

综述

诱导型一氧化氮合酶和缺氧缺血性脑损伤

刘海婷^{1,2} 综述 母得志^{1,2} 审校

(1. 四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041;
2. 妇女儿童与出生缺陷教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 缺氧缺血可导致严重的神经系统疾病, 如脑卒中、新生儿缺氧缺血性脑病。诱导型一氧化氮合酶在缺氧、缺血过程中被诱导表达, 产生过量一氧化氮, 导致神经系统的炎症反应及神经元死亡, 加重神经损伤。抑制诱导型一氧化氮合酶表达在体内体外实验及临床应用中显示了一定的神经保护作用。该文综述了诱导型一氧化氮合酶在中枢神经系统中的表达及与缺氧缺血性脑损伤的相关性, 展望了诱导型一氧化氮合酶抑制剂作为缺氧缺血性脑损伤治疗策略的前景。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(9): 962-967]

[关键词] 诱导型一氧化氮合酶; 一氧化氮; 缺氧缺血性脑损伤

Inducible nitric oxide synthase and brain hypoxic-ischemic brain damage

LIU Hai-Ting, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: liuhaiting9@163.com)

Abstract: Brain hypoxia-ischemia has been considered as critical factors in many human central nervous system diseases, including stroke and neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. In brain hypoxia-ischemia processes, inducible NO synthase (iNOS) is induced to produce excessive nitric oxide (NO) which leads to cascade reactions of inflammation and neuronal death, deteriorating primary brain injury. Inhibiting iNOS expression has opened new perspectives in the treatment of brain hypoxia-ischemia because iNOS inhibitor has been shown as a potent therapeutic agent. This reviews focus on recent research achievements regarding the relationship between iNOS and ischemic-hypoxic brain damage and the perspective of using iNOS inhibitors as therapeutic strategies for brain ischemic-hypoxic brain damage.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(9): 962-967]

Key words: Inducible nitric oxide synthase; Nitric oxide; Hypoxic-hypoxic brain damage

越来越多的研究证实, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 在中枢神经系统的生理病理中起着重要的作用。过量 NO 与缺氧缺血性脑损伤后的炎症反应、兴奋性毒性以及神经元的死亡有关。诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 作为一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 家族中的一个亚型, 在炎症、缺血等病理情况下可以被细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或一些细胞因子激活, 诱导过量 NO 产生^[1]。本文对 iNOS 的表达、过量 NO 及次级产物活性氮 (reactive

nitrogen species, RNS) 的产生、以及 iNOS 抑制策略与缺氧缺血性脑损伤的关系综述如下, 希望为缺氧缺血性脑损伤的治疗提供新的思路和方法。

1 NOS 概况

NO 在哺乳动物体内主要是通过 3 种 NOS 催化生成, 分别是神经元型一氧化氮合酶 (Neuronal NOS, nNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (Epithelial NOS, eNOS), 以及诱导型一氧化氮合酶 (Inducible

[收稿日期] 2014-02-14; [接受日期] 2014-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (81330016, 31171020, 81270724, 81172174); 教育部科研基金 (13037, 20110181130002, IRT0935); 国家科技部基金 (2012BAI04B04); 国家临床重点专科 (儿科新生儿专业) 建议项目 (1311200003303); 四川省科技厅科技支撑项目 (2012SZ0150) 资助。

[作者简介] 刘海婷, 女, 博士研究生, 主治医师。

NOS, iNOS)^[2]。3种亚型NOS都是二聚体,以L-精氨酸作为底物,与氧分子以及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)一起共同作用,以黄素腺嘌呤二核苷酸、黄素腺嘌呤单核苷酸、四氢生物嘌呤作为辅酶产生NO^[2]。

在中枢神经系统中3种亚型NOS都有表达,在大脑中以iNOS和nNOS的表达为主,其中iNOS主要表达在巨噬细胞、小胶质细胞、神经元和星型胶质细胞中,nNOS则主要表达在神经元中,而eNOS在中枢神经系统的表达水平相对较低^[3]。

