

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.006

调节 TREK1 对小鼠海马神经干细胞增殖和 BDNF 表达的影响 *

刘军昌 薛姗姗 周翠红 王化宁 何 宏[△]

(空军军医大学第一附属医院心身科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察调节 TWIK 相关的 K⁺ 通道 1(TREK1)对小鼠海马神经干细胞增殖和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达的影响。**方法:**从孕 10.5 d C57bl/6J 小鼠胚胎海马中分离出神经干细胞并培养,待细胞达到 70%~80%融合后,对细胞进行慢病毒干预,细胞分为 sham 组, Ctrl 组(转染对照病毒), Plenti-TREK-1 组(转染携带 TREK1 高表达载体病毒)和 sh-TREK-1 组(转染携带 TREK1-shRNA 病毒)。采用 CCK-8 法检测病毒干预后 3 天和 7 天各组神经干细胞的细胞活力,采用 qRT-PCR 检测病毒干预后 7 天各组神经干细胞 TREK-1 基因表达情况,并通过 Elisa 检测各组神经干细胞上清液 BDNF 表达水平。**结果:**与 sham 组相比较,(1)Plenti-TREK-1 组 TREK1 基因表达上调,神经干细胞的神经球体积减小,细胞活力降低,细胞增殖减少,细胞上清 BDNF 水平下降;(2)sh-TREK-1 组 TREK1 基因表达下调,神经干细胞的神经球体积增加,细胞活力增高,细胞增殖增加,细胞上清 BDNF 水平上调;(3)上述各项指标 Ctrl 组与 sham 组之间无统计学差异。**结论:**神经干细胞的增殖与 TREK1 通道密切相关,上调 TREK-1 可以抑制神经干细胞增殖及其 BDNF 的表达水平;下调 TREK-1 则可以促进神经干细胞增殖并上调其 BDNF 的表达水平。

关键词:神经干细胞;增殖;TREK-1;BDNF

中图分类号:R-33;R331.2;R338.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1227-06

Regulation of TREK1 on the Proliferation and BDNF Expression in the Hippocampal Neural Stem Cells of Mice*

LIU Jun-chang, XUE Shan-shan, ZHOU Cui-hong, WANG Hua-ning, HE Hong[△]

(Department of Psychiatry, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of TREK-1 over-express or knock-down on the proliferation and brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in neural stem cells from the mice hippocampus. **Methods:** Neural stem cells were isolated from the embryonic hippocampus of 10.5 D C57bl/6J mice and cultured. After the cells reached 70%~80% fusion, the cells were subjected to lentiviral intervention and divided into sham group, Ctrl group, Plenti-TREK-1 group and sh-TREK-1 group. The cell viability in each group was detected by CCK-8 method at 3 and 7 days after virus intervention. The expression of TREK-1 gene and BDNF in the supernatant was detected by QRT-PCR or Elisa at 7 days after virus intervention respectively. **Results:** (1) Compared with sham group, the mRNA level of TREK1 was up-regulated and the volume of neurospheres, cell activity and cell proliferation as well as the level of BDNF in the supernatant were reduced in Plenti-TREK-1 group; (2) the mRNA level of TREK1 was down-regulated and the volume of neurospheres, cell activity and cell proliferation as well as the level of BDNF in the supernatant were increased in sh-TREK-1 group when compared with sham group; (3) There were no significant differences between sham and Ctrl group in the above parameters. **Conclusion:** The proliferation of neural stem cells is mediated by the expression of TREK1 channel. Up-regulation of TREK-1 inhibits the proliferation of neural stem cells and the expression of BDNF, and down-regulation of TREK-1 promotes the proliferation of neural stem cells and up-regulate the expression of BDNF.

Key words: Neural stem cells; Proliferation; TREK-1; BDNF

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R338.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1227-06

前言

海马是成年动物存在神经干细胞的脑区之一^[1]。海马神经再生现象普遍并终生存在于哺乳动物,而且成年动物的海马神经发生在一定程度上重复了胚胎大脑的发育过程,在学习和记

忆形成中发挥重要作用^[2,3]。近年的研究显示,海马的神经发生了多种神经精神疾病的发病机制^[4,5],海马神经干细胞成为研究神经退行性疾病的重要工具之一,研究影响海马神经干细胞生理功能的分子机制有助于寻找神经退行性疾病治疗新的靶点^[6]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81571309);陕西省重点研发计划项目(2017ZDXM-SF-047)

作者简介:刘军昌(1982-),本科,主治医师,主要研究方向:精神疾病的治疗及机制研究, E-mail: lj_c_xjyy@163.com

△ 通讯作者:何宏,本科,主治医师,主要研究方向:精神疾病的治疗及机制研究, E-mail: hehong715@163.com

(投稿日期:2018-09-23 接受日期:2018-10-18)

