

CXC 趋化因子受体 7 对缺血性脑卒中神经元细胞周期的影响

王雪颖¹ 孟海宁¹ 王松梅³ 谢伟峰² 曲彦²

¹ 青岛大学医学部, 山东青岛 266071; ² 青岛大学附属青岛市市立医院重症医学科, 山东青岛 266071; ³ 青岛大学附属青岛市市立医院急诊科, 山东青岛 266071

通信作者: 曲彦, Email: qdquyan@aliyun.com

【摘要】 目的 探究 CXC 趋化因子受体 7 (CXCR7) 在缺血性脑卒中神经元中的功能及机制。**方法** 采用小干扰 RNA (si-RNA) 技术干扰 CXCR7 在人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞中的表达; 在 SH-SY5Y 细胞中构建氧-葡萄糖剥夺/复氧 (OGD/R) 损伤模型; 流式细胞术 (FCM) 检测 CXCR7 蛋白表达以及细胞周期; 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 CXCR7 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 信号通路蛋白表达。**结果** 与 OGD/R 0 h 相比, OGD/R 6 h 后 CXCR7 表达明显降低 (CXCR7/GAPDH: Western blotting 检测为 0.483 ± 0.098 比 1.000 ± 0.000 , FCM 检测为 0.686 ± 0.052 比 1.000 ± 0.000 , 均 $P < 0.01$), 细胞周期阻滞在 G0/G1 期 (1.190 ± 0.040 比 1.000 ± 0.000 , $P < 0.01$); CXCR7 si-RNA 干扰 SH-SY5Y 细胞后再次构建 OGD/R 6 h, 与相同环境下阴性对照组 (si-NC 组) 相比, CXCR7 与磷酸化 Akt (p-Akt) 表达明显降低 (CXCR7/GAPDH: 0.471 ± 0.051 比 1.000 ± 0.000 , p-Akt/GAPDH: 0.616 ± 0.027 比 1.000 ± 0.000 , 均 $P < 0.001$), 并且细胞周期阻滞在 G0/G1 期 (1.105 ± 0.033 比 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$)。**结论** CXCR7 可以通过 Akt 信号通路调节缺血性脑卒中神经元的周期, 对神经元起到保护作用。

【关键词】 缺血性脑卒中; 氧-葡萄糖剥夺/复氧; CXC 趋化因子受体 7; 蛋白激酶 B; 细胞周期
基金项目: 国家自然科学基金 (81971873)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211221-01898

Effect of CXC chemokine receptor 7 on cell cycle of neuronal cells in ischemic stroke

Wang Xueying¹, Meng Haining¹, Wang Songmei³, Xie Weifeng², Qu Yan²

¹Department of Medicine, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China; ²Department of Critical Care Medicine, Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China; ³Department of Emergency, Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China

Corresponding author: Qu Yan, Email: qdquyan@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the function and mechanism of CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) in neuronal cells of ischemic stroke. **Methods** The expression of CXCR7 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells was interfered by small interfering RNA (si-RNA) technique. Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury model was constructed in SH-SY5Y cells. CXCR7 protein expression and cell cycle were detected by flow cytometry (FCM). The protein expression of CXCR7 and Akt signaling pathway was detected by Western blotting. **Results** After 6 hours of OGD/R, the expression of CXCR7 was significantly decreased compared with OGD/R 0 hour (CXCR7/GAPDH: 0.483 ± 0.098 vs. 1.000 ± 0.000 by Western blotting and 0.686 ± 0.0524 vs. 1.000 ± 0.000 by FCM, both $P < 0.01$), cell cycle arrest in G0/G1 phase (1.190 ± 0.040 vs. 1.000 ± 0.000 , $P < 0.01$). After CXCR7 si-RNA interference with SH-SY5Y cells, OGD/R was constructed again for 6 hours. Compared with negative control group (si-NC group) under the same environment, the expression of CXCR7 and phosphorylated Akt (p-Akt) was significantly decreased (CXCR7/GAPDH: 0.471 ± 0.051 vs. 1.000 ± 0.000 , p-Akt/GAPDH: 0.616 ± 0.027 vs. 1.000 ± 0.000 , both $P < 0.001$) and cell cycle arrest in G0/G1 phase (1.105 ± 0.033 vs. 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$). **Conclusion** The CXCR7 could regulate the cycle of neuronal cells in ischemic stroke through Akt signaling pathway, which has a protective effect on neuronal cells.

