

视黄酸通过 RAR α 对缺氧缺血性脑损伤后神经元凋亡的影响

陈双 江伟 陈洁 肖农

【摘要】 目的 探讨视黄酸通过视黄酸核受体 α (RAR α) 对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后神经元凋亡的影响。**方法** 采用维生素 A 缺乏饲料和维生素 A 正常的普通饲料分别构建视黄酸缺乏(RAD)和视黄酸正常(RAN)新生 SD 模型大鼠,随机选取 24 只 RAD 新生模型鼠作为 RAD 组,选取 48 只 RAN 新生模型鼠随机分为 RAN 组和假手术组,每组 24 只。RAN 组和 RAD 组采用经典 Rice 法进行分离结扎左侧颈总动脉建立 HIBD 模型,假手术组只做颈部皮肤切开缝合。分别于术后第 3 天和第 7 天,采用 TUNEL 法检测脑皮质神经元凋亡情况,于术后第 7、14、21 和 28 天进行神经功能缺损评估。体外分离培养原代神经元,建立缺氧缺血损伤(OGD)模型,将原代神经元细胞分为对照组、OGD 组、视黄酸 OGD 组,采用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)和 Western blot 法检测各组 RAR α 、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)的 mRNA 及蛋白表达水平。采用 RAR α 基因小干扰 RNA 重组腺病毒(Ad-si RAR α)感染原代神经元,将原代神经元分为沉默组和阴性对照组,检测 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** ①RAD 组和 RAN 组大鼠在缺氧缺血后第 3 天到第 7 天,皮质凋亡神经元数量逐渐增加,且 RAD 组神经元凋亡数量明显多于 RAN 组;RAD 组大鼠各时间点的神经功能损伤评分均高于 RAN 组($P < 0.05$)。②视黄酸 OGD 组神经元的 RAR α 、GDNF mRNA 表达水平 [(1.49 ± 0.05) 、 (0.61 ± 0.02)] 均高于 OGD 组 [(0.51 ± 0.04) 、 (0.21 ± 0.02)], Caspase-8 的 mRNA 表达水平显著低于 OGD 组 [(1.13 ± 0.09) vs (1.79 ± 0.11)], 且组间差异均有统计学意义($P < 0.01$);各组神经元的蛋白表达水平与 mRNA 表达水平基本一致。③沉默组神经元的 RAR α 、GDNF mRNA 表达水平均低于阴性对照组 [RAR α (1.07 ± 0.12) vs (2.33 ± 0.08) , $P < 0.01$]; GDNF [(0.11 ± 0.01) vs (0.13 ± 0.01) , $P < 0.05$], 沉默组神经元的 Caspase-8 mRNA 表达水平较阴性对照组高 [(2.92 ± 0.20) vs (2.40 ± 0.18) , $P < 0.01$];各组蛋白表达水平与 mRNA 表达水平基本一致。**结论** 视黄酸可通过 RAR α 上调 GDNF 表达,下调 Caspase-8 的表达,进而抑制 HIBD 后神经元的凋亡。

【关键词】 视黄酸核受体 α ; 神经元凋亡; 腺病毒; 神经营养因子; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8
基金项目:国家自然科学基金(81571091)

Retinoic acid affects apoptosis of neurons injured by hypoxic-ischemic brain damage via retinoic acid receptor alpha Chen Shuang*, Jiang Wei, Chen Jie, Xiao Nong. * Department of Children's Rehabilitation, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Corresponding author: Xiao Nong, Email: xiaonongwl@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of the retinoic acid (RA) on the apoptosis of neurons caused by hypoxic ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Seventy-two newborn Sprague-Dawley rats were randomly divided into an RA deficiency (RAD) group, an RA normal (RAN) group and a control group, each of 24. The HIBD model was established in the RAD and RAN groups using Rice's method. The left common carotid artery was exposed, ligated and cut, inducing hypoxia. In the control group the left common carotid artery was exposed without any other treatment. Three and 7 days after the operation, neuron apoptosis in the brain tissue was evaluated using TUNEL staining. The degree of HIBD was quantified using modified neurological severity scores (mNSS) 7, 14, 21 and 28 days after the operation. Primary neurons were cultured in vitro, and oxygen glucose deprivation (OGD) was induced, then control, OGD and RA+OGD groups were formed. The gene transcription and the protein activity of retinoic acid receptor alpha (RAR α), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) and Caspase-8 were examined with polymerase chain reactions (PCR) and Western blotting. The RA+OGD group was exposed to RA and SiRNA adenovirus, and divided into a silenced group and a negative transfection group according to the infection. **Results** The average mNSS of the RAD group was significantly higher than that of the RAN group. TUNEL staining showed that the apoptotic cells in the cortex

