神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000623

全反式视黄酸通过 RARα 抑制缺氧缺糖引起的原代神经元凋亡

郭 敏,江 伟,侯娜丽,谷 燕,黄鸿眉,陈 洁,李廷玉

(重庆医科大学附属儿童医院营养研究中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、认知发育与学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室、儿科学重庆市重点实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨全反式视黄酸(all-trans retinoic acid,ATRA)是否能够抑制缺氧缺糖损伤(oxygen and glucose-deprivation,OGD)诱导的原代神经元凋亡。**方法**:采用原代神经元作为研究对象,分为对照组、OGD 组、OGD+ATRA 组;体外分离培养原代神经元,用神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)鉴定神经元;倒置显微镜观察 OGD 损伤前后细胞形态变化;流式细胞技术研究 OGD 损伤后各组原代神经元凋亡水平;Real-time PCR 检测视黄酸核受体 α(retinoic acid receptor alpha,RARα)、转录生长因子 β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、转录生长因子 β2(transforming growth factor-β2,TGF-β2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteinyl aspartate specific proteinase,Caspase-3)mRNA 表达水平;Western blot 印迹检测 RARα、TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平。**结果**:成功培养原代神经元;原代神经元 OGD 损伤后,倒置显微镜观察发现 OGD 组死亡的原代神经元较 OGD+ATRA 组明显增多,细胞更加杂乱;流式细胞计数发现 OGD+ATRA 组(26.11 ± 2.96)%细胞凋亡率较 OGD 组(52.14 ± 5.23)%明显降低(P=0.025);OGD+ATRA 组 RARα mRNA 表达水平(1.52 ± 0.43)和蛋白表达水平(0.22 ± 0.02)较 OGD 组的 mRNA 表达水平(0.49 ± 013)和蛋白表达水平(0.10 ± 0.02)均明显增高(P=0.006,P=0.005),而 OGD+ATRA 组 TGF-β1、TGF-β2 mRNA 表达水平(0.45 ± 0.10,0.41 ± 0.08)分别较 OGD 组(0.81 ± 0.15,0.98 ± 0.15)明显降低(P=0.034,P=0.018),而且 OGD+ATRA 组 TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平(0.22 ± 0.04,0.18 ± 0.03)分别较 OGD 组(0.39 ± 0.05,0.47 ± 0.06)也明显降低(P=0.016,P=0.002),OGD+ATRA 组(1.08 ± 0.49)与 OGD 组(1.00 ± 0.15)Caspase-3 mRNA 表达水平无明显差异(P=0.148)。**结论**:ATRA 可以激活其受体 RARα 进而下调 TGF-β,抑制凋亡因子 Caspase-3 的表达,最终抑制 OGD 损伤引起的原代神经元凋亡。

【关键词】全反式视黄酸;缺氧缺糖损伤;原代神经元;转录生长因子 β;含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3

【中图分类号】R329.28;R361.3;R977.4 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-03-29

All-trans retinoic acid(ATRA) inhibits apoptosis of primary neurons induced by oxygen and glucose-deprivation via retinoic acid receptor alpha

Guo Min, Jiang Wei, Hou Nali, Gu Yan, Huang Hongmei, Chen Jie, Li Tingyu

(*Department of Pediatric Research Institute, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Chongqing Key Laboratory of Translational Medical of Research in Cognitive Development and Learning and Memory Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics*)

【Abstract】***Objective***: To investigate whether all-trans retinoic acid(ATRA) can inhibit apoptosis effects on primary neurons caused by oxygen and glucose-deprivation(OGD). ***Methods***: Primary neurons were isolated and cultured *in vitro*, and were determined for neuron-specific enolase(NSE) by immunofluorescence technique. Primary neurons were divided into three groups: control group, OGD group and OGD+ATRA group. Cell morphology before and after OGD injury was observed by inverted microscopy. Apoptosis rate of primary neurons after OGD injury was measured by flow cytometry. The gene transcription levels of retinoic acid receptor alpha(RARα), transforming growth factor-β1(TGF-β1), transforming growth factor-β2 (TGF-β2), cysteinyl aspartate specific proteinase(Caspase-3) were examined via real-time PCR, while

