

黄芩苷对大鼠脑缺血再灌注损伤后海马神经元 HSP70 表达的影响

刘萍¹, 王菊英¹, 李倩², 许复郁³, 王姿颖¹, 徐红岩¹, 刘兆平^{4*}, 张岫美^{1*}

(1. 山东大学医学院药理学研究所, 2. 山东省地方病防治研究所,
3. 山东大学医学院病理学与病理生理学研究所, 4. 山东大学新药评价中心, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 研究黄芩苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后海马神经元热休克蛋白质 (HSP) 70 表达的影响。方法 Wistar 大鼠随机分为假手术组、脑缺血再灌注模型组、黄芩苷组 (50, 100 和 200 mg·kg⁻¹) 以及尼莫地平 0.4 mg·kg⁻¹ 组。利用大鼠大脑中动脉内栓线阻断法制备局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 通过 HE 染色、流式细胞术、免疫组织化学以及 RT-PCR 等方法, 观察黄芩苷对缺血再灌注损伤大鼠脑组织病理形态学改变、神经细胞凋亡率以及 HSP70 表达的影响。结果 黄芩苷可明显改善缺血再灌注所致的大鼠脑组织病理形态学改变, 降低神经细胞凋亡率, 促进 HSP70 基因的转录与翻译。结论 黄芩苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其作用机制可能与黄芩苷促进 HSP70 表达、抑制神经细胞凋亡有关。

关键词: 黄芩苷; 脑缺血; 再灌注损伤; 热休克蛋白质 70; 细胞凋亡

中图分类号: R965; R282.71 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)07 - 0619 - 06

Effect of baicalin on HSP70 expression of hippocampal neurons in focal brain ischemia-reperfusion injury rats

LIU Ping¹, WANG Ju-ying¹, LI Qian², XU Fu-yu³, WANG Zi-ying¹, XU Hong-yan¹,
LIU Zhao-ping^{4*}, ZHANG Xiu-mei^{1*}

(1. Institute of Pharmacology, School of Medicine, Shandong University; 2. Shandong Institute of Research and Treatment for Endemic Disease; 3. Institute of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University; 4. The Evaluation Center of New Drugs, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Aim** To investigate the effect of baicalin on the hippocampal neuronal apoptosis and the expression of HSP70 in rats with focal brain ischemia-reperfusion injury. **Methods** One hundred and twenty male Wistar rats were randomly divided into six groups: sham operated group, ischemia-reperfusion group, nimodipine group and three baicalin groups, to which baicalin was administered at doses of 50, 100 and 200 mg·kg⁻¹, separately. The models of focal brain ischemia-reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) were used in this study. HE stain was used to observe the pathological changes. Flow cytometry (FCM) was used for determination of neuronal apoptosis. HSP70 protein expression of the neurons was detected with immunohistochemistry. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of the mRNA level of HSP70. **Results** Baicalin can significantly relieve the pathological changes and inhibit apoptosis in hippocampus CA1 area, and at the same time increase the expression of HSP70 and HSP70 mRNA. **Conclusion** Baicalin can relieve brain damage induced by focal brain ischemia-reperfusion in rats, which may be related to inhibiting the process of the neuronal apoptosis. The mechanism of antiapoptosis effect of baicalin may be related to the promotion of transcription of HSP70 mRNA and increasing the expression of the protein.

Key words: baicalin; brain ischemia; reperfusion injury; heat-shock proteins 70; apoptosis

收稿日期: 2005-10-25.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 531 - 88380319, E-mail: liuzhaoping@sdu.edu.cn

Tel / Fax: 86 - 531 - 88383146, E-mail: zhangxm@sdu.edu.cn

热休克蛋白质 (heat-shock proteins, HSP) 70 作为分子伴侣,参与缺血后的神经保护,是脑细胞或脑组织遭受可逆性损伤时敏感而可靠的标志^[1]。缺血、缺氧及癫痫均可诱导 HSP70 表达, HSP70 表达增强是机体的一种自身保护机制。近年研究还发现, HSP70 与细胞凋亡信号传导调控有关,其合成增加能减轻缺血损伤诱导的神经细胞凋亡,从而产生脑保护作用^[2]。文献^[3]报道,黄芩苷 (baicalin, 分子式 $C_{21}H_{18}O_{11}$) 具有明显的抗凋亡作用,可抑制大鼠癫痫发作后的神经细胞凋亡,减轻癫痫所致的脑损伤。作者以往研究显示,黄芩苷对大鼠缺血性脑损伤尤其是脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用^[4],但其脑保护作用机制尚未明确,是否与其抑制脑缺血后的神经细胞凋亡有关亦未见报道。本研究通过观察黄芩苷对局灶性脑缺血再灌注损伤后海马神经元 HSP70 表达及神经细胞凋亡的影响,旨在探讨黄芩苷是否能通过调控 HSP70 抑制细胞凋亡,从而发挥抗缺血性脑损伤的作用。

