

文章编号:1001-6880(2015)1-0158-05

黄芪多糖和葡萄籽提取物对衰老模型小鼠负重游泳时间和血常规参数的影响

徐海军*,陶文众,彭欢欢,张林,许玉宝,金露

皖西学院生物与制药工程学院健康养殖与动物疫病监测预警工程技术中心,六安 237012

摘要:比较日粮中单独添加或同时添加黄芪多糖、葡萄籽提取物对衰老模型小鼠负重游泳时间和血常规参数的影响。采用在日粮中添加 0.5% 半乳糖构建衰老小鼠动物模型,并将衰老模型小鼠分为模型对照组、黄芪多糖处理组、葡萄籽提取物处理组、黄芪多糖 + 葡萄籽提取物处理组,每组 10 只。黄芪多糖和葡萄籽提取物的添加量均为 0.1%。试验第 42 d 时进行负重游泳时间测定,第 43 d 时眼眶采血,检测血常规参数。结果显示与衰老模型组相比,同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物,可显著提高小鼠的负重游泳时间,显著降低血液粒细胞数和红细胞平均血红蛋白含量;分别单独添加黄芪多糖和葡萄籽提取物均可显著降低红细胞体积分布宽度、血红蛋白浓度和红细胞平均血红蛋白含量。说明黄芪多糖和葡萄籽提取物同时添加对衰老模型小鼠的负重游泳时间有较好延长作用,单独或同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物对于衰老模型小鼠部分血常规参数有一定影响。

关键词:黄芪多糖;葡萄籽提取物;衰老;小鼠;血常规参数

中图分类号:S816.75

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.032

Effects of Astragalus Polysaccharides and Grape Seed Extract on Loaded Swimming Time and Blood Parameters in Aging Mice Model

XU Hai-jun, TAO Wen-zhong, PENG Huan-huan, ZHANG Lin, XU Yu-bao, JIN Lu

Animal healthy breeding & animal epidemic monitoring and early warning center, College of biological and pharmaceutical engineering, west Anhui University, Anhui Luan 237012, China

Abstract: The effects of dietary supplementation with Astragalus polysaccharides (APS) and grape seed extract (GSE) individually and together on loaded swimming time and blood parameters in aging mice model were investigated in this study. The aging mice model was induced by dietary supplementation with 0.5% D-galactose. Forty aging mice model were randomly assigned to four treatment groups as aging model control, APS group, GSE group and APS + GSE group with 10 mice in each treatment. APS and GSE both supplemented at the dose of 0.1% of diet. Loaded swimming time and blood parameters were determined on the 42 day and 43 day respectively after the beginning of the experiment. The results showed that the mice had markedly increased loaded swimming time, decreased significantly granulocyte counts and mean corpuscular hemoglobin (MCH) in APS + GSE treatment as compared with aging model control; the mice treated by APS or GSE had significantly decreased red blood cell volume distribution width (RDW), hemoglobin (HGB) and mean corpuscular hemoglobin (MCH). These results suggested that dietary supplementation with APS and GSE can significantly prolong loaded swimming time in aging mice model while individual or simultaneous dietary supplementation with APS and GSE can affect some blood parameters.

Key words: Astragalus polysaccharides; grape seed extract; aging; mice; blood parameters

随着我国人民生活水平的提高和生活方式的改变,以及社会主流消费群体中“丁克族”、“单身贵族”的出现和老年独居人群、独生子女数量的增加,

宠物产业迅速兴起。宠物饲料是宠物饲养中的最大支出,占整体宠物市场的 71%,具有很大的市场空间。中草药植物提取物为纯天然绿色产品,添加剂量小、适口性好、毒副作用小,能全面调整机体生理功能,符合当今时代发展潮流。随着宠物养殖和宠物饲料工业的发展以及人们环保意识的不断增强,中草药植物提取物作为一种新型的宠物饲料添加剂

收稿日期:2014-08-25 接受日期:2014-11-19

基金项目:安徽省教育厅自然科学研究项目(KJ2011B215);皖西学院大学生创新创业训练计划项目(201210376036)

