

黄芪多糖减轻蛛网膜下腔出血后早期脑损伤及保护神经的作用研究

宋晓征¹, 伍雪英¹, 李成杰² (1. 成都三六三医院神经内科, 四川 成都 610041; 2. 成都三六三医院放射科, 四川 成都 610041)

摘要: **目的** 探讨黄芪多糖(Astragalus Polysaccharide, APS)对大鼠蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后早期脑损伤(Early brain injury, EBI)的保护作用及其机制。**方法** 根据随机数据表法将 100 只大鼠随机分为 4 组, 每组 25 只, 即假手术组(Sham 组)、SAH 组、赋形剂对照组(Vehicle 组)和 APS 组。在 SAH 后 1 h 和 6 h, APS 组腹腔注射 APS 溶液($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 mL), vehicle 组注射相同体积的生理盐水, 其他组不做任何处理。观察各组大鼠死亡率、SAH 等级、神经功能和脑水肿情况, 同时, 进行生化实验和组织学研究。**结果** 死亡率调查结果显示, Sham 组中的老鼠都没有死亡, SAH 组、Vehicle 组和 APS 组的死亡率依次为 20.0 % (5/25)、16.0 % (4/25) 和 20.0 % (5/25)。经 APS 治疗后, APS 组的神经功能和脑含水量较 Vehicle 组和 SAH 组显著改善 ($P < 0.05$)。免疫组化和 Western blot 分析结果均显示, SAH 大鼠经 APS 治疗后 p-Akt、p-Bad 蛋白表达较 SAH 组和 Vehicle 组显著提高 ($P < 0.05$), 同时 Caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** APS 可通过抗凋亡作用减轻 SAH 后的 EBI, 并保护神经元细胞, 其作用机制可能与调节 PI3K/Akt 通路有关。

关键词: 蛛网膜下腔出血; 脑损伤; 黄芪多糖; PI3K/Akt; 保护神经

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.0

Astragalus Polysaccharide Alleviates Early Brain Injury and Protecting Nerve Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats

Song Xiaozheng¹, Wu Xueying¹, Li Chengjie² (1. Department of Neurology, Chengdu 363 hospital, 610041, China; 2. Radiological department, Chengdu 363 Hospital, 610041, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of APS on EBI and neuronal apoptosis induced by experimental SAH in rats, and analyze the potential mechanisms. **Methods** Rats ($n=100$) were randomly divided into the following groups: Sham group ($n=25$), SAH group ($n=25$), Vehicle group ($n=25$), and APS group ($n=25$). APS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 mL) or an equal volume of vehicle was administered at 1 h and 6 h after SAH, all the rats were subsequently sacrificed at 24h after SAH. Mortality, neurological scores, and brain edema were assessed, biochemical tests and histological studies were also performed at that point. **Results** Mortality survey showed that the mice in the Sham group did not die, and the mortality rates in the SAH group, Vehicle group and APS group were 20.0% (5/25), 16.0% (4/25) and 20.0% (5/25). There was no significant difference in SAH grade between SAH group, Vehicle group and APS group ($P > 0.05$). After APS treatment, the neurological function and brain water content of APS group were significantly better than those of Vehicle group and SAH group ($P < 0.05$). Immunohistochemistry and Western blot analysis showed that post-SAH treatment with APS could cause a significant increase of phosphorylated Akt and Bad levels ($P < 0.05$), along with a significant decrease of cleaved caspase-3 levels in the cortex after SAH ($P < 0.05$). **Conclusion** APS could attenuate EBI after SAH and protect neuronal cells by anti apoptotic effect, potentially, in part, through modulating the PI3K/Akt pathway.

Key words: Subarachnoid hemorrhage; Brain injury; Astragalus polysaccharide; PI3K/Akt; Protecting Nerve

收稿日期: 2017-03-07

作者简介: 宋晓征, 女, 副主任医师, 研究方向: 神经病学。Email: suwlkc@163.com。

蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)是一种常见的出血性脑血管病^[1-2]。虽然,目前外科技术,放射学和麻醉学取得了重大的进步,但是,在SAH的治疗方面并没有取得较大突破,疾病的死亡率依然很高。研究认为,早期脑损伤(Early brain injury, EBI)是引发SAH死亡的独立危险因素,通常发生在SAH后72 h内^[3-4]。因此,预防EBI的发生被认为是SAH患者治疗的主要目标。目前,关于EBI的确切发病机制仍不明确,但大量研究表明,细胞凋亡在EBI的发生发展过程中起着至关重要的作用,并且越来越多的证据表明SAH后细胞凋亡程度明显,而在临床治疗SAH中采用抗凋亡治疗能够取得有益的治疗效果^[5-7]。因此,凋亡细胞死亡可能作为SAH后EBI的潜在治疗靶点。

