

缺血后处理对大鼠脑缺血一再灌注中细胞凋亡的作用及其机制研究

宫利¹, 王志², 邢诒刚³, 李华¹

1. 烟台市毓璜顶医院神经内科, 山东省烟台市 264004

2. 中山大学附属第二医院麻醉科, 广东省广州市 510120

3. 中山大学附属第二医院神经内科, 广东省广州市 510120

摘要:目的 观察缺血后处理(IP)对大鼠脑缺血-再灌注(I/R)中细胞凋亡的影响,并探寻其机制。方法 开颅永久性阻断大脑中动脉+临时夹闭双侧颈总动脉法制作模型。将大鼠随机分为空白对照组(Control组)12只、假手术组(Sham组)、I/R组、IP组各48只、I/R+caspase-3抑制剂组(I/R+Z-DEVD-FMK组)、I/R+溶剂组(I/R+DMSO组)各12只。通过免疫荧光及Western blot法检测细胞凋亡数、细胞色素c(cyt-c)释放及caspase-3活性。结果 IP组较I/R组TUNEL阳性细胞数减少($P < 0.05$)。Sham组、IP组和I/R组均有细胞呈cyt-c/TUNEL双阳性,但cyt-c阳性不全伴有TUNEL阳性。I/R组与IP组cyt-c呈双峰样释放(再灌注3h和48h),在48h时IP组较I/R组降低($P < 0.05$)。I/R组caspase-3活性在再灌注3h时开始升高,12h和24h时最高。各相应时点IP组较I/R组的caspase-3活性降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。I/R+Z-DEVD-FMK组cyt-c后期释放量小于I/R+DMSO组($P < 0.01$),但完整细胞数多于I/R+DMSO组($P < 0.01$)。结论 IP可以抑制凋亡;cyt-c参与凋亡,并与caspase-3形成相互作用的反馈回路。IP对该反馈回路具有调节作用。

关键词:缺血后处理;脑缺血-再灌注;细胞凋亡;机制;大鼠

Effects of ischemic postconditioning on apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanisms

GONG Li, WANG Zhi, XING Yi-Gang, LI Hua. Department of Neurology, Yuhuangding Hospital, Yantai, Shandong 264004, China. Corresponding author: LI Hua, E-mail: lihuachenting@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To study the effects of ischemic postconditioning (IP) on apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats, and possible mechanisms. **Methods** Focal cerebral ischemia rat model was developed by cauterizing the middle cerebral artery permanently and occluding the bilateral common carotid arteries temporarily. Rats were assigned randomly into following groups: Control, Sham-operated, I/R, IP, I/R + Z-DEVD-FMK and I/R + DMSO. Apoptosis, cytochrome c (cyt-c) and caspase-3 expression were detected by immunofluorescence staining and Western blot. **Results** The number of TUNEL-positive cells was lower in the IP group than in the I/R group ($P < 0.05$). Some cells were cyt-c/TUNEL double-positive in the Sham-operated, IP, and I/R groups. But not all cyt-c positive cells were TUNEL positive. Cyt-c was released in a double hump-type in the I/R and IP groups (3 hrs and 48 hrs after reperfusion). The amount of released cyt-c in the IP group was much lower 48 hrs after reperfusion than in the I/R group ($P < 0.05$). The activity of caspase-3 increased 3 hrs after reperfusion, and peaked at 12 hrs and 24 hrs in the I/R group. The activity of caspase-3 in the IP group was lower than in the I/R group at each time point ($P < 0.05$). The release of cyt-c in the I/R + Z-DEVD-FMK group was much less than in the I/R + DMSO group ($P < 0.01$). The number of intact cell in ischemic penumbra in the I/R + Z-DEVD-FMK group was more than in the I/R + DMSO group ($P < 0.01$). **Conclusions** IP can inhibit apoptosis of ischemic neurons after I/R. Cyt-c is involved in apoptosis of cerebral I/R injury in rats. There might be a feedback loop between cyt-c and caspase-3 in a focal cerebral ischemia rat model. IP plays a role in this loop.

