

雌激素对急性一氧化碳中毒迟发性脑病的研究*

刘勇^{1,2} 王仲霞³ 李虎年¹ 黄光庆¹ 赵旭¹ 尤志瑞⁴ 付守芝⁵

[摘要] 目的:研究雌激素干预对急性一氧化碳(CO)中毒迟发性脑病(DNS)的防治作用,探索有效的临床治疗手段。**方法:**选择成年 Wistar 雌性大鼠。腹腔注入 CO(150 ml/kg)建立 CO 中毒 DNS 模型。存活大鼠随机分为对照组和雌激素组。中毒 2~6 周后水迷宫试验评估动物的智力状态,苏木精-伊红染色观察脑组织病理改变,TUNEL 法检测脑组织细胞凋亡。**结果:**实验动物腹腔注入 CO 后出现智力下降,脑组织细胞凋亡明显,符合 DNS 表现。雌激素干预可显著改善模型动物智力,减轻脑组织病理损害,降低细胞凋亡率。雌激素主要通过抑制凋亡相关信号通道 Bcl-2 来实现对神经的保护作用。**结论:**早期雌激素干预可有效降低 CO 中毒 DNS 发病率,显著减轻 CO 中毒 DNS 损害程度。

[关键词] 一氧化碳中毒迟发性脑病;雌激素;细胞凋亡

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2015.04.011

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A

Early estrogen intervention has therapeutic effect on delayed neuropsychologic sequelae in acute carbon monoxide poisoning

LIU Yong^{1,2} Wang Zhongxia³ LI Hunian¹ HUANG Guangqing¹
ZHAO Xu¹ YOU Zhijun⁴ FU Shouzhi⁵

(¹ICU, Renmin Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;²University of Hongkong Shenzhen Hospital;³Office of Medical Affairs, Renmin Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine;⁴Department of Geriatrics, Renmin Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine;⁵Department of Emergency, Wuhan Third Hospital)

Corresponding author: FU Shouzhi, E-mail: fszfsz188@163.com

Abstract Objective: To investigate the effect of estrogen intervention on delayed neuropsychologic sequelae (DNS) in acute carbon monoxide (CO) poisoning. **Method:** Adult Wistar rats were selected and were infused CO (150 ml/kg) by intraperitoneal injection to build DNS model. The rats were randomly grouped. Group of Estrogen (5 μg/kg) were injected Estrogen (5 μg/kg) with 30 min after poisoning. Morris maze test was adopted to evaluate the intelligence of rats. The apoptosis rates in brain was detected by TUNEL staining. The expression levels of Bcl, ERK1/2 and P38 protein were determined with western blot analysis. **Result:** After CO infusing, poisoning rats showed intelligence decline, leukoence demyelination and apoptosis increasing, which coincided to DNS. After early estrogen intervention, the intelligence, leukoence demyelination, brain lesion and apoptosis rates were ameliorated significantly. Western blot showed the protein expression of Bcl significantly increased, while level of ERK1/2 and P38 had no significantly difference. **Conclusion:** Early Estrogen intervention can effectively decrease the rates and alleviate the damage of DNS occur after acute CO poisoning. Its effects may be due to stimulating early expression of bcl-2 and ERK and inhibited P38 protein.

Key words delayed neuropsychologic sequelae; acute carbon monoxide poisoning; estrogen; apoptosis

一氧化碳(CO)是一种无色、无味的非刺激性气体。煤气管道泄漏和各种可燃物的不完全燃烧,如燃气热水器,木炭、煤或液化气炉不合理使用等,均可造成急性 CO 中毒^[1],在我国 CO 中毒年发病

率为 136/20 万^[2]。急性 CO 中毒的患者即使接收正规的治疗,也可能在中毒后 3 d~4 周出现一系列神经-精神障碍,称之为迟发性脑病(delayed neuropsychologic sequelae, DNS)。其发病率占全部病例的 14%~40%。轻者可遗留轻度认知或精神障碍,严重者甚至完全痴呆,丧失完全劳动力^[3]。目前普遍采用的高压氧治疗缺乏循证学证据^[4]。实验及临床资料均证实了雌激素强大的神经保护功能。本研究拟通过观察雌激素对急性 CO 中毒动物行为学和神经细胞凋亡的影响,探讨雌激素的作用机制。

