

缺血再灌注损伤时 iNOS 通过激活 BAD 诱发脊髓神经元凋亡

黄瑶^{1,2}, 李益明¹, 凡进¹, 李青青¹, 殷国勇^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029; ²南京江北人民医院骨科, 江苏 南京 210048)

[摘要] 目的:探讨大鼠脊髓缺血再灌注损伤过程中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)调控脊髓神经元凋亡的具体机制。方法:42只SD大鼠随机分为假手术组(A组,6只)、缺血再灌注组(B组,18只)和iNOS抑制组(C组,18只)。A组动物麻醉后仅腹腔切开,B组及C组采用腹主动脉阻断法(夹闭腹主动脉1h后松开,再灌注6、12、24h)建立脊髓缺血再灌注损伤模型。手术后,A组及B组动物按5ml/kg腹腔注射5%二甲亚砷,C组动物按150mg/kg腹腔注射同等量氨基胍。Tarlov运动功能评分法评估三组大鼠的后肢运动功能。取腰段脊髓组织,透射电镜观察脊髓神经细胞形态学变化,神经元特异性抗体NeuN免疫荧光计算各组脊髓组织中存活神经元数目,Western blot检测iNOS、Bcl-xL/Bcl-2相关死亡启动因子(Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter,BAD)、磷酸化BAD(p-BAD)、14-3-3及细胞色素C的表达,免疫共沉淀检测BAD与14-3-3的结合状态。结果:Tarlov运动功能评分显示A组大鼠后肢运动功能无损害,B组和C组大鼠后肢功能明显损害,但C组大鼠后肢功能好于B组($P < 0.05$)。NeuN免疫荧光结果显示B组和C组大鼠脊髓神经元数目明显减少,但C组大鼠脊髓神经元数目多于B组($P < 0.05$)。电镜结果示B组及C组中脊髓组织均有明显凋亡现象,但C组大鼠凋亡程度较轻。Western blot结果表明iNOS和细胞色素C表达量在B组及C组中随再灌注时间延长而增加,但相同再灌注时间C组表达强度明显弱于B组($P < 0.05$);p-BAD表达量则随着灌注时间延长而下降,但C组中下降程度明显小于B组($P < 0.05$)。免疫共沉淀结果表明:BAD与14-3-3结合力随着再灌注时间的延长在B组和C组中逐渐降低,但是C组程度更慢($P < 0.05$)。结论:脊髓缺血再灌注过程中,iNOS通过促进p-BAD去磷酸化,降低BAD与14-3-3的结合力,进而诱发脊髓神经元的凋亡。

[关键词] 缺血再灌注损伤;脊髓;诱导型一氧化氮合酶;Bcl-xL/Bcl-2相关死亡启动因子

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1173-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20130901

iNOS induces apoptosis via p-BAD dephosphorylation during spinal cord ischemia-reperfusion injury

Huang Yao^{1,2}, Li Yimin¹, Fan Jin¹, Li Qingqing¹, Yin Guoyong^{1*}

(¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Orthopedics, Nanjing Jiangbei People's Hospital, Nanjing 210048, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of iNOS in ischemia-reperfusion injury of rat spinal cord. **Methods:** Forty-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into three different groups: Sham-operated group ($n = 6$), ischemia-reperfusion group (I/R, $n = 18$), and iNOS inhibitor group (I/R + AG, $n = 18$). In sham-operated group, peritoneotomy was performed without abdominal aortic cross-clamping (AACC), however, rats in I/R group and iNOS inhibitor group experienced 1 h AACC followed by 6 h, 12 h, 24 h reperfusion, respectively. After operation, rats in sham-operated and I/R group received an intraperitoneal injection of the carrier solutions (5 ml/kg of 5% DMSO), while rats in iNOS inhibitor groups received the treatment of AG at the dose of 150 mg/kg (i.p.). We examined the neurological motor function using 'Tarlov's score' at 6 h, 12 h and 24 h, alterations of spinal cord neurons morphologically by transmission electron microscopy (TEM). Immunofluorescent staining with anti-NeuN, a specific marker for neurons, was performed to observe the number of surviving neurons in different conditions. The level of iNOS, BAD, p-BAD, 14-3-3, and cytochrome C were detected by Western blot; the interaction of BAD and 14-3-3 was determined by coimmunoprecipitation analysis. **Results:** ①The motor functions of the hind limbs of the sham-operated rats were normal. Rats in ischemia-reperfusion group were observed with significant reduce on hind limb movements ($P < 0.05$) in every reperfusion time compared to those in inhibitor