Key words: ischemic postconditioning; cerebral ischemia-reperfusion; apoptosis; mechanisms; rats

收稿日期:2012-01-10;修回日期:2012-05-28

作者简介:宫利(1971-),女,主治医师,博士,主要从事脑血管疾病基础与临床研究。

通讯作者:李华(1963-),女,主任医师,博士,主要从事脑血管疾病基础与临床研究。

缺血后处理 (ischemic postconditioning, IP) 是指在缺血后、永久性再灌注前对缺血组织进行多次短时间的间断性灌注; 该技术减轻脑缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤的作用已被证实^[1,2], 但机制不详。研究表明, 凋亡在 I/R 损伤中占有重要地位^[3], 且为脑缺血半暗带区细胞死亡的主要方式^[4,5]。因此, 本研究推测抑制半暗带区细胞凋亡是 IP 发挥保护作用的靶点之一; 本实验旨在对该推测进行证实并进一步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

雄性 SD 大鼠, 清洁级, 体重 270 ~ 350 g。由中山大学动物中心提供。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究; DAPI (4, 6-联脒-2-苯基吡啶)、Z-DEVD-FMK (caspase-3 抑制剂)、Ac-DEVD-AMC (caspase-3 作用底物) 购自 Sigma 公司; 细胞色素 C 一抗购自 Santa Cruz 公司; Cy3 标记的二抗购自 Boster 公司。

1.2 动物分组

动物随机分为 6 组: ①正常对照组 (Control 组, $n = 12$): 正常大鼠。②假手术组 (Sham 组, $n = 48$): 暴露分离双侧颈总动脉 (bilateral common cerebral arteries, bCCA), 开颅暴露左侧大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA)。③缺血-再灌注组 (I/R 组, $n = 48$): 方法见模型复制。④缺血后处理组 (IP 组, $n = 48$): 方法见模型复制, 再灌注前即刻行灌注 15 s/阻断 15 s, 如此循环 3 次, 然后永久性开放 bCCA。⑤缺血-再灌注 + caspase-3 抑制剂组 (I/R + Z-DEVD-FMK 组, $n = 12$): 模型复制后, 于再灌注 5 h 时, 将 Z-DEVD-FMK 溶液 5.0 μl 缓慢注入左侧侧脑室。⑥缺血-再灌注 + 溶剂组 (I/R + DMSO 组, $n = 12$): 模型复制后, 在再灌注 5 h 时, 将 1% 二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 溶液 5.0 μl 缓慢注入左侧侧脑室。

1.3 局灶性脑缺血模型制作

参考相关文献复制大鼠模型^[6,7]。暴露 bCCA, 沿大鼠左侧眼外眦和外耳道连线做一弧形切口开颅, 暴露左侧 MCA 及嗅束。夹闭 bCCA 2 min 后在嗅束水平将左侧 MCA 电凝进行永久性阻断。缺血 15 min 后松开血管夹, 观察 bCCA 血流复通后, 缝合颈部切口。镜下观察颅内术野有无出血及 MCA

复通情况, 若无则缝合切口。

1.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡

取 Control 组、Sham 组、I/R 组及 IP 组大鼠各 6 只, 于相应处理后 48 h 时断头取脑。将脑组织固定、脱水后由视交叉开始切片, 制成厚度为 6 μm 的冰冻切片。参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒程序, 对冰冻切片进行 TUNEL [2 μl 末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) + 48 μl 荧光标记液]、DAPI (4, 6-联脒-2-苯基吡啶) 染色, 其中 Control 组, 以 PBS 代替 TdT 酶。

1.5 免疫荧光三重染色检测 cyt-c 是否参与细胞凋亡

取上述各组冰冻切片行免疫荧光三重染色, 首先在样品上加 50 μl cyt-c 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内避光反应过夜, PBS 液洗涤后滴加 Cy3 标记的二抗孵育, PBS 液洗涤后用 TUNEL 检测液 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育, PBS 液洗涤后用 DAPI 避光染核, PBS 液洗涤后用甘油封片。实验设两种空白对照, 一种用 PBS 代替 cyt-c 一抗, 余相同。另一种以 PBS 代替 TdT 酶, 余相同。

