

## · 研究简报 ·

## 血管内皮生长因子介导 PI3K-eNOS 信号通路对脑瘫模型大鼠神经损伤的保护作用

刘毅梅 惠需 徐晓华 华颖 徐锦文 窦红波

**【摘要】目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)对脑瘫模型大鼠神经损伤的保护作用及机制。**方法** 构建新生大鼠宫内脑缺血缺氧性脑瘫模型,体外培养原代皮质神经细胞和皮质组织,添加谷氨酸制造神经损伤,Q-PCR及Western blot分别检测VEGF处理对细胞凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)与信号通路相关蛋白磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的mRNA与蛋白表达的影响。**结果** 随着谷氨酸浓度的逐渐升高,原代神经细胞和脑片组织细胞的存活率均逐渐降低,分别由(92.34±4.12)%和(98.23±2.74)%逐渐降为0,分别选择200 μM、400 μM作为后续谷氨酸处理原代神经细胞、脑片组织细胞的浓度,此时细胞存活率分别为:(65.32±6.45)%、(53.21±5.03)%;谷氨酸处理细胞后Bcl-2的蛋白表达降低,Bax的蛋白表达升高,二者mRNA表达的Bcl-2/Bax比值显著降低( $P<0.05$ );VEGF预处理细胞后Bcl-2的蛋白表达显著升高,Bax的表达显著降低,二者mRNA表达的Bcl-2/Bax比值显著升高( $P<0.05$ );VEGF预处理细胞后PI3K、eNOS的蛋白和mRNA表达均显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );PI3K抑制剂和eNOS抑制剂预处理细胞后,与谷氨酸处理相比,Bcl-2、Bax的蛋白表达以及二者mRNA表达的Bcl-2/Bax比值的变化差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** VEGF可改善由谷氨酸所造成的缺血缺氧脑组织的神经损伤,且该保护作用可能是部分通过PI3K-eNOS信号通路完成的。

**【关键词】** 血管内皮生长因子; VEGF; 脑性瘫痪; PI3K-eNOS信号通路; 谷氨酸

脑性瘫痪(cerebral palsy),简称脑瘫,很大一部分是由于分娩时窒息、缺氧导致的脑缺血缺血性损伤<sup>[1]</sup>。在脑缺血缺血性损伤后,受损部位的神经细胞会产生过量的兴奋性氨基酸(excitatory amino-acid, EAA),EAA类神经递质兼有对神经元的兴奋作用和神经毒性作用,兴奋性强则毒性也强<sup>[2]</sup>,其中谷氨酸(glutamate)是脑内含量最多、毒性最强的兴奋性氨基酸。谷氨酸盐的异常释放是导致新生儿脑损伤的重要因素,与缺血缺氧性脑病有紧密关系<sup>[3]</sup>。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有营养与保护神经的作用。已有的研究表明缺氧可诱导缺氧诱导因子(hypoxia induced factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )与VEGF基因启动子上的缺氧应答元件结合,增加VEGF的表达<sup>[4]</sup>,而缺血缺氧动物和细胞模型反复证明病理状态下VEGF的表达减少,提示增加VEGF表达可能对治疗脑瘫有促进作用,但其对小儿脑瘫中神经损伤的保护作用及其作用机制目前尚未见报道。本研究通过构建新生大鼠宫内脑缺血缺氧性脑瘫模型,检测外源性VEGF对体外培养的原代神经细胞及模型皮质组织细胞凋亡的影响,观察VEGF对磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)信号通路的作用,旨在探讨VEGF对脑瘫模型大鼠神经损伤的保护作用及其作用机制。

## 材料与amp;方法

## 一、主要实验试剂及仪器

主要试剂:无血清神经培养基(neurobasal medium, NB)、Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)(美国Invitrogen公司)、B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(美国Cell Signaling公司)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(美国Cell Signaling公司)、eNOS抗体(美国Cell Signaling公司)、PI3K一抗选用Phospho-PI3K p85(Tyr458)/p55(Tyr199)抗体(美国Cell Signaling公司)、eNOS抑制剂选用L-NAME(美国Sigma公司)、PI3K抑制剂选用LY294002(美国Sigma公司)、蛋白免疫印迹(Western-Blot)内参选用微管蛋白基因 $\beta$ -Tubulin(美国Cell Signaling公司)。

