

· 基础研究 ·

Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路在 2 型糖尿病大鼠局灶性脑缺血早期作用的研究*

王文娟^{1,2}, 武晓宁^{1,2}, 贾玉洁², 谷成^{1,2}, 闵连秋^{2△}

(1. 辽宁医学院研究生学院, 辽宁锦州 121000; 2. 辽宁医学院附属第一医院神经内科, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 探讨高血糖加重脑梗死机制与 Ras/Raf/丝裂原激活蛋白激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号传导通路的关系。方法 通过大鼠尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)及大鼠中动脉闭塞(MCAO)术造成大鼠糖尿病脑缺血模型。将大鼠分成假手术组、健康大鼠脑缺血组、2 型糖尿病(T2DM)大鼠脑缺血组、PD98059 组, 每组 12 只。PD98059 组于 MCAO 术前 30 min 尾静脉注射 PD98059(3 mL/kg)。MCAO 术后 2 h 给各组大鼠做神经学评分, 取脑组织标本。应用免疫组织化学、蛋白质印迹法(Western blotting)测定大鼠磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)蛋白的表达, 应用 TUNEL 检测神经细胞凋亡情况。结果 除假手术组外, 其他 3 组均有不同程度的神经功能缺损、神经细胞凋亡, 且差异有统计学意义($P < 0.01$)。p-ERK1/2 蛋白在假手术组偶见表达, 在健康大鼠脑缺血组、T2DM 大鼠脑缺血组表达明显升高($P < 0.01$), 且 T2DM 大鼠脑缺血组升高更加明显($P < 0.01$)。PD98059 组 p-ERK1/2 蛋白表达较少。免疫组织化学和 Western blotting 结果基本一致。结论 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路在局灶性脑缺血早期能促进神经细胞的凋亡, 糖尿病加重脑梗死与 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路有关。

关键词:脑缺血; 糖尿病, 2 型; 大鼠; Ras/Raf/MEK/ERK 通路; PD98059

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.10.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)10-1122-03

The study of the primary effects of Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway on focal cerebral ischemia in type 2 diabetes rats*

Wang Wenjuan^{1,2}, Wu Xiaoning^{1,2}, Jia Yujie², Gu Cheng^{1,2}, Min Lianqiu^{2△}

(1. the Graduate School, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To study the relationship between Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and the mechanism of hyperglycemia aggravating cerebral infarction. **Methods** Construct cerebral ischemia models of diabetic rats by rat tails vein injection of streptozotocin (STZ) and middle cerebral artery occlusion (MCAO) surgery. Rats were divided into four groups, namely the sham group, normal rat cerebral ischemia group, type 2 diabetes cerebral ischemia group and PD98059 group ($n = 12$). The rats in PD98059 group underwent tail vein injection of PD98059(3 mL/kg) preoperative 30 minutes before MCAO. Two hours after MCAO, rats of each group were measured with neurological score and then brain tissue samples were extracted. The expression of p-ERK1/2 protein was detected by immunohistochemistry and Western blotting; the cell apoptosis was detected by TUNEL. **Results** In addition to the sham operation group, the other three groups have different levels of neurological deficit and neuronal cells apoptosis ($P < 0.01$). There was occasional expression of p-ERK1/2 protein in sham operation and significantly increased expression in normal rats cerebral ischemia group and T2DM cerebral ischemia group ($P < 0.01$). The increase in the T2DM cerebral ischemia group was more distinct ($P < 0.01$). There were less expression of p-ERK1/2 protein in PD98059 group, and there were no difference between the result from immunohistochemistry and Western blotting. **Conclusion** The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway could promote neuronal apoptosis in the early focal cerebral ischemia; diabetes aggravating cerebral infarction is related to Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways.

