

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.014

类缺血等多种预处理上调脂多糖应答基因在神经元中的表达

胡玲 殷亮 吴畏 蔡琳 巩固[△]

(成都军区总医院麻醉科 四川 成都 610083)

摘要 目的:研究体外和体内多种预处理对小鼠神经元细胞内脂多糖应答基因(LRG)表达的影响。**方法:**利用 qRT-PCR 和 western blot 方法检测体外多种预处理(类缺血、高压氧、异氟和脂多糖)对小鼠神经元细胞中 LRG 的转录水平和蛋白表达水平的影响;运用小 RNA 干扰方法(siRNA)沉默神经元细胞中 LRG 的表达,噻唑蓝(MTT)方法检测神经元细胞的生长情况;运用大脑中动脉阻断法(MCAO)建立多种预处理诱导脑缺血耐受的小鼠试验模型,qRT-PCR 和 western blot 方法检测小鼠脑组织中 LRG 转录水平和蛋白水平的变化。**结果:**体外多种预处理明显上调 LRG 在小鼠脑海马神经元细胞中的表达;沉默 LRG 在神经元中的表达明显加快类缺血处理细胞的死亡;多种预处理建立的脑缺血耐受小鼠的脑组织中 LRG 转录水平和蛋白表达水平明显升高。**结论:**类缺血等多种预处理可上调神经元细胞内 LRG 的表达,但其在脑缺血再灌注损伤中的作用机制尚不清楚,需进一步的研究。

关键词:预处理;LRG 基因;脑缺血/再灌注

中图分类号:R741.02,R743,Q95-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)13-2453-04

Ischemia-like and Various Preconditioning Promote the Expression of Lipopolysaccharide Response Gene in Neurons

HU Ling, YIN Liang, WU Wei, CAI Lin, GONG Gu[△]

(Department of Anesthesiology, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA, Chengdu, Sichuan, 610083, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of various preconditioning on lipopolysaccharide response gene (LRG) expression in neurons of mice in vitro and in vivo. **Methods:** qRT-PCR and western blot were used to detect the expression profiles of LRG in mice neurons under various preconditioning in vitro. LRG expression was silenced by small interference RNA (siRNA) and cell growth was detected by MTT assay. The mouse model of ischemia tolerance under various pre-conditions was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) and the transcription level and protein level of LRG in mouse brain tissues were determined by qRT-PCR and western blot, respectively. **Results:** The mRNA and protein levels of LRG were increased in neurons under various preconditioning including ischemic-like-reperfusion, hyperbaric oxygen, isoflurane and lipopolysaccharide in vitro. The growth of neurons under ischemic-like-reperfusion pretreatment was significantly decreased in LRG expression silencing cells. In addition, the mRNA and protein levels of LRG in brain tissues of mouse model of ischemia tolerance under various preconditioning were also up-regulated. **Conclusion:** Ischemia-reperfusion-like and various preconditioning promoted the expression of LRG in mice neurons. However, the precise molecular mechanism of LRG in regulating cerebral ischemia-reperfusion injury remains unclear which deserved further investigation.

Key words: Preconditioning; LRG gene; Brain ischemic reperfusion

Chinese Library Classification: R741.02, R743, Q95-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)13-2453-04

前言

脑缺血耐受(brain ischemic tolerance, BIT)是指预先的短暂性缺血或轻度缺氧处理能够使机体对随后更严重的缺血、缺氧产生防御和保护作用的现象^[1]。研究已在脑、心肌、骨骼肌、肝、肾、小肠等多种器官中都发现了缺血耐受现象^[2]。脑缺血耐受的产生具体机制目前还未明确,已知是一种与递质^[3]、通道、基因表达^[4]、蛋白质合成^[5]相关的多环节相关的生物学过程。研究发现,物理性和化学药物预处理均能够提高脑缺血耐受,但其分

