

# 藁本内酯对低钾大鼠小脑颗粒神经元凋亡的保护作用\*

李玲姣, 王 宇, 王良芬, 杜俊蓉<sup>△</sup>

四川大学华西药学院 药理学系(成都 610041)

**【摘要】 目的** 探讨藁本内酯(ligustilide, LIG)对原代培养小脑颗粒神经元细胞(cerebellar granule neurons, CGN)低钾性凋亡的影响。**方法** 建立低钾诱导体外培养新生大鼠 CGN 凋亡模型,将 CGN 分为对照组、模型组、CGP54626+LIG 组及 LIG 组,分别进行给药处理;采用噻唑兰(MTT)法检测各组细胞存活率,Western blot 检测胰岛素样生长因子 1(IGF-1)信号通路中主要效应分子 IGF-1R、Akt、ERK1/2、CREB 及 caspase 3 的蛋白表达水平。**结果** LIG(2.5~20  $\mu\text{mol/L}$ )可浓度依赖性抑制大鼠 CGN 的低钾性凋亡、提高其存活率;20  $\mu\text{mol/L}$  LIG 可显著上调 IGF-1R、Akt、ERK1/2 和 CREB 的磷酸化水平,下调 cleaved-caspase 3 的表达水平;同时,LIG 上述效应均可被  $\gamma$ -氨基丁酸代谢型受体(GABA<sub>B</sub>)的选择性拮抗剂 CGP54626 所阻断。**结论** LIG 对低钾所致大鼠 CGN 凋亡有保护作用,其机制可能与激活 GABA<sub>B</sub> 受体及其下游的 IGF-1 信号通路有关。

**【关键词】** 藁本内酯 GABA<sub>B</sub> 受体 IGF-1 信号通路 小脑颗粒神经元

## Protective Effect of Ligustilide Against Low Potassium Induced Apoptosis in Cultured Rat Cerebellar Granule Neurons

LI Ling-jiao, WANG Yu, WANG Liang-fen, DU Jun-rong<sup>△</sup>. Department of Pharmacology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: dujr07@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of ligustilide (LIG) on low potassium-induced apoptosis in primary cultured cerebellar granule neurons (CGN). **Methods** Apoptosis was induced by low potassium in cultured neonatal rat CGN *in vitro*. The CGN was divided into control/model/CGP54626 + LIG and LIG group. The neuronal viability of each group was measured by MTT assay. The protein expression levels of the key insulin-like growth factor 1 (IGF)-1 signaling effectors, including the phosphorylated IGF-1 receptor (IGF-1R), Akt, ERK1/2, CREB and activated caspase 3 were examined by Western blot analysis. **Results** LIG ranging from 2.5 to 20  $\mu\text{mol/L}$  could protect against low potassium-induced apoptosis of CGN in a concentration-dependent manner. 20  $\mu\text{mol/L}$  LIG significantly induced upregulation of the phosphorylated levels of IGF-1, Akt, ERK1/2 and CREB, and downregulation of cleaved-caspase 3 expression, which could be blocked by a selective gamma-aminobutyric acid B (GABA<sub>B</sub>) receptor antagonist CGP54626. **Conclusion** LIG concentration-dependently protects against low potassium-induced apoptosis in CGN at least partly through GABA<sub>B</sub> receptor activation and its downstream IGF-1 signaling pathway.

**【Key words】** Ligustilide GABA<sub>B</sub> receptor IGF-1 signaling pathway Cerebellar granule neurons

藁本内酯(ligustilide, LIG)是伞形科植物如当归、川芎挥发油的主要成分<sup>[1,2]</sup>。现代药理学研究表明 LIG 具有平喘、解痉、镇痛、抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种药理作用<sup>[3,4]</sup>。本课题组前期研究表明, LIG 对多种缺血性脑损伤动物模型均具有良好的神经保护作用<sup>[5,6]</sup>,但其对神经元凋亡变化作用及其机制尚未完全阐明。

