

# ERK1/2 信号传导通路在大鼠局灶性急性脑缺血再灌注中的作用

杨 洋, 刘晓楠, 马 超, 姜 源, 孙晓红

(中国医科大学附属第四医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110032)

[关键词] ERK; 脑缺血再灌注; 血管生成素

[摘要] 目的 研究 ERK1/2 信号传导通路在局灶性急性脑缺血再灌注中的作用。方法 健康雄性 SD 大鼠, 随机分为假手术组和缺血组, 缺血组又分为脑缺血再灌注 6、12、24、48 和 72 h 组, 每组 6 只, 共计 36 只。采用线栓法建立大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。应用免疫组织化学方法测定 CD34、血管生成素 2(Ang-2)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)蛋白表达。结果 Ang-2 及 ERK1/2 在局灶性脑缺血再灌注大鼠模型中均在 24 h 达到高峰。结论 ERK1/2 信号传导通路参与了血管生成素对新生血管的促进作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effect of ERK1/2 Signal Transduction Pathway in Rats Focal Acute Ischemia-reperfusion

YANG Yang, LIU Xiao-Nan, MA Chao, JIANG Yuan, and SUN Xiao-Hong

(The 4th Affiliated Hospital of China Medical University, Shengyang, Liaoning 110032, China)

[KEY WORDS] ERK; Ischemic Reperfusion; Angiopoietin

[ABSTRACT] **Aim** This paper studies the effect of ERK1/2 signal transduction in focal acute brain ischemia-reperfusion. **Methods** 36 healthy male SD rats were randomly divided into sham operation group and ischemia group. Ischemia group was further divided into brain ischemia-reperfusion with different time (6, 12, 24, 48 and 72 h). Suture-occluded method was used to build cerebral middle artery infarction model (MCAO). CD34, Ang-2 and ERK1/2 were detected through immunohistochemical method. **Results** Ang-2 and ERK1/2 in focal cerebral ischemia-reperfusion rat model had dynamic change, and both reached peak at 24 hour. **Conclusion** ERK1/2 signal transduction way takes part in the promotion effect of angiogenesis of angiopoietin.

缺血性脑血管病所产生的神经功能损害一直是困扰医学界的一大难题,新近的研究提示,脑缺血后神经元的修复不仅与神经营养因子、生长相关因子等因素有关,还取决于缺血区新生血管的恢复情况。血管生成素<sup>[1]</sup>(angiopoietin, Ang)是近年发现的一种蛋白质分子,参与多种生理以及病理情况下的血管新生,在脑缺血后可以通过多种作用机制改善脑血流灌注,挽救缺血半暗带的神经元,从而改善缺血性脑血管病的神经功能恢复。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)<sup>[2]</sup>是一组在细胞内广泛存在的丝氨酸和苏

氨酸蛋白激酶,它包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)、p38、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase, JNK)和 ERK5(BMK1)等,通过一系列激酶的链式磷酸化,激活转录因子从而调节细胞生存、分化及凋亡等。ERK1/2 是 MAPK 家族中最早被认识的激酶,但是 ERK1/2 信号传导通路在大鼠局灶性脑缺血中的作用机制尚缺乏深入的了解,本研究通过大鼠局灶性急性脑缺血再灌注模型观察 ERK1/2 及 Ang 的表达水平,明确 ERK1/2 信号通路在大鼠脑缺血再灌注中的作用。

[收稿日期] 2013-05-07

[作者简介] 杨洋,硕士研究生,医师,研究方向为脑血管疾病治疗,E-mail 为 xxs0508@163.com。刘晓楠,硕士研究生,研究方向为脑血管疾病治疗。通讯作者孙晓红,博士,主任医师,研究方向为神经遗传性疾病发病机制,E-mail 为 sunxiaohong1972@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品

羊抗兔二步法试剂盒、枸橼酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;水合氯醛、甲醛、二甲苯、过氧化氢、氯化钠、氢氧化钠、多聚甲醛等药品均为国产分析纯。