子机理并不清楚。LRG 是一种新发现的脂多糖应答基因,最早由人牙髓细胞差异表达、基因文库中筛选出来^[6]。近年来,研究发现脂多糖应答基因(LRG)在脑缺血耐受中具有重要的作用。本研究主要研究 LRG 在体外和体内类缺血等多种预处理情况下的 mRNA 和蛋白水平的表达模式,探讨其对神经元细胞生长的影响,为阐明 LRG 在脑缺血耐受中的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验动物的使用严格遵守解放军总医院伦理道德委员会制定的指导原则。成年雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 18~30g,饲养在 24±2℃,50±10%相对湿度条件下。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、细胞培养基(Gibco);DyNAmo SYBR Green qPCR 试剂盒(Invitrogen/USA);辣根过氧化物酶标

作者简介:胡玲(1978-),女,硕士,主治医师,从事脑保护研究,
E-mail: hulin1165@163.com

[△]通讯作者:巩固, E-mail: gonggu_135@163.com

(收稿日期:2013-11-20 接受日期:2013-12-13)

记的羊抗鼠二抗和胰蛋白酶(Sigma);脂质体(LipofectamineTM 2000, Invitrogen/USA); 半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解 3 (cysteinyI aspartate specific proteinase 3, caspase-3)检测试剂盒(上海浩然生物技术有限公司); 兔抗 LRG 抗体和兔抗 β -actin 抗体(Santa Cruz)。

1.2 实验方法

1.2.1 神经元的原代培养 取新生 24 h 内的小鼠, 75% 乙醇消毒后断头取脑, 分离脑海马, 用低浓度(0.25%)的胰酶结合机械吹打的方法制备单细胞悬液, 调节细胞浓度至 $10^6/\text{mL}$, 种板。24 至 48 h 后首次全量换液, 培养到第 3~4 天。加入阿糖胞苷(终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)抑制胶质细胞生长, 纯化神经元。作用 1~2 d 后全量换液, 以后每周换液 2-3 次每次半量换液。

1.2.2 神经元细胞体外多种预处理 类缺血预处理: 将在 12 孔无菌培养板上原代培养 7 d 的海马神经细胞随机分为处理组和对照组, 将处理组培养板移入 37°C 恒温密闭容器中, 连续充以 95% NO_2 +5% CO_2 混合气体, 流速为 20 mL/min , 持续 15 min; 然后复氧 0、6、12、24、48 h。高压氧(HBO)预处理: 将在 12 孔无菌培养板上原代培养 7 d 的海马神经细胞随机分为处理组和对照组; 对照组未经高压氧处理; 高压氧(0.2 MPa/1 h)预适应组。异氟烷预处理: 将神经细胞培养接种于 12 孔板中, 培养至 7 d, 随机分为 2 组, 分别为: ①空白对照组(C 组); ②IMAC 异氟烷组 (ISO 组)。有研究表明异氟烷 IMAC 对应的异氟烷浓度为 1.2%, 同时采用 5330 型麻醉气体监测仪进行持续监测。脂多糖预处理: 将实验分组和处理细胞培养到第 7 天左右, 随机分成对照组(C 组), LPS 组(L 组), L 组用 LPS($10 \mu\text{g/mL}$)处理 48 h, 而对照组神经元仍进行正常培养。

1.2.3 siRNA 的合成和转染 根据 LRG 的基因序列, 设计含有 Sal I 和 Xba I 酶切位点的 siRNA 序列: P1: TCGACGCTCTTCAGACATAAAGGATTCGCTCTTCTGTCTGAAGAGC TTTT; P2: CTAGAAAAAGCTCTTCAGACAGAAAGGACGA ATCCTTCTGTCTGAAGAGCG。引物通过 SalI-XbaI 限制性位点克隆到 shRNA 质粒 pAVU6+27 中, 重组质粒序列由测序进行鉴定。同时设计非特异性 siRNA 序列作为阴性对照正, 序列由上海生工合成。细胞接种到 24 孔培养板中, 取 $5 \mu\text{L}$ LipofectamineTM2000 稀释到 $250 \mu\text{L}$ 减血清培养基 MEM (minimum essential media, MEM)培养基中, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min; 取 $8.0 \mu\text{L}$ siRNA 稀释到上述含 $5 \mu\text{L}$ LipofectamineTM 2000 的 $250 \mu\text{L}$ 减血清 MEM 培养基中, 室温孵育 20 min。取 $50 \mu\text{L}$ siRNA-Lipofectamine 复合物加入到细胞培养孔中, 轻轻摇动混匀, 37°C , 5% CO_2 条件下培养。