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81071481)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoyong_yin2005nanjing@yahoo.com

group. ②The number of NeuN-positive cells (surviving neurons) in I/R group and iNOS inhibitor group was less than that in sham-operated group, while the number in iNOS inhibitor group was more than that in I/R group ($P < 0.05$). ③In the sham-operated group, no apoptotic neuron was noted. In ischemia-reperfusion group and iNOS inhibitor group, numerous apoptotic neurons could be detected. However the severity of apoptotic neuron in inhibitor group was less than that in I/R group. ④In the sham-operated group, iNOS was hardly detected at an extremely low level and was increased in a time-dependent manner in I/R group and iNOS inhibitor group, but the expression of iNOS in iNOS inhibitor group was lower than that in I/R group at each reperfusion time (6 h, 12 h, 24 h) ($P < 0.05$). Simultaneously, the change of cytochrome C was the same as the iNOS expression mode. In addition, the expression of p-BAD started to decrease at 6 h and decrease remarkably at 12 h, 24 h in I/R group and iNOS inhibitor group, but the extent of decrease of p-BAD expression in iNOS inhibitor group was lower than that in I/R group ($P < 0.05$). ⑤In I/R group, the level of p-BAD/14-3-3 dimerization began to decrease since the reperfusion process started. However in the iNOS inhibitor group, the trend was alleviated by AG treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** iNOS inducing apoptosis of neurons in spinal cord ischemia-reperfusion injury is involved in dephosphorylating BAD, and it can lessen spinal neurons apoptosis by inhibiting the activity of iNOS.

[Key words] ischemia-reperfusion injury; spinal cord; iNOS; BAD

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1173-1179]

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII) 是脊柱外科临床常见的严重并发症^[1]。作为脊髓原发性损害后的继发性损害, 缺血再灌注损伤可引起脊髓神经元一系列的病理生理学改变, 包括兴奋性氨基酸的变化、自由基的产生、炎症以及凋亡的发生^[2]。近年来作为中枢神经系统的信使递质^[3], 一氧化氮(NO)在缺血再灌注损伤过程的效应引起了广泛关注。一氧化氮合酶(NOS)是NO合成的限速酶, 是调节NO的重要因素。NOS广义上可分为两大类, 即原生型NOS(constitutive NOS, cNOS)和诱生型NOS(inducible NOS, iNOS)。在缺血再灌注损伤中, Hamada等^[4]学者报道, 由cNOS产生的NO主要起神经保护作用, 而由iNOS产生的NO主要参与了损害过程。但是, 由iNOS产生的NO在脊髓缺血再灌注损伤过程中所导致损害的具体机制还未被阐明。

Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡启动因子(Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter, BAD) 隶属于Bcl-2家族促凋亡蛋白分支, 是含有BH3结构域的凋亡前体蛋白^[5]。BAD可根据外界环境的变化迅速调节自身的磷酸化状态, 从而改变细胞的生存状态。作为与磷酸化丝氨酸/磷酸化苏氨酸结合的蛋白家族的一员, 14-3-3参与了包括增殖和分化在内的许多细胞变化, 正常生理情况下, 14-3-3与p-BAD结合在一起, 抑制了BAD的活性。本课题组前期研究表明, BAD是脊髓缺血再灌注损伤过程中重要调节蛋白^[6]。iNOS特异性抑制剂氨基胍(aminoguanidine, AG)是一种可溶于水的小分子复合物, 主要用于预防糖尿病等慢性疾病。本研究通过构建脊髓缺血再

灌注损伤模型及应用AG, 研究了iNOS对BAD活性的影响, 旨在初步阐明iNOS调节脊髓神经元凋亡的具体机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级SD大鼠42只, 300~350g, 南京医科大学动物中心提供, 雌雄不限。二甲亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS, 南通碧云天生物技术研究所在所)。全蛋白提取试剂盒(包括Lysis Buffer、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和PMSF, 凯基生物公司)。小鼠抗大鼠iNOS(Abcam公司, 美国), 兔抗大鼠BAD、山羊抗大鼠细胞色素C(Cyto C, Calbiochem公司, 美国), 兔抗大鼠p-BAD(Ser136, Santa Cruz公司, 美国), 山羊抗大鼠14-3-3(Lab Vision公司, 美国), GAPDH(KANGCHEN公司, 美国), Western blot发光试剂盒(Thermo Scientific Pierce公司, 美国), 兔抗大鼠NeuN(Millipore公司, 美国), 免疫共沉淀用Protein G/Protein A agarose beads (Santa Cruz公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

