

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.12.1325

· 论 著 ·

氧糖剥夺条件下 p75 神经营养受体在人神经母细胞瘤细胞中的表达和作用

陈 甲, 秦鲁平, 赵 明, 陈 蕾, 吴 涛, 邓本强*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院脑血管病中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨氧糖剥夺(OGD)条件下 p75 神经营养受体(p75NTR)在人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)中的表达变化和作用。**方法** SH-SY5Y 细胞 OGD 模型的建立采用三气培养箱无糖无血清培养方法。模型成功建立后设立 3 组: 无血清常规培养组(对照组)、OGD 组和 OGD+LM11A-31 处理组(OGD+LM11A-31 组)。在细胞培养 12 h 时用利用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 3 组细胞存活率, 乳酸脱氢酶(LDH)活力检测试剂盒测定 LDH 释放活力, 流式细胞术检测凋亡细胞比例, 蛋白质印迹法检测 p75NTR 的蛋白表达。**结果** 成功构建 SH-SY5Y 细胞 OGD 模型。细胞培养 12 h 时, 对照组、OGD 组和 OGD+LM11A-31 组细胞存活率分别为(94.80±4.06)%、(50.34±5.55)%、(64.68±4.59)%, LDH 释放活力分别为(46.93±5.49) U/L、(353.09±30.67) U/L 和(282.20±25.60) U/L, 凋亡细胞比例分别为(1.82±0.45)%、(14.98±2.59)%和(7.36±1.98)%, p75NTR 蛋白相对表达量分别为 0.06±0.01、0.41±0.02 和 0.19±0.03, 差异均有统计学意义($F=67.94, 142.10, 36.28, 221.20, P$ 均 <0.05)。多重比较显示, OGD 组细胞存活率低于对照组, LDH 释放活力高于对照组, 凋亡细胞比例高于对照组, p75NTR 蛋白表达高于对照组, 差异均有统计学意义(Bonferroni 法, P' 均 <0.05); 而 LM11A-31 处理后 OGD+LM11A-31 组细胞存活率高于 OGD 组, LDH 释放活力低于 OGD 组, 凋亡细胞比例低于 OGD 组, p75NTR 蛋白表达低于 OGD 组, 差异均有统计学意义(Bonferroni 法, P' 均 <0.05)。**结论** OGD 条件下 p75NTR 在人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中表达增加, 可能促进了神经损伤和凋亡。

[关键词] 神经营养受体; 氧糖剥夺; 人神经母细胞瘤细胞; 神经凋亡

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)12-1325-05

Expression of p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells under condition of oxygen-glucose deprivation and its significance

CHEN Jia, QIN Lu-ping, ZHAO Ming, CHEN Lei, WU Tao, DENG Ben-qiang*

Stroke Center, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression and effect of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y cells) under the condition of oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** The OGD model of SH-SY5Y cells was established by glucose-free and serum-free culturing using tri-gas incubator, and then was assigned to 3 groups, including serum-free regular culturing group (control group), OGD group and OGD+LM11A-31 (a competitive blocker of p75NTR) group. After 12 h of culturing, the cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, lactate dehydrogenase (LDH) release activity was determined by LDH activity assay kit, cell apoptosis proportion was detected by flow cytometry, and p75NTR protein expression was detected by Western blotting. **Results** The OGD model of SH-SY5Y cells was successfully established. Twelve hours after cell culture, the cell viability of the control, OGD and OGD+LM11A-31 groups was (94.80±4.06)%, (50.34±5.55)% and (64.68±4.59)%, the LDH release activities were (46.93±5.49) U/L, (353.09±30.67) U/L and (282.20±25.60) U/L, the proportions of apoptosis cells were (1.82±0.45)%, (14.98±2.59)% and (7.36±1.98)%, and the relative expression levels of p75NTR were 0.06±0.01, 0.41±0.02 and 0.19±0.03, respectively, and the differences were all significant ($F=67.94, 142.10, 36.28$ and 221.20 , all $P<0.05$). Post hoc analysis showed that the cell viability of the OGD group was significantly lower than that of the control group, and the LDH release activity, the proportion of apoptosis cells and the relative protein expression level of p75NTR of the OGD group were significantly higher (Bonferroni test, all $P'<0.05$). After treatment with LM11A-31, the cell viability of the OGD+LM11A-31 group was significantly higher than that of the OGD group, and the LDH release