1.2 实验分组

健康雄性 SD 大鼠,鼠龄 3~4 个月,体重 200~250 g,由中国医科大学动物部提供,随机分为假手术组和缺血组,缺血组又分为脑缺血/再灌注 6、12、24、48 和 72 h 组,每组 6 只,共计 36 只。大鼠术前禁食不禁水。

1.3 缺血再灌注模型制备

大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型<sup>[3]</sup>:应用线栓法制作大鼠大脑总动脉梗死模型。具体过程:大鼠全身麻醉后,颈正中中部切开,显微镜下分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)以及 ECA 和 ICA 的分支,并仔细分离迷走神经。0 号线结扎 CCA 和 ECA, ICA 挂线备用。在 CCA 扎线上端即 ECA、ICA 分叉膨大处下方剪一小口,以顶端烫成光滑球面的 4-0 单尼龙线为栓线插入小口并缓慢送入 ICA,当插入 18.5±0.5 mm 时即大脑中动脉的起始部停止插线,此时应提拉 ICA 的挂线,阻断血从 ICA 颅内段流出,插线完毕后,将 ICA 和尼龙线一起结扎,消毒,缝合皮肤后留 1 cm 尼龙线在皮肤外面。制备再灌注模型,无需再次切开颈部。假手术组大鼠暴露颈内、颈外动脉后即缝合,其余处理同手术组。

1.4 脑梗死模型的判定

线栓法大鼠局灶性脑缺血模型评分<sup>[4]</sup>:手术大鼠清醒后进行神经功能评分,参照 Zea Longa 等的 5 分制评分标准,在大鼠麻醉清醒后观察并记录神经功能症状:无神经病学征象为 0 分;提尾时病灶对侧前肢不能完全伸直为 1 分;向瘫痪侧旋转征象为 2 分;向病灶对侧跌倒为 3 分;无自发活动及意识障碍者为 4 分;评分在 1~3 分的大鼠认为模型制作成功,纳入实验分组。采用单盲法进行神经功能评分,即观察者不知实验分组。排除标准:手术、麻醉意外等死亡,蛛网膜下腔出血、存活时间未达取材时间以及再灌注时未苏醒的动物。并按严格的实验条件统一补充动物。

1.5 标本取材

缺血组动物按分组情况至规定时间后立即断头,取海马组织并用 4% 中性缓冲甲醛溶液固定,常规脱水、透明、石蜡包埋。连续冠状切片,片厚为 4

μm,分别行 HE 染色、免疫组化检测。假手术组取与缺血组对应区域海马组织,假手术组在缺血组对应时间点断头取脑,其余操作与缺血组相同。

1.6 苏木素-伊红染色

取缺血区脑组织常规脱蜡至水。置于 0.5% 苏木素液中染色 5 min 左右,水洗 1 min,75% 盐酸酒精分化 30 s,自来水流动洗后,氨水反蓝处理 30 s,再水洗 1 min 后,0.5% 酸化伊红乙醇染 12 min,流水快速冲洗。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性光学树脂封固。光学显微镜下观察缺血区脑组织神经元形态结构的改变。

1.7 免疫组织化学染色检测 Ang-2、ERK1/2、CD34

缺血区海马组织石蜡切片常规脱蜡至水,置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 PBS 中,室温下孵育 10 min,蒸馏水洗涤 5 min×3。将切片浸入 0.01 mol/L (pH 6.0) 枸橼酸缓冲液中微波炉煮沸 15 min,冷却后 PBS 洗涤 2 次。滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗。滴加稀释的一抗(兔抗大鼠 ERK 多克隆抗体;兔抗大鼠 Ang-2 多克隆抗体;兔抗大鼠 CD34 多克隆抗体。抗体购自武汉博士德公司),保湿盒内 4℃ 过夜,PBS 洗涤切片 2 min×3 次。滴加生物素化二抗(山羊抗兔 IgG 抗体,购自武汉博士德公司),37℃ 保湿盒中作用 30 min,PBS 洗涤切片 2 min×3 次。滴加试剂 SABC,37℃ 保湿盒中作用 20 min,PBS 洗涤切片 5 min×4 次。DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒,取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各一滴,混匀后滴至切片,反应 30 min,蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。

