

大黄酚对 $A\beta_{1-42}$ 致阿尔茨海默症大鼠学习记忆及海马 CA1 区组织 JNK 通路的影响

林小玲¹, 柯维强¹, 唐文军^{2*}, 闫其星¹

(1. 海南医学院第二附属医院药学部, 海南 海口 570311; 2. 海南医学院第二附属医院肿瘤内科, 海南 海口 570311)

摘要: **目的** 观察大黄酚对阿尔茨海默症大鼠学习、记忆能力的影响, 并探讨对大鼠海马 CA1 区组织 c-JUN 氨基末端激酶 (JNK) 通路的调控作用。**方法** 70 只 SD 大鼠采用 $A\beta_{1-42}$ 脑内注射法建立阿尔茨海默症模型, 随机分为正常组、模型组、阳性药组及大黄酚低、中、高剂量组。第 7 天开始, 阳性药组予以多奈哌齐 0.33 mg/kg, 低、中、高剂量组予以大黄酚 0.007、0.014、0.028 mg/kg; 模型组和正常组均予以等容量生理盐水, 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 3 周。Morris 水迷宫实验评价大鼠学习、记忆能力, HE 染色观察大鼠海马 CA1 区组织病理改变, TUNEL 染色检测大鼠海马 CA1 区组织神经元凋亡情况, RT-qPCR 检测大鼠海马 CA1 区组织 JNK、c-JUN、caspase12 mRNA 表达, 蛋白质免疫印迹法检测大鼠海马 CA1 区组织 JNK、p-JNK、c-JUN、p-c-JUN、caspase12 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠学习、记忆能力变差, 海马 CA1 区组织病理严重改变, 细胞凋亡率升高、JNK、c-JUN、caspase12 mRNA 与蛋白表达及 p-JNK、p-c-JUN 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性药组和大黄酚各剂量组上述指标均有改善 ($P < 0.05$), 其中阳性药组和大黄酚中剂量组作用相近, 且高剂量组作用最佳。**结论** 大黄酚可改善阿尔茨海默症大鼠学习、记忆能力, 减轻海马组织 CA1 区病变, 减少细胞凋亡, 推测与抑制 JNK 通路激活有关。

关键词: 大黄酚; 阿尔茨海默症; 学习能力; 记忆能力; c-JUN 氨基末端激酶 (JNK)

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1977-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.046

阿尔茨海默症属于一种常见的中枢神经退行性疾病, 多发生于老年前期和老年期, 以进行性加重性认知功能障碍和行为改变为基本特征。我国 65 岁以上人群阿尔茨海默症的患病率约为 5.9%, 其中每年约有 30 万新增病例, 中重度病情占比约为 67%, 且患病率逐年增加^[1]。多奈哌齐是阿尔茨海默症患者常用的治疗药物, 属于可逆性乙酰胆碱酯酶抑制剂, 选择性高, 可减轻临床症状, 但可能由于作用靶点单一, 其综合效果不甚理想^[2]。

大黄酚可抗菌消炎、止咳, 还可促使神经兴奋, 与多奈哌齐联用可有效防治阿尔茨海默症, 改善行为学^[3]。c-JUN 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路激活可参与神经系统损伤, 加重认知障碍和行为改变, JNK 底物转录因子 c-JUN 也可参与神经系统损害^[4]。JNK 信号通路在某种因素刺激下被激活, JNK、c-JUN 表达及其磷酸化水平均升高, 激活其下游含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 12 (caspase12) 的表达, 可参与大鼠 CA1 区海马组织神经元凋亡, 推测是通过内质网应激途径实现的, 从而可引起认知损害, 减弱学习、记忆能力, 参与阿尔茨海默症的发生^[5-6]。本研究建立阿尔茨海默症大鼠模型, 研究大黄酚抑

制阿尔茨海默症大鼠 JNK 信号通路激活, 减轻海马 CA1 区组织病理损害作用, 旨在为阿尔茨海默症新药的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 70 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 7~9 周龄, 体质量 180~220 g, 购自凯学生物科技 (上海) 有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2019-0002, 实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2019-0032。

