

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.002

清开灵对小胶质细胞 BV2 缺氧再复氧损伤 gp^{91phox} 表达的影响 *高永红¹ 王 珊² 玛娜璐璐¹ 朱海燕³ 孙逸坤¹ 杨 硕^{4△}

(1 北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部重点实验室和北京市重点实验室 北京 100700;

2 中国中医科学院广安门医院南区 北京 102618; 3 北京中医药大学东直门医院心血管研究所 北京 100700;

4 中国中医科学院中医药信息研究所 北京 100700)

摘要 目的:建立小胶质细胞缺氧再复氧损伤模型,观察产生 ROS 的 NADPH 氧化酶的重要功能亚基 gp^{91phox} 的表达变化及清开灵的干预作用,丰富清开灵基于解毒通络法以祛除内毒恢复脉络的作用内涵。**方法:**体外培养小鼠胶质细胞 BV2,细胞分为正常组、模型组和清开灵高、中、低剂量组,在 1% O₂ 三气培养箱中缺氧 12 小时再复氧 12 小时模拟缺血再灌注损伤,正常对照组在培养箱中培养 24 小时,实时荧光定量 PCR 法检测 gp^{91phox} mRNA 的转录水平,Western blot 法检测 gp^{91phox} 蛋白表达。**结果:**缺氧再复氧损伤后,模型组 gp^{91phox} 基因转录水平和蛋白表达提高(P<0.05);与模型组比较,清开灵低、中、高剂量组都有明显改善作用,其中低剂量(0.0625%)对基因转录降低更明显,高剂量组(0.25%)对 gp^{91phox} 蛋白表达的抑制更显著,具有统计学意义(P<0.05)。**结论:**清开灵可通过降低缺氧再复氧后小胶质细胞 gp^{91phox} 的表达,减少活性氧的产生而抑制脑缺血损伤氧化应激反应。

关键词:清开灵;小胶质细胞;缺氧再复氧;gp^{91phox}

中图分类号:R-33;R743;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6807-03

Effects of QingKaiLing on Expression of gp^{91phox} in the Hypoxia-reoxygenation Model of BV2 Microglial Cells*GAO Yong-hong¹, WANG Shan², MANA Lu-lu¹, ZHU Hai-yan³, SUN Yi-kun¹, YANG Shuo^{4△}

(1 Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education and Beijing, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China; 2 The south instrict of Guang'anmen Hosptial, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 102618, China; 3 Beijing University of Chinese Medicine Institute for Cardiovascular Disease, Beijing, 100700, China; 4 Institute of Information on TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: To establish the ischemic/reperfusion model of microglia in vitro, and to observe the effects of QingKaiLing on the expression of NADPH oxidase subunit gp^{91phox} of BV2 microglial cells. **Methods:** BV2 microglial cells were cultured in vitro and divided into control group, model group, QingKaiLing low, medium and high concentration groups. The hypoxia duration was 12 hours with 1 % O₂ in a tri-gas incubator while reoxygenation lasted 12 hours, the normal group was cultured in CO₂ incubator for 24 hours. Real-Time PCR was used to evaluate the gene expression of gp^{91phox}, and Western blot assay was used to detect the gp^{91phox} protein expression. **Results:** The gp^{91phox} expression increased in BV2 microglial cells exposed to hypoxia and reoxygenation conditions (P<0.05). Compared with the model group, the gene expression of gp^{91phox} in the low dose of Qingkailing injection decreased significantly and gp^{91phox} protein declined obviously in the high dose group. **Conclusion:** QingKaiLing can inhibit the oxidative stress reaction in brain ischemia disease partly by decreasing the expression of gp^{91phox} in microglial cells to reduce the production of ROS.