作者介绍:郭 敏,Email:290356806@qq.com,研究方向:维生素 A 与脑发育。

通信作者:李廷玉,Email:tyli@vip.sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81161120498、81100454、81100476)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150414.2245.005.html (2015-04-14)

the protein expressions of RARα, TGF-β, Caspase-3 were determined by Western blot. ***Results***: Successfully cultured primary neurons, neuron-specific enolase was observed in primary neurons obviously. After OGD injury, the cell death of OGD group was more obvious than OGD+ATRA group. Flow cytometry suggested that the apoptosis rate of OGD+ATRA group (26.11 ± 2.96)% significantly decreased when compared with that of OGD group (52.14 ± 5.23)% (P=0.025). The mRNA and protein levels of RARα in OGD+ATRA group (1.52 ± 0.43, 0.22 ± 0.02) were significantly higher than those in OGD group (0.49 ± 013, 0.10 ± 0.02) (P=0.006, P=0.005). The mRNA transcription levels of TGF-β1, TGF-β2 were significantly lower in OGD+ATRA group (0.45 ± 0.10, 0.41 ± 0.08) than in OGD group (0.81 ± 0.15, 0.98 ± 0.15) (P=0.034, P=0.018). The protein expressions of TGF-β, Caspase-3 were significantly lower in OGD+ATRA group (0.22 ± 0.04, 0.18 ± 0.03) than in OGD group (0.39 ± 0.05, 0.47 ± 0.06) (P=0.016, P=0.002). And the mRNA transcription of Caspase-3 in OGD+ATRA group (1.08 ± 0.49) and OGD group (1.00 ± 0.15) were not significantly different (P=0.148). ***Conclusion***: ATRA inhibits the apoptosis of primary neurons induced by OGD injury via activating its receptor RARα and then turning down TGF-β and Caspase-3 expressions.

【Key words】all-trans retinoic acid; oxygen and glucose-deprivation; primary neurons; transforming growth factor-β; cysteinyl aspartate specific proteinase

维生素 A（vitamin A，VA）在一系列重要的生物学过程中扮演着重要的角色，包括视觉、繁殖、生长和发育[1]。VA 的生物学效应主要以其活性代谢物视黄酸（retinoic acid，RA）发挥作用，RA 通过激活其核受体视黄酸受体（retinoic acid receptors，RARs）或视黄酸 X 受体（retinoid-X receptors，RXR）介导细胞的分化、增殖、凋亡和免疫调节等多种生物学功能[2]。有研究报道，RA 可促进肿瘤细胞凋亡，同时也具有损伤后保护作用，RA 对过氧化氢损伤引起的肾小球系膜细胞和 PC12 细胞凋亡均有抑制作用[3]。RA 包括全反式视黄酸（all-trans retinoic acid，ATRA）、9-顺式视黄酸（9-cis-retinoic acid，9-cis-RA）和 13-顺式视黄酸（13-cis-retinoic acid，13-cis-RA），本课题组前期研究发现适宜浓度的 ATRA 可以抑制缺氧缺糖损伤（oxygen and glucose-deprivation，OGD）损伤后 PC12 细胞的凋亡[4]。因此本研究中将细胞系定位为神经元，更能客观的揭示 RA 信号对神经元缺氧缺血损伤的作用，拟通过 OGD 损伤原代神经元模型，分析 ATRA 对其凋亡的影响，了解其可能作用的信号调节途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雌性 Wistar 大鼠购自第三军医大学动物中心。

