

网络出版时间:2016-06-08 16:21 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.07.006
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1621.012.html>

丙烯酰胺对小鼠成体神经发生及增殖相关基因的影响

张亚妹,王久涛,宋玲珍,张伟,李玲玲,颜润川,胡新德,赵善廷

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**探讨丙烯酰胺对成年小鼠海马成体神经发生及增殖相关基因的影响,为了解丙烯酰胺的毒性机理提供参考。**【方法】**将20只10周龄雄性成年昆明小鼠(体质量 (30 ± 2) g/只),随机均分为丙烯酰胺染毒组和生理盐水对照组,丙烯酰胺染毒组通过腹腔注射丙烯酰胺进行染毒,注射剂量为50 mg/kg,连续注射14 d,第15天注射5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,50 mg/kg,2次/d,共3 d),观察2组小鼠体质量及行为活动的变化。用BrdU标记和免疫组织化学染色方法分析丙烯酰胺染毒对小鼠齿状回神经干细胞数量的影响,用RT-PCR法研究丙烯酰胺对小鼠海马增殖相关基因 *JNK3*、*Akt1*、*Gsk-3 β* 、*RhoA* 和 *Rac1* mRNA 表达的影响。**【结果】**丙烯酰胺染毒组小鼠体质量极显著低于对照组,精神萎靡、后肢无力,走路时后肢偶成劈叉姿势;与对照组相比,丙烯酰胺染毒组小鼠齿状回亚颗粒细胞层中的BrdU阳性细胞数量极显著降低($P<0.01$),海马组织中 *JNK3* 和 *Rac1* 的 mRNA 表达量显著升高($P<0.05$),*Akt1*、*Gsk-3 β* 和 *RhoA* 的 mRNA 表达量极显著升高($P<0.01$)。**【结论】**丙烯酰胺中毒能显著抑制小鼠齿状回成体神经干细胞增殖,可使海马组织中增殖相关基因 *JNK3*、*Akt1*、*Gsk-3 β* 、*Rac1* 和 *RhoA* 的表达量发生明显变化。

[关键词] 丙烯酰胺中毒;成体神经发生;免疫组织化学;增殖相关基因

[中图分类号] S852.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)07-0039-06

Influence of acrylamide on adult neurogenesis and expression of proliferation associated genes of mouse

ZHANG Yamei, WANG Jiutao, SONG Lingzhen, ZHANG Wei, LI Lingling,
YAN Runchuan, HU Xinde, ZHAO Shanting

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**This study investigated the influence of acrylamide poisoning on adult neurogenesis and expression of proliferation associated genes in hippocampus of mouse. **【Method】**Twenty 10-week old male adult Kunbai mice with body weight of (30 ± 2) g were randomly divided into control group and acrylamide exposure group. Acrylamide exposure group were exposed to acrylamide by intraperitoneal injection with a dose of 50 mg/kg for 14 days before injection of 50 mg/kg BrdU for 3 days and twice per day. The changes in body weight and behavioral activity was observed. Immunohistochemistry and BrdU labeling were used to investigate the effect on number of neural stem cells in the subgranular zone(SGZ). Influences of acrylamide on the expression of proliferation associated genes (*JNK3*, *Akt1*, *Gsk-3 β* , *RhoA* and

[收稿日期] 2014-12-10

[基金项目] 西北农林科技大学人才引进专项基金项目(Z-111021101)

[作者简介] 张亚妹(1991—),女,安徽蚌埠人,在读硕士,主要从事分子神经生物学研究。E-mail: xinongzhangyamei@126.com

[通信作者] 赵善廷(1964—),男,新疆乌鲁木齐人,教授,博士生导师,主要从事分子神经生物学研究。

E-mail: zhaoshanting@nwsuaf.edu.cn

Rac1) were also examined using RT-PCR. 【Result】 Result showed that the body weight of acrylamide exposed mice was significantly lower than that of the control group. The mice in acrylamide exposed group were listless with weak hind limbs, which showed splitting position when walking. BrdU-positive cells in experimentally acrylamide exposed mice were extremely significantly decreased compared with that in the control group ($P < 0.01$). *JNK3* and *Rac1* mRNA expressions were remarkably increased ($P < 0.05$), while *Akt1*, *Gsk-3 β* and *RhoA* mRNA expressions were very significantly increased ($P < 0.01$). 【Conclusion】 Acrylamide poisoning suppressed the proliferation of adult neural stem cells of dentate gyrus in mouse and influenced the expression of *JNK3*, *Akt1*, *Gsk-3 β* , *Rac1* and *RhoA* in mouse hippocampus.

