

本文引用:李青,白宏英,曾志磊,等. 乌司他丁对脑缺血再灌注大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-2 活性的影响 [J]. 新乡医学院学报,2020,37(8):720-723. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.08.004.

【基础研究】

# 乌司他丁对脑缺血再灌注大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-2 活性的影响

李 青<sup>1</sup>, 白宏英<sup>2</sup>, 曾志磊<sup>2</sup>, 赵盼盼<sup>1</sup>, 徐志秀<sup>1</sup>, 赵建华<sup>1</sup>, 袁 彬<sup>1</sup>, 吉四辈<sup>1</sup>

(1. 新乡医学院第一附属医院神经内科 河南省老年性痴呆神经修复国际联合实验室, 河南 卫辉 453100; 2. 郑州大学第二附属医院神经内科, 河南 郑州 450014)

**摘要:** **目的** 探讨乌司他丁对脑缺血再灌注大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)活性的影响。**方法** 采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组和乌司他丁组,每组 24 只。模型组和乌司他丁组大鼠根据改良 Zea Longa 线栓法制备大鼠局部脑组织缺血再灌注损伤模型,假手术组大鼠步骤同模型组,但不插入鱼线。乌司他丁组大鼠于再灌注后 5 min 内腹腔注射乌司他丁( $10\,000\text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每日 1 次,直至处死为止;模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水,假手术组大鼠不做任何处理。各组分别于再灌注后 6、24、48、72 h 处死大鼠,通过测定损伤侧脑组织中伊文思蓝(EB)渗出量来观察血脑屏障(BBB)通透性的改变,采用明胶酶谱法检测损伤侧脑组织中 MMP-2 活性。**结果** 模型组大鼠各时间点脑组织内 EB 渗出量均显著高于假手术组( $P < 0.05$ )。乌司他丁组大鼠再灌注 24、48、72 h 时脑组织内 EB 渗出量均显著低于模型组( $P < 0.05$ );乌司他丁组和模型组大鼠再灌注 6 h 时脑组织内 EB 渗出量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。乌司他丁组大鼠再灌注 6、24、48 h 时脑组织内 EB 渗出量均显著高于假手术组( $P < 0.05$ );乌司他丁组和假手术组大鼠再灌注 72 h 时脑组织内 EB 渗出量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。模型组和乌司他丁组大鼠各时间点脑组织中 MMP-2 活性均显著高于假手术组( $P < 0.05$ )。乌司他丁组大鼠各时间点脑组织中 MMP-2 活性均显著低于模型组( $P < 0.05$ )。**结论** 大鼠脑组织缺血再灌注后,乌司他丁可能通过抑制 MMP-2 活性来减轻 BBB 通透性,从而保护脑组织。

**关键词:** 脑缺血再灌注损伤;乌司他丁;基质金属蛋白酶-2;血脑屏障

**中图分类号:** R743.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)08-0720-04

## Effect of ulinastatin on the activity of matrix metalloproteinase-2 in brain tissues of rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury

LI Qing<sup>1</sup>, BAI Hongying<sup>2</sup>, ZENG Zhilei<sup>2</sup>, ZHAO Panpan<sup>1</sup>, XU Zhixiu<sup>1</sup>, ZHAO Jianhua<sup>1</sup>, YUAN Bin<sup>1</sup>, JI Sibe<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Joint International Research Laboratory of Neurorestoratology for Senile Dementia, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of ulinastatin on the activity of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) in brain tissue of rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** The rats were randomly divided into the sham operation group, model group and the ulinastatin group, with 24 rats in each group. The focal cerebral ischemia reperfusion injury model of rats in the model group and the ulinastatin group were established by the modified Zea Longa suture method, and the rats in the sham operation group took the same steps as the model group, but no fish thread was inserted. The rats in the ulinastatin group were intraperitoneally injected with ulinastatin ( $10\,000\text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) within 5 min after reperfusion, once a day until they were executed; the rats in the model group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline, and the rats in the sham operation group were not given any intervention. Rats in each group were killed at 6, 24, 48 and 72 h after reperfusion. The blood brain barrier(BBB) permeability was evaluated by detecting the exudation of evans blue (EB) in the brain tissue of the injured side; the MMP-2 activity in the brain tissue of the injured side was measured by gelatin zymography.