Key words: QingKaiLing; Microglia; Hypoxia/reoxygenation; gp^{91phox}

Chinese Library Classification: R-33; R743; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6807-03

前言

脑缺血再灌注的发病机制十分复杂,其中炎症反应和氧化应激反应是造成脑缺血损伤级联反应的重要环节。小胶质细胞作为脑组织内的常驻免疫反应细胞,与中枢神经系统(central nervous system, CNS)内多种疾病的病理过程有关,在脑缺血损

伤后小胶质细胞,可迅速活化、增殖,此时具有较强的吞噬能力,并释放神经营养因子和神经毒性因子^[1]。活化的小胶质细胞产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和前炎症因子可激活多种转录因子引发一系列反应^[2]。ROS 作为细胞内信号转导的第二信使,介导细胞内多条信号通路,参与调控炎症、凋亡等许多病理生理活动。还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81173229);北京中医药大学自主基金课题(2011 JYBZZJS 001)

作者简介:高永红(1975-),女,副研究员,中西医结合应用基础研究, E-mail: gaoyh7088@sina.com

△ 通讯作者:杨硕, E-mail: y1y6y3@163.com

(收稿日期:2014-08-29 接受日期:2014-09-23)

(NADPH oxidase, NOX) 是小胶质细胞内产生 ROS 的主要酶体, 激活的 NADPH 氧化酶使小胶质细胞介导的炎症反应成瀑布式放大^[3]。如何抑制 NADPH 氧化酶活性从而改善体内氧化应激反应是阻抑脑缺血再灌注损伤的重要环节^[4]。

清开灵注射液是解毒通络法治疗中风病的传统中药复方, 对脑缺血损伤级联反应具有多环节、多靶点的作用优势, 其配伍作用机制以炎症反应病理过程为核心^[5]。因此本实验在前期研究基础上, 进一步探讨产生 ROS 的 NOX 的重要功能亚基 gp^{91phox} 在小胶质细胞缺氧再复氧损伤后的表达变化及清开灵的干预作用, 丰富清开灵基于解毒通络法以祛除内毒恢复脉络的作用内涵, 为在“毒损脑络”学说的理论指导下治疗中风病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

小鼠小胶质细胞 BV2 购自于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 主要药物与试剂

清开灵注射液(亚宝北中大(北京)制药有限公司, 国药准字 Z11020269, 10 mL/支); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); 优质胎牛血清 (PAA 公司); TRIZOL Reagent (美国 Invitrogen 公司); Rverse Transcription System (A3500 试剂盒) (美国 Promega 公司); Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(美国 ABI 公司); 引物(北京诺赛基因组研究中心有限公司)。RIPA 裂解液, SuperECL Plus 超敏发光液, 预染色蛋白质分子量标准 Marker (10-170 KD), 蛋白磷酸酶抑制剂混合物 (All-in-One, 100×), ImBlotter-NC 硝酸纤维素膜 (20×20 cm) (北京普利莱基因技术有限公司); gp^{91phox} 抗体 (Santa 公司, 货号 sc-130543); Mouse Anti-β-Actin (武汉博士德生物工程有限公司, 货号 BM0627); 过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司, 货号 BA1054)。

1.3 主要仪器

倒置相差显微镜及成像系统(德国 Leica 公司, 4000B), CO2 细胞培养箱(SANYO 公司), 超净工作台(新加坡 ESCO 公司), 实时荧光定量 PCR 仪(Stratagene 公司, 型号 ZA29-Mx3000P); 三气培养箱(RS biotech 公司, 型号 MiniGalaxy A); 垂直电泳槽、电泳仪和转膜仪(北京六一仪器厂)。

1.4 细胞培养

将 BV2 细胞常规培养在已配好的 DMEM 完全培养基(10 %血清灭活)中, 在 37 °C、5 %CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。当细胞汇合达到 90 %以上时加入消化液(0.05 %胰酶 +0.02 % EDTA)消化传代。

1.5 细胞体外缺氧/复氧模型与分组

将单细胞悬液以 5×10⁴/mL 浓度接种在培养板中, 培养 48 h, 待细胞生长至 80 %汇合状态后分组, 更换相应的培养液。共分为 5 组, 正常对照组(DMEM 培养基)、模型组(DMEM 培养基)和清开灵低、中、高剂量组(DMEM 培养基稀释清开灵注射液为 0.0625 %, 0.125 %, 0.25 %)。正常对照组在 37 °C、5 %CO₂ 培养箱中培养 24 h, 模型组和清开灵组分别置于 1.0 % O₂、37 °C 缺氧培养箱中缺氧 12 h, 复氧时再置于 37 °C、5 % CO₂ 培养箱中培养 12 h。

