doi:10.11659/jjssx.03E02071

·基础研究·

贝沙罗汀对小鼠脑缺血再灌注损伤神经元的保护作用及机制

刘海林[1,2],李明航[1],饶江艳[1],田晓翠[1],董 志[1] (1.重庆医科大学生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016;2.重庆两江新区第一人民医院药剂科,重庆 401121)

[摘 要] **目的** 探讨贝沙罗汀(Bexarotene)对脑缺血再灌注(CIR)损伤神经元的保护作用及机制。**方法** 将45只C57BL/6雄性小鼠随机分为假手术组、模型组及贝沙罗汀组(5 mg/kg),每组15只。采用线栓法建立短暂小鼠中动脉栓塞(tMCAO)模型,再灌注后通过神经行为学评分观察小鼠神经功能缺损情况;HE染色观察脑部皮层损伤侧神经元病理变化;TUNEL染色检测脑部皮层损伤侧神经元凋亡;免疫荧光染色检测损伤部位Cleaved Caspase-3表达;Western blot检测小鼠损伤脑组织中JNK信号通路相关蛋白P-C-Jun、P-JNK及Cleaved Caspase-3的表达情况。**结果** 与假手术组相比,模型组和贝沙罗汀组小鼠神经功能缺损明显较重($P<0.05$),皮层神经元损伤分级明显增加($P<0.05$),损伤部位TUNEL阳性细胞数及Cleaved Caspase-3的表达明显较高($P<0.05$),同时损伤侧小鼠脑组织JNK、C-Jun、Cleaved Caspase-3的蛋白表达水平显著上调($P<0.05$);与模型组相比,贝沙罗汀组小鼠神经行为学评分较低($P<0.05$),贝沙罗汀可有效阻止tMCAO后脑组织形态学的改变($P<0.05$),降低小鼠损伤侧脑组织TUNEL染色阳性细胞数及P-JNK、P-C-Jun、Cleaved Caspase-3蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** 贝沙罗汀对CIR神经元损伤具有保护作用,且该作用可能通过抑制JNK/Caspase-3信号通路的激活来实现。

[关键词] 贝沙罗汀;脑缺血再灌注损伤;神经保护作用;细胞凋亡;JNK/Caspase-3信号通路

[中图分类号] R743;R363.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-03-11

Protective effect and mechanism of Bexarotene on neuronal injury induced by cerebral ischemia reperfusion in mice

LIU Hai-lin[1,2], LI Ming-hang[1], RAO Jiang-yan[1], TIAN Xiao-cui[1], DONG Zhi[1] (1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Pharmacy, First People's Hospital of Chongqing Liangjiang New District, Chongqing 401121, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Bexarotene on neuronal injury induced by cerebral ischemia reperfusion (CIR) and its mechanism. **Methods** A total of 45 C57BL/6 male mice were randomly divided into sham group, model group and Bexarotene group (5 mg/kg), with 15 mice in each group. The transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model in mice was established by the thread technique. After reperfusion, the effect of Bexarotene on the neurological function of mice was measured by the neurologic deficit score. The morphological changes of neurons in damaged cerebral cortex were observed by HE staining. The neuronal apoptosis of damaged cerebral cortex was assessed by TUNEL staining. The expression of Cleaved Caspase-3 was detected by immunofluorescence staining. The levels of P-C-Jun, P-JNK, Cleaved Caspase-3 in damaged brain tissue were analyzed by Western blot. **Results** Compared with the sham group, the nerve function injury of mice was more serious ($P<0.05$), the cortical neuron damage was aggravated ($P<0.05$), the number of TUNEL positive cells and the expression of Cleaved Caspase-3 were higher ($P<0.05$), the expression levels of P-JNK, P-C-Jun and Cleaved Caspase-3 were up-regulated in the model group and the Bexarotene group ($P<0.05$). Compared with the model group, Bexarotene treatment significantly reduced the neurobehavioral score of tMCAO mice ($P<0.05$), which effectively prevented the brain morphological changes, reduced the number of TUNEL positive cells, down-regulated the expression levels of P-JNK, P-C-Jun and Cleaved Caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion** Bexarotene has protective effect on neuron injury induced by cerebral ischemia-reperfusion, which may be achieved by inhibiting the activation of JNK/Caspase-3 signaling pathway.

