

### 【实验研究】

张婷婷 赵岩松 王海宇 杨明 程丹丹 牟青杰 王晓莉

【摘要】 目的 探讨 N-乙酰-5-羟色胺(N-acetylserotonin,NAS)对视网膜缺血再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury,RIRI)大鼠视网膜活性Caspase-3、Bcl-2

Bax 表达的影响。方法 取健康成年 Sprague-Dawley 大鼠 66 只,采用随机数字表法随机分为正常对照组(6 只)、缺血再灌注组(30 只)与药物组(30 只),药物组于造模前 30 min 腹腔注射  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  NAS,缺血再灌注组腹腔注射同等剂量的生理盐水,缺血再灌注组与药物组按 RIRI 后时间,分为 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 五个亚组。采用 HE 染色法观察各组视网膜形态学变化,免疫组织化学染色检测各组大鼠视网膜活性 Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达。结果 HE 染色显示正常对照组大鼠视网膜结构清晰,各层细胞排列紧密;缺血再灌注组大鼠 RIRI 后 6 h、12 h 视网膜各层高度水肿,24 h 后水肿逐渐减轻,神经节细胞逐渐减少,分布较紊乱,随着时间延长,视网膜神经节细胞大片缺失;药物组 6 h、12 h 较缺血再灌注组细胞水肿明显减轻,24 h、48 h、72 h 组较缺血再灌注组细胞排列规整,神经节细胞数量减少减轻。缺血再灌注组视网膜活性 Caspase-3 阳性细胞数在灌注后 6 h 开始表达增加,阳性细胞数为  $(561.15 \pm 37.19) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-2}$ ,24 h 达到较高水平,阳性细胞数为  $(1522.61 \pm 84.36) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-2}$ ,随后逐渐下降,药物组视网膜各时间点活性 Caspase-3 阳性细胞数均显著少于缺血再灌注组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。正常对照组视网膜可见大量 Bcl-2 阳性细胞;缺血再灌注组 RIRI 后 6 h Bcl-2 阳性细胞开始下降,12 h 后继续减少,24 h 降至较低水平;药物组各时间点 Bcl-2 阳性细胞数均显著多于缺血再灌注组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。正常对照组大鼠视网膜几乎未见 Bax 阳性细胞;缺血再灌注组 RIRI 后 6 h 神经节细胞层及内核层可见 Bax 阳性细胞,24 h 达到较高水平,48 h 开始下降;药物组各时间点 Bax 阳性细胞均显著少于缺血再灌注组,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。结论 NAS 可促进 RIRI 大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 蛋白的表达,降低活性 Caspase-3 蛋白表达,减轻细胞凋亡,具有神经保护作用。

视网膜缺血再灌注损伤(retina ischemia-reperfusion injury, RIRI)是目前常见的视网膜疾病,如青光眼、缺血性视神经病变、视网膜和脉络膜血管阻塞、糖尿病视网膜病变等,严重威胁着人们的视力,也是目前致盲的主要原因。因此,RIRI 的预防和治疗也成为眼科学研究的热点,寻找其行之有效的治疗方案并探讨其相关机制将为 RIRI 的治疗提供新思路。N-乙酰-5-羟色胺(N-acetylserotonin, NAS)是褪黑素的前体物质<sup>[1]</sup>,可转化为褪黑素发挥其神经保护作用,同时还具有抑制凋亡的作用。研究发现 NAS 可减轻缺血脑损伤大鼠神经细胞的凋亡,具有神经保护作用<sup>[2]</sup>,但 NAS 对大鼠 RIRI 是否具有保护作用及相关机制尚未见报道,弄清其对 RIRI 的影响并探讨其机制对预防和治疗 RIRI 具有重要意义。本研究采用升高眼压法建立 RIRI 模型,探讨 NAS 对视网膜形态结构及活性 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响,以期对 RIRI 的治疗提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 取健康成年 Sprague-Dawley 大鼠 66 只,体质量 200 ~ 250 g,采用随机数字表法随机分为正常对照组(6 只)、缺血再灌注组(30 只)与药物组(30 只),缺血再灌注组与药物组按 RIRI 后时间,分为 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 五个亚组。药物组于造模前 30 min 腹腔注射  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  NAS,缺血再灌注组腹腔注射同等剂量的生理盐水。