1.2 药品和试剂 $A\beta_{1-42}$ (美国 Sigma 公司, 批号 190213001A); 多奈哌齐 [卫材 (中国) 药业有限公司, 批号 191205112]; 大黄酚 (中国药品生物制品检定所, 批号 110796-201948, 纯度 > 99%)。苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G11021805); 原位末端标记法 (TUNEL) 试剂盒 (瑞士 Roche 公司, 批号 TG190415002C); Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号 YSN190715112); 蛋白提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司, 批号 YT190114A); 兔抗鼠 JNK、c-JUN、磷酸化-JNK (p-JNK)、磷酸化 c-JUN (p-c-JUN)、caspase12 单克隆抗体, 山羊抗兔 JNK、c-JUN、p-JNK、p-c-JUN、caspase12 多克隆

收稿日期: 2020-08-12

基金项目: 海南省自然科学基金 (818MS126)

作者简介: 林小玲 (1987—), 女, 硕士生, 主管药师, 研究方向为临床药学。E-mail: lin_hnzy@sina.com

* 通信作者: 唐文军 (1983—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向为肺癌的早期诊断及治疗。E-mail: 304200886@qq.com.

抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 a191004002、a190715116、a190408315、a190712007、a190617005、a190523001、a190715008、a190512002、a190610004、a190518003)。

1.3 仪器 BW-MWM101 型 Morris 水迷宫 (上海软隆科技发展有限公司); RM2235 型组织切片机 (德国 Leica 公司); H12611 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 7300 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); GelDoc XR Biorad 型凝胶电泳成像系统、E8015-C1 型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 建模与分组 取无菌生理盐水加入 500 μg $\text{A}\beta_{1-42}$, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 7 d, 凝聚后开始建模。取 60 只 SD 大鼠采用 $\text{A}\beta_{1-42}$ 脑内注射法建立阿尔茨海默症模型^[7]。将大鼠麻醉、固定, 采用脑立体定位仪定位, 剪掉大鼠顶部毛发, 常规消毒, 切开皮肤后定位双侧海马区, 将前囟作为基准点, 后移 4.5 mm, 中线旁开移动 2 mm, 钻孔将针头没入 2 mm, 采用微量泵将制备好的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 注入双侧海马区, 10 min 后将针头拔出, 缝合、消毒。术后肌肉注射青霉素 2×10^5 U 预防感染。术后 7 d 观察到建模大鼠有行为障碍 (被动回避反射及水迷宫学习障碍等) 则建模成功。将建模成功大鼠随机分为模型组、阳性药组及大黄酚低、中、高剂量组, 另将 10 只正常 SD 大鼠双侧海马区注射等量无菌生理盐水记为正常组。

2.2 给药 术后第 7 天开始, 阳性药组予以多奈哌齐 0.33 mg/kg, 大黄酚低、中、高剂量组分别予以大黄酚 0.007、0.014、0.028 mg/kg, 药物溶于生理盐水 (*N,N*-二甲基甲酰胺助溶), 灌胃给药体积 1 mL/100 g; 模型组和正常组均予以等容量生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续 3 周。

2.3 Morris 水迷宫实验评价学习、记忆能力 定位航行实验为在水池边缘 55 cm 处将平台固定, 从 4 个不同的方向将大鼠放入水中, 利用跟踪系统记录航行轨迹和时间。在放入水中 120 s 内大鼠可自由寻找固定平台, 若找到可停留 20 s, 将大鼠入水后到爬上平台的时间记为逃避潜伏期 (PLA), 若 120 s 内未找到平台则将 PLA 记为 120 s, 并引导大鼠至平台停留 20 s; 空间探索实验为在完成上述实验后将平台撤去, 从原入水点放入水中, 使其自由游泳 120 s, 记录跨越原固定平台位置的次数 (TCP)。