Keywords: Bexarotene; cerebral ischemia-reperfusion injury; neuroprotective effect; cell apoptosis; JNK/Caspase-3 signaling pathway

随着社会老龄化速度加快,缺血性脑卒中已经成为导致成人死亡和残疾的主要疾病[1]。目前缺血性脑卒中最主要的治疗方式为通过药物溶栓或者机械取栓的方式使脑缺血部位血液复流,减轻脑组织损伤,挽救半暗带。然而血液复流后,由于氧化应激、自噬、炎症、线粒体损伤等复杂的病理生理机制易进一步加重脑缺血再灌注(cerebral ischemia reperfusion, CIR)损伤,导致神经元凋亡[2]。尽管近年来国内外针对此疾病开展了大量的基础及临床研究,但目前仍然没有找到

[基金项目] 重庆市科技局基础研究项目(CSTC2016jcyjA0268);重庆市科技局创新与应用发展专项(CSTC2019jscx-msxmX0096)

[通信作者] 董 志,E-mail:dongzhi0608@163.com

一个有效的具有神经保护作用且可有效逆转缺血性脑卒中结局的药物。因此,寻找安全有效的治疗缺血性脑卒中的药物具有重要研究价值及临床意义。

C-Jun 氮端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)是广泛存在于神经细胞中的一种蛋白,与缺氧、缺血再灌注等应激情况密切相关,JNK 通路的激活在细胞凋亡中发挥着重要作用[3]。贝沙罗汀是一种高选择性的可通过血脑屏障的维 A 类 X 受体(retinoid X receptor,RXR)激动剂,是一种经 FDA 认证的抗肿瘤药物。RXR 有三种亚型,即 RXRα、RXRβ 和 RXRγ,其中 RXRα 是贝沙罗汀的主要靶点。近年来,越来越多的研究发现了贝沙罗汀在中枢神经系统疾病中的有益作用。有研究证实,贝沙罗汀可以减轻阿尔兹海默病小鼠的神经功能障碍[4]。还有学者发现,贝沙罗汀可以促进小鼠创伤性脑损伤后神经功能的恢复[5]。尽管贝沙罗汀在其他神经系统疾病中已经有了较多的研究进展,但其对脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制还缺乏深入研究。故本研究通过观察短暂中动脉栓塞(transient middle cerebral artery occlusion,tMCAO)模型小鼠脑组织 Cleaved Caspase-3 及 JNK 信号通路相关蛋白 P-C-Jun、P-JNK 的表达情况,对小鼠进行神经行为学评分,并观察小鼠脑组织形态学变化,探讨贝沙罗汀对脑缺血再灌注损伤的保护作用以及其与 JNK/Caspase-3 信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

1.1.1 实验动物 健康 C57BL/6 雄性小鼠 45 只,动物周龄 8~12 周,体质量 20~25 g,均购于重庆医科大学动物中心。动物生产许可证编号:SCXK(渝)2012-0001。SPF 实验室喂养,温度维持在(25±1)℃,每天给予 12 h 光照。本实验获重庆医科大学伦理委员会批准,所有参加实验人员均已通过动物实验及饲养规范化培训,所有手术均在全身麻醉下进行,尽量减少实验动物的痛苦。

1.1.2 主要试剂与材料 贝沙罗汀(ab141025)、anti-Cleaved Caspase-3(ab49822)购于 Abcam 公司;二甲基亚砜、细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒购于中国 Vazyme 生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;DAPI 购于美国 Beyotime 公司;RIPA 裂解液、磷酸酯酶抑制剂购于上海碧云天生物技术有限公司;anti-p-c-Jun、anti-p-JNK 购于美国 CST 公司;anti-β-actin 抗体购于武汉三鹰公司;荧光二抗(DyLight 594,山羊抗兔 IgG)购于美国 Abbkine 公司;MCAO 线栓购于广州佳灵生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 Sigma 低温高速离心机(德国 Sigma 公司);超低温冰箱(日本 Sanyo 公司);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Western blot 垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司);荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法

