

丁基苯酞抗大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧损伤及其机制

吴丽蓉, 罗勇*

(重庆医科大学 附属第一医院, 重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016)

摘要: 本研究探讨丁基苯酞抗大鼠大脑皮质神经元氧糖剥夺/复氧损伤及其机制。原代培养大鼠大脑皮质神经元, 建立氧糖剥夺/复氧模型(OGD/R), 采用 MTT 法、酶学检查、免疫组化、RT-PCR 等观察丁基苯酞(各浓度组)的保护作用及其机制。在氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 时丁基苯酞各浓度组可增加神经元的细胞活力和减少神经元 LDH(乳酸脱氢酶)的释放, 可显著降低神经元表达 iNOS mRNA(诱生型一氧化氮合酶)和 NF- κ B(核因子 κ B) p65 蛋白(增加)。不同剂量丁基苯酞(100、10、1 和 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在增加细胞活力、减少 LDH 释放及降低神经元表达 iNOS mRNA 等方面, 高浓度的作用强于低浓度, 且丁基苯酞 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTIC) 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异显著。在 OGD 4 h/R 8 h 时丁基苯酞可能抑制 iNOS mRNA 的表达及 NF- κ B 的活化, 从而有效保护氧糖剥夺/复氧中损伤的大脑皮质神经元。

关键词: 丁基苯酞; 核因子 κ B; 氧糖剥夺/复氧; 大脑皮质神经元; 诱生型一氧化氮合酶

中图分类号: R963 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2008)04-0366-05

Mechanism of action of butylphalide against the injury following oxygen glucose deprivation/reoxygenation in rat cortical neurons

WU Li-rong, LUO Yong*

(The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Key Lab of Neurology in Chongqing, Chongqing 400016, China)

Abstract: To explore the mechanism of action of butylphalide (NBP) against the injury following oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) in rat cortical neurons, neurons of Wistar newborn rats were prepared by filtering through a mesh, centrifugation and trypsin digestion. A simple, stable and reliable *in vitro* model of OGD/R of neurons was established. We studied the activation, the nuclear translocation of NF- κ B p65 and the mRNA expression of iNOS affected by NBP in each group neuron by RT-PCR. NBP is proved to be able to add cellular vigor and decrease LDH release. The mRNA expression of iNOS in neurons after OGD 4 h/R 8 h decreased when treated with NBP. There is statistical difference between each concentration of NBP that it adds cellular vigor, decreases LDH release and expression of iNOS in neurons after OGD 4 h/R 8 h. There is also statistical difference between NBP (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and PDTIC (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). It is proved that NBP can protect neurons, block upregulation of iNOS mRNA, and restrain activation of NF- κ B in neurons.

Key words: NBP; NF- κ B; oxygen glucose deprivation/reoxygenation; cortical neurons; iNOS

丁基苯酞(NBP)是从我国南方的一种水芹籽中提取出来的有效成分, 可分为左旋丁基苯酞(*l*-NBP)、右旋丁基苯酞(*d*-NBP)及消旋丁基苯酞(*dl*-NBP), 其作用机制包括增加缺血区的脑血流,

重建缺血区微循环, 缩小脑梗塞面积, 保护线粒体, 改善脑缺血后能量代谢, 减轻局部脑缺血所致的脑水肿等^[1-5]。既往的研究主要着眼于丁基苯酞对低氧/复氧所致的内皮细胞损伤的保护作用, *d*-NBP 可降低低氧/复氧所致的中性粒细胞-内皮细胞黏附, 或从动物模型提示 NBP 能明显降低缺血再灌注时脑损伤区的中性粒细胞数目, 并可以抑制缺血区的细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的升高, *l*-NBP

收稿日期: 2007-09-26.

基金项目: 重庆市科委资助项目(CSTC, 2007BB5297).

