

· 基础研究 ·

清脑益智方通过调控 PI3K/Akt 信号通路抗缺氧复氧诱导皮层神经元细胞凋亡的实验研究

秦秀德¹ 刘 玉¹ 朱金墙² 王 硕² 林松俊¹ 魏周科¹

摘要 **目的** 观察清脑益智方含药脑脊液对缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)神经元存活率、凋亡及 PI3K/Akt 信号转导通路的影响,探讨清脑益智方治疗血管性痴呆的部分机制。**方法** 原代培养皮层神经元,将神经元细胞(CNC)按照 1×10^6 的浓度接种于细胞培养板,将 CNC 分为正常组(简称 NC 组)、缺氧复氧组(简称 MC 组)、正常脑脊液组(简称 N-CSF 组)、清脑益智方含药脑脊液高剂量组(简称 QN-H 组)、清脑益智方含药脑脊液低剂量组(简称 QN-L 组)、恩必普组(简称 NBP 组)。除 NC 组外,其余各组均在添加相应干预措施后进行缺氧 24 h 复氧 24 h 处理。采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力;采用 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况;采用 Western blot 法检测磷酸化 PI3K 及磷酸化 Akt 蛋白表达;采用逆转录 PCR(RT-PCR)法检测 PI3K、Akt、mTOR 基因表达。**结果** 与 NC 组比较,MC 组 CNC 活力(OD 值)下降($P < 0.01$)。CNC 凋亡数目明显增多($P < 0.01$)。PI3K、Akt、mTOR 基因表达均显著降低,p-PI3K、p-Akt 蛋白表达升高($P < 0.05$);与 MC 组比较,QN-H 组 OD 值升高明显($P < 0.01$);QN-H、QN-L、NBP 组神经元凋亡数目明显减少($P < 0.01$),其中 QN-H 组神经元凋亡数目较 NBP 组更少($P < 0.01$);QN-H 组 PI3K、Akt、mTOR 基因表达水平均提高($P < 0.05$, $P < 0.01$),QN-L 组 PI3K、Akt 基因表达水平亦升高($P < 0.01$);QN-H、QN-L、NBP 组的 p-PI3K 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。**结论** 清脑益智方能提高缺氧复氧致皮层神经细胞活力,减少缺氧复氧引起的皮层神经元的凋亡数目,此作用可能与清脑益智方对 PI3K/Akt 信号转导通路的调节有关。

关键词 清脑益智方;血管性痴呆;缺氧复氧;神经元;PI3K/Akt 信号转导通路

Mechanism Study of Qinnao Yizhi Recipe on Fighting against Neuron Apoptosis through Regulating PI3K/Akt Signaling Transduction Way QIN Xiu-de¹, LIU Yu¹, ZHU Jin-qiang², WANG Shuo², LIN Song-jun¹, and GUO Zhou-ke¹ 1 Department of Encephalopathy, Shenzhen TCM Hospital, Guangdong (518000); 2 Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of TCM, Key Laboratory of Pharmacology of TCM Formulae, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193)

ABSTRACT **Objective** To observe possible mechanism of Qingnao Yizhi Recipe (QN) for treating vascular dementia (VD) through the effect of QN containing cerebrospinal fluid (CSF) on the survival rate and apoptosis of hypoxia/reoxygenation (H/R) neurons, as well as PI3K-Akt signaling transduction pathway. **Methods** The primary cultured rat cortical neurons were vaccinated in culture plates at 1×10^6 /mL. Central nerve cells (CNCs) were divided into the normal control group (NC), the H/R group (model control, MC), the normal CSF group (N-CSF), high dose CSF containing QN group (QN-H), low dose CSF containing QN group (QN-L), and CSF containing butylphthalide (NBP) group. Except the NC group, CNCs in the other groups were firstly dealt with hypoxia for 24 h and then with reoxygenation for 24 h. The cell viability was tested by CCK-8 kit. The cell apoptosis of each group was detected through

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81202653);全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(No. 201082);中国博士后科学基金一等资助项目(No. 20110490080);广东省省中医传承项目(No. 粤财社 2014-539 号);深圳市科技计划项目(No. JCYJ20150401163247219)

作者单位:1.广东省深圳市中医院脑病科(广东 518000);2.天津中医药大学中医药研究院方剂学教育部重点实验室(天津 300193)

通讯作者:魏周科, Tel:18938065979, E-mail:szzyygzk@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170901. 253

