

桂皮醛对脑缺血小鼠的脑保护作用 及对 Toll 样受体 6/核因子- κ B 信号通路的影响

赵景茹¹, 董立朋¹, 李尧¹, 杨宝明², 陈景红¹, 霍甜甜¹, 李娜¹, 贾艳丽¹, 李俐涛¹

1. 河北省人民医院, 河北省石家庄市 050051

2. 河北医科大学第四医院, 河北省石家庄市 050000

摘 要: **目的** 探讨桂皮醛对局灶性脑缺血小鼠的脑保护作用及机制。 **方法** 雄性 CD-1 小鼠通过腹腔注射的方法给予桂皮醛干预, 应用改良线栓法建立小鼠右侧永久性大脑中动脉闭塞模型, 将成年健康雄性 CD-1 小鼠随机分为大脑中动脉闭塞 (MCAO) 组及桂皮醛 (CA) 低、中、高剂量干预组, 即 CA25 组、CA50 组和 CA75 组 (在 MCAO 小鼠模型基础上腹腔给予 25 mg/kg、50 mg/kg 及 75 mg/kg 桂皮醛)。术后 24 h 通过测定小鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积及脑组织含水量来评价桂皮醛的脑保护作用。通过 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 法测定 Toll 样受体 6 (TLR6)、肿瘤坏死因子受体相关分子 6 (TRAF6) 和核因子- κ B (NF- κ B) 在脑组织中的表达。 **结果** 与 MCAO 组相比, CA50 组神经功能评分显著改善 (中位数 2.0 vs. 3.5), 病变侧脑组织含水量降低 [(83.72 ± 0.73) % vs. (85.09 ± 0.95) %], 脑梗死体积缩小 (0.45 ± 0.06 vs. 0.54 ± 0.02), 均 $P < 0.05$ 。同样与 MCAO 组相比, CA50 组 TLR6、TRAF6 及 NF- κ B 基因表达明显下调 (TLR6: 3.26 ± 0.03 vs. 6.32 ± 0.07; TRAF6: 1.88 ± 0.21 vs. 3.33 ± 0.48; NF- κ B: 1.47 ± 0.33 vs. 4.21 ± 0.57, 均 $P < 0.05$)。TLR6、TRAF6 及胞核 NF- κ B 蛋白表达明显下降 (TLR6: 0.12 ± 0.01 vs. 0.19 ± 0.03; TRAF6: 0.45 ± 0.09 vs. 0.67 ± 0.07; 胞核 NF- κ B: 0.32 ± 0.06 vs. 0.46 ± 0.06, 均 $P < 0.05$)。 **结论** 桂皮醛可能通过抑制 TLR6/TRAF6/NF- κ B 通路对局灶性脑缺血小鼠发挥脑保护作用。

关键词: 脑缺血; 炎症反应; 桂皮醛; Toll 样受体 6; 肿瘤坏死因子受体相关分子 6; 核因子- κ B; 小鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.01.015

Cerebral protective effect of cinnamaldehyde and its influence on the Toll-like receptor 6/nuclear factor-kappa B signaling pathway in mice with cerebral ischemia

ZHAO Jing-Ru, DONG Li-Peng, LI Yao, YANG Bao-Ming, CHEN Jing-Hong, Huo Tian-Tian, LI Na, JIA Yan-Li, LI Li-Tao. Department of Neurology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China

Corresponding author: LI Li-Tao, E-mail: zjr840911@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the cerebral protective effect of cinnamaldehyde (CA) in mice with focal cerebral ischemia and related mechanism. **Methods** Male CD-1 mice were treated with intraperitoneal injection of CA, and the modified suture method was used to establish a mouse model of permanent right middle cerebral artery occlusion (MCAO). Healthy adult male CD-1 mice were randomly divided into MCAO group and low-, middle-, and high-dose CA groups (CA25, CA50, and CA 75 groups treated with intraperitoneal injection of CA at concentrations of 25, 50, and 75 mg, respectively, in addition to the treatment in the MCAO group). At 24 hours after surgery, neurologic impairment score, cerebral infarct volume, and brain water content were measured to evaluate the cerebral protective effect of CA. Western blot and quantitative real-time PCR were used to measure the expression of Toll-like receptor 6 (TLR6), tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in brain tissue. **Results** Compared with the MCAO group, the CA50 group had a significant improvement in median neurological score (2.0 vs 3.5, $P < 0.05$) and significant reductions in brain water content (83.72% ± 0.73% vs 85.09% ± 0.95%, $P < 0.05$) and cerebral infarct volume (0.45 ± 0.06 vs 0.54 ± 0.02, $P < 0.05$). Compared with

