

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00708

· 论 著 ·

白藜芦醇在缺氧缺糖再灌注损伤不同时间窗对大鼠皮质神经元氧化应激的影响

沈长波, 黄家贵, 张黎黎, 刘舒, 徐兰, 杨琴*

重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究白藜芦醇在缺氧缺糖再灌注损伤不同时间窗对大鼠皮质神经元氧化应激的影响。**方法** 大鼠皮质神经元缺氧缺糖处理 150 min, 随即恢复正常培养 24 h。实验分为 6 组, 即正常组、模型组、白藜芦醇预处理组(在缺氧缺糖前加入白藜芦醇干预 24 h)、造模时处理组(从缺氧缺糖开始加入白藜芦醇干预直至再灌注损伤后 24 h)、造模后处理组(从缺氧缺糖后加入白藜芦醇干预直至再灌注损伤后 24 h)和全程处理组(从缺氧缺糖前 24 h 开始加入白藜芦醇干预直至再灌注损伤后 24 h)。倒置显微镜下观察细胞形态, 用化学比色法测定神经元超氧化物歧化酶(SOD)活性以及一氧化氮(NO)的含量, 免疫荧光检测观察核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)的核移位情况, 免疫印迹法检测神经元 Nrf2、血红素加氧酶 1(HO-1)和苯醌氧化还原酶(NQO-1)蛋白表达。**结果** 培养至第 6 天, 神经元立体感及折光性强。与模型组比较, 在白藜芦醇全程处理组中, 各浓度(10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇均可升高神经元 SOD 活性($P < 0.05$), 降低 NO 含量($P < 0.05$), 其中以 40 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇作用最佳; 在缺氧缺糖再灌注损伤的不同时间窗内给予白藜芦醇干预, 均能减轻缺氧缺糖再灌注导致的细胞损伤, 促进 Nrf2 蛋白从细胞质转移到细胞核, 上调 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白的表达, 其中全程处理组作用最佳, 其次为预处理组。**结论** 白藜芦醇对缺氧缺糖再灌注损伤的神经元有剂量依赖性的抗氧化应激作用, 而且全程处理组作用最佳, 预处理组次之。其机制可能是通过激活 Nrf2/抗氧化反应元件(ARE)信号通路而上调抗氧化蛋白的表达而实现。

[关键词] 白藜芦醇; 氧化性应激; 缺氧缺糖; 再灌注损伤; 神经元

[中图分类号] R 743.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0708-06

Effect of resveratrol on oxidative stress of rat primary cortical neurons during different time windows of oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury

SHEN Chang-bo, HUANG Jia-gui, ZHANG Li-li, LIU Shu, XU Lan, YANG Qin*

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of resveratrol on oxidative stress of rat primary cortical neurons during different time windows of oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/RP) injury. **Methods** Rat cortical neurons were cultured under oxygen and glucose deprivation for 150 min and returned to normal culture for 24 h. The experiment was divided into 6 groups, including the normal group, model group, pre-treatment group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD), OGD-treatment group (treated with resveratrol during 150 min of OGD and 24 h of reperfusion), post-treatment group (treated with resveratrol during 24 h of reperfusion), and the whole processing group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD, during 150 min of OGD, and 24 h of reperfusion). Invert microscope was used to observe cell morphology. Chemical colorimetry was used to detect the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of nitric oxide (NO). Immunofluorescence was used to detect the nuclear translocation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Western blotting analysis was used reveal the the protein expressions of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and NADP (H):quinone oxidoreductase-1 (NQO-1). **Results** The stereoscopic effect and refraction of neurons were enhanced at the sixth day of culture. Compared with the model group, resveratrol of various concentrations (10, 20, 40, 60 and 80 $\mu\text{mol/L}$) significantly elevated the activity of SOD and decreased NO content in the whole processing group ($P < 0.05$), with the effect being the best when at 40 $\mu\text{mol/L}$. Compared with model group, resveratrol significantly alleviated neuronal OGD/RP injury, promoted

[收稿日期] 2013-02-25 **[接受日期]** 2013-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071119), 重庆市卫生局科研基金(2009-2-359). Supported by National Natural Science Foundation of China (81071119) and Grant from Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-359).