* 通讯作者 E-mail:xhjflyng@aliyun.com

受到越来越广泛的重视和应用^[1,2]。宠物随着年龄的增长,也会出现与人类相似的衰老现象。宠物主人饲养宠物的时间越长,对宠物的感情往往也更深厚,更希望所饲养的宠物能尽可能长久地保持健康和活力。因此,开发具有抗衰老作用的宠物饲料将具有很好的市场前景。

黄芪多糖是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的水溶性杂多糖。黄芪多糖具有抗氧化、提高免疫力、增强体质、抗肿瘤、肠道保健、抗病毒、抗细菌、抗衰老和抗辐射等作用^[3,4]。许多研究表明,在日粮中添加黄芪多糖,可以改善动物的生长性能和产品品质^[5-7]。葡萄籽提取物是从酿酒葡萄籽中提取的一种多酚类物质的混合物,其主要活性成分是葡萄籽原花青素^[8]。研究表明,葡萄籽原花青素具有抗氧化、降血脂、降血糖、抗炎和免疫调节等多种功能^[9-11]。有关在日粮中添加这两种物质对衰老动物负重游泳时间和血常规参数的影响还鲜见研究。本研究比较了日粮中单独添加或同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物对衰老模型小鼠负重游泳时间和血常规参数的影响,以期为将其开发成抗衰老宠物饲料添加剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

葡萄籽提取物(低聚体占64%,原花青素含量为98%,购自天津尖峰天然产物有限公司);黄芪多糖[纯度:每1g含黄芪多糖以葡萄糖计为571 mg,每1g黄芪多糖粉相当于原生药7 g,购自爱迪森(北京)生物科技有限公司];D-半乳糖(Sigma);肝素锂抗凝管(山东奥赛特医疗器械有限公司);HC海迈血液测试系统(山东美医林电子仪器有限公司)。

1.2 实验动物、分组与饲养管理

健康昆明种雄性小鼠(体重 23.5 ± 2.35 g,购自安徽医科大学实验动物中心,动物合格证号:皖医实动准第01号)40只,适应性喂养一周,空腹称重。随机分为模型对照组、黄芪多糖处理组、葡萄籽提取物处理组、黄芪多糖+葡萄籽提取物处理组,每组10只,分两笼饲养,每笼5只小鼠。模型对照组在小鼠标准饲料中添加0.5%半乳糖,黄芪多糖处理组、葡萄籽提取物处理组和黄芪多糖+葡萄籽提取物处理组饲料中除添加0.5%半乳糖外,还分别添加0.1%的黄芪多糖、0.1%葡萄籽提取物和0.1%的黄芪多糖+0.1%葡萄籽提取物。小鼠饲养在塑

料饲养笼中,饲养笼底部垫有锯末屑,顶部为钢丝网盖,配有自动饮水器,室温(25 ± 1)℃,相对湿度50±5%,自由饮水。

1.3 负重游泳时间测定

试验第42 d时,对各组小鼠称重,根据体重进行负重游泳试验,负重方法为在小鼠尾巴悬挂体重15%的重物。泳池采用水深40 cm,直径30 cm的塑料桶。水温25℃左右。轻轻将小鼠放入泳池中时开始计时,在观测过程中若有小鼠弓腰静止悬浮休息,则用玻璃棒进行刺激,使之游动。当小鼠沉入水下10 s,不能浮出水面时终止计时。

1.4 血常规参数测定

负重游泳试验结束后第2 d,即试验第43 d早上,空腹从眼眶采血,肝素锂抗凝,用HC海迈血液测试系统检测各项血常规参数。

1.5 数据统计和分析

采用DPS软件对各项指标进行单因素方差分析,并用Duncan氏法进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 实验结果

各处理组小鼠负重游泳时间和血常规参数测定结果见表1。从表1可见,与衰老模型组相比,同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物可提高小鼠的负重游泳时间($P < 0.05$);单独添加黄芪多糖或葡萄籽提取物对负重游泳时间影响不显著($P > 0.05$)。

在血常规参数方面,与衰老模型组相比,同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物显著降低小鼠的粒细胞数($P < 0.05$),极显著降低小鼠红细胞平均血红蛋白含量(MCH)($P < 0.01$);单独添加黄芪多糖显著降低红细胞分布宽度(RDW)($P < 0.05$),极显著降低血红蛋白浓度(HGB)($P < 0.01$)、MCH($P < 0.01$)和红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)($P < 0.01$);单独添加葡萄籽提取物极显著降低红细胞平均体积(MCV)($P < 0.01$)、RDW($P < 0.01$)和MCH($P < 0.01$)。

