

## 铜对低钾诱导大鼠小脑颗粒神经元凋亡的保护作用

蓝秀健<sup>1,2</sup>, 叶敏忠<sup>1</sup>, 李莹莹<sup>1</sup>, 刘培庆<sup>1</sup>, 余剑平<sup>2</sup>, 皮荣标<sup>1</sup>

(中山大学 1. 药学院药理毒理实验室, 2. 基础医学实验教学中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨铜体外抗低钾诱导大鼠小脑颗粒神经元(CGNs)凋亡作用及其机制。【方法】体外培养大鼠的CGNs并用去极化诱导凋亡模型;噻唑兰(MTT)法检测细胞存活率;相差显微镜及Hoechst 33258染色分别观察细胞及其核形态学变化;流式细胞仪(FCM)检测亚二倍体峰。【结果】1~40 μmol/L的铜可抗低钾所致的大鼠CGNs凋亡,明显提高CGNs的存活率。铜(20 μmol/L)显著减少低钾所致的大鼠CGNs胞体皱缩、细胞核固缩和亚二倍体峰等凋亡特征。铜的神经保护作用可以持续72 h以上。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3-K)抑制剂LY294002可阻断铜的保护作用。【结论】一定浓度范围的铜对低钾所致的大鼠CGNs凋亡有保护作用,PI3-K/Akt信号传导通路可能参与其保护作用。

**关键词:**铜;小脑颗粒神经元;凋亡;磷脂酰肌醇3-激酶

中图分类号:R971

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)02-0154-05

## Neuroprotective Effects of Copper against Apoptosis Induced by Low Potassium in Cultured Rat Cerebellar Granule Neurons

LAN Xiu-jian<sup>1,2</sup>, YE Min-zhong<sup>1</sup>, LI Ying-ying<sup>1</sup>, LIU Pei-qing<sup>1</sup>, YU Jian-ping<sup>2</sup>, PI Rong-biao<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, 2. Basic Medical Experimental Teaching Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects and mechanism of copper on apoptosis of primary cultured cerebellar granule neurons induced by low potassium. 【Methods】Apoptosis was induced by low potassium in cultured rat cerebellar granule neurons. The neuronal viability was measured by MTT. Morphology of neurons and their nuclei were observed by phase-contrast microscopy and Hoechst 33258 staining, separately. The ratio of apoptotic cells was detected by flow cytometry (FCM). 【Results】Appropriate copper (1~40 μmol/L) blocked apoptosis of primary cultured cerebellar granule neurons induced by low potassium. The effects of diminished neuronal body, chromatin concentration and the ratio of apoptotic cells induced by low potassium were markedly weakened by copper. The neuroprotective effect of copper sustained for over 72 h. But the effect can be suppressed by LY294002, a specific inhibitor of PI3-K. 【Conclusion】Copper, at appropriate concentration, was found to protect against apoptosis induced by low potassium in primary cultured cerebellar granule neurons and PI3-K/Akt signaling pathway might be involved in the copper-mediated anti-apoptotic effects.

**Key words:** copper; cerebellar granule neurons; apoptosis; PI3-K

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):154-158]

铜是人体必需的微量元素,正常人血浆铜浓度约为15 μmol/L。微量的铜是细胞色素氧化酶(Cytox)、超氧化物歧化酶、酪氨酸酶等必需的组成部分。现大量研究工作已表明由于环境或基因变

化可能会导致铜在体内平衡的破坏并最终导致各种神经退行性疾病(neurodegenerative disease)。已有报道阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿舞蹈病

收稿日期:2007-10-12

基金项目:国家自然科学基金(30400547);广东省自然科学基金博士启动项目(04300310)

作者简介:蓝秀健(1973-),女,广东罗定人,学士,实验师,E-mail:lanxj@mail.sysu.edu.cn;皮荣标,通讯作者,副教授,硕士生导师,E-mail:pirb@mail.sysu.edu.cn

