

• 基础论著 •

Wortmannin 对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区自噬相关蛋白 Beclin-1 及凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响

袁敏 唐静 刘斌

【摘要】 目的 探讨 Wortmannin 对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区的自噬及凋亡表达的影响及意义。方法 将 150 只大鼠随机分为假手术组、模型组及 Wortmannin 组。每组又随机分为 1 周、2 周、4 周、8 周和 12 周 5 个亚组 ($n = 10$)。采用四血管阻断法制备血管性痴呆模型,应用 Morris 水迷宫试验检测大鼠的学习记忆能力,HE 染色观察大鼠海马区神经元形态变化,免疫组化法检测 Beclin-1 及 Caspase-3 蛋白的表达。结果 与假手术组比较,模型组出现明显学习记忆障碍,海马 CA1 区 Beclin-1 阳性表达在 1 周开始增多,4 周达到高峰,8 周开始下降,到 12 周仍增多;Caspase-3 阳性表达在 1 周开始增多,2 周达到高峰,4 周开始下降,到 12 周仍增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,Wortmannin 组学习记忆障碍明显改善,海马 CA1 区 Beclin-1 及 Caspase-3 阳性表达减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 Wortmannin 可能通过减轻自噬及凋亡对神经细胞的损伤,从而达到保护神经细胞,增强和调节学习记忆能力的作用。这可能为血管性痴呆的治疗提供一个靶点。

【关键词】 自噬; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; Wortmannin; Beclin-1

Effects of wortmannin on autophagy-related protein Beclin-1 and apoptosis-related protein Caspase-3 on CA1 area of hippocampus in vascular dementia rats YUAN Min, TANG Jing, LIU Bin. Emergency Department, Tangshan Kaiping Hospital, Tangshan 063021, China

Corresponding author: LIU Bin, Email: yuanminzuibang@qq.com

【Abstract】 Objective To discuss the influence and significance of wortmannin by means of autophagy and apoptosis on CA1 area of hippocampus in vascular dementia rats. **Methods** One hundred and fifty mice were randomly divided into sham operation group, vascular dementia model group and wortmannin group. And then the groups were randomly subdivided into 1, 2, 4, 8 and 12 weeks groups ($n = 10$). Vascular dementia rat models were established by blocking four vessels. Learning and memory abilities were detected by Morris water maze. The structural change of hippocampus neurons were observed by HE dyeing. The expression of Beclin-1 and Caspase-3 were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the sham operation group, model group was appeared obvious learning memory disorders, the positive expression of Beclin-1 was rose at 1 week, peaked at 4 weeks, at 8 weeks began to decline, to 12 weeks higher still on CA1 area of hippocampus; the positive expression of Caspase-3 was rose at 1 week, peaked at 2 weeks, at 4 weeks began to decline, to 12 weeks higher still, there were statistical significance ($P < 0.05$); Compared with vascular dementia model group, Study memory disorders of wortmannin group were obviously improved, the positive expression of Beclin-1 and Caspase-3 were reduced on CA1 area of hippocampus, there were statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Wortmannin may reduce the damage of nerve cells by means of autophagy and apoptosis, and then protect nerve cells, help to enhance and adjust the ability of learning and memory. It may provide a target for treatment of vascular dementia.

【Key words】 Autophagy; Apoptosis; Caspase 3; Wortmannin; Beclin-1

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.12.109

基金项目:唐山市科技局科技攻关计划应用项目(121302110a)

作者单位:063021 河北省,唐山市开平医院急诊科(袁敏);河北联合大学附属医院神经内一科[唐静(在读研究生)、刘斌]

