

没食子酸丙酯对脑缺血大鼠神经元 SAPK/JNK 及 p38MAPK 激活的抑制作用

郑关毅¹, 陈晓春^{1*}, 杜建², 刘昌云¹, 方芳¹, 张静¹, 黄天文¹, 曾育琦¹

(1. 福建医科大学 附属协和医院 福建省老年医学研究所, 福建 福州 350001; 2. 福建中医学院, 福建 福州 350003)

摘要: 目的 探讨没食子酸丙酯对大鼠脑缺血再灌注模型缺血区周边组织神经元损伤的保护作用及其可能机制。方法 通过 Nissl 和 TUNEL 染色法检测阳性神经元数量, 蛋白免疫印迹、免疫组化法观察活化型 Caspase-3, SAPK/JNK, p38MAPK 及其磷酸化组分的表达。结果 没食子酸丙酯干预后, SAPK/JNK, p-SAPK/JNK (1 h), p38MAPK, p-p38MAPK (6 h) 及活化型 Caspase-3 (12 h) 表达均减弱, TUNEL 阳性神经元减少 (24 h), Nissl 阳性神经元增多 (24 h), 神经元凋亡率明显降低。结论 没食子酸丙酯保护缺血再灌注后神经元损伤的机制可能与抑制 SAPK/JNK 及 p38MAPK 的激活有关。

关键词: 没食子酸丙酯; 脑缺血再灌注; 磷酸化; 应激活化蛋白激酶 /c-Jun 氨基末端激酶; p38 MAP 激酶; 神经元凋亡

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2006)06 - 0548 - 07

Inhibitory action of propyl gallate on the activation of SAPK/JNK and p38MAPK induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats

ZHENG Guan-yi¹, CHEN Xiao-chun^{1*}, DU Jian², LIU Chang-yun¹, FANG Fang¹,
ZHANG Jing¹, HUANG Tian-wen¹, ZENG Yu-qi¹

(1. Fujian Institute of Geriatrics, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;

2. Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Aim To explore the protective effect of propyl gallate against neuronal injury in the boundary zone of the infarction area in the rat cerebral ischemia-reperfusion model and its possible mechanism. **Methods** Transient focal ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in the rats was established by ligation of the left internal carotid artery for 2 h. Rats were treated by propyl gallate with different doses (23.5, 47 and 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) for three days before operation. Coronal brain sections were collected after 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h of reperfusion, neuronal injury in the boundary zone of the infarction area was evaluated by TUNEL and Nissl staining. The expression of activated Caspase-3, total SAPK/JNK, p38MAPK and their phosphorylation ($\text{Thr}^{183}/\text{Tyr}^{185}$, $\text{Thr}^{180}/\text{Tyr}^{182}$) was investigated by immunohistochemistry and Western blotting with corresponding antibodies. **Results** Although SAPK/JNK immunoreactivity did not increase at each time point in the boundary zone of the infarction area after reperfusion, p-SAPK/JNK immunoreactivity increased significantly at 1 h and then decreased gradually, and p38MAPK immunoreactivity was enhanced at each time point, peaked at 6 h. Expression of p-p38MAPK peaked at 6 h. Activated Caspase-3 immunoreactivity appeared at 6 h in the boundary zone of the infarction area and peaked at 12 h. TUNEL positive neurons were observed at 12 h and became more abundant at 24 h. The number of Nissl positive neurons decreased gradually and apoptosis ratio of neurons peaked at 24 h. Propyl gallate reduced the immunoreactivity of SAPK/JNK, p-SAPK/JNK, p38MAPK and

收稿日期: 2005-09-19.

* 通讯作者 Tel: 86 - 591 - 83377664, Fax: 86 - 591 - 83370393, E-mail: xc-chen329@sohu.com

p-p38MAPK markedly at 1 and 6 h. Propyl gallate with doses of 47 and 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ were more effective. **Conclusion** Inhibition on the activation of SAPK/JNK and p38MAPK is the possible protective mechanism of propyl gallate against neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion.