[作者简介] 沈长波, 硕士生. E-mail: changbo529@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012008, E-mail: xyqh200@126.com

translocation of Nrf2 from the cytoplasm into the nuclei, and upregulated Nrf2, HO-1 and NQO-1 protein expression at all stages of OGD/RP injury, with the best effect found in the whole processing group, followed by the pre-treatment group.

Conclusion Resveratrol has a dose-dependent anti-oxidative stress effect on rat cortical neurons during OGD/RP injury, with the best effect seen in the whole processing group, followed by the pre-treatment group. The mechanism might be associated with activation of Nrf2/antioxidant response element (ARE) signaling pathway and the subsequent upregulation of antioxidant protein expression.

[Key words] resveratrol; oxidative stress; oxygen and glucose deprivation; reperfusion injury; neuron

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7): 708-713]

缺血性脑卒中是严重危害人类健康的疾病,其病理生理机制十分复杂。其中氧化应激损伤是其核心病理环节^[1]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路能调节抗氧化酶的转录和表达,增强细胞抗氧化应激损伤能力,减轻脑缺血再灌注损伤^[2]。白藜芦醇是一种天然植物中的多酚类物质,具有抗氧化、清除自由基等多种药理活性^[3]。白藜芦醇预处理或后处理均可减轻脑缺血再灌注损伤^[4],但在何时用药效果最佳,其保护机制如何,目前尚不清楚。本实验采用大鼠皮质神经元缺氧缺糖再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/RP)损伤模型模拟体内脑缺血再灌注,在缺氧缺糖再灌注损伤不同时间窗内给予白藜芦醇干预,观察其对神经元的抗氧化应激作用、最佳给药时间以及对 Nrf2/ARE 信号通路的影响,探讨白藜芦醇的神经保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 健康新生 24 h 内 SD 大鼠,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)20070001。神经基础培养液、B27、L-谷氨酰胺购自 Gibco 公司,DMEM/F12 培养液、D-Hanks 液购自 HyClone 公司,白藜芦醇(纯度 99%)购自陕西慈缘生物技术有限公司。兔抗 Nrf2、山羊抗苯醌氧化还原酶(NQO-1)多克隆抗体购自 Abcam 公司,兔抗血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 大鼠原代皮质神经元的培养 参考文献[5]的方法,无菌条件下分离出 SD 大鼠大脑皮质,小心剥离表面的脑膜和血管并去除海马部分,将其剪成约

1 mm³的小块。加入 0.125% 胰蛋白酶后置于培养箱中消化 30 min,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化,用刻度吸管吹打制成细胞悬液,并经过悬浮、离心、过滤等步骤收集细胞。用 0.4% 锥虫蓝拒染法计数活细胞后,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液制成细胞悬液,将细胞接种于预先用多聚赖氨酸处理的孔板中,置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养。当细胞培养 6 h 贴壁后,将培养液更换为含有 2% B27、0.5 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素/0.1 mg/mL 链霉素的神经基础培养液,以后每 2 d 换液 1 次。细胞培养至 6 d 时可用于实验。

1.3 大鼠皮质神经元缺氧缺糖再灌注损伤模型的构建 参考文献[5]的方法,除去神经基础完全培养液, D-Hanks 液清洗 3 次,将培养液改为 D-Hanks 液,置于 37℃ 细胞缺氧培养箱培养 150 min,通以厌氧混合气体(95% N₂和 5% CO₂)。缺氧缺糖后将细胞培养液更换为含有 2% B27 的神经基础培养液并置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养 24 h。

1.4 实验分组与药物干预时间窗 (1)从缺氧缺糖前 24 h 开始加入不同浓度白藜芦醇(10、20、40、60、80 μmol/L)直至再灌注损伤后 24 h 进行全程干预,以摸索最佳保护浓度。(2)将细胞分为 6 组,即正常(normal)组,模型(model)组,白藜芦醇预处理(pre-treatment)组、白藜芦醇造模时处理(OGD-treatment)组、白藜芦醇造模后处理(post-treatment)组和白藜芦醇全程处理(whole processing)组。白藜芦醇预处理组在缺氧缺糖前加入白藜芦醇干预 24 h;造模时处理组从缺氧缺糖开始加入白藜芦醇干预直至再灌注损伤后 24 h;造模后处理组从缺氧缺糖后加入白藜芦醇干预直至再灌注损伤后 24 h;全程处理组从缺氧缺糖前 24 h 开始加入白藜芦醇干预直至再灌注损伤后 24 h。在实验过程中,应用倒置显微镜观察细胞形态。