【Key words】 Ischemic stroke; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; CXC chemokine receptor 7; Protein kinase B; Cell cycle

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81971873)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211221-01898

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是由于多种原因造成的脑供血的突然减少而引起一系列的病理改变, 最终造成人脑功能障碍的一种疾病, 是全球神经系统发病率和病死率均位居前位的疾病之一。有研究表明, 脑卒中的发生率正在逐渐增

加, 全球脑卒中的终生风险可达 24.9%, 其中缺血性卒中的风险明显高于出血性卒中^[1]。由于 IS 的高致残与致死率, 已在全球范围内造成不可忽视的经济负担, 引起了广泛关注^[2-3]。在临床治疗中, IS 现有的主要治疗方法为组织型纤溶酶原激活物 (tissue

plasminogen activator, TPA) 静脉溶栓与乙酰水杨酸^[4],虽然这些治疗方法取得了一定的治疗效果,但寻求更高效、更安全的治疗方案仍是研究重点。

CXC 趋化因子受体 7(CXC-chemokine receptor 7, CXCR7) 属于七跨膜结构的非典型趋化因子受体(atypical chemokine receptors, ACKRs) 的家族成员,是趋化因子 12(CXC-chemokine ligand 12, CXCL12) 的受体之一,而且它与 CXCL12 的亲合力明显高于 CXCL12 的另一个受体 CXCR4^[5]。先前对 CXCL12 的研究主要集中在受体 CXCR4 方面,如其可参与癌症进程^[6-8],可动员 IS 祖细胞的归巢^[9],但是关于 CXCR7 的研究相对较少,需要进一步研究。CXCR7 具有七次跨膜结构,与典型的 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPCR) 的保守结构域具有同源性,但是 CXCR7 与典型的 GPCR 不同,由于 CXCR7 缺乏可以用于与 Gi 蛋白耦联以及用于信号转导的功能域,所以其无法通过 Gi 蛋白诱导细胞信号转导^[10],而是作为配体的清道夫受体发挥功能。

大脑神经元细胞是参与脑部细胞间信号转导的高度特化细胞,是中枢神经系统(central nervous system, CNS) 中含量最丰富以及功能最重要的细胞种类之一^[11]。有研究证明,脑部神经元中可以检测到 CXCR7 的表达^[12]。然而,就 IS 而言,神经元中 CXCR7 的作用和机制目前尚不完全清楚, CXCR7 通过何种信号通路发挥作用有待进一步研究。

SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞,其形态学、神经化学和电生理学特性与神经元相似,已被广泛用于研究神经元损伤或死亡的体外模型^[13]。因此,本研究通过构建氧-葡萄糖剥夺/复氧(oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 模型,探究 CXCR7 基因在 SH-SY5Y 细胞中的表达及功能。

1 材料与方法

1.1 细胞培养:神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y(青岛大学生理实验室)常规培养在含有体积分数为 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; 美国 Biological Industries 公司)、100 kU/L 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),每天更换培养基,并将细胞培养在 37 °C、含有体积分数为 5% CO₂ 的加湿培养箱中。当细胞汇合度约为 80% 时,用 0.25 g/L 的胰蛋白酶消化进行细胞传代。

1.2 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,经青岛市市立医院伦理委员会审批(审批号:2022-002)。