实验动物随机分为3组: 假手术组(A组)6只, 缺血0h/再灌注0h; 缺血再灌注组(B组)18只, 缺血时间均为1h, 再灌注时间分别为6、12和24h共3个时间点, 每个时间点6只; iNOS抑制剂组(C组)18只, 具体分组同B组。腹腔注射戊巴比妥50mg/kg麻醉大鼠, 采用经典Zivin法^[7]建立大鼠脊髓缺血再灌注模型。将实验动物仰卧位摆放, 取正中切口。A组仅切开腹腔后缝合。B组和C组在无菌条件下进

入腹腔找到腹主动脉,在左肾动脉下端以动脉夹完全夹闭腹主动脉,完全阻断血流 1 h 后松开动脉夹,关闭腹腔再灌注至预定时间。手术后,A 组及 B 组动物按 5 ml/kg 腹腔注射溶解于 PBS 的 5% 二甲基亚砜(DMSO),C 组动物按 150 mg/kg 腹腔注射同等量的 AG^[8]。

1.2.2 实验动物运动功能评价

采用 Tarlov 运动功能评分^[9],在处死动物前,分别于再灌注时间点(6、12、24 h)评价实验动物后肢的运动功能。具体的标准如下:0 级,后肢无活动,不能负重;1 级,后肢可见活动,但不能负重;2 级,后肢活动频繁或有力,不能负重;3 级,后肢可支持体重,能走 1~2 步;4 级,可行走仅有轻度障碍;5 级,行走正常。

1.2.3 神经细胞形态学观察

在预定的灌注时间点,后肢运动功能评价完成后,用过量的麻醉药物处死实验动物,取腰段脊髓。将所得脊髓组织分为三部分,分别予 5% 戊二醛、4% 多聚甲醛和液氮冷冻保存,分别用于电镜,制作冰冻切片进行免疫荧光观察和 Western blot 和免疫共沉淀检测。

将 5% 戊二醛固定的脊髓灰质切成 0.5 mm 大小,PBS 漂洗 3 次,每次 15 min。1% 锇酸 4℃ 固定 2 h,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。2% 醋酸铀水溶液染色 2 h,4℃ 下 50%、70%、90%、100% 丙酮依次脱水 15 min。然后依次用 100% 丙酮:包埋剂(1:1)室温 1.5 h、100% 丙酮:包埋剂(1:2)室温 1.5 h、纯包埋剂 37℃ 浸渍处理 3 h,超薄切片(厚度 < 0.1 μm),60℃ 恒温聚合 36 h 后,进行透射电镜观察。每份标本选 3 张切片观察,主要观察脊髓神经元细胞核的形态和线粒体等细胞器的变化。

1.2.4 脊髓冰冻切片 NeuN 免疫荧光

将脊髓组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 4~6 h,然后依次用 10%、20% 和 30% 的蔗糖溶液梯度脱水,最终使脊髓组织沉底,取出组织用冰冻切片包埋剂包埋,用冰冻切片将脊髓切成 10 μm 厚度的横切面冰冻切片。将切片用 10% 的羊血清封闭,然后孵育特异性的 NeuN 抗体(1:1 000),4℃ 过夜。第 2 天在暗室中孵育荧光二抗 2~3 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,荧光显微镜观察。

1.2.5 Western blot 检测 iNOS、BAD、磷酸化 BAD (p-BAD)、细胞色素 C

脊髓组织以适当比例(1:4)于蛋白裂解液中裂解,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后去上清,Braford

法测蛋白浓度。上清用 5 倍的上样缓冲液稀释,然后煮沸 10 min。每孔上样 20 μl 蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳并转膜,室温下以 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,加一抗(iNOS:一抗稀释液=1:1 000),4℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,37℃ 下加相应的二抗(二抗:封闭液=1:5 000)孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。暗室中,将条带置于 Bio-Rad ChemiDoc MP system 中,加入超敏发光液,用 Quantity One 软件收集条带信号,分析条带灰度值。