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统的主要抑制性神经递质,主要通过离子型受体

(GABA<sub>A</sub> 和 GABA<sub>C</sub>)或代谢型受体 GABA<sub>B</sub> 结合而发挥生理效应<sup>[7]</sup>。研究表明, GABA<sub>B</sub> 是一种 G 蛋白偶联受体,激活 GABA<sub>B</sub> 可以通过调节离子通道的活性产生一种缓慢的长期的抑制性信号,调节体内神经递质的释放<sup>[8]</sup>。有研究发现,激活 GABA<sub>B</sub> 介导的神经元保护作用通过转激活胰岛素样生长因子 1(IGF-1)受体实现<sup>[9,10]</sup>。IGF-1 受体(IGF-1R)磷酸化后,可介导 IGF-1 信号通路下游的 PI3K/Akt 和 ERK/MAPK 等主要效应分子的活化,从而在神经元细胞的增殖、分化和存活中发挥重要作用<sup>[11,12]</sup>。

\* 国家自然科学基金(No. 81072636)资助

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: dujr07@gmail.com

本研究建立了低钾诱导的原代培养大鼠小脑颗粒神经元细胞(CGN)凋亡模型,并将不同浓度 LIG 和 GABA<sub>B</sub> 受体的选择性拮抗剂 CGP54626 作用于 CGN,观察 LIG 对 CGN 低钾性凋亡的影响并探讨其与 GABA<sub>B</sub>/IGF-1 信号通路之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级健康成年 SD 大鼠,体重约 250 g,由四川省达硕生物科技有限公司提供,动物合格证号:SCXK0003931。按照 3:1 的雌雄比例分笼常规饲养进行交配,温度(23±2)℃,相对湿度 40%~70%,自由进食和饮水。

**1.1.2 主要试剂** DMEM 高糖培养基、胎牛血清、Neurobasal 培养基、B27 添加剂、胰蛋白酶购自 GIBCO 公司;DMSO、L-谷氨酰胺、HEPES 购自 Amresco 公司;CGP54626 购自 Tocris Bioscience 公司;L-多聚赖氨酸(PLL)购自 Sigma 公司;IGF-1R 和 pIGF-1R 多克隆抗体,β-actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;Akt 和 pAkt 单克隆抗体,ERK1/2 和 pERK1/2 单克隆抗体,CREB 和 pCREB 单克隆抗体,caspase 3 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司;RIPA 裂解液购自碧云天生物技术有限公司。LIG 按照文献方法<sup>[3]</sup>,从当归挥发油中以硅胶柱分离纯化得到,用高效液相法鉴定其纯度>99%。实验前,将 LIG 溶于 DMSO 中配制为储备液,保存于-20℃,临用前以细胞培养基稀释。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 原代大鼠 CGN 培养** 参考 Bhanu 等<sup>[13]</sup>报道,取出生 7 d 的新生 SD 大鼠断头,取出小脑置于冷 D-Hank's 溶液中,分离出小脑皮层,加入 0.25%胰酶 37℃消化 15 min。加入完全培养基(含 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基)终止胰酶消化,离心弃上清,加入完全培养基重悬,200 目筛网过滤、计数,调整细胞密度为 6×10<sup>5</sup>/mL,种于 96 孔板或 6 孔板中,在 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。4 h 后,换成高 K<sup>+</sup> 维持培养基(含 2% B27 添加剂,0.5 mmol/L L-谷氨酰胺,25 mmol/L KCl 的 Neurobasal 培养基)继续培养 7 d,用于后续实验。

#### 1.2.2 MTT 法检测细胞存活率

**1.2.2.1 检测 LIG 和 CGP54626 对 CGN 细胞活力的影响** CGN 培养 7 d,换高 K<sup>+</sup>(25 mmol/L)维持培养基,再将细胞分为 7 组,对照组不加入药物;

实验组分别加入 2.5、5、10、20 μmol/L LIG,10 μmol/L CGP54626,以及 20 μmol/L LIG + 10 μmol/L CGP54626。