1.6 胞浆内 cyt-c 检测

1.6.1 用 Western blot 法对胞浆内的 cyt-c 进行定量检测 利用分光光度计绘制蛋白含量标准曲线。然后 Control 组取 6 只动物; Sham 组、I/R 组、IP 组在处理 3 h、12 h、24 h 和 48 h, 每组每时间点各取 6 只, 按前述方法取脑后, 将 50 mg 缺血区^[7] 大脑皮质制成匀浆, 采用差速离心法提取胞浆中的 cyt-c, Western blot 法对 cyt-c 进行定量^[7,8]。用 Image Pro 5.2 软件对 Western blot 的图像结果进行平均灰度值分析。

1.6.2 免疫荧光双重染色对 cyt-c 进行定位检测

为排除 cyt-c 定量检测过程中缺血中心区的干扰, 采用 cyt-c 和 DAPI 免疫荧光双重染色的方法观察半暗带内 cyt-c 的变化。Control 组取 6 只动物; Sham 组、I/R 组、IP 组在处理 3 h、12 h、24 h 和 48 h, 各取 6 只, 按前述方法制成 6 μm 的冰冻切片, 在样品上滴加 50 μl cyt-c 一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育过夜, PBS 液洗涤后滴加 Cy3 标记的二抗孵育, PBS 液洗涤后 DAPI 避光染核, PBS 液洗涤后甘油封片。

1.7 检测 caspase-3 活性

以已知量的游离 7-氨基-4-甲基香豆素 (7-amino-4-methylcoumarin, AM) 做出工作曲线 (荧光强度)。样本同 1.5.1, 将 50 mg 缺血区大脑皮质加入 1 ml 裂解液中匀浆、离心。用考马斯亮蓝法检测样

品上清液蛋白浓度。以 Ac-DEVD-AMC (人工合成的荧光四肽) 为底物检测 caspase-3 荧光底物强度。在空白 Eppendorf 管中加入 480 μl caspase-3 缓冲液, 20 μl 底物; 在样本 Eppendorf 管中在加入 460 μl caspase-3 缓冲液, 20 μl 底物, 混匀后再加入 20 μl 样本; 将所有 Eppendorf 管置于 37℃ 孵育 60 min, 测量荧光强度; 每个样本的实际荧光强度 = 样本管荧光强度 - 空白管荧光强度。根据样品上清液蛋白浓度计算单位剂量 caspase-3 的荧光强度。荧光强弱与反应体系中 caspase-3 的活性成正比。

1.8 caspase-3 抑制剂侧脑室注射后胞浆内 cyt-c 检测

取 I/R + Z-DEVD-FMK 组, I/R + DMSO 组大鼠各 12 只, 再灌注 48 h 时取脑组织, 各组取 6 只按 1.5.1 法行 cyt-c 定量检测。余脑组织用甲醛固定 24 h 后, 含缺血区脑组织部分制成冰冻切片行胞浆 cyt-c 定位检测, 部分制成蜡块行 HE 染色观察完整细胞数。其中, TUNEL 染色检测细胞凋亡、cyt-c 定位检测、蜡块 HE 染色观察组织病理学变化, 结果均为每份标本取 6 张切片计数, 以半暗带为观察对象, 每张切片随机取互不重叠的 5 个视野计数阳性细胞, 各组间比较。

1.9 统计学方法

用 SPSS 12.0 统计软件进行分析处理, 各参数以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示。采用方差分析的方法分析各检测指标, 组间比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 检测结果

在半暗带区, I/R 组和 IP 组 TUNEL 阳性细胞较 Sham 组显著升高 (P < 0.01); IP 组 TUNEL 阳性细胞显著低于 I/R 组 (P < 0.01); Sham 组 TUNEL 阳性细胞数较 Control 组无明显变化 (P > 0.05), 见表 1、图 1A、图 1B。