BAD、p-BAD、CytoC 和 14-3-3 表达量的检测同前。

1.2.6 分析 p-BAD 与 14-3-3 的相互关系变化

采用免疫共沉淀(coimmunoprecipitation,IP)方法检测。将各组样本取 200 μl,加入 3 μl 抗 14-3-3 一抗,4℃ 缓慢震荡过夜。每组中加入 30 μl Protein G/Protein A agrose beads (Santa Cruz 公司,美国),4℃ 缓慢震荡 2 h。4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。重复 3 次后加入约 30 μl 组织裂解液,6 μl 上样缓冲液,煮沸 10 min 后,离心取上清。按上述 Western blot 步骤检测 p-BAD。

1.3 统计学方法

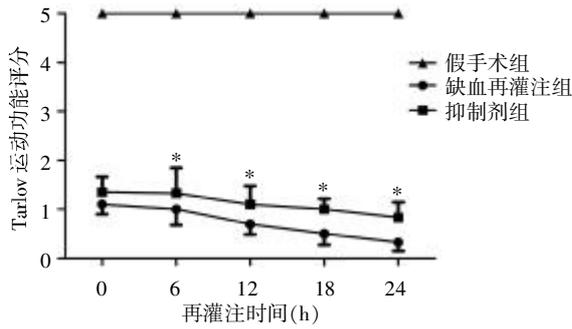
用 PASW18.0 统计学软件进行统计分析。结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。Tarlov 运动功能评分采用 Mann-Whitney 非参数检验。各组间蛋白表达的差异用单因素方差分析(ANOVA),差异有显著性再用 SNK-*q* 法进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

Tarlov 运动评分结果(图 1)显示:假手术组大鼠后肢运动功能无损害,缺血再灌注组和 iNOS 抑制组大鼠后肢功能均有明显损害。但在相同灌注时间点(6、12、24 h),iNOS 抑制组评分均明显高于缺血再灌注组($P < 0.05$)。

作为神经元特异性的抗体,NeuN 阳性细胞可认为存活神经元。NeuN 特异性免疫荧光结果显示:与假手术组相比,再灌注 24 h 时,缺血再灌注组(图 2B)和 iNOS 抑制组(图 2C)中的 NeuN 阳性的细胞(存活神经元)数量减少,但是 iNOS 抑制组中存活神经元数量明显多于缺血再灌注组($P < 0.05$,图 2D)。

透射电镜结果显示假手术组神经细胞结构清晰完整,核膜完整,核染色质颗粒细致,线粒体形态基



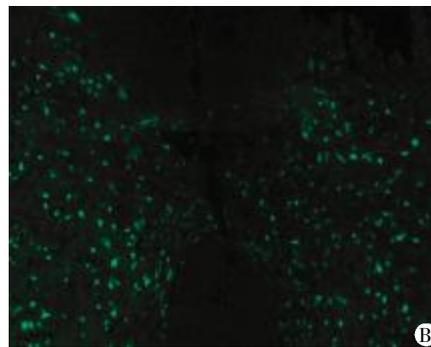
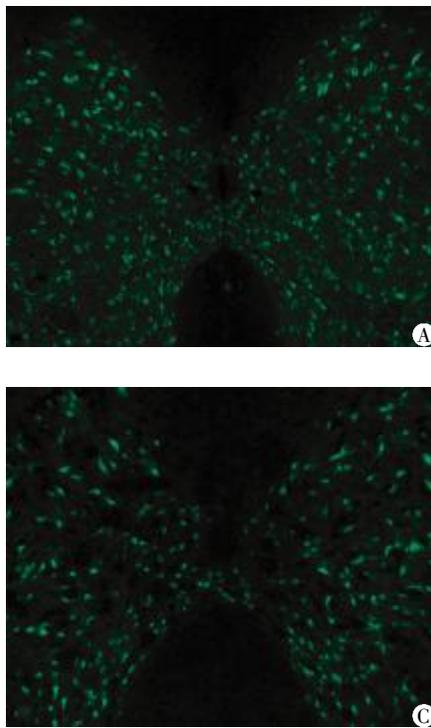
与抑制剂组比较, * $P < 0.05$ 。