Key words: propyl gallate; cerebral ischemia-reperfusion; phosphorylation; stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase; p38 mitogen-activated protein kinase; neuronal apoptosis

脑缺血 缺血再灌注导致神经元损伤的分子机制的途径尚未明确,但神经元凋亡与缺血周边组织复杂的信号转导通路激活有密切关系。近来研究表明,丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPK)在其中起着重要的作用^[1,2]。没食子酸丙酯(propyl gallate, PG)系活血化瘀中药赤芍的主要有效成分没食子酸的酯化衍生物^[3],除具有抗血小板聚集^[3]及扩张血管^[4]等作用外,还是较强的抗氧化剂^[3],可提高脑缺血再灌注模型大鼠脑组织 SOD, GSH-Px和 CAT活性,降低 MDA含量,保护脑组织 Na⁺/K⁺-ATP酶活性,有效地抑制脑水肿^[5];能显著地降低血黏度,增加缺血区的脑血流速度,改善脑梗死患者的神经功能缺损状态^[6,7]。这些研究结果均提示,PG对防治脑缺血再灌注损伤可能有较好的应用前景,但其抗脑缺血再灌注后氧化应激损伤所涉及的信号转导机制,至今未见报道。因此本研究建立大鼠大脑中动脉阻塞模型,结合 Nissl和 TUNEL染色法、免疫组织化学、蛋白免疫印迹等技术,探讨没食子酸丙酯保护缺血性神经元损伤的作用及其与抑制 SAPK/JNK及 p38MAPK激活的关系。

材料和方法

实验动物 成年雄性 SD大鼠,体重 250~270 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。

试剂及抗体 注射用没食子酸丙酯粉针剂由福建省闽东力捷迅药业有限公司提供,使用前溶于丙二醇,分别配成 3种终浓度为 23.5, 47和 94 mmol·L⁻¹的溶液。兔多克隆抗体 SAPK/JNK, p-SAPK/JNK(Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵)和多克隆抗体 p38MAPK、鼠单克隆抗体 p-p38MAPK(Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²)均购自 Cell Signaling公司;兔多克隆抗体活化型 Caspase-3购自 BioVision公司,鼠单克隆抗体 Pan-actin抗体购自 Data Sheet公司;免疫组织化学染色试剂盒购自 Lab Vision公司,Western blotting试剂盒为 KPL公司产品。

动物模型的建立与分组 模型制作采用白色、直径 0.23 mm的日本进口尼龙鱼线,在插入端蘸聚酯成光滑纺锤状,在距插入端 18 mm处作标记。用

2%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔麻醉,取颈部正中切口,分离暴露左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),电凝 ECA分支,结扎并游离 ECA主干远端,将栓线从 ECA残端起始部插入,插入深度距 CCA分叉处约(18±0.5) mm,遇阻力即停止进线,固定栓线结扎缝合。2 h后回抽栓线使其头端回到 ECA内,恢复灌注。实验随机分成对照组(不作任何处理,6只)、假手术组(手术过程同造模,但不插入栓线,6只)、模型组(分成缺血 2 h分别再灌注 1, 2, 4, 6, 12和 24 h等 6个亚组,每组各 6只)等 6组。治疗组(术前每日腹腔注射没食子酸丙酯,连续 3 d,插入栓线后再注射 1次,分 1, 2, 4, 6, 12和 24 h等 6个亚组,每组分 23.5, 47和 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量,每种剂量各 6只)、溶剂组(腹腔注射等体积溶剂,其余处理同治疗组,按上述时段分 6个亚组,每组各 6只)。

标本的收集 根据分组不同,模型组、溶剂组、治疗组分别于缺血 2 h再灌注 1, 2, 4, 6, 12和 24 h收取标本。用于 Nissl和 TUNEL染色及免疫组织化学的标本,4%多聚甲醛固定后包埋,行冠状切片,片厚约 4 μm 。用于蛋白免疫印迹的脑组织冠状切片标本,小心剥离缺血灶周边组织,按 1:9加入匀浆缓冲液研磨成组织匀浆,15 000×g离心 30 min,取上清液置 -20℃冰箱贮存备用。

Nissl染色 组织切片经脱蜡,逐级乙醇脱水及水洗后,加入缓冲亚甲蓝染液 10 min,0.2 mol·L⁻¹乙酸盐缓冲液(pH 4.6)分色 2 min,阳性染色者胞核淡染,胞浆呈蓝色,即存活神经元。

