

## 赤芍 801 通过抑制 NF- $\kappa$ B 抗脑缺血-再灌注损伤的机制

郑建明<sup>1,2</sup>, 陈晓春<sup>1\*</sup>, 林敏<sup>3</sup>, 张静<sup>3</sup>, 林智颖<sup>1</sup>, 郑关毅<sup>3</sup>, 李康增<sup>2</sup>

(1. 福建医科大学附属协和医院神经内科, 福建 福州 350001; 2. 福建省宁德市闽东医院神经内科, 福建 宁德 355000;  
3. 福建省老年医学研究所, 福建 福州 350001)

**摘要:** 探讨赤芍 801 减轻在体大鼠脑缺血-再灌注损伤的可能机制。采用线栓模型制作大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤模型, 在缺血后给予赤芍 801, 用 Western blotting 方法检测脑缺血周边区的 NF- $\kappa$ B 活性、COX-2 和 HSP70 的表达量, 用 ELISA 方法测定 TNF- $\alpha$  的表达量, 用 RT-PCR 方法和免疫荧光染色法检测 TLR-4 的转录和蛋白表达。结果显示: 赤芍 801 能抑制脑缺血周边区 NF- $\kappa$ B 活性, 减少 COX-2 和 TNF- $\alpha$  的表达, 同时抑制 NF- $\kappa$ B 的上游 TLR-4 的转录和蛋白表达, 对 TLR-4 的内源性配体 HSP70 的蛋白表达也有抑制作用。赤芍 801 作为一种抗氧化剂, 有可能通过抑制脑缺血周边区的 NF- $\kappa$ B 活性, 减少局部的 COX-2 和 TNF- $\alpha$  的表达, 达到减轻脑缺血-再灌注损伤的目的, 同时对 NF- $\kappa$ B 的上游 HSP70 和 TLR-4 产生影响。

**关键词:** 赤芍 801; NF- $\kappa$ B; 脑缺血-再灌注损伤

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0158-07

## Mechanism of the reduction of cerebral ischemic-reperfusion injury through inhibiting the activity of NF- $\kappa$ B by propyl gallate

ZHENG Jian-ming<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-chun<sup>1\*</sup>, LIN Min<sup>3</sup>, ZHANG Jing<sup>3</sup>, LIN Zhi-ying<sup>1</sup>,  
ZHENG Guan-yi<sup>3</sup>, LI Kang-zeng<sup>2</sup>

(1. Department of Neurology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;  
2. Department of Neurology, Mindong Hospital of Ningde City, Fujian Province, Ningde 355000, China;  
3. Fujian Institute of Geriatrics, Fuzhou 350001, China)

**Abstract:** The probable mechanism of the reduction of rat cerebral ischemic-reperfusion injury by propyl gallate was studied. Intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rat was employed. Propyl gallate was injected immediately after the ischemia was happened. The activity of NF- $\kappa$ B, and the expression of COX-2 and HSP70 on the peripheral ischemia were determined by Western blotting. The expression of TNF- $\alpha$  was determined by ELISA assay. RT-PCR and immunofluorescence staining were employed to detect the transcription and expression of TLR-4. Results showed that propyl gallate could inhibit the activity of NF- $\kappa$ B in the peripheral ischemia, and reduce the expression of COX-2 and TNF- $\alpha$ . As the upstream of NF- $\kappa$ B, the transcription and expression of TLR-4 decreased, as well as HSP70, the endogenous ligand of TLR-4. As an antioxidant, propyl gallate could reduce the cerebral ischemic-reperfusion injury through inhibiting the activity of NF- $\kappa$ B and decreasing the COX-2 and TNF- $\alpha$  in the peripheral ischemia. It also could influence HSP70 and TLR-4.

**Key words:** propyl gallate; NF- $\kappa$ B; cerebral ischemic-reperfusion injury

收稿日期: 2010-08-12.

基金项目: 福建省重大科技基金资助项目 (2003F009).