increased from day 3 to 7 after the operation, but significantly more in the RAD group than in the RAN group. The gene transcription and protein activity of RAR α and GDNF in the RA+OGD group were significantly higher than in the OGD group, and those of Caspase-8 were significantly lower. The gene transcription and protein activity of RAR α and GDNF in the silenced group were significantly lower than in the negative transfection group, while those of Caspase-8 were just the opposite. **Conclusion** RA can inhibit the apoptosis of primary neurons after HIBD by up-regulating the expression of GDNF and down-regulating that of Caspase-8 via RAR α .

【Key words】 Retinoic acid receptor alpha; Neuron apoptosis; Adenovirus; Glial cell-derived neurotrophic factor; Caspase-8

Fund program: National Natural Science Foundation of China (grant 81571091)

缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic ischemic brain damage, HIBD) 是儿童常见的中枢神经系统疾病, 可造成永久性神经损伤^[1-2]。神经元凋亡为 HIBD 继发性脑损伤的主要形式^[3-4], 因此, 研究并阐明 HIBD 神经元凋亡机制具有重要意义。胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF) 是重要的神经营养因子, 可抑制缺氧缺糖损伤 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 所致的神经元凋亡^[5], 但具体机制仍不清楚。视黄酸主要通过视黄酸核受体 α (retinoic acid receptor alpha, RAR α) 调节神经细胞的增殖、分化和凋亡^[6-8]。Thang 等^[9] 研究表明, 视黄酸可以通过 RAR α 上调大鼠颈上神经节对 GDNF 的反应活性, 发挥神经保护作用。本研究旨在通过视黄酸干预 HIBD 大鼠探讨视黄酸对神经元凋亡的影响及具体机制, 为治疗 HIBD 提供新的思路。

材料与方法

一、实验动物与材料

无特定病原体级健康雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 220g~250 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。神经元基础培养基 (Neuron basal)、B27 等均购自 Gibco 公司; 视黄酸为全反式视黄酸, 购自 Sigma 公司; EBSS 购自 Hyclone 公司; RNA 提取试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR) 试剂盒等购自 Takara 公司; RAR α 抗体购自 Abcam 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8 (Caspase-8)、GDNF 一抗购自 Santa Cruz 公司; 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 凋亡试剂盒购自 Roche 公司; 引物由华大基因有限公司合成。

二、分组与造模

采用课题组经典维生素 A 控制缺乏饲料和普通饲料构建视黄酸缺乏 (retinoic acid deficiency, RAD) 和视黄酸正常 (retinoic acid normal, RAN) 新生鼠模型^[10-11], 具体方法如下: 取 10 只健康雌性 SD 大鼠分别给予维生素 A 缺乏饲料和维生素 A 正常的普通饲料饲养 4 周 (各 5 只), 随后与健康雄性 SD 大鼠按

2:1 比例合笼, 其子代即为 RAN 和 RAD 模型鼠。随机选取 24 只新生 7 日龄 RAD 模型鼠, 体重 10~12 g, 标记为 RAD 组; 选取 48 只新生 7 日龄 RAN 模型鼠, 体重 10~12 g, 随机分为 RAN 组和假手术组, 每组 24 只。RAN 组和 RAD 组采用经典 Rice 法^[12] 进行 HIBD 建模, 用 10% 水合氯醛按 250 mg/kg 对大鼠进行腹腔注射麻醉, 分离并结扎左侧颈总动脉。休息 30 min 后放入缺氧箱中, 给予 3 L/min 流速的氮氧混合气体 (8% O₂+92% N₂), 持续缺氧 2.5 h 后, 母乳继续哺乳。HIBD 造模成功标准: 新生鼠 HIBD 后出现不同程度的行为异常, 如头颤、肢体抖动、翻身或爬行困难、夹尾左旋、右后肢拖步甚至抽搐等。假手术组只做颈部皮肤切开缝合。整个实验期以母乳加维生素 A 控制饲料喂养。