TUNEL染色 切片常规脱蜡,细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,产品编号:MK1022,按说明书操作,BCIP/NBT显色,核快红复染,甘油封片。细胞核中有紫蓝色颗粒者为阳性细胞。

免疫组织化学染色 切片常规脱蜡,3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶 10 min,一抗(SAPK/JNK 1:400, p-SAPK/JNK 1:400, p38MAPK 1:400, p-p38MAPK 1:400,活化型 Caspase-3 1:100) 4℃过夜,生物素标记的二抗和 SABC试剂各在室温下作

用 60 min,最后用 DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、中性树胶封固。PBS代替一抗作阴性对照。阳性者胞浆和突起呈棕黄色。

蛋白免疫印迹 提取的匀浆标本用 Bradford法进行蛋白定量。取等量样品,加入等体积的 2 × 上样缓冲液混匀,在 100 °C沸水中煮 120 s,以 10% (SAPK/JNK, p-SAPK/JNK, p38MAPK及 p-p38MAPK)和 15% (活化型 Caspase-3) SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,分离的蛋白用半干电转移法转移到 PVDF膜,室温下用封闭液封闭 1 h后加入用封闭液稀释的 (1:1 000)一抗 4 °C过夜;洗液 3 × 5 min,1 × 10 min;HRP标记的二抗 (1:1 000稀释)孵育 2 h,用化学发光法显色,X射线底片曝光。以 β -actin为内参照。实验重复 3次。

统计学处理 阳性细胞计数:每例阳性细胞数为在高倍镜下计数缺血区周边组织 5个非连续视野阳性细胞数之和,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0软件包进行单因素方差分析,方差齐者组间比

较用 LSD检验,方差不齐者用 Games-Howell检验, $P < 0.05$ 为差别有显著意义。

结果

1 没食子酸丙酯对脑缺血再灌注后 SAPK/JNK 和 p38MAPK激活的影响

1.1 蛋白免疫印迹 如图 1所示,SAPK/JNK包含 46 kD(下)和 54 kD(上)两条带,模型组再灌注后 4和 12 h,其条带密度略有降低,再灌注后 1 h,46 kD的 p-SAPK/JNK密度明显增高,随时间的延长密度逐渐降低;模型组自再灌注 1 h起,p38MAPK条带密度明显增高,于 6 h达到高峰,p-p38MAPK条带密度亦于同期增高。没食子酸丙酯干预组在不同的时段均可观察到:随着剂量的增加,SAPK/JNK, p-SAPK/JNK, p38MAPK和 p-p38MAPK条带密度有降低的趋势,以 $94 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 较明显,说明没食子酸丙酯能抑制再灌注后 SAPK/JNK, p38MAPK及其磷酸化组分蛋白的表达。

