

电针对大鼠早期局灶性脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究*

陶静¹ 陈阿贞² 兰岚² 杨珊莉³ 林志诚⁴ 陈立典^{2,5}

摘要

目的:探讨电针刺激对大鼠早期局灶性脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的机制。

方法:选用96只雄性SD大鼠,随机分为假手术组、模型组、电针组各32只。采用改良Longa线栓法制作缺血再灌注大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠模型,电针组于脑缺血再灌注2h后开始电针患侧“曲池”、“足三里”穴。各组于术后24h行神经行为学评分,TUNEL法检测脑组织细胞凋亡,免疫印迹法及逆转录PCR法检测脑组织细胞凋亡相关蛋白Bcl-2, Bax的表达,ELISA检测血清BDNF的变化。

结果:脑缺血再灌注24h后,电针组大鼠神经行为学评分较模型组差异有显著性,且脑组织中TUNEL阳性细胞数明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,电针组Bcl-2表达增高,Bax表达下降;模型组与电针组血清脑源性神经营养因子(BDNF)水平较假手术组相比均明显下降,但电针组较模型组有进一步的升高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

结论:电针刺激可抑制脑组织中Bax的表达,提高Bcl-2, BDNF的作用,对抗脑缺血再灌注损伤所致的细胞凋亡,达到加速神经功能恢复的目的。

关键词 电针;脑缺血再灌注;凋亡

中图分类号:R743.3, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-01-0003-06

A study on mechanism of anti-apoptotic effect of electroacupuncture in acute local cerebral ischemia-reperfusion rats/TAO Jing, CHEN Azhen, LAN Lan, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(1): 3-8

Abstract

Objective: To study the mechanism of anti-apoptotic effect of electroacupuncture (EA) in acute local cerebral ischemia-reperfusion(I/R) rats.

Method: Ninety-six male adult SD rats were randomly divided into three groups: sham-operated group, model group and EA group. The model of middle cerebral artery occlusion(MCAO) was established with thread ligation method. The EA group were administered with EA at Quchi (LI11) and Zusanli (ST36) acupoints on the contralateral paralyzed limb at 2h after cerebral I/R. Then, 24h after I/R, rats brains were taken out for TUNEL, Western-blot and RT-PCR examinations, and the blood for ELISA examinations.

Result: At 24h after I/R, neurological behavior improved, and the apoptotic cells in ischemic brains decreased in EA group compared with model group ($P < 0.05$). The expression of Bcl-2 increased and Bax decreased significantly in EA group, brain derived neurotrophic factor(BDNF) in blood was milder in EA group than those in model group ($P < 0.05$).

Conclusion: EA can significantly regulate anti-apoptotic effect and promote neurological function recovery in ce-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.01.002

*基金项目:福建省卫生厅医学创新(2012-CX28);福建省教育厅A类科技杰青(JA10157)

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350003; 2 福建中医药大学; 3 教育部中医骨伤及运动康复重点实验室; 4 福建省运动功能康复重点实验室; 5 通讯作者

作者简介:陶静,女,副主任医师; 收稿日期:2013-01-26

rebral I/R rats in early stage.

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 350008

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia reperfusion; apoptosis

缺血性脑血管病是指起病迅速,由脑血管病变引起的局限性脑组织缺血性坏死的一组疾病,具有高发病率、高致残率、高死亡率等特点^[1]。脑缺血再灌注损伤是缺血存在一定时间的组织器官在重新得到血液灌注后,其功能不仅不能恢复,结构损伤和功能障碍反而加重。其过程包含一系列复杂的病理生理变化,机制极其复杂^[2-3]。近年来,缺血性脑损伤及其再灌注损伤在临床治疗中日益受到重视,如何降低缺血性再灌注脑损伤是当今研究的焦点。临床上,电针疗法是治疗缺血性脑血管病的有效方法之一,但关于电针疗法的作用机制尚不明确。近年来国内外相关研究表明,抗凋亡机制在脑缺血再灌注损伤过程中扮演着极其重要的角色^[4-6]。故本研究通过制作大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型,观察电针刺激“曲池”、“足三里”穴后脑组织细胞凋亡情况和凋亡相关蛋白Bcl-2, Bax表达的变化,探讨其脑保护机制,为针灸临床提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选取96只SPF级健康雄性SD大鼠,体重(250±30)g。由上海市动物实验中心提供。用随机数字表法,将96只大鼠随机分为3组,假手术组、模型组、电针组,每组32只,称重并编号。