Key words: acrylamide poisoning; adult neurogenesis; immunohistochemistry; proliferation-associated gene

丙烯酰胺是一种工业常用的化学药品,用于制造聚丙烯酰胺,在人们的日常生活中经常会接触到丙烯酰胺,如化妆品、洗涤剂 and 除臭剂等^[1]。在实验室中,丙烯酰胺常用于电泳和凝胶层析等。除了工业和实验室使用之外,含糖量较高的食品经过高温加热,也会形成丙烯酰胺^[2-4]。有研究报道显示,丙烯酰胺具有神经毒性和生殖毒性,对动物具有致癌作用,导致动物体质量降低和神经综合征等^[5-6]。

在哺乳动物中,成体神经干细胞主要局限于中枢神经系统的两个部位:海马结构中的齿状回(dentate gyrus, DG)和侧脑室壁的室周带(subventricular zone, SVZ)^[7]。齿状回的神经干细胞主要存在于亚颗粒细胞层(subgranular zone, SGZ),其新生的神经干细胞迁移入亚颗粒细胞层,其中 85%~95%的新生干细胞发育分化成神经元^[8]。SVZ 区新生的神经干细胞先是通过喙侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)到达嗅球(olfactory bulb),然后在嗅球中发育分化成几种中间神经元^[9]。

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)注射标记法是目前研究成体神经发生最常用的方法,BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷的类似物,可以代替胸腺嘧啶插入并整合到正在合成的 DNA 链中,同时不影响细胞的正常功能,因此 BrdU 是研究细胞增殖较为理想的标记物^[10]。SGZ 区新生的神经干细胞能标记上 BrdU,且一旦标记上 BrdU,该细胞将会始终带有 BrdU。SGZ 区被 BrdU 标记的细胞可能是神经干细胞,也可能是已经发生分裂或分化的神经干细胞的子细胞。

为了研究丙烯酰胺对海马组织中增殖相关基因的影响,笔者通过大量查阅前人在增殖相关基因方面的研究成果,发现 *JNK* 信号通路参与神经元增殖、凋亡过程,而 *JNK3* 是 *JNK* 信号通路的关键分子。*JNK* 有 *JNK1*、*JNK2* 和 *JNK3* 3 种亚型,前

2 个分布在机体大部分组织中,*JNK3* 只特异性地在神经系统中表达并起细胞保护作用^[11]。另外,与细胞增殖相关的 *PI3K* 信号通路中有 2 个关键分子 *Akt* 和 *Gsk-3 β* 。*Akt* 又称 *PKB*,研究表明,*Akt* 与成纤维母细胞、上皮细胞以及神经元的增殖相关^[12]。*Rho* 家族蛋白也是目前研究细胞增殖相关基因的热点。本试验观察了丙烯酰胺中毒对小鼠形态的影响及齿状回中神经干细胞的增殖变化,并对与增殖相关的基因进行深入分析,以期为研究丙烯酰胺毒性机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 10 周龄昆明种小鼠 20 只,体质量(30±2) g/只,雄性,购自西安交通大学医学院。