1.2.4 噻唑蓝 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 法检测细胞的生长情况 各组细胞经处理后弃去上清液, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗, 每孔加入 MTT $100 \mu\text{L}$ (终浓度为 0.15 mg/ml), 置于 5% CO_2 培养箱内继续孵育 4-6 h, 加入 10%十二烷基硫酸钠与 50%异丙醇 ($100 \mu\text{L/孔}$) 助溶。 37°C 放置过夜后于全自动酶标仪 490 nm 波长处测定 OD 值。实验重复三次, 取平均数作为实验结果。

1.2.5 多种预处理处理小鼠 C57Bl/6J 小鼠 18-30g, 由本院动物部提供, 共 50 只, 随机分 5 组($n=10$)。假手术组(SHAM 组),

只分离双侧颈总动脉而未予夹闭; 缺血组, 夹闭双侧颈总动脉 5 min 后再开放; 高压氧预处理组, HBO 组动物接受连续 5 d 的高压氧预处理, 高压氧处理条件为: 100% 氧气, 253.3 kPa , 1 h/d 。处理过程: 动物进高压氧舱后先用 100% 氧气洗舱 10 min, 再进行匀速加压, 20 min 加压至 2.5 ATA, 舱内氧气浓度 $> 96\%$, 并用 100% 氧气通风, 之后匀速减至常压。20 min/ 次, 间隔 30 min, 连续 4 次。ISO 组, 进行 I/R 损伤前将鼠置于 $100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$ 的实验舱里, 内放 ISO(雅培公司)和钠石灰, 使 ISO 浓度维持在 1.2%~1.5%(Datex 气体监测仪监测), 进行 ISO 预处理 30 min, 后在空气中洗脱 30 min; LPS 组供体第 1 天经尾静脉给予 LPS 0.1 mg/kg , 第 2、3、4、5 天给予 0.5 mg/kg 。所有动物手术前夜禁食不禁水, 10% 水合氯醛 0.35 g/kg 腹腔注射麻醉。小鼠经预处理后建立局灶性脑缺血模型。

1.2.6 局灶性脑缺血模型的建立 采用颈内动脉尼龙线(3-0)线栓法, 根据 Koizumi 等^[7]方法, 参考 longa 等^[8]即将动物置于一半密闭容器中, 经 10% 水合氯醛 0.35 g/kg 腹腔注射麻醉后, 保留自主呼吸。取颈正中切口, 暴露右侧颈总动脉, 颈外动脉及颈内动脉; 结扎颈总动脉、颈外动脉; 于颈总动脉分叉下方剪一切口, 将一预先用乙醇灯烧成圆头的尼龙线 (3-0, Ethicon Inc, Japan)置入颈内动脉 17~18 mm, 直到有轻微阻力感为止。手术时间 15~20 min, 术毕 1 min 内动物基本清醒, 恢复活动。右侧大脑中动脉(MCA)阻断 120 min 后再次用 10% 水合氯醛快速麻醉动物, 抽出尼龙线, 恢复再灌注。术中保留自主呼吸, 体温由肛温探头连接多功能监测仪(Spacerlab, USA)监测, 并用烤灯维持在 $37.0 \sim 37.5^\circ\text{C}$ 。

