

Klotho 对缺血性脑损伤的抗氧化保护作用及机制研究

李欣, 杨雪琴, 史梦琪, 杜俊蓉*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 本实验通过侧脑室注射慢病毒载体编码的小鼠 klotho 基因 (LV-KL), 研究 klotho 过表达对缺血再灌注损伤的抗氧化保护作用及潜在机制。C57B6/6J 小鼠双侧侧脑室注射慢病毒 4 周后, 通过双侧颈总动脉结扎法 (2VO) 建立小鼠全脑缺血再灌注模型。应用神经行为学评分、Nissl 染色、qPCR 及 Western blot 等指标研究 klotho 对脑缺血的作用及相关抗氧化机制。实验结果表明, klotho 过表达明显改善了 2VO 小鼠的神经行为学障碍, 改善海马 CA1 区和纹状体区 (CPu) 神经元损伤。同时, LV-KL 增加了脑内锰超氧化物歧化酶 (Mn-SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的表达, 减少了脑内丙二醛 (MDA) 含量。Western blot 结果显示, klotho 过表达抑制了 Akt 和 FoxO1 的磷酸化, 表明 klotho 的抗氧化作用可能与抑制 Akt/FoxO1 信号通路有关。由此可见, 利用 klotho 或 klotho 增强剂可以减缓衰老相关的 klotho 表达下降, 而本实验也为治疗老年急性缺血性脑卒中提供了一种新的研究方向。

关键词: klotho; 脑缺血; 氧化应激; Akt/FoxO1 信号通路; 衰老

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1331-06

Anti-oxidative protective effect and mechanism of klotho on ischemic brain injury

LI Xin, YANG Xue-qin, SHI Meng-qi, DU Jun-rong*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Present study was designed to investigate the effects and underlying antioxidant mechanism of klotho overexpression through an intracerebroventricular injection of a lentiviral vector that encoded murine klotho (LV-KL) on cerebral ischemia injury. Four weeks after the injection of lentivirus into the lateral ventricle of C57B6/6J mice, a mouse model of global cerebral ischemia-reperfusion was established by bilateral common carotid artery occlusion (2VO). Klotho overexpression significantly improved neurobehavioral deficits and increased the number of survival neurons in the hippocampal CA1 and caudate putamen subregions. The overexpression also decreased malondialdehyde (MDA) content in brain, while mitochondrial manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) and catalase (CAT) expression in brain were increased. Moreover, klotho overexpression decreased Akt and forkhead box class O1 phosphorylation. These findings suggest that klotho may compensate for its aging-related decline to provide a promising therapeutic approach for the acute ischemic stroke during aging.

Key words: klotho; ischemic stroke; oxidative stress; Akt/FoxO1 signaling; aging

缺血性脑卒中是由于脑血管供血不足而引起脑

损伤的一种疾病, 死亡率高, 约占全球死亡总数的 11.3%^[1]。研究表明, 衰老是脑卒中发生及预后不良的最大风险因素^[2]。与衰老相关的脑部病理生理学变化非常复杂, 其中氧化应激与衰老大脑中的缺血性损伤呈现出高度正相关^[3], 然而, 氧化应激与脑损伤相关的潜在分子机制目前仍不清楚。

收稿日期: 2018-04-11; 修回日期: 2018-05-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473219).

*通讯作者 Tel: 86-28-85503938, Fax: 86-28-85501371,

E-mail: dujr_1@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0328

Klotho 是一种具有多种生物学活性的抗衰老基因, 该基因缺陷小鼠在出生 4 周后会出现器官功能衰竭、认知障碍和寿命缩短等一系列与人类衰老相似的表型变化, 而上调 klotho 的表达则能使小鼠的寿命延长 20%~30%^[4]。最新研究表明, klotho 可能通过激活由 insulin/IGF-1 信号通路负调节的 FoxO 转录因子, 诱导 Mn-SOD 和 CAT 等抗氧化酶的转录, 清除体内产生的过多的 ROS, 从而减轻氧化应激^[5]。