1.1.2 主要试剂和仪器 丙烯酰胺分析纯(含量≥99.9%, Amresco)、BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷, bromodeoxyuridine, Sigma)、大鼠抗 BrdU IgG (Serotec, Düsseldorf, Germany)、生物素化兔抗大鼠 IgG (武汉博士德)、SABC (Streptavidin, HRP conjugated, 武汉博士德, bse-0437P)、Trizol (Invitrogen)、反转录试剂盒 (Thermo scientific) 和 DAB 显色试剂盒 (福州迈新生物技术有限公司); VT1000S 振荡切片机 (Leica)、Observer Z1 结构照明显微镜 (Zessi)、PCR 仪 (Bio-Rad)、体视显微镜 (浙江瞬宇)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 试验动物随机分为对照组(生理盐水, 10 只)和丙烯酰胺染毒组(50 mg/kg, 10 只,连续腹腔注射 14 d)。试验第 15 天按 50 mg/kg 剂量腹腔注射 BrdU,每只小鼠注射量为 2 次/d(间隔 12 h),连续 3 d,最后一次注射 BrdU 后 24 h 灌注取材。试验期间,小鼠自由饮水和取

食,每天光照及黑暗各 12 h,温度(25±3)℃,相对湿度 30%~73%,每天观察小鼠的进食、活动、反应、死亡等情况并做好记录。

(1)取材。先用质量分数 0.56%戊巴比妥钠腹腔注射,待小鼠麻醉后,将其腹部朝上放置在蜡盘上固定四肢,用剪刀快速从腹腔中部剪开,经两侧剪至膈膜直达胸腔,使小鼠心脏充分暴露。在小鼠未死亡状态下将灌注针插入左心室,并迅速剪破右心房,灌注质量分数 0.9%生理盐水使其通过血液循环系统排尽小鼠体内血液,待流出液清亮时关闭生理盐水阀门,用质量分数 4%多聚甲醛(PFA)持续灌注固定 10 min 左右,至小鼠身体僵硬、肝脏和眼球发白时,开颅取小鼠大脑。用振荡切片机进行冠状切片(厚度 50 μm),然后进行免疫组织化学染色。

(2)染色。①取海马冠状切片,用质量分数 3% H₂O₂ 漂洗 10 min 封闭内源性过氧化物酶;②0.1 mol/L PB(pH 7.4)充分漂洗,用蒸馏水缓冲处理 10 min;③加入 2 mol/L HCl 在 37℃条件下孵育 30 min;④0.1 mol/L (pH 8.5)硼酸溶液充分漂洗(15 min/次,3 次);⑤加入一抗大鼠抗 BrdU(1:1 000)4℃孵育过夜;⑥PB 漂洗,加入二抗生物素

化兔抗大鼠(1:300)4℃孵育过夜;⑦PB 漂洗,加入 SABC(1:300 Streptavidin)室温孵育 1 h;⑧PB 漂洗,DAB 显色试剂盒显色 2 min,PB 漂洗并经梯度酒精脱水和二甲苯透明后中性树胶封片观察。

1.2.2 BrdU 阳性细胞计数 在结构照明显微镜下观察 DAB 染色切片,统计齿状回 SGZ 区 BrdU 阳性细胞数量,测量整个齿状回 SGZ 区的长度,门区(hilus)内的 BrdU 阳性细胞不作统计,计算齿状回 SGZ 区单位长度(1 000 μm)内的 BrdU 阳性细胞数。

1.2.3 细胞增殖相关基因表达的检测 本试验选取与细胞增殖相关的基因,包括 *JNK3*、*Akt1*、*Gsk-3β*、*RhoA*、*Rac1*,用 Primer 5.0 软件设计各基因的特异性引物(表 1),内参基因为 *GAPDH*。试验结束后,小鼠断颈处死,体视显微镜下分离小鼠左右两侧的海马组织,参照 Trizol 法提取总 RNA,通过反转录获得 cDNA 模板,RT-PCR 检测海马中各增殖相关基因转录水平的变化。2%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果,用 Image J 软件对 PCR 产物条带进行灰度值分析,以各增殖基因与内参基因 *GAPDH* 灰度值的比值作为该基因的相对表达量。