通讯作者:刘斌,Email:yuanminzuibang@qq.com

血管性痴呆是指大脑缺血性、出血性疾病以及循环系统疾病导致的脑组织低灌注引起的一种痴呆综合征^[1-2]。自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是真核细胞特有的生命现象^[3],它是细胞生长发育、分化成熟及死亡的重要调控机制,与衰老、神经变性疾病、肌肉疾病和脑血管病等多种疾病相关^[4-8]。细胞凋亡,亦称程序性死亡(programmed cell death,PCD),细胞凋亡与血管性痴呆的发病过程也密切相关^[9-10],但自噬和凋亡在血管性痴呆发病过程中的共同作用的研究还比较少。Wortmannin 是常用的Ⅲ型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)特异性抑制剂^[11],它可以通过细胞膜与胞内PI3K的110 kD催化亚基相结合,然后特异性地抑制PI3K/Akt信号转道通路,从而减轻细胞凋亡^[12]。目前有关渥曼青霉素(Wortmannin)对血管性痴呆引起的自噬、凋亡的影响及可能机制的研究还太少,本实验通过采用先电凝双侧椎动脉,24 h后再反复夹闭双侧颈总动脉制作大鼠血管性痴呆模型,研究Wortmannin对血管性痴呆大鼠海马CA1自噬及凋亡的影响,从而去了解Wortmannin在血管性痴呆的作用及可能机制。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物:健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠150只,体质量250~280 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司供给,合格证号SCXK(京)2010-0013。在河北联合大学屏障环境动物实验室自由进食喂养,室温控制在(23±2)℃,自然光照,实验前适应喂养2周。

2. 主要试剂和仪器:兔抗鼠Beclin-1多克隆抗体及兔抗鼠Caspase-3多克隆抗体购自北京博奥森公司,Wortmannin购自上海碧云天有限公司,SP免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。Morris水迷宫由淮北正华生物仪器设备有限公司提供,电凝仪器由张家港市航天医疗电器有限公司提供。

二、方法

1. 动物分组:大鼠按随机数字法分为:假手术组、血管性痴呆模型组(模型组),Wortmannin组,每组又随机分为1周、2周、4周、8周和12周5个亚组(各10只)。

2. 动物模型制备:采用改良四血管阻断法^[13]建立血管性痴呆大鼠模型,模型组、Wortmannin组用电凝针烧灼双侧翼小孔内的椎动脉,造成椎动脉永久性闭塞,24 h后用动脉夹夹闭双侧颈总动脉5 min,共夹闭3

次,每次间隔1 h,Wortmannin组在夹闭前30 min,腹腔注射Wortmannin(0.5 mg/kg)^[14]。假手术组仅做手术,但不进行椎动脉烧灼和颈总动脉夹闭。术中大鼠肛温保持36.5~37.5℃,以防低温对脑缺血损伤的保护作用,术后连续肌肉注射3 d庆大霉素,预防感染。

3. 学习记忆能力测试:在相应时间点前5 d随机抽选6只大鼠行Morris水迷宫试验,测试学习记忆能力,包括定位航行试验和空间探索试验。每天分上午、下午两个训练时间段,每段训练4次,记录第5天其在120 s内寻找到并爬上平台的时间,即逃避潜伏期,若大鼠120 s内未找到平台,则逃避潜伏期记录为120 s。

4. 标本制备:各组大鼠在进行行为学测试结束后,立即以致死量100 g/L水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉后,仰卧位固定于手术台上,剪开胸腔,暴露心脏,从心尖插入灌注针至左心室,同时剪开右心耳,快速滴入37℃生理盐水300 ml,无血污后改为滴入固定液4℃的多聚甲醛400 ml。待大鼠尾巴完全僵直时迅速断头,取出脑组织,固定于4%多聚甲醛溶液中12~24 h,进行脱水透明及石蜡包埋。冠状面连续切片,厚度约3 μm,用经多聚赖氨酸处理过的载玻片捞片,晾干后至于60℃的烤箱中烘烤备用。

5. Beclin-1和Caspase-3检测:采用免疫组化SP法检测Beclin-1及Caspase-3的表达,严格按照试剂说明书操作要求进行检测。Beclin-1和Caspase-3阳性标准:光镜下观察,Beclin-1蛋白染色呈棕黄色颗粒,位于胞质内;Caspase-3蛋白染色呈棕黄色颗粒,位于核膜或胞质内。高倍镜下随机分别观察皮质缺血半暗带区不重叠的6个视野,进行Beclin-1和Caspase-3蛋白阳性细胞计数,计算阳性细胞平均数。

三、统计学方法

所得数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以Excel数据库整理后用SPSS 13.0统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两组之间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠定位航行及空间探索试验结果:与假手术组比较,模型组、Wortmannin组大鼠逃避潜伏期在第1、2天无统计学意义;第3、4、5天模型组和Wortmannin组逃避潜伏期延长,学习能力差,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,Wortmannin组逃避潜伏期缩短,学习能力较好,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01),见表1,图1。大鼠在第5天进行的跨越平台次数实验提示,相同时间组比较,模型组大鼠的跨越平台次数较假手术组、Wortmannin组明显减少,差异有