* 基金项目:2009-2010 年度湖北省科技厅自然科学基金(No: 2006ABA339);湖北省卫生厅科研项目(No: 2009JX2B92)
¹湖北医药学院附属人民医院重症医学科(湖北十堰, 442000)
²香港大学深圳医院重症医学科
³湖北医药学院附属人民医院医务处
⁴湖北医药学院附属人民医院老年病科
⁵武汉市第三医院急诊科
通信作者:付守芝, E-mail: fszfsz188@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

雄性清洁级 Wistar 大鼠,由湖北医药学院实验动物中心供应,体重 240~280 g,自由食水,实验前 1 天禁食。CO 和氩气纯品气体(99.95%)购自佛山市科的气体化工有限公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒由北京中彬金桥生物技术公司提供;Morris 水迷宫,由中国中医研究院研制;分光光度计为 CE2041(英国);石蜡切片机为 Lecia(德国)荧光显微镜为 Nikon EL2000(日本);电子照相系统为 Nikon Coolpix 995(日本);其余试剂均为市售分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 实验大鼠购入后,参考王耀宏等^[5]方法制备大鼠急性 CO 中毒模型。按 150 ml/kg 腹腔注射 CO 纯品气体。观察染毒后大鼠的症状及体征。成功染毒 30 min 后,将存活的 60 只大鼠随机分为雌性大鼠、去势雌性大鼠雌激素干预组(5 μg/kg)和去势雌性大鼠对照组(生理盐水)。各组的大鼠数量分别为 20 只。

1.2.2 碳氧血红蛋白(HbCO)监测 分别于中毒后 15 min~4 h,断尾取血,采用尾尖采血改良双波长 HbCO 定量法监测各组大鼠血 HbCO 浓度。取大鼠尾血 0.1 ml 加 0.4 mol/L 氢氧化铵 20 ml,混匀,加 20 mg 低亚硫酸钠混匀。10 min 内于 535 nm 及 578 nm 波长下测定其吸光度,按照下列公式计算 HbCO 含量(%): $HbCO(\%) = (2.44 \times A_{535} / A_{578} - 2.68) \times 100\%$ 。

1.2.3 行为学检测 大鼠行 Morris 水迷宫定向航行实验。所用水迷宫为直径 120 cm,高度 50 cm 的圆形水池,水面高度 30 cm,水温(25±1)℃。圆形平台(直径 9 cm,高 29 cm)位于某象限中。燃毒前 1 周每隔 1 d 进行进行 3 次定向航行试验:每日将大鼠分从 3 个象限(非平台所在象限)之一靠池壁放入水中,60 s 内大鼠从入水到爬上站台(设置于 m 象限),所需时间即逃避潜伏期。大鼠朝向墙面入水,如果 120 s 中未能找到平台,则引导至平台,停留 30 s。水迷宫上方的摄像头同步记录大鼠运动轨迹,软件分析运动情况。连续 4 d,每次实验结束,立即擦干并吹干毛发,放回笼中。

1.2.4 病理学检查 颈椎脱臼处死大鼠,迅速冰面上取出脑部前额皮质及海马部分,4 μm 冠状切片。常规制备石蜡切片采用苏木素-伊红染色观察脑组织结构及神经细胞形态;采用 Luxol 氏坚牢蓝焦油紫(LFB)染色观察脑白质髓鞘结构及神经细胞形态。采用 Tunnel 原位标记 DNA 片段法检测神经细胞凋亡情况。部分脑组织 3 μm 冷冻切片,具体步骤按照罗氏公司提供说明书进行。细胞核呈棕黄色或棕褐色为凋亡细胞。在高倍镜下

(×400)进行观察,每只大鼠取 1 张切片,采用 Image ProPlus 6.0 图像分析系统计数凋亡细胞和总细胞,计算细胞凋亡指数(apoptosis index, AI),AI=凋亡细胞计数/总细胞计数×100%。