临床前基础研究和临床数据表明, 动物和人脑内 klotho 表达随年龄增长而下降。老年猕猴脑内 klotho 水平低于青年猕猴, 而血清 klotho 水平与受试者年龄呈现负相关^[6, 7]。以往的研究也表明, 衰老小鼠脉络丛中 klotho 蛋白和 mRNA 水平均显著降低^[5]。据估计, 到 2050 年, 脑卒中发病率有望翻倍, 其中 75 岁以上的老年人口则是脑卒中发病的主要人群^[8]。通过对韩国女性缺血性脑卒中患者进行基因分型发现, klotho 是缺血性脑卒中一个重要基因风险因子^[9]。由此推测, 随年龄增长, 内源性 klotho 减少, 氧化应激反应增强, 最终导致脑细胞对缺血的敏感性增加和老年卒中患者的神经障碍加重。同时, Zeldich 等^[10]的相关研究也已表明, klotho 蛋白对谷氨酸诱导产生的神经氧化损伤具有直接性的保护作用, Zhou 等^[11]研究发现上调 klotho 的表达能够抑制缺血后的炎症反应, 证实了 klotho 在缺血脑损伤中的保护作用, 这些都为本实验提供了研究基础与依据。本实验采用侧脑室注射慢病毒载体编码的小鼠 klotho 基因 (LV-KL) 上调 klotho 的表达, 研究 klotho 过表达对缺血再灌注损伤的氧化保护作用及潜在机制, 以期为老年急性缺血性脑卒中治疗提供新的靶点。

材料与方 法

实验动物 SPF 级 C57B6/J 小鼠, 雄性, 6 周龄, 20~22 g 左右, 购自四川省成都市达硕生物科技有限公司, 合格证号: SCXK (川) 2013-15。饲养环境温度维持在 25±1 °C, 相对湿度 50%~70%, 12 h/12 h 昼夜节律, 自由摄食饮水。

材料和试剂 HEK293 细胞 (American Type

Culture Collection); Klotho 重组质粒、对照载体质粒 (美国 OriGene Technologies 公司); Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); GM easyTM 慢病毒包装试剂盒、GML-PCTM 慢病毒浓缩试剂盒、Polybrene (上海吉满生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基购自 (美国 Gibco 公司); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad 公司); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物科技有限公司)。Akt、pAkt (Ser473)、FoxO1、pFoxO1 (Ser256) 抗体购自 (美国 Cell Signaling Technology 公司)。实验中用到的所有引物序列见表 1。

实验动物分组 用于研究 LV-KL 对正常小鼠 klotho 表达影响的 C57B6/J 小鼠分为 3 组: 空白对照组 (Sham)、对照病毒组 (LV-GFP)、上调病毒组 (LV-KL), 每组 4 只, 仅注射慢病毒, 不进行双侧颈总动脉结扎 (2VO); 用于研究 LV-KL 对 2VO 小鼠 klotho 表达影响的 C57B6/J 小鼠分为 3 组: 空白对照组 (Sham+LV-GFP)、对照病毒组 (2VO+LV-GFP)、上调病毒组 (2VO+LV-KL), 每组 10 只。

慢病毒生产及双侧侧脑室注射 HEK293 细胞汇合达 90%~100% 时, 将 GM easyTM lentiviral mix、lipofectamine 3000 和慢病毒编码的 klotho 或 GFP 基因加到无血清、无抗生素的 DMEM 中混合均匀, 于 CO₂ 培养箱中培养, 72 h 后, 连续稀释病毒液转染 HEK293 细胞, 计算病毒滴度^[11]。小鼠脑立体定位仪进行注射位点的定位 (前卤后 0.2 mm, 中线旁开 1.0 mm, 硬脑膜下 2.5 mm) 并用颅骨钻打孔, 使用微量注射器向小鼠双侧侧脑室分别注射 3 μL 慢病毒溶液 (2.1×10⁷ TU·mL⁻¹), 骨蜡封闭^[12]。实验中仅注射 1 次病毒。

2VO 模型建立 慢病毒注射 4 周后, 进行 2VO 手术。4%水合氯醛腹腔麻醉后, 暴露双侧颈总动脉鞘, 剥离迷走神经, 动脉夹夹闭 20 min 后松开, 并确保再灌成功, Sham+LV-GFP 组仅暴露双侧颈总动脉, 不进行夹闭^[13]。

