文章编号:1000-5404(2012)24-2493-05

论著

cAMP衍生物特异性激活Epac2/Akt信号通路促进大鼠脊髓损伤的修复

张 涛[1],文益民[2],魏祥科[1],李 含[1] (730000 兰州,兰州大学第二临床医学院科教科[1];730050 兰州,兰州军区兰州总医院脊柱外科[2])

[摘要] **目的** 研究应用cAMP衍生物特异性激活Epac2/Akt信号通路在哺乳动物脊髓损伤中的病理和生理机制。**方法** 96只成年健康雌性SD大鼠,完全随机分为4组($n=24$),A、B、C组均采用改良Allen重物打击法制备大鼠脊髓损伤模型。A组给予8-CPT-2′-O-Me-cAMP 0.5 mg/(kg·d)、B组给予等量10%(体积分数)DMSO、C组给予8-CPT-2′-O-Me-cAMP 0.5 mg/(kg·d)加LY294002 0.2 mg/(kg·d)各7 d。D组为正常对照组。各组分别于1、2、3、4周采用BBB评分法评估大鼠后肢功能恢复情况,各时间点取材行HE染色、免疫荧光、实时荧光定量PCR检测脊髓细胞标志物(Nestin、NF200、GFAP)和通路因子(Epac2、Akt)的表达。**结果** A组大鼠在术后1~4周BBB评分持续升高,均高于B、C组($P<0.01$),低于D组($P<0.01$)。在1、2、3周,A组Epac2 mRNA表达与C组Epac2 mRNA表达差异无意义,但高于B组($P<0.01$)和D组($P<0.01$)。A组Akt mRNA表达高于B、C、D组($P<0.01$)。A组Nestin、NF200 mRNA表达在各期均高于B、C、D组($P<0.01$)。A、B、C组GFAP mRNA表达差异无统计学意义。HE染色可见A、B、C组造模后脊髓组织结构疏松,有大量空洞形成。免疫荧光染色并进行积分光密度值分析,其结果与实时荧光定量PCR检测结果相符。**结论** 在哺乳动物脊髓损伤后应用cAMP衍生物能够特异性激活Epac2/Akt通路,促使神经干细胞分化和神经细胞增殖,有助于脊髓修复。

[关键词] 脊髓损伤;环磷腺苷;Epac2;信号通路;大鼠
[中图法分类号] R-332;R363;R651.2 [文献标志码] A

cAMP derivative promotes repair of spinal cord injury in rats by activating Epac2/Akt kinase signaling pathway

Zhang Tao[1], Wen Yimin[2], Wei Xiangke[1], Li Han[1] ([1]Department of Science and Education, Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Department of Spinal Surgery, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the underlying mechanism of cAMP derivative(8-CPT-2′-O-Me-cAMP) in the physiology and pathology of spinal cord injury (SCI). **Methods** Ninety-six adult healthy female Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups ($n=24$). The rats from groups A, B and C were inflicted to SCI models with a modified Allen's method. The rats were subjected to administer the derivative of 0.5 mg/(kg·d) in group A, 10% DMSO at equal volume in group B, and the derivative and LY294002 of 0.2 mg/(kg d) in group C respectively for 7 d. The rats in groups D served as normal control. Locomotor activity was evaluated by using the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score test at 1, 2, 3 and 4 weeks postoperatively. The expression of spinal cord cell markers, Nestin, glial frillary acidic protein (GFAP) and NF200, and of pathway factors, Epac2 and Akt were detected at the every week by HE staining, immunofluorescence analysis and real-time fluorescence PCR analysis. **Results** The BBB scores in group A showed a steady increase in the postoperative 1 to 4 weeks and were significantly higher than those in groups B and C ($P<0.01$), but were lower than that in group D ($P<0.01$). In the postoperative 1st to 3th weeks, the mRNA expression of Epac2 in group A was significantly higher than that of group B ($P<0.01$) and group D ($P<0.01$), but was not different with that of group C. The mRNA expression of Akt in group A was significantly higher than those of groups B, C and D (all $P<0.01$). The mRNA expression of Nestin and NF200 in group A were significantly higher than those of groups B, C and D ($P<0.01$) at 1 to 4 weeks. There was no