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题 (20160485)

收稿日期: 2017-06-23; **修回日期:** 2017-11-18

作者简介: 赵景茹 (1984-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事脑血管病相关机制研究。

通信作者: 李俐涛 (1972-), 女, 博士后, 主任医师, 主要从事脑血管病相关机制研究。Email: zjr840911@163.com。

the MCAO group, the CA50 group had significant reductions in the mRNA expression of TLR6, TRAF6, and NF- κ B (TLR6: 3.26 ± 0.03 vs 6.32 ± 0.07 , $P < 0.05$; TRAF6: 1.88 ± 0.21 vs 3.33 ± 0.48 , $P < 0.05$; NF- κ B: 1.47 ± 0.33 vs 4.21 ± 0.57 , $P < 0.05$), as well as significant reductions in the protein expression of TLR6, TRAF6, and nuclear NF- κ B (TLR6: 0.12 ± 0.01 vs 0.19 ± 0.03 , $P < 0.05$; TRAF6: 0.45 ± 0.09 vs 0.67 ± 0.07 , $P < 0.05$; NF- κ B: 0.32 ± 0.06 vs 0.46 ± 0.06 , $P < 0.05$). **Conclusions** CA exerts a cerebral protective effect in mice with focal cerebral ischemia, possibly by inhibiting the TLR6/TRAF6/NF- κ B signaling pathway.

Key words: cerebral ischemia; inflammatory response; cinnamaldehyde; Toll-like receptor; tumor necrosis receptor-associated factor 6; nuclear factor-kappa B; mouse

缺血性脑卒中后继发性脑损伤是患者病情加重的重要原因,其病理机制主要包括炎症反应、氧化应激和凋亡等,其中过度炎症反应是加重继发性脑损伤的主要原因之一,因此抗炎症损伤成为治疗缺血性脑卒中的重要途径之一^[1-4]。Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)介导的核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)激活在促炎反应中发挥关键作用,并与缺血性继发性脑损伤密切相关^[5,6]。

桂皮醛(cinnamaldehyde, CA)是具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、抗肿瘤和抗凋亡等多种生物学作用的中药单体。桂皮醛已被证实通过抑制TLR6信号通路从而抑制果糖介导的心脏炎症反应及纤维化,对缺血心肌发挥保护作用^[7,8]。但桂皮醛是否具有通过抗炎达到脑保护作用,仍不得而知。

本研究旨在深入探讨桂皮醛是否对局灶性脑缺血小鼠具有脑保护作用,并探讨其可能的作用机制,为桂皮醛的开发及临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

桂皮醛(成都艾科生物科技有限公司);兔抗TLR6、抗肿瘤坏死因子受体相关分子6(TRAF6)和抗NF- κ B多克隆抗体(Bioworld公司,美国);经颅多普勒超声监测仪VMS-LDF(Moor Instruments Ltd公司,美国);多功能酶标仪(Bio-Tek公司,美国);电泳仪,电泳槽(北京六一仪器厂);PCR扩增仪(Eppendorf公司,德国)。

1.2 动物分组及给药方式

实验动物采用健康雄性CD-1小鼠,体重约27~30 g,购自北京维通利华公司。随机将CD-1小鼠分为4组:大脑中动脉闭塞组(MCAO):小鼠大脑中动脉闭塞后即刻腹腔注射等量0.2% DMSO;桂皮醛低、中、高剂量组(CA25、CA50及CA75):小鼠大脑中动脉闭塞后即刻腹腔注射桂皮醛25 mg/kg、50 mg/kg及75 mg/kg。

1.3 动物模型的建立

采用改良线栓法制作小鼠右侧大脑中动脉闭

塞模型(MCAO)^[9,10]。手术过程中应用经颅多普勒超声监测大脑中动脉血流,当血流下降70%~80%说明模型成功。

1.4 动物模型神经功能缺损的评价

各组小鼠在术后24 h采用Bederson评分法^[11]测定小鼠神经功能缺失。在动物麻醉清醒后24 h进行评分并记录神经功能缺失症状,评分标准如下:0分(无神经损伤症状);1分(提尾时病灶对侧前肢不能完全伸直);2分(行走时向瘫痪侧转圈);3分(向病灶对侧跌倒);4分(不能自发行走)。