TUNEL. The phosphorylation of PI3K and phosphorylated Akt levels were tested by Western blot. The gene expressions of PI3K, Akt, and mTOR were detected through reverse transcription-PCR (RT-PCR). Results Compared with the NC group, the vitality (OD value) of the CNCs reduced in the MC group ($P < 0.01$). The number of apoptotic CNCs increased obviously ($P < 0.01$). The gene expressions of PI3K, Akt, and mTOR all significantly decreased, the p-PI3K and p-Akt protein expressions were elevated ($P < 0.05$). Compared with the MC group, the OD value of the QN-H group significantly increased ($P < 0.01$). The apoptotic CNCs in the QN-H, QN-L, and NBP groups were all apparently reduced ($P < 0.01$). Of them, the number of apoptotic CNCs in the QN-H group was even less than that in the NBP group ($P < 0.01$). The gene expressions of PI3K, Akt, and mTOR in the QN-H group all increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The gene expressions of PI3K, Akt, and mTOR in the QN-H group also all increased ($P < 0.01$). The p-PI3K protein expression in the QN-H, QN-L, and NBP group all apparently increased ($P < 0.05$). Conclusions QN could elevate the vitality of H/R CNCs, reduce H/R induced apoptotic number of CNCs. Its effect might be probably related to regulating PI3K-Akt signaling transduction pathway.

KEYWORDS Qingnao Yizhi Recipe; vascular dementia; hypoxia/reoxygenation; neuron; PI3K-Akt signaling transduction pathway

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是包括缺血性或出血性脑血管病, 或心脏循环障碍引起的低血流灌注导致的各种临床痴呆, 是痴呆的常见类型。60 岁及以上人群的 VD 患病率为 0.9%, 男性较女性更为常见, 给社会和家庭带来沉重负担^[1,2]。清脑益智方是张伯礼院士治疗痴呆的临床经验方。PI3K/Akt 信号转导途径是重要的细胞存活信号通路, 对脑缺血神经细胞凋亡起重要的调控作用^[3]。本实验拟从 PI3K/Akt 信号转导途径探讨清脑益智方对 VD 的作用机制, 现报道如下。

材料与方法

1 动物 雄性大耳白家兔 20 只, 体重 (2 ± 0.2) kg, 购自天津中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (津) 2010 - 0004; 孕 16 天 Wistar 大鼠 10 只, 体重 (200 ± 20) g, 购自天津中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (津) 2009 - 0004。动物实验经天津中医药大学医学动物实验中心伦理委员会批准。

2 药物 清脑益智方 (由人参 5 g 麦冬 12 g 浙贝母 12 g 黄连 6 g 石菖蒲 12 g 等组成) 由天津中医药大学附属保康医院提供; 恩必普软胶囊 (每粒 0.1 g, 石药集团恩必普药业有限公司, 批号: 11060211); 清脑益智方浸膏由天津中医药大学制药厂经水煎醇沉加工为 200% 的清脑益智方浓缩液, -20°C 保存。恩必普工作液采用花生油将恩必普软胶囊配制为 5% 的溶液。

3 主要试剂 Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公

司); Power SYBR Green PCR Master Mix (美国 Applied Biosystems 公司); RNase-free ddH₂O (天根生化科技有限公司); 乙二胺四乙酸 (EDTA, 美国 Promega 公司); 二硫苏糖醇 (DTT, 美国 Invitrogen 公司); TEMED (德国 Serva 公司); 40% 丙烯酰胺 (北京索莱宝科技有限公司); 过硫酸铵 (AP, 美国 Sigma 公司); RIPA 裂解液 (上海生工生物工程有限公司); ECL 化学发光试剂 (美国 GE Healthcare 公司); BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒 (上海生工生物工程有限公司); 兔抗鼠一抗、羊抗兔二抗 (p-PI3K、p-Akt, 美国 Cell Signaling 公司); Anti rabbit secondary antibody (美国 Cell Signaling 公司); 硝酸纤维素膜 (美国, Mollipore); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、抗荧光淬灭封片液、免疫染色固定液、免疫染色洗涤液 (上海碧云天生物技术有限公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Ameresco 公司); 多聚赖氨酸 (美国 Sigma 公司); DMEM/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司)。