主要试剂盒:细胞增殖与活性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(南京恩晶公司)、SYBRGreen荧光定量PCR试剂盒(日本Takara公司);引物设计合成依据Genebank采用Primer 5.0软件设计,由上海生工合成。

主要仪器:CO<sub>2</sub>培养箱(美国Forma Scientific公司)、倒置显微镜(日本Nikon公司)、实时荧光定量PCR仪7900(美国ABI公司)。

## 二、实验大鼠脑瘫模型制作及实验分组

1. 实验动物:选取健康SPF级妊娠期第17~19天(记为孕<sub>17-19</sub>)雌性Sprague-Dawley(SD)大鼠与妊娠期第22~23天(记为孕<sub>22-23</sub>)雌性SD大鼠各30只,由北京维通利华公司提供。

2. 原代皮质神经细胞提取:无菌条件下将孕<sub>17-19</sub>大鼠麻醉后断头处死,取出胎鼠的脑部组织,分离皮质,置于HBSS中,剔除软脑膜等,0.03%胰酶消化分散后,加入含胎牛血清的培养基

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.01.015

作者单位:214023 江苏,无锡市儿童医院康复科(刘毅梅、惠需、徐晓华、华颖、徐锦文);无锡市残疾人联合会(窦红波)

通信作者:惠需,Email:huixu5919@sina.com

终止消化,制成密度为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  个/ml 的细胞悬液,置于  $37^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养,48 h 后,加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷 ( $10 \mu\text{M}$ ) 抑制非神经细胞增殖,24 h 后全换液,继续培养 1 周后用于实验。

3. 新生大鼠缺血缺氧性脑瘫模型<sup>[1]</sup>的建立:于孕<sub>22-23</sub>大鼠腹部明显摸到胎鼠,行剖宫产手术,即用吸入异氟烷(怡美宁公司)麻醉孕鼠,沿腹中线切开皮肤,钝性分离肌肉,从剑骨向下分离至后腹部暴露子宫,止血钳夹住子宫颈与两侧输卵管和子宫动脉,阻断血流 30 min 后,取出胎鼠。用代乳母鼠喂养 3 d 后(P3)用于实验。

4. 脑瘫模型大鼠皮质脑片制片:取 P3 乳鼠,75% 乙醇浸泡表面消毒,断头取脑,体视显微镜下剥除脑膜,分离皮质部分,置于预冷的 HBSS 中,活体组织切片机上切取全脑脑片,厚度  $400 \mu\text{m}$ ,脑片置于 6 孔板中培养(95%  $\text{O}_2$ )。

5. 实验分组:本研究分为原代神经细胞组和脑片组织细胞组两个大组分别进行研究,将每个大组培养好的细胞和组织按随机数字表法又分为谷氨酸处理组、VEGF 处理组、VEGF 保护组、LY294002 组、L-NAME 组及对照组。①谷氨酸处理组:只使用谷氨酸  $200 \mu\text{M}$ 、 $400 \mu\text{M}$  分别处理原代神经细胞和脑片组织细胞 12 h;②VEGF 处理组:只使用 VEGF ( $50 \mu\text{M}$ ) 分别预处理原代神经细胞和脑片组织细胞 12 h;③ VEGF 保护组:使用 VEGF ( $50 \mu\text{M}$ ) 分别预处理原代神经细胞和脑片组织细胞 12 h 后,再分别加入  $200 \mu\text{M}$  和  $400 \mu\text{M}$  的谷氨酸处理细胞和组织 12 h;④ LY294002 组:使用 PI3K 抑制剂 LY294002 ( $10 \mu\text{M}$ ) 处理原代神经细胞和脑片组织细胞 6 h 后,再使用 VEGF ( $50 \mu\text{M}$ ) 分别处理细胞和组织 12 h,最后再分别加入  $200 \mu\text{M}$  和  $400 \mu\text{M}$  的谷氨酸处理细胞和组织 12 h;⑤ L-NAME 组:使用非选择性的 eNOS 抑制剂 L-NAME ( $80 \mu\text{M}$ ) 处理原代神经细胞和脑片组织细胞 6 h 后,再使用 VEGF ( $50 \mu\text{M}$ ) 分别处理细胞和组织 12 h,最后再分别加入  $200 \mu\text{M}$  和  $400 \mu\text{M}$  的谷氨酸处理细胞和组织 12 h;⑥ 对照组:用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 代替药物分别同时处理细胞和组织。收集处理后的细胞,提取总 RNA 和总蛋白,检测相关蛋白如 Bcl-2、Bax、PI3K、eNOS 的 mRNA 和蛋白的表达,比较 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达的 Bcl-2/Bax 比值变化。

