

• 论 著 •

# 甲异靛对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对 CD68<sup>+</sup> 细胞极化的影响

金桐 叶樱泽 古丽娟 熊晓星

**【摘要】 目的** 研究甲异靛在脑缺血再灌注损伤中的抗炎症反应及调节巨噬细胞/小胶质细胞极化的作用。**方法** 采用经颈内动脉线栓法造成大脑中动脉闭塞,闭塞 60min 后将线栓拔出以实现大脑中动脉血流再灌注,形成小鼠短暂性大脑中动脉阻塞(transient middle cerebral artery occlusion,tMCAO)模型,观察甲异靛对小鼠脑梗死范围、脑含水量、神经行为学的影响;采用免疫荧光染色观察甲异靛对小鼠脑组织缺血区小胶质细胞/巨噬细胞极化的影响,Western blot 法检测缺血区大脑皮层炎症信号通路相关分子 TLR-4、p65/NF- $\kappa$ B 以及炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达水平。**结果** 甲异靛可以减少脑缺血再灌注 48 h 后的脑梗死体积( $P < 0.01$ ),改善神经功能评分( $P < 0.05$ ),减轻脑水肿( $P < 0.01$ ),降低 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路分子及炎症因子表达水平,减少脑梗死区小胶质细胞/巨噬细胞 M0 向 M1 极化( $P < 0.05$ ),促进 M0 向 M2 极化( $P < 0.001$ )。**结论** 甲异靛可能通过改善脑水肿、调控小胶质细胞/巨噬细胞极化和抑制炎症反应,从而在脑缺血再灌注损伤中起保护作用。

**【关键词】** 甲异靛 脑缺血再灌注损伤 小胶质细胞/巨噬细胞极化

**【中图分类号】 【文献标识码】 A 【文章编号】** 1007-0478(2019)01-0003-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.01.001

**The protective effect of meisoindigo on cerebral ischemic/reperfusion injury and its influence on CD68<sup>+</sup> cells polarization in mice** Jin Tong\*, Ye Yingze, Gu Lijuan, et al. \* Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

**【Abstract】 Objective** To explore the anti-inflammation effect of meisoindigo and its ability to modulate macrophage/microglia polarization in cerebral ischemia and reperfusion injury. **Methods** Transient focal ischemia was induced in C57BL/6J mice by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 60 min. Infarct volume, neurological scores and cerebral water content were evaluated 48 h after MCAO. TTC staining, immunofluorescence and western-blot analysis were used to assess the effects of meisoindigo on the cellular inflammatory response and macrophage/microglia polarization. **Results** Administration of meisoindigo reduced infarct size( $P < 0.01$ ), improved neurological score( $P < 0.05$ ), alleviated brain edema( $P < 0.01$ ), decreased M0 to M1 polarization( $P < 0.05$ ), prompted M0 to M2 polarization( $P < 0.001$ ), and reduced inflammation in the brain 48 h after stroke. **Conclusion** Our results suggested that meisoindigo might alleviates cerebral ischemic injury by modulating macrophages/microglia polarization and alleviating inflammation in the infarct region, thus meisoindigo provided a potential therapeutic agent for treating ischemic stroke.

**【Key words】** Meisoindigo Cerebral ischemic and reperfusion injury Microglia/macrophage polarization

缺血性脑卒中发生后缺血区血管可通过自然再通或医源性再通而恢复血液灌注,但与此同时部分细胞的结构破坏或功能代谢障碍却进一步加重,即脑缺血再灌注损伤(Cerebral Ischemic Reperfusion

Injury,CIRI)<sup>[1]</sup>。脑卒中后多种炎性细胞包括中性粒细胞、T 细胞、单核巨噬细胞(含小胶质细胞活化)浸润至缺血区<sup>[2-4]</sup>,在脑缺血再灌注的整个过程中小胶质细胞/巨噬细胞(macrophages, m $\Phi$ s)的数量总是远超包括中性粒细胞和 T 淋巴细胞在内的白细胞数量;巨噬细胞在特定条件下会极化为 M1 或 M2<sup>[5]</sup>,M1 释放的细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等具有促进炎症的作用,而 M2 释放 IL-10、TGF- $\beta$  等则在