1.2 主要试剂

TUNEL试剂盒(Promega, Madison, WI, USA); Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CACCC); 逆转录试剂盒(Fermentas, USA), Bcl-2、Bax及 β -actin一抗及辣根过氧化物酶二抗(Cell Signaling, Beverly, MA, USA); 大鼠BDNF ELISA试剂盒(上海西塘生物有限公司, 上海)。

1.3 主要实验设备

金属恒温箱、低温离心机、常温离心机、激光共聚焦显微镜(日本产); 切片机、烤片机(上海产); 石蜡包埋机、电泳槽(武汉产); 4℃摇床机、冰箱(青岛产); DNA浓度测试仪、-80℃超低温冰箱(北京产);

Kodak数码相机M883(美国产); 华佗牌G6805电针(苏州产)。

1.4 方法

1.4.1 动物模型制备: 大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)动物模型的制作参照Longa等^[7]报道的线栓法加以改进。首先,术前所有实验动物均禁食12h,将大鼠称重,应用10%水合氯醛按3ml/kg腹腔注射进行麻醉,麻醉后在手术台下充分暴露并分离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。依次结扎颈总动脉近心端、颈外动脉远心端,并于颈总动脉分叉处近心端预留结扎线。用微动脉夹夹闭远端颈内动脉,在距颈总动脉分叉处1.0mm处用显微剪刀剪一切口,并将头端已涂上硅胶的钝头单丝尼龙线(直径为0.2mm)自左侧颈总动脉插入颈内动脉,直至感觉有少许阻力为止(从颈外动脉与颈内动脉分叉处起计算插入约18—22mm),此时线栓到达大脑中动脉分支处,阻断大脑中动脉血供。固定线栓,颈部伤口常规缝合。2h后缺血再灌注时,轻柔回抽线栓至颈总动脉分叉处,此时MCAO模型制备完成。术中和术后保持室温25℃左右,直到动物恢复活动。假手术组只分离动脉,不结扎、插线。手术结束后,动物放置于室温(25℃)环境下苏醒,正常饮水、饮食。

1.4.2 神经行为学评分: 按照Longa等的5分法评分标准,分别于脑缺血再灌注后2h(即治疗前)和24h(即治疗后)对实验大鼠进行神经功能评分:0分:无神经功能缺损;1分:提尾时右前肢内收,不能完全伸展;2分:自发行走时向右侧转圈;3分:行走时身体向右侧倾倒;4分:不能自发行走,有意识丧失。

1.4.3 动物模型剔除标准: ①神经功能评分0分及4分者;②取材时发现蛛网膜下腔有出血者;③实验动物未到观察时间点便死亡者;④TTC染色时发现未梗死者。

1.4.4 电针刺激: 电针组动物于脑缺血再灌注后2h开始治疗,取患侧“曲池”、“足三里”穴(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》中的定位方法),30号0.5寸华

侗牌不锈钢毫针刺入,应用G6805电针仪,电压峰值为6V,以肢体轻轻抖动为度,疏密波,频率1/20Hz,电针30min,造模后电针治疗1次,至脑缺血再灌注24h经神经行为学评分后处死动物取材。

1.4.5 标本获取与检测:脑缺血再灌注24h后,以10%水合氯醛按4ml/kg麻醉大鼠。麻醉后的各组大鼠从腹主动脉采集动脉血5ml,室温下静置凝固后置于高速离心机上以3000r/min转速分离血清,吸取上清,-20℃下冷冻保存备用。按实验设计,各组实验动物于腹主动脉采血后,分组进行脑组织处理。一组于冰上迅速开颅取脑,将取出的脑组织置于液氮罐中,后置于-80℃的冰箱中保存备用,用于免疫印迹法和逆转录PCR技术检测脑组织中蛋白和基因含量;另一组于采血结束后立即打开大鼠胸腔,迅速暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,先缓慢灌注150ml 0.9%生理盐水,再滴注4%多聚甲醛250ml,直至动物呈僵硬状态,固定后于冰上迅速断头取脑,在视交叉后2mm处以冠状切面切开大脑,平均切成5等分,片厚约3mm,置于4%多聚甲醛液体中固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋。石蜡包埋制成5mm厚防脱切片,将包埋好的石蜡切片分组收集,用于TUNEL染色法。

