

Bcl-2 抑制剂对黄芪注射液减轻缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元凋亡的影响

董雅洁¹, 高维娟², 钱涛³, 卢锴锋¹, 朱炎杰¹, 谢亚芹¹

(1. 承德医学院病理生理学教研室, 河北 承德 067000; 2. 河北中医学院, 石家庄 050200;
3. 河北省人民医院, 石家庄 050051)

【摘要】 目的 探讨黄芪注射液(AI)对 Bcl-2 抑制剂(TW-37)作用下的缺氧缺糖/复氧复糖(H/R)大鼠海马神经元凋亡的影响。**方法** 取原代培养 8 d 的胎鼠海马神经元, 随机分为 6 组: 正常对照组、H/R 组、AI 组、AI 溶剂对照组、Bcl-2 抑制剂(TW-37) + H/R 组、TW-37 + AI + H/R 组。除正常对照组外, 各组均进行缺氧缺糖 0.5 h, 再于复氧复糖后七个时间点(0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h、72 h、120 h)分别进行指标检测。采用 MTT 法检测细胞活性, western blot 法和 RT-PCR 法检测海马神经元 Caspase-3 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与正常对照组比, 除 0 h 外, H/R 组海马神经元活性明显降低($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白及 Caspase-3 mRNA 表达均明显增强($P < 0.05$); 与 H/R 组相比, 除 0 h 外, AI 组海马神经元活性明显增高($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达均明显降低($P < 0.05$); 而 AI 溶剂对照组、TW-37 + H/R 组及 TW-37 + AI + H/R 组则无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 黄芪注射液可通过激活 Bcl-2 抗凋亡机制增强 H/R 大鼠海马神经细胞活性、降低 Caspase-3 表达, Bcl-2 是黄芪注射液抑制 H/R 大鼠海马神经元凋亡的重要靶点之一。

【关键词】 黄芪注射液; Bcl-2 抑制剂; 缺氧缺糖/复氧复糖; 海马神经元; 细胞凋亡; Caspase-3

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0011-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.003

The influence of Bcl-2 inhibitor on the alleviation action of astragalus injection on apoptosis of hippocamal neurons of rats induced by hypoxia /hypoglycemia and reoxygenation

DONG Ya-jie¹, GAO Wei-juan², QIAN Tao³, LU Kai-feng¹,
ZHU Yan-jie¹, XIE Ya-qin¹

(1. Department of Pathophysiology, Chengde Medical College, Hebei Chengde 067000, China;

2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

3. Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

【Abstract】 Objective To observe the influence of Bcl-2 inhibitor (TW-37) on the alleviation action of astragalus injection (AI) on apoptosis of hippocamal neurons of rats induced by hypoxia /hypoglycemia and reoxygenation (H/R).

【基金项目】 河北省科技支撑计划项目(13272504D); 河北省普通高等学校高层次人才科学研究计划项目(GCC2014031); 河北省教育厅青年基金项目(Q2012002); 承德医学院自然科学研究计划项目(Q201506); 河北省高校重点学科建设项目资助(冀教高[2013]4号病理学与病理生理学)。

【作者简介】 董雅洁(1980-), 女, 硕士生, 研究方向: 脑血管病发病机制及中医药防治。Email: dyj9606@163.com。

【通讯作者】 高维娟(1966-), 女, 教授, 研究方向: 脑血管病发病机制及中医药防治。Email: gwj6088@163.com。

Methods The hippocampal neurons were isolated from fetal rat and cultured for eight days. The cells were randomly divided into six groups: normal control group, H/R group, AI group, AI solution group (sterile deionized water), TW-37 group, TW-37 with AI group. All groups were tested after 0 h, 0.5 h, 2 h, 6 h, 24 h, 72 h and 120 h since they were treated with hypoglycemia and reoxygenation after deprived of oxygen and glucose for 30 min except normal control group. The activity of hippocampal neurons were detected with MTT, The expression level of Caspase-3 was measured by western blotting, the expression of mRNA of Caspase-3 was tested by RT-PCR. **Results** Compared with normal control group, aside from 0 h group, the activity of neurons decreased obviously ($P < 0.05$), moreover, the protein and mRNA expressions of Caspase-3 were enhanced significantly ($P < 0.05$) in H/R groups. Compared with H/R group, the activity of neurons increased obviously in astragalus group ($P < 0.05$), and the expressions of Caspase-3 protein and the expression of Caspase-3 mRNA in the AI groups decreased significantly ($P < 0.05$) besides 0 h group; but there was no significant difference in both AI solution group, TW-37 + H/R and TW-37 + AI + H/R group ($P > 0.05$). **Conclusions** Astragalus injection to increase the neurons activity and decrease the expression level of Caspase-3 in hippocampal neurons of rat by activating the effect of anti-apoptosis of Bcl-2. Bcl-2 is one of the targets exerting the inhibitory action of astragalus injection on apoptosis of hippocampal neurons of rats induced by hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation.