1.2.7 qRT-PCR 方法检测 mRNA 表达水平 利用 RNA-Solve Reagent 试剂盒提取神经细胞的总 RNA, 合成 cDNA。利用 cDNA 进行 lrg 基因片断扩增, 引物按照 GenBank 登录号 NM_018360 进行设计, P1: 5'-CATGGCGACGCGGGTA-GAGG-3c, P2: 5'-CACATCAAGGAACCATCGTC-3'。内参 β -actin 引物为: P1: 5'-ATGGATGACGTATCGCTG-3', P2: 5'-ATGAGGTAGTTGTCAGGT-3'。25 μL 反应体系中含 $10 \times$ buffer 2.5 μL , dNTPs 2 μL , P1 和 P2 ($20 \mu\text{mol/L}$) 分别为 0.5 μL (每个片断均单独扩增), Ex Taq 酶 0.2 μL , cDNA 2 μL , 灭菌三蒸水 17.3 μL 。反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s、 50°C 退火 30 s、 72°C 延伸 40 s, 共 36 个循环; 72°C 延伸 8 min。扩增产物电泳后染色、观察, 将 PCR 产物纯化、测序, 序列采用 DNAMAN 分析软件进行序列分析和比较。采用 DNA Engine OpticonTM2 荧光检测系统和 DyNAmo SYBR Green qPCR 试剂盒进行基因表达的测定。反应体系为 25 μL , 其中 12.5 μL DyNAmo SYBR Green qPCR mix, 0.5 μL 20 pmoL 引物, 2 μL cDNA 模板 ($< 10 \text{ ng/}\mu\text{L}$)。反应条件为: UNG 酶 50°C 孵育 2 min, 94°C 预变性 10 min。 94°C DNA 变性 20 sec, 引物在 50°C 退火 30 sec, 72°C 延伸 30 sec, 36 个循环, 72°C 后延伸 10 min。溶解曲线的制作条件为 $65^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$, 每 0.2°C 停留 1 sec。

基因表达定量的方法采用相对标准曲线法, 内源性管家基因 β -actin 标准化目的基因, 目的基因和管家基因都绘制标准曲线。纯化的 DNA 片断克隆后, 按 10 到 10^4 倍比稀释, 由 Opticon Monitor 2 软件产生最佳荧光基线和标准曲线。目的基

因和 β -actin 基因的拷贝数分别根据产生的 Ct 值从各自的标准曲线获得。取 3 次重复的平均值,用目的基因的拷贝数除以 β -actin 的拷贝数作为靶基因的相对表达量。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达 提取神经元细胞 LRG 蛋白,测定蛋白的浓度,取 30 μ g 蛋白样品,首先进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳。电泳结束后,将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,并用 1% 丽春红染色检测转移效果。而后,将膜放在 10 ml 封闭液中(2% 脱脂奶粉)1 h;加入一抗(1:1000),4 $^{\circ}$ C 过夜孵育;加入二抗(1:10000)室温孵育 2 h;暗处发色。

1.3 统计学分析 实验数据采用统计学软件 SPSS13.0 分析,计量资料的组间比较采用 t 检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外多种预处理上调神经元细胞内 LRG mRNA 的表达

利用 qPCR 检测体外预处理后神经元细胞内 LRG mRNA 的表达水平,结果显示:与对照组相比,经过类缺血、高压氧、异氟烷和脂多糖预处理的神经元细胞内 LRG mRNA 的表达水平明显升高($P < 0.05$)(图 1)。