2.4 大鼠海马 CA1 区组织病理改变和神经元凋亡 采用 HE 染色观察大鼠海马 CA1 区组织病理改变, 大鼠多聚甲醛心脏灌注, 取海马 CA1 区 (位于海马头部, 参照大鼠海马分区图谱精准确定海马 CA1 区位置) 组织, 置于冰上操作。多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片 (4 μm), 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜, 脱蜡至水, HE 染色, 脱水后封片, 封固, 光镜下观察; 采用 TUNEL 法检测大鼠海马 CA1 区组织神经元凋亡, 取海马 CA1 区组织, 切片, 常规脱蜡、脱水, 3% 过氧化氢溶液室温处理 10 min, 消化后加缓冲液、TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μL , 混匀后甩去多余的液体, 置于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 加封闭液, 室温 30 min, 稀释生物素化抗地高辛抗体, 混匀加至切片并置于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育

30 min, 稀释链霉亲和素溶液, 滴加 50 μL 至切片, 置于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。加入二氨基联苯胺显色液, 苏木素轻度复染, 光镜下观察, 随机选 5 个不重复视野计算细胞凋亡率。

2.5 RT-qPCR 法检测大鼠海马 CA1 区组织 *JNK*、*c-JUN* mRNA 表达 取海马 CA1 区组织匀浆研磨, 提取总 RNA 并鉴定其纯度与完整性。采用逆转录试剂盒处理后进行 PCR 扩增实验。*JNK* 正向引物 5'-ATTGCTCGATATCGCTAGAGCTAGATCGA-3', 反向引物 5'-TGCTCGAGAGACGCGATAGCTAAACGTA-3'; *c-JUN* 正向引物 5'-ATGATATCGCGCGATAGCTAAGAGCTAGA-3', 反向引物 5'-TGTTGCGATATAGCGCGATAGCATACG-3'; β -actin 正向引物 5'-CTCGCGCGATATAGCTAGAGAGCTATAGC-3', 反向引物 5'-TGTTGCGGATAGAAAGCTAGACCGTCAG-3'。用 Primer 5.0 软件合成后配置反应体系, 共 25 μL 。扩增反应为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环。琼脂糖凝胶电泳后采用凝胶电泳成像系统进行半定量分析。

2.6 蛋白质免疫印迹法检测大鼠海马 CA1 区组织 *JNK*、*p-JNK*、*c-JUN*、*p-c-JUN*、*caspase12* 蛋白表达 取海马 CA1 区组织, 提取总蛋白, 定量后取 15 μL 上样, 加上样缓冲液变性, 电泳至溴酚蓝接近凝胶底部, 300 mA 电流湿转 1 h, 脱脂奶粉常温封闭 1.5 h, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。显影, 曝光, 采用凝胶图像分析软件进行半定量分析。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多样本比较采用单因素方差分析, 每 2 样本比较采用 SNK-*q* 检验, 干预前后比较采用配对 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄酚对大鼠学习、记忆能力的影响 60 只大鼠造模成功 51 只, 成功率为 85%, 随机分为模型组 (10 只)、阳性药组 (11 只) 和大黄酚低、中、高剂量组 (各 10 只)。与干预前比较, 干预后模型组 PLA 延长 ($P<0.01$), TCP 减少 ($P<0.01$), 阳性药组和大黄酚各剂量组 PLA 均缩短 ($P<0.05$, $P<0.01$), TCP 均增加 ($P<0.05$, $P<0.01$); 干预前, 与正常组比较, 模型组、阳性药组和大黄酚各剂量组 PLA 均延长 ($P<0.01$), TCP 均减少 ($P<0.01$); 干预后, 与模型组比较, 阳性药组和大黄酚各剂量组 PLA 均缩短 ($P<0.01$), TCP 均增加 ($P<0.01$), 且呈剂量依赖性, 大黄酚中剂量组作用与阳性药组相当, 大黄酚高剂量组作用优于阳性药组, 见表 1。

3.2 大黄酚对大鼠海马 CA1 区组织病理学变化和细胞凋亡率的影响 正常组大鼠海马 CA1 区神经细胞饱满, 形态正常, 结构完整, 排列整齐, 细胞核呈正圆形, 核仁清晰; 模型组大鼠海马 CA1 区神经细胞皱缩严重, 形态不规则, 多呈三角锥形, 层次紊乱, 核固缩、深染, 核仁消失, 且有严重的碎裂、溶解表现; 大黄酚低剂量组大鼠海马 CA1