材料与方 法

药品、试剂及仪器 黄芩苷 (批号: 0403070), 成都市前江制药厂产品; 尼莫地平 (nimodipine, 批号: 0401402-H), 山东健康药业有限公司产品; RNase A 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 均为美国 Sigma 公司产品; 兔抗大鼠 HSP70 多克隆抗体, 美国 Newmark 公司产品; 免疫组化 ElivisionTM plus 试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司产品; Trizol 为上海生工生物工程技术有限公司产品; RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, 美国 MBI 公司产品; CytomicsTM FC500 型流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司产品; MiniCycleTM 扩增仪, 美国 Perkin Elmer (PE) 公司产品; Smart View 凝胶扫描分析仪, 上海复旦生物实验技术研究所产品; 医学形态学图像分析系统, 江苏捷达科技发展有限公司产品。

动物分组及模型制备 雄性 Wistar 大鼠 120 只, 体重 270 ~ 300 g, 山东大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(鲁) 20030004。实验条件下适应性喂养 1 周后, 随机分为 6 组 (每组 20 只动物), 即假手术组 (sham operation), 脑缺血再灌注模型组 (ischemia-reperfusion, I-R), 黄芩苷组 (50, 100 和 200 mg·kg⁻¹), 以及尼莫地平 0.4 mg·kg⁻¹ 组。再灌注后立即静脉注射给予相应药物 (假手术组和 I-R 组于相同时限注射等体积生理盐水)。

以直径 0.20 mm、顶端烫制成光滑球状 (直径 0.25 ~ 0.30 mm) 的尼龙线作为栓子, 采用改进的 Longa 腔内栓线阻断法^[5]制备大鼠左侧大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型。缺血 1 h 麻醉状态下抽出尼龙栓线, 实现再灌注。假手术组只进行麻醉和血管分离术, 不结扎血管及导入栓线。再灌前参照 Longa 方法^[5]进行 5 分制神经功能评分: 0 分, 无明显神经病学症状; 1 分, 不能完全伸展右前肢; 2 分, 向右侧旋转; 3 分, 行走时向右侧倾倒; 4 分, 不能自行行走。评分为 1 ~ 3 分者模型制备成功, 余者剔除。不足预定数额者按照随机抽样原则补齐动物并重新制备模型。

病理形态学观察 脑缺血 1 h 再灌注 24 h, 大鼠灌流固定后断头取脑, 于视交叉后 1.7 ~ 4 mm (海马齿状回互包平面) 进行冠状切块, 取中间切块梯度脱水、透明、浸蜡、包埋。常规 4 μm 连续冠状切片, 共切 12 张。隔 4 取 1 (间隔 16 μm) 为 1 套切片, 制成 2 套切片, 每套 3 张, 分别进行 HE 染色与 HSP70 免疫组化分析。

HE 染色后, 光镜下观察大鼠海马 CA1 区神经元的形态学变化。

流式细胞仪检测细胞凋亡率 脑缺血 1 h 再灌注 24 h, 迅速断头取脑, 分离缺血侧海马组织 100 mg, 1.25 g·L⁻¹ 胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液, 70% 乙醇 4 °C 过夜固定样品, 次日离心弃乙醇收集细胞, 加入 50 mg·L⁻¹ RNase A, 37 °C 孵育 30 min, 再加入 50 mg·L⁻¹ PI, 4 °C 避光染色 30 min, 300 目筛网过滤, 利用 CytomicsTM FC500 型流式细胞仪计数 10 000 个细胞, 测定各期细胞 DNA 含量并计算凋亡细胞所占比例。