3 讨论

目前常用一些动物模型来研究人类衰老。这些模型中,D-半乳糖致衰老模型造模时间短、操作简便、模型易于建成、重复性好,表现出与自然衰老动物相似的衰老体征,已成为国内较公认的衰老动物模型^[12]。D-半乳糖致衰老模型的原理是在一定时

表 1 黄芪多糖和葡萄籽提取物对衰老模型小鼠负重游泳时间和血常规参数的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *astragalus* polysaccharides and grape seed extract on the loaded swimming time and blood parameters in aged mice model ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

指标 Index	衰老模型组 Aged mice model group	黄芪多糖组 Supplement with ASP	葡萄籽提取物组 Supplement with GSE	同时添加组 Supplement with ASP and GSE
负重游泳时间 Loaded swimming time (S)	74.2 ± 33.75 bAB	62.6 ± 27.85 bB	90.7 ± 41.29 abAB	114.9 ± 37.85 aA
粒细胞数 Granulocyte counter ($10^9/L$)	1.56 ± 0.279 a	1.56 ± 0.725 a	0.98 ± 0.642 ab	0.82 ± 0.614 b
粒细胞比率 Granulocyte percent (%)	17.7 ± 4.30	18.3 ± 4.49	14.5 ± 4.59	13.0 ± 4.75
淋巴细胞数 Lymphocyte count ($10^9/L$)	5.63 ± 1.270	5.94 ± 1.697	5.28 ± 2.401	4.51 ± 1.379
淋巴细胞比率 Lymphocyte percent (%)	66.3 ± 3.29 b	71.0 ± 9.25	72.0 ± 8.74	75.6 ± 9.84
中间细胞数 Intermediate cell counter ($10^9/L$)	1.23 ± 0.260	1.18 ± 0.549	1.02 ± 0.497	0.85 ± 0.574
红细胞总数 Erythrocyte counter ($10^{12}/L$)	5.11 ± 0.888	5.57 ± 0.329	5.49 ± 0.430	5.80 ± 0.820
红细胞压积 Hematocrit (%)	36.4 ± 6.34	39.5 ± 2.53	37.6 ± 2.08	40.1 ± 4.55
红细胞平均体积 Mean Corpuscular Volume (fL)	73.3 ± 3.54 aA	71.0 ± 3.17 abAB	67.4 ± 5.64 bB	72.1 ± 4.35 aAB
红细胞体积分布宽度 RBC volume distribution width (RDW) (%)	34.8 ± 1.68 aA	32.7 ± 1.36 bAB	32.1 ± 1.64 bB	34.4 ± 1.64 aA
血红蛋白浓度 Hemoglobin (HGB) (g/L)	127.1 ± 8.19 aA	111.1 ± 11.77 bB	114.3 ± 14.60 abAB	116.11 ± 10.90 abAB
红细胞平均血红蛋白含量 mean corpuscular hemoglobin (MCH) (pg)	23.7 ± 4.52 A	18.9 ± 1.07 B	19.7 ± 1.16 B	19.9 ± 1.64 B
红细胞平均血红蛋白浓度 mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) (g/L)	318.3 ± 55.74 A	267.1 ± 19.93 B	281.1 ± 36.89 AB	276.3 ± 20.93 AB
血小板总数 Platelet (PLT) ($10^9/L$)	1171.78 ± 192.759 AB	1001.13 ± 134.546 B	1188.25 ± 138.646 AB	1282.20 ± 234.240 A
血小板压积 platelet crit (PCT) (%)	0.35 ± 0.075	0.30 ± 0.040	0.31 ± 0.043	0.33 ± 0.048
血小板平均体积 mean platelet volume (MPV) (fL)	2.69 ± 0.436	2.59 ± 0.327	2.39 ± 0.318	2.35 ± 0.288
血小板分布宽度 platelet volume distribution width (PDW) (%)	12.5 ± 0.35	12.6 ± 0.12	12.5 ± 0.28	12.5 ± 0.18
血小板大细胞比率 Platelet-large cell rate (P-LCR) (%)	40.9 ± 14.14	38.6 ± 8.13	42.9 ± 10.93	39.5 ± 12.22

注:同行数据标注不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$),标注不同大写字母表示有极显著差异 ($P < 0.01$);表中数据每组样本个数为 10 ($n = 10$)。

Note: The data within same row with different lowercase letters and capital letters indicated significant ($P < 0.05$) and very significant ($P < 0.01$) differences; Each result was the mean of 10 samples.