表 1 各组干预前后学习、记忆能力对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	PLA/s		TCP/次	
		干预前	干预后	干预前	干预后
正常组	9	14.25±2.58	14.05±2.44	10.55±1.82	10.95±1.75
模型组	10	28.30±3.11**	35.20±4.58 ^{▲▲} **	5.15±1.02**	3.11±0.40 ^{▲▲} **
阳性药组	9	28.97±3.15**	22.71±3.02 ^{▲▲##}	5.19±1.08**	7.95±1.50 ^{▲▲##}
大黄酚低剂量组	9	28.71±3.02**	25.46±3.19 ^{▲##△}	5.03±1.04**	6.30±1.42 ^{▲##△}
大黄酚中剂量组	10	27.96±3.50**	22.53±3.07 ^{▲▲##}	5.06±1.07**	8.02±1.52 ^{▲▲##}
大黄酚高剂量组	10	28.14±3.42**	19.75±2.16 ^{▲▲##△}	5.25±1.08**	9.35±1.25 ^{▲▲##△}

注:与干预前比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与阳性药组比较,△ $P<0.05$ 。

区神经细胞形态不规则,有明显变形,层次紊乱,部分细胞核固缩、深染,核仁消失,且有碎裂、溶解表现;大黄酚中剂量组和阳性药组大鼠海马 CA1 区有部分神经细胞形态不规则,层次紊乱,少量细胞核固缩、深染,核仁不清

晰,且有部分碎裂、溶解表现;大黄酚高剂量组大鼠海马 CA1 区有极少神经细胞形态不规则,层次紊乱,极少细胞核固缩表现,大多核仁清晰,稍有碎裂、溶解表现,见图 1。

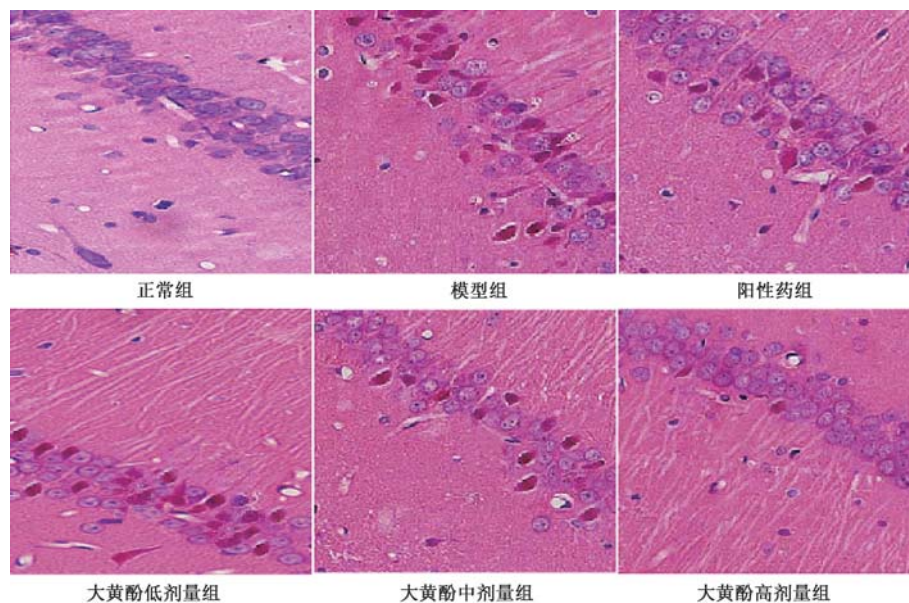


图 1 各组大鼠海马 CA1 区组织病理学变化 (×400)

与正常组比较,模型组大鼠海马 CA1 区组织细胞凋亡率升高 ($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组和大黄酚各剂量组海马 CA1 区组织细胞凋亡率均降低 ($P<0.01$);与阳性药组比较,大黄酚低剂量组海马 CA1 区组织细胞凋亡率升高,高剂量组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$),见表 2、图 2。