4 主要仪器 酶标仪 (Multiskan Ascent)、三气培养箱 (MODEL 3131)、CO₂ 恒温培养箱 (FORMA3111 型) 均购自美国 Thermo 公司; 全自动生化分析仪 (7020, 日本日立公司); 超净工作台 (BCM-1300A, 苏州安泰空气技术有限公司); Nikon 倒置相差显微镜 (TE300, Leica dmil 公司); 倒置荧光显微镜 (Ti-U, 日本 Nikon 公司); 实时荧光定量 PCR 系统 (ABI © 7300 型, 美国 Applied Biosystems 公司); 电泳仪 (DYY-11B, 天津泰斯特公司); 多功能成像系统 (VersaDoc 5000 MP), C1000TM (Thermal Cycler); SLT Spectra III 酶标仪 (F039003, 澳大利亚

Tecan 公司); 冷冻离心机 (Microfuge 22R, 美国 Beckman 公司)。

5 方法

5.1 含药脑脊液的制备 采用随机数字表法将 20 只大耳白家兔随机分为空白对照组 5 只, 清脑益智方组 10 只, 恩必普组 5 只。清脑益智方组和恩必普组灌胃剂量如下 (灌胃剂量均为成人服用量的 10 倍^[4]): 清脑益智方组: 6.25 mL, 每天 2 次; 恩必普组: 0.1 g, 每天 2 次。连续灌胃 3 天, 末次给药后 1.5 h 取脑脊液, 然后 3 000 r/min 离心 10 min, 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌后 -40 ℃ 冰箱储存备用。

5.2 神经元原代培养 取怀孕 16 天的 Wistar 大鼠, 将之颈椎脱臼处死, 70% 医用酒精浸泡 3 ~ 5 min, 在无菌条件下, 取出胚胎大脑皮层, 剔除脑膜及大血管。将皮质剪碎约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 加入体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化, 37 ℃, 5 min。立刻加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化, 并将组织完全吹散。经 75 μm 筛网过滤, 收集滤液; 800 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 收集沉淀, 用含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液重新悬浮, 调整细胞密度 1 × 10⁶/mL, 接种于预先涂有体积分数 0.01% 多聚赖氨酸的培养板中。4 h 后, 置换为无血清 DMEM/F12 培养液 (含体积分数 0.02 B-27, 100 IU/mL 青霉素, 100 IU/mL 链霉素)。以后, 每 2 天半量换液 1 次。细胞生长至 7 天时, 用于实验。

5.3 分组及给药方法 将接种于细胞培养板 (96 孔、6 孔) 的神经元细胞 CNC 分组如下: 正常对照组 (简称 NC 组): 置换无血清培养液继续培养 48 h, 不做 H/R 处理; 缺氧复氧组 (简称 MC 组): 置换无血清培养液, 将培养板放入体积分数分别为 0.94 N₂, 0.05 CO₂, 0.01 O₂ 的三气培养箱缺氧孵育 24 h, 再于体积分数分别为 0.95 空气, 0.05 CO₂ 条件下复氧孵育 24 h; 清脑益智方含药脑脊液高剂量组 (简称 QN-H 组): 置换含清脑益智方含药脑脊液 10% 的无血清培养液; 清脑益智方含药脑脊液低剂量组 (简称 QN-L 组): 置换含清脑益智方含药脑脊液 5% 的无血清培养液; 恩必普组 (简称 NBP 组): 置换含恩必普含药脑脊液 5% 的无血清培养液; 之后将 QN-H、QN-L、NBP 组培养板放入体积分数分别为 0.94 N₂, 0.05 CO₂, 0.01 O₂ 的三气培养箱缺氧孵育 24 h, 再于体积分数分别为 0.95 空气, 0.05 CO₂ 条件下复氧孵育 24 h。

6 观察指标及检测方法

6.1 CNC 活力检测 采用 CCK-8 检测, 按照试剂盒说明书操作。

6.2 CNC 细胞凋亡情况 采用 TUNEL 法。操作步骤按上海碧云天生物技术有限公司一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。计算细胞凋亡率: 在 40 × 10 高倍镜下每个玻片在左上、左下、右上、右下及中间随机取 5 个不同视野, 计算细胞凋亡率 (%) = (凋亡细胞数/总细胞数) × 100%, 以反映细胞凋亡程度。

6.3 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达 采用 Western blot 法。于冰上收集各组细胞, 加入蛋白裂解液及 PMSF, 冰上放置 40 min, 4 ℃ 下 12 000 r/min, 离心 40 min, 取上清。Bradford 法进行蛋白浓度测定。取 20 μm 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 通过电转移将蛋白印迹到硝酸纤维素膜上, 放入封闭液中, 37 ℃ 封闭 1 h, 加入对应的 p-PI3K 或 p-Akt 一抗过夜。洗膜后, 加入二抗, 室温静置 1 h 后, 洗膜 3 次, 进行条带检测。