RT-PCR 检测 HSP70 mRNA 的表达 参照文献^[6]设计 HSP70 与 β-肌动蛋白 (β-actin) 引物, 并由上海生工生物工程技术有限公司合成。HSP70 上游引物: 5'-CGCGACCTGAACAAGAGCAT-3'; 下游引物: 5'-TCGAAGGTCACCTCGATCTG-3'; PCR 产物长度 363 bp。β-Actin 上游引物: 5'-GTGGGGCGCCC CAGGCACCA-3'; 下游引物: 5'-CTCCTTAATGTCACG CACGATTT-3'; PCR 产物长度为 500 bp。

取大鼠缺血侧海马组织 50 mg, Trizol 法提取总 RNA, 并经紫外分光光度计鉴定 RNA 的浓度与纯度。取总 RNA 1 μg, 应用 DNA 循环合成仪进行总 RNA 逆转录。Oligo(dT) 15 为引物, M-MuLV 为逆转录酶, 反应体系为 20 μL, 42 °C 孵育 60 min, 合成 cDNA 第 1 条链。取逆转录产物 2 μL 为模板进行

PCR扩增, β -actin作为内参照同时扩增。循环条件 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 28个循环。扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶扫描分析仪扫描凝胶,并分析 HSP70与 β -actin基因谱带的积分光密度,以两者比值(即相对系数)表示 HSP70基因的相对表达水平。

免疫组织化学染色检测 HSP70 蛋白的表达 石蜡切片常规烘干、脱蜡、水化后,按照试剂盒说明书,采用 Elivision 两步法进行免疫组织化学染色,以 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS代替一抗作为阴性对照,胞浆或胞核内有棕黄色颗粒者为阳性细胞。每组 10只动物,每只动物观察 3张切片,利用“医学形态学图像分析系统”,在每张切片的海马 CA1 区随机测量 3个视野中阳性染色的平均光密度与阳性细胞百分率,取其均值,以两者乘积再乘以 100作为阳性表达指数(positive expression index, PEI, $\text{PEI} = \text{平均光密度} \times \text{阳性细胞百分率}$),表示每张切片的蛋白表达水平。

统计学处理 所有数据均采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验。

结果

1 黄芩苷对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织形态学的影响

HE染色结果显示,假手术组海马组织结构正常,锥体细胞排列整齐,形态正常,细胞着色均匀,胞浆呈淡红色,胞核呈蓝色且较清亮(图 1A)。I-R组

海马组织结构明显异常,锥体细胞排列紊乱,细胞间隙增宽,神经元变性明显。部分退变的神经元呈现凋亡特征:细胞皱缩成圆形或卵圆形;核染色质固缩、边集或碎裂;胞浆皱缩,嗜酸性增加。部分神经元亦出现胞浆红染、胞核固缩、溶解等坏死特征(图 1B)。黄芩苷和尼莫地平组神经细胞排列略紊乱,仍可见细胞皱缩和胞核固缩浓染现象,但程度较模型组明显减轻,其中以黄芩苷 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组及 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组改善最为明显(图 1C~F)。

2 黄芩苷对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的影响

流式细胞术细胞周期定量分析表明(表 1),假手术组未见明显的凋亡峰(图 2A),虽也有自发性细胞凋亡发生,但细胞凋亡百分率很低,仅为 $(3.7 \pm$

Table 1 Effect of baicalin on apoptosis in focal cerebral injury rats induced by ischemia-reperfusion (I-R)

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Apoptotic rate / %
Sham	-	3.7 ± 0.6
I-R	-	$20.6 \pm 5.4^{###}$
Baicalin	50	$14.5 \pm 3.1^{###*}$
	100	$11.2 \pm 4.2^{###*}$
	200	$10.2 \pm 2.6^{###*}$
Nimodipine	0.4	$14.1 \pm 3.8^{###*}$

Rats were prepared for models of focal cerebral ischemic injury by inserting a nylon thread (0.25 - 0.30 mm OD) into middle brain artery to make it occluded. One hour later, the thread was withdrawn to resume perfusion. Baicalin or nimodipine was given iv instantly after reperfusion, at the same time, the sham and I-R groups were given iv normal saline. Twenty-four hours after reperfusion, the rats were sacrificed for determination of cell apoptosis by flow cytometry (FCM). $n=10$, $\bar{x} \pm s$. $^{###} P < 0.01$ vs sham group; $^{**} P < 0.01$ vs I-R group