三、标本取材及脑组织原位凋亡检测

分别于 HIBD 术后第 3 天和第 7 天, 每组随机各选取 2 只乳鼠, 用 4% 多聚甲醛灌注洗脑组织, 并断头取脑, 即刻将脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 24 h 后进行水洗、梯度脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤制备脑组织标本备用。每个样本连续切片 10 张, 随机选择 3 张切片, 严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行凋亡细胞检测, 具体步骤如下: 切片常规脱蜡、水化; 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 浸洗 5 min, 阻断剂室温孵育 30 min; PBS 洗片后, 通透液冰浴 2 min; PBS 冲洗 2 遍, 擦干样品周围的水, 滴加 50 μ l 的 TUNEL 反应混合溶液, 在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, PBS 洗 3 次; 二苯甲亚胺 (Hoechst) 核染^[13], PBS 洗 3 次。置于荧光显微镜下观察并拍摄。

四、行为学评估

采用改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS) 法^[14], 分别于 HIBD 术后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天四个时间点对各组大鼠 (每组 20 只) 进行评估。评估内容包括运动测试、感官测试、本体感觉测试, 评分范围 0~18 分, 1~6 分代表轻度损伤, 7~12 分代表中度损伤, 13~18 分代表重度损伤。

五、原代神经元培养及干预

取出生 24 h 内的 SD 大鼠, 75% 乙醇消毒后断头

取脑,钝性分离迅速取出皮质组织,剔除脑膜及血管后置于冰 D-Hank's 液中清洗 2 次;剪碎,放入 15 ml 离心管中,轻轻吹打至充分混匀;200 目细胞筛过滤得到细胞悬液;4 ℃,1000 r/min 离心 5 min 得到细胞沉淀物,收集沉淀;弃上清,加入 2 ml 培养基重悬;将细胞分为对照组、OGD 组和视黄酸 OGD 组,接种于多聚赖氨酸包被的 6 孔板中,接种密度为 2×10^6 个/孔;用含 10% 胎牛血清的细胞培养基培养 6~10 h 后,更换为有 2% B27 细胞培养添加剂、0.25% L-谷氨酰胺、1% 青链霉素混合液的 Neuron basal 培养基;此后每 3 天换 1 次培养液,连续培养 7 d。每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。7 d 后,视黄酸 OGD 组给予 2 ml 含 $1 \mu\text{mol/L}$ 视黄酸的 Earle's 平衡盐溶液,置于 37 ℃ 恒温细胞培养箱中持续通以 2 L/min 流速的 5% O_2 与 95% N_2 混合气体进行 OGD 损伤 2 h。

六、Real-time PCR 检测

原代神经元 OGD 2 h 后,提取细胞总 RNA 并检测其浓度;逆转录合成 cDNA,以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,检测目的基因的相对转录水平。按 SYBR[®] Green II Real-time PCR 试剂盒说明进行三步法 PCR 反应。

PCR 循环如下:95 ℃ 变性 10 min,45 个循环 95 ℃ 下 15 s,60 ℃ 60 s 和 72 ℃ 30 s 溶解曲线分析。计算公式:以 β -肌动蛋白(β -actin)作为对照,阈值(CT)为参数。基因改变倍数 = $2^{-\Delta(\Delta\text{CT})}$, $\Delta(\Delta\text{CT}) = \text{实验组}(\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参}}) - \text{对照组}(\text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参}})$ 。实验独立重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物及腺病毒干扰序列

基因	序列	
	上游	下游
RAR α	5'-GACTCCGCTTTGGAATCG-3'	5'-ACTGCTGCTCTGGGTCTC-G-3'
GDNF	5'-CACTGACTTGGGTTTGGG-3'	5'-TCACTTGTAGCCTTC-TACTTC-3'
β -actin	5'-GCATAGCCACGCTTGT-TCTTGAAG-3'	5'-GAACCGCTCATTGCCGAT-AGTG-3'
Caspase-8	5'-GGCAGCCAGTCTTCGTT-3'	5'-CTCGGGACAGGTTA-CAG-3'