标本收集 慢病毒注射 4 周后, 部分 C57B6/J

Table 1 The primer sequence of real time-PCR

Gene	Primer sequence forward (5'-3')	Primer sequence reverse (5'-3')
GAPDH	AGCGAGACCCCACTAACATC	GGTTCACACCCATCACAAAC
CAT	AGCGACCAGATGAAGCAGTG	TCCGCTCTGTCAAAGTGTG
Mn-SOD	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
Klotho	GGCTTTCCTCTTACTGAAAA	CACATCCACAGATAGACATTCG

小鼠直接处死取脑,用于检测正常小鼠脑内和脉络丛 klotho 的表达 ($n=4$); 部分 C57Balb/6J 小鼠于 2VO 手术再灌 72 h 后,处死取脑,用于组织病理学和生化检查 ($n=10$)。

神经行为学评分 分别在术后 24、48、72 h 进行神经行为学评分^[14],评分方法见表 2。

Nissl 染色 脑石蜡切片于 0.5% 焦油紫水溶液染色 10 min,镜下分色晾干后,封片。光镜下 ($\times 400$) 盲法计数海马 CA1 区和 CPu 区 3 个微观区域神经元活细胞数^[13]。

Real-time PCR 用 Trizol 从小鼠脑组织和脉络丛中分离总 RNA,并逆转录为 cDNA,随后进行 qPCR 反应。特异性引物序列见表 1。Klotho mRNA 水平归一化为 GAPDH。结果表示为使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法相对于空白对照组的阈循环 (C_t) 值的倍数变化。

MDA 测定 MDA 试剂盒用于检测脑内脂质过氧化代表性产物 MDA 含量,将脑匀浆与三氯乙酸混合,离心取上清。将 TBA 加入到上清液中,然后采用分光光度法在 532 nm 处进行测定。

Western blot 检测 脑组织提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。然后用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的脑组织蛋白,并转移至聚偏氟乙烯膜上。将膜与一抗在 4 °C 孵育过夜,第二天

加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗溶液在 37 °C 下孵育 1 h,使用 ECL 化学发光试剂盒进行显影分析,并用 Gel Pro Analyzer 6.0 测定每条带的 OD 值。对免疫印迹结果进行定量分析,并表示为各组相对于空白对照组的比值。

统计学处理 SPSS 19.0 统计软件用于数据分析,实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,神经行为学评分采用多因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

结果

1 LV-KL 上调正常小鼠 klotho 表达

如图 1 所示,与 Sham 组相比 (1.07 ± 0.14 和 0.98 ± 0.07),LV-GFP 组脑内和脉络丛 klotho mRNA 水平 (1.13 ± 0.13 和 1.01 ± 0.08) 均无显著变化 ($P > 0.05$),而 LV-KL 显著上调正常小鼠脑内和脉络丛 klotho 表达 (1.71 ± 0.16 和 1.82 ± 0.12 , $P < 0.01$)。

2 LV-KL 上调缺血小鼠 klotho 表达

如图 2 所示,与 Sham+LV-GFP 组相比 (1.0 ± 0.07 和 1.01 ± 0.11),2VO 手术对 2VO+LV-GFP 组脑内和脉络丛 klotho mRNA 水平 (1.03 ± 0.09 和 1.05 ± 0.07) 均无显著影响 ($P > 0.05$),而 LV-KL 显著上调 2VO+LV-KL 组小鼠脑内和脉络丛 klotho 表达 (1.53 ± 0.05 和

Table 2 Neuroscore

Task	Best performance score	Deficit score
Grasping movement reflex (inducing the catching reflex by running a little rod over the plantar surface of the paw)	0 (present at all paws)	4 (1 point for each missing reflex)
Stop at the edge of a table	0 (stopping at the end of table)	1 (no stopping behavior)
Turning the head (touching the ear from behind with a little rod)	0 (turning towards both directions)	2 (1 point for each failure to turn towards the stimulated ear)
Falling reflex (lifting the mouse at the tail and lowering with the front legs towards the ground)	0 (extension of both front paws)	1 (not reaching down towards the ground with both front paws)
Spontaneous motility (moving behavior on a flat surface)	0 (immediate, spontaneous activity)	1 (activity after 30-60 s) or 2 (no activity within 60 s)
Circling behavior (moving behavior on a flat surface)	0 (no circling, moving in all directions)	2 (spontaneous circling, turning only to one direction)
Pelt property (appearance of the coat)	0 (clean, well kept)	1 (coarse, scrubby)
Flight reaction (spontaneous behavior on a flat surface)	0 (normal behavior)	1 (anxious, jumpy behavior)
Maximum total score		14