(Huntington disease, HD)、Wilson 病和 Menkes 病等都与铜的失衡相关<sup>[1-5]</sup>。神经退行性疾病多由中枢神经发生了病理性的程序性死亡所致。如由于基因异常导致体内铜缺乏的 Menkes 病<sup>[6]</sup>患者小脑有颗粒细胞层变薄、神经元细胞减少等特征性变化。Yan 等<sup>[7]</sup>发现低钾可诱导小脑颗粒神经元 (cerebellar granule neurons, CGNs) 凋亡:去极化浓度的  $K^+$  (培养液中含 25 mmol/L 的 KCl, 下简称 25K) 抑制体外培养 CGNs 的凋亡,低钾 (培养液中含 5 mmol/L 的 KCl, 下简称 5K) 则诱导 CGNs 凋亡,其具有典型的形态学和生化特征:包括细胞核明显固缩、凝聚和断裂。该模型现已成为研究神经元凋亡及其信号转导机制的经典模型之一。研究表明,磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3-K) 及其下游激酶 Akt-1 与神经元存活密切相关,是神经元存活的重要通路<sup>[8,9]</sup>。微量的铜是否干扰低钾诱导 CGNs 凋亡,以及通过什么机制影响 CGNs 的存活尚未见报道。因此,本文在用低钾诱导体外培养的 CGNs 发生凋亡后,观察微量的铜对 CGNs 凋亡是否具有保护作用并探讨其与 PI3-K/ Akt 通路的关系,为神经退行性疾病中铜的作用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动 物

出生 7~8 d 的 SD 乳鼠,体质量 16~19 g,雌雄兼用。由中山大学实验动物中心提供。

### 1.2 药 品

Basal Medium Eagle 培养基 (BME) 和胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 均为 Gibco BRL 产品。胰酶 (trypsin), 脱氧核糖核酸酶 (DNase), 胰酶抑制剂, 阿糖胞苷 (Ara-c), 多聚赖氨酸, 溴化乙啶 (ethidium bromide, EB), Hoechst 33258, 琼脂糖凝胶等均为 Sigma 公司产品。LY294002 购自美国 Calbiochem 公司。DNA 分子量标准 DL2000 购自日本 Takara Biotech 公司。其余试剂为国产分析纯。

### 1.3 仪 器

$CO_2$  细胞培养箱购于 Thermo Electron Corporation; 荧光倒置显微镜购于 Leica 仪器有限公司; DYY-8C 型电泳仪购于北京市六一仪器厂, Elx-800 型酶标仪购于 Bio-Tek 公司, YJ-875S 医用净化工作台购于苏州净化设备有限公司等等。

## 1.4 方 法

1.4.1 CGNs 离体培养 参照 Yan 等<sup>[7]</sup>介绍的方法建立原代大鼠 CGNs 培养及凋亡模型。

1.4.2 分 组 将含血清和 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基换成无血清含 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基 16 h 后才开始分组。①对照组 (Control, CT 或 25 K): 不再加药, 只同时换无血清含 25 mmol/L KCl 的 BME 培养; ②低钾模型组 (5K): 将无血清 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基换成含 5 mmol/L KCl 的 BME 培养基; ③  $Cu^{2+}$ +5K 组: 加入用含 5 mmol/L KCl 的培养液稀释  $CuCl_2$  成 1、5、10、20、30、40  $\mu$ mol/L 的培养基; ④  $Cu^{2+}$ +25K 组: 加入用含 25 mmol/L KCl 的培养液配成 20  $\mu$ mol/L  $CuCl_2$  的培养基; ⑤ LY+ $Cu^{2+}$ +5K 组: 加入用含 5 mmol/L KCl 的培养液中配成 20  $\mu$ mol/L LY294002 和 20  $\mu$ mol/L  $CuCl_2$  的培养基; ⑥ LY+25K 组: 加入用含 25 mmol/L KCl 的培养液配成 20  $\mu$ mol/L LY294002 的培养基; ⑦ LY+5K 组: 加入用含 5 mmol/L KCl 的培养液配成 20  $\mu$ mol/L LY294002 的培养基。

1.4.3 细胞存活率分析 按文献<sup>[10]</sup>的 MTT 方法, 各因素处理后, 按照设定组给药后 24 h, 加入 MTT 工作液 (终浓度为 0.5 mg/mL), 继续培养 4 h, 吸去上清液, 加入相应培养基体积的 DMSO 溶液, 振荡混匀 10 min 后, 酶标仪检测各孔的 570 nm 处吸光度值。

1.4.4 相差显微镜观察神经元形态学 按 Yan 等<sup>[7]</sup>的方法, 各因素处理后, 按照预定的时间于倒置相差显微镜 (Leica,  $\times 400$  倍视野) 观察并拍照神经元的形态学改变。