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81571147)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经外科[金桐 熊晓星(通信作者)],中心实验室(叶樱泽 古丽娟)

脑卒中炎症反应中起到一定程度的抗炎作用。前期研究调控 CIRI 后炎症反应及小胶质细胞/巨噬细胞极化状态可能在其损伤中起重要作用<sup>[6]</sup>。

甲异靛(Meisoindigo, Mei)为靛玉红衍生物,在临床上用于治疗慢性粒细胞性白血病,我们前期研究表明甲异靛可以抑制白细胞向损伤部位的趋化性迁移作用<sup>[7]</sup>。但甲异靛能否影响 CIRI 区域巨噬细胞浸润及极化,从而影响脑缺血再灌注损伤,目前尚无相关研究。本研究利用小鼠脑缺血再灌注损伤模型,通过免疫荧光、western-blot 等方法验证甲异靛是否对 CIRI 起保护作用,并初步阐明其炎性机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

本研究所有实验方案均经武汉大学人民医院医学伦理委员会同意,实验过程遵循《实验动物福利伦理审查指南》,实验动物购自湖南省斯莱克景达实验动物有限公司,为雄性 C57 BL/6J 野生型小鼠,体重 25~30 g,共 60 只,饲养于武汉大学人民医院动物实验中心 SPF 级环境中,(动物合格证号: NO. 43004700018817/NO. 43004700020932;设施许可证号: SYXK(鄂)2009-0027),实验前自由进食进水。60 只小鼠随机分为 3 组,每组各 20 只,分别为假手术组、手术(MCAO)组、手术+甲异靛 8 mg/kg(MCAO+ Mei 8 mg/kg)(剂量见下文 1.3)组。各组小鼠腹腔注射给药,每天固定时间 1 次,连续 7 d,末次给药 1 h 后进行手术,手术后继续每天给药 1 次直至术后 48 h 取材。假手术组和手术组每次注射等量生理盐水,其余实验步骤与手术+甲异靛 8 mg/kg 组相同。

### 1.2 主要试剂

TLR4、NF- $\kappa$ B、Tubulin 抗体购自美国 CST 公司(#14358、#8242、#2148),iNOS 抗体购自英国 Abcam 公司(ab15323)、Ym1 抗体购自 Stemcell(#60130),甲异靛购自中国药品生物制品检定所,RI-PA 裂解液(G2002,含 1% 磷酸化蛋白酶抑制剂 AG2007、1% 磷酸化蛋白酶抑制剂 BG2007、1% PMSFG2008 和 1% COCKTAIL G2006,均购自武汉赛维尔生物科技有限公司)。

### 1.3 药物配制及给药剂量确定

将甲异靛 100 mg 溶于 1 mL DMSO 中制成母液,按甲异靛 8 mg/kg 给药前取相应剂量的母液稀释于生理盐水中,实际 DMSO 浓度为 0.5%。甲异

靛剂量说明:按人和小鼠体表面积折算的等效剂量比值来确定小鼠甲异靛剂量,成人(60 kg)口服甲异靛推荐剂量为 100 mg/d,即  $1.67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,小鼠与人等效剂量比值为 9.1<sup>[8]</sup>,计算得到相应小鼠腹腔注射剂量为  $1.67 \times 9.1/2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} = 7.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,则确定小鼠腹腔注射剂量为  $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,以此剂量在实验过程中未发现术前手术+甲异靛 8 mg/kg 组小鼠体重与非给药组小鼠体重有统计学差异( $P > 0.05$ )。

### 1.4 小鼠 CIRI 模型建立与神经行为学评分

小鼠以 3% 异氟烷气体在麻醉诱导盒中诱导麻醉,随后以面罩输送含 1.5% 异氟烷的氧气(氧流量为 0.3 L/min)维持麻醉,实验过程中以保温毯保持小鼠体温在  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。线栓法制作小鼠 MCAO 模型,步骤如下:剪去颈正中中部毛发,酒精棉球消毒,做一颈正中切口,分离两侧颌下腺,找到并钝性分离颈总动脉,以 6-0 丝线打一活结暂时阻断颈外动脉,同样方法暂时阻断颈总动脉,微动脉夹阻断颈内动脉血流,在颈总动脉上沿血管周径剪一小口,长度约为颈总动脉周径  $1/4 \sim 1/3$ ,从此孔插入硅胶头包裹的线栓,推进线栓至硅胶头端过分叉并距离分叉处约 10 mm,分叉处扎一活结固定线栓,1 h 后取出线栓,再次夹闭颈内动脉,以 11-0 带针显微缝合线缝合颈总动脉破口,解开所有活结,取下微动脉夹,恢复血流。