1.4.6 TUNEL染色:TUNEL染色采用DeadEnd荧光测定TUNEL系统来检测细胞凋亡。试剂盒由普洛麦格(北京生物技术有限公司,产品货号G3250)提供,实验过程严格按照产品说明书进行操作。实验结束后立即将做好的切片放在激光共聚焦显微镜(Leiss LSM710)下分析样本,在200倍高倍视野下观察,镜下细胞核由DAPI染成蓝色,凋亡细胞则呈绿色荧光,每张切片缺血梗死区随机取5个高倍视野,拍照、计数,用Motic Med 6.0显微生物图像分析系统统计阳性细胞数及总细胞数,计算每高倍视野内的凋亡阳性细胞率。

1.4.7 免疫印迹法(Western blot法)检测脑组织Bcl-2、Bax的蛋白含量:(1)取100mg大鼠脑组织剪成碎片,加入裂解液混匀(每20mg组织+100—200 μ l裂解液),用玻璃匀浆器匀浆至充分裂解,裂解后,14000r/min转速离心5min,取上清;(2)用BCA蛋白浓度测定法测定蛋白浓度:①取0.8ml蛋白标准配制液加入到一标准管中(20mg BCA),充分溶解

成25mg/ml标准溶液;②取适量标准溶液,用PBS稀释液稀释到0.5mg/ml;③根据样品数量,按50体积BCA A液和1体积BCA B液配制工作液,将标准品按0,1,2,4,8,12,16,20 μ l加到96孔板的标准孔中,加PBS补充到20 μ l,加适当体积样品到96孔板的样品孔中,加PBS稀释到20 μ l,各孔再加200 μ l BCA工作液,37℃ 20—30min,根据标准曲线算出浓度;(3)蛋白变性:将溶解的上样缓冲液混匀,按每4 μ l样品+1 μ l上样缓冲液(5 \times)比例混合,100℃充分蛋白变性;(4)变性后蛋白放入冰中迅速冷却,根据蛋白浓度,算出上样体积,依次上样,跑电泳(5%浓缩胶,12%分离胶,80V跑浓缩胶,100V跑分离胶,待溴酚兰至胶边缘即可);(5)转膜:电泳结束后将凝胶取出,进行转膜,遵循胶在负极,膜在正极的原则,100V 30—40min,以Marker转完为准,可用丽春红对固定于硝酸纤维素滤膜上的蛋白质进行预染,看电泳带是否清晰,证实蛋白质确实转移到膜上;(6)洗膜:转膜结束后,取下PVDF膜,标记正面,放入1 \times TBS-T中洗清2次;(7)封闭:倒掉TBS-T,加入5%脱脂奶粉封闭2h;(8)一抗孵育:分别将一抗Bcl-2、Bax, β -actin(CST公司提供)按1:1000稀释于含5%脱脂奶粉的1 \times TBS-T中,过夜,4℃摇床;(9)洗膜;(10)二抗孵育:(CST公司提供)按1:5000溶解稀释(同一抗),室温孵育1h;(11)洗膜:再用1 \times TBS-T 10min洗3次;(12)显像:将滤膜放入配好的显色液中显色,采用Bio-Image(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)图像分析系统扫描,分析处理。

1.4.8 逆转录PCR技术检测脑组织细胞凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的mRNA表达:(1)用Trizol法提取总RNA(参照Trizol试剂说明书进行操作):①取100mg大鼠脑组织剪碎,加入1ml Trizol(Fermentas),震荡1min;②加0.2ml氯仿,剧烈震动30s,置于室温5min;③低温离心机中,12000g,4℃离心10min;④轻轻吸取上层无色水相,移入另一EP管中(约0.5ml);⑤加等体积异丙醇,室温放置30min;⑥4℃离心,12000g,离心10min,在管底部可见微量RNA沉淀;⑦加入75%乙醇1ml,振荡,4℃离心,7500r/min,离心5min,吸走上清,注意防止RNA丢失;⑧室温下放置5min,使酒精完全挥发,用无RNAase的DEPC

水 20 μ l 溶解 RNA, 检测 RNA 浓度, 根据 RNA 浓度, 计算 RNA 体积。(2) 取总 RNA 1 μ g, 应用逆转录 (RT) 试剂盒 (碧云天生物技术公司) 进行逆转录反应, 反应体系 20 μ l。按照试剂盒说明书加入相应量的试剂, 进行 PCR 反应物, 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 持续 33 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。(3) 将 Loading buffer(1 μ l)+Sample(5 μ l)+Mark(5 μ l) 混匀上样, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 100V 跑 30—40min。(4) 用 Bio-Image (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 图像分析系统分析处理型凝胶成像, 统计数据。