[收稿日期] 2019-07-11 **[接受日期]** 2019-10-16

[基金项目] 上海市科委医学引导类项目(124119a8900). Supported by Medical Guiding Project of Shanghai Science and Technology Commission (124119a8900).

[作者简介] 陈 甲, 博士生. E-mail: daoqiaoxia@sina.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161940, E-mail: xiaocalf@163.com

activity, the proportion of apoptosis cells and the relative protein expression level of p75NTR of the OGD+LM11A-31 group were significantly lower (Bonferroni test, all $P' < 0.05$). **Conclusion** The expression of p75NTR is increased in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells under OGD condition, which may promote neuronal injury and apoptosis.

[Key words] neurotrophin receptor; oxygen-glucose deprivation; human neuroblastoma cells; neural apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(12): 1325-1329]

缺血和缺氧是神经损害并导致神经功能障碍的重要原因,其本质是细胞因氧糖缺乏发生的能量枯竭及一系列瀑布样损伤效应。急性的缺血、缺氧多发生于缺血性脑卒中,而缺血半暗带是处于缺血、缺氧状态下尚具有挽救希望的组织区域,若不能在时间窗内及时恢复有效血流灌注往往会发展为不可逆性神经坏死^[1]。而慢性缺血、缺氧,如脑动脉慢性狭窄和闭塞等导致的持续脑低灌注使脑组织长时间处于缺血、缺氧状态,可引起神经损伤和凋亡并逐渐破坏神经网络的结构和功能完整性^[2]。p75 神经营养素受体 (p75 neurotrophin receptor, p75NTR) 被认为对神经元的存活、分化等有重要作用,并可能参与了众多神经系统疾病的发生和发展^[3],但关于在缺血、缺氧情况下 p75NTR 在神经元中的表达变化及其作用尚不清楚。因此,本实验基于培养的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 在体外构建氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 模型,模拟体内缺氧、缺血环境,并研究在缺氧、缺血条件下 p75NTR 表达的变化及其在细胞损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器 SH-SY5Y 细胞株购自中国科学院上海细胞库。DMEM 培养液购于美国 HyClone 公司;四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活力检测试剂盒、Annexin V/碘化丙啶凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天公司;兔抗 p75NTR 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,β-肌动蛋白 (β-actin) 抗体及 LM11A-31 (小分子非肽类 p75NTR 竞争性配体) 购自美国 Sigma 公司。三气培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司,酶标仪购自美国 BioTek 公司, Cytomics FC 500 型流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 SH-SY5Y 细胞 OGD 模型建立与分组 参照相关文献^[4-5],采用三气培养箱进行细胞培养。选择生长状态良好的 SH-SY5Y 细胞,用经多聚赖氨酸包被的可拆卸式 96 孔板,以每孔 5×10^3 细胞加入 100 μL 无血清、无糖或含葡萄糖 1 000 mg/L 的 DMEM 培养液进行培养。OGD 细胞模型建立方法:

细胞用无血清、无糖 DMEM 培养液,置于三气培养箱 (1% O₂、5% CO₂、94% N₂, 37 °C) 中培养,分别在培养 0、3、6、12、24 h 时采用 MTT 法检测细胞存活率,并测定培养液中 LDH 释放活力,以判断 OGD 模型是否建立成功并确定最佳干预时间。SH-SY5Y 细胞 OGD 模型建立成功后进行分组干预,设立对照组、OGD 组和 OGD+LM11A-31 组。对照组细胞用无血清、含葡萄糖 1 000 mg/L 的 DMEM 培养液,置于 5% CO₂、37 °C 常规培养箱中培养。OGD+LM11A-31 组 LM11A-31 干预浓度为 100 nmol/L。每组设 6 个平行复孔,实验重复 3 次。

