

甘氨酸改善缺氧性 MDCK 细胞损伤的作用依赖于 ERK1/2、Akt 及 p38MAPK 信号通路

秦霞^{1,2}, 蒋莉², 张咏梅¹, 陈琪^{2*}

(¹徐州医学院麻醉生理学教研室, 江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221004; ²南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**建立犬肾细胞(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞缺氧模型,进一步阐明甘氨酸对缺氧细胞增殖活性的影响及其作用机制。**方法:**将 MDCK 细胞置于体积分数为 95% N₂ 和 5% CO₂ 的有机玻璃调节性密闭容器中,分别培养 24、36、48、72 或 84 h,用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测甘氨酸对缺氧性损伤 MDCK 细胞增殖活性的影响。将 MDCK 细胞分为正常组、缺氧组和甘氨酸处理组,加药后孵育 1、2 或 3 h 后,收集细胞总蛋白,用 Western blot 检测细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, ERK1/2)、p38MAPK 和 Akt 的磷酸化活性。**结果:**在所观察的所有缺氧时段内,MDCK 细胞 MTT 活性均较正常对照组明显下降($P < 0.01$)。加入甘氨酸后,缺氧 24、36 或 48 h 后细胞的增殖能力比缺氧组有明显增强,差异有统计学意义。在缺氧 72 或 84 h 后,甘氨酸未能显示明显的保护作用。缺氧时 ERK1/2 和 Akt 的磷酸化活性明显降低,p38MAPK 的磷酸化活性明显增高。将甘氨酸加入到缺氧细胞中,ERK1/2 和 Akt 又重新被激活,p38MAPK 被抑制。**结论:**甘氨酸可保护 MDCK 细胞免于早期缺氧性损伤,该作用可能通过激活 ERK1/2 和 Akt,抑制 p38MAPK 而实现。

[关键词] MDCK 细胞; 缺氧; 甘氨酸; 信号转导

[中图分类号] R329.26.63

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1337-06

ERK, Akt and p38MAPK are involved in the cytoprotective effect of glycine on hypoxic impair in MDCK cells

QIN Xia^{1,2}, JIANG Li², ZHANG Yong-mei¹, CHEN Qi^{2*}

(¹Department of Anesthesia Physiology, Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004; ²Atherosclerosis Research Center, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of glycine on hypoxic impair in cells. **Methods:** MDCK cells were cultured in a modular incubator chamber full of 95% N₂ and 5% CO₂ in the presence or absence of glycine for 24 h, 36 h, 48 h, 72 h and 84 h. We observed the effects of glycine on cellular proliferation under hypoxic conditions by MTT method. Western blot was used to detect the phosphorylation activities of ERK1/2, p38MAPK and Akt in cells. **Results:** The proliferation of MDCK cells cultured under hypoxic conditions decreased significantly, while the proliferation increased after glycine treatment. Protective effect of glycine on cells was found at 24 h, 36 h and 48 h of hypoxia. Activation of p38MAPK and depression of ERK1/2 and Akt in MDCK cells were detected when oxygen was deprived. Treatment with glycine antagonized the hypoxia-induced phosphorylative changes in ERK1/2, Akt and p38MAPK. **Conclusion:** Glycine could protect MDCK cells from early hypoxic injury. Activation of ERK1/2 and Akt but suppression of p38MAPK may contribute to the cytoprotective mechanisms of glycine on hypoxic impair in MDCK cells.

[Key words] MDCK cell; hypoxia; glycine; signal transduction

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1337-1342]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070120); 江苏省高校自然科学研究面上项目(12KJD320005)

*通讯作者, E-mail: qichen@njmu.edu.cn

临床上因任何原因造成人体供血不畅而血液供应减少,或因回流受阻,回心血量下降,均可能引起人体缺血性疾病的发生。缺血性疾病包括冠心病、缺血性脑卒中和周围动脉闭塞性疾病(peripheral arte-

rial occlusive disease, PAOD)。心脑血管疾病已经成为危害人类健康的第一大杀手。据统计,我国每年新发生的心脑血管疾病患者达180~200万人,死亡人数约100万。甘氨酸(glycine, Gly)是天然结构最简单的氨基酸,作为非必需氨基酸参与蛋白质的代谢。在中枢神经系统内,甘氨酸可与突触后膜甘氨酸受体结合,发挥抑制性神经递质的作用。甘氨酸对能量代谢障碍的细胞具有明显的保护作用,可以增强细胞对能量缺乏的耐受能力,从而增加细胞的存活机会^[1-3]。而甘氨酸对缺氧性损伤犬肾细胞(Madin-Darby canine kidney, MDCK)是否有保护作用及其具体机制尚不清楚。本研究观察了甘氨酸对缺氧性细胞损害的作用,并对其可能机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