表 1 半暗带 TUNEL 染色结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞凋亡数
Control 组	6	1.48 ± 0.76
Sham 组	6	1.69 ± 1.13
I/R 组	6	39.15 ± 2.64▲
IP 组	6	21.64 ± 2.09▲★

注: ▲为与 Sham 组相比, P < 0.01; ★为与 I/R 组相比, P < 0.01。

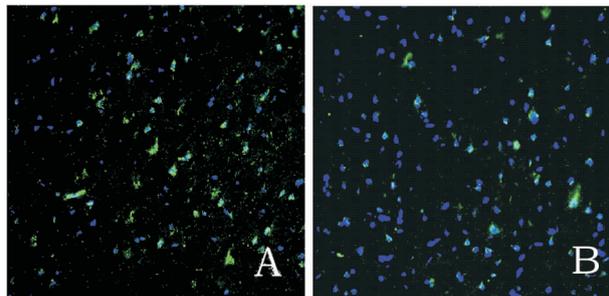


图 1 I/R 组及 IP 组半暗带 TUNEL/DAPI 双重染色 (200 ×)。A: I/R 组; B: IP 组。

2.2 cyt-c 参与细胞凋亡检测结果

免疫荧光三重染色结果显示, Sham 组、I/R 组、IP 组均有不同数量细胞呈 cyt-c/TUNEL 双阳性表达, 但 cyt-c 阳性细胞不全伴有 TUNEL 阳性, 见图 2A、图 2B。

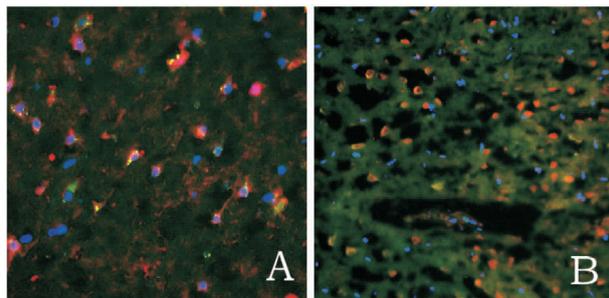


图 2 免疫荧光三重染色结果 (200 ×)。A: 细胞凋亡伴随 cyt-c 的释放; B: cyt-c 释放不伴细胞凋亡。

2.3 cyt-c 释放检测结果

Western blot 检测结果 (见表 2、图 3) 显示, I/R 及 IP 组 cyt-c 均呈双峰样释放, 第一个高峰在再灌注后 3 h, 第二个高峰在再灌注后 48 h。与 I/R 组比较, IP 组 cyt-c 释放量在再灌注 3 h 时无明显变化 (P > 0.05), 但在再灌注 48 h 时显著降低 (P < 0.01)。

免疫荧光染色结果 (见表 3) 与 Western blot 结果相似, I/R 组半暗带区 cyt-c 阳性细胞数亦在再灌注后 3 h 和 48 h 显著增多; 在再灌注 48 h 时, IP 组 cyt-c 阳性细胞数显著少于 I/R 组 (P < 0.01), 但再灌注 3 h 时二者差异不明显 (P > 0.05) (见图 4A-图 4E)。在各相应时点, I/R 组和 IP 组 cyt-c 释放量均高于 Sham 组 (P < 0.01, P < 0.05)。

表2 cyt-c Western blot 平均灰度检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 h	12 h	24 h	48 h
Control 组	6			/	
Sham 组	6	6.81 ± 0.68	5.77 ± 0.62	6.22 ± 0.83	6.43 ± 0.58
I/R 组	6	31.34 ± 2.36 [▲]	15.78 ± 1.59 [▲]	9.37 ± 1.02 [△]	82.51 ± 8.76 [▲]
IP 组	6	28.17 ± 2.42 [▲]	10.79 ± 1.61 ^{△☆}	10.65 ± 0.94 [△]	24.43 ± 1.84 ^{▲★}

注:与 Sham 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.01$; 与 I/R 组相比, $\star P < 0.01$, $\diamond P < 0.05$ 。