丝氨酸-苏氨酸激酶Akt/蛋白激酶B(PKB)在细胞凋亡/生存途径中起重要作用,其被Ser473残基处的磷酸化活化以后,会促使Bad等蛋白凋亡,阻止其结合为Bcl-xL,并抑制Caspase-3蛋白活性^[8-9]。目前,已证实PI3K/Akt存活途径在中枢神经系统疾病中参与神经元细胞凋亡,包括缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、脊髓损伤和SAH^[10-11]。

黄芪多糖(Astragalus Polysaccharide, APS)是广泛用于治疗各种疾病的中药材黄芪的主要活性成分^[12]。最近研究表明,APS对多种中枢神经系统疾病如卒中、阿尔茨海默病、帕金森病等,以及一些神经损伤症状均具有良好的改善作用^[13]。然而,关于APS在SAH诱导的EBI治疗方面应用未见报道。因此,在目前的工作中,我们旨在观察APS对SAH诱导的EBI的改善和保护神经作用,并探讨其可能存在的分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 健康成年SD大鼠,雄性,SPF级,体重220~260 g,购自北京维通利华动物实验中心,生产许可证号:SCXK(京)2014-0009。实验前,大鼠于独立通风笼采用标准饲料适应性饲养7 d。

1.2 试剂 APS,购自陕西永源生物技术有限公司,批号:JY-20160315,纯度 $\geq 98\%$;免疫组化试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司,批号: ; TUNEL试剂盒,购自瑞士罗氏(Roche)公司,批号: ; p-Akt、p-Bad、Caspase-3抗体,购自英国Abcam公司,批号: 。

1.3 分组、模型制备及给药 根据随机数据表法将100只大鼠随机分为4组,每组25只,即假手术组

(Sham组),SAH模型组,赋形剂对照组(Vehicle组),APS组。除Sham组外,其余大鼠根据文献方法建立SAH模型^[14],具体方法如下:大鼠经腹腔麻醉后,做颈正中切口,暴露颈动脉,夹闭颈内动脉,在颈外动脉剪“V”型切口,将4-0单丝尼龙缝合线自切口处插入动脉,使其在有阻力感后穿刺前脑动脉和大脑中动脉引起SAH,然后将单丝尼龙缝合线拔出,整个操作控制在30 s内完成。假手术组除不将单丝尼龙缝合线插入动脉外,其余过程相同。实验过程通过使用温垫控制大鼠温度在 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。手术后,将大鼠放回笼中,使食物和水容易接近。造模成功判定标准:以大鼠有明确无脑实质损害的SAH或血凝块表明造模成功。SAH后1 h和6 h,APS组腹腔注射APS溶液($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 3 mL),vehicle组在相同时段腹腔注射相同体积的生理盐水。在建立SAH模型后24 h内计算各组大鼠死亡率。

1.4 SAH严重程度评估 在SAH建立24 h后,对每组大鼠SAH严重程度进行评估。参照文献报告方法^[15],即将脑基底池分为6个区域:左右前额,左右颞和上下脑干,每个区域分配一个分数(从0到3分),0分:蛛网膜下腔无血液;1分:蛛网膜下腔最小血液;2分:蛛网膜下腔可识别动脉的中度血块;3分:血块堵塞蛛网膜下腔的所有动脉,总分(0~18分,Sham组=0分)。参照此标准由一位被蒙蔽者独立记录每只大鼠得分。

1.5 神经行为检测 在SAH建立24 h后,使用改良的Garcia评估方法对每组大鼠的神经行为进行检测^[16],神经功能缺损涉及6个方面:自发活动(0~3分),所有肢体运动对称(0~3分),前爪伸展(0~3分),爬坡(1~3分),身体本体感觉(1~3分)和响应触觉(1~3分)。最小神经评分为3分,满分为18分;得分越低表示神经功能缺陷越严重。参照此标准由一位被蒙蔽者独立记录每只大鼠得分。