2 iNOS的调节

iNOS通常在病理情况下被诱导才会表达,并且一旦表达就会产生大量NO,不受细胞内钙离子浓度的调节^[2],因此对iNOS的调节的研究主要存在于转录水平上。

诱导iNOS表达的细胞外刺激物在小鼠和大鼠中主要是LPS以及一些细胞因子,如IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等,而在人则更为复杂,常常为IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 的复合物^[4]。

研究发现iNOS基因的启动子区域存在与转录基因的结合位点,这些转录因子包括核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、信号传导及转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)1 α 、干扰素转录调节因子(interferon regulatory transcription factor, IRF)-1等都可以与iNOS基因的启动子作用促进iNOS基因的转录^[4]。此外,缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF-1)的一个调节亚单位HIF-1 α 也能与iNOS基因的启动子结合,促进iNOS基因的转录^[5]。

调节iNOS表达的信号通路比较复杂,不同的诱导物在不同细胞中诱导iNOS表达的信号通路都可能不同,活化NF- κ B通路、Janus激酶(Janus-activated kinase, JAK)/STAT通路以及丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路都可以增加iNOS的表达^[4]。

LPS主要通过经典的NF- κ B通路诱导iNOS表达。LPS通过与Toll样受体结合,引起NF- κ B酶抑制剂(I κ B kinase, IKK)磷酸化,而活化的IKK可以使NF- κ B的抑制剂磷酸化后失活,使NF- κ B

释放,发生核转位,与核内iNOS基因的启动子结合位点相互作用,从而激活iNOS的转录^[6]。

IFN- γ 主要是通过活化JAK/STAT通路诱导iNOS的表达。IFN- γ -JAKS-STAT-1 α 这条通路已经在小鼠、大鼠及人的细胞培养中被确认。STAT-1 α 则可以与iNOS的启动子直接结合诱导iNOS的表达或者是间接诱导IRF-1的活性来诱导iNOS的表达^[4]。最近的一项研究,一种名叫反应停的药物可以通过减少iNOS蛋白及mRNA来抑制小鼠血管内皮细胞中IFN- γ 诱导的NO的产生,其机制可能是抑制了IRF1、STAT1的磷酸化从而减少了iNOS的表达^[7]。

近年在对神经系统变性疾病的研究中发现MAPK通路参与了iNOS的调节。MAPK家族包括细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases1/2, ERK1/2),P38和C-Jun氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK),它们都参与了iNOS表达的调节^[8]。研究发现异丙酚在胶质细胞中可以增加JNK和P38的活性从而诱导iNOS的表达以及NO和活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)的增加^[9]。

最近研究显示微小RNA(MicroRNA, miRNA)也可以调节iNOS的表达。miRNA-155以TAK1结合蛋白2为结合位点来抑制iNOS的基因表达^[10]。在小鼠肾细胞癌细胞株中,发现miRNA-146a可以抑制iNOS的表达和NO的产生,抑制这种miRNA时可恢复iNOS的表达和NO的产生^[11],进一步证实了miRNA对iNOS调节的抑制作用。

3 iNOS在缺氧缺血脑损伤发生中的作用

3.1 iNOS在缺氧缺血脑损伤中的表达

许多研究都提示缺氧缺血脑损伤时iNOS的表达出现在相对后期的阶段,在脑部浸润的中性粒细胞中iNOS的表达在缺血后12h开始出现,高峰出现在缺血后48h,缺血后7d又回到基准线^[1]。近几年的研究发现缺血后24h iNOS表达明显增加^[12],甚至缺血再灌注后7d仍有iNOS的表达和大量NO的产生^[13]。