*通讯作者 Tel: 13320215873, Fax: 86-23-68811487,

E-mail: luoyong1998@163.com

能够明显抑制 iNOS(诱生型一氧化氮合酶)表达和 NO 的合成。本文采用氧糖剥夺/复氧模型,从抑制 NF- κ B 活化等方面对丁基苯酚的作用做进一步研究。

材料与方法

动物 Wistar 大鼠乳鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,雌雄兼用。

主要试剂与药品 DMEM/F12 培养基、D-Hank's 液,美国 Hyclone 公司;多聚赖氨酸、胰蛋白酶,美国 Sigma 公司;胎牛血清,Cell Science 公司;乳酸脱氢酶试剂盒,南京建成生物工程研究所;RNA 抽提试剂盒,上海生工生物工程技术有限公司;TaKaRa RNA PCR Kit (AWV) Ver 3.0,宝生物工程(大连)有限公司;鼠抗 NF- κ B p65 单克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司;鼠 SP Kit、兔 SP Kit、DAB 试剂盒,北京中山生物技术有限公司;引物序列,重庆升博/重庆波尔生物科技有限公司设计并合成。

丁基苯酚为无色油状液体,由石药集团恩必普药业有限公司提供,含量 >98%,用 PEG400 助溶,无血清培养基稀释,配制成终浓度为 100、10、1 及 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4 个浓度组;PDTC,白色粉末(美国 Sigma 公司产品),用 PBS 配制成终浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。

细胞培养 取 Wistar 大鼠乳鼠(0~1 d),常规消毒头皮后,沿正中中线剪开头皮与颅骨,迅速取出整个脑组织,放入冰上盛有 D-Hank's 液的玻璃培养皿中。仔细剥离脑组织表面血管及脑膜,去除小脑、脑干。取大脑皮质,移入玻璃培养皿中,剪碎大脑皮质,加入胰酶,巴氏管反复吸取脑组织与胰酶混合物,将两者混匀,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱中消化后,加入含有血清的培养基中止消化,用 200 目筛网过滤,滤液离心(800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min,弃去上清液,加适量培养液悬浮沉淀,台盼蓝计数,接种于底部涂有多聚赖氨酸的 96 孔、24 孔和 6 孔塑料培养板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。24 h 后全量换液,48 h 加入阿糖胞苷(终浓度 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),处理 24 h 后全量换液,以后每 2 d 半量换液。

体外氧糖剥夺/复氧模型的建立 选取生长到 d 7 的神经元进行体外氧糖剥夺/复氧模型。参照文献^[6~8]方法,采用体积约 1.5 L 的密闭保鲜盒,在两侧钻孔,安装三通阀,分别作为进气孔和出气孔,在盒的底部平铺无菌双蒸水湿润的纱布起湿化作用。用 D-Hank's 液将培养板中的细胞洗两遍,加

入事先去氧处理的 D-Hank's 液,迅速将细胞培养板放入保鲜盒中,立即将盖子盖上,封口胶密闭四周。出气孔接真空泵,迅速抽空盒内的气体,关闭出气孔三通阀,于进气孔处迅速充入 95% N_2 和 5% CO_2 的混合气体,关闭进气孔的三通阀。重复上述抽气充气过程 3 次。将充满混合气体的密闭保鲜盒放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水槽中。4 h 后,用含有胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,代替 D-Hank's 液,重新放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱培养给予复氧。

MTT 法测定细胞活性 取 4 块神经元生长到 d 7 左右的 96 孔板,在氧糖剥夺前给予药物,放入密闭保鲜盒中给予氧糖剥夺,在氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 后取出,将培养基吸出,每孔加入无血清培养基 200 μL ,MTT 20 μL 继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入二甲基亚砜 200 μL ,振荡 10 min,于自动酶标仪(波长 570 nm)测定吸收度值(A),间接反映神经元细胞存活数量和活性。重复 3 次。

乳酸脱氢酶(LDH)的测定 取神经元生长到 d 7 的 24 孔板,在氧糖剥夺前给予药物,在氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 后收集培养液,按试剂说明书测定各时间点的 LDH 活性,LDH 能催化乳酸生成丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,通过比色可求出酶的活力。

免疫细胞化学检测 NF- κ B p65 蛋白表达 免疫细胞化学组时间点及分组的确定:选择氧糖剥夺时间为 4 h、复氧 4、8、12 和 24 h 对指标 NF- κ B p65 进行检测。选择氧糖剥夺 4 h 复氧 8 h 组及在处理前分别给予丁基苯酚或 PDTC 的组对指标 NF- κ B p65 进行检测。