参照 Longa 法建立小鼠 tMCAO 模型[6]。术前小鼠禁食 12 h,禁水 4 h(末次给药 4 h 后造模)。小鼠用 3% 戊巴比妥钠溶液(40 mL/kg)腹腔麻醉注射。颈部备皮,75% 酒精消毒局部皮肤,颈中线切口 2 cm,分离颈前肌,右侧胸锁乳突肌。暴露右侧颈总动脉(common carotid artery,CCA)、颈外动脉(external carotid artery,ECA)和颈内动脉(internal ca-rotid artery,ICA)。用手术线结扎 ECA 近心端,血管夹暂时夹闭 ICA 及 CCA。用显微剪在 CCA 分叉约 6 mm 处剪出 V 型切口,然后插入线栓,缓缓将线栓经 ICA、CCA 分叉处推入 ICA 颅骨分支约 10 mm 后,有阻力感即停止进入,固定线栓。缺血 60 min 后拔出线栓,恢复血流,造成右侧脑部的再灌注损伤。彻底止血后结扎血管,缝合皮肤。手术过程中使用恒温红外灯将小鼠体温维持在(37±0.5)℃。

将 45 只小鼠随机分为假手术组、模型组、贝沙罗汀组,每组 15 只。先用 DMSO 溶解 20 mg 贝沙罗汀,用聚乙二醇(15)-羟基硬脂酸镁、乙醇、水以 15∶10∶75的比例制成混合液作为溶剂配制。贝沙罗汀组术后立即按 5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d$ 剂量给与上述配置好的贝沙罗汀,模型组则仅给予等量的溶剂(除不含药物外,其余成分均相同)。假手术组不给予任何药物或溶剂处理。

1.3 神经行为学评分

各组小鼠再灌注 24 h 后,根据 Longa 法进行小鼠神经行为学评分,评分标准见表 1。选取神经行为学评分为 2~3 分的小鼠纳入后续研究。

表 1 小鼠神经行为学评分标准

小鼠神经功能缺损程度	肢体活动评估	分值
无神经功能缺损症状	肢体活动、肌力均正常	0
轻微神经功能缺损	缺血对侧前肢力弱	1
中度局灶性神经功能缺损	小鼠爬行时向缺血对侧(左侧)转圈	2
重度局灶性神经功能缺损	小鼠站立时向缺血对侧(左侧)倾倒	3
严重神经功能缺损	无自主活动,意识障碍	4

1.4 标本的采集

小鼠缺血再灌注损伤72 h后,经腹腔注射10%水合氯醛,待小鼠完全麻醉后,从小鼠左心室插入灌注针并固定,同时剪开后心耳,从左心室注入生理盐水约50 mL,待小鼠肝、脑组织变白后再灌入4%多聚甲醛约50 mL,灌注完成后分离完整脑组织,置于冻存管中,于-80 ℃保存待用。

1.5 HE染色

小鼠缺血再灌注损伤72 h后,深度麻醉下断头取脑,将新鲜采集的脑组织于4%多聚甲醛中固定24~48 h,进行石蜡包埋切片。石蜡切片行常规脱蜡后经苏木精液染3~4 min,水洗冲掉表面的染料,于自来水中返蓝5 min,待切片全部变蓝,再用双蒸水洗2 min。然后伊红溶液染色30 s,75%酒精洗脱伊红1~2 min,95%乙醇浸泡3 min,两级无水乙醇分别脱水3 min,两级二甲苯分别透明3 min,最后用中性树胶封固。结果判断:把染色的切片置于普通光学显微镜下,在放大200倍的镜下观察损伤部位皮层神经元细胞的形态、细胞有无水肿以及细胞核有无固缩等情况。