1.5 大鼠皮质神经元缺氧缺糖再灌注损伤后 SOD

活性及 NO 含量的测定 大鼠皮质神经元再灌注损伤 24 h 后提取细胞蛋白,采用化学比色法测定 SOD 活性和 NO 含量,操作按照试剂盒说明进行。实验重复 4 次,每次每组各设 3 个复孔。

1.6 免疫荧光检测观察 Nrf2 的核移位情况 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;4%多聚甲醛溶液室温下固定 15 min,PBS 洗涤 3 次;0.3% Triton X-100 室温下破膜 5~10 min,再用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;10% 山羊血清封闭 30 min,吸去血清,不洗;各组加入兔抗 Nrf2 一抗 4℃ 过夜,空白对照组用 PBS 代替一抗;PBS 洗涤 3 次,加入荧光标记二抗,室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,用 PI 染核 2 min,PBS 洗涤 3 次,50% 甘油封片,荧光显微镜观察拍照。实验重复 3 次。

1.7 免疫印迹法检测神经元 Nrf2、HO-1 及 NQO-1 蛋白表达 收取细胞,加入 200 μL 添加了苯甲基磺酰氟(PMSF)的细胞质蛋白抽提试剂 A,剧烈涡旋 5 s,冰浴 10 min;加入 10 μL 细胞质蛋白抽提试剂 B,剧烈涡旋 5 s,冰浴 1 min;剧烈涡旋 5 s,4℃ 12 000×g 离心 5 min,上清为抽提得到的细胞质蛋白;完全吸尽上清,加入 50 μL 添加了 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂,剧烈涡旋 30 s,冰上裂解 30 min,每隔 2 min 再剧烈涡旋 30 s;4℃ 12 000×g 离心 10 min,上清即为抽提得到的细胞核蛋白。收取细胞,加入 RIPA 细胞裂解液 200 μL 及 100 mmol/L PMSF 2 μL,冰上裂解 30 min,4℃ 12 000×g 离心 10 min,上清即为总蛋白。Bradford 法检测蛋白浓度。取 30~40 μg 蛋白用 SDS-PAGE 分离后电转移至 PVDF 膜上。取出膜用脱脂奶粉封闭 1 h,然后置于杂交袋中,加入兔抗 Nrf2 或兔抗 HO-1 或山羊抗 NQO-1 一抗 4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 10 min×3 次,HRP 标记的二抗 37℃ 孵育 1 h, TBST 漂洗 10 min×3 次。PVDF 膜上覆盖足量 ECL 发光试剂,化学发光显色,照相。用 Quantity One 4.6.2 软件对图像进行分析,以目的条带与 β-actin 光密度的比值作为蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-*q* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 大鼠原代皮质神经元的生长 在倒置相差显微镜下观察,接种初期皮质神经元呈圆形,体积小,

6 h 时细胞全部贴壁,并有短小的突起生成。3~4 d 时细胞有明显增长的突起并相互连接形成稀疏的网络,神经元以双极和多极神经元为主,胞体呈椭圆形或三角形,6 d 时神经元细胞体进一步增大,突起增粗、增长,细胞立体感及折光性强。

2.2 白藜芦醇对神经元缺氧缺糖再灌注损伤后 SOD 活性及 NO 含量的影响 检测结果(图 1)显示,与模型组相比,白藜芦醇全程处理组中,各浓度(10、20、40、60、80 μmol/L)白藜芦醇均能增强神经元 SOD 活性($P < 0.05$),白藜芦醇浓度为 40 μmol/L 时 SOD 活性最高;而各浓度白藜芦醇均能降低神经元 NO 含量($P < 0.05$),白藜芦醇浓度为 40 μmol/L 时 NO 含量最低。结果表明 40 μmol/L 白藜芦醇的作用最佳。因此,我们选择 40 μmol/L 白藜芦醇进行后续研究。