**Results** The exudation of EB in brain tissue of rats in the model group was higher than that in the sham operation group at each time point ( $P < 0.05$ ). The exudation of EB in brain tissue of rats in the ulinastatin group was lower than that in the

DOI:10.7683/xyxyxb.2020.08.004

收稿日期:2019-12-23

作者简介:李 青(1984-),女,河南长垣人,硕士,主治医师,研究方向:脑血管疾病、帕金森及运动障碍疾病。

通信作者:吉四辈(1964-),男,河南卫辉人,硕士,主任医师,研究方向:脑血管疾病研究;E-mail:jisibe@aliyun.com。

model group at 24,48,72 h after reperfusion ( $P<0.05$ );there was no significant difference in the exudation of EB in brain tissue of rats between the ulinastatin group and the model group at 6 h after reperfusion ( $P>0.05$ ). The exudation of EB in brain tissue of rats in the ulinastatin group was higher than that in the sham operation group at 6,24,48 h after reperfusion ( $P<0.05$ );there was no significant difference in the exudation of EB in brain tissue of rats between the ulinastatin group and the sham operation group at 72 h after reperfusion ( $P>0.05$ ). The activity of MMP-2 in brain tissue of rats in the model group and the ulinastatin group was higher than that in the sham operation group ( $P<0.05$ ). The activity of MMP-2 in brain tissue of rats in the ulinastatin group was lower than that in the model group at each time point ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Ulinastatin may reduce the permeability of BBB by inhibiting the activity of MMP-2,so as to protect ther brain tissue.

**Key words:** cerebral ischemia reperfusion;ulinastatin;matrix metalloproteinase-2;blood-brain barrier

脑血管疾病致残率、病死率高,尽早溶栓、重新恢复血流是重要的治疗措施,但该治疗方法会使患者出现更严重的再灌注损伤。血脑屏障(blood brain-barrier,BBB)是否完整在脑缺血再灌注损伤发生机制中起重要作用。有研究表明,乌司他丁(ulinastatin,UTI)具有脑保护作用<sup>[1]</sup>。作者之前研究显示,脑缺血再灌注损伤后基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)尤其是基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)表达增加,乌司他丁可抑制 MMP-9 活性,减轻 BBB 破坏,保护脑细胞<sup>[2]</sup>,但乌司他丁对 MMP-2 活性的作用仍不明确,国内外也未见相关报道。因此,本研究在之前研究基础上通过测定损伤侧脑组织中伊文思蓝(evans blue,EB)及 MMP-2 含量,进一步研究乌司他丁对脑组织的保护作用及作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠 72 只,体质量( $275\pm25$ ) g,由郑州大学实验动物中心提供,按标准饲料喂养。

**1.2 试剂与仪器** 明胶(猪皮来源)、EB 购自美国 Sigma 公司,乌司他丁(每支 10 万 U,国药准字 H19990134)购自广东天普生化医药股份有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度定量试剂盒购自上海觅拓生物技术公司,预染蛋白质 MarkerⅢ(蓝色,相对分子质量 18 000~94 000)购自天根生化科技(北京)有限公司,Tris-base (JY-SJ120,500 g)购自日本 Japan 公司,甲酰胺、聚丙烯酰胺、双聚丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、四甲基乙二胺、甘氨酸、甘油、Triton X-100、Brij-35、考马斯亮蓝 R250 均购自美国 Amresco 公司;垂直电泳仪、制胶架、电泳玻璃板、酶标仪(BIO-RAD Model 680)购自美国伯乐生命医学产品有限公司,pHS-3C 型精密酸度计购自上海仪器设备厂,气浴恒温振荡器购自常州拓兴实验仪器厂。