1.5 脑组织含水量测定

采用干湿重法^[12],去除额极后取病变侧约2 mm厚的脑组织,将脑组织放入事先称重(A)的锡纸中,立即称重(B),B-A即得湿重,然后用锡纸包裹脑组织,放入95℃烤箱内烘干24 h后取出恢复到室温,称重(C),C-A即得干重,反复称量至恒重。最终代入公式计算脑组织含水量:(脑组织湿重-脑组织干重)/湿重 $\times 100\%$,即 $(B-C)/(B-A) \times 100\%$ 。

1.6 脑梗死体积百分比测定

脑缺血24 h后,将小鼠麻醉后断头处死并迅速取脑,切除额极,将大脑均匀切为冠状切片。脑片浸入2% TTC溶液,37℃孵育15 min。再置于4%多聚甲醛中固定24 h,将图像导入计算机(Image-Pro Plus 5.1软件进行图像分析)。测定脑梗死面积和脑梗死体积(红色区域为正常脑组织,苍白色区域为梗死区),水肿修正后梗死体积百分比(%): $= \{ [\text{总梗死体积} - (\text{梗死侧半球体积} - \text{梗死对侧半球体积})] / \text{梗死对侧半球体积} \} \times 100\%$ ^[13]。

1.7 Western Blot及RT-qPCR法测定小鼠大脑皮质缺血区TLR6、TRAF6和NF- κ B表达

各实验组动物取皮质脑组织,置-80℃储存备用,采用Western Blot检测TLR6、TRAF6和NF- κ B蛋白表达,远红外荧光扫描成像系统扫描,TLR6/

GAPDH、TRAF6/GAPDH 和胞核 NF- κ B/GAPDH 比值代表相对表达水平。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 TLR6、TRAF6 及 NF- κ B mRNA 表达量。以 GAPDH 作为内参基因,与对照组相比,得到目的基因表达 CT 值并进行数据定量分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,多组数据比较采用方差分析 (one-way ANOVA),当方差齐并具有显著性差异时,进一步运用 S-N-K 检验两两比较,当方差不齐时,采用非参数的秩和检验。神经功能缺损评分使用 chi-square (χ^2) 检验进行多组数据比较,并进一步用 Mann-Whitney U 检验两两比较,除了神经功能缺损学评分,数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准取 $\alpha = 0.05$,当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 桂皮醛对局灶性脑缺血小鼠神经功能的影响

和 MCAO 组比较,CA75 和 CA50 组的神经功能缺损评分明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),CA25 组神经功能评分与 MCAO 组比较无明显降低,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 桂皮醛对局灶性脑缺血小鼠神经功能的影响

| 组别 | 1 分 | 2 分 | 3 分 | 4 分 | 中位数 | 95% 可信区间 |
|--------|-----|-----|-----|-----|------|-------------|
| MCAO 组 | 0 | 0 | 4 | 4 | 3.5 | 3.05 ~ 3.50 |
| CA25 组 | 0 | 1 | 6 | 1 | 3.0 | 2.55 ~ 3.45 |
| CA50 组 | 0 | 6 | 2 | 0 | 2.0* | 1.86 ~ 2.64 |
| CA75 组 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1.5* | 1.05 ~ 1.95 |

注:每组神经功能缺损评分, $\chi^2 = 84.4$, d. f. = 16, $P < 0.001$; * 为与 MCAO 组比较, $P < 0.05$ (Mann-Whitney U 检验)。

2.2 桂皮醛对局灶性脑缺血小鼠脑组织含水量的影响

MCAO 组小鼠病变侧脑组织含水量明显升高,而与 MCAO 组 [$(85.09 \pm 0.95)\%$] 相比,CA50 及 CA75 组 24 h 病变侧脑组织含水量明显降低 [$(83.72 \pm 0.7)3\%$, $(81.69 \pm 0.93)\%$],差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),CA25 组病变侧脑组织含水量在 24 h 与 MCAO 组比较无明显降低 [$(85.42 \pm 0.86)\%$],差异无统计学意义 ($P > 0.05$),这也和桂皮醛对神经功能的作用是相一致的 (图 1)。基于桂皮醛对脑缺血小鼠神经功能及脑水肿的改善,我们推断桂皮醛中、高剂量 (50 mg/kg 和 75 mg/kg) 能够显示较好的脑保护作用,因此,接下来的研究我们主要关注桂皮醛的最低有效给药剂量 50 mg/kg。