1.4.9 酶联免疫吸附法 (ELISA 法) 检测血清脑源性神经营养因子 (brain derived neuro-trophic factor, BDNF) 含量: 将预先收集的血清上清液取出, 用 ELISA 法检测血清中 BDNF 的含量, 产品试剂盒由上海西塘生物科技有限公司提供, 操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析

所有数据均以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 16.0 软件包进行统计分析, 组间比较 *t* 检验。

2 结果

2.1 神经行为学评分

假手术组大鼠均无神经功能缺损, 模型组 (2.63 \pm 0.52) 和电针组 (2.30 \pm 0.54) 大鼠在缺血再灌注 2h 麻醉清醒后即出现不同程度的神经功能缺损, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。经电针治疗脑缺血再灌注后 24h, 电针组 (1.38 \pm 0.52) 与模型组 (2.00 \pm 0.53) 再行比较, 电针组神经功能缺损程度明显减轻, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.2 TUNEL 法检测脑组织细胞凋亡及其凋亡细胞的计数

假手术组: 大鼠正常脑组织仅有少量 TUNEL 阳性凋亡细胞表达 (图 1 箭头所示) (1.98 \pm 0.19); 模型组: 大鼠缺血侧 TUNEL 阳性凋亡细胞数较假手术组明显增多 (46.32 \pm 8.31), 差异有显著性意义 ($P <$

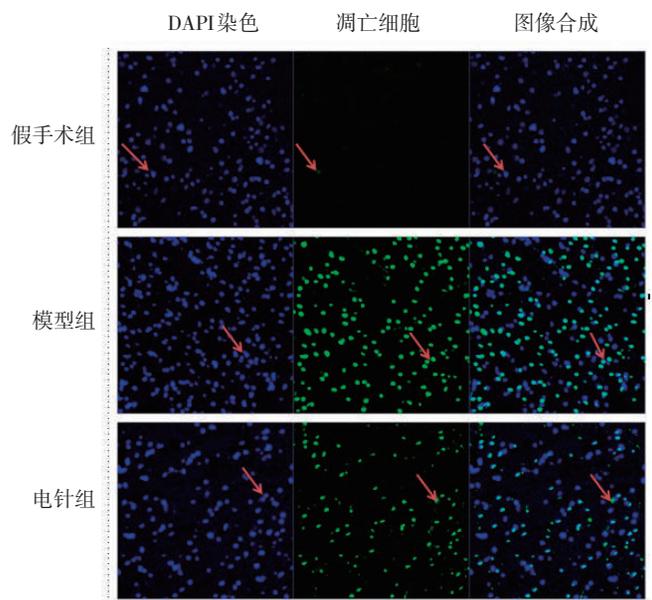
0.05); 电针组: 大鼠缺血侧 TUNEL 阳性细胞数较模型组相比明显减轻 (22.13 \pm 2.86), 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.3 Western-blot 法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白变化

脑缺血再灌注后 24h, 模型组大鼠缺血区梗死侧脑组织抗凋亡基因 Bcl-2 的蛋白表达较假手术组明显减少, 电针组较模型组相比则有进一步增加; 相反, 与假手术组相比, 模型组脑组织中促凋亡基因 Bax 蛋白表达增多, 而电针组的表达有显著下降。见图 2。

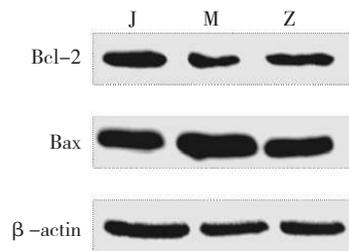
2.4 逆转录 PCR 法检测脑组织中 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达

图 1 各组脑组织缺血侧 TUNEL 阳性细胞表达



DAPI 为蓝色荧光染色的细胞核, 凋亡细胞显示为绿色荧光, 如箭头所示。

图 2 Western-Blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白变化



J=假手术组; M=模型组; Z=电针组

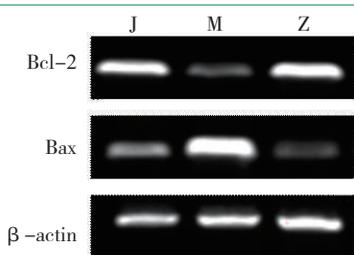
假手术组大鼠脑组织中均有基础的 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达, 电针组较模型组相比其脑组织

中抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达明显增加,而促凋亡基因 Bax 的 mRNA 的含量则减少,这与其蛋白含量的表达变化是一致的。见图 3。

2.5 ELISA 检测血清转化生长因子(transforming growth factor, TGF)的含量变化

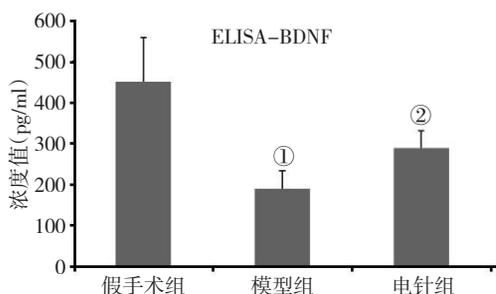
脑缺血再灌注后 24h,模型组和电针组血清中 BDNF 的含量均比假手术组有所下降,但电针组较模型组相比则有进一步的升高,差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

图 3 RT-PCR 检测大鼠脑组织 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达



J=假手术组;M=模型组;Z=电针组

图 4 各组血清 BDNF 浓度值



与假手术组比较:① $P < 0.05$;与模型组比较:② $P < 0.05$

3 讨论

缺血性脑血管病是一组起病迅速,由脑血管病变引起的局限性脑组织缺血性坏死的病变,其损伤的发生机制极其复杂,至今有多种相关学说,如细胞凋亡学说、细胞内钙超载学说、炎症反应学说、自由基损伤学说、兴奋性氨基酸中毒学说等^[8-10]。国内外许多学者均支持脑缺血再灌注损伤与细胞凋亡途径有密切联系^[11-13]。

本研究结果显示,电针刺激能明显改善缺血性脑损伤大鼠神经行为学评分,脑缺血再灌注后 24h 即可在大脑缺血侧检测到 TUNEL 阳性细胞数,而且

主要集中在缺血半暗带区,缺血中心区只可见到少量的阳性细胞,这在形态学上符合细胞凋亡的特点。我们进一步研究发现,电针能明显减少阳性凋亡细胞在脑组织中的表达,并通过抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达,提高 Bcl-2, BDNF 的作用,共同起到抗凋亡的脑保护作用。

有研究表明,脑源性神经营养因子 BDNF 是脑内合成的一种蛋白,是脑内分布最为广泛的神经营养因子,是神经元维持生存和执行正常功能所必需的,具有一定的抗凋亡作用。这可能与机体发生缺血缺氧后, BDNF 的表达被激活,进一步诱发细胞间信息传导通路的系列改变有密切的关系,即 BDNF 可能通过激活某个特定的信号传递途径,诱发凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 在体内的表达,减少神经元细胞因缺血缺氧所致的应激损伤,共同挽救中枢神经系统损伤后的神经元细胞,进而发挥抗神经细胞凋亡的脑保护作用。故通过研究,我们认为,电针刺激即可能是通过这一途径,在脑缺血再灌注损伤早期,通过激活 BDNF 的活性,来双向调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达,共同抑制脑缺血后神经元的凋亡。

细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 和 Bax 蛋白是 Bcl-2 蛋白基因家族分别具有抑制和促进细胞凋亡的一对胞内蛋白质,黄浏姣等^[14]发现脑缺血再灌注损伤的大鼠脑组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白均明显增多,且于 24h 达高峰,之后逐渐下降,而电针组 Bcl-2 蛋白各时点均高于模型组, Bax 明显低于模型组,说明电针对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠脑损伤有保护作用,其作用机制可能与上调 Bcl-2、下调 Bax 蛋白表达有关。有研究进一步认为,脑缺血再灌注能直接磷酸化多种转录因子,激活下游 Bcl-2, Bax, 并可能影响神经营养因子的表达,通过抑制凋亡基因的表达和增强抗凋亡基因的表达等方面,达到促进细胞存活的目的^[15-16]。Baba 等^[17]制备大鼠 MCAO 模型,术后将电极片植入大鼠大脑额叶硬膜外间隙进行电刺激,1 周后检测发现电刺激可通过激活抗凋亡级联反应而减少皮质缺血区域的细胞凋亡,并通过抑制炎症因子迁移的中枢神经营养因子水平,阻滞神经元凋亡、促血管和星形胶质细胞新生而达到减小梗死面积的作用。刘氏等^[18]针刺 MCAO 模型,发现不

