

育真熄风汤对帕金森病模型小鼠脑内铁蛋白 Fn 的影响*

秦博文¹, 党晓伟¹, 卢思英¹, 商亚珍²

(1. 承德护理职业学院科研处, 河北承德 067000; 2. 承德医学院, 河北承德 067000)

摘要:目的 探讨育真熄风汤(YZXFT)对小鼠帕金森病(PD)模型中脑铁蛋白 Fn 的影响。方法 将试验动物分为空白对照组、模型对照组、阳性药物对照组和中药治疗组,在 1-甲基-4-苯基-1,20,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的 PD 小鼠模型基础上,采用免疫组织化学染色,观察各组小鼠脑内 Fn 蛋白的表达情况。结果 爬杆实验结果显示,中药治疗组小鼠与模型对照组小鼠比较,运动协调障碍有所减轻;免疫组织化学结果显示,第 6、13、20 天模型对照组 Fn 水平与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),分别为 2.21 倍、1.15 倍、0.36 倍。YZXFT 71.5 g/kg 和 143 g/kg 组与模型对照组比较能明显增加 Fn 蛋白水平。结论 YZXFT 具有提高脑内 Fn 蛋白表达作用,为进一步研究其治疗 PD 的机制提供依据。

关键词:帕金森病;育真熄风汤;铁蛋白 Fn

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1889-03

Effect of Yuzhenxifeng Decoction on the brain ferritin in PD mouse models*

Qin Bowen¹, Dang Xiaowei¹, Lu Siying¹, Shang Yazhen²

(1. Department of Scientific Research, Chengde Nursing Vocational College, Chengde, Hebei 067000, China;

2. Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract:Objective To study the effect of Yuzhenxifeng Decoction on the brain ferritin in PD mouse models. **Methods** All experimental animals were divided into 4 groups: the control group, the model group, the positive drug group and TCM group. Prepare PD model mice with MPTP, then use the immunohistochemical staining technique to observe the change of expression of Fn. **Results** the results showed that compared with the model group, movement coordination disorder of rats in TCM group were relieved; the Fn level of the model group on 6th, 13th, 20th were higher than control group ($P < 0.05$), and were 2.21 times, 1.15 times and 0.36 times higher respectively. Compared with model group mice, expression of Fn were enhanced in the treatment group. **Conclusion** Yuzhenxifeng Decoction can improve the expression of Fn in the brain, which provide the basis for further study on mechanism of the treatment of Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease; Yuzhenxifeng Decoction; Fn

1924 年,Lehermitte 等发现帕金森病(PD)患者脑内铁含量增加显著,存在异常堆积的现象。PD 患者黑质内铁异常沉积的原因不明,但越来越多的证据显示铁在脑黑质部位的异常沉积与 PD 密切相关,极有可能是 PD 发病的一个重要因素^[1]。铁在脑内主要以 Fn 蛋白的形式储存,正常情况下,当细胞内增多的铁离子水平高于细胞代谢所需时,就会诱导 Fn 合成,这样游离铁就可以结合在铁蛋白核内,以一种可利用的无毒形式存在,如果铁蛋白的合成正常进行,黑质中增加的铁就会是无毒性状态^[2],Fn 可以防止细胞内过剩的自由铁离子的堆积,被认为是天然的铁螯合剂,Fn 蛋白越高对 PD 患者疗效越好。本研究通过探讨育真熄风汤(YZXFT)对脑内 Fn 蛋白表达作用,为进一步研究其治疗 PD 的机制提供依据。

1 材料与方

1.1 材料 健康雄性 C57/BL 小鼠 90 只,SPF 级,6~7 周龄,体质量(18±2)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,小鼠饲养于承德医学院动物实验中心,室温维持在(18±2)℃,湿度维持在 50%±10%,昼夜循环光照条件下,自由进食和饮水,实验开始前适应环境 1 周。