图1 Tarlov 运动功能评分结果

Figure 1 Motor function evaluated by Tarlov's criteria

本正常(图 3A、D)。缺血再灌注组再灌注 24 h 时可见神经元出现核破裂,核固缩,胞核染色质边集、呈碎块状,凋亡小体形成等典型的凋亡细胞形态变化,线粒体失去正常形态,变得肿胀,嵴消失(图 B、E)。与相同再灌注时间的缺血再灌注组相比,iNOS 抑制组神经细胞凋亡程度明显减轻,可见细胞体积变小,胞浆开始浓缩,胞质内少量空泡样改变,核形开始不规则,染色质开始边集,固缩,线粒体的形态略有变化,但明显好于缺血再灌注组(图 3C、F)。

Western blot 结果显示:BAD 和 14-3-3 表达量在各组间无明显差异。iNOS 在假手术组中表达量极



A:假手术组;B:缺血再灌注组;C:抑制剂组;D:NeuN 免疫荧光染色阳性细胞数目统计图。

图2 再灌注时间 24 h 脊髓神经元 NeuN 免疫荧光结果($\times 50$)

Figure 2 Immunofluorescence analysis of anti-NeuN after spinal cord reperfusion($\times 50$)

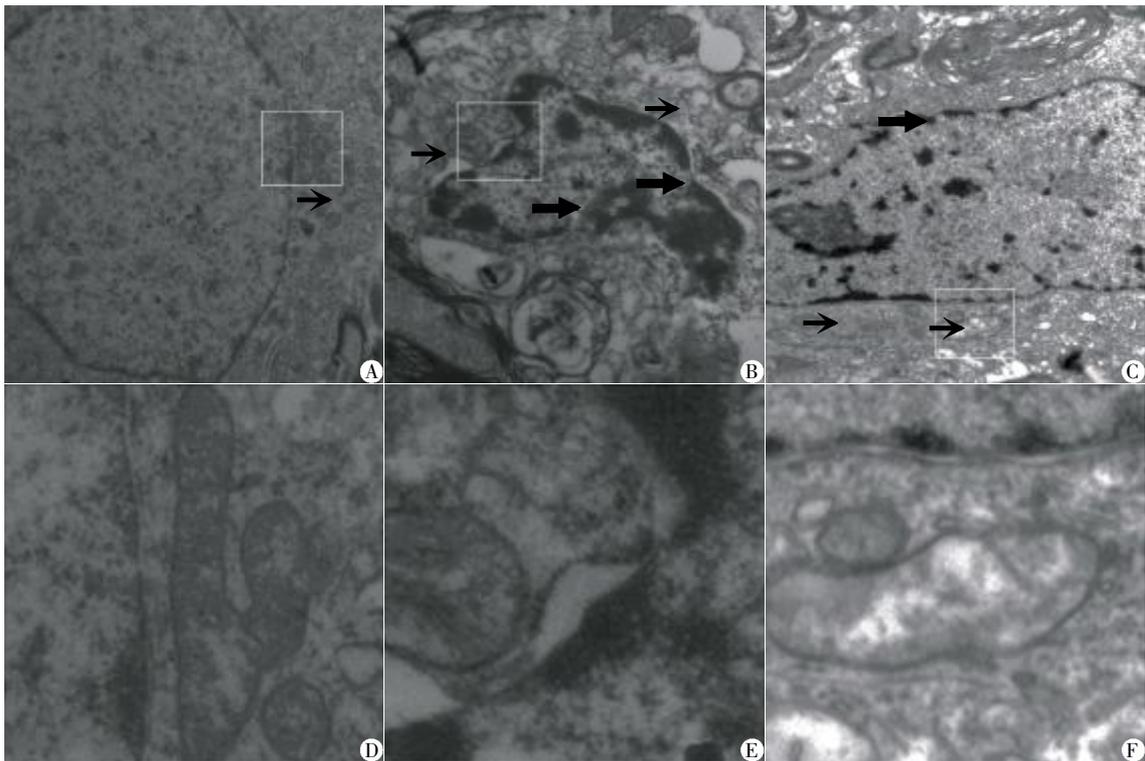
低,而在缺血再灌注组中,随着灌注时间的延长而逐渐增加。氨基胍明显抑制了 iNOS 活性。相同的时间点,iNOS 的表达量明显低于缺血再灌注组 ($P < 0.05$)。p-BAD(Ser136)表达量在缺血再灌注组和 iNOS 抑制组均随着再灌注时间的延长逐渐降低。但是在 iNOS 抑制组中,p-BAD(Ser136)表达量降低的趋势明显缓于缺血再灌注组($P < 0.05$)。此外,随着 iNOS、BAD 的活化,缺血再灌注组中 Cyto C 表达量逐渐增加。但在 iNOS 抑制组,氨基胍明显抑制了 Cyto C 表达量($P < 0.05$,图 4)。