表1 各组大鼠逃避潜伏期比较($s, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术1周组	6	59.40 ± 2.16	44.06 ± 1.21	31.29 ± 3.31	24.00 ± 1.78	13.66 ± 2.63
假手术2周组	6	58.83 ± 2.63	45.83 ± 2.96	31.83 ± 2.48	24.33 ± 2.16	14.16 ± 3.07
假手术4周组	6	58.00 ± 2.89	46.00 ± 2.31	33.16 ± 2.40	26.50 ± 2.58	15.83 ± 1.47
假手术8周组	6	59.33 ± 3.65	47.06 ± 2.28	33.29 ± 2.04	25.33 ± 2.40	15.66 ± 3.18
假手术12周组	6	57.50 ± 2.28	46.66 ± 1.87	30.26 ± 2.42	25.00 ± 1.21	14.66 ± 2.09
模型1周组	6	59.50 ± 3.93	51.00 ± 1.41	45.16 ± 1.72 ^a	35.33 ± 3.44 ^a	26.33 ± 2.73 ^a
模型2周组	6	59.33 ± 2.58	56.66 ± 2.58	48.16 ± 2.04 ^a	38.16 ± 3.18 ^a	32.50 ± 1.87 ^a
模型4周组	6	59.00 ± 4.04	53.33 ± 2.94	52.66 ± 2.16 ^a	46.16 ± 2.84 ^a	35.83 ± 3.18 ^a
模型8周组	6	58.83 ± 2.31	49.83 ± 2.48	46.66 ± 1.86 ^a	40.00 ± 1.78 ^a	32.00 ± 2.09 ^a
模型12周组	6	57.50 ± 3.72	50.83 ± 3.31	46.50 ± 2.42 ^a	37.66 ± 1.21 ^a	30.50 ± 1.87 ^a
Wortmannin 1周组	6	57.66 ± 2.42	50.83 ± 2.63	39.50 ± 1.87 ^{ab}	31.33 ± 2.80 ^{ab}	23.00 ± 2.36 ^{ab}
Wortmannin 2周组	6	58.00 ± 2.89	50.83 ± 1.16	44.16 ± 2.04 ^{ab}	35.66 ± 2.58 ^{ab}	27.83 ± 3.18 ^{ab}
Wortmannin 4周组	6	58.16 ± 3.65	51.83 ± 3.31	48.00 ± 1.67 ^{ab}	38.16 ± 2.40 ^{ab}	29.16 ± 1.47 ^{ab}
Wortmannin 8周组	6	57.83 ± 3.43	52.50 ± 2.88	46.16 ± 2.28 ^{ab}	37.83 ± 2.16 ^{ab}	28.16 ± 1.16 ^{ab}
Wortmannin 12周组	6	58.50 ± 2.07	52.00 ± 4.28	45.83 ± 3.18 ^{ab}	35.66 ± 1.75 ^{ab}	27.50 ± 5.78 ^{ab}

注:同一时间,与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

表2 各组大鼠跨越平台次数比较(次, $\bar{x} \pm s$)

组别	1周	2周	4周	8周	12周
假手术组	8.33 ± 0.51	8.00 ± 1.41	8.50 ± 1.21	7.83 ± 0.83	8.00 ± 0.75
模型组	5.66 ± 1.21 ^a	4.83 ± 1.47 ^a	3.80 ± 0.75 ^b	6.83 ± 0.75 ^a	7.50 ± 0.83 ^a
Wortmannin 组	7.50 ± 0.75 ^c	6.83 ± 0.40 ^c	6.33 ± 0.8 ^d	7.00 ± 0.6 ^c	7.50 ± 0.83 ^c

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

表3 各组大鼠海马CA1区Beclin-1蛋白阳性表达数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1周	2周	4周	8周	12周
假手术组	9.50 ± 1.87	9.16 ± 1.47	9.00 ± 1.47	10.33 ± 1.96	9.83 ± 1.47
模型组	21.50 ± 1.47 ^a	26.66 ± 2.58 ^a	44.00 ± 2.36 ^b	22.50 ± 1.87 ^a	18.50 ± 1.87 ^a
Wortmannin 组	15.16 ± 1.47 ^c	16.16 ± 1.47 ^c	32.50 ± 2.73 ^d	18.33 ± 1.86 ^c	15.00 ± 1.41 ^c