1.2 仪器与试剂 Leica 石蜡切片机(德国),恒温摊片烤片机(TK-218,湖北),Thermo 石蜡包埋机(英国),Olympus 显微镜及摄像装置(BH-2 型,日本),HI98127 酸度计(意大利),水域振荡器(SZX-B,哈尔滨),恒温磁力搅拌器(江苏),美多巴(每片含左旋多巴 200 mg+苄丝肼 50 mg,上海罗氏),1-甲基-4-苯基-1,20,3,6-四氢吡啶(MPTP,美国 Sigma),兔抗小鼠 TH 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),Ferritin heavy chain(H-53);sc-25617(Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 药物制备 YZXFT(含生黄芪 15 g,熟地 30 g,龟板 30 g,怀牛膝 15 g,白芍 20 g,鹿角胶 12 g,附子 3 g,补骨脂 12 g,天南星 12 g,白芥子 12 g,天麻 15 g,牡蛎 30 g,枳壳 10 g,丹参 30 g,酒大黄 6 g,全蝎 8 g,蜈蚣 2 g,条僵蚕 12 g),生药总量 275 g,根据药理学方法计算小鼠给药量,按照每次小鼠灌胃 10 mL/kg 计算,3 个中药治疗组分为低、中、高剂量组,小鼠给予相当于生药量分别为 35.75、71.50、143.00 g/kg 的药液,阳性对照药物美多巴(每片 250 mg),采用 CMC 溶解配制成浓度为 12.5 mg/mL 的溶液,造模药 MPTP 采用生理盐水配制成浓度

为 0.33% 的溶液。

1.2.2 PD 小鼠模型 建立参照 Nobutaka Arai, Kazuaki Misugi 的实验方法, 略加修改。小鼠造模前训练小鼠自上而下完成爬杆运动 1 min, 以确保小鼠能顺利完成实验项目。训练时间为每日上、下午每只小鼠各完成爬杆活动 3 次, 连续 5 d。造模前 1 d, 采用爬杆实验筛选健康灵活小鼠, 选用能在 6~10 s 内完成爬杆的小鼠, 消除小鼠的运动差异, 造模采用生理盐水配制的 0.33% MPTP (30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 腹腔注射, 连续 5 d。

1.2.3 动物分组与给药 将小鼠分成 6 组, 每组 15 只, 实验药物采用灌胃法给药, 按照 10 mL/kg 的剂量给予小鼠灌胃, 从首次注射 MPTP 前 3 d 开始, 灌胃小鼠 (中药治疗组) 分别给予高 (143 g/kg)、中 (71.5 g/kg)、低 (35.75 g/kg) 浓度的 YZXFT, 美多巴组给予阳性药物美多巴悬液 (125 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 灌胃, 以上统称 (治疗组); 空白对照组和模型对照组给予生理盐水灌胃, 造模期间及造模后持续灌胃给药共 27 d。

1.2.4 行为学检测 取一长 50 cm, 直径 1 cm 的木制杆垂直竖立, 顶端固定一直径 1.5 cm 的黏土小球, 为防止打滑, 木杆表面缠一层纱布。将被测小鼠头向下放到小球上, 从小鼠接触小球开始计时, 到小鼠前爪着地为止, 记录小鼠从小球爬下木杆所用时间。如遇小鼠中途停止或反向爬行结果不计, 重新测试。如小鼠抱杆停留, 不能爬行, 或不能抓杆, 直接掉落计 120 s。每只小鼠每天在同一时间测试 3 次, 以连续爬行用时最短的 2 次作为有效, 取平均值作为小鼠最终爬杆时间。

1.2.5 标本采集 分别于造模第 6、13、20、27 天分批处死小鼠取材。用 10% 水合氯醛腹腔麻醉小鼠, 麻醉成功后, 打开胸腔, 插管经左心室插入升主动脉, 经插管快速注入 37 °C 生理盐水灌流液冲洗, 同时剪开右心耳放血, 直到流出液不见血色, 肝

脏发白为止。再用推注 10% 福尔马林溶液灌注, 直至小鼠头和四肢僵硬, 灌注完毕后迅速断头, 剥离颅骨及软脑膜, 取出脑, 置于 10% 福尔马林固定液中继续固定, 24 h 后 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.2) 液浸泡 6 h 中止固定。经脱水, 常规石蜡包埋, 灌状连续切片, 片厚 5 μm, 隔 100 μm 取 1, 用于免疫组织化学染色。