**1.2.2.2 检测 LIG 对低 K<sup>+</sup> 诱导的 CGN 凋亡的保护作用** CGN 培养至第 7 d,分组给药:① 对照组:不加药,只更换高 K<sup>+</sup>(25 mmol/L)维持培养基,② 模型组:将高 K<sup>+</sup>(25 mmol/L)维持培养基换成低 K<sup>+</sup>(5 mmol/L)维持培养基。③ CGP54626 + LIG20 组:将高 K<sup>+</sup>(25 mmol/L)维持培养基换成低 K<sup>+</sup>(5 mmol/L)维持培养基,同时加入 CGP54626 10 μmol/L,37℃孵育 30 min,再加入 LIG 20 μmol/L。④ LIG 组:将高 K<sup>+</sup>(25 mmol/L)维持培养基换成低 K<sup>+</sup>(5 mmol/L)维持培养基,同时加入不同浓度的 LIG(2.5~20 μmol/L)。

细胞按 1.2.2.1 及 1.2.2.2 分组给药孵育 24 h 后,用 MTT 法检测各组细胞活力<sup>[14]</sup>。每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,37℃继续孵育 4 h 后吸去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,常温下在摇床上摇 10 min 以便溶解蓝紫色结晶甲臜,在酶标仪 490 nm 波长下测定各孔吸光度值(A<sub>490</sub>),并计算细胞存活率(实验组 A<sub>490</sub>/空白对照组 A<sub>490</sub>×100%)。

**1.2.3 Western blot 检测 IGF-1R、Akt、ERK1/2、CREB 及 caspase 3 蛋白表达** CGN 培养 7 d 后弃上清,按 1.2.2.2 分组,分别用高 K<sup>+</sup> 或低 K<sup>+</sup> 的 HEPES 缓冲液洗涤 1 次,然后在相应的 HEPES 缓冲液中 37℃孵育。孵育 30 min 后,加入 10 μmol/L CGP54626 或溶媒,继续孵育 30 min 后,再加入 20 μmol/L LIG 或溶媒,继续孵育 10 min。弃去上清,用 0.01 mol/L PBS 洗涤,加入 200 μL RIPA 裂解液,收集细胞裂解液,4℃离心 15 min,取上清,即为细胞总蛋白。考马斯亮蓝法蛋白定量,取 20~40 μg/孔上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,利用电泳法将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转移至 PVDF 膜上,TBST 溶液清洗 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶溶液进行封闭,弃去封闭液,分别加入一抗(IGF-1R、pIGF-1R、Akt、pAkt、ERK1/2、pERK1/2、CREB、pCREB、caspase 3、β-actin; 1:1 000 比例稀释),4℃过夜,TBST 溶液洗膜,加辣根过氧化物酶标记二抗(中杉金桥,1:10 000),室温摇动 1 h,TBST、TBS 洗涤,ECL 显影,BIO-RAD 成像系统成像,以目的条带与 β-actin 灰度值的比值为目的蛋白相对表达量,并以对照组的蛋白相对表达量为 1。

### 1.3 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素

方差分析(one-way AVONA), $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 LIG 和 CGP54626 对 CGN 细胞活力的影响

MTT 结果(图 1)显示,2.5~20  $\mu\text{mol/L}$  LIG、10  $\mu\text{mol/L}$  CGP54626、20  $\mu\text{mol/L}$  LIG + 10  $\mu\text{mol/L}$  CGP54626 组 CGN 细胞存活率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。说明本实验中所用药物浓度对 CGN 本身没有毒性。

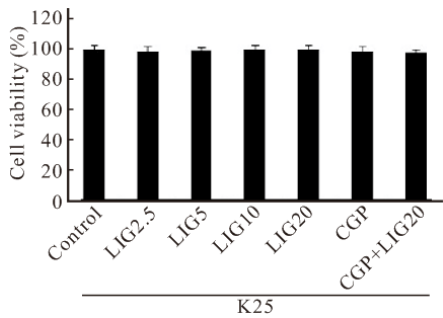


图 1 各组 CGN 细胞存活率

Fig 1 Cell viability of cultured neonatal rat CGN in each group

K25: High potassium media (25 mmol/L)

