DOI:10.16016/j.1000-5404.201602113

大鼠液压冲击脑损伤 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 动态表达变化及意义

高梦颖[1],何永昌[2],孙国柱[2],徐 伟[2],武利伟[2] (050000 石家庄,河北医科大学第二医院:急诊科[1],神经外科[2])

[摘要] **目的** 探讨大鼠液压冲击伤后水肿脑组织核因子 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2,Nrf2)、血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)和磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶-1(NADPH quinineoxidoreductase-1,NQO-1)的表达变化及其意义。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 56 只制作液压冲击颅脑损伤模型,术后 1 h、6 h、12 h、24 h、3 d、7 d 用干湿质量法测定脑组织含水量,Western blot 测定 Nrf2 胞浆、胞核蛋白以及 HO-1、NQO-1 蛋白;用实时荧光定量 PCR 测定 Nrf2 mRNA 表达。**结果** 自冲击伤后 6 h,脑组织含水量开始增加,24h 达高峰,持续至 3 d,然后开始下降($P<0.05$)。组织学观察印证了脑水肿趋势。Western blot 检测结果显示胞浆 Nrf2 蛋白于伤后 12 h 开始持续降低,而胞核 Nrf2 蛋白则于 1h 开始升高,24 h 达到高峰,3 d 时降低,7 d 后明显降低,但仍高于 NC 组($P<0.05$)。HO-1 和 NQO-1 蛋白表达与胞核 Nrf2 蛋白趋势一致。实时荧光定量 PCR 显示 TBI 组术后各时间点 Nrf2 mRNA 表达水平无明显变化($P>0.05$)。**结论** 液压冲击伤后出现核因子 Nrf2 转位激活,可能通过上调 HO-1、NQO-1 蛋白表达发挥神经保护作用。

[关键词] 颅脑液压冲击伤;核因子 2 相关因子 2;血红素氧化酶-1;磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶-1

[中图法分类号] R-332;R642;R651.150.2 [文献标志码] A

Expression of Nrf2, NO-1 and NQO-1 in rat brain following fluid percussion injury

Gao Mengying[1], He Yongchang[2], Sun Guozhu, Xu Wei[2], Wu Liwei[2] ([1]Department of Emergency, [2]Department of Neurosurgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression alternation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), hemeoxygenase-1 (HO-1) and NADPH:quinine oxidoreductase (NQO-1) in rats following fluid percussion injury. **Methods** Traumatic brain injury (TBI) model in rats was established by fluid percussion injury ($n=56$). At 1, 6, 12 and 24 h, and 3 and 7 d after operation, the water content in brain tissues was quantified by dry-wet measurement, and the protein expression levels of Nrf2 (cytoplasm and nuclear), NO-1 and NQO-1 were detected by Western blotting. Also, the mRNA expression of Nrf2 was measured by real-time (RT) PCR. **Results** Comparing with normal control (NC) group, the water content in TBI group increased after 6 h, reaching the peak at 24 h and retaining for 3 d, and then dropped ($P<0.05$). This was in agreement with the edema tendency in injured brain tissue observed by pathohistological staining. Moreover, Western blotting result showed the same change trend in protein expression of Nrf2 in nuclei, NO-1 and NQO-1 but not Nrf2 in cytoplasm. Only after 7 d, their expression was remarkably decreased but still higher than NC group ($P<0.05$). The expression of Nrf2 in cytoplasm was consistently decreased after 12h of the injury. In addition, RT-PCR analysis showed that there were no significant differences in Nrf2 mRNA levels in TBI group at different time points ($P>0.05$). **Conclusion** Nrf2 is translocated and activated in rats following fluid percussion injury, indicating that Nrf2-ARE signaling pathway may be involved in neuro-protection *via* upregulating expression of NO-1 and NQO-1 proteins in TBI.