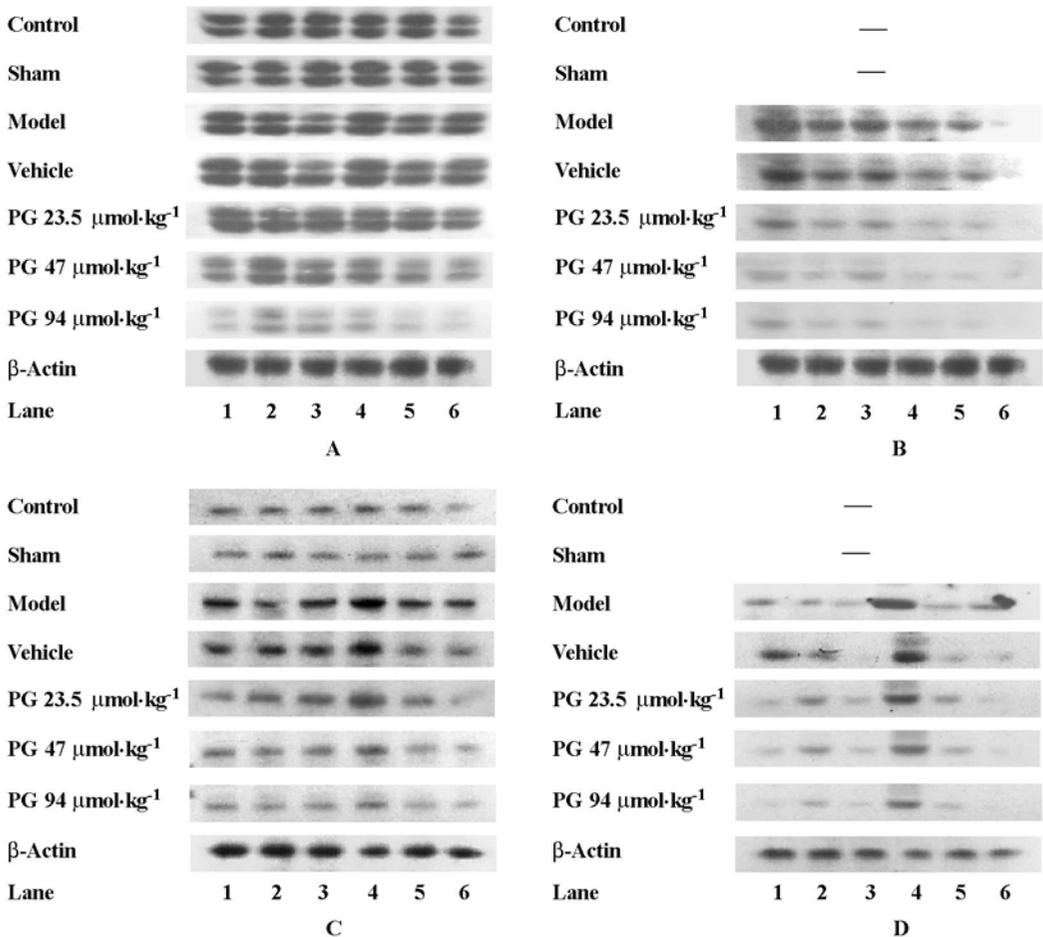


Figure 1 Effect of propyl gallate (PG) on expression of total SAPK/JNK, p38MAPK and their phosphorylation. Lane 1 - 6: 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h. A: SAPK/JNK; B: p-SAPK/JNK; C: p38MAPK; D: p-p38MAPK

1.2 免疫组织化学 没食子酸丙酯干预组的 SAPK/JNK, p-SAPK/JNK(1 h,图 2), p38MAPK和 p-

p38MAPK(6 h,图 3)表达均较模型组弱,以 47和 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组较明显,阳性神经元计数结果见表 1。

Table 1 Effect of propyl gallate (PG) on number of total SAPK/JNK, p38MAPK and their phosphorylation positive cells

Group	Number of positive cells			
	SAPK/JNK	p-SAPK/JNK	p38MAPK	p-p38MAPK
Control	89.2 ± 5.6	-	64.5 ± 5.5	-
Sham	88.0 ± 4.9	-	66.5 ± 5.9	-
Model	88.8 ± 6.7	87.7 ± 5.6	96.7 ± 6.0	62.0 ± 6.5
Vehicle	88.0 ± 6.4	86.0 ± 4.1	92.5 ± 7.7	62.7 ± 8.2
PG 23.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	89.7 ± 8.1	62.7 ± 7.7	73.8 ± 7.0	51.2 ± 6.2
47 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	64.0 ± 5.5**	52.2 ± 7.8**	58.7 ± 6.2	37.2 ± 4.2**
94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	64.5 ± 8.7**	49.8 ± 7.4**	48.7 ± 5.6**	36.3 ± 3.4**