### 2.2 LIG 对低 $\text{K}^+$ 诱导的 CGN 凋亡的保护作用

图 2 显示,模型组在低钾情况下 CGN 的细胞

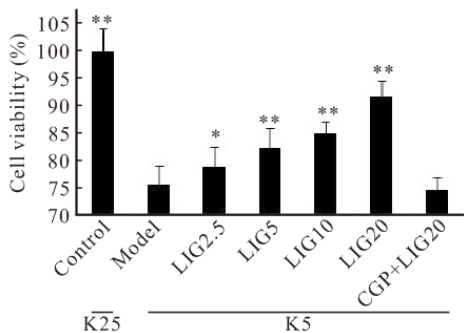


图 2 LIG 在低钾诱导的大鼠 CGN 死亡模型中的保护作用

Fig 2 Protective effect of LIG against rat CGN death induced by

potassium deprivation. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , vs. model group

K25: High potassium media (25 mmol/L); K5: Low potassium media (5 mmol/L)

活力显著降低,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );而 LIG(2.5~20  $\mu\text{mol/L}$ )可以剂量依赖性地逆转由低钾引起的细胞活力的下降,LIG 的这种神经保护作用可以被  $\text{GABA}_\text{B}$  受体的选择性拮抗剂 CGP54626 所拮抗。

### 2.3 LIG 对体外低钾大鼠 CGN 的 IGF-1 信号通路的影响

Western blot 结果显示(图 3,附表),与对照组相比,模型组的 IGF-1R 的磷酸化水平(pIGF-1R)无明显变化( $P>0.05$ ),pAkt、pERK1/2 和 pCREB 的水平均有明显下调,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),cleaved-caspase 3(由 pro-caspase 3 切割而来)的表达则有显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。LIG 组较模型组 pIGF-1R 水平增加( $P<0.01$ ),逆转了低钾介导的 pAkt、pERK1/2 和 pCREB 下调趋势( $P<0.01$ ),同时抑制了 leaved-caspase 3 表达的升高( $P<0.01$ )。而 LIG 的以上效应均可被 CGP54626 拮抗和逆转。

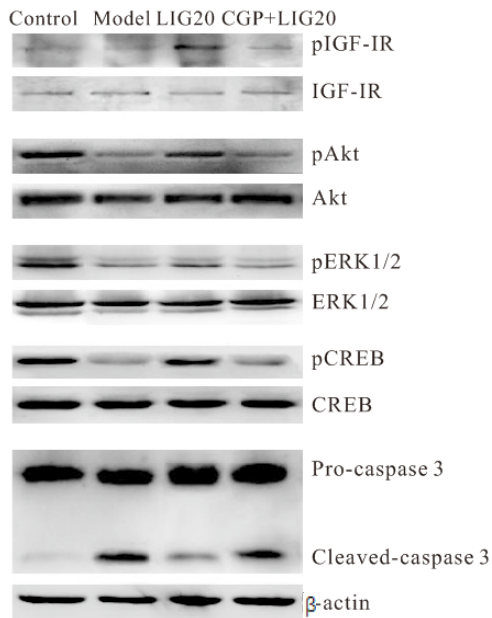


图 3 LIG 对体外低钾大鼠 CGN 的 IGF-1 信号通路的影响 ( $n=3$ )

Fig 3 Effects of LIG on IGF-1 signaling effectors expression in potassium-deprived rat CGN in vitro ( $n=3$ )

附表 LIG 对体外低钾大鼠 CGN 的 IGF-1 信号通路的影响 ( $n=3$ )