[基金项目] 全军医学科学技术研究"十一五"计划课题(06MA081)
[通信作者] 文益民,电话:(0931)8994323,E-mail:wenyimin007@163.com

difference in GFAP mRNA expression among groups A, B and C. The similar changes were found by immunofluorescence analysis. A lot of cavities were observed in spinal cord tissues by HE staining in groups A, B and C. **Conclusion** The derivative of cAMP activates the Epac2/Akt pathway to induce neural stem cells to proliferate and differentiate into neurons, and thus enhances the healing of SCI in rats.

[**Key words**] spinal cord injury; cAMP; Epac2; signaling pathway; rats

Supported by the Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science and Technology of PLA (06MA081). Corresponding author: Wen Yimin, Tel: 86-931-8994323, E-mail: wenyimin007@163.com

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后的脊髓增生修复效果不理想主要归因于两个方面,一方面是脊髓神经周围环境的抑制作用[1],另一方面是脊髓神经自身修复机制改变导致增生能力受损[2]。哺乳动物成年后其中枢神经系统的干细胞分化、增殖及损伤后的修复能力较胚胎时期明显减弱,原因之一是成年哺乳动物中枢神经系统内环磷腺苷(cyclic adenosinemonophosphate,cAMP)的表达较胚胎时期减少[3]。cAMP的表达在哺乳动物中枢神经系统干细胞分化和增殖过程中起着重要作用[4]。在cAMP信号通路中,cAMP的下游因子cAMP激活交换蛋白2(exchange protein activated by cAMP, Epac2)的表达可促进离体培养的背根神经节轴突增长和分化,增加神经传导过程中兴奋性神经递质的释放[5]。但Epac2激活是否可促进哺乳动物SCI的修复,及其在脊髓神经细胞中促进细胞增殖分化时所激活的下游信号因子目前仍不清楚。本实验研究在大鼠体内应用Epac2特异性激活剂(8-CPT-2′-O-Me-cAMP)激活Epac2/Akt信号通路在SCI修复中的生理和病理机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雌性SD大鼠96只,体质量220~250 g,由兰州大学动物实验中心提供。实验过程中对动物处置方法符合中华人民共和国科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准[6]。

1.2 主要试验试剂,仪器

8-CPT-2′-O-Me-cAMP(Biolog公司,美国),Tris-HCl裂解液、LY294002(Sigma公司,美国),兔多克隆抗体巢蛋白(nestin)、兔多克隆抗体神经丝蛋白200(NF200)、兔多克隆抗体神经胶质原酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、辣根过氧化物酶标记的二抗(Proteintech group公司,美国),Trizol、PrimeScript RT试剂盒、SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ试剂盒、引物(大连宝生物有限公司)。ABI Prism 7300系统(Applied Biosystems公司,美国),BX51TF荧光显微镜(Olympus公司,日本),Image-Pro Plus 6.0图像分析软件(Meyer Instruments公司,美国)。

1.3 SCI模型制备

采用改良Allen重物打击法。SD大鼠给予0.5%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,于8~10胸椎段背部切开,显露硬膜并暴露脊髓。随机数字表法将大鼠分为4组,每组24只。A、B、C组均采用4 g钢珠从12 cm高处自由落下打击脊髓致其损伤(致伤能量为48 g·cm)。D组在胸8~10仅行椎板切除术。术后消毒,笼内饲养,自由进食水。每日辅助排尿3次,至自主排尿恢复。

