

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.010

褪黑素对慢性脑低灌注大鼠海马齿状回区神经再生的影响*

王少朋¹ 王 茹¹ 李丹丹² 马 芮² 赵弘轶² 黄勇华² 迟丽屹^{3△}

(1 陕西中医药大学 陕西 咸阳 712046; 2 中国人民解放军总医院第七医学中心神经内科 北京 100700;

3 解放军空军第九八六医院神经内科 陕西 西安 710054)

摘要 目的:研究褪黑素在慢性脑低灌注(Chronic Cerebral Hypoperfusion, CCH)大鼠模型中对神经再生的作用及机制。**方法:**使用双侧颈总动脉结扎法(bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)制备大鼠 CCH 模型, 80 只雄性的 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只: 生理盐水治疗假手术组(Sham 组)、生理盐水治疗模型组(BCCAO 组)、褪黑素(5 mg/kg)治疗模型组(MT1 组)、褪黑素(10 mg/kg)治疗模型组(MT2 组)。连续腹腔注射褪黑素或生理盐水共 4 周。利用挖掘实验评估大鼠行为学; 使用 HE 染色观察神经细胞变性坏死; 采取尼氏染色法观察大鼠海马齿状回区神经元损伤情况; 利用免疫荧光法测定神经元特异性核蛋白(NeuN)、胶质纤维酸性蛋白(Ki67)、双皮质素(DCX)的表达; 利用 Western Blot 法测定大鼠海马区脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶 B 受体(TrkB)含量的表达。**结果:**和 Sham 组相比, BCCAO 组大鼠挖掘能力明显下降($P<0.01$), HE 和尼氏染色出现神经细胞大量坏死、数量减少, NeuN 阳性细胞数增加($P<0.01$)、Ki67/DCX 阳性细胞数无明显增加($P>0.05$), BDNF、TrkB 蛋白含量明显低于假手术组($P<0.01$)。与 BCCAO 组相比, MT1 组和 MT2 组大鼠挖掘能力均明显改善($P<0.01$), HE 和尼氏染色显示神经元存活数量增加, MT1 组 NeuN 阳性细胞数增加($P<0.05$)、Ki67/DCX 阳性细胞数增加($P<0.05$), MT2 组 NeuN、Ki67/DCX 阳性细胞数明显增加($P<0.01$), MT1 组及 MT2 组 BDNF、TrkB 蛋白含量明显增加($P<0.01$)。**结论:**褪黑素促进了 CCH 大鼠海马齿状回区神经再生和行为学的改变, 其机制可能与激活 BDNF-TrkB 信号转导通路有关。

关键词:褪黑素; 海马; 脑低灌注; 神经再生

中图分类号: R-33; R338.2; R749.16 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2019)07-1251-06

Effects of Melatonin on Neuron Proliferation in Dentate Gyrus Area of Hippocampal of Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion*

WANG Shao-peng¹, WANG Ru¹, LI Dan-dan², MA Ru², ZHAO Hong-yi², HUANG Yong-hua², CHI Li-yi^{3△}

(1 Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046, China; 2 Department of Neurology, the Seventh Medical Center of the Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100700, China; 3 Department of Neurology, the 986 Hospital of the PLA Air Force, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: Investigate the role and mechanism of melatonin on neuron regeneration in a rat model of Chronic Cerebral Hypoperfusion (CCH). **Methods:** Rat CCH model was made by bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO). Eighty male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to 4 groups ($n=20$): the sham operation group (Sham group), the BCCAO group (BCCAO group), the BCCAO with melatonin (5 mg/kg) treatment group (MT1 group), and the BCCAO with melatonin (10 mg/kg) treatment group (MT2 group). Continuous administration of melatonin or saline were used for 4 weeks. The behavioral research of rats was evaluated by burrowing experiment and use HE staining to observe neuronal degeneration and necrosis. The neuronal damage on the dentate gyrus of rat hippocampus was observed by Nissl staining. The expression of neuron-specific nuclear protein (NeuN), glial fibrillary acidic protein (Ki67) and double cortisol (DCX) were determined by immunofluorescence. Western Blot method was used to determine the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase B receptor (TrkB) in rat hippocampus. **Results:** Compared with Sham group, the burrowing ability of rats in BCCAO group was significantly decreased ($P<0.01$). The number of necrotic cells and neurons in HE and Nissl staining were decreased significantly, and the number of NeuN and Ki67/DCX positive cells did not increase significantly ($P>0.05$). The protein content of BDNF was decreased ($P<0.01$) and TrkB was significantly lower than that of the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the BCCAO group, the burrowing ability of the rats in the MT1 group and the MT2 group was significantly improved ($P<0.01$). HE and Nissl staining showed an increase in the number of neurons surviving, and the number of NeuN was increased ($P<0.05$) and Ki67/DCX positive cells in the MT1 group was increased ($P<0.01$). The number of NeuN and Ki67/DCX positive cells in MT2 group was increased significantly ($P<0.01$), and the content of BDNF and TrkB protein in MT1 group and MT2 group was increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** Melatonin promoted neuronal regeneration and behavioral changes in the dentate gyrus

* 基金项目: 解放军空军后勤科研基金项目(CKJ17J019)

作者简介: 王少朋(1984-), 硕士研究生, 主要研究方向: 脑血管病的基础与临床研究, 电话: 18189156365, E-mail: 407966791@qq.com

△ 通讯作者: 迟丽屹, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 脑血管病的基础与临床研究, 电话: 029-84734239, E-mail: 1173319088@qq.com

(收稿日期: 2018-12-17 接受日期: 2019-01-21)

of CCH rats, and its mechanism may be related to activation of BDNF-TrkB signal transduction pathway.