间内,连续给动物注射大剂量 D-半乳糖,使机体细胞内半乳糖浓度增高,在醛糖还原酶的催化下,生成半乳糖醇,这种物质不能被细胞进一步代谢,而堆积在细胞内,影响正常渗透压,使细胞肿胀,引起机体多器官、多系统的功能障碍,最终导致衰老的发生^[13]。该模型在整体水平上与自然衰老比较相似,因此被广泛用于脑老化、白内障、筛选药物以及评价具有延缓衰老的保健品等方面的研究^[14-16]。但由于 D-半乳糖致衰老效应需时较长,长期重复注射给药有诸多不利,如易引起感染、药物吸收不良、动物体重下降及其他不良反应,致使模型研究不能获得预期效果。因此,李春海等(2008)^[17]以口服途径对 D-半乳糖的致衰老效应进行了探讨,发现与皮下注射给药途径相比,口服途径具有效果相近、体重减低

不明显、简便易行、节约人力物力等优点。李春海等(2008)^[17]研究结果表明,每日口服 700 mg/kg D-半乳糖,连续 6 周,即可获得较好的拟衰老效应。本研究预试验采用皮下连续注射 D-半乳糖制作衰老模型,结果部分小鼠出现注射部位胶冻样肿胀,个别小鼠发生死亡。所以,本研究正式试验采用在小鼠饲料中添加 D-半乳糖制作衰老模型。参考文献 D-半乳糖使用剂量(李春海等,2008)^[17],结合小鼠每天的采食量,确定日粮中 D-半乳糖的添加比例为 0.5%。

负重游泳试验是评价小鼠抗疲劳能力的常用试验。一般采用的负重量是体重的 10%^[16]。但本研究发现负重量为体重的 10% 时,有较多小鼠可在水中呈静止悬浮状态。当负重为体重的 20% 时,小鼠

马上直接沉入水中。当负重为体重的 15% 时, 小鼠基本上不能在水中悬浮静止, 也不会马上直接沉入水中, 而会拼命游泳以保持鼻孔不没入水中。所以本研究采用 15% 体重的负重量进行实验。从实验结果来看, 单独添加黄芪多糖或葡萄籽提取物对小鼠的负重游泳时间没有显著影响 ($P > 0.05$), 而同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物可以显著延长小鼠的负重游泳时间 ($P < 0.05$)。衰老的一个明显生理特点是抗疲劳能力降低。所以抗衰老的药品或保健品理论上能提高衰老模型小鼠的负重游泳时间。本研究未发现黄芪多糖或葡萄籽提取物单独应用时有显著抗疲劳作用, 其原因还有待进一步探讨。可能与黄芪多糖和葡萄籽提取物使用的剂量和添加方式有关。但本研究发现黄芪多糖和葡萄籽提取物同时添加时能显著延长小鼠的负重游泳时间, 说明两者存在较好的协同作用, 两者最佳剂量组合有待于进一步研究。

本研究观察了黄芪多糖、葡萄籽提取物单独添加或同时添加时对衰老模型小鼠血常规参数的影响, 发现同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物显著降低小鼠的粒细胞数 ($P < 0.05$), 并且黄芪多糖和葡萄籽提取物单独添加或同时添加还对衰老模型小鼠的红细胞相关指标产生一定影响。MCV、MCH 和 MCHC 是根据红细胞计数、血红蛋白测定和红细胞比积结果计算出来的, 对贫血的鉴别有一定的价值。本研究中, 同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物极显著降低小鼠 MCHC ($P < 0.01$), 对 MCH 也有降低的趋势。值得注意的是, HGB、MCHC 和 MCH 反映机体红细胞的携氧能力, 这些指标升高似乎有利于提高机体血液的携氧能力, 从而延长小鼠负重游泳时间。在一些非衰老动物模型实验中, 肌注^[18] 或口服^[19,20] 黄芪多糖能提高动物血液的血红蛋白水平, 口服葡萄籽提取物也提高动物血液中血红蛋白水平^[21]。但本研究结果发现, 黄芪多糖或葡萄籽提取物单独添加或同时添加时均程度不一地降低这些指标的水平。晏瑞琴等(2006)^[22] 报道高原短跑运动员不同负荷前后血红蛋白和白细胞数均会出现升高的变化, 该研究在运动后即刻进行采血测定。本研究中, 血常规参数检测是在负重游泳试验后的第 2 d 进行的, 因此本研究中粒细胞数和红细胞相关指标的变化是否受到负重游泳试验的影响还有待进一步研究。如果受到影响, 则黄芪多糖和葡萄籽提取物单独添加或同时添加或许可以减轻负重游泳对这些指标的影响, 降低它们的升高幅度。这些推测还有