1.1.2 实验试剂 多聚赖氨酸购自碧云天公司；DF12 培养基、Neuron basal、B27、L-谷氨酰胺、胎牛血清、马血清均购自 Gibco 公司；EBSS 购自 Hyclone 公司；青链霉素混合液、RNA 提取试剂盒、RIPA 裂解液和蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术公司；RT-PCR 试剂盒、Real-time PCR 试剂盒购自 Takara 公司；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天公司；视黄酸核受体 α（retinoic acid receptor alpha，RARα）和神经元特异性烯醇化酶（neuron-specific enolase，NSE）抗体购自 abcam 公司；转录生长因子 β（transforming growth factor-β，TGF-β）和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶（cysteinyl aspartate specific proteinase，Caspase-3）抗体购自 santa cruz 公司；DAPI 购自 Beyotime 公司；牛血清白蛋白购自 Genview 公司；Annexin V-PI 凋亡检测试剂盒购自 Bestbio 公司；引物由华大基因有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 原代神经元培养 取 1 日龄新生鼠，无菌条件下快速处死后剥离皮层组织；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 ℃，800 r/min 离心 5 min 得到细胞沉淀物；弃上清，加入 2 ml 培养基吹打混匀；将细胞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；DF12 培养基+10% HS+5% FBS 培养 7~10 h 后，更换为含有 2% B27、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 d 换 1 次培养液，连续培养 6 d。

1.2.2 NSE 免疫荧光检测 原代神经元培养至第 6 天，甲醇与冰乙酸 3:1 于 4 ℃冰箱固定 30 min；5%胎牛血清蛋白液封闭 1 h，NSE（1:200）一抗在 4 ℃孵育过夜；次日，二抗羊抗兔 IgG/FITC（1:250）于室温下孵育 1 h；DAPI（1:1 000）染核 10 min，荧光倒置显微镜下观察细胞染色情况并拍照。

1.2.3 原代神经元 OGD 损伤 在 37 ℃三气恒温细胞培养箱中通以 95%N_2+5%O_2 的氮氧混合气体，使孵箱内氧气浓度持续为 5%；用 D-Hank's 缓冲液将原代神经元清洗 3 遍，洗掉已经凋亡的细胞和杂质，保证损伤前各组的背景一致；每孔给予 EBSS 无糖培养基 2 ml，将 OGD 组和 OGD+ATRA 组置于三气细胞培养箱中持续通以混合气以 OGD 损伤 2 h，在整个损伤期给予 OGD+ATRA 组 1 μmol/L ATRA 于 EBSS 液中。

1.2.4　细胞形态学观察　倒置显微镜观察光镜下细胞的形态，在 OGD 损伤前用 D-Hank's 液清洗后，观察正常细胞的形态，OGD 损伤 2 h 后观察损伤后细胞的形态。

1.2.5　Annexin V-PI 凋亡流式检测　OGD 损伤 2 h 后取出细胞，用离心管收集培养基 EBSS 液，每孔用 D-Hank's 液清洗 2 遍，清洗的 D-Hank's 液加入相对应的含有 EBSS 液的离心管中；每孔给予 0.5 ml Triple 液消化细胞 1 min，至绝大部分细胞消化完全，移入上述对应的离心管中，4 ℃离心机，1 000 r/min 离心 5 min；弃上清，将离心所得的细胞按照 Annexin V-PI 凋亡检测试剂盒操作指南给予细胞 Annexin V、PI 双标，运用流式细胞仪进行检测。

1.2.6　原代神经元 RARα、TGF-β1、TGF-β2、Caspase-3 mRNA 表达水平检测　采用荧光定量 PCR 方法。原代神经元 OGD 损伤 2 h 后，提取细胞总 RNA，并逆转录合成 cDNA，以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，检测 RARα、TGF-β1、TGF-β2 及 Caspase-3 基因的相对转录水平。反应体系如下：SYBR® Green Ⅱ 10 μl，PCR Forward Primer 0.8 μl，PCR Reverse Primer 0.8 μl，ddH_2O 6.4 μl，cDNA 模板 2.0 μl，共 20 μl。扩增参数：95 ℃变性 10 min，40 个循环 95 ℃下 5 s，58 ℃ 30 s 和 65 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s 溶解曲线分析。计算公式：以 β-actin 作为对照，阈值(CT)为参数，基因改变倍数=2-Δ(ΔCT)，其中ΔCT=CTtarget-CTβ-actin，Δ(ΔCT)=ΔCT 实验组-ΔCT 对照组。资料分析采用 GraphPad prism 软件分析各基因表达水平。引物序列表 1。