6.4 基因表达的检测 采用 RT-PCR 法。首先提取细胞总 RNA, 紫外分光光度法检测 RNA 样品的浓度及纯度, 然后反转录成 cDNA。根据 Genbank 数据库发布的相关基因序列并参考相关文献报道, 设计合成各基因引物和内参的引物。在 PCR 反应体系中加入引物和荧光染料, 用荧光定量 PCR 仪进行扩增, 通过计算标本的目的基因拷贝数与内参拷贝数的比值来确定各组目的基因的相对含量, 并比较各组间的差异。引物的设计采用 PrimerExpress 2.0. (ABI) 软件, 由上海生工生物技术有限公司合成, 检测基因的引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

基因名称	引物序列	引物长度 (bp)
PI3K	F: 5'-AACTCTGGGGATGACCTGGA-3'	20
	R: 5'-AGGCGGTCAACAACACTCCTA-3'	20
Akt	F: 5'-AGGGTTGGCTGCACAAACGA-3'	20
	R: 5'-GTTGTTGAAGACACCCGCG-3'	20
mTOR	F: 5'-GGCTTCTGAAGATGCTGTCC-3'	20
	R: 5'-GAGTTCCAAGGGCAAGAGTG-3'	20
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	20
	R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-TA-3'	20

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件包进行数据处理, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有统计检验均采用双侧检验, 若符合正态分布和方差齐性, 则采用方差分析; 若不符合正态分布和方差齐性, 则采用多个独立样本的秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠 CNC 活力比较 (表 2) 与 NC 组比较, MC 组 OD 值下降 (P < 0.01); 与 MC 组比较, QN-H、QN-L、NBP 组 OD 值均升高。其中 QN-H 组的 OD 值差异有统计学意义 (P < 0.01)。

表 2 各组大鼠 CNC 活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CNC (OD 值)
NC	6	0.49 ± 0.01
MC	6	0.39 ± 0.04 *
N-CSF	6	0.39 ± 0.04
QN-H	6	0.47 ± 0.02 Δ
QN-L	6	0.43 ± 0.02
NBP	6	0.43 ± 0.02

注:与 NC 组比较, * $P < 0.01$;与 MC 组比较, $\Delta P < 0.01$;n 为每组细胞复孔个数

2 各组大鼠 CNC 凋亡率比较(表 3) 与 NC 组比较,MC 组 CNC 凋亡数目明显增多 ($P < 0.01$)。与 MC 组比较,QN-H、QN-L、NBP 组 CNC 凋亡数目明显减少 ($P < 0.01$); QN-H 组 CNC 凋亡数目较 NBP 组更少($P < 0.01$)。

表 3 各组 CNC 凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率 (%)
NC	15	0.53 ± 0.52
MC	15	85.20 ± 2.27 *
N-CSF	15	52.27 ± 1.67
QN-H	15	26.53 ± 1.33 $\Delta \Delta$
QN-L	15	35.00 ± 1.56 Δ
NBP	15	34.20 ± 1.82 Δ

注:与 NC 组比较, * $P < 0.01$;与 MC 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 NBP 组比较, $\Delta P < 0.01$;n 为细胞凋亡检测视野个数

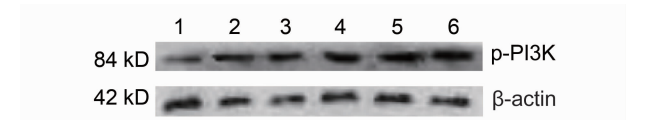
3 各组 CNC PI3K、Akt、mTOR 基因表达比较(表 4) 与 NC 组比较,MC 组 PI3K、Akt、mTOR 基因表达均显著降低 ($P < 0.05$);与 MC 组比较,QN-H 组 PI3K、Akt、mTOR 基因表达水平均有所提高 ($P < 0.05, P < 0.01$),QN-L 组 PI3K、Akt 基因表达水平差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

表 4 各组 CNC PI3K、Akt、mTOR 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	Akt	mTOR
NC	6	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.24
MC	6	0.94 ± 0.07 *	0.91 ± 0.14 *	0.90 ± 0.13 *
N-CSF	6	0.95 ± 0.16	0.94 ± 0.17	0.93 ± 0.12
QN-H	6	1.15 ± 0.15 $\Delta \Delta$	1.19 ± 0.16 $\Delta \Delta$	1.17 ± 0.20 Δ
QN-L	6	1.12 ± 0.14 $\Delta \Delta$	1.14 ± 0.11 $\Delta \Delta$	1.09 ± 0.29
NBP	6	1.09 ± 0.19	1.10 ± 0.18	1.09 ± 0.20