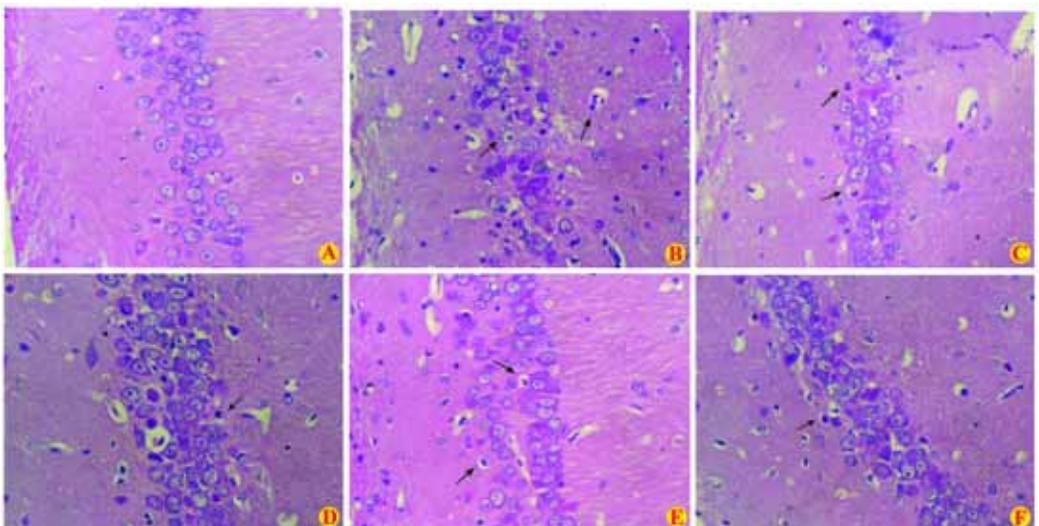


Figure 1 Morphological changes of the pyramidal cells in hippocampus CA1 region of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury (HE, $\times 400$). A: Sham operation group; B: I-R group; C - E: Baicalin 50, 100 and $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group, respectively; F: Nimodipine $0.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group. Arrows: Apoptosis cells

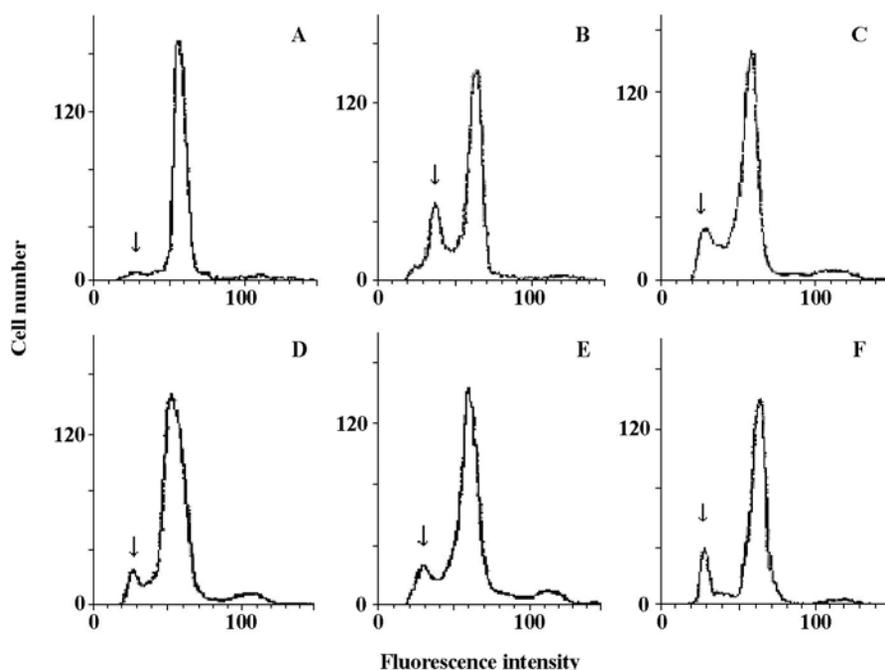


Figure 2 DNA histograms of apoptotic cell analyzed by flow cytometry (FCM). A: Sham operation group; B: I-R group; C - E: Baicalin 50, 100 and 200 mg• kg⁻¹ group, respectively; F: Nimodipine 0.4 mg• kg⁻¹ group