1.2.6 免疫组织化学 (SABC 法) 切片常规脱蜡至水 (二甲苯 I、II 各 15 min; 无水乙醇 I、II 各 10 min, 95%、90%、80%、70% 乙醇依次浸没 10 min, 纯水浸洗 5 min × 2 次; PBS 浸泡 5 min × 2 次), 3% H₂O₂ 37 °C 恒温箱孵育 30 min 灭活内源性酶; 枸橼酸盐修复液微波煮沸修复, 冷却至 37 °C; 5% BSA 羊血清封闭; 一抗分别用 1:150 兔抗小鼠 TH 抗体, 1:200 Ferretin heavy chain (H-53), 4 °C 过夜; 生物素化山羊抗兔 IgG 抗体 (II 抗) 和 SABC, 37 °C 各孵育 20 min; DAB 显色, 苏木素复染 2 min, HCL-ALC 分化 1~2 s; 脱水、透明、封片, 阴性对照以 PBS 代替一抗进行染色。结果判定: 以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性神经元。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间多样本均值间比较采用单因素方差检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学测试 小鼠在注射 MPTP 5~10 min 后, 出现肢体震颤、弓背、竖毛竖尾、后肢伸张及跳窜等动作, 持续 20~30 min 后, 小鼠活动明显减少, 动作迟缓, 对外界反应降低, 逃避反应迟钝, 甚至匍匐不动, 此情况持续一段时间后逐渐恢复, 24 h 后完全消失。爬杆实验采用小鼠完成固定爬杆的时间来评估小鼠的运动协调能力, 见表 1。

表 1 实验各组爬杆标准计分比较 ($n=15, \bar{x} \pm s$, 分)

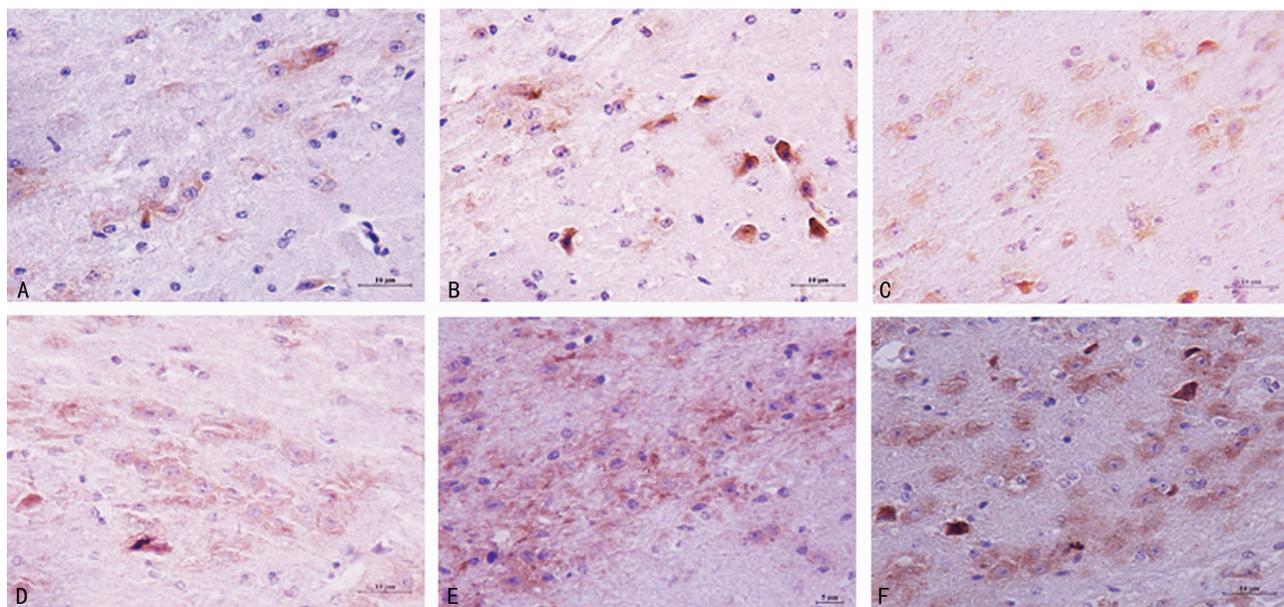
组别	当天	1 d	3 d	5 d
空白对照组	6.40 ± 1.35	7.07 ± 1.16	6.93 ± 1.98	6.80 ± 2.04
模型对照组	6.33 ± 1.67	19.20 ± 5.40 ^{△△}	54.73 ± 17.03 ^{△△}	76.28 ± 27.65 ^{△△}
YZXFT 低剂量组	6.47 ± 1.55	21.20 ± 6.33	44.00 ± 20.81	62.14 ± 18.37*
YZXFT 中剂量组	6.80 ± 1.74	22.73 ± 9.49	41.67 ± 24**	59.15 ± 19.45**
YZXFT 高剂量组	6.47 ± 1.85	20.40 ± 4.27	36.13 ± 19.77*	53.29 ± 12.28*
美多巴组	6.73 ± 1.39	18.80 ± 4.39	39.13 ± 12.87*	50.94 ± 14.80**