1.3 OGD/R 模型:培养瓶中去除原培养基,更换为

不含血清的低糖 DMEM 培养基(葡萄糖 1 000 mg/L)。通过使用以抗坏血酸钠为主要成分的 AnaeroPack(日本三菱瓦斯化学公司)吸收氧气,并通过氧化降解产生 CO₂^[14]来创造缺氧条件。将两组细胞、一袋 AnaeroPack(日本三菱瓦斯化学公司)和一个 Anaero-Indicator(日本三菱瓦斯化学公司)一起放入密闭罐(日本三菱瓦斯化学公司)中,于 37 °C 培养箱中培养。缺氧 1 h 后开始计时,此时 Anaero-Indicator 为粉红色,提示密闭罐中氧含量低于 0.1%,6 h 后开启密闭罐终止缺氧,取出细胞,更换无血清低糖 DMEM 培养基为普通 DME 培养基,然后将细胞放在含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中继续复氧 24 h。

1.4 小干扰 RNA (small interfering RNA, si-RNA) 转染:神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 提前 1 d 接种于 6 孔板内,于培养箱中贴壁培养过夜,待细胞贴壁达约 70% 后使用无血清 DMEM 进行 CXCR7 的 si-RNA 转染, si-RNA 靶序列由吉玛基因(中国)设计合成,转染 6~8 h 后更换为含有血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h,并将细胞分别设置为阴性对照组(si-NC 组,指与目的基因序列无同源性的普通阴性对照)与转染干扰 CXCR7 的 si-RNA 实验组(si-CXCR7 组)。

1.5 蛋白质提取和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting):细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 2 次,然后将细胞在 RIPA 缓冲混合物(RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂为 100:1:1)中裂解提取总蛋白后,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BAC)法测定蛋白样品的浓度。蛋白质在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离,然后印迹到聚偏二氟乙烯膜(美国 Immobilon 公司)上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,与特异性 CXCR7 抗体(1:1 000 稀释,美国 Abcam 公司)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)抗体、磷酸化 Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)抗体(1:1 000 稀释,美国 Cell Signaling Technology 公司)、anti-GAPDH(1:10 000 稀释,碧云天)4 °C 过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween 20, TBST)洗涤后加入辣根过氧化物酶耦联的抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG; 1:8 000 稀释,中国 Absin 公司)室温孵育 2 h。通过暴露于具有化学发光底物的放射自显影胶片来检测蛋白质表达水平。

1.6 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测蛋白表达:细胞经过 OGD/R 模型处理后用无乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的 0.25%

胰蛋白酶消化,离心后悬浮在 500 μ L 的 5% 血清白蛋白 (blood serum albumin, BSA) 中封闭 15 min,加入 2 μ L 的 APC-CXCR7 抗体(美国 Biolegend 公司)混匀静置 20 min,离心重悬于 200 μ L 0.1% 的茶皂素(中国 Solabio 公司),离心后再次重悬于 50 μ L 0.1% 的茶皂素与 300 μ L 的 PBS,用 CytoFLEX S 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)检测,用 CytExpert 软件进行数据分析。

1.7 FCM 检测细胞周期:细胞经过 OGD/R 模型处理后,用 PBS 洗 2 次,用体积分数 66% 的乙醇轻轻混匀细胞沉淀,4 $^{\circ}$ C 固定 3 d。上机前准备:提前 20~30 min 取出固定细胞恢复到室温,离心吸净乙醇后,用 300~400 μ L PBS 重悬细胞,轻轻吹散成单细胞悬液,加入 5 μ L 的核糖核酸酶(ribonuclease, RNase),静置 15 min 后加入 10 μ L 碘化丙啶(propidine iodide, PI)。冰上避光孵育 30 min,1 h 内用 CytoFLEX S 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)上机检测,用 FlowJo V10 软件分析数据。

1.8 统计学分析:应用 GraphPad Prism 7.0(美国 La Jolla CA 公司)软件对数据进行统计分析。数据统计结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用非配对 *t* 检验进行数据间比较,当 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