**1.1.2 主要试剂** NAS(美国 Sigma-Aldrich 公司),兔抗活性 Caspase-3(美国 Cell Signaling Technology 公司),兔抗 Bcl-2、兔抗 Bax(美国 Abcam 公司),兔抗二步法试剂盒、DAB 显色剂试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),HE 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 RIRI 模型的制作** 采用升高眼压法建立大鼠 RIRI 模型<sup>[3]</sup>, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔注射麻醉,盐酸奥布卡因滴眼液局部麻醉,小儿头皮针自颞侧

角膜缘刺入大鼠左眼前房并固定,升高眼压至 110 mmHg( $1 \text{ kPa} = 7.5 \text{ mmHg}$ )后,可见角膜逐渐雾浊,结膜苍白,前房变深,眼底镜见视网膜色淡,血管血流中断,60 min 后逐渐降低输液瓶高度,从而缓慢降低眼压,直至眼压恢复正常,可见角膜逐渐清亮,视网膜恢复血供,RIRI 模型成功建立。

**1.2.2 取材及石蜡切片的制作** 各组分别于 RIRI 后的 6 h、12 h、24 h、48 h 及 72 h 取眼球, $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定,冲洗后常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。将包埋好的标本,平行于视神经矢状轴且以其为平面进行非连续切片,每 4 ~ 5 张切片取一张,切片厚约  $4 \mu\text{m}$ 。

**1.2.3 HE 染色** 石蜡切片脱蜡至水,苏木素液染色 6 min,双蒸水冲洗两次,体积分数 1% 盐酸酒精分化,自来水冲洗,梯度酒精脱水;伊红染色,体积分数 95% 酒精分色;无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

**1.2.4 免疫组织化学染色** 石蜡切片  $60^\circ\text{C}$  烤片 2 h,脱蜡至水,热修复抗原,体积分数 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  消除内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭后,加入兔抗活性 Caspase-3(1 : 75)、兔抗 Bcl-2(1 : 200)、兔抗 Bax(1 : 200)一抗, $4^\circ\text{C}$  冰箱中过夜;复温后  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液冲洗,加兔抗大鼠多克隆抗体,DAB 显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察,每只大鼠取 4 ~ 5 张非连续切片,计数活性 Caspase-3、Bcl-2、Bax 阳性细胞数。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,所有计量资料均以均数  $\pm$  标准差表示。方差齐性资料,采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- $q$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HE 染色结果** HE 染色显示正常对照组大鼠视网膜结构清晰,各层细胞排列紧密;缺血再灌注组大鼠 RIRI 后 6 h、12 h 视网膜各层高度水肿,24 h 后水肿逐渐减轻,神经节细胞逐渐减少,分布较紊乱,

随着时间延长,视网膜神经节细胞大片缺失;药物组6 h、12 h 较缺血再灌注组细胞水肿明显减轻,24 h、48 h、72 h 组较缺血再灌注组细胞排列规整,神经节细胞数量减少减轻(图1)。

图1 各组大鼠视网膜 HE 染色情况(×400)。A 为正常对照组,视网膜各层细胞形态规则,排列整齐,视网膜较厚;B 为缺血再灌注组,RIRI 后 24 h,视网膜细胞形态不规则,排列紊乱,视网膜变薄;C 为药物组,RIRI 后 24 h,视网膜各层细胞形态较规则,排列整齐,视网膜较厚

**2.2 各组大鼠视网膜活性 Caspase-3 蛋白表达的变化** 正常对照组大鼠视网膜活性 Caspase-3 阳性细胞较少,活性 Caspase-3 阳性细胞数为(102.89 ± 18.97)个·mm<sup>-2</sup>;RIRI 后 6 h,缺血再灌注组视网膜活性 Caspase-3 阳性细胞数在灌注后 6 h 开始增加,24 h 达到较高水平,随后逐渐下降;药物组各时间点视网膜活性 Caspase-3 阳性细胞数均显著少于缺血再灌注组,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05,见图 2、表 1)。

