

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.004

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201214.1137.002.html>(2020-12-14)

p38-MAPK 介导 AT2R 对低氧/复氧损伤后 PC12 细胞的保护作用研究^{*}

罗 敏¹,刘雅婷^{2,3},龙双涟²,彭凤玲^{2,4△}

(1. 南华大学附属第二医院麻醉科,湖南衡阳 421001;2. 南华大学衡阳医学院应用解剖与生殖医学研究所组织学与胚胎学教研室,湖南衡阳 421001;3. 南华大学衡阳医学院 2017 级卓越医师班,湖南衡阳 421001;4. 南华大学附属第一医院神经内科,湖南衡阳 421001)

[摘要] 目的 探讨 p38-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在血管紧张素Ⅱ2 型受体(AT2R)活化影响缺氧/复氧(H/R)损伤大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞存活中的作用。方法 以连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)模拟细胞缺氧反应的环境,复制 H/R 损伤细胞模型(对照组),给予 AT2R 激动剂(CGP42112,CGP42112 组)、p38-MAPK 抑制剂(SB203580,SB203580 组)和(或)AT2R 抑制剂(PD123319)分别处理细胞,四氮唑盐(MTT)法检测细胞存活率,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达,Western blot 检测磷酸化 p38-MAPK(p-p38-MAPK)、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。结果 与对照组比较,CGP42112 组和 SB203580 组 PC12 细胞存活率升高($P<0.05$)。CGP42112 可下调细胞中 p-p38-MAPK 蛋白表达,PD123319 可上调 p-p38-MAPK 蛋白表达,且均呈浓度和时间依赖性($P<0.05$)。CGP42112 组和 SB203580 组 Bax mRNA 及蛋白表达水平降低,Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.05$)。结论 AT2R 活化可通过调控 p38-MAPK 信号通路而影响 Bcl-2 和 Bax 的表达,促进 H/R 损伤 PC12 细胞的存活。

[关键词] 受体,血管紧张素,2 型;血管紧张素Ⅱ2 型受体拮抗剂;PC12 细胞;缺氧/复氧损伤;p38 丝裂原活化蛋白激酶类

[中图法分类号] R329

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)04-0557-06

Study on AT2R protecting PC12 cells from hypoxia/reoxygenation injury mediated by p38-MAPK^{*}

LUO Min¹,LIU Yating^{2,3},LONG Shuanglian²,PENG Fengling^{2,4△}

(1. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Histology and Embryology, Clinical Anatomy & Reproductive Medicine Application Institute, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. 2017 Grade Excellent Doctor Class, Hengyang Medical School, University of South, Hengyang, Hunan 421001, China; 4. Department of Internal Medicine-Neurology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) on the activation of angiotensinⅡ type 2 receptor (AT2R) in the survival of rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cells damaged by hypoxia/reoxygenation (H/R). **Methods** Sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) was used to simulate the environment of cellular hypoxia response to replicate the H/R injury cell model (the control group), AT2R agonist (CGP42112, the CGP42112 group) p38-MAPK inhibitor (SB203580, the SB203580 group) and (or) AT2R inhibitor (PD123319) was used to treat cells separately, MTT method was used to detect cell viability,

^{*} 基金项目:应用解剖与生殖医学湖南省衡阳市重点实验室建设资助项目(2017KJ182)。 作者简介:罗敏(1979—),主治医师,硕士,主要从事细胞损伤保护机制研究。 △ 通信作者,E-mail:273752797@qq.com。

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect Bax and Bcl-2 mRNA expression, Western blot was used to detect phosphorylated p38-MAPK (p-p38-MAPK), Bax And Bcl-2 protein expression. **Results** Compared with the control group, the survival rate of PC12 cells in the CGP42112 group and the SB203580 group increased ($P < 0.05$). CGP42112 could down-regulate the expression of p-p38-MAPK protein, and PD123319 could up-regulate the expression of p-p38-MAPK protein, with a concentration and time-dependent manner ($P < 0.05$). The expression levels of Bax mRNA and protein in the CGP42112 group and the SB203580 group decreased, while the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion** AT2R activation can affect the expression of Bcl-2 and Bax by regulating the p38-MAPK signaling pathway, and promote the survival of PC12 cells damaged by H/R.

