

## 芒针对促进大鼠急性脊髓损伤功能修复的机制研究

李长明<sup>1</sup>, 谢尚举<sup>1</sup>, 全仁夫<sup>1</sup>, 王拓<sup>1</sup>, 杜伟斌<sup>1</sup>, 杨宗保<sup>2</sup>

(1. 杭州市萧山区中医院, 杭州 311201; 2. 厦门大学医学院, 厦门 361102)

**【摘要】** 目的 观察芒针对急性脊髓损伤炎症反应和神经细胞凋亡的影响, 研究 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号转导途径是否参与芒针的神经保护作用, 探讨芒针促脊髓损伤修复的具体作用机制。方法 将 150 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 A 组、B 组、C 组、D 组和 E 组, 每组 30 只。采用改良 Allen's 法制作大鼠脊髓中度损伤模型, A 组为假手术组, 不予以损伤脊髓及芒针治疗; B 组造模后不予以芒针治疗; C 组造模后采用芒针治疗; D 组造模前 0.5 h 鞘内注射 LY294002, 造模后采用芒针治疗; E 组造模前 0.5 h 鞘内注射 PD98059, 造模后采用芒针治疗。分别采用 BBB 评分检测大鼠的自发活动; ELISA 检测炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 的含量; TUNEL 检测细胞凋亡的程度; 免疫组化检测 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞水平; Western 印迹分析 p-Akt 和 p-ERK 在脊髓组织的表达, RT-PCR 分析 Cyt-C 和 Caspase-3 在体内的表达。相对的下行 Akt 和 ERK 信号通路通过 LY294002 和 PD98059 特异性抑制剂处理分析在体内的抑制作用。结果 炎症反应和 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路抑制的神经元凋亡参与了脊髓损伤大鼠模型的损害, 芒针介导的神经保护作用与 Bax 蛋白阳性神经元数目的减少及 Bcl-2 蛋白阳性神经元数量的增加有关。芒针治疗能改善大鼠的运动功能, PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路中 p-Akt 和 p-ERK 的激活, 通过下调 Bax 蛋白和 Bcl-2 表达上调, 抑制了线粒体凋亡途径关键因子 Cyt-C 的表达。TUNEL 法检测并抑制激活神经元凋亡的 Caspase-3 的级联。PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路特异性抑制剂 LY294002 和 PD98059 的应用抑制了 p-Akt 和 p-ERK 的表达。结论 芒针促脊髓损伤修复的神经保护作用可能与炎症反应和 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号通路的激活、通过下调 Bax 蛋白和 Bcl-2 表达上调以及抑制线粒体途径诱导的凋亡有关。

**【关键词】** 巨刺疗法; 芒针; 脊髓损伤; 炎症反应; p-Akt; p-ERK; Bcl-2; Bax; Cyt-C; Caspase-3; 凋亡; 大鼠

**【中图分类号】** R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2017.03.0343

**Mechanism Study of the Promoting Action of Elongated Needle Acupuncture on Functional Repair in Rats with Acute Spinal Cord Injury** LI Chang-ming<sup>1</sup>, XIE Shang-ju<sup>1</sup>, QUAN Ren-fu<sup>1</sup>, WANG Tuo<sup>1</sup>, DU Wei-bin<sup>1</sup>, YANG Zong-bao<sup>2</sup>. 1.Hangzhou Xiaoshan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311201, China; 2.Xiamen University School of Medicine, Xiamen 361102, China

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of elongated needle acupuncture on inflammatory reactions and apoptosis in acute spinal cord injury, investigate if PI3K/Akt and MAPK/ERK signal transduction pathways are involved in the neuroprotective effect of elongated needle acupuncture and explore the promoting action of elongated needle acupuncture on spinal cord injury repair. **Method** One hundred and fifty adult male SD rats were randomized into groups A, B, C, D and E, 30 each. A model of moderate spinal cord injury was made by modified Allen's method. Group A received a sham operation without spinal cord injury and no elongated needle acupuncture. Group B did not receive elongated needle acupuncture after model making. Group C received elongated needle acupuncture after model making. Group D received an intrathecal injection of LY294002 at 0.5 hour before model making and elongated needle acupuncture after model making. Group E received an intrathecal injection of PD98059 at 0.5 hour before model making and elongated needle acupuncture after model making. Rat spontaneous activity was examined

基金项目:浙江省中医药科研计划项目(2008CB067)

作者简介:李长明(1988—),男,住院医师,硕士,Email:lcmmail@126.com

通信作者:全仁夫(1969—),男,教授,Email:quanrenfu@126.com

using the BBB rating. Inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B contents were measured by ELISA. The degree of apoptosis was determined by TUNEL. Bcl-2- and Bax-positive cell levels were measured by an immunohistochemical method. Spinal p-Akt and p-ERK expressions were determined by Western blot. In vivo expressions of Cyt-C and Caspase-3 were determined by RT-PCR. The in vivo inhibitory effect on downstream Akt and ERK signaling pathways was investigated using specific inhibitors LY294002 and PD98059. **Result** Inflammatory reactions and neuronal apoptosis due to the inhibition of PI3K/Akt and MAPK/ERK signal pathways were involved in the damage in a rat model of spinal cord injury. The neuroprotective effect of elongated needle acupuncture was related to a decrease in the number of Bax protein-positive neurons and an increase in the number of Bcl-2 protein-positive neurons. Elongated needle acupuncture treatment improved rat motor function, activated p-Akt and p-ERK in PI3K/Akt and MAPK/ERK signal pathways by down-regulating Bax protein expression and up-regulating Bcl-2 protein expression and inhibited the expression of Cyt-C, a key factor in the mitochondrial apoptosis pathway. TUNEL detected and inhibited the activation of caspase-3 cascade in neuronal apoptosis. Application of specific inhibitors LY294002 and PD98059 to PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways inhibited the expression p-Akt and p-ERK expressions. **Conclusion** JIN's three needle therapy plus mirror therapy for knee joint movement is an effective approach in treating hemiplegia after cerebral infarction, and it can improve the lower-limb motor function and the ADL.