表 1　PCR 引物序列

Tab.1　Primer sequences for PCR

基因	序列(5'~3')
RARα	5'-ATTGCCGACCAGATTACC-3'
	5'-AAAGCCAGCGTTGTGC-3'
TGF-β1	5'-TGAACCAAGGAGACGGAATA-3'
	5'-TCGACGTTTGGGACTGATC-3'
TGF-β2	5'-ATCCCGCCCACTTTCTAC-3'
	5'-CCGTTGTTCAGCCACTCT-3'
Caspase-3	5'-GGGTGCGGTAGAGTAAGC-3'
	5'-CTGGACTGCGGTATTGAG-3'
β-actin	5'-GCATAGCCACGCTTGTTCTTGAAG-3'
	5'-GAACCGCTCATTGCCGATAGTG-3'

1.2.7　原代神经元 RARα、TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平检测　采用 Western blot 法。原代神经元 OGD 损伤 2 h 后，用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂混合液(100:1)提取细胞总蛋白；用 BCA 法及酶标仪测定蛋白浓度；使用标准方法聚丙烯酰胺凝胶电泳，将蛋白转移至 0.45 μm PVDF 膜上；5%胎牛血清蛋白液封闭，室温下孵育 1 h；一抗 RARα(1:2 000)，TGF-β(1:250)，Caspase-3(1:500)，β-actin(1:500)；4 ℃孵育过夜；次日，二抗在室温下孵育 1 h，ECL 化学发光显色。样品均以 β-actin 为内参对照。

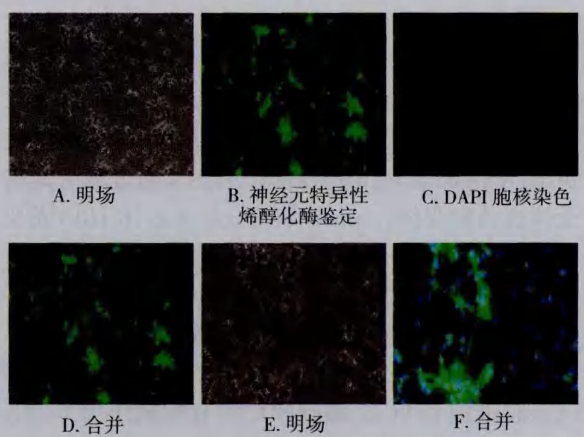
1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行分析，数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-q 法。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　NSE 免疫荧光检测

大鼠原代神经元培养 7~10 h 开始贴壁，培养 5~7 d 突起增粗伸长，连接成网，以多极神经元为主，细胞核大而圆，胞体呈三角形、梭形、椭圆形；NSE 为神经元特异性烯醇化酶，是鉴定神经元的特异性标志；经免疫荧光观察鉴定，90%左右神经元表达绿色荧光，提示原代神经元培养纯度较高(图1)，可进行后续实验。



A. 明场　B. 神经元特异性烯醇化酶鉴定　C. DAPI 胞核染色

D. 合并　E. 明场　F. 合并

（A~D 倒置相差显微镜，200×；E、F 倒置相差显微镜，400×）

图 1　大鼠原代培养神经元的形态及鉴定

Fig.1　Cell morphology of primary neurons and identification by NSE

2.2　OGD 损伤后神经元形态学改变

OGD 损伤前，细胞体清晰，呈椭圆形、三角形或梭形，突触长，有立体感及光泽，漂浮细胞较少；损伤后突触缩短，胞体变园，部分细胞体浑浊，缺乏立体感，胞体变暗淡，缺乏光泽，部分细胞聚集成团，形态不清，有部分漂浮细胞；而OGD+ATRA 组细胞破溃程度稍轻，漂浮细胞相对较少(图 2)。