1.6 评估脑含水量 在SAH后24 h,各组取6只大鼠断头处死,迅速将大鼠脑完整分离进行含水量测定。

1.7 免疫组织化学研究和细胞计数 在SAH后24 h各组取6只大鼠断头处死,收集脑组织标本并进行常规石蜡包埋,切片,采用ABC法免疫组化染色检测检测海马组织p-Akt, p-Bad和Caspase-3蛋白表达。将脑切片在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 正常山羊血清工作溶液中孵育30 min,弃去山羊血清,并加入兔抗人p-Akt(1:500)、兔抗人Akt(1:1000)、兔抗人p-Bad(1:500)、兔抗

人 Bad(1 : 1000)和兔抗人 Caspase-3(1 : 100), 4 ℃ 孵育过夜。然后, 加入用辣根过氧化物酶缀合的免疫球蛋白 G(1 : 500)工作溶液, 室温孵育 60 min。DAB 显色, 苏木精复染。以细胞染为黄色到棕黄色为阳性标准。

1.8 TUNEL 免疫荧光染色检测神经元细胞凋亡 选取脑组织标本石蜡包埋切片, 使用原位细胞死亡检测试剂盒进行 TUNEL 测定。最后用 4'6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)复染细胞核 3 min, 荧光显微镜下计数 TUNEL 阳性细胞数。细胞凋亡指数(AI)定义为在六个皮层微观领域(×400 放大)观察到 TUNEL 阳性细胞的平均百分比。

1.9 Nissl 染色 将脑组织切片置于 Nissl 工作液中染色 30 min, 用双蒸水洗涤后, 脱水并封片。

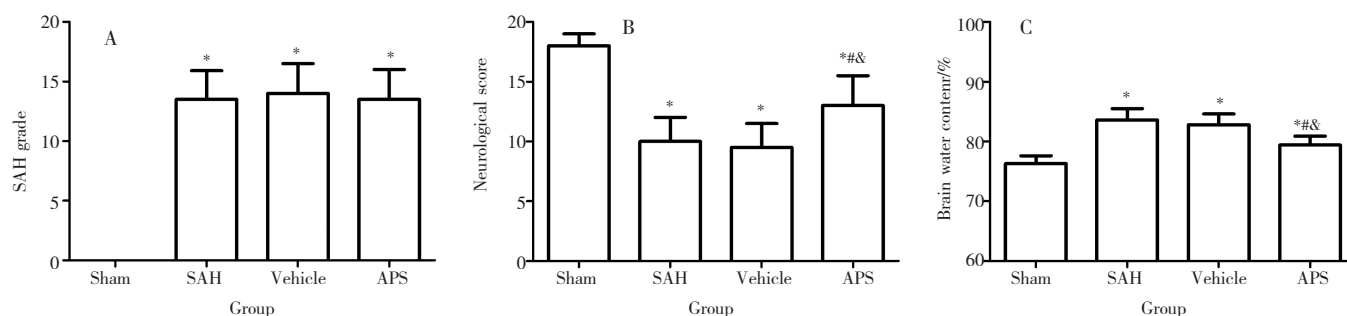
1.10 Western Blot 实验 大鼠处死后, 取下基底颞叶同一部位约 200 mg, 提取总蛋白后用 10 % SDA-PAGE 垂直电泳分离, 将分离的蛋白质转移到聚乙烯二氟膜上, 5 %脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜。加入 p-Akt 一抗、Bad 一抗、Caspase-3 一抗和 GAPDH 一抗, 工作浓度分别为: 1 : 500、1 : 500、1 : 1000 和 1 : 5000, 4 ℃孵育过夜。之后, 将膜洗涤 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(工作浓度为

1 : 5000), 室温孵育 2 h, 膜洗 3 次, ECL 显色, 对条带进行定性分析, 以 GAPDH 作为内参照。

1.11 统计学处理方法 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 连续变量使用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 并进行正态性检验, 服从正态和非正态分布数据组间比较使用 *t* 检验和 Mann-Whitney U 检验。