TRIK 相关的 K^+ 通道 1 (TRIK-Related K^+ Channel 1, TREK-1) 是一种双孔结构域 K^+ 通道, 在整个大脑中表达, 特别是在皮质、小脑和海马的神经元和星形胶质细胞中, 参与细胞增殖、坏死和凋亡的调节^[7]。以往研究发现, TREK-1 可以调节仓鼠卵巢细胞的体外增殖^[8], 还参与了氟西汀对体外神经发生的调节作用^[9], 但调节 TREK-1 对神经干细胞增殖的影响及其可能的机制尚不清楚。此外, 研究发现, 脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 在大脑皮质和海马区高表达, 可以促进神经干细胞增殖。阻断 TREK-1 可以上调海马中的 CREB-BDNF 信号^[10]。星形胶质细胞高表达 TREK-1 后, BDNF 的表达水平降低, 而下调 TREK-1 后, 可以抑制异氟醚所致星形胶质细胞 BDNF 表达减少的现象^[11]。因此, 本研究通过离体培养小鼠神经干细胞 (Neural Stem Cells, NSCs), 构建携带 TREK-1 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 和高表达载体 (Plenti-TREK-1) 的慢病毒, 观察了病毒转染后, 上调或下调 TREK1 对小鼠神经干细胞增殖和 BDNF 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 实验动物: 实验使用孕 10.5 d C57bl/6J 小鼠, 由空军军医大学实验动物中心提供并饲养。实验过程遵循神经科学和行为学实验中关于哺乳动物的饲养和使用规定。(2) 主要仪器: PCR 仪 (Thermo Scientific); 实时定量 PCR 仪 (Thermo Scientific PikoReal); 全波段酶标仪 (Thermo 公司); 恒温细胞培养箱 (Thermo Scientific); (3) 细胞培养试剂: DMEM/F12 (Hyclone); 20 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子 bFGF (Peprotech, 100-18B, USA), 20 ng/mL 上皮细胞生长因子 EGF (Peprotech, 400-25, USA), B27 (Gibco, 17504-010), HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Hyclone)。(4) 抗体: mouse anti-nestin (1:500, Abcam, UK), mouse anti-BrdU antibody (B8434, 1:500, Sigma Aldrich), 荧光二抗 (Alexa fluor 594 donkey anti-mouse IgG, 1:800, Invitrogen, USA), Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (A21202, 1:500, Invitrogen, USA); 碘化丙啶 (PI; P4170 Sigma-Aldrich, USA)。(5) 其他试剂: Polybrene (Hexadimethrine Bromide, 上海吉凯基因化学技术有限公司), RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂, 上海吉凯基因化学技术有限公司), Prime-Script RT 试剂盒 (上海吉凯基因化学技术有限公司), SYBR Premix Ex Taq (上海吉凯基因化学技术有限公司), Cell Counting Kit-8 (CCK-8, C0037, 碧云天生物技术公司), BDNF 小鼠 Elisa 试剂盒 (北京 Sunred 公司)。(6) 慢病毒: 表达针对 TREK-1 基因序列的短发夹 RNA (sh-TREK-1) 的慢病毒、阴性对照慢病毒 (Ctrl) 和高表达 TREK-1 的慢病毒 (Plenti-TREK-1) 均购自上海吉凯基因化学技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠 NSCs 的分离及培养 脱颈处死孕 10.5 d C57bl/6J 小鼠, 取出仔鼠, 分离出大脑海马, 剪成约 1~2 mm³ 大小的组织块, 并置于含 HBSS 的离心管中; 弃去上层 HBSS, 使用 0.5% 胰酶 (含 EDTA) 37 °C 消化 5 min 后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化, 800 r/min 离心 5 min 后弃上清。使用 200 目网筛进行过滤, 离心后取细胞沉淀重悬浮于 DMEM 中, 待使用

DMEM 清洗 3 次后, 加入含生长因子和 B27 的培养基并接种于细胞培养瓶, 置于 5% CO₂ 37 °C 恒温箱中培养。第 3 天半量换液, 至细胞融合达 80% 后进行细胞传代。细胞主要以 1×10⁵ 细胞/mL 的密度接种在培养瓶 (4 mL/瓶) 中, 并在含有 20 ng/mL bFGF 的无血清培养基中生长。培养 7 天后, 传代初级神经球。于倒置显微镜下拍照。

