acute ischemic stroke[J]. Fp Essentials, 2014, 420: 16-22
- [5] 魏毅君.姜黄素后处理通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路抵抗脑缺血再灌注损伤[D].第四军医大学,2017
- [6] Zhu HR, Wang ZY, Zhu XL, et al. Icaritin protects against brain injury by enhancing SIRT1-dependent PGC-1 α Expression in experimental stroke[J]. Neuropharmacology, 2010, 59(1-2): 70-76
- [7] Hinkle JL, Guanci MK. Acute ischemic stroke review[J]. J NeurosciNurs, 2007, 39(5): 285-293, 310
- [8] Duan JL, Yin Y, Cui J, et al. ChikusetsuSaponinIVa Ameliorates Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Diabetic Mice via Adiponectin-Mediated AMPK/GSK-3 β Pathway In Vivo and In Vitro [J]. MolecNeurobiol, 2016, 53(1): 728-43
- [9] Hu HP, Wu MX. Mechanism of anesthetic action: oxygen pathway perturbation hypothesis[J]. Med Hypotheses, 2001, 57(5): 619-27
- [10] French B R, Boddepalli R S, Govindarajan R. Acute Ischemic Stroke: Current Status and Future Directions [J]. Missouri medicine, 2016, 113(6): 480-486
- [11] Yepes M, Roussel B D, Ali C, et al. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic[J]. Trends in Neurosciences, 2009, 32(1): 0-55
- [12] Turc G, Sallem A, Moulin, Solène, et al. Microbleed Status and 3-Month Outcome After Intravenous Thrombolysis in 717 Patients With Acute Ischemic Stroke[J]. Stroke, 2015, 46(9): 2458-63
- [13] May N, Fabien S, David SL. Ischemia-reperfusion injury in stroke[J]. Interventional neurology, 2013, 1(3-4): 185-199
- [14] Warner, D. S. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain[J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(18): 3221-3231
- [15] Rodrigo, Ramon, Fernandez-Gajardo, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities [J]. Cns& Neurological Disorders Drug Targets, 2013, 5(12): 698-714
- [16] Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation [J]. MolecNeurobiol 2013, 47(1): 9-23
- [17] Mancuso C, Scapagini G, Currò D, et al. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders[J]. Front Biosci, 2007, 12(3): 1107-1123
- [18] Jaspreet K, Sarika A, Bhawna S, et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of transient ischemic attack and stroke [J]. international journal of biological & medical research, 2011, 3(18): 94-98
- [19] Li W, Yang S. Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: upstream and downstream therapeutic strategies [J]. Brain Circulation, 2016, 2(4): 153-163
- [20] Manzanero S, Santro T, Arumugam T V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury[J]. Neurochemistry International, 2013, 62(5): 712-718
- [21] Yang Q, Dong H, Deng J, et al. Sevoflurane Preconditioning Induces Neuroprotection Through Reactive Oxygen Species-Mediated Up-Regulation of Antioxidant Enzymes in Rats [J]. Anesthesia & Analgesia, 2011, 112(4): 931-937
- [22] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ, 2012, J 5: 9-19
- [23] Rathore P, Dohare P, Varma S, et al. Curcuma Oil: Reduces Early Accumulation of Oxidative Product and is Anti-apoptogenic in Transient Focal Ischemia in Rat Brain [J]. Neurochemical Research, 2008, 33(11): 2376-2376
- [24] Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2004, 29(5): 233-242
- [25] Shibata M, Yamawaki T, Sasaki T, et al. Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Brain Research, 2002, 942(1-2): 1-10
- [26] Janelidze S, Hu B R, Peter Siesjö, et al. Alterations of Akt1 (PKB α) and p70S6K in Transient Focal Ischemia[J]. Neurobiology of Disease, 2001, 8(1): 147-154
- [27] Richard CS. Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function [J]. Physiological Reviews, 2008, 88 (2): 611-638
- [28] Wright DC, Geiger PC, Han DH, et al. Calcium Induces Increases in Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 and Mitochondrial Biogenesis by a Pathway Leading to p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(26): 18793-18799
- [29] Wu J, Li Q, Wang X, et al. Neuroprotection by Curcumin in Ischemic Brain Injury Involves the Akt/Nrf2 Pathway[J]. Plos One, 2013, 8(3): e59843