1.2.5 RT-PCR 测定 Bcl-2 mRNA 表达 大鼠大脑皮质神经元总 RNA 的提取按照上海华舜生物工程有限公司提取试剂盒说明进行,mRNA 测定参照大连宝生物试剂盒说明进行 β-actin 上游引物:5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC-3',下游引物 5'-GCC AGG ATA GAG CCA CCA AT-3'长度 684 bp, Bcl 上游引物 5'-GTG CGT GGA AAG CGT AGA CA-3',下游引物 5'-CAG CCA AGG TGA CCC ATT AC-3',长度 465 bp。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,长波紫外灯下观测照相,电泳结果以 Quantity One(美国 Bio-Rad)图像分析系统进行电泳条带吸光度(A)分析。

1.2.6 蛋白表达分析 对 Bcl-2, ERK1/2 和 P38 采用 Western 印迹法进行检测。各组随机选择 3 只动物的双侧海马用于蛋白表达的检测。LA 刺激细胞 0.5 h 后,提取胞浆蛋白,在 10% SDS-PAGE 胶上分离蛋白质,再将分离的蛋白质转印到硝化纤维素膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗于 4℃ 过夜。彻底洗涤后,加入 HRP 标记的二抗于 4℃ 孵育 2 h。ECL 显色后,在 X 线下曝光。ERK 的激活水平以磷酸化 ERK(P-ERK)与总 ERKS 的比值表示。每组实验重复 3 次。

加入蛋白裂解液和 PMSF 分别裂解各组大鼠脑组织,冰上裂解 20 min,测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,沸水变性 5 min。每孔加入 40 μg 蛋白样品电泳,用 PDVF 膜转膜,封闭后加一抗(P38 1:1000, P-P38 1:1000, MMP-9 1:300),4℃ 孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗,37℃ 孵育 1 h, ECL 显影, GAPDH 作为内对照参数。

用 Quantity One 软件分析荧光条带平均光密度值, p-p38/p38 光密度值的积分 A 值为 p-p38 的表达水平用 Quantity One 软件分析荧光条带平均光密度值, p-p38/p38 光密度值的积分 A 值为 p-p38 的表达水平

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性 CO 中毒大鼠模型建立

大鼠腹腔注射 CO 后 5~10 min 出现烦躁、撞笼,15 min 后陆续出现少动、四肢瘫软、抽搐、昏迷,黏膜及肢端皮肤呈櫻桃红色,部分发生角弓反张。约 1/3 大鼠在中毒 30 min 内死亡。尸检发现内脏

重度充血伴散在出血点,脑组织充血水肿严重。海马区锥体细胞层变薄,细胞稀疏,大量锥体细胞萎缩变性。大鼠中毒后符合急性CO中毒表现。

2.2 HbCO监测

大鼠注射CO后血中HbCO水平迅速升高,15 min达到高峰70%左右,4 h后逐渐下降至50%,体内CO半衰期约5~6 h,8 h后逐渐恢复至染毒前水平。

2.3 行为学检测

经水迷宫试验检测,对照组中巡游轨迹以圆周式和随机式为主。正常雌性大鼠组和雌激素干预组中,大多数大鼠巡游轨迹仍然以直线式或趋向式为主,正常雌性大鼠组和雌激素干预组潜伏期显著低于对照组(图1)(方差分析 $F=1586, P=0.00$)。

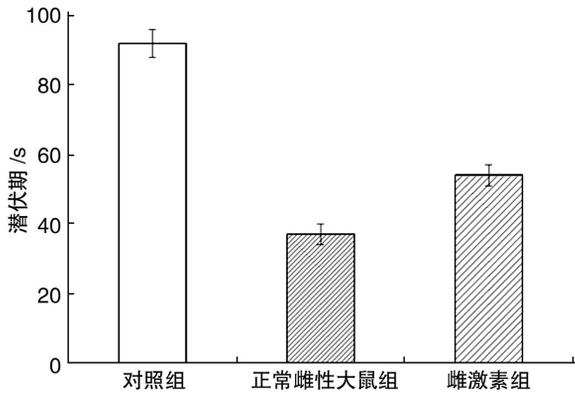


图1 对照组与正常雌性大鼠组及雌激素组的潜伏期比较

2.4 细胞凋亡检测

经TUNEL染色,凋亡细胞核呈现深棕色,正常细胞核呈浅蓝色。对照组组织形态紊乱,并可观察到较多凋亡细胞(见图2)。雌激素干预组中,可观察到部分凋亡细胞,但凋亡率仍然显著低于对照组。