1.8 图像分析

ERK1/2、Ang-2、CD34 阳性表达为细胞核呈棕黄色或棕褐色;采用 Image J 图像分析软件测定免疫反应阳性细胞平均光密度值,每张切片选取海马 CA 1 区 5 个不重叠的高倍视野(200 倍)。

1.9 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理,各组数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间的比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

假手术组大鼠步态平稳,活动正常,肌张力无减弱,无明显神经功能缺损症状;模型组大鼠均出现明显的神经功能缺损症状,并且随着缺血再灌注时间的延长,神经功能评分逐渐增加( $P < 0.05$ ;表 1)。



表 1. 各组大鼠 MCAO 术后神经功能缺损症状评分比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1. The score of nerve function defect after MCAO of each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分 组	n	神经功能评分
假手术组	6	0.00 ± 0.00
缺血再灌注 6 h 组	6	1.02 ± 0.32 <sup>a</sup>
缺血再灌注 12 h 组	6	1.48 ± 0.44 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 24 h 组	6	1.65 ± 0.21 <sup>abc</sup>
缺血再灌注 48 h 组	6	1.88 ± 0.42 <sup>abcd</sup>
缺血再灌注 72 h 组	6	2.34 ± 0.02 <sup>abcde</sup>

a 为  $P<0.05$  ,与假手术组比较; b 为  $P<0.05$  ,与缺血再灌注 6 h 组比较; c 为  $P<0.05$  ,与缺血再灌注 12 h 组比较; d 为  $P<0.05$  ,与缺血再灌注 24 h 组比较; e 为  $P<0.05$  ,与缺血再灌注 48 h 组比较。

2.2 病理组织学观察

假手术组右侧海马结构致密,细胞数量多,胞

质丰富,细胞核清楚,核仁明显;间质无水肿,无炎症细胞浸润。模型组右侧海马组织结构紊乱,细胞数量减少,可见变性、坏死的神经细胞,胞质疏松,有空泡样变性,核溶解或发生固缩,核仁消失;而且随着缺血再灌注时间的延长,海马组织的病理改变更加明显,神经细胞变性坏死、胞核固缩等现象也更加严重(图 1)。

2.3 CD34 的表达

免疫组织化学染色结果显示,假手术组大鼠海马无明显阳性细胞;缺血再灌注模型组可见大量胞核染色呈阳性的神经细胞,与假手术组相比较阳性细胞显著增多( $P<0.05$ );并且随着再灌注时间不同呈现出动态演变,最高峰出现在再灌注 24 小时。( $P<0.05$ ;表 2 和图 2)。