### 三、实验检测方法

1. CCK-8 测细胞活力:使用不同浓度的 VEGF 和谷氨酸分别预处理神经细胞和皮质脑片组织,然后继续孵育 2 h,采用细胞活力检测试剂盒测细胞活力,严格按照产品说明书操作,在  $450 \text{ nm}$  测定吸光度。

2. 实时荧光定量 RT-PCR (RT-qPCR) 检测:按 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)说明书操作,提取细胞和脑片组织的总 RNA,分光光度计测总 RNA 浓度,然后反转录为 cDNA。按照 SYBRGreen 荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作,在实时 PCR 仪中进行实时 PCR 反应。反应完毕后,采用 Opticon Monitor 3.1 软件处理实验结果,以 Bcl-2 相对 mRNA 的表达与 Bax 相对 mRNA 的表达的比值 Bcl-2/Bax 作为纵坐标绘制柱状图,所有实验均设定未进行处理的对照组为 100(%)。

3. 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测:收集细胞和脑片组织,加入适量放射免疫沉淀试验 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液(碧云天公司),冰上匀浆,  $4^\circ\text{C}$   $12\ 000 \text{ r/min}$

(离心半径为 6 cm) 离心 15 min,取上清,二辛可酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测总蛋白浓度。调整样品上样量终浓度为  $50 \sim 80 \mu\text{g}$ ,蛋白煮沸变形 5 min,进行 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),湿转法转移蛋白至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入适当浓度的一抗,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,漂洗后加适当浓度的二抗,室温孵育 2 h。漂洗后采用增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 法显色,暗室用胶片曝光。冲洗后采用 Bandscan 5.0 软件扫描蛋白条带,并分析结果。

### 四、统计学方法

使用 SPSS 19.0 版统计软件进行统计学分析,所得数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 ANOVA 方法进行方差分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、不同浓度谷氨酸对脑瘫模型大鼠神经元的毒性损伤作用

在培养 7 d 后的原代神经细胞和脑片组织培养槽中,分别加入不同浓度 (0、50、100、200、400、600 和 1000  $\mu\text{M}$ ) 的谷氨酸预处理 12 h 后测细胞活力。随着谷氨酸浓度的逐渐升高,原代神经细胞和脑片组织细胞的存活率均逐渐降低(表 1)。对于原代神经细胞,谷氨酸浓度为  $200 \mu\text{M}$  和  $400 \mu\text{M}$  时对细胞有较强的毒性作用,但鉴于当谷氨酸浓度为  $400 \mu\text{M}$  时细胞凋亡率过高,不宜在此基础上再进行更多的研究,故选择  $200 \mu\text{M}$  作为后续实验处理浓度。同样的方法,对于脑片组织细胞,选择  $400 \mu\text{M}$  作为后续实验处理浓度。

表 1 不同谷氨酸浓度预处理原代神经细胞和脑片组织细胞 12 h 后的细胞存活率情况 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

谷氨酸浓度 ( $\mu\text{M}$ )	存活率	
	原代神经细胞	脑片组织细胞
0	92.34 $\pm$ 4.12	98.23 $\pm$ 2.74
50	88.23 $\pm$ 2.31	85.48 $\pm$ 3.18
100	86.92 $\pm$ 4.16	83.02 $\pm$ 6.44
200	65.32 $\pm$ 6.45	79.29 $\pm$ 5.39
400	20.21 $\pm$ 4.97	53.21 $\pm$ 5.03
600	0	21.22 $\pm$ 4.38
1000	0	0