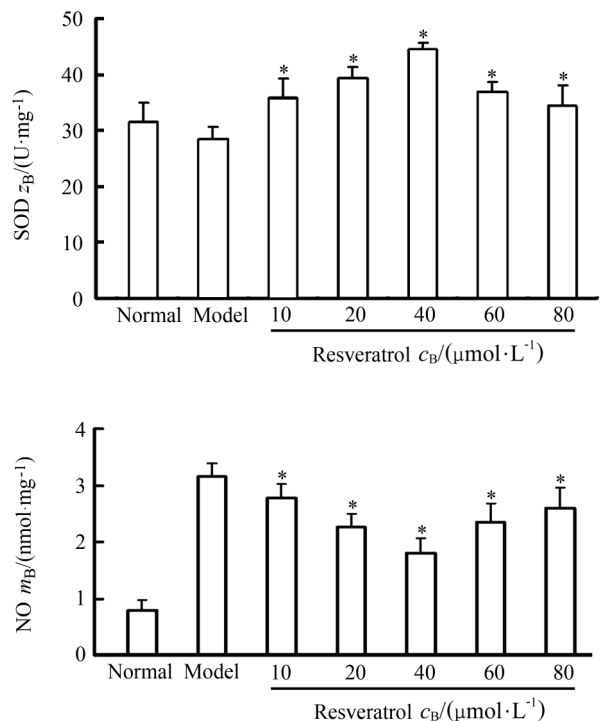


图 1 全程处理组各浓度白藜芦醇对神经元缺氧缺糖再灌注损伤后 SOD 活性和 NO 含量的影响

Fig 1 Effects of resveratrol of different concentrations on activity of SOD and content of NO after neuronal OGD/RP injury in whole processing group

OGD/RP: Oxygen-glucose deprivation/reperfusion; SOD: Superoxide dismutase; NO: Nitric oxide. * $P < 0.05$ vs model group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