Key words: brain ischemia; diabetes mellitus, type2; rats; Ras/Raf/MEK/ERK pathway; PD98059

近些年来,糖尿病合并脑梗死的发病率逐年升高, 给人们健康带来了严重的威胁。糖尿病已经被认为是脑梗死的独立危险因素, 能加重神经细胞的凋亡, 增加了脑梗死的致残率和病死率, 严重地影响了患者预后的生活质量。有关糖尿病加重脑梗死的机制近年来研究较多, 但具体机制至今尚未明确^[1]。本实验旨在探讨大鼠局灶性脑缺血早期 Ras/Raf/丝裂原激活蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号传导通路的作用, 以及糖尿病加重脑梗死与

Ras/Raf/MEK/ERK 传导通路的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选取健康的雄性 SD 大鼠, 体质量 280~330 g, 由辽宁医学院动物实验中心提供, 合格证号[SCXK(辽)2003-0007]。PD98059 由德国默克公司提供(批号 513001); p-ERK1/2 一抗、二抗均由北京博奥森生物有限公司提供, 末端脱氧核苷酸转移酶接到的 dUTP 原位切口末端标记(TUNEL)试剂盒购于南京凯基公司。

1.2 方法

1.2.1 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠脑缺血模型的建立 取 SD 大鼠常规饲料适应性饲养 1 周, 然后喂饲高脂高糖饲料 (10% 猪油, 2.5% 胆固醇, 1.0% 猪胆酸盐, 20.0% 糖, 66.5% 常规饲料^[2])。4 周后, 按 25.0 mg/kg^[3] 体质量的剂量一次性尾静脉注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 溶液。72 h 后取尾血测血糖, 血糖超过 16.7 mg/kg 为 T2DM 大鼠^[4]。选取 T2DM 造模成功的 SD 大鼠, 按照文献^[5] 制作大鼠大脑中动脉缺血模型 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)。麻醉后的 SD 大鼠颈部正中切口, 暴露并钝性游离左侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA), 结扎同侧 CCA 近心端和颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 分叉部, 距 CCA 末端约 5 mm 处剪口, 选用头端烧成光滑杵状的国产尼龙线 (直径 0.235 mm, 长 6 cm) 插入, 以颈总动脉分叉处计算进线深度为 (18.0 ± 0.5) mm, 至大脑中动脉起始部以完全阻断血供。假手术组手术步骤同上, 但不插入线栓。

1.2.2 分组与给药 将大鼠分为假手术组、健康大鼠脑缺血组、T2DM 大鼠脑缺血组、PD98059 组, 每组 12 只。假手术组是选取健康大鼠只游离出动脉不进行栓塞; 健康大鼠脑缺血组是选取血糖正常, 进行 MCAO 造模成功的大鼠; T2DM 脑缺血组为选取糖尿病造模成功且 MCAO 造模成功大鼠; PD98059 组为选取糖尿病造模成功且 MCAO 造模成功大鼠, 此组大鼠于 MCAO 术前 30 min 尾静脉注射 PD98059 (3 mL/kg)。MCAO 术 2 h 后各组取 6 只大鼠麻醉、处死、灌流、石蜡包埋固定制成病理切片; 每组剩余的 6 只大鼠迅速取缺血侧大脑海马, 保存于 -80 °C 冰箱。

1.2.3 评价标准 参照 Bederson 6 级 5 分评分标准, 对大鼠 MCAO 术后 2 h 进行 3 次神经功能评分, 平均值大于或等于 2 分提示造模成功, 评分标准见表 1。

表 1 Bederson 评分标准

评分	表现
5 级 0 分	正常 (无功能障碍)
4 级 1 分	对侧上肢不能完全伸展
3 级 2 分	向对侧推时抵抗力下降
2 级 3 分	提尾时向对侧转圈
1 级 4 分	自动转圈
0 级 5 分	无自发性活动伴意识障碍

1.2.4 检测方法

1.2.4.1 TUNEL 法检测大鼠脑组织神经细胞凋亡 切片常规脱蜡水化, 3% H₂O₂ 室温处理后蛋白酶 K 于 37 °C 消化 10 min, 标记液 32 °C 标记 2 h, 后封闭 30 min, 生物素化地高辛抗体 37 °C 反应 37 min。加 SABC、DAB 显色, 常规封片。在海马 CA3 区不重复随机选取 5 个高倍视野, 在 400 倍光镜下计算阳性细胞 (阳性细胞数/计数细胞总数) 100%。

1.2.4.2 免疫组化法检测大鼠脑组织 p-ERK1/2 的表达 采用 SABC 法按照免疫组化试剂盒说明进行。显微镜下观察缺血侧大脑海马 CA3 区 p-ERK1/2 表达情况, 每张免疫组化切片中采集 5 个具有代表性的高倍视野, 在 400 倍光镜下计数海马 CA3 区 p-ERK1/2 的阳性细胞数。