MDCK(ATCC公司,美国);胰酶,Gly(Sigma公司,美国);DMEM培养基(Gibco公司,美国);新生牛血清(杭州四季青公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma公司,美国);超净工作台(苏州净化设备厂);恒温CO₂培养箱(Heraeus);显微镜(Olympus公司,日本);超纯水系统(Pall Lifescience Lab);混合气体(南京市三乐公司);RPMI 1640无糖培养基(Sigma公司,美国);Anti-phospho-ERK1/2抗体、Anti-ERK1/2抗体、Anti-phospho-p38MAPK抗体、Anti-p38MAPK抗体、Anti-phospho-Akt抗体、Anti-Akt抗体(Cell Signaling Technology公司,美国),Electrochemiluminescence(ECL, Amersham Biosciences公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和传代

MDCK细胞接种于含10%小牛血清DMEM培养基,37℃、5% CO₂培养箱中生长,至对数生长期用于实验。当细胞生长至融合度约90%时进行传代,用Dhank's液洗2遍,以0.25%胰酶加0.1% EDTA(w/v)混合液覆盖细胞表面,37℃作用1~2 min,用倒置显微镜观察,可见细胞收缩边缘清晰时,弃去消化液。将细胞置于37℃待细胞充分消化,加入10%小牛血清DMEM培养液终止消化,用滴管吹打瓶壁上的细胞制成单细胞悬液,接种到新的细胞瓶中培养。

1.2.2 制作缺氧模型

实验分为正常组、缺氧组和Gly处理组。调节性密闭容器有进气孔和出气孔。MDCK细胞以 6×10^5

个/孔接种于6 cm细胞板,生长24 h后置于容器中,通入5% CO₂,95% N₂,待容器中空气排尽后,封闭进气孔、出气孔,形成密闭装置,置于37℃、5% CO₂培养箱,向缺氧细胞中立即加入5 mmol/L Gly即为Gly处理组,缺氧或Gly处理24、36、48、72、84 h后取出。

1.2.3 MTT检测细胞的活力

MDCK细胞以 1×10^4 个/孔接种于96孔板,37℃、5% CO₂培养箱中生长24 h。细胞缺氧特定的时间后,每孔200 μl培养液中加入MTT工作液25 μl(用pH7.4的无血清培养液配成5 mg/ml,现配现用),37℃孵育4 h,镜下可见蓝紫色针状结晶。弃上清液,每孔加200 μl二甲基亚砜(DMSO)。CliniBio-128酶标仪于波长492 nm处读取光密度值*D*(492 nm)。在细胞缺氧不同时相检测*D*(492 nm)以反应细胞线粒体酶活性。

1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)

收集正常对照组、缺氧组细胞总蛋白,将蛋白煮沸5 min使其变性,取处理后的相同蛋白量(60 μg)的样品经10%SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离后,以湿转法电转至PVDF膜上,电转条件为恒流0.3 A,100 min;转移完毕后,5%脱脂奶粉室温封闭2 h;封闭后,加入用封闭液稀释的一抗(1:1 000)4℃孵育过夜;TBST洗膜3次,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔IgG)室温孵育2 h,洗膜后加ECL化学发光液用数字化多功能成像系统曝片,Image J软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS13.0软件进行统计学处理,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