1.6 TUNEL染色

小鼠缺血再灌注损伤72 h后,将取出的脑组织置于4%多聚甲醛固定过夜,然后依次置于10%、20%和30%的蔗糖溶液进行梯度脱水,脱水后制成5 μm厚的冠状冰冻切片,于-80 ℃保存待用。根据细胞凋亡检测试剂盒说明书对小鼠脑组织切片进行染色,用DAPI对细胞核进行染色。在荧光显微镜下观察损伤部位皮层神经元细胞的凋亡情况,红色荧光标记的细胞核为TUNEL阳性细胞。通过荧光显微镜采集标本,每组选取具有代表性的3~4张图片,使用Image-Pro Plus 6软件进行分析。

1.7 免疫荧光

进行免疫荧光前的组织处理同TUNEL染色。在4 ℃下采用1∶100稀释的兔来源的Cleaved Caspase-3多克隆抗体(#ab49822,Abcam,1∶250)对冰冻切片组织进行孵育。过夜后,采用荧光二抗(DyLight 594,山羊抗兔IgG)在避光、37 ℃条件下对切片组织进行孵育1 h。在荧光显微镜下观察小鼠损伤部位皮层神经元细胞周围Cleaved Caspase-3表达情况。使用Image-Pro Plus 6软件计算Cleaved Caspase-3染色的积分光密度(IOD)。

1.8 Western blot测定小鼠脑组织中JNK/Caspase-3信号通路相关蛋白表达

在实验预设的时间点深度麻醉下断头取脑,收集各组小鼠的损伤侧海马组织,置于冰袋上分离出伤侧大脑半球,称重、剪碎,然后置于装有按RIPA∶PMSF=100∶1配置好的RIPA蛋白裂解液的匀浆器中(10 mg脑组织加入100 μL裂解液)。置于冰上充分研磨后提取总蛋白,总蛋白浓度采用BCA法测定。每孔上样30 μg,经过SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,室温5% BSA封闭2 h,按以下比例加入稀释好的一抗:P-JNK(1∶1 000)、P-C-Jun(1∶1 000)、Cleaved Caspase 3(1∶1 000)、β-actin(1∶2 000),置于4 ℃冰箱中孵育过夜。洗膜,二抗室温孵育并洗膜后显色成像。成像结果用Image-Lab检测图像灰度值并分析结果,以目标蛋白与内参β-actin灰度值的比值表示蛋白的表达水平。

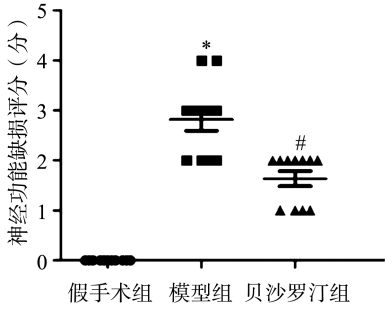
1.9 统计学处理

所有数据均使用SPSS 20软件进行分析,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。除了神经行为学评分采用Mann-Whitney test,其余指标各组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 贝沙罗汀干预对tMCAO小鼠行为学评分的影响

假手术组小鼠并未观察到神经功能缺损;贝沙罗汀组与模型组相比,神经行为学评分较低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图1。