缺氧缺血脑损伤时,3型NOS均表达上调,其中,iNOS和nNOS催化神经元产生过量NO,诱导神经元凋亡;而eNOS催化脑血管内皮细胞

生成 NO, 促进脑血管扩张, 维持脑血流量, 抑制血小板和白细胞聚集和粘附, 从而发挥神经保护作用^[14]。nNOS 在缺氧缺血相对早期出现, 呈现一过性上调^[15], 而 iNOS 的表达可能在脑缺氧缺血相对后期的阶段参与迟发型的细胞损伤。研究提示 JNK1/2 的活化参与了脑缺血缺氧诱导的神经元死亡, JNK1/2 有 2 个表达高峰, 分别在脑缺血后 30 min 和脑缺血后 3 d, 前者可以被 nNOS 抑制剂 7NI 所抑制, 而后者则被 iNOS 的抑制剂 AMT 所抑制, 这也提示 nNOS 来源的 NO 可能参与了 JNK1/2 早期的活化导致神经元的损伤, 而 iNOS 来源的 NO 则参与了后期 JNK1/2 的活化与后期神经元的损伤有关^[16]。在小鼠的脑损伤模型中, 也发现迟发型的脑损伤与活化小胶质细胞中 iNOS 来源的 NO 有关^[17]。

3.2 NO 在缺氧缺血脑损伤中的作用

许多研究都显示在一些病理情况下, 例如脑缺血时, 活化的的小胶质细胞和胶质细胞中表达的 iNOS 会产生大量 NO^[8,12,18], iNOS 和 nNOS 催化神经元产生过量 NO^[19], 而过量 NO 是有神经毒性的, 这可能是 iNOS 在缺氧缺血脑损伤中发挥损伤作用的最重要的机制。过量 NO 常通过以下机制在缺氧缺血脑损伤中起毒性作用。

(1) 产生 RNS。最主要的就是过氧亚硝酸盐 (peroxynitrite, ONOO⁻)。ONOO⁻ 主要由 NO 和超氧阴离子相互作用形成, 它可以与多种细胞内组分相互作用, 这些细胞内组分包括一些线粒体蛋白酶, 如顺乌头酸酶, NADH 脱氢酶, 和一些小分子物质如 DNA 和脂质。除此之外, ONOO⁻ 还能导致细胞内钙稳态的改变和促进线粒体膜通透性的改变从而导致细胞的死亡^[20]。有研究在脑卒中的模型中来源于 nNOS 和 iNOS 的 NO 可以形成 ONOO⁻, 它可以直接损伤线粒体酶和 DNA^[21]。最近的研究发现灵菌红素可以通过清除 ONOO⁻ 诱导产生的蛋白的亚硝基化减轻大脑中动脉缺血再灌注模型 (middle cerebral artery occlusion /reperfusion, MCAO/R) 诱导的脑损伤, 提示 ONOO⁻ 在缺氧缺血脑损伤中的重要作用^[22]。

(2) 蛋白的 S-亚硝基化。所谓 S-亚硝基化是指 NO 共价结合到半胱氨酸硫醇基上^[23]。有研究发现在神经元和脑组织中 NO 可以使 Src 同源区 2 的蛋白酪氨酸磷酸酶 (Src homology region

2-containing protein tyrosine phosphatase-2, SHP-2) 发生 S-亚硝基化, 形成 SNO-SHP-2, 在体内局部脑缺血后 SNO-SHP-2 的水平明显增加, SHP-2 的 S-亚硝基化可以抑制其本身的磷酸化, 阻断下游神经保护通路 ERK1/2 通路的活化, 从而可以增加 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) 调节的兴奋性毒性, 导致脑卒中后的兴奋性毒性的损伤^[23]。此外, NO 还可以使甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 发生 S-亚硝基化而失活, 使它和核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) Siah1 结合, GAPDH-Siah1 蛋白复合体进入核内, 调节细胞死亡^[24]。