Key words: Melatonin; Hippocampus; Cerebral hypoperfusion; Neurogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338.2; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1251-06

前言

血管性认知功能障碍和痴呆 (Vascular Cognitive Impairment and Dementia, VCID) 是老年人痴呆的最常见病因^[1]。血管性痴呆和阿尔茨海默病, 以认知功能障碍和神经变性为其神经病理学共同特征^[2]。VCID 目前尚无确切有效的治疗方法^[3,4]。尽管 VCID 的不同亚型具有异质性, 但 CCH 被认为是该疾病的病理之一^[5]。大鼠双侧颈总动脉闭塞 (bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO) 是最常用的 CCH 动物模型之一^[6,7], 用于研究 VCID 的潜在机制^[1]。使用 BCCAO 大鼠模型最近的研究已经揭示了可能参与的 VCID 认知功能障碍机制中重要的病理过程, 例如氧化应激, 神经炎症, 神经递质系统功能障碍, 线粒体功能障碍等^[8]。褪黑素 (5-甲氧基-N-乙酰基色胺) 是松果体合成和分泌的主要激素, 受 24 小时睡眠节律和黑暗周期调节, 它是一种多效的激素^[9]。在体实验研究证实褪黑素减轻东莨菪碱诱导的健忘症小鼠模型中的记忆缺陷^[10]。成年哺乳动物海马齿状回区被认为是新生神经元发生的微环境。而研究证实 BDNF-TrkB 通路在神经发生中起关键作用。当前, 褪黑素已被证实多种因素导致的脑组织慢性缺氧和缺血中具有改善作用, 考虑有可能与其抗氧化、抗炎等作用相关^[11,12]。因此, 本课题探讨褪黑素激活对 CCH 大鼠海马齿状回区 (Dentate Gyrus, DG) 新生神经元的增殖的影响, 其机制是否与激活 BDNF-TrkB 信号通路有关, 从而促进 BCCAO 大鼠海马 DG 区内源性神经发生。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

成年健康雄性清洁级 SD 大鼠 80 只, 体重 (250±20)g, 购于斯贝福北京实验动物科技有限公司 (许可证: SCXK (京) 2015-0015)。褪黑素 (粉剂, ≥98% (TLC), M5250-1G, Sigma-Aldrich)。兔抗 Ki67 多克隆抗体 (ab15580, Abcam), 兔抗酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 抗体 (ab187041, Abcam), 兔抗脑源性神经生长因子 (BDNF) 抗体 (ab108319, Abcam), 兔抗神经元核心抗原 (NeuN) 抗体 (ab177487, Abcam), 兔抗双皮质素 (Doublecortin, DCX) 抗体 (sc-271390, Santa Cruz Biotechnology)。兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体 (GB11002, 谷歌生物), 山羊抗小鼠 IgG 辣根过氧化物酶 (M21002, Abmart) 尼氏 (Nissl) 染色液 (G1036, 武汉市古泰生物技术有限公司)。Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (A0423, 碧云天科技), Alexa Fluor 555 标记驴小鼠 IgG (H+L) (A0460, 碧云天科技) 3-0 非吸收性外科缝线 (苏州市嘉盛医疗用品有限公司)。

1.2 实验分组和模型制备

80 只雄性 SD 大鼠, 按随机数字表法分成假手术 (Sham) 组 (n=20)、双侧颈总动脉结扎 (BCCAO) 组 (n=20)、BCCAO+褪黑素低剂量治疗组 (5 mg/Kg, 以下简称 MT1 组) (n=20) 以及

BCCAO+褪黑素高剂量治疗组 (10 mg/kg, 以下简称 MT2 组) (n=20)。采取以前学者的经验采取 BCCAO 法建立 CCH 模型^[13]。简要地说, 使用 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 颈部腹侧中线暴露动脉, 并小心分离颈动脉鞘避免损伤迷走神经等, 每根动脉使用真丝缝线双重结扎。Sham 组动物在不结扎的情况下进行相同的手术。动物体温维持在 37±0.5℃。术后 24 小时, 褪黑素 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 治疗组予以腹腔注射 5、10 mg/kg 体重 (先溶于无水乙醇, 后加生理盐水定容至 2 mL), 安慰剂 (vehicle) 治疗组注射同等剂量的生理盐水 (2 mL), 每晚 19-20 点一次, 连续 4 周。饲养于清洁级动物房, 自由进水进食。

1.3 行为学评估

挖掘实验: 挖掘行为是啮齿类动物先天性自我奖励行为之一^[14]。按之前的方法^[15], 取 2500 g 清洁石英砂填充于黑色塑料管 (长 32 cm, 直径 10 cm) 中。要求黑色塑料管的开口端从笼的底部升高 6 cm。至少在暗周期开始前 2 小时, 将每只大鼠单个放进实验笼。12 小时后, 取出大鼠, 将从黑色塑料管内被挖掘出来的石英砂称重。术前对所有正常 SD 大鼠进行挖掘实验测试, 术后 4 周分别对各组大鼠再次进行挖掘实验测试。

1.4 组织制备

行为学测试后, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 参照之前的方法行心脏灌注^[16]。简言之, 常规剖开心脏, 灌注针经左心尖部穿入, 经心脏依次灌注 240 mL 生理盐水及 240 mL 4% 多聚甲醛溶液, 在冰上快速完整取出脑组织, 分离左右大脑。将左侧大脑海马区迅速冻于 -80℃ 冰箱。右侧大脑 4% 多聚甲醛溶液固定, 20% 蔗糖、30% 蔗糖梯度脱水, 后进行冰冻切片。