表 1 本研究 RT-PCR 中所用的引物序列

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank number	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Product length
<i>JNK3</i>	NM_001081567	F:ATGAGCCTCCATTTCTTATACTAC R:TCACCTGCAACAACCCAAC	55	1 395
<i>Akt1</i>	BC066018	F:ATGAACGACGTAGCCATTGTG R:GGCTGTGCCACTGGCTGAG	53	1 440
<i>Gsk-3β</i>	NM_019827	F:ATGTCGGGGCGACCGAGAACCAC R:GGTGGAGTTGGAAGCTGATGCAG	58	1 260
<i>RhoA</i>	JN971019	F:ATGGCTGCCATCAGGAAGAAAC R:TCACAAGATGAGGCACCCAGAC	53	582
<i>Rac1</i>	JN971018	F:ATGCAGGCCATCAAGTGTGTG R:TTACAACAGCAGGCATTTTCTC	53	579
<i>GAPDH</i>	NM_008084	F:GGTGCTGAGTATGTCTGTGGAG R:AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATG	60	291

1.3 数据统计分析

所有试验数据用 GraphPad Prism v5.0 软件进行 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 丙烯酸胺对小鼠运动行为和体质量的影响

试验开始前各组小鼠体质量为(30±2)g/只,无明显差异。试验后各组小鼠运动行为和体质量变

化如图 1 所示。由图 1 可知,对照组小鼠正常采食饮水,被毛整洁有光泽,行为活动正常(图 1-A),体质量(31.38±1.21)g/只。经过 14 d 丙烯酸胺腹腔注射染毒的染毒组小鼠被毛粗乱无光泽,精神萎靡,走路摇摆,后肢无力,有时走路后肢呈劈叉姿势(图 1-B),无法站立;染毒组小鼠采食量和饮水量均下降,体质量(26.62±1.49)g/只,极显著低于对照组($P<0.01$)(图 1-C)。

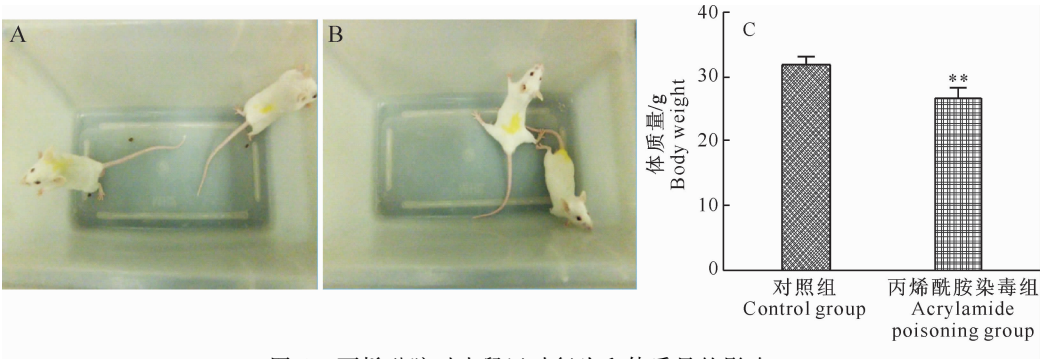


图 1 丙烯酰胺对小鼠运动行为和体质量的影响

A. 对照组;B. 丙烯酰胺染毒组;C. 小鼠体质量变化

、 * 分别表示与对照组有显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)差异,下同

Fig. 1 Effect of acrylamide on motor behavior and body weight of mice

A. Control group;B. Acrylamide poisoning group;C. Body weight change

* and * * represent significantly($P<0.05$) and very significantly($P<0.01$) difference compared with the control group, respectively. The same below

2.2 丙烯酰胺对小鼠齿状回中成体神经干细胞增殖的影响

对照组小鼠 BrdU 阳性细胞多成簇存在,胞体呈椭圆形、胞核多浓染(图 2-A,B),丙烯酰胺染毒组小鼠 BrdU 阳性细胞胞体形态、胞核染色深浅程度(图 2-C,D)与对照组无明显差异,神经干细胞主要

集中在齿状回的亚颗粒细胞层。对每个小鼠的齿状回 SGZ 区 BrdU 阳性细胞进行统计,结果显示,对照组小鼠单位长度齿状回中 BrdU 阳性细胞数量平均为 29.53 个,丙烯酰胺染毒组阳性细胞数量平均为 19.86 个(图 2-E),丙烯酰胺染毒组 BrdU 阳性细胞数量比对照组极显著降低了 33.90% ($P<0.01$)。