\*通讯作者 Tel: 86-591-83333995, Fax: 86-591-83370993, E-mail: chenxiaochun998@gmail.com

在脑缺血-再灌注损伤中,核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 被强烈激活后从胞浆转移入胞核,启动下游基因,参与脑缺血的病理生理过程。抑制 NF- $\kappa$ B 的活性能减轻脑缺血-再灌注损伤<sup>[1]</sup>。Toll 样受体 4 (TLR-4) 主要在小胶质细胞中表达。脑缺血后大量细胞和组织崩解,热休克蛋白 70 (HSP70) 释放到细胞间隙,作为 TLR-4 的内源性配体,激活 TLR-4<sup>[2]</sup>。从而激活 NF- $\kappa$ B。

赤芍 801 是由中药赤芍的活性成分没食子酸经酯化反应合成的没食子酸丙酯 (propyl gallate)。在其分子结构中含有多个酚羟基,具有较强的抗氧化作用<sup>[3]</sup>。该药物脂溶性好,容易通过血脑屏障。该药系福建省自主研发的,拥有自主知识产权的药物。以往常因为在缺血前给药,导致临床试验的失败。此次研究改为缺血后给药,并且在前期研究中已经证实:在脑缺血后给予赤芍 801 具有明显的神经保护作用。但其作用机制尚不明确。因此,本研究进一步探讨,赤芍 801 的抗氧化作用是否与其影响 NF- $\kappa$ B 的转录活性有关及其对 HSP70 和 TLR-4 的影响。

## 材料与方法

**实验动物** SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雄性,体重 230~270 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号: SCXK (沪) 2003-0003。

**药品与试剂** TNF- $\alpha$  的 ELISA 检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, EK0526); 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (碧云天生物技术研究所, P0028); 组织蛋白抽提试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, AR0101)。兔源抗 COX-2 一抗 (Cellsignal 公司, 4842); 兔源抗 NF- $\kappa$ B 的 P65 一抗 (Cellsignal 公司, 3034); 鼠源抗 HSP70 一抗 (比利时 Stressgen 公司); 兔源抗 TLR-4 一抗 (Abcam 公司);  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (NeoMarkers 公司)。注射用赤芍 801 粉针剂 (福建闽东力捷迅药业, 国药准字 H35021288), 使用前溶于生理盐水, 配成 94 mmol·L<sup>-1</sup> 的溶液。注射用盐酸川芎嗪注射液 (无锡第七制药厂, 国药准字 H32023383), 使用前用生理盐水稀释成 48 mmol·L<sup>-1</sup> 溶液。

**大脑中动脉阻塞再灌注 (MCAO) 模型的制作** 模型制作根据 Longa 法进行改良<sup>[4]</sup>。线栓准备: 采用直径 0.27 mm 的日本进口尼龙鱼线, 一端用聚酯蘸成光滑的纺锤状, 直径约 0.32~0.34 mm。大鼠用 604.5 mmol·L<sup>-1</sup> 水合氯醛溶液 (1.81 mmol·kg<sup>-1</sup>) 腹腔麻醉, 颈部备皮、消毒, 取正中切口, 分离右侧的颈总及颈

内外动脉, 电凝颈外动脉分支, 游离颈外动脉近端, 将栓线从颈外动脉近端插入。在进入距颈总动脉分叉约 (18.5±0.5) mm 处, 遇阻力即停止进线, 固定栓线结扎缝合。2 h 后重新麻醉大鼠, 回抽栓线到颈外动脉近端, 恢复灌注。

**实验分组及取材** 将实验大鼠随机分成空白对照组 (未作任何处理,  $n=6$ ), 假手术组 (线栓仅插入 10 mm 左右,  $n=6$ ), 溶剂对照组 (注射等量的生理盐水), 赤芍 801 (94  $\mu$ mol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 组<sup>[5]</sup>和盐酸川芎嗪 (48  $\mu$ mol·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 组。后 3 组分为 2、4、8、12、24 和 48 h 共 6 个时间点, 每个时间点均  $n=6$ , 总共 120 只大鼠。所有药物干预处理的开始时间均为插入线栓后立即腹腔注射给药。大鼠行生理盐水心脏灌注后, 断头取脑, 将脑组织切片, 小心剥取缺血灶周边组织, -80 °C 保存。

**细胞核蛋白和细胞浆蛋白的提取** 按试剂盒说明书操作。用于 NF- $\kappa$ B 的 P65 检测。

**组织蛋白的抽提** 每组每个时间点的 6 份标本各取 20 mg, 混在一起, 按组织净重 (g): 裂解液 (mL) 为 1:20 的比例, 加入相应体积的裂解液, 运用超声破碎仪进行匀浆, 12 000×g 离心 10 min (4 °C)。