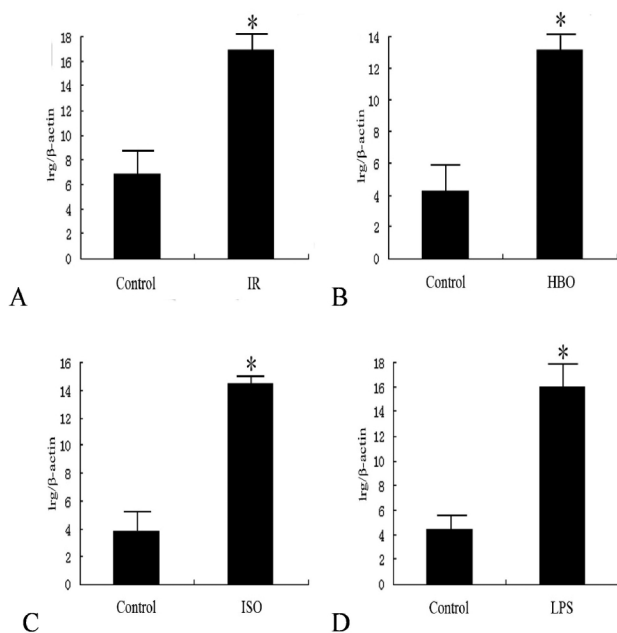


图 1 多种预处理对神经元细胞中 LRG mRNA 表达水平的影响

Fig.1 Effect of various preconditioning on the mRNA level of LRG in neurons. A, Ischemia-like-reperfusion precondition (IR); B, hyperbaric oxygen precondition (HBO); C, isoflurane precondition (ISO); D, lipopolysaccharide precondition (LPS) (* $P < 0.05$)

2.2 体外多种预处理上调神经元细胞内 LRG 蛋白的表达

通过提取体外预处理组及对照组神经元细胞的 LRG 蛋白,并利用 western blot 的方法检测其表达状况。结果显示:与对照组相比,类缺血、高压氧、异氟烷和脂多糖预处理组的神经元细胞 LRG 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)(图 2)。

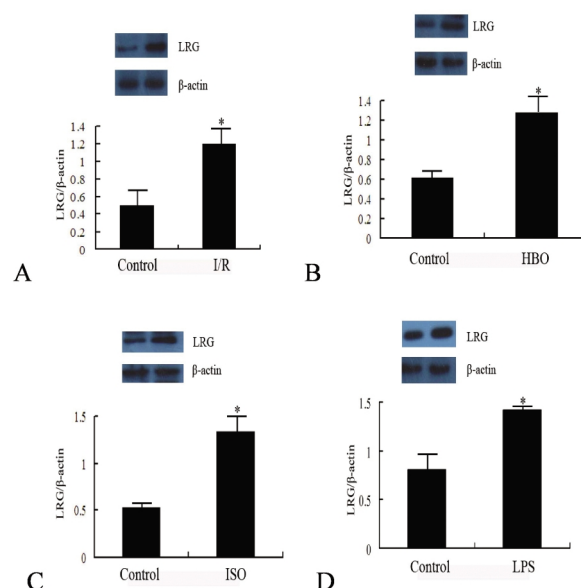


图 2 多种预处理对神经元细胞中 LRG 蛋白水平表达的影响

Fig. 2 Effect of various preconditioning on the protein levels of LRG in neurons. A, Ischemia-like-reperfusion precondition (IR); B, hyperbaric oxygen precondition (HBO); C, isoflurane precondition (ISO); D, lipopolysaccharide precondition (LPS) (* $P < 0.05$)

2.3 LRG 基因沉默抑制类缺血预处理的神经元细胞的生长

本研究利用 siRNA 技术沉默 LRG 在类缺血预处理神经元细胞中的表达来探讨 LRG 对神经元细胞生长的影响。首先,根据 LRG 的基因序列,我们合成了 lrg 基因的 siRNA 序列。实验共分成了 3 组:① 对照组,未做任何处理的细胞;② 阴性对照组,加入非特异性 siRNA 序列 (non-specific siRNA);③ LRG-siRNA 组。随后通过 MTT 实验来检测细胞生长状况,结果显示:与空白组和阴性对照组相比,LRG 沉默后,缺血处理神经元细胞的生长能力显著降低($P < 0.05$)(图 3)。

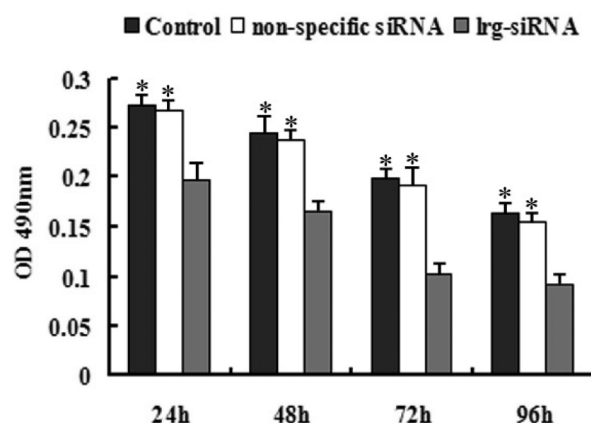


图 3 LRG 表达沉默对缺血处理海马神经元细胞的生长影响

Fig 3 Effect of LRG expression silencing on the growth of neurons under ischemia-like-reperfusion preconditioning. (* $P < 0.05$)