$n = 6, \bar{x} \pm s. ** P < 0.01$ vs model

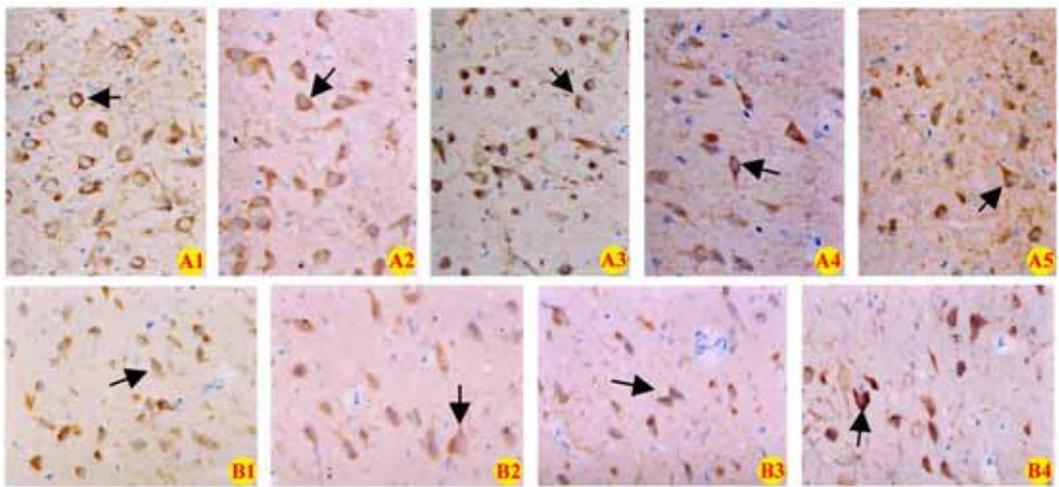


Figure 2 Immunohistochemistry of rat coronal brain sections (caudate putamen) with SAPK/JNK (A) and p-SAPK/JNK (B) antibody at 1 h ($\times 400$). The arrows head point to the positive neuron. A1: Sham; A2, B1: Model; A3 - A5, B2 - B4: Propyl gallate (23.5, 47 and 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

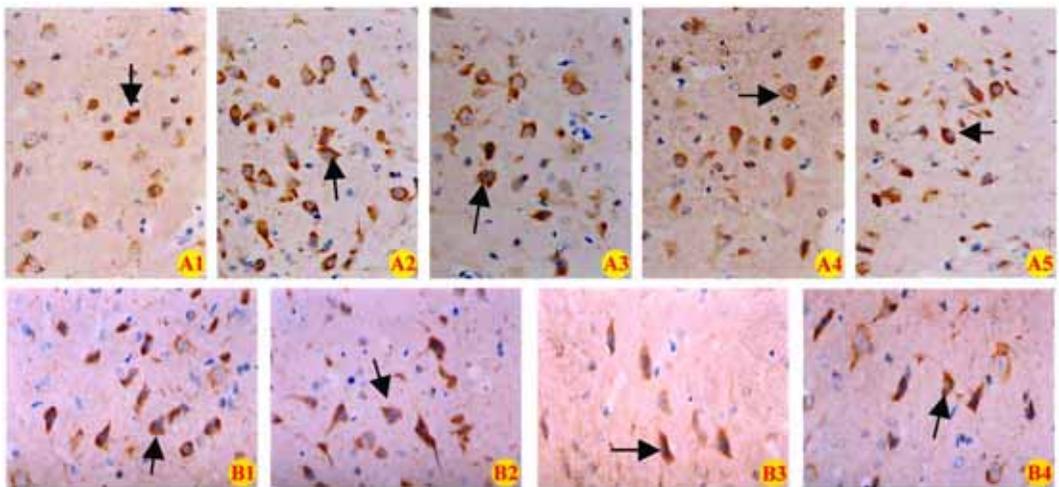


Figure 3 Immunohistochemistry of rat coronal brain sections (caudate putamen) with p38MAPK (A) and p-p38MAPK (B) antibody at 6 h ($\times 400$). The arrows head point to the positive neuron. A1: Sham; A2, B1: Model; A3 - A5, B2 - B4: Propyl gallate (23.5, 47 and 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

2 没食子酸丙酯对脑缺血再灌注后神经元凋亡的影响

2.1 活化型 Caspase-3 蛋白免疫印迹 模型组于再灌注后 6 h 开始表达, 12 h 其条带密度明显增高, 24 h 密度降低, 以没食子酸丙酯干预后, 条带密度明显降低 (图 4), 说明没食子酸丙酯能抑制再灌注后活化型 Caspase-3 蛋白的表达。

2.2 活化型 Caspase-3 免疫组织化学 如图 5A 所示, 模型组 12 h 时段缺血区周边组织活化型 Caspase-3 阳性神经元较为密集; 没食子酸丙酯干预组随着剂量的增加, 其阳性神经元数明显减少, 以 47 和 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 最明显, 阳性神经元计数结果见表 2。