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

表4 各组大鼠海马CA1区Caspase-3蛋白阳性表达数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1周	2周	4周	8周	12周
假手术组	10.33 ± 1.21	11.83 ± 1.47	11.00 ± 1.41	10.50 ± 1.87	10.83 ± 1.47
模型组	33.16 ± 2.69 ^a	53.16 ± 3.18 ^a	31.16 ± 2.63 ^b	31.00 ± 2.36 ^a	26.50 ± 1.04 ^a
Wortmannin 组	27.16 ± 2.16 ^c	38.16 ± 2.92 ^d	25.83 ± 2.16 ^c	23.83 ± 1.94 ^c	21.16 ± 1.16 ^c

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

统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01),见表2,图2。

2. HE染色结果(图3):假手术组大鼠海马CA1区组织结构清晰,神经细胞排列整齐,形态正常,核仁清楚;模型组大鼠海马CA1区神经细胞的层次不清,排列松散,细胞水肿、坏死,胞体溶解,胞质淡染,可见核固缩,核溶解;与模型组比较,Wortmannin组大鼠海马

CA1区细胞排列较紧密、层次较清晰,核固缩、核溶解现象较少。

3. 各组大鼠海马CA1区Beclin-1及Caspase-3蛋白表达结果(表3,4,图4,5):与假手术组比较,大鼠海马CA1区Beclin-1阳性表达在1周开始增多,4周达到高峰,8周开始下降,到12周仍增多;Caspase-3阳性表