(3) 其他机制。例如诱导细胞凋亡。在新生小猪大脑的缺氧模型中, NO 可以诱导线粒体中促凋亡蛋白 Bax 表达的上调, 导致促凋亡和抗凋亡蛋白的比例增加, 膜通透性的改变, 钙离子内流, 最后线粒体 DNA 断裂^[25]。过量 NO 还可以调节自噬通路, 加重神经毒性。自噬是一个涉及蛋白质降解和细胞器退化的过程^[26], 在神经元中自噬在低氧环境下对活性氧物质和活性氮物质形成的蛋白质损伤有保护作用。研究发现 NO 可以通过一系列的机制影响自噬体的形成, 在体外大鼠的原代皮质神经元培养予以缺氧再复氧的情况下, NO 可以抑制自噬而促进神经损伤^[18]。

3.3 iNOS 在缺氧缺血脑损伤中的调节机制及抑制策略

研究发现 iNOS 是引起缺血性脑损伤进展的一个重要因素, 而且其主要作用在脑缺血的后期 (12~24 h), 为治疗脑损伤提供了一个可能的时间窗^[27], 探索缺氧缺血后 iNOS 的调控机制及其抑制策略成为目前的研究热点。

有研究拟通过抑制诱导刺激物降低 iNOS 的表达。研究用 miRNA-181c 可以抑制缺氧缺血诱导的脑损伤模型中 TNF- α 的升高, 从而抑制 iNOS 的升高和 NO 产生的增加^[13]。还有研究发现 IL-6 的生物活性是在中枢神经系统缺血损伤中诱导 iNOS 表达的一个病理因素, 中和 IL-6 的生物活性可以减少 iNOS 表达的上调, 改善脑缺血损伤的远期康复^[28]。

还有些研究则从抑制转录因子和 iNOS 的结合来抑制 iNOS 的表达。例如在内毒素血症小鼠体内

运用 Hsp70 可以阻止 iNOS 的诱导和 NO 的产生, 虽然没有研究在缺氧缺血脑病中作用, 但是缺氧缺血脑损伤会产生炎症反应, 可能也会存在相应的机制, 需要进一步研究^[6]。IL-13 通过降低 iNOS 上特异的 IRF-1/ISRE 的结合来下调细胞因子诱导的 iNOS 的转录^[29]。抑制蛋白激酶 C 的一个亚型 Δ 可以抑制 IRF1 及 STAT1 的活化, 减少 iNOS 的表达^[30]。

更多研究主要在抑制 iNOS 的信号通路上。在小胶质细胞株 BV-2 细胞的体外培养中, 氧糖剥夺模型 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 和体内实验小鼠的 MCAO/R 模型在小胶质细胞和小鼠大脑都产生大量的 ROS, 并且有蛋白的 S-亚硝基化的明显增加, 其原因主要是 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX2/gp91) 的表达、iNOS 的表达增加, OGD 诱导的 ROS 和 NO 产生是通过 gp91 活化 NF- κ B 途径来上调了 iNOS 的表达, 而灵杆菌素则是通过抑制 NF- κ B 的活化来降低 iNOS 的表达^[22]。

尽管胰岛素及其受体都存在于中枢神经系统, 但是在脑中胰岛素是否作用于 iNOS 通路一直没有被肯定。最近一项研究发现, 用 LPS 刺激星型胶质细胞可导致 iNOS 表达上调; 但若胰岛素先于 LPS 作用于星型胶质细胞, 则会抑制 iNOS 基因和蛋白的表达, 并且这种抑制有剂量相关性, 其机制可能是胰岛素可抑制 LPS 诱导的 I κ B 磷酸化和降解, 通过抑制 NF- κ B 通路作用于 iNOS 的表达^[31]。