### 二、谷氨酸对脑瘫模型大鼠神经元中 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

在原代神经细胞组和脑片组织细胞组两大组实验中,与对照组相比,谷氨酸处理组的 Bcl-2 蛋白表达均明显降低,其 Bax 蛋白的表达亦均较对照组升高,详见图 1。

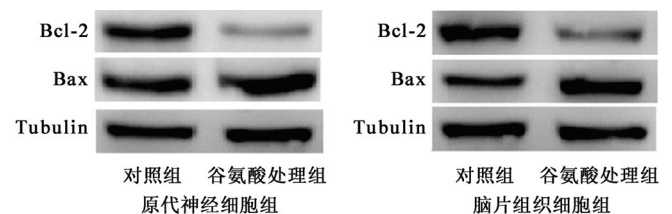
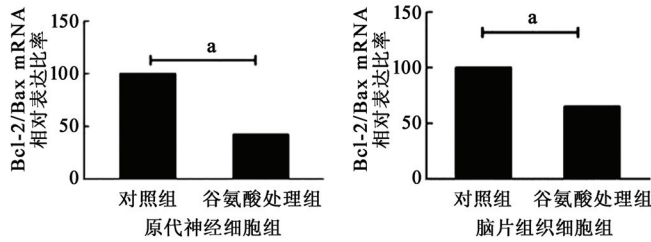


图 1 两大实验组经谷氨酸处理后 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

二者 mRNA 表达的比值 Bcl-2/Bax 均显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见图 2。



注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$

图 2 两大实验组经谷氨酸处理后 Bcl-2/Bax mRNA 相对表达比值的比较

三、VEGF 对损伤的脑瘫模型大鼠神经元中 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

在原代神经细胞组和脑片组织细胞组两大组实验中, 与谷氨酸处理组相比, VEGF 保护组的抗凋亡蛋白 Bcl-2 的蛋白表达均显著增加, 促凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达均显著降低, 详见图 3。

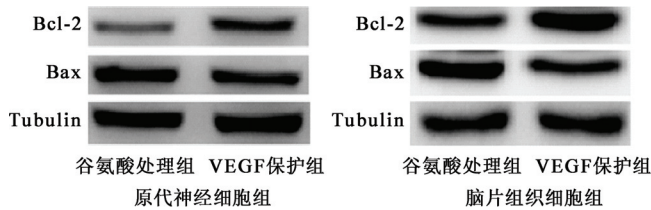
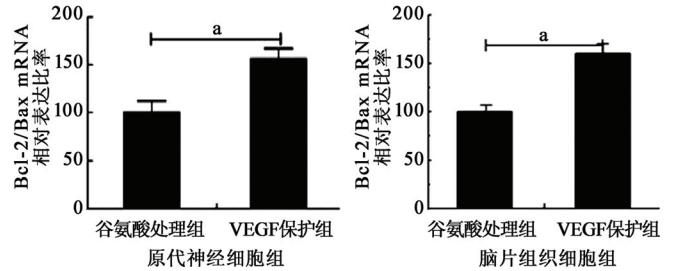


图 3 两大实验组经 VEGF 预处理后 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

二者 mRNA 表达的比值 Bcl-2/Bax 均显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见图 4。