**Western blotting 分析** 采用 Bradford 法对提取的匀浆标本进行蛋白定量, 取等量样品, 加上样缓冲液混匀, 以 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 半干电转至 PVDF 膜, 封闭 1 h 后, 加入 P65 (1:500)、COX-2 (1:500)、HSP70 (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 一抗, 过夜。HRP 标记的二抗 (1:1 000) 孵育 2 h, 用化学发光法显色, X 线底片曝光。

**ELISA 检测 TNF- $\alpha$**  按试剂盒说明书操作, 用 Curveexpert 1.3 软件计算样品的浓度。

## RT-PCR 检测 TLR-4 mRNA

**引物设计** TLR-4 为 F 5'-ATCATCCAGGAAGGCTTCCA-3', R 5'-CTGCCTCAGCAAGGACTTCT-3';  $\beta$ -actin 为 F 5'-ATTGTAACCAACTGGGACG-3', R 5'-TCTCCAGGGAGGAAGAGG-3'。

**扩增条件** 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 退火温度 58 °C, 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

**RT-PCR 产物的电泳分析** 以  $\beta$ -actin 校正做 TLR-4 相对表达量分析, 数值以 TLR-4/ $\beta$ -actin 表示。

**免疫荧光染色检测 TLR-4 的表达** 切冰冻组织片, 片厚 10  $\mu$ m, 贴于多聚赖氨酸包被过的玻片上。固定、封闭后, TLR-4 一抗 1:50, 4 °C 过夜。1:500 荧光二抗, 湿盒内孵育 2 h。TBS 漂洗 3 次。封片, 荧

光显微镜下观察、拍照。

**图像处理及统计学处理** 实验结果采用数据和图表显示,测定值以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学处理采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,显著性水平为  $P < 0.05$ 。

### 结果

#### 1 赤芍 801 抑制了 NF- $\kappa$ B 的 P65 亚基的活性

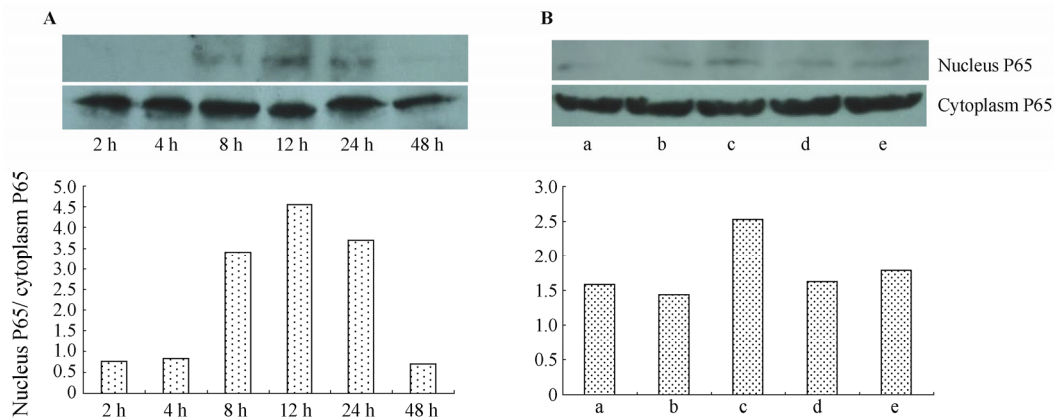
在大鼠 MCAO 模型的缺血周边区,核内的 P65 亚基表达在再灌注 8 h 开始升高,12 h 后达到了高峰,24 h 仍维持较高的活化水平,48 h 后下降。给予赤芍 801 ( $94 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 的大鼠,缺血-再灌注 12 h 后,核内的 P65 水平较溶剂对照组明显降低,仍高于正常对照组大鼠。给予盐酸川芎嗪 ( $48 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 的大鼠,其 P65 水平和赤芍 801 组相当 (图 1)。