分别将各组各时间点长有细胞的盖玻片用 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗后,4% 多聚甲醛固定 20 min,0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 5 min \times 3 次;滴加 3% 过氧化氢,室温下放置 20 min,0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 5 min \times 3 次;滴加封闭血清,室温下放置 30 min,倾斜玻片,使血清倾去,勿洗;滴加 1:100 稀释的 NF- κ B p65 单抗,PBS 代替一抗作空白对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜,0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 5 min \times 3 次;滴加生物素标记的二抗,室温孵育 2 h,0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 5 min \times 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,室温孵育 30 min,0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 5 min \times 3 次;滴加 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,自来水冲洗终止显色,梯度酒精脱水,二甲苯透明于干燥后中性树脂封片,显

显微镜下观察、照像。

结果判定: 排除爬片边缘细胞, 10×10 低倍镜下随机选取 10 个细胞分布均匀的视野, 10×20 中倍镜下随机计数 50 个细胞/视野。按着色强弱分为 4 个等级: 无着色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分, 按公式

$$\text{HSCORE} = \sum p_i(i+1) \quad (1)$$

($i=0, 1, 2, 3$; p_i 表示评分为 i 的比例)

计算 HSCORE 得分。该评分方法考虑到了单个细胞是否为阳性及其强弱, 能反应细胞蛋白表达情况。

RT-PCR 半定量检测氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 及药物处理后大鼠皮质神经元中 iNOS mRNA 表达 扩增大鼠 i-NOS mRNA 的上、下游引物: 上游引物序列: 5'-TGGAGCGAGTTGTGGATTGT C-3'; 下游引物序列: 5'-TCTCTGCCATCCGCTCTCGT C-3'。扩增大鼠 β -actin mRNA(内参照)的上、下游引物序列分别为: 5'-CTGCCGATCCTCTTCCTC-3' 和 5'-CTCCTGC TTGCTGATCCACAT-3'。iNOS mRNA 的扩增片段长度为 212 bp, β -actin mRNA 的扩增片段长度为 398 bp。按照试剂盒说明完成操作, 运用 Bio-Red 凝胶成像系统摄像。

统计学处理 所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 组间比较采用方差分析, 选择 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结果

1 MTT 法测定细胞活性

经氧糖剥夺后, 大鼠皮质神经元 A 值明显下降, 提示活细胞数量减少, 氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 时, 活细胞数量减少达到高峰, 丁基苯酞和 PDTC 预处理后发现, 丁基苯酞各浓度组及 PDTC 组均可增

Table 1 Comparison of effects of butylphalide (NBP) and PDTC on rat cortical neurons after OGD 4 h/R 8 h (MTT method, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	A
Control	0.128 67 \pm 0.005 51
NBP 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.287 33 \pm 0.006 03 **
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.258 33 \pm 0.045 09 **
1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.237 67 \pm 0.003 21 **
0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.202 00 \pm 0.003 641 **
PDTC 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.255 33 \pm 0.007 09 **

** $P < 0.01$ vs control

加细胞活性发挥保护作用, 与损伤组比较有显著性差异 ($P < 0.01$, 表 1)。

2 乳酸脱氢酶(LDH)释放量的测定

神经元 LDH 的释放量反映了细胞对 LDH 的渗透程度, 即反映了膜的通透性, 亦可以作为检测神经元死亡程度的指标, 丁基苯酞和 PDTC 预处理后发现, 丁基苯酞各浓度组及 PDTC 组均可以降低 LDH 的释放量, 与损伤组比较有显著性差异 ($P < 0.01$, 表 2)。

Table 2 Release of LDH from each group after OGD 4 h/R 8 h treated by drugs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	LDH release/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
Control	1 148.100 0 \pm 46.358 3
NBP 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	471.533 3 \pm 18.217 9 **
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	554.966 7 \pm 14.551 4 **
1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	659.466 7 \pm 33.648 5 **
0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	775.933 3 \pm 64.591 0 **
PDTC 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	599.600 0 \pm 71.561 8 **