【Key words】 Astragalus injection; Bcl-2 inhibitor; Hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation; Hippocampal neurons of rats; Apoptosis; Caspase-3

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 是临床缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 常见的病理生理过程, 程序性细胞凋亡是神经元发生损害的重要机制。Bcl-2 基因家族是线粒体信号转导通路中重要的调控基因之一, 其中抗凋亡相关基因 Bcl-2 与 CIRI 的发生密切相关^[1-2]。本课题组前期的实验研究证实, “补药之长” 黄芪的精纯制剂黄芪注射液 (astragalus injection, AI) 可抑制原代培养的缺氧缺糖/复氧复糖 (hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation, H/R) 大鼠胎鼠的海马神经元凋亡^[3-4], 并初步推断其抗凋亡作用与上调 Bcl-2 的表达有关^[5]。因此本实验选择特异性 Bcl-2 抑制剂 TW-37, 观察黄芪注射液对 Bcl-2 抑制剂预处理后的缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 表达改变, 明确其发挥脑保护作用的具体靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级新生 24 ~ 48 h SD 乳大鼠, 体重 8 ~ 10 g, 雌雄不限, 购于河北省实验动物中心【SCXK(冀)2013-1003】。动物实验于承德医学院屏障环境动物室进行【SYXK(冀)2013-0026】。

1.1.2 主要试剂 NSE 抗体 (AB53025), 英国 Abcam 公司; GFAP 抗体 (BA0056), 武汉 Boster 公司; Caspase-3 抗体 (SC56050), 美国 santa cruz 公司; Bcl-2 抑制剂 (TW-37), 美国 Selleck 公司; 免疫组化检测试剂盒 (SP9001), 北京 ZSGB-BIO 公司; BCA

蛋白浓度测定试剂盒 (P0012S), 上海 Beyotime 公司; Caspase-3 引物 F: 5'-ACTGGACTGTGGCAT TGAG-3', R: 5'-GAAACAATACATGGAATCTG-3' 和 β -actin 引物 F: 5'-CAT CCTGCGTCTGGACCT-3', R: 5'-TCAGGAGGAGCAATGATC TTG-3', 均由上海 Sangon Biotech 公司合成; RT-PCR 试剂盒 (RR001Q), 大连 Takara Bio 公司; 黄芪注射液 (批号 Z51021776), 成都地奥九泓制药厂。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱 (HERAcell 150i), 德国 Heraeus 公司; 全自动酶标仪 (Multiskan MK-3), 芬兰 Thermo Fisher 公司; 稳压稳流电泳仪 (DYY-6C), 北京 LIUYI 公司; RT-PCR 仪 (PTC-100), 美国 MJ Research 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元的分离与培养 无菌条件下, 取 24 h 新生 SD 大鼠, 浸于冰浴的 75% 乙醇 1 min 消毒, 用显微眼科镊钝性分离并夹取海马组织, 放入冰浴的盛有 D-Hanks 液的培养皿中, 剔除含有血管的软脑膜, 用体积分数为 0.125% 的胰酶的同时充分消化, 15 min 后添加马血清终止消化。根据海马组织量加入适量有血清种植培养液, 充分吹打, 制成细胞悬液, 用 200 目滤网过滤。经胎盘蓝计数后, 接种在经多聚赖氨酸包被的培养皿或培养瓶中, 放入 37℃ 恒温、5% CO₂, 饱和湿度培养箱中常规培养。8 d 后用 H/R 法建立脑缺血再灌注损伤模型。