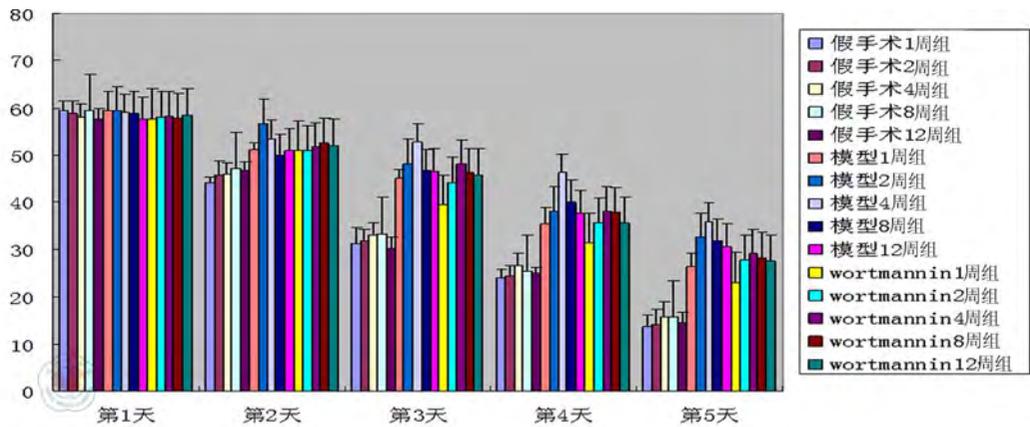


图1 各组大鼠逃避潜伏期比较

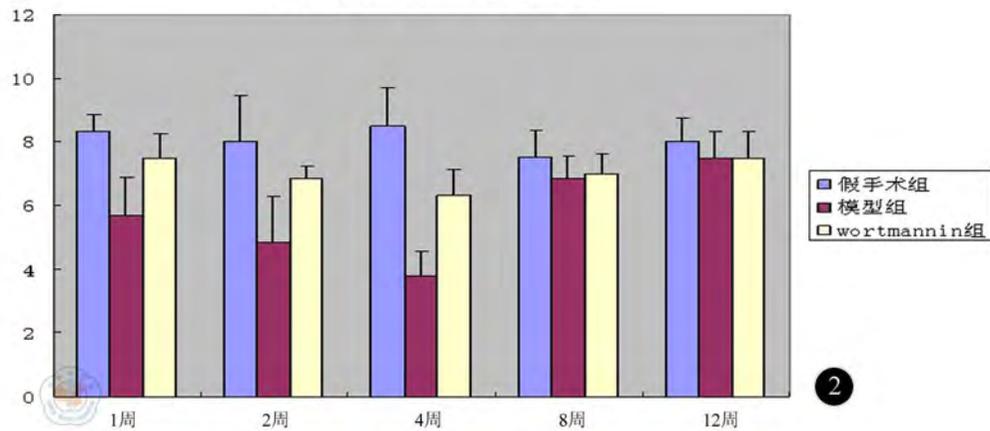


图2 各组大鼠跨越平台次数比较

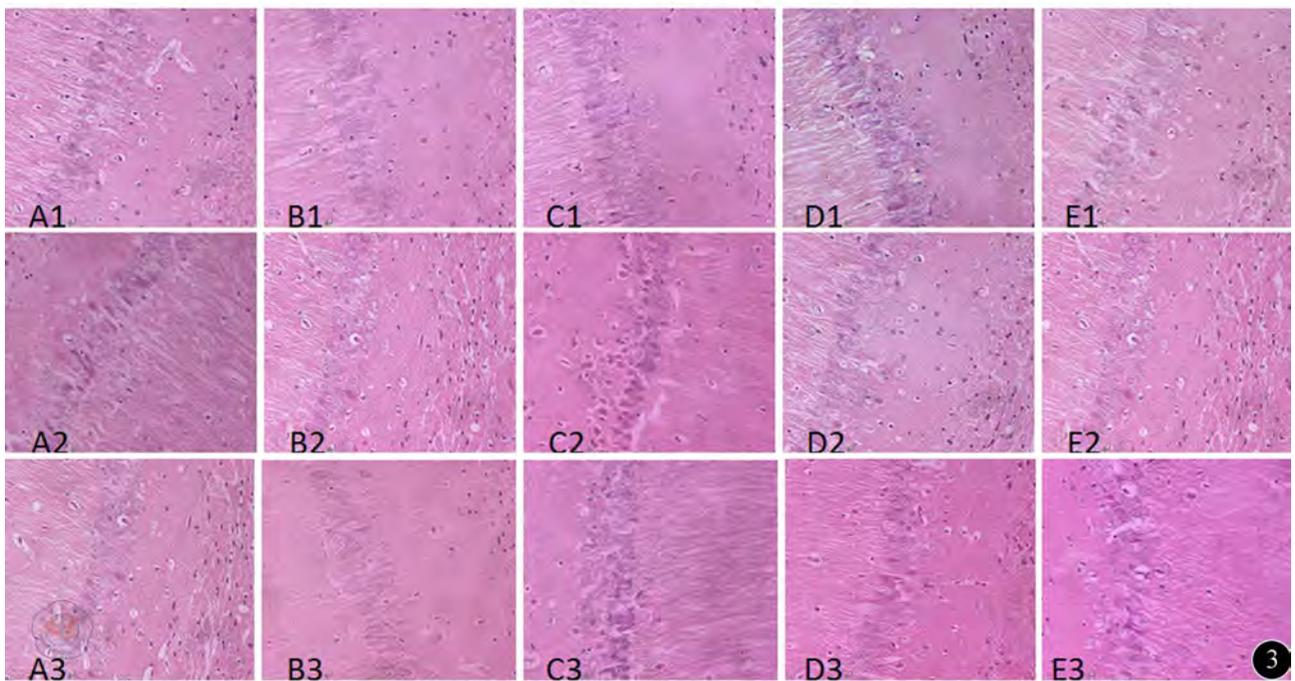


图3 各组大鼠海马CA1区不同时间点 HE染色 (×200)。A1假手术1周组; B1假手术2周组; C1假手术4周组; D1假手术8周组; E1假手术12周组; A2模型1周组; B2模型2周组; C2模型4周组; D2模型8周组; E2模型12周组; A3 wortmannin 1周组; B3 wortmannin 2周组; C3 wortmannin 4周组; D3 wortmannin 8周组; E3 wortmannin 12周组