2.3 白藜芦醇在不同时间窗对神经元缺氧缺糖再灌注损伤后细胞形态学的影响 在倒置相差显微镜下观察,正常组神经元立体感强,突起相互连接成

网(图 2A)。模型组细胞经过缺氧缺糖再灌注损伤后,轮廓模糊,胞体肿胀,突起变短或者消失,有部分细胞死亡(图 2B)。与模型组相比,白藜芦醇各组细

胞轮廓相对清晰,仍可见细胞间网络,死亡以及肿胀细胞数目减少,其中以全程处理组细胞损伤最小,预处理组次之(图 2C~2F)。

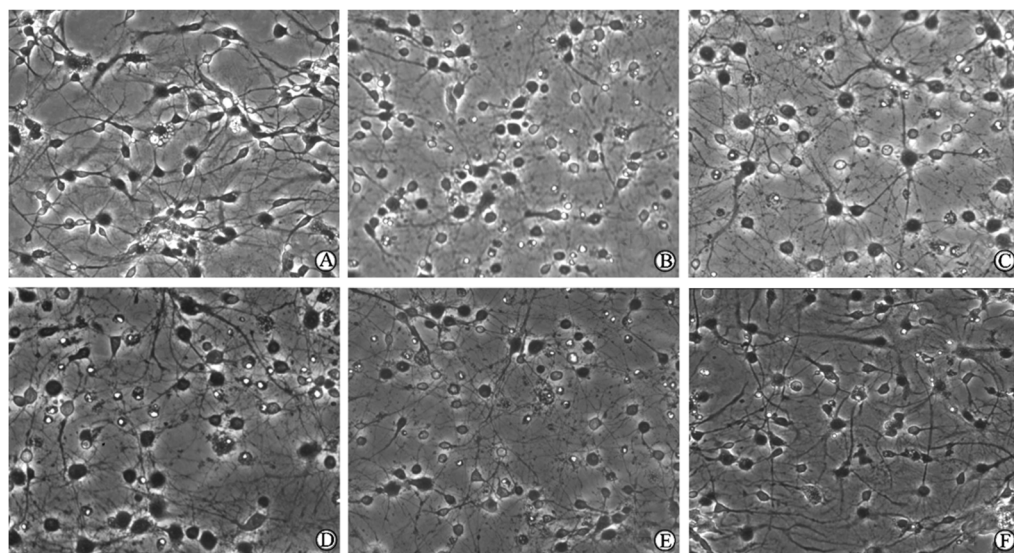


图 2 各组大鼠神经元缺氧缺糖再灌注损伤后细胞形态学变化

Fig 2 Morphologies of rat neurons in different groups after oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/RP) injury

A: Normal group; B: Model group; C: Pre-treatment group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD); D: OGD-treatment group (treated with resveratrol during 150 min of OGD and 24 h of reperfusion); E: Post-treatment group (treated with resveratrol during 24 h of reperfusion); F: Whole processing group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD, during 150 min of OGD, and 24 h of reperfusion). Original magnification: $\times 200$

2.4 白藜芦醇对蛋白 Nrf2 核移位的影响 免疫荧光检测结果显示,在正常组,Nrf2 主要表达于细胞质(图 3A、3B),经过缺氧缺糖再灌注损伤后,部分

Nrf2 转移到细胞核(图 3C、3D)。在白藜芦醇预处理组,不管是否经历缺氧缺糖再灌注损伤,Nrf2 均转移到细胞核(图 3E~3H)。

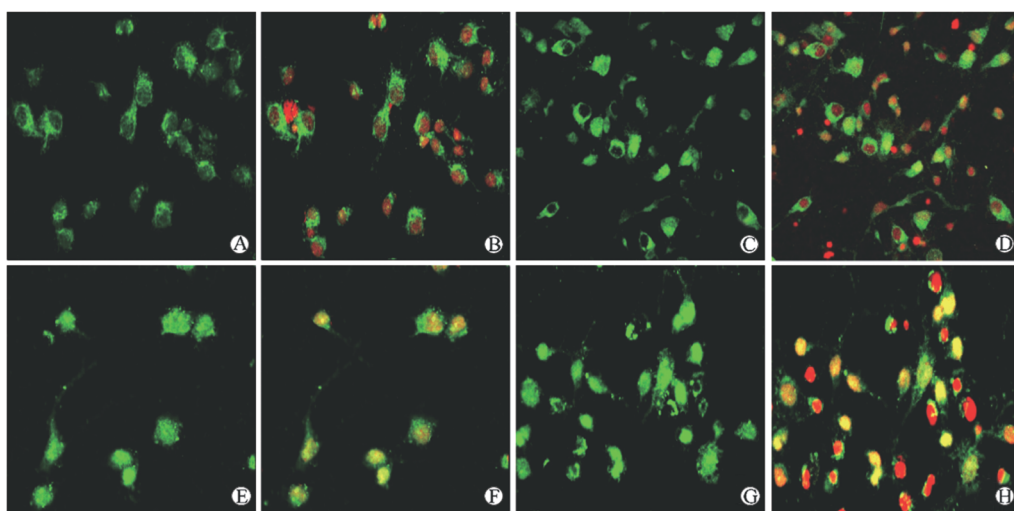


图 3 免疫荧光检测白藜芦醇对蛋白 Nrf2 核移位的影响

Fig 3 Immunofluorescence analysis of effect of resveratrol on Nrf2 nuclear translocation

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; OGD/RP: Oxygen-glucose deprivation/reperfusion. A,B: Normal group; C, D: Model group; E,F: Pre-treatment group without OGD/RP injury; G,H: Pre-treatment group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD). Green represents Nrf2 proteins, red represents nucleus, and yellow represents the combination of red and green. Original magnification: $\times 400$

2.5 白藜芦醇在缺氧缺糖再灌注损伤后不同时间窗对 Nrf2 及其下游蛋白表达的影响 免疫印迹检测结果显示,与正常组相比,缺氧缺糖再灌注损伤后,模型组神经元 Nrf2、NQO-1 蛋白表达增加($P < 0.05$)。与模型组相比,白藜芦醇各组神经元 Nrf2、NQO-1 蛋白的表达增加($P < 0.05$),白藜芦醇预处理组和全程处理组 HO-1 蛋白表达增加($P < 0.05$);其中全程处理组蛋白增加最明显,其次是预处理组。见图 4。