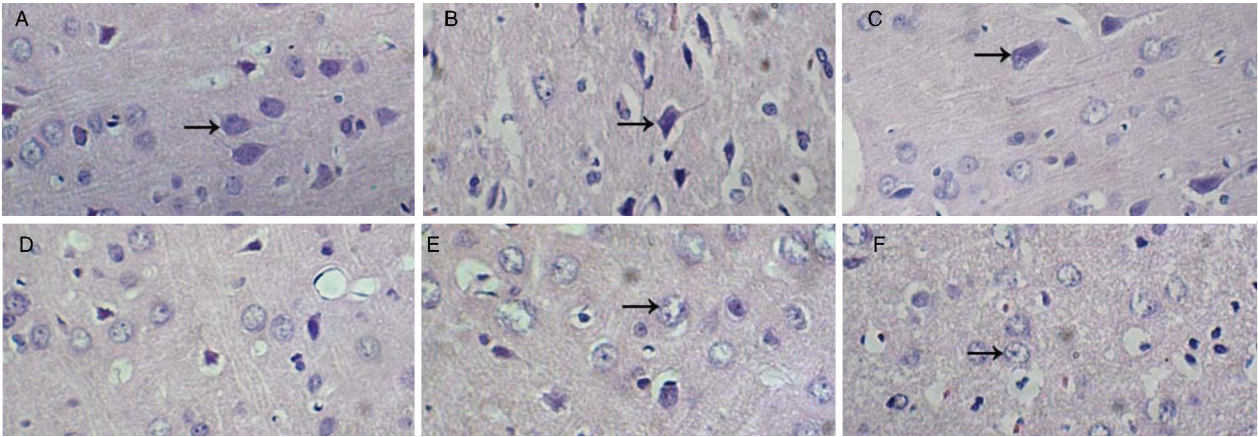


图 1. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区神经元 HE 染色结果(×200) A 为假手术组,B、C、D、E、F 分别为缺血再灌注 6、12、24、48 和 72 h 组。→示神经细胞。

Figure 1. The results of HE staining at right sea horse after MCAO of different groups(×200)

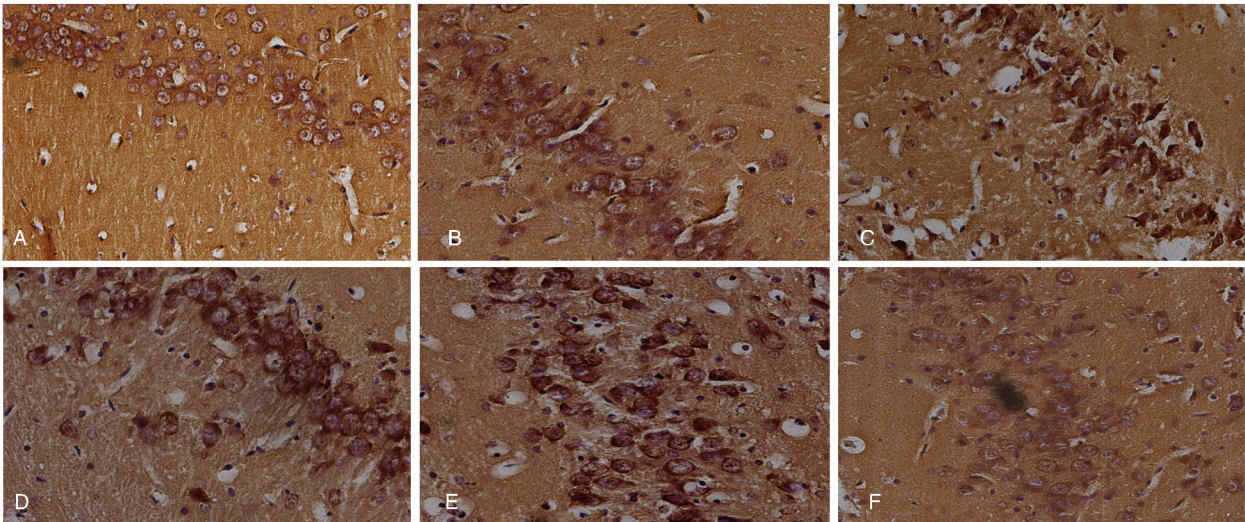


图 2. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区 CD-34 表达的情况(×200) A 为假手术组,B、C、D、E、F 分别为缺血再灌注 6、12、24、48 和 72 h 组。

Figure 2. The expression of CD34 at right sea horse after MCAO of different groups(×200)



表 2. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区 CD34 表达的光密度比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. The optical density of CD34 expression at right sea horse after MCAO ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	CD34 光密度值
假手术组	6	0.00 ± 0.00
缺血再灌注 6 h 组	6	0.59 ± 0.12 <sup>a</sup>
缺血再灌注 12 h 组	6	0.97 ± 0.02 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 24 h 组	6	1.31 ± 0.11 <sup>abcde</sup>
缺血再灌注 48 h 组	6	1.08 ± 0.22 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 72 h 组	6	1.02 ± 0.02 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 6 h 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 12 h 组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 48 h 组比较; e 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 72 h 组比较。