神经行为学评分采用 Longa 评分法,由单盲观察者于再灌注 48 h 后评定。0 分,正常,无神经功能缺陷;1 分,右(梗死半球对侧)前爪不能完全伸展,轻度神经功能缺损;2 分,行走时小鼠向右侧转圈,中度神经功能缺损;3 分,行走时小鼠身体向右侧倾倒,重度神经功能缺损;4 分,无法自发行走,有意识障碍。

### 1.5 脑组织含水量测定

小鼠脑缺血再灌注 48 h 后以 4% 水合氯醛按剂量 50 mg/kg 麻醉,断头处死取出大脑组织,取出的大脑组织去除嗅球、小脑和脑干后分成左右两半,大脑组织样本分别予以称取湿重;然后样本放入  $100^\circ\text{C}$  烤箱中 24 h,称取脑组织干重。脑组织含水量 =  $(\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$ 。

### 1.6 脑梗死体积测定

再灌注 48 h 后行神经行为学评分,后按上述方法腹腔麻醉小鼠并断头,完整剥离脑组织后置于小鼠脑切片模具(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,

68707)中将大脑以 1 mm 的厚度切成连续 5 片,立即将切片置于 2% TTC(武汉赛维尔生物科技有限公司, G1017)溶液中, 37 °C 避光水浴 20 min, 染色完毕后吸除 TTC 溶液, 加入 2 mL 4% 多聚甲醛稍作固定, 将切片平铺干净纯色背景上扫描。由单盲观察者用 NIH Image j 软件(下载于 imagej. nih. gov)测定脑梗死体积百分比来表示脑梗死体积。

### 1.7 组织切片与免疫荧光染色

将小鼠以 4% 水合氯醛按剂量 50 mg/kg 腹腔麻醉后用在冰中预冷的 0.9% 生理盐水进行心脏灌注, 灌注量 15~20 mL, 继而用 4% 多聚甲醛 PBS 溶液灌注 15~20 mL, 断头取脑并将脑组织保存在 4% 多聚甲醛 PBS 溶液中固定 48 h, 在切片机(Leica VT1000S 振动切片机)上将脑组织按冠状位切成 50  $\mu$ m 厚切片, 放入防冻液(乙二醇: 丙三醇: 0.1 MPBS = 3:3:4), 于 -20 °C 保存。

漂片免疫荧光染色: 各组挑取解剖层面相近的切片, 漂洗和抗体孵育均在含 0.1% Triton-X100 的 0.1 M PBS 中, 每步漂洗 5 min  $\times$  3 次, 一抗和二抗稀释液为含 5% BSA 的 0.1 M PBST 溶液; 一抗于 4 °C 孵育过夜, 二抗室温下孵育 1.5 h, DAPI 染色 15 min, 爬片, 滴封片剂后盖盖玻片, 激光共聚焦显微镜(Olympus FV1200, 日本)下观察。

### 1.8 Western-Blot 检测

小鼠以冰生理盐水灌注后断头取脑, 取梗死区域组织冻存于 -80 °C 冰箱备用; 按每 100 mg 组织加入 1 mL RIPA 裂解液, 于冰上充分研磨, 冰浴 30 min 至充分裂解组织, 离心机中 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 分取上清液, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用; 取上述处理过的 1  $\mu$ L 溶液, 采用 BCA 法