1.2.2 小鼠 NSCs 的鉴定 收集神经球并在 4 °C 条件下于 4% 多聚甲醛中固定 2 小时, 然后在 4 °C 条件下转移至含有 20% 蔗糖的 0.1 M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中过夜, 以进行冷冻保护。用低温恒温器切割冷冻切片 (10 μm) 并固定在凝胶化的载玻片上。PBS 清洗 3 次, 在室温下将含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.3% Triton 的 PBS 溶液加入细胞中封闭 30 分钟。除去该封闭试剂后, 滴加用封闭试剂稀释的小鼠抗 Nestin 抗体并 4 °C 过夜, 然后用 PBS 清洗 3 次, 室温避光滴加荧光二抗并孵育 2 小时, 随后, 将细胞与 DAPI 在室温下孵育 20 分钟以染色细胞核, PBS 清洗 3 次, 并固定在 PBS/ 甘油的载玻片上。置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.3 BrdU 检测 用 10 μM BrdU 标记神经干细胞球 5 天, 然后将它们解离成单细胞, 并在 24 孔板中以每孔 3×10⁴ 的浓度接种到聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上。培养 6 小时后, 将细胞在 4 °C 条件下于 4% 多聚甲醛中固定 2 小时, 并如 1.2.2 所述进行免疫细胞化学染色。与小鼠抗 BrdU 抗体和 Alexa Fluor 488 偶联的二抗孵育过夜后, 使用 50 μg/mL 碘化丙啶 (PI) 对细胞进行复染并固定在 PBS/ 甘油的载玻片上。使用荧光显微镜计数 BrdU 标记的细胞, 并统计其占总细胞数 (PI 染色的细胞) 的比例。

1.2.4 病毒干预 将对数生长期的细胞以 1×10⁴ 个细胞/孔接种到 96 孔板中或 5×10⁵ 个细胞/孔接种到 6 孔板中, 并在 37 °C 下孵育。细胞分为 sham 组, Ctrl 组, Plenti-TREK-1 组和 sh-TREK-1 组。待细胞达到 70%~80% 融合后, 根据说明书, 使用 Polybrene 分别对 Ctrl 组、Plenti-TREK-1 组和 sh-TREK-1 组进行转染。即将 20 μL Polybrene (5 mg/mL) 和 50 μL 病毒 (病毒储存浓度: sh-TREK-1 为 5.0×10⁸ TU/mL, Ctrl 为 4.5×10⁸ TU/mL, Plenti-TREK-1 为 4.9×10⁸ TU/mL) 加入至 20 mL 培养基中轻轻混合, 用混合培养基培养。在病毒转染后 24 小时, 用新鲜培养基替换转染混合物, 并在 37 °C 下继续培养。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞活力 病毒干预 3 天或 7 天后, 以 100 μL/孔向 96 孔细胞板中加入 10% CCK-8 溶液, 继续在细胞培养箱中孵育 4 h。将 96 孔细胞板放入酶联免疫检测仪, 在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度值。

1.2.6 实时定量 PCR (RT-PCR) 检测 TREK-1 水平 对细胞进行病毒干预 7 天后, 收集细胞, 使用 RNAiso Plus 从细胞中提取 mRNA, 并使用 Prime-Script RT 试剂盒逆转录成 cDNA (37 °C 15 分钟, 85 °C 5 秒和 4 °C 10 分钟)。随后, 用 SYBR Premix Ex Taq 通过 qPCR 定量检测基因表达。使用的 RT-PCR 引物由 Takara 公司合成, 序列如表 1 所示。使用的两步 qPCR 程序如下: (1) 1 个循环的 95 °C 持续 30 秒, 然后是 40 个循环的 95 °C 持续 5 秒, 60 °C 持续 30 秒; (2) 1 个循环的 95 °C 持续 15 秒, 然后保持在 4 °C。随后, 通过 2^{-ΔΔCt} 方法分析 TREK-1 的基因表达的相对变化。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of Real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
TREK-1	TCAAGCACATAGAAGGCTGG	ACGGATGTGGCAGCGTGG
GAPDH	CCAATGTGTCCGTCGTGGATCT	GTTGAAGTCGAGGAGACAACC

1.2.7 ELISA 检测 BDNF 水平 使用无菌管收集各处理组细胞,离心 20 min 左右(2000-3000 r/min),收集上清做为待测样本。参照 Elisa 检测说明书,逐步加入相应试剂,通过酶标仪检测得到标准曲线以及相应样品的 BDNF 的含量。