2.4 pERK1/2 蛋白的表达

免疫组织化学染色结果显示,假手术组大鼠海马无明显阳性细胞;缺血再灌注模型组可见大量胞核染色呈阳性的神经细胞,与假手术组相比较阳性细胞显著增多( $P < 0.05$ );并且随着再灌注时间不同呈现出动态演变,最高峰出现在再灌注 24 h( $P < 0.05$ ;表 3 和图 3)。

2.5 Ang-2 的表达

免疫组织化学染色结果显示,假手术组大鼠海马无明显阳性细胞;缺血再灌注模型组可见大量胞核染色呈阳性的神经细胞,与假手术组相比较阳性细胞显著增多( $P < 0.05$ );并且随着再灌注时间不同呈现出动态演变,最高峰出现在再灌注 24 h( $P < 0.05$ ;表 4 和图 4)。

表 3. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区 pERK1/2 表达的光密度比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. The optical density of pERK1/2 expression at right sea horse after MCAO ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	pERK1/2 光密度值
假手术组	6	0.00 ± 0.00
缺血再灌注 6 h 组	6	0.99 ± 0.22 <sup>a</sup>
缺血再灌注 12 h 组	6	1.36 ± 0.44 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 24 h 组	6	1.78 ± 0.21 <sup>abcde</sup>
缺血再灌注 48 h 组	6	1.42 ± 0.42 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 72 h 组	6	1.22 ± 0.02 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 6 h 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 12 h 组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 48 h 组比较; e 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 72 h 组比较。

表 4. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区 Ang-2 表达的光密度比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4. The optical density of Ang-2 expression at right sea horse after MCAO ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	Ang-2 光密度值
假手术组	6	0.00 ± 0.00
缺血再灌注 6 h 组	6	0.77 ± 0.22 <sup>a</sup>
缺血再灌注 12 h 组	6	0.11 ± 0.12 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 24 h 组	6	1.32 ± 0.21 <sup>abcde</sup>
缺血再灌注 48 h 组	6	1.16 ± 0.42 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 72 h 组	6	1.12 ± 0.02 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 6 h 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 12 h 组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 48 h 组比较; e 为  $P < 0.05$ , 与缺血再灌注 72 h 组比较。