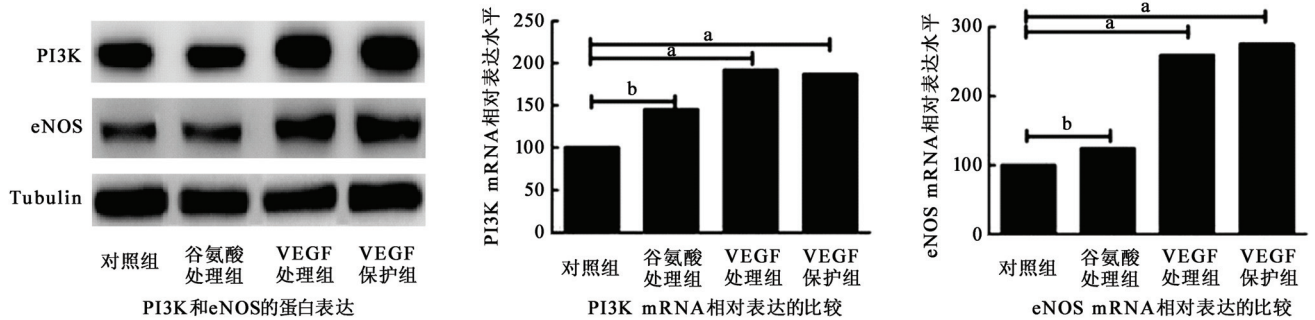
注: 与谷氨酸处理组比较,  $^a P < 0.05$

图 4 两大实验组经 VEGF 预处理后 Bcl-2/Bax mRNA 相对表达比值的比较

四、VEGF 对脑瘫模型大鼠神经元中 PI3K 和 eNOS 表达的影响

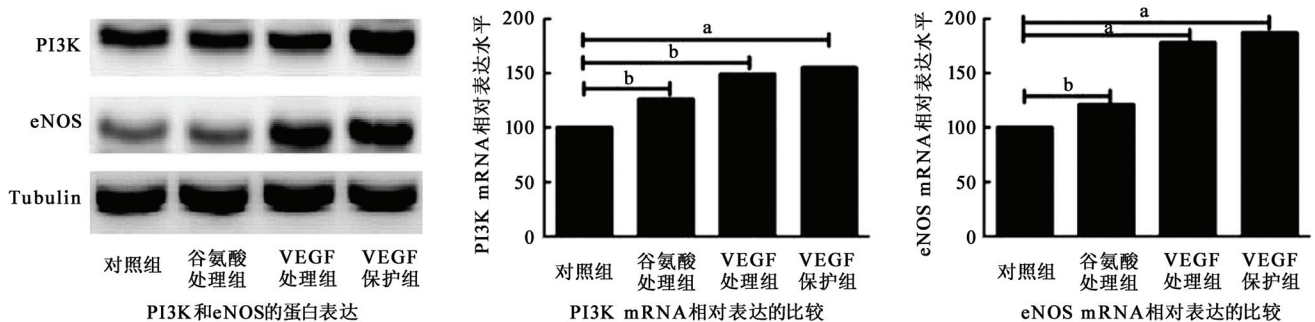
1. 原代神经细胞组实验: 与对照组相比, 谷氨酸处理组的 PI3K、eNOS 的 mRNA 和蛋白表达无明显变化 ( $P > 0.05$ ), VEGF 处理组和 VEGF 保护组 PI3K、eNOS 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 详见图 5。

2. 脑片组织细胞组实验: 与对照组相比, 谷氨酸处理组的 PI3K、eNOS 的 mRNA 和蛋白表达无明显变化 ( $P > 0.05$ ), VEGF 保护组的 PI3K、eNOS 的 mRNA 和蛋白表达显著上升, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); VEGF 处理组的 eNOS mRNA 和蛋白表达显著增强 ( $P < 0.05$ ), 但 VEGF 处理组的 PI3K mRNA 和蛋白表达变化不明显, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 详见图 6。



注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P > 0.05$

图 5 原代神经细胞组实验各组经 VEGF 预处理后 PI3K 和 eNOS 的蛋白表达及 mRNA 相对表达的比较



注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P > 0.05$

图 6 脑片组织细胞组实验各组经 VEGF 预处理后 PI3K 和 eNOS 蛋白表达及 mRNA 相对表达的比较

### 五、PI3K 和 eNOS 抑制剂对 VEGF 保护作用的影响

在原代神经细胞组和脑片组织细胞组两大组实验中,与谷氨酸处理组相比,LY294002 组和 L-NAME 组的 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达及二者 mRNA 表达的 Bcl-2/Bax 比值均无明显变化,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图 7 和图 8。

### 讨 论

脑性瘫痪的病因复杂,包括分娩时窒息、缺氧缺血性脑病、黄疸、早产等,导致这些表现的病理过程主要是脑组织神经细胞的凋亡和坏死。从病理学角度考虑,谷氨酸盐的异常释放是导致新生脑损伤的重要因素。VEGF 为血管内皮细胞特异性的促有丝分裂原,具有血管发生、促进神经细胞恢复及对神经系统保护的功能,在缺血缺氧性脑病中有着重要作用。本研究采用先夹闭孕鼠子宫动脉造成尚未娩出的胎鼠供血供氧不足,再剖腹取出胎鼠的方法构建新生大鼠缺血缺氧性脑瘫模型,与传统的结扎新生乳鼠单侧颈总动脉、再吸入低氧的方法构建的缺血缺氧动物模型相比,更接近人类新生儿因缺血缺氧导致脑瘫的发病过程<sup>[5]</sup>。本研究中对损伤程度的判断选用典型的凋亡调控蛋白 Bcl-2 和 Bax,二者的表达在缺血缺氧过程中的变化趋势相反,且二者的比值与凋亡程度呈负相关<sup>[6-7]</sup>。本研究的结果显示谷氨酸可以降低原代神经细胞和脑片组织细胞的存活率,经谷氨酸处理后 Bcl-2 蛋白的表达下调,Bax 蛋白的表达上调,二者 mRNA 表达的比值 Bcl-2/Bax 的显著降低,mRNA 和蛋白的