1.5 HE 染色

从 4℃ 冰箱取出冰冻切片, 使用蒸馏水冲洗 1 min, 苏木素染色 9 min, 自来水洗涤 5 min, 1% 醋酸酒精分化液 1 min, 流动自来水冲洗 1 min, 1% 氨水分化液 40 s, 伊红染色 50 s, 95%、100%、100% 酒精梯度脱水, 二甲苯 20 S, 50% 中性树脂封片。

1.6 尼氏染色法 (Nissl Staining)

切取大鼠完整海马区 (冠状面) 做冰冻切片, 纯化水泡片 2 min 后, 尼氏染色液 (碧云天生物技术有限公司) 染色 4 min, 水洗 20 sec, 90% 乙醇分化 20 sec, 风干后, 用中性树脂封片。使用正置荧光显微镜 (DML3000, LEICA) 观察神经元的数量及形态变化。

1.7 免疫荧光

将大鼠海马区的脑片经抗原修复液修复后, 用 10% 山羊血清封闭 1 h, 加一抗兔源 NeuN (1:300, Abcam)、Ki67 (1:100, Abcam)、DCX (1:50, Abcam), 4℃ 孵育过夜后加二抗 488 标记山羊抗兔 (1:500, 碧云天) 孵育 2 h, 后加 DAPI 染料 (1:200, 碧云天) 15 min。使用正置荧光显微镜 (DML3000, LEICA) 观察神经元的增殖情况。使用 Image-Pro Plus 图像分析软件定量评定海马 DG 区增殖神经元的数量^[17]。

1.8 Western blot 法

大鼠海马组织称重后,加入含有苯甲基磺酰氟的强 RIPA 蛋白裂解液中,用匀浆器冰上匀浆至组织完全溶解。4℃ 下 12000 rpm 离心 15 min,留取上清。采用 BCA 法行定量蛋白,行 SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳,一抗为 BDNF(1:1000)、TrkB(1:5000)、GAPDH(1:2000),二抗为山羊抗兔 IgG(1:5000)。具体操作过程不再赘述。显影后使用 ImageJ 图像分析软件分析结果。

1.9 数据处理

所有数据均使用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,比较组间差异使用单因素方差分析(one-way ANOVA)。各组之间两两比较则选用最小显著差数法(LSD)。P<0.05 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

4 周后,BCCAO 组及 MT1 组各有一只大鼠死亡,Sham 组及 MT2 组大鼠未发生死亡,推测可能由于感染或者手术不耐受导致。各组大鼠体重之间无统计学差异。

2.2 褪黑素对大鼠行为学的影响(表 1)

本研究中,经过术前训练,四组大鼠挖掘(burrowing)数量之间无显著差异;术后 4 周假手术组 burrowing 数量较术前无显著变化,而 BCCAO 组在术后 burrowing 量较术前均显著下降,低于假手术组(P<0.01)(表 1),说明 BCCAO 组大鼠术后 Burrowing 行为能力存在障碍。而与 BCCAO 组相比,MT1 组以及 MT2 组 Burrowing 量均有显著上升,且具有统计学差异(P<0.01)。

表 1 各组挖掘行为学评分比较(克, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of burrowing behavior scores of each group(g, $\bar{x}\pm s$)

Groups	N	Pre-operation	4 weeks after BCCAO
Sham	6	2067 $\pm$ 171	2207 $\pm$ 104
BCCAO	6	2152 $\pm$ 160	1188 $\pm$ 81**
MT1	6	2024 $\pm$ 170	1468 $\pm$ 81 [#]
MT2	6	2073 $\pm$ 165	1696 $\pm$ 98 $\Delta\Delta$

Notes: VS Sham group, the burrowing ability in BCCAO group were decreased.(**P<0.01). VS BCCAO group, the burrowing ability of MT1 group were improved([#]P<0.01). VS BCCAO group, the burrowing ability of MT2 group were ameliorated($\Delta\Delta$ P<0.01).

2.3 褪黑素减少了 BCCAO 大鼠的神经元损伤

2.3.1 HE 染色结果 评估 CCH 的组织学损伤和褪黑素的保护作用,对海马 DG 的脑切片进行 HE 染色(图 1)。在 BCCAO 后 28 天,通过与 Sham 组比较,HE 染色显示 BCCAO 组中观

察到神经细胞形态异常,可见多数胞浆皱缩的细胞体,核固缩,着色加深(图 1B)。通过给予褪黑素治疗,MT1 组及 MT2 组存在显著改善的病理改变(图 1C、D)。

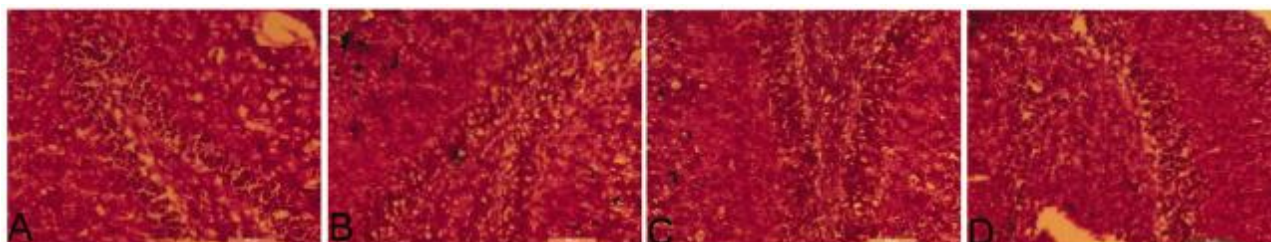


图 1 HE 染色结果(10 $\times$ 20,标尺=50 μ m)

Fig.1 Results of HE Staining(10 $\times$ 20, bar=50 μ m)

Notes: A-Sham group, B-BCCAO group, C-MT1 group, D-MT2 group.