1.4 方法

造模成功后,A组大鼠给予8-CPT-2′-O-Me-cAMP 0.5 mg/(kg·d)治疗7 d,B组以等量10%(体积分数)DMSO治疗7 d,C组以8-CPT-2′-O-Me-cAMP 0.5 mg/(kg·d)加LY294002 0.2 mg/(kg·d)治疗7 d,D组以等量10%(体积分数)DMSO治疗7 d。各组分别于术后1、2、3、4周以随机数字表法抽取6只大鼠处死,以损伤区为中心取脊髓组织3 cm,样品等分后1/2置于液氮中,用于实时荧光定量PCR检测。余1/2样品冰冻切片,用于HE染色和免疫荧光检测。

1.5 检测指标

1.5.1 运动功能评分 各组分别于脊髓造模后1、2、3、4周采用BBB(Basso-Beattie-Bresnahan)评分法评估大鼠后肢运动功能的恢复情况[7]。

1.5.2 HE染色 取损伤区脊髓标本,纵向冰冻切片,常规HE染色。

1.5.3 免疫荧光检测 将新鲜脊髓迅速冰冻切片,厚9 μm,贴至载玻片上,PBS漂洗,5%牛血清白蛋白室温封闭1 h。加一抗Nestin、GFAP、NF200后4 ℃孵育,48 h后PBS洗涤,加二抗37 ℃孵育2 h,PBS洗涤后贴片荧光显微镜下观察。用PBS代替一抗作为阴性对照。每个标本选取6个400倍镜下视野,使用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件对荧光部分进行积分光密度值(integrated optical density, IOD)检测并分析。

1.5.4 实时荧光定量PCR检测 每0.1克脊髓标本加入1 ml Trizol冰上匀浆。离心并提取总RNA,使用紫外分光光度仪检测总RNA纯度和含量。用PrimeScript RT试剂盒配制10 μl反应体系,将其逆转录成cDNAs。用SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ试剂盒配制50 μl反应体系(SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ 25 μl,PCR上游及下游引物各2 μl,ROX Reference Dye 1 μl,DNA 4 μl,dH_2O 16 μl),扩增cDNAs。在"95 ℃预变性10 s,95 ℃变性5 s,60 ℃退火延伸31 s,共40个循环"条件下用ABI Prism 7300系统实行PCR反应。梯度稀释cDNAs检测后产生标准曲线并计算PCR反应效率,用凝胶电泳和溶解曲线检测各引物特异性。各引物序列见表1。

1.6 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。

表 1 实时荧光定量 PCR 中各引物序列

基因	引物序列	片段长度(bp)
Epac2	上游 5′-CGAATTCGTTTATGCGGTTACTATGAGAAC-3′	153
	下游 5′-TACAAGCTTAATGAGAACACCTGCTAACTC-3′	
Akt	上游 5′-TCACCTCTGAGACCGACACC-3′	146
	下游 5′-ACTGGCTGAGTAGGAGAACTGG-3′	
Nestin	上游 5′-GGGAGAGGAAGAAGATGCTG-3′	143
	下游 5′-GACCACTGACACCCACAGAC-3′	
GFAP	上游 5′-TGCTAGGCCCAATTCCCATC-3′	85
	下游 5′-TCCATGAGACTCCGCACTGAC-3′	
NF200	上游 5′-CAAAGAAGGTGGAGGAGGAG-3′	77
	下游 5′-GGGAGCTTCATCTTTCTTGC-3′	

2 结果

2.1 运动功能评分

术后 1 ~4 周 A 组大鼠 BBB 评分呈持续性升高,均高于同期 B、C 组,低于同期 D 组($P<0.01$)。B、C 组评分均低于同期 D 组($P<0.01$)。B、C 组间比较各期评分差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 术后各组大鼠各时间点 BBB 评分 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
A	2.30 ± 0.44^{b}	6.65 ± 0.46^{b}	9.88 ± 0.52^{b}	12.16 ± 0.54^{b}
B	1.52 ± 0.52^{ab}	3.62 ± 0.53^{ab}	5.14 ± 0.79^{ab}	6.01 ± 0.76^{ab}
C	1.60 ± 0.52^{ab}	3.30 ± 0.61^{ab}	5.25 ± 0.71^{ab}	6.06 ± 0.70^{ab}

