

• 实验研究 •

通络化痰胶囊和熊去氧胆酸对 MPP⁺诱导的小鼠 中脑神经细胞的保护作用研究^{*}

王飞雪¹, 李 浩¹, 周 杰², 王孝理³, Wolf Dieter Rausch⁴, 范吉平^{5△}

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102;
3. 北京市房山区中医医院, 北京 102400; 4. 奥地利维也纳兽医大学, 维也纳 A1210;
5. 中国中医药出版社, 北京 100013)

摘要: **目的** 探讨通络化痰胶囊对 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-Methyl-4-Phenylpyridinium ion, MPP⁺)导的小鼠中脑多巴胺能神经元的保护作用。**方法** 采用 FRAP 法测定通络化痰胶囊(TLHT)和熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)的抗氧化能力。原代培养小鼠中脑神经细胞, 于对数生长期进行药物处理, 分为空白组、模型组(MPP⁺诱导)、TLHT 治疗组(6.25, 25, 100 $\mu\text{g/mL}$)与 UDCA 治疗组(3.75, 15, 60 μM)共 8 组。药物处理 48 h 后, 进行酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫组织化学染色, 观察多巴胺能神经元形态、数量及轴突长度的改变, 采用 MTT 法检测细胞存活率, 采用 Griess 法检测 NO 释放量。**结果** FRAP 法显示, TLHT 与 UDCA 均具有抗氧化活性, 其中 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 TLHT 和 15 μM 的 UDCA 抗氧化能力最显著。经 MPP⁺诱导损伤后, 与空白组相比, 多巴胺能神经元形态略有肿胀, 表面不光滑, 细胞核缩小, 神经突起数量减少, 长度变短; MTT 显示总细胞存活率下降; Griess 法检测发现 NO 释放量明显增加。经过 TLHT 与 UDCA 处理后, 与模型组比较, 各药物治疗组的多巴胺能神经元形态均有所改善, 数量增加, 神经突起数量增加, 长度增长, 细胞增殖, 存活率明显增加, NO 释放量减少。其中 TLHT 与 UDCA 的中剂量对各项改善作用最为明显, 差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。TLHT 与 UDCA 各相应浓度对各项的改善趋势一致, TLHT 略优于 UDCA, 但差异无统计学意义。**结论** 通络化痰胶囊对小鼠中脑的多巴胺能神经元具有保护作用, 机制可能与减少 NO 的释放、抗氧化应激有关。

关键词: 通络化痰胶囊; 熊去氧胆酸; 异病同治; 帕金森病; 多巴胺能神经元; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)01-0001-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.01.001

帕金森病是一种常见的老年中枢神经系统退行性疾病, 临床静止性震颤、运动减少、肌强直和姿势步态异常为特征, 可伴有智力减退、言语错乱等非运动症状^[1]。一项针对全球的 Meta 分析显示, 帕金森病随着年龄增长患病率增加, 至 70~79 岁达到发病高峰, 患病率约为 1087/10 万人^[2], 而在我国 65 岁以上人群帕金森患病率为 1700/10 万人^[3]。帕金森病由于其低病死率、高致残率的特点, 严重影响老年人生活质量, 给患者家庭以及社会都带来沉重的负担。中医药治疗帕金森病具有明显的疗效和优势。帕金森病在中医属于“颤证”范围, 以痰热动风或瘀血阻络所致者最为常

见^[4], 在治疗上应以息风止痉、活血化瘀为主。

通络化痰胶囊(TLHT)由熊胆粉、天麻、三七、丹参、天竺黄、大黄组成, 主要功效为化痰息风、活血化瘀, 其治疗中风疗效确切, 已在临床实验、动物实验和细胞实验中得到验证^[5-9]。熊胆粉为息风止痉的良药, 在本方中用作君药, 而熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)是熊胆粉的主要成分。因为通络化痰胶囊具有良好的息风止痉、活血化瘀的疗效, 根据中医异病同治的理论, 因此推测其对帕金森病可发挥一定的治疗作用。本研究以 MPP⁺诱导原代培养的小鼠中脑细胞为研究载体, 探讨 TLHT 及其君药的主要成分

^{*} 基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(ZZ0708094)