1.2.4.3 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测大鼠脑组织 p-ERK1/2 的表达 将冻存的脑组织剪碎置于裂解液中机械匀浆, 4 °C 17 000 r/min 离心 1 h, 取出上清液。用考马斯亮蓝 G250 结合法, 根据已知牛血清清蛋白溶液的浓度及其吸光度和样品吸光度计算样品蛋白浓度和加样量。加入样品缓冲液,

置于沸水浴中 5 min 使蛋白变性。制备 7.5% 分离胶和 4% 浓缩胶, 将样品加在凝胶表面的样品槽中, 电泳后转移至硝酸纤维素膜上。5% 奶粉 TTBS 缓冲液振荡封闭 3 h 后洗膜, 分别加入一抗、β-actin, 4 °C 冰箱孵育 1 夜。洗膜, 辣根酶标记, 室温孵育 1 h, 洗膜后进行增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 反应 1~3 min, 暗室曝光, 显影后冲洗胶片。凝胶成像分析系统摄像分析测定目标带的光密度 (integrated density value, DV), 计算出各指标各组目标带与 β-actin DV 比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间显著性检验采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠神经行为学评分 T2DM 大鼠脑缺血组较健康大鼠脑缺血组神经行为学评分明显增高, 而 PD98059 组神经行为学评分明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 大鼠神经行为学评分

组别	n	评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)
假手术组	12	0.00 ± 0.00
健康大鼠脑缺血组	12	3.33 ± 0.52*
T2DM 大鼠脑缺血组	12	4.50 ± 0.54*#
PD98059 组	12	2.16 ± 0.41*#

*: $P < 0.01$, 与假手术组比较; #: $P < 0.01$, 与健康大鼠脑缺血组比较。

2.2 免疫组织化学测定大鼠缺血侧大脑海马 CA3 区 p-ERK1/2 蛋白的表达 p-ERK1/2 阳性染色呈深棕色, 常存在于神经元胞浆中, 磷酸化后转移至细胞核。阳性染色的神经细胞核呈深棕色, 多数发生形态学改变, 胞核皱缩, 核仁偏位或者缺失。假手术组偶见 p-ERK1/2 阳性蛋白表达。健康大鼠脑缺血组可见 p-ERK1/2 阳性神经细胞核, T2DM 大鼠脑缺血组阳性胞核增多, PD98059 组阳性胞核明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3、图 1。

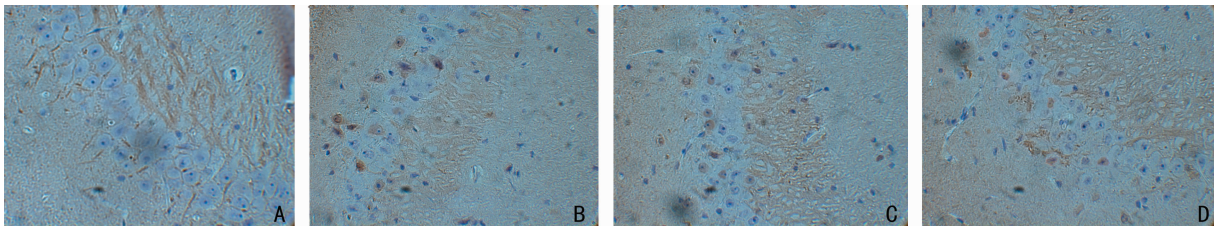
2.3 Western blotting 测定大鼠缺血侧海马 p-ERK1/2 蛋白 p-ERK1/2 蛋白在假手术组表达较少, 在健康大鼠脑缺血组和 T2DM 大鼠脑缺血组表达较多, 且 T2DM 大鼠脑缺血组增高明显 $P < 0.01$, 而 p-ERK1/2 蛋白在 PD98059 组表达明显减少, 见表 4、图 2。

2.4 TUNEL 法检测大鼠缺血侧大脑海马 CA3 区神经细胞凋亡情况 凋亡的神经细胞核为棕黄色颗粒。假手术组海马 CA3 区偶见神经细胞凋亡, 健康大鼠脑缺血组缺血侧海马 CA3 区见较多神经细胞凋亡, T2DM 大鼠脑缺血组凋亡率较健康大鼠脑缺血组明显升高 ($P < 0.01$), 而 PD98059 组凋亡率明显下降, 见表 5。