**[Key words]** Big needle therapy; Elongated needles; Spinal cord injury; inflammatory reaction; P-Akt; P-ERK; Bcl-2; Bax; Cyt-C; Caspase-3; Apoptosis; Rats

脊髓损伤是一种临床常见病,常导致脊髓功能的不可逆转、损伤平面以下运动及感觉功能完全丧失,从而引起终身残疾,给家庭和社会带来了沉重的负担。脊髓损伤后的不可逆损伤是由继发性损害所致,而继发性脊髓损伤是由一系列复杂的细胞和分子过程介导的。

炎症反应和凋亡是继发性损伤的重要组成部分,在调节急性和慢性脊髓损伤<sup>[1-2]</sup>的发病机制中起核心作用。有研究<sup>[3-4]</sup>报道,减少炎症反应和细胞凋亡能减轻脊髓损伤后的继发性损伤和促进脊髓功能的恢复。PI3K/Akt 和 MAPK 信号转导途径是中枢神经系统几个关键的促生存通路。有研究<sup>[5]</sup>表明,中枢神经系统存在大量 Akt 和 ERK1/2,其参与神经组织的各个生理和病理过程。Akt 和 ERK1/2 能通过多种途径促进细胞的存活,增加与 Bcl-2/Bax 的比例,抑制细胞色素 C 的释放及 Caspase 级联反应,产生抗凋亡作用<sup>[6-10]</sup>。LY294002 和 PD98059 是 Akt 和 ERK1/2 的特异性抑制剂,能阻断 Akt 和 ERK1/2 信号通路产生促凋亡作用<sup>[11-13]</sup>。

目前无论中医学还是西医学,仍然没有很好的方法用于治疗脊髓损伤<sup>[14]</sup>。针灸是中国传统医学的一部分<sup>[15]</sup>,针刺对脊髓的形态结构及功能的影响是多方面的,但至今还未能完全被认知。芒针系由古代“九针”中的“长针”发展而来,具有取穴少、透穴多、针感强、

传导快等特点,尤其在治疗病位深、病势急、病因复杂而难愈的顽疾时,能发挥出一般针灸无法达到的疗效。笔者前期研究表明,芒针秩边与水道穴可以明显改善脊髓损伤后尿潴留的情况,使脊髓诱发电位产生变化。然而,芒针对脊髓损伤的具体作用和机制尚不明了。故本实验探讨芒针对脊髓损伤后炎症反应和凋亡的影响,并阐明芒针促脊髓功能修复的 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 信号转导途径介导抗凋亡机制,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

150 只健康成年雄性 SD 大鼠,体重为(250 ± 30)g,清洁级,由厦门大学动物实验中心提供并分笼饲养[SYXK(闽)2013-0006]。所有大鼠饲养于恒温、恒湿环境,每笼 3 ~ 4 只,采用人工照明,12 h 光照/黑暗(光照时间 7:00—19:00)周期循环自由取食基础饲料和自来水,检疫 1 星期后分组实验。动物实验经厦门大学实验动物管理委员会批准,并遵循美国国立卫生研究院于 1996 年修订的《实验动物管理和使用指南》。

### 1.2 主要试剂与仪器

山羊抗兔磷酸化蛋白激酶 B 多克隆抗体(P-Akt)、山羊抗兔 p-ERK1/2 多克隆抗体、山羊抗兔 Bcl-2 多克

隆抗体、山羊抗兔 Bax 多克隆抗体和山羊抗兔 Bad 多克隆抗体(Bioword 公司, 中国); LY294002 和 PD98059 (Sigma 公司, 美国); TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、IL-1 $\beta$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和 NF- $\kappa$ B 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(TSZ 公司, 美国); 原位末端转移酶标记法(TUNEL)试剂盒(罗氏生物公司, 北京); JL2B 型电脉冲刺激仪(苏州医疗用品厂有限公司, 江苏); RM2135 型切片机(Leica 公司, 德国); 电泳及转膜仪(Bio-Rad 公司, 美国)。

### 1.3 大鼠脊髓损伤模型建立

SD 大鼠造模前禁食 8 h, 实验顺序随机进行。大鼠称重后用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉, 用卵圆钳钳夹四肢反应后将大鼠俯卧位固定于操作台上, 采用改良 Allens 法制脊髓中度损伤 SD 大鼠模型。胸背部(T<sub>8-12</sub>)正中切口, 钝性分离椎旁肌和棘上韧带, 暴露上下各 1 个椎体长度, 咬除 T<sub>9-10</sub> 棘突及全部椎板, 暴露 0.5 cm 宽硬膜。用质量为 10 g 的克氏针沿带有刻度的导管从 60 mm 高处垂直自由下落, 打击在直径 4 mm、宽 2 mm 的由薄塑料材料制成的半圆片上, 致伤后迅速移开打击物, 造成大鼠脊髓后角中度损伤, 采用 4-0 丝线逐层缝合。整个实验过程在(37 $\pm$ 0.5) 的温度下进行, 术后皮下注射 1.0 mL 生理盐水以补充丢失的血容量及每日青霉素(80 U/d)腹腔注射预防感染, 单笼饲养, 室温保持在 20 ~ 25 , 给予充足的食物和水。每日 2 次膀胱按摩协助排尿, 直至建立反射性膀胱排空。

### 1.4 动物分组及处理

将 150 只大鼠随机分为 A 组、B 组、C 组、D 组和 E 组, 每组 30 只。A 组只打开椎板, 不予以损伤脊髓及芒针治疗; B 组造模后, 不予以芒针治疗; C 组造模后, 采用芒针治疗, 每日 1 次, 共治疗 7 次; D 组术前 0.5 h 鞘内注射 5  $\mu$ g LY294002 10  $\mu$ L(溶于 1%DMSO), 造模后行芒针治疗, 每日 1 次, 共治疗 7 次; E 组术前 0.5 h 鞘内注射 20  $\mu$ mol/L PD98059 10  $\mu$ L(溶于 1%DMSO), 造模后行芒针治疗, 每日 1 次, 共治疗 7 次。

### 1.5 芒针治疗方法

C 组、D 组和 E 组造模成功后, 待大鼠麻醉苏醒后再进行芒针治疗。取秩边、水道穴。穴位定位根据世界卫生组织制定的国际标准。秩边位于臀外下部, 股骨大转子与荐椎尾椎结合部连线外 1/3 与中 1/3 交点处;

水道位于腹部, 耻骨联合与胸剑联合中点连线(分 13 等份)耻骨联合上 3 等份旁开约 2 cm 处。详见图 1。针刺部位备皮消毒, 采用华佗牌 0.25 mm $\times$ 25 mm 不锈钢芒针直刺 14~15 mm, 捻转 1 min 后留针 15 min, 其间同侧秩边、水道(每次单侧, 左右交替)连接 JL2B 型电脉冲刺激仪, 频率为 2 Hz, 电流为 1~3 mA, 共治疗 15 min。每日 1 次, 共治疗 7 次。

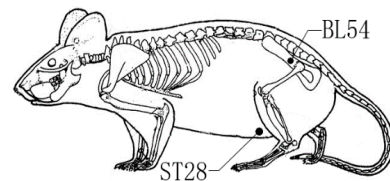


图 1 大鼠穴位示意图

### 1.6 实验取材

每组取 10 只大鼠分别于术后即刻及术后 1 d、3 d、7 d、14 d 进行运动功能评分; 每组取 10 只大鼠于术后 7 d 心脏灌注取受损节段脊髓组织 1 cm 用于 HE、TUNEL 和免疫组化检测; 每组取 10 只大鼠于术后 7 d 在冰上取新鲜段受损节段脊髓组织 1 cm 用于 ELISA、Western 印迹和 RT-PCR 检测。

### 1.7 检测指标与方法

#### 1.7.1 功能评价

采用 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) 评分法对大鼠进行功能评价。在本次研究中, 笔者对大鼠特定的功能行为进行了评价, 如肢体运动、爪掌面、步态协调、脚趾间隙和尾部的位置等。如果没有自发的后肢运动得分为 0 分, 21 分表示正常运动。评价时由两位经验丰富且独立的测试者在 1 个 100 cm $\times$ 100 cm 的开放区域内进行, 共测试 4 min。