2.4 多种预处理促进脑缺血 / 再灌注模型小鼠脑组织中 LRG mRNA 的表达

本研究在建立脑缺血 / 再灌注小鼠模型前,对小鼠进行了多种预处理,将小鼠分为 5 组:① 假手术组 (SHAM 组): 只分离双侧颈总动脉而未予夹闭;② 类缺血组 (I/R 组): 夹闭双侧颈总

动脉 5min 后再开放;③ 高压氧组(HBO 组):动物接受连续 5d 的高压氧预处理;④ 异氟烷组(ISO 组):进行 I/R 损伤前将鼠置于实验舱中进行 ISO 染毒;⑤ 脂多糖组(LPS 组):供体小鼠 I/R 损伤前经尾静脉给予 LPS。提取小鼠神经元细胞总 RNA, qPCR 检测 LRG 基因 mRNA 的表达量。结果显示:与对照组相比,各预处理组 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$)(图 4)。

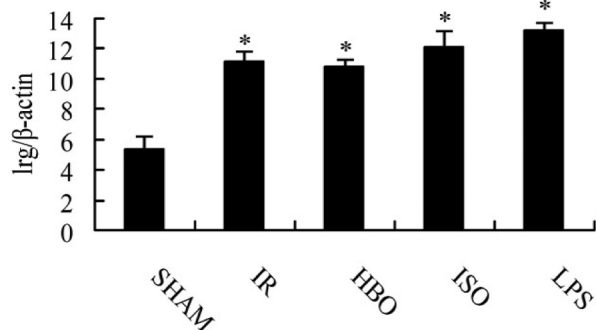


图 4 多种预处理建立脑缺血 / 再灌注模型小鼠脑组织中 LRG mRNA 的表达(* $P<0.05$)

Fig. 4 The mRNA level of LRG in brain tissues of mouse model of cerebral ischemia reperfusion under various preconditioning. SHAM, sham; IR, Ischemia-like-reperfusion preconditioning; HBO, hyperbaric oxygen preconditioning; ISO, isoflurane preconditioning; LPS, lipopolysaccharide preconditioning (* $P<0.05$)

2.5 多种预处理提高脑缺血 / 再灌注模型小鼠脑组织中 LRG 蛋白的表达

模型建立后,提取小鼠神经元细胞 LRG 蛋白,通过 western blot 检测 LRG 蛋白的表达量。结果表明:各预处理组小鼠 LRG 蛋白表达水平平均显著高于对照组小鼠($P<0.05$)(图 5)。

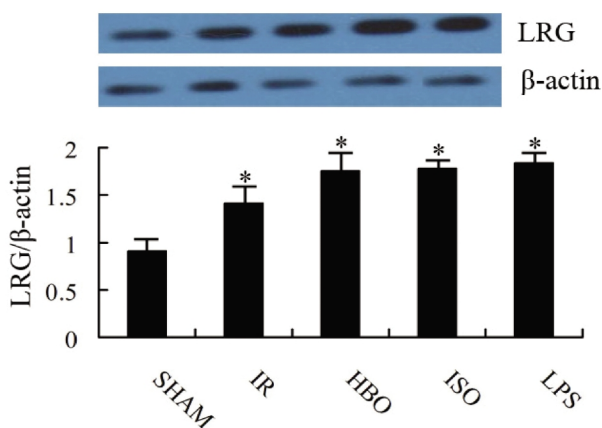


图 5 多种预处理建立脑缺血 / 再灌注模型小鼠脑组织中 LRG 蛋白的表达

Fig. 5 The protein level of LRG in brain tissues of mouse model of cerebral ischemia reperfusion under various preconditioning. SHAM, sham; IR, Ischemia-like-reperfusion preconditioning; HBO, hyperbaric oxygen preconditioning; ISO, isoflurane preconditioning; LPS, lipopolysaccharide preconditioning (* $P<0.05$)