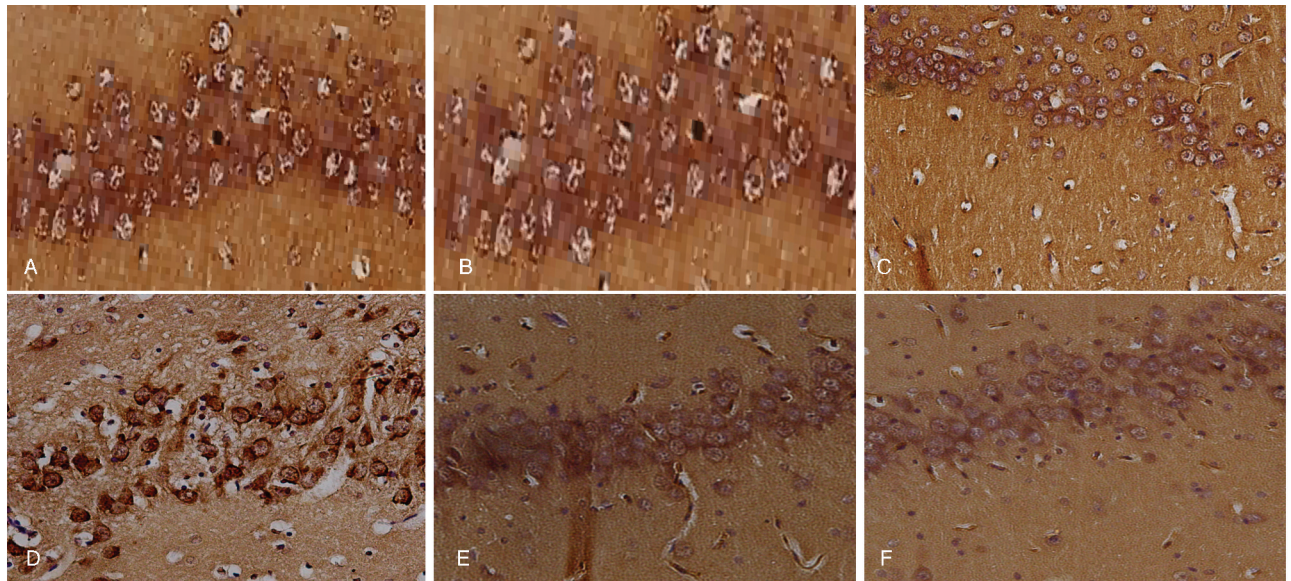


图 3. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区 ERK 表达的情况(×200) A 为假手术组,B、C、D、E、F 分别为缺血再灌注 6、12、24、48 和 72 h 组。

Figure 3. The expression of ERK at right sea horse after MCAO of different groups(×200)



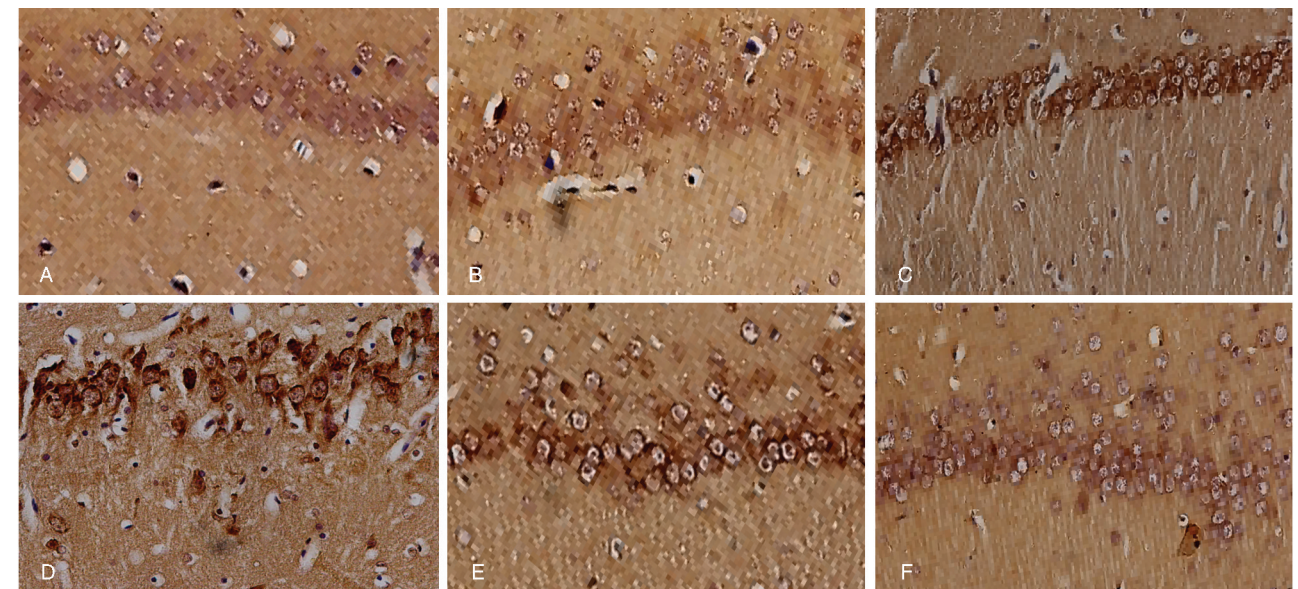


图 4. 各组大鼠 MCAO 术后右侧海马区 Ang 表达的情况( ×200) A 为假手术组,B、C、D、E、F 分别为缺血再灌注 6、12、24、48 h 及 72 h 组。

Figure 4. The expression of Ang at right sea horse after MCAO of different groups( ×200)