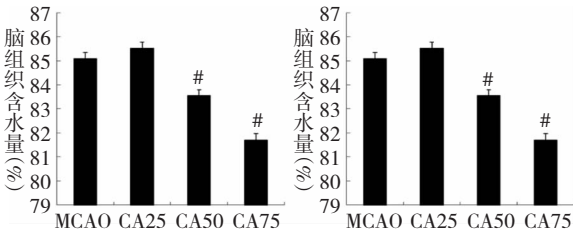


图 1 桂皮醛对脑组织含水量的影响
注: # 为与 MCAO 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 桂皮醛对局灶性脑缺血小鼠脑梗死体积的影响

MCAO 组缺血脑组织 TTC 染色出现大范围苍白色梗死区域。与 MCAO 组相比,给予桂皮醛干预后 (50 mg/kg),小鼠脑梗死体积明显缩小,CA50 组 vs. MCAO 组: 0.45 ± 0.06 vs. 0.54 ± 0.02 , $P < 0.05$,差异有统计学意义 (见图 2)。

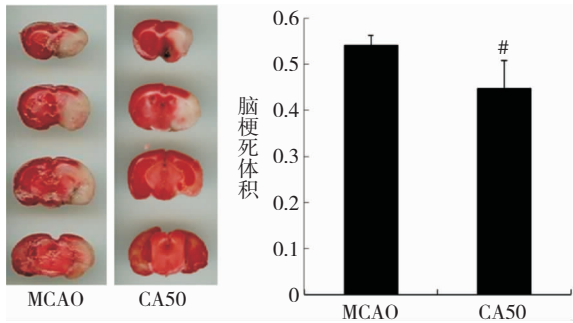


图 2 桂皮醛对脑梗死体积的影响

注: A: TTC 染色示脑梗死处为苍白色; B: 两组脑梗死体积柱形图; # 为与 MCAO 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 桂皮醛对 TLR6、TRAF6 及 NF- κ B 蛋白和基因表达的影响

2.4.1 桂皮醛降低 TLR6、TRAF6 及胞核 NF- κ B 的蛋白表达 脑缺血后 24 h,与 MCAO 组 (TLR6: 0.19 ± 0.03 ; TRAF6: 0.67 ± 0.07 ; 胞核 NF- κ B: 0.46 ± 0.06) 相比,CA50 组 TLR6、TRAF6 及胞核 NF- κ B 蛋白表达明显下降 (TLR6: 0.12 ± 0.01 ; TRAF6: 0.45 ± 0.09 ; 胞核 NF- κ B: 0.32 ± 0.06),差异具有统计学意义,均 $P < 0.05$ 。见图 3A-图 3C。

2.4.2 桂皮醛降低 TLR6、TRAF6 及 NF- κ B 的 mRNA 水平 与 MCAO 组 (TLR6: 6.32 ± 0.07 ; TRAF6: 3.33 ± 0.48 ; NF- κ B: 4.21 ± 0.57) 相比,CA50 组 TLR6、TRAF6 及 NF- κ B mRNA 水平明显减低 (TLR6: 3.26 ± 0.03 ; TRAF6: 1.88 ± 0.21 ; NF- κ B: 1.47 ± 0.33),差异有统计学意义,均 $P < 0.05$ 。见图 4A-图 4C。

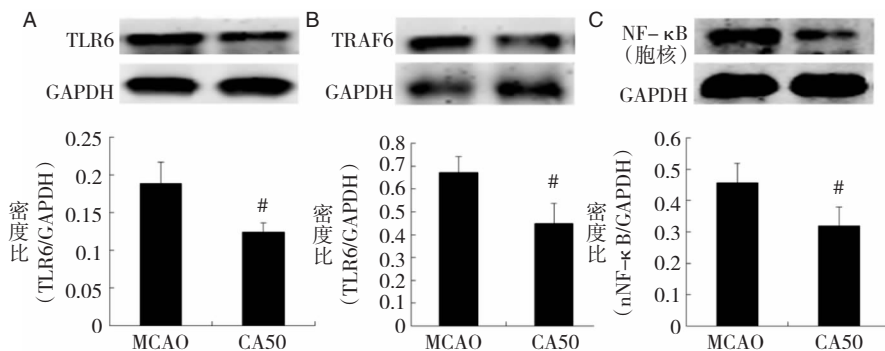


图3 桂皮醛对TLR6、TRAF6及胞核NF-κB蛋白表达的影响

注:A:TLR6蛋白电泳图及与GAPDH密度比;B:TRAF6蛋白电泳图及与GAPDH密度比;C:胞核NF-κB蛋白电泳图及与GAPDH密度比;#为与MCAO组比较, $P < 0.05$ 。