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2008001084,H2014206383);河北省高层次人才资助项目(A201401041);河北省卫生厅资助课题(20120073,20130178)

[通信作者] 孙国柱,E-mail:sungzh705@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.r.20160707.0930.001.html(2016-07-07)

[**Key words**] fluid percussion injury; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; hemeoxygenase-1; NADPH:quinine oxidoreductase

Surpported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2008001084, H2014206383), the Project for High Talents of Hebei Prouince (A201401041) and the Project of Hebei Provincial Department of Health (20120073, 20130178). Corresponding author: Sun Guozhu, E-mail: sungzh705@163.com

创伤性颅脑损伤(traumatic brain injury,TBI)是严重威胁人类健康特别是中青年人群的重要疾病之一,脑外伤后所诱发的缺血、缺氧启动一系列病理性生化过程,触发瀑布式神经生化降解过程的损伤级联反应,其中伴随氧自由基介导的氧化应激损伤是神经细胞受损的关键病理环节,现有研究亦证实抗氧化应激能够有效减轻继发性脑损伤[1-2]。

最新研究发现,核因子2相关因子2-抗氧化反应原件(nuclear factor e2-related factor 2 -antioxidant response element,Nrf2-ARE)通路是内源性抗氧化系统的核心调控枢纽,在正常情况下Nrf2与Keal1结合位于胞浆内,当受到氧化应激刺激时Nrf2与Keapl解耦连转位进入细胞核,发挥具有强大的抗氧化应激、抗凋亡和抗炎性损伤的细胞保护作用[3]。然而,其在创伤性脑损伤中的动态表达及其调控的下游抗氧化酶变化尚不清楚。本研究通过建立大鼠液压冲击脑损伤模型,观察Nrf2及其下游抗氧化酶血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)和磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶1(NADPH quinineoxidoreductase-1,NQO-1)表达变化,探讨Nrf2-ARE通路对颅脑损伤的神经保护作用,旨在为有效救治颅脑损伤提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雄性SD大鼠56只,体质量250~300 g,购于河北医科大学实验动物中心,兔抗鼠Nrf2多克隆抗体购于美国Bioword公司,兔抗小鼠HO-1和NQO-1单克隆抗体购于美国Santa Cruz公司,浆蛋白和核蛋白提取试剂盒购于深圳碧云天公司,PCR引物由上海生工生物工程公司合成,RNA提取试剂TRIzol Reagent购于美国Invitrogen公司,RNasin、dNTP、M-MLVreverse transcriptase、*Taq* DNA polymers和荧光定量RT-PCR试剂盒购于美国Promega公司,BCA Protein Assay Kit购自美国Pierce公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。Primo R台式高速冷冻离心机购于德国Heraeus公司,SDS-PAGE胶电泳转膜装置购于美国Bio-Rad公司,ABI 7300 Real-time PCR System购于美国ABI公司。

1.2 动物分组和模型制作

将大鼠按随机数字表法分为对照组(NC组)和脑损伤组(TBI组),其中TBI组48只,再按照伤后1 h、6 h、12 h、24 h、3 d、7 d又分为6个亚组,每个亚组8只;NC组共8只。大鼠采用2%戊巴比妥(50 mg/kg,购自Sigma公司)腹腔注射麻醉,TBI组按文献[4]方法制作动物模型,打击强度为0.2 MPa制作中度TBI。NC组,仅切开头皮,凿骨窗,不行液压打击,余同上。喂养标准饲料和饮用纯净水,使用动物专用笼箱和洁净垫料,恒温20~25 ℃饲养,自由进食水。

1.3 标本的制作和采集

NC组大鼠于术后24 h,TBI组各亚组大鼠分别于术后1 h、6 h、12 h、24 h、3 d和7 d各相应时间点,在10%水合氯醛过度麻醉后,断头处死开颅取脑,从损伤区域前缘取约100 mg脑组织,用干湿质量法测脑含水量。经损伤区域切成3 mm左右冠状薄片,在4%多聚甲醛中固定,24 h后,常规进行脱水、透明和石蜡包埋,4 μm切片,HE染色行组织学观察。损伤区域后缘的脑组织按矢状方向分为两份(迅速放于液氮中),其中一份用Western blot检测Nrf2核蛋白、Nrf2胞浆蛋白、HO-1蛋白和NQO-1蛋白含量。另一份用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)来检测Nrf2 mRNA的表达。