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$;与 MC 组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta \Delta P < 0.01$;n 为 RT-PCR 检测所取复孔个数

4 各组 CNC P-pi3K、p-Akt 蛋白表达比较(图 1、2,表 5) 与 NC 组比较,MC 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达升高($P < 0.05$),与 MC 组比较,QN-H、QN-L、NBP 组 p-PI3K 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。QN-H、QN-L 组及 NBP 组 p-Akt 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:1 为 NC 组;2 为 MC 组;3 为 N-CSF 组;4 为 QN-H 组;5 为 QN-L 组;6 为 NBP 组;图 2 同

图 1 各组神经元 p-PI3K 蛋白表达电泳图

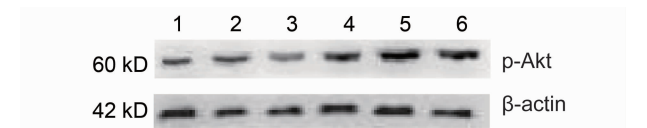


图 2 各组神经元 p-Akt 蛋白表达电泳图

表 5 各组神经元 p-PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-PI3K	p-Akt
NC	3	0.652 ± 0.065	0.639 ± 0.058
MC	3	1.006 ± 0.037 *	0.708 ± 0.039 *
N-CSF	3	1.012 ± 0.105	0.811 ± 0.162
QN-H	3	1.255 ± 0.038 Δ	1.157 ± 0.198
QN-L	3	1.231 ± 0.139 Δ	1.160 ± 0.181
NBP	3	1.239 ± 0.037 Δ	1.159 ± 0.181

注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$;与 MC 组比较, $\Delta P < 0.05$;n 为 Western blot 所取复孔个数

讨 论

VD 是一种慢性进行性疾病,以认知、记忆、言语、情感、性格、动作等方面的精神减退或消失为主要表现,其障碍并非一过性而是慢性持续性,并影响职业、日常生活、社会活动的状态。VD 常见的危险因素包括卒中复发、高血压、糖尿病、高血脂、肥胖、吸烟、高盐饮食等。西医目前尚无肯定的治疗方法和药物可以改善 VD 的整个病程。

中医学认为 VD 多因年老体衰,肾精亏虚,痰瘀阻络而导致髓海空虚,神机失用,治疗多从痰、瘀、虚论治,或补肾填精,或活血通络,或化痰开窍,或益气养阴,或加减用之,或兼而用之,临床多获良效。王永炎院士提出了“浊毒损伤络脉”的病机理论,认为年迈之人,脏腑渐虚,髓海渐衰,水津失布,痰瘀内生互结,郁蒸腐化,浊毒化生,败坏形体,络脉结滞,脑络痹阻,神机失用而发为脑病^[5]。张伯礼院士根据前人关于 VD 的相关理论及自己多年的临床实践经验,筛选出了黄连、丹参、人参、麦冬、石菖蒲等中药,组成具有开窍益智、清脑化毒、醒神降浊、祛痰通络作用的清脑益智方^[6]。本课题前期的研究结果表明清脑益智方具有改善 VD 患者记忆力、提高认知能力、对调节脑血流状态和血液流变性有良好的作用,并能起到恢复异常的行为学等作用^[6,7]。并能