1.4.5 Hoechst33258 核染色进行核形态学分析 按 Yan<sup>[7]</sup>的方法, 各因素处理后, 用 PBS 4  $^{\circ}C$  洗 2 次, 40 g/L 多聚甲醛液 (4  $^{\circ}C$ , 溶于 PBS) 固定 15 min, 移去固定液, 用蒸馏水清洗 2 次, 每孔加入 5  $\mu$ g/mL Hoechst 33258 室温孵育 5 min, 用蒸馏水清洗 2 次, 在荧光倒置显微镜下观察细胞核形态学变化并随机拍照 (激发波长 200~380 nm, 可释放波长 420 nm 的蓝色荧光)。

1.4.6 细胞 DNA 亚二倍体凋亡峰检测 按文献<sup>[11]</sup>的方法, 各因素处理后, 移去培养液, 培养 24 h 后, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化收集各组细胞, PBS 反复洗 2 次, 最后将细胞重悬于 700 mL/L 的乙醇中, 4  $^{\circ}C$  固定过夜, 加入 RNase (1 g/L), 37  $^{\circ}C$  处理 1 h,

用碘化丙啶(PI)对样品 DNA 荧光染色,然后上流式细胞仪检测各组细胞的 DNA 亚二倍体凋亡峰。

1.4.7 统计学分析 所有实验用不同批次的神经元重复 3 次。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计软件 SPSS 11.0 进行数据处理,不同组间神经元存活率分析采用方差分析(ANOVA)检验,有显著意义后用最小有意义差异  $t$  检验 (least significant difference- $t$  test, LSD- $t$ )进行均数间的多重比较,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 铜抗低钾诱导 CGNs 凋亡的浓度范围

低钾作用 CGNs 24 h 后,低钾模型组神经元生存率急剧下降  $65.4\% \pm 1.9\%$ ,与对照组(100%)生存率比较, $P < 0.001$ ;不同浓度(1、5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ )的  $\text{Cu}^{2+}+5\text{K}$  组,神经元生存率都有上升,分别为: $72.6\% \pm 1.8\%$ 、 $77.3\% \pm 1.6\%$ 、 $79.6\% \pm 2.1\%$ 、 $82.8\% \pm 2.4\%$ 、 $81.9\% \pm 1.7\%$ 和  $77.0\% \pm 1.5\%$ ,各浓度与低钾模型组相比, $P < 0.001$ ;不同浓度(10、20、30  $\mu\text{mol/L}$ )的  $\text{Cu}^{2+}+5\text{K}$  组之间无显著性差异( $P > 0.05$ ),但与 1、5、40  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Cu}^{2+}+5\text{K}$  组有显著性差异( $P < 0.05$ )。经 SPSS 软件分析,各组数据服从正态分布及具方差齐性(总  $F = 42.48$ ,  $P < 0.001$ ,  $n=6$ )。因此,以 5 ~ 30  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围的微量  $\text{Cu}^{2+}$  抗凋亡的效果最好,以后实验中我们选用 20  $\mu\text{mol/L}$  的铜的浓度作为其对低钾诱导 CGNs 凋亡保护作用的有效浓度。

### 2.2 相差显微镜及Hoechst 染色观察

相差显微镜下观察对照组 CGNs 胞体饱满透亮,细胞突起以及由之构成的网络紧密、清晰而完整(图 1A)。在低钾模型组中触发 CGNs 凋亡,神经元大部分胞体出现皱缩,胞体明显缩小,神经元突起及网络出现紊乱,轴突及树突断裂或消失(图 1B)。而在 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  与低钾共同作用 CGNs 组,大部分神经元都能保持胞体和突起的完整(图 1C)。Hoechst33258 染色的方法在荧光显微镜下观察可见正常细胞核体积较大,较圆,表面光滑,细胞核发出弥散均匀蓝色荧光(图 1A);低钾模型组可见大部分胞核体积明显变小,皱缩,呈浓染致密的颗粒块状,有时可见核碎裂成小叶状的凋亡细胞核(图 1B);20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  与低钾共同作用 CGNs 组的凋亡细胞核形态和凋亡小体明显减少(图 1C)。

