

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.04.008

丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠记忆能力及海马 5-HT1A 受体和 PKA 信号通路活化的影响 *

孙克德¹ 李娜^{2△} 唐彦² 闫欣² 马京京² 武娇² 张晓红² 杜双霞²

(保定市第二中心医院 1 内分泌科;2 神经内科 河北 保定 072750)

摘要 目的: 研究丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠学习和记忆能力的影响和大鼠海马 5-HT1A 受体和 PKA 信号通路的调控作用。**方法:** 将雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和丁苯酞组(n=15)。丁苯酞组大鼠建立大脑中动脉闭塞模型,并按照每天 60 mg/kg 的剂量灌胃丁苯酞,假手术组和模型组灌胃等体积的玉米油,共给药 2 周。治疗完成后对各组大鼠进行神经功能缺损评估和 Morris 水迷宫测试(n=15)。通过磁共振成像(MRI)检测梗塞区域(n=15)。ELISA 法检测海马组织 PKA 激酶活性(n=6)。使用钙检测试剂盒测定海马组织的细胞内[Ca²⁺]浓度(n=6)。Western blot 检测海马组织中 5-羟色胺(1A)受体(5-HT1A)、谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1(NMDA1)和 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体 1(AMPA1)的表达(n=6)。**结果:** 与模型组相比:丁苯酞组大鼠的逃避潜伏期显著降低,而穿越平台次数显著升高($P<0.05$);大鼠的神经功能缺损评分和脑梗死体积较显著降低($P<0.05$);大鼠的 PKA 激酶活性和细胞内[Ca²⁺]浓度显著升高($P<0.05$);丁苯酞组大鼠的 5-HT1A 蛋白相对表达量显著降低,而 AMPA1 和 NMDA1 的磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。**结论:** 丁苯酞可改善缺血性脑卒中大鼠的学习和记忆能力,下调海马 5-HT1A 受体活性并激活 PKA 信号通路。

关键词: 缺血性脑卒中;丁苯酞;学习和记忆能力;5-HT1A 受体;PKA 信号通路

中图分类号: R-33;R743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)04-639-06

Effects of Butylphthalide on Memory Ability and Activation of 5-HT1A Receptor and PKA Signaling Pathway in Hippocampus of Rats with Ischemic Stroke*

SUN Ke-de¹, LI Na^{2△}, TANG Yan², YAN Xin², MA Jing-jing², WU Jiao², ZHANG Xiao-hong², DU Shuang-xia²

(1 Department of Endocrinology; 2 Department of Neurology Clinic, The Second Central Hospital of Baoding, Baoding, Hebei, 072750, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to reveal the effect of butylphthalide on learning and memory ability of rats with ischemic stroke, and the regulation of butylphthalide on 5-HT1A receptor and PKA signaling pathway in hippocampus of rats. **Methods:** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a sham group, a model group and a butylphthalide group (n=15). A model of middle cerebral artery occlusion was established in rats in the butylphthalide group, and the rats were administrated orally with butylphthalide at a dose of 60 mg / kg per day for 2 weeks. The sham group and the model group were administered orally with equal volume of corn oil for 2 weeks. After the treatment, neurological deficit assessment and Morris water maze test were performed on each group of rats (n=15). The infarcted area was detected by magnetic resonance imaging (MRI) (n=15). ELISA was performed to determine PKA kinase activity in hippocampus (n=6). Intracellular [Ca²⁺] concentration in the hippocampus was measured using a calcium detection kit (n=6). Western blot was used to detect the expression of serotonin (1A) receptor (5-HT1A), N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDA1) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor (AMPA1) in hippocampus (n=6). **Results:** Compared with the model group: the escape latency of rats in the butylphthalide group were significantly reduced, but the number of crossing platforms was greatly increased ($P<0.05$); the neurologic deficit score and cerebral infarction volume of rats were tremendously reduced ($P<0.05$); the PKA kinase activity and intracellular [Ca²⁺] concentration in rats increased dramatically ($P<0.05$); the relative expression of 5-HT1A protein decreased markedly in rats in the phthalide group, while the phosphorylation level of AMPA1 and NMDA1 increased sharply ($P<0.05$). **Conclusion:** Butylphthalide can improve the learning and memory ability of rats with ischemic stroke, and down-regulate the activity of 5-HT1A receptor, and activate the PKA signaling pathway in hippocampus.

