.基础研究.

# 适宜浓度视黄酸对缺氧缺血性脑损伤后神经 修复及 PI3K/Akt 信号通路的影响

李思雨 江伟 肖农

重庆医科大学附属儿童医院康复科;国家儿童健康与疾病临床医学研究中心;儿童发育疾病研究教育部重点实验室;儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地;儿童神经发育与认知障碍 重庆市重点实验室,重庆 400010

通信作者:肖农, Email: xiaonongwl@163.com

观察不同浓度视黄酸(RA)对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后神经修复及 PI3K/Akt 信号 【摘要】 目的 通路的影响。方法 将原代培养的海马神经干细胞分为对照组、模型组、(0.5、1、5、10、50 μmol/L) RA 组及 RA(5 µmol/L)+PI3K 抑制剂组,在培养第5天时各 RA 组及 RA+PI3K 抑制剂组分别给予相应浓度的 RA 干 预,在培养第6天时模型组、各 RA 组及 RA+PI3K 抑制剂组均进行细胞氧糖剥夺(OGD)处理,RA+PI3K 抑制 剂组于 OGD 处理前 2 h 给予 PI3K 抑制剂 LY294002 干预。在 OGD 损伤后 12 h、24 h 及 48 h 时分别采用 CCK-8 法检测各组细胞存活率,于 OGD 损伤后 24 h 时采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测各组细胞 RARa、 PI3K、Akt、β-catenin、Cyclin D1 蛋白及 mRNA 表达水平。结果 在 OGD 损伤后 24 h、48 h 时 5 µmol/L RA 组 的吸光度值(OD)均显著高于模型组水平(P<0.05),故本研究认为5μmol/LRA对神经损伤的修复作用较显 著。在 OGD 损伤后 24 h 时模型组细胞存活率显著低于 5 μmol/L RA 组, RA+PI3K 抑制剂组细胞存活率亦显 著低于 5 μmol/L RA 组(P<0.05)。进一步分析发现,5 μmol/L RA 组 RARα、PI3K、Cyclin D1 蛋白及 mRNA 表 达水平均较模型组显著升高(P<0.05);10 μmol/L RA 组 β-catenin 蛋白及 mRNA 表达水平亦显著高于模型组 (P<0.05);RA+PI3K 抑制剂组 RARα、PI3K、Akt、β-catenin、Cyclin D1 蛋白及 mRNA 表达水平均较 5 μmol/L RA 组显著降低(P<0.05)。结论 适宜浓度的 RA 干预可通过上调 RARα 表达,激活 PI3K/Akt 信号通路及下 游 Cyclin D1 信号分子,从而有效促进 OGD 损伤后海马神经干细胞的增殖及修复进程。

【关键词】 视黄酸; 缺氧缺血性脑损伤; PI3K/Akt 信号通路 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81571091) DOI:10.3760/cma.j.cn421666-20240418-00280

# The effects of retinoic acid on nerve repair and PI3K/Akt signaling pathway after hypoxic-ischemic brain damage

#### Li Siyu, Jiang Wei, Xiao Nong

Department of Rehabilitation Children's Hospital of Chongqing Medical University; National Clinical Research Center for Child Health and Disorders; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation base of Child development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Child Neurodevelopment and Cognitive Disorders, Chongqing 400010, China

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

**[Abstract] Objective** To observe any effect of retinoic acid (RA) concentration on nerve repair and PI3K/ Akt signaling after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Primary cultured hippocampal neural stem cells were randomly divided into a control group, 0.5, 1, 5, 10 and 50 $\mu$ mol/L RA model groups and 5 $\mu$ mol/L RA+ PI3K inhibitor group. The RA groups and the RA+PI3K inhibitor group were given those treatments at the appropriate concentrations on the 5th day of culture, and then all except the control group underwent cellular oxygen and glucose deprivation (OGD) on the following day. The RA+PI3K inhibitor group was given PI3K inhibitor LY294002 2h before the OGD treatment. The cell viability of each group was detected using the CCK8 method at 12, 24 and 48 hours after the start of the OGD. Twenty-four hours later, the expression levels of RAR $\alpha$ , PI3K, Akt,  $\beta$ -catenin, cyclin D1 protein and mRNA were detected using a reverse-transcription-polymerase chain reaction and western blotting. **Results** The OD value of the 5 $\mu$ mol/L RA group was significantly higher than that of the model group 24 and 48h after the OGD, suggesting significant nerve injury repair. Also, 24h after the OGD the cell viability in the model and RA+PI3K inhibitor groups was significantly lower than in the 5 $\mu$ mol/L RA group. The expressions of RAR $\alpha$ , PI3K, NAR $\alpha$ , PI3K, NIA, PI3K, · 1080 ·