2 结果

2.1 各组死亡率、神经学评分、SAH 评分和脑含水量情况 死亡率调查结果显示, Sham 组中的老鼠都没有死亡, SAH 组、Vehicle 组和 APS 组的死亡率依次为 20.0 %(5/25)、16.0 %(4/25) 和 20.0 %(5/25)。大部分死亡大鼠是在 SAH 模型建立后 3 h 内。排除死亡大鼠, SAH 等级评分在 SAH 组、Vehicle 组和 APS 组之间无显著性差异($P > 0.05$), APS 并没有改变 SAH 大鼠出血情况, 见图 1A。与 Sham 组比较, SAH 组的神经学评分显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而脑含水量显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 经 APS 治疗后, APS 组的神经功能和脑含水量较 Vehicle 组显著改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1B、1C。



注: 与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAH 组比较, # $P < 0.05$; 与 Vehicle 组比较, & $P < 0.05$ 。A~C: SAH 评分、神经学评分、脑含水量

图 1 各组在 SAH 后 24 h SAH 评分、神经学评分和脑含水量情况

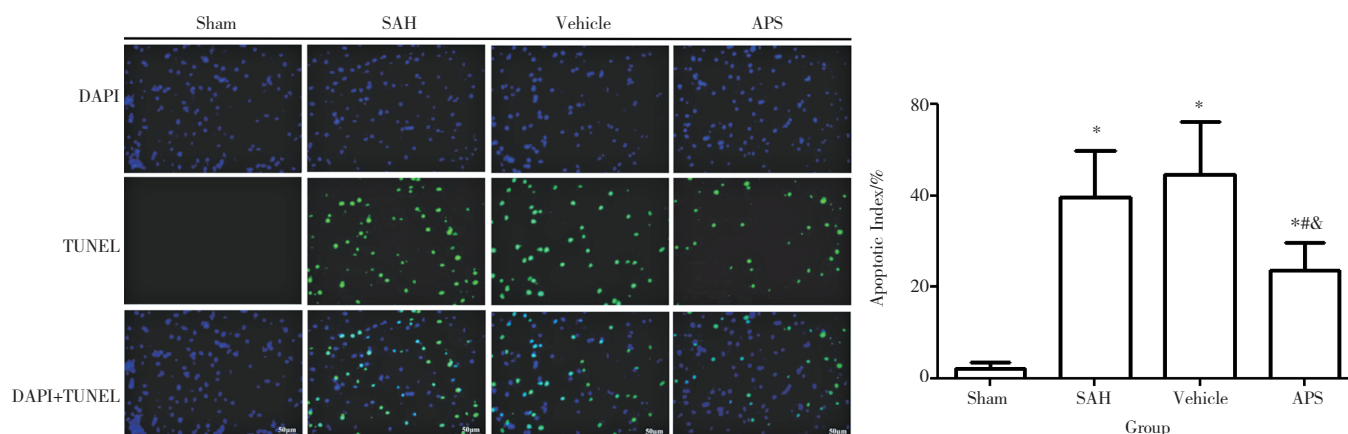
Figure 1 The SAH grade, neurological score and brain water content among each group at 24 h after SAH. A~C: SAH grade, neurological score, brain water content

2.2 TUNEL 染色结果 Sham 组几乎没有发现 TUNEL 阳性细胞, 而在 SAH 组、Vehicle 组和 APS 组中均发现 TUNEL 阳性细胞。其中, APS 组的 TUNEL 阳性细胞较 SAH 组和 Vehicle 组均显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 Nissl 染色结果 Nissl 染色结果显示, 在 Sham 组中, 正常神经元细胞显示出尖锐的分界线, 具有较大的细胞体, 并含有丰富的细胞质和一个或两个细胞核; 相比之下, SAH 组、Vehicle 组和 APS 组中损

伤的神经元细胞体收缩明显, 核凝聚, 细胞质较暗, 空囊泡较多。其中, APS 组中正常神经元细胞数较 SAH 组和 Vehicle 组显著增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