3 讨论

自 1986 年 Murry 在 MI 研究中首先发现缺血预处理(IPC)

能够诱导产生缺血耐受来,诱导缺血耐受发生机制受到广泛关注,但至今还未能阐述其确切机制^[9,10]。随后大量实验研究证明缺血耐受具有器官普遍性^[11]。IPC 可以有效诱导器官产生缺血耐受并因此使器官获得保护作用,但是在临床治疗上还无法得到应用。越来越多的实验研究表明,通过药物激发或模拟机体内源性物质(如腺苷、缓激肽、一氧化氮等)可以诱导缺血耐受的保护作用;许多刺激如高压氧^[12]、异氟烷^[13]等均可诱导脑缺血耐受,但其具体机制尚不明了。

短暂性脑缺血再灌注可导致脑易感区如海马 CA1 区产生选择性迟发性神经元损害^[14,15],研究者多采用大鼠作为研究对象来制作缺血再灌注模型进行脑缺血神经元损伤相关的病理生理机制。而 C57BL/6J、129X1/SvJ、Balb/C 小鼠是转基因小鼠常用的母系小鼠,制作相应缺血模型可以为研究转基因小鼠脑缺血损伤机制提供很好的工具。目前常用于实验研究的是多采用小鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)和双侧颈总动脉夹闭(bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)的缺血模型。本研究应用小鼠大脑中动脉夹闭法(MCAO)制作了 C57BL/6J 小鼠脑缺血模型,为研究小鼠在脑缺血 / 再灌注损伤耐受提供一种较好的模型。

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的组成部分,作为细菌的内毒素,能够诱导出机体对局灶性脑缺血再灌注损伤的耐受,体现了机体的适应性调节。LRG 是新发现的一种 LPS 应答基因。Du K 等研究发现 LRG 主要分布于 HepG2 细胞的细胞质中,可能是细胞质中由细胞膜向细胞核传递 LPS 信息的一种重要分子,因此 LRG 是参与 LPS 介导信号途径一种新的分子^[16]。在人 HEK293 和 U937 细胞中发现^[17],LRG 的表达受到 LPS 的正向调控,并且也受 TNF-α 分子的上调作用^[18],显示出 LRG 在炎症和免疫调控中的作用。本研究在体外实验和体内实验中都证明,多种预处理方式包括类缺血、高压氧、异氟烷和脂多糖都能上调神经元细胞 LRG 基因表达量,而将 LRG 基因沉默后则降低了神经元细胞在类缺血处理中的活力,提示出 LRG 基因与小鼠机体缺血耐受的调节之间的联系。但关于 LRG 基因参与缺血耐受调节的具体机制还有待更深入地研究。

综上所述,类缺血等多种预处理能够上调 LRG 的表达,与脑缺血再灌注损伤保护具有密切的联系。探讨 LRG 在脑缺血再灌注损伤保护中的作用机制具有重要的理论意义,但是其具体作用机制目前并不清楚,本研究为进一步研究 LRG 参与缺血耐受调节机制奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Kitagawa, K. Ischemic tolerance in the brain: endogenous adaptive machinery against ischemic stress [J]. Neurosci Res, 2012, 90 (5): 1043-1054
- [2] Bhuiyan MI, Kim YJ. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning[J]. Int Neurol, 2010, 14 (4): 203-212
- [3] Chouker A, Ohta A, Martignoni A, et al. In vivo hypoxic preconditioning protects from warm liver ischemia-reperfusion injury through the adenosine A2B receptor[J]. Transplantation, 2012, 94 (9): 894-902