1.6 实时荧光定量 PCR 法检测 BV2 细胞 gp^{91phox} mRNA 的转录

水平

再复氧结束后, 六孔板中每孔加入 Trizol 1ml 提取总 RNA, 在紫外分光光度计中测 OD260/OD280 值, 计算 RNA 浓度和含量, OD260/280 在 1.8~2.0。采用逆转录系统试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA; 特异性引物分别扩增 β-actin, gp^{91phox} 引物序列: 187 bp, sense: 5'-CCCCAAGGTATCCAAGTT-3' anti-sense: 5'-AAAGGGTCCATCAACTGC-3' β-actin 引物序列: 185 bp, sense: 5'-AGGCCAACCGTGTAAAAGATG-3' antisense: 5'-T-GGCGTGAGGGAGAGCATAG-3' 95 °C 10 min 预变性; 然后 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 次循环。反应结束后计算机自动计算 CT 值, 目的基因的相对转录量采用 2^{-ΔCT} 法计算。

1.7 Western blot 检测 gp^{91phox} 蛋白表达

6 孔板中每孔加 0.2 mL 裂解缓冲液, 冰浴下超声破碎, 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行蛋白定量, 等体积加入 2× 蛋白上样缓冲液, 100 °C 煮沸 20 min。将样本蛋白行 SDS-PAGE(10 %)电泳, 电转移于硝酸纤维素(NC)膜上, 5 %脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 gp^{91phox} 单克隆抗体(1:1000, santa cruz 公司)和小鼠抗 β-actin(1:1000, 武汉博士德公司), 4 °C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标的羊抗小鼠 IgG 抗体(1:6000, santa cruz 公司)。室温孵育 1 h, 以 TBS 液冲洗 3 次, ECL 化学发光法显影。使用 NIH ImageJ 计算灰度值, 用目的蛋白与内参蛋白的比值作为目的蛋白表达的相对量。

1.8 统计学分析

全部实验数据采用 SPSS17.0 统计分析软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述, 多组独立样本比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), P<0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 清开灵对小胶质细胞缺氧再复氧 gp^{91phox} mRNA 的影响

正常组有 gp^{91phox} mRNA 的少量转录, 模型组的表达比正常组明显增加 (P<0.05), 0.0625 % 的清开灵注射液显著降低了 gp^{91phox} 基因的表达 (P<0.05), 0.125 %、0.25 % 的清开灵注射液有降低的趋势, 但是无统计学差异 (P>0.05)。结果见图 1。

2.2 清开灵对小胶质细胞缺氧再复氧 gp^{91phox} 蛋白表达的影响

结果如图 2 所示, 模型组 gp^{91phox} 蛋白较正常组表达增加 (P<0.05), 与模型组比较, 清开灵各组有降低趋势, 高剂量的作用最显著, 具有统计学差异 (P<0.05)。

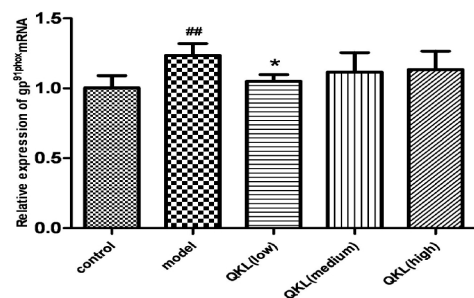


图 1 BV2 细胞体外缺血再灌注损伤 gp^{91phox} 基因转录的影响

Fig. 1 Hypoxia/reoxygenation induced changes in the mRNA expression levels of gp^{91phox} of BV2 microglia cells

注: ## 与正常组比较, P<0.01; * 与模型组比较, P<0.05。

Note: ##P<0.01, compared to the control group; *P<0.05 compared to the model group.