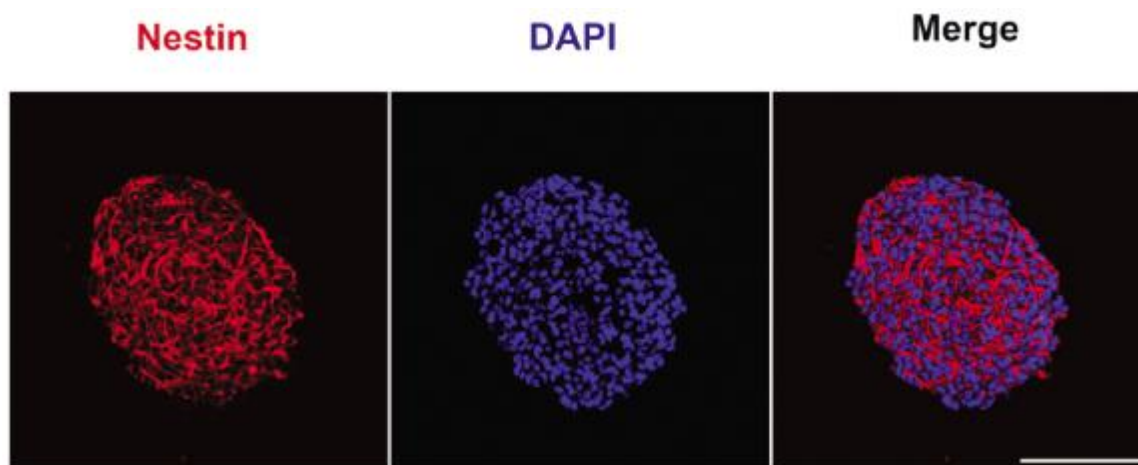
1.3 统计学处理

实验结果采用均值 $\pm$ 标准差(SD)的形式表示,采用 SPSS19.0 进行数据统计分析。各组之间的比较用单因素方差分析,两两数据比较采用最小显著差数法(Least significant difference, LSD)检验;设 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠神经干细胞的鉴定

在无血清培养基中培养后,神经干细胞形成自由漂浮的簇(即神经球),这些簇在培养过程中长大。通过免疫组织化学检测小鼠海马的神经球的巢蛋白表达情况(Nestin,神经干细胞的标记物),对其进行评估鉴定。结果显示,神经球中的大多数细胞为巢蛋白阳性(如图 1 所示),表明本实验培养所得的细胞确实是神经干细胞,可用于后续实验使用。

图 1 神经干细胞的 Nestin 染色($\times 100$)Fig.1 Nestin staining for neural stem cells (NSCs)($\times 100$)

2.2 调节 TREK1 对小鼠神经干细胞增殖的影响

如图 2 所示,病毒干预后 3 天,sham 组和 Ctrl 组之间神经球体积及细胞活力无显著差异($P > 0.05$),Plenti-TREK-1 组神经

球体积及细胞活力均显著小于 sham 组和 Ctrl 组($P < 0.01$),sh-TREK-1 组与 sham 组和 Ctrl 组之间无显著差异。

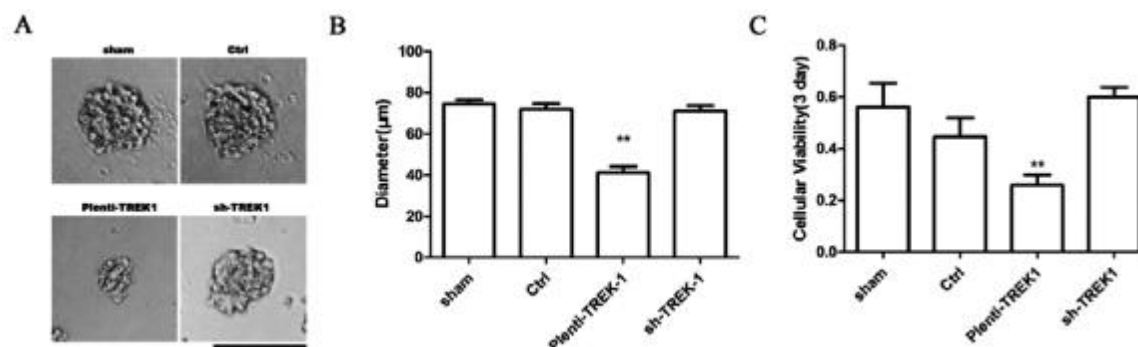


图 2 慢病毒干预后 3 天对神经干细胞增殖的影响。(A)慢病毒干预后 3 天的神经球($\times 100$)。(B)神经球直径的直方图。(C)慢病毒干预后 3 天对神经干细胞活力的影响。注:与 sham 和 Ctrl 相比 $*P < 0.05$

Fig.2 The effects of lentiviral intervention on proliferation of neural stem cells 3 days after intervention. (A) Microphotographs of neurospheres ($\times 100$) at 3 days after lentiviral intervention. (B) Histograms of sphere diameters. (C) The effect of lentiviral intervention for 3 days on neural stem cell viability.

Note: $*P < 0.05$ vs. sham group and Ctrl group.