** $P < 0.01$ vs control

3 NF- κ B p65 免疫细胞化学检测

正常条件下, NF- κ B p65 蛋白主要存在于细胞浆, 少数细胞核有表达, 氧糖剥夺及复氧后, 其在细胞浆的表达明显增强, 且胞核阳性细胞数明显增多。与正常对照组比较, 各时间段 (OGD 4 h、R 4 h、R 8 h、R 12 h、R 24 h) 大鼠皮质神经元 NF- κ B p65 蛋白表达变化差异均显著 ($P < 0.05$), 且组间差异显著 ($P < 0.05$)。氧糖剥夺 4 h 时, NF- κ B 出现活化, NF- κ B p65 蛋白表达增强, 主要表现在胞浆染色加深, 但胞核多未着色; 氧糖剥夺 4 h/复氧 4 h 时, p65 表达明显增强, 表现为核内出现阳性颗粒的细胞数增多, 胞核着色深, 即发生核转位的细胞数增多 ($P < 0.05$); 氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 时, NF- κ B 核转位率达到高峰 ($P < 0.05$), 以后逐渐减弱; 复氧 12 h, NF- κ B p65 蛋白表达仍较正常对照组强, 与正常对照组差异显著 ($P < 0.05$); 复氧 24 h 时 NF- κ B p65 蛋白表达仍较正常对照组稍强, 与正常组无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 3、表 4)。

给予 NBP 和 PDTC 处理组的细胞, 其 NF- κ B p65 蛋白表达明显减弱, 经 HSCORE 法评分, 并通过统计分析, 与对照组间差异显著 ($P < 0.05$) (表 5)。且丁基苯酞 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与 PDTC 组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。

Table 3 HSCORE of NF- κ B p65 protein expression in each group treated with OGD/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	HSCORE
Normal	0.960 0 \pm 0.028 3
OGD 4 h	1.630 0 \pm 0.106 1 *
OGD 4 h/R 4 h	2.350 0 \pm 0.077 8 *
OGD 4 h/R 8 h	3.430 0 \pm 0.056 6 Δ
OGD 4 h/R 12 h	2.425 0 \pm 0.035 4 *
OGD 4 h/R 24 h	1.390 0 \pm 0.042 4

* $P < 0.05$ vs normal group; $\Delta P < 0.05$ vs other group

Table 4 Percentage of cells with nuclear translocation of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	Percentage of nuclear translocation/%
Normal	0.1225 \pm 0.003 5
OGD 4 h	0.3550 \pm 0.021 2 *
OGD 4 h/R 4 h	0.4350 \pm 0.021 2 *
OGD 4 h/R 8 h	0.6000 \pm 0.028 3 Δ
OGD 4 h/R 12 h	0.3450 \pm 0.021 2 *
OGD 4 h/R 24 h	0.1995 \pm 0.014 8

* $P < 0.05$ vs normal group; $\Delta P < 0.05$ vs other group

Table 5 HSCORE of NF- κ B p65 protein expression after OGD 4 h/R 8 h treated with drug ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	HSCORE
Normal	0.390 \pm 0.070
OGD 4 h/R 8 h	3.415 \pm 0.213
NBP 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.268 \pm 0.103 * Δ
PDTC 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2.578 \pm 0.055 *

* $P < 0.05$ vs OGD 4 h/R 8 h group; $\Delta P < 0.05$ vs PDTC

4 各干预组神经元中 iNOS mRNA 的表达

给予大脑皮质神经元氧糖剥夺 4 h/复氧 8 h 后,神经元表达较多 iNOS。当神经元在进行氧糖剥夺/复氧处理前,分别用 NBP 和 PDTC 预处理神经元,再予以氧糖剥夺/复氧处理,用 RT-PCR 法检测 iNOS 的 mRNA,发现 NBP 各浓度组及 PDTC 组均能明显减少氧糖剥夺/复氧所诱发的 iNOS mRNA 水平 ($P < 0.01$),丁基苯酚 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与 PDTC 组比较有显著性差异 ($P < 0.01$) (图 1、2)。