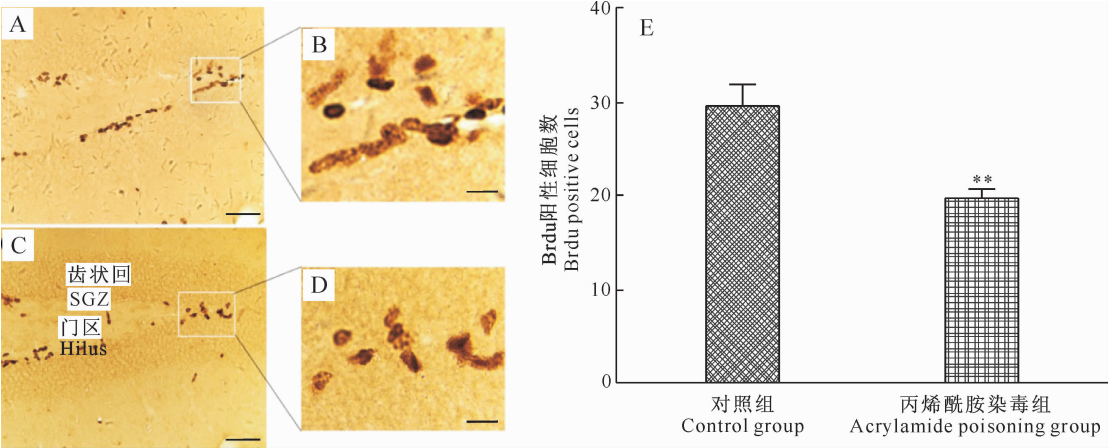


图 2 丙烯酰胺对小鼠齿状回中成体神经干细胞增殖的影响

A. 对照组;B. 图 A 放大效果图;C. 丙烯酰胺染毒组;D. 图 C 放大效果图;E. 2 组小鼠 BrdU 阳性细胞数比较

图 A、C 标尺长度为 100 μm ,B、D 标尺长度为 10 μm

Fig. 2 Influence of acrylamide on proliferation of adult neural stem cells in dentate gyrus of mice

A. Control group;B. Amplification of picture A;C. Neural stem cell of dentate gyrus in acrylamide poisoning group;

D. Amplification of picture C;E. Number of BrdU positive cells in the two groups;

Scale length in picture A and C is 100 μm while that in B and D was 10 μm

2.3 丙烯酰胺对小鼠海马组织中增殖相关基因 mRNA 表达的影响

图 3 显示,在 *JNK3*、*Akt1*、*Gsk-3 β* 、*RhoA*、*Rac1* 这些增殖相关基因中,mRNA 表达量变化最为明显的是 *Gsk-3 β* ,丙烯酰胺染毒组小鼠海马组织中 *Gsk-*

3 β 的 mRNA 表达量比对照组升高约 3 倍,差异极显著($P<0.01$)。其次是 *Akt1*,其 mRNA 表达量比对照组升高 2 倍多,差异极显著($P<0.01$)。再次是 *RhoA*,其 mRNA 表达量较对照组极显著升高($P<0.01$)。与对照组相比,丙烯酰胺染毒组小鼠

海马组织中 *JNK3* 和 *Rac1* 的 mRNA 表达量均显著升高($P<0.05$)。丙烯酰胺染毒后引起小鼠海马组织中各增殖相关基因的表达量发生变化,说明丙烯酰胺中毒会导致小鼠海马组织中这些基因表达量不同程度的升高。

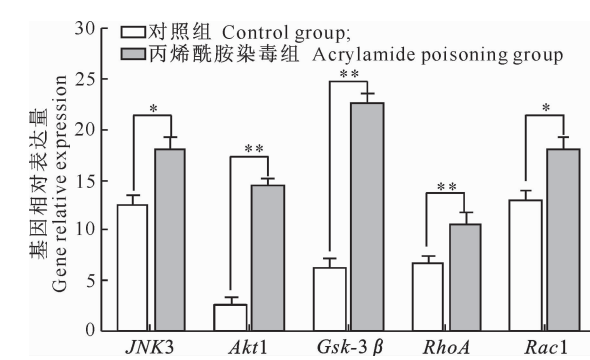


图 3 丙烯酰胺染毒后小鼠海马组织中各增殖相关基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of proliferation genes in hippocampus of mice after acrylamide poisoning