待进一步研究证实。

4 结论

在本研究实验条件下, 单独添加黄芪多糖或葡萄籽提取物对衰老模型小鼠的负重游泳时间影响不明显, 而同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物可显著延长衰老模型小鼠的负重游泳时间, 说明两者同时添加可获得较好的协同作用。单独或同时添加黄芪多糖和葡萄籽提取物对衰老模型小鼠部分血常规参数(特别是红细胞相关指标)有一定影响。

参考文献

- Leimolei B (B·勒莫雷), Dalimoter-Nikelao C (C·达里莫特-尼科劳). Pet food composition for regulating body weight and preventing obesity and related disorders in pets (用于调节体重和防止肥胖及相关障碍的宠物饲料组合物). CN 02814453, 2011-7-13.
- Chen JS (陈金生). A pet food composition for health care and its preparation method (一种宠物保健的组合物及其制备方法). CN 200510110758, 2009-2-11.
- Shen YJ (申义君), Zhou JW (周金伟), Wang B (王斌), et al. Effects of *Astragalus* polysaccharides on the activity of antioxidant enzyme in lactating holstein cows. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:244-247.
- Jin LY (金连玉). Progress of chemical and pharmacological study of *Astragalus* polysaccharide. *Heilongjiang Sci Technol Inf* (黑龙江科技信息), 2013, 21:2.
- Li SP (李树鹏), Zhao XJ (赵献军). Effects of probiotics of *Astragalus* polysaccharide and profitable microbe on growth performance and immune function of chick. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2005, 21(6):51-54.
- Xiang X (向枭), Chen J (陈健), Zhou XH (周兴华), et al. Effect of *Astragalus* polysaccharides on growth, body composition and immune index in *Schizothorax Prenanti*. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2011, 35:291-299.
- Wang CJ (王翠菊), Wang HF (王洪芳), Chen H (陈辉), et al. Effects of *Astragalus* polysaccharides on antioxidant capacity and egg quality of laying hens. *Chin J Anim Nutri* (动物营养学报), 2011, 23:280-284.
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, et al. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food*, 2003, 6: 291-299.
- Li RF (李润丰). Proanthocyanidins in grape seeds. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(6):88-91.
- Wang Y (王颖), Zhang GF (张桂芳), Xu BZ (徐炳政), et al. Effect of grape seed proanthocyanidin extracts on blood glucose of diabetic mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(6):88-91.