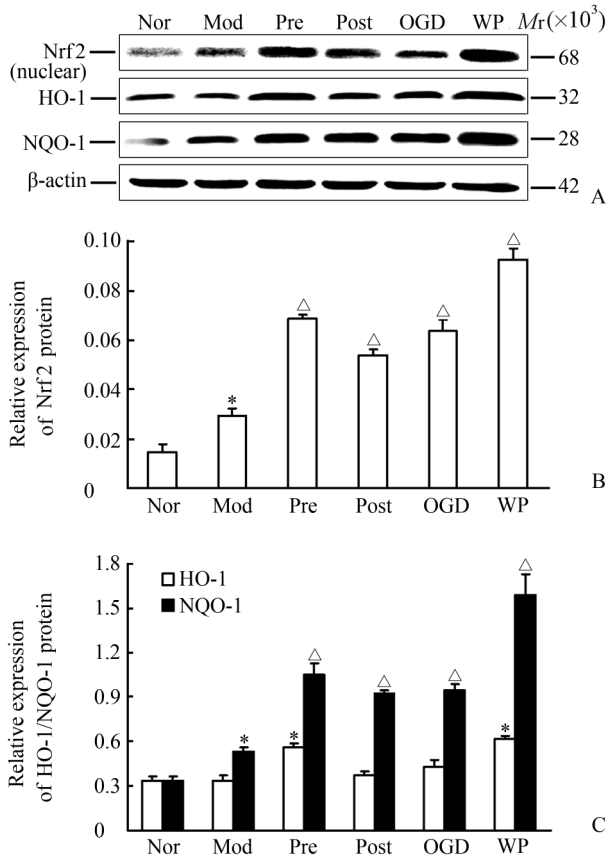


图 4 白藜芦醇(40 μmol/L)对 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of resveratrol (40 μmol/L) on protein expressions of Nrf2, HO-1 and NQO-1 after OGD/RP injury Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1: Heme oxygenase-1; NQO-1: Quinone oxidoreductase-1; OGD/RP: Oxygen-glucose deprivation/reperfusion; Nor: Normal group; Mod: Model group; Pre: Pre-treatment group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD); Post: Post-treatment group (treated with resveratrol during 24 h of reperfusion); OGD: OGD-treatment group (treated with resveratrol during 150 min of OGD and 24 h of reperfusion); WP: Whole processing group (treated with resveratrol for 24 h prior to OGD, during 150 min of OGD, and 24 h of reperfusion). * $P < 0.05$ vs Nor; $\Delta P < 0.05$ vs Mod. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

氧化应激是脑缺血再灌注损伤的核心病理环节,氧化应激反应中产生的活性氧在脑缺血再灌注损伤的发生、发展中起关键性作用^[6-7]。白藜芦醇具有清除体内自由基、抗氧化等作用。动物实验显示缺血性脑损害前预防性或损害后立即、1 h、3 h 给予白藜芦醇干预均能减轻脑损害,促进神经功能恢复^[8-10],但最佳治疗时间窗尚不明确。缺血性脑血管病发病机制复杂,目前已证实,在脑损伤后,NO 的产生增多,可引起神经细胞的毒性损伤^[11],SOD 则是生物体内重要的清除自由基物质^[12-13]。本实验结果显示,在白藜芦醇全程处理组中,各浓度白藜芦醇均可降低细胞内 NO 含量,同时使 SOD 活性升高,其中以 40 μmol/L 白藜芦醇的作用最佳。结果表明白藜芦醇可增加神经元缺氧缺糖再灌注损伤过程中保护性物质的生成,同时降低有害物质的产生。倒置相差显微镜下观察显示,经过缺氧缺糖再灌注损伤后,模型组细胞轮廓模糊,胞体肿胀,突起变短或者消失,部分细胞死亡;而在缺氧缺糖再灌注损伤的不同时间内给予 40 μmol/L 白藜芦醇,均可减少细胞的肿胀以及死亡,其中以全程处理组细胞损伤最小,预处理组次之。结果表明白藜芦醇能剂量依赖性地减轻缺氧缺糖再灌注对神经元的损伤,既可预防使用也可治疗使用,但最好是早期、全程使用,效果更佳。