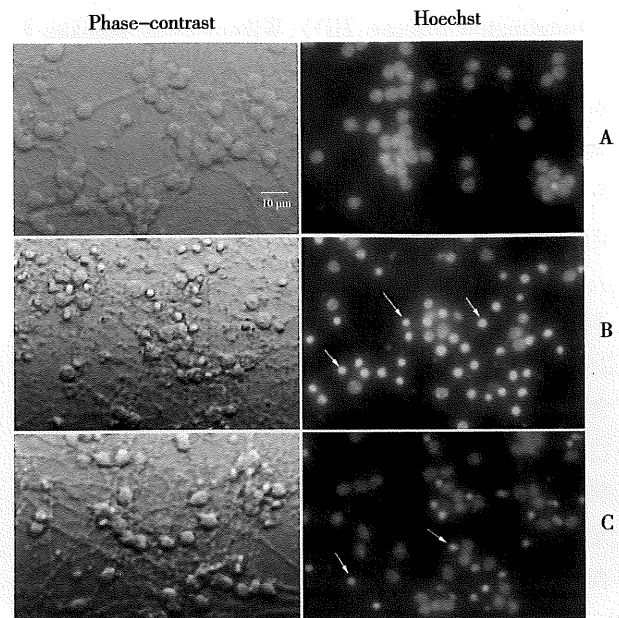


图 1 相差显微镜及Hoechst 染色

Fig.1 Phase-contrast micrographs and Hoechst33258staining

A: control group; B: 5K group; C: 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}+5\text{K}^+$  group; The arrows denote the apoptotic neurons;  $\times 400$

### 2.3 FCM 检测凋亡峰

流式细胞仪检测凋亡峰(图 2)中,正常对照组 CGNs 的凋亡率较少,约为 1.5%;低钾模型组凋亡

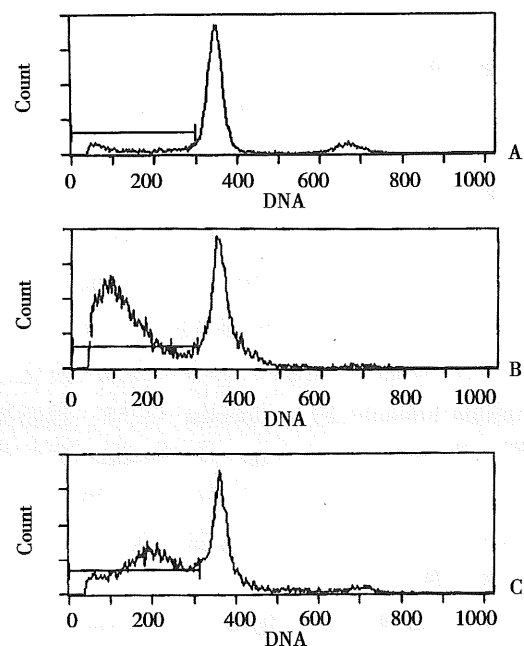


图 2 FCM 检测  $\text{Cu}^{2+}$  抗低钾诱导 CGNs 凋亡作用

Fig.2 The effect of  $\text{Cu}^{2+}$  protected CGNs against apoptosis induced by 5K were evaluated by FCM

A: control group; B: 5K group; C: 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}+5\text{K}$  group

率很高,约为70%;而加20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ 组凋亡率明显减少,约为30%。由此可观察到铜对低钾诱导CGNs凋亡的保护作用。

#### 2.4 铜抗低钾诱导CGNs凋亡作用的时效性

低钾作用CGNs后,培养24 h、48 h、72 h时神经元存活率随着作用的时间不断延长而下降,分别为 $70.6\% \pm 1.4\%$ 、 $60.3\% \pm 1.2\%$ 、 $57.1\% \pm 1.7\%$ ;而20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ 与低钾共同作用组的生存率明显高于低钾模型组,分别为 $90.8\% \pm 1.8\%$ 、 $72.6\% \pm 1.2\%$ 、 $68.5\% \pm 2.4\%$ ,不同时间点上,两组比较 $P < 0.001$ ,经SPSS软件分析,各组数据服从正态分布及具方差齐性(总 $F = 188.07$ , $P = 0.000$ , $n = 6$ )。