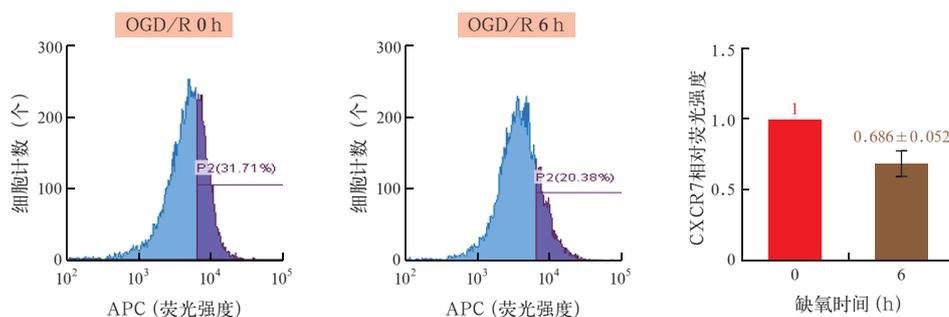
2.1 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞中 CXCR7 蛋白表达(图 1~2):SH-SY5Y 细胞暴露于 OGD/R 0 h 和 6 h 后,分别通过 Western blotting 与 FCM 检测 CXCR7 蛋白表达水平,两种检测结果均提示,OGD/R 6 h 组 CXCR7 蛋白表达水平较 0 h 组降低(均 $P < 0.01$)。

2.2 干扰 CXCR7 基因抑制 OGD/R 后 p-Akt 蛋白表达(图 3):在 SH-SY5Y 细胞中转染 CXCR7 的 si-RNA

后,将转染过 si-RNA 的细胞暴露于 OGD/R 6 h 环境中,然后采用 Western blotting 方法检测 Akt、p-Akt 和 CXCR7 蛋白表达水平。结果提示,在成功干扰了 CXCR7 表达之后,与相同缺氧/再复氧环境下的 si-NC 组比较,si-CXCR7 组的 p-Akt 蛋白表达降低($P < 0.001$)。

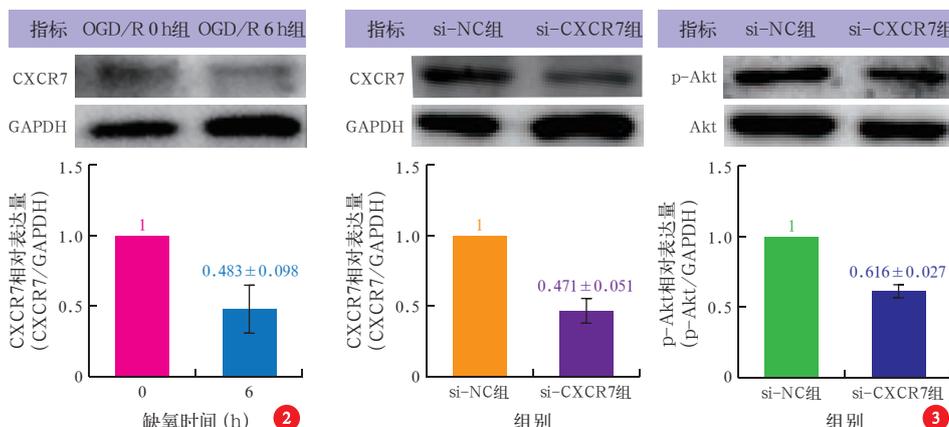
2.3 OGD/R 后 SH-SY5Y 细胞中细胞周期阻滞(图 4):SH-SY5Y 细胞暴露于 OGD/R 0 h 与 6 h 后,通过 FCM 检测 SH-SY5Y 细胞中细胞周期改变,结果显示,与 OGD/R 0 h 组比较,OGD/R 6 h 组细胞周期阻滞在 G0/G1 期($P < 0.01$)。