1.4 干湿质量法测定脑组织含水量[5]

所取标本先用滤纸吸除表面水分,置电子分析天平(分度值0.0 00 1g)称取湿质量(W),再经110 ℃恒温烤箱烘烤24 h后称取干质量(D)。应用公式:脑组织含水量=(W-D)/W×100%,计算出脑组织含水量。

1.5 免疫组化测定Nrf2

按免疫组织化学常规步骤进行。主要步骤如下:切片于新鲜配制的3% H_2O_2室温浸泡10 min以灭活内源性过氧化物酶;滴加正常山羊血清30 min;滴加一抗Nrf2稀释液(1∶100),恒温下(37 ℃)孵育2 h,PBS洗;滴加二抗生物素化羊抗兔IgG室温下30 min,滴加试剂SABC,室温30 min;DAB显色,室温下20 min;脱水、透明,中性树胶封片。染色对照:同一组片中,分别用正常山羊血清和PBS代替一抗作孵育,其余步骤同上。应用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统,测定阳性染色区域平均光密度值(IOD)。

1.6 Western blot测定Nrf2(胞浆/胞核)蛋白、HO-1蛋白和NQO-1蛋白表达

按照试剂盒说明书提取脑组织标本内核、浆蛋白,简要如下:将上述所取的约100 mg脑组织,置于微量电子天平上称质量,快速剪成小块,加入适量低温缓冲

液 A,使用碾磨器仔细碾磨打成匀浆,4 ℃下震荡裂解 20 min,加入乙基苯基聚乙二醇(NP)-40 液剧烈震荡 10 s 并冰盘上静置 1 min,放入低温离心机 10 000 ×g 离心 3min,上层液体为浆蛋白。下层沉淀物加入 200 μL 预冷的缓冲液 B,震荡混匀,在 4 ℃下震荡裂解 30 min 后,低温离心机 12 000 ×g 离心 10 min,上层蛋白提取物即为核蛋白。

BCA 法蛋白定量检测试剂盒测定提取的核、浆蛋白浓度。经过上样、电泳、转 PVD 膜,醋酸纤维素膜包被后,5% 脱脂牛奶室温封闭,加入一抗 Nrf2 稀释液(1∶500)、HO-1 单抗稀释液(1∶500)、NQO-1 单抗稀释液(1∶2 000),4 ℃孵育过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1∶2 000),37 ℃孵育 1 h,ECL 显色。采用美国 UVP 分析仪器扫描胶片,系统自动生成灰度值进行分析。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 Nrf2 mRNA 表达

按 TRIzol 提取细胞总 RNA,合成 cDNA,目的基因引物序列:Nrf2 上游引物:5′-TTCCTCTGCTGCCATTAGTCAGT-3′;下游引物:5′-GCTCTTCCATTTCCGAGTCACT-3′;片段长度 215 bp。β-actin 上游引物:5′-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3′;下游引物:5′-GCCAGAGCAGTAATCTCCTTC-3′;扩增产物大小为 150 bp。PCR 反应条件为:96 ℃ 4 min,然后 3 步反应:94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共进行 40 个循环,第 3 步 72 ℃ 30 s 收集荧光信号,同时扩增大鼠 β-actin 做内参照,将目的基因的 IOD 值/内参 β-actin 的 IOD 值(RQ 值),代表其 mRNA 相对表达水平,将 RQ 值用于统计分析。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,用单因素方差分析比较多组均数,采用 LSD 检进行两组间比较,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑含水量测定

TBI 后 1 h,TBI 组脑含水量稍升高,与 NC 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),6 ~ 12 h 明显升高($P < 0.05$),24 h 达到高峰($P < 0.05$),3 d 开始下降($P < 0.05$),7 d 仍高于正常($P < 0.05$,表 1)。