1.2.2 免疫化学染色法检测海马神经元纯度 取经冷丙酮固定的海马神经元, 采用免疫组化 SP 法

检测神经元特异性烯醇化酶(NSE)及胶质纤维酸性蛋白 A(GFAP)表达,具体操作按照 ZSGB-BIO 免疫组化检测试剂盒说明书进行。分别加入一抗 NSE 多克隆抗体(1:50 稀释),GFAP 多克隆抗体(1:100 稀释)。对免疫组化阳性结果采用 MiVnt 图像分析系统进行半定量分析。阳性细胞计算方法:高倍镜下计算 3 个非连续视野阳性数。

1.2.3 实验分组及体外 H/R 模型的建立 将体外培养 8 d 的大鼠胎鼠海马神经元随机分为 6 组:正常对照组、H/R 组、AI 组、AI 溶剂对照组、TW-37 组、TW-37 + AI 组。除正常对照组外,其余各组用预热的无糖 Earle's 液替代原培养基,并将其置于 37℃、高纯氮气温箱中培养 0.5 h,随后用正常无血清培养液,在饱和湿度培养箱(37℃、5% CO₂)中常规培养^[6]。AI 组于缺氧缺糖前 10 min 加入 AI(终浓度为 0.5 g/L);AI 溶剂对照组换为等量无菌去离子水(pH7.4);TW-37 组加入 TW-37(终浓度为 400 nmol/L);TW-37 + AI 组缺氧缺糖前 15 min 加入 TW-37,5 min 后再加入等量 AI,直至细胞培养结束。各组均于复氧复糖七个不同时间点(0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h、72 h 和 120 h)分别进行海马神经元活性、Caspase-3 蛋白及其 mRNA 的表达的测定。

1.2.4 MTT 法检测海马神经元活性 用有血清培养基稀释后配成细胞悬液,以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板,各组均于复氧复糖后 0 h、0.5 h、2 h、6 h、24 h、72 h、120 h 后,在各孔中加入 10% 孔内培养液量的浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ L,37℃ 恒温孵育 4 h,弃去全部培养液,每孔加 200 μ L DMSO 使结晶迅速溶解,放入酶标仪中震荡 10 min,在 492 nm 处测定 OD 值。

1.2.4 Western blot 法检测海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达 收集裂解的神经细胞的胞质蛋白,具体操作步骤按试剂盒和仪器的说明书执行,并采用 BCA 法进行定量。蛋白上样量为 30 μ g,SDS-PAGE 分离胶体积分数 12%,PVDF 膜转膜,浸入 5% Milk-TBST 封闭液中封闭 2 h,加入兔抗 Caspase-3 单克隆抗体(1:500 稀释),4℃ 振摇过夜后,用 TBST 洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000 稀释),室温孵育 1 h。洗膜后,用化学发光法显影、定影。胶片扫描后,将显影条带输入 Quantity One 凝胶分析系统,进行定量分析。

1.2.5 RT-PCR 法检测海马神经元 Caspase-3 mRNA 表达的 采用 Trizol 一步法抽提神经细胞总

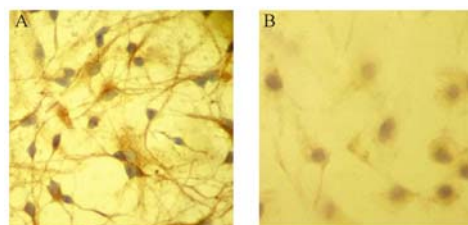
RNA,按 TaKaRa RNA PCR kit(AMV)说明逆转录为 cDNA。按照 PCR amplification kit 说明进行反应,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物,将经紫外透射仪采集的图象输入 Quantity one 凝胶分析系统,进行半定量分析,计算 Caspase-3 条带与 β -actin 条带的灰度比值,作为二者 mRNA 的相对表达水平。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS12.0 进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,Shapiro-Wilk 法检验数据符合正态分布,计量资料组间差异显著性用方差分析法检验,组间两两比较用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 海马神经元纯度