2.3.2 尼氏染色结果 尼氏染色结果显示(图 2),通过与 Sham 组比较,BCCAO 组神经元核固缩,形态各异,形成大量

空泡腔,分布紊乱,存活神经元数量明显减少(图 2B)。而 MT1 组及 MT2 组与 BCCAO 组相比,上述改变明显减少(图 2C、D)。

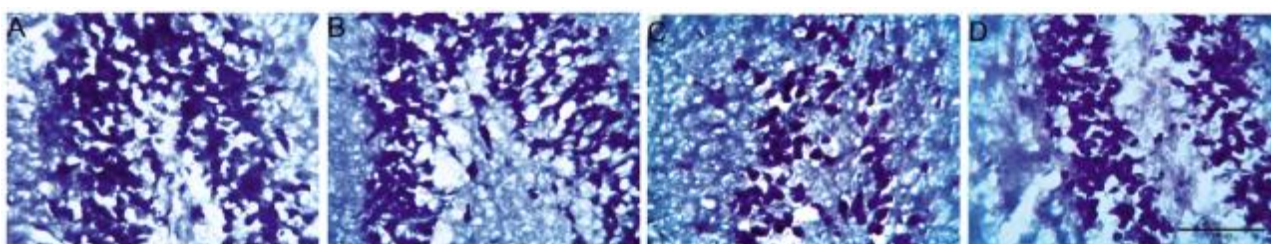


图 2 尼氏染色结果(10 $\times$ 20,标尺=100 μ m)

Fig.2 Results of Nissl Staining(10 $\times$ 20, bar=100 μ m)

Notes: A-Sham group, B-BCCAO group, C-MT1 group, D-MT2 group.

2.4 褪黑素促进了海马 DG 区的神经再生

2.4.1 海马 DG 区 NeuN 染色 NeuN 是神经元核的特异性抗原的标记物。NEUN 染色结果显示, 通过与 Sham 组相比较,

(图 3), BCCAO 组新生神经元数量显著减少($P<0.01$)(表 2)。而 MT1 组与 BCCAO 组相比 (表 2), 新生神经元增多($P<0.05$), MT2 组与 BCCAO 组相比, 新生神经元明显增多($P<0.01$)。

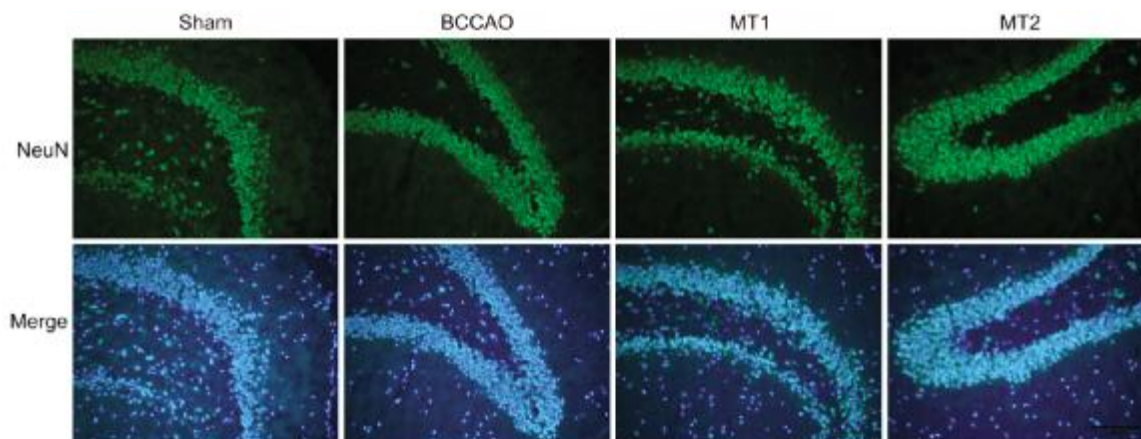


图 3 NEUN 染色结果(10×20 , 标尺 = $200\ \mu\text{m}$)

Fig.3 Results of NeuN Immunofluorescence (10×20 , bar= $200\ \mu\text{m}$)

Notes: NeuN staining of neurons in the hippocampal DG region of adult rats, NeuN positive cells were green.