测定各组蛋白水平, 用配制好的细胞裂解液按比例调整蛋白水平; 按 4:1 比例加入 5 $\times$  上样缓冲液, 混合均匀后于 98 °C 金属浴中变性 5 min; 上样, 以 Tubulin 为内参, SDS-PAGE 电泳, 70V 电压下电泳至蛋白到达浓缩胶与分离胶界线, 之后在 110 V 电压下电泳分离蛋白质; 电泳结束后取出凝胶置于转膜缓冲液中, 在 200 mA 电流下将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上; 转膜结束后按所要检测的蛋白分子量大小切取相应条带, 用 TBST 溶液洗膜, 在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中常温封闭 1 h; 封闭结束后 TBST 溶液洗膜, 置入含相应抗体溶液(1:1000, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释)的抗体孵育盒中, 置于 4 °C 摇床中过夜; 次日取出 PVDF 膜, TBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入到相应二抗中(1:10 000, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释), 室温下圆周摇床上孵育 1 h, 取出膜, TBST 溶液中漂洗 3 次, 每次 10 min; 用双色红外荧光成像系统(Odyssey CLx, 美国 LI-COR)扫描获取 Western 条带图片, 以 NIH Image j 软件分析条带灰度值。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA)后 2 组比较应用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为统计学差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 甲异靛对小鼠 CIRI 后脑梗死体积的影响

缺血再灌注 48 h 后假手术组小鼠脑组织没有梗死灶, 与 MCAO 组比较甲异靛组脑梗死体积显著减小( $P < 0.01$ )(图 1)。

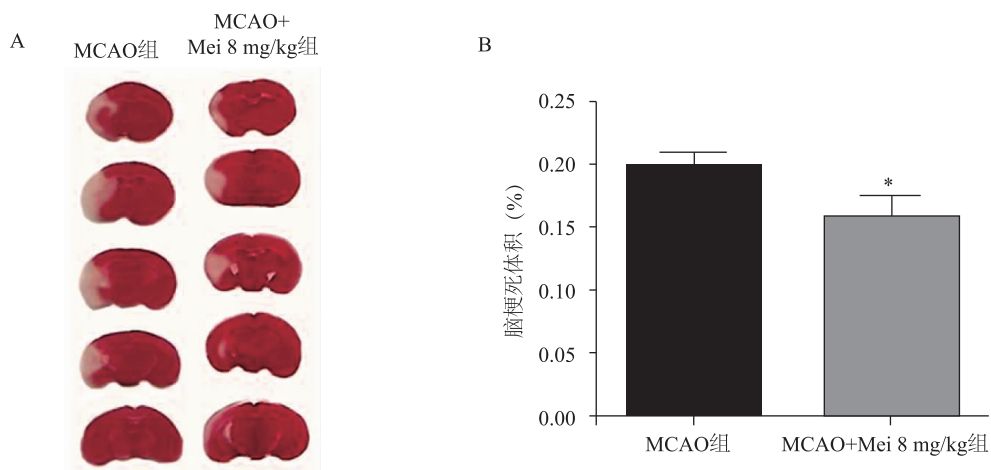


图 1 A 为 TTC 染色检测甲异靛(Me)对 CIRI 小鼠脑梗死体积的影响; B 为与 MCAO 组比较, \*  $P < 0.01$

2.2 甲异靛对小鼠 CIRI 后神经功能缺损的影响

缺血再灌注48 h后假手术组小鼠行为正常,无神经功能缺损症状;MCAO 组小鼠均出现明显的神经行为缺陷症状;与 MCAO 组比较,甲异靛组能明显减轻小鼠神经缺损症状( $P<0.05$ )(表 1,图 2)。

2.3 甲异靛对小鼠 CIRI 后脑含水量的影响

缺血再灌注损伤 48 h 后与 sham 组比较, MCAO 组小鼠脑含水量显著升高( $P<0.01$ );与 MCAO 组比较,甲异靛组脑含水量明显降低( $P<0.05$ )(表 1,图 2)。

2.4 甲异靛对小鼠 CIRI 后巨噬细胞极化水平的影响

免疫荧光染色显示,缺血再灌注48 h后与 MCAO 组比较,甲异靛组激活的 CD68<sup>+</sup> 细胞数量明显减少( $P<0.01$ ), iNOS<sup>+</sup> 细胞数量明显减少( $P<0.05$ ), Ym1<sup>+</sup> 细胞数量显著增加( $P<0.001$ )(图 3)。