**2.3 各组大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白表达的变化** 正常对照组视网膜可见大量 Bcl-2 阳性细胞,Bcl-2 阳性细胞数为(1634.45 ± 345.26)个·mm<sup>-2</sup>;缺血再灌注组 RIRI 后 6 h Bcl-2 阳性细胞开始下降,12 h 后继续减少,24 h 降至较低水平;药物组各时间点 Bcl-2 阳性细胞数均显著多于缺血再灌注组,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05,见图 3、表 2)。

图2 各组大鼠视网膜活性 Caspase-3 蛋白的表达(×400)。A 为正常对照组,几乎未见活性 Caspase-3 阳性细胞;B 为缺血再灌注组,RIRI 后 24 h,可见大量活性 Caspase-3 阳性细胞;C 为药物组,RIRI 后 24 h,可见较少活性 Caspase-3 阳性细胞。箭头指示活性 Caspase-3 阳性细胞

表 1 RIRI 后不同时间点各组活性 Caspase-3 阳性细胞数比较					
(n = 6, $\bar{x} \pm s$ , 个·mm <sup>-2</sup> )					
组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
缺血再灌注组	561.15 ± 37.19 *	853.85 ± 97.18 *	1522.61 ± 84.36 *	1258.90 ± 98.30 *	809.82 ± 94.33 *
药物组	318.64 ± 55.17 *	622.23 ± 107.45 *	1333.58 ± 107.32 *	808.93 ± 67.13 *	567.83 ± 40.56 *
<i>P</i> 值	0.000	0.022	0.047	0.000	0.000

注:与正常对照组比较,\* *P* < 0.01

图3 各组大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白的表达(×400)。A 为正常对照组,视网膜神经节细胞层和内核层可见大量 Bcl-2 阳性细胞;B 为缺血再灌注组,RIRI 后 24 h,神经节细胞层和内核层可见较少 Bcl-2 阳性细胞;C 为药物组,RIRI 后 24 h,有少量 Bcl-2 阳性细胞,显著多于缺血再灌注组。箭头指示 Bcl-2 阳性细胞

**2.4 各组大鼠视网膜 Bax 蛋白表达的变化** 正常对照组大鼠视网膜 Bax 阳性细胞较少,Bax 阳性细胞数为(108.59 ± 29.93)个·mm<sup>-2</sup>;缺血再灌注组 RIRI 后 6 h 神经节细胞层及内核层可见 Bax 阳性细胞,24 h

**表 2 RIRI 后不同时间点各组 Bcl-2 阳性细胞数比较**

(n = 6,  $\bar{x} \pm s$ , 个·mm<sup>-2</sup>)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
缺血再灌注组	1246.94 ± 31.57 *	1141.58 ± 60.01 *	1083.07 ± 45.50 *	879.94 ± 54.71 *	756.95 ± 108.65 *
药物组	1372.65 ± 40.74	1348.19 ± 37.47 #	1265.91 ± 30.38 *	1262.71 ± 16.11 #	1247.83 ± 52.04 *
P 值	0.002	0.001	0.000	0.011	0.000

注:与正常对照组比较,\*P < 0.01,#P < 0.05

**图 4** 各组大鼠视网膜 Bax 蛋白的表达(×400)。A 为正常对照组,几乎未见 Bax 阳性细胞;B 为缺血再灌注组,RIRI 后 24 h,可见大量 Bax 阳性细胞;C 为药物组,RIRI 后 24 h,可见较多 Bax 阳性细胞,显著少于缺血再灌注组。箭头指示 Bax 阳性细胞