0.6) %。脑缺血 1 h再灌注 24 h后, I-R组大鼠在 G₀/G₁ 期前出现明显的亚二倍体凋亡峰(图 2B), 细胞凋亡发生率为 (20.6 ± 5.4) %, 较假手术组显著增加。黄芩苷组细胞凋亡发生率较模型组显著降低(图 2C ~ E), 其中以黄芩苷 200 mg• kg⁻¹降低细胞凋亡率的效果最佳。

3 黄芩苷对脑缺血再灌注损伤大鼠 HSP70 mRNA 表达的影响

自大鼠脑组织提取的总 RNA经逆转录及 PCR 扩增后, 均于 363 bp处出现了背景清晰但亮度不同的条带, 表示各组均有 HSP70 mRNA 的表达(图 3)。对各组条带进行光密度分析(表 2), 可见假手

术组仅有微弱的 HSP70 mRNA表达, 脑缺血 1 h再灌注 24 h后, 模型组 HSP70 mRNA表达明显增加。黄芩苷 200 及 100 mg• kg⁻¹治疗后可明显增加 HSP70 mRNA的表达强度; 黄芩苷 50 mg• kg⁻¹有增加 HSP70 mRNA表达的趋势, 但无统计学差异。

4 黄芩苷对脑缺血再灌注损伤大鼠 HSP70 蛋白表达的影响

免疫组织化学结果显示, 假手术组大鼠 HSP70 阳性细胞极少, 蛋白表达微弱(图 4A, 表 3)。脑缺

Table 2 Effect of baicalin on HSP70 mRNA expression in focal cerebral injury rats induced by ischemia-reperfusion (I-R)

Group	Dose / mg• kg ⁻¹	HSP70 mRNA expression (A _{HSP70} : A _{β-actin})
Sham	-	0.288 9 ± 0.080 9
I-R	-	0.764 2 ± 0.178 8 ^{##}
Baicalin	50	0.779 2 ± 0.207 7 ^{##}
	100	0.911 1 ± 0.094 4 ^{###*}
	200	0.955 6 ± 0.101 2 ^{###*}
Nimodipine	0.4	0.896 0 ± 0.112 3 ^{###*}

At 24 h after reperfusion, the rats were sacrificed for determination of the expression of the mRNA level of HSP70 protein by RT-PCR method. n = 10, $\bar{x} \pm s$. ^{##} P < 0.01 vs sham group; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs I-R group

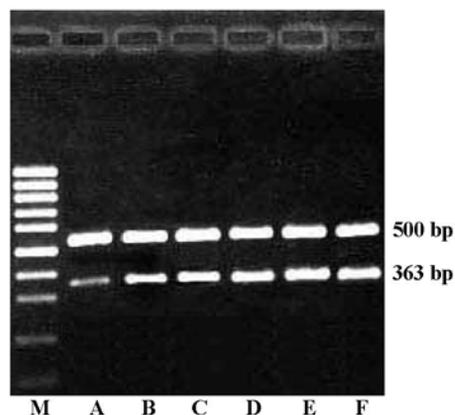


Figure 3 Expression of HSP70 mRNA as determined by RT-PCR in hippocampus CA1 region of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury. A: Sham operation group; B: I-R group; C - E: Baicalin 50, 100 and 200 mg• kg⁻¹ group, respectively; F: Nimodipine 0.4 mg• kg⁻¹ group; M: Marker

血 1 h 再灌注 24 h 后,模型组大鼠皮层、海马及纹状体等处均可见到棕黄色颗粒状的 HSP70 阳性细胞,且数目较多,蛋白表达较假手术组明显增强(图 4B,表 3)。药物治疗后,脑组织 HSP70 阳性细胞数进一步增加,分布密集且胞浆着色较深(图 4C~F,表 3),其中黄芩苷 200 mg·kg⁻¹组及 100 mg·kg⁻¹组 HSP70 蛋白表达较模型组明显增强,黄芩苷 50 mg·kg⁻¹组无明显诱导 HSP70 蛋白表达的作用。

Table 3 Effect of baicalin on HSP70 protein expression in focal cerebral injury rats induced by ischemia-reperfusion (I-R)

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	HSP70 PEI/%
Sham	-	0.39 ± 0.07
I-R	-	8.02 ± 2.43 ^{##}
Baicalin	50	8.75 ± 3.18 ^{##}
	100	12.91 ± 4.02 ^{##*}
	200	16.05 ± 3.72 ^{##**}
Nimodipine	0.4	12.11 ± 2.92 ^{##*}