表 3 免疫组织化学测定大鼠缺血侧大脑海马 CA3 区 p-ERK1/2 阳性细胞数

组别	n	阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$, n)
假手术组	6	1.58 ± 1.12
健康大鼠脑缺血组	6	13.50 ± 1.31*
T2DM 大鼠脑缺血组	6	19.08 ± 1.37*#
PD98059 组	6	4.33 ± 1.29*#

*: $P < 0.01$, 与假手术组比较; #: $P < 0.01$, 与健康大鼠脑缺血组比较。



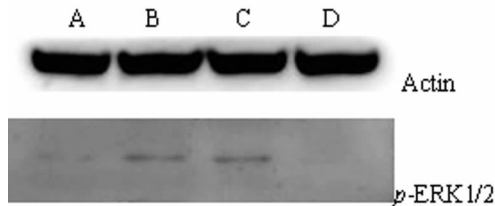
A:假手术组;B:健康大鼠脑缺血组;C:T2DM 大鼠脑缺血组;D:PD98059 组。

图 1 免疫组织化学测定大鼠缺血侧大脑海马 CA3 区 p-ERK1/2 阳性表达($\times 400$)

表 4 Western-blotting 法检测大鼠缺血侧海马 p-ERK1/2 蛋白灰度比值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	灰度比值
假手术组	6	0.003 2 \pm 0.000 1
健康大鼠脑缺血组	6	0.012 4 \pm 0.000 2*
T2DM 大鼠脑缺血组	6	0.038 4 \pm 0.001 7*#
PD98059 组	6	0.007 4 \pm 0.000 1*#

*: $P < 0.01$, 与假手术组比较; #: $P < 0.01$, 与健康大鼠脑缺血比较。



A:假手术组;B:健康大鼠脑缺血组;C:T2DM 大鼠脑缺血组;D:PD98059 组。

图 2 Western blotting 法检测大鼠缺血侧海马 p-ERK1/2 蛋白的表达

表 5 大鼠缺血侧大脑海马 CA3 区神经细胞凋亡率

组别	n	凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)
假手术组	6	1.50 \pm 0.55
健康大鼠脑缺血组	6	41.61 \pm 5.31*
T2DM 大鼠脑缺血组	6	49.83 \pm 3.72*#
PD98059 组	6	2.50 \pm 0.68*#

*: $P < 0.01$, 与假手术组比较; #: $P < 0.01$, 与健康大鼠脑缺血比较。

3 讨 论

脑缺血后神经细胞的凋亡是一个动态进行的过程,在早期(30 min 时)缺血区会出现明显的水肿,水肿区的周围出现少量的凋亡细胞,随着缺血时间的延长神经细胞的凋亡数目增加,凋亡的神经细胞主要位于缺血半暗带区,而缺血中心区细胞的死亡以坏死为主^[6],因此选取大鼠海马 CA3 区作为观察区域。本实验主要研究大鼠脑缺血早期神经细胞的凋亡情况及与 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路的关系,所以选取 MCAO 术后 2 h 作为观察的时间点。

Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路是一条可以被多种因素广泛激活的有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路。MAPK 通路的核心包括 3 种蛋白激酶:(1)MAPKKK,是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,Raf 为其中重要的一员;(2)MAPKK,具有磷酸化苏/酪氨酸残基的双

特异功能,Mek 为其中重要的一员;(3)MAPK 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,Erk 即为其中重要的一员^[7]。是当 Ras 受到细胞外信号刺激时,即转化为激活型 Ras,激活型 Ras 继而激活 Raf-1;而 Raf-1 可将 MEK 磷酸化激活,p-MEK 进一步磷酸化 ERK1/2,然后 p-ERK1/2 再将细胞核内的 EIK-1L 磷酸化,此瀑布式的激活过程将神经细胞外的信号通过细胞膜、细胞质传递到细胞核,来调节细胞周期调控细胞的增殖、分化和凋亡等生理病理过程^[8]。PD98059 是 ERK 的上游激酶 MEK-1 特异性阻断剂,能够阻断 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路的传导,从而影响了细胞的命运。本实验采用 TUNEL 染色法,对比观察高血糖、高血脂大鼠和健康大鼠 MCAO 术后 2 h 海马 CA3 区神经细胞凋亡变化,并通过免疫组织化学、Western blotting,对比观察高血糖、高血脂大鼠和健康大鼠 p-ERK1/2 蛋白表达变化,以明确 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路是否参与了 T2DM 加重脑缺血损伤时的神经细胞凋亡,从而进一步明确高血糖、高血脂加重脑缺血损伤的机制。从实验结果看,与健康大鼠脑缺血组相比,T2DM 大鼠脑缺血组的 p-ERK1/2 蛋白表达明显增加($P < 0.01$),免疫组织化学与 Western blotting 结果一致。TUNEL 结果显示,健康大鼠脑缺血组有部分神经细胞凋亡,而 T2DM 大鼠脑缺血组凋亡率明显升高($P < 0.01$),可见高血糖、高血脂能引起 P-ERK1/2 蛋白上调从而加重了神经细胞的凋亡。