2.3 TUNEL 及 Nissl 染色 模型组 24 h 时段 TUNEL 阳性神经元较为密集, 未着色的神经元结构不清, 有的呈空泡样变性, 没食子酸丙酯干预组背景神经元结构较模型组清晰, 同时 TUNEL 阳性神经元有所减少, 以 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 较明显 (图 5B); 模型组缺血区周边组织 24 h 时段 Nissl 阳性神经元较少, 没食子酸丙酯干预组 24 h 时段阳性神经元数明显增多, 神经元凋亡率 (TUNEL 阳性神经元数 / TUNEL 阳性神经元数 + Nissl 阳性神经元数) 均有不同程度降低, 以 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 较明显 (图 5C), TUNEL 及 Nissl 阳性神经元计数结果如表 2 所示, 结果提示, 没食子酸丙酯对缺血区周边组织神经元具有保护作用。

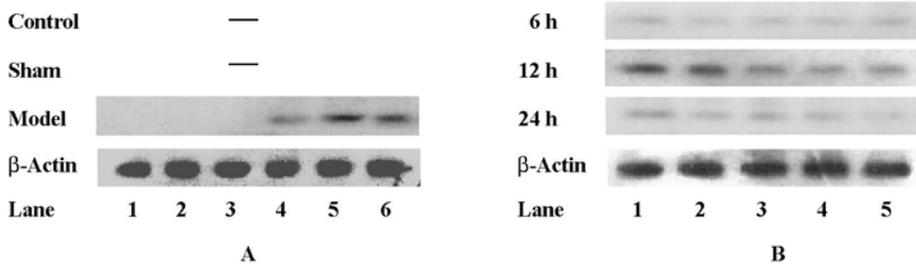


Figure 4 Western blotting of activated Caspase-3 protein. Activated Caspase-3 immunoreactivity appeared at 6 h and peaked at 12 h (A). Propyl gallate treatment reduced the expression of activated Caspase-3 (B). (A) Lane 1 - 6: 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h; (B) Lane 1: Model; Lane 2: Vehicle; Lane 3 - 5: Propyl gallate (23.5, 47 and 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