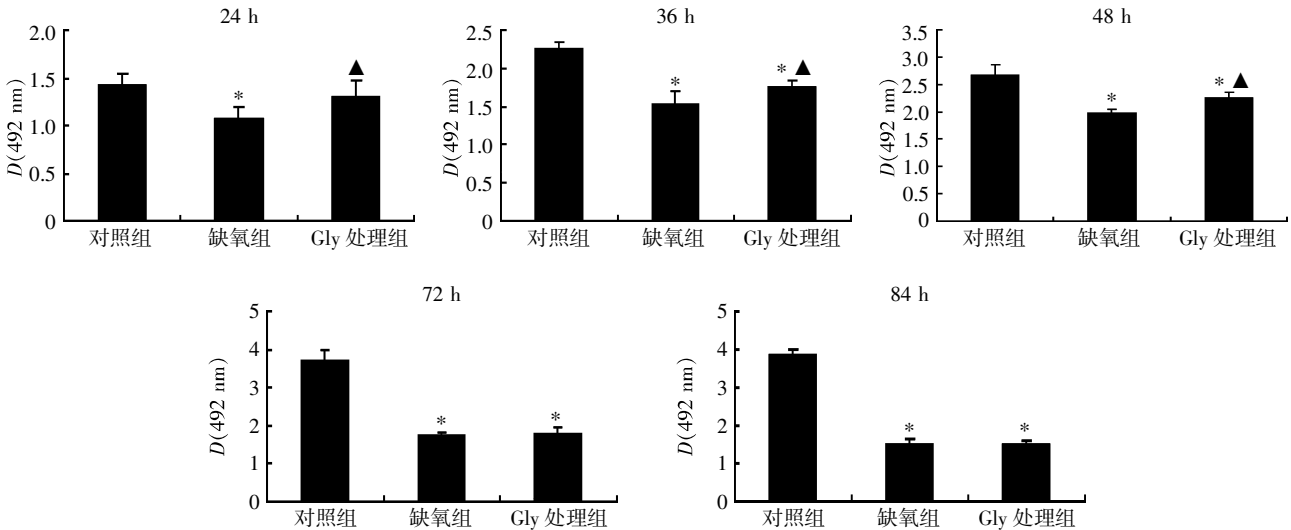
2 结果

2.1 Gly对缺氧MDCK细胞增殖活性影响

MDCK细胞缺氧24、36、48、72或84 h后,细胞*D*(492 nm)分别为正常对照组的(79.7 ± 6.9)%、(71.0 ± 7.7)%、(71.0 ± 7.7)%、(47.6 ± 1.1)%、(39.1 ± 3.2)%,在观察的所有缺氧时段内,MDCK细胞均较正常对照组明显下降($P < 0.05$)。Gly处理组细胞缺氧24、36、48、72或84 h后*D*(492 nm)分别为正常对照组的(90.2 ± 6.9)%、(81.9 ± 3.6)%、(84.4 ± 3.6)%、(47.9 ± 4.8)%、(39.0 ± 2.6)%,与正常对照组相比,*D*(492 nm)24 h时无明显差异($P > 0.05$),36、48、72或84 h时有明显差异,差异具有统计学

意义($P < 0.05$)。缺氧 MDCK 加入 Gly 后,缺氧 24、36、或 48 h 后细胞的 $D(492 \text{ nm})$ 比缺氧组有明显增

强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在缺氧 72 或 84 h 后,Gly 未能显示明显的保护作用($P > 0.05$,图 1)。



MDCK 细胞缺氧过程中,MTT 测定细胞线粒体活性。与对照组相比,* $P < 0.05$;与缺氧组相比,▲ $P < 0.05(\bar{x} \pm s, n = 5)$ 。

图 1 MTT 实验检测缺氧细胞增殖活性

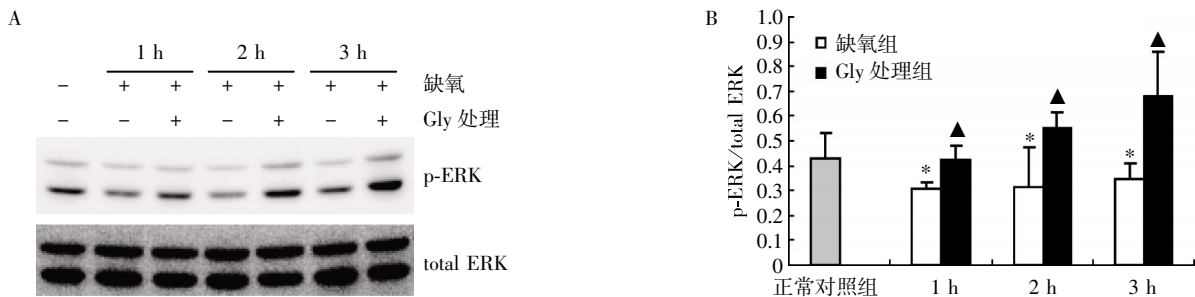
Figure 1 MTT assay to detect cell proliferation during hypoxia