2.4 干扰 CXCR7 基因对 OGD/R 后细胞周期阻滞(图 5):在 SH-SY5Y 细胞中转染 CXCR7 的 si-RNA 后,将转染过 si-RNA 的细胞暴露于 OGD/R 6 h 环境中,通过 FCM 检测转染过 si-RNA 后的细胞,结果显示,与相同环境下 si-NC 组比较,si-CXCR7 组的细胞周期阻滞在 G0/G1 期($P < 0.05$)。



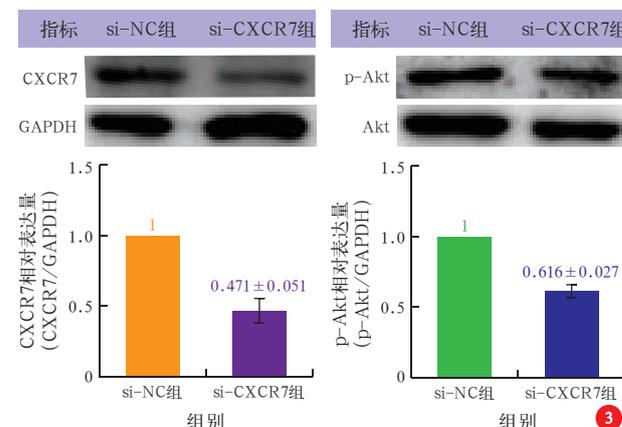
注: OGD/R 为氧-葡萄糖剥夺/复氧, SH-SY5Y 为神经母细胞瘤细胞, CXCR7 为 CXCR7 趋化因子受体 7, APC 为别藻蓝蛋白

图 1 流式细胞术(FCM)检测 OGD/R 模型中 SH-SY5Y 细胞 CXCR7 蛋白表达变化



注: OGD/R 为氧-葡萄糖剥夺/复氧, SH-SY5Y 为神经母细胞瘤细胞, CXCR7 为 CXCR7 趋化因子受体 7, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 OGD/R 模型中 SH-SY5Y 细胞 CXCR7 蛋白表达变化



注: CXCR7 为 CXCR7 趋化因子受体 7, OGD/R 为氧-葡萄糖剥夺/复氧, SH-SY5Y 为神经母细胞瘤细胞, Akt 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, p-Akt 为磷酸化 Akt, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测干扰 CXCR7 后 OGD/R 模型中 SH-SY5Y 细胞 CXCR7、Akt 与 p-Akt 蛋白表达变化