表 1 甲异靛对 CIRI 小鼠神经行为学评分及脑组织含水量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	神经功能缺损评分	脑组织含水量
sham 组	0	77.97 ± 0.58 $\Delta$
MCAO 组	2.42 ± 0.15	83.67 ± 0.48 *
MCAO + Mei 8 mg/kg 组	1.92 ± 0.15 *	81.82 ± 0.39

注:与 MCAO 组比较, \*  $P<0.05$ ; 与 MCAO + Mei8mg/kg 组比较, \*  $P<0.01$ ,  $\Delta P<0.001$

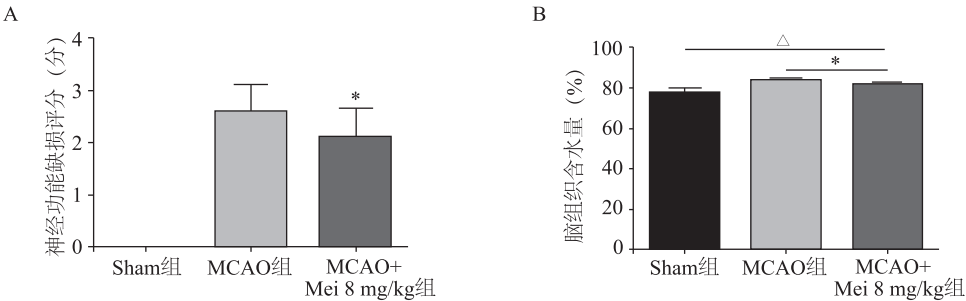


图 2 A 为与 MCAO 组比较, \*  $P<0.05$ ; B 为与甲异靛组比较, \*  $P<0.01$ ,  $\Delta P<0.001$

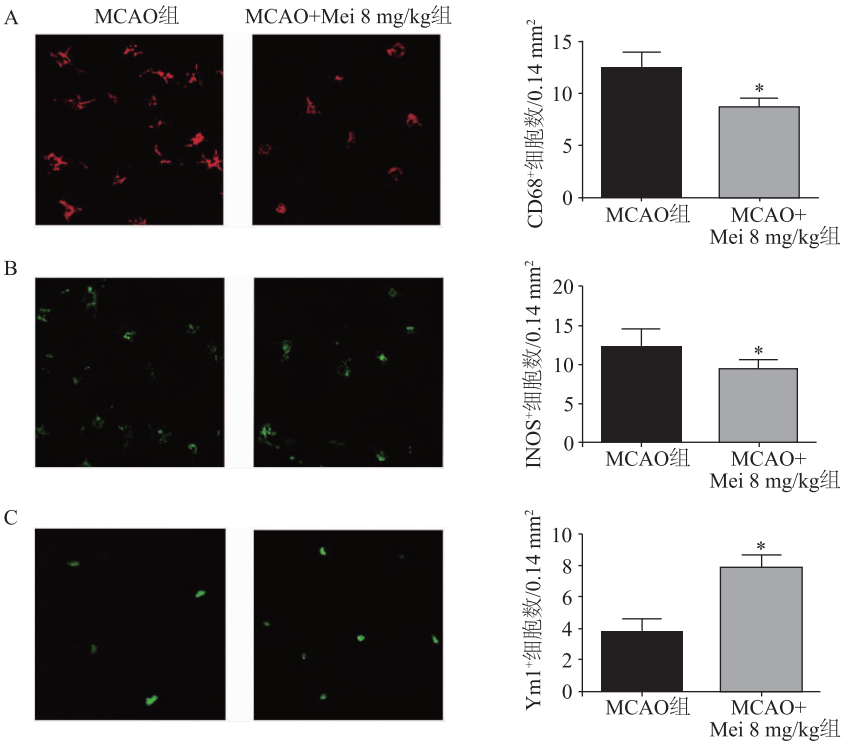


图 3 免疫荧光染色检测 MCAO 组与甲异靛组缺血再灌注损伤区域 CD68<sup>+</sup>、iNOS 及 Ym1 阳性细胞数(A/B/C) A 为与 MCAO 组比较,甲异靛组激活的 CD68<sup>+</sup> 细胞数量明显减少(\*  $P<0.01$ );B 为与 MCAO 组比较,iNOS<sup>+</sup> 细胞数量明显减少(\*  $P<0.05$ );C 为与 MCAO 组比较,Ym1<sup>+</sup> 细胞数量显著增加(\*  $P<0.001$ )