2.2 Gly 细胞保护作用的信号转导途径

在 MDCK 细胞缺氧 1、2 或 3 h 时收集细胞总蛋白,Western blot 检测各个时间点磷酸化蛋白活化和总蛋白的表达情况。Western blot 显示缺氧组与正常对照组相比,ERK1/2 的磷酸化水平降低,Gly 处理组与缺氧组相比,在各个时段 ERK1/2 磷酸化活性均增强,ERK1/2 总蛋白各组之间无明显差异($P > 0.05$,图 2A)。Image J 灰度测量,计算磷酸化蛋白与总蛋白之比值,统计分析显示缺氧组与正常对照组、Gly 处理组与缺氧组相比有显著差

异,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2B)。

Western blot 显示缺氧组与正常对照组相比,Akt 磷酸化水平降低,Gly 处理组与缺氧组相比,1、2 h 两个时间点 Akt 磷酸化活性增强,随着时间的延长,3 h 时 Gly 处理组与缺氧组 Akt 磷酸化活性又无明显差异,Akt 总蛋白各组之间无明显差异 ($P > 0.05$,图 3A)。Image J 灰度测量,计算磷酸化蛋白与总蛋白之比值,统计分析显示缺氧组与正常对照组、Gly 处理组与缺氧组相比有显著差异,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 3B)。



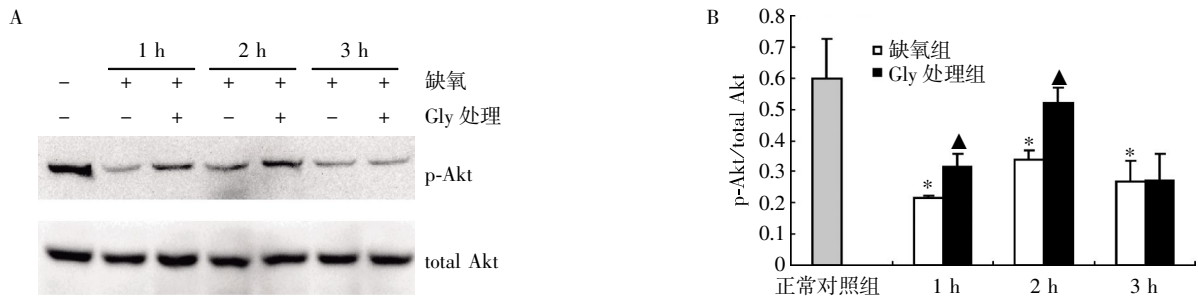
A:Western blot 结果;B:灰度分析蛋白表达结果;与正常对照组相比,* $P < 0.05$;与缺氧组相比,▲ $P < 0.05$ 。

图 2 ERK1/2 磷酸化活性变化

Figure 2 The changes of ERK1/2 phosphorylation

Western blot 显示缺氧组与正常组相比,2 h 时缺氧组可明显增加 p38MAPK 的磷酸化活性。Gly 处理组与缺氧组相比,在各个时段 p38MAPK 磷酸化活性均减弱,3 h 时 p38MAPK 的磷酸化活性几乎消

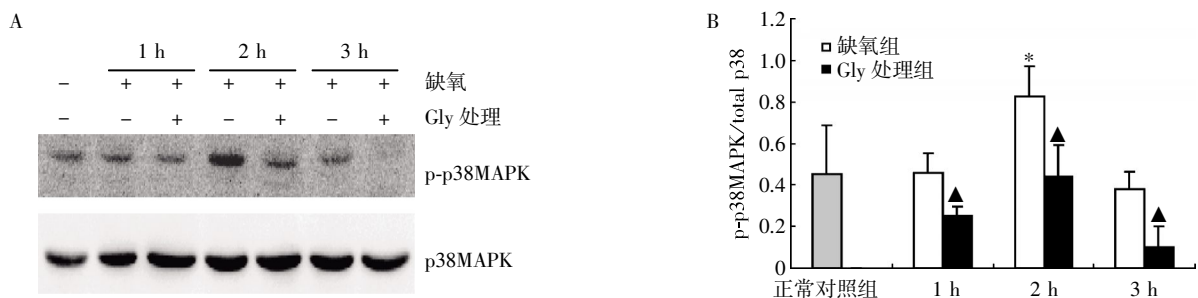
失。p38MAPK 总蛋白各组之间无明显差异 (图 4A)。Image J 灰度测量,计算磷酸化蛋白与总蛋白之比值,统计分析显示 Gly 处理组与缺氧组相比有显著差异,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 4B)。