**1.3 实验分组及干预措施** 采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组和乌司他丁组,每组 24 只。模型组和乌司他丁组大鼠根据改进后 Zea Longa 线栓法制备大鼠局灶性大脑中动脉脑缺血再灌注损伤模型<sup>[2]</sup>,具体造模方法为:大鼠给予  $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  水合氯醛(按照  $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉后,将四肢、头部仰卧固定于手术台,碘伏消毒颈部后切皮,无齿镊钝性分离皮下肌膜、肌肉,充分暴露左颈总动脉(left common carotid artery,LCCA)、左颈内动脉(left internal carotid artery,LICA)及左颈外动脉(left external carotid artery,LECA),避免伤及迷走神经。结扎 LCCA 和 LECA 根部,于 LCCA 分叉处插入直径 0.26 mm 鱼线至大脑中动脉,于深度 18~20 mm 处扎紧、固定、局部缝合,阻断血供 2 h 后,拔出栓线至 LCCA 恢复血流达到再灌注,以大鼠出现右侧肢体瘫痪、行走时向右侧旋转、右上肢屈曲为造模成功。假手术组大鼠步骤同模型组,但不插入鱼线。3 组大鼠于缺血期及再灌注后 2 h 内均维持体温在( $37.0\pm0.5$ )℃。乌司他丁组大鼠于再灌注后 5 min 内腹腔注射乌司他丁(溶于生理盐水,  $10\,000\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每日 1 次,直至处死为止;模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水,假手术组大鼠不做任何处理<sup>[3]</sup>。假手术组大鼠分别于术后 6、24、48、72 h 分批处死,模型组和乌司他丁组分别于再灌注后 6、24、48、72 h 分批处死大鼠,3 组均每个时间点处死 6 只。各组大鼠于处死前 30 min 舌下静脉注射  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  EB( $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),大鼠全身立刻变蓝;脊椎脱臼法处死大鼠,立刻经右心室注入生理盐水,至心脏流出清亮液停止,剪开颅骨取脑组织,梗死侧脑组织呈蓝染,冰块上去掉额叶、枕叶约 2 mm,以蓝染最深处为中心将左半侧梗死脑组织冠状切为 2 份,枕侧份用做 MMP-2 活性测定,额侧份用做 EB 测定,标记后于 -80℃ 冰箱保存用于后续试验。

**1.4 EB 法测定各组大鼠 BBB 通透性** 取额侧脑组织称质量、剪碎后置于离心管,每 100 mg 脑组织

加入 1 mL 甲酰胺溶液, 60 ℃ 水浴 24 h, 5 000 r · min<sup>-1</sup>离心 20 min, 取上清液, 10 000 r · min<sup>-1</sup>离心 10 min, 吸取 200 μL 上清液, 以甲酰胺溶液作为空白对照管, 酶标仪检测 630 nm 波长处吸光度值, 以标准曲线计算 EB 渗出量, 以 EB 渗出量表示 BBB 通透性。

**1.5 脑组织蛋白提取及浓度测定** 取枕侧脑组织称质量, 迅速剪碎置于预冷玻璃匀浆器, 每 100 mg 脑组织加入 1 mL 匀浆缓冲液和 0.1 mg 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 低温匀浆, 4 ℃ 静置 20 min, 4 ℃、12 000 r · min<sup>-1</sup>离心 20 min, 取上清液小管分装(至少 40 μL), 其中 1 管于 -20 ℃ 下保存, 采用 BCA 法测蛋白浓度, 其余置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

**1.6 明胶酶谱法检测损伤测脑组织中 MMP-2 活性** 配制聚丙烯酰胺凝胶, 取 20 μL 组织上清液与 5 mL 5 × 上样缓冲液混匀, 按照 BCA 蛋白浓度测定结果, 每孔等蛋白量上样, 含 10 mg · L<sup>-1</sup>明胶底物、体积分数为 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(125 V) 90 min; 将凝胶转移至 25 mg · L<sup>-1</sup>Triton X-100 溶液中, 震荡洗涤 3 次(20、20、30 min), 期间双蒸馏水漂洗, 37 ℃ 孵育 72 h 后, 凝胶置于染色液中震荡 30 min, 脱色液脱色, 直至凝胶可以看到蓝色背景下的透明条带。凝胶经扫描后, 采用 Gel-Pro Analyzer 生物电泳图像分析系统进行光密度定量。以透明条带的相对光密度值来表示 MMP-2 活性。为方便比较, 每次平行加入脑组织胶质瘤细胞上清液或蓝色预染蛋白 marker 作为参考<sup>[2]</sup>。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS22.0 软件进行统计学处理。数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 3 组大鼠 EB 渗出量比较** 结果见表 1。模型组大鼠各时间点脑组织内 EB 渗出量均高于假手术组( $P < 0.05$ )。乌司他丁组大鼠再灌注 24、48、72 h 时脑组织内 EB 渗出量均低于模型组( $P < 0.05$ ); 乌司他丁组和模型组大鼠再灌注 6 h 时脑组织内 EB 渗出量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。乌司他丁组大鼠再灌注 6、24、48 h 时脑组织内 EB 渗出量均高于假手术组( $P < 0.05$ ); 乌司他丁组和假手术组大鼠再灌注 72 h 时脑组织内 EB 渗出量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 3 组大鼠脑组织中 EB 渗出量比较