#### 1.7.2 光镜

脊髓损伤后 7 d, 各组大鼠给予 10%的水合氯醛(0.3 mL/100 g)和过量肝素生理盐水心脏灌注 20 min, 继之再用 0.1 mol PBS 配置的 4%多聚甲醛固定液(pH 值=7.4)灌注 5 min, 取受损节段脊髓组织 1 cm 石蜡包埋, 切成纵向 6  $\mu$ m 厚的石蜡切片, 组织片二甲苯脱蜡, 加入 1X 苏木素染液/溶性伊红染液, 中性树胶封固, 再使用光学显微镜进行分析。

#### 1.7.3 细胞因子的测定

取 T<sub>9-10</sub> 节段脊髓组织匀浆提取上清液, 取提取的上清液及不同浓度的标准品各孔 50  $\mu$ L, 用封板膜封板

后置 37 温育 30 min,洗涤 5 次,每孔加入酶标试剂 50 μL,再温育、洗涤、显色,在酶标仪上于 450 nm 波长处以阴性对照孔调零,检测各孔光密度(OD)值,根据标准液的检测结果得出标准曲线,求出各组样品的实际浓度。

1.7.4 TUNEL 检测

切片二甲苯脱蜡和再水化,将切片用 Proteinase K 工作液处理 20 min,然后用 PBS 洗涤 3 次,加 50 μL TUNEL 反应混合液于标本上(1 号试剂 2 号试剂以 1:14 混合),加盖玻片或封口膜在暗湿盒中(37 1 h)。然后用 PBS 洗涤,滴加 50 μL 3 号试剂(37 30 min),再用 PBS 洗涤后,滴加 100 μL 新鲜配制的 DAB 工作液,显微镜下观察随时终止反应。采用苏木素进行复染,中性树胶封固。每张切片随机取 5 个视野计数 TUNEL 阳性和阴性细胞,结果以 TUNEL 阳性细胞数占总细胞的百分比表示。

1.7.5 Bcl-2 和 Bax 的免疫组化定位

石蜡包埋制备 6 μm 厚的组织切片,然后二甲苯脱蜡和再水化,经微波抗原修复,每张切片加 1 滴或 50 μL 的 3%过氧化酶阻断剂,以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 10 min;加 1 滴或 50 μL 正常非免疫血清,37 孵育 10 min;加 50 μL 的第一抗体(bcl-2,1:40 稀释,bs1511;bax,1:20 稀释,bs1030);加 50 μL 生物素标记的山羊抗兔 IgG(1:200 稀释,B-0061),37 孵育 40 min;加 50 μL 辣根过氧化物酶标记链亲和素溶液(1:400 倍稀释,IH-0061),37 孵育 40 min;加 100 μL 新鲜配制的 DAB 工作液(AR-0611),显微镜下观察随时终止反应。每一步期间进行 0.01 M PBS 浸泡,每次 5 min,共 3 次。苏木素复染,中性树胶封固。染色切片用成像软件系统和显微镜检测免疫阳性细胞。

1.7.6 免疫印迹检测 p-Akt 和 p-ERK1/2

总蛋白用总蛋白提取试剂盒提取分离。蛋白浓度使用 BCA 蛋白定量试剂盒的说明书进行测定。受损节段脊髓样品 50 ~ 100 μg 加入相同体积的 5 × loading buffer 上样缓冲液,煮沸 10 min。进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 PVDF 膜上,室温下孵育兔抗大鼠 p-Akt 蛋白一抗(1:1000);兔抗大鼠 p-ERK1/2 蛋白一抗(1:1000),再与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体(1:4000)在室温下孵育,将膜与 ECL 发光底物,膜与胶片在暗室结合曝光、显影、成像。经 Quantity One

图像分析软件进行光密度分析,目的条带的光密度与相应的内参蛋白β-actin 条带的光密度的比值即为目的蛋白表达的相对表达值。

1.7.7 RT-PCR 检测 Cyt-C 和 Caspase-3

总 RNA 采用 RNA 自旋试剂盒的说明书进行抽提。反转录体系含 4 μL DNase 处理过的 RNA、5 × Buffer μL、1 μL dNTPs(10 mM)、1 μL Oligo(dT)18 (50μM)、0.5 μL 随机引物(100 μM)、1 μL MMLV 逆转录酶(200 U/μL)、8.5 μL DEPC H<sub>2</sub>O,共 20 μL。然后按以下条件进行反转录反应。30 10 min,42 60 min,99 5 min,4 5 min。取出后在 0.2 mL PCR 管内,依次加入 1 μL 反转录产物(RT 产物),各基因上游与下游引物各 0.25 μL,12.5 μL PCR 反应 mix(Taq 酶,Taq buffer, dNTPs),用 ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 25 μL。按以下条件进行反转录反应,94 预变性 2 min,94 变性 30 s,56 /55 /48 退火 30 s,72 延伸 30 s,72 延伸 10 min,扩增 35 个循环。用 one-Dscan 图像分析软件分析目标条带的灰度值。

从 GenBank 获得目的基因 mRNA 的全长序列,利用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计引物序列。经过 Blast 分析,引物序列具有特异性。所用的引物及内参 β-actin 引物见表 1。引物均委托鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

表 1 目的基因的引物信息

目的基因	引物序列	产物长度
GAPDH	5' ACAGCAACAGGGTGGTGGAC 3'	252 bp
	5' TTTGAGGGTGCAGCGAACTT 3'	
Caspase 3	5' GATCACAGCAAAAAGGAGCAGT 3'	214 bp
	5' CTCCACTGTCTGTCTCAA 3'	
Cyt-C	5' AGGCTGCTGGATTCTCTTACA 3'	151 bp
	5' GCCCTTTCTCCCTTCTCTTA 3'	

1.8 统计学方法

所有数据采用 SPSS16.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差表示,组间比较若满足正态性且方差齐时采用单因素方差分析 LSD法和 SNK法,方差不齐时选择 Tamhane T2和 Dunnett T3法进行方差检验和两两比较,若不满足正态性时采用秩和检验。

2 结果

2.1 功能评估

本实验共用大鼠 150 只,存活 139 只,存活率为



92.7%,死亡大鼠予以补齐。A 组后肢的运动功能(BBB 评分)在术后 3 d 恢复到了 21 分,且 A 组造模后各时间点 BBB 评分与 B 组比较,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。B 组和 C 组在术后 1 d 内 BBB 评分  $< 2$  分,随着时间的延长,后肢功能逐渐恢复,BBB 评分逐渐升高,表 2 各组不同时间 BBB 评分比较

组别	n	术后即刻	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
A 组	30	20.20 ± 0.84	20.40 ± 0.55	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00
B 组	30	0.20 ± 0.45 <sup>1)</sup>	0.60 ± 0.55 <sup>1)</sup>	2.20 ± 0.45 <sup>1)</sup>	3.80 ± 0.45 <sup>1)</sup>	5.20 ± 0.45 <sup>1)</sup>
C 组	30	0.20 ± 0.45	0.40 ± 0.84	2.80 ± 0.84	7.40 ± 0.55 <sup>2)</sup>	11.60 ± 0.89 <sup>2)</sup>