够抑制 JAK2/STAT3 活化,提高神经干细胞的分化^[8],促进缺氧复氧皮层神经元细胞突触重塑^[4]。

近年来的研究表明 PI3K/Akt 信号转导途径是重要的细胞存活信号通路,对脑缺血神经细胞凋亡起重要的调控作用^[9]。是细胞代谢和抗凋亡的重要转导途径。脑卒中后的缺血/再灌注诱导的损伤可导致炎症反应,可进一步触发信号通路激活而最终导致细胞凋亡或坏死。大量研究证实,PI3K/Akt 信号通路参与了脑缺血神经细胞凋亡^[10-12]。Akt 是 PI3K 信号通路中的重要激酶,因其活性区与蛋白激酶 C 和蛋白激酶 A 有高度同源性,故也被称为蛋白激酶 B,其上游信号分子磷酸肌醇依赖性蛋白激酶,整合素连接激酶可增进其活性,而磷酸酶 PTEN 则抑制其活性。Akt 通过 Ser473 残基磷酸化而激活,激活后的 Akt 可磷酸化下游蛋白,如 Bad、GSK3、Caspase-9 等底物或活化 NF- κ B 等抗凋亡蛋白而发挥抑制凋亡作用,对脑缺血缺氧后线粒体凋亡机制亦有调控作用^[13-16]。此外,Akt 激活可显著增加脑缺血诱导的神经发生,促进新生神经细胞的迁移和存活^[17]。PI3K/Akt 等信号系统调控 mTOR 的活性,而 mTOR 则调控低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)等分子表达^[18]。HIF1 对细胞的增生、存活和凋亡有重要影响,能影响 Bcl2 等蛋白的表达^[19]。

本实验研究结果表明,清脑益智方含药脑脊液发挥的提高 H/R CNC 细胞活力、抗 H/R CNC 细胞凋亡的作用可能与 PI3K-Akt 信号转导通路的调节有关。清脑益智方通过促进 PI3K、Akt 的磷酸化激活 PI3K-Akt 信号转导通路,发挥提高 H/R CNC 细胞活力、抗 H/R CNC 细胞凋亡的作用。

参 考 文 献

- [1] 贾建平主编.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2013:227.
- [2] Zhang Y, Xu Y, Nie H, et al. Prevalence of dementia and major dementia subtypes in the Chinese populations: A meta-analysis of dementia prevalence surveys, 1980-2010[J]. Clin Neurosci, 2012, 19(10): 1333-1337.
- [3] 朱金墙,宋宛珊,马妍,等. PI3K/Akt 信号通路与管理性痴呆的关系及中药干预作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2016, 22(9): 223-229.
- [4] 秦秀德,刘玉,张玉莲,等. 清脑益智方含药脑脊液对缺氧复氧皮层神经元细胞重塑相关指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013, 19(10): 174-177.
- [5] 王永炎.“浊毒痹阻脑络”对老年期痴呆的影响[J]. 北京中医药大学学报,1997, 20(6): 691.
- [6] 张军平,张伯礼,王永炎,等. 清脑益智方药血清在缺氧培养条件下对人胚大脑神经细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2002, 8(8): 17-19.
- [7] Zhang J, Li L, Chen X, et al. Effects of a traditional Chinese medicine, Qing Nao Yi Zhi Fang, on glutamate excitotoxicity in rat fetal cerebral neuronal cells in primary culture[J]. Neurosci Lett, 2000, 290(1): 21-24.
- [8] Wu YQ, Jing ZW, Qin XD, et al. Qingnao Yizhi Decoction suppresses the formation of glial fibrillary acidic protein-positive cells in cultured neural stem cells by inhibiting the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription3 signaling pathway[J]. J Tradit Chin Med, 2015, 35(1): 69-76.
- [9] 韩彩萍,胡长林. PI3K/AKT 信号通路对脑缺血神经细胞凋亡[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2006, 33(1): 88-91.
- [10] Cuny GD. Kinase inhibitors as potential therapeutics for acute and chronic neurodegenerative conditions[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(34): 3919-3939.
- [11] Miyawaki T, Ofengeim D, Noh KM, et al. The endogenous inhibitor of Akt, CTMP, is critical to ischemia induced neuronal death[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(5): 618-626.
- [12] Hotokezaka Y, van Leyen K, Lo EH, et al. Alpha NAC depletion as an initiator of ER stress induced apoptosis in hypoxia[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(11): 1505-1514.
- [13] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide 3 kinase/Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke[J]. Mol Neurobiol, 2006, 34(3): 249-270.
- [14] Kamada H, Nito C, Endo H, et al. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. J Cerebr Blood Flow Metab, 2007, 27(3): 521-533.
- [15] De Bartolo P, Leggio MG, Mandolesi L, et al. Environmental enrichment mitigates the effects of basal forebrain lesions on cognitive flexibility[J]. Neuroscience, 2008, 154(2): 444-453.
- [16] Craig H, Charleen TC. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38(1): 2-11.
- [17] Shioda N, Han F, Fukunaga K. Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis is following brain ischemia[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 85: 375-387.
- [18] Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment[J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(3): 63-76.
- [19] Ke QD, Costa M. Hypoxia inducible factor-1(HIF-1)[J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(5): 1469-1480.

(收稿:2016-10-16 修回:2017-08-24)

责任编辑:段碧芳

英文责编:张晶晶