△: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与模型对照组比较。

表 2 各组小鼠脑内 Fn 蛋白表达比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量	6 d	13 d	20 d	27 d
空白对照组	—	0.005 7 ± 0.000 4	0.005 8 ± 0.000 2	0.012 6 ± 0.001 9	0.019 2 ± 0.001 7
模型对照组	—	0.018 3 ± 0.000 3 ^{△△}	0.012 5 ± 0.001 3 ^{△△}	0.019 9 ± 0.000 7 ^{△△}	0.019 9 ± 0.000 0
YZXFT 低剂量组	35.75 g/kg	0.018 8 ± 0.001 0	0.014 1 ± 0.000 1	0.023 6 ± 0.001 7	0.014 3 ± 0.001 7**
YZXFT 中剂量组	71.50 g/kg	0.040 3 ± 0.001 9**	0.034 8 ± 0.000 4**	0.024 6 ± 0.003 2	0.028 6 ± 0.000 1**
YZXFT 高剂量组	143.00 g/kg	0.099 1 ± 0.001 8**	0.077 1 ± 0.002 5**	0.095 2 ± 0.009 2**	0.053 7 ± 0.003 2**
美多巴组	125.00 mg/kg	0.083 7 ± 0.007 9**	0.089 1 ± 0.001 4**	0.140 1 ± 0.002 3**	0.065 5 ± 0.001 8**

△: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与模型对照组比较。—: 表示此项无数据。



A:空白对照组;B:模型对照组;C:YZXF 低剂量组;D:YZXF 中剂量组;E:YZXF 高剂量组;F:美多巴组。

图 1 实验第 27 天黑质内 Fn 免疫组织化学蛋白表达(SABC 法, $\times 400$)

结果显示,首次注射 MPTP 前 1 d,各组小鼠均在 6~10 s 内完成爬杆活动,注射 MPTP 后,模型对照组与空白对照组比较,完成爬杆时间出现延长,且完成爬杆时间随着用药时间的延长而显著增加,尤其从第 3 天开始,差异有统计学意义($P < 0.05$),中药组与模型对照组比较,爬杆时间有所缩短。

2.2 Fn 组化染色 Fn 阳性细胞染色为棕黄色,为神经胶质细胞,空白对照组小鼠脑内胞质着色均匀分布,神经细胞胞体正常,轮廓饱满,核仁清晰,模型对照组与空白对照组比较,模型对照组神经胶质细胞数量明显降低,治疗组神经胶质细胞较模型对照组增多,体积较饱满,结构较清晰,见图 1。

2.3 YZXFT 对小鼠脑内 Fn 蛋白表达的影响 Fn 免疫组织化学结果显示,在给药的第 6、13、20 天模型组 Fn 含量与空白组比较增加,差异均有统计学差异($P < 0.05$),分别为 2.21 倍、1.15 倍、0.36 倍。给药的第 6、13、20 和 27 天,YZXF 低剂量组与模型对照组比较,差异无统计学意义($P < 0.05$);YZXF 中剂量组与模型对照组比较,Fn 蛋白表达分别增加了 1.20 倍($P < 0.01$)、1.78 倍($P > 0.05$)、95.2%($P > 0.05$)、48.95%($P < 0.01$);YZXF 高剂量组与模型对照组比较,Fn 蛋白表达分别增加了 4.41、5.16、6.55、1.79 倍,差异均有统计学意义($P < 0.01$);而美多巴组与模型对照组比较,Fn 蛋白表达分别增加了 3.57、6.12、10.19、2.41 倍,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