[Key words] receptor, angiotensin, type 2; angiotensin II type 2 receptor blockers; PC12 cells; hypoxia/reoxygenation injury; p38 mitogen-activated protein kinases

缺血性脑病是最常见的脑血管疾病, 临床治疗往往以重建脑血流、挽救濒死细胞、改善神经细胞功能为主要目的。但脑血流重建的同时也可能进一步加重缺血区组织的病理损害, 即脑缺血/再灌注损伤^[1]。神经细胞的缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 损伤及缺血区神经细胞凋亡是脑缺血/再灌注损伤的主要表现^[2]。研究发现, Bax 和 Bcl-2 分别作为促凋亡基因和抑凋亡基因在细胞凋亡过程中发挥着重要作用^[3], 缺血可抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 参与细胞应激反应、凋亡和增殖等过程^[4]。其中 p38-MAPK 与神经细胞的凋亡密切相关, 调控 p38-MAPK 信号途径可明显改善大鼠脑缺血造成的神经损伤^[5-6]。

血管紧张素 II 型受体 (angiotensin II type 2 receptor, AT2R) 是肾素-血管紧张素系统中主要活性分子之一。韩素芳^[7] 分析认为 AT2R 与血管紧张素 II 相互作用后对缺血性脑损伤起保护作用, 但具体机制仍不清楚。因此, 本研究用化学性缺氧剂连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 处理大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (pheochromocytoma-derived cell line-12, PC12) 细胞以复制 H/R 损伤的细胞模型, 采用抑制剂、激活剂干预 p38-MAPK 信号分子, 观察 Bax 和 Bcl-2 表达变化, 以探讨 AT2R 活化影响 H/R 损伤 PC12 细胞存活的可能分子机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

PC12 细胞株 (受赠于南华大学神经科学研究所); 四氮唑盐 (MTT, 北京康为世纪生物科技有限公司); $2 \times \text{Taq PCR Mastermix}$ (上海市碧云天生物技术有限公司), FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (长沙市佳和生物科技有限责任公司), Bax、Bcl-2 和 GAPDH 引物 (上海生工生物工程有限公司), p38-MAPK 抗体、磷酸化 p38-MAPK (p-p38-MAPK) 抗体

(美国 Cell Signaling Technology 公司), GAPDH、Bax 及 Bcl-2 抗体 (美国 Biosharp 公司), AT2R 抑制剂 PD123319 (美国 Abcam 公司), AT2R 激动剂 CGP42112 和 p38-MAPK 抑制剂 SB203580 (美国 Sigma 公司), GAPDH (美国 CST 公司), 高糖 DMEM 培养基和无糖 DMEM 培养基 (美国 Solarbio 公司), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料责任有限公司); 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 H/R 损伤 PC12 细胞模型的建立及实验分组

PC12 细胞置于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基中, 于 5% CO_2 、37 °C 恒温培养箱中孵育。取对数生长期细胞, 弃培养液, 以无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 加入新鲜配制含 40 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的无糖无血清 DMEM 培养基中孵育, 1 h 后取出细胞, 用无菌 PBS 洗 3 次, 加入新鲜含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 再置入 5% CO_2 、37 °C 恒温培养箱中继续孵育 1 h, 复制 H/R 损伤细胞模型。

将 H/R 损伤 PC12 模型细胞分为 4 组: 对照组 (仅 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理)、CGP42112 组 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + 1 \times 10^{-6}$ mol/L CGP42112 共处理)、SB203580 组 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + 1 \times 10^{-6}$ mol/L SB203580 共处理) 和 CGP42112 + SB203580 组 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + 1 \times 10^{-6}$ mol/L CGP42112 + 1×10^{-6} mol/L SB203580 共处理)。此外, 分别以 CGP42112 和 PD123319 处理细胞, 观察其作用的浓度和时间效应。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞存活率

细胞接种于 96 孔培养板, 40 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理细胞 1 h, 加 MTT (20 μL 5 g/L), 继续孵育 4 h, 弃孔内液体后收获细胞, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡混匀 10 min 以溶解结晶物, 经全自动酶标仪测定各孔的吸光度 (A 值, 波长为 490 nm), 取均值计算不同药物浓度和作用时间的生长抑制率。

设定对照组 A 值代表的细胞存活率为 100%，按以下公式计算细胞存活率：细胞存活率(%)=(实验孔 A 值—调零孔 A 值)/(对照组 A 值—调零孔 A 值)×100%。