#### 2 赤芍 801 抑制脑缺血-再灌注损伤后 COX-2 的表达

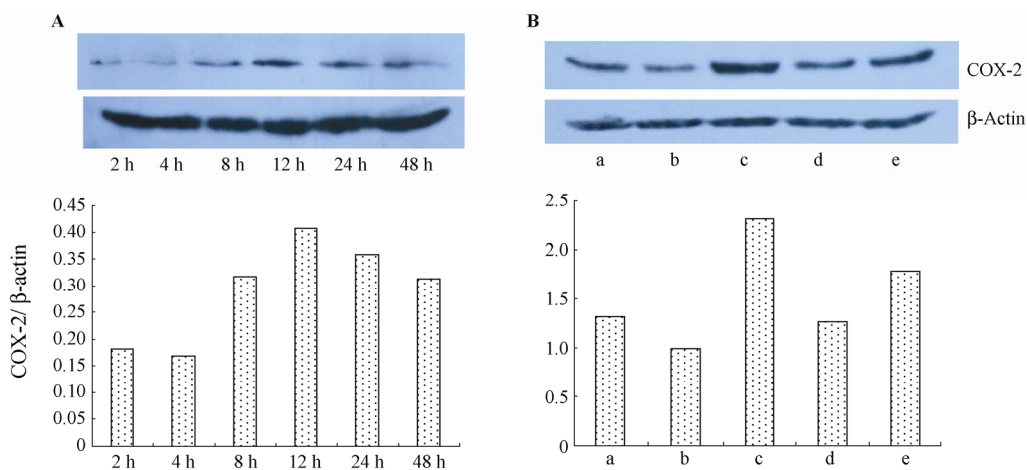
COX-2 表达在缺血-再灌注损伤后开始逐渐升高,在再灌注后 12 h 达到高峰,在 24 和 48 h 后仍维持较高的表达水平。给予赤芍 801 ( $94 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),在再灌注 12 h 能明显抑制 COX-2 的表达,盐酸川芎嗪 ( $48 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 也能抑制 COX-2 的表达 (图 2)。

#### 3 赤芍 801 抑制脑缺血-再灌注损伤后缺血周边区 TNF- $\alpha$ 的表达

缺血-再灌注损伤后,缺血周边区的 TNF- $\alpha$  表达在再灌注 8 h 后逐渐升高,24 和 48 h 达到高峰期。再灌注 8~48 h 的 TNF- $\alpha$  水平与前两个时间点比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。给予赤芍 801 ( $94 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 能明显抑制 TNF- $\alpha$  在缺血周边区的表达,抑制率为 44% ( $P < 0.05$ )。给予盐酸川芎嗪



**Figure 1** The changes of nucleus and cytoplasm P65 on the peripheral ischemia over time after ischemic-reperfusion injury (A). The effect of propyl gallate on the nucleus and cytoplasm P65 in the peripheral ischemia (B). a: Normal group; b: Sham operation group; c: Model group; d: Propyl gallate  $94 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group; e: Tetramethylpyrazine  $48 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group



**Figure 2** The changes of COX-2 on the peripheral ischemia over time after ischemic-reperfusion injury (A). The effect of propyl gallate on the COX-2 in the peripheral ischemia (B). a: Normal group; b: Sham operation group; c: Model group; d: Propyl gallate  $94 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group; e: Tetramethylpyrazine  $48 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group

(48  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 也能明显抑制 TNF- $\alpha$  的表达 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

#### 4 赤芍 801 能减轻大鼠缺血周边区 HSP70 的表达

在缺血-再灌注损伤后, 缺血周边区的 HSP70 表达有随再灌注时间的延长而逐渐升高的趋势。在再灌注 24 h 出现明显的高表达, 形成急剧的高峰, 48 h 后明显回落。赤芍 801 (94  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 组再灌注 24 h 的 HSP70 表达被明显抑制, 盐酸川芎嗪 (48  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 也表现出了同样的作用 (图 4)。