3 讨论

YZXF 以熟地、龟板、鹿角胶为君药,辅以其他滋肝阴、补肾气、补脾益气、活血化痰、化疾通络的中药有效成分,从多靶点、多层次、多途径整体调节机体功能,达到熄风止痉、引血下行、肾阳充盛,肝阳下潜,虚风得熄,筋脉得养,抽搐震颤自止的效果,符合 PD 的中医治疗理论。行为学上采用爬杆实验^[3-4]作为测试小鼠协调运动能力改变的指标,结果显示在造模第 3 天,模型对照组与空白对照组的出现显著差异,随着 MPTP 注射时间的增加,每次注射后小鼠的运动障碍程度较前 1 d 增加,症状持续时间相应延长。中药治疗组和美多巴组与模型对照组比较 PD 小鼠运动协调障碍均有不同程度的减轻,恢复时

间有所缩短,显示 YZXFT 可减轻 PD 小鼠的行为学障碍,实验结果表明,本次研究所采用的连续 5 d 腹腔注射 MPTP($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)建立的 PD 小鼠模型是可靠的,并且 YZXFT 对 MPTP 所致小鼠运动协调能力障碍具有一定的改善作用。

多数学者普遍认为,铁通过 Fenton 反应与 H_2O_2 反应产生具有高度活性的羟自由基($^{\cdot}\text{OH}$), $^{\cdot}\text{OH}$ 通过作用于核酸、蛋白质和含有大量不饱和脂肪酸的细胞膜,从而引起细胞损伤^[5]。结合的 Fe^{3+} 需要被还原成 Fe^{2+} 后才能与 H_2O_2 反应生成 $^{\cdot}\text{OH}$,这是铁产生氧化应激损伤的一个关键环节。铁在脑内主要以 Fn 的形式储存,Fn 是由蛋白质外壳和壳内无机复合体的铁核构成。蛋白质外壳是由重链(H 亚基)和轻链(L 亚基)组成。H 亚基含有有活性的铁氧化酶,它是氧化 Fe^{2+} 的关键酶^[6]。SN 内铁以 Fe^{2+} 的形式被摄取,随之在铁蛋白外壳被铁氧化酶氧化为 Fe^{3+} 并转入铁核,以多聚体形式聚集在铁核内,而 L 亚基不含有铁氧化酶。因此 H 亚基具有迅速结合和稳定铁,减少氧化应激损伤的作用,被认为是细胞抗氧化损伤的天然保护剂。同样,铁蛋白中的 Fe^{3+} 也可以在多种生物还原剂如半胱氨酸、还原型核黄素和抗坏血酸的作用下还原成 Fe^{2+} 而释放^[7]。正常情况下,当细胞内增多的 Fe^{2+} 水平高于细胞代谢所需时,就会诱导 Fn 合成,这样游离铁就可以结合在铁蛋白核内,以一种可利用的无毒形式存在。如果铁蛋白的合成正常进行,SN 中增加的铁就会是无毒性状态^[8],Fn 可以防止细胞内过剩的自由铁离子的堆积,因此,被认为是天然的铁螯合剂。

本研究结果显示,模型对照组比空白对照组 Fn 显著增加,可能是游离铁的增加诱发铁蛋白合成增多。而治疗组小鼠 Fn 水平较模型组增多显著,且随着剂量的增加,Fn 水平也增加,YZXFT 高剂量组与美多巴组近似,提示 YZXFT 可能是通过促进胶质细胞内铁蛋白含量的增加,进而结合游离铁离子,降低铁的异常堆积,对抗神经细胞膜上产生的脂质过氧化反应,从而保护黑质多巴胺神经元免遭氧化应激的攻击,达到抗 PD 的目的。