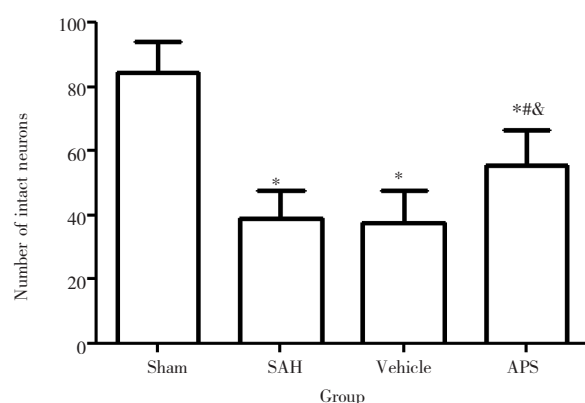
2.4 免疫组织化学染色结果 免疫组化结果中, p-Akt 和 p-Bad 阳性表达呈棕褐色, 主要位于大脑皮层的神经元。Caspase-3 阳性表达呈棕色, 主要位于大脑皮质。与 Sham 组比较, SAH 组、Vehicle 组和 APS 组中 p-Akt、p-Bad 和 Caspase-3 的阳性表达均



注: TUNEL 为绿色, DAPI 为蓝色。与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAH 组比较, # $P < 0.05$; 与 Vehicle 组比较, & $P < 0.05$ 。

图2 TUNEL 染色结果(400 ×)

Figure 2 The result of TUNEL(400 ×)



注: TUNEL 为绿色, DAPI 为蓝色。与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAH 组比较, # $P < 0.05$; 与 Vehicle 组比较, & $P < 0.05$ 。

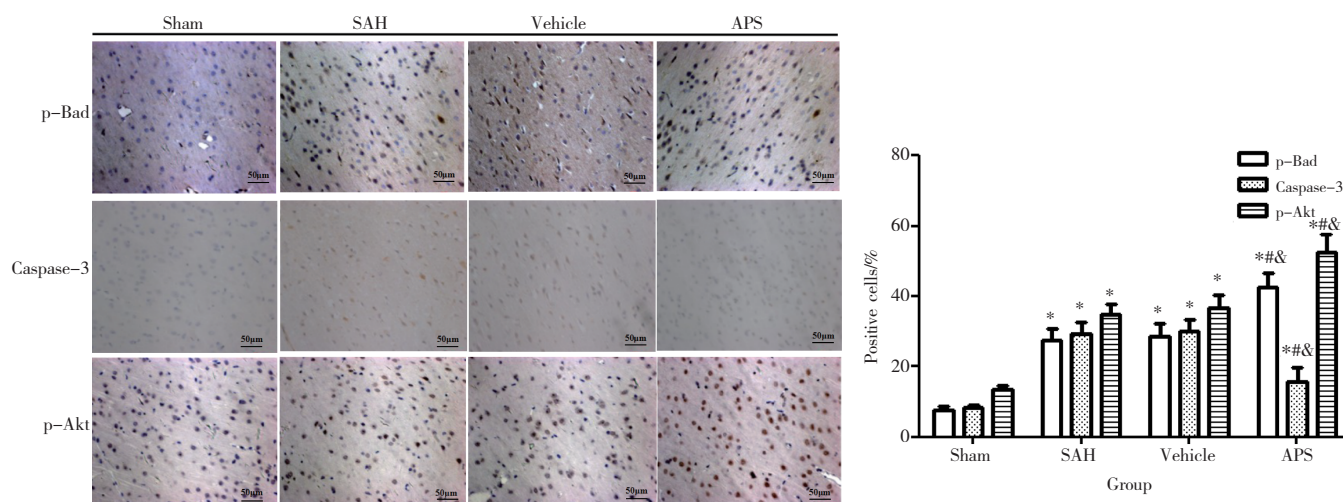
图3 Nissl 染色结果(× 400)

Figure 3 The result of Nissl(× 400)

显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中, APS 组的 p-Akt、p-Bad 阳性表达较 SAH 组和 Vehicle 组均显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 Caspase-3 的阳性表达较 SAH 组和 Vehicle 组均显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 APS 对 p-Akt, p-Bad 和 Caspase-3 表达的影响