如图 3 所示,病毒干预后 7 天,sham 组和 Ctrl 组之间神经球体积及细胞活力无显著差异,Plenti-TREK-1 组神经球体积及细胞活力均显著小于 sham 组和 Ctrl 组($P < 0.01$),sh-TREK-1

组神经球体积及细胞活力显著高于 sham 组 ($P < 0.05$)、Ctrl 组 ($P < 0.05$)及 Plenti-TREK-1 组($P < 0.01$)。

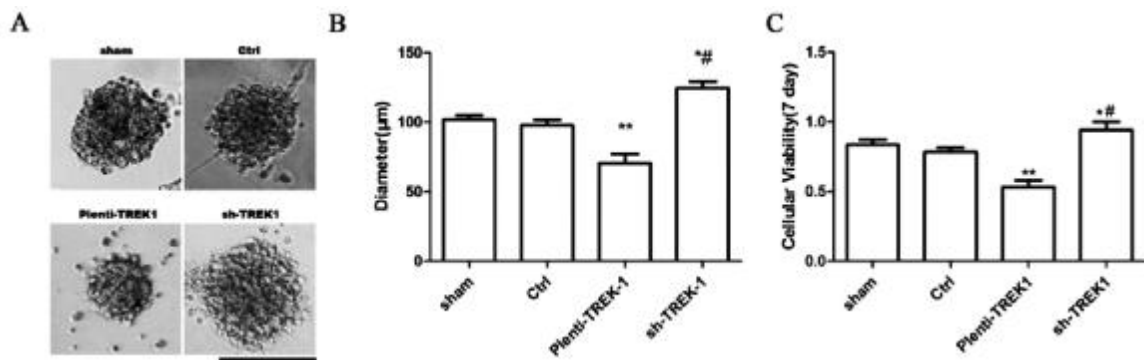


图3 慢病毒干预后7天对神经干细胞增殖的影响。(A)慢病毒干预后7天的神经球(×100)。(B)神经球直径的直方图。(C)慢病毒干预后7天对神经干细胞活力的影响。注:与 sham 和 Ctrl 相比 **P<0.01, *P<0.05;与 Plenti-TREK1 相比 #P<0.01

Fig.3 The effects of lentiviral intervention on proliferation of neural stem cells 7 days after intervention. (A) Microphotographs of neurospheres (× 100) at 7 days after lentiviral intervention. (B) Histograms of sphere diameters. (C) The effect of lentiviral intervention for 7 days on neural stem cell viability.

Note: **P<0.01, *P<0.05 vs. sham group and Ctrl group; #P<0.01 vs. Plenti-TREK1.

如图4所示,慢病毒干预后7天BrdU染色标记结果显示,与sham组和Ctrl组对比,Plenti-TREK-1组BrdU+/PI细胞比例显著降低(P<0.01);sh-TREK-1组BrdU+/PI细胞比例显著

高于sham组(P<0.05)、Ctrl组(P<0.05)及Plenti-TREK-1组(P<0.01)。

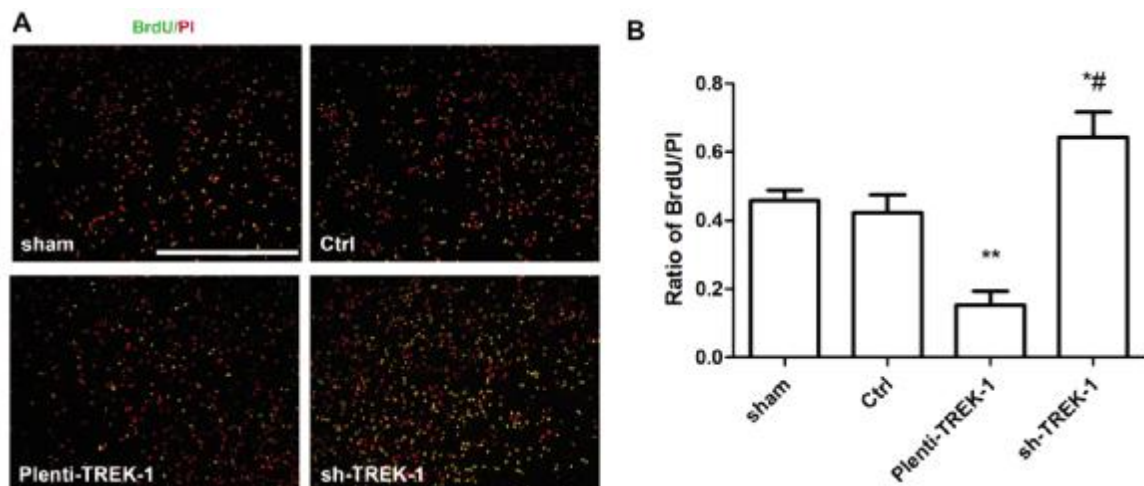


图4 慢病毒干预后7天对神经干细胞增殖的影响。(A)BrdU染色。(B)BrdU阳性细胞比例统计图。注:与 sham 和 Ctrl 相比 **P<0.01, *P<0.05;与 Plenti-TREK1 相比 #P<0.01

Fig.4 Microphotographs (A) and histograms showing BrdU incorporations (B) of the NSCs following interventions with lentiviral for 7 days

Note: **P<0.01, *P<0.05 vs. sham group and Ctrl group; #P<0.01 vs. Plenti-TREK1.