注:与 A 组比较 <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较 <sup>2)</sup> $P < 0.05$

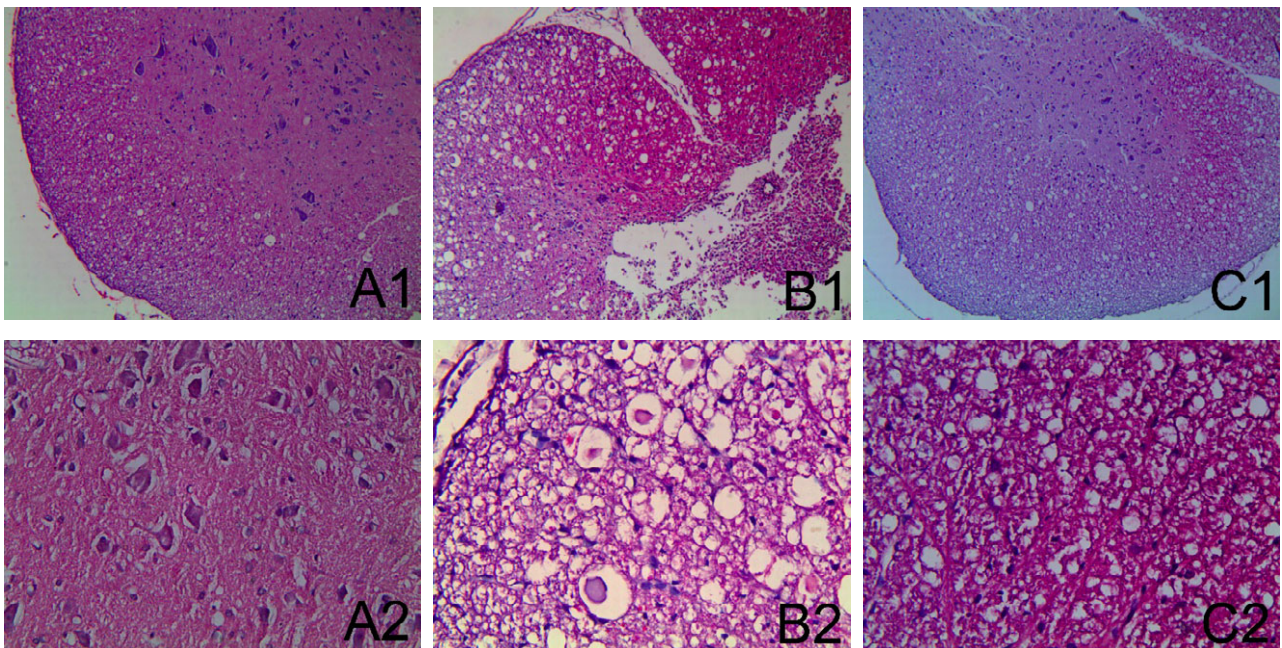
### 2.2 光镜

术后 7 d,光镜下检查 A 组(见图 2A1、图 2A2)脊髓形态结构完整,灰质神经细胞形态正常,分布均匀,细胞膜、细胞核及组织间隙均正常,白质纤维分布均匀,髓鞘形态完整,排列整齐。B 组(见图 2B1、图 2B2)脊髓形态不完整,神经组织残缺;组织重度出血,存在大量血细胞;组织疏松水肿,细胞空泡变性,部分细胞核固缩,神经纤维溶解、消失;灰质神经细胞数量减少,

但两组均未达到术前水平。C 组治疗后 1、3 d BBB 评分与 B 组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。C 组治疗后 7、14 d BBB 评分与 B 组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示芒针治疗能促进大鼠脊髓功能的恢复,治疗后 7 d 芒针的疗效开始显现。详见表 2。

( $\bar{x} \pm s$ ,分)

灰质神经细胞肿胀、核裂解甚至消失,细胞周围基质消失呈空泡状;白质纤维减少,分布不均匀,脱髓鞘,形态不完整、相互融合。C 组(见图 2C1、图 2C2)脊髓形态结构基本完整,组织中散在血细胞,组织无水肿;灰质神经细胞形态基本正常,空泡变性减轻,部分细胞仍存在空泡变性,细胞核无明显固缩,白质纤维分布基本均匀,形态完整,无脱髓鞘。提示芒针能有效促进脊髓形态的恢复,效果优于 B 组。



注:图 A1 为 A 组 × 100,图 A2 为 A 组 × 400,图 B1 为 B 组 × 100,图 B2 为 B 组 × 400,图 C1 为 C 组 × 100,图 C2 为 C 组 × 400

图 2 各组光镜下脊髓组织的组织学改变

### 2.3 抗炎反应

为了测试芒针治疗是否通过调节炎症性细胞因子的分泌调控炎症过程,笔者分析了 T<sub>9-10</sub> 节段脊髓组织中的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B 的水平。由表 3 可见,脊髓损伤 7 d 后,B 组促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、

IL-6、NF- $\kappa$ B)的水平均显著升高,与 A 组比较,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。芒针治疗后,C 组促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B)的水平均显著下降,与 B 组比较,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。提示芒针能通过抑制炎症反应促进脊髓损伤的恢复。



表 3 各组大鼠脊髓组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B 水平比较

( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

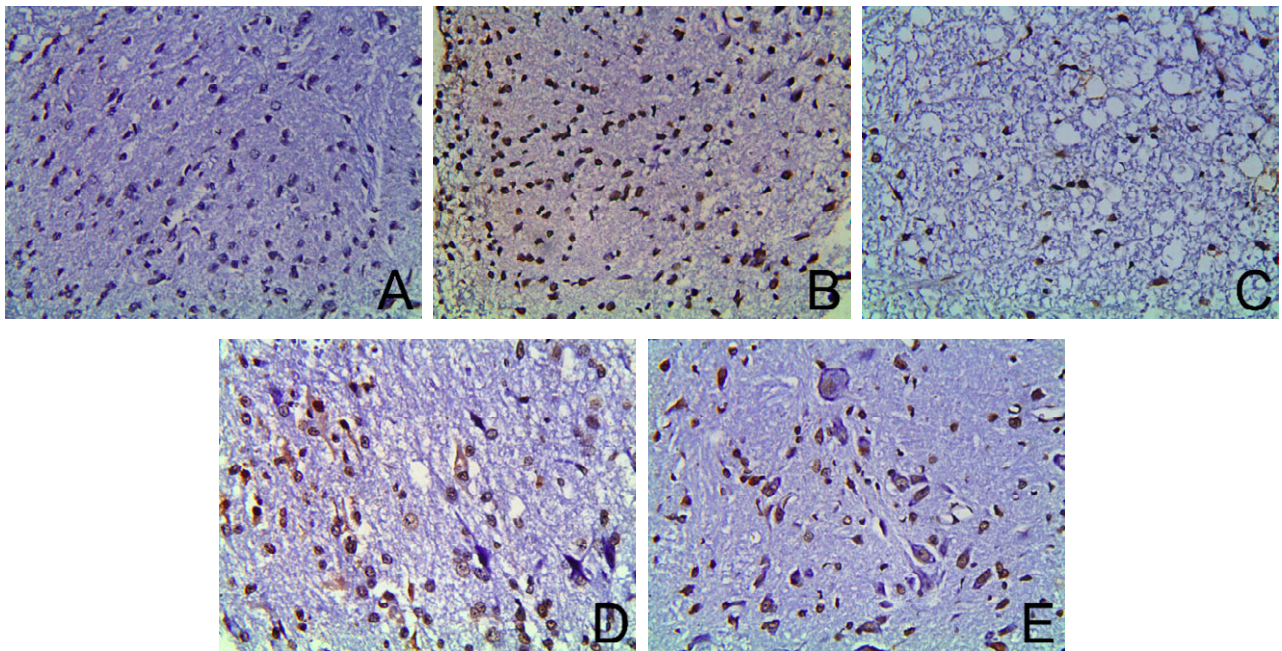
组别	n	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	NF- $\kappa$ B
A 组	30	154.61 $\pm$ 4.51	16.95 $\pm$ 0.80	76.67 $\pm$ 3.40	538.80 $\pm$ 14.04
B 组	30	211.38 $\pm$ 3.54 <sup>1)</sup>	23.75 $\pm$ 0.77 <sup>1)</sup>	102.53 $\pm$ 3.23 <sup>1)</sup>	816.79 $\pm$ 13.79 <sup>1)</sup>
C 组	30	170.06 $\pm$ 3.21 <sup>2)</sup>	18.73 $\pm$ 1.04 <sup>2)</sup>	86.81 $\pm$ 1.49 <sup>2)</sup>	626.45 $\pm$ 4.95 <sup>2)</sup>