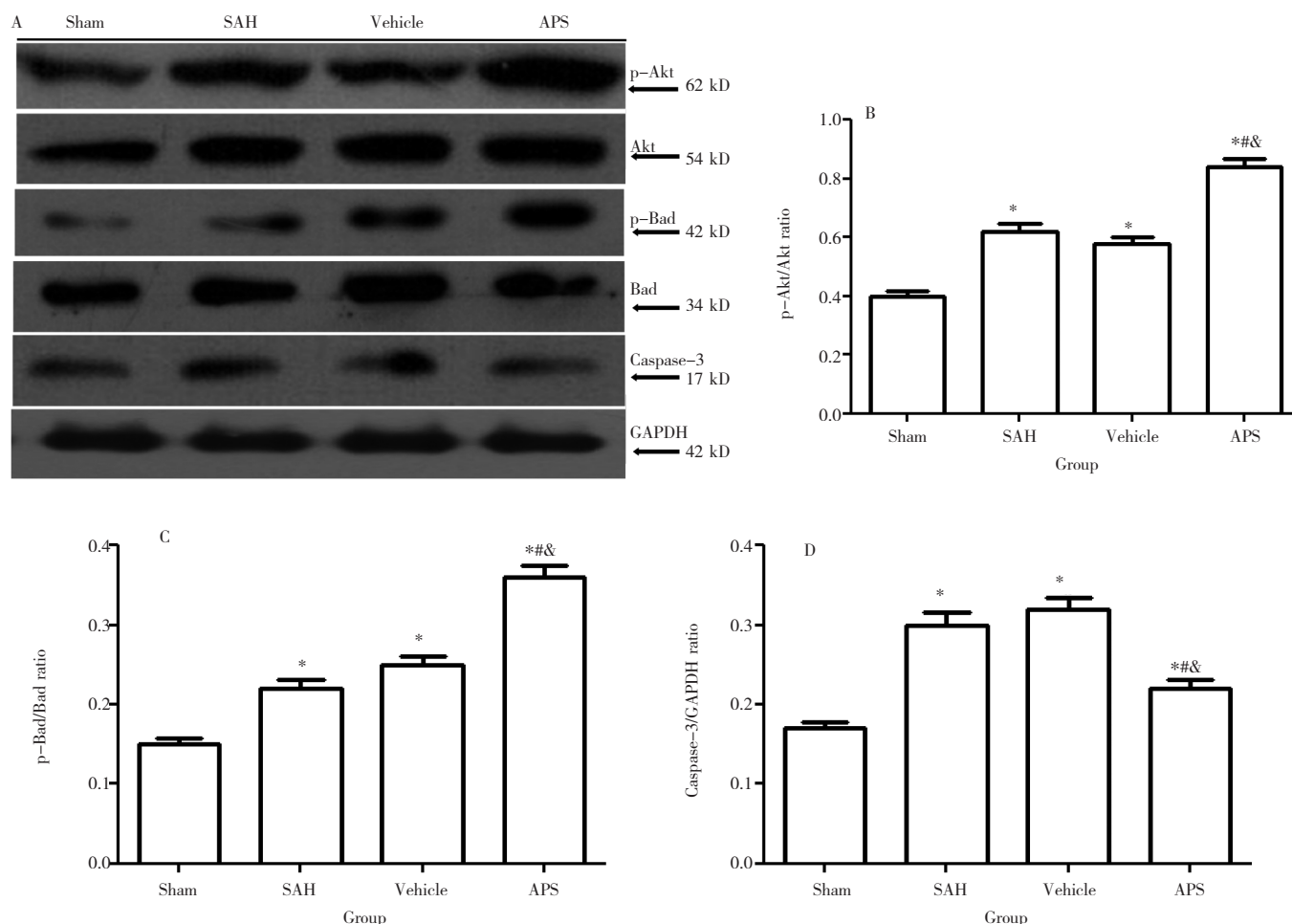
Western blot 分析结果显示, 与 Sham 组比较, SAH 组、Vehicle 组和 APS 组中 p-Akt、p-Bad 和 Caspase-3 的蛋白表达均显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中, APS 组的 p-Akt、p-Bad 蛋白表达较 SAH 组和 Vehicle 组均显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 Caspase-3 的蛋白表达则显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。



注: 与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 SAH 组比较, # $P < 0.05$; 与 Vehicle 组比较, & $P < 0.05$ 。

图4 免疫组织化学染色结果(400 ×)

Figure 4 The result of immunohistochemical staining(× 400)



注：与 Sham 组比较，* $P < 0.05$ ；与 SAH 组比较，# $P < 0.05$ ；与 Vehicle 组比较，& $P < 0.05$ 。A. 各组 p-Akt，p-Bad 和 Caspase-3 蛋白表达；B-D：p-Akt，p-Bad 和 caspase-3 的定量分析