表 2 各组大鼠海马 CA1 区组织细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	细胞凋亡率/%
正常组	9	5.15±1.30
模型组	10	41.52±4.68**
阳性药组	9	21.20±3.25 ^{##}
大黄酚低剂量组	9	30.25±3.49 ^{##△△}
大黄酚中剂量组	10	20.89±3.37 ^{##}
大黄酚高剂量组	10	16.11±3.06 ^{##△△}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与阳性药组比较,△△ $P<0.01$ 。

3.3 大黄酚对大鼠海马 CA1 区组织 JNK、c-JUN、caspase12 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马 CA1 区组织 JNK、c-JUN、caspase12 mRNA 表达升高

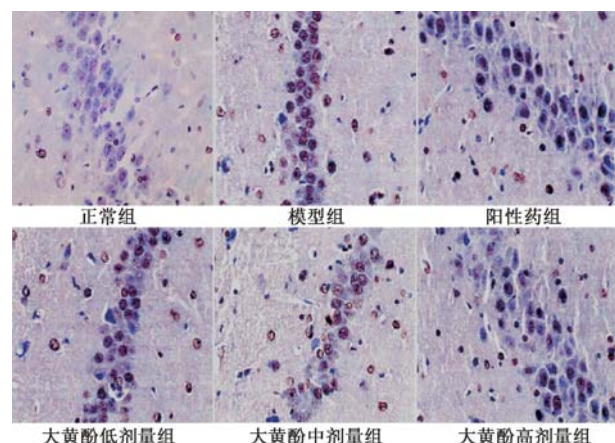


图 2 各组大鼠海马 CA1 区细胞凋亡率 TUNEL 染色 (×200)

($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组和大黄酚各剂量组上述 mRNA 表达均降低 ($P<0.01$);与阳性药组比较,大黄酚低剂量组大鼠海马 CA1 区组织上述 mRNA 表达降低 ($P<0.05$),高剂量组上述 mRNA 表达升高 ($P<0.01$),见表 3。

表 3 各组大鼠海马 CA1 区组织 JNK、c-JUN、caspase12 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	JNK mRNA	c-JUN mRNA	caspase12 mRNA
正常组	9	0.54±0.08	0.71±0.12	0.42±0.06
模型组	10	1.25±0.19**	1.59±0.22**	1.28±0.22**
阳性药组	9	0.88±0.13##	1.15±0.17##	0.85±0.17##
大黄酚低剂量组	9	1.01±0.12### Δ	1.31±0.14### Δ	1.01±0.14### Δ
大黄酚中剂量组	10	0.85±0.15##	1.17±0.18##	0.83±0.15##
大黄酚高剂量组	10	0.70±0.11### Δ	0.91±0.13### Δ	0.52±0.07### Δ

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与阳性药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3.4 大黄酚对大鼠海马 CA1 区组织 JNK、p-JNK、c-JUN、p-c-JUN、caspase12 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马 CA1 区组织 JNK、p-JNK、c-JUN、p-c-JUN、caspase12 蛋白表达均升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组和大黄酚各剂量组大鼠海马 CA1 区组织上述蛋白表

表 4 各组大鼠海马 CA1 区组织 JNK、p-JNK、c-JUN、p-c-JUN、caspase12 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	JNK	p-JNK	c-JUN	p-c-JUN	caspase12
正常组	9	0.21±0.04	0.29±0.05	0.24±0.04	0.18±0.03	0.86±0.11
模型组	10	1.56±0.21**	1.42±0.17**	1.31±0.18**	1.65±0.22**	2.23±0.31**
阳性药组	9	1.00±0.15##	0.70±0.11##	0.85±0.11##	0.62±0.10##	1.36±0.18##
大黄酚低剂量组	9	1.31±0.19### $\Delta\Delta$	0.83±0.12### Δ	1.08±0.15### $\Delta\Delta$	0.91±0.12### $\Delta\Delta$	1.82±0.22### $\Delta\Delta$
大黄酚中剂量组	10	0.98±0.17##	0.72±0.11##	0.82±0.13##	0.59±0.09##	1.34±0.16##
大黄酚高剂量组	10	0.61±0.12### $\Delta\Delta$	0.51±0.10### $\Delta\Delta$	0.74±0.10### Δ	0.45±0.07### $\Delta\Delta$	1.01±0.13### $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与阳性药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