1.2.3 台盼蓝染色观察细胞活力

细胞接种于 96 孔培养板，经相应处理后以无菌 PBS 洗涤 3 次，加入约 100 μL 0.4% 的台盼蓝，静置染色 3 min，显微镜下观察细胞形态。死亡细胞常被染成蓝色，活细胞则拒染呈无色透明状。

1.2.4 Western blot

收集细胞提取蛋白质样品，10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE，积层胶 60 mV，分离胶 120 mV)后电转移(100 mA，2 h)至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。5%的牛奶封闭 2 h 后，依次孵育一抗和二抗，用高灵敏度化学发光检测试剂盒显色，凝胶成像系统采集图像并进行半定量分析。

1.2.5 逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)

采用 TRIzol 试剂常规提取细胞总 RNA，按试剂盒说明，序列合成 cDNA 并进行 PCR。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，以天能凝胶成像系统采集图像并进行半定量分析。实验中使用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列		
基因	引物	产物长度
Bax	正向:5'-ATGCGTCCACCAAGAAGC-3'	344 bp
	反向:5'-GGTCCCGAAGTAGGAGAGGA-3'	
Bcl-2	正向:5'-CCTGGCATCTTCTCCTTCC-3'	344 bp
	反向:5'-TTGACGCTCTCCACACACAT-3'	
GAPDH	正向:5'-GGTGCTGAGTATGTCGTGGAG-3'	193 bp
	反向:5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'	

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 *t* 检验，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CGP42112 和 SB203580 对 H/R 损伤 PC12 细胞存活的影响

与对照组比较，CGP42112 组、SB203580 组和 CGP42112+SB203580 组 PC12 细胞存活率升高，且 CGP42112+SB203580 组存活率高最高，差异有统计学意义(*P* < 0.05)，见图 1。

2.2 CGP42112 和 PD123319 对 H/R 损伤 PC12 细胞 p38-MAPK 磷酸化的影响

CGP42112 可下调细胞 p-p38-MAPK 蛋白表达，

且随着 CGP42112 浓度升高和处理时间延长，p-p38-MAPK 蛋白表达水平均逐渐降低，见图 2。

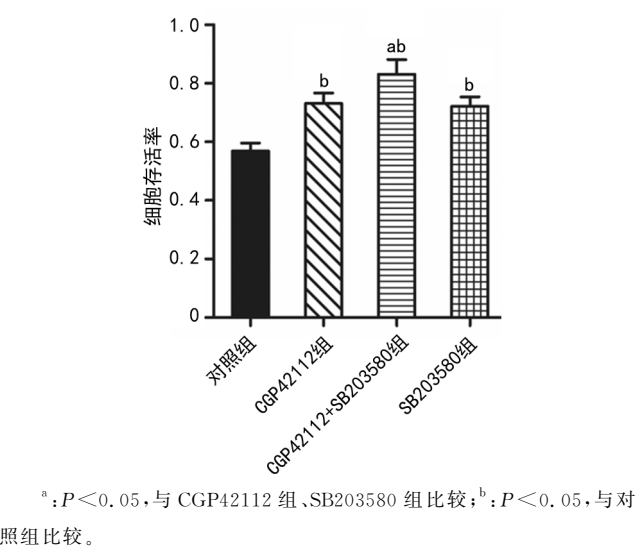
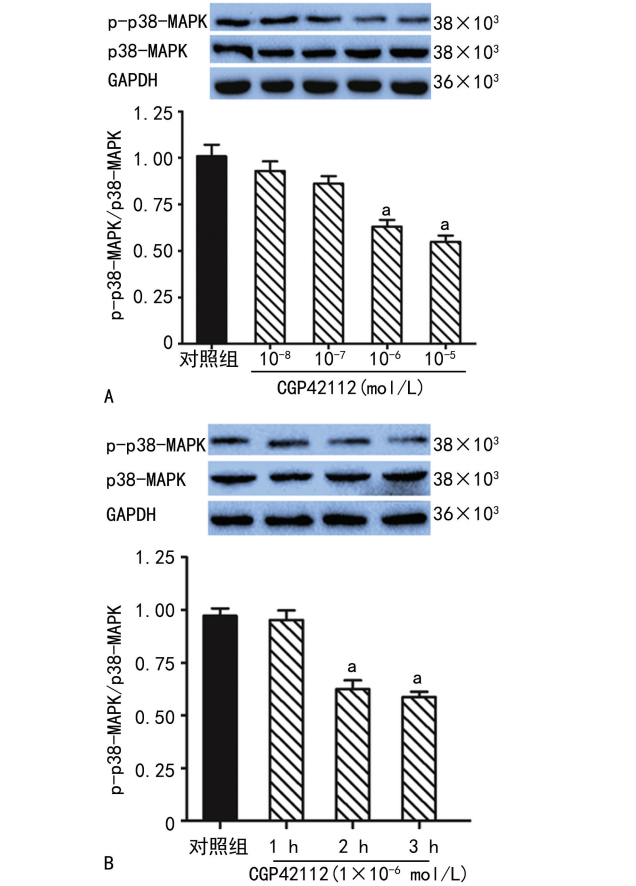