#### 2.5 观察LY294002对铜抗低钾诱导CGNs凋亡的作用

PI3K/Akt通路是介导存活的一条经典通路,LY294002为AKT上游激酶PI3-K的特异抑制剂,可以抑制AKT的磷酸化进而阻断该通路的信号传导。LY294002对铜抗低钾诱导CGNs凋亡的作用结果见图3。由图3可知,LY+ $\text{Cu}^{2+}$ +5K组作用24 h后,与 $\text{Cu}^{2+}$ +5K组比,使神经元存活率大大下降,提示LY294002可逆转微量铜抗低钾诱导的CGNs凋亡的作用。

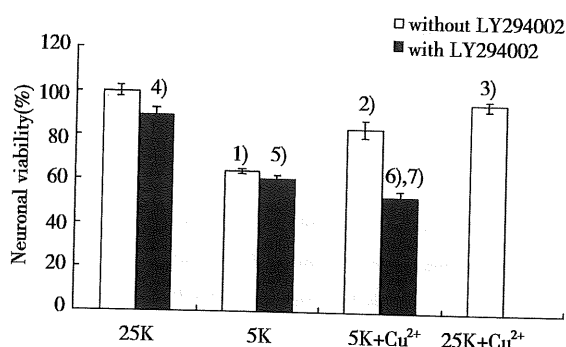


图3 LY294002对铜抗低钾诱导的大鼠CGNs凋亡的影响

Fig. 3 The effects of LY294002 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) on anti-apoptotic action of  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) preconditioning in cultured rat cerebellar granule neurons

Neuronal survival% = (survival cells in the treated groups/survival cells in the control group)  $\times 100\%$ . 25K group is the control group. ANOVA was performed and revealed a significant effect ( $F = 48.50$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 6$ ). Post hoc tests showed: 1)  $P < 0.001$  for compared with 25K group; 2)  $P < 0.001$  for compared with 5K group; 3)  $P > 0.05$  for compared with 25K group; 4)  $P < 0.05$  for compared with 25K group; 5)  $P > 0.05$  for compared with 5K group; 6)  $P < 0.001$  for compared with  $\text{Cu}^{2+}$ +5K group; 7)  $P < 0.001$  for compared with LY+5K group.

## 3 讨论

### 3.1 铜的神经保护作用

神经退行性疾病多由中枢神经发生了病理性的程序性死亡所致,它是神经系统正常发育的必经之路,而成熟的神经元不能再生增殖,因而,如何减少因病理性凋亡而损失的神经元显得尤其重要。铜是人体必需的金属离子,是体内氧化还原酶和单氧化酶类的辅助因子,存在于细胞色素C氧化酶、多巴胺- $\beta$ -羟化酶、超氧化物歧化酶、肽- $\alpha$ -酰胺酶、赖氨酸氧化酶、酪氨酸酶和铜蓝蛋白等蛋白质中,铜在这些酶类的氧化代谢中起重要作用。体内铜代谢是否正常,关系到多脏器正常生理运转功能,尤其神经系统,其一旦损害则恢复较为困难。铜在体内的失衡与神经退行性疾病密切相关,铜的增加或缺失都可导致神经退行性疾病<sup>[1-6]</sup>。本实验从细胞形态学观察、Hocchst33258核染色、FCM观察细胞凋亡峰、存活率等方法角度进行观察,发现微量的铜能够在一定浓度范围内对低钾所致的CGNs凋亡有保护作用,此作用具长时效性。由此进一步证实,微量元素铜在神经退行性疾病具有重要的作用,维持神经系统中铜适量的浓度可抑制神经元凋亡的进程。

### 3.2 铜神经保护作用的机制

磷脂酰肌醇3-激酶/AKT(PI3-K/AKT)信号传导通路是促神经元存活通路<sup>[12]</sup>。本实验中,LY294002可逆转微量铜抗低钾诱导的CGNs凋亡的作用,使神经元存活率下降,提示PI3-K/AKT信号传导通路可能参与铜的神经保护作用。PI3K/Akt信号传导通路活化可以抑制多种刺激诱发的细胞凋亡,促进细胞周期进展,从而促进细胞的生存和增殖。通常,维持神经元存活因素作用于神经元后,信号传入细胞内激活PI3-K,进而催化形成磷酸肌醇-3,4-磷酸以激活丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶Akt。Akt主要作用于抗凋亡通路,因为显性负效应Akt能阻止由类胰岛素生长因子1(IGF1)介导的存活,持续激活Akt能够阻止由PTEN介导的凋亡。Akt通过对其下游的靶蛋白进行磷酸化而发挥其抗凋亡的作用,如Akt能通过磷酸化Bcl-2家族成员BAD和蛋白水解酶Caspase-9而阻止凋亡;还能磷酸化转录因子Forkhead家族成员FKHR,通过抑制FKHR的核转位以及FKHR