在脑缺血时, 各种转录因子如 NF- κ B 的激活在调节氧化应激诱导的细胞损伤和缺血后炎症反应中起着重要的作用, 可以上调一些引起细胞死亡的炎症基因和蛋白^[32]。HIF-1 的 2 个靶基因 iNOS 和环氧酶都可以通过炎症反应诱导脑损伤^[33]。iNOS 和 (或) gp91 在小胶质细胞中表达都是依赖 NF- κ B 和 HIF-1 α 信号途径^[34]。在缺氧缺血脑损伤的模型中, CD36 是一种 B 型的清道夫受体, 在 NF- κ B 的活化和缺血后的炎症中起着重要作用。研究发现在不表达 CD36 的小鼠 MCAO 模型中 NF- κ B 活化和 iNOS 表达都减弱, 而且脑缺血所诱导的中性粒细胞浸润和胶质细胞活化都被抑制了^[35]。

雌激素在中枢神经系统有保护作用。敲除 iNOS 基因的雌性小鼠在永久性 MCAO 后梗死区域明显减小, 但是添加雌二醇没有进一步降低这种损伤, 而在野生型小鼠模型中雌二醇有神经保护作

用, 这些结果显示 iNOS 增加炎症反应的作用加重了皮质和纹状体的卒中所致损伤, 在切除卵巢用雌二醇代替的雌性小鼠 iNOS 的敲除也有神经保护作用^[36], 这些结果提示雌激素的神经保护作用与转录或转录后的调节机制减弱 iNOS 的表达有关^[37]。

4 iNOS 的神经保护作用

也有研究认为 iNOS 的表达在神经系统也有保护作用, 其机制可能与神经再生以及参与缺氧缺血耐受有关。

一些研究提示大脑一些特定部位 iNOS 表达的增加可以诱导神经再生, 有报道白血病抑制因子可以诱导 iNOS 的表达和增加 NO 的水平, 刺激嗅觉前体神经细胞的增殖^[38]。还有研究发现 iNOS 和其来源的 NO 在放射状胶质细胞和星型胶质细胞的成熟中起着重要的作用^[39]。而在缺血性损伤中, 有研究认为 iNOS 以及 iNOS 产生的 NO 有利于缺血诱导的神经损伤, 该研究发现在暂时性缺血的模型中 iNOS 的表达增加了, 用 BrdU 标记的新生神经元细胞也增加了, 但是在敲除了 iNOS 基因的小鼠模型中则没有检测到新生的神经元^[40]。进一步的研究也证实了缺血可以诱导海马区神经元的再生, 其机制是增加 iNOS 的表达和 NO 的产生, 使 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element-binding protein, CREB) 的磷酸化增加, 而 CREB 的磷酸化是 NO 调节神经元生存的重要环节^[41]。在暂时性全脑缺血后人参皂苷 Rg1 可以增加神经元的增生, 其机制可能就是增加脑中 iNOS 的活性和 NMDAR^[42]。

研究认为 iNOS 的表达可以诱导缺血耐受, 如异氟烷在神经元的 OGD 模型中起保护作用, 其机制是通过激活 HIF-1 α 增加 iNOS mRNA 的水平, 而 HIF-1 α 活化部分是受 Erk1/2 途径的调节的^[43]。最近报道异氟烷在大鼠脑缺血后处理可以使 HIF-1 α 和 iNOS 的基因表达都扩增, 而敲除 HIF-1 α 则减少 iNOS 的表达, 使脑组织对缺血不耐受^[44]。除此之外, 兴奋性毒性是一种被普遍认为参与缺血脑损伤发生的机制, 研究发现 iNOS 来源的 NO 形成的 ONOO⁻ 参与了诱导对兴奋性毒性的耐受, 与之前认为 ONOO⁻ 在缺血脑损伤中的主要是毒性作用的研究也有不同^[45]。