表达变化一致。这表明谷氨酸对原代神经细胞和脑片组织细胞的凋亡都有一定的促进作用,说明谷氨酸可对神经细胞造成损伤。本研究显示,VEGF 预处理可显著促进 Bcl-2 的蛋白表达、抑制 Bax 的蛋白表达,从而升高二者 mRNA 表达的比值 Bcl-2/Bax;mRNA 和蛋白的表达变化一致,表明 VEGF 预处理对谷氨酸引起的原代神经元细胞和脑片组织细胞的凋亡都有显著的抑制作用,提示 VEGF 可以通过减少神经细胞凋亡,改善由谷氨酸所造成的神经细胞损伤,发挥其神经保护作用。这一研究结果与多篇关于 VEGF 及其受体对缺血缺氧组织保护作用的文献报道<sup>[8-11]</sup>一致。Bain 等<sup>[8]</sup>研究显示,新生儿神经胶质祖细胞中 VEGF-A 和 VEGF-C 的表达在缺血缺氧条件下有显著提高。Zheng 等<sup>[9]</sup>研究发现,表达 VEGF 的神经干细胞在新生大鼠脑瘫模型中可发挥修复作用。Oosthuysen 等<sup>[10]</sup>报道,VEGF165 与 VEGF 受体 2 和神经纤毛蛋白 1 结合可以促进缺氧过程中运动神经元的存活。Bearden 等<sup>[11]</sup>认为,VEGF 的增多可以促进运动神经细胞的存活和再生。

通常认为在缺血缺氧的病理条件下,一氧化氮(nitric oxide, NO)的合成增多会导致一系列不良预后。有研究表明,缺血缺氧时外周血和脑脊液中 NO 含量明显增高,诱导炎症细胞(包括胶质细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等)浸润,谷氨酸盐、氧自由基的过度释放,从而在继发脑缺血损伤中扮演一定作用。测量临床脑瘫患儿血液中的 NO 含量也表明,患儿的 NO 水平跟正常儿童比显著增高,提示具有 NOS 抑制活性的药物可作为治疗小

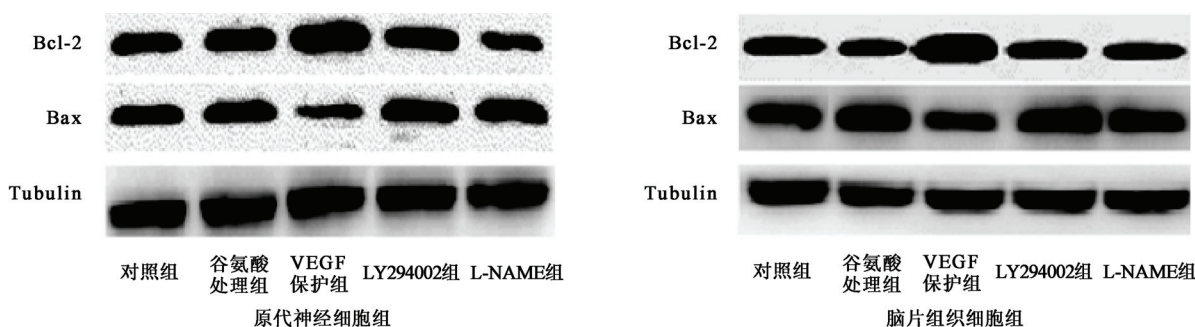
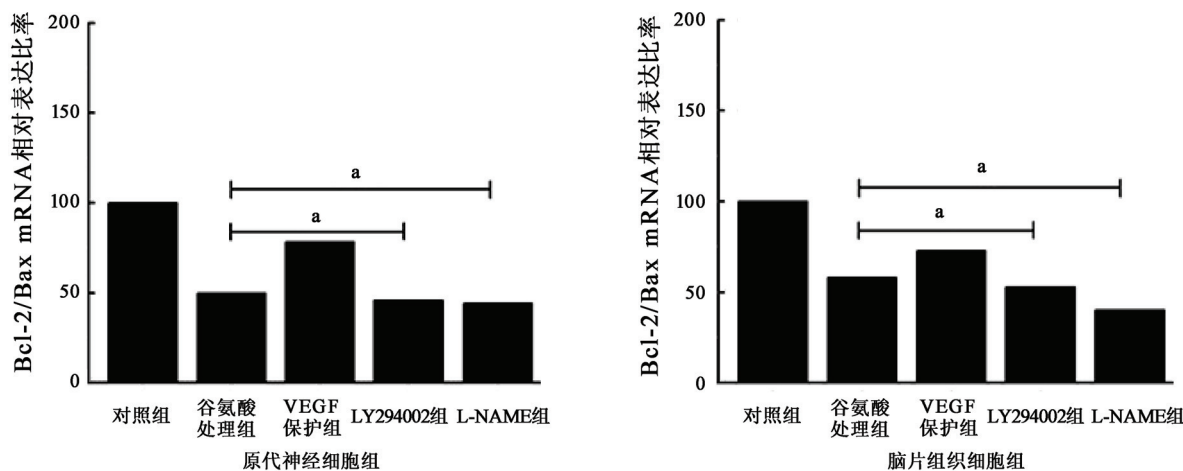