讨论

NF- κ B 是一种核转录因子,具有传递细胞核内外信息的功能。多项研究表明缺血时可引发神经细胞、胶质细胞、血管内皮细胞中 NF- κ B 的活化。从动物模型、细胞培养及临床病理等方面^[9~15]的研究均表明, NF- κ B 激活参与了脑缺血损伤后的炎性反

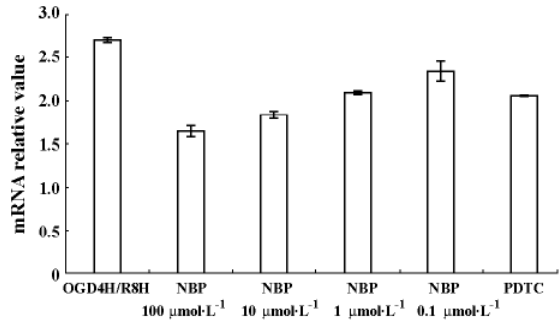


Figure 1 mRNA expression of iNOS in neuron of each group

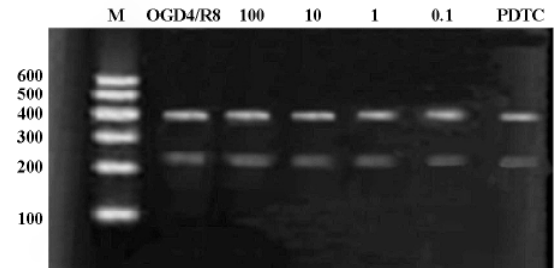


Figure 2 Expression of iNOS mRNA in the rat cortical neuron subjected to OGD/R and received different treatments by RT-PCR. Lane 1: Marker; Lane 2: OGD4/R8; Lane 3 - 6: NBP 100 - 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Lane 7: PDTC

应,且与神经细胞死亡机制有关,应用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 可抑制 NF- κ B 的活化从而发挥保护作用。活化的 NF- κ B 参与许多基因表达的调整,包括 IL-1、IL-6、IL-8、iNOS、ICAM-1、VCAM -1、E-选择素等炎性细胞因子,在上述因子的启动子中均含有 NF- κ B 序列,所有上述炎症因子在缺血组织的再灌注阶段均上调并被认为是中性粒细胞侵入和神经元凋亡的信号,最终导致细胞损害和神经元死亡。

既往研究^[16~18]着眼于丁基苯酚对低氧/复氧所致的内皮细胞损伤具有保护作用,对丁基苯酚是否具有神经保护作用提供了十分有价值的依据,但是未采用氧糖剥夺/复氧模型,从大鼠皮质神经元、抑制 NF- κ B 活化等方面研究丁基苯酚的保护作用,而单纯的低氧/复氧与脑缺血/再灌注损伤是有差别的。作者通过免疫细胞化学观察到大脑皮质神经元 NF- κ B p65 蛋白表达在 OGD 4 h 时开始明显增加, NF- κ B 核转位 R 8 h 达到高峰,与正常对照组有显著差异,且各组间差异显著, NF- κ B 激活后,随之引起炎性介质 iNOS 的显著增加。在 OGD 4 h/R 8 h 的条件下,运用 MTT 法观察神经元细胞活性,发现

丁基苯酞各浓度组及 PDTC 组均可增加细胞活性发挥保护作用,与损伤组比较有显著性差异。本试验中发现丁基苯酞各浓度组及 PDTC 组均可降低 LDH 的释放量,与损伤组比较有显著性差异。在 OGD 4 h/R 8 h 的条件下,用丁基苯酞预处理过的神经元表达 NF- κ B p65 蛋白的 HSCORE 评分有所降低。用 RT-PCR 检测丁基苯酞预处理神经元和未预处理神经元 iNOS mRNA 表达的差异,观察到丁基苯酞各浓度组及 PDTC 组均可降低神经元 iNOS mRNA 表达,与损伤组比较有显著性差异。活化的 NF- κ B 可上调 iNOS 的表达,丁基苯酞预处理后可降低其表达,推测丁基苯酞可能抑制了 NF- κ B 的核转位而使其不能与 iNOS 启动子的 κ B 位点结合,阻断转录的启动或增强,因而 iNOS 在 mRNA 水平的表达明显降低。由此可知,丁基苯酞能有效拮抗 NF- κ B 活性,降低脑缺血损伤后酶类的表达,有望成为治疗脑血管疾病的早期治疗药物。从 MTT 法测细胞活性、LDH 释放量测定及 RT-PCR 检测 iNOS mRNA 表达可发现丁基苯酞 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与 PDTC 组比较有显著性差异,且丁基苯酞 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组及 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组组间比较有显著性差异,PDTC 为 NF- κ B 抑制剂,从上述试验数据可以推测丁基苯酞 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 NF- κ B 抑制作用强于 PDTC $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从 MTT 法、LDH 释放量测定可以推断本试验中丁基苯酞各浓度组对神经元没有明显毒副作用。