NSE 细胞免疫化学结果显示:体外无血清原代培养 8 d 的海马神经细胞,胞体饱满,成锥体状,边缘有光晕,突起较多,末端彼此相互连接形成复杂的神经网络。光镜下观察发现,NSE 表达阳性细胞为棕黄色,高倍镜下随机选择三个视野中统计阳性神经细胞的比率,计算海马神经细胞纯度为 $(94.69 \pm 0.93)\%$,GFAP 染色则为阴性,证明原代培养的海马神经细胞中胶质细胞较少(图 1)。



注:A:神经元特异性烯醇化酶;B:GFAP 胶质纤维酸性蛋白 A。

图 1 免疫化学染色法检测海马神经元 NSE 蛋白及 GFAP 蛋白的表达($\times 40$)

Note: A:NSE; B:GFAP.

Fig. 1 Expression of NSE in cultured hippocampal neurons and GFAP in cultured neuroglial cell detected by immunohistochemistry ($\times 40$)

2.2 黄芪注射液及 Bcl-2 抑制剂对 H/R 大鼠海马神经细胞活性的影响

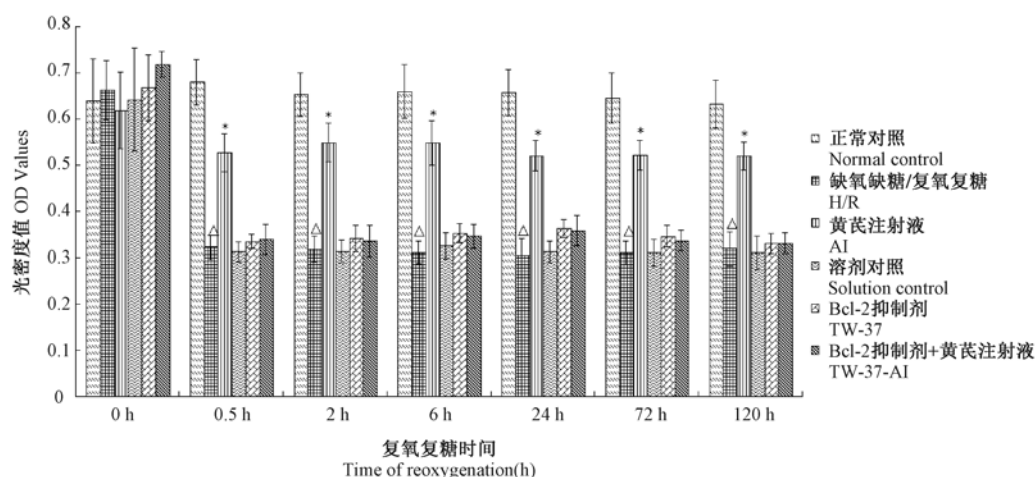
MTT 结果显示:与正常对照组相比,除 0 h 外,H/R 组海马神经元活性均显著降低($P < 0.05$);而与 H/R 组细胞相比,除 0 h 外,AI 组海马神经元活性明显升高($P < 0.05$),而 AI 溶剂对照组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组与之相比则无显著差异($P > 0.05$)(表 1,图 2)。

表 1 MTT 法检测 Bcl-2 抑制剂及黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)**Tab. 1** The effects of Bcl-2 inhibitor and astragalus injection on the activity in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by MTT

分组 Groups	光密度值 OD Values						
	0 h	0.5 h	2 h	6 h	24 h	72 h	120 h
正常对照 Normal control	0.64 ± 0.091	0.680 ± 0.050	0.654 ± 0.047	0.659 ± 0.059	0.657 ± 0.050	0.649 ± 0.055	0.633 ± 0.052
缺氧缺糖/ 复氧复糖 H/R	0.66 ± 0.064	0.323 ± 0.02 [△]	0.319 ± 0.02 [△]	0.311 ± 0.02 [△]	0.306 ± 0.03 [△]	0.311 ± 0.02 [△]	0.319 ± 0.03 [△]
黄芪注射液 AI	0.62 ± 0.083	0.527 ± 0.041 *	0.550 ± 0.043 *	0.549 ± 0.048 *	0.521 ± 0.034 *	0.522 ± 0.032 *	0.520 ± 0.031 *
溶剂对照 solution control	0.64 ± 0.112	0.313 ± 0.021	0.313 ± 0.024	0.326 ± 0.028	0.313 ± 0.023	0.310 ± 0.028	0.310 ± 0.035
Bcl-2 抑制剂 TW-37	0.67 ± 0.071	0.335 ± 0.015	0.341 ± 0.029	0.353 ± 0.021	0.363 ± 0.020	0.346 ± 0.023	0.331 ± 0.022
Bcl-2 抑制剂 + 黄芪注射液 TW-37 + AI	0.72 ± 0.028	0.339 ± 0.032	0.336 ± 0.034	0.346 ± 0.026	0.358 ± 0.034	0.336 ± 0.022	0.330 ± 0.023