2.2 组织学观察

大体观察发现 TBI 组大鼠冲击伤灶处存在弥散性硬膜下出血,局部脑实质有程度一致的脑挫裂伤,同时合并蛛网膜下腔出血和脑室内出血。

显微镜下发现 NC 组大鼠硬膜、脑组织标本完整,神经细胞排列有序,形态正常,核仁呈淡染蓝色并核膜完整,无出血、水肿等损伤改变。TBI 组脑组织标本 1 h 可见明显的挫伤灶、点片状出血,但损伤灶周神经细胞未出现胞浆空泡样变性;6 h 挫伤灶组织崩解,其周围神经细胞变形及出现轻度空泡样变性,血管外间隙扩大。12 h 胞浆空泡样变性较前加重,24 h 时神经细胞体积明显增大,胞浆嗜酸性变伴大量空泡样变性,且该类变性细胞数量增多,伴有胶质细胞增生;神经元及胶质细胞周围水肿,间隙变宽。3 d 时上述细胞变性和水肿程度较前有所减轻(图 1),7 d 时水肿明显减退,但胶质细胞增生显著。

2.3 Nrf2 在脑组织中的动态表达

在 NC 组中 Nrf2 其主要表达在神经元和胶质细胞的胞浆中。TBI 组,Nrf2 在损伤侧的皮质中表达主要在神经元和胶质细胞的胞核和胞浆中,胞核更为明显。伤后 1 h 开始增高,6 h 到 12 h 逐渐增高,24 h 达到高峰,随后逐渐降低。与 NC 组比较各时间点均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1,图 2)。

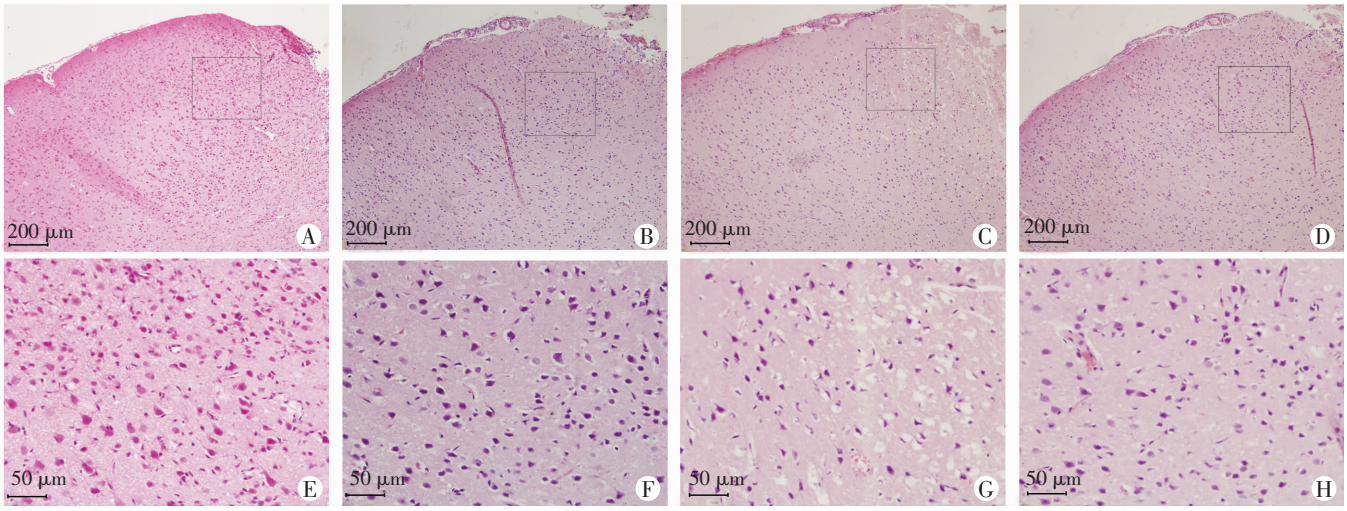
2.4 Nrf2(胞浆/胞核)蛋白、HO-1 蛋白和 NQO-1 蛋白在脑组织中的动态表达