1.3 MTT 法检测细胞存活率与 LDH 释放活力测定 参考试剂盒说明书进行操作。MTT 检测方法:将噻唑蓝 5 mg/mL 加入培养液中继续孵育 4 h,换甲臞结晶溶解液,用酶标仪测定 570 nm 波长处光密度 (D_{570}) 值。细胞存活率 (%) = (实时 $D_{570}/0$ h D_{570}) × 100%,定义 0 h 相应对照细胞存活率为 100%。LDH 释放活力测定方法:在细胞上清液中加入 LDH 检测工作液,室温下避光孵育 30 min,用酶标仪测定 490 nm 波长处光密度 (D_{490}) 值。LDH 释放活力值 = (样品 D_{490} - 空白对照孔 D_{490}) / (标准品 D_{490} - 空白对照孔 D_{490}) × 标准品 LDH 活力值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 根据说明书,将 5×10^5 /孔的细胞培养板在 200×g 离心 5 min,移除大部分上清液 (悬浮有大量细胞碎片) 后,加入结合缓冲液 200 μL、浓度为 20 μg/mL 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的 Annexin V 10 μL 和浓度为 50 μg/mL 的碘化丙啶 5 μL,室温下避光孵育 30 min,0.25% 胰酶消化后重悬细胞,移至样品管并检测。

1.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达 收集培养板内细胞,裂解、离心并取上清,BCA 法测定蛋白含量。蛋白质印迹法主要步骤:加样后电泳、转膜,5% 脱脂奶粉溶液常温下封闭 1 h,4 °C 过夜孵育兔抗 p75NTR 单克隆抗体 (稀释比例 1:2 000)、β-actin (1:1 000) 一抗,次日洗膜后加入二抗常温孵育 1 h,ECL 法显影。采用 ImageJ 软件测定灰度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组

间比较采用单因素方差分析, 事后两两比较采用 Bonferroni 法 (校正后的 $P' = P \text{ 值} \times \text{检验次数}$)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 SH-SY5Y 细胞 OGD 模型的建立 OGD 组细胞存活率随 OGD 干预时间延长逐渐降低 [3、6、12、24 h 细胞存活率分别为 $(95.82 \pm 2.72)\%$ 、 $(82.70 \pm 2.10)\%$ 、 $(55.70 \pm 4.02)\%$ 、 $(27.07 \pm 6.09)\%$], 而 LDH 释放活力随 OGD 干预时间延长逐渐升高 [0、

3、6、12、24 h 时 分别为 (47.98 ± 4.58) 、 (77.07 ± 6.89) 、 (162.70 ± 20.11) 、 (342.97 ± 31.90) 、 (454.85 ± 38.97) U/L], 差异均有统计学意义 ($F = 171.5$ 、 153.9 , P 均 < 0.05); 多重比较显示 OGD 组任意两个时间点之间细胞存活率和 LDH 释放活力差异均有统计学意义 (Bonferroni 法, P' 均 < 0.05)。对照组在细胞存活率和 LDH 释放活性方面均未显示随时间而变化的趋势。见图 1。结果提示在 OGD 干预后细胞存活率和损伤程度都随时间延长而显著增加, 说明 OGD 模型成功建立。