图 1 CGP42112 和 SB203580 对 H/R 损伤 PC12 细胞存活的影响



A:不同浓度 CGP42112 对 p-p38-MAPK 蛋白表达的影响;B:1 × 10⁻⁶ mol/L CGP42112 处理不同时间对 p-p38-MAPK 蛋白表达的影响;*:*P* < 0.05，与对照组比较。

图 2 CGP42112 对 H/R 损伤 PC12 细胞 p38-MAPK 磷酸化的影响

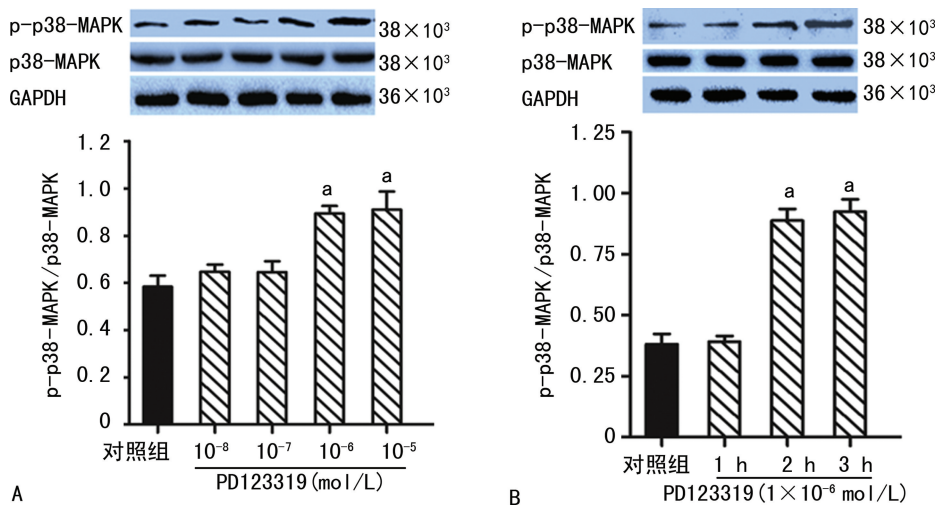
PD123319 可上调 H/R 损伤 PC12 细胞的 p-p38-MAPK 蛋白表达，且随着 PD123319 浓度升高和处理

时间延长,p-p38-MAPK 蛋白表达水平逐渐升高,见图 3。台盼蓝染色法发现,与对照组比较,PD123319 处理细胞后显微镜视野下被染成蓝色的死亡细胞数量增多,且随着 PD123319 浓度升高,死亡细胞数量逐渐增多,见图 4。

2.3 CGP42112 和 SB203580 对 H/R 损伤 PC12 细

胞 Bax、Bcl-2 mRNA 及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

与对照组比较,CGP42112 组、SB203580 组和 CGP42112+SB203580 组 Bax mRNA 表达水平降低,Bcl-2 mRNA 表达水平升高,且 CGP42112+SB203580 组 Bax mRNA 表达水平最低,Bcl-2 mRNA 表达水平最高,见图 5。



A:不同浓度PD123319对p-p38-MAPK蛋白表达的影响;B:1×10⁻⁶mol/L PD123319处理不同时间对p-p38-MAPK蛋白表达的影响;^a:P<0.05,与对照组比较。