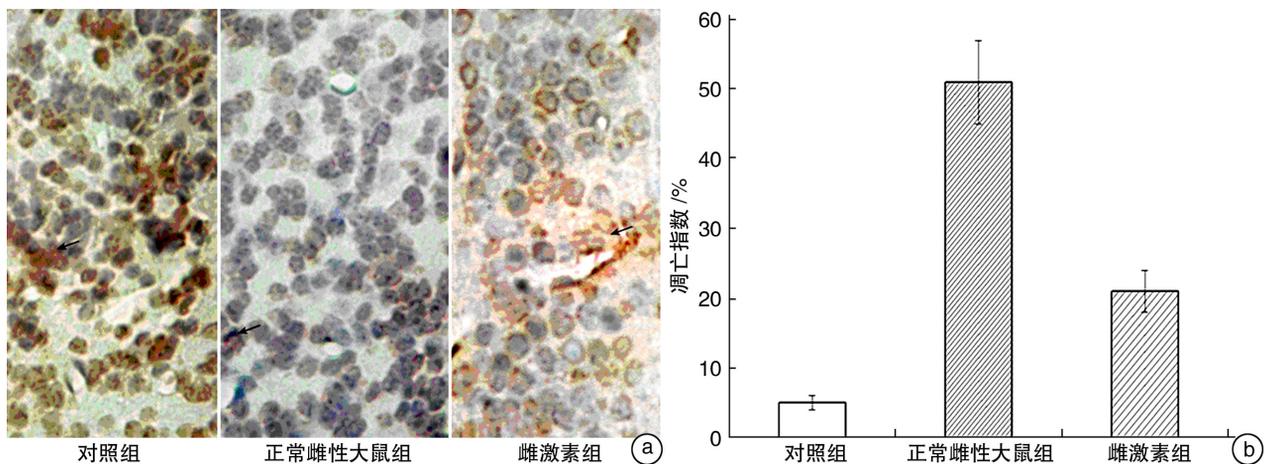


图2 a:对照组与正常雌性大鼠组及雌激素组的凋亡细胞;b:正常雌性大鼠,雌激素组与对照组凋亡TUNEL染色比较

2.5 RT-PCR测定Bcl-2 mRNA表达及Western blot显示

雌激素及正常大鼠组的Bcl-2 mRNA表达水平较对照组明显增强,差异有统计学意义(方差分析 $F=1586, P=0.00$)。如图3所示Western blot结果提示雌激素组及正常大鼠组Bcl蛋白显著高表达(方差分析 $F=196.8, P=0.00$)。

2.6 Western blot检测ERK1/2及P38

与对照组比较,雌激素组及ERK激活水平增加,但差异无统计学意义(方差分析 $F=1.012, P=0.37$),而P38雌激素组P38表达水平变化不大,差异无统计学意义(方差分析 $F=0.171, P=0.84$)(见图4)。

3 讨论

实验中大鼠虽然给予高压氧及其他综合治疗,但仍不可避免地发生迟发性脑病,且与CO中毒严重程度及血中碳氧血红蛋白数量的高低也无明确相关。一般认为,缺氧是CO中毒的主要发病机制。然而,组织缺氧并不能解释DNS的发生^[6]。因为组织缺氧的重要指标:动脉血一氧化碳血红蛋白(HbCO)的浓度与DNS的严重程度不存在相关性,也不能根据HbCO浓度预测是否发生DNS。Thom等认为各种自由基的大量生成促使内皮细胞和血小板释放一氧化氮,其进一步使线粒体酶失活,导致脑组织发生脂质过氧化,引起脱髓鞘等病理改变,DNS是发生的主要原因。然而上述学说不能解释为何DNS发生于中毒后3 d~4周,且仅发生于部分患者。无法解释CO暴露程度与DNS是否发生及严重程度不相关,为何临床及生化指标对该病预测价值有限等。目前CO中毒迟发型脑病的治疗缺乏确切手段,寻找潜在可行疗法仍是迫切需要解决的问题。