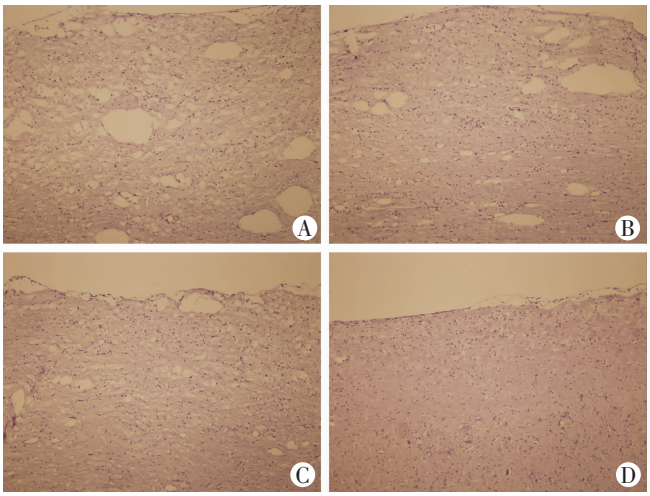
D 组各时间点 BBB 评分均为 21 ±0;a: $P<0.01$,与 A 组比较;b:$P<0.01$,与 D 组比较

2.2 HE 染色

HE 染色可见 A、B、C 组损伤区脊髓组织与 D 组相比结构疏松,形成大量空泡,部分形成空洞。在损伤区周围可见大量炎性细胞出现。见图 1。

2.3 免疫荧光染色

Nestin、GFAP、NF200 蛋白主要位于神经干细胞、神经胶质细胞和神经元中,IOD 分析其表达情况,见表 3。A 组术后 Nestin 阳性细胞在 1、2 周表达持续升高,在 3、4 周下降,GFAP、NF200 阳性细胞在 1 ~4 周表达呈逐渐性升高趋势,第 4 周达高峰。各时间点 A 组 Nestin、NF200 阳性细胞表达均高于其他 3 组($P<0.05$),GFAP 阳性细胞表达高于 D 组($P<0.05$),但与 B、C 组间比较无明显差异($P>0.05$)。除第 2 周 C 组 GFAP 明显增多外,B、C 组间 Nestin、GFAP、NF200 阳性细胞表达无差异($P>0.05$)。见图 2。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

图 1 各组脊髓损伤后脊髓组织病理学观察 (HE ×100)

2.4 实时荧光定量 PCR 检测

术后 1 ~4 周,A、C 组 Epac2 表达量升高,于 2 周达高峰后下降,均高于同期 B、D 组($P<0.01$),A、C 组间无统计学差异($P>0.05$)。见图 2。A 组 Akt mRNA 表达量升高,于术后 2 周达高峰,均高于同期 B、C、D 组($P<0.01$)。B、C 组 Akt mRNA 表达高于同期 D 组($P<0.01$)。见图 3。