## 2.5 甲异靛对小鼠 CIRC 后炎症通路相关分子及炎症因子表达水平的影响

Western-blot 显示,CIRC 48 h 后甲异靛组炎症信号通路分子 TLR-4( $P<0.05$ )、p65/NF- $\kappa$ B( $P<0.01$ )以及炎症因子 TNF- $\alpha$ ( $P<0.001$ )和 IL-1 $\beta$ ( $P<0.05$ )的表达水平较 MCAO 组均显著降低(图 4)。

## 3 讨论

CIRC 是极其复杂的病理生理过程,确切发生机制尚未完全阐明,脑缺血再灌注后的炎性反应作用尚未澄清,一方面脑缺血再灌注后各种炎性细胞被募集至缺血脑组织区,产生大量活性氧族(Reactive oxygen species,ROS)和促炎细胞因子,导致脑缺血再灌注后 2 次损伤<sup>[9,10]</sup>;另一方面炎性细胞可吞噬坏死组织并释放抗炎因子及生长因子,促进脑卒中愈合及恢复。减轻再灌注损伤是治疗缺血性脑血管病的重要部分。小胶质细胞的激活由模式识别受体(PRRs)介导,Toll 样受体(Toll-like receptors,TLRs)一类最重要的模式识别受体,目前的研究已经证明 TLR4 介导的炎症反应涉及 CIRC,参与脑组织的病理损伤中小胶质细胞介导的神经毒作用<sup>[11]</sup>。例如,张清等<sup>[12]</sup>的实验发现 TLR4 蛋白在大鼠 CIRC 时的皮质缺血半暗区及邻近纹状体中有表达,并且在再灌注后 1 h 达到高峰,再灌注后 3 h 炎症因子 IL-1 $\beta$ 显著增加,并在 12 h 达到高峰。Tu 等<sup>[13]</sup>则认为 TLR4 和 TLR2 共同参与加重脑缺血再灌注损伤的炎症反应过程,其可能的机制为通过 TLR4 信

号激活 TLR2,并且在 NF- $\kappa$ B 的调节下 TLR2 直接参与脑缺血再灌注损伤中。Hua<sup>[14]</sup>的研究还发现 TLR4 基因敲除小鼠在脑缺血再灌注 24 h 后的损伤中脑梗死体积明显较少,同时 NF- $\kappa$ B 激活减少,这可能是因为阻断了通过 TLR4 介导的 NF- $\kappa$ B 的激活通路所致,缺乏可减少由脑缺血再灌注所致的脑损伤。有研究发现<sup>[15]</sup>,甲异靛对 RAW264.7 细胞产生 NO 有明显的抑制作用,并可通过抑制 TLR4-NF- $\kappa$ B 通路降低 HaCaT 细胞产生炎症因子如 COX-2,iNOS 的水平。

本研究采用小鼠短暂局灶性大脑中动脉闭塞模型,观察甲异靛对脑缺血再灌注损伤的影响及其炎性机制,结果表明甲异靛可改善缺血再灌注损伤小鼠的神经功能障碍,并可减少脑梗死体积,降低脑水肿的程度,免疫荧光结果表明甲异靛可明显改变脑缺血区域巨噬细胞极化方向(M2/M1 细胞数比值增大),综上可说明甲异靛可以减轻小鼠脑缺血再灌注损伤。本实验还发现,CIRC 后梗死区域 TLR4、NF- $\kappa$ B 及炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平均明显升高,发现甲异靛能明显抑制 CIRC 引起的 TLR4、NF- $\kappa$ B 及炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平增高,提示甲异靛可以调节缺血后炎症因子的生成,改善脑组织的微环境,从而减轻脑组织的病理损伤及缺血带来的神经功能障碍,从而起到对 CIRC 的保护作用。

甲异靛主要经肝脏代谢,绝大部分以代谢产物随粪便排除,本研究下一步将检测甲异靛对小鼠肝功能的影响、综合治疗作用及副作用、确定最适剂量;检测甲异靛在缺血及非缺血区域脑组织中的药