图 7 两大实验组经 LY294002 和 L-NAME 分别预处理后各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达



注:与谷氨酸处理组比较,<sup>a</sup> $P > 0.05$

图 8 两大实验组经 LY294002 和 L-NAME 分别预处理后各组 Bcl-2/Bax mRNA 相对表达比值的比较

儿脑瘫的候选药物<sup>[12]</sup>。但本研究结果显示,VEGF 预处理可以上调 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达;NOS 抑制剂 L-NAME 预处理细胞后,跟谷氨酸处理组相比,Bcl-2、Bax 的蛋白表达以及二者 mRNA 表达的比值 Bcl-2/Bax 均无统计学意义的变化,mRNA 和蛋白的表达变化一致,即 VEGF 对 Bcl-2、Bax 表达的调节作用均被抑制,说明 VEGF 对神经细胞的保护作用可被 eNOS 抑制剂 L-NAME 所阻断,提示 VEGF 预处理所导致的 NO 释放可发挥一定程度的神经保护作用。有文献报道 NO 在缺血缺氧组织中起保护作用,如孟凌新等<sup>[13]</sup>研究发现,通过缺血缺氧处理前给精氨酸处理,能减轻水肿,抑制脑内氧自由基表达,表明 NO 代谢对脑缺血有保护作用。上述结果提示,NO 在缺血缺氧的过程中扮演了双重作用。