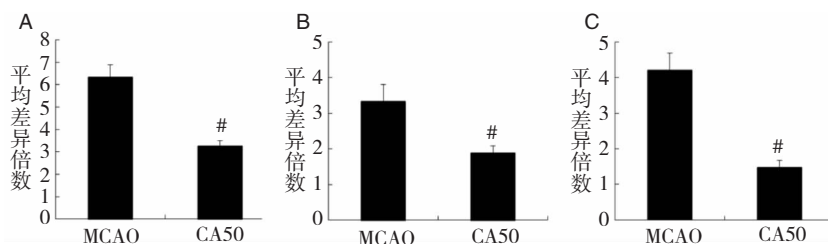


图4 桂皮醛对TLR6、TRAF6及NF-κB基因表达的影响

注:A:两组TLR6 mRNA平均差异倍数;B:两组TRAF6 mRNA平均差异倍数;C:两组NF-κB mRNA平均差异倍数;#为与MCAO组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

TLRs作为模式识别受体,通过激活TLRs信号通路诱导炎症介质的释放,发挥其促炎作用^[14]。TLRs信号转导通路主要由两条胞内信号传导途径介导:髓样分化因子88(myeloid differentiation protein 88, MyD88)依赖型途径及MyD88非依赖型途径。细胞膜表面的TLRs胞外段被相应的配体激活后,TLRs胞内段招募胞浆内的接头蛋白MyD88,MyD88的氨基末端死亡结构域与白介素受体相关激酶(IL-1 receptor-associated kinase, IRAK)的死亡结构域相互作用,导致IRAK的磷酸化。并转而与肿瘤坏死因子受体相关分子6(TNF receptor associated factor6, TRAF6)形成复合物。TRAF6激活活化激酶1(activated kinase 1, TAK1),TAK1进一步激活IκB激酶(IκB kinase, IKK)复合体和活化有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)。激活IKK复合体导致IκBα磷酸化降解,被解除抑制的核转录因子NF-κB转位入核,从而最终诱导炎症介质的表达(如TNF-α和IL-1β)。激活MAPK可以导致转录因子AP-1的活化,并诱导其他炎症介质的释放(如MMPs)^[15-17]。在TLRs介导的信号

转导途径中,TRAF6同时介导了MyD88依赖和非依赖信号通路,位于NF-κB和MAPKs信号通路的交叉点,且TRAF6介导的炎症信号通路与血管闭塞性疾病密切相关^[18,19]。

已有研究证实TLRs/TRAF6/NF-κB信号通路缺血后继发性脑损伤及炎症反应密切相关^[6, 20-22]。因此,TLRs/TRAF6/NF-κB炎症信号通路就成为研究缺血性脑卒中治疗的重要靶点。

在心肌缺血的动物模型中,桂皮醛通过抗炎发挥心脏保护作用^[7]。桂皮醛还能够通过抑制TLR6信号通路从而抑制果糖介导的心脏炎症反应及纤维化^[8]。

本研究显示桂皮醛能够通过改善神经功能评分,减轻脑组织含水量并减小脑梗死体积,进而对局灶性脑缺血小鼠发挥脑保护作用,在分子生物学试验中发现桂皮醛降低TLR6、TRAF6及NF-κB的mRNA水平,同时下调TLR6、TRAF6及胞核NF-κB蛋白的表达,因此,我们推测桂皮醛的脑保护作用可能与其抑制TLR6/TRAF6/NF-κB通路相关蛋白表达相关。当然,我们也不否认桂皮醛可能通过作用于其他完全不同的信号通路发挥其抗炎及脑保护作用,因此,仍然需要对其脑保护作用机制做出