3 讨 论

丙烯酰胺是一种中等毒性的亲神经毒物,水溶性强,可通过多种途径进入生物体内,引起不同程度的神经系统损伤,Smith 等^[13]研究发现,在高剂量丙烯酰胺中毒时,动物机体不仅会出现周围神经受损的症状,而且还会出现中枢神经受损症状。本试验中,对小鼠进行丙烯酰胺染毒后,观察到小鼠走路震颤,后肢无力,有时走路后肢呈劈叉姿势等,这与 Smith 等^[13]研究中所述症状相符,说明丙烯酰胺通过损伤小鼠神经系统导致运动障碍。

哺乳动物成体神经发生主要存在于海马结构中的齿状回和侧脑室壁的室周带。通过改变环境条件和提高机体代谢可以刺激成体神经发生,如加强锻炼、丰富生存环境或限制饮食等^[14]。本试验中丙烯酰胺染毒组小鼠齿状回中的神经干细胞数量、体质量均显著降低,与 Hee 等^[15]有关成体神经发生的研究结果相符,但在 Hee 等^[15]的试验中,染毒组小鼠与对照组小鼠体质量没有表现出明显差异,可能是动物品系、耐药性等因素导致的。丙烯酰胺能影响小鼠成体神经发生,推测神经干细胞数量降低是导致小鼠运动行为障碍的因素之一。

本试验发现,丙烯酰胺染毒组小鼠海马组织中, *JNK3* mRNA 表达量升高,齿状回神经干细胞数量减少,这与前人“*JNK3* 高表达能促进神经干细胞凋亡”的研究结论^[16-17]一致。研究发现, *Gsk-3β* 与神经干细胞增殖相关,在小鼠发育时期,敲除 *Gsk-3β* 后,

整个脑中神经前体细胞大量增殖^[18]。据此可以推断 *Gsk-3β* 是阻碍细胞增殖的一个因素。本研究中丙烯酰胺染毒小鼠海马组织中 *Gsk-3β* 的 mRNA 表达量升高,齿状回中神经干细胞减少。

研究发现,活化的 *Akt* 能促进细胞增殖,若双敲除 *Akt1/Akt2*,细胞增殖速度明显减慢^[19]。另外, Wu 等^[20]用一种降血脂药物处理脑损伤小鼠后,其海马组织中的 *Akt* 磷酸化水平升高,齿状回 SGZ 区中的神经干细胞增殖数量增加。但 *Akt2* 并不介导细胞增殖^[21],因此本试验只检测了 *Akt1* 转录水平的变化,结果发现,与对照组相比,丙烯酰胺染毒组小鼠 *Akt1* 的 mRNA 水平极显著升高,但齿状回中的神经干细胞数量却极显著降低,与 Wu 等^[20]结果不同的原因可能在于蛋白表达水平与转录水平不同,蛋白水平上存在着活性调节,本试验结果说明,丙烯酰胺可能不是通过 *Akt1* 途径来影响成体神经发生的。

Rho 家族蛋白是一种重要的细胞内信号分子,以多种信号途径调节细胞的行为与功能,如细胞收缩、分裂、迁移、凋亡等^[22]。Pierre 等^[23]研究发现, *RhoA* 的持续性激活能阻止细胞中 DNA 从 G1 期向 S 期转化,从而阻止细胞分裂。这与本试验中 *RhoA* 表达量升高、神经干细胞增殖降低的结果相一致。另外,在大脑发育过程中,SVZ 区神经前体细胞的增殖和分化都需要 *Rac1* 的参与^[24]。但是对于 *Rac1* 的具体功能尚不清楚,本试验中 *Rac1* 表达量升高,推测其可能也参与了成体神经干细胞的增殖抑制。