cyclin D1 protein and mRNA in the  $5\mu$ mol/L RA group were significantly higher than in the model group, and those of  $\beta$ -catenin protein and mRNA in the 10 $\mu$ mol/L RA group were also significantly higher than in the model group. RAR $\alpha$ , PI3K, Akt,  $\beta$ -catenin, cyclin D1 protein and mRNA in the RA+PI3K inhibitor group were significantly lower than in the  $5\mu$ mol/L RA group. **Conclusions** RA of appropriate concentration can up-regulate RAR $\alpha$  expression and activate PI3K/Akt signaling and its downstream cyclin D1, thereby effectively promoting the proliferation and repair of hippocampal stem cells after OGD.

[Key words] Retinoic acid; Hypoxia; Ischemia; Brain damage; PI3K/Akt pathway Funding:National Natural Science Foundation of China (81571091) DOI:10.3760/cma.j.cn421666-20240418-00280

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)是指新生儿由于围产期窒息导致脑组 织缺氧或缺血所引起的损伤,是临床上较常见的新生 儿中枢神经系统疾病<sup>[1]</sup>,对新生儿的生命质量、神经 系统发育等具有严重影响,容易导致脑瘫、癫痫、认知 及运动发育迟缓等神经系统后遗症,严重时可致患儿 死亡。在 HIBD 早期,受损部位周围的神经干细胞、祖 细胞可能被激活,并开始增殖、分化为新的神经元、星 形胶质细胞或少突胶质细胞等<sup>[2]</sup>,以替代损失的脑细 胞,并修复受损的神经网络架构。然而理论上新生儿 期相对较强的神经再生能力受多种因素影响,如炎症 反应、氧化应激以及微环境改变等,实际上 HIBD 患儿 的神经再生效率并不高<sup>[3]</sup>。因此,通过外部干预手段 安全、有效地促进神经细胞再生及功能修复是一个极 具挑战性的科研及临床难题。

在临床中已发现 HIBD 新生儿体内维生素 A(vitamin A, VA)的含量普遍低于健康新生儿水平<sup>[4]</sup>。VA 主要通过其活性代谢产物视黄酸(retinoic acid, RA)在 神经系统发育及功能维持方面发挥重要作用<sup>[5]</sup>;而 RA 作为一种强效转录调控因子,参与多种细胞的生 物学过程<sup>[6]</sup>,包括神经干细胞增殖、分化为不同类型 的神经细胞、神经管形成以及神经轴突生长、导向和再 生等,因此推测向 HIBD 患儿及时补充适量的 VA 或 RA,在理论上可促进受损神经组织修复及再生,从而 改善预后。

有大量研究报道,磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt)信号通路异常往往与多种中枢神经系统疾病 的发病机制密切相关<sup>[7-8]</sup>。鉴于 PI3K/Akt 信号通路 及 RA 在神经保护及修复中的潜能,本研究拟对体外 培养的海马神经干神经(neural stem cells,NSCs)进 行细胞氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)处理以模拟体内 HIBD 损伤,并观察不同浓度 RA 及 PI3K 抑制剂 LY294002 对 HIBD 后神经干细 胞增殖、分化及 PI3K/Akt 信号通路的影响,为临床 治疗 HIBD 患儿提供新策略及理论依据。

## 材料与方法

#### 一、实验动物及主要试剂

选取无特定病原体级(specific pathogen-free,SPF) 健康 Sprague-Dawley(SD)孕鼠(孕 16~18 d)作为实验 动物,由重庆医科大学实验动物中心提供,实验动物生 产许可证号:SYXK(渝)2018-0003。本研究主要试剂 包括: 全反式视黄酸 (RA) (美国 Sigma 公司)、 LY294002(美国 Cayman 公司)、视黄酸受体 α(retinoic acid receptor-alpha, RARα) 抗体(美国 Abcam 公司)、 PI3K 抗体、Akt 抗体、β-连环蛋白(β-catenin) 抗体、细 胞周期蛋白 D1(Cyclin D1) 抗体和 β-actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)、M199 培养基(美国 Hyclone 公司)、DMEM(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基、DMEM/F12 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司)、RNA 提 取试剂盒(美国 Biotec 公司)、cDNA 合成试剂盒 (RR047A)和SYBR-Green Real-time PCR(RR820A)试 剂盒(日本 TaKaRa 公司)、目标引物(生工基因)、BCA 蛋白定量试剂盒、全蛋白提取试剂盒及十二烷基硫酸 钠聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(南京 凯基生物技术有限公司)、CCK-8 细胞增殖检测试剂 盒(日本同仁公司)等。