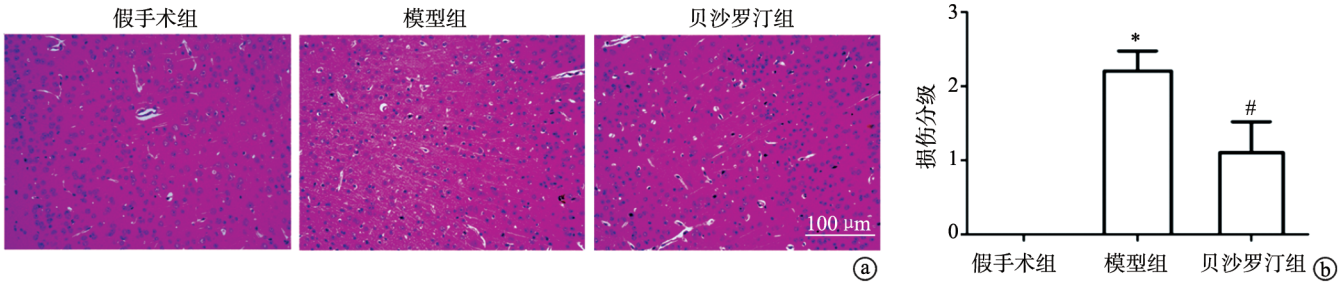


*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图1 小鼠神经功能缺损评分比较

2.2 贝沙罗汀干预对tMCAO小鼠脑组织形态学的影响

与假手术组相比,模型组大鼠缺血处大片神经细胞消失、排列稀疏不规则、紊乱、数量减少、间质水肿疏松、神经细胞胞浆浓缩红染、胞核皱缩或溶解、碎裂;凋亡细胞的主要特征为核染色质致密深染、形成致密质块,并可见凋亡小体。与模型组相比,贝沙罗汀组经干预后上述情况明显好转,表明贝沙罗汀能有效阻止小鼠tMCAO后脑组织形态学的改变($P<0.05$),见图2。

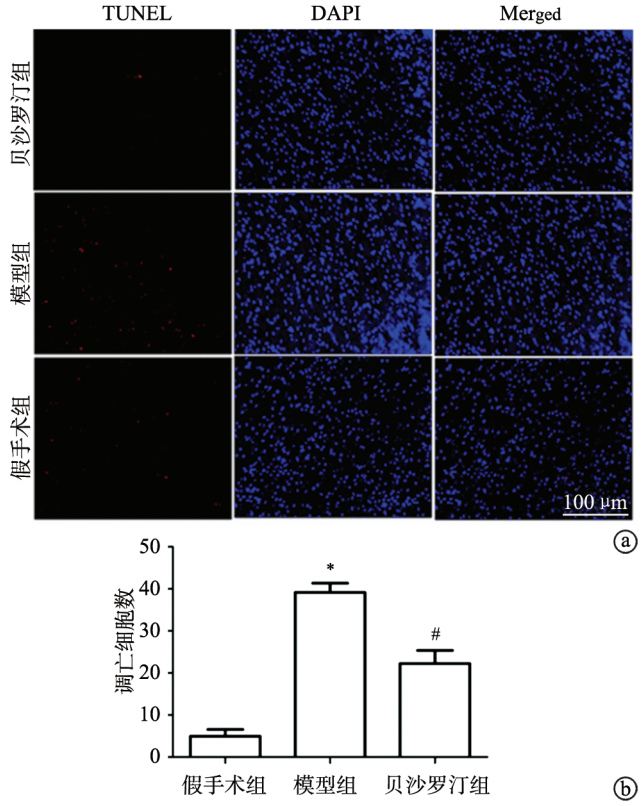


a:HE 染色图片;b:HE 染色损伤分级定量统计图 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图 2 HE 染色观察小鼠脑组织形态学变化

2.3 贝沙罗汀干预对 tMCAO 小鼠脑组织神经元细胞凋亡的影响

假手术组未发现 TUNEL 阳性染色细胞;而模型组和贝沙罗汀组小鼠在 tMCAO 模型后均检测到大量的 TUNEL 染色阳性细胞,且贝沙罗汀组小鼠伤灶周围 TUNEL 染色阳性细胞明显少于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 3。Cleaved Caspase-3 是执行细胞凋亡的关键因子,为进一步验证 TUNEL 实验结果,本研究使用了免疫荧光检测该蛋白酶在损伤脑组织中的表达,结果发现:与假手术组相比,模型组和贝沙罗汀组小鼠伤灶周围脑组织中 Cleaved Caspase-3 的水平均在 tMCAO 建模以后 72 h 显著较高($P<0.05$);贝沙罗汀组给予贝沙罗汀干预后,小鼠损伤部位脑组织中 Cleaved Caspase-3 的水平显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