2.4.2 海马 DG 区 Ki67/DCX 染色结果 Ki67 为细胞增殖的内源性标记物, DCX 为成神经细胞的标志物。Ki67/DCX 染色结果显示 (图 4), 通过与 Sham 组相比较, BCCAO 组 Ki67/DCX 阳性细胞数量无统计学差异 ($P>0.05$)(表 2)。而

BCCAO 组与 MT1 组相比(表 2), MT1 组 Ki67/DCX 阳性细胞数有所增加 ($P<0.01$)。BCCAO 组与 MT2 组相比, MT2 组 Ki67/DCX 阳性细胞数量增加明显($P<0.01$)。

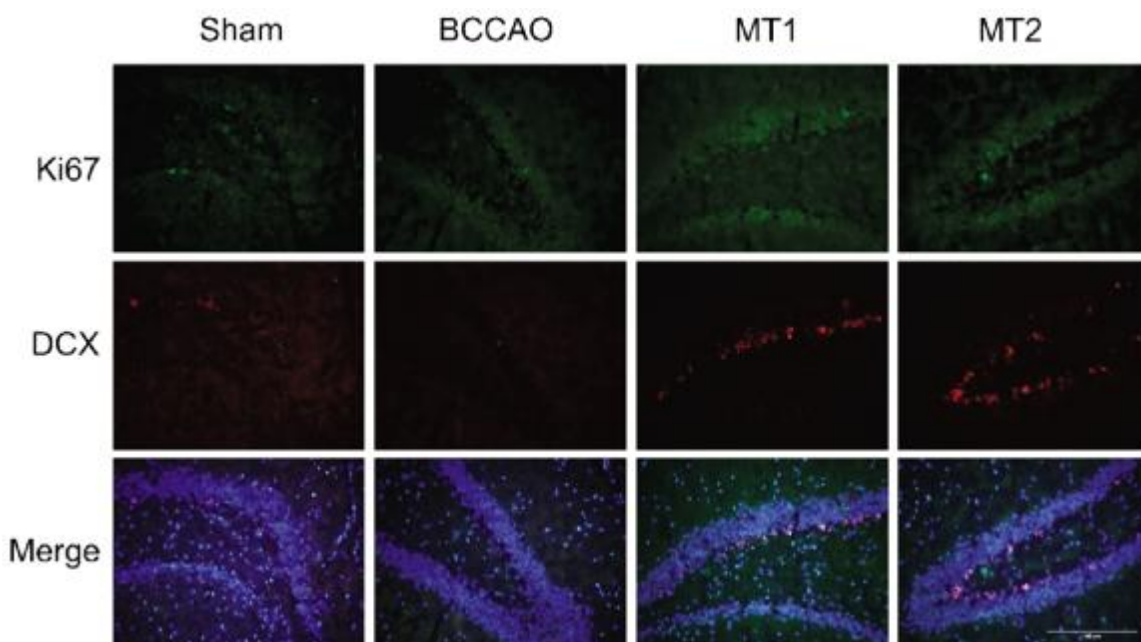


图 4 Ki67/DCX 染色结果 ($N=6, 10\times 20$, 标尺 = $400\ \mu\text{m}$)

Fig. 4 Results of Ki67/DCX Immunofluorescence($N=6, 10\times 20$, bar= $400\ \mu\text{m}$)

Notes: The Ki67 and DCX staining of neurons in the hippocampal DG region of adult rats showed that Ki67-positive neurons were green and DCX-positive cells were red.

2.5 WB 结果

蛋白质印迹法结果显示(图 5), BCCAO 组 BDNF、TrkB 蛋白含量明显低于假手术组($P<0.01$)(表 3)。BCCAO 组分别与 MT1 及 MT2 组相比(表 3), 褪黑素干预后 BDNF、TrkB 蛋白含量明显增加($P<0.01$)。MT1 组与 MT2 组相比, MT2 组 BD-

NF、TrkB 蛋白含量增加($P<0.01$)。

3 讨论

VCID 是一种不可被逆转的疾病, 临床表现以进行性的认知能力下降, 以及记忆、语言和社交能力的困难, 病理表现为各

表 2 四组大鼠海马 DG 区免疫荧光染色阳性细胞数

Table 2 Number of immunofluorescent staining positive cells in DG area of hippocampus of four groups of rats

Groups	N	NeuN positive cells ^{1>}	Ki67 positive cells	DCX positive cells
Sham	6	27.17± 4.71	6.50± 1.87	18.17± 8.23
BCCAO	6	7.17± 3.25**	2.50± 1.05ns	6.33± 3.89ns
MT1	6	14.83± 4.36 [#]	10.50± 3.02 ^{##}	44.67± 11.01 ^{##}
MT2	6	27.19± 5.42 ^{△△}	13.5± 4.14 ^{△△}	53.17± 9.67 ^{△△}

Notes: 1> refer to the number of cells of NeuN positive neurons within 0.01 cm²;

For NeuN: VS Sham group, the NeuN positive cells in BCCAO group were decreased. (**P<0.01). VS BCCAO group, the NeuN positive cells of MT1 group were improved([#]P<0.05), the NeuN positive cells of MT2 group were ameliorated(^{△△}P<0.01). For Ki67: there was no statistical difference between the BCCAO group and the Sham group (nsP>0.05). VS BCCAO group, the Ki67 positive cells of MT1 group were improved (^{##}P<0.01), the Ki67 positive cells of MT2 group were ameliorated (^{△△}P<0.01). For DCX, there was no statistical difference between the BCCAO group and the Sham group. (nsP>0.05). VS BCCAO group, the DCX positive cells of MT1 group were improved(^{##}P<0.01), the DCX positive cells of MT2 group were ameliorated (^{△△}P<0.01).



图 5 各组 BDNF、TrkB 蛋白表达情况(N=6)

Fig.5 Results of Protein Expression of BDNF and TrkB(N=6)

Notes: ① Sham group; ② BCCAO group; ③ MT1 group; ④ MT2 group.