Western blot 检测结果显示,大鼠挫伤灶灶周围脑组织中胞浆和胞核 Nrf2 具有相反趋势的动态。NC 组胞浆 Nrf2 呈明显表达,TBI 组自 12 h 开始持续降低,与 NC 组对比差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。NC 组胞核 Nrf2 呈少量表达,TBI 组各时间点 Nrf2 蛋白表达均有上调,其中于 1h 开始升高,6 h 继续增高,24 h 达到高峰,3 d 时降低,7 d 后明显降低,但仍高于 NC 组,与 NC 组对比差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1,图 4)。

表 1 各组大鼠不同时间点脑含水量和 Nrf2(胞浆/胞核)蛋白以及 mRNA、HO-1 h 和 NQO-1 蛋白的相对表达量比较 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

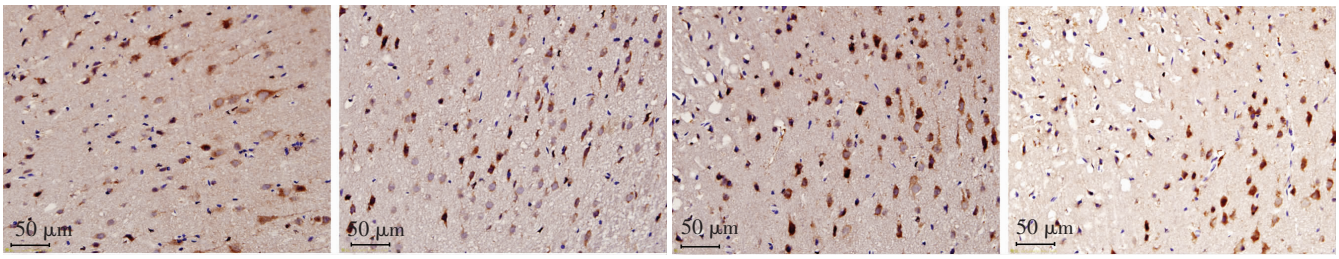
组别		脑含水量(%)	Nrf2 组化	胞浆 Nrf2	胞核 Nrf2	HO-1	NQO-1	Nrf2 mRNA
NC 组		78.07 ±0.97	0.246 ±0.03	1.44 ±0.16	0.23 ±0.02	0.20 ±0.08	0.15 ±0.05	0.21 ±0.02
TBI 组	1 h	78.24 ±0.66	0.36 ±0.03[a]	1.42 ±0.09	0.36 ±0.04[a]	0.31 ±0.07[a]	0.34 ±0.09[a]	0.24 ±0.05
	6 h	78.98 ±0.52[a]	0.59 ±0.04[a]	1.45 ±0.18	0.51 ±0.06[a]	0.52 ±0.08[a]	0.45 ±0.12[a]	0.23 ±0.02
	12 h	81.88 ±0.75[a]	0.87 ±0.06[a]	1.32 ±0.17[a]	0.62 ±0.05[a]	0.61 ±0.05[a]	0.54 ±0.10[a]	0.24 ±0.04
	24 h	82.98 ±0.62[a]	1.29 ±0.11[a]	1.03 ±0.16[a]	0.83 ±0.03[a]	0.80 ±0.04[a]	0.62 ±0.13[a]	0.25 ±0.06
	3 d	82.06 ±0.72[a]	1.05 ±0.12[a]	0.84 ±0.14[a]	0.61 ±0.02[a]	0.78 ±0.06[a]	0.51 ±0.09[a]	0.240 ±0.07
	7 d	79.04 ±0.54[a]	0.43 ±0.02[a]	0.56 ±0.08[a]	0.44 ±0.05[a]	0.45 ±0.06[a]	0.42 ±0.13[a]	0.23 ±0.07