图 5 Western blot 结果

Figure 5 The result of Western blot

3 讨论

在过去的几十年里，迟发性脑血管痉挛被认为是导致 SAH 后高死亡率的关键因素^[16]。然而，大量的临床实验发现抗血管扩张药物并不能改善 SAH 患者结局，这导致越来越多学者怀疑抗血管痉挛治疗的意义并探索新的 SAH 治疗路径^[17]。积累的证据表明，EBI 与 SAH 患者的预后密切相关。然而，关于 EBI 的确切发病机制仍不明确。研究^[18]证实，EBI 的病理机制涉及细胞凋亡。因此，靶向治疗 SAH 诱导的 EBI 对于改善 SAH 患者预后具有重要意义。在本研究中，我们评估了 APS 对 SAH 诱导的 EBI 的改善作用，结果发现 APS 可以抑制细胞凋亡，减轻脑水肿，最终减轻 SAH 后的神经功能缺损。在进一步的 TUNEL 免疫荧光染色和 Nissl 染色观察中，APS 组的 TUNEL 阳性细胞较 SAH 组和 Vehicle 组均显著减少，同时，正常神经元细胞数较 SAH 组和 Vehicle 组显著

增多，提示 APS 有助于保护 SAH 后神经元细胞损伤。

SAH 后神经元细胞凋亡对神经功能缺损产生重要影响。PI3K/Akt 通路作为信号转导途径在调节细胞凋亡中发挥重要作用。近年来，研究发现，PI3K/Akt 通路的激活是中风的治疗靶点^[19]。Akt 也称为 PKB，当其结构上的 Ser473 被磷酸化后能抑制促细胞凋亡蛋白质功能，同时，p-Bad 主要存在于胞浆中，抑制其促凋亡作用，降低 Caspase-3 的活性，进一步促进细胞存活^[8]。已有研究^[20-21]证实，在脑缺血、创伤性脑损伤、脊髓损伤和 SAH 后 p-Akt 的表达会增加，并且上调的 p-Akt 的表达可改善局部缺血，脊髓的神经元损伤等症状。本研究通过免疫组化和 Western blot 分析发现，SAH 组、Vehicle 组和 APS 组中 p-Akt、p-Bad 蛋白表达均较 Sham 组显著提高，并且 APS 组的 p-Akt、p-Bad 蛋白表达提高程度高于

SAH 组和 Vehicle 组,证实了 PI3K/Akt 途径在 SAH 建立后早期被激活,并且 APS 有助于促进 Akt 和 Bad 磷酸化,从而促进神经元细胞存活。

细胞死亡,尤其是凋亡,是 EBI 发生的重要机制^[6]。细胞凋亡级联为 SAH 后 EBI 的治疗提供了许多潜在机会。本研究中,我们主要关注胱天蛋白酶(Caspase)依赖性细胞凋亡途径。首先,Caspase 依赖途径是 SAH 后 EBI 发生的最重要细胞凋亡途径之一^[22]。其次,Caspase-3 是常见的凋亡介质,通过抑制其活化可以有效保护细胞,从而在 SAH 后 EBI 中提供神经血管保护。最后,Caspase-3 是 PI3K/Akt 信号通路的下游,多项研究发现,APS 具有抗 Caspase-3 活性^[23]。因此,本研究选择 Caspase-3 作为细胞凋亡的主要靶标,免疫组化和 Western blot 分析结果均显示,SAH 大鼠经 APS 治疗后 Caspase-3 蛋白表达较 SAH 组和 Vehicle 组显著降低,提示 APS 能有效抑制 Caspase-3 的活化,从而降低神经元细胞凋亡的发生。

然而,我们的研究仍然存在一些限制。首先,我们虽然证明了 APS 通过 Akt/Bad 通路参与 EBI 中的神经保护作用,但是,具体早期如何影响该通路尚不清楚。其次,我们不能排除 APS 的其他性质涉及其在 SAH 后 EBI 中的抗凋亡作用,例如:APS 可抑制谷氨酸释放,降低 NF- κ B 核转录因子活化,并抑制氧化损伤等。第三,其他在 PI3K 下游发挥作用的生存激素,如糖皮质激素诱导型激酶-1(SGK1),糖原合酶激酶-3(GSK3)和 Caspase-9 是否参与了 APS 的抗凋亡作用尚不清楚。最后,本研究中 APS 治疗只进行两次,对于多次和长期使用 APS 治疗在 SAH 后期是否有效尚不清楚。因此,我们将在进一步的研究中专注于解决上述问题。