收稿日期: 2017-12-15

作者简介: 王飞雪(1986-), 女, 中国中医科学院西苑医院老年病研究所站博士后, 研究方向: 中医药防治老年病。

△通信作者: 范吉平, E-mail: fanjiping5218@vip.sina.com

UDCA 对中脑神经细胞的保护作用,期望能在中医异病同治的理论框架下,为中药复方治疗帕金森病做出科学阐释。

1 材料与方法

1.1 实验动物 OF1/SPF 孕 14 d 小鼠,由奥地利实验动物学和兽医遗传学研究所提供。本实验于奥地利生物医学系完成,实验遵守欧盟(86/609 / EU)关于实验动物护理和使用的指导原则。

1.2 实验药品 通络化痰胶囊(生产批号 140902)由山东沃华医药科技有限公司提供,熊去氧胆酸购买自美国 Sigma 公司。根据前期实验^[10]确定 TLHT 最佳药物浓度,根据 TLHT 中 UDCA 的比例确定 UDCA 的浓度,以此作为两者的中剂量,分别以四分之一和四倍浓度作为低剂量和高剂量。实验开始前将药物溶于 DMSO,制备两者的储备液。

1.3 实验试剂 DMEM 完全培养基、无血清无色 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、谷氨酸、青霉素-链霉素(Pen-Strep)、葡萄糖、两性霉素、Hepes 缓冲液、多聚甲醛(PFA)、二甲基亚砜(DMSO)、十二烷基硫酸钠(SDS)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、醋酸、醋酸钠、盐酸、FeCl₃、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TPTZ)、Griess 试剂盒等购自美国 sigma 公司。磷酸盐缓冲液(PBS)、Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水(DPBS)、胰蛋白酶、胰蛋白酶抑制剂、Triton-X 等购自美国的 Invitrogen 公司。多聚赖氨酸(PDL)购自德国的 Nunclon 公司。DNA 酶购自德国的 Roche 公司。Vectastain ABC Elite 试剂盒购自美国的 Vector 公司。1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-Methyl-4-Phenylpyridinium ion, MPP⁺)购自美国 RBI 公司。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体、神经组织培养添加剂 B-27(不含抗氧化剂)购自德国 Gibco 公司。噻唑蓝(MTT)购自美国的 Amresco 公司。Kaiser's 甘油明胶购自美国的 Merck 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 TLHT 与 UDCA 铁离子还原/抗氧化能力分析(Ferric Reducing/Antioxidant Power, FRAP) FRAP 法^[11]的原理为 Fe³⁺-TPTZ 在酸性条件下,可以被样品还原为 Fe²⁺而呈现出明显的蓝色,在 593 nm 波长处具有最大吸收值。吸光度越大,说明样品将 Fe³⁺还原为 Fe²⁺的能力越强,即抗氧化活性越强。采用 FRAP 法测定 TLHT 与 UDCA 的抗氧化能力,步骤如下:(1)

将 25 mL 0.3 mol/L 的醋酸盐缓冲液、2.5 mL 10 mmol/L 的 TPTZ 溶液与 2.5 mL 20 mmol/L 的 FeCl₃ 溶液配制成新鲜的 FRAP 工作液;(2) 配制不同浓度的 Trolox 甲醇溶液(12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 μM),在 593 nm 处测定光吸收值,以吸光值和 Trolox 浓度制作标准曲线,得到吸光值(y)和 Trolox 浓度(x)之间的直线方程;(3) 在反应管中分别加入不同浓度的 TLHT(6.25, 25, 100 μg/mL)与 UDCA(3.75, 15, 60 μM)各 200 μL,然后各加入 3.8 mL FRAP 工作液,混匀后于 37 °C 反应 30 min;(4) 在 593 nm 波长处测定光吸收值,经方程换算,得到不同浓度 TLHT 与 UDCA 的 FRAP 值,代表两者的抗氧化能力,FRAP 值越大,抗氧化能力越强。