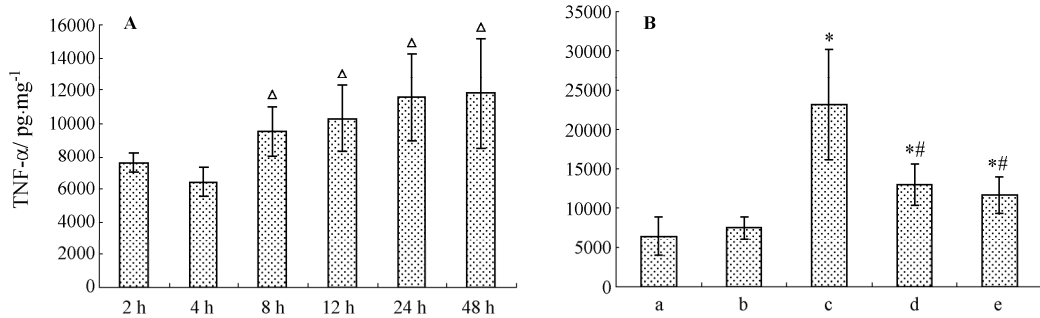
#### 5 赤芍 801 减少缺血周边区 TLR-4 的转录和表达

缺血周边区 TLR-4 的 mRNA 表达在再灌注后就已升高, 再灌注 24 h 后形成明显的高峰。与各时间点间的差异, 经统计学检验, 只有再灌注 24 h 有意义 ( $P < 0.05$ )。高表达 TLR-4 细胞的数量在再灌注后即升高, 再灌注 24 h 增加尤为明显, 与 mRNA 表达的变化趋势相一致。各时间点间的差异, 经统计学检验,

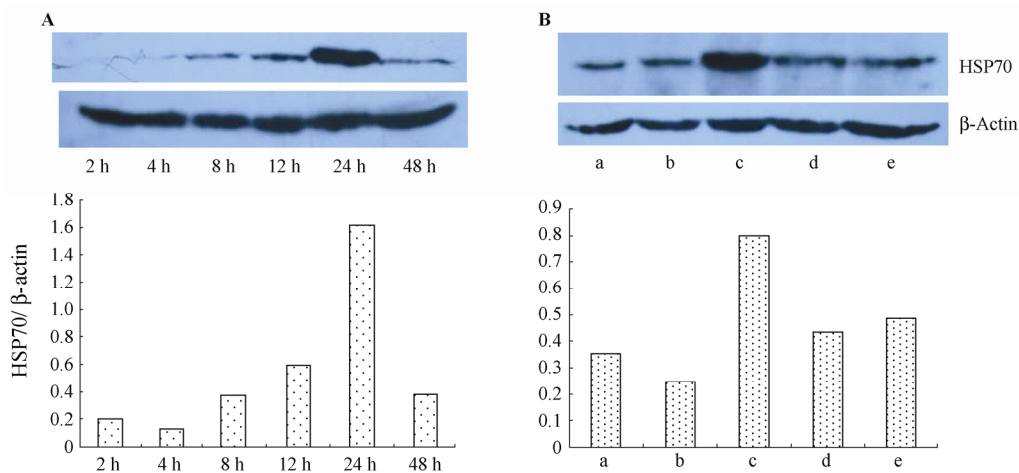
也只有再灌注 24 h 有意义 ( $P < 0.05$ )。给予盐酸川芎嗪 (48  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 与赤芍 801 (94  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) 均能显著减少 TLR-4 的 mRNA 和蛋白水平 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