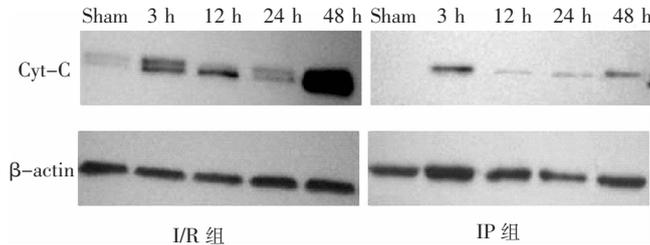


图3 Western blot 检测 cyt-c 结果

表3 免疫荧光染色检测 cyt-c 阳性细胞数结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 h	12 h	24 h	48 h
Control 组	6			/	
Sham 组	6	3.84 ± 0.47	4.71 ± 0.49	3.23 ± 0.29	3.47 ± 0.35
I/R 组	6	21.37 ± 1.13 [▲]	11.75 ± 2.31 [▲]	8.45 ± 1.62 [△]	62.37 ± 5.86 [▲]
IP 组	6	20.86 ± 2.74 [▲]	8.72 ± 1.21 ^{△☆}	6.37 ± 0.56 [△]	9.48 ± 1.65 ^{△★}

注:与 Sham 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.01$; 与 I/R 组相比, $\star P < 0.01$, $\diamond P < 0.05$ 。

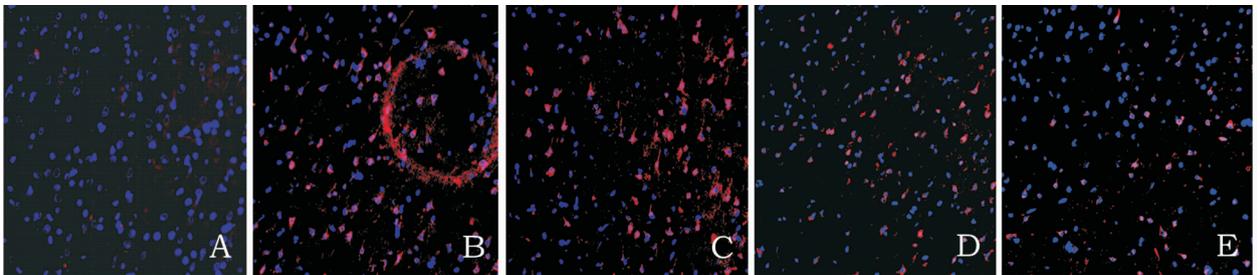


图4 免疫荧光染色检测 cyt-c 阳性细胞数结果 (200 ×)。A: Sham 组; B: I/R 组再灌注 3 h 半暗带区 cyt-c; C: I/R 组再灌注 48 h 半暗带区 cyt-c; D: IP 组再灌注 3 h 半暗带区 cyt-c; E: IP 组再灌注 48 h 半暗带区 cyt-c。

2.4 caspase-3 活性检测结果

与 Sham 组相比, I/R 组 caspase-3 的活性在再灌注 3 h 时已开始升高 ($P < 0.05$), 12 h 和 24 h 时最高 ($P < 0.01$), 48 h 时二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 I/R 组比较, IP 组 caspase-3

活性在各相应时点均降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 但仍在再灌注 12 h 和 24 h 时形成高峰, 且显著高于 Sham 组 ($P < 0.05$)。Sham 组与 Control 组在各时点均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

表4 caspase-3 蛋白酶活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 h	12 h	24 h	48 h
Control 组	6		98.43 ± 2.65		
Sham 组	6	100.83 ± 5.74	104.76 ± 6.04	101.29 ± 3.87	100.46 ± 3.5
I/R 组	6	157.35 ± 15.32 [△]	275.72 ± 5.13 [▲]	300.46 ± 17.67 [▲]	110.67 ± 9.7
IP 组	6	108.82 ± 7.76 [★]	121.78 ± 11.58 ^{△★}	128.39 ± 7.65 ^{△★}	97.49 ± 5.5 [☆]

注:与 Sham 组相比, $\Delta P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.01$; 与 I/R 组相比, $\star P < 0.01$, $\diamond P < 0.05$ 。