1.4.2 小鼠中脑神经元原代培养与药物处理 小鼠怀孕第 14 天时以 CO₂ 处死,在室温无菌条件下,剖开腹腔和子宫,取小鼠胚胎放入 DPBS 中。在立体显微镜(10 倍)下分离胚胎脑组织,去除脑膜和其他组织,切取中脑。将中脑切碎后转移至 2 mL 0.1%胰蛋白酶和 2 mL 0.02%DNA 酶 I 中,37°C 水浴锅中消化 7 min 后,加入胰蛋白酶抑制剂停止消化。1 000 g 离心 4 min 后,弃去上清,加入 DMEM、Hepes 缓冲液(终浓度为 10 μmol/L)、10%FBS、30 mmol/L 葡萄糖、1%青霉素-链霉素及两性霉素作为基本培养基,以 5×10⁵/mL 的密度接种于预先采用 PDL 包被的 4 孔培养板和 48 孔培养板中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。每 2 d 更换一次培养基,第 6 天更换为含有 2% B27 的无血清 DMEM。细胞培养第 10 d,将细胞分为 8 组,分别为空白组(Control)、模型组(Model, 10 μM MPP⁺)、TLHT 治疗组(6.25, 25, 100 μg/mL TLHT 分别与 10 μM MPP⁺共孵育,即 TLHTL、TLHTM、TLHTH 3 组)、UDCA 治疗组(3.75, 15, 60 μM UDCA 分别与 10 μM MPP⁺共孵育,即 UDCAL、UDCAM、UDCAH 3 组),药物处理 48 h。

1.4.3 TH 免疫组化染色 中脑的多巴胺能神经元的胞体和轴突均富含酪氨酸羟化酶(TH)^[12],因此采用 TH 免疫组化染色可以将多巴胺能神经元及其轴突均染为深棕色,显微镜下可反映细胞的形态和数量。药物处理 48 h 后,按下列步骤对 4 孔板中的细胞进行 TH 免疫组化染色:(1) 培养板中的每孔中加入 0.3 mL 4%的多聚甲醛(PFA),于 4 °C 固定 30 min 后,

PBS 冲洗 1 次;(2)加入 0.3 mL 0.4%Triton X-100 室温下透化 30 min 后用 PBS 洗涤 3 次;(3)加入 0.3 mL 马血清溶液(Vectastain ABC Kit, USA)室温下封闭 90 min;(4)加入 0.3 mL 0.1%的一抗酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体在 4 ℃下孵育 24 h 后, PBS 冲洗 3 次;(5)加入 0.3 mL 生物素标记的二抗室温下孵育 90 min 后, PBS 冲洗 3 次;(6)加入 0.3 mL Vectastain ABC Elite 试剂盒中的 AB 液, 静置 30 min 后加入 C 液, 孵育 90 min, 后用 PBS 冲洗 3 次;(7)加入含有过氧化氢(H_2O_2)的 DAB(5 mg/mL)于室温下染色 5-10 min, 直至染色均匀, 后用 PBS 冲洗 3 次;(8)甘油明胶封片。在 100 倍倒置显微镜下, 每孔随机选择 10 个视野(1 立方毫米/视野)进行 TH 阳性神经元(TH immuno-reactive, THir)计数, 采用 Image-Pro Plus 6 软件进行神经轴突长度测量, 计算每组的平均轴突长度。

1.4.4 MTT 细胞活性测定 MTT 法测定细胞存活率主要依据的是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将 MTT 还原为不溶性的蓝紫色结晶, 即甲臜(Formazan), 而死细胞则无此功能^[13]。DMSO 可以溶解细胞中的甲臜, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞的数量。具体方法: 使用无色的无血清 DMEM 配置 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液。药物处理 48 h 后, 弃去 48 孔培养板内的培养基, 每孔加入 750 μ L MTT 溶液。孵育 4 h 后, 弃去上清液, 加入 DMSO 缓冲液(9.94 mL DMSO, 1g SDS 和 0.06 mL 4% HCl), 摇床震荡 20 min, 使蓝紫色结晶完全溶解。然后在 570 nm 波长处测量吸光度。

1.4.5 NO 浓度测定 药物处理 48 h 后, 吸取各孔上清液, 采用 Griess 法测定 NO 浓度, 按照试剂盒步骤进行。以亚硝酸盐为标准品绘制标准曲线, 将吸光度转换为亚硝酸盐(Nitrite)浓度(μ M), 以此表示 NO 的浓度。

1.5 统计学处理 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 数据采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。当 $P<0.05$ 时, 表示差异具有统计学意义, $P<0.01$ 时, 表示差异具有显著性统计学意义。