#### 二、原代海马神经干细胞的分离及培养

对实验孕鼠进行麻醉处理,使用 75% 酒精消毒, 在无菌条件下取出胎鼠并置于冰面上,将胎鼠头部转 移至预冷的 DMEM/F12 培养基中,在显微镜下分离颅 骨及硬脑膜,然后去除间脑、小脑、脑膜及血管等,将提 取的海马组织置于 DF12 培养基(DMEM/F12 培养基+ 1%双抗+10% FBS)中,使用眼科剪将其剪碎,轻吹打 数次促使细胞分散,再通过 200 目细胞筛过滤以去除 较大颗粒,经离心(1500 rpm)5 min 后吸除上清液,再 加入适量培养基混匀,将细胞悬液接种于 10 cm 培养 皿中,并置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温恒湿孵箱中进行培 养,第 2 天进行 DMEM/F12 培养基+20 mg/L 表皮生 长因子(epidermal growth factor, EGF)+20 mg/L 碱性

· 1081 ·

成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)+1%双抗+2% B27 混合培养基全量换液,第3~4 天进行半量换液。

#### 三、分组及干预

在培养第4天时将上述细胞分为对照组、模型组、 (0.5、1、5、10、50 µmol/L) RA 组及 RA(5 µmol/L)+ PI3K 抑制剂组,将各组海马神经干细胞接种于 6 孔板 中,保证每孔约含1.0×10<sup>6</sup>个细胞。在培养第5天时 各 RA 组及 RA+PI3K 抑制剂组分别给予相应浓度的 RA 干预,在培养第6天时模型组、各 RA 组及 RA+ PI3K 抑制剂组均进行细胞氧糖剥夺(OGD)处理,采用 无糖 M199 培养基进行培养,并将细胞置于含 95% N<sub>2</sub>+ 5%0,的细胞培养箱中培养2h。随后进行复糖复氧 处理,即更换为之前的混合培养基(DMEM/F12培养 基+20 mg/L EGF+20 mg/L bFGF+1%双抗+2% B27), 并置于 37 ℃、5%CO, 恒温恒湿孵箱中进行培养。RA +PI3K 抑制剂组于 OGD 处理前 2 h 给予 PI3K 抑制剂 LY294002 干预(终浓度为 20 µmol/L)<sup>[9]</sup>。对照组细 胞未进行 RA、PI3K 抑制剂 LY294002 干预及后续 OGD 处理。

四、CCK-8法检测细胞存活率

于 OGD 损伤后 12 h、24 h 及 48 h 时分别采用 CCK-8 法对各组细胞存活率进行检测,每个实验组均 设置 5 个复孔,同时设立对照孔(仅含正常培养条件 下的细胞)和空白孔(仅含培养基),向每孔加入 10 µl CCK-8 溶液,37 ℃孵育 4 h,采用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔的吸光度值(optical density,OD)。细胞存 活率具体计算公式如下:细胞存活率(%)=[(实验 孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)]×100%。上述实验均重复进行 3 次,结果取 平均值。

五、Western blot 法检测目标蛋白含量

采用 Western blot 法检测各组细胞 RARα、PI3K、 Akt、β-catenin 及 Cyclin D1 表达量。在复糖复氧处理 24 h 后对各组海马神经干细胞进行全蛋白提取,并采 用 BCA(bicinchoninic acid)法检测目标蛋白含量。将 各组蛋白样品浓度及体积调成一致,分别取等量的蛋 白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜及封闭处理。 封闭后加入一抗 RARα、PI3K、Akt、β-catenin、Cyclin D1 及 β-actin,于4 ℃环境下孵育过夜,经三羟甲基氨 基甲烷盐缓冲液(tris-buffered saline with tween-20, TBST)清洗4次,每次5 min,二抗在室温环境下孵育 1 h,经 TBST 清洗4次,每次5 min,最后进行化学发光 法处理。采用蛋白成像系统对各组细胞发光膜进行曝 光、拍照,所有样品均以 β-actin 作为参照。上述实验 均重复进行3次,结果取平均值。 六、RT-PCR 法检测目标基因表达量