图3 PD123319对H/R损伤PC12细胞p38-MAPK磷酸化的影响

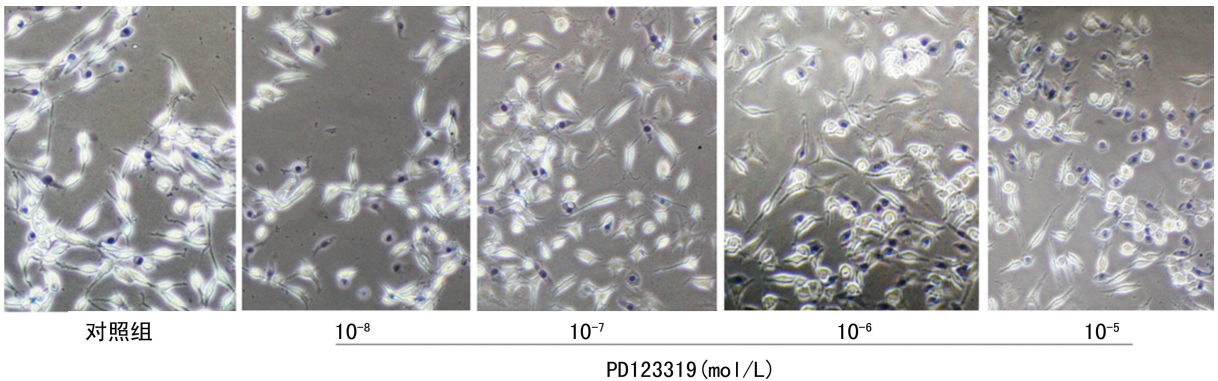
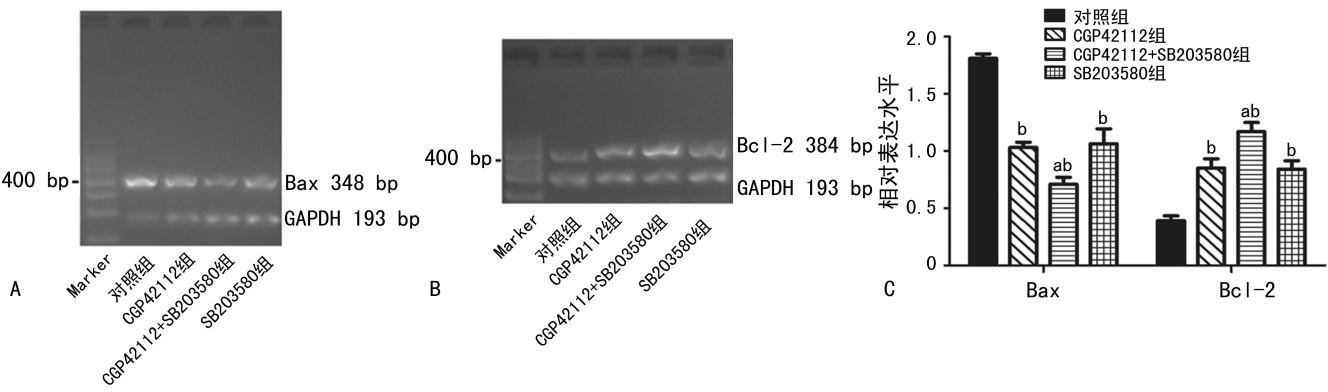


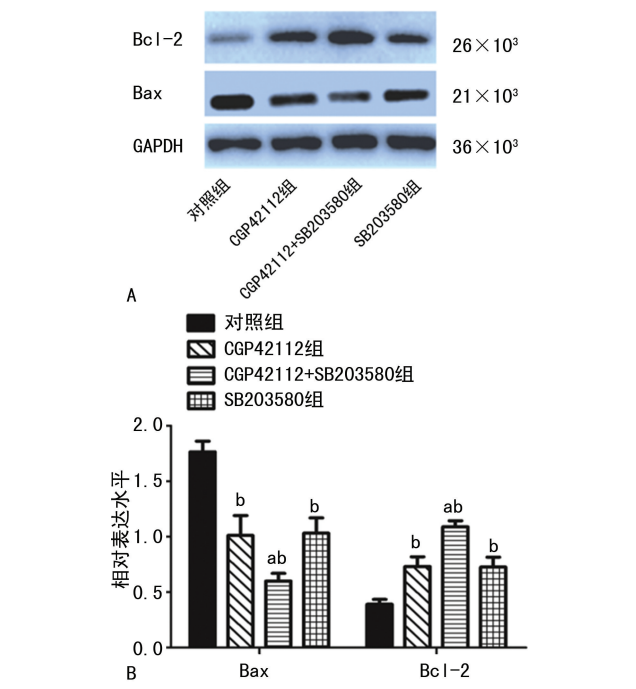
图4 台盼蓝染色观察PD123319对H/R损伤PC12细胞活力的影响(10×20)