注:与正常对照组比, [△] $P < 0.05$;与缺氧缺糖/复氧复糖组比, * $P < 0.05$ 。

Note: [△] $P < 0.05$ vs Normal control group; * $P < 0.05$ vs H/R group.



注:与正常对照组比, [△] $P < 0.05$;与缺氧缺糖/复氧复糖组比, * $P < 0.05$ 。

图 2 MTT 法检测 Bcl-2 抑制剂及黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Note: [△] $P < 0.05$ vs Normal control group; * $P < 0.05$ vs H/R group.

Fig. 2 The effects of Bcl-2 inhibitor and astragalus injection on the activity in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by MTT

2.3 黄芪注射液及 Bcl-2 抑制剂对 H/R 大鼠海马神经元 Caspase-3 蛋白表达的影响

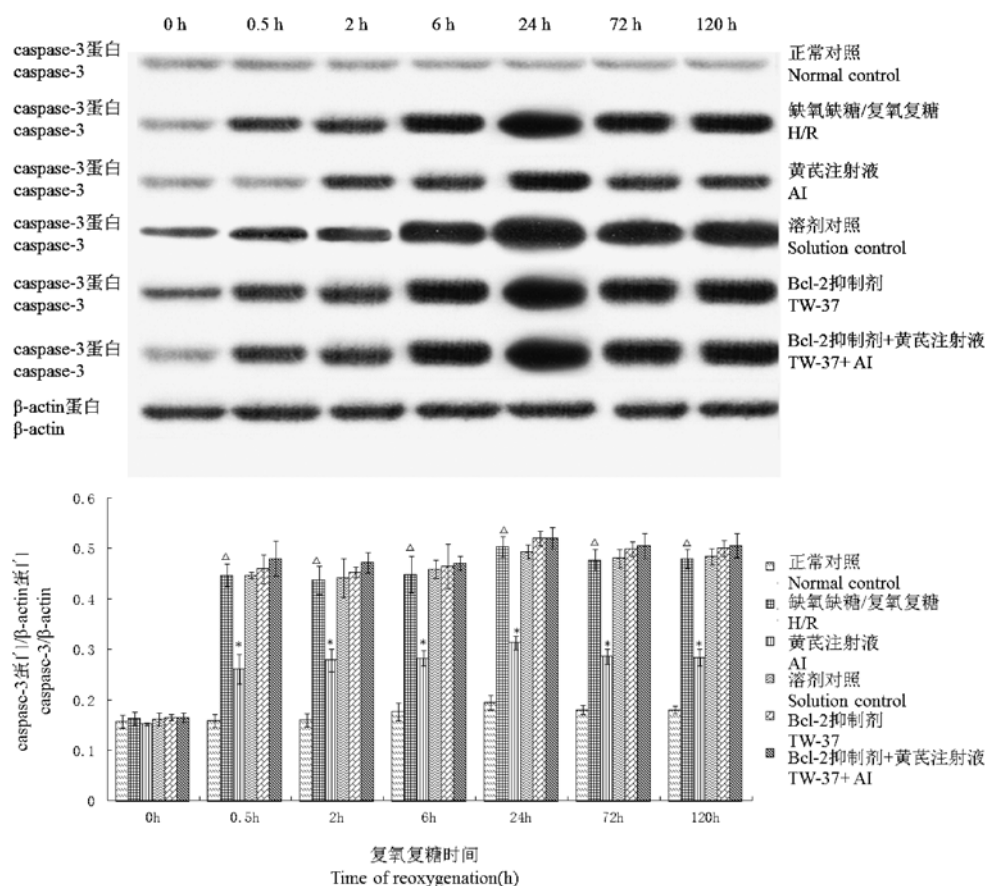
Western blot 结果显示:与正常对照组相比,除 0 h 外,其余各时间点 H/R 组海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达均显著增高 ($P < 0.05$),复氧复糖后 24 h 最高;与 H/R 组比,除 0 h 外,在其余各时间点 AI 组海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.05$),而 AI 溶剂组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组海马神经元 Caspase-3 蛋白的表达在各点与之相一致,无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 黄芪注射液及 Bcl-2 抑制剂对 H/R 大鼠海马神经元 Caspase-3 的 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示:与正常对照组比,除 0 h 外,其余各时间点 H/R 组海马神经元 Caspase-3 mRNA 的表达均显著增加 ($P < 0.05$),24h 最高;与 H/R 组比,除 0 h 外,在其余各时间点 AI 组 Caspase-3 的 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$),而 AI 溶剂组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组的海马神经元 Caspase-3 的 mRNA 的表达在各点与之无明显差别 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