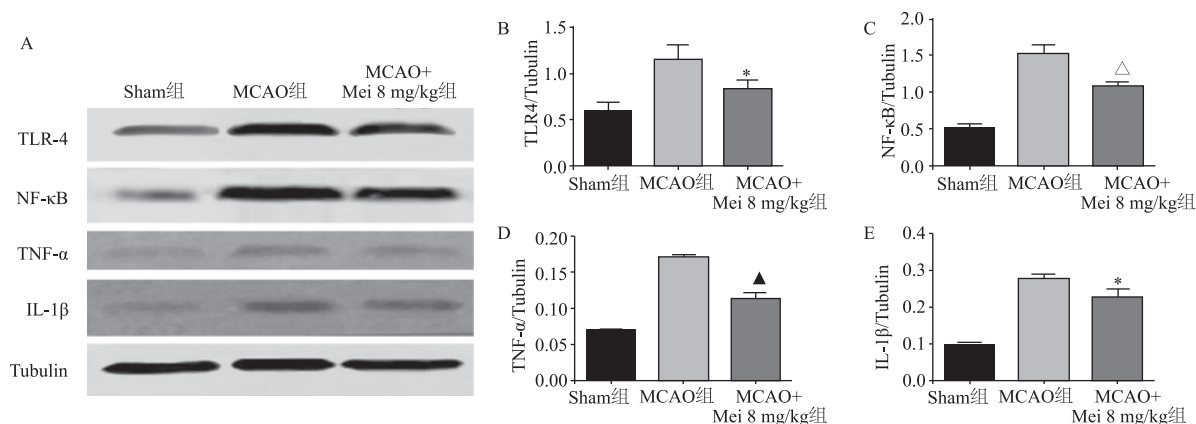


图 4 A 为 Western-blot 检测脑缺血再灌注区域信号通路相关分子 TLR-4、NF- $\kappa$ B 以及炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达水平;B/C/D/E 柱状图分别为各组蛋白水平表达差异,与 MCAO 组比较,甲异靛组 TLR-4、p65/NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达水平均显著降低(\* $P<0.05$ , $\Delta P<0.01$ , $\blacktriangle P<0.001$ )

- iability in blood pressure and risk of stroke[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(5): 469-480.
- [13] Tan ZF, Meng H, Xing XF, et al. Blood pressure variability estimated by average real variability predicts stroke in progression of acute ischemic stroke[J]. *Biomedical Research*, 2018, 29(5): 1001-1007.
- [14] 李宁. 大面积脑梗死亚急性期血压变异性与短期预后的关系[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [15] De Havenon A, Bennett A, Stoddard GJ, et al. Increased blood pressure variability is associated with worse neurologic outcome in acute anterior circulation ischemic stroke[J]. *Stroke Res Treat*, 2016(6): 7670161.
- [16] 刘宁. 前后循环脑梗死患者动态血压特点分析[J]. *海南医学院学报*, 2012, 18(4): 476-478.
- [17] 南宇飞, 卢翠莲, 严之红. 合并 H 型高血压的急性脑梗死患者血压变异性及其临床意义[J]. *中国医学装备*, 2018, 15(1): 78-81.
- [18] 石铸, 李淑恩, 李瑞兰, 等. 非心源性脑梗死患者急性期血压变异与早期神经功能恶化的相关性研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2016, 42(6): 357-361.
- [19] Yu JM, Kong QY, Schoenhagen P, et al. The prognostic value of long-term visit-to-visit blood pressure variability on stroke in real-world practice: a dynamic cohort study in a large representative sample of Chinese hypertensive population[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 177(3): 995-1000.
- [20] 李海华, 胡振龙, 陈甜, 等. 急性脑梗死患者血清脑利钠肽动态变化及临床意义[J]. *重庆医学*, 2014, 43(24): 3226-3228.
- [21] 汪进丁, 罗江洪, 徐丽君, 等. N 端脑钠肽前体与急性脑梗死患者预后的相关性[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2014, 40(11): 646-651.
- [22] De Lemos JA, McGuire darren K, drazner mark H. b-type natriuretic peptide in cardiovascular disease[J]. *Lancet*, 2003, 362(9380): 316-322.
- [23] Wang R, Wei YM, Teng JF. Levels of plasma n-terminal pro-brain natriuretic peptide and D-dimer on the prognosis of patients with acute cerebral infarction[J]. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2018, 34(4): 855.
- [24] Yang Q, Li C, Wang L, et al. Clinical significance of serum NT-proBNP in patients with acute cerebral stroke[J]. *Panminerva Med*, 2018.
- [25] De GM, Schneider J, Weck A, et al. Midregional proatrial natriuretic peptide improves risk stratification after ischemic stroke: Association with mortality and cardioembolic etiology[J]. *Neurology*, 2018, 91(13): 637.
- [26] Yang J, Zhong C, Wang A, et al. Association between increased N-terminal pro-brain natriuretic peptide level and poor clinical outcomes after acute ischemic stroke[J]. *Journal of the Neurological sciences*, 2017, 383: 5-10.
- [27] 韩永全, 刘跃亭. 关于 NT-ProBNP 在重型颅脑损伤中临床价值的研究[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2017, 3(6): 330-334.
- [28] 方麒林, 沈滔, 刘团结, 等. 急性缺血性脑卒中患者入院时血浆 BNP 水平与梗死部位关系[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(18): 3465-3468.