种脑血管疾病低灌注,缺氧,缺血等,具体发病机制尚不明确^[18,19]。由于它的发病率及检出率逐年上升,但诊断繁琐复杂且缺

乏特异性治疗方案,从而给家庭,全社会以及医疗系统的巨大负担^[20]。VCID 的相关机制包括内皮功能障碍、脑白质脱髓鞘、炎症、缺氧、微血管细胞外基质和小血管功能障碍等。CCH 被认为是 VCID 及 AD 等神经系统疾病的共同危险因素。慢性脑灌注不足引起的神经病理变化包括神经元损伤、星形胶质细胞增生、小胶质细胞激活、神经变性等。CCH 能够导致认知功能障碍和痴呆,但其基本的神经生理病理机制目前研究不清。其发病机制主要由脑低灌注引起脑组织有效灌注减少而导致缺血缺氧,进而造成神经元损伤和死亡等病理改变^[19]。大鼠颈总动脉的永久和双侧结扎被广泛用作模拟慢性脑灌注不足和神经保护策略发展的适当动物模型。

表 3 四组大鼠蛋白电泳标准化蛋白表达情况

Table 3 Four groups of rat protein electrophoresis normalized protein expression

Groups	N	BDNF	TrkB
Sham	6	0.205± 0.021	0.446± 0.041
BCCAO	6	0.170± 0.008**	0.414± 0.039**
MT1	6	0.247± 0.016 ^{##}	0.595± 0.058 ^{##}
MT2	6	0.302± 0.014 ^{△△}	0.623± 0.072 ^{△△}

Notes: For BDNF protein level, VS Sham group, the BDNF protein level in BCCAO group were decreased (**P<0.01); VS BCCAO group, the BDNF protein level in MT1 and MT2 group were increased (**P<0.01). For TrkB protein level, the TrkB protein level in BCCAO group were decreased (**P<0.01); VS BCCAO group, the TrkB protein level in MT1 and MT2 group were increased (**P<0.01).

在本研究中,通过在成年雄性 SD 大鼠上使用间隔结扎左、右侧颈总动脉的制作 BCCAO 模型。该模型可产生包括脑白质损伤、海马区缺血性损伤,学习和记忆障碍等认知功能损害。在双侧颈总动脉结扎后,大鼠挖掘的石英砂量减少。挖掘实验是一种简单测定啮齿类动物行为学的方法,既往在骨科如椎间盘痛、关节痛和慢性神经疼痛方面作为行为学改变的一项指标。然而近期学者指出挖掘是啮齿类动物先天性奖励行为之一^[14],已被证实对海马病变和其他处理反应灵敏^[21],这说明 CCH 可能导致大鼠海马区损伤,出现大鼠自发性本能活动的减少或者出现情感障碍,为我们下一步研究通过思路。

哺乳动物的神经发生被定义为从神经前体细胞(NPCs)到产生功能性神经元的过程。该过程发生在四个不同的步骤中:

1)通过不对称分裂的细胞增殖;2)细胞命运的特化;3)细胞迁移;4)回路中的细胞分化,成熟和突触整合^[22]。传统观念认为,神经发生仅存在于哺乳动物胚胎和围生期阶段。但是,现已证实:成年哺乳动物的神经发生主要发生在海马齿状回的颗粒下区(SGZ)和侧脑室外侧壁的脑室下区(SVZ)。新生成的神经元细胞通过嗅侧神经干细胞迁移流(RMS)迁移到嗅球(OB),并迁移到齿状回(DG)的颗粒层^[23],构成神经细胞的迁移。但是在某些特殊条件下,如缺血缺氧、有氧运动、睡眠剥夺等,成年 SGZ 区内源性 NPCs 会出现增殖、分化、定向迁移^[22,24]。在中枢神经系统损伤后,不同脑区域中创伤性(即创伤性脑损伤)和缺血性(即中风)的病因都有可能导致的 NPCs 都被激活,增加其增殖速率并迁移到损伤部位。但这些神经元大部分无法长期存

活从而发挥生物化学作用,据推测可能是与缺乏结构性的联系和营养因子的支持有关^[25]。

神经营养因子是一大类在神经元的发育、存活和凋亡中具有关键作用的蛋白质,主要有神经生长因子(NGF),脑源性生长因子(BDNF),神经营养因子 3(NT-3),神经营养因子 4(NT-4)等,它们可能作为治疗神经元损伤等的潜在药物。国内学者研究证实,川芎嗪联合 BDNF 可以明显提高大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的效率和存活率,一方面可能与 BDNF 参与调控神经结构和功能改变有关,另一方面提示 BDNF 可能延长了神经样细胞的存活时间^[26]。然而目前还有新的神经营养因子出现,如中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 / 保守型多巴胺神经营养因子,它们亦具有神经营养、促进细胞存活、分化的作用,可能是通过抗氧自由基、抗凋亡以及抗炎等途径发挥保护神经的作用^[27]。总之,神经营养因子在神经发生中起到了关键作用,但其具体机制,目前尚未解释清楚。

褪黑素是一种高度保守的吲哚类激素,以前的研究集中在改善睡眠、调节下丘脑-垂体-性腺轴等方面。有研究表明,褪黑素具有保护关键分子免受缺血 / 再灌注损伤(中风、心脏病发作)、电离辐射和氧化应激条件下的破坏性影响等^[28,29]。体外实验表明:褪黑素可通过其抗氧化作用及神经保护作用对 β -淀粉样蛋白(amyloid- β ,A β) 诱导的氧化应激、炎症反应以及免疫反应等对神经毒性起到抑制作用^[30]。但褪黑素能否促进 CCH 大鼠 DG 区 NSCs 增殖,目前未见报道。