### 3 讨 论

缺血性脑血管病所遗留的神经功能损害一直是困扰医学界的一个难题,研究提示,脑缺血后神经元的修复与缺血区血管新生( angiogenesis, AG )的恢复情况有关。AG<sup>[5]</sup>指的是从已经存在的血管上生长出毛细血管,病理性血管新生包括关节炎、糖尿病视网膜病变、肿瘤的生长等。AG 是缺血区组织抗损伤和神经元修复的结构基础。脑缺血后机体血管生成取决于局部组织释放的内源性促血管生长因子和抑制因子,这些因子在脑缺血后微血管生成中发挥了重要作用<sup>[6]</sup>。血管生成过程依赖于诱导因子和抑制因子的平衡。目前已经发现影响血管新生的物质有 20 多种,它们控制着内皮细胞的增殖、迁移,调节血管新生,包括血管内皮细胞生长因子( VEGF )、Ang、碱性成纤维细胞生长因子( bFGF )、转化生长因子( TGF )、肝细胞生长因子( HGF )、表皮生长因子( EGF )、胰岛素生长因子( IGF-I )、血小板源性生长因子( PDGF )、白细胞介素 8( IL-8 )等,其中血管生成素在血管新生中发挥了重要作用。

Ang 是新近发现的蛋白质分子,是一种重要的促血管生成因子,包括 Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4 四种分子,与血管新生关系密切的主要是 Ang-1 和 Ang-2,它们主要通过 Ang 家族的共同受体 Tie-2 发挥生理学效应。既往的研究多局限在 Ang-1 对血管生成的调节方面,研究表明,Ang-1 具有促进血管生

成、抑制血管渗漏以及抑制炎症基因的表达等作用,能够维持成人血管的稳定性<sup>[7]</sup>。但是对 Ang-2 的血管生成调节机制研究较少。目前研究表明 Ang-2 对不同细胞上的 Tie-2 作用不同。在内皮细胞竞争性抑制 Ang-1 引起的 Tie-2 磷酸化,研究还提示 Ang-2 的拮抗效应与局部 VEGF 水平有关:VEGF 存在时,Ang-2 促进新生血管形成;VEGF 缺乏时,Ang-2 则有利于血管的消退。在成纤维细胞则诱导 Tie-2 的磷酸化。张小芳等<sup>[8]</sup>的研究表明大鼠局灶性脑梗死后 Ang-2 的变化分为两个阶段,高峰期出现在梗死后 24 h( 6.4 倍 )和 2 周后( 4.6 倍 )。而 Ang-2 mRNA 于梗死后 6 h 后在梗死灶的单个细胞中检测到,12 ~ 24 h 后 Ang-2 mRNA 的表达达到高峰,表达局限于梗死灶周边区以及对侧大脑半球相应区域的单个细胞( 主要是内皮细胞 ),此外,同侧和对侧的海马结构也能诱导 Ang-2 mRNA 的表达。

丝裂原活化蛋白激酶( mitogen activated protein kinases, MAPK )<sup>[9]</sup>的家族成员是哺乳动物细胞内一组进化保守的酶。具有丝氨酸和苏氨酸双重磷酸化功能的蛋白激酶,是介导细胞反应的重要信号系统,在基因表达以及调控方面发挥重要作用<sup>[10]</sup>。近年发现 MAPK 家族是连接细胞膜表面受体与决定性基因之间的重要信号调节酶,控制着细胞的适应、增殖、分化、存活和程序性细胞凋亡等几乎所有生理功能和过程。目前发现哺乳动物脑组织至少表达了 4 种严格调节的 MAPK<sup>[11]</sup>: 分别为 ERK1/2

(p44/42)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK1/2/3)、p38MAPK 和 ERK5(BMK1)。Hicks 等<sup>[12]</sup>研究全脑缺血模型海马区 MAPK 通路激活的特征时发现:小鼠因窒息 8 min 造成全脑缺血,发现在再灌注 6、12、24 h 的 3 个时间点,磷酸化 ERK 水平渐进性增高。Grzenda 等<sup>[13]</sup>对 19 名急性中风后 1~44 天的病人检测脑组织的 MAPK 磷酸化水平时发现 13 名病人灰质半暗带(与正常对侧组织相比)的 MAPK 磷酸化水平明显升高(ERK1 2.0~8 倍、ERK2 2.2~11 倍)。研究提示大鼠脑缺血再灌注损伤的中心区域以神经元中 ERK 的早期激活为主,而未受损区以星形胶质细胞中 ERK 的早期激活为主,促进了星形胶质细胞的存活。由此可见 ERK 信号通路在保护缺血区神经元和抑制未受损脑区细胞凋亡的过程中起到重要的作用<sup>[14]</sup>。