A:H/R损伤PC12细胞中Bax mRNA的表达;B:H/R损伤PC12细胞中Bcl-2 mRNA的表达;C:Bax和Bcl-2 mRNA表达的灰度分析;^a:P<0.05,与GP42112组、SB203580组比较;^b:P<0.05,与对照组比较。

图5 RT-PCR检测H/R损伤PC12细胞中Bax和Bcl-2 mRNA的表达

与对照组比较,CGP42112 组、SB203580 组和 CGP42112+SB203580 组 Bax 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高,且 CGP42112+SB203580 组 Bax 蛋白表达水平更低,Bcl-2 蛋白表达水平更高, 见图 6。



A: H/R 损伤 PC12 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达;B: Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的灰度分析;^a: $P < 0.05$,与 CGP42112 组、SB203580 组比较;^b: $P < 0.05$,与对照组比较。

图 6 Western blot 检测 H/R 损伤 PC12 细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

3 讨 论

MAPK 是细胞内重要的蛋白激酶之一,其介导的信号通路可以将胞外刺激信息传导至胞核内,调控基因的转录和表达,从而参与细胞的生物学功能^[8]。p38-MAPK 是 MAPK 家族中的重要成员,它与应激反应、脑缺血等病理条件下所诱导的细胞凋亡密切相关。有研究发现,抑制 MAPK 信号转导通路介导的炎症反应,可减少缺血引起的脑损伤^[9],p38-MAPK 在缺氧缺糖预处理后的神经损伤中也起着重要的作用^[10]。

PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株,它在形态和功能上与神经细胞类似,常作为体外细胞模型被广泛应用于神经细胞分化和凋亡等方面的研究^[2]。神经细胞的 H/R 损伤是脑缺血/再灌注损伤的主要表现之一,因此,本研究中以 PC12 细胞为研究对象,以化学性缺氧剂 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 模拟细胞缺氧反应环境,复制 H/R 损伤细胞模型,结果发现 p38-MAPK 特异性抑制剂 SB203580 能诱导 H/R 损伤 PC12 细胞的存活,提示抑制 p38-MAPK 可以减轻 H/R 所导

致的 PC12 细胞损伤。

AT2R 是肾素血管紧张素系统中的一种 G 蛋白偶联受体,它在大脑发育、脑缺血及高血压发病过程中有重要作用^[11-12]。研究发现,AT2R 与 Ang II 相互作用后可舒张血管、调节细胞生长发育、促进细胞增殖和分化、参与组织结构的修复和重塑,还可以促进侧支循环开放、改善脑血液循环、影响炎症因子分泌,保护缺血性脑损伤的组织和细胞^[13]。本研究发现,AT2R 激动剂 CGP42112 可促进 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的 H/R 损伤 PC12 细胞的存活,且与 p38-MAPK 特异性抑制剂具有协同作用,提示 p38-MAPK 信号通路参与了 AT2R 活化影响 H/R 损伤 PC12 细胞存活的作用。

磷酸化的 MAPK 是发挥其生物学作用的有效形式^[14]。因此,检测细胞内磷酸化 MAPK 的水平可反映 MAPK 的活性。本研究采用 AT2R 激动剂 CGP42112 处理 H/R 损伤 PC12 模型细胞后发现,CGP42112 可下调细胞 p-p38-MAPK 蛋白的表达。相反,AT2R 抑制剂 PD123319 则上调该模型细胞的 p-p38-MAPK 蛋白的表达,抑制细胞的存活,提示 AT2R 活化可抑制 p38-MAPK 蛋白磷酸化,这也是 AT2R 活化减轻 H/R 致 PC12 细胞损伤的机制之一。

Bax 是促凋亡基因,Bcl-2 则为抑凋亡基因,两者在细胞凋亡过程中发挥着重要作用^[3]。多项研究发现,在缺血性脑血管疾病中诱导 Bcl-2/Bax 表达比值增大,则可抑制缺血所诱导的神经元凋亡,提示 Bax 和 Bcl-2 之间的平衡或比值的变化在脑缺血神经元的凋亡过程中有着十分重要的作用^[15-17]。本研究中,p38-MAPK 特异性抑制剂 SB203580 和 AT2R 激动剂 CGP42112 均能下调 H/R 损伤 PC12 细胞 Bax 的表达,上调 Bcl-2 的表达,从而增大细胞内 Bcl-2/Bax 表达比值,这提示 AT2R 活化可减轻 H/R 所致的 PC12 细胞损伤,其机制可能是通过抑制细胞 p38-MAPK 蛋白磷酸化,影响细胞内 Bcl-2/Bax 表达比值,从而抑制 PC12 细胞的凋亡。