A: Western blot 结果; B: 灰度分析蛋白表达结果; 与正常对照组相比, * $P < 0.05$; 与缺氧组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

图 3 Akt 磷酸化活性变化

Figure 3 The changes of Akt phosphorylation



A: Western blot 结果; B: 灰度分析蛋白表达结果; 与正常对照组相比, * $P < 0.05$; 与缺氧组相比, [▲] $P < 0.05$ 。

图 4 p38MAPK 磷酸化活性变化

Figure 4 The changes of p38 phosphorylation

3 讨论

缺氧是指当组织和细胞得不到充足的氧,或用氧障碍不能充分利用氧时,组织和细胞的代谢、功能,甚至形态结构都可能发生异常变化的病理过程。氧缺乏所诱导的细胞损伤涉及细胞钙代谢紊乱,细胞骨架崩解,自由基的产生,细胞形态和单价阴离子稳态紊乱^[4]。本研究发现,MDCK 细胞缺氧 24、36、48、72 或 84 h 后,细胞 $D(492 \text{ nm})$ 值分别为正常对照组的 $(79.7 \pm 6.9)\%$ 、 $(71.0 \pm 7.7)\%$ 、 $(71.0 \pm 7.7)\%$ 、 $(47.6 \pm 1.1)\%$ 、 $(39.1 \pm 3.2)\%$, 缺氧组与正常对照组相比有明显差异,差异具有统计学意义。说明达到缺氧效果,本文成功建立一种操作简便、有效的细胞缺氧模型。Gly 处理组细胞缺氧 24、36、48、72 或 84 h 后 $D(492 \text{ nm})$ 值分别为正常对照组的 $(90.2 \pm 6.9)\%$ 、 $(81.9 \pm 3.6)\%$ 、 $(84.4 \pm 3.6)\%$ 、 $(47.9 \pm 4.8)\%$ 、 $(39.0 \pm 2.6)\%$, Gly 保护组与正常对照组相比,细胞的 $D(492 \text{ nm})$ 值 24 h 时无明显差异,36、48、72、84 h 时有明显差异,差异具有统计学意义。在 MDCK 细胞缺氧早期,细胞钙代谢紊乱,细胞骨架崩解,自由基的产生,细胞形态和单价阴离子稳态紊乱等细胞损伤较轻微,由于 Gly 的保护作用,缺氧损伤的细胞基本能恢复到正常状态,而随着时

间延长,缺氧性损伤越来越严重,Gly 的保护作用已不能将缺氧性损伤细胞的增殖活性恢复到正常状态。甘氨酸处理组与缺氧组相比,细胞的 $D(492 \text{ nm})$ 值 24、36、48 h 时有明显差异,差异具有统计学意义,而在 72、84 h 时无明显差异。24、36、48 h Gly 对缺氧 MDCK 细胞有保护作用,而在 72、84 h 这种保护作用消失。本文用“死亡通道”假说来解释此现象。假说认为,在细胞缺氧初期,先是小分子阴离子进入细胞增加,继而允许小分子阳离子漏过细胞膜。此时由于细胞内晶体渗透压升高,细胞肿胀、出泡,但细胞膜仍保持完整,细胞的功能及生物活性并未出现严重损伤。只有当缺氧持续到一定时间后,细胞膜允许大分子物质通过,细胞膜才会迅速崩解。Nishimura^[5]认为当细胞损伤达到一定程度后,细胞膜上 Gly 敏感的“死亡通道”开放,细胞膜迅速崩解,一旦这些通道开放,则 Gly 不再具有保护作用。在细胞缺氧初期,Gly 可保护细胞免于缺氧性损伤,而晚期缺氧造成的损伤达到一定程度形成不可逆损伤后,Gly 对于缺氧性损伤细胞则不再有保护作用。前期研究表明 Gly 受体 (glycine receptor, GlyR) 介导 Gly 对 ATP 耗竭细胞的保护作用,增强细胞对 ATP 耗竭的耐受能力,增加细胞的存活几率^[3]。Gly 不仅对 ATP 耗竭细胞有保护作用,还可保护 MDCK 细胞