免疫共沉淀的结果显示:在缺血再灌注组中,

BAD/14-3-3 复合体随着再灌注时间的延长而逐渐解离。在 iNOS 抑制组,氨基胍明显抑制了这种解离 ($P < 0.05$,图 5)。

3 讨论

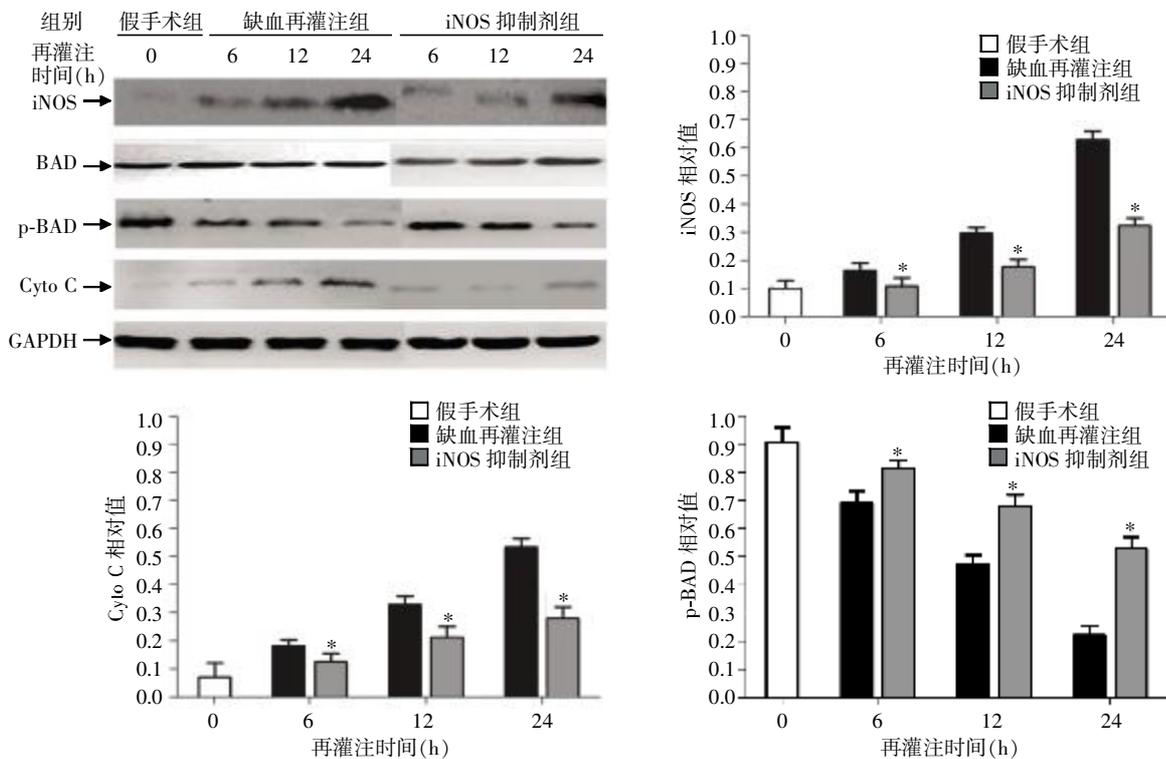
脊髓缺血再灌注损伤(SCII)是指脊髓缺血因素去除后,脊髓恢复血供,神经功能不仅得不到改善,反而在原缺血损伤基础上进一步加重,甚至出现不可逆性脊髓神经元迟发性死亡的现象^[10]。SCII 的病理过程及发病机制非常复杂,迄今尚无统一论。Sakurai 等^[11]学者通过 TUNEL 染色的方法观察到



A:假手术组神经细胞结构清晰完整,核膜完整,线粒体形态正常;B:缺血再灌注 24 h 组神经细胞出现核破裂、核固缩、胞核染色质边集,线粒体肿胀等形态学改变;C:iNOS 抑制组神经细胞胞浆开始浓缩,胞核和线粒体形态开始不规则;D、E、F($\times 400$)分别是 A、B、C($\times 40$)图中线粒体部分的局部放大图(\rightarrow 指示线粒体变化, \blackrightarrow 指示胞核染色质边集,核膜变化)。