2.3 病毒干预对小鼠神经干细胞 TREK1 水平及细胞上清液 BDNF 水平的影响

如图5所示,病毒干预后7天,sham组和Ctrl组之间TREK-1基因表达无显著差异,Plenti-TREK-1组TREK-1基因表达显著高于sham组和Ctrl组(P<0.01),sh-TREK-1组TREK-1基因表达显著低于sham组(P<0.01)、Ctrl组(P<0.01)和Plenti-TREK-1组(P<0.01)。此外,病毒干预后7天,sham组和Ctrl组之间上清液BDNF表达水平无显著差异,Plenti-TREK-1组上清液BDNF表达水平显著低于sham组和Ctrl组(P<0.01),sh-TREK-1组上清液BDNF表达水平显著高于sham组(P<0.01)、Ctrl组(P<0.01)和Plenti-TREK-1组(P<0.01)。说明TREK-1可以调节小鼠胚胎神经干细胞BDNF的表达水平,上调TREK-1表达时可以降低小鼠神经干细胞BDNF的表达,反之,下调TREK-1可增高小鼠神经干细胞BDNF的表达。

3 讨论

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类存在于胚胎和成年哺乳动物中枢神经系统中的母细胞,具有自我更新和多向分化潜能,其增殖、凋亡及分化与其内在分化程序、细胞外基质、黏附分子及细胞间的相互作用等密切相关。新神经元被认为起源于多能成体NSCs,其可以自我更新并产生不同的神经谱系细胞^[12],如星形胶质细胞、少突胶质细胞或神经元。除了在胚胎中发现的神经干细胞外,各种成体器官和组织在未分化状态下也具有神经干细胞的潜能。研究表明,在啮齿动物和人类中,神经发生在胚胎发育期间最强烈地发生,在出生后以较低的强度发生^[13]。胚胎神经发生决定了大脑结构和神经功能,而出生后神经发生受限,参与区域神经再生,与海马区记忆、认知和情绪功能有关^[14]。在成年哺乳动物的中枢神经系统中,神经

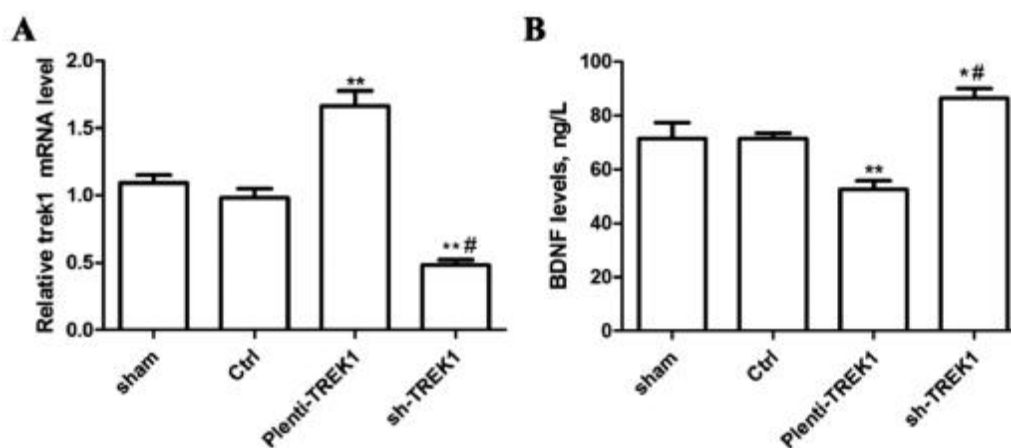


图5 慢病毒干预后7天对 TREK1 mRNA(A)和细胞上清液 BDNF 水平表达(B)的影响。注:与 sham 和 Ctrl 相比 ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 与 plenti-TREK1 相比 # $P<0.01$

Fig.5 The effects of lentivirus intervention on the expression of TREK1 mRNA (A) and BDNF level (B) in cell supernatant at the day 7 after intervention.

Note: ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs. sham group and Ctrl group; # $P<0.01$ vs. Plenti-TREK1.