在复糖复氧处理 24 h 后提取各组海马神经干细 胞的总 RNA,并检测 RNA 浓度,采用两步法将 mRNA 逆转录为 cDNA。逆转录反应条件如下: 37 ℃反应 15 min,85 ℃反应 5 s,4 ℃保存。将逆转录后的 cDNA 进行 RT-PCR 反应,试剂采用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> Ⅱ,总反应体系为 25  $\mu$ l,所有操作均在冰面上进行。 PCR 循环条件如下: 95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s,共45 个循环,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 30 s。采 用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算各组神经干细胞目标基因 mRNA 相对 表达量,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为参照,具体引 物名称及序列情况详见表 1。上述实验均重复进行 3 次,结果取平均值。

表1 各目标基因上、下游引物序列

目标基因	上、下游引物序列
GAPDH	上游:5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'
	下游:5'-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3'
RARa	上游:5'-GACTCCGCTTTGGAATGG-3'
	下游:5'-ACTGCTGCTCTGGGTCTCG-3'
PI3K	上游:5'-CTGGAAGCCATTGAGAAG-3'
	下游:5'-CAGGATTTGGTAAGTCGG-3'
Akt	上游:5'-TGAGACCGACACCAGGTATTTTG-3'
	下游:5'-GCTGAGTAGGAGAACTGGGGAAA-3'
β-catenin	上游:5'-GTTCTACGCCATCACGACAC-3'
	下游:5'-GAGCAGACAAGCACTTTC-3'
Cyclin D1	上游:5'-TTCATCGAACACTTCCTCTCCA-3'
	下游:5'-GAGGGTGGGTTGGAAATGAA-3'

七、统计学方法

采用 SPSS 20.0 版统计学软件包进行数据分析, 使用 GraphPad Prism 9.5 版软件对数据进行绘图,所 得计量数据均符合正态分布且方差齐性,并以(*x*±*s*) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比 较采用 *t* 检验,*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

#### 结 果

#### 一、各组神经干细胞存活率比较

通过 CCK-8 法检测发现,模型组 OD 值在 OGD 损 伤后 12 h、24 h 及 48 h 时均显著低于对照组水平, 5 μmol/L RA 组 OD 值在 OGD 损伤后 24 h、48 h 时均 显著高于模型组水平,组间差异均具有统计学意义 (*P*<0.05)。1 μmol/L RA 组 OD 值在 OGD 损伤后 24 h、 48 h 时均较模型组有增高趋势,但组间差异均无统计 学意义(*P*>0.05)。基于此,本研究认为 5 μmol/L 是 RA 的适宜干预浓度。另外本研究还发现在 OGD 损伤 后 24 h 时模型组及 RA+PI3K 抑制剂组细胞存活率均 显著低于 5 μmol/L RA 组水平,组间差异均具有统计 学意义(P<0.05)。具体情况见图 1。

二、各组神经干细胞 RARa、PI3K、Akt、β-catenin 及 Cyclin D1 蛋白表达比较

通过 Western blot 检测发现,5 μmol/L RA 组 RARα、PI3K、Akt、Cyclin D1 蛋白表达水平均显著高于 模型组,10 μmol/L RA 组 β-catenin 蛋白表达水平亦 显著高于模型组,组间差异均具有统计学意义(P< 0.05)。经 20 μmol/L PI3K 抑制剂 LY294002 处理后, 发现 RA+PI3K 抑制剂组 RARα、PI3K、Akt、β-catenin、 Cyclin D1 蛋白表达水平均较 5 μmol/L RA 组显著降 低,组间差异均具有统计学意义(P<0.05)。具体结果 见图 2、表 2~3。



注:与对照组比较,<sup>\*</sup>P<0.05;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05;与5 μmol/L RA 组比较,<sup>e</sup>P<0.05;图 1B 为 OGD 损伤后 24 h 时进行比较 **图1** OGD 损伤后不同时间点各组神经干细胞存活率比较



图2 各组神经干细胞 RARa、PI3K、Akt、β-catenin 及 Cyclin D1 蛋白表达水平比较

	表 2	不同浓度 RA	干预后各组神经干细胞 RARd	LPI3K Akt β-c	catenin 及 Cyclin D	1 蛋白表达水平比较( <i>ī</i> ±	s)
--	-----	---------	-----------------	---------------	--------------------	------------------------	----