免于早期缺氧性损伤。

为了进一步研究 Gly 保护缺氧性损伤细胞的作用机制,本研究检测丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 家族中 ERK1/2、p38MAPK 的磷酸化活性。MAPKs 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是公认的与细胞增殖、分化或凋亡调控密切相关的细胞内信号转导酶类^[6]。到目前为止,在哺乳类动物细胞中,已经发现 MAPKs 家族具有 ERK1-2 (extracellular signal-regulated kinases)、JNKs/SAPKs (c-Jun NH2-terminal kinases/stress-activated protein kinases)、p38MAPK、ERK3/ERK4 和 ERK5 等不同亚类^[7]。MAPKs 调节细胞增殖、分化、凋亡及压力应激反应等多种过程。由不同刺激引起,MAPKs 可磷酸化转录因子、细胞骨架蛋白、激酶,参与基因表达、代谢、细胞分裂及细胞存活等过程。ERK 作为 MAPKs 家族的一个重要亚族,ERK1 和 ERK2 是其中的两个重要成员。ERK 可被各种生长因子等有丝分裂原激活,进入细胞核作用于转录因子,促进某些基因的转录与表达,以及促进细胞增殖、分化、迁移、侵袭,抑制细胞凋亡^[8]。p38MAPK 是最有特征性的压力诱导激酶。激活的 p38MAPK 可磷酸化几种靶分子,引起凋亡性细胞死亡^[9-10], p38MAPK 激活也可诱导细胞坏死^[11]。文献报道,氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)的新生大鼠海马脑片 p38MAPK 被激活^[12]; 脑缺血缺氧引起 ERK1/2、p38MAPK 及 JNK 表达上调^[13]。神经组细胞(NPS)缺氧诱导 ERK1/2 和 JNK 激活^[14]。Zhang 等^[2]报道 Gly 对 ATP 耗竭 PC12 细胞保护作用是由 GlyR 介导的,而 GlyR 的氯离子通道特性并不是必不可少的。去除细胞外氯离子不能影响 ATP 耗竭性细胞损伤及 Gly 的保护作用。Selin 等^[15]在体实验研究显示, Gly 可能通过稳定脑线粒体能量来保护脑缺血大鼠;离体实验表明, Gly 可减少脑线粒体磷酸化紊乱及 H₂O₂ 的产生。课题组以往研究表明, Gly 与 GlyR 结合以后,通过增加 ERK1/2-Elk1 (Ets-like transcription factor-1)、Akt-Foxo1 (Forkhead box O-class 1)的磷酸化活性;同时抑制 p38MAPK 的磷酸化活性,从而发挥其对 ATP 耗竭细胞的保护作用^[16]。本研究发现,缺氧时 ERK1/2 的磷酸化活性降低, p38MAPK 的磷酸化活性增高。将 Gly 加入到缺氧细胞中, ERK1/2 又重新被激活, p38MAPK 被抑制。Pal 等^[17]报道, Gly 可通过清除活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和其抗氧化活性来保护肝细胞免于氧化应激损伤。Gly 可抑制汞诱导的肝细

胞凋亡,这种抗凋亡作用是通过下调 p38MAPK、JNK、ERK 及 NF- κ B 来实现。Kim 等^[18]报道 anthocyanins 可通过抑制凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulating kinase, ASK1)-JNK/p38 途径,清除 ROS,增加血红素氧合酶(heme oxygenase, HO-1)基因表达发挥其神经保护作用。