更为深入的研究。TRAF6 已经被证实 在脑缺血的病理生理机制中发挥作用^[23,24],而本研究也显示桂皮醛降低了脑缺血后 TRAF6 在脑组织的表达,这也进一步揭示 TRAF6 和缺血性脑损伤有着紧密联系,其可能成为独立的作用靶点在缺血性脑损伤中发挥重要作用,不过关于 TRAF6 和缺血性脑卒中甚至炎症相关疾病的关系,仍然需要更为深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Kleinig TJ, Vink R. Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options[J]. *Curr Opin Neurol*, 2009, 22 (3): 294-301.
- [2] Dong L, Qiao H, Zhang X, et al. Parthenolide is neuroprotective in rat experimental stroke model: down-regulating NF- κ B, phospho-p38 MAPK, and caspase-1 and ameliorating BBB permeability [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 370804.
- [3] 丁妹,曹志勇,李胜利,等.不同炎症反应在脑梗死与短暂性脑缺血发作患者中表达及意义研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2017, 44 (3): 280-284.
- [4] 张秀萍,翟凤国,梁启超,等.脑缺血时半乳糖凝集素-3 对大鼠脑皮质中 bcl-2、BAX 及 caspase-3 表达的影响[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2017, 44 (4): 375-378.
- [5] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev*, 2001, 1 (2): 135-145.
- [6] Zhang J, Fu B, Zhang X, et al. Neuroprotective effect of bicyclol in rat ischemic stroke: Down-regulates TLR6, TLR9, TRAF6, NF- κ B, MMP-9 and up-regulates claudin-5 expression [J]. *Brain Res*, 2013, 1528: 80-88.
- [7] Hwa JS, Jin YC, Lee YS, et al. 2-methoxycinnamaldehyde from *Cinnamomum cassia* reduces rat myocardial ischemia and reperfusion injury in vivo due to HO-1 induction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139 (2): 605-615.
- [8] Kang LL, Zhang DM, Ma CH, et al. Cinnamaldehyde and allopurinol reduce fructose-induced cardiac inflammation and fibrosis by attenuating CD36-mediated TLR4/6-IRAK4/1 signaling to suppress NLRP3 inflammasome activation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27460.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [10] Cheatwood JL, Emerick AJ, Schwab ME, et al. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat [J]. *Stroke*, 2008, 39 (7): 2091-2098.
- [11] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17 (3): 472-476.
- [12] Hatashita S, Hoff JT, Salamat SM. Ischemic brain edema and the osmotic gradient between blood and brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988, 8 (4): 552-559.
- [13] Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, et al. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (26): 16657-16662.
- [14] Akira S. TLR signaling [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 311: 1-16.
- [15] Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling [J]. *Nature*, 2010, 465 (7300): 885-890.
- [16] Huxford T, Hoffmann A, Ghosh G. Understanding the logic of I κ B: NF- κ B regulation in structural terms [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 349: 1-24.
- [17] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature*, 2000, 406 (6797): 782-787.
- [18] Miyahara T, Koyama H, Miyata T, et al. Inflammatory signaling pathway containing TRAF6 contributes to neointimal formation via diverse mechanisms [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64 (1): 154-164.
- [19] Liu X, Cao H, Li J, et al. Autophagy induced by DAMPs facilitates the inflammation response in lungs undergoing ischemia-reperfusion injury through promoting TRAF6 ubiquitination [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24 (4): 683-693.
- [20] Fan H, Li L, Zhang X, et al. Oxymatrine downregulates TLR6, TLR2, MyD88, and NF- κ B and protects rat brains against focal ischemia [J]. *Mediators of Inflamm*, 2009, 2009: 704706.
- [21] Qiao H, Zhang X, Zhu C, et al. Luteolin downregulates TLR4, TLR6, NF- κ B and p-p38 MAPK expression, upregulates the p-ERK expression, and protects rat brains against focal ischemia [J]. *Brain Res*, 2012, 1448: 71-81.
- [22] 尤晓欣,裴建. Toll 样受体信号通路与缺血性中风炎症反应机制的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41 (2): 138-141.
- [23] Li M, Li H, Fang F, et al. Astragaloside IV attenuates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in mice via anti-inflammatory mechanisms [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 639: 114-119.
- [24] Chen G, Ye X, Zhang J, et al. Limb Remote Ischemic Post-conditioning Reduces Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NADPH Oxidase Activation and MyD88-TRAF6-P38 MAPK Kinase Pathway of Neutrophils [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (12): pii: E1971.