2 实验结果

2.1 TLHT 和 UDCA 的抗氧化能力

标准曲线, 得到直线方程为 $y=0.467x-0.16$, 相关系数 $R^2=0.9998$ 。测定 TLHT 和 UDCA 的吸光度值, 换算为 Trolox 浓度, 以 Trolox 的浓度作为 TLHT 和 UDCA 的抗氧化能力, 即 FRAP 值。不同浓度的 TLHT 和 UDCA 的均具有一定的抗氧化能力。其中 25 μ g/mL 的 TLHT 和 15 μ M 的 UDCA 抗氧化能力最强, 其中 TLHT 的抗氧化能力优于 UDCA。见图 1。

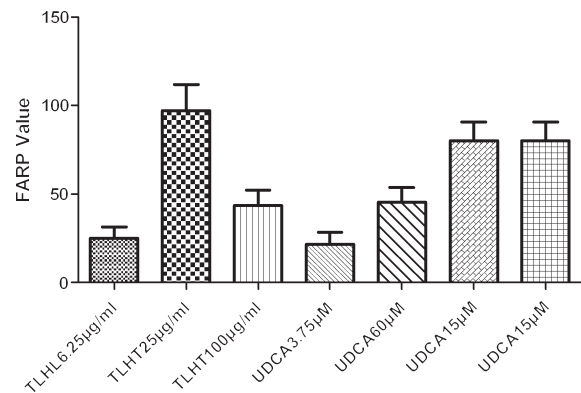


图1 TLHT 和 UDCA 的抗氧化能力

2.2 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元形态的影响 TH 免疫组化染色后, 在 100 倍倒置显微镜下观察可见, 空白组可见光滑、圆形或椭圆形的神经元胞体, 细胞核一般位于胞体正中, 核中呈空泡样。每个胞体可见多个突起, 轴突细长, 清晰可见。MPP+处理的模型组神经元数量明显减少, 细胞核缩小, 神经突起远端断裂或消失, 长度变短, 数量明显减少, 个别神经元仅残存突起的根部。细胞表面不光滑, 少数出现胞体肿胀, 甚至完全空虚。TLHT 和 UDCA 处理后, 神经元胞体形态趋于正常, 轴突数目增多, 长度增加。以两者中剂量处理的细胞形态改善最为明显。两者低、中、高剂量对多巴胺能神经元形态的改善趋势一致。见图 2。

2.3 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元数量和轴突长度的影响 TH 免疫组化染色后, 每孔随机选取 10 个视野, 进行神经元计数, 计算平均值。使用 Image Pro Plus 6 软件测量细胞轴突, 计算神经元轴突的平均长度。经 MPP+诱导损伤后, 神经元数量较对照组减少, 神经元突起长度较对照组缩短, 差异具有显著的统计学意义($P<0.01$)。经不同剂量的 TLHT 处理后, 神经元数量较模型组增加, 神经元突起长度较模型组增长, 其中中剂量组和高剂量组的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。经不同剂量的 UDCA 处理后, 神经元数量较模型组增加, 其中中剂量组和高剂量组对神经元

数量的增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。两者中剂量对神经元轴突长度的影响的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。低、中、高剂量的 TLHT 和相应剂量的