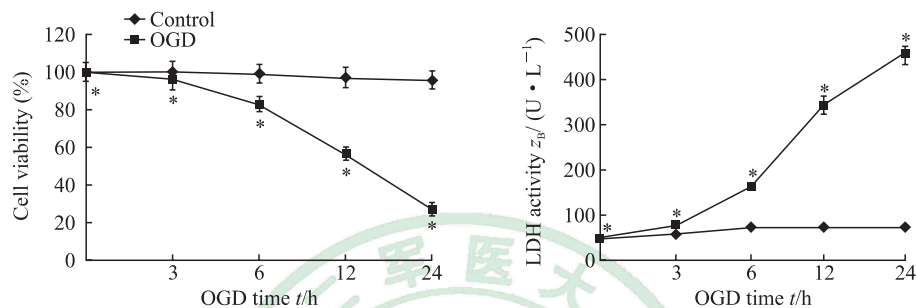


图1 OGD 条件下人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞存活率和 LDH 释放活力变化

Fig 1 Viability and LDH activity of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells under OGD condition

OGD: Oxygen-glucose deprivation; LDH: Lactate dehydrogenase. Bonferroni test. $P' < 0.05$ vs any other time point in OGD group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 3 组细胞存活率和 LDH 释放活力的比较 细胞培养 12 h 时, 对照组、OGD 组和 OGD + LM11A-31 组细胞存活率分别为 $(94.80 \pm 4.06)\%$ 、 $(50.34 \pm 5.55)\%$ 和 $(64.68 \pm 4.59)\%$, 3 组间差异有统计学意义 ($F = 67.94$, $P < 0.05$); 多重比较显示 OGD 组细胞存活率低于对照组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$), 而 LM11A-31 处理细胞后 OGD + LM11A-31 组高于 OGD 组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$)。细胞培养 12

h 时, 对照组、OGD 组和 OGD + LM11A-31 组 LDH 释放活力分别为 (46.93 ± 5.49) 、 (353.09 ± 30.67) 和 (282.20 ± 25.60) U/L, 3 组间差异有统计学意义 ($F = 142.10$, $P < 0.05$); 多重比较显示 OGD 组 LDH 释放活力高于对照组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$), 而 LM11A-31 处理细胞后 OGD + LM11A-31 组低于 OGD 组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$)。以上结果进一步验证了 OGD 模型的可靠性。见图 2。

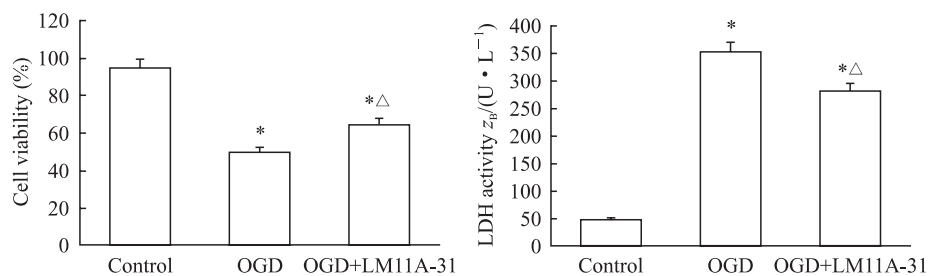


图2 各组人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞存活率和 LDH 释放活力

Fig 2 Viability and LDH activity of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells in each group

OGD: Oxygen-glucose deprivation; LDH: Lactate dehydrogenase. LM11A-31: A non-peptide competitive p75NTR ligand. Bonferroni test. $*P' < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P' < 0.05$ vs OGD group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 3 组细胞凋亡检测结果比较 流式细胞术检测结果显示, 对照组、OGD 组和 OGD + LM11A-31 组凋亡细胞比例 (Q2 + Q4) 分别为 $(1.82 \pm 0.45)\%$ 、 $(14.98 \pm 2.59)\%$ 和 $(7.36 \pm 1.98)\%$, 3 组间差异有

统计学意义 ($F = 36.28$, $P < 0.05$); 多重比较显示 OGD 组凋亡细胞比例高于对照组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$), 而 LM11A-31 处理细胞后 OGD + LM11A-31 组低于 OGD 组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$)。见图 3。