References

- [1] Feng YP, Hu D, Zhang LY. Effect of *dl*-butylphthalide on mouse brain energy metabolism in complete brain ischemia induced by decapitation [J]. Acta Pharmacol Sin, 1995,30:741-744.
- [2] Xiong J, Feng YP. The protective effect of butylphthalide against mitochondrial injury during cerebral ischemia [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000,35:408-412.
- [3] Xu HL, Feng YP. Effect of 3-*n*-butylphthalide on pial arterioles in focal cerebral ischemia rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 1999,34:172-175.
- [4] Yan CH, Feng YP, Zhang JT, et al. Effects of *dl*-3-*n*-butylphthalide on regional cerebral blood flow in right middle cerebral artery occlusion rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 1998,19:117-120.
- [5] Liu XG, Feng TP. Protective effect of *dl*-3-*n*-butylphthalide against ischemic neurological damage and abnormal behavior in rats subjected to focal ischemia [J]. Acta Pharmacol Sin, 1995,30:896-903.
- [6] Zhang RL, Chopp M, Jing N, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemia cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat [J]. Stroke, 1995,26:1438-1442.
- [7] Wang GJ, Deng HY, Maier CM, et al. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke [J]. Neuroscience, 2002,114:1081-1090.
- [8] Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat [J]. Brain Res, 1995,682:182-188.
- [9] Sironi L, Banfi C, Gelosa P, et al. Activation of NF- κ B and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment [J]. Neurobiol Dis, 2006,22:445-451.
- [10] Pennypacker KR, Kassed CA, Eidizadeh S, et al. NF- κ B P50 is increased in neurons surviving hippocampal injury [J]. Exp Neurol, 2001,172:307-319.
- [11] Shen W, Zhang C, Zhang G. Nuclear factor kappa B activation is mediated by NMDA and non-NMDA receptor and L-type voltage-gated Ca^{2+} channel following severe global ischemia in rat hippocampus [J]. Brain Res, 2002,933:23-30.
- [12] Schneider A, Marlin-Villalba A, Weih F, et al. NF-kappa B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia [J]. Nat Med, 1999,5:554-559.
- [13] Howard EF, Chen Q, Cheng C, et al. NF-kappa B is activated and ICAM-1 gene expression is upregulated during reoxygenation of human brain endothelial cells [J]. Neurosci Lett, 1998,248:199-203.
- [14] Nurmi A, Vartiainen N, Pihlaja R, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits translocation of nuclear factor kappa B in neurons and protects against brain ischemia with a wild therapeutic time window [J]. J Neurochem, 2004,91:755-765.
- [15] Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, et al. Nuclear factor-kappa B contributes to infarction after permanent focal ischemia [J]. Stroke, 2004,35:987-991.
- [16] Xu HL, Feng YP. Effect of 3-*n*-butylphthalide on neutrophil-endothelial cell adhesion and endothelial cell injury induced by anoxia/reoxygenation, interleukin-1 and tumor necrosis factor [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 1999,13:281-284.
- [17] Xu HL, Feng YP. Inhibitory effects of chiral 3-*n*-butylphthalide on inflammation following focal ischemic brain injury in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000,21:433-438.
- [18] Hu DB, Li SW. Effect of vitamin E and *l*-3-*n*-butylphthalide on the expression of NO and iNOS induced by chronic episodic hypoxia [J]. Chin J Neurosci (中国神经科学杂志), 2004,20:140-144.