a:$P < 0.05$,与 NC 组比较



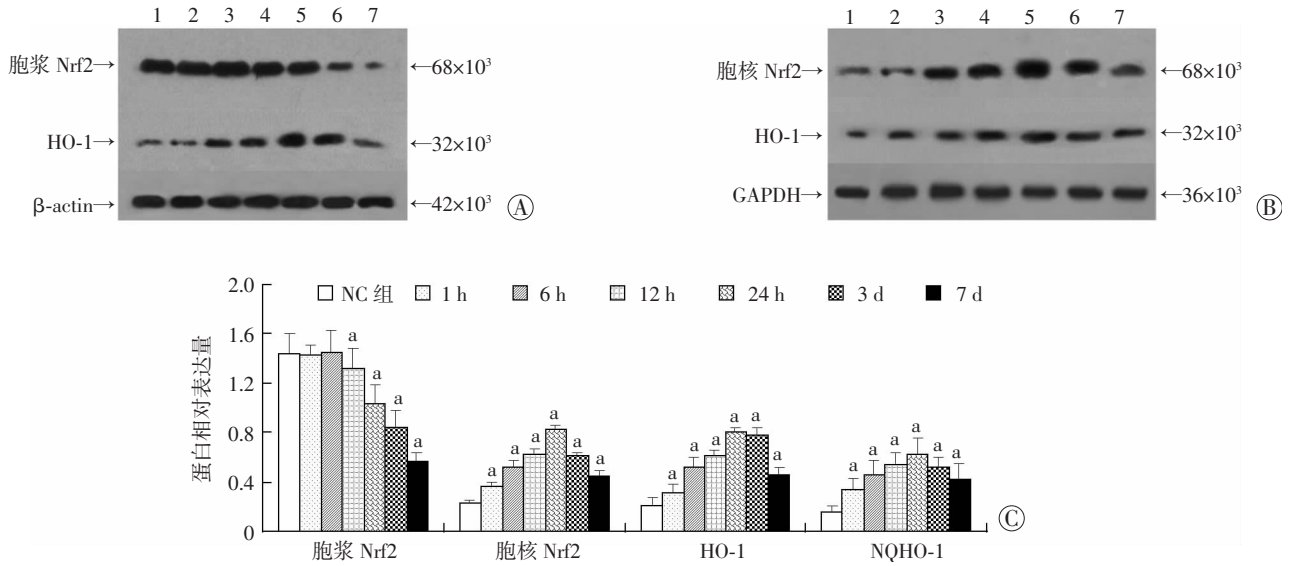
A、E:6 h; B、F: 12 h; C、G: 24 h; D、H: 3 d;E~H:A~D 的局部放大

图 1　TBI 组大鼠不同时间点脑组织损伤灶周围水肿的病理学变化　(HE)



A: 6 h;B: 12 h;C: 24 h;D: 3 d

图 2　TBI 组大鼠不同时间点脑组织损伤灶周围水肿的 Nrf2 表达　(S-P)



A:胞浆 Nrf2 和 HO-1 蛋白;B:胞核 Nrf2 和 NQO-1 蛋白　1: NC; 2: 1 h; 3: 6 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 3 d; 7: 7 d;C:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与 NC 组比较

图 3　Western blot 检测不同时间点胞浆 Nrf2 和 HO-1 蛋白及胞核 Nrf2 和 NQO-1 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示,NC 组大鼠脑组织中 HO-1 和 NQO-1 蛋白均有少量表达,TBI 组各时间点 HO-1 和 NQO-1 蛋白表达均有上调,其中于 1 h 开始升高,6 h 继续增高,24 h 达到高峰,3 d 时降低,7 d 后明显降低,但仍高于 NC 组,与 NC 组对比差异有统计学意义($P<0.05$,表 1,图 3)。

2.5 Nrf2 mRNA 在脑组织中的动态表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,NC 组中 Nrf2 mRNA 有少量表达。TBI 组个时间点 Nrf2 mRNA 表达水平无明显变化,与 NC 组比较差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

3 讨论

Nrf2 是近年来新发现的一种核转录因子,氧化应激刺激或疾病可激活 Nrf2-ARE 信号通路,诱导上调其下游的一系列内源性的保护基因,例如抗氧化酶、激活钙离子稳态蛋白和解毒蛋白酶等[6],有效抵抗自由基等活性物质及一些毒性物质的侵害,发挥着抗炎、抗凋亡、免疫调节、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗缺血再灌注损伤和肺纤维化等重要作用,在中枢神经系统疾病中的有益作用也日益得到重视[7]。但在颅脑创伤方面有关 Nrf2-ARE 信号通路及其下游因子的激活规律系统研究较少。