UDCA 对神经元数量和轴突长度的改善作用趋势一致,TLHT 作用优于 UDCA,但差异无统计学意义。见图 3、图 4。

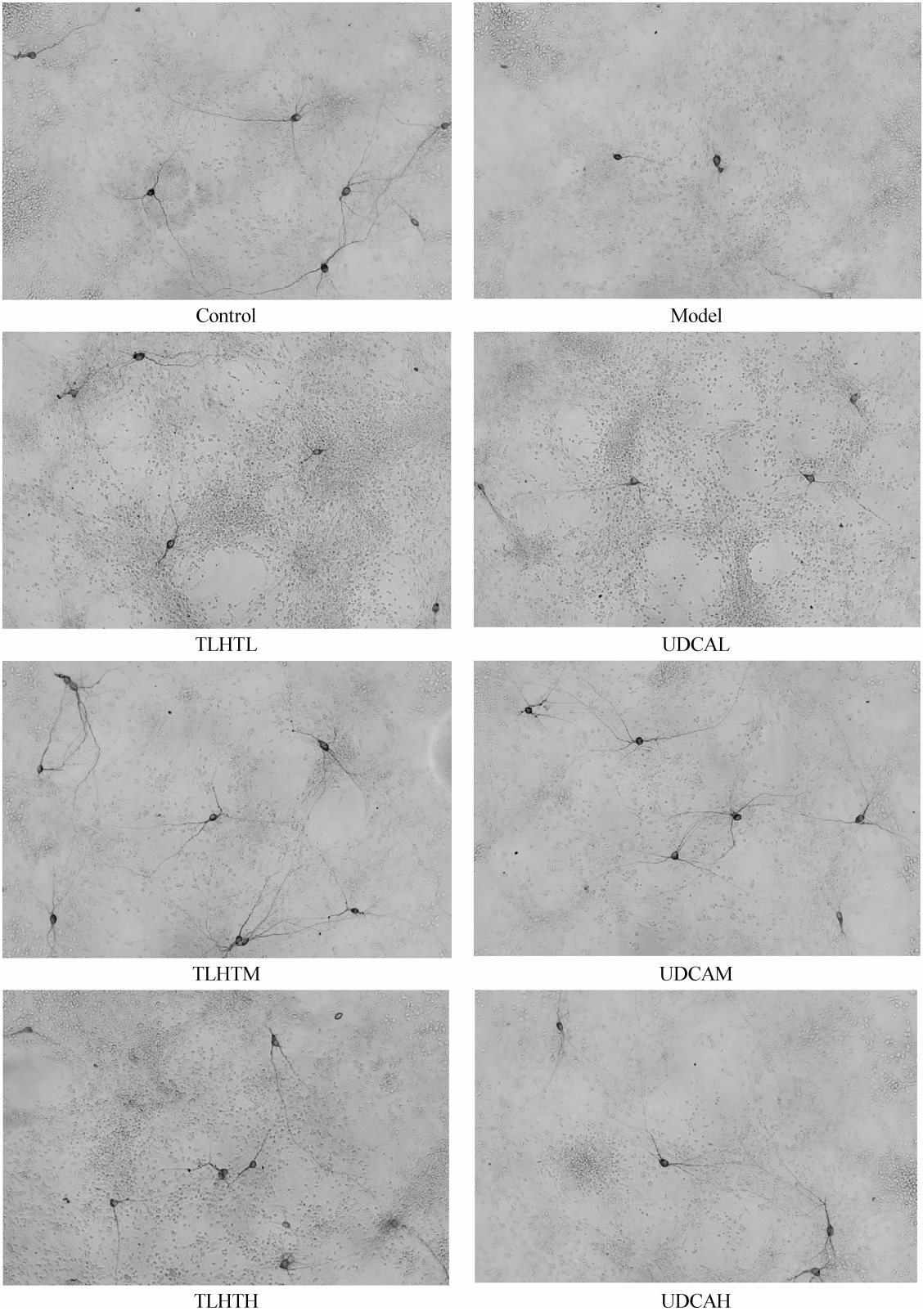


图 2 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元形态的影响(IHC,100×)