七、Western blot 检测

原代神经元 OGD 损伤 2 h 后,提取细胞总蛋白;用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法及酶标仪测定蛋白浓度;用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离蛋白,转移蛋白到聚偏二氯乙烯膜上。5% 胎牛血清蛋白液封闭,室温孵育 1 h。一抗 RAR α (1:400),GDNF(1:300),Caspase-8(1:200)和 β -actin(1:500)4 ℃ 孵育过夜。次日二抗室温下孵育 1 h。增强化学发光法处理后用其成像系统拍照。

八、腺病毒感染原代神经元及相关检测指标

采用 RAR α 基因小干扰 RNA 重组腺病毒(Ad-siRAR α)感染原代神经元。阴性对照为 RAR γ 基因小干扰 RNA 重组腺病毒(Ad-siRAR γ),表现为红色荧光蛋白(red fluorescence protein,RFP)。将 2 μl 的 Ad-siRAR α 重组腺病毒加入到融合至 70% 原代神经元的培养基中进行感染;同时以相同感染复数(multiplicity of infection,MOI)的腺病毒穿梭载体作为阴性对照组;感染 24 h 后,在荧光显微镜上通过观察红色荧光判断病毒感染状态。将原代神经元分为沉默组和阴性对照组。在病毒感染 36 h 后,用 D-Hank's 缓冲液冲洗原代神经元,以含有 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 EBSS 进行 OGD 2 h。采用 Real-time PCR 和 Western blot 方法,检测 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达水平。

九、统计学方法

使用 SPSS 17.0 版统计软件对所得数据进行统计学分析处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠皮质细胞凋亡变化

HIBD 损伤后第 3 天,RAD 组顶叶皮质、颞叶皮质的细胞凋亡明显多于 RAN 组(黄箭头所示绿色荧光),且皮质凋亡主要出现在第 4 层~第 5 层,详见图 1。

HIBD 损伤后第 7 天,RAD 组凋亡也多于 RAN 组,而且凋亡的发生区开始扩散,皮质的第 2 层~第 5 层都可见明显的细胞凋亡。详见图 2。

二、神经功能缺损评分

HIBD 后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天,RAN 组各时间点的神经功能损伤评分均低于 RAD 组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);假手术组显著低于 RAD 组和 RAN 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。详见表 2。

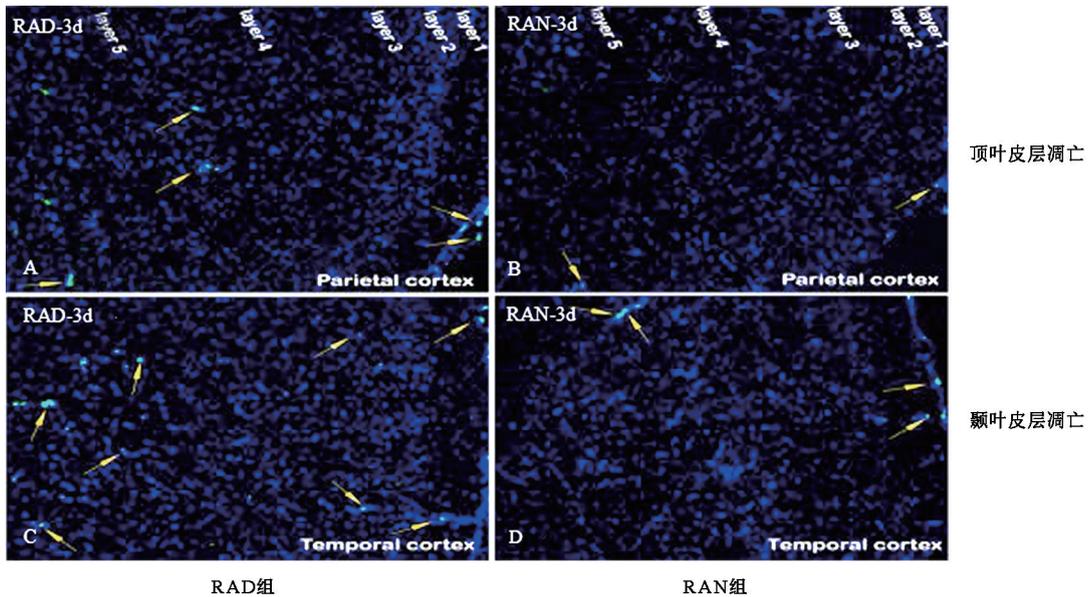
表 2 各组大鼠的 mNSS 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
RAN 组	20	7.85 \pm 0.80	5.25 \pm 0.68	3.38 \pm 0.45	2.20 \pm 1.34
RAD 组	20	9.31 \pm 1.11 ^a	6.04 \pm 1.02 ^a	4.44 \pm 0.72 ^b	2.93 \pm 0.44 ^b
假手术组	20	3.32 \pm 0.34 ^{bc}	2.11 \pm 0.54 ^{bc}	1.55 \pm 0.25 ^{bc}	1.32 \pm 0.23 ^{bc}