A. 对照组　B. OGD 组　C. OGD+ATRA 组

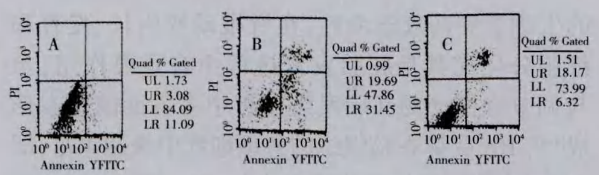
（倒置相差显微镜，200×）

图 2　OGD 损伤后各组原代神经元形态学观察

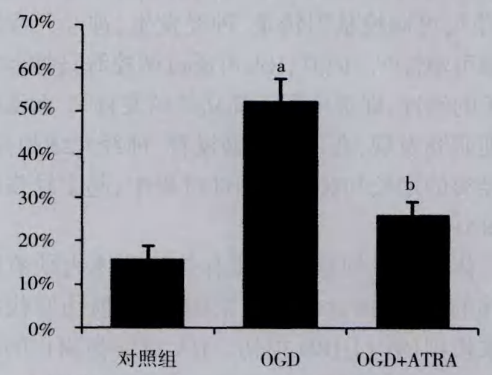
Fig.2　Morphological observation of primary neurons following oxygen and glucose-deprivation injury

2.3 OGD 损伤的原代神经元凋亡水平变化

流式细胞技术检测结果如图 3 及表 2 所示，OGD 组原代神经元凋亡率明显高于对照组（P=0.003），而用 1 μmol/L ATRA 干预原代神经元 24 h 后，OGD 损伤的原代神经元凋亡率明显降低，且明显低于 OGD 组（P=0.025）；提示 1 μmol/L ATRA 可以抑制 OGD 损伤引起的原代神经元凋亡。



A. 对照组　　B. OGD 组　　C. OGD+ATRA 组



D. 各组凋亡率的比较

a. 与对照组比较 P=0.003；b. 与 OGD 组比较 P=0.025

图 3　流式细胞仪检测各组原代神经元细胞凋亡情况

Fig.3　Changes of apoptosis rate in the three groups of OGD-injury primary neurons by flow cytometry

表 2　各组原代神经元细胞凋亡情况（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2　Apoptosis rate of the three groups（$\bar{x} \pm s$）

组别	凋亡率（%）
对照组	15.91 ± 3.10
OGD	52.14 ± 5.23
OGD+ATRA	26.11 ± 2.96

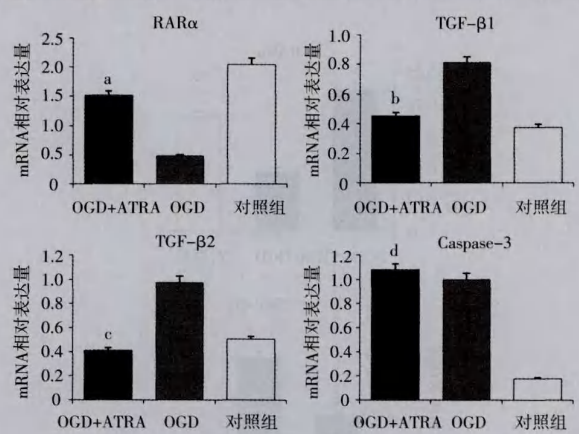
2.4 ATRA 干预后，RARα、TGF-β1、TGF-β2、Caspase-3 mRNA 表达水平变化

Real-time PCR 检测结果如表 3 及图 4 所示，ATRA 干预 24 h 后，OGD+ATRA 组 RARα mRNA 表达水平明显高于 OGD 组（P=0.006），而 OGD+ATRA 组 TGF-β1 和 TGF-β2 mRNA 表达水平均明显低于 OGD 组（P=0.034，P=0.018）；提示 OGD 损伤原代神经元后可通过激活 ATRA 的核受体 RARα，降低 TGF-β1、TGF-β2 mRNA 表达水平；而凋亡因子 Caspase-3 mRNA 表达水平变化无统计学意义（P=0.148），提示 ATRA 不影响 Caspase-3 mRNA 水平。

表 3　ATRA 干预后，RARα、TGF-β1、TGF-β2、Caspase-3 mRNA表达水平（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3　Transcription levels of RARα, TGF-β1, TGF-β2, Caspase-3 mRNA in the three groups（$\bar{x} \pm s$）