颅脑损伤的病理生理过程包括原发性损伤和继发性损伤,前者由于瞬间机械性冲击所致,后者为损伤后启动的一系列生化过程引起的继发性、进行性损伤。继发性脑损伤是临床干预的重点,其过程包括缺血、缺氧诱发大量的活性氧和自由基,触发脂质过氧化,蛋白质氧化及水解,核酸链断裂等一系列瀑布式级联反应,加重细胞损伤。HO-1 和 NQO-1 是机体内抗氧化应激性损伤的两种主要蛋白,其通过强大的抗氧自由基与抗凋亡发挥神经保护作用[6]。二者均属于二相酶,前者可催化形成胆绿素、胆红素、铁离子。胆绿素和胆红素是体内强有力的自由基清除剂,具有广谱抗氧化能力,铁蛋白是神经系统内铁贮存的主要形式,其重链具有抗氧化酶活性,是细胞内抗氧化损伤能力的有力保护剂[8];NQO-1 是广泛存在于真核生物细胞的黄素蛋白酶,借助 NADH 或 NADPH 作为电子供体,催化醌类物质发生还原反应,降解醌类及其衍生物,阻止其进一步参与氧化还原反应和 ROS 的产生,发挥抗氧化应激作用[9]。本研究 Western blot 检测结果显示,液压冲击伤后 HO-1 和 NQO-1 蛋白于 1h 开始升高, 24 h 达到高峰,3 d 时开始降低。有趣的是,其与脑组织水含量和组织学恶化趋势一致,提示为应对 TBI 后一系列逐渐加重的继发性神经损伤过程,机体启动了内源性防御机制,通过诱导 HO-1 和 NQO-1 蛋白表达增高来增强了其自身的抗氧化能力、抗损伤能力,参与内源性抗损伤和神经修复过程。

Nrf2-ARE 信号通路通过调控下游一系列抗氧化和解毒酶基因的转录来实现的其保护作用,其中 HO-1 和 NQO-1 是 Nrf2-ARE 信号通路调控的主要下游靶基因[10]。本研究发现 TBI 组胞浆 Nrf2 自 12 h 开始持续降低,胞核 Nrf2 则于 1 h 开始升高,24 h 达到高峰,3 d 时降低,提示 Nrf2 在液压冲击脑损伤中出现 Nrf2 自胞浆向胞核转位。结合 HO-1 和 NQO-1 蛋白表达与胞核 Nrf2 的表达趋势一致,提示在液压冲击脑损伤中出现 Nrf2-ARE 信号通路及其下游因子的激活,可能参与了自身抗神经损伤和修复过程。Zhang 等[11]研究发现在蛛网膜下腔大鼠脑组织中 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 表达均增高,应用 Nrf2 激活剂后 HO-1 和 NQO-1 表达进一步增高,MDA 浓度、MPO 活性和 ROS 含量出现降低。Yin 等[12]发现脑出血后大鼠脑组织中 Nrf2 和 HO-1 及其 mRNA 表达增高,应用 Nrf2 激活剂莱菔硫烷能增加两者表达,脑水肿程度和神经功能评分明显好转。Chen 等[13]在脑梗死大鼠模型中也证实 Nrf2、HO-1 和 SOD 蛋白增高,上调 Nrf2 表达能够增高 HO-1、SOD 蛋白表达和降低 NF-κB 和 MDA 表达,减轻脑梗死性脑损伤。Li 等[14]研究脑梗死小鼠,发现敲除 Nrf2 基因引起 HO-1 降低和炎性因子表达增高,导致脑梗死范围增大和神经功能恶化。值得一提的是,本研究发现液压冲击伤 Nrf2 mRNA 在 TBI 的表达随时间变化无明显差异,说明 Nrf2 发挥作用可能发生在基因转录后水平,而不是在基因转录水平,与郑海燕的结果相一致[15]。而 Yang 等[16]发现大鼠大脑中动脉闭塞后 Nrf2 蛋白及其 mRNA 则表达均增高,表明 Nrf2 调控活性表达即可发生在转录水平,也可在转录后水平,可能与实验条件及模型制作类型不同有关。