注:与 A 组比较 <sup>1)</sup>P<0.01;与 B 组比较 <sup>2)</sup>P<0.01

### 2.4 抗细胞凋亡的影响

为了检验芒针是否能有效抑制细胞凋亡,笔者采用损伤脊髓组织(距离 T<sub>10</sub> 脊髓节段损伤正中 0.1 cm)进行 TUNEL 染色观察。A 组因未损伤脊髓,仅有少量凋亡(见图 3A)。术后 7 d, B 组大鼠脊髓损伤节段周围出现大量的凋亡细胞(见图 3B),大鼠脊髓组织神经细胞凋亡指数与 A 组比较,差异具有统计学意义(P<0.01)。C 组经芒针治疗后,凋亡细胞数明显减少(见图 3C),神经细胞凋亡指数与 B 组比较,差异具有统计学意义

(P<0.01)。D 组和 E 组分别使用 LY294002 和 PD98059 后,凋亡细胞数有所回升(见图 3D、图 3E),神经细胞凋亡指数与 C 组比较,差异均具有统计学意义(P<0.01)。每张切片选取 5~10 个不同的视野进行 TUNEL 阳性细胞计数,阳性细胞率 = 阳性细胞数/总细胞数。提示脊髓损伤后存在大量凋亡的发生,芒针治疗后减少了凋亡现象,使用 LY294002 和 PD98059 后抑制了芒针的作用,说明 PI3K/Akt 和 MAPK/1/2 信号通路可能参与了芒针修复脊髓损伤的过程。详见表 4。



注:图 A 为 A 组,图 B 为 B 组,图 C 为 C 组,图 D 为 D 组,图 E 为 E 组

图 3 脊髓损伤 7 d 后各组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡情况

表 4 各组脊髓组织神经细胞凋亡指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	神经细胞凋亡指数
A 组	30	0.08 $\pm$ 0.02
B 组	30	0.95 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
C 组	30	0.69 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
D 组	30	0.89 $\pm$ 0.02 <sup>3)</sup>
E 组	30	0.88 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>

注:与 A 组比较 <sup>1)</sup>P<0.01;与 B 组比较 <sup>2)</sup>P<0.01;与 C 组比较 <sup>3)</sup>P<0.01

### 2.5 Bax 和 Bcl-2 免疫反应的分布及其变化

表 5 各组脊髓组织 Bcl-2、Bax 阳性表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

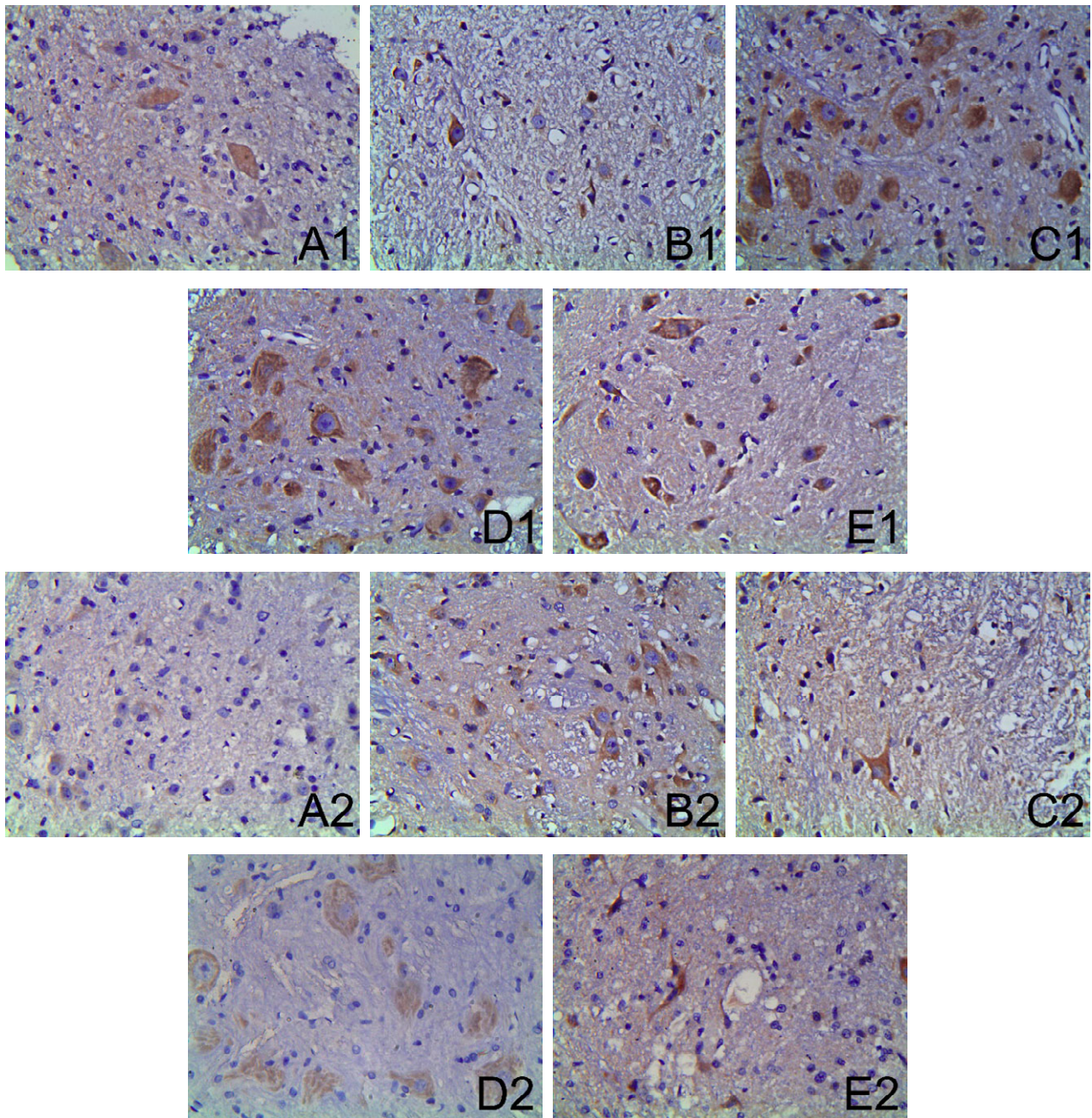
组别	n	Bcl-2(个/mm <sup>2</sup> )	Bax(个/mm <sup>2</sup> )
A 组	30	0.09 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00
B 组	30	0.12 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.00
C 组	30	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.08 $\pm$ 0.00 <sup>1)</sup>
D 组	30	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>
E 组	30	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>