由于本研究仅检测了增殖相关基因 mRNA 水平的变化,而未检测其蛋白水平的变化,因此对丙烯酰胺影响成体神经发生的具体途径,以及这种影响与增殖基因表达之间的关系,仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Exon J H. A review of the toxicology of acrylamide [J]. Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2006, 9: 397-412.
[2] Parzefall W. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 6: 1360-1364.
[3] Tardiff R G, Gargas M L, Kirman C R, et al. Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48: 658-667.
[4] Haase N U, Grothe K H, Matthaus B, et al. Acrylamide formation and antioxidant level in biscuits related recipe and baking [J]. Food Additives & Contaminants Part A, 2012, 29: 1230-1238.
[5] Lopachin R M, Ross J F, Reid M L, et al. Neurological evalua-

- tion of toxic axonopathies in rats; Acrylamide and 2,5-hexanedione [J]. *Neurotoxicology*, 2002, 23: 95-110.
- [6] Lopachin R M. The changing view of acrylamide neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25: 617-630.
- [7] Konefal S, Elliot M, Crespi B. The adaptive significance of adult neurogenesis; an integrative approach [J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2013, 7(21): 1-21.
- [8] Cameron H A, McKay R D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus [J]. *J Comp Neurol*, 2001, 435(4): 406-417.
- [9] Zhao C M, Deng W, Gage F H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis [J]. *Cell*, 2008, 132: 645-660.
- [10] Philippe T. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis; Paradigms, pitfalls, limitations, and validation [J]. *Brain Research Reviews*, 2007, 53(1): 198-214.
- [11] Kuan C Y, Whitmarsh A J, Yang D D, et al. A critical role of neural-specific *JNK3* for ischemic apoptosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 25(100): 15184-15189.
- [12] Wu H T, Lu D Y, Jiang H, et al. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury [J]. *Journal of Neurotrauma*, 2008, 25: 130-139.
- [13] Smith E A, Oehme F W. Acrylamide and polyacrylamide; A review of production, use, environmental fate and neurotoxicity [J]. *Rev Environ Health*, 1991, 9: 215-228.
- [14] Lee J, Duan W, Mattson M P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice [J]. *Neurochem*, 2002, 82: 1367-1375.
- [15] Hee R P, Kim M S, Kim S J. Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis [J]. *Toxicology Letters*, 2010, 193(3): 86-93.
- [16] Mathias G, Sevgie E, Thomas H, et al. C-Jun N-terminal kinases (*JNKs*) and the cytoskeleton-functions beyond neurodegeneration [J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2004, 22(7): 559-564.
- [17] Yang D D, Kuan C Y, Whitmarsh A J, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *JNK3* gene [J]. *Nature*, 1997, 38(9): 865-870.
- [18] Kim W Y, Wang X S, Wu Y H, et al. GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis [J]. *Nature Neuro Science*, 2009, 12: 1390-1397.
- [19] Jennifer E, Skeen P T, Chen C C, et al. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(4): 269-280.
- [20] Wu H T, Lu D Y, Jiang H, et al. Increase in phosphorylation of Akt and its downstream signaling targets and suppression of apoptosis by simvastatin after traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2008, 109: 691-698.
- [21] Lisa H M, Celine F, Vanessa R, et al. Only Akt1 is required for proliferation, while *Akt2* promotes cell cycle exit through p21 binding [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(22): 8267-8280.
- [22] 宋雪慧, 辛 莲, 周俊松, 等. Rac1 蛋白表达与神经前体细胞增殖分化的关系 [J]. *苏州学报(医学版)*, 2009, 29(2): 201-203.
- Song X H, Xin L, Zhou J S, et al. The relations between Rac1 expression and neural progenitor proliferation [J]. *Journal of Suzhou (Medicine Edition)*, 2009, 29(2): 201-203.
- [23] Pierre M, Cristin A F, Michael F. Olson constitutively active *RhoA* inhibits proliferation by retarding G1 to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2009, 88(9): 495-507.
- [24] Dino P, Leone, Karpagam S, et al. The Rho GTPase *Rac1* is required for proliferation and survival of progenitors in the developing forebrain [J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(9): 659-678.