本研究结果表明,BCCAO 后大鼠海马齿状回区尼氏染色示神经元大量坏死,NeuN/Ki67/DCX 染色发现神经增殖明显减少,其发生机制可能是由于 CCH 引起的缺血缺氧造成的。而给予褪黑素腹腔注射后,褪黑素能够促进 CCH 大鼠海马 NSC 的增殖,能够使慢性低灌注导致的大鼠行为学得到改善,上调 CCH 大鼠海马 BDNF、TrkB 等蛋白的表达。说明褪黑素能逆转 CCH 带来的行为学改变及神经损伤,并且能够促进新生神经元的增殖。

脑源性神经营养因子(BDNF)其单体是以含 252 个氨基酸残基的前体形式合成,经加工形成 119 个残基、分子量为 13kD 的成熟碱性蛋白,等电点(pI)为 9.99^[31]。它在神经元的增殖、营养、分化等方面发挥作用,能通过特异性的结合 TrkB。有研究证实了 BDNF 在神经元前体细胞的蛋白质分化、突触发生和神经元存活等方面具有积极的作用^[32]。本研究证实,褪黑素能激活慢性脑低灌注大鼠海马齿状回区新生神经元的增殖,其机制可能与激活 BDNF-TrkB 信号通路有关,从而促进 BCCAO 大鼠海马 DG 区内源性神经发生。

参 考 文 献(References)

- [1] Gooch J, Wilcock D M. Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID)[J]. Cellular & Molecular Neurobiology, 2016, 36(2): 233-239
- [2] Gorelick P B, Counts S E, Nyenhuis D. Vascular Cognitive Impairment and Dementia [J]. BBA - Molecular Basis of Disease, 2016, 1862(5): 860-868
- [3] Sun M K. Potential Therapeutics for Vascular Cognitive Impairment and Dementia[J]. Current Neuropharmacology, 2017, 15 (7)
- [4] 郭强,赵欢,杨东东,等.中西医结合治疗血管性痴呆的系统评价[J].

- 中国老年学, 2016, 36(2): 339-342
- [5] Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia [J]. Clinical Science, 2017, 131(19): 2451-2468
- [6] 谭洁, 韩国栋, 张泓, 等. 改良大鼠双侧颈总动脉结扎方式建立血管性痴呆模型的评价研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(03): 264-268
- [7] Quintana D D, Ren X, Hu H, et al. Gradual common carotid artery occlusion as a novel model for cerebrovascular Hypoperfusion [J]. Metabolic Brain Disease, 2018, 33: 2039
- [8] Song J, Nan D, He Q, et al. Astrocyte activation and capillary remodeling in a modified bilateral common carotid artery occlusion mice[J]. Microcirculation, 2017, 24: e12366
- [9] Ng K Y, Leong M K, Liang H, et al. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions [J]. Brain Structure & Function, 2017, 222(1): 1-19
- [10] Shen D, Tian X, Sang W, et al. Effect of Melatonin and Resveratrol against Memory Impairment and Hippocampal Damage in a Rat Model of Vascular Dementia[J]. Neuroimmunomodulation, 2016, 23: 318-331
- [11] Xiaoqi P, Lanlan Z, Huiping L, et al. Melatonin Attenuates Oxidative Damage Induced by Acrylamide In Vitro and In Vivo [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 2015: 1-12
- [12] Carloni S, Riparini G, Buonocore G, et al. Rapid modulation of the silent information regulator 1 (SIRT1) by melatonin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain[J]. Journal of Pineal Research, 2017: e12434
- [13] Dong H K, Su J J, Son K H, et al. Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice [J]. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 2006, 85 (3): 658-668
- [14] Deacon R M J. Burrowing: A sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents [J]. Behavioural Brain Research, 2009, 200(1): 128-133
- [15] Bryden L A, Nicholson J R, Doods H, et al. Deficits in spontaneous burrowing behavior in the rat bilateral monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: an objective measure of pain-related behavior and analgesic efficacy [J]. Osteoarthritis & Cartilage, 2015, 23 (9): 1605-1612
- [16] Mori M A, Meyer E, Soares L M, et al. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2016, 75: 94-105
- [17] Zhao F, Zhang J, Li P, et al. Prognostic value of Ki-67 index in adult medulloblastoma after accounting for molecular subgroup: a retrospective clinical and molecular analysis [J]. Journal of Neuro-Oncology, 2018: 1-8
- [18] Prins N D, Scheltens P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: an update [J]. Nature Reviews Neurology, 2015, 11(3): 157-165

(下转第 1265 页)