PEI: Positive expression index. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs I-R group

讨论

随着分子生物学的发展,脑缺血致病机制研究中的重要进展之一,是认识到细胞凋亡与脑缺血再灌注损伤关系密切,且在脑梗死的形成、发展过程中发挥重要作用,而抑制细胞凋亡的发生可减轻脑缺血再灌注损伤的程度和范围^[7,8]。由于海马 CA1 区的锥体细胞对缺血再灌注损伤非常敏感,主要表现

为迟发性神经元死亡^[9,10],因此作者选取海马 CA1 区作为研究对象。本实验 HE 染色及流式细胞术结果显示,大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤可诱导海马 CA1 区神经元凋亡,黄芩苷可明显减少呈凋亡形态学改变的神经元数量,降低细胞凋亡百分率。提示黄芩苷可能通过抑制神经细胞凋亡,发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

近年研究发现,HSP70 对缺血脑组织的保护作用可能与抑制细胞凋亡有关^[11]。脑缺血后 HSP70 表达时间与神经元凋亡的时序基本吻合,而且凋亡细胞的 HSP70 表达水平较非凋亡细胞低,有翻译 HSP70 能力的缺血神经元大多不出现细胞凋亡,提示 HSP70 可能参与抑制细胞凋亡,从而对缺血神经细胞产生保护作用^[11]。Lee 等^[12]在 HSP70 基因敲除小鼠的局灶性脑缺血模型中观察到,基因敲除小鼠与普通小鼠相比,脑梗死体积明显增大,神经细胞凋亡数明显增加。而过表达大鼠 HSP70 的转基因小鼠在局灶性脑缺血再灌注损伤后,其脑梗死体积较普通小鼠明显减小,海马 CA1 和 CA3 区嗜酸性细胞亦明显减少,提示过表达 HSP70 可抑制神经细胞凋亡,减轻神经损伤^[13]。进一步的实验研究表明,HSP70 合成增加可防止蛋白质聚集,一方面抑制 Caspase-3 的活化和线粒体细胞色素 c 的释放,从而阻断细胞的程序化死亡途径;另一方面可保护染色体,防止其受到参与凋亡的蛋白酶和核酸攻击,以阻止细胞开启自杀途径,减轻细胞凋亡^[14]。因此有研究认为,HSP70 有可能成为治疗缺血性脑损伤的又

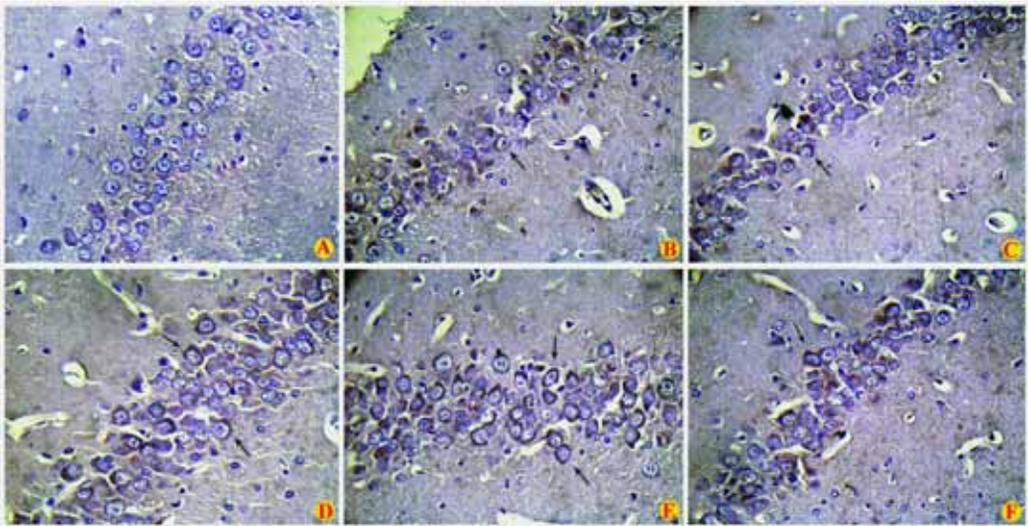


Figure 4 Immunohistochemistry staining of HSP70 protein expression in hippocampus CA1 region of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury ($\times 400$). A: Sham operation group; B: I-R group; C - E: Baicalin 50, 100 and 200 mg·kg⁻¹ group, respectively; F: Nimodipine 0.4 mg·kg⁻¹ group