#### 讨论

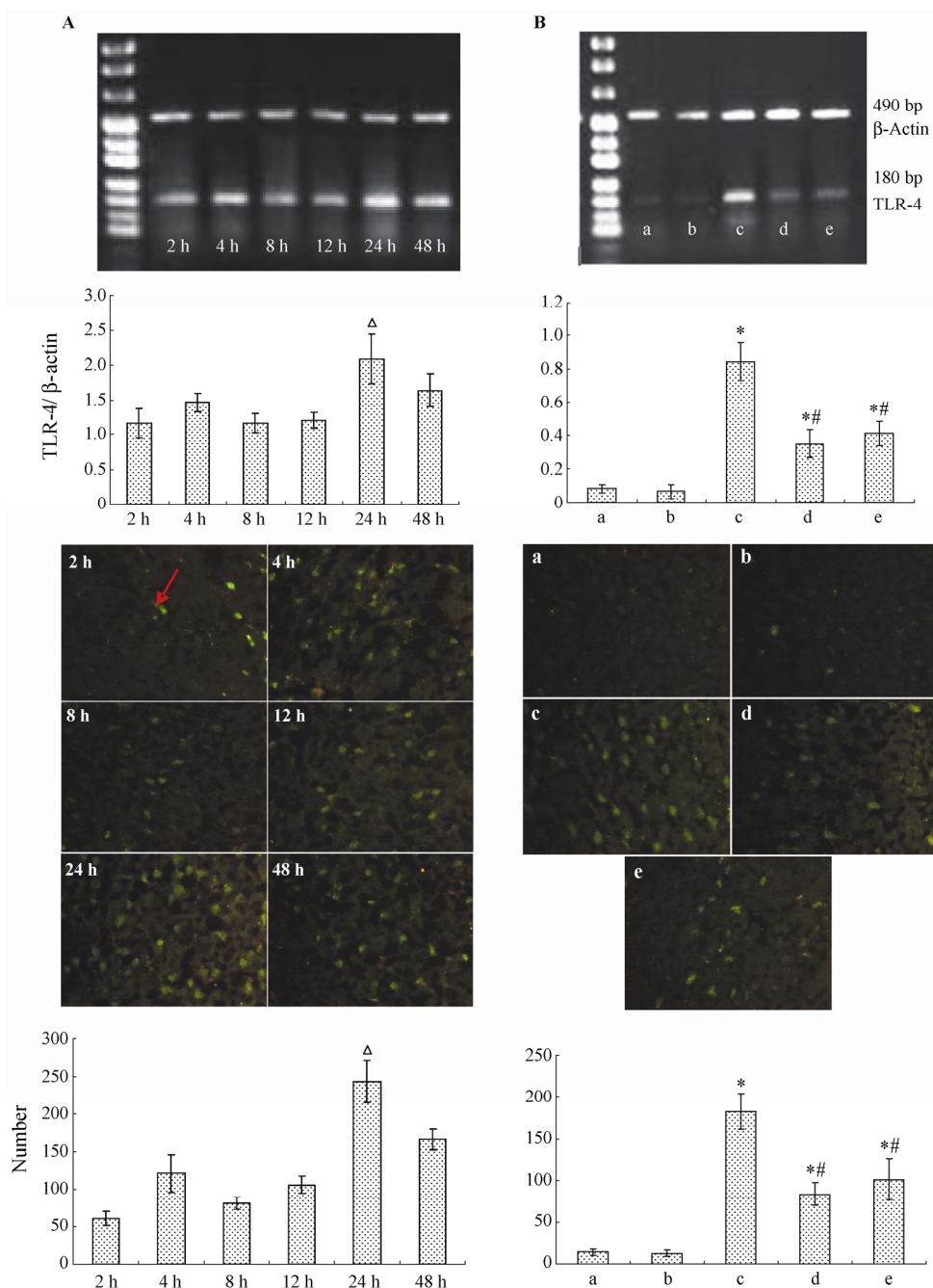
氧化应激和 NF- $\kappa$ B 的关系十分密切, 在脑缺血过程中, NF- $\kappa$ B 的激活大部分和活性氧有关<sup>[6]</sup>。Stephenson 等的研究也表明, 局灶性脑缺血中脑组织的 NF- $\kappa$ B 活性得到很大的提高, 在再灌注 2、6 和 12 h 后, NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性分别提高了 3 倍、1.4 倍和 7 倍。应用抗氧化剂后, NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性明显下降<sup>[7]</sup>。NF- $\kappa$ B 激活后能启动炎症因子的表达, 如 TNF- $\alpha$  和 COX-2。此次研究结果显示: 缺血周边区的 COX-2 表达在 12 h 后达到高峰, TNF- $\alpha$  表达在 24 h 达到高峰。这与 NF- $\kappa$ B 激活的时间曲线比较吻合。



**Figure 3** The changes of TNF- $\alpha$  on the peripheral ischemia over time after ischemic-reperfusion injury (A). The effect of propyl gallate on the TNF- $\alpha$  in the peripheral ischemia (B). a: Normal group; b: Sham operation group; c: Model group; d: Propyl gallate 94  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group; e: Tetramethylpyrazine 48  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group.  $\Delta P < 0.05$  vs 2 h; \* $P < 0.05$  vs normal group; # $P < 0.05$  vs model group



**Figure 4** The changes of HSP70 on the peripheral ischemia over time after ischemic-reperfusion injury (A). The effect of propyl gallate on the HSP70 in the peripheral ischemia (B). a: Normal group; b: Sham operation group; c: Model group; d: Propyl gallate 94  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group; e: Tetramethylpyrazine 48  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group