3 为活性的 MMP-3, MMP-3 又可快速激活 Pro-MMP-9, 大量 MMP-3, 9 又可刺激细胞分泌更多的 uPA, 从而在细胞外基质降解病理过程中形成一个恶性循环, 通过早期干预, 抑制 uPA 的表达水平, 可显著减缓组织胶原的降解。笔者前期构建了靶向 uPA-shRNA 序列并进行慢病毒包装, 本研究在进行慢病毒包装时加载了 GFP, 转染软骨细胞后观察不同分组之间 uPA、MMP-3 基因和蛋白的表达水平, 结果显示 uPA-siRNA 慢病毒载体可高效转染软骨细胞, 其可显著抑制 uPA、MMP-3 基因和蛋白的表达水平, 而同期应用 MMP-3 抑制剂 TIMP 后, 其只抑制了 MMP-3 蛋白的表达, 对 uPA、MMP-3 基因和 uPA 蛋白的表达未产生任何影响, 进一步表明沉默 uPA 在 OA 病变早期基因治疗中的价值, 也间接证明 uPA 作为调控 MMP-3 表达的上游因子, 在 MMP-3 相关分子信号通路中发挥着极其重要的作用。笔者后续将通过动物实验进一步验证此项研究结果, 为进一步研究 uPA 基因在 OA 病变中的作用机制及其治疗作用奠定实验基础。

参考文献:

- [1] Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(12): 1465-1469.
- [2] Loeser RF. Aging processes and the development of osteoarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2013, 25(1): 108-113.
- [3] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): 227-231.
- [4] Gepstein A, Arbel G, Blumenfeld I, et al. Association of metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and proteoglycans with development, aging, and osteoarthritis processes in mouse temporomandibular joint [J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 120(1): 23-32.
- [5] Inuzuka K, Ogata Y, Nagase H, et al. Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and 9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2000, 93(2): 211-218.
- [6] Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a con-

verging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(19): 13066-13076.

- [7] Dreier R, Grassel S, Fuchs S, et al. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(2): 303-312.
- [8] Murphy G, Atkinson S, Ward R, et al. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, 667: 1-12.
- [9] Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, et al. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(6): 491-500.
- [10] Sato T, Tamai H, Kobayashi M, et al. Immunohistochemical properties in the patients with Buerger's disease—possible role of plasminogen activator inhibitor-1 for preservation of vessel wall architecture [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(5): 266-271.
- [11] Jorgensen C, Apparailly F. Prospects for gene therapy in inflammatory arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2010, 24(4): 541-552.
- [12] 季丙元, 关晶. siRNA 抑制人乳腺癌 KLK6 基因表达的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(1): 33-35.
- [13] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational [J]. *Biochem J*, 2012, 443(3): 603-608.
- [14] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827-839.
- [15] Korshunov VA, Solomatina MA, Plekhanova OS, et al. Plasminogen activator expression correlates with genetic differences in vascular remodeling [J]. *J Vasc Res*, 2004, 41(6): 481-490.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-11)

(上接第 1891 页)

参考文献:

- [1] Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2012, 211: 51-76.
- [2] Zhang HX, Tao L, Jiao XY, et al. Nitrate thioresoxin inactivation as a cause of enhanced myocardial ischemia reperfusion injury in the aging heart [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 39-47.
- [3] 许耀刚, 庞晓峰. MPTP 损伤的小鼠 PD 模型的制作与评价 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(10): 74-75.
- [4] 李丽波, 王玉祥. 帕金森病 MPTP 模型小鼠两种行为学检测方法的比较研究 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2009, 30(15): 1641-1643.
- [5] Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxi-

dative stress [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(10): 1161-1208.

- [6] Rivera-Mancia S, Pérez-Neri I, Ríos C. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 186(2): 184-199.
- [7] Jimenez-Del-Río M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 156: 163-193.
- [8] Zhang HX, Tao L, Jiao XY, et al. Nitrate thioresoxin inactivation as a cause of enhanced myocardial ischemia reperfusion injury in the aging heart [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 39-47.

(收稿日期: 2013-12-03 修回日期: 2014-02-07)