综上所述,脑血管疾病以颅内血液循环障碍导致脑组织损伤为特点,主要病理过程涉及缺血再灌注损伤后造成的神经细胞凋亡,但其机制尚未完全阐明。本研究以 H/R 损伤的 PC12 细胞为研究模型,探讨 AT2R 活化影响 H/R 损伤 PC12 细胞存活的机制,发现 AT2R 活化可抑制细胞 p38-MAPK 蛋白磷酸化,增高 Bcl-2/Bax 的表达比值,提示 AT2R 活化是通过调控 p38-MAPK 信号通路而影响 Bcl-2、Bax 的表达,从而保护 H/R 损伤的 PC12 细胞,增加其存活率。

参考文献

- [1] ZHURAVIN I A, DUBROVSKAYA N M, VASILLEV D S, et al. Regulation of neprilysin activity and cognitive functions in rats after pre-natal hypoxia[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(6): 1387-1398.
- [2] TOK L, NAZIROGLU M, UGUZ A C, et al. Elevated hydrostatic pressures induce apoptosis and oxidative stress through mitochondrial membrane depolarization in PC12 neuronal cells: a cell culture model of glaucoma[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 34(5): 410-416.
- [3] THANGARAJAN S, VEDAGIRI A, SOMASUNDARAM S, et al. Neuroprotective effect of morin on lead acetate-induced apoptosis by preventing cytochrome c translocation via regulation of Bax/Bcl-2 ratio[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2018, 66: 35-45.
- [4] KONDO Y, HIGA-NAKAMINE S, MAEDA N, et al. Stimulation of cell migration by flagellin through the p38MAP kinase pathway in cultured intestinal epithelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(1): 247-258.
- [5] LI L, LI Y, MIAO C, et al. Coriolus versicolor polysaccharides (CVP) regulates neuronal apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury via the p38-MAPK signaling pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(18): 1168.
- [6] LIAO W, ZHONG Y, CHENG W, et al. 3-N-butylphthalide inhibits neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction via targeting p38/MAPK[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 144-152.
- [7] 韩素芳. 血管紧张素转换酶抑制剂联合血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂对糖尿病肾病肾功能临床疗效的 Meta 分析[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(11): 1257-1262.
- [8] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [9] LI H, ZHOU S, WU L, et al. The role of p38-MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 357(1): 270-275.
- [10] GUAN J, DU S, LV T, et al. Oxygen-glucose deprivation preconditioning protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion induced injury via bone morphogenetic protein-7 mediated ERK, p38 and Smad signalling pathways[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(1): 125-134.
- [11] SHARMA N, GAIKWAD A B. Effects of renal ischemia injury on brain in diabetic and non-diabetic rats; role of angiotensinⅡ type 2 receptor and angiotensin-converting enzyme 2[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 882: 173241.
- [12] DENTON K M. Angiotensin type 2 receptor: hidden partner[J]. *Hypertension*, 2015, 66(2): 273-274.
- [13] 黄焱平, 宋先兵. 血管紧张素Ⅱ 2 型受体对大鼠脑缺血-再灌注的保护作用研究[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2015, 36(18): 2653-2656.
- [14] 朱明燕, 王燕, 王毓, 等. 血清淀粉样蛋白 A 经 p38-MAPK/SR-BI 途径促进巨噬细胞炎症反应[J]. *生理学报*, 2016, 68(3): 293-300.
- [15] GUAN J, LI H, LV T, et al. Bone morphogenetic protein-7 contributes to cerebral ischemic preconditioning induced-ischemic tolerance by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37(4): 1289-1296.
- [16] TAO T, ZHAO M, YANG W, et al. Neuroprotective effects of therapeutic hypercapnia on spatial memory and sensorimotor impairment via anti-apoptotic mechanisms after focal cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 573: 1-6.
- [17] ZHAO T, FU Y, SUN H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(1): 60-70.