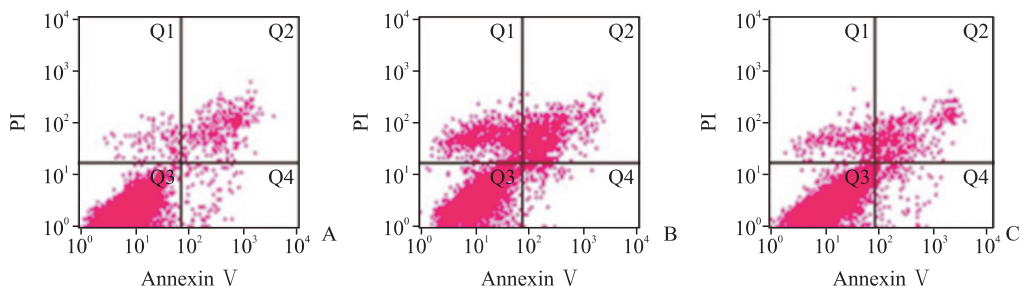


图3 流式细胞术检测各组人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞的凋亡情况

Fig 3 Apoptosis of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells in each group detected by flow cytometry

A: Control group; B: OGD group; C: OGD+LM11A-31 group. PI: Propidium iodide; OGD: Oxygen-glucose deprivation. LM11A-31: A non-peptide competitive p75NTR ligand

2.4 3组细胞中 p75NTR 蛋白表达水平比较 蛋白质印迹法检测结果显示, 对照组、OGD 组和 OGD + LM11A-31 组 p75NTR 相对表达量 (p75NTR 灰度值/ β -actin 灰度值) 分别为 0.06 ± 0.01 、 0.41 ± 0.02 和 0.19 ± 0.03 , 3 组间差异有统计学意义 ($F = 221.20$, $P < 0.05$); 多重比较显示 OGD 组 p75NTR 相对表达量高于对照组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$), 而 LM11A-31 处理细胞后 OGD + LM11A-31 组 p75NTR 相对表达量也高于对照组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$), 但低于 OGD 组 (Bonferroni 法, $P' < 0.05$)。见图 4。

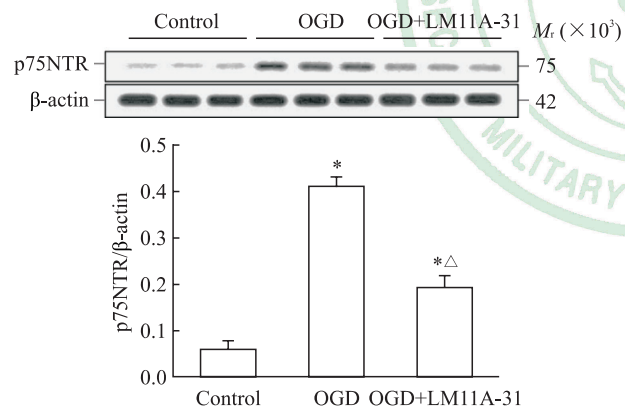


图4 蛋白质印迹法检测各组人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 细胞中 p75NTR 蛋白表达

Fig 4 Protein expression of p75NTR of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells in each group detected by Western blotting

p75NTR: p75 neurotrophin receptor; OGD: Oxygen-glucose deprivation. LM11A-31: A non-peptide competitive p75NTR ligand. Bonferroni test. * $P' < 0.05$ vs control group; $\Delta P' < 0.05$ vs OGD group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

缺血、缺氧与多种神经系统疾病有关。缺血缺氧性损害常发生于急慢性脑血管病, 特别是慢性脑动脉狭窄导致的低灌注或局部脑缺血往往会由于持

续缺血、缺氧状态而引发病状性神经损害。这种慢性缺血、缺氧还见于存在低灌注状态的晚期阿尔茨海默病和帕金森病等神经退行性疾病, 并被认为与神经元减少、皮质萎缩及认知损害相关^[6-7]。因此, 若能够在早期降低或延缓慢性缺血缺氧性神经损害将有助于神经系统疾病的治疗。