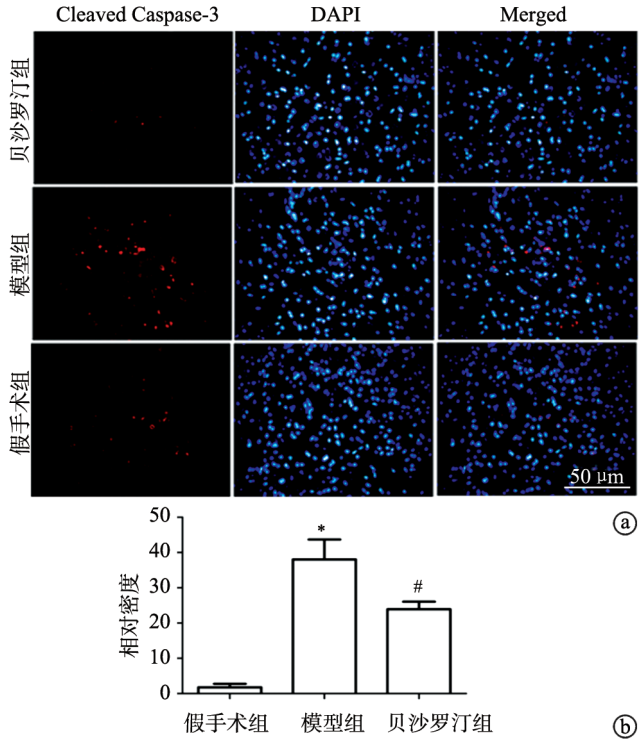


a:TUNEL 染色图;b:TUNEL 染色阳性细胞数定量统计图 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图 3 TUNEL 染色检测脑组织细胞凋亡情况

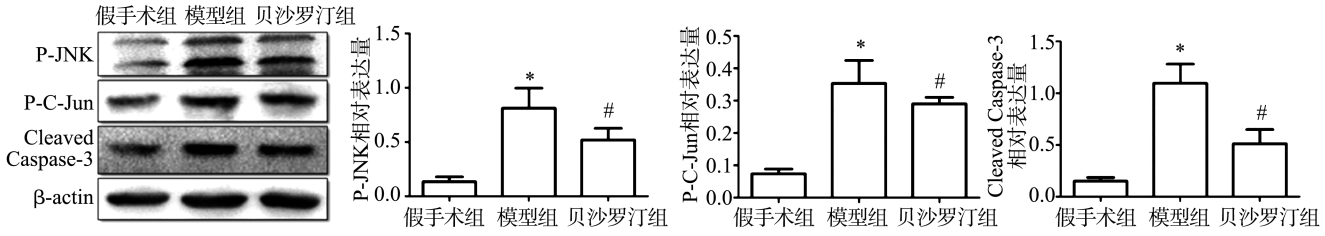
2.4 贝沙罗汀干预对 tMCAO 小鼠 JNK/Caspase-3 信号通路蛋白表达的影响

由图 5 可知,模型组和贝沙罗汀组小鼠伤灶周围脑组织中 P-JNK、P-C-Jun、Cleaved Caspase-3 表达水平均在 tMCAO 建模以后 72 h 高于假手术组($P<0.05$)。贝沙罗汀组小鼠给予贝沙罗汀干预后,三种蛋白表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),提示贝沙罗汀处理可通过抑制 tMCAO 小鼠神经元中 JNK、P-C-Jun 的磷酸化,减少 Cleaved Caspase-3 表达,进而达到神经保护、对抗细胞凋亡的作用。



a:Cleaved Caspase-3 免疫荧光染色图;b:Cleaved Caspase-3 免疫荧光染色定量统计图 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图 4 免疫荧光检测贝沙罗汀对 Cleaved Caspase-3 表达的影响



*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图5 Western blot 检测贝沙罗汀干预对 JNK/Caspase 3 信号通路蛋白表达的影响

3 讨论

贝沙罗汀是一种经 FDA 批准用于治疗皮肤淋巴瘤的药物,近年来也被证明对多种神经系统疾病有效。Zhong 等[5]研究表明,贝沙罗汀可能通过上调载脂蛋白 E 的表达,减少神经细胞凋亡,减轻炎症反应,显著改善 TBI 后小鼠的神经功能。Certo 等[7]报道贝沙罗汀可以通过调节外周免疫反应,为缺血性中风的急性期治疗提供有利的条件。在这两项研究中,使用的药物剂量分别为 5 mg/kg 和 0.5 ~25 mg/kg,相较于抗肿瘤剂量 100 mg/kg,两者均为小剂量。Zhong 等[5]的研究证实了 5 mg/kg 贝沙罗汀在动物体内没有发现明显的副作用。因此,本研究选取了 5 mg/kg 贝沙罗汀用于探讨贝沙罗汀对小鼠脑缺血再灌注损伤的治疗效果,结果表明,该剂量即可显著改善脑损伤后小鼠的神经功能及皮层区域神经元缺失、间质水肿,减少损伤部位神经元凋亡。