同时时间点胶质细胞源性神经营养因子和碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达均有所增加,可能通过某一抗凋亡信号传导途径达到减缓神经细胞凋亡和坏死过程,这些与本研究发现的脑源性神经营养因子可能激活凋亡相关蛋白表达达到脑保护的目的明显相关。另有研究证明了电针“曲池”、“足三里”穴可以促进脑缺血后细胞增殖作用,并可激发新增殖细胞向星型胶质细胞分化^[19]。这为临床针灸促进脑缺血后细胞增殖及抑制其凋亡达到脑保护作用提供了一定依据。

综上所述,早期介入电针治疗对于缺血区的脑神经细胞具有明显的脑保护作用。机体损伤后激活脑源性神经营养因子BDNF的活性,诱发某个特定的信号传递途径,双向调节凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax的表达,从而抑制缺血再灌注后神经细胞凋亡加速神经功能的恢复,这可能是电针刺刺激发挥脑保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival[J]. *Semin Cell Dev Bio*, 2004, 15(2):177—182.
- [2] Wang J, Zhao H, Mao-Ying QL, et al. Electroacupuncture downregulates TLR2/4 and pro-inflammatory cytokine expression after surgical trauma stress without adrenal glands involvement[J]. *Brain Research Bulletin*, 2009, 80(1—2):89—94.
- [3] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. *Cell*, 2007, 129(7):1261—1274.
- [4] Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion[J]. *J Invest Surg*, 2007, 20(3):195—203.
- [5] Xi HJ, Zhang TH, Tao T, et al. Propofol improved neurobehavioral outcome of cerebral ischemia-reperfusion rats by regulating Bcl-2 and Bax expression[J]. *Brain Res*, 2011, (1410):24—32.
- [6] Zhang GC, Fu WB, Xu NG, et al. Meta analysis of the curative effect of acupuncture on post-stroke depression[J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(1):6—11.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [8] Kriz J, Lalancette-Hébert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(5):497—509.
- [9] Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, et al. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7):4670—4678.
- [10] Jørgensen HS, Nakayama H, Pedersen PM, et al. Epidemiology of stroke-related disability[J]. *Clin Geriatr Med*, 1999, 15(4):785—799.
- [11] 王晔,刘乃红,王锐,等.大鼠全脑缺血再灌注后海马CA1区神经元凋亡机制的研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2011,9(7):845—850.
- [12] 于荣波,刘瑞珍,徐伟丽,等.大鼠局灶性脑缺血再灌注后Caspase-9蛋白的表达[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2009,7(7):803—804.
- [13] Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(14):5099—5104.
- [14] 黄浏姣,洪亚群,陈邦国,等.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠Bcl-2、Bax表达的影响[J].*中国康复*,2011,26(2):83—85.
- [15] Kam KY, Yu SJ, Jeong N, et al. p-Hydroxybenzyl alcohol prevents brain injury and behavioral impairment by activating Nrf2, PDI, and neurotrophic factor genes in a rat model of brain ischemia[J]. *Mol Cells*, 2011, 31(3):209—215.
- [16] Produit-Zengaffinen N, Pourmaras CJ, Schorderet DF. Retinal ischemia-induced apoptosis is associated with alteration in Bax and Bcl-x(L) expression rather than modifications in Bak and Bcl-2[J]. *Molecular Vision*, 2009, (15):2101—2110.
- [17] Baba T, Kameda M, Yasuhara T, et al. Electrical stimulation of the cerebral cortex exerts antiapoptotic, angiogenic, and anti-inflammatory effects in ischemic stroke rats through phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Stroke*, 2009, 40(11):e598—605.
- [18] 刘丹,孙申田,樊爽,等.不同时间针刺对局灶性脑缺血再灌注大鼠GDNF和bFGF蛋白表达的影响[J].*现代中西医结合杂志*,2011,20(13):1588—1589.
- [19] Tao J, Xue XH, Chen LD, et al. Electroacupuncture improves neurological deficits and enhances proliferation and differentiation of endogenous nerve stem cells in rats with focal cerebral ischemia[J]. *Neurological Research*, 2010, 32(2):198—204.