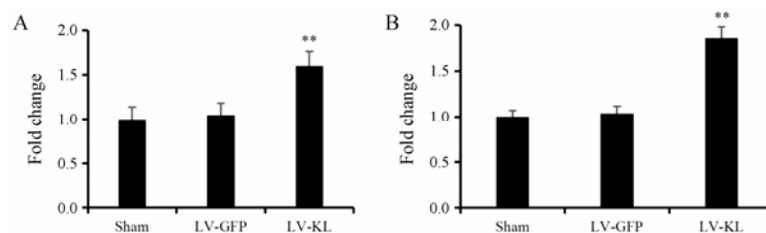


Figure 1 Overexpression of klotho induced by intracerebroventricular injection of lentivirus encoding klotho (LV-KL) in the choroid plexus and brain in normal mice. A: Quantitative analysis of klotho mRNA levels in the brain; B: Quantitative analysis of klotho mRNA levels in the choroid plexus. $n=4$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$. ** $P < 0.01$ vs LV-GFP group

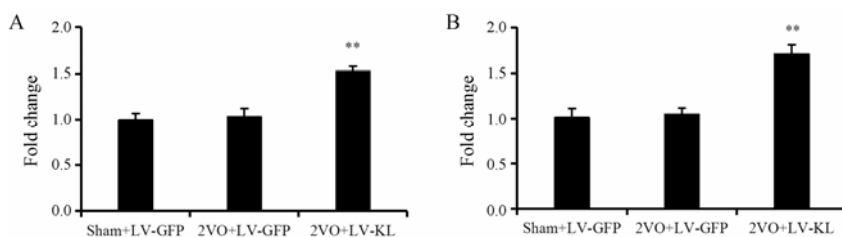


Figure 2 Overexpression of klotho induced by intracerebroventricular injection of lentivirus encoding klotho (LV-KL) in the brain and choroid plexus in ischemic mice (2VO). A: Quantitative analysis of klotho mRNA levels in the brain; B: Quantitative analysis of klotho mRNA levels in the choroid plexus. $n=4$, mean \pm SEM. ** $P<0.01$ vs 2VO+LV-GFP group

1.71 \pm 0.12, $P<0.01$).

3 Klotho 过表达减轻 2VO 小鼠神经行为学障碍

如图 3 所示, Sham+LV-GFP 组没有表现出神经行为学障碍, 神经行为学评分为 0。20 min 的脑缺血引起了神经行为学障碍, 表现为 2VO+LV-GFP 组缺血后神经行为学评分增加 (24 h: 4.9 \pm 0.63, 48 h: 4.4 \pm 0.52, 72 h: 4.2 \pm 0.79)。LV-KL 有效改善了 2VO 导致的神经损伤 ($F_{2, 27} = 11.459$, $P < 0.001$), 表现为在相应时间点, 2VO+LV-KL 组的神经行为学评分显著低于 2VO+LV-GFP 组 (24 h: 3.9 \pm 0.63, 48 h: 3.5 \pm 0.53, 72 h: 3.2 \pm 0.42)。

4 Klotho 过表达改善 2VO 小鼠神经元损伤

如图 4 所示, 2VO 手术 72 h 后, 2VO+LV-GFP 组海马 CA1 神经元活细胞总数和 CPu 神经元活细胞数 (158 \pm 18 和 29 \pm 3) 明显少于 Sham+LV-GFP 组 (397 \pm 10, $P < 0.01$; 117 \pm 6, $P < 0.01$)。而 klotho 过表达

有效地改善了缺血后海马 CA1 和 CPu 神经元损伤 (266 \pm 21 和 54 \pm 8; $P < 0.05$)。

5 Klotho 过表达抑制 2VO 小鼠脑内氧化应激

如图 5 所示, 与 Sham+LV-GFP 组相比 (1.02 \pm 0.11 和 1.01 \pm 0.08), 2VO+LV-GFP 组 Mn-SOD mRNA