总之,本研究探讨 Nrf2 以及 HO-1、NQO-1 在液压冲击伤中的表达变化规律,证明了 Nrf2 及其下游抗氧化酶可能在创伤性颅脑损伤中发挥神经保护作用。

参考文献:

[1] Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, *et al*. Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(8): 836-853. DOI: 10.1089/ars.2012.4981

[2] Mao X, Hao S, Zhu Z, *et al*. Procyanidins protects against oxidative damage and cognitive deficits after traumatic brain injury[J]. Brain Inj, 2015, 29(1): 86-92. DOI: 10.3109/02699052.2014.968621

[3] Sasaki S, Tozawa T, Sugamoto K, *et al*. A novel di terpene para-hydroquinone compound derived from cryptoquinone protects neuronal cells against oxidative stress and activates the

Nrf2/ARE pathway[J]. Neurosci Lett, 2013, 548: 132 - 136. DOI: 10.1016/ j.neulet. 2013.04.047

[4] 孙国柱, 刘性强, 王目纲, 等. 一种大鼠液压冲击脑损伤装置的研制[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(5): 749 - 750. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2011.05.036

[5] 孙国柱, 赵宗茂, 杨雷芳, 等. 实验性大鼠液压冲击脑损伤神经功能评分与脑水肿、水通道蛋白4表达的关系[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2012,21(5): 392 - 394. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2012.05.003

[6] Tanaka N, Ikeda Y, Ohta Y, *et al*. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion[J]. Brain Res, 2011, 1370: 246 - 253. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.11.010

[7] Zenkov N K, Menshchikova E B, Tkachev V O. Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target[J]. Biochemistry (Mosc), 2013, 78(1): 19 - 36. DOI: 10.1134/ S0006297913010033

[8] Lee J Y, Park J M, Hong J A, *et al*. Serum Ferritin Is Differentially Associated with Anti-oxidative Status and Insulin Resistance in Healthy Obese and Non-obese Women[J]. Korean J Fam Med, 2012, 33(4): 205 - 210. DOI: 10.4082/kjfm. 2012.33.4.205

[9] Siegel D, Gustafson D L, Dehn D L, *et al*. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger[J]. Mol Phammcol, 2004, 65(5): 1238 - 1247. DOI: 10.1124/mol.65. 5.1238

[10] Li P, Su L, Li X, *et al*. Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury *via* upregulating expression of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in mice[J]. Int J Neurosci, 2016, 126(6): 552 - 559. DOI: 10.3109/ 00207454.2015.1042973

[11] Zhang Y, Sun J, Zhu S, *et al*. The role of rhynchophylline in alleviating early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Brain Res, 2016, 1631: 92 - 100. DOI: 10.1016/j.brainres. 2015.11.035

[12] Yin X P, Chen Z Y, Zhou J, *et al*. Mechanisms underlying the perifocal neuroprotective effect of the Nrf2-ARE signaling pathway after intracranial hemorrhage[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 5973 - 5986. DOI: 10.2147/dddt.s79399

[13] Chen L, Wang L, Zhang X, *et al*. The protection by octreotide against experimental ischemic stroke: up-regulated transcription factor Nrf2, HO-1 and down-regulated NF-κB expression[J]. Brain Res, 2012, 1475: 80 - 87. DOI: 10.1016/j.brainres.2012. 07.052

[14] Li L, Zhang X, Cui L, *et al*. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice[J]. Brain Res, 2013, 1497: 32 - 39. DOI: 10. 1016/ j.brainres. 2012.12.032

[15] 郑海燕, 洪远, 陈高. Nrf2-ARE在大鼠创伤性脑损伤模型中的表达及意义[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(1): 80 - 84. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2013.01.026

[16] Yang C, Zhang X, Fan H, *et al*. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia[J]. Brain Res, 2009, 1282: 133 - 141. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.05.009

(**收稿**:2016-02-28;**修回**:2016-06-15)

(编辑 王小寒)