组别	RARα	PI3K	Akt	β-catenin	Cyclin D1
对照组	$1.14 \pm 0.08$	1.10±0.08	1.07±0.09	1.03±0.09	1.10±0.08
模型组	$0.85 \pm 0.02$	1.16±0.15	$0.88 \pm 0.01$	$0.90 \pm 0.07$	$1.04 \pm 0.05$
0.5 µmol/L RA 组	$0.89 \pm 0.03$	$1.34 \pm 0.08$	$1.00 \pm 0.13$	$0.75 \pm 0.08$	1.33±0.09
1 µmol/L RA 组	$0.99 \pm 0.15$	$1.49 \pm 0.12^{a}$	$1.21 \pm 0.08^{\mathrm{b}}$	0.99±0.15	$1.75{\pm}0.34^{\rm ab}$
5 µmol/L RA 组	$1.24 \pm 0.21^{b}$	$1.66 \pm 0.20^{ab}$	$1.34 \pm 0.12^{b}$	$1.08 \pm 0.14$	$2.44 \pm 0.34^{ab}$
10 µmol/L RA 组	$0.66 \pm 0.10^{a}$	$1.30 \pm 0.14$	$1.28 \pm 0.18^{b}$	$1.34 \pm 0.12^{b}$	$2.36 \pm 0.32^{ab}$
50 µmol/L RA 组	$0.16 \pm 0.01^{ab}$	$0.23 \pm 0.01^{ab}$	$0.42 \pm 0.06^{ab}$	$0.75 \pm 0.25$	1.18±0.06

注:与对照组比较, \*P<0.05; 与模型组比较, \*P<0.05

组别	RARα	PI3K	Akt	β-catenin	Cyclin D1
对照组	1.05±0.09	1.10±0.07	$1.05 \pm 0.08$	1.06±0.04	1.02±0.07
5 µmol/L RA 组	$1.43 \pm 0.11^{ab}$	$1.46 \pm 0.17^{ab}$	$1.37 \pm 0.09^{ab}$	$1.34 \pm 0.23^{b}$	$1.35 \pm 0.17^{ab}$
模型组	1.12±0.07	0.96±0.15	$0.81 \pm 0.07^{a}$	$1.03 \pm 0.18$	$0.87 \pm 0.10$
RA+PI3K 抑制剂组	$0.99 \pm 0.07^{\circ}$	$1.02 \pm 0.10^{\circ}$	$0.73 \pm 0.12^{\rm ac}$	0.96±0.22°	$0.88 \pm 0.11^{\circ}$

表 3 经 PI3K 抑制剂干预后各组神经干细胞 RARa、PI3K、Akt、β-catenin 及 Cyclin D1 蛋白表达水平比较(*x*±s)

注:与对照组比较,\*P<0.05;与模型组比较,\*P<0.05;与5 µmol/L RA 组比较,\*P<0.05

三、各组神经干细胞 RARa、PI3K、Akt、β-catenin 及 Cyclin D1 mRNA 表达比较

通过 RT-PCR 检测发现, 5~10  $\mu$ mol/L RA 组 RARa、PI3K、Cyclin D1 的 mRNA 表达水平均较模型 组显著上调, 10  $\mu$ mol/L RA 组 β-catenin 的 mRNA 表 达水平亦较模型组显著升高,组间差异均具有统计学 意义(P<0.05)。1~10  $\mu$ mol/L RA 组 Akt 的 mRNA 表 达水平均较模型组有增高趋势,但组间差异均无统计 学意义(P>0.05)。经使用 PI3K 抑制剂 LY294002 处 理后,发现 RA+PI3K 抑制剂组 RARa、PI3K、Akt、βcatenin 及 Cyclin D1 的 mRNA 表达水平均显著低于 5  $\mu$ mol/L RA 组,组间差异均具有统计学意义(P< 0.05)。具体结果见图 3。