的基因靶点 BIM 和 FAS 配体的激活而抑制凋亡;此外,Akt 还能通过对 NF-KB 和 p53 的间接作用影响细胞存活,Akt 通过磷酸化激活 KB 激酶 (IKK)导致 NF-KB 的抑制剂 IKB 的降解,从而使 NF-KB 从细胞质中释放出来进行核转位,激活其靶基因而促进细胞的存活<sup>[13,14]</sup>。LY294002 为 AKT 上游激酶 PI3-K 的特异抑制剂,可以抑制 AKT 的磷酸化进而阻断该通路的信号转导。去极化浓度的 K<sup>+</sup>促进许多种神经元,包括 CGNs 的存活。高钾的这种“促生存”效应依赖磷脂酰肌醇 3-激酶/AKT (PI3-K/AKT)<sup>[15]</sup>。但也有研究如 Dudek 等<sup>[16]</sup>的实验结果不同,他们认为 LY294002 对在含血清和高钾的培养基中生长的神经元无影响。最近 Barthel 等<sup>[17]</sup>新报道铜在多种细胞上能激活 PI3-K/AKT 通路。但本实验的结果与 Barthel 的报道相符合,铜的神经保护作用可能与激活 PI3-K/AKT 信号传导通路有关。

本实验还有一有趣的现象是 LY294002 不但逆转铜抗低钾诱导 CGNs 凋亡作用,而且可能诱发低剂量的铜对 CGNs 毒性作用。但 20  $\mu\text{mol/L}$  LY294002 本身对 25 mmol/L KCl 的无血清培养基中 CGNs 存活率有一定的影响。虽然 LY294002 对低钾诱导的 CGNs 凋亡影响不大,但与铜共同作用后是否激发其它凋亡机制,这有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Magaki S, Raghavan R, Mueller C, et al. Iron, copper, and iron regulatory protein 2 in Alzheimer's disease and related dementias [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 418(1): 72-76.
- [2] Llanos RM, Mercer JF. The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders[J]. *DNA Cell Biol*, 2002, 21(4):259-270.
- [3] 何德富, 张 贝, 翁恩琪. 帕金森病的环境诱发因子 [J]. *中国临床康复*, 2005,9(33):120-122.
- [4] Harris ED. Basic and clinical aspects of copper[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, 40(5):547-586.
- [5] 向晓辉. 铜和阿尔茨海默病 [J]. *国外医学:医学地理分册*, 2003, 24(02):54-56.
- [6] 高 晶, 郭玉璞, 高淑芳, 等. Menkes 病的临床及病理[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2006,6(03):173-178.
- [7] Yan GM, Ni B, Weller M, et al. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons [J]. *Brain Res*, 1994,656(1):43-51.
- [8] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery[J]. *Cell*, 1997,91(2):231-241.
- [9] 曹 林, 江伟健, 苏兴文, 等. LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005,26(01):4-10.
- [10] Pi R, Li W, Lee NT, Chan HH, et al. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways[J]. *J Neurochem*, 2004, 91(5):1219-1230.
- [11] 邱鹏新, 黎明涛, 唐孝礼, 等. 黑海参多糖对  $\beta$ -淀粉样蛋白诱导的皮质神经元凋亡的保护作用 [J]. *中草药*, 2000,31(04):271-273.
- [12] Cao L, Cao DX, Su XW, et al. Activation of PI3-K/Akt pathway for thermal preconditioning to protect cultured cerebellar granule neurons against low potassium-induced apoptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(2): 173-179.
- [13] Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(11):657-664.
- [14] Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, et al. Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(11):2838-2852.
- [15] Miller TM, Tansey MG, Johnson EM Jr, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells[J]. *Biol Chem*, 1997, 272(15):9847-9853.
- [16] Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt [J]. *Science*, 1997, 275(5300):628-630.
- [17] Barthel A, Ostrakhovitch EA, Walter PL, et al. Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 463(2):175-182.

(编辑 孙慧兰)