**表 3 RIRI 后不同时间点各组 Bax 阳性细胞数比较**

(n = 6,  $\bar{x} \pm s$ , 个·mm<sup>-2</sup>)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
缺血再灌注组	899.82 ± 71.39 *	1653.28 ± 113.31 *	2379.08 ± 200.74 *	1352.40 ± 104.35 *	855.72 ± 29.93 *
药物组	638.72 ± 96.16 *	1126.45 ± 89.92 *	1976.34 ± 83.98 *	951.54 ± 79.90 *	578.99 ± 80.26 *
P 值	0.005	0.001	0.000	0.000	0.002

注:与正常对照组比较,\*P < 0.01

3 讨论

NAS 属于吡啶类激素,是褪黑素的前体物质<sup>[4]</sup>。OXENKRUG 等<sup>[5]</sup>给大鼠皮下注射 NAS,发现大鼠脑和肾中脂质过氧化率减少,首次展示了 NAS 的抗衰老作用。YU 等<sup>[6]</sup>研究了 NAS 对小鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用,发现 NAS 能减少血清中天冬氨酸氨基转移酶含量,减少肝脏组织学损伤,降低 Caspase-3 的水平,表明 NAS 可以抑制缺血再灌注后的肝细胞凋亡。SHAHAR 等<sup>[7]</sup>通过建立大鼠肠缺血再灌注损伤模型,观察了 NAS 对缺血再灌注后肠道细胞的保护作用,发现 NAS 可以预防肠黏膜损伤,抑制大鼠肠缺血再灌注损伤后的细胞凋亡。本实验将 NAS 用于大鼠 RIRI 模型中,以期研究 NAS 对大鼠 RIRI 后视网膜神经细胞的保护作用。

在 RIRI 中,细胞凋亡是损伤的主要形式之一。Caspase-3 是细胞凋亡途径的终末蛋白,又称死亡蛋白,通常是以无活性的 Caspase-3 前体存在的。当细胞受到外界有害物质刺激或者接受凋亡信号后,Caspase-3 活化变成活性 Caspase-3,活性 Caspase-3 作为 Caspase-3 的活化形式,在凋亡的发生过程中具有重要意义,其表达程度可反映 Caspase-3 的活性和细胞凋亡情况,因此活性 Caspase-3 是判断细胞凋亡

达到较高水平,48 h 开始下降;药物组各时间点 Bax 阳性细胞均显著少于缺血再灌注组,差异均有统计学意义(均为 P < 0.05,见图 4、表 3)。

严重性的可靠指标之一。本研究中,正常对照组有极少量的活性 Caspase-3 阳性细胞表达,RIRI 后 6 h,活性 Caspase-3 阳性细胞明显增多,于 24 h 达较高水平,随后逐渐下降,说明 RIRI 的发生与凋亡密切相关,这与文献报道一致<sup>[8]</sup>,经 NAS 干预后,药物组各时间点活性 Caspase-3 阳性细胞均显著少于缺血再灌注组,提示 NAS 可抑制 RIRI 大鼠视网膜细胞的凋亡。

研究表明,Bcl-2 家族成员在凋亡过程中起着关键作用<sup>[9]</sup>。Bcl-2 是最重要的抗凋亡蛋白,可以阻断细胞色素 C 释放至细胞质,抑制下游凋亡级联反应<sup>[10]</sup>。Bax 是促凋亡蛋白,它通过与 Bcl-2 的同源结构域结合形成异源二聚体,封闭 Bcl-2 活性,促进细胞色素 C 穿过线粒体膜,导致细胞凋亡<sup>[11]</sup>。本研究中,药物组 RIRI 后 6 h Bcl-2 阳性细胞开始下降,12 h 后继续减少,24 h 降至较低水平,显著多于缺血再灌注组,提示经 NAS 干预后 Bcl-2 蛋白表达上调;而缺血再灌注组 RIRI 后 6 h 神经节细胞层及内核层可见 Bax 阳性细胞,于 24 h 达到较高水平,72 h 下降,药物组各时间点 Bax 阳性细胞均显著少于缺血再灌注组,说明在 NAS 的作用下 Bax 蛋白表达降低,提示 NAS 抑制 RIRI 大鼠视网膜细胞凋亡的机制可能与促进 Bcl-2 蛋白的表达,同时,抑制 Bax 蛋白表达有关。