### 讨 论

相关研究发现,大鼠海马区 RA 含量水平与神经认 知功能间具有显著相关性<sup>[10]</sup>,适宜浓度的 RA 能优化神 经递质活动,改善学习记忆能力,从而影响整体认知表 现。RA 被证实可抑制脑外伤后细胞凋亡,并激活小胶 质细胞,有助于清除受损脑组织并促进神经再生<sup>[11]</sup>。 在脑缺血再灌注损伤研究中,预先给予 RA 处理可减轻 血脑屏障破坏程度,并促进损伤后的神经组织修复<sup>[12]</sup>。 在针对新生儿缺氧缺血性脑病的研究中,有学者发现适 宜水平的 VA 供应对于 HIBD 后神经细胞增殖至关重 要,缺乏 VA 则会阻碍神经组织功能恢复<sup>[13]</sup>。上述研究 已初步证实 RA 在神经保护及修复中的重要作用,有望 成为未来治疗脑部相关疾病的重要手段。

尽管现有研究表明 RA 在神经发育、神经再生以 及神经保护中扮演重要角色,但并未明确 VA 及 RA 修复脑损伤的作用机制。本研究通过 OGD 损伤原代 培养的海马干细胞以模拟体内 NSCs 在缺氧、缺血条 件下的损伤情况<sup>[14]</sup>,进而观察不同浓度 RA 对受损 NSCs 细胞增殖的影响,发现 1~5 μmol/L RA 均可有 效促进 OGD 损伤后 NSCs 增殖,并以 5 μmol/L RA 的 干预效果最佳,过低或过高浓度的 RA 干预则表现为 抑制细胞增殖效应,如高浓度 RA 对细胞生长具有毒 性作用。上述发现与既往报道结果<sup>[14-15]</sup>基本一致,表 明 RA 能双向调控 NSCs 细胞增殖,如适宜浓度的 RA 能刺激细胞增殖分化、加速损伤修复,过高浓度的 RA 则能抑制细胞正常生理功能。因此在制订HIBD治疗



注:与对照组比较, \*P<0.05;与模型组比较, \*P<0.05;与5 μmol/L RA 组比较, \*P<0.05 **图 3** 各组神经干细胞 RARa、PI3K、Akt、β-catenin 及 Cyclin D1 mRNA 表达水平比较

策略时,选择适宜浓度的 RA 干预对于神经再生及损伤修复至关重要,需要找到一个既能充分激活 NSCs 活性、又能避免细胞毒性的治疗窗口,这对于指导临床 实践具有重要意义。

据报道, RA 能通过激活 PI3K/Akt 信号通路参与 调控细胞增殖、分化等生理活动<sup>[16-17]</sup>。Bai 等<sup>[18]</sup>研究 发现 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路参与了 HIBD 损伤 后的神经修复过程。本研究结果显示,海马 NSCs 遭 OGD 损伤后,给予适宜浓度的 RA 干预可显著提高 RARα、PI3K、Akt、β-catenin、Cyclin D1 蛋白及 mRNA 表达水平,与本课题组前期针对 PC12 细胞的观察结 果<sup>[15]</sup>基本一致,提示 RA 促进 NSCs 增殖的作用机制 可能与调控 PI3K/Akt 信号通路及细胞周期蛋白 Cyclin D1 含量有关。为进一步探究该信号通路中起 关键作用的信号分子,本研究使用 PI3K 抑制剂 LY294002 进行干预,结果显示经 RA、OGD 处理后的 NSCs 在加入 PI3K 抑制剂后其细胞增殖水平被显著抑 制,提示阻断 PI3K/Akt 信号通路能导致 NSCs 无法有 效增殖,同时还能抑制 RA 对 RARα、PI3K、Akt、βcatenin、Cyclin D1 蛋白及 RNA 表达的提升作用,进一 步验证了 RA 对 NSCs 增殖的正向调控作用与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

综上所述,本研究结果表明适宜浓度的 RA 干预 可通过上调 RARα 表达,激活 PI3K/Akt 信号通路及 下游 Cyclin D1 信号分子,从而有效促进 OGD 损伤后 NSCs 的细胞增殖及修复进程,为临床实践中给予 HIBD 患儿适量 VA 补充以促进大脑功能恢复及重建提 供了理论基础。未来研究可进一步验证不同浓度 RA 对脑功能恢复的影响,找到一个既能充分激活 NSCs 活 性、又能避免细胞毒性的理想治疗窗,同时还需进一步 探讨 RA 与 PI3K/Akt 信号通路间的关系以及该通路在 介导 RA 调控 NSCs 细胞增殖中的具体机制。