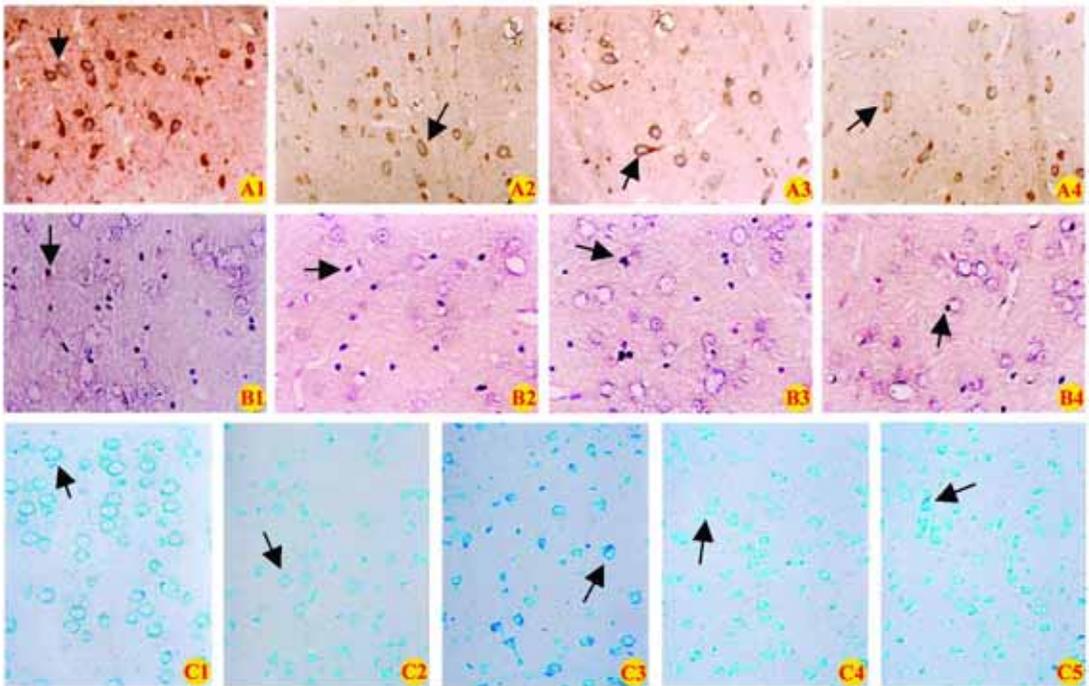


Figure 5 Effect of propyl gallate on neuronal apoptosis after reperfusion ($\times 400$). Immunohistochemistry of rat coronal brain sections (caudate putamen) with activated Caspase-3 antibody at 12 h (A). TUNEL staining of rat coronal brain sections (caudate putamen) at 24 h (B). Nissl staining of rat coronal brain sections (caudate putamen) at 24 h (C). The arrows head point to the positive neuron. C1: Sham; A1, B1, C2: Model; A2 - A4, B2 - B4, C3 - C5: Propyl gallate (23.5, 47 and 94 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Table 2 Effect of propyl gallate (PG) on neuronal apoptosis after reperfusion

Group	Number of positive cells			Apoptosis ratio/%
	Activated Caspase-3	TUNEL	Nissl	
Control	-	-	143.5 ± 10.8	-
Sham	-	-	146.7 ± 9.1	-
Model	63.7 ± 7.0	52.7 ± 5.6	94.3 ± 5.6	35.9 ± 2.8
Vehicle	65.7 ± 6.7	54.3 ± 7.4	95.5 ± 6.7	36.5 ± 2.7
PG 23.5 μmol·kg ⁻¹	69.0 ± 5.3	46.0 ± 5.8	90.0 ± 6.3	37.0 ± 2.3
47 μmol·kg ⁻¹	55.7 ± 5.4	49.3 ± 5.1	120.0 ± 10.4**	19.0 ± 2.4**
94 μmol·kg ⁻¹	46.0 ± 5.2**	26.3 ± 4.7**	122.3 ± 9.2**	16.3 ± 2.2**

$n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs model

讨论

JNK由 JNK1, JNK2和 JNK3等 3种不同的基因编码构成,分子质量分别为 46和 54 kD, 46 kD JNK包含 JNK1, JNK2和 JNK3; 54 kD JNK包含 JNK2和 JNK3^[8]。在脑缺血模型中, JNK及上游激酶 MKK4和 MKK7被同步磷酸化激活^[8-10],下游转录因子 c-Jun及 ATF-2活性增高^[11,12],磷酸化 JNK还能激活 Bax,通过线粒体途径诱导神经元凋亡^[9],在脑组织中,由于 JNK1活性占 JNK总活性的 65%, JNK1在脑缺血中可能起重要作用;除 JNK1外,近年来 JNK3的作用逐渐受到重视, JNK3基因缺乏的小鼠磷酸化 54 kD JNK基本消失,而且其磷酸化 c-Jun水平明显低于野生型,缺血后脑损伤也明显较之为轻; JNK2的作用则较次^[8]。脑缺血时,磷酸化 p38MAPK亦明显增高,磷酸化 p38MAPK除激活 ATF-2外^[11],还能直接调节下位激酶 MAPKAP2,参与调节促炎症细胞因子的表达^[13]。本研究观察到,再灌注后 4和 12 h, SAPK/JNK蛋白印迹条带密度较低,其余各时段并无明显差异; p-SAPK/JNK再灌注后 1 h时段表达较强,而后开始逐渐减弱,到 24 h时段则基本消失,表达以 46 kD的 p-SAPK/JNK1为主, 54 kD的 p-SAPK/JNK2较弱,说明 SAPK/JNK总量并无增加,但 SAPK/JNK1基本磷酸化激活,其早期表达增强与缺血再灌注后应激反应有关, SAPK/JNK3的激活需 Thr²²¹/Tyr²²³位点磷酸化^[14],因此, SAPK/JNK3在研究中的作用还有待进一步研究;缺血后 p38MAPK各时段表达均明显增加,高峰在 6 h时段, p-p38MAPK再灌注后 1 h表达较强,高峰时间亦在 6 h时段,其余各时段较弱,说明 p38MAPK总量及磷酸化 p38MAPK均有明显增加。作者以不同剂量的没食子酸丙酯干预后,在不同的时段均可观察到,随着剂量的增加, SAPK/JNK, p38MAPK及其磷酸化组分条带密度有降低的趋势;免疫组织化学