注:与 RAN 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 RAD 组比较,^c $P < 0.01$

三、各组原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的 mRNA 表达水平

视黄酸 OGD 组原代神经元 RAR α 、GDNF 的 mRNA 表达水平较 OGD 组高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),而 Caspase-8 的 mRNA 表达水平低于 OGD 组,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。具体情况见表 3。



注:图中箭头示皮质凋亡神经元
图 1 RAD 组和 RAN 组 HIBD 后第 3 天大脑皮质凋亡荧光显微镜镜下观(TUNEL 染色,×200)

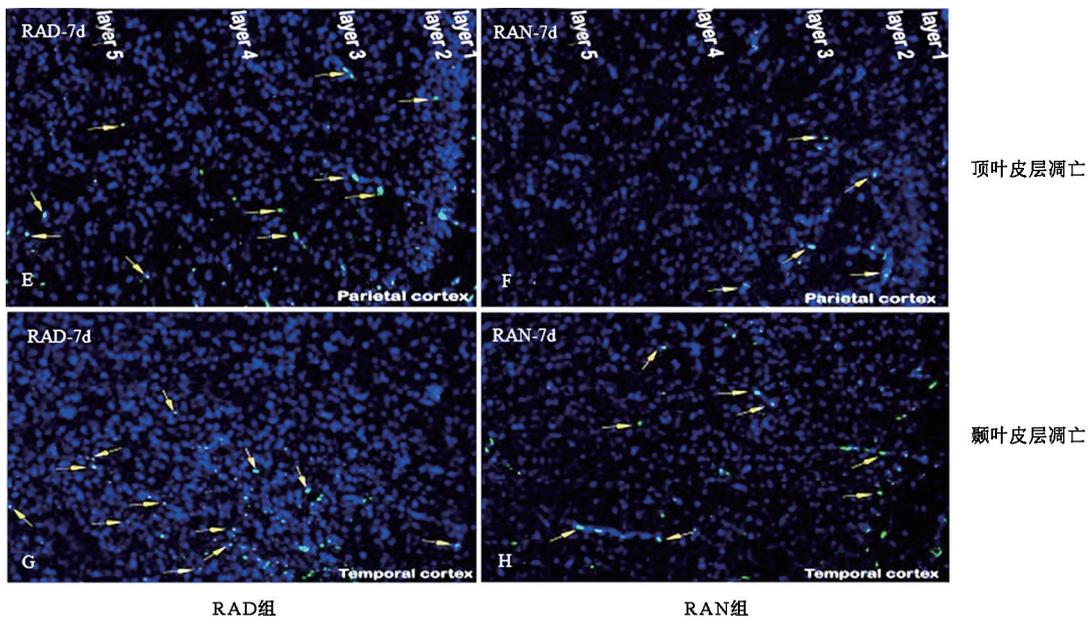


图 2 RAD 组和 RAN 组 HIBD 后第 7 天大脑皮质凋亡荧光显微镜镜下观(TUNEL 染色,×200)

表 3 各组原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	RAR α	GDNF	Caspase-8
视黄酸 OGD 组	1.49 \pm 0.05 ^a	0.61 \pm 0.02 ^a	1.13 \pm 0.09 ^a
OGD 组	0.51 \pm 0.04	0.21 \pm 0.02	1.79 \pm 0.11
对照组	2.06 \pm 0.06	0.42 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02

注:与 OGD 组比较,^aP<0.01

四、各组原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的蛋白表达水平

视黄酸 OGD 组的原代神经元 RAR α 和 GDNF 蛋白表达水平较 OGD 组高,而 Caspase-8 的蛋白表达水平较 OGD 组低,与 Real-time PCR 结果一致。具体情