组别	RAR α	TGF-β1	TGF-β2	Caspase-3
OGD+ATRA	1.52 ± 0.43	0.45 ± 0.10	0.41 ± 0.08	1.08 ± 0.49
OGD	0.49 ± 0.13	0.81 ± 0.15	0.98 ± 0.15	1.00 ± 0.15
对照组	2.04 ± 0.19	0.38 ± 0.04	0.50 ± 0.08	0.18 ± 0.08
F 值	48.500	21.200	26.700	0.280
P 值	0.006	0.034	0.018	0.148



a. 与 OGD 组比较 P=0.006；b. 与 OGD 组比较 P=0.034；c. 与 OGD 组比较 P=0.018；d. 与 OGD 组比较 P=0.148

图 4　ATRA 干预后，RARα、TGF-β1、TGF-β2、Caspase-3 mRNA 表达水平

Fig.4　Transcription levels of RARα, TGF-β1, TGF-β2, Caspase-3 mRNA in the three groups following RA treatment

2.5 ATRA 干预后，RARα、TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平

Western blot 检测结果如图 5、表 4 及图 6 所示，OGD+ATRA 组的 RARα 表达水平明显高于 OGD 组（P=0.005），而 OGD+ATRA 组的 TGF-β、Caspase-3 表达水平均明显低于 OGD 组（P=0.016，P=0.002）；提示 ATRA 可以激活其受体 RARα，促进 RARα 蛋白表达，继而下调 TGF-β 蛋白表达水平，抑制凋亡因子 Caspase-3 蛋白表达，且这种调节不通过转录水平影响 Caspase-3 的转录和翻译。

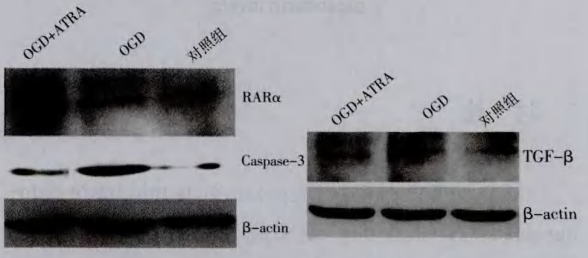


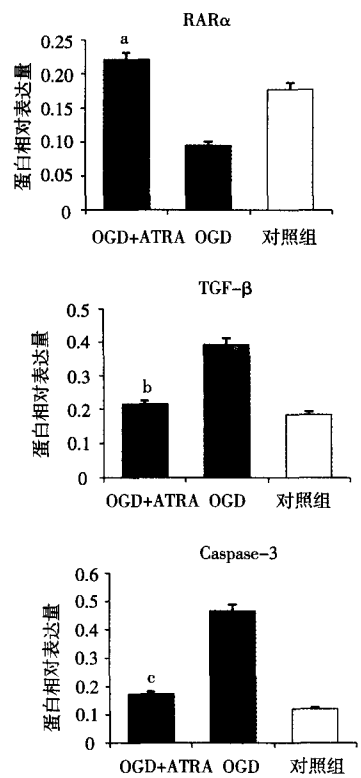
图 5　ATRA 干预后，RARα、TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平

Fig.5　Changes of expression levels of RARα, TGF-β, Caspase-3 protein in the three groups following RA treatment

表 4 ATRA 干预后，RARα、TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平的统计学分析（$\bar{x} \pm s$）

Tab.4 Statistical analysis of RARα, TGF-β, Caspase-3 protein expression levels in the three groups（$\bar{x} \pm s$）

组别	RARα	TGF-β	Caspase-3
OGD+ATRA	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.18 ± 0.03
OGD	0.10 ± 0.02	0.39 ± 0.05	0.47 ± 0.06
对照组	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.02
F 值	52.400	34.500	68.600
P 值	0.005	0.016	0.002



a. 与 OGD 组比较 *P*=0.005；b. 与 OGD 组比较 *P*=0.016；c. 与 OGD 组比较 *P*=0.002

图 6 ATRA 干预后，RARα、TGF-β、Caspase-3 蛋白表达水平的统计学分析

Fig.6 Statistical analysis of RARα, TGF-β, Caspase-3 protein expression levels

3 讨 论

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是由于围产期窒息、脑血液供应减少，导致新生儿期大脑部分或全部缺氧缺血性疾病，严重时可发生一系列神经系统发育障碍，甚至死亡。新生儿人群发生率是 1‰~2‰，HIBD 患儿中 15%~20% 会导致死亡，约 25%~30%会发生永久性的神经损伤，如脑瘫、癫痫、记忆力缺陷、智力缺陷等，目前发病机制不完全清楚[5-6]。缺血损伤的发展有两个阶段，即缺血阶段和再灌注阶段，此过程中凋亡占主导地位，并且扩散至未缺血区域，导致神经元凋亡[7-8]。