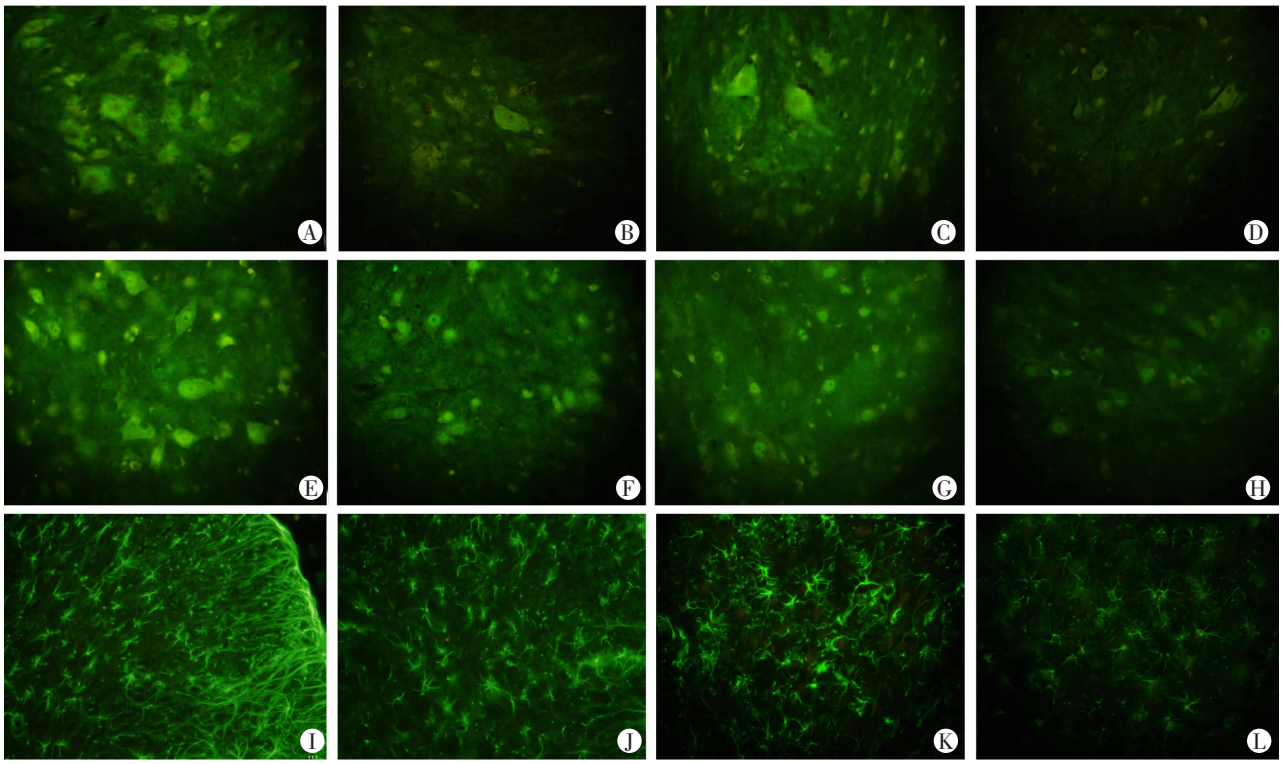
术后 1 ~4 周,Nestin mRNA 表达在前 1、2 周逐渐升高,在 3、4 周逐渐下降,A 组 NF200 的 mRNA 表达逐渐升高,于术后 4 周达高峰。各时间点 A 组 Nestin、NF200 mRNA 表达均高于 B、C、D 组($P<0.01$)。B 组 Nestin、NF200 表达均高于 D 组($P<0.05$)。B、C 组间比较无统计学差异($P>0.05$)。

术后 1 ~4 周,A、B、C 组 GFAP mRNA 表达量均持续升高,高于 D 组($P<0.01$)。A、B、C 组除 C 组在第 2 周 GFAP mRNA 表达量高于 A、B 组外($P<0.01$),其他时间点各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 4。

表 3 术后各组大鼠不同时间 Nestin、NF200 和 GFAP 的积分光密度值 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