2.5 Z-DEVD-FMK 对 cyt-c 后期释放及神经细胞的影响

Western blot 结果显示,再灌注 48 h 时,I/R + Z-DEVD-FMK 组 cyt-c 表达量显著小于 I/R + DMSO 组 ($P < 0.01$), I/R + DMSO 组与 I/R 组比较 cyt-c 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 5、图 5。

免疫荧光染色结果显示,I/R + Z-DEVD-FMK 组半暗带区 cyt-c 阳性细胞数显著小于 I/R + DMSO 组

($P < 0.01$), I/R + DMSO 组与 I/R 组比较 cyt-c 阳性细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 5、图 6A、图 6B。

HE 染色对半暗带区进行完整细胞计数结果显示,I/R + Z-DEVD-FMK 组完整细胞数明显多于 I/R + DMSO 组 ($P < 0.01$), I/R + DMSO 组与 I/R 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 5、图 7A、图 7B。

表 5 Z-DEVD-FMK 对 cyt-c 后期释放及神经细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	WB 平均灰度值 (%)	cyt-c 阳性细胞数	HE 完整细胞计数
I/R 组	6	82.51 ± 8.76	62.37 ± 5.86	30.37 ± 2.49
I/R + Z-DEVD-FMK 组	6	35.24 ± 3.29 [▲]	23.29 ± 3.08 [▲]	80.48 ± 6.11 [▲]
I/R + DMSO 组	6	76.19 ± 6.15 [★]	60.17 ± 4.81 [★]	27.36 ± 2.07 [★]

注:▲为与 I/R 组相比, $P < 0.01$;★为与 I/R + Z-DEVD-FMK 组相比, $P < 0.01$ 。

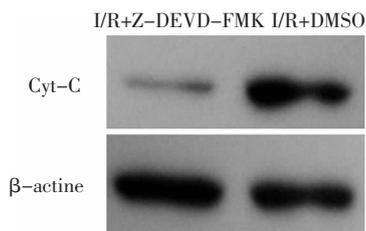


图 5 Western blot 检测 I/R + Z-DEVD-FMK 组及 I/R + DMSO 组 cyt-c 表达。

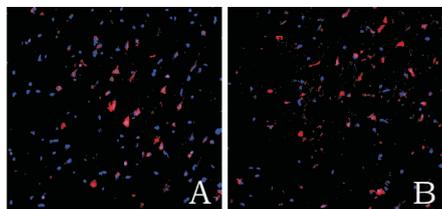


图 6 免疫荧光双染显示半暗带区 cyt-c 阳性细胞 (200 ×)。A: I/R + Z-DEVE-FMK 组; B: I/R + DMSO 组。

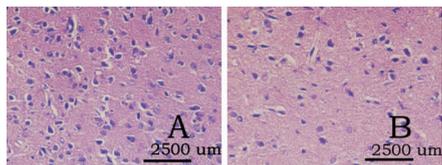


图 7 HE 染色显示半暗带区完整细胞 (400 ×)。A: I/R + Z-DEVD-FMK 组; B: I/R + DMSO 组。

3 讨论

细胞死亡分为坏死和凋亡。凋亡是一种程序化的主动死亡方式,在过程上具有可干预性、在时间上具有延迟性,故成为抑制细胞死亡的突破口。本实验首先针对 IP 是否抑制了脑 I/R 损伤中的细胞凋

亡、cyt-c 是否参与了该凋亡过程进行检测。结果表明,IP 抑制了脑 I/R 模型中的细胞凋亡;大多数凋亡伴随着 cyt-c 释放,但 cyt-c 释放未必均引起凋亡也可能是坏死,这可能是由于 cyt-c 大量释放导致由 cyt-c 构成的线粒体呼吸链功能障碍,ATP 合成减少。ATP 的缺乏使细胞死亡方式由耗能的凋亡转为坏死^[9]。

cyt-c 释放是多种凋亡途径的重要步骤。释放至胞浆的 cyt-c 可与凋亡蛋白水解酶激活因子 1 及 caspase-9 前体结合形成凋亡复合体,间接激活凋亡效应因子 caspase-3 导致细胞凋亡^[10]。本实验中,I/R 组及 IP 组 cyt-c 均呈双峰样释放,双峰时间分别为再灌注 3 h 和 48 h;而 caspase-3 活性在再灌注后 3 h 开始升高。因此推测 cyt-c 的首次释放是 caspase-3 活性升高的原因之一。目前关于 cyt-c 首次少量释放的原因尚不清楚,有研究^[11]认为这是细胞为了维持线粒体内有足够的 cyt-c 而产生的自我保护反应。