根据本实验的研究结果提示,大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型中,CD34 随着再灌注的时间不同而有着动态演变,在再灌注 24 h 达到高峰,这说明在急性缺血性脑卒中大鼠模型中新生血管的形成在发病早期即出现高峰,与既往研究结果基本一致<sup>[15]</sup>。此外,ERK1/2 与 Ang-2 均随着再灌注时间的不同而呈现动态演变,并且均在再灌注 24 h 达到高峰,与 CD34 达峰时间基本一致,提示 ERK 及 Ang-2 在大脑缺血再灌注中发挥了重要的作用。此外根据研究提示 ERK1/2 和 Ang-2 在大鼠急性脑缺血再灌注中呈现出比较相近的演变规律,所以初步推测 ERK 信号传导通路参与了 Ang-2 对新生血管的促进作用。

血管生成是脑缺血后自身修复和重塑的重要机制,为降低缺血性脑卒中患者神经功能的损害提供了新的治疗方向,并对探讨治疗脑缺血的作用机制有一定的意义。本研究进一步验证了血管生成素在急性脑缺血新生血管形成中的重要作用,并提示 ERK1/2 信号传导通路在血管生成素的作用中发挥了重要的作用,为提高脑缺血的治疗效果提供了一个新的方向。但是本实验主要探讨的是急性缺血性脑卒中 ERK1/2 信号传导通路对新生血管的促进作用,对于慢性缺血性脑卒中的作用机制需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 张健,曾进胜. 脑缺血后血管生成的分子机制[J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 18 (2): 146-150.

[2] Ahn NG. The MAP kinase cascade: Discovery of a new signal transduction pathway [J]. Mol Cell Biochem, 1993, 201 (8): 127-128.

[3] Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, et al. Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2000, 26 (1): 232-242.

[4] Longa EI, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery: occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.

[5] Hayashi T, Nagot DK. Cerebral ischemia and angiogenesis[J]. Curr Neurovasc Res, 2006, 3 (1): 126-129.

[6] 王锡煌,王挹青,宋晶金. 血管生成素 1 通过核因子  $\kappa$ B 传导通路调节内皮祖细胞炎症因子表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (4): 309-314.

[7] 刘轲,李建生,邵利霞,等. 老龄大鼠脑缺血/再灌注微血管生成及 Ang/Tie-2 系统的表达变化[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(3): 584-588.

[8] 张小芳,刘丹. Ang-1/Ang-2/Tie2 信号通路在血管生成中的研究进展[J]. 微循环学杂志, 2011, 21 (3): 78-80.

[9] 李军,曹红. MAPK 级联反应与缺血性脑损伤[J]. 国外医学-麻醉学与复苏, 2002, 23 (4): 232-235.

[10] 李菊香,丁浩,洪葵,等. ERK1/2 信号通路介导心肌营养素 1 对心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (9): 711-715.

[11] 王耀岐,李军,曹红. ERK 和 JNK 通路在沙土鼠脑缺血预处理中的表达及作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22 (3): 337-340.

[12] Hicks, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis[J]. Front Mol Neurosci, 2011, 49(1): 51.

[13] Grzenda A, Shannon J, Fisher J, et al. Timing and expression of the Angiopoietin-1/Tie-2 pathway in murine lung development and congenital diaphragmatic hernia (CDH) [J]. Dis Model Mech, 2013, 6 (1): 106-114.

[14] 刘瑞,高维娟. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路及其在细胞凋亡中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32 (18): 4 089-092.

[15] 孙顺昌,王国峰,赵仁亮. 血管生成素-1 在缺血性脑损伤中的作用研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2011, 38 (5): 496-500.

(此文编辑 李小玲)