发生出现在两个区域:海马区的脑室下区和齿状回。成年哺乳动物脑内的神经干细胞(NSCs)终生保持在侧脑室壁内,通过吻侧迁移流(RMS)向嗅球供应新的神经元,并在海马的颗粒下层,产生新的齿状回颗粒细胞^[15,16]。虽然成人大脑中的 NSCs /神经发生系统被认为相对稳定,但 NSCs 的数量随着年龄的增长而逐渐减少,并且还因心理社会和身体压力而减少^[12,17]。相反,NSCs 群体大小可通过丰富的环境、运动、学习和各种治疗性药物治疗(如抗抑郁药和情绪稳定剂)来增加^[12]。

伴随神经干细胞的发现和确立以及近年来对神经干细胞的不断深入研究,人们对神经干细胞可能给神经科学带来的临床应用寄予厚望。神经干细胞自我更新和形成不同成熟细胞的能力扩展了在基于细胞的疗法中应用的可能性,例如再生医学中的组织重组、药物筛选和神经退行性疾病的治疗。对神经干细胞命运的调节是一个精细控制的过程,依赖于从表观遗传延伸到翻译水平并涉及细胞外基质成分的复杂调节网络^[18]。因此,更好地理解诱导、调节和维持神经发生过程的潜在机制将为开发神经退行性治疗的新神经生物学策略提供信息。

钾(K⁺)通道是专门转运钾离子的膜蛋白,在细胞体积调节、激素分泌、心跳、突触传递和肌肉收缩等方面发挥重要作用。根据结构特点,K⁺通道分为电压门控 K⁺通道(Kv)、内向整流 K⁺通道(Kir)和双孔域 K⁺通道(K2P)^[9]。其中,双孔结构域 K⁺通道(K2P)家族的成员逐渐被发现,并且越来越多地被认为是治疗药物的潜在靶标,在神经系统疾病的诊断和治疗中发挥作用^[20]。它们被认为在多效细胞类型中的广泛和多样的表达模式、细胞功能的重要性、独特的生物物理特性以及对病理生理学参数的敏感性代表了它们参与中枢神经系统(CNS)疾病的基础^[7]。TWIK 相关的 K⁺通道(TREK-1)是双孔结构域 K⁺通道(K2P)家族的成员之一,其对细胞体积的调节至关重要,参与细胞增殖、坏死和凋亡的调节^[21],在控制神经元兴奋性和一般脑功能中发挥重要作用^[7]。有研究表明,TREK-1 在整个大脑中表达,特别是在皮质、小脑和海马的神经元和星形胶质细胞中表达^[7]。星形胶质细胞 K⁺通道在中枢神经系统稳态中的重要作用已在动物疾病模型中得到证实,并且新出现的证据表明由星形胶质细胞离子通道(如 TREK-1)介导的信号传导能够实现星形胶质

细胞和神经元之间的相互作用,调节突触传递和可塑性^[22]。此外,TREK-1 控制涉及记忆形成的几种主要细胞反应,并且被认为参与抑郁症、脑缺血和血脑屏障功能障碍的发展^[23]。研究发现,TREK-1 抑制剂 spadin 有一定的抗抑郁效果,而且还可以促进海马的神经发生^[24]。我们的前期研究也证实,TREK-1 是吸入麻醉剂异氟醚引起认知障碍的关键作用分子,下调 TREK-1 的表达不仅可以抑制异氟醚所致认知障碍,还可以改善异氟醚所致海马神经发生受损的现象^[25]。因此,TREK-1 可能对海马神经发生有调节作用,但是其对神经干细胞的直接作用还不清楚。本研究的结果显示,通过慢病毒干预的方式上调海马神经干细胞的 TREK-1 表达后,可以降低其细胞活性,减少其 BrdU 阳性细胞的数量,抑制其增殖;反之,下调 TREK-1 则可以促进神经干细胞的增殖并上调其细胞活性及 BrdU 阳性细胞的数量。

为了进一步探讨 TREK-1 可能的作用机制,本研究进一步比较了各处理组细胞上清 BDNF 的水平差异。BDNF 是神经干细胞发挥功能的重要影响因素,在大脑皮质和海马区高表达,可以促进神经干细胞增殖,是调节中枢神经系统发育和海马神经可塑性的关键因子,与多种神经退行性疾病的学习认知损伤密切相关^[11,26]。研究表明,体外培养的海马脑片新生神经元的生成依赖于 BDNF,外源给予 BDNF 促进其神经干细胞增殖和新生神经元形成,而阻断内源性或减少外源性的 BDNF 均可抑制海马脑片培养的新生神经元生成。此外,在抑郁、亨廷顿氏舞蹈病等神经性疾病动物模型中,海马的 BDNF 水平明显下降,神经发生受损,而药物治疗可以通过上调大脑海马 BDNF 水平和神经发生缓解疾病症状,发挥治疗作用^[26,27]。此外,已有研究发现,阻断 TREK-1 可以上调海马中的 CREB-BDNF 信号^[10]。我们既往的研究也发现,星形胶质细胞高表达 TREK-1 后,BDNF 的表达水平降低,而下调 TREK-1 后,可以抑制异氟醚所致星形胶质细胞 BDNF 表达减少的现象^[10]。本研究结果显示,上调 TREK-1 可以降低神经干细胞 BDNF 的表达水平,反之,下调 TREK-1 增加其 BDNF 的表达水平。因此,对 BDNF 水平的调节可能是 TREK1 影响神经干细胞增殖能力的机制之一。