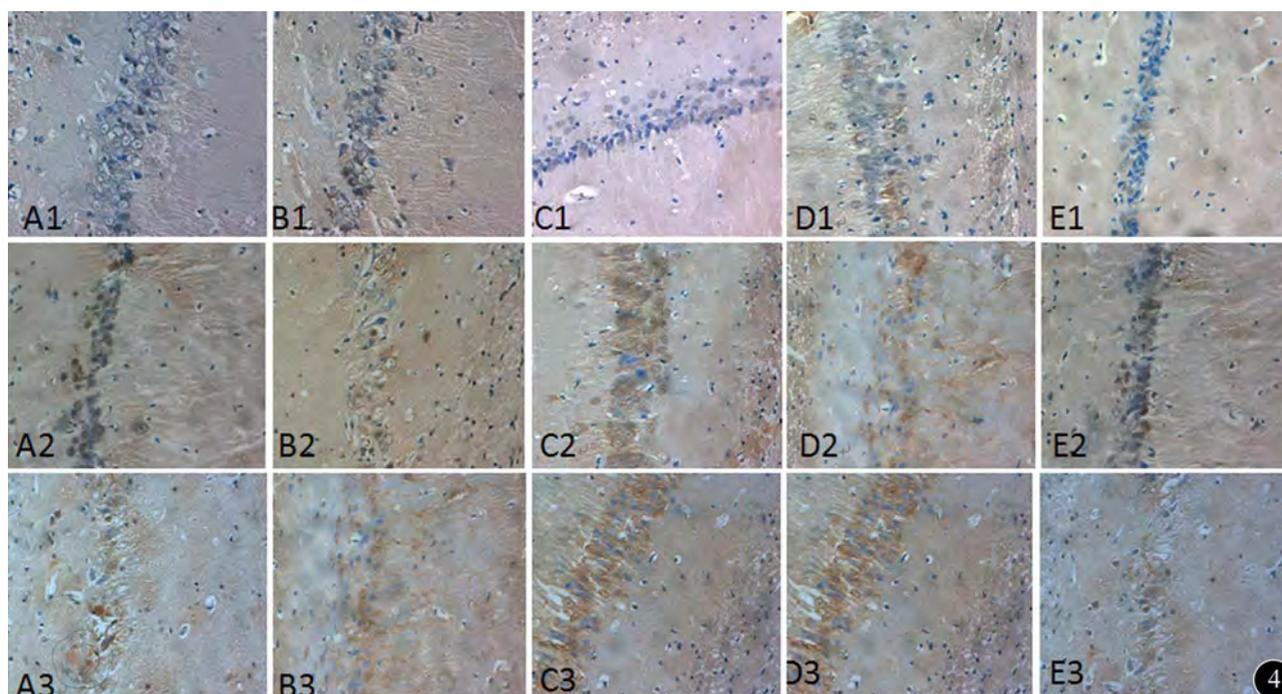


图4 各组大鼠海马CA1区不同时间点 Beclin-1免疫组化染色($\times 200$)。A1假手术1周组; B1假手术2周组; C1假手术4周组; D1假手术8周组; E1假手术12周组; A2模型1周组; B2模型2周组; C2模型4周组; D2模型8周组; E2模型12周组; A3 wortmannin 1周组; B3 wortmannin 2周组; C3 wortmannin 4周组; D3 wortmannin 8周组; E3 wortmannin 12周组