本研究提示:①雌激素具备神经保护功能,对

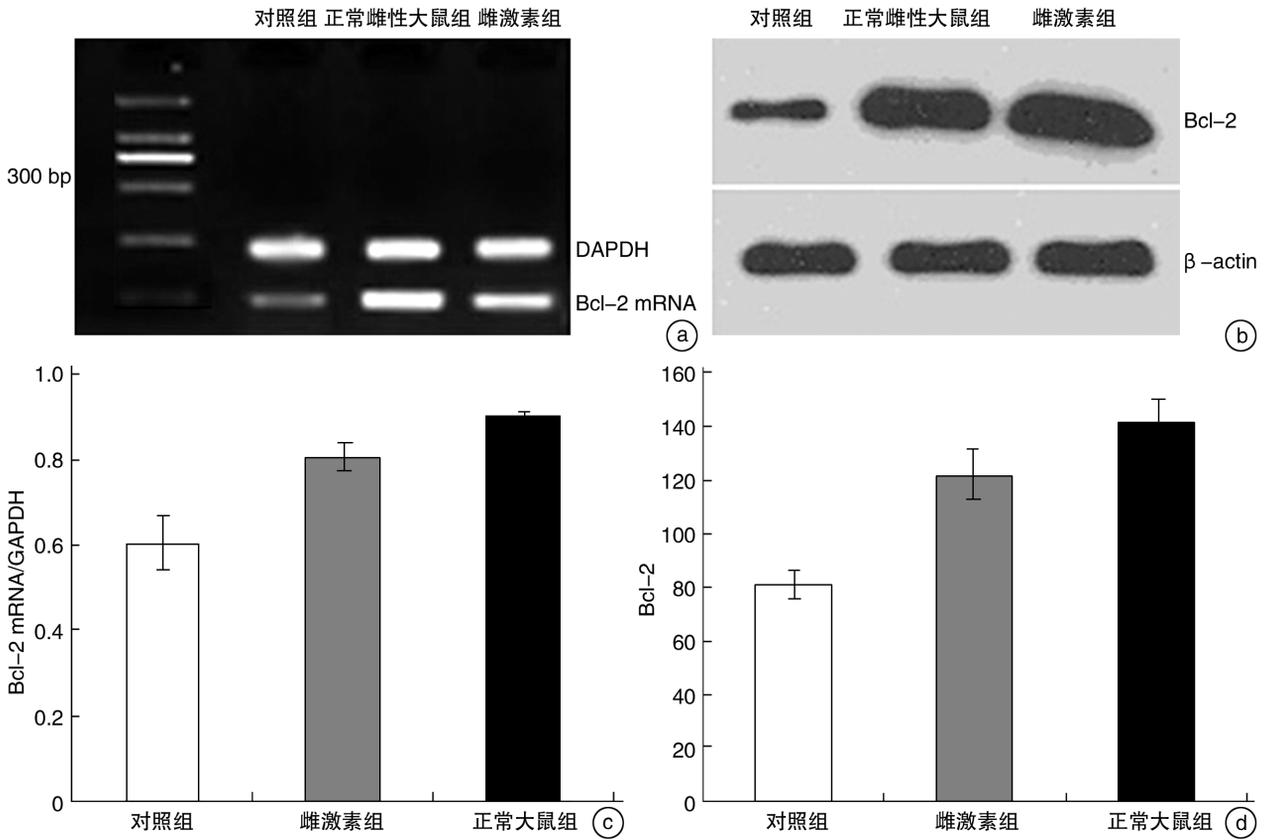


图 3 正常雌性大鼠, 雌激素组与对照组 Bcl-2 mRNA 表达及 Western blot 比较

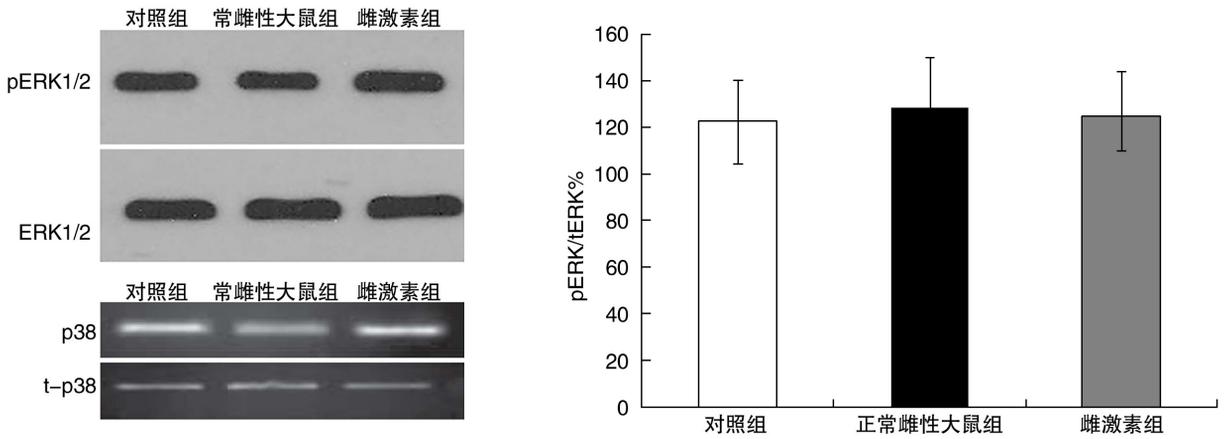


图 4 正常雌性大鼠, 雌激素组与对照组 ERK1/2 及 P38 比较

CO 中毒迟发型脑病具备改善作用; ②正常雌性大鼠及雌激素干预大鼠的 Bcl mRNA 转录及 Bcl 蛋白表达显著增加; ③雌激素主要通过上调 Bcl 蛋白发挥神经保护作用, 改善认知功能; ④尽管 ERK1/2 及 P38 是凋亡的重要信号通道, 但本研究并无证据证实参与雌激素抑制神经细胞凋亡作用。

雌激素对神经系统的保护作用被广泛关注, 并成为研究热点^[7]。但其具体机制仍存在争议, 有待进一步阐明^[8]。尽管雌激素具有血管活性, 可改善脑循环, 但许多研究表明, 和内源性雌激素不同, 雌

激素干预组的皮质血流并无显著改善, 血管因素并非神经保护的关键机理^[9]。根据目前的文献报道, 雌激素的作用机理主要在于上调 Bcl 的表达。笔者对多种通道进行研究, 表明 Bcl 仍然是雌激素改善 CO 中毒性脑病认知功能的重要机理, 而非 ERK 和 P38。

雌二醇(E2)可以防止缺氧诱导的细胞凋亡, 保护内皮细胞的结构和功能。尽管传统的观点认为, 雌激素作为一种核转录因子, 通过调节基因的转录进而启动与生理效应有关蛋白质合成而发挥作用^[7], 但是也已经发现在细胞质膜中存在可以被信