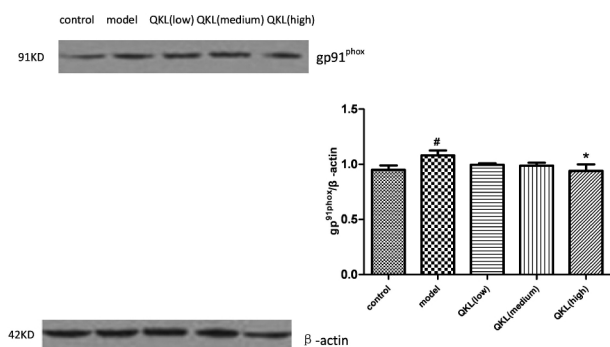


图2 清开灵对BV2细胞体外缺血再灌注损伤gp^{91phox}蛋白表达的影响
Fig. 2 Effect of QKL on gp^{91phox} protein expression in BV2 microglial cells exposed to hypoxia/reoxygenation.

注: [#]与正常组比较, $P < 0.05$; ^{*}与模型组比较, $P < 0.05$ 。

Note: [#] $P < 0.05$, compared to the control group; ^{*} $P < 0.05$, compared to the model group.

3 讨论

基于小胶质细胞在中枢神经系统疾病的生理及病理过程中发挥的重要作用,近年来许多临床治疗药物的研究都聚焦于小胶质细胞,深入研究小胶质细胞在脑缺血损伤过程中的作用机制,将为脑缺血再灌注损伤的临床治疗提供新的思路。

激活的小胶质细胞可以通过释放促炎细胞因子、炎症相关酶、趋化因子,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)等物质损伤神经元^[6-8]。在脑缺血激活小胶质细胞的过程中,参与其中并起关键作用的ROS大多是NADPH氧化酶源性。用脂多糖诱导MG产生胞内氧化应激时,胞内50%的ROS是由NADPH氧化酶产生^[9]。大量产生的ROS导致细胞膜被氧化,骨架降解,细胞受到损伤甚至死亡。ROS作为细胞信号转导的第二信使,也可活化p38MAPK、蛋白激酶C等信号通路,产生大量的前炎症因子^[10,11],反过来这些前炎症因子又可以特异性的激活NADPH氧化酶,继续促进ROS和其他炎症因子的产生,这样就形成了一个导致神经毒性物质不断增加的恶性循环,最终神经元坏死^[12]。

NADPH氧化酶是多亚单位复合体酶,是由gp^{91phox}, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox和Rac六种亚基组成的复合体,其中gp^{91phox}是其主要的功能亚基^[13]。研究显示gp^{91phox}基因敲除小鼠抑制了脑缺血后血脑屏障损伤和紧密连接蛋白表达的减少^[14],阻断gp^{91phox}基因转录和NADPH氧化酶抑制剂都能减少ROS的产生^[15,16]。我们之前的研究中也发现,小胶质细胞缺氧损伤后ROS活性明显提高,细胞上清中TNF- α , IL-1 β 分泌增加,细胞COX-2, iNOS的蛋白表达明显增高,清开灵注射液能够明显抑制小胶质细胞活化后这些细胞因子和蛋白的表达^[17,18]。故本实验在前期实验基础上,进一步研究产生ROS的重要功能单位gp^{91phox}的变化。实验结果表明,清开灵各浓度都有改善趋势,其中小剂量对gp^{91phox}mRNA的转录抑制作用明显,在蛋白表达方面高剂量的作用更显著。结合以往研究,我们推测清开灵通过减少NOX主要功能亚基gp^{91phox}减少小胶质细胞活化后ROS的大量产生,从而抑制炎症和氧化应激反应。

“毒损脑络”是清开灵治疗缺血性脑中风的理论基础,中风

发病是由于毒邪损伤脑络,络脉破损或络脉拘挛瘀闭,气血渗灌失常所致^[19]。在治疗中风病的过程中重视病因病理学的发展,以“毒邪”和“络病”作为深入研究的切入点^[20]。内毒损伤脑络包含了脑组织内细胞损伤,细胞因子及信号通路调控异常,细胞、基因、蛋白多个环节层次构成的网络状的异常变化^[21,22]。小胶质细胞在脑缺血再灌注损伤过程中产生的大量活性氧、炎症细胞因子等物质都属于中医学所说“毒”邪,清开灵抑制小胶质细胞活化反应NADPH氧化酶源性的ROS大量产生的过程,体现了解毒通络法祛除内毒恢复络脉的作用内涵。