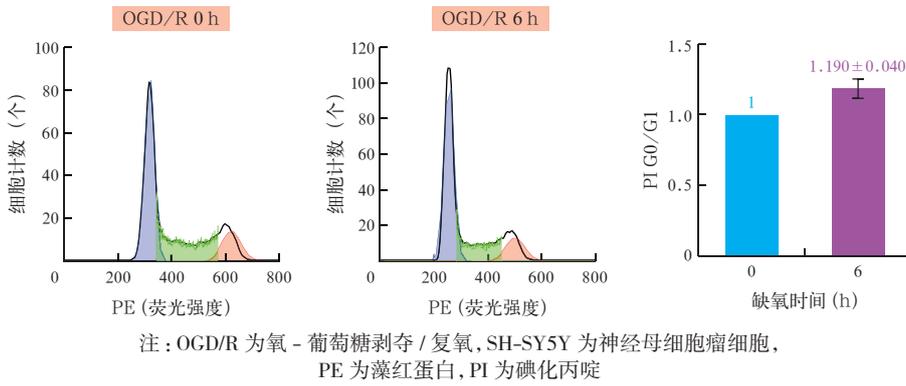


图 4 流式细胞术 (FCM) 检测 OGD/R 模型中 SH-SY5Y 细胞周期改变

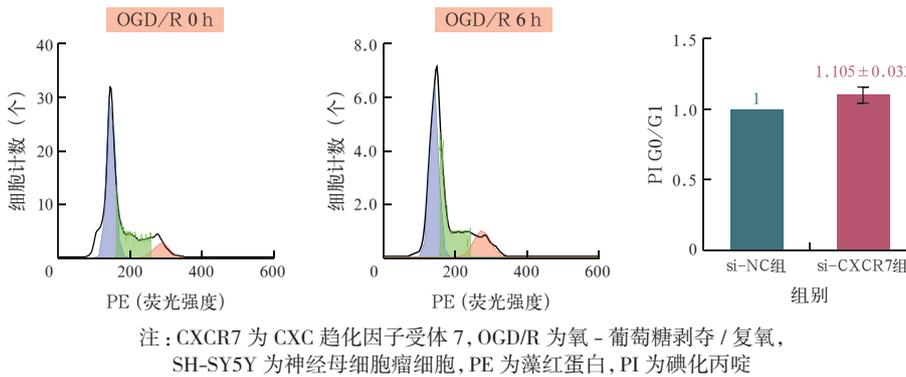


图 5 流式细胞术 (FCM) 检测干扰 CXCR7 后 OGD/R 模型中 SH-SY5Y 细胞周期改变

3 讨论

IS 已然成为威胁人类健康的主要疾病之一, 而且, 由于其具有高发病率、高致残率以及高病死率的特点, 已经给社会和家庭带来了较重的负担, 严重影响患者的生活质量^[15]。IS 是由于大脑局部区域供血不足所造成的脑损伤, 脑部血氧的供需不平衡会打破细胞稳态, 脑组织能力耗竭, 最终可导致神经元死亡。研究表明, CXCR7 在成熟神经元中普遍表达, 当 CXCR7 与其配体 CXCL12 结合后可参与调节神经系统功能^[16]。先前的研究显示, 缺氧条件下, CXCR7 在多形性胶质母细胞瘤细胞中表达增加, 并且发挥抗细胞凋亡作用^[17-18]。CXCL12/CXCR7 可以独立或者与 CXCR4 相互作用调节神经祖细胞迁移^[19]。一项在小鼠神经祖细胞中的研究表明, 敲除 CXCR7 可以抑制 CXCL12 介导的原代小鼠神经祖细胞的增殖, 参与调控细胞周期^[20]。

为探究 CXCR7 对 IS 神经元细胞周期的调控作用, 我们进行了相关实验。在体外模拟脑缺血损伤常通过构建 OGD/R 模型来实现^[21]。本研究通过构建 OGD/R 模型发现, 在缺氧环境下 CXCR7 表达量明显降低, 并且细胞周期阻滞在 G0/G1 期。当成功

干扰 CXCR7 之后, 再次构建 OGD/R 模型, 我们可以发现, p-Akt 的表达量降低, 并且细胞周期阻滞在 G0/G1 期。结果表明, 干扰 CXCR7 的表达对 OGD/R 诱导的细胞损伤起到一定程度的促进作用, 其潜在的可能机制是通过抑制 Akt 信号通路促进对细胞周期 G0/G1 期的阻滞, 抑制细胞增殖。

Akt 信号通路属于酪氨酸激酶级联信号通路, 该通路对于维持细胞存活具有重要意义^[22-23]。在癌症中, Akt 信号通路可通过磷酸化下游靶点发挥抗凋亡作用^[24]。在器官移植中, 细胞代谢及免疫信号可汇集于 Akt 信号通路, 进而激活下游信号通路^[25]。在中枢神经系统中, Akt 信号通路广泛分布, 可参与神经