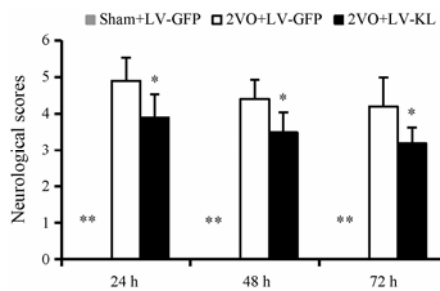


Figure 3 Effects of klotho overexpression on neurological deficits in ischemic mice. Neurological function was blindly evaluated at corresponding time point during the experiment. $n=10$, mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 2VO+LV-GFP group

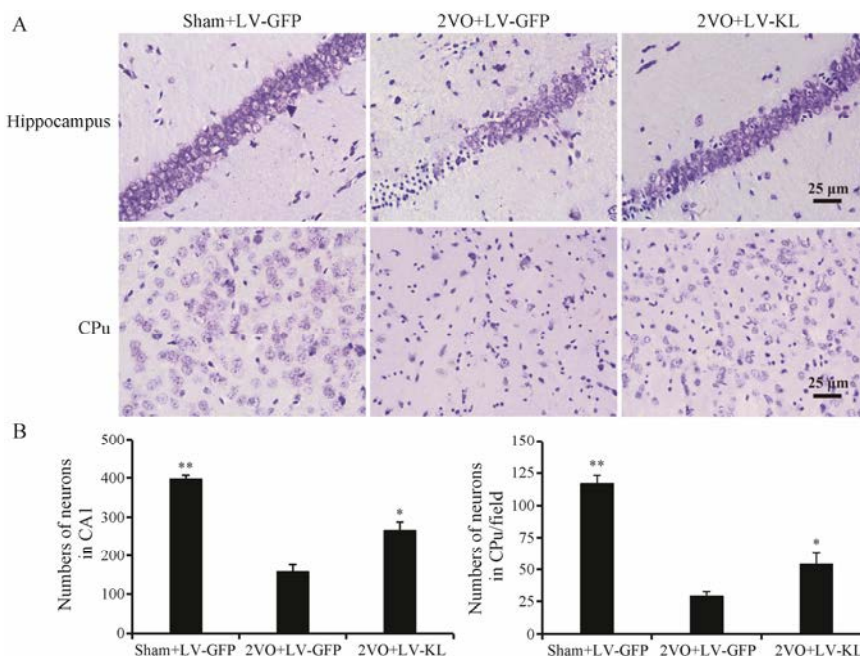


Figure 4 Effects of klotho overexpression on neuronal injury in ischemic mice. A: Representative images of Nissl staining showing ischemic injury of neurons in hippocampal CA1 and CPu areas of the brain; B: Quantitative analysis of the number of normal neurons in hippocampal CA1 subregion and per field of CPu (40 \times), respectively. $n=6$, mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 2VO+LV-GFP group

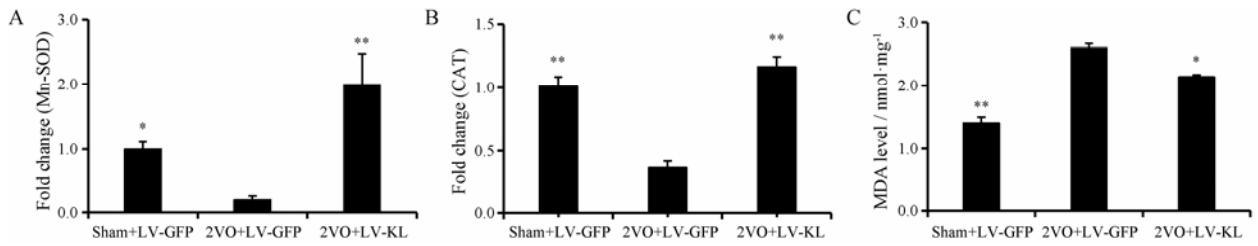


Figure 5 Effects of klotho overexpression on oxidative stress in ischemic mice induced by 2VO. A: Quantitative analysis of Mn-SOD expression by qPCR in the brain; B: Quantitative analysis of catalase expression by qPCR in the brain; C: Quantitative analysis of MDA content in the brain. $n=4$, mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 2VO+LV-GFP group