图 3 脊髓神经元的电镜观察结果

Figure 3 Ultrastructural analysis of spinal neurons by transmission microscopy



与缺血再灌注组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测脊髓组织中 iNOS、p-BAD、BAD 和 Cyto C 的表达

Figure 4 Western blot analysis reveals the expressions of iNOS、p-BAD、BAD and Cyto C in spinal cord

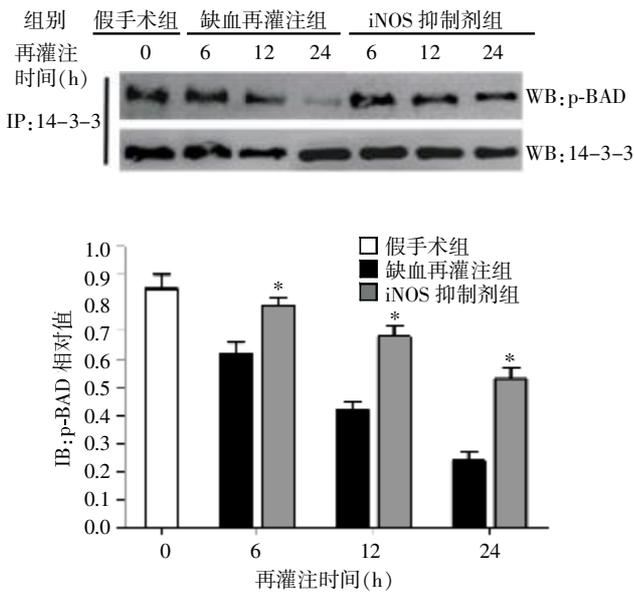


图5 再灌注不同时段 p-BAD 和 14-3-3 相互作用的免疫共沉淀检测结果

Figure 5 The association of p-BAD and 14-3-3 in reperfusion of ischemic spinal cord in different ischemia/reperfusion groups

15 min 的缺血可以导致兔脊髓神经元出现凋亡的改变,凋亡的神经元在后期产生的运动障碍中起到非常重要的作用。本课题组以前的研究也证明了这种观点^[6],但是凋亡的具体机制仍需要进一步阐明。最近,NO 和 NOS 在脊髓缺血再灌注损伤方面的作用引起了人们的关注。NO 自由基可在特定情况下转变为细胞毒性介质,此时 NO 在缺血再灌注损伤过程中起着重要作用^[12]。NOS 作为合成 NO 的限速酶,以多种形式存在体内。Hamada 等^[4]学者曾指出由 iNOS 产生的 NO 主要介导了脊髓缺血再灌注过程中神经细胞的损伤,但具体机制尚不清楚。

在本研究中,笔者发现脊髓缺血再灌注损伤导致了后肢运动功能障碍,存活脊髓神经细胞大量减少,这和 Ning 等^[13]学者的报道结果基本一致;而氨基胍可明显改善大鼠后肢运动功能,提高脊髓神经细胞存活率,这表明 iNOS 参与了缺血再灌注介导的脊髓神经细胞损伤。我们既往研究表明脊髓缺血再灌注损伤可通过 MAPK 信号通路,激活线粒体途径介导的细胞凋亡^[6,14-16]。本研究中,发现 iNOS 的激活伴随着脊髓神经细胞凋亡,而 iNOS 活性被抑制后,脊髓神经元的凋亡明显减轻。这表明 iNOS 在脊髓缺血再灌注过程中被激活,介导了神经细胞的凋亡。

BAD 隶属于 Bcl-2 家族促凋亡蛋白分支,是调节线粒体途径凋亡的重要蛋白,其促凋亡过程主要

通过去磷酸化激活和二聚体解离的方式完成。在生理情况下,BAD 主要以磷酸化形式与 14-3-3 结合稳定地存在于胞质中^[17-21]。本课题组既往研究证明:在脊髓缺血再灌注损伤过程中,BAD 可被去磷酸化激活,导致其与 14-3-3 结合力降低,被 BAD/14-3-3 二聚体释放,从而促使 Cyto C 从线粒体释放至胞浆,激活线粒体途径介导的细胞凋亡。本研究中,发现 iNOS 活性激活的同时,p-BAD 表达水平也逐渐降低,同时 BAD 与 14-3-3 逐渐解离,细胞色素 C 表达量亦有增加。而氨基胍在抑制 iNOS 活性的同时,也提高了 p-BAD 表达水平,抑制了 BAD 与 14-3-3 的解离,降低了 Cyto C 的表达量。这表明氨基胍不仅可抑制 iNOS 活性,还抑制了 BAD 的活性,从而减少了脊髓缺血再灌注损伤过程中神经细胞的凋亡。