本研究表明,VEGF 可以上调 PI3K 和 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达;PI3K 抑制剂 LY294002 和 eNOS 抑制剂 L-NAME 预处理细胞后,跟谷氨酸处理组相比,Bcl-2、Bax 的蛋白表达以及二者 mRNA 表达的比值 Bcl-2/Bax 均无统计学意义的变化,且 mRNA 和蛋白的表达变化一致,说明 VEGF 对 Bcl-2、Bax 的表达的调节作用可被 PI3K 抑制剂和 eNOS 抑制剂所阻断,提示 VEGF 可以通过 PI3K-eNOS 信号通路发挥抑制细胞凋亡进而保护神经细胞的作用。这为 VEGF 的详细作用机制的揭示以及脑瘫临床药物的开发提供了新的思路,奠定了一定的研究基础。但已有的研究表明,VEGF 可通过多条信号通路发挥其神经保护作用,如 Shiote 等<sup>[14]</sup>研究显示,VEGF 通过其特异性受体 Flk-1 介导 PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 和促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 两条信号通路保护运动神经元对抗缺氧诱导的毒性损伤。Tolosa 等<sup>[15]</sup>研究证明,VEGF 通过激活 PI3K/AKT 通路保护大鼠脊髓神经对抗慢性谷氨酸导致的兴奋毒性;Ma 等<sup>[16]</sup>研究发现,MEK/ERK 通路参与了 VEGF 介导的对抗机械性创伤损伤的神经保护作用;Cui 等<sup>[17]</sup>研究证明,VEGF 通过活化 PI3K/AKT 通路和 ERK 通路抑制神经细胞凋亡;Wang 等<sup>[18]</sup>研究发现促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/ERK 通路在 VEGF 诱导 Homer 1a 基因 mRNA 表达的过程中起着重要的作用;Fournier 等<sup>[19]</sup>研究表明,海马神经元祖细胞中 VEGF 通过 ERK 和 AKT 通路发挥其促增殖作用。但关于 VEGF 是否还通过其它信号通路[如蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 通路、MAPK 通路、MEK/ERK 通路等]保护脑瘫模型大鼠中的神经损伤,以及参与 PI3K-eNOS 信号通路的其它信号蛋白到底有哪些,均有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006 [J]. Dev Med Child Neurol Suppl, 2007, 109(1): 8-11.
- [2] McIntosh TK. Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review [J]. J Neurotrauma, 1993, 10(3): 215-226.
- [3] Plangger C. Effect of gamma-hydroxybutyrate on intracranial pressure, mean systemic arterial pressure and cerebral perfusion pressure in experimentally induced brain edema of the rat [J]. Zentralbl Neurochir, 1990, 51(1): 24-33.
- [4] McCloskey DP, Hintz TM, Scharfman HE. Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects [J]. Brain Res Bull, 2008, 76(1-2): 36-44.
- [5] 张奇, 李瑞林, 李占魁, 等. 高压氧预处理对宫内缺氧缺血大鼠脑组织 SOD 活性、MDA 含量的影响 [J]. 中国儿童保健杂志, 2001, 9(3): 188-190.
- [6] 梅波, 赖应龙. 体外循环脑损伤及脑保护研究进展 [J]. 中国体外循环杂志, 2010, 8(2): 125-128.
- [7] Gibson ME, Han BH, Choi J, et al. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia; evidence for distinct apoptosis pathways [J]. Molecular Medicine, 2001, 7(9): 644-655.
- [8] Bain JM, Moore L, Ren Z, et al. Vascular endothelial growth factors A and C are induced in the SVZ following neonatal hypoxia-ischemia and exert different effects on neonatal glial progenitors [J]. Transl Stroke Res, 2013, 4(2): 158-170.
- [9] Zheng XR, Zhang SS, Yin F, et al. Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats [J]. Behavioural Brain Research, 2012, 230(1): 108-115.
- [10] Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration [J]. Nat Genet, 2001, 28(2): 131-138.
- [11] Bearden SE, Segal SS. Microvessels promote motor nerve survival and regeneration through local VEGF release following ectopic reattachment [J]. Microcirculation, 2004, 11(8): 633-644.
- [12] 梅波, 赖应龙. 体外循环脑损伤及脑保护研究进展 [J]. 中国体外循环杂志, 2010, 8(2): 125-128.
- [13] 孟凌新, 张丽红, 崔健君. 一氧化氮代谢对缺血缺氧脑组织丙二醛的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2002, 31(3): 168-169.
- [14] Shiote M, Nagano I, Ilieva H, et al. Reduction of a vascular endothelial growth factor receptor, fetal liver kinase-1, by antisense oligonucleotides induces motor neuron death in rat spinal cord exposed to hypoxia [J]. Neuroscience, 2005, 132(1): 175-182.
- [15] Tolosa L, Mir M, Asensio VJ, et al. Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase [J]. J Neurochem, 2008, 105(4): 1080-1090.
- [16] Ma Y, Liu W, Wang Y, et al. VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway [J]. Brain Res Bull, 2011, 86(5-6): 441-446.
- [17] Cui W, Li W, Han R, et al. PI3-K/Akt and ERK pathways activated by VEGF play opposite roles in MPP<sup>+</sup>-induced neuronal apoptosis [J]. Neurochem Int, 2011, 59(6): 945-953.
- [18] Wang Y, Fei Z, Ma YH, et al. VEGF upregulates Homer 1a gene expression via the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured cortex neurons [J]. Neurosci Lett, 2012, 515(1): 44-49.
- [19] Fournier NM, Lee B, Banasr M, et al. Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/Akt-dependent signaling [J]. Neuropharmacology, 2012, 63(4): 642-652.

(修回日期: 2014-05-30)

(本文编辑: 汪 玲)