注:与 B 组比较 <sup>1)</sup>P<0.01;与 C 组比较 <sup>2)</sup>P<0.01, <sup>3)</sup>P<0.05



脊髓损伤后 7 d, B 组 Bcl-2 的阳性细胞数明显减少(见图 4B1), Bax 的阳性细胞数明显增加(见图 4B2)。经芒针治疗后, C 组 Bcl-2 的阳性细胞数明显增加(见图 4C1), Bax 的阳性细胞数明显减少(见图 4C2), 与 B 组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。D 组 Bcl-2

的阳性细胞数有所下降(见图 4D1、图 4E1), Bax 的阳性细胞数有所增加(见图 4D2、图 4E2), 与芒针组相比, 差异均具有统计学意义( $P < 0.01, P < 0.05$ )。提示芒针可以通过上调 Bcl-2 和下调 Bax 的表达产生抗凋亡作用。详见表 5。



注: A1 为 A 组 Bcl-2, A2 为 A 组 Bax, B1 为 B 组 Bcl-2, B2 为 B 组 Bax, C1 为 C 组 Bcl-2, C2 为 C 组 Bax, D1 为 D 组 Bcl-2, D2 为 D 组 Bax, E1 为 E 组 Bcl-2, E2 为 E 组 Bax

图 4 脊髓损伤 7 d 后各组大鼠脊髓神经组织 Bcl-2 和 Bax 阳性表达情况

## 2.6 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路的影响

信号转导过程的激活, 可以影响疾病的转归。为了检验 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路是否参与了芒针治疗的过程, 笔者采用新鲜脊髓组织(距离 T<sub>10</sub> 脊髓节段

损伤正中 0.1 cm)进行 Western Blot 检测。结果显示, B 组脊髓损伤后 p-Akt 和 p-ERK1/2 表达明显升高, 与 A 组比较, 差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。C 组 p-Akt 和 p-ERK1/2 显著增高, 与 B 组比较, 差异均有统计学意

义( $P < 0.01$ )。D组和E组 p-Akt 和 p-ERK1/2 表达均降低,与C组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。提示芒针治疗可能与 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路有关。详见表 6 及图 5、图 6。

表 6 各组受损节段脊髓组织 p-Akt 和 p-ERK1/2 表达情况比较 ( $\bar{x} \pm s, ng/L$ )

组别	n	p-Akt	p-ERK1/2
A组	30	0.56 ± 0.11	0.86 ± 0.09
B组	30	1.04 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.20 ± 0.13 <sup>1)</sup>
C组	30	1.38 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.62 ± 0.20 <sup>2)</sup>
D组	30	1.17 ± 0.04 <sup>4)</sup>	-
E组	30	-	1.32 ± 0.06 <sup>3)</sup>

注:与A组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与B组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与C组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.05$

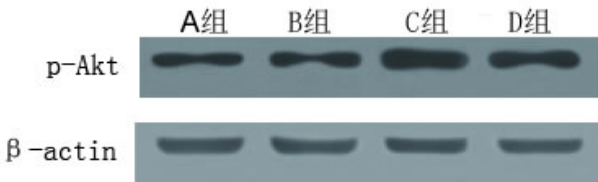


图 5 术后 7 d 各组受损节段脊髓组织 p-Akt 表达情况

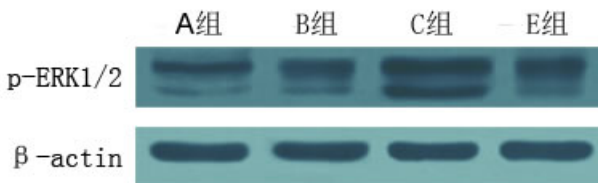


图 6 术后 7 d 各组受损节段脊髓组织 p-ERK1/2 表达情况

### 2.7 线粒体凋亡途径的影响

表 7 各组受损节段脊髓组织 Cyt-C 和 Caspase-3 的 mRNA 含量比较 ( $\bar{x} \pm s, ng/L$ )

组别	n	Cyt-C	Caspase-3
A组	30	1.00 ± 0.02	0.91 ± 0.12
B组	30	1.45 ± 0.03 <sup>1)</sup>	1.28 ± 0.03 <sup>1)</sup>
C组	30	1.04 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.95 ± 0.05 <sup>1)</sup>
D组	30	1.21 ± 0.09 <sup>3)</sup>	1.10 ± 0.06 <sup>3)</sup>
E组	30	1.31 ± 0.02 <sup>3)</sup>	1.17 ± 0.02 <sup>3)</sup>

注:与A组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与B组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与C组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$

A组因未损伤脊髓,Cyt-C 和 Caspase-3 仅少量表达。B组脊髓损伤后促进了 Cyt-C 和 Caspase-3 的激活,与A组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。C组显著抑制 Cyt-C 和 Caspase-3 的表达,与B组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。D组和E组 Cyt-C 和

Caspase-3 的表达均有所升高,与C组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。提示芒针治疗后可以促进 Cyt-C 和 Caspase-3 的降低,这种作用可能与 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路有关。详见表 7 及图 7、图 8。