**Figure 5** The mRNA and immunofluorescence of TLR-4 on the peripheral ischemia over time after ischemic-reperfusion injury (A). The effect of propyl gallate on the mRNA and immunofluorescence of TLR-4 in the peripheral ischemia (B). The red arrow points to TLR-4 positive cell. a: Normal group; b: Sham operation group; c: Model group; d: Propyl gallate  $94 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group; e: Tetramethylpyrazine  $48 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  group.  $\Delta P < 0.05$  vs 2 h;  $*P < 0.05$  vs normal group;  $\#P < 0.05$  vs model group

赤芍 801 进入脑内后作为抗氧化剂，抑制了氧化应激产物丙二醛的产生，提高了超氧化物歧化酶的含量<sup>[5]</sup>，减轻了氧化应激作用，与此同时，在缺血周边区胞核内的 P65 的含量下降。缺血周边区的 TNF- $\alpha$  和 COX-2 的水平降低，进一步说明了 NF- $\kappa$ B 的活性被抑制。另外以往的研究也发现，赤芍 801 对 iNOS 也有抑制作用<sup>[8]</sup>。iNOS 主要由 NF- $\kappa$ B 调控。这一结

果进一步支持赤芍 801 对 NF- $\kappa$ B 的抑制作用。

TNF- $\alpha$  是一种由激活的单核/巨噬细胞产生的细胞因子，缺血-再灌注损伤后，TNF- $\alpha$  mRNA 的高峰在再灌注后 6 h<sup>[9]</sup>。TNF- $\alpha$  的表达在 12 h 达到高峰<sup>[10]</sup>。TNF- $\alpha$  的另一个很主要的作用是作为 NF- $\kappa$ B 的正反馈调节剂。TNF- $\alpha$  通过 TNFR，作用于 IKK，进一步激活 NF- $\kappa$ B<sup>[11]</sup>。赤芍 801 抑制 TNF- $\alpha$  在缺血周边区

的水平,一方面可能减轻了 TNF- $\alpha$  引起的炎症反应,另一方面可能打断了 TNF- $\alpha$  对 NF- $\kappa$ B 的正反馈作用,进一步抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。

COX-2 是前列腺素合成的限速酶,COX-2 能产生 PGE2 和 ROS。两者均能导致脑损害<sup>[12]</sup>。赤芍 801 能抑制 COX-2 的表达。另外赤芍 801 还具有抑制 COX-2 活性的作用<sup>[13]</sup>。赤芍 801 通过对 COX-2 的影响,能减少 COX-2 生成 ROS,有可能进一步加强其抗氧化作用。

盐酸川芎嗪本身具有抗氧化作用,对 NF- $\kappa$ B 也具有抑制作用,在 MCAO 模型中对 TNF- $\alpha$  有抑制作用<sup>[14]</sup>,与此次研究的内容比较相近,因此被选择作为阳性对照。从本次研究结果看,盐酸川芎嗪的作用与文献报道的比较一致。

TLR-4 是 Toll 样受体家族的成员,与先天性免疫有关,能识别外源性的脂多糖。在脑中,TLR-4 主要在小胶质细胞中表达,能识别从损伤细胞中释放出来的物质,激活 NF- $\kappa$ B<sup>[15]</sup>。TRL-4 被激活后能导致炎症反应<sup>[16]</sup>。TRL-4 基因敲除后,局灶性脑缺血-再灌注造成的损伤减轻,而且 COX-2、iNOS 等炎症因子的表达也明显下降<sup>[17]</sup>。HSP70 被认为是 TLR-4 的内源性配体<sup>[18]</sup>。HSP70 通过两种途径释放到细胞外:① 被动释放,细胞坏死后,崩解,释放出 HSP70<sup>[19]</sup>;② 主动释放<sup>[20]</sup>。HSP70 进入细胞外后,能够通过 TLR-4 激活 NF- $\kappa$ B,启动炎症反应<sup>[21]</sup>。