缺血后再灌注过程中引起的神经元的损伤是造成 ICVD 的发病率、致死率逐年上升的重要病理



注:与正常对照组比, $\Delta P < 0.05$;与缺氧缺血/复氧复糖组比, $* P < 0.05$ 。

图3 Western blot 法检测 Bcl-2 抑制剂和黄芪注射液对缺血缺氧/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Note: $\Delta P < 0.05$ vs Normal control group; $* P < 0.05$ vs H/R group.

Fig. 3 The effect of Bcl-2 inhibitor and astragalus injection on the protein expression of Caspase-3 in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by Western blot

生理机制,而 H/R 是缺血再灌注损伤的一种最常见的表现形式^[7-8]。我们前期的研究表明,H/R 可通过激活 JNK 信号转导通路,上调 C-JUN 氨基末端激酶-3 (JNK3) 的表达,并引发其下游底物 Caspase-3 表达增加,进而诱发神经元凋亡^[4,9]。

Bcl-2 基因家族是 JNK 信号转导通路中重要的调控因素,作为代表的 Bcl-2 和 Bax 二者在功能上相互对立^[10]。定位于线粒体外膜上的 Bcl-2 含有抗凋亡蛋白所特有的结构域 BH4,决定其抗细胞凋亡功能的存在^[11];定位于胞浆中的 Bax 的结构中含有 BH1、BH2 和 BH3 三个结构域,可促进细胞的凋亡,两蛋白间的比例决定是否发生细胞凋亡^[12]。研究发现,当凋亡信号刺激后 Bax 可转位至线粒体膜上, Bax/Bax 同源二聚体形成增多, Bcl-2 抑制作用减弱,利于形成通透性 PT 孔道,释放出细胞色素 C 等促凋亡因子,即刻与凋亡酶激活因子 Apaf-1 及

dATP 结合,形成复合体,从而启动下游的 caspase 级联反应,激活关键效应蛋白酶 Caspase-3,进入凋亡进程^[13-15]。

抑制细胞凋亡是治疗缺血性脑损伤的有效途径之一,中药制剂对 CIRI 神经元凋亡干预作用的研究是目前研究的热点。黄芪注射液是从黄芪中提取的有效成分精制而成,包括多种皂苷、多糖、氨基酸和微量元素等,每毫升注射液中所含有效成分相当于含生药 2 g。大量研究发现,其在扩血管、清除氧自由基,增加微循环灌注、增强免疫功能以及抗血栓等方面具有一定的药理活性,可抑制神经元凋亡的发生,临床应用广泛^[16-17]。

本实验选取对缺血缺氧最为敏感的胎大鼠海马神经元进行体外原代培养,用 H/R 法模拟 CIRI,并用黄芪注射液和 Bcl-2 抑制剂干预海马神经元缺氧缺血/复氧复糖模型。实验结果显示:海马神经