Nrf2/ARE 信号通路在抗氧化过程中发挥着重要作用^[8,14]。本实验结果显示,正常培养的神经元, Nrf2 主要表达于胞质。经缺氧缺糖再灌注损伤后,部分 Nrf2 转移到细胞核。白藜芦醇预处理后,不论是否经历缺氧缺糖再灌注损伤,均可促使 Nrf2 转移到细胞核,表明白藜芦醇可激活 Nrf2/ARE 通路。本研究结果与之前报道相吻合,即在生理状态下, Nrf2 与细胞质中 Kelch 样 ECH 联合蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1,Keap1)蛋白结合,活性处于相对抑制状态^[15]。氧化应激时,Nrf2 脱离 Keap1,转移入细胞核,与 Maf 蛋白结合形成异二聚体,异二聚体识别并结合 ARE,启动 ARE 调控的抗氧化酶基因,如谷胱甘肽 S 转移酶、HO-1、NQO-1 等的转录^[16]。进一步实验结果显示,在缺氧缺糖再灌注损伤的不同时间窗内给予 40 μmol/L 白藜芦醇,能提高细胞核蛋白 Nrf2 以及下游抗氧化蛋白 HO-1、NQO-1 的表达,其中以全程处理组作用最

强, 预处理组次之, 表明白藜芦醇可通过 Nrf2/ARE 通路保护神经元免受氧化应激损伤, 但最好是早期、全程使用, 效果更佳。

本实验结果表明, 白藜芦醇对缺氧缺糖再灌注损伤的大鼠皮质神经元有剂量依赖性的抗氧化应激作用, 早期、全程使用, 效果更佳, 其保护机制可能是通过激活 Nrf2/ARE 信号通路进而增强下游抗氧化酶 HO-1 及 NQO-1 的表达而实现。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Roberts R A, Laskin D L, Smith C V, Robertson F M, Allen E M, Doorn J A, et al. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 112:4-16.
- [2] 任俊伟, 杨 琴, 范层层, 陈 娜. 白藜芦醇减轻脑缺血再灌注损伤及其机制[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32:2586-2590.
- [3] 任俊伟, 杨 琴. 白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24:292-296.
- [4] 任俊伟, 杨 琴, 陈 娜, 范层层. 白藜芦醇对脑缺血再灌注后细胞凋亡及 Caspase-3 表达的影响 [J]. *中成药*, 2011, 33:570-573.
- [5] Chen T, Liu W, Chao X, Qu Y, Zhang L, Luo P, et al. Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Neuroscience*, 2011, 183:203-211.
- [6] Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10:644-654.
- [7] Moro M A, Almeida A, Bola os J P, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39: 1291-1304.
- [8] Ren J, Fan C, Chen N, Huang J, Yang Q. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by up-regulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36:2352-2362.
- [9] Sinha K, Chaudhary G, Gupta Y K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats[J]. *Life Sci*, 2002, 71:655-665.
- [10] Tsai S K, Hung L M, Fu Y T, Cheng H, Nien M W, Liu H Y, et al. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats[J]. *J Vasc Surg*, 2007, 46:346-353.
- [11] Peeters-Scholte C, Koster J, Veldhuis W, van den Tweel E, Zhu C, Kops N, et al. Neuroprotection by selective nitric oxide synthase inhibition at 24 hours after perinatal hypoxia-ischemia[J]. *Stroke*, 2002, 33:2304-2310.
- [12] Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4) [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(Suppl 4):111-116.
- [13] 李 琳, 张志强. 脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:63-65.
- [14] Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia F A, Sonntag W E, Pearson K, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299:H18-H24.
- [15] Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Kaneko H, Nakayama Y, et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29:493-502.
- [16] Thimmulappa R K, Mai K H, Srisuma S, Kensler T W, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray[J]. *Cancer Res*, 2002, 62:5196-5203.