- [12] Nazmeen A, Maiti S, Mandal K, et al. Predictive Value of Cancer Antigen125 (CA125) as Biomarker in Ovary and Breast Tumors and its Correlation with the Histopathological Type/Grade of the Disease[J]. Med Chem, 2017, 13(8): 796-804
- [13] Dewan R, Dewan A, Hare S, et al. Diagnostic Performance of Serum Human Epididymis Protein 4 in Endometrial Carcinoma: A Pilot Study[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(7): XC01-XC05
- [14] 黄萨, 韩冰, 宫心扣, 等. 依据 FIGO2009 新分期评价子宫内膜癌磁共振分期准确性[J]. 临床放射学杂志, 2012, 31(9): 1290-1293
- [15] Su Q, Sun Z, Lv G. Contrast enhanced ultrasound in diagnosis of endometrial carcinoma and endometrial hyperplasia [J]. Cell Mol Biol, 2018, 64(11): 88-91
- [16] McElroy JA, Kruse RL, Guthrie J, et al. Cadmium exposure and endometrial cancer risk: A large midwestern U.S. population-based case-control study[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0179360
- [17] Kalampokas E, McRobbie S, Payne F, et al. Endometrial cancer after endometrial ablation or resection for menorrhagia [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2018, 142(1): 84-90
- [18] Yin D, Jiang Y, Zhang S, et al. No association between p21 gene rs1059234 polymorphisms and risk of endometrial cancer among Han women in Northeast China [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(1): 167-171
- [19] Chung EH, Brady PC, Smith KK, et al. Combined Oocyte Retrieval and Robot-assisted Hysterectomy in a Super Morbidly Obese Patient with Endometrial Carcinoma [J]. Anticancer Res, 2018, 38 (3): 1467-1470
- [20] Gao S, Shi Z, Li X, et al. Fatostatin suppresses growth and enhances apoptosis by blocking SREBP-regulated metabolic pathways in endometrial carcinoma[J]. Oncol Rep, 2018, 39(4): 1919-1929
- [21] 夏晓伟, 吴梦琦, 杨芳, 等. 彩色多普勒超声测定子宫内膜癌血流动力学参数在子宫内膜癌早期诊断中的价值 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 409-411
- [22] Jiang JX, Zhao JL, Zhang Q, et al. Endometrial carcinoma: diffusion-weighted imaging diagnostic accuracy and correlation with Ki-67 expression[J]. Clin Radiol, 2018, 73(4): 413.e1-413.e6
- [23] Tanase Y, Takahama J, Kawaguchi R, et al. Analysis of Risk Factors for Lymphatic Metastasis in Endometrial Carcinoma and Utility of Three-Dimensional Magnetic Resonance Imaging in Gynecology[J]. World J Oncol, 2018, 9(3): 74-79
- [24] D'Souza K, Nzirorera C, Cowie AM, et al. Autotaxin-LPA signaling contributes to obesity-induced insulin resistance in muscle and impairs mitochondrial metabolism [J]. J Lipid Res, 2018, 59 (10): 1805-1817
- [25] Riquelme-Guzmán C, Contreras O, Brandan E. Expression of CTGF/CCN2 in response to LPA is stimulated by fibrotic extracellular matrix via the integrin/FAK axis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 314(4): C415-C427
- [26] Ha JH, Radhakrishnan R, Jayaraman M, et al. LPA Induces Metabolic Reprogramming in Ovarian Cancer via a Pseudohypoxic Response[J]. Cancer Res, 2018, 78(8): 1923-1934
- [27] Modarres-Gilani M, Vaezi M, Shariat M, et al. The prognostic role of preoperative serum CA125 levels in patients with advanced endometrial carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2017, 20(2): 135-141
- [28] 叶辉霞, 李小毛, 邓柳枝, 等. CA125 在子宫内膜癌诊断预测中的价值[J]. 广东医学, 2014, 35(16): 2562-2563
- [29] Li J, Chen H, Curcuro JR, et al. Serum HE4 Level as a Biomarker to Predict the Recurrence of Gynecologic Cancers[J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(10): 1158-1164
- [30] 崔彭华, 张玉娟, 邵雪斋, 等. 人附睾蛋白 4 过表达对子宫内膜癌细胞增殖、侵袭能力及肿瘤形成的影响 [J]. 解剖学报, 2017, 48(6): 704-709

(上接第 1256 页)

- [19] Skrobot O A, Attems J, Esiri M, et al. Vascular cognitive impairment neuropathology guidelines (VCING): the contribution of cerebrovascular pathology to cognitive impairment [J]. Brain A Journal of Neurology, 2016, 139(11): 2957-2969
- [20] Kapasi A, Schneider J A. Vascular contributions to cognitive impairment, clinical Alzheimer's disease, and dementia in older persons[J]. BBA - Molecular Basis of Disease, 2016, 1862(5): 878-886
- [21] Deacon R M J. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts [J]. Nat. Protocols 1, 2006, 122-12(2006)
- [22] Pino A, Fumagalli G, Bifari F, et al. New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies[J]. Biochemical Pharmacology, 2017, 141
- [23] Gage F H. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287 (5457): 1433
- [24] Baptista P, Andrade J P. Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation and Possible Functional and Clinical Correlates [J]. Frontiers in Neuroanatomy, 2018, 12: 44
- [25] Manni L, Rocco M L, Bianchi P, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications [J]. Growth Factors, 2013, 31(4): 8
- [26] 苏立宁, 宋小青, 朱登祥, 等. 川芎嗪联合脑源性神经营养因子诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化[J]. 中国老年学杂志, 2018, (1)
- [27] 柳胤, 卢祖能. 新型神经营养因子 CDNF/MANF 家族与神经系统疾病[J]. 医学综述, 2018, (11)
- [28] 黄靓, 王汉群, 张弛, 等. 新型褪黑素受体激动剂 Neu-P11 激活 AMPK 减轻心肌细胞缺氧/复氧损伤 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 104-108
- [29] 赵哲维. 褪黑素对大鼠脑缺血再灌注保护作用的研究[D]. 北京协和医学院, 2017: 8-9
- [30] 赵悦. 褪黑素对 A β 25-35 诱导原代脑皮层神经元损伤的保护作用及其机制研究[D]. 山东大学, 2018: 11-13
- [31] 江东, 于建云. 脑源性神经营养因子临床研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(2): 221-225
- [32] Leal G, Afonso P M, Salazar I L, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF[J]. Brain Research, 2015, 1621: 82-101