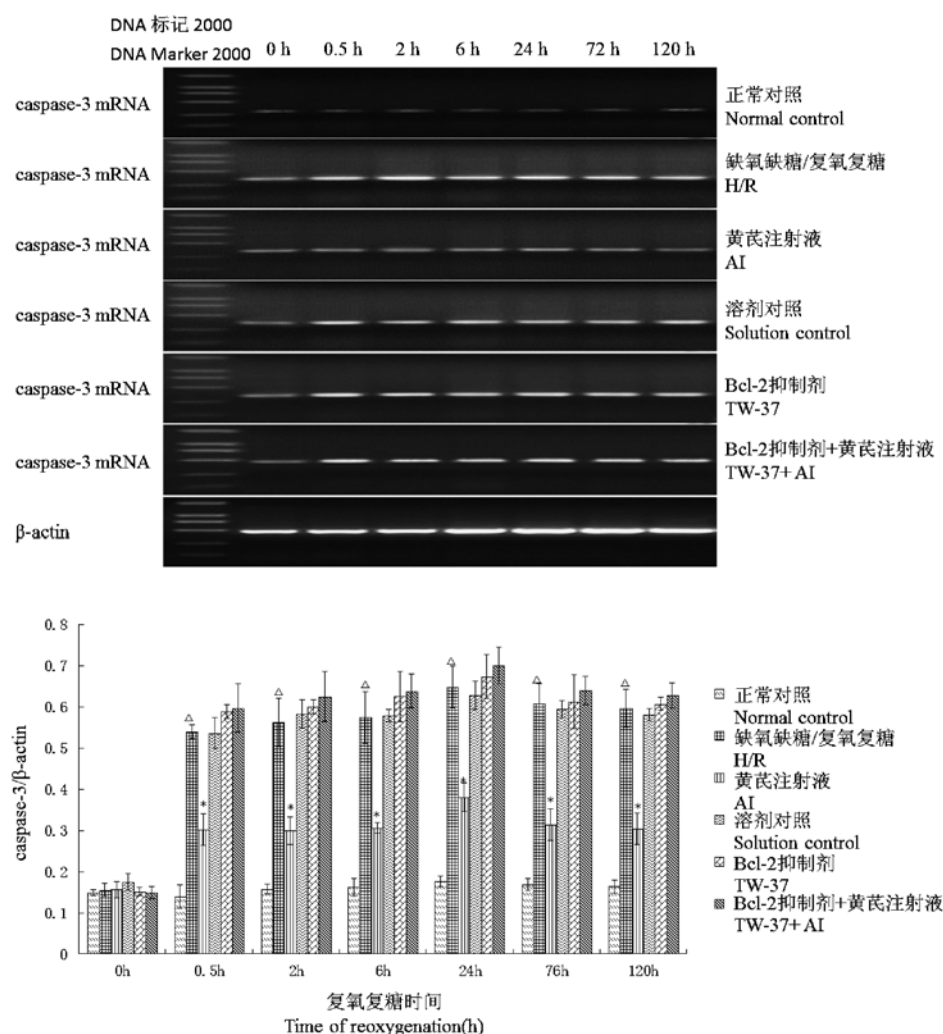


图 4 RT-PCR 法检测 Bcl-2 抑制剂对缺氧缺血/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Note: $\Delta P < 0.05$ vs Normal control group; $* P < 0.05$ vs H/R group.

Fig. 4 The effect of Bcl-2 inhibitor and Astragalus injection on the mRNA expression of Caspase-3 in the rat hippocampal neurons after hypoxia/hypoglycemia and reoxygenation detected by RT-PCR

元经缺氧缺血/复氧复糖后,各个时间点的 OD 值明显减低,细胞活性明显下降, Caspase-3 蛋白及 mRNA 的表达均明显增加 ($P < 0.05$), 24 h 最高。这证明海马神经元在 H/R 条件下凋亡信号触发启动, Caspase-3 表达升高,进一步地诱导细胞凋亡,在 24h Caspase-3 的表达达到最高,分析原因可能是先通过下调 Bcl-2 的表达,封闭 Bax 形成孔道的活性减弱,进而活化 Caspase-3,促使细胞凋亡^[18-20]。在以后各时间点 Caspase-3 表达量平稳下降,推测可能是与磷酸化的 Caspase-3 半衰期密切相关^[21]。而与同时点 H/R 组相比, AI 组海马神经元活性显著升高 ($P < 0.05$), 而 Caspase-3 蛋白和 mRNA 的表达