可以推论 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路可能是 T2DM 加重缺血性脑损伤机制中的一条重要的信号传导通路。但从实验结果看,阻断了 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路仅能部分抑制神经细胞的凋亡,经 PD98059 干预的缺血组其神经细胞的凋亡率仍明显高于假手术组($P < 0.01$),这与付度关^[9]得出的结论一致,这又进一步说明了神经细胞凋亡机制的复杂性,需要更进一步的研究。

参考文献:

- [1] Li PA, He QP, Ouyang YB, et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase after transient cerebral ischemia in hyperglycemic rats[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8 (1):127-135.
- [2] Piao CS, Kiln JB, Han PL, et al. Administration of the p38 MAPK inhibitor SB203580 affords brain protection with a wide therapeutic window against focal ischemic insult[J]. J Neurosci Res, 2003, 73(4):537-544.
- [3] 陈秋,夏永朋,邱宗荫,等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立与评价[J]. 天津医药, 2006, 34(1):33-35.
- [4] 司晓晨,尚文斌,卞慧敏,等. 链脲佐菌素加高脂膳食诱导 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 安徽:中医临床杂志, 2003, 15 (5):383-385.
- [5] 陈佳俊,石岩殊,韩雪梅,等. 线栓法大(下转第 1127 页)

表 5 各组小鼠肺组织中 Bcl-2 mRNA 图像分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.263 2±0.066 5	0.282 6±0.060 4	0.313 5±0.028 2
模型组	0.599 6±0.058 2 ^a	0.809 7±0.106 5 ^a	0.793 3±0.245 0 ^a
PNS 组	0.328 7±0.036 6 ^b	0.402 5±0.110 1 ^b	0.371 8±0.085 1 ^c

^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, ^c: $P < 0.01$, 与模型组比较。

3 讨 论

细胞凋亡是一种广泛存在于多细胞生物体内,对不需要的细胞和受损伤的细胞发生的由众多基因参与调控的细胞自主的有序死亡过程,在组织损伤修复过程中,通过细胞凋亡机制不仅可以限制炎症反应的发展,而且可防止炎症后纤维增生和瘢痕形成。有研究表明,上皮细胞过度凋亡,使其抑制成纤维细胞增殖的功能丧失,从而导致成纤维细胞过度增生,产生过多的胶原蛋白而发生器官纤维化^[7]。

肺纤维化是以细支气管和肺泡上皮细胞过度凋亡,导致肺泡结构完整性遭到破坏以及肺成纤维细胞凋亡受抑为特征。

TUNEL 染色结果显示,在 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型中,7、14、28 d 肺组织的细胞凋亡指数明显高于对照组 ($P < 0.01$)。凋亡第 7 天起明显增强,并持续至第 14、28 天时凋亡指数最高。凋亡的细胞主要为支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和巨噬细胞,还有少量肺间质细胞。与模型组比较,PNS 组能显著降低肺纤维化小鼠肺组织上皮细胞的凋亡 ($P < 0.01$)。

细胞凋亡调控机制及信号转导系统的研究发现,多种基因及其表达产物如 Bax、Bcl-2 和 Bad 等参与细胞凋亡的调控,其中 Bcl-2 基因家族是最受重视的基因之一。Bcl-2 主要通过线粒体途径,来发挥其抗凋亡作用^[8]。Bax 主要作用是通过自身形成同源二聚体或与 Bcl-2 作用形成异源二聚体,来参与细胞凋亡的调节。Bax 同源二聚体促进细胞的凋亡,Bax/Bcl-2 异源二聚体则抑制细胞凋亡。因此细胞的凋亡与 Bax/Bcl-2 的比值有关,Bax 蛋白的表达量多于 Bcl-2 的表达量时促进细胞凋亡,反之则抑制细胞凋亡^[9]。