5 结语

iNOS 作为 NOS 家族中的诱导亚型,广泛存在于中枢神经系统,在缺血等病理情况下可产生过量 NO。过量 NO 有神经毒性,可加重缺血后的神经炎症反应,诱导神经元的坏死、凋亡,参与许多缺氧缺血脑损伤相关疾病的发生。抑制 iNOS 的表达及过量 NO 产生在一些研究中取得了对缺氧缺血脑损伤的保护作用,另有研究提示 iNOS 在大脑一些特定部位的表达也存在保护作用,但具体机制还需要进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Iadecola C, Zhang F, Xu S, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15(3): 378-384.
- [2] Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(7): 829-837.
- [3] Qi SH, Hao LY, Yue J, et al. Exogenous nitric oxide negatively regulates the S-nitrosylation p38 mitogen-activated protein kinase activation during cerebral ischaemia and reperfusion[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013, 39(3): 284-297.
- [4] Kleinert H, Pautz A, Linker K, et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 500(1-3): 255-266.
- [5] Robinson MA, Baumgardner JE, Otto CM. Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(11): 1952-1965.
- [6] Zhang L, Liu Q, Yuan X, et al. Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1310-1317.
- [7] Badamtseren B, Odkhuu E, Koide N, et al. Thalidomide inhibits interferon-gamma-mediated nitric oxide production in mouse vascular endothelial cells[J]. *Cell Immunol*, 2011, 270(1): 19-24.
- [8] Saha RN, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes[J]. *Neurochem Int*, 2006, 49(2): 154-163.
- [9] Ko HM, Kim SY, Joo SH, et al. Synergistic activation of lipopolysaccharide-stimulated glial cells by propofol[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 438(2): 420-426.
- [10] Xu C, Ren G, Cao G, et al. miR-155 regulates immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by targeting TAK1-binding protein 2[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(16): 11074-11079.
- [11] Perske C, Lahat N, Sheffy Levin S, et al. Loss of inducible nitric oxide synthase expression in the mouse renal cell carcinoma cell line RENCA is mediated by microRNA miR-146a[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(4): 2046-2054.
- [12] Zhou M, Wang CM, Yang WL, et al. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2013, 1506: 105-114.
- [13] Zhang L, Dong LY, Li YJ, et al. The microRNA miR-181c controls microglia-mediated neuronal apoptosis by suppressing tumor necrosis factor[J]. *J Neuroinflammation*, 2012(9): 211.
- [14] Bauer V, Sotnikova R. Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2010, 29(4): 319-340.
- [15] Yu L, Derrick M, Ji H, et al. Neuronal nitric oxide synthase inhibition prevents cerebral palsy following hypoxia-ischemia in fetal rabbits: comparison between JI-8 and 7-nitroindazole[J]. *Dev Neurosci*, 2011, 33(3-4): 312-319.
- [16] Zeng XW, Li MW, Pan J, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1/2 regulated by nitric oxide is associated with neuronal survival in hippocampal neurons in a rat model of ischemia[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(20): 3367-3372.
- [17] Ono K, Suzuki H, Sawada M. Delayed neural damage is induced by iNOS-expressing microglia in a brain injury model[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(2): 146-150.
- [18] Benavides GA, Liang Q, Dodson M, et al. Inhibition of autophagy and glycolysis by nitric oxide during hypoxia-reoxygenation impairs cellular bioenergetics and promotes cell death in primary neurons[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65C: 1215-1228.
- [19] Khovryakov AV, Podrezova EP, Kruglyakov PP, et al. Involvement of the NO synthase system in stress-mediated brain reactions[J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2010, 40(3): 333-337.
- [20] Martinez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 17-29.
- [21] ArunaDevi R, Ramteke VD, Kumar S, et al. Neuroprotective effect of s-methylisothiourea in transient focal cerebral ischemia in rat[J]. *Nitric Oxide*, 2010, 22(1): 1-10.
- [22] Chang CC, Wang YH, Chern CM, et al. Prodigiosin inhibits gp91(phox) and iNOS expression to protect mice against the oxidative/nitrosative brain injury induced by hypoxia-ischemia[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 257(1): 137-147.
- [23] Shi ZQ, Sunico CR, McKercher SR, et al. S-nitrosylated SHP-2 contributes to NMDA receptor-mediated excitotoxicity in acute ischemic stroke[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(8): 3137-3142.
- [24] Sen N, Hara MR, Kornberg MD, et al. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(7): 866-873.
- [25] Mishra OP, Randis T, Ashraf QM, et al. Hypoxia-induced Bax and Bcl-2 protein expression, caspase-9 activation, DNA fragmentation, and lipid peroxidation in mitochondria of the cerebral cortex of newborn piglets: the role of nitric oxide[J]. *Neuroscience*, 2006, 141(3): 1339-1349.
- [26] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [27] Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(23): 9157-9164.
- [28] Tuna M, Yilmaz DM, Erman T, et al. Effect of neutralization of rat interleukin 6 bioactivity on inducible nitric oxide synthase