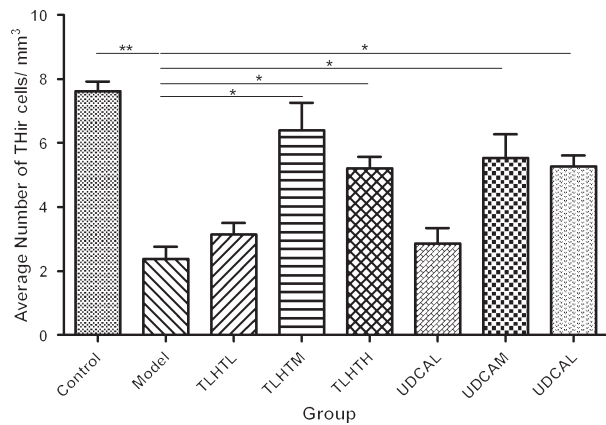


图3 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元数量的影响

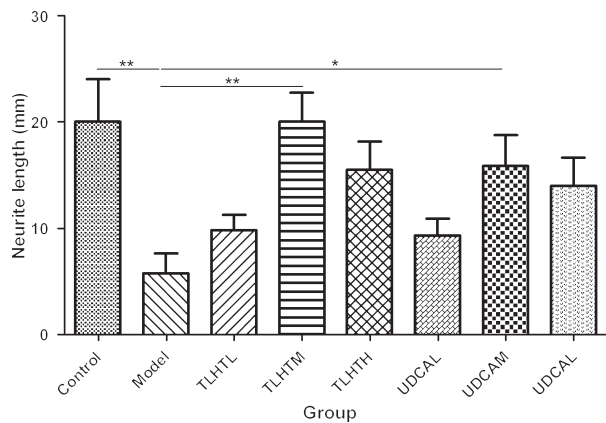


图4 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元轴突长度的影响

2.4 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元存活率和增值的影响 采用 MTT 法测定 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元存活率和增值的影响。MPP+处理 48h 后,与空白组相比,细胞存活率明显下降,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组相比,TLHT 与 UDCA 各剂量对细胞均有一定的增值作用,其中 TLHT 中剂量组与 UDCA 中剂量组对细胞具有明显的增值作用,差异具有显著性统计学意义 ($P<0.01$)。低、中、高剂量的

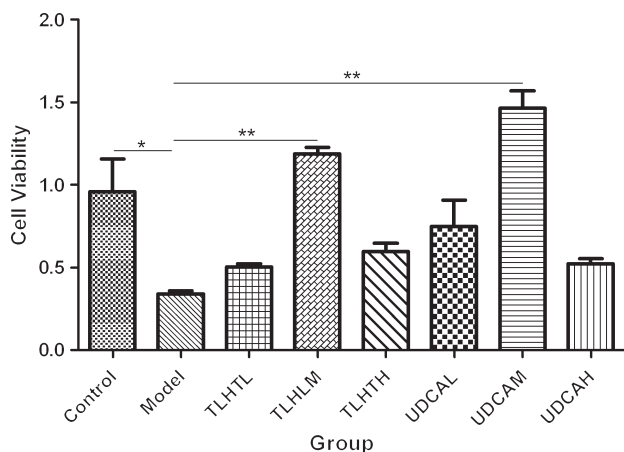


图5 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元存活率和增值的影响

TLHT 与相应剂量的 UDCA 对细胞增值的影响趋势一致,UDCA 略优于 TLHT,但差异无统计学意义。见图 5。

2.5 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元损伤后 NO 释放的影响 采用 Griess 法测定各组 NO 的浓度。和空白组相比,MPP+损伤组的 NO 浓度明显增高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。经 TLHT 与 UDCA 处理后,与模型组相比 NO 的浓度均有所降低,其中 TLHT 中剂量与 UDCA 中剂量对 NO 浓度的影响最为明显,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 6。

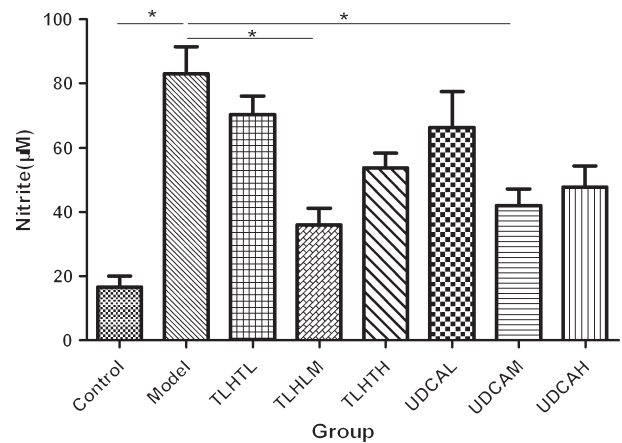


图6 TLHT 和 UDCA 对中脑神经元损伤后 NO 释放的影响

3 讨论

帕金森病的主要病理学表现为多巴胺能神经元的丢失,而引起多巴胺能神经元丢失的分子机制并不明确,大量研究证明,帕金森病与氧化应激密切相关^[14-15]。氧化应激是指体内自由基产生超过人体清除的速率或能力,造成人体组织损伤的一种病理状态^[16]。多种原因如遗传、环境等因素可造成中脑黑质致密部的多巴胺能神经元无法有效清除自由基^[17],如氧自由基(ROS)等。蓄积的自由基可刺激细胞产生各种炎症因子,甚至激活诱导型一氧化氮合酶(iNOS),促使 NO 大量释放^[18]。过量的 NO 不但可以穿透细胞膜,损伤线粒体呼吸链,经过一系列信号通路介导神经细胞的凋亡^[19],而且可以与 ROS 结合生成 ONOO-,作用于效应蛋白质甚至损伤 DNA,加重氧化应激水平,最终造成神经细胞的变性和凋亡^[20]。