- 与开发),2012,24:1191-1195.
- 11 Zhao J (赵娇). Effects and possible mechanism of grape seed procyanidins on alleviating hepatic oxidative damage in weaned piglets. Yaan: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), MSc. 2013.
- 12 Lei M (雷鸣), Zhu ZJ (朱祖健). The research progress of D-galactose-induced aging. *Prog Anatomical Sci* (解剖科学进展), 2011, 17:83-85.
- 13 Xu Y (许扬), Wu T (吴涛), Gu JL (顾佳黎). The research progress of D-galactose-induced aging animal model. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2009, 29:1710-1713.
- 14 Luan HY (栾海云), Wang GH (王桂华), Xu Y (许勇), et al. Antioxidant effects of *tricholoma matsutake* extracting solution on aging mice induced by D-galactose. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2012, 40:8471-8472.
- 15 Fu YJ (傅永锦), Pan JQ (潘竟锵), Zhang XM (张小牧), et al. Effects of silybin on inhibiting glycoxidative stress and improving the learning and memory in aging rats treated by D-galactose. *Chin J Clin Pharm Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2012, 17:10-14.
- 16 Wang LM (王丽梅), Ye C (叶诚), Wu C (吴晨), et al. The effect of *peperilla* oil on anti-aging for aging model rats. *Food Sci Tech* (食品科技), 2013, 38:280-284.
- 17 Li CH (李春海), Liu YQ (刘亚千), Chen H (陈华). Evaluation of method of developing senescence by oral administration of D-galactose. *Lab Anim Sci* (实验动物科学), 2008, 25(3):5-7, 17.
- 18 Xiang JZ (向建洲), Li WP (李文平), Peng T (彭涛), et al. Effect of *Astragalus polysaccharides* on blood index of rats. *Hunan J Anim Sci Vet Med* (湖南畜牧兽医), 2008, (6):10-11.
- 19 Zhang YQ (张艳秋). Studies on anti-fatigue effect of *Astragalus polysaccharide* and its mechanism. Yanbian: Yanbian University (延边大学), MSc. 2009.
- 20 Zhang F (张飞), Xu JB (许静波), Mou T (牟藤), et al. Effects of *astragalus polysaccharide* on blood physiological parameters and growth performance in weaned piglets. *Feed Ind* (饲料工业), 2011, 32(13):16-18.
- 21 Liu X (刘协), Li XN (李小宁), Bao LX (包六行), et al. Effect of grape seed extract proanthocyanidin on loaded swimming time in mice. *Chin J Clin Rehabilitation* (中国临床康复), 2005, 9:245-247.
- 22 Yan RQ (晏瑞琴), Yuan JX (袁际学), Kang L (康连), et al. Changes of hemoglobin and leucocyte after different loads of sprinter in plateau. *J Qujing Normal Univ* (曲靖师范学院学报), 2006, 25(6):89-91.

(上接第 142 页)

- 12 Akihisa T, Tokuda H, Ichiiishi E, et al. Anti-tumor promoting effects of multiflorane-type triterpenoids and cytotoxic activity of karounidiol against humancancer cell lines. *Cancer Lett*, 2001, 173:9-14.
- 13 Barker EC, Gatbonton-Schwager TN, Han Y, et al. Bryonolic acid: A large-scale isolation and evaluation of heme oxygenase 1 expression in activated macrophages. *J Nat Prod*, 2010, 73:1064-1068.
- 14 Mao QQ, Zhong XM, Li ZY, et al. Paeoniflorin protects against NMDA-induced neurotoxicity in PC12 cells via Ca²⁺ antagonism. *Phytother Res*, 2011, 25:681-685.
- 15 Lin WY, Chang YC, Lee HT, et al. CREB activation in the rapid, intermediate, and delayed ischemic preconditioning against hypoxic-ischemia in neonatal rat. *J Neurochem*, 2009, 108:847-859.
- 16 Negis Y, Unal AY, Korulu S, et al. Cell cycle markers have different expression and localization patterns in neuron-like PC12 cells and primary hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 2011, 496:135-140.
- 17 Kim JY, Jeong HY, Lee HK, et al. Neuroprotection of the leaf and stem of *Vitis amurensis* and their active compounds against ischemic brain damage in rats and excitotoxicity in cultured neurons. *Phytomedicine*, 2012, 19:150-159.
- 18 Choi SS, Seo YJ, Kwon MS, et al. Increase of phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II in several brain regions by substance P administered intrathecally in mice. *Brain Res Bull* 2005, 65:375-381.
- 19 Takano H, Fukushi H, Morishima Y, et al. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase IImediate neuronal cell death induced by depolarization. *Brain Res*, 2003, 962(1-2):41-47.
- 20 Tang K, Liu C, Kuluz J, et al. Alterations of CaMKII after hypoxia-ischemia during brain development. *J Neurochem*, 2004, 91:429-437.
- 21 Meng F, Guo J, Zhang Q, et al. Autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha (CaMKII alpha) reversibly targets to and phosphorylates N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B (NR2B) in cerebral ischemia and reperfusion in hippocampus of rats. *Brain Res*, 2003, 967:161-169.
- 22 Lonze BE, Riccio A, Cohen S, et al. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*, 2002, 34:371-85.
- 23 Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron*, 2002, 34:999-1010.