Akt 也称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是 PI3K 介导细胞存活中的关键调节因子。激活 Akt 足以阻断由多种刺激而引起的细胞死亡^[19-20]。但是 Akt 是否促进缺血后细胞存活尚无定论^[21]。研究结果显示,缺氧引起 Akt 磷酸化水平降低, Gly 阻止这种磷酸化活性降低。Gly 增加缺氧细胞 Akt 磷酸化活性出现在缺氧 1、2 h,且在缺氧 2 h 时更明显,而随着时间的延长,至缺氧 3 h 时这种作用消失。本研究在缺氧模型证实 Gly 是通过增加 ERK1/2、Akt 的磷酸化活性;同时抑制 p38MAPK 的磷酸化活性,从而发挥其对缺氧性损伤细胞的保护作用。Shen 等^[22]在 HEK293 细胞及肾小球系膜细胞证实 cAMP 可通过 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-PKB-mitogen-activated protein kinase (MEK)-ERK1/2 途径激活 TR-PC6 (transient receptor potential channel 6)。RAS/RAF/MEK/ERK 和 PI3K/AKT/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径由复杂的反馈和交互对话机制调控^[23]。

综上所述,甘氨酸可保护 MDCK 细胞免于早期缺氧性损伤,该作用可能通过激活 ERK1/2 和 Akt,抑制 p38MAPK 而实现。当然,还需在体实验进一步证实。

[参考文献]

- [1] Qu W, Ikejima K, Zhong Z, et al. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(6): G1249-G1256
- [2] Zhang K, Weinberg JM, Venkatachalam MA, et al. Glycine protection of PC-12 cells against injury by ATP-depletion [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(6): 893-901
- [3] Pan C, Bai X, Fan L, et al. Cytoprotection by glycine against ATP-depletion-induced injury is mediated by glycine receptor in renal cells [J]. *Biochem J*, 2005, 390(2): 447-453
- [4] Trump BF, Berezsky IK. The role of calcium in cell injury and repair; a hypothesis [J]. *Surv Synth Pathol Res*, 1985, 4(3): 248-256
- [5] Nishimura Y, Lemasters JJ. Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia [J]. *Cell Death and Dif-*

- ferentiation, 2001, 8(8): 850-880
- [6] Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(3): 218-226
- [7] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83
- [8] 潘伟东, 王东军. ERK1/2 研究进展及其与神经胶质瘤相关性 [J]. *海南医学*, 2011, 22(22): 121-124
- [9] Gougeon ML, Piacentini M. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 501-508
- [10] Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions; cell cycle checkpoints and survival [J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(1): 44-51
- [11] Warny M, Keates AC, Keates S, et al. p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8): 1147-1156
- [12] Lu Q, Rau TF, Harris V, et al. Increased p38 mitogen-activated protein kinase signaling is involved in the oxidative stress associated with oxygen and glucose deprivation in neonatal hippocampal slice cultures [J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 34(7): 1093-1101
- [13] Armstead WM, Riley J, Cines DB, et al. tPA contributes to impairment of ATP and Ca sensitive K channel mediated cerebrovasodilation after hypoxia/ischemia through upregulation of ERK MAPK [J]. *Brain Res*, 2011, 1376: 88-93
- [14] Zhao L, Jiao Q, Chen X, et al. mGluR5 is involved in proliferation of rat neural progenitor cells exposed to hypoxia with activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *J Neuroscience Res*, 2012, 90(2): 447-460
- [15] Selin AA, Lobysheva NV, Vorontsova ON. Mechanism underlying the protective effect of glycine in energetic disturbances in brain tissues under hypoxic conditions [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2012, 153(1): 44-47
- [16] Jiang L, Qin X, Zhong X, et al. Glycine-induced cytoprotection is mediated by ERK1/2 and AKT in renal cells with ATP depletion [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(4): 333-340
- [17] Pal PB, Pal S, Das J, et al. Modulation of mercury-induced mitochondria-dependent apoptosis by glycine in hepatocytes [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(5): 1669-1683
- [18] Kim SM, Chung MJ, Ha TJ. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids [J]. *Life Sci*, 2012, 90(21-22): 874-882
- [19] Song J, Teng X, Cai Y, et al. Activation of Akt/GSK-3 β signaling pathway is involved in intermedin1-53 protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(9): 1061-1069
- [20] Bellis A, Castaldo D, Trimarco V, et al. Cross-Talk between PKA and Akt protects endothelial cells from apoptosis in the late ischemic preconditioning [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(8): 1207-1212
- [21] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, et al. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1): 152-162
- [22] Shen B, Kwan HY, Ma X, et al. cAMP activates TRPC6 channels via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB)-mitogen-activated protein kinase (MEK)-ERK1/2 signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(22): 19439-19445
- [23] De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways; role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(Suppl 2): S17-27

[收稿日期] 2012-04-29