(2018-08-01 收稿)

(上接第 7 页)

物浓度, 以评估甲异靛通过血脑屏障的能力; 深度挖掘甲异靛抗炎机制及相关信号途径; 并尝试对甲异靛结构进行修饰, 以降低其肝毒性及胃肠道反应, 并可能增加血脑屏障通透性。

## 参 考 文 献

- [1] VAN DER SPUIJ W J, Pretorius E. interrelation between inflammation, thrombosis, and neuroprotection in cerebral ischemia[J]. *Reviews in the Neurosciences*, 2012, 23(3): 269-278.
- [2] GU Lijuan, XIONG Xiaoxing, WEI Dingtai, et al. T cells contribute to stroke-induced lymphopenia in rats[J]. *PLOS One*, 2013, 8(3): e59602.
- [3] GU Li-juan, XIONG Xiao-xing, ZHANG Hong-fei, et al. Distinctive effects of T cell subsets in neuronal injury induced by cocultured splenocytes in vitro and by in vivo stroke in mice[J]. *Stroke*, 2012, 43(7): 1941-1946.
- [4] IADECOLA C, ANRATHER J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(7): 796-808.
- [5] MURRAY P J, WYNN T A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011, 89(4): 557-563.
- [6] XIONG Xiao-xing, XU Li-jun, WEI Liang, et al. IL-4 is required for sex differences in vulnerability to focal ischemia in mice[J]. *Stroke*, 2015, 46(8): 2271-2276.
- [7] YE B, XIONG X, DENG X, et al. But not its core chemical structure indirubin, inhibits zebrafish interstitial leukocyte chemotactic migration[J]. *Le Pharmacien Biologiste*, 2017, 55(1): 673-679.
- [8] 孔利佳, 汤宏斌. 实验动物学[M]. 武汉: 湖北人民出版社, 2006: 281-282.
- [9] GELDERBLUM M, LEYPOLDT F, STEINBACH K, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(5): 1849-1857.
- [10] MATSUMOTO H, KUMON Y, WATANABE H A, et al. Accumulation of macrophage-like cells expressing NG2 proteoglycan and Iba1 in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2008, 28(1): 149-163.
- [11] 王超, 路华, 杨智勇. TLR4 信号通路在脑卒中后脑损伤中的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(6): 557-561.
- [12] 张清, 孙鹏, 冯新民, 等. Toll 样受体 4 蛋白在大鼠脑缺血再灌注损伤中的表达及其意义[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2008(2): 219-221.
- [13] TU Xian-kun, YANG Wei-zhong, SHI Song-sheng, et al. Spatio-temporal distribution of inflammatory reaction and expression of TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent focal cerebral ischemia[J]. *Neurochemical Research*, 2010, 35(8): 1147-1155.
- [14] HUA Fang, MA Jing, HA Tuan-zhu, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Brain Research*, 2009, 1262: 100-108.
- [15] 张海婧, 张翼, 金晶, 等. 甲异靛通过 TLR4-TAK-NF- $\kappa$ B 途径治疗银屑病机制研究[J]. *药学报*, 2013, 48(4): 503-507.

(2018-08-02 收稿)