研究表明,模型组及溶剂组再灌注后 1和 6 h,缺血区周边组织 SAPK和 p38MAPK阳性神经元数明显多于对照组及假手术组 ($P < 0.01$),没食子酸丙酯干预各剂量组的 SAPK/JNK, p38MAPK及其磷酸化组分阳性神经元数均少于模型组及溶剂组 ($P < 0.01$),以 47及 94 μmol·kg⁻¹的剂量较明显,说明没食子酸丙酯能抑制再灌注后 SAPK/JNK和 p38MAPK的激活。

作者在研究中还观察到,模型组自再灌注 6 h,活化型 Caspase-3蛋白条带密度逐渐增高, 24 h其密度明显降低,以不同剂量的没食子酸丙酯干预后, 12 h时段蛋白条带密度明显降低,其缺血区周边组织阳性神经元数亦明显较模型组及溶剂组少 ($P < 0.01$), 24 h时段 TUNEL阳性神经元数明显减少,而 Nissl阳性神经元明显增多,同期神经元凋亡率明显降低,以 94 μmol·kg⁻¹作用为著,说明没食子酸丙酯能抑制再灌注后 Caspase-3的激活导致的神经元凋亡。

本研究表明,再灌注 1 h时段 p-p38MAPK的表达较弱, 6 h时段 p38MAPK及 p-p38MAPK的表达明显增高,而 p-SAPK/JNK 1 h时段表达较强,而后减弱, 24 h基本消失,其中并无高峰出现, 6 h时段开始出现活化型 Caspase-3阳性神经元,于 12 h达到高峰,同时在缺血区周边组织出现神经元凋亡。作者推测 p-p38MAPK可能通过激活 Caspase-3诱导神经元凋亡,但亦不能排除 p-SAPK/JNK在其中的作用,而没食子酸丙酯保护缺血性神经元损伤的机制可能与抑制 SAPK/JNK及 p38MAPK的激活有关。

尽管目前对没食子酸丙酯的化学结构、生物学效应、临床功效等都有了较深入的研究,但其作用的体内靶点和分子机制仍不清楚。由于没食子酸丙酯有较强的抗氧化作用,其抗脑缺血再灌注损伤的机

制可能与减轻氧化应激对 SAPK/JNK 及 p38MAPK 的激活有关。

References

- [1] Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 631 - 647.
- [2] Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2001, 23: 1 - 19.
- [3] Jiang YR, Yin HJ, Chen KJ. Current status of propyl gallate [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医结合杂志)*, 2004, 24: 760 - 763.
- [4] Li J, Wu BY, Jiang YR, et al. Study on interaction of Radix Paeoniae 801 and endothelin-1 by using a piezoelectric quartz crystal biosensor [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med (中国中西医结合杂志)*, 2004, 24: 714 - 716.
- [5] Chen XX, He B. Protection of propyl gallate against lipid peroxidation induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2000, 17: 261 - 263.
- [6] Li YM. The review of Tongmaizhi injection on the acute cerebral infarction [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志)*, 2002, 9: 7 - 8.
- [7] Li Z, Liu Y, Wang YM. Clinical observation of Tongmaizhi injection in treatment of acute cerebral infarction [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care (中国中西医结合急救杂志)*, 2002, 9: 112 - 114.
- [8] Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, et al. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15184 - 15189.
- [9] Okuno S, Saito A, Hayashi T, et al. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 7879 - 7887.
- [10] Zhang Q, Tian H, Fu X, et al. Delayed activation and regulation of MKK7 in hippocampal CA1 region following global cerebral ischemia in rats [J]. *Life Sci*, 2003, 74: 37-45.
- [11] Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, et al. Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2003, 105: 425 - 437.
- [12] Gillardon F, Spranger M, Tiesler C, et al. Expression of cell death-associated phospho-c-Jun and p53-activated gene 608 in hippocampal CA1 neurons following global ischemia [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 73: 138 - 143.
- [13] Wang XK, Lin X, Wang H. Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 43968 - 43972.
- [14] Haddad JJ. Hypoxia and the regulation of mitogen-activated protein kinases: gene transcription and the assessment of potential pharmacologic therapeutic interventions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4: 1249 - 1285.