Table Effects of LIG on IGF-1 signaling effectors expression in potassium-deprived rat CGN in vitro ( $n=3$ )

|                                   | Control group | Model group | LIG20 group | CGP+LIG20 group |
|-----------------------------------|---------------|-------------|-------------|-----------------|
| pIGR-1R/IGF-1R                    | 1.00±0.13     | 0.99±0.04   | 4.45±0.58** | 1.56±0.19       |
| pAkt/Akt                          | 1.00±0.10**   | 0.62±0.07   | 0.90±0.06** | 0.69±0.01       |
| pERK1/2/ERK1/2                    | 1.00±0.05**   | 0.33±0.06   | 0.58±0.06** | 0.39±0.02       |
| pCREB/CREB                        | 1.00±0.09**   | 0.20±0.04   | 0.64±0.13** | 0.26±0.05       |
| Cleaved-caspase 3/ $\beta$ -actin | 1.00±0.15**   | 25.50±6.22  | 5.20±1.72** | 16.00±3.56*     |

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , vs. model group

### 3 讨论

细胞的凋亡,即程序性死亡,广泛存在于中枢神经系统的正常发育过程中。由于成熟的神经元属于终末分化的细胞,不具有再生能力,病理性的神经元凋亡可能导致多种神经退行性疾病如帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)、老年性痴呆症(Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等的产生<sup>[15,16]</sup>,因此,研究如何减少病理性的神经元凋亡及其作用机制对中枢神经系统退行性疾病的防治具有重要意义。

CGN 为哺乳动物中枢神经系统中纯度最高的神经元集群,有易获取、同系性高、稳定性好等优点,被广泛用于神经元存活、分化和凋亡机制等方面的研究。SD 大鼠出生 7 d 左右,CGN 数达到高峰,体外培养存活率也相对较高。CGN 可以在去极化(25 mmol/L  $K^+$ )的培养条件下发育成熟,但低钾(5 mmol/L  $K^+$ )的生理条件却会诱导其凋亡,出现包括染色质的浓聚及核的固缩、DNA 核小体间降解以及胞膜皱缩、神经元存活率显著降低等典型凋亡特征<sup>[17]</sup>。该模型可重复性高,故常用于研究中枢神经系统神经元凋亡的分子机制<sup>[9,10]</sup>。在本研究中,我们以低钾培养条件诱导的 CGN 凋亡作为研究模型,通过 MTT 法以及 caspase 3 活性检测来探究 LIG 对 CGN 细胞凋亡的影响。2.5 ~ 20  $\mu$ mol/L LIG 在低钾培养条件下可以剂量依赖地提高 CGN 的存活率且不对 CGN 产生细胞毒性。但预先给予 10  $\mu$ mol/L GABA<sub>B</sub> 受体选择性拮抗剂 CGP54626 可以拮抗 LIG 的这种神经保护效应。这些结果提示,在低钾条件下,LIG 可能通过激活 GABA<sub>B</sub> 受体来抑制 CGN 凋亡。

GABA<sub>B</sub> 是一种以异二聚体形式存在的 G 蛋白偶联受体,广泛存在于哺乳动物中枢神经系统,其中分布最多的区域是小脑、脚间核、额叶皮质、前嗅核以及丘脑核分子层<sup>[18]</sup>。GABA<sub>B</sub> 被激活后,在突触前膜通过下调电压敏感性钙离子受体或直接抑制释放系统抑制神经递质的释放;在突触后膜上则通过激活 Kir3 型钾离子通道诱导缓慢的抑制性突触后电流<sup>[8,19]</sup>,导致细胞膜的超极化,抑制神经元的兴奋性。因此,GABA<sub>B</sub> 选择性激动剂巴氯芬在临床上具有解痉和肌松等药理作用<sup>[20,21]</sup>。最近有研究发现,巴氯芬在缺血型脑中风的动物模型损伤中,表现出了神经保护的作用<sup>[22]</sup>。而在大鼠的小脑颗粒细胞和爪蟾脊髓神经元中,GABA<sub>B</sub> 受体的激活会促