Tab.1 Comparison of EB exudation in brain tissue of rats among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	EB 渗出量/(μg · g <sup>-1</sup> )			
		6 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	4.16 ± 0.16	4.19 ± 0.35	4.22 ± 0.69	4.18 ± 0.72
模型组	6	7.38 ± 1.52 <sup>a</sup>	13.56 ± 1.43 <sup>a</sup>	10.81 ± 1.46 <sup>a</sup>	8.29 ± 1.26 <sup>a</sup>
乌司他丁组	6	5.71 ± 1.19 <sup>a</sup>	8.32 ± 1.17 <sup>ab</sup>	6.95 ± 1.21 <sup>ab</sup>	4.77 ± 1.52 <sup>b</sup>

注: 与假手术组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 3 组大鼠脑组织中 MMP-2 活性比较** 结果见表 2。模型组和乌司他丁组大鼠各时间点脑组织中 MMP-2 活性均高于假手术组( $P < 0.05$ )。乌司他丁组大鼠各时间点脑组织中 MMP-2 活性均低于模型组( $P < 0.05$ )。

表 2 3 组大鼠脑组织中 MMP-2 活性比较

Tab.2 Comparison of MMP-2 activity in brain tissue of rats among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	MMP-2 活性(光密度值)			
		6 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	0.085 ± 0.026	0.082 ± 0.021	0.124 ± 0.019	0.091 ± 0.013
模型组	6	2.759 ± 0.162 <sup>a</sup>	5.278 ± 0.519 <sup>a</sup>	5.165 ± 0.263 <sup>a</sup>	5.127 ± 0.211 <sup>a</sup>
乌司他丁组	6	2.362 ± 0.135 <sup>ab</sup>	4.551 ± 0.089 <sup>ab</sup>	4.395 ± 0.313 <sup>ab</sup>	4.316 ± 0.193 <sup>ab</sup>

注: 与假手术组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤与 BBB 破坏密切相关<sup>[4]</sup>。BBB 是具有渗透特异性的屏障, 由内皮细胞和微血管内皮细胞(包括毛细血管和小静脉)、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、周细胞、星形胶质细胞终足之间的紧密连接组成, 可防止血液中有物质侵入脑内, 还可将脑内毒素泵回毛细血管内, 调节脑内能源物质代谢。当各种原因造成脑组织缺血, 继而再通灌注后, 一方面炎症因子、氧自由基等大量释放, 其对血脑屏障内皮细胞的直接毒性作用可造成细胞水肿; 另一方面细胞壁结构被破坏, 造成水分和大分子物质如血浆蛋白穿越 BBB 进入组织间隙, 造成血管源性脑水肿和中枢神经内环境紊乱, 进一步加重再灌注损伤, 两者相互作用, 形成恶性循环。本研究结果显示, 模型组大鼠再灌注 6 h 脑组织中 EB 渗出量少量增加, 24 h EB 渗出量达高峰, 48、72 h 后 EB 渗出量有所下降, 但各时间点均高于假手术组。表明大鼠脑缺血再灌注后 BBB 通透性增加, 且 BBB 通透性变化与缺血后再灌注时间密切相关, 与 GIDDAY 等<sup>[5]</sup>研究结果一致。因此, 保护 BBB 可减轻脑组织再灌注损伤。

目前认为, BBB 的破坏可能与自由基损伤、神经细胞内钙超载、兴奋性氨基酸细胞毒性、前列腺素

升高、内皮细胞黏附分子表达及蛋白酶激活等多种因素有关<sup>[6]</sup>。MMPs 是一组降解 ECM 的锌依赖的金属蛋白酶,其中一类是明胶酶,包括明胶酶-A/MMP-2 和明胶酶-B/MMP-9,正常情况下以低水平酶原形式存在,在某些病理情况下,酶原被活化,影响组织损伤与修复,应用外源性抑制剂可在一定程度上减轻缺血再灌注损伤<sup>[7]</sup>。YANG 等<sup>[8]</sup>研究发现,MMP-2 在脑缺血再灌注后 3 h 内可降解内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞之间的紧密连接蛋白(tight junction proteins,TJPs)如密封蛋白和咬合蛋白,破坏 BBB,应用 MMP 抑制剂可防止 MMP 降解 TJP,表明 MMP-2 与早期脑缺血再灌注后 BBB 破坏有关。WANG 等<sup>[9]</sup>研究发现,模型组大鼠再灌注 2 h 后 MMP-2 表达上调,BBB 通透性增加,且具有时间依赖性;提示 MMP-2 与再灌注早期 BBB 的开放导致出血及水肿有关。本研究结果发现,假手术组大鼠脑组织中 MMP-2 活性较低,脑缺血再灌注后模型组大鼠 6 h 脑内 MMP-2 活性升高,24 h 达高峰,48、72 h 后有所下降,进一步说明脑缺血再灌注后 BBB 的破坏与 MMP-2 活性有关,且与再灌注时间呈动态变化。