RA 是动物体内 VA 的代谢中间产物，有着广泛的生理学和药理学活性，在脊椎动物生长、发育和细胞分化尤其是胚胎发育过程中有重要作用，参与调节脊椎动物胚胎发生过程中多方面的形态形成[9-10]。RA 受体在脑组织的各型细胞中表达丰富，即 RARs 在中枢神经系统呈高分布。RA 可以调控前脑和后脑的发育，在体节和神经管发育中也有重要的作用[11]，可调控基因转录、神经发生、神经元存活和突触可塑性[12]。同时，RA 可通过调控海马神经元钙离子的活性，促进生后认知功能的发育[13]。而课题组前期研究发现，在出生后脑发育、神经元细胞分化、神经突的增长和突触可塑性过程中，起主导作用的是 RARα[14]。

体外缺氧缺糖损伤能有效反映体内缺氧缺血损伤的变化，因此本研究采用 OGD 损伤原代神经元来模拟体内 HIBD 损伤。RA 对细胞凋亡的影响具有细胞类型依赖性，可诱导肿瘤细胞凋亡，如白血病癌细胞、乳腺癌细胞等，然而它对胚胎神经细胞和某些间质细胞等又具有抗凋亡作用。据报道，在神经回路形成过程的晚期，RA 通过结合突触前 RA 受体信号和神经活性依赖事件，能有效的抑制犁鼻基底神经元的死亡[15]。Dodurga 等[16]发现在 SH-SY5Y 人类神经母细胞瘤中，RA 通过降低 URG4/URGCP 和 Bax 的表达水平，上调 Bcl-2 和 CCND1基因表达水平，从而诱导细胞分化和逃避凋亡。Reiner 等[17]也发现 RA 通过抑制 c-fos/c-jun 的表达，激活 JNK，抑制过氧化氢损伤引起的凋亡，增加细胞存活。结合文献及本实验结果所示 ATRA 抑制 OGD 损伤诱导的神经元凋亡，提示 RA 信号对神经元 OGD 损伤表现出抑制作用。

众所周知，Caspase-3 在细胞凋亡级联反应中具有不可替代的作用，并且可被体内外多种因素激活，从而引起多种细胞的凋亡。Wang 等[18]发现 RA 可抑制二氯化钴处理 PC12 细胞后引起的细胞内活性氧和 Caspase-3 的增加，从而抑制 PC12 细胞凋亡。在体内，卵丘细胞凋亡会逆转相关的胚胎发育，因此抑制卵丘细胞的凋亡对正常的胚胎发育及质

量有着重要的作用，Deb 等[19]发现 RA 可减少凋亡因子 Caspase-3、Caspase-8 及肿瘤坏死因子 α 的表达，增加抗凋亡因子 Bcl-2 的表达，抑制发育过程中卵母细胞的凋亡，维持正常的胚胎发育。TGF-β 是一组可调节细胞生长、分化、免疫和凋亡的 TGF-β 超家族，在多个器官系统中有着至关重要的作用，参与细胞的增殖与分化、炎症损伤、细胞凋亡和肿瘤生长等多个生理过程。据报道，大鼠脑缺血再灌注后，TGF-β 和 Caspase-3 的表达水平明显增高[20]，而 TGF-β 可上调 RPE 细胞表面 Fas 基因的表达水平，从而激活 Caspase-3 的活性而诱导 RPE 细胞凋亡[21]。在本实验中，ATRA 干预原代神经元后，能明显增加 RARα mRNA 和蛋白表达水平，降低 TGF-β1、TGF-β2 mRNA 表达水平和 TGF-β 蛋白表达水平，抑制 Caspase-3 蛋白表达，提示 ATRA 可以抑制 OGD 损伤引起的原代神经元凋亡，其可能的信号通路是通过激活 RARα，抑制 TGF-β 和凋亡蛋白 Caspase-3 的表达，从而抑制细胞凋亡。