在 TUNEL 染色实验中作者已经看到支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和部分炎性细胞的凋亡,说明这些细胞的凋亡参与肺纤维化的形成。免疫组化结果提示:(1)肺内实质细胞是 Bax 的主要来源之一,Bax 在肺纤维化实质细胞的过度凋亡中发挥重要作用;(2)增多的 Bcl-2 主要是由肺间质细胞分泌的,Bcl-2 在抑制成纤维细胞凋亡中发挥重要作用。综合以上研究说明,肺纤维化时,肺实质细胞的凋亡过度可能与局部 Bax 的表达升高、Bcl-2 表达下降使肺实质细胞 Bax/Bcl-2 比值升高有关,而肺间质细胞 Bcl-2 的过度表达,可能与成纤维细胞的凋亡受抑有关,从而使成纤维细胞的增殖多于凋亡,促进肺纤维化的进展。应用 RT-PCR 方法研究表明,模型组小鼠肺组织

Bax mRNA 和 Bcl-2 mRNA 的表达亦明显增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明 Bax 和 Bcl-2 对肺纤维小鼠肺组织细胞凋亡的调控至少是在蛋白转录或翻译水平进行的。

以上研究结果提示,通过选择性地调节细胞中 Bax 和 Bcl-2 的表达,抑制肺实质细胞的凋亡和成纤维细胞的增生,就有可能在治疗肺纤维化方面取得一定的进展。本实验发现,PNS 能在一定程度上抑制肺组织气道上皮细胞的凋亡,从蛋白转录和翻译水平调节肺纤维化小鼠肺组织中 Bax 和 Bcl-2 的表达。据此,作者初步认为 PNS 抗肺纤维的作用机制可能与 PNS 抑制肺组织气道上皮细胞的凋亡、调节 Bax/Bcl-2 的表达有关,更详细的机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孔璐,王继峰,牛建昭.特发性肺纤维化与细胞凋亡[J].中华结核和呼吸杂志,2004,27(6):368-371.
- [2] Kuwano K, Hagimoto N, Tanaka T, et al. Expression of apoptosis regulatory genes in epithelial cells in pulmonary fibrosis mice[J]. Pathol, 2000, 190(2):221-229.
- [3] Kuwano K, Maeyama T, Inoshima I, et al. Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases[J]. Respirology, 2002, 7(1):15-21.
- [4] 孙晓芳,杨长福,黄春芳,等.三七总皂苷对肺纤维化小鼠肺组织胶原影响的实验研究[J].中医学报,2010,38(5):14-15.
- [5] 孙晓芳,黄春芳,杨长福,等.三七总皂苷对肺纤维化小鼠血清中 IV-C 型胶原透明质酸的干预作用[J].现代生物医学进展,2010,10(14):2609-2614.
- [6] Rongqi W, Olivia IS, Luba V, et al. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or a caspase inhibitor[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physio, 2000, 27(9):143-151.
- [7] Yang L, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2 release of cytochrome from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303):1129-1132.
- [8] Almeida OF, Conde GL, Croehemore C, et al. Subtle shifts in the ratio between Pro and anti-apoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate[J]. FASEB J, 2000, 14(5):779-790.
- [9] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Toxicol Lett, 2004, 149(1/3):19-23.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2012-12-22)

(上接第 1124 页)

鼠局灶性脑缺血模型 (PMCAO) 的实验研究[J]. 吉林医学, 2004, 25(10):16-17.

- [6] 储照虎,吴家幕,刘富东,等.大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡及其调控基因的表达[J].临床神经病学,2000,13(3):134.
- [7] 李英,段惠军. Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路在糖尿病肾病发生发展中的作用[J]. 国际内分泌代谢杂志,

- 2007, 27(4):269.
- [8] Hu BR, Liu CL, Park DJ. Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(7):1089-1095.
- [9] 付度关. ERK 对缺血缺氧性脑损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2007, 14(6):346-349.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2012-12-22)