行为学测试是评估神经功能最直接有效的方法。tMCAO 建模后,小鼠脑缺血区域由于血管内皮细胞损伤,蛋白质、核酸过氧化,线粒体破坏及小胶质细胞激活等现象,严重影响了缺血区域神经元的正常生理功能及神经纤维的正常传导,导致神经功能缺损,出现感觉、运动和学习认知障碍[8]。有研究显示,贝沙罗汀能增加原代神经元细胞轴突的数量[9],同时 Mounier 等[10]通过二代测序证明了贝沙罗汀能影响与神经元发育及轴突生长关系密切的 mRNA。本研究也证实了贝沙罗汀能显著改善损伤部位皮层神经元缺失、间质水肿、胞核皱缩及凋亡小体的形成,进而可显著改善神经功能,可能与上述原因有一定的关系,但具体机制还有待进一步研究证明。

JNK 为丝裂原激活蛋白激酶类(mitogen-activated protein kinases,MAPK)家族重要的成员[3]。近年来,大量文献报道了 JNK 可通过参与调节转录及非转录等相关信号通路,在脑中风、阿尔茨海默病和帕金森病中扮演重要角色[11-13]。JNK 包含 10 种不同的亚型,其中 JNK1/2 分布广泛,而 JNK3 只分布在大脑、心脏中。JNK 主要通过上游特异性的两个激酶(特异性丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 和 7)而激活,激活后的 JNK 信号通路通过磷酸化不同的底物参与机体在应激环境下对炎症、凋亡、坏死等相关信号通路的调控[14]。因此,JNK 信号通路可能与脑缺血再灌注损伤密切相关。Uzdensky[15]报道了 JNK 为脑卒中诱导神经元细胞凋亡最重要的靶标蛋白。Shvedova 等[16]研究发现,在脑缺血再灌注损伤早期,损伤部位的 P-JNK 与 P-C-Jun 表达量显著升高,且神经元细胞凋亡水平亦显著增加。也有研究显示[17-18],激活后的 JNK 可能通过以下两条途径发挥促凋亡作用:一是上调促凋亡蛋白的表达,JNK 可增加转录因子复合物 AP-1 活性,促进转录因子 c-Jun 与靶基因激活,最终激活死亡受体凋亡通路;二是通过调节 Bcl-2 家族相关蛋白,促进 Cyt-C 的释放,参与线粒体介导的细胞凋亡通路。两条通路最终都会激活执行凋亡程序的关键蛋白酶 Caspase-3。

本研究结果表明,tMCAO 模型建立 72 h 后,P-JNK与 P-C-Jun 蛋白表达量增加,同时,执行凋亡程序的关键蛋白酶 Cleaved Caspase-3 表达量及凋亡细胞 DNA 降解产物的 TUNEL 阳性细胞数均增加,表明 tMCAO模型的构建能显著上调神经元凋亡水平。而经贝沙罗汀干预后,P-JNK 与 P-C-JUN 表达量显著下调,海马区域组织学状态及 CIR 神经功能缺损评分改善,Cleaved Caspase-3 表达量下调,神经元细胞的凋亡显著逆转。提示贝沙罗汀的抗凋亡作用可能与降低 JNK/Caspase-3 信号通路相关。

综上,贝沙罗汀作为一种抗肿瘤药物在临床已使用较长的时间,上市后疗效及安全性的数据较新开发药物更充分,且其具有分子量小、脂溶性高、容易透过血脑屏障等优点,可作为安全、有效的脑缺血再灌注损伤的治疗药物。

[参考文献]

[1] Naghavi M, Wang H, Lozano R, et al. Global, regional, andnational age-sex specific all cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990 – 2013: asystematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet, 2015, 385(9963): 117 – 171. doi: 10.1016/S0140 – 6736(14)61682 – 2.