号识别的雌激素受体,而其所起的作用尚不明确^[10]。通过实验证实,来自膜的 E2 受体有助于保护内皮细胞的结构和功能^[7]。由于雌激素具有对缺氧缺血再灌注的保护作用,因而可能改善 CO 中毒和迟发性脑病的预后,是 CO 中毒的候选药物^[11]。

水迷宫实验是判断大鼠学习和记忆能力的重要指标。然而水迷宫实验受动物个体差异影响较大。因此本实验首先对动物进行训练和筛选,淘汰学习记忆能力较差的动物,最大程度提高结果的可靠性。研究表明大鼠染毒后出现智力下降,符合 DNS 表现。

细胞凋亡也可能是 CO 中毒 DNS 重要的病理基础之一^[12]。研究表染毒 3 d 后,大鼠脑内开始出现细胞凋亡,7~14 d 为高峰,至少持续 21 d。除神经细胞外,血管内皮细胞也发生明确而严重的凋亡^[12]。本研究同样观察到染毒大鼠脑组织内细胞凋亡明显。

本研究提示雌激素发挥抗凋亡作用主要通过 Bcl-2 途径抑制凋亡。Bcl-2 基因(即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因)是一种原癌基因,它具有抑制凋亡的作用^[13],近年来的一些研究已开始揭示这一作用的机制。实验表明,Bcl-2 可增强细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性,抑制大多数化疗药物所引起的靶细胞凋亡,但其本身并不能抑制这些因素对细胞的损伤^[14];同样地,它也不能促进 DNA 修复^[15]。本研究中,无论 Bcl-2 转录及蛋白表达均显著增加,高度支持雌激素通过 Bcl-2 途径发挥抗凋亡作用。