Key words: Ischemic stroke; Butylphthalide; Learning and memory ability; 5-HT1A receptor; PKA signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)04-639-06

* 基金项目:河北省保定市科技支撑计划项目(17ZF222)

作者简介:孙克德(1983-),男,主治医师,研究方向:内分泌学,电话:15632229389,E-mail: 116107003@qq.com

△ 通讯作者:李娜,E-mail: L_Na81@163.com,电话:15830200585

(收稿日期:2020-04-28 接受日期:2020-05-23)

前言

缺血性脑卒中占脑血管意外的 60% 以上,而认知障碍是缺血性脑卒中后的常见并发症。学习和记忆功能障碍是缺血性脑卒中后认知障碍的主要症状^[1]。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT) 是一种参与调节神经可塑性的神经递质^[2]。5-羟色胺(1A)受体(5-hydroxytryptamine receptor 1A, 5-HT1A 受体)是 5-HT 的一种重要的负反馈调节受体,主要分布于海马 CA1 区、前脑、中缝核等区域^[3]。海马调控啮齿动物和人类的学习和记忆能力。海马通过 5-HT1A 受体调节恐惧、焦虑和学习^[4]。5-HT1A 受体是引发 5-羟色胺诱导的海马神经发生的主要受体,因此其与认知功能密切相关。先前的研究表明,脑缺血后海马区 5-HT1A 受体 mRNA 和蛋白的上调会影响大鼠的学习、记忆和神经元死亡^[5]。

5-HT1A 受体是 G 蛋白偶联受体,5-HT 通过与 5-HT1A 受体结合抑制环磷腺苷(3',5'-cyclic AMP, cAMP) 信号通路^[6]。5-HT1A 受体的激活导致 N 型钙通道的抑制并降低钙依赖性腺苷酸环化酶的活性,从而减少 cAMP 的形成,并降低蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA) 的活性^[7]。PKA 可磷酸化谷氨酸 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDA) 和 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPA) ^[8,9]。海马中的长时程增强(long-term potentiation, LTP)是学习和记忆的神经基础,而 LTP 的诱导与 NMDA 受体和 AMPA 受体密切相关^[10]。因此,5-HT1A 受体介导的 PKA 信号通路在认知缺陷发生中具有重要作用。

丁苯酞(dl-3-n-butylphthalidide, NBP)是治疗脑梗死的 I 类新药,其在改善缺血性脑卒中患者的运动功能障碍、吞咽障碍、认知障碍和肢体功能方面具有多方面的作用^[11]。然而,目前尚不清楚丁苯酞的脑保护作用是否通过 5-HT1A 受体和 PKA 信号通路介导。因此,本研究旨在阐明丁苯酞对缺血性脑卒中动物模型的学习和记忆能力的影响,及其对 5-HT1A 受体和 PKA 信号通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

丁苯酞购自石家庄石药集团恩必普药业公司。玉米油购自金龙鱼有限公司。PKA 酶活性 ELISA 试剂盒、钙检测试剂盒均购自美国 Abcam 公司。链霉素抗生物素蛋白过氧化酶、DAB 显色液、苏木素、ECL 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。RIPA 缓冲液购自美国 Santa Cruz 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。5-HT1A、AMPA1、NMDA1、p-AMPA1、p-NMDA1 和 β -actin 一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京百奥莱博科技有限公司。