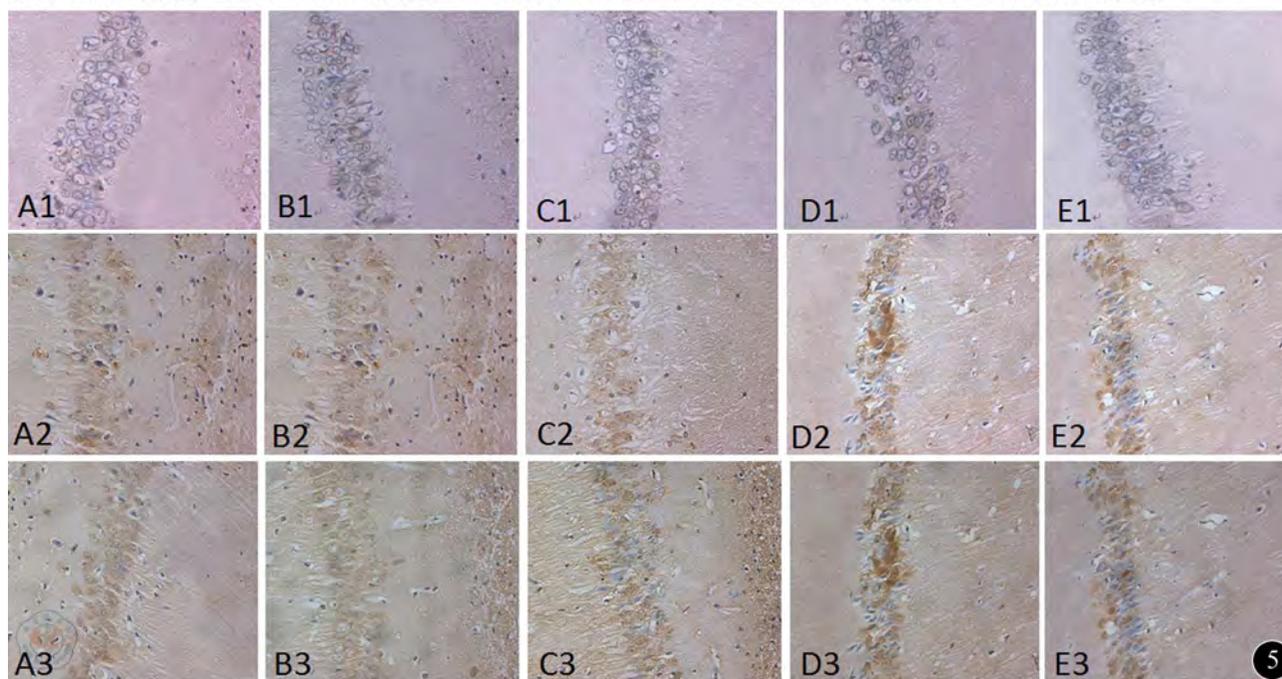


图5 各组大鼠海马CA1区不同时间点 Caspase-3免疫组化染色($\times 200$)。A1: 假手术1周组; B1: 假手术2周组; C1: 假手术4周组; D1: 假手术8周组; E1: 假手术12周组; A2: 模型1周组; B2: 模型2周组; C2: 模型4周组; D2: 模型8周组; E2: 模型12周组; A3: wortmannin 1周组; B3: wortmannin 2周组; C3: wortmannin 4周组; D3: wortmannin 8周组; E3: wortmannin 12周组

达在1周开始增多,2周达到高峰;4周开始下降,到12周仍增多,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01);与模型组比较,Wortmannin组大鼠海马CA1区 Beclin-1和Caspase-3阳性表达减少,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 < 0.01)。

讨 论

Wortmannin是在1957年首次从真菌 *Penicillium Wortmannii* 中提取出来的一种霉菌代谢产物,Wortmannin与PI3K的催化亚单位 p110 结合后能非竞争性

和不可逆地抑制 PI3K 的激酶活性,进而阻断 PI3K/PKB 信号通路,是 PI3K 的特异性抑制剂^[15]。细胞培养实验证实 Wortmannin 通过抑制自噬底物向溶酶体内的运输而抑制自噬,即使小剂量亦可发挥抑制作用,并且具有更高的选择性^[16]。曹丽丽等^[14]实验证实通过自噬抑制剂 Wortmannin 预处理能减少癫痫大鼠海马神经元的损伤,增加海马神经元存活数量,并抑制自噬的激活。Beclin-1 是酵母 At96/Vps30 基因的同源物,PI3K 可与 Beclin-1 形成复合物参与自噬体的形成^[17]。因此,Beclin-1 是自噬的重要调节因子,它的表达反映了自噬的活性^[18]。自噬在神经损伤和修复过程中发挥双重性作用。一方面,它可以降解胞质大分子和细胞器为蛋白质合成提供能量和氨基酸,同时还能降解异常蛋白质,防止其在神经元内积聚;另一方面,自噬的过度活跃则会形成自噬应激可能对细胞有毒性作用,并参与神经变性疾病的致病过程^[19]。相关文献报道自噬的激活可以通过吞噬和降解重要的细胞器,并参与凋亡的级联反应而引起神经元死亡^[20]。Komatsu 等^[21]研究表明分别敲除小鼠自噬基因 ATG7 和 ATG5 可以导致小鼠出现神经元死亡及神经退行性变的症状。还有研究表明自噬在神经退行性疾病中有神经保护作用^[22],自噬可以降解突变的蛋白,清除老年斑。

细胞凋亡,是由基因控制的细胞主动死亡的一种过程^[23]。Caspases 是一大类凋亡调控基因,对神经元的凋亡起着非常关键的作用,凋亡的实施是通过激活 Caspases 而实现。Caspase-3 是 Caspases 家族中最重要的细胞凋亡执行者之一,在蛋白酶级联切割过程中 Caspase-3 发挥着重要的作用,一旦 Caspase-3 被激活就会导致细胞死亡,因此它被称为死亡蛋白酶^[24]。实验证明 Wortmannin 不仅可以减轻局部脑缺血损伤^[25],还可以抑制蛛网膜下腔出血导致的细胞凋亡^[26]。许多证据表明 Caspase-3 的活化与脑细胞缺血死亡有关^[27]。同时 Lavrik 等^[28]证实 Caspase-3 在脑缺血再灌注神经元凋亡数与 Caspase-3 活性呈显著正相关。Eldadah 等^[29]证实 Caspase-3 表达的时空分布以及动态变化与凋亡细胞表达一致,几乎在相同时间和相同脑区出现,并且在同一时间达到高峰,提示 Caspase-3 的表达参与并促进脑缺血再灌注过程中细胞的凋亡。