况见图 3。

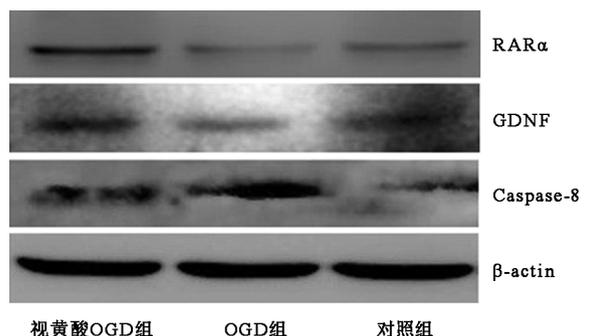


图 3 各组原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的蛋白表达水平

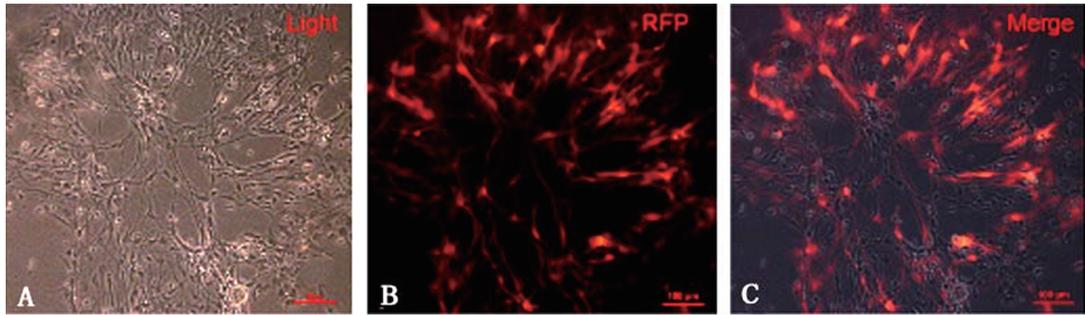


图 4 腺病毒感染原代神经元的荧光显微镜下观(未染色,×200)

五、腺病毒感染原代神经元效率评估

原代神经元培养第 8 天,荧光显微镜下观察腺病毒感染情况如图 4 所示,由光镜(图 A)和 RFP 红色荧光(图 B)合并图片(图 C)可知,腺病毒干预 24 h 后感染效率达 80%~90%。

六、腺病毒感染原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的 mRNA 表达水平

PCR 检测显示,沉默组 RAR α 的 mRNA 表达水平较阴性对照组低,差异有明显统计学意义($P<0.01$)。RAR α 沉默后,GDNF 的 mRNA 表达水平较阴性对照组低,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 Caspase-8 的 mRNA 表达水平较阴性对照组高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。具体情况见表 4。

表 4 腺病毒感染原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	RAR α	GDNF	Caspase-8
沉默组	1.07 \pm 0.12 ^a	0.11 \pm 0.01 ^b	2.92 \pm 0.20 ^a
阴性对照组	2.33 \pm 0.08	0.13 \pm 0.01	2.40 \pm 0.18

注:与阴性对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$

七、腺病毒感染原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 蛋白表达水平

Western blot 法检测结果显示,沉默组 RAR α 、GDNF 的蛋白表达水平较阴性对照组低,而 Caspase-8 的蛋白表达水平较阴性对照组高,与 Real-time PCR 结果一致。具体情况见图 5。