(下转第 708 页)

御外来刺激筑起第一道防线。同时,当角膜受到过强的外来刺激时,角膜上皮细胞可能通过诱导“TLR 耐受”,避免角膜出现不可控性炎症反应,以保护角膜组织和视功能。然而“TLR 耐受”出现的原因和具体作用机制尚不明确,这将成为下一步实验研究的方向和着眼点。

参考文献

[1] 杨杰,汪泽,温积权,季娟,刘健,江媛. 感染性角膜炎患者的病原菌分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染杂志, 2016, 26 (19): 4497-4499.  
YANG J, WANG Y, WEN JQ, JI X, LIU J, JIANG Y. Pathogen distribution and drug resistance of infectious keratitis[J]. Chin J Nosocomiol, 2016, 26 (19): 4497-4499.

[2] EVANS DJ, MCNAMARA NA, FLEISZIG SM. Life at the front: dissecting bacterial-host interactions at the ocular surface[J]. Ocul Surf, 2007, 5 (3): 213-227.

[3] HUANG LC, JEAN D, PROSKE RJ, REINS RY, MCDERMOTT AM. Ocular surface expression and in vitro activity of antimicrobial peptides[J]. Curr Eye Res, 2007, 32 (7-8): 595-609.

[4] LAMBIASE A, MICERA A, SACCHETTI M, MANTELLI F, BONINI S. Toll-like receptors in ocular surface diseases: overview and new findings[J]. Clin Sci, 2011, 120 (10): 441-450.

[5] WONG Y, SEHU C, LOUAFI F, HOSSAIN P. Lipopolysaccharide regulation of toll-like receptor-4 and matrix metalloproteinase-9 in human primary corneal fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (5): 2796-803.

[6] SVEDOVA J, TSURATANI N, LIU W, KHANNA KM, VELLA AT. TNF and CD28 signaling play unique but complementary roles in the systemic recruitment of innate immune cells after staphylococcus aureus enterotoxin A inhalation[J]. J Immunol, 2016, 196 (11): 4510-4521.

[7] 袁钊辉, 龙崇德, 林晓峰, 张铁英, 姜秉盛, 刘奕志. 金黄色葡萄球菌胞壁成分在细菌性内炎中的致病作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26 (10): 1901-1907.  
YUAN ZH, LONG CD, LIN XF, ZHANG TY, LOU BS, LIU YZ. Bacterial cell wall components of staphylococcus aureus in-

duce thalmitis [J]. Chin J Pathophys, 2010, 26 (10): 1901-1907.

[8] 苏亚茹, 白浪, 刘晶, 梁伟怡, 于健, 孟婷. TLR2 调节 Th 细胞极化对小鼠角膜移植排斥反应发生的影响[J]. 眼科新进展, 2016, 36 (7): 601-604.  
SU YR, BAI L, LIU J, LIANG WY, YU J, MENG T. Effects of Th cell polarization regulated by TLR2 on immune rejection after corneal transplantation in mouse [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2016, 36 (7): 601-604.

[9] HAMERMAN JA, POTTLE J, NI M, HE Y, ZHANG ZY, BUCKNER JH. Negative regulation of TLR signaling in myeloid cells-Implications for autoimmune diseases [J]. Immunol Rev, 2016, 269 (1): 212-227.

[10] RREDFERN RL, PATEL N, HANLON S, FARLEY W, GONDO M, PFLUGFELDER SC, et al. Toll-like receptor expression and activation in mice with experimental dry eye/TLRs and AMPs in EDE [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 (2): 1554-1563.

[11] LANG LL, WANG L, LIU L. Exogenous MD-2 confers lipopolysaccharide responsiveness to human corneal epithelial cells with intracellular expression of TLR4 and CD14 [J]. Inflammation, 2011, 34 (5): 371-378.

[12] 刘苏俊, 林麟, 周武庆, 张彩萍, 冯雨苗, 马一平. 金黄色葡萄球菌肽聚糖对 HaCat 细胞 TLR2 和 4 的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23 (2): 84-86.  
LIU SJ, LIN L, ZHOU WQ, ZHANG CP, FENG YM, MA YP. The effect of peptidoglycan from staphylococcus aureus on TLR2 and TLR4 in hacat cells [J]. Chin J Derm Venereol, 2009, 23 (2): 84-86.