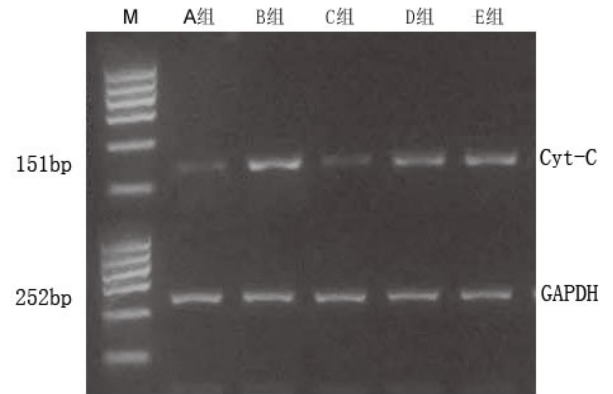


图 7 术后 7 d 各组大鼠受损节段脊髓组织 Cyt-C 的 mRNA

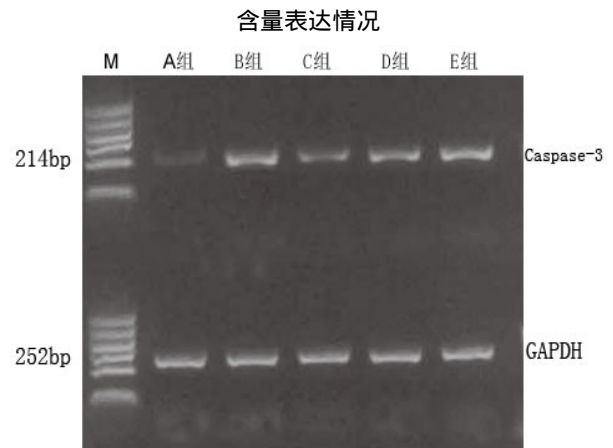


图 8 术后 7 d 各组大鼠受损节段脊髓组织 Caspase-3 的 mRNA 含量表达情况

### 3 讨论

芒针由古代九针之一的“长针”发展而来,因针体长、刺入深,具有取穴少、透穴多、针感强、传导快等特点,被广泛应用于各种疾病的治疗中,包括神经系统疾病中的神经根炎、多发性神经炎、瘫痪、胃肠疾病以及运动系统、精神系统、妇科等方面的疾患<sup>[16-17]</sup>。本研究结果显示,芒针促进了脊髓损伤的功能性恢复;炎症反应和细胞凋亡参与了芒针的治疗作用;进一步研究发现,PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路参与了芒针抗凋亡作用;PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路的激活是通过线粒体凋亡途径产生抗凋亡作用实现的。

脊髓损伤的治疗一直是神经科学研究的一大问题。长期大量的研究证明,针刺治疗急性脊髓损伤可以减



轻炎症反应和脊髓继发性损伤,改善感觉和运动功能,并改善晚期神经功能障碍<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,芒针治疗 7 d 后,损伤大鼠 BBB 评分及形态学观察均有好转,运动功能恢复明显,脊髓形态结构尚完整。在此基础上,笔者认为芒针治疗急性脊髓损伤是有疗效的,其参与了脊髓损伤的神经保护作用。

众所周知,免疫炎症反应是脊髓继发性损伤的主要机制之一。小胶质细胞在继发性神经损伤发挥重要的作用。激活的小胶质细胞会释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促炎性因子,从而加重局部炎症反应。TNF- $\alpha$ 通过与肿瘤坏死因子受体(TNFR)结合,活化积聚炎症细胞,激活内皮细胞及神经细胞,促进 NF- $\kappa$ B 的活化及 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 自身的分泌,释放细胞毒素(如氧自由基、蛋白水解酶等),诱导花生四烯酸代谢产物的释放及脂质过氧化,破坏细胞膜性结构,导致炎症加重,增加血脊髓屏障的通透性,使损伤的脊髓进一步损伤,并可通过多种途径诱发凋亡<sup>[20]</sup>。大量研究<sup>[21-24]</sup>证明,针灸具有抗炎、镇痛、抗脂质过氧化、防止细胞受损、抗凋亡等作用。本研究结果发现,脊髓损伤后,大鼠 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促炎性因子含量和神经元细胞凋亡率明显增高,经芒针治疗可明显降低伤段脊髓组织中 NF- $\kappa$ B、IL-6 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的浓度,并使神经元细胞凋亡率明显下降,具有明显的炎症抑制和抗凋亡作用。

细胞凋亡是神经细胞损伤后细胞程序性死亡的重要形式。处于细胞凋亡的早期阶段的信号转导过程的激活,是细胞凋亡发生的必要前提。PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路的活化是调节细胞的增殖、分化、代谢、凋亡的主要途径<sup>[25-26]</sup>。活化的 Akt(p-Akt)被认为是调节神经元生存的中枢性控制因子,与神经元的发育、分化、轴突的生长以及介导突触的可塑性等密切相关。Akt 的凋亡抑制作用是由 Yao R 等<sup>[27]</sup>首次发现的,其研究表明抑制 PI3K/Akt 的活性能抵消神经生长因子(NGF)抑制细胞凋亡促细胞存活的作用。Jung SY 等<sup>[7]</sup>在研究跑步机运动通过激活 PI3K/Akt 通路在大鼠降低脊髓损伤诱导的细胞凋亡中发现脊髓损伤后降低了 NT-3 和 IGF-1 蛋白的表达,p-Akt/Akt 的比率与 Bcl-2/Bax 的比例明显下降,Caspase-3 的表达明显增加。这项研究表明在脊髓损伤后跑步机上锻炼通过抑制细胞凋亡促进运动功能的恢复,且锻炼的有益效果可以归因于通过激活 PI3K/Akt 途径的增加的神经营

养因子表达的影响。ERK1/2 细胞信号传导通路是由一个小 GTP 蛋白连接活化的受体酪氨酸激酶和胞浆蛋白组成的级联反应<sup>[28]</sup>,使 ERK 在神经损伤的区域迅速激活(p-ERK1/2),减少神经损伤对机体带来的影响。在外伤性脑损伤中,急性挫伤区的神经元可发生凋亡,并且持续数天至数星期,此过程中 ERK1/2 与 Caspase 家族蛋白被激活,引起兴奋性氨基酸增多,使细胞内的钙离子和氧自由基增加,促进了神经元的凋亡作用<sup>[29]</sup>。本研究也显示,芒针治疗后,大鼠 p-Akt、p-ERK1/2 的表达明显增强,说明 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路有可能参与了芒针的抗凋亡作用。LY294002 和 PD98059 分别为 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路的特异性抑制剂,特异性抑制 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化,因而阻断信号通路下游的级联反应。有研究<sup>[11]</sup>发现,帕金森病中促红细胞生成素的抗凋亡作用是通过 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /Caspase-3 信号通路实现的,而这种抗凋亡作用可以被 PI3K 抑制剂 LY294002 和 GSK-3 $\beta$ 抑制剂氯化锂抵消。Lu KT 等<sup>[13]</sup>通过使用 ERK/MAPK 通路特异性抑制剂 PD98059,发现抑制 ERK/MAPK 通路的激活可以减轻大鼠 TBI 模型引起的脑组织水肿和神经功能损害。本实验在脊髓损伤前 0.5 h 通过鞘内注射 LY294002 和 PD98059,并进行芒针治疗后发现,注射过特异性抑制剂 LY294002 和 PD98059 的大鼠 p-Akt 和 p-ERK1/2 表达较芒针组少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。因此验证了 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路确实参与了芒针的抗凋亡作用。