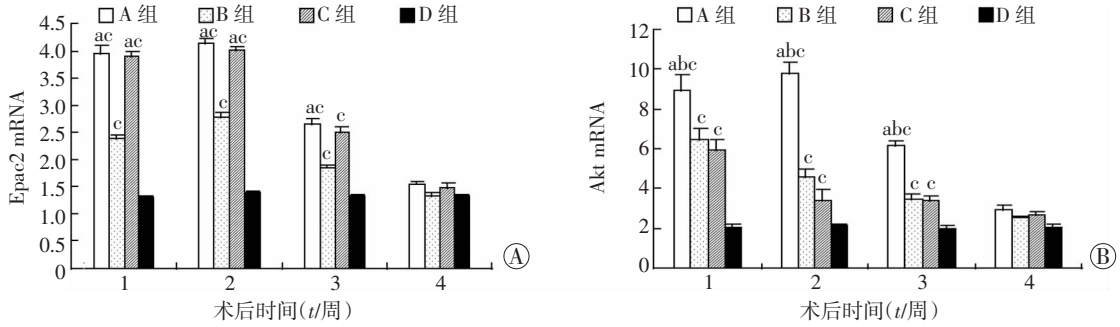
基因	组别	1 周	2 周	3 周	4 周
Nestin	A 组	$499\,807.00\pm1\,785.51^{abc}$	$865\,749.16\pm2\,483.98^{abc}$	$662\,682.29\pm1\,766.59^{abc}$	$193\,972.50\pm1\,629.48^{abc}$
	B 组	$66\,752.36\pm1\,641.09^{c}$	$138\,670.03\pm2291.17^{c}$	$136\,184.376\pm10\,566.21^{c}$	$115\,286.51\pm12\,412.03^{c}$
	C 组	$113\,264.79\pm2\,671.11^{c}$	$89\,252.43\pm1\,586.72^{c}$	$98\,476.01\pm783.38^{c}$	$137\,400.41\pm1\,768.46^{c}$
	D 组	$13\,751.20\pm31.04$	$9\,830.45\pm19.22$	$11\,257.08\pm54.79$	$11\,462.83\pm26.25$
NF200	A 组	$512\,806.79\pm893.42^{abc}$	$643\,467.09\pm1\,993.30^{abc}$	$712\,627.94\pm4\,643.89^{abc}$	$732\,311.63\pm1\,309.88^{abc}$
	B 组	$82\,231.89\pm2\,180.17^{c}$	$114\,970.37\pm1\,578.95^{c}$	$121\,558.92\pm9\,973.02^{c}$	$116\,790.33\pm1\,982.64^{c}$
	C 组	$201\,748.26\pm11\,358.41^{c}$	$283\,478.25\pm2\,672.63^{c}$	$274\,263.57\pm1\,341.56^{c}$	$352\,502.61\pm1\,521.32^{c}$
	D 组	$28\,964.07\pm368.25$	$17\,946.28\pm123.39$	$18\,247.09\pm298.81$	$20\,071.64\pm98.75$
GFAP	A 组	$391\,448.76\pm1\,843.51^{c}$	$421\,174.61\pm1\,272.32^{bc}$	$432\,080.53\pm1\,647.80^{c}$	$585\,690.79\pm789.98^{c}$
	B 组	$488\,759.20\pm1\,766.59^{c}$	$798\,236.83\pm3\,033.25^{bc}$	$421\,559.31\pm2\,746.55^{c}$	$488\,267.69\pm1\,965.67^{c}$
	C 组	$367\,595.44\pm1\,181.29^{c}$	$826\,844.75\pm2\,463.06^{c}$	$662\,457.36\pm11\,547.28^{c}$	$697\,605.57\pm7\,675.19^{c}$
	D 组	$32\,807.72\pm401.99$	$74\,926.81\pm481.14$	$58\,719.68\pm298.93$	$41\,168.88\pm378.02$