传统的抗帕金森药物具有引起认知功能障碍的风险,寻找副作用较少的抗帕金森药物一直是临床焦点。TLHT 是治疗中风的有效中成药,其对缺血性中风的治疗作用已经临床实验验证,疗效确切^[5-7]。动物

实验和细胞实验发现 TLHT 可以提高神经细胞存活率,促进细胞增殖,减少炎症因子释放、抗细胞凋亡等作用^[8-9]。通络化痰胶囊的主要功效为化痰息风,活血通络,与帕金森痰热化风,瘀血阻络的病机相符,根据中医异病同治的理论,课题组猜测通络化痰胶囊对帕金森病具有治疗作用。MPP+是一种神经毒素,可以高度选择性的与大脑黑质结合,破坏黑质神经元,经实验发现其造成的病理改变与帕金森病高度相似^[21],因此实验中多采用 MPP+诱导的中脑细胞作为帕金森病的细胞模型。本实验采用 MPP+诱导中脑神经细胞损伤,通过实验发现,通络化痰胶囊可以改善中脑多巴胺能神经元的形态,促进损伤状态下神经元的增殖,提高细胞存活率,可以减少损伤神经元 NO 的释放。通过 FARP 测定,显示通络化痰胶囊具有一定的抗氧化能力。因此可以推测 TLHT 可能通过减少 NO 的释放、抗氧化应激的途径对中脑多巴胺能神经元起到保护作用。熊胆粉作为 TLHT 的君药,其主要成分 UDCA 同样具有抗氧化损伤,保护神经元的作用,但与 TLHT 相比,对神经元的保护作用稍弱,说明中药复方配伍作用优于单味中药。

中医的异病同治理论是指不同的疾病具有相同的病机,可以用同一种方法进行治疗。虽然中风与帕金森病具有不同的临床表现,但具有相同的根本病机,即痰热动风,瘀血阻络,而在微观水平都可见氧化应激所造成的组织损伤。本实验以治疗中风的有效中成药通络化痰胶囊作用于帕金森病模型,发现其对中脑多巴胺能神经元同样具有保护作用,不但在微观水平为异病同治理论做出了科学阐释,也期望能为中医异病同治理论的科学内涵研究提供借鉴。

参考文献:

- [1] LANG AE, LOZANO AM. Parkinson's disease[J]. Lancet, 1998, 386(9996):896-912.
- [2] PRINGSHEIM T, JETTE N, FROLKIS A, et al. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Mov Disord, 2014, 29(13):1583-1590.
- [3] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组. 中国帕金森病的诊断标准(2016版)[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(4):268-271.
- [4] 王永炎, 张伯礼. 中医脑病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:719
- [5] 马大勇, 韩振蕴, 周杰, 等. 通络化痰胶囊治疗脑梗死恢复期痰瘀阻络证 353 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2012, 53(7):563-567.
- [6] 赵碎巧, 操银针, 李信华, 等. 通络化痰胶囊联合阿托伐他汀对急性脑梗死病人血小板聚集度及炎症因子水平的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(7):685-687.
- [7] 王兆义, 孟昭阳. 他汀联合通络化痰胶囊对痰瘀阻络证冠心病患者相关危险因素的影响 [J]. 医药卫生, 2016(8):45.
- [8] 富苏, 范吉平. 通络化痰胶囊对脑缺血损伤大鼠神经细胞凋亡及缺血半暗带 CytC、caspase-9 和 caspase-3 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013(5):1194-1198.
- [9] 富苏, 韩经丹, 周杰, 等. 通络化痰胶囊对脑缺血损伤大鼠神经细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):242-246.
- [10] 富苏, 范吉平, 王新志. 通络化痰胶囊对 H₂O₂ 所致的 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12):188-193.
- [11] BENZIE IF, STRAIN JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. Anal Biochem 1996; 239(1):70-76.
- [12] KHAN MS, TABREZ S, PRIYADARSHINI M, et al. Targeting Parkinson's -tyrosine hydroxylase and oxidative stress as points of interventions [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(4):369-380.
- [13] MOLAEI N, MOSAYEBI G, PISHDADIAN A, et al. Evaluating the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells using MTT assay [J]. Int J Basic Sci Med, 2017, 2(1):25-28.
- [14] HWANG O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease[J]. Exp Neurobiol 2013, 22(1):11-17.
- [15] LU C, WEI Y, HU R, et al. Transcranial direct current stimulation ameliorates behavioral deficits and reduces oxidative stress in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuromodulation, 2015, 18(6):442-446.
- [16] SALIM S. Oxidative stress and the central nervous system[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 360(1):201-205.
- [17] JIANG T, SUN Q, CHEN S. Oxidative stress: a major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidant agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease[J]. Progress in Neurobiology, 2016, 147:1-19.