和 CAT mRNA 表达水平均明显下降 (0.2 ± 0.06 , $P<0.05$, 图 5A; 0.36 ± 0.06 , $P<0.05$, 图 5B)。而 klotho 过表达有效抑制 2VO 诱导的脑内氧化应激的增加, 表现为 2VO+LV-KL 组 Mn-SOD 和 CAT mRNA 水平明显升高 (2 ± 0.48 , $P<0.01$; 1.17 ± 0.08 , $P<0.01$)。另外, 与 Sham+LV-GFP 组相比, 2VO 增加了 2VO+LV-GFP 组的 MDA 水平 (2.6 ± 0.07 , $P<0.01$, 图 5C), 而 LV-KL 有效抑制脂质磷酸化, 降低了缺血脑中 MDA 含量 (2.14 ± 0.03 , $P<0.05$)。

6 Klotho 过表达抑制 2VO 小鼠脑内 Akt/FoxO1 磷酸化

如图 6 所示, 与 Sham+LV-GFP 组相比 (1.0 ± 0.03 和 1.0 ± 0.14), 2VO+LV-GFP 组 Akt 和 FoxO1 磷酸化水平增加 (1.21 ± 0.09 和 1.23 ± 0.09), 提示全脑缺血/再灌注促进了 Akt/FoxO1 磷酸化, 可能导致 2VO 小鼠脑内抗氧化酶表达减少, 脑内氧化应激水平增加。而 klotho 过表达明显逆转了 2VO 手术引起的脑内 Akt 和 FoxO1 磷酸化的增加 (0.46 ± 0.11 和 0.53 ± 0.05 , $P<0.01$)。这些结果表明, 抑制 Akt/FoxO1 磷酸化可

能是 klotho 过表达发挥抗氧化保护作用的潜在靶标。

讨论

缺血性脑卒中是脑卒中最普遍的疾病亚型, 1/3 缺血性脑卒中发生在老年人群^[15]。此外, 老龄化增加了静脉溶栓给药后出血性转化的风险, 大大限制了溶栓治疗的效果^[2]。Klotho 作为一种抗衰老基因, 其表达随年龄增长而下降, 表明了其在衰老相关疾病中的潜在作用。

短暂性 2VO 诱导的全脑缺血作为一种缺血耐受小鼠模型, 很好地模拟了由晚期动脉硬化引发的进行性结构和功能改变引起的脑灌注不足^[16]。本实验采用此小鼠模型发现, 2VO 手术引起了明显的神经功能障碍, 海马 CA1 区和纹状体神经元大量死亡, 表明 2VO 手术造成了明显的缺血再灌注损伤。

2VO+LV-KL 组实验结果表明, 慢病毒介导的 klotho 过表达显著改善了神经功能障碍, 逆转了 2VO 手术引起的神经元死亡, 并抑制了脑内氧化应激水平, 表现为降低 MDA 含量和增加 Mn-SOD 和 CAT

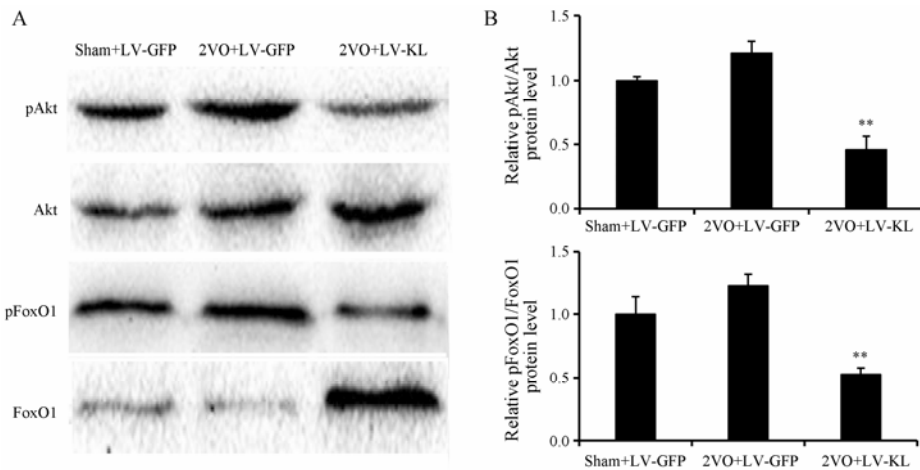


Figure 6 Effects of klotho overexpression on FoxO1 activation in the brain of ischemic mice. Representative Western blots (A) and quantitative analysis (B) of the expression and phosphorylation of Akt and FoxO1. The amount of pFoxO1 protein was normalized to FoxO1, and the amount of pAkt protein was normalized to Akt. The values were expressed as each normalized value relative to LV-GFP-treated sham group. $n=4$, mean \pm SEM. ** $P<0.05$ vs 2VO+LV-GFP group