#### 参考文献

- [1] Ristovska S, Stomnaroska O, Danilovski D. Hypoxic ischemic encephalopathy(HIE) in term and preterm infants[J].Prilozi, 2022, 43(1): 77-84.DOI:10.2478/prilozi-2022-0013.
- [2] Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, et al. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17 (1): 155. DOI: 10.1186/ s12974-020-01819-z.
- [3] Li Y, Wisnowski JL, Chalak L, et al. Mild hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE): timing and pattern of MRI brain injury [J]. Pediatr Res, 2022, 92(6):1731-1736.DOI:10.1038/s41390-022-02026-7.
- [4] 江伟.VitA 在缺氧缺血脑损伤中的作用及机制研究[D].重庆医科 大学,2011.DOI:10.7666/d.Y2021010.
- [5] Gudas LJ. Retinoid metabolism: new insights [J]. J Mol Endocrinol, 2022,69(4):T37-T49.DOI:10.1530/JME-22-0082.

- [6] Ghyselinck NB, Duester G.Retinoic acid signaling pathways [J]. Development, 2019, 146(13); 167502. DOI: 10.1242/dev.167502.
- [7] Chen S, Peng J, Sherchan P, et al. TREM2 activation attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis via PI3K/Akt pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17 (1):168.DOI:10.1186/s12974-020-01853-x.
- [8] Luo X, Zeng H, Fang C, et al. N-acetylserotonin derivative exerts a neuroprotective effect by inhibiting the NLRP3 inflammasome and activating the PI3K/Akt/Nrf2 pathway in the model of hypoxic-ischemic brain damage[J]. Neurochem Res, 2021, 46 (2): 337-348. DOI: 10. 1007/s11064-020-03169-x.
- [9] Tu L, Wang Y, Chen D, et al. Protective effects of notoginsenoside R1 via regulation of the PI3K-Akt-mTOR/JNK pathway in neonatal cerebral hypoxic-ischemic brain injury[J].Neurochem Res, 2018, 43(6): 1210-1226.DOI:10.1007/s11064-018-2538-3.
- [10] Hernández-Pinto AM, Puebla-Jiménez 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. DOI: 10. 1016/j.neuroscience.2006.04.034.
- [11] Hummel R, Ulbrich S, Appel D, et al. Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective
  [J].Br J Pharmacol, 2020, 177 (22) : 5208-5223. DOI: 10.1111/bph. 15259.
- [12] Li M, Tian X, An R, et al. All-trans retinoic acid ameliorates the early experimental cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting the loss of the blood-brain barrier via the JNK/P38MAPK signaling pathway[J]. Neurochem Res, 2018, 43 (6): 1283-1296. DOI: 10. 1007/s11064-018-2545-4.
- [13] Dadwal P, Mahmud N, Sinai L, et al. Activating endogenous neural precursor cells using metformin leads to neural repair and functional recovery in a model of childhood brain injury [J]. Stem Cell Reports, 2015,5(2):166-173.DOI:10.1016/j.stemcr.2015.06.011.
- [14] 李思雨,赵敏,杨茂玲,等.视黄酸通过 GSK-3β 对大鼠缺氧缺血性脑损伤后海马神经干细胞增殖的调节作用[J].吉林大学学报(医学版),2021,47(5):1077-1085. DOI:10.13481/j.1671-587X.20210501.
- [15] Zhao M, Chen S, Yang ML, et al. Vitamin A regulates neural stem cell proliferation in rats after hypoxic-ischemic brain damage via RARαmediated modulation of the β-catenin pathway [J]. Neurosci Lett, 2020,727:134922.DOI:10.1016/j.neulet.2020.134922.
- [16] Nagl F, Schönhofer K, Seidler B, et al. Retinoic acid-induced nNOS expression depends on a novel PI3K/Akt/DAX1 pathway in human TGW-nu-I neuroblastoma cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297(5):C1146-C1156.DOI:10.1152/ajpcell.00034.2009.
- [17] Uruno A, Sugawara A, Kanatsuka H, et al. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Aktpathway [J]. Circulation, 2005, 112 (5): 727-736. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA. 104. 500959.
- [18] Bai J, Zeng S, Zhu J, et al. The small molecule P7C3-A20 exerts neuroprotective effects in a hypoxic-ischemic encephalopathy model via activation of PI3K/Akt/GSK-3β signaling [J]. Neuroscience, 2020, 441: 197-208. DOI:10.1016/j.neuroscience.2020.05.051.

(修回日期:2024-08-20) (本文编辑:易 浩)