OGD 是目前常用的体外模拟机体缺血和缺氧的方法, 主要通过低糖或无糖培养和缺氧环境实现。缺氧环境可采用化学或物理方法实现, 如 Padmanabha 等^[8]采用氯化钴 (CoCl_2) 的化学方法建立 0.5%~2.0% 氧浓度的缺氧环境; 而更多学者推荐通过密闭装置实现物理缺氧, 以更贴近实际地模拟体内缺氧, 且便于控制缺氧程度和减少化学物质对培养液性质的干扰^[9-10]。本实验采用三气培养箱建立缺氧环境, 配合无血清 (为避免影响 LDH 活力检测准确性) 和无糖的培养液实现 OGD 模型的建立。SH-SY5Y 细胞是人骨转移灶的神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 经 3 次克隆后的亚细胞系, 在形态、神经化学和电生理学方面均具有与神经元相似的特性^[11]。该细胞处于不同生长状态、不同培养环境时, 对于不同损伤因素的反应有较大差异。一项对采用 SH-SY5Y 细胞和不同方法造成细胞损伤模型相关研究的 meta 分析显示, 过氧化氢、缺氧、葡萄糖剥夺和谷氨酸兴奋性毒性能对细胞造成 29%~58% 的损伤效应, 不同的实验环境和相关参数也可能产生不同的效应, 甚至导致模型建立失败^[12]。在本实验中, 随着 OGD 干预时间延长, SH-SY5Y 细胞存活率逐渐下降, 培养液中 LDH 释放活力逐渐增高, 说明细胞损伤、死亡与 OGD 之间存在时间-效应关系, 也由此确认了 OGD 模型的成功建立, 后续的分组实验结果再次验证了 OGD 干预后细胞损伤。

缺血、缺氧对细胞造成损伤的机制主要与线粒体功能障碍、氧自由基损伤、兴奋性氨基酸毒性

和炎症反应等一系列能够启动凋亡的关键因素有关^[13]。有学者利用基因芯片对局灶性脑缺血模型大鼠皮质基因表达谱进行分析, 结果显示在责任血管闭塞仅 6 h 后 1 174 个目标基因中有 71 个基因表达出现显著变化, 其中代谢相关基因、细胞通讯相关基因和信号转导相关基因表达下调, 而应激反应相关基因表达增加^[14], 这提示缺血、缺氧引发基因水平的改变, 从而参与应激或炎症过程而加重自身细胞的损伤, 那么是否可以在这段时间内通过特定靶点的干预而延迟或改善损伤效应呢? p75NTR 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员, 能够通过多条信号通路 (如 c-Jun 氨基末端激酶/p53/B 淋巴细胞瘤-2 基因关联 X 蛋白通路、核因子 κ B 通路和神经酰胺通路等) 引起炎症等损伤效应, 并可能参与了多种神经系统疾病的发生^[3,15]。基于大鼠脑缺血模型的研究发现脑缺血后脑组织中 p75NTR 的表达上调, 且这种上调与损伤程度有关^[16], 通过对大鼠缺血性视网膜损伤的研究也发现了这种与损伤有关的 p75NTR 上调现象^[17]。但是, 对于缺血、缺氧条件下 p75NTR 的表达变化及其对神经损伤影响的特点仍需进一步阐明。本实验结果显示, 经过 OGD 干预后, 神经细胞中 p75NTR 表达增加, 提示其与 OGD 后细胞凋亡增多和存活率下降有关, 而给予竞争性配体 LM11A-31 阻断后细胞损伤有所改善, 且 p75NTR 表达有所降低, 提示降低 p75NTR 的介导效应可能通过减少细胞损伤反馈性降低自身表达, 反过来进一步减轻对细胞损伤的介导效应, 这也是我们希望能够干预的环节。因此, 我们设想, 在缺血性脑卒中和慢性脑低灌注导致的神经损伤中脑内 p75NTR 的表达也可能增高, 并通过某些信号通路介导神经细胞的损伤和凋亡, 说明以 p75NTR 作为靶点延缓或改善这种损伤可能是一种有效的治疗策略, 能为这类患者延缓疾病进展或争取更多的治疗窗口和时机。