mRNA 表达, 抑制缺血脑内 Akt 和 FoxO1 的磷酸化。综上所述, klotho 过表达可能是通过抑制 Akt/FoxO1 信号通路来发挥抗脑缺血的作用。

FoxOx 蛋白由一个核转录因子家族组成, 其中 FoxO1 被 Akt 磷酸化后, 从胞核转移至胞质, 失去转录活性, 这可能介导缺血预处理后的缺血耐受。同时, FoxOs 蛋白磷酸化后, 其转录减少, Mn-SOD 和 CAT 等下游抗氧化酶的表达降低, 导致 ROS 的大量累积, 引起严重的氧化损伤^[5]。有研究表明, Akt/FoxO1 通路可能在藁本内酯 (ligustilide, LIG) 抗衰老相关的氧化损伤的神经保护作用中发挥了重要作用, 而对脑缺血的作用少有报道。通过实验结果推测, klotho 过表达之所以能够减轻脑内的氧化损伤, 可能是由于其明显抑制了 2VO 小鼠缺血脑中 FoxO1 磷酸化, 上调了抗氧化酶的活性及其表达, 有助于 O₂⁻、过氧化氢等 ROS 的清除。由此可见, klotho 可作为脑卒中等 Akt/FoxO1 信号通路相关疾病的潜在治疗手段。

References

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2015, 131: e29–e322.
- [2] Denti L, Artoni A, Scoditti U, et al. Impact of gender-age interaction on the outcome of ischemic stroke in an Italian cohort of patients treated according to a standardized clinical pathway [J]. *Eur J Intern Med*, 2013, 24: 807–812.
- [3] Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, et al. Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32: 757–773.
- [4] Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone klotho [J]. *Science*, 2005, 309: 1829–1833.
- [5] Kuang X, Chen YS, Wang LF, et al. Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35: 169–178.
- [6] King GD, Rosene DL, Abraham CR, et al. Promoter methylation and age-related downregulation of klotho in rhesus monkey [J]. *Age (Dordr)*, 2012, 34: 1405–1419.
- [7] Pedersen L, Pedersen SM, Brasen CL, et al. Soluble serum klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46: 1079–1083.
- [8] Troen BR. The biology of aging [J]. *Mt Sinai J Med*, 2003, 70: 3–22.
- [9] Kim Y, Kim JH, Nam YJ, et al. Klotho is a genetic risk factor for ischemic stroke caused by cardioembolism in Korean females [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 407: 189–194.
- [10] Zeldich E, Chen CD, Colvin TA, et al. The neuroprotective effect of klotho is mediated *via* regulation of members of the redox system [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 24700–24715.
- [11] Zhou HJ, Li H, Shi MQ, et al. Protective effect of klotho against ischemic brain injury is associated with inhibition of RIG-I/NF- κ B signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8: 950.
- [12] Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes [J]. *Cytotechnology*, 2014, 66: 1031–1038.
- [13] Shen J, Bai XY, Qin Y, et al. Interrupted reperfusion reduces the activation of NADPH oxidase after cerebral I/R injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50: 1780–1786.
- [14] Thal SC, Thal SE, Plesnial N, et al. Characterization of a 3-vessel occlusion model for the induction of complete global cerebral ischemia in mice [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 192: 219–227.
- [15] Peng Y, Ma F, Xu TT, et al. Advances and challenges in preclinical evaluation of therapeutic drugs for treating ischemic stroke [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 3: 339–346.
- [16] Bhuiyan MI, Kim JC, Hwang SN, et al. Ischemic tolerance is associated with VEGF-C and VEGFR-3 signaling in the mouse hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2015, 290: 90–102.