综上所述,本研究初步证明了脊髓缺血再灌注损伤过程中,iNOS 参与脊髓神经细胞凋亡的机制,即去磷酸化激活 BAD,促使 BAD/14-3-3 二聚体解离,从而释放 Cyto C,激活线粒体途径介导的神经细胞凋亡。这为临床治疗脊髓缺血再灌注损伤提供了新思路、新方向。但是脊髓缺血再灌注损伤是多种信号转导途径共同介导的复杂病理过程,其确切机制还需进一步研究。iNOS 导致神经细胞凋亡的具体机制及氨基胍具体的神经保护作用也有待明确。

[参考文献]

- [1] Crawford ES,Rubio PA. Reappraisal of adjuncts to avoid ischemia in the treatment of aneurysms of descending thoracic aorta [J]. J Thorac Cardiovasc Surg,1973,66 (5):693-704
- [2] Zhang Q,Huang C,Meng B,et al. Acute effect of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the rat spinal cord [J]. Int J Mol Sci,2012,13(8):9864-9876
- [3] Wei T,Chen C,Hou J,et al. Nitric oxide damages neuronal mitochondria and induces apoptosis in neurons [J]. Chin Sci Bull,2000,45(5):422-426
- [4] Hamada Y,Ikata T,Katoh S,et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord [J]. Free Radic Biol Med,1996,20(1):1-9
- [5] Kamada H,Nito C,Endo H,et al. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab,2007,27 (3):521-533
- [6] Fan J,Xu G,Nagel DJ,et al. A model of ischemia and reperfusion increases JNK activity,inhibits the association of BAD and 14-3-3,and induces apoptosis of rabbit

- spinal neurocytes [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473(3): 196–201
- [7] Zivin JA, DeGirolami U. Spinal cord infarction; a highly reproducible stroke model [J]. *Stroke*, 1980, 11(2): 200–202
- [8] Hao W, Wu XQ, Xu RT, et al. The molecular mechanism of aminoguanidine-mediated reduction on the brain edema after surgical brain injury in rats [J]. *Brain Res*, 2009, 1282: 156–161
- [9] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat [J]. *J Neurosurg*, 1977, 47(4): 577–581
- [10] Cheng B, Wang W, Lin L, et al. The change of the spinal cord ischemia-reperfusion injury in mitochondrial pathway and the effect of the Ginkgo biloba extract's preconditioning intervention [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(3): 415–420
- [11] Savas S, Delibas N, Savas C, et al. Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits [J]. *Spinal Cord*, 2002, 40(5): 224–229
- [12] Diaz-Ruiz A, Ibarra A, Perez-Severiano F, et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 319(3): 129–132
- [13] Ning N, Dang X, Bai C, et al. Panax notoginsenoside produces neuroprotective effects in rat model of acute spinal cord ischemia-reperfusion injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 504–512
- [14] Yang C, Ren Y, Liu F, et al. Ischemic preconditioning suppresses apoptosis of rabbit spinal neurocytes by inhibiting ASK1-14-3-3 dissociation [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(3): 267–271
- [15] Wang P, Cao X, Nagel DJ, et al. Activation of ASK1 during reperfusion of ischemic spinal cord [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 415(3): 248–252
- [16] 杨成伟, 刘 锋, 殷国勇, 等. GIT1 和 ERK1/2 在兔脊髓缺血再灌注损伤中作用的初步研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2008, 28(4): 508–512
- [17] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239–252
- [18] Hsu SY, Kaipia A, Zhu L, Kandel ES, Cross TK, et al. Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11 [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(12): 1858–1867
- [19] Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, et al. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5800–5810
- [20] Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x (L) by the MAPK/Erk kinase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(43): 31108–31113
- [21] Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(1): 67–71

[收稿日期] 2013-04-27