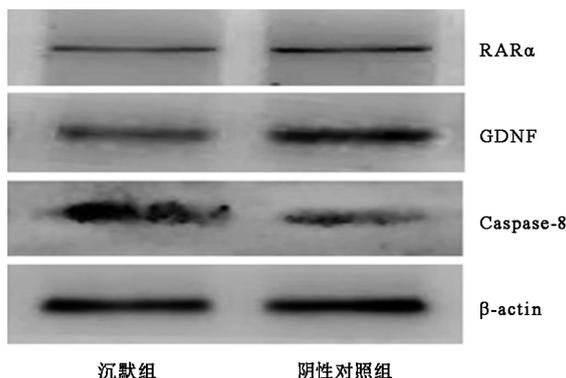


图 5 腺病毒感染原代神经元 RAR α 、GDNF、Caspase-8 的蛋白表达水平

讨 论

视黄酸是维生素 A 的主要活性代谢产物,具有介导细胞增殖、分化、凋亡以及免疫调节等多种生物学功能^[15]。目前发现,视黄酸在神经系统发育过程中扮演着重要作用,可调控神经发生、神经元存活和突触的可塑性等^[16]。已有研究发现,体内视黄酸水平会影响啮齿动物的神经认知功能^[17],但具体机制仍不清楚。本研究通过构建 RAD、RAN 叠加 HIBD 大鼠模型,分别在 HIBD 后第 7、14、21 和 28 天进行神经功能损伤评分,结果显示 RAN 组的神经功能损伤评分在各时间点均低于 RAD 组($P<0.05$),且以第 21 天和第 28 天差异尤为显著($P<0.01$),提示正常水平的视黄酸可改善 HIBD 大鼠的神经功能损伤程度;对各组大鼠脑皮质 TUNEL 染色发现,RAN 组的神经元凋亡数量明显少于 RAD 组,且各组在 HIBD 后第 7 天的神经元凋亡数量较第 3 天多,且凋亡范围更广,与文献报道一致^[18]。提示体内正常水平的视黄酸可抑制神经元凋亡,改善 HIBD 后大鼠的脑损伤程度。

大量研究发现,视黄酸可通过视黄酸核受体抑制细胞凋亡^[19-21]。本研究通过 1 μ mol/L 视黄酸干预原代神经元后发现,视黄酸 OGD 组的 RAR α mRNA 及蛋白表达水平均明显高于 OGD 组($P<0.01$),说明 1 μ mol/L 视黄酸可有效激活 OGD 损伤后原代神经元的 RAR α 表达。GDNF 是神经元和神经胶质细胞分泌的重要的神经营养因子,可通过调节 PI3K/AKT 信号转导途径来抑制 OGD 后神经元凋亡以及促进神经修复^[22-24]。本研究中,视黄酸 OGD 组 GDNF 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于 OGD 组,尤以蛋白表达水平变化明显($P<0.01$),提示视黄酸可通过 RAR α 上调原代神经元 GDNF 的蛋白表达水平进而影响神经元凋亡。Caspase 家族引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节,Caspase-8 更是细胞凋亡发生的关键步骤及凋亡信号传导的共同通路^[25]。Pu 等^[20]发现,视黄酸可以通过上调 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的表达,下调 Caspase-8

的表达,进而减少卵丘细胞的凋亡。本研究中,视黄酸 OGD 组 Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达水平均低于 OGD 组 ($P < 0.05$),提示视黄酸可能通过 RAR α 上调原代神经元 GDNF 的蛋白表达水平,进而抑制 Caspase-8 的表达,最终发挥抗神经元凋亡作用;进一步用腺病毒沉默 RAR α 表达后,发现沉默组 RAR α 、GDNF 的 mRNA 和蛋白表达水平较阴性对照组低 ($P < 0.05$),而 Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达水平较阴性对照组明显增高 ($P < 0.01$),这也验证了视黄酸可通过 RAR α 抑制 HIBD 后神经元凋亡。