IP 组的结果显示,IP 减少了 cyt-c 在 48 h 时的释放量,但对 3 h 时的释放量无显著性影响,推测 cyt-c 的首次释放可能不是造成再灌注 48 h 时细胞死亡的主要原因。IP 对 cyt-c 首次释放量无显著影响的具体原因还不清楚。推测可能是由于在 I/R 过程中存在复杂的病理生理过程,IP 不能完全阻断那些早期即可引起 cyt-c 释放的病理生理过程所致。本实验中 I/R 组与 IP 组 cyt-c 首次释放量无明显差异,但随后的 caspase-3 活性却显著不同,这表明胞浆中 cyt-c 的含量不是决定 caspase-3 活性的唯一因素。

本实验结果还显示 cyt-c 再次释放前 caspase-3 活性有明显升高,二者之间是否存在因果联系目前仍属未知。为进一步明确二者的关系,本实验用 caspase-3 抑制剂抑制 caspase-3 活性后,再次对胞浆内的 cyt-c 进行检测,结果显示, cyt-c 在 48 h 的释放量明显降低。这表明 caspase-3 的活化是 cyt-c 后期释放的重要原因。至此可以推断 cyt-c 与 caspase-3 之间存在着相互作用的反馈回路。

IP 组各相应时点 caspase-3 活性显著低于 I/R 组的结果表明,IP 抑制了 caspase-3 的活性;结合 IP 对 cyt-c 后期释放的影响与 caspase-3 抑制剂作用相似的事实推测,IP 可能通过抑制 caspase-3 活性继发减少 cyt-c 的释放。在本实验过程中,随着再灌注时间延长,Sham 组大鼠 cyt-c 释放和 caspase-3 活性无明显变化,这表明 I/R 是导致 cyt-c 释放和 caspase-3 活性变化的重要原因。

综上所述,本研究证明抑制细胞凋亡是 IP 的一个作用环节; cyt-c 参与了该模型脑 I/R 过程中的细胞凋亡,并且与 caspase-3 形成相互作用的反馈回路。IP 对该反馈回路具有调节作用。这为我们寻找 IP 的作用靶点提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] 刘佳丽,王晔,张迎. 缺血后处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其最佳时间窗的探讨. 国际神经病学神经外科学杂志,2011,38(3): 222-226.

[2] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006,26(9): 1114-1121.

[3] Cavallucci V, D'Amelio M. Matter of life and death: the

pharmacological approaches targeting apoptosis in brain diseases. *Curr Pharm Des*,2011,17(3): 215-229.

[4] Dore S, Goto S, Sampei K, et al. Heme oxygenase-2 acts to prevent neuronal death in brain cultures and following transient cerebral ischemia. *Neuroscience*,2000,99(4): 587-592.

[5] Hong KW, Kim KY, Lee JH, et al. Neuroprotective effect of (2S, 3S, 4R)-N"-cyano-N-(6-amino-3, 4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-2-dimethoxymethyl-2H-benzopyran-4-yl)-N'-benzylguanidine (KR-31378), a benzopyran analog, against focal ischemic brain damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002,301(1): 210-216.

[6] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem*, 2003, 85(4): 1026-1036.

[7] Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, et al. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*,2005,25(42): 9794-9806.

[8] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, et al. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*,2000,20(8): 2817-2824.

[9] Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*, 1997,57(10): 1835-1840.

[10] Ayoub IM, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med*,2008,36(11 Suppl): S440-446.

[11] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*,1998, 281(5381): 1309-1312.