60 只雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠购自河北省动物实验中心[SYXK(冀)2018-008]。大鼠分笼饲养,每笼 5 只。饲养条件为 50-60% 相对湿度、25℃、12 h 光/暗循环。在整个实验过程中允许大鼠自由进食和饮水。

1.2 方法

1.2.1 大脑中动脉闭塞(MCAO)模型的建立 参考文献所述方法建立大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型^[12]。随机选择 40 只大鼠,使用 1.5% 异氟烷麻醉大鼠,通过颈部中线切口暴露左颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎颈外动脉和颈总动脉,然后从颈总动脉中插入一条具有圆形硅胶尖端 4-0 尼龙线堵塞大脑中动脉。闭塞 2 h 后抽出尼龙线进行再灌注。20 只假手术大鼠进行相同的手术操作但不闭塞中动脉。

1.2.2 动物分组 40 只用于建模的大鼠中有 7 只死亡,将建模后的大鼠随机纳入模型组和丁苯酞组,每组纳入 15 只。20 只假手术大鼠中有 2 只死亡,选择 15 只大鼠纳入假手术组。

1.2.3 丁苯酞治疗 将丁苯酞溶解在玉米油中,丁苯酞组大鼠按照每天 60 mg/kg 的剂量灌胃,假手术组和模型组大鼠灌胃等体积的玉米油,共给药 2 周。

1.2.4 神经功能缺损评分 参考文献所述方法^[13]对大鼠进行神经功能缺损评估。评分标准如下:0 分,无神经功能缺损;1 分,无法完全伸展左前爪;2 分,向左转圈;3 分,向左倾倒;4 分,意识丧失;5 分,死亡。

1.2.5 Morris 水迷宫测试 大鼠在手术后第 14 天进行 Morris 水迷宫测试。水迷宫由一个充满水的圆形水池(直径 150 cm,深度 30 cm, 26±2℃)和一个逃逸平台(直径 12 cm)组成,共分成四个象限,该平台淹没在一个象限中心水面以下 2 cm 处。定位航行实验:对所有大鼠进行了连续 4 d(4 次试验/d)的训练,将四个象限的中心作为入水点,并通过测量大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)来评估大鼠的记忆能力和空间学习能力。如果大鼠在 90 s 内未到达平台,则将大鼠引导到平台,并在平台上停留 10 s,然后继续进行训练。空间探索实验:在第 5 天取出平台,在离平台放置点最远的象限放入大鼠,记录 90 s 内大鼠穿过原平台放置点的次数,使用视频跟踪系统记录 90 s 内大鼠穿越平台区域的次数,通过穿越平台次数考察大鼠的记忆能力。

1.2.6 磁共振成像检测 在手术 14 d 后通过 MRI 测量大鼠脑梗塞的体积和位置。3% 异氟烷麻醉大鼠并进行磁共振成像(MRI)。使用 Pharmascan 7.0-T MRI 并使用 T2 加权自旋回波序列获取解剖图像,参数为:回波时间/重复时间=35/4200 ms,视野=32 mm×32 mm,层厚=2 mm,间隔=0.8 mm,层数=24,矩阵=256×256。在 T2W 图像上分析病变体积。通过使用 Image J 软件在同侧半球的信号增强区域上定义感兴趣区域。通过将感兴趣区域的总面积乘以层厚来计算梗塞区域的总体积。

1.2.7 PKA 激酶活性的测定 给药完成后,从各组中分别取 6 只大鼠,用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,打开大鼠胸腔暴露心脏,用 200 mL 冰冷的生理盐水对大鼠心脏进行灌流,然后用 200 mL 4% 多聚甲醛灌流。将大鼠断头处死,解剖大鼠的单侧海马组织,研磨制备匀浆,根据试剂盒说明,通过 PKA 激酶活性 ELISA 试剂盒测定 PKA 激酶活性。然后在酶标仪上测定 450 nm 的光密度值(OD)。