a:$P<0.05$,与 B 组比较;b:$P<0.05$,与 C 组比较;c:$P<0.05$,与 D 组比较



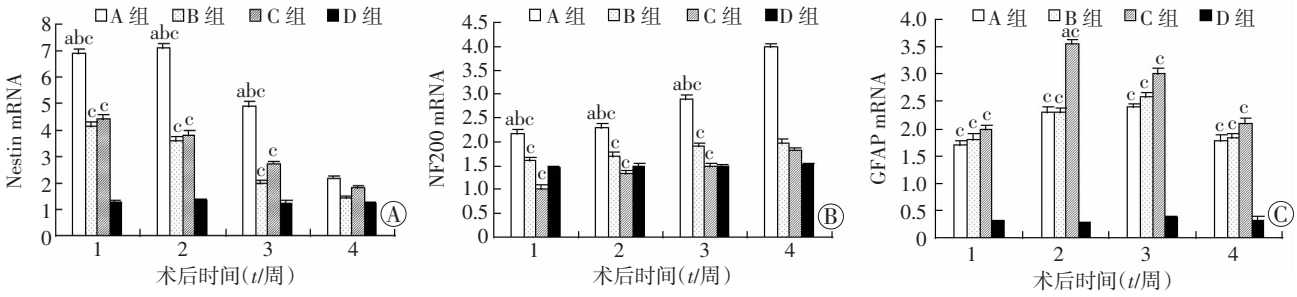
A～D:Nestin;E～H:NF200;I～L:GFAP;A、E、I:A组;B、F、J:B组;C、G、K:C组;D、H、L:D组

图2 脊髓损伤后脊髓组织中Nestin、NF200和GFAP的免疫荧光观察 (×400)



a:$P<0.01$,与B组比较;b:$P<0.01$,与C组比较;c:$P<0.01$,与D组比较

图3 实时荧光定量PCR分析脊髓损伤后Epac2(A)、Akt(B) mRNA在各组大鼠脊髓组织中的表达变化



a:$P<0.01$,与B组比较;b:$P<0.01$,与C组比较;c:$P<0.01$,与D组比较

图4 实时荧光定量PCR分析脊髓损伤后Nestin(A)、NF200(B)、GFAP(C) mRNA在各组大鼠脊髓组织中的表达变化

3 讨论

cAMP可以通过激活蛋白激酶A(protein kinase A,PKA)促进中枢神经系统的神经生长[3]。近期有研究表明Epac2是独立于PKA的另一cAMP下游蛋白。Epac2表达量越多,哺乳动物中枢神经系统的神经分

化、增殖及损伤后修复能力越强[2,8]。Epac2亦可促进哺乳动物中枢神经系统中神经递质的释放,提高神经传导的兴奋性[5,9]。另外,Epac2与PC12细胞中的促细胞分裂激酶相结合可促进神经细胞突的生长[10]。上述实验证实Epac2在神经细胞增殖与损伤修复方面起重要作用。本实验BBB评分结果同样表明,应用8-CPT-2′-O-Me-cAMP特异性激活Epac2,与对照组相比能够改善大鼠后肢运动功能,促进SCI的修复,但不能使其运动功能完全恢复。

本实验在大鼠SCI模型中应用cAMP衍生物(8-CPT-2′-O-Me-cAMP)特异性激活Epac2,使大鼠脊髓组织中Epac2的mRNA表达增加,同时也升高了Akt的表达,促进了大鼠SCI的修复。应用了Akt特异性阻断剂LY294002后,阻断了Akt激活表达,在Epac2高表达而Akt mRNA表达被阻断后,8-CPT-2′-O-Me-cAMP促进大鼠SCI功能恢复作用消失。因此,在特异性激活Epac2促进大鼠SCI修复的过程中,Akt作为Epac2的下游蛋白起主导作用。