综上所述,本研究发现调节 TREK-1 的表达可以影响神经干细胞的增殖水平和 BDNF 的表达水平,但是 TREK-1 影响干

细胞增殖的详细分子机制以及其与 BDNF 的相互作用还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Yeh C Y, Asrican B, Moss J, et al. Mossy Cells Control Adult Neural Stem Cell Quiescence and Maintenance through a Dynamic Balance between Direct and Indirect Pathways [J]. *Neuron*, 2018, 99 (3): 493-510, e494
- [2] Baptista P, Andrade J P. Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation and Possible Functional and Clinical Correlates [J]. *Frontiers in neuroanatomy*, 2018, 12: 44
- [3] Akers K G, Cherasse Y, Fujita Y, et al. Concise Review: Regulatory Influence of Sleep and Epigenetics on Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive and Emotional Function [J]. *Stem cells*, 2018 [Epub ahead of print]
- [4] Rotheneichner P, Lange S, O'sullivan A, et al. Hippocampal neurogenesis and antidepressive therapy: shocking relations [J]. *Neural plasticity*, 2014, 2014: 723915
- [5] Toda T, Parylak S L, Linker S B, et al. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease [J]. *Molecular psychiatry*, 2018[Epub ahead of print]
- [6] Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(32): 13594-13599
- [7] Ehling P, Cerina M, Budde T, et al. The CNS under pathophysiologic attack—examining the role of K(2)p channels[J]. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2015, 467(5): 959-972
- [8] Zhang M, Yin H J, Wang W P, et al. Over-expressed human TREK-1 inhibits CHO cell proliferation via inhibiting PKA and p38 MAPK pathways and subsequently inducing G1 arrest [J]. *Acta pharmacologica Sinica*, 2016, 37(9): 1190-1198
- [9] Xi G, Zhang X, Zhang L, et al. Fluoxetine attenuates the inhibitory effect of glucocorticoid hormones on neurogenesis in vitro via a two-pore domain potassium channel, TREK-1[J]. *Psychopharmacology*, 2011, 214(3): 747-759
- [10] Ye D, Li Y, Zhang X, et al. TREK1 channel blockade induces an antidepressant-like response synergizing with 5-HT1A receptor signaling[J]. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 2015, 25(12): 2426-2436
- [11] Zhou C H, Zhang Y H, Xue F, et al. Isoflurane exposure regulates the cell viability and BDNF expression of astrocytes via upregulation of TREK1[J]. *Molecular medicine reports*, 2017, 16(5): 7305-7314
- [12] Kempermann G. Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2015, 7(11): a018929
- [13] Urban N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2014, 8: 396
- [14] Christian K M, Song H, Ming G L. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis [J]. *Annual review of neuroscience*, 2014, 37: 243-262
- [15] Lim D A, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2016, 8(5): a018820
- [16] Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain [J]. *Journal of neurochemistry*, 2017, 141(6): 835-847
- [17] Schoenfeld T J, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 12-21
- [18] Vieira M S, Santos A K, Vasconcellos R, et al. Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications [J]. *Biotechnology advances*, 2018, 36 (7): 1946-1970
- [19] Maljevic S, Lerche H. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases [J]. *Journal of neurology*, 2013, 260(9): 2201-2211
- [20] Mao Q, Yuan J, Ming X, et al. Role of dorsal root ganglion K2p1.1 in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Molecular pain*, 2017, 13: 1744806917701135
- [21] Noel J, Sandoz G, Lesage F. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions[J]. *Channels*, 2011, 5(5): 402-409
- [22] Olsen M L, Khakh B S, Skatchkov S N, et al. New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling[J]. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2015, 35(41): 13827-13835
- [23] Cai Y, Peng Z, Guo H, et al. TREK-1 pathway mediates isoflurane-induced memory impairment in middle-aged mice [J]. *Neurobiology of learning and memory*, 2017, 145: 199-204
- [24] Mazella J, Petraut O, Lucas G, et al. Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design[J]. *PLoS biology*, 2010, 8(4): e1000355
- [25] 韦朝霞. BDNF-TrkB 通路在海马脑片培养中的神经再生研究[D]. 南方医科大学, 2013
- [26] Zuccato C, Liber D, Ramos C, et al. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery [J]. *Pharmacological research*, 2005, 52(2): 133-139
- [27] 孟盼, 王宇红, 张秀丽, 等. 百事乐胶囊对慢性应激抑郁模型大鼠行为活动及海马突触素表达的影响[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2013, 15(7): 1562-1568