1.2.8 细胞内[Ca²⁺]的测定 根据试剂盒的说明,使用钙检测试剂盒测定大鼠海马组织的细胞内[Ca²⁺]浓度。海马组织收集方法同 1.2.7 一节。将海马组织剪碎并研磨,然后在冰上重悬于 PBS+0.1% NP-40 中。将钙测定缓冲液和组织样品混合并在室温下避光孵育 5~10 min。然后在酶标仪上测定 575 nm OD 值。

1.2.9 免疫组织化学分析(IHC) 给药完成后,用 10%水合氯醛麻醉大鼠,每组 6 只,开胸暴露心脏,用 200 mL 冰冷的生理盐水对大鼠心脏进行灌流,然后用 200 mL 4%多聚甲醛灌流,断头处死大鼠,取出脑组织,用 70%-80%-90%-95%-100%的乙醇溶液分别依次浸泡 1 h。然后用二甲苯 I 和 II 分别浸泡 1 h,然后石蜡包埋,切成 5 μm 厚的切片,通过免疫组织化学分析。切片脱蜡水化,使用 30 mL/L 过氧化氢阻断内源过氧化物酶活性,胎牛血清孵育切片 10 min,然后将切片与 5-HT1A(1:500)一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。后与链霉素抗生素蛋白过氧化酶室温孵育 30 min。DAB 显色 5 min,苏木素复染 2 min,树胶封片后置于显微镜下观察。分别对各组的染色强度和阳性细胞数进行评分。染色强度:0 分,未染色;1 分,浅黄色染色;2 分,棕色染色;3 分,深棕色染色。阳性细胞数(按百分比计算):0 分,<5%;1 分,5~25%;2 分,25~50%;3 分,>50%。5-HT1A 染色评分为染色强度和阳性细胞数得分的乘积。

1.2.10 Western blot 取大鼠海马组织用 RIPA 缓冲液裂解,通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。裂解液在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分离,并转移至 PVDF 膜(0.45 μm)。用 5% 脱脂牛奶封闭膜,并与 5-HT1A (1:500)、AMPA1(1:2000)、

p-AMPA1 (1:2000)、NMDA1 (1:1000)、p-NMDA1 (1:1000) 和 β -actin(1:3000)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。然后室温下与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:1000)二抗孵育 2 h。 β -actin 用作上样对照。使用 ECL 试剂盒进行显影,并使用 Image J 软件分析灰度值。

1.3 统计分析

使用 SPSS 22.0 版软件分析数据。满足正态分布的数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差,使用单因素方差分析及 LSD 事后检验进行组间的差异比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠学习和记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验结果显示,缺血性脑卒中模型组($n=15$)大鼠的逃避潜伏期显著高于假手术组($n=15$)($P<0.05$),而穿越平台次数显著低于假手术组(0.67 ± 0.09 vs 4.52 ± 0.37 次, $P<0.05$)。药物治疗 2 周后,与模型组相比,丁苯酞组($n=15$)的逃避潜伏期显著降低(23.30 ± 1.47 s, $P<0.05$),而穿越平台次数显著升高(2.11 ± 0.16 次, $P<0.05$)。见图 1。