参考文献:

- [1] Lucke-Wold B P, Logsdon A F, Branavan M, et al. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 497-512.
- [2] Cui Y, Duan X, Li H, et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Early Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(6): 3646-3657.
- [3] Helbok R, Schiefecker A J, Beer R, et al. Early brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a multimodal neuromonitoring study[J]. *Crit Care*, 2015, 19(1): 1-9.
- [4] Shao A, Wu H, Hong Y, et al. Hydrogen-Rich Saline Attenuated Subarachnoid Hemorrhage-Induced Early Brain Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Response: Possible Involvement of NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3462-3476.
- [5] Yuksel S, Tosun Y B, Cahill J, et al. Early brain injury following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: emphasis on cellular apoptosis[J]. *Turk Neurosurg*, 2012, 22(5): 529-533.
- [6] Zhang Z Y, Yang M F, Wang T, et al. Cysteamine alleviates early brain injury via reducing oxidative stress and apoptosis in a rat experimental subarachnoid hemorrhage model [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(4): 543-553.
- [7] Yin J, Li H, Meng C, et al. Inhibitory effects of Omega-3 fatty acids on Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage in Rats: possible involvement of G protein-coupled receptor 120/ β -arrestin2/TGF- β activated kinase-1 binding protein-1 signaling pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 75(16): 11-22.
- [8] Hami J, Kerachian M A, Karimi R, et al. Effects of streptozotocin-induced type 1 maternal diabetes on PI3K/AKT signaling pathway in the hippocampus of rat neonates[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2016, 36(3): 254-260.
- [9] McGuire V A, Gray A, Monk C E, et al. Cross talk between the Akt and p38 α pathways in macrophages downstream of Toll-like receptor signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(21): 4152-4165.
- [10] 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.
- [11] Zhao S, Fu J, Liu X, et al. Activation of Akt/GSK-3 β /beta-catenin signaling pathway is involved in survival of neurons after traumatic brain injury in rats[J]. *Neurol Res*, 2012, 34(4): 400-407.
- [12] Liu L, Shen J, Zhao C, et al. Dietary Astragalus polysaccharide alleviated immunological stress in broilers exposed to lipopolysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72: 624-632.
- [13] 向艳霞, 肖凌云, 张菊, 等. 黄芪多糖治疗神经系统疾病的作用及其机制研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(8): 687-691.
- [14] Feng D, Wang B, Ma Y, et al. The Ras/Raf/Erk Pathway Mediates the Subarachnoid Hemorrhage-Induced Apoptosis of Hippocampal Neurons Through Phosphorylation of p53[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 53(8): 1-12.
- [15] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 167(2): 327-334.
- [16] Chen S, Ma Q, Krafft P R, et al. P2X7 receptor antagonism inhibits p38 mitogen-activated protein kinase activation and ameliorates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(12): 466-474.
- [17] Zoerle T, Ilodigwe D, Wan H, et al. Pharmacologic Reduction of Angiographic Vasospasm in Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2013, 115: 247-251.
- [18] Caner B, Hou J, Altay O, et al. Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurochem*, 2012, 123(Supplement s2): 12-21.

- [19] Zhao H, Sapolsky R M, Steinberg G K. Phosphoinositide-3-kinase/ Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke[J]. Mol Neurobiol, 2006, 34(3): 249-270.
- [20] Shi T J, Huang P, Mulder J, et al. Expression of p-Akt in sensory neurons and spinal cord after peripheral nerve injury[J]. Neurosignals, 2009, 17(3): 203-212.
- [21] Chakrabarti M, Das A, Samantaray S, et al. Molecular mechanisms of estrogen for neuroprotection in spinal cord injury and traumatic brain injury[J]. Rev Neurosci, 2015, 27(3): 271-281.
- [22] Cahill J, Calvert J W, Zhang J H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(11): 1341-1353.
- [23] 罗成, 沈娜. 黄芪多糖对 CLP 诱导的脓毒症小鼠急性肝损伤 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响研究[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 23(11): 1641-1646.

(编辑: 宋威)