综上所述,视黄酸可抑制脑皮质神经元凋亡,促进 HIBD 大鼠的神经功能的修复;视黄酸通过 RAR α 上调 GDNF 的表达和下调 Caspase-8 的表达,进而发挥抗凋亡作用,更深入机制尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Dixon BJ, Reis C, Ho WM, et al. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (9): 22368-22401. DOI: 10.3390/ijms160922368.
- [2] Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, et al. Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11 (8): 78-114. DOI: 10.3389/fncel.2017.00078.
- [3] Lee AC, Kozuki N, Blencowe H, et al. Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990 [J]. *Pediatr Res*, 2013, 74 (1): 50-72. DOI: 10.1038/pr.2013.206.
- [4] Fleiss B, Gressens P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy [J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11 (6): 556-566. DOI: 10.1016/S1474-4422 (12) 70058-3.
- [5] Lv B, Li F, Fang J, et al. Activated microglia induce bone marrow mesenchymal stem cells to produce glial cell-derived neurotrophic factor and protect neurons against oxygen-glucose deprivation injury [J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 16 (10): 283-294. DOI: 10.3389/fncel.2016.00283.
- [6] Aoto J, Nam CI, Poon MM, et al. Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity [J]. *Neuron*, 2008, 60 (2): 308-320. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.08.012.
- [7] Froeling FE, Feig C, Chelala C, et al. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141 (4): 1486-1497. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.06.047.
- [8] Jiang W, Wen EY, Gong M, et al. The pattern of retinoic acid receptor expression and subcellular, anatomic and functional area translocation during the postnatal development of the rat cerebral cortex and white matter [J]. *Brain Res*, 2011, 138 (2): 77-87. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.027.
- [9] Thang SH, Kobayashi M, Matsuoka I. Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor responsiveness in developing rat sympathetic neurons by retinoic acid and bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Neurosci*, 2000, 20 (8): 2917-2925.
- [10] Zeng J, Li T, Gong M, et al. Marginal vitamin A deficiency exacerbates memory deficits following A β 1-42 injection in rats [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14 (5): 562-570. DOI: 10.2174/1567205013666161223162110.
- [11] Zhang X, Yuan X, Chen L, et al. The change in retinoic acid receptor signaling induced by prenatal marginal vitamin A deficiency and its effects on learning and memory [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 47 (1): 75-85. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.05.007.
- [12] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9 (2): 131-141. DOI: 10.1002/ana.410090206.
- [13] Kubbies M, Rabinovitch PS. Flow cytometric analysis of factors which influence the BrdUrd-Hoechst quenching effect in cultivated human fibroblasts and lymphocytes [J]. *Cytometry*, 1983, 3 (4): 276-281. DOI: 10.1002/cyto.990030408.
- [14] Gould E, Tampt P, Hastings NB, et al. Neumgenesis in adulthood: a possible role in learning [J]. *Trends Cogn Sci*, 1999, 3 (5): 186-192.
- [15] Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8 (10): 755-765. DOI: 10.1038/nrn2212.
- [16] Das BC, Thapa P, Karki R, et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22 (2): 673-683. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.11.025.
- [17] Yin X, Meng F, Wang Y, et al. Effect of hyperbaric oxygen on neurological recovery of neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage and its underlying mechanism [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6 (1): 66-75.
- [18] Hernandez-Pinto AM, Puebla-Jimenez L, Arilla-Ferreiro E. A vitamin A-free diet results in impairment of the rat hippocampal somatostatinergic system [J]. *Neuroscience*, 2006, 141 (2): 851-861.
- [19] Janesick A, Shiotsugu J, Taketani M, et al. RIPPLY3 is a retinoic acid-inducible repressor required for setting the borders of the pre-placodal ectoderm [J]. *Development*, 2012, 139 (6): 1213-1224. DOI: 10.1242/dev.071456.
- [20] Pu Y, Wang Z, Bian Y, et al. All-trans retinoic acid improves goat oocyte nuclear maturation and reduces apoptotic cumulus cells during in vitro maturation [J]. *Anim Sci J*, 2014, 85 (9): 833-839. DOI: 10.1111/asj.12216.
- [21] Zhou Y, Zhang H, Zheng B, et al. Retinoic acid induced-autophagic flux inhibits ER-stress dependent apoptosis and prevents disruption of blood-spinal cord barrier after spinal cord injury [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12 (1): 87-99. DOI: 10.7150/ijbs.13229.
- [22] Blanchard H, Donepudi M, Tschopp M, et al. Caspase-8 specificity probed at subsite S(4): crystal structure of the caspase-8-Z-DEVD-cho complex [J]. *J Mol Biol*, 2000, 302 (1): 9-16. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4041.
- [23] Yue P, Gao L, Wang X, et al. Intranasal administration of GDNF protects against neural apoptosis in a rat model of Parkinson's disease through PI3K/Akt/GSK3beta pathway [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (5): 1366-1374. DOI: 10.1007/s11064-017-2184-1.
- [24] 王军, 杜江华, 程萍萍, 等. 银杏内酯 B 对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠脑神经元凋亡及 P-AKT (ser473) 表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2017, 39 (9): 646-650. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2017.09.002.
- [25] 焦先婷, 刘晓青, 黄丽素, 等. Caspase-3, -8, -9 在铜诱导大鼠原代皮层神经元凋亡中的作用研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11 (11): 917-922.

(修回日期: 2018-03-20)

(本文编辑: 汪 玲)