元形成和功能发挥^[26]。部分研究表明, 在脑缺血 / 再灌注损伤中, Akt 信号通路的激活可以防止缺血性脑损伤, 促进神经元存活与神经修复功能^[27-29], 也可以减轻高尔基体的应激反应, 发挥神经保护作用^[30]。另外, Akt 信号通路可以通过激活细胞周期蛋白 D1 (一种参与细胞周期进展的关键因子) 参与调控细胞周期, 也可以通过诱导 DNA 合成调控细胞周期进程^[31]。细胞周期是一个紧密严谨的过程, 其正常运行对于细胞生长、修复和增殖具有至关重要的意义^[32]。一项在缺血预处理的皮质小胶质细胞的研究中发现, 细胞周期 / 细胞增殖基因的表达增加, 并且伴随着单侧反应, 即缺血预处理后的同侧半皮质区域小胶质细胞增殖明显^[33]。在本研究中, 干扰 CXCR7 表达并构建 OGD/R 模型后, Akt 信号通路的表达受到抑制, 并且影响细胞周期, 即 CXCR7 表达降低可能是通过 Akt 信号通路影响细胞周期, 不利于神经元的存活与修复, 因此, 我们假设 CXCR7 表达量的降低可能在 OGD/R 诱导损伤中发挥神经破坏作用。