- [J]. Human reproduction, 2009, 24(7): 1670-1683
- [12] Zhang JM, Liu XL, Yang YX, et al. Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2010, 45(4): 694-698
- [13] Shen W, Li L, Bai Z, et al. In vitro development of mouse fetal germ cells into mature oocytes[J]. Reproduction, 2007, 134(2): 223-231
- [14] Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation[J]. Biology of Reproduction, 2001, 64(1): 171-178
- [15] Yang HY, Cox SL, Jenkin G, et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts[J]. Reproduction, 2006, 131:851-859
- [16] Israely T, Dafni H, Granot D, et al. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts[J]. Biology of Reproduction, 2003, 68:2055-2064
- [17] Soderstrom -Anttila V, Makinen S, Tuuri T, et al. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients[J]. Hum Reprod, 2005, 20(6): 1534-1540
- [18] Chain RC, Lim JH, Tan SL. State of the art in in vitro oocyte maturation[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2004, 16(3): 211-219
- [19] Jeruss J S, Woodruff T K. Preservation of fertility in patients with cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2009, 360(9): 902-911
- [20] Song Y, Sharp R, Lu F, et al. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction[J]. Cryobiology, 2010, 60(3): S60-S65

(上接第 2456 页)

- [4] Shamloo M, Rytter A, Wieloch T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning[J]. Neuroscience, 1999, 93 (1): 81-88
- [5] Van Winkle JA, Chen B, Lei IF, et al. Concurrent middle cerebral artery occlusion and intra-arterial drug infusion via ipsilateral common carotid artery catheter in the rat[J]. Neurosci Methods, 2013, 213 (1): 63-69
- [6] 杜可军. 人 Irg 真核表达载体的构建和初步分析 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14 (4): 179-184
- Du Ke-jun. Construction of human Irg eukaryotic expression vector and primary assay [J]. Chin J Conserv Dent, 2004, 14 (4): 179-184
- [7] Koizumi J Y M, Nakazawa T. Experimental studies of ischemic brain edema, A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recondition can be introduced in the ischemic area [J]. Jpn J Stroke, 1986, 8(12): 1-8
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91
- [9] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. Circulation, 1986, 74 (5): 1124-1136
- [10] Zhang F, Wu Y, Jia J, et al. Pre-ischemic treadmill training induces tolerance to brain ischemia: involvement of glutamate and ERK1/2. Molecules, 2010, 15 (8): 5246-5257
- [11] De Zeeuw S, Lameris T W, Duncker D J, et al. Cardioprotection in pigs by exogenous norepinephrine but not by cerebral ischemia-induced release of endogenous norepinephrine [J]. Stroke, 2001, 32 (3): 767-774
- [12] Li J, Liu W, Ding S, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats [J]. Brain Res, 2008, 1210: 223-229
- [13] Li L, Zuo Z. Isoflurane preconditioning improves short-term and long-term neurological outcome after focal brain ischemia in adult rats [J]. Neuroscience, 2009, 164 (2): 497-506
- [14] Chen M, Chen Q, Cheng X W, et al. Zn²⁺ mediates ischemia-induced impairment of the ubiquitin-proteasome system in the rat hippocampus [J]. J Neurochem, 2009, 111 (5): 1094-1103
- [15] Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, et al. Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOS-knockout mice [J]. Curr Neurovasc Res, 2010, 7 (1): 23-31
- [16] Du K, Chai Y, Hou L, et al. Over-expression and siRNA of a novel environmental lipopolysaccharide-responding gene on the cell cycle of the human hepatoma-derived cell line HepG2 [J]. Toxicology, 2008, 243 (3): 303-310
- [17] 宋庆贺, 于欣平, 陈苏民. 人 Lrp 蛋白在细胞中的定位及 LPS 对其表达的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22 (7): 542-546
- Song Qing-he, Yu Xin-ping, Chen Su-min. Intracellular location of human Lrp and effects of LPS on Lrp expression in human cell lines [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2006, 22 (7): 542-546
- [18] 秦明哲, 李树志, 侯立朝. TNF- α 对人 Irg 基因表达的调控 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30 (1): 11-13
- Qin Ming-zhe, Li Shu-zhi, Hou Li-zhao. Effects of TNF- α on Irg expression in human cell lines [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2009, 30 (1): 11-13