进轴突的生长<sup>[23]</sup>。这表明 GABA<sub>B</sub> 活化可能会促进神经元存活。GABA<sub>B</sub> 受体的具体的神经保护机制还未完全清楚,但用 IGF-1R 受体拮抗剂 AG1024 和 NDGA 抑制 IGF-1R 后,GABA<sub>B</sub> 受体激活后诱导神经元存活的效应会终止<sup>[9]</sup>。同时,GABA<sub>B</sub> 受体选择性激动剂 baclofen 或 CGP7930 可瞬时增强 IGF-1 受体的活性<sup>[10]</sup>,这表明激活 GABA<sub>B</sub> 受体可以诱导 IGF-1R 的转激活。因此,本实验通过探究 LIG 对 IGF-1R 信号通路的作用来进一步验证 LIG 神经保护作用与 GABA<sub>B</sub> 受体激活之间的关系。

目前的研究发现,IGF-1R 磷酸化后主要会激活两条通路:PI3K/Akt 通路和 Raf/MEK/ERK 通路。

已有文献报道,巴氯芬可以促使  $G\beta\gamma$  亚单位从 Gi/o 蛋白中释放出来,激活 PLC/ $Ca^{2+}$  依赖的 FAK1 通路,从而转激活 IGF-1R,通过 Src 家族激酶诱导 PI3K/Akt 通路活化,最终导致 caspase 3 的抑制和神经元存活。而 CGP54626 则能逆转巴氯芬对 pIGF-1R、pAkt 和 caspase 3 的效应<sup>[10,24]</sup>。另外,巴氯芬还能通过 Gi/o 蛋白和 PLC 依赖的 IGF-1R 转激活的方式诱导 ERK1/2 的磷酸化,以及后续的 ERK1/2 依赖的 CREB 的活化。另有研究发现,激活 GABA<sub>B</sub> 受体之后,PI3K 还能促进 ERK1/2 的磷酸化。但提前给予 CGP54626 对细胞进行干预后,磷酸化的 ERK1/2 和 CREB 的表达都出现了明显下调<sup>[10,24,25]</sup>。本实验采用 Western blot 法检测 IGF-1 信号通路中 IGF-1R、Akt、ERK1/2、CREB 以及 caspase 3 活化情况,以探讨 LIG 神经保护作用的可能机制。Western blot 结果显示 LIG 也表现出了与巴氯芬相似的特征,能显著地上调 IGF-1 信号效应因子如 pIGF-1R、pAkt、pERK1/2 和 pCREB,下调 cleaved-caspase 3 的水平。并且 LIG 的这些调节作用也都可以被 CGP54626 所拮抗。这些结果表明,LIG 可能是通过活化 GABA<sub>B</sub> 受体来激活 IGF-1 信号通路的。此外,许多实验研究都发现了在低钾情况下,IGF-1 可以促进 CGN 的存活,但它们都没有显示出在低钾和高钾情况下 CGN 中 pIGF-1R 表达水平的差异<sup>[9,26-28]</sup>。在本实验中,低钾情况下 CGN 中 pIGF-1R 的表达水平和高钾情况下相比并没有显著降低,但它下游的效应因子 pAkt、pERK1/2 和 pCREB 的表达水平在低钾条件下出现了明显降低。这意味着低钾诱导的 pAkt、pERK1/2 和 pCREB 的表达水平的下调,并不依赖

于 IGF-1R 的磷酸化。

综上, LIG 对低钾所致大鼠 CGN 凋亡有保护作用,其机制可能与激活 GABA<sub>B</sub> 受体及其下游的 IGF-1 信号通路有关,这为进一步探寻治疗神经退行性疾病的有效药物和作用机制提供了实验依据。