综上所述，ATRA 可以激活其受体 RARα 进而下调 TGF-β，抑制凋亡蛋白 Caspase-3 的表达水平，最终抑制 OGD 损伤引起的原代神经元凋亡，促进细胞存活。既往研究多注重外缘性药物等方法治疗 HIBD，本研究试图揭示机体内环境因素如营养水平对神经损伤修复的影响，但 ATRA 通过 RARα 如何抑制神经元凋亡，其具体的分子机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Chen L, Khillan JS. A novel signaling by vitamin A/retinol promotes self renewal of mouse embryonic stem cells by activating PI3K/Akt signaling pathway via insulin-like growth factor-1 receptor[J]. Stem Cells, 2010, 28(1): 57-63.

[2] Li M, Sun Y, Guan X, et al. Advanced progress on the relationship between RA and its receptors and malignant tumors[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 91(3): 271-282.

[3] Shen H, Luo Y, Kuo CC, et al. 9-Cis-retinoic acid reduces ischemic brain injury in rodents via bone morphogenetic protein[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(2): 545-555.

[4] 江 伟，温恩懿，龚 敏，等. ATRA 和 9-cis-RA 对缺氧缺糖损伤 PC12 细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(24)：2595-2598.

[5] Zhang Q, Ding Y, Yao Y, et al. Creating rat model for hypoxic brain damage in neonates by oxygen deprivation[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83589.

[6] Zhu AH, Hu YR, Liu W, et al. Systemic evaluation of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 69(2): 295-301.

[7] Distefano G, Praticò AD. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Ital J Pediatr, 2010(36): 63.

[8] 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 Patho, 2013, 6(1): 66-75.

[9] D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin A metabolism: an update[J]. Nutrients, 2011, 3(1): 63-103.

[10] Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis[J]. Cell, 2008, 134(6): 921-931.

[11] Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development[J]. Development, 2012, 139(5): 843-858.

[12] Olson CR, Mello CV. Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning[J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54(4): 489-495.

[13] Jiang W, Yu Q, Gong M, et al. Vitamin A deficiency impairs postnatal cognitive function via inhibition of neuronal calcium excitability in hippocampus[J]. J Neurochem, 2012, 121(6): 932-943.

[14] 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(1382): 77-87.

[15] Hörnberg M, Gussing F, Berghard A, et al. Retinoic acid selectively inhibits death of basal vomeronasal neurons during late stage of neural circuit formation[J]. J Neurochem, 2009, 110(4): 1263-1275.

[16] Dodurga Y, Gundogdu G, Koc T, et al. Expression of URG4/URGCP, *Cyclin D1*, *Bcl-2*, *and Bax genes in retinoic acid treated* SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2013, 17(4): 346-349.

[17] Reiner DJ, Yu SJ, Shen H, et al. 9-Cis retinoic acid protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons[J]. Neurotox Res, 2014, 25(3): 248-261.

[18] Wang S, Hu CP, Jiang DJ, et al. All-trans retinoic acid inhibits cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells: role of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway [J]. J Neurosci Res, 2009, 87(8): 1938-1946.

[19] Deb GK, Dey SR, Bang JI, et al. 9-cis Retinoic acid inhibits cumulus cell apoptosis during the maturation of bovine cumulus-oocyte-complexes[J]. J Anim Sci, 2012, 90(6): 1798-1806.

[20] 赵 敏，李江华，霍晓东，等. 高血压大鼠脑缺血再灌注后 TGF-β1、Caspase-3 的表达与细胞凋亡[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2010，8(2)：205-206.

[21] 赵 宏，丁相奇，顾东霞，等. TGF-β1 对 RPE 细胞 Bcl-2/Fas mRNA 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展，2006，27(3)：194-197.

（责任编辑：关蕴良）