本研究未能证实雌激素通过 P38 途径发挥抑制凋亡效应。P38 MAPK 通路是 MAPK 信号传导途径中的重要成员^[16]。在中枢神经损伤后 P38 MAPK 表达发生改变,并且和多种因素相互作用介导神经损伤^[17]。有研究表明 P38 MAPK 通路主要通过抑制单胺合成和再摄取,以及促进血清素转运子的合成减少血清素浓度发挥抗神经细胞凋亡作用。

本研究表明雌激素并非通过 ERK1/2 通路发挥抗凋亡作用。尽管雌激素组 pERK 轻度增加,但差异无统计学意义。细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular-signal regulated kinase, ERK1/2)是广泛存在于真核细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员。从信号转导角度看,活化后的 ERK1/2 作用于胞浆或胞核内的底物蛋白,引起特定蛋白的表达或活化,调控细胞的增殖、分化、凋亡等^[18]。关于 ERK1/2 信号通路与中枢神经系统疾病关系的研究,目前集中在脑缺血领域^[19],而在 CO 迟发性脑病方面尚处在起步阶段。

ERK1/2 主要分布于脊髓和大脑。

本模型采用腹腔注射 CO 法进行染毒,注射后血中 HbCO 可于 15 min 内迅速升至重度中毒水平,大鼠出现严重 CO 中毒表现,血液携氧能力明显降低,从而造成组织缺氧、脂质过氧化反应增强、循环血中丙二醛含量迅速升高,中枢神经系统亦出现明显病理学改变。采用腹腔注射途径染毒虽与临床所见急性 CO 中毒的 CO 侵入途径不同,但中毒机制相符。CO 吸入中毒模型具备的所有条件,并无明显差异。此外,注射法还具有以下优点:操作简便,毒剂量容易控制,影响因素少,便于及时监控染毒动物血中 HbCO 水平,并可避免吸入染毒可能出现的缺氧因素对实验结果的影响^[20]。所需 CO 量明显减少,对设备仪器条件亦无特殊要求。实验表明大鼠接受 CO 注射后,呈现典型急性 CO 中毒变化,HbCO 监测进一步证实大鼠血液中 CO 含量与急性 CO 中毒一致。

本研究对于 Bcl-2 途径参与凋亡存在一定的局限。由于限于技术手段没有采用信号通道抑制剂及基因敲出技术进一步证明 Bcl-2 途径,需要在将来的研究中进一步明确。

本研究提示雌激素能够一定程度改善 CO 迟发型脑病的神经功能,并可能通过一系列凋亡相关信号通道发挥作用。

参考文献

- [1] Guzman J A. Carbon monoxide poisoning [J]. Crit Care Clin, 2012, 28: 537-548.
- [2] 邓文彬, 韩超, 急性 CO 中毒 418 例临床分析 [J]. 中国热带医学, 2007, 7(4): 534-535.
- [3] Hampson N B, Dunn S L, Yip F Y, et al. The UHMS/ CDC carbon monoxide poisoning surveillance program: three-year data [J]. Undersea Hyperb Med, 2012, 39: 667-685.
- [4] Wu P E, Juurlink D N. Carbon monoxide poisoning [J]. CMAJ, 2014, 186: 611-611.
- [5] 王耀宏, 赵金垣, 崔书杰, 等. 急性一氧化碳中毒迟发性脑病的动物模型制备研究 [J]. 中国职业医学, 2004, 31(2): 5-10.
- [6] Weaver L K. Hyperbaric oxygen therapy for carbon monoxide poisoning [J]. Undersea Hyperb Med, 2014, 41: 339-354.
- [7] Ritzel R M, Capozzi L A, McCullough L D. Sex, stroke, and inflammation: The potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke [J]. Horm Behav, 2012, 63: 238-253.
- [8] Liu S B, Zhao M G. Neuroprotective effect of estrogen: role of nonsynaptic NR2B-containing NMDA receptors [J]. Brain Res Bull, 2013, 93: 27-31.
- [9] Rusa R, Alkayed N J, Crain B J, et al. 17beta-estradiol

表 1 2 组家兔 2 种测量方法所测得压强值

分组	cmH ₂ O	
	新型水柱法	Whiteside 法
第 1 组		
1	18	22
2	17	16
3	22	25
4	23	19
5	18	24
6	20	16
7	17	20
8	21	19
第 2 组		
1	65	58
2	60	55
3	64	56
4	60	66
5	56	49
6	59	67
7	61	58
8	55	48