乌司他丁是一种胰蛋白酶抑制剂,具有抑制炎症因子释放、减轻自由基损伤、抑制蛋白质分解亢进等作用,最初主要用于治疗急性胰腺炎、改善休克时的微循环。目前研究发现,其在肝脏、心脏、肾脏、肠和肺再灌注损伤中具有细胞保护作用,但其对脑组织缺血再灌注损伤的保护机制尚未完全阐明<sup>[10]</sup>。以往关于乌司他丁对脑缺血再灌注损伤的研究主要集中在清除氧自由基对机体的损害<sup>[11]</sup>、减少炎症因子<sup>[12]</sup>、抑制凋亡<sup>[13]</sup>等方面,作者前期研究结果提示,乌司他丁可能通过抑制 MMP-9 活性减轻 BBB 通透性,从而发挥脑保护作用<sup>[3]</sup>。本研究结果发现,与模型组比较,乌司他丁组大鼠脑组织内 EB 渗出量明显下降,MMP-2 活性明显降低,提示乌司他丁可能通过抑制 MMP-2 活性减轻 BBB 通透性。

综上所述,乌司他丁可能通过抑制 MMP-9 及 MMP-2 活性,从而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤后 BBB 的破坏,进而发挥其脑组织保护作用。本研究为乌司他丁的神经保护作用提供了新的实验依据,该药有可能成为防治脑血管病的新药。但本研究仍然存在一些问题,比如观察时间短,不能详细地反映脑缺血再灌注后各项指标的动态变化;此外,定位的

缺血取材区与实际缺血区可能有一定差别。

**参考文献:**

[1] HU H X,XU D H,JU W N,*et al.* Neuroprotection of ulinastatin on transient cerebral ischemia via antioxidative mechanisms[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*,2018,32(2):283-288.

[2] 李青,白宏英,曾志磊,等. 乌司他丁对脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性和 MMP-9 活性的影响[J]. 中风与神经疾病杂志,2011,28(2):123-125.

[3] 谢惠芳,徐如祥,陈中灿. 线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的改进[J]. 中华神经医学杂志,2007,6(4):340-342.

[4] ARBA F, LEIGH R, INZITARI D, *et al.* Blood-brain barrier leakage increases with small vessel disease in acute ischemic stroke[J]. *Neurology*,2017,89(21):2143-2150.

[5] GIDDAY J M,GASCHE Y G,COPIN J C,*et al.* Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2005,289(2):H558-H568.

[6] SIFAT A E,VAIDYA B,ABBUSCATO T J. Blood-brain barrier protection as a therapeutic strategy for acute ischemic stroke[J]. *AAPS J*,2017,19(4):957-972.

[7] CHEN S,CUI J,JIANG T,*et al.* Gelatinase activity imaged by activatable cell-penetrating peptides in cell-based and *in vivo* models of stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,2017,37(1):188-200.

[8] YANG Y,THOMPSON J F,TAHERI S,*et al.* Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,2013,33(7):1104-1114.

[9] WANG X,LIU Y,SUN Y,*et al.* Blood brain barrier breakdown was found in non-infarcted area after 2-h MCAO[J]. *J Neurol Sci*,2016,15(363):63-68.

[10] LIU M,SHEN J,ZOU F,*et al.* Effect of ulinastatin on the permeability of the blood-brain barrier on rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury as assessed by MRI[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,85:412-417.

[11] HU H X,XU D H,JU W N,*et al.* Neuroprotection of ulinastatin on transient cerebral ischemia via antioxidative mechanisms[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*,2018,32(2):283-288.

[12] LI X,SU L,ZHANG X,*et al.* Ulinastatin downregulates TLR4 and NF- $\kappa$ B expression and protects mouse brains against ischemia/reperfusion injury[J]. *Neurol Res*,2017,39(4):367-373.

[13] JIANG X M,HU J H,WANG L L,*et al.* Ulinastatin alleviates neurological deficiencies evoked by transient cerebral ischemia via improving autophagy, Nrf-2-ARE and apoptosis signals in hippocampus[J]. *Physiol Res*,2018,67(4):637-646.

( 本文编辑:孟 月 )