综上所述, 本实验结果初步证明了在 OGD 条件下神经细胞中 p75NTR 的表达变化, 及其对细胞损伤、凋亡的作用, 但可能仍需要进一步揭示这种变化和作用发生的潜在机制。

[参 考 文 献]

- [1] BARON J C. Protecting the ischaemic penumbra as an adjunct to thrombectomy for acute stroke[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 325-337.
- [2] KAZUMATA K, THA K K, NARITA H, KUSUMI I, SHICHINOHE H, ITO M, et al. Chronic ischemia alters brain microstructural integrity and cognitive performance in adult moyamoya disease[J]. *Stroke*, 2015, 46: 354-360.
- [3] ELSHAER S L, EL-REMESSY A B. Implication of the neurotrophin receptor p75^{NTR} in vascular diseases: beyond the eye[J]. *Expert Rev Ophthalmol*, 2017, 12: 149-158.
- [4] KAUSHAL V, SCHLICHTER L C. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra[J]. *J Neurosci*, 2008, 28: 2221-2230.
- [5] HE C, STROINK A R, WANG C X. The role of DAPK-BimEL pathway in neuronal death induced by oxygen-glucose deprivation[J]. *Neuroscience*, 2014, 258: 254-262.
- [6] THOMAS T, MINERS S, LOVE S. Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. *Brain*, 2015, 138: 1059-1069.
- [7] LIN W C, CHEN P C, HUANG C C, TSAI N W, CHEN H L, WANG H C, et al. Autonomic function impairment and brain perfusion deficit in Parkinson's disease[J/OL]. *Front Neurol*, 2017, 8: 246. doi: 10.3389/fneur.2017.00246.
- [8] PADMANABHA D, PADILLA P A, YOU Y J, BAKER K D. A HIF-independent mediator of transcriptional responses to oxygen deprivation in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 2015, 199: 739-748.
- [9] TASCA C I, DAL-CIM T, CIMAROSTI H. *In vitro* oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1254: 197-210.
- [10] CHAO W H, LAI M Y, PAN H T, SHIU H W, CHEN M M, CHAO H M. Dendrobium nobile Lindley and its bibenzyl component moscatilin are able to protect retinal cells from ischemia/hypoxia by downregulating placental growth factor and upregulating Norrie disease protein[J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 193. doi: 10.1186/s12906-018-2256-z.
- [11] SHIPLEY M M, MANGOLD C A, SZPARA M L. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line[J/OL]. *J Vis Exp*, 2016(108): 53193. doi: 10.3791/53193.
- [12] LIU Y, EATON E D, WILLS T E, MCCANN S K, ANTONIC A, HOWELLS D W. Human ischaemic cascade studies using SH-SY5Y cells: a systematic review and meta-analysis[J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9: 564-574.
- [13] RADAK D, KATSIKI N, RESANOVIC I, JOVANOVIC A, SUDAR-MILOVANOVIC E, ZAFIROVIC S, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15: 115-122.
- [14] KIM Y D, SOHN N W, KANG C, SOH Y. DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 2002, 58: 491-498.
- [15] SHU Y H, LU X M, WEI J X, XIAO L, WANG Y T. Update on the role of p75NTR in neurological disorders: a novel therapeutic target[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 76: 17-23.
- [16] IRMADY K, JACKMAN K A, PADOW V A, SHAHANI N, MARTIN L A, CERCHIETTI L, et al. MiR-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75^{NTR} in neuronal ischemic injury[J]. *J Neurosci*, 2014, 34: 3419-3428.
- [17] WEI Y, WANG N, LU Q, ZHANG N, ZHENG D, LI J. Enhanced protein expressions of sortilin and p75^{NTR} in retina of rat following elevated intraocular pressure-induced retinal ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 429(2/3): 169-174.