参考文献 (References)

- [1] 陈灵丽,任明山. 小胶质细胞Toll样受体2与脑缺血,2013,21(1): 792-794
Chen Ling-li, Ren Ming-shan. Microglial Toll-like receptor 2 and cerebral ischemia[J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2013,21(10):792-794
- [2] Schramm A, Matusik P, Osmenda G, et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology[J]. Vasc Pharmacol, 2012,56(5/6):216-231
- [3] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev,2007,87(1):245-313
- [4] 卢冲,张黎明.小胶质细胞NADPH氧化酶与阿尔茨海默病[J]. 中国老年学杂志,2012,32(21):4835-4837
Lu Chong, Zhang Li-ming. Microglial NADPH oxidase and AD[J]. Chinese Journal of Gerontology,2012,32(21):4835-4837
- [5] 李澎涛,罗国安,潘彦舒,等. 清开灵注射液多环节抑制脑缺血级联反应药效物质与作用机理研究[J]. 中国医药学报,2004,19:1-4
Li Peng-tao, Luo Guo-an, Pan Yan-shu, et al. The study of identification for effective substances in QKL and complicated mechanisms of QKL blocking cascade of damage of cerebral ischemia [J]. China journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2004,19:1-4
- [6] Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism [J]. Prog Neurobiol,2005,76:77-98
- [7] Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression [J]. Trends Immunol,2008,29:357-365
- [8] Chen H, Kim GS, Okamin, et al. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation [J]. Neurobiol Dis,2011,42(3): 341-348
- [9] Qin L, Liu Y, Wang T, et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia [J]. J Biol Chem,2004,279(2): 1415-1421
- [10] Bedard K, Klaus KH. The NOX Family of ROS-Generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology[J]. Physiol Rev,2007,87(1): 245-313
- [11] Zhang L, Wu C, Zhao S, et al. Demethoxyeugenin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-kappaB signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(3):331-338
- [12] Block ML, Hong JS. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity[J]. Biochem Soc Trans, 2007,35(5):1127-1132