### 参 考 文 献

- Spitzer NC. How GABA generates depolarization. *J Physiol*, 2010;588(5):757-758.
- Gallo V, Haydar T. GABA:exciting again in its own right. *J Physiol*,2003;550(3):665-665.
- Du J, Bai B, Kuang X, *et al.* Ligustilide inhibits spontaneous and agonists-or K<sup>+</sup> depolarization-induced contraction of rat uterus. *J Ethnopharmacol*,2006;108(1):54-58.
- Kuang X, Yao Y, Du JR, *et al.* Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Res*,2006;1102(1):145-153.
- Kuang X, Du JR, Liu YX, *et al.* Postischemic administration of ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav*,2008;88(3):213-221.
- Feng Z, Lu Y, Wu X, *et al.* Ligustilide alleviates brain damage and improved cognitive function in rats of chronic cerebral hypoperfusion. *J Ethnopharmacol*,2012;144(2):313-321.
- Young SZ, Bordey A. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology (Bethesda)*,2009;24(3):171-185.
- Kulik A, Vida I, Fukazawa Y, *et al.* Compartment-dependent colocalization of Kir3. 2-containing K<sup>+</sup> channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*,2006;26(16):4289-4297.
- Zafra M, Chorvicer M, Klamann I, *et al.* Systematic characterisation of GABRP expression in sporadic breast cancer and normal breast tissue. *Int J Cancer*, 2006; 118(6): 1453-1459.
- Tu H, Xu C, Zhang W, *et al.* GABAB receptor activation protects neurons from apoptosis via IGF-1 receptor transactivation. *J Neurosci*,2010;30(2):749-759.
- Quesada A, Lee BY, Micevych P. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol*,2008;68(5):632-644.
- Laviola L, Natalicchio A, Giordano F. The IGF-1 signaling pathway. *Curr Pharm Des*,2007;13(7):663-669.
- Bhanu MU, Mandraju RK, Bhaskar C, *et al.* Cultured cerebellar granule neurons as an *in vitro* aging model; topoisomerase II  $\beta$  as an additional biomarker in DNA repair and aging. *Toxicol In Vitro*,2010;24(7):1935-1945.
- Yu Y, Du JR, Wang CY, *et al.* Protection against hydrogen peroxide-induced injury by Z-ligustilide in PC12 cells. *Exp Brain Res*,2008;184(3):307-312.
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*,2000;23:73-87.
- Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med*,2000;108(4):317-330.
- Yan GM, Ni B, Weller M, *et al.* Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res*,1994;656(1):43-51.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, *et al.* Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*,2002;54(2):247-264.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, *et al.* G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*,1997;19(3):687-695.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, *et al.* Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol Rev*,2004;84(3):835-867.
- Uusi-Oukari M, Korpi ER. Regulation of GABAA receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev*, 2010;62(1):97-135.
- Cozzi A, Meli E, Carlà V, *et al.* Metabotropic glutamate 1 (mGlu1) receptor antagonists enhance GABAergic neurotransmission: a mechanism for the attenuation of post-ischemic injury and epileptiform activity? *Neuropharmacology*, 2002;43(2):119-130.
- Xiang Y, Li Y, Zhang Z, *et al.* Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nature Neurosci*, 2002;5(9):843-848.
- Jiang X, Su L, Zhang Q, *et al.* GABAB receptor complex as a potential target for tumor therapy. *J Histochem Cytochem*, 2012;60(4):269-279.
- Baloucoune GA, Chun L, Zhang W, *et al.* GABAB receptor subunit GB1 at the cell surface independently activates ERK1/2 through IGF-1R transactivation. *PLoS One*, 2012; 7(6): e39698. doi:10.1371/journal.pone.0039698. Epub 2012 Jun 28.
- Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, *et al.* Insulin-like growth factor- I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci*,2002;22(21):9287-9297.
- Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. Ethanol induces apoptosis in cerebellar granule neurons by inhibiting insulin-like growth factor 1 signaling. *J Neurochem*,1998;71(1):196-204.
- Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, *et al.* Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res*,2003;119(2):184-191.

(2014-05-08 收稿, 2014-09-07 修回)

编辑 汤 洁