[2] Madathil RJ, Hira RS, Stoeckl M, et al. Ischemia reperfusion injury as a modifiable therapeutic target for cardioprotection or neuroprotection in patients undergoing cardiopulmonary resuscitation[J]. Resuscitation, 2016, 105: 85 – 91. doi: 10.1016/j. resuscitation. 2016. 04. 009.

[3] Zhu Y, Li S, Liu J, et al. Role of JNK signaling pathway in dexmedetomidine post-conditioning-induced reduction of the inflammatory response and autophagy effect of focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Inflammation, 2019, 42(6): 2181 – 2191. doi: 10.1007/s10753 – 019 – 01082 – 2.

[4] Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, et al. ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models[J]. Science, 2012, 335(6075): 1503 – 1506. doi: 10.1126/science.1217697.

[5] Zhong J, Cheng C, Liu H, et al. Bexarotene protects against traumatic brain injury in mice partially through apolipoprotein E[J]. Neuroscience, 2017, 343: 434 – 448. doi: 10.1016/j. neuroscie-nce. 2016. 05. 033.

[6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 – 91. doi: 10.1161/01. str. 20. 1. 84.

[7] Certo M, Endo Y, Ohta K, et al. Activation of RXR/PPARγ underlies neuroprotection by bexarotene in ischemic stroke[J]. Pharmacol Res, 2015, 102(4): 298 – 307. doi: 10.1016/j. phrs. 2015. 10. 009.

[8] Zaleska MM, Mercado ML, Chavez J, et al. The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translationalchallenges[J]. Neuropharmacology, 2009, 56(2): 329 – 341. doi: 10.1016/j. neuropharm. 2008. 10. 006.

[9] Tachibana M, Shinohara M, Yamazaki Y, et al. Rescuing effects of RXR agonist bexarotene on aging-related synapse loss depend on neuronal LRP1[J]. Exp Neurol, 2016, 277(11): 1 – 9. doi: 10.1016/j. expneurol. 2015. 12. 003.

[10] Mounier A, Georgiev D, Nam KN, et al. Bexarotene-activated retinoid X receptors regulate neuronal differentiation and dendritic complexity[J]. J Neurosci, 2015, 35(34): 11862 – 11876. doi: 10.1523/JNEUROSCI. 1001 – 15. 2015.

[11] Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1341 – 1348. doi: 10.1016/j. bbamcr. 2006. 12. 009.

[12] Ye KP, Chen CR, Zheng JW, et al. Effect of curcumine on the nuclear pathway of JNK during hippocampal ischemia/reperfusion injury in SHR[J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2010, 26(4): 416 – 420.

[13] He B, Chen W, Zeng J, et al. MicroRNA-326 decreases tau phosphorylation and neuron apoptosis through inhibition of the JNK signaling pathway by targeting VAV1 in Alzheimer's disease[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(1): 480 – 493. doi: 10.1002/jcp. 28988.

[14] Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(5): 131. doi: 10.3390/cancers10050131.

[15] Uzdensky AB. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins[J]. Apoptosis, 2019, 24(9 – 10): 687 – 702. doi: 10.1007/s10495 – 01901 – 556 – 6.

[16] Shvedova M, Anfinogenova Y, Atochina-Vasserman EN, et al. c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Front Pharmacol, 2018, 5(9): 715. doi: 10.3389/fphar.2018.00715.

[17] Schreck I, Al-Rawi M, Mingot JM, et al. c-Jun localizes to the nucleus independent of its phosophorylation by and interaction with JNK and vice versa promotes nuclear accumulation of JNK[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(4): 735 – 740. doi: 10.1016/j. bbrc. 2011. 03. 092.

[18] Guo XX, An S, Yang Y, et al. Emerging role of the Jun N-terminal kinase interactome in human health[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(7): 756 – 768. doi: 10.1002/cbin. 10948.

(编辑:杨 颖)