均显著降低 ($P < 0.05$), AI 溶剂对照组、TW-37 组及 TW-37 + AI 组与之相比却无显著差异 ($P > 0.05$), 则提示 Bcl-2 抑制剂可拮抗黄芪注射液提高 H/R 大鼠海马神经细胞活性、降低 Caspase-3 表达的作用, 黄芪注射液是以 Bcl-2 为靶点来抑制 Caspase-3 表达,抑制细胞凋亡。且因为黄芪注射液可使海马神经元 Caspase-3 蛋白表达降低, Caspase-3 mRNA 的表达也相应的下调,说明黄芪注射液是在转录水平抑制 Caspase-3 的表达。因此,推测黄芪注射液是以 Bcl-2 为靶点来抑制 Caspase-3 表达,抑制细胞凋亡,这为缺血性脑血管病的靶向治疗提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Zhao J, Yu S, Zheng W, *et al.* Curcumin improves outcomes and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35 (3):374-379.
- [2] Burguillos MA, Hajji N, Englund E, *et al.* Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus Evidence in Parkinson's disease patients[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 41 (1):177-188.
- [3] 张雅丽,高维娟,闫凤霞,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖后复氧复糖大鼠海马神经细胞凋亡的研究[J]. *中国老年学杂志*,2009,29(7):793-796.
- [4] 闫凤霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Caspase-3 表达的作用[J]. *中国药理学通报*,2011,27(1):85-90.
- [5] 焦俊霞,高维娟,李玉明,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*,2011,27(5):905-910.
- [6] Bossenmeyer C, Chihab R, Muller S, *et al.* Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in cultured rat brain neurons[J]. *Brain Res*, 1998,787(1):107-116.
- [7] Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia[J]. *Folia Neuropathol*, 2011,49(2):78-87.
- [8] Li J, Qu Y, Chen D, *et al.* The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation [J]. *Neuroscience*,2013,252:346-358.
- [9] 叶冬青,高维娟,闫凤霞,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 JNK3 mRNA 的表达[J]. *中国病理生理杂志*,2009,25(9):1756-1761.
- [10] Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,2013,5(2):8719-8722.
- [11] Villeneuve C, Baricault L, Canelle L, *et al.* Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells [J]. *Mol Bio Cell*,2011,22 (7):999-1013.
- [12] Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The role of BH3-Only proteins in tumor cell development ,signaling, and treatment [J]. *Genes Cancer*,2011,2 (5):523-537.
- [13] Liu YQ, Liu YF, Ma XM, *et al.* Hydrogen-rich saline attenuates skin ischemia/reperfusion induced apoptosis via regulating Bax/Bcl-2 ratio and ASK-1/JNK pathway[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*,2015,68(7):147-156.
- [14] Raychaudhuri S, Skommer J, Henty K, *et al.* Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death[J]. *Apoptosis*,2010,15(4):401-411.
- [15] Zhao YX, Cui M, Chen SF, *et al.* Amelioration of ischemic mitochondrial injury and Bax-dependent outer membrane permeabilization by Mdivi-1 [J]. *CNS Neurosci Ther*,2014,20 (6):528-538.
- [16] 郭雪红. 黄芪注射液的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(21):3018-3021.
- [17] 严丽华,邵寅. 黄芪注射液的临床应用进展[J]. *中国药业*, 2013,22(5):126-128.
- [18] 王新高,童萼塘,孙圣刚. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠皮质神经细胞凋亡的影响[J]. *中国比较医学杂志*,2005,15 (6):363-367.
- [19] Scarfo L, Ghia P. Reprogramming cell death: BCL-2 family inhibition in hematological malignancies [J]. *Immunol Lett*, 2013, 155(1-2):36-39.
- [20] 曾兆禄,韩继超,薛云,等. 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国比较医学杂志*,2016, 26(2):62-66.
- [21] 李广明,李军,曹红,等. SB202190 减轻沙土鼠海马 CA1 区脑缺血再灌注损伤的作用与磷酸化 Caspase-3 含量变化的关系[J]. *中国药理学通报*,2005,21(8):1150-1151.

[修回日期]2016-06-28