综上所述, 在 OGD/R 模型中, SH-SY5Y 细胞中的 CXCR7 表达量降低, 可能通过 Akt 信号通路

影响细胞周期,损伤神经元功能。然而,CXCR7对SH-SY5Y细胞周期阻滞的深入机制尚未明确,后续将进一步研究CXCR7对周期检测点相关蛋白的影响与作用,寻找CXCR7的作用靶点及其调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016 [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379 (25): 2429–2437. DOI: 10.1056/NEJMoa1804492.
- [2] Franke M, Bieber M, Kraft P, et al. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92: 223–233. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.12.009.
- [3] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会. 中国急性缺血性脑卒中中西医结合诊治专家共识 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (3): 193–197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.03.001.
- [4] 王永利, 祝兆林. 急性缺血性卒中的治疗进展 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2003, 10 (4): 255–256. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2003.04.032.
- [5] Guyon A. CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 65. DOI: 10.3389/fncel.2014.00065.
- [6] 郑淑芳, 展晓红, 时丽芳, 等. 探讨大肠腺癌中 SDF-1、CXCR4 mRNA 的表达及相关性 [J]. *实用检验医师杂志*, 2013, 5 (3): 156–159. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.006.
- [7] 汪道峰, 娄宁, 曾灿光, 等. CXCL12 和 CXCR4 在食管鳞癌组织中的表达及其与预后的关系 [J]. *癌症*, 2009, 28 (2): 187–192. DOI: 10.3321/j.issn:1000-467X.2009.02.015.
- [8] 杨世昕, 卞修武, 蒋雪峰, 等. 脑胶质瘤趋化因子受体 CXCR4 表达的临床意义 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2005, 10 (8): 360–362. DOI: 10.3969/j.issn.1009-122X.2005.08.010.
- [9] 黄春念, 杨振国, 张晶晶. CXCL12/CXCR4 通路在心脑血管疾病中的研究进展 [J]. *南通大学学报(医学版)*, 2016, 36 (3): 202–206. DOI: 10.16424/j.cnki.cn32-1807/r.2016.03.011.
- [10] Schönemeier B, Kolodziej A, Schulz S, et al. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain [J]. *J Comp Neurol*, 2008, 510 (2): 207–220. DOI: 10.1002/cne.21780.
- [11] von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting [J]. *J Comp Neurol*, 2016, 524 (18): 3865–3895. DOI: 10.1002/cne.24040.
- [12] Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? [J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 198 (1–2): 9–13. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.020.
- [13] Lee HJ, Lyu da H, Koo U, et al. Inhibitory effect of 2-arylbenzofurans from the Mori Cortex Radicis (Moraceae) on oxygen glucose deprivation (OGD)-induced cell death of SH-SY5Y cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34 (8): 1373–1380. DOI: 10.1007/s12272-011-0818-4.
- [14] Kamiya T, Kwon AH, Kanemaki T, et al. A simplified model of hypoxic injury in primary cultured rat hepatocytes [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34 (2): 131–137. DOI: 10.1007/s11626-998-0095-9.
- [15] Ribeiro PW, Cola PC, Gatto AR, et al. Relationship between dysphagia, National Institutes of Health Stroke Scale Score, and predictors of pneumonia after ischemic stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24 (9): 2088–2094. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.05.009.
- [16] Shimizu S, Brown M, Sengupta R, et al. CXCR7 protein expression in human adult brain and differentiated neurons [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (5): e20680. DOI: 10.1371/journal.pone.0020680.
- [17] Esencay M, Sarfraz Y, Zagzag D. CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 α [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 347. DOI: 10.1186/1471-2407-13-347.
- [18] Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (8): 3299–3308. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3642.
- [19] Cheng X, Wang HB, Zhang XC, et al. The role of SDF-1/CXCR4/CXCR7 in neuronal regeneration after cerebral ischemia [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 590. DOI: 10.3389/fnins.2017.00590.
- [20] Wang Y, Xu P, Qiu L, et al. CXCR7 participates in CXCL12-mediated cell cycle and proliferation regulation in mouse neural progenitor cells [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16 (8): 738–746. DOI: 10.2174/1566524016666160829153453.
- [21] Niatsetskaya ZV, Sosunov SA, Matsiukevich D, et al. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (9): 3235–3244. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6303-11.2012.
- [22] Frebel K, Wiese S. Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34 (Pt 6): 1287–1290. DOI: 10.1042/BST0341287.
- [23] Zhang RJ, Zhang L, Manaenko A, et al. Helium preconditioning protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway [J]. *J Hepatol*, 2014, 61 (5): 1048–1055. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.06.020.
- [24] 陈樑, 张红锋, 杨帆. Akt 抗凋亡机制与癌症治疗 [J]. *生命的化学*, 2004, 24 (5): 431–433. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1336.2004.05.023.
- [25] 王凯, 高伟. PI3K/Akt/mTOR 通路在调控器官移植 Treg/Th17 平衡中的作用 [J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2018, 6 (1): 72–75. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2018.01.019.
- [26] 高洋洋, 赵志英. PI3K/Akt 信号通路及神经损伤的研究进展 [J]. *医学综述*, 2017, 23 (16): 3121–3125. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2017.16.001.
- [27] Xu J, Huai YP, Meng N, et al. L-3-n-butylphthalide activates Akt/mTOR signaling, inhibits neuronal apoptosis and autophagy and improves cognitive impairment in mice with repeated cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (10): 2968–2981. DOI: 10.1007/s11064-017-2328-3.
- [28] Yan BC, Wang J, Rui YG, et al. Neuroprotective effects of gabapentin against cerebral ischemia reperfusion-induced neuronal autophagic injury via regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2019, 78 (2): 157–171. DOI: 10.1093/jnen/nly119.
- [29] Huang YL, Yu J, Wan F, et al. Panaxatriol saponins attenuated oxygen-glucose deprivation injury in PC12 cells via activation of PI3K/Akt and Nrf2 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 978034. DOI: 10.1155/2014/978034.
- [30] He JL, Liu JY, Huang Y, et al. OM-MSCs alleviate the golgi apparatus stress response following cerebral ischemia/reperfusion injury via the PEDF-PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4805040. DOI: 10.1155/2021/4805040.
- [31] Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy [J]. *Leukemia*, 2003, 17 (3): 590–603. DOI: 10.1038/sj.leu.2402824.
- [32] Sun Y, Liu Y, Ma XL, et al. The influence of cell cycle regulation on chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (13): 6923. DOI: 10.3390/ijms22136923.
- [33] McDonough A, Noor S, Lee RV, et al. Ischemic preconditioning induces cortical microglial proliferation and a transcriptomic program of robust cell cycle activation [J]. *Glia*, 2020, 68 (1): 76–94. DOI: 10.1002/glia.23701.

(收稿日期: 2021-12-21)