本研究通过观察 Wortmannin 对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 Beclin-1 及 Caspase-3 蛋白表达的影响,发现与假手术组比较,模型组出现明显学习记忆障碍,海马 CA1 区 Beclin-1 阳性表达在 1 周开始增多,4 周达到高峰,8 周开始下降,到 12 周仍增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 < 0.01);Caspase-3 阳性表达在 1 周开始增多,2 周达到高峰;4 周开始下降,到 12 周仍增多,差

异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 < 0.01);与模型组比较, Wortmannin 组学习记忆障碍明显改善,海马 CA1 区 Beclin-1 及 Caspase-3 阳性表达减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 < 0.01)。这说明 Wortmannin 可能通过减轻自噬及凋亡对神经细胞的损伤,从而达到保护神经细胞,增强和调节学习记忆能力的作用。这可能为血管性痴呆的治疗提供一个靶点。

参 考 文 献

- [1] Róman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, et al. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology*, 1993, 43:250-260.
- [2] 李林昕,董强. 从血管性痴呆到血管认知功能损害. *中华脑血管病杂志*, 2009, 3:127-131.
- [3] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Differ*, 2005, 12:1542-1552.
- [4] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132:27-42.
- [5] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451:1069-1075.
- [6] 左全庭,吴成翰,高丽丽. 自噬与卒中. *国际脑血管病杂志*, 2010, 18:548-552.
- [7] Lynch-Day MA, Mao K. The role of autophagy in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2:a009357.
- [8] Tung YT, Wang BJ, Hu MK, et al. Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease. *J Biosci*, 2012, 37:157-165.
- [9] 刘斌,马原源,毛文静,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠海马 CA 区细胞凋亡及 Bcl2, Bax 蛋白表达的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17:176-179.
- [10] 蔺心敬,李吕力,杨德刚,等. 血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡和蛋白表达实验研究. *中国现代医学杂志*, 2007, 17:2326.
- [11] Zhang F, Zhang T, Jiang T, et al. Wortmannin potentiates roscovitine-induced growth inhibition in human solid tumor cells by repressing PI3K/AKT pathway. *Cancer Lett*, 2009, 286:232-239.
- [12] Schmid T, Kastner R, Paschen W, et al. A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats. *Stroke*, 1989, 20:936-946.
- [13] Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 1982, 11:491-498.
- [14] 曹丽丽,董艳,许婧婧,等. Wortmannin 通过抑制癫痫大鼠海马自噬活性发挥神经保护作用. *中国病理生理杂志*, 2010, 26:1584-1588.
- [15] Wipf E, Halter RJ. Chemistry and biology of wortmannin. *Org Biomol Chem*, 2005, 3:2053-2061.
- [16] Fruman DA, Meyers RE, Cantle LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:481-507.
- [17] Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, et al. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*, 2001, 2:330-335.
- [18] Rubinsztein DC, Difiglia M. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*, 2005, 1:11-22.
- [19] Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 2004, 4:70-77.
- [20] Chu CT. Eaten alive: autophagy and neuronal cell death after hypoxia-ischemia. *Am J Pathol*, 2008, 172:284-287.
- [21] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006, 441:880-884.
- [22] Martine-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration:

- when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 352-361.
- [23] 张运克. 补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响. *中华中医药杂志*, 2007, 22: 404-407.
- [24] Cain K, Bratton SB, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-KDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*, 2000, 275: 6067-6070.
- [25] Zhou YL, Lekic T, Fathali N, et al. Isoflurane posttreatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by the sphingosine-1-phosphate/phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Stroke*, 2010, 41: 1521-1527.
- [26] Cheng G, Chunlei W. Simvastatin activates Akt/glycogen synthase kinase-3 β signal and inhibits caspase-3 activation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Vascul Pharmacol*, 2010, 52: 77-83.
- [27] Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, et al. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways are involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21: 529-540.
- [28] Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2665-2672.
- [29] Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma*, 2000, 17: 811-829.

(收稿日期: 2013-03-13)

(本文编辑: 戚红丹)

袁敏, 唐静, 刘斌. Wortmannin 对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区自噬相关蛋白 Beclin-1 及凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(12): 5401-5407.