一靶点,如能通过某些方法、途径或药物提高缺血组织 HSP70 的合成,可能为防治缺血性脑血管疾病提供新的思路和途径^[15,16]。

本实验 RT-PCR 结果显示,大鼠大脑中动脉缺血 1 h 再灌注 24 h 后,缺血侧脑组织海马区 HSP70 mRNA 表达升高,说明脑缺血再灌注损伤可明显诱导 HSP70 mRNA 的转录。结合缺血侧海马 CA1 区 HSP70 的免疫反应性及形态学变化,发现 HSP70 蛋白表达与转录水平的升高平行一致,提示伴随 HSP70 转录水平的升高,再灌注后某些因素可诱导 HSP70 蛋白的表达,且其表达强度与损伤的严重性及对损伤的耐受性有关。这与文献^[17,18]报道 HSP70 可作为细胞或组织遭受可逆性损伤的分子生物学标志相一致。黄芩苷可在转录与翻译水平进一步增加 HSP70 的表达,同时细胞凋亡率亦较模型组明显降低,即 HSP70 表达增加的时间与神经元凋亡率降低的时序基本吻合。进一步的形态学分析发现,HSP70 主要在非凋亡细胞中表达,而有表达 HSP70 能力的缺血神经元大多不发生细胞凋亡,提示黄芩苷可能通过促进 HSP70 表达,在辅助蛋白正确折叠、耐受缺血损伤的同时,进一步抑制细胞凋亡,从而发挥脑保护作用。

References

- [1] Sato K, Saito H, Matsuki N, et al. HSP70 is essential to the neuroprotective effect of heat shock [J]. *Brain Res*, 1996, 740: 117 - 123.
- [2] Buzzar KA, Giaccia AJ, Killender M, et al. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 17147 - 17153.
- [3] Li TF, Luo YM, Lu CZ. Effect of baicalin on neuronal apoptosis induced by limbic seizure following kainic acid injection into amygdaloid nucleus [J]. *Chin J Neurosci (中国神经科学杂志)*, 2003, 19: 395 - 400.
- [4] Liu P, Li Q, Wang JY, et al. Effects of baicalin on infarct volume and behavior in focal cerebral ischemia-reperfusion injury rats [J]. *Shandong Med J (山东医药)*, 2004, 44: 38 - 39.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84 - 91.
- [6] Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C, et al. Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 547 - 551.
- [7] Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1993, 24: 2002 - 2008.
- [8] Sun GL, Han YK, Li GQ. Study on the ultrastructure of apoptosis after cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat [J]. *Chin J Perinatal Med (中华围产医学杂志)*, 1999, 2: 21 - 23.
- [9] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10: 267 - 272.
- [10] Han MF, Rao ML, Zhang SQ, et al. The ultrastructural pathological changes of delayed neuronal necrosis (DNN) after cerebral ischemia [J]. *J Apoplexy Nerv Dis (中风与神经疾病杂志)*, 1993, 10: 65 - 67.
- [11] He L, Fox MH. Variation of heat shock protein 70 through the cell cycle in HL-60 cells and its relationship to apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 232: 64 - 71.
- [12] Lee SH, Kwon HM, Kim YJ, et al. Effects of HSP70.1 gene knockout on the mitochondrial apoptotic pathway after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2004, 35: 2195 - 2199.
- [13] Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, et al. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures [J]. *Neurosurgery*, 2003, 53: 1179 - 1188.
- [14] Li CY, Lee JS, Ko YG, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 25665 - 25671.
- [15] Kirino T. Ischemic tolerance [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 1283 - 1296.
- [16] Ren M, Leng Y, Jeong M, et al. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction [J]. *J Neurochem*, 2004, 89: 1358 - 1367.
- [17] Sharp FR, Sagar SM. Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: heat shock and the immediate early gene response [J]. *Neurotoxicology*, 1994, 15: 51 - 59.
- [18] Dettre JA, Zager EL, Alsop DC, et al. Correlation of diffusion MRI and heat shock protein in a rat embolic stroke model [J]. *J Neurol Sci*, 1997, 148: 163 - 169.