TLR-4 在缺血周边区随再灌注时间的延长逐渐升高,在 24 h 达到了高峰。TLR-4 在脑的小胶质细胞中表达,而再灌注 24 h 正好是小胶质细胞活化最明显的时候<sup>[22]</sup>。由此推测,TLR-4 随再灌注时间的延长而增高的趋势可能与小胶质细胞的活化有关。TLR-4 作为 NF- $\kappa$ B 的上游,它增高的峰值在再灌注 24 h,而 NF- $\kappa$ B 的高峰却在再灌注后 12 h,两者在时程上不是非常吻合。这可能是因为:实验检测的 NF- $\kappa$ B 的活性是所有细胞的总的活性,而 TLR-4 大部分在小胶质细胞中表达,这样 TLR-4 激活的 NF- $\kappa$ B 的活性很可能被其他细胞的活性掩盖,表现出两者时程上的差异。

给予赤芍 801 后,TLR-4 在缺血周边区的表达量下降,可能是赤芍 801 通过抑制炎症反应,减弱局部的趋化作用,抑制小胶质细胞向缺血周边区的聚集,使缺血周边区的 TLR-4 的表达量下降。赤芍 801 减轻了局部的应激损害,HSP70 作为损伤反应程度的

标志,相应的表达下降。HSP70 的变化可能是局部损害变化的一个伴随效应。从总的效应看,在赤芍 801 的影响下,缺血周边区的 HSP70 和 TLR-4 的表达都呈下降的趋势,有可能提示 TLR-4 受体通路活性在缺血周边区也呈下降的趋势。这对抑制炎症反应的正反馈效应,进一步抑制炎症反应,有积极的意义。

综上所述,赤芍 801 抑制 NF- $\kappa$ B 的活性,减少了 NF- $\kappa$ B 下游的 TNF- $\alpha$  和 COX-2 的表达,保护缺血周边区,同时对 NF- $\kappa$ B 的上游 TLR-4 和 HSP70 也有抑制作用。

## References

- [1] Ridder DA, Schwaninger M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2009, 158: 995-1006.
- [2] Khan KN, Kitajima M, Imamura T, et al. Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70 [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23: 2210-2219.
- [3] Li XD. The anti-thrombosis effectiveness of the propyl gallate [J]. *China Prescr Drug (中国处方药)*, 2003, 9: 38-39.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [5] Zheng JM, Chen XC, Zhang J, et al. Protective effect of the propyl gallate against cerebral ischemia-reperfusion injury via antioxidation in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2008, 24: 942-996.
- [6] James AC. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28: 1526-1531.
- [7] Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, et al. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 592-603.
- [8] Zheng GY, Chen XC, Du J, et al. Inhibition of neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion through down-regulation of nNOS and iNOS expression by propyl gallate [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2006, 22: 992-997.
- [9] Berti R, Williams AJ, Moffett JR, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 1068-1079.
- [10] Wang YX, Shen XP, Li MQ, et al. Effect of Acanthopanax senticosus injection (ASI) on expressions of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 proteins of the transient focal ischemia-reperfusion in

- rats [J]. *J Harbin Med Univ (哈尔滨医科大学学报)*, 2007, 41: 561-512, 565.
- [11] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 2195-2224.
- [12] Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity [J]. *Nat Med*, 2006, 12: 225-229.
- [13] Bryan JS, Carol D, Gerard M. Measurement of arachidonic acid liberation in thrombin-stimulated human platelets. Use of agent that inhibit both the cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 835: 344-351.
- [14] Chang Y, Hsiao G, Chen SH, et al. Tetramethylpyrazine suppresses HIF-1alpha, TNF-alpha, and activated caspase-3 expression in middle cerebral artery occlusion-induced brain ischemia in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28: 327-333.
- [15] Guolong Z, Sankar G. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 13-19.
- [16] Ji YY, Wang ZD, Liu JT, et al. Inhibitory effect of fenofibrate on angiotensin II-induced toll-like receptor 4 expression, myeloperoxidase activity and expression in RAW264.7 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 462-467.
- [17] Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, et al. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke [J]. *Circulation*, 2007, 115: 1599-1608.
- [18] Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 76: 514-519.
- [19] Calderwood SK. Chaperones and slow death--a recipe for tumor immunotherapy [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 57-59.
- [20] Clayton A, Turkes A, Navabi H, et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118: 3631-3638.
- [21] Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15028-15034.
- [22] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22: 391-397.