(下转第 24 页)

- [9] 李伟君, 李应东. 心肌缺血再灌注损伤钙超载及中医药防治策略[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(2): 217-218.
- [10] 陈蓓蕾, 李晓波, 李军, 等. 短暂性脑缺血发作与 IL-6、IL-8 和 IL-10 的关系 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2013, 21(4): 247-250.
- [11] BROWN G C. Nitric oxide and neuronal death [J]. Nitric Oxide, 2010, 23(3): 153-165.
- [12] 吴海洋. 通督调神针刺对脑缺血再灌注模型大鼠 TNF- α 和 CRP 水平的动态观察[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014.
- [13] ZHANG S, QI Y, XU Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation [J]. Neurochem Int, 2013, 63(5): 522-532.
- [14] ZHANG X, ZHANG X, WANG C, et al. Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- κ B expression, ameliorated BBB permeability[J]. Brain Research, 2012, 1459: 61-70.
- [15] 于凌志, 左艳丽, 贾孟辉, 等. 核转录因子 NF- κ B 对脑缺血再灌注干预机制的研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2015(7): 42-44.
- [16] 万东, 罗勇, 谢鹏. 电刺激小脑顶核对缺血/再灌注大鼠脑组织内 NF- κ B 活性及其活化的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(10): 660-665.
- [17] LUANGSAY S, WITTAMER V, BONDUE B, et al. Mouse ChemR23 Is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6489-6499.
- [18] ROMAN A A, PARLEE S D, SINAL C J. Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes [J]. Endocrine, 2012, 42(2): 243-251.
- [19] RHEE E J. Chemerin: a novel link between inflammation and atherosclerosis[J]. Diabetes Metab J, 2011, 35(3): 216-218.
- [20] 张玲, 张国庆, 朱玲玲, 等. 通督调神针刺法治疗风痰瘀阻型急性脑梗死临床观察 [J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4): 59-62.
- [21] 郑仕平, 韩为, 储浩然, 等. 通督调神针灸预处理对脑缺血再灌注大鼠 miRNA664 及 MMP9 调控机制的研究 [J]. 上海针灸杂志, 2016, 35(1): 76-80.
- [22] 孙培养, 储浩然, 李佩芳, 等. 通督调神针法对脑卒中后抑郁模型大鼠血浆单胺类神经递质的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2013, 29(11): 33-36.
- [23] 孙培养, 储浩然, 李佩芳, 等. 通督调神针刺干预对药物治疗脑卒中后抑郁的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(5): 753-757.

(上接第 6 页)

- [18] KOPRICH J B, RESKE-NIELSEN C, MITHAL P, et al. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease [J]. J Neuroinflammation, 2008, 5(1): 8.
- [19] WU D, TSENG IJ, YUAN RY, et al. Memory consolidation and inducible nitric oxide synthase expression during different sleep stages in Parkinson disease [J]. Sleep Medicine, 2014, 15(1): 116-120.
- [20] HUO Y, RANGARAJAN P, LING EA, et al. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia[J]. BMC Neurosci, 2011, 12(1): 49.
- [21] LANGSTON JW, IRWIN I, LANGSTON EB, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra[J]. Neurosci Lett, 1984, 48(1): 87-92.