- thaliana[J]. FEBS Letters,2002,514 (2- 3):300-304
- [3] Cheng Yuan, Zhou Yuan, Yang Yan, et al. Structural and Functional Analysis of VQ Motif-Containing Proteins in Arabidopsis as Interacting Proteins of WRKY Transcription Factors [J]. Plant Physiology,2012,159(2):810-825
- [4] Kim DY, Kwon SI, Choi C, et al. Expression analysis of rice VQ genes in response to biotic and abiotic stresses [J]. Gene,2013,529 (2): 208-214
- [5] Wang X, Zhang H, Sun G, et al. Identification of active VQ motif-containing genes and the expression patterns under low nitrogen treatment in soybean[J]. Gene, 2014,543(2):237-243
- [6] Xie YD, Li W, Guo D, et al. The Arabidopsis gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses [J]. Plant Cell Environ,2010, 33(5):828-839
- [7] Lai Z, Li Y, Wang F, et al. Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense[J]. Plant Cell, 2011,23(10):3824-3841
- [8] 苏琦, 尚宇航, 杜密英, 等. 植物 WRKY 转录因子研究进展[J]. 中国农学通报,2007,23(5):94-98
Su Qi, Shang Yu-hang, Du Mi-ying, et al. Process on plant WRKY transcription factor [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(5): 94-98
- [9] 高银. 植物抗逆机制与基因工程研究进展 [J]. 内蒙古农业科技, 2007(5):75-78
Gao Yin. Research progress of gene engineering in plant stress tolerance mechanism [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2007(5):75-78
- [10] 林渊源, 余迪求. 拟南芥 VQ 基因家族响应抗性相关激素表达谱分析[J]. 植物分类与资源学报, 2012,34(5):509-518
Lin Yuan-yuan, Yu Di-qiu. Expression profiles of Arabidopsis thaliana VQ gene family in defense-related hormones treatments[J]. Plant Diversity and Resources,2012,34(5):509-518
- [11] 刘安娜, 腾瑶, 徐文忠, 等. 一个编码含 VQ 模序蛋白的基因 AtARVQ1 参与拟南芥对砷酸盐的响应调控 [J]. 科学通报, 2011, 56(21):1891-1898
Liu An-na, Teng Yao, Xu Wen-zhong, et al. AtARVQ1 encodes a novel VQ motif-containing protein involved in arsenate stress response regulation in Arabidopsis [J]. Chinese Sci Bull,2011,56(21): 1891-1898
- [12] Li YL, Jing YJ, Li JJ, et al. Arabidopsis VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 represses seedling deetiolation by interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 [J]. Plant Physiology, 2014,164(4):2068-2080
- [13] Yan ZH, Wan YF, Liu KF, et al. Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequence with those of homologous subunits [J]. Chinese Science Bulletin, 2002,47 (3):220-225
- [14] Wang A, Garcia D, Zhang H, et al. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis [J]. Plant J, 2010,63(4):670-679
- [15] Perruc E, Charpentreau M, Ramirez B C, et al. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana seedlings [J]. The Plant Journal,2004,38(3):410-420
-
- (上接第 6809 页)
- [13] Krause KH, Lambeth D, Krönke M. NOX enzymes as drug targets[J]. Cell Mol Life Sci, 2012,69(14):2279-2282
- [14] Liu W, Chen Q, Liu J, et al. Normobaric hyperoxia protects the blood brain barrier through inhibiting Nox2 containing NADPH oxidase in ischemic stroke[J]. Med Gas Res, 2011,1(1):22
- [15] Hur J, Lee P, Kim MJ, et al. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp⁹¹phox NADPH oxidase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,391(3):1526-1530
- [16] Shen J, Bai XY, Qin Y, et al. Interrupted reperfusion reduces the activation of NADPH oxidase after cerebral I/R injury [J]. Free Radical Bio Med, 2011,50(12):1780-1786
- [17] 王珊, 玛娜璐璐, 高永红, 等. 小胶质细胞缺氧再复氧模型的建立方法[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014,12(1):74-75
Wang Shan, Mana Lu-lu, Gao Yong-hong, et al. Method to establish an Ischemic/Reperfusion Model of microglia BV2 model in vitro[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine of Cardio/cerebrovascular Disease,2014,12(1):74-75
- [18] Mana L, Wang S, Zhu H, et al. Qingkailing Suppresses the Activation of BV2 Microglial Cells by Inhibiting Hypoxia/Reoxygenation-Induced Inflammatory Responses [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, [Epub ahead of print].
- [19] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(1):1-6
Li Peng-tao, Wang Yong-yan, Huang Qi-fu. The Hypothesis of the Injury of Brain Collaterals by Toxins and Its Theoretical and Practical Significance [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2001, 24(1):1-6
- [20] 王永炎. 关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(2):195-196
Wang Yong-yan. Ideas of improving therapeutic effects on cerebrovascular diseases difficulties[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 1997,17(2):195-196
- [21] 张允岭, 白文, 韩振蕴, 等. 9601 颗粒对急性多发性脑梗塞大鼠海马层 MARCKS 磷酸化调节作用的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2005,28(1):45-48
Zhang Yun-ling, Bai Wen, Han Zhen-yun. Study on regulating effects of 9601-Granules on phosphorylation of MARCKS in hippocampal cortex in the rats with multiple acute cerebral infarct [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine,2005,28(1):45-48
- [22] 雷燕, 黄启福, 王永炎. 论瘀毒阻络是络病形成的病理基础 [J]. 北京中医药大学学报,1999,22(2):8-10
Lei Yan, Huang Qi-fu, Wang Yong-yan. Pathologic Basis of Collateral Disease Formation [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine,1999, 22(2):8-10