本实验应用8-CPT-2′-O-Me-cAMP激活Epac2/Akt信号通路后,促进了Nestin、NF200蛋白表达的增多,表明Epac2/Akt信号通路激活有助于大鼠SCI后神经干细胞分化、神经元增殖,促进SCI修复。免疫荧光染色显示Nestin标记的干细胞增殖主要出现在灰质,以中央管周围和后角为著。NF200标记神经元细胞主要在灰质部分增多。在脊髓白质中有大量GFAP标记的神经胶质细胞出现。对各蛋白荧光进行IOD检测示Epac2/Akt信号通路激活对脊髓损伤后神经干细胞分化增殖有较强促进作用,其结果与实时荧光定量PCR结果相符。本课题组曾证实激活Akt/mTOR/p70S6K通路信号能增加大鼠SCI后内源性神经元前体细胞的增殖能力,促进新神经元的形成[11]。Akt作为mTOR/p70S6K信号通路的上游蛋白,在神经干细胞分化、神经信号的传导中起重要作用。Akt信号蛋白增多能够降低神经细胞损伤后的自我吞噬能力,同时还具有抗细胞凋亡和促进损伤区血管再生作用[12-13]。因此,通过Epac2激活Akt表达可能对于减轻SCI后的继发性损伤有重要作用。

Hu等[11]研究表明Akt的高表达对GFAP的增殖有抑制作用,但根据本实验的结果,通过Epac2激活Akt后,GFAP表达与对照组差异无统计学意义,但在应用LY294002阻断Akt后,术后第2周GFAP有明显增多,推断,Epac2在促进神经细胞增殖的同时亦可能通过激活其他通路蛋白促进神经胶质细胞的增殖,此推断还有待于进一步研究验证。

应用cAMP衍生物能够特异性激活Epac2/Akt,Epac2/Akt和Akt/mTOR/p70S6K信号通路激活都能促进神经干细胞分化、神经细胞增殖,促进SCI的修复,更加说明了Epac2激活与Akt/mTOR有一定联系。因此,cAMP/Epac2/Akt/mTOR/p70S6K信号通路在促进SCI后的修复和脊髓功能重建方面发挥着重要作用。

志谢 衷心感谢兰州军区兰州总医院骨科研究所各位老师给予的技术指导和帮助

参考文献:

[1] Schwab M E. Nogo and axon regeneration[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14(1): 118-124.
[2] Murray A J, Shewan D A. Epac mediates cyclic AMP-dependent axon growth, guidance and regeneration[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 38(4): 578-588.
[3] Abel T, Nguyen P V. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase[J]. Prog Brain Res, 2008, 169: 97-115.
[4] Peace A G, Shewan D A. New perspectives in cyclic AMP-mediated axon growth and guidance: The emerging epoch of Epac[J]. Brain Res Bull, 2011, 84(4/5): 280-288.
[5] Gekel I, Neher E. Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses[J]. J Neurosci, 2008, 28(32): 7991-8002.
[6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals[S]. Beijing: The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. 2009.
[7] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
[8] McPhee I, Gibson L C, Kewney J, *et al*. Cyclic nucleotide signalling: a molecular approach to drug discovery for Alzheimer's disease[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33(Pt 6): 1330-1332.
[9] Molosh A I, Sajdyk T J, Truitt W A, *et al*. Selective roles of Epac and PKA in postsynaptic modulation of NMDA and GABAA-mediated currents following NPY Y1 receptor activation in the projection neurons of rat basolateral amygdala[J]. Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, 2011, 41.
[10] Liu C, Takahashi M, Li Y, *et al*. Ras is required for the cyclic AMP-dependent activation of Rap1 *via* Epac2[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(23): 7109-7125.
[11] Hu L Y, Sun Z G, Wen Y M, *et al*. ATP-mediated protein kinase B Akt/mammalian target of rapamycin mTOR/p70 ribosomal S6 protein p70S6 kinase signaling pathway activation promotes improvement of locomotor function after spinal cord injury in rats[J]. Neuroscience, 2010, 169(3): 1046-1062.
[12] Zhuang Z, Zhao X, Wu Y, *et al*. The anti-apoptotic effect of PI3K-Akt signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Ann Clin Lab Sci, 2011, 41(4): 364-372.
[13] 张珊珊, 罗勇, 武磊. PI3K/AKT通路在电针促进局灶脑缺血再灌注大鼠脑内血管再生中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(23): 2488-2491.

(**收稿**:2012-06-20;**修回**:2012-07-16)
(编辑 王小寒)