[13] CAO L, YANG XJ, LI ZJ, SUN FF, WU XH, YAO JH. Reduced lesions in chickens with Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis by Lactobacillus fermentum 1. 2029 [J]. Poult Sci, 2012, 91 (12): 3065-3071.

[14] BOTOS I, SEGAL DM, DAVIES DR. The structural biology of Toll-like receptors [J]. Structure, 2011, 19 (4): 447-459.

[15] REDGERN RL, MCDERMOTT AM. Toll-like receptors in ocular surface disease [J]. Exp Eye Res, 2010, 90 (6): 679-687.

[16] LI Y, YANG H, WU X. Pretreatment with TLR2 and TLR4 ligand and modulates innate immunity in corneal fibroblasts challenged with Aspergillus fumigatus [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 (6): 4261-4270.



(上接第 704 页)

总之, NAS 可促进 RIRI 大鼠视网膜 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制 Bax 蛋白的表达, 从而抑制活性 Caspase-3 蛋白表达, 减轻细胞凋亡, 具有神经保护作用, 这为 RIRI 的临床治疗提供新思路。

参考文献

[1] ANDERSON G, RODRIGUEZ M. Multiple sclerosis: The role of melatonin and N-acetylserotonin [J]. Mult Scler Relat Disord, 2015, 4 (2): 112-123.

[2] ZHOU Y, LI HQ, LU L, FU DL, LIU AJ, LI JH, et al. Ginsenoside Rg1 provides neuroprotection against blood brain barrier disruption and neurological injury in a rat model of cerebral ischemia /reperfusion through downregulation of aquaporin 4 expression [J]. Phytomedicine, 2014, 21 (7): 998-1003.

[3] 赵岩松, 赵堪兴, 王晓莉, 牟青杰, 王丽, 毕学辉. 低氧预适应对缺血再灌注损伤大鼠视网膜促红细胞生成素及活性 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 眼科新进展, 2013, 33 (1): 5-8.  
ZHAO YS, ZHAO KX, WANG XL, MOU QJ, WANG L, BI XH. Effects of hypoxia preconditioning on expression of EPO and active Caspase-3 protein in retina after ischemia reperfusion injury [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2013, 33 (1): 5-8.

[4] FAGALI N, CATALA A. The antioxidant behaviour of melatonin and structural analogues during lipid peroxidation depends not only on their functional groups but also on the assay system [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423

(4): 837-877.

[5] OXENKRUG MH, RATNER R. N-acetylserotonin and aging-associated cognitive impairment and depression [J]. Aging Dis, 2013, 3 (4): 330-338.

[6] YU S, ZHENG J, JIANG Z, SHI C, LI J, DU X, et al. Protective effect of N-acetylserotonin against acute hepatic ischemia-reperfusion injury in mice [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (9): 17680-17693.

[7] SHAHAR YB, SUKHOTIK I, BITTERMAN N, POLLAK Y, BEJAR J, CHEPUROV D, et al. Effect of N-acetylserotonin on intestinal recovery following intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat [J]. Eur J Pediatr Surg, 2016, 26 (1): 47-53.

[8] KARA S, GENCER B, KARACA T, TUFAN HA, ARIKAN S, ERSAN I, et al. Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion n-induced retinal injury in rats [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014: 797824.

[9] DOLKA I, KROL M, SAPIERZYNSKI R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved-caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study [J]. Res Vet Sci, 2016, 105: 124-133.

[10] THOMADAKI H, SCORILAS A. Bcl-2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2006, 43 (1): 1-67.

[11] ZHANG ZG, ZOU J, HUANG Y, WU L. Kinetin inhibits proliferation of hepatic stellate cells by interrupting cells cycle and induces apoptosis by down-regulating ratio of Bcl-2/Bax [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2015, 35 (5): 672-678.