4 讨论

阿尔茨海默症的发病原因和机制目前尚不明确,与遗传、环境、年龄增长等有关^[8],可出现进行性加重性认知功能障碍与行为损害,记忆和学习能力受损。在海马区头部组织对各种伤害性刺激较为敏感,即 CA1 区,神经细胞变性、凋亡与学习和记忆能力减退均有密切关系^[9]。因此,在阿尔茨海默症治疗中应积极减轻海马 CA1 区组织病理损害,减少神经细胞凋亡,以改善其学习和记忆能力。

双侧海马区注入 $A\beta_{1-42}$ 是目前常用的阿尔茨海默症大鼠造模方法,该方法建模的成功率并不高,本研究中阿尔茨海默症建模成功率为 85.00%,与既往报道相符^[10]。大黄酚有抗菌、消炎、止咳、促进肠道运动、增强神经兴奋性、抑制黑色素瘤生长等^[11-12]。干预后模型组大鼠学习、记忆能力指标均恶化,阳性药组和大黄酚各剂量组均较干预前改善,且干预后均优于模型组,高剂量组作用最佳,提示大黄酚和多奈哌齐均可改善阿尔茨海默症大鼠的学习、记忆能力,且高剂量大黄酚作用更为理想。阳性药组和大黄酚各剂量组大鼠海马 CA1 区病理改变均较模型组减轻,且高剂量组与正常组较为接近;阳性药组和大黄酚各剂量组细胞凋亡率均下降,且高剂量组与正常组最为接近,表明大黄酚和多奈哌齐还可减轻阿尔茨海默症大鼠海马 CA1 区组织病变,减少细胞凋亡,且高剂量大黄酚的效果最为理想。

JNK 与脑内长时程增强效应的形成及学习、记忆能力的维持和改变均有重要的关联^[13-14]。在某种伤害性因素刺激下,如 $A\beta_{1-42}$ 在海马区沉积,JNK 可被激活,其磷酸化水平升高,调控神经细胞的增殖、分化和凋亡,诱导细胞凋

亡,导致机体学习、记忆能力减退^[15]。JNK 通路下游的分子 c-JUN 也被激活,其基因和蛋白表达增强,磷酸化水平也升高,可协同 JNK 诱导神经细胞凋亡,可对中枢神经系统产生不可逆的伤害,诱发中枢神经系统疾病^[16]。caspase12 属于真核细胞凋亡调控基因的重要组成部分,可参与细胞的生长、分化与凋亡调节。caspase12 位于 JNK 信号通路的下游,与细胞凋亡程度呈正相关,可参与细胞内重要蛋白质合成折叠环境的调控,影响内质网的结构与稳定性^[17]。对阿尔茨海默症大鼠予以有效措施抑制 JNK 通路信号的传导,可降低 JNK、c-JUN、caspase12 基因与蛋白表达,下调其磷酸化水平,减少海马组织神经细胞凋亡^[18],提示可将 JNK 信号通路作为阿尔茨海默症治疗的作用靶点。模型组大鼠海马 CA1 区组织 JNK、c-JUN、caspase12 mRNA 与蛋白表达及 p-JNK、p-c-JUN 蛋白表达均高于正常组;阳性药组和大黄酚各剂量组上述指标均低于模型组;且低剂量组上述指标均高于阳性药组;高剂量组上述指标均低于阳性药组,提示大黄酚和多奈哌齐均可抑制阿尔茨海默症大鼠海马组织 CA1 区 JNK 信号通路的激活,抑制 JNK、c-JUN 和 caspase12 mRNA 与蛋白表达及 p-JNK、p-c-JUN 蛋白表达,且大黄酚的作用呈剂量依赖性。综上所述,大黄酚和多奈哌齐均可改善阿尔茨海默症大鼠的学习和记忆能力,减轻海马组织 CA 区病理损伤,减少神经细胞凋亡,可能是通过抑制 JNK 信号通路激活。此外,大黄酚的作用剂量依赖性,高剂量大黄酚的作用优于多奈哌齐。