- up-regulation and cerebral ischemic damage[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(7): 714-720.
- [29] Shao L, Guo Z, Geller DA. Transcriptional suppression of cytokine-induced iNOS gene expression by IL-13 through IRF-1/ISRE signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 582-586.
- [30] Leppanen T, Korhonen R, Laavola M, et al. Down-regulation of protein kinase Cdelta inhibits inducible nitric oxide synthase expression through IRF1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52741.
- [31] Li H, Liu B, Huang J, et al. Insulin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in rat primary astrocytes[J]. *Brain Res*, 2013, 1506: 1-11.
- [32] Harari OA, Liao JK. NF-kappaB and innate immunity in ischemic stroke[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207: 32-40.
- [33] Mi Z, Rapisarda A, Taylor L, et al. Synergistic induction of HIF-1alpha transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(2): 232-241.
- [34] Chern CM, Liou KT, Wang YH, et al. Andrographolide inhibits PI3K/AKT-dependent NOX2 and iNOS expression protecting mice against hypoxia/ischemia-induced oxidative brain injury[J]. *Planta Med* 2011, 77(15): 1669-1679.
- [35] Kunz A, Abe T, Hochrainer K, et al. Nuclear factor-kappaB activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(7): 1649-1658.
- [36] Brown CM, Dela Cruz CD, Yang E, et al. Inducible nitric oxide synthase and estradiol exhibit complementary neuroprotective roles after ischemic brain injury[J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 782-787.
- [37] Park EM, Cho S, Frys KA, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(3): 392-401.
- [38] Lopez-Arenas E, Mackay-Sim A, Bacigalupo J, et al. Leukaemia inhibitory factor stimulates proliferation of olfactory neuronal progenitors via inducible nitric oxide synthase[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45018.
- [39] Bechade C, Pascual O, Triller A, Bessis A. Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 46(4): 762-769.
- [40] Corsani L, Bizzoco E, Pedata F, et al. Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion[J]. *Exp Neurol*, 2008, 211(2): 433-440.
- [41] Luo CX, Zhu XJ, Zhou QG, et al. Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression[J]. *J Neurochem*, 2007, 103(5): 1872-1882.
- [42] Shen L, Zhang J. NMDA receptor and iNOS are involved in the effects of ginsenoside Rg1 on hippocampal neurogenesis in ischemic gerbils[J]. *Neurol Res*, 2007, 29(3): 270-273.
- [43] Li QF, Zhu YS, Jiang H. Isoflurane preconditioning activates HIF-1alpha, iNOS and Erk1/2 and protects against oxygen-glucose deprivation neuronal injury[J]. *Brain Res* 2008, 1245: 26-35.
- [44] Fang Li Q, Xu H, Sun Y, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase by isoflurane post-conditioning via hypoxia inducible factor-1alpha during tolerance against ischemic neuronal injury[J]. *Brain Res*, 2012, 1451: 1-9.
- [45] Kawano T, Kunz A, Abe T, et al. iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite[J]. *J Cereb Blood Flow, Metab*, 2007, 27(8): 1453-1462.

(本文编辑: 王庆红)