产生的压强下降, 骨筋膜室内的压强升高, 当二者压强相等时盐水柱的液面将保持不变, 此时测得的压强实际上是盐水进入骨筋膜室内后产生的压强, 比实际值要偏大, 而且这种测量方法使得骨筋膜室压强增大可能进一步加重病情, 张强等^[6]也指出了苏伟这一方法的缺陷。

从测量所得的数据分析, 本实验中无论是正常家兔还是造模后的家兔, 用新型水柱法测得左大腿骨筋膜室压力与之配对的 Whiteside 法测得右大腿骨筋膜室压强比较, 差异无统计学意义, 因此可以认为 2 种测量方法测定的结果相同, 因此新型水柱法可以替代传统的 Whiteside 法来测量骨筋膜室内

压强。

综上所述, 本文介绍的新型水柱法拥有操作简便、计算简单、结果可靠等优点, 在缺乏 Whiteside 法基本用具时, 可做替代。

参考文献

[1] Whitney A, O'Toole R V, Hui E, et al. Do one-time intracompartmental pressure measurements have a high false-positive rate in diagnosing compartment syndrome[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 76:479-483.

[2] Prayson M J, Chen J L, Hampers D, et al. Baseline compartment pressure measurements in isolated lower extremity fractures without clinical compartment syndrome[J]. *J Trauma*, 2006, 60:1037-1040.

[3] Ovre S, Hvaal K, Holm I, et al. Compartment pressure in nailed tibial fractures. A threshold of 30 mmHg for decompression gives 29% fasciotomies[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1998, 118:29-31.

[4] Matava M J, Whitesides T E Jr, Seiler J G 3rd, et al. Determination of the compartment pressure threshold of muscle ischemia in a canine model[J]. *J Trauma*, 1994, 37:50-58.

[5] Hammerberg E M, Whitesides T E Jr, Seiler JG 3rd. The reliability of measurement of tissue pressure in compartment syndrome[J]. *J Orthop Trauma*, 2012, 26:e166-166.

[6] 张强, 曲伟, 慕晓芳. 骨筋膜室综合征改良水柱测压法的临床意义及分析[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2011, 26(12):1138-1139.

[7] 苏伟, 赵劲民, 张斌, 等. 垂直水柱测压法与 Whiteside 法诊断骨筋膜室综合征的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2010, 18(22):1896-1898.

(收稿日期:2014-11-16)

(上接第 283 页)

reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals[J]. *Stroke*, 1999, 30:1665-1670.

[10] Manwani B, McCullough L D. Estrogen in ischaemic stroke: the debate continues[J]. *Eur J Neurol*, 2012, 19:1276-1277.

[11] Zhang L, Nair A, Krady K, et al. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113:85-95.

[12] Piantadosi C A, Zhang J, Levin E D, et al. Apoptosis and Delayed Neuronal Damage after Carbon Monoxide Poisoning in the Rat[J]. *Exp Neurol*, 1997, 147:103-114.

[13] Taniwaki M. Chromosome and gene[J]. *Nihon Rinsho*, 2007, 65:34-40.

[14] Fulda S. Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy[J]. *Front Oncol*, 2011, 1:23-23.

[15] Garcia-Saez A J. The secrets of the Bcl-2 family[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19:1733-1740.

[16] Mamik M K, Ghorpade A. Src homology-2 domain-

containing protein tyrosine phosphatase (SHP) 2 and p38 regulate the expression of chemokine CXCL8 in human astrocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e45596.

[17] Bachstetter A D, van Eldik L J. The p38 MAP kinase family as regulators of proinflammatory cytokine production in degenerative diseases of the CNS[J]. *Aging Dis*, 2010, 1:199-211.

[18] Clarke D N, Al Ahmad A, Lee B, et al. Perlecan Domain V induces VEGF secretion in brain endothelial cells through integrin alpha5beta1 and ERK-dependent signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e45257.

[19] Sagar D, Lamontagne A, Foss C A, et al. Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood-brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9:245-245.

[20] 付守芝, 刘勇, 王家良, 等. 氦气防治一氧化碳中毒迟发性脑病的实验研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2008, 17(5):487-490.

(收稿日期:2014-04-24)