线粒体是细胞的“能量供应器”,不仅参与了多种生理过程的调节,还通过线粒体凋亡途径在细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。当细胞受损时,线粒体膜的通透性改变,将会释放 Cyt-C 和 Caspase,通过信号级联激活细胞死亡程序。细胞色素 C 是线粒体介导凋亡途径的关键因子。Akt 可阻止线粒体释放细胞色素 C 及凋亡诱导因子 AIF,抑制 Caspase 瀑布级联反应,从而发挥抗凋亡的作用。Akt 还能磷酸化 Bcl-2 家族成员 BAX 的 Ser184 位点,抑制 Cyt-C 释放,负调控促凋亡功能<sup>[31]</sup>。ERK1/2 的激活不但可以上调 Bcl-2 等抗凋亡蛋白的表达,而且可以诱导其活化<sup>[32-33]</sup>。另外,活化的 ERK1/2 能使 Bad ser112 位点磷酸化(p-Bad),p-Bad 与 Bcl-2 或 Bcl-xL 发生解聚,并且与磷酸丝氨酸结合蛋白 14-3-3 结合,游离的 Bcl-2 或 Bcl-xL 则促进细胞的抗凋亡作用。Luchetti F 等<sup>[10]</sup>发现褪黑激素能够通过提高 bcl-2

水平降低超氧阴离子的产生、线粒体损伤和 Caspase 依赖的细胞凋亡,并在细胞质减少 Cyt-C 的释放,且增加了 ERK 的激活,ERK1/2 抑制剂 PD98059 的应用,ROS 增加、线粒体功能障碍和细胞凋亡。本研究采用免疫组化检测 Bcl-2 和 Bax 的阳性细胞数,发现芒针治疗后 Bcl-2 阳性细胞数增加,Bax 阳性细胞数减少。Cyt-C 和 Caspase-3 在芒针干预后也显著降低,凋亡受到抑制。特异性抑制剂 LY294002 和 PD98059 预处理后,Bcl-2 阳性细胞数下调,Bax 阳性细胞数上调。Cyt-C 和 Caspase-3 在芒针干预后较芒针组有所升高,凋亡较明显。证实了芒针治疗激活 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路通过线粒体凋亡途径产生抗凋亡作用的。

综上所述,芒针治疗通过炎症抑制和 PI3K/Akt 及 ERK1/2 信号通路通过线粒体凋亡途径产生的抗凋亡作用,介导神经保护作用及改善神经运动功能,明确了芒针治疗脊髓损伤的具体机制,为临床应用芒针治疗急性脊髓损伤提供了理论依据。

#### 参考文献

- [1] Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure[J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(2): 294-301.
- [2] Borgens RB, Liu-Snyder P. Understanding secondary injury[J]. *Q Rev Biol*, 2012, 87(2): 89-127.
- [3] Ferguson AR, Hook MA, Garcia G, et al. A simple post hoc transformation that improves the metric properties of the BBB scale for rats with moderate to severe spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21(11): 1601-1613.
- [4] Lan WB, Lin JH, Chen XW, et al. Overexpressing neuroglobin improves functional recovery by inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2014, 1562: 100-108.
- [5] Fukunaga K, Miyamoto E. Role of MAP kinase in neurons[J]. *Mol Neurobiol*, 1998, 16(1): 79-95.
- [6] Shehadah A, Chen J, Zacharek A, et al. Niaspan treatment induces neuroprotection after stroke[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 40(1): 277-283.
- [7] Jung SY, Kim DY, Yune TY, et al. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7 (3): 587-593.
- [8] Raghupathi R, Muir JK, Fulp CT, et al. Acute activation of mitogen-activated protein kinases following traumatic brain injury in the rat: implications for posttraumatic cell death[J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 438-448.
- [9] Zhuang S, Schnellmann RG. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(3): 991-997.
- [10] Luchetti F, Betti M, Canonico B, et al. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(3): 339-351.
- [11] Wu Y, Shang Y, Sun S, et al. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway[J]. *Apoptosis*, 2007, 12 (8): 1365-1375.
- [12] Wang Y, Gao C1, Zhang Y, et al. Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 43(1): 168-178.
- [13] Lu KT, Cheng NC, Wu CY, et al. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(3): 917-922.
- [14] Baptiste DC, Fehlings MG. Update on the treatment of spinal cord injury[J]. *Prog Brain Res*, 2007, 161: 217-233.
- [15] Park J, Hopwood V, White AR, et al. Effectiveness of acupuncture for stroke: a systematic review[J]. *J Neurol*, 2001, 248(7): 558-563.
- [16] 高锡朋. 针刺治疗外伤性截瘫[J]. *中国针灸*, 1985, 5(5): 3-4.
- [17] 李观荣, 戢良秀, 张声泽, 等. 针刺治疗外伤性截瘫 124 例疗效观察[J]. *中医杂志*, 1985, 26(12): 34-36.
- [18] Rapson LM, Wells N, Pepper J, et al. Acupuncture as a promising treatment for below-level central neuropathic pain: a retrospective study[J]. *J Spinal Cord Med*, 2003, 26(1): 21-26.
- [19] Paola FA, Arnold M. Acupuncture and spinal cord medicine[J]. *J Spinal Cord Med*, 2003, 26(1): 12-20.
- [20] Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, et al. TNF-alpha

- blockage in a mouse model of SCI: evidence for improved outcome[J]. *Shock*, 2008, 29(1): 32-41.
- [21] Lü YL, Zhao LM, Chen HP, *et al.* Effect of electroacupuncture at Jiaji acupoint on anti-inflammation, analgesia and immunoregulation[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, 10 (19): 171-173.
- [22] Usichenko TI. Acupuncture as part of multimodal analgesia after caesarean section[J]. *Acupunct Med J*, 2014, 32 (3): 297-298.
- [23] Xu JN, Xiao D, Ju JH, *et al.* Effect of electroacupuncture on treatment of spinal cord injuries in rats[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, 10(23): 180-182.
- [24] Wang F, Gao Z, Li X, *et al.* NDRG2 is involved in anti-apoptosis induced by electroacupuncture pretreatment after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurol Res*, 2013, 35(4): 406-414.
- [25] Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(11): 2050-2055.
- [26] Zhu Y, Culmsee C, Klumpp S, *et al.* Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways[J]. *Neuroscience*, 2004, 123(4): 897-906.
- [27] Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor[J]. *Science*, 1995, 267(5206): 2003-2006.
- [28] Mazzucchelli C, Brambilla R. Ras-related and MAPK signalling in neuronal plasticity and memory formation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(4): 604-611.
- [29] Raghupathi R, Muir JK, Fulp CT, *et al.* Acute activation of mitogen-activated protein kinases following traumatic brain injury in the rat: implications for posttraumatic cell death[J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 438-448.
- [30] Bleicken S, Wagner C, García-Sáez AJ. Mechanistic differences in the membrane activity of Bax and Bcl-xL correlate with their opposing roles in apoptosis[J]. *Biophys J*, 2013, 104(2): 421-431.
- [31] Xin M, Deng X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(11): 10781-10789.
- [32] Wiener Z, Band AM, Kallio P, *et al.* Oncogenic mutations in intestinal adenomas regulate Bim-mediated apoptosis induced by TGF- $\beta$  [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (21): E2229-E2236.
- [33] Irls C, Nava-Kopp AT, Morán J, *et al.* Neonatal maternal separation up-regulates protein signalling for cell survival in rat hypothalamus[J]. *Stress*, 2014, 17(3): 275-284.

收稿日期 2016-08-21