参考文献:

[1] 王英全,梁景宏,贾瑞霞,等. 2020-2050 年中国阿尔茨海默

- 病患病情预测研究[J]. 阿尔茨海默病及相关病, 2019, 2 (1): 289-298.
- [2] Gozdek M, Ratajczak J, Arndt A, *et al.* Transcatheter aortic valve replacement with Lotus and Sapien 3 prosthetic valves: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Thorac Dis*, 2020, 12 (3): 893-906.
- [3] 严贵亮, 张丹参. 大黄酚联合多奈哌齐对阿尔茨海默病模型大鼠的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 151-154.
- [4] Razak A R, Spira A, Kawai A, *et al.* Effect of doxorubicin plus olaratumab *vs* doxorubicin plus placebo on survival in patients with advanced soft tissue sarcomas: the announce randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2020, 323(13): 1266-1276.
- [5] 樊 婷, 王 举. 基于通路和网络方法对重度抑郁症和阿尔茨海默症易感基因的分析[J]. 航天医学与医学工程, 2019, 32(4): 306-312.
- [6] Xia S, Wang J, Kalonis B, *et al.* Genistein protects against acute pancreatitis *via* activation of an apoptotic pathway mediated through endoplasmic reticulum stress in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(2): 421-428.
- [7] 黄 海, 陈丽君, 陈立艺, 等. Aβ1-42 寡聚体对大鼠认知功能的影响和神经毒性分析[J]. 解剖学杂志, 2015, 38(6): 698-701.
- [8] Xia X, Li J, Liang X, *et al.* Ticagrelor suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cell apoptosis and alleviates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice *via* downregulation of PCSK9[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1453-1462.
- [9] Valokola M G, Karimi G, Razavi B M, *et al.* The protective activity of nanomicelle curcumin in bisphenol A-induced cardiotoxicity following subacute exposure in rats [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(3): 319-329.
- [10] Muhammad T, Ali T, Ikram M, *et al.* Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2019, 14 (2): 278-294.
- [11] Santos A C A, Hebeba C B, Hastreiter A A, *et al.* Exogenous glutamine impairs neutrophils migration into infections sites elicited by lipopolysaccharide by a multistep mechanism [J]. *Amino Acids*, 2019, 51(3): 451-462.
- [12] Chen G L, Coates E E, Plummer S H, *et al.* Effect of a chikungunya virus-like particle vaccine on safety and tolerability outcomes: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2020, 323 (14): 1369-1377.
- [13] Jiang X, Zhu C, Li X, *et al.* Cyanidin-3-*O*-glucoside at low doses protected against 3-chloro-1, 2-propanediol induced testis injury and improved spermatogenesis in male rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(48): 12675-12684.
- [14] Wang Y, Deng X, Yu C, *et al.* Synergistic inhibitory effects of capsaicin combined with cisplatin on human osteosarcoma in culture and in xenografts [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37 (1): 251.
- [15] Wang Y, Chen C, Wang Q, *et al.* Inhibitory effects of cycloastragenol on abdominal aortic aneurysm and its related mechanisms [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(2): 282-296.
- [16] Cui Y, Jiang L, Shao Y, *et al.* Anti-alcohol liver disease effect of *Gentiana macrophylla* extract through MAPK/JNK/p38 pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(2): 240-250.
- [17] Lakshmanan A P, Thandavarayan R A, Palaniyandi S S, *et al.* Modulation of AT-1R/CHOP-JNK-Caspase12 pathway by olmesartan treatment attenuates ER stress-induced renal apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44(5): 627-34.
- [18] 江爱娟, 蔡 标, 谢道俊, 等. 黄蒲通窍胶囊对阿尔茨海默病模型大鼠 JNK 信号通路蛋白及炎症因子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2441-2444.