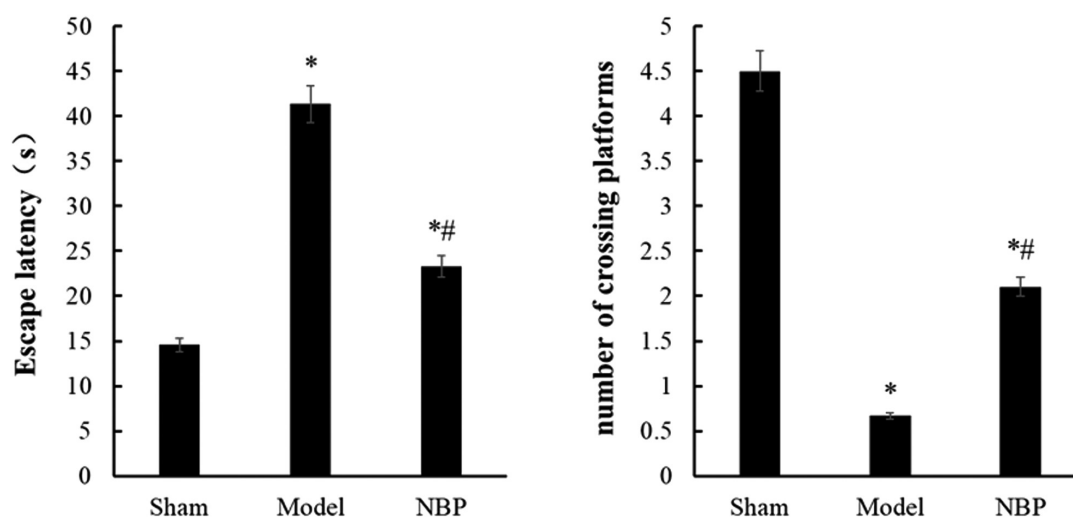


图 1 各组大鼠的逃避潜伏期和穿越平台次数

Fig.1 Escape latency and number of platform crossings in each group of rats

Note: Compared with sham group, * $P<0.05$; Compared with model group, # $P<0.05$.

2.2 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠神经功能和脑损伤的影响

神经功能缺损评分显示,模型组($n=15$)大鼠的神经功能缺损评分显著高于假手术组($n=15$)(2.44 ± 0.21 vs 0.15 ± 0.02 , $P<0.05$)。药物治疗 2 周后,与模型组相比,丁苯酞组($n=15$)大鼠的神经功能缺损评分显著降低(1.03 ± 0.11 , $P<0.05$)。见图 2A。

MRI 检查结果显示,模型组($n=15$)大鼠的脑梗死体积显著高于假手术组($n=15$)($34.63\pm 2.87\%$ vs $0.32\pm 0.08\%$, $P<0.05$)。药物治疗 2 周后,与模型组相比,丁苯酞组($n=15$)大鼠的脑梗死体积显著降低($15.67\pm 1.71\%$, $P<0.05$)。见图 2B 和图 2C。

2.3 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠海马组织 PKA 激酶活性的影响

ELISA 法检测大鼠海马组织 PKA 激酶活性的结果显示,模型组($n=6$)大鼠的 PKA 激酶活性显著低于假手术组($n=6$)(0.18 ± 0.02 vs 0.27 ± 0.03 , $P<0.05$)。药物治疗 2 周后,与模型

组相比,丁苯酞组($n=6$)大鼠的 PKA 激酶活性显著升高(0.31 ± 0.03 , $P<0.05$)。见图 3。

2.4 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠海马组织细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的影响

结果显示,模型组($n=6$)大鼠海马组织细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度显著低于假手术组($n=6$)(0.48 ± 0.05 pg/mL vs 0.91 ± 0.11 pg/mL, $P<0.05$)。药物治疗 2 周后,与模型组相比,丁苯酞组($n=6$)大鼠的细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度显著升高(0.78 ± 0.07 pg/mL, $P<0.05$)。见图 4。

2.5 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠海马组织 5-HT1A 受体、AMPA1 和 NMDA1 蛋白活化的影响

免疫组化染色结果显示,假手术组($n=6$)大鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区中 5-HT1A 受体阳性染色强度较低,而模型组($n=6$)和丁苯酞组($n=6$)的 5-HT1A 受体阳性染色明显增强。

Western blot 显示, 模型组大鼠海马组织中 5-HT1A 的蛋白相对表达量显著高于假手术组, 而 AMPA1 和 NMDA1 的磷酸化水平显著低于假手术组 ($P<0.05$)。药物治疗 2 周后, 与模型组

相比, 丁苯酞组的 5-HT1A 蛋白相对表达量显著降低, 而 AMPA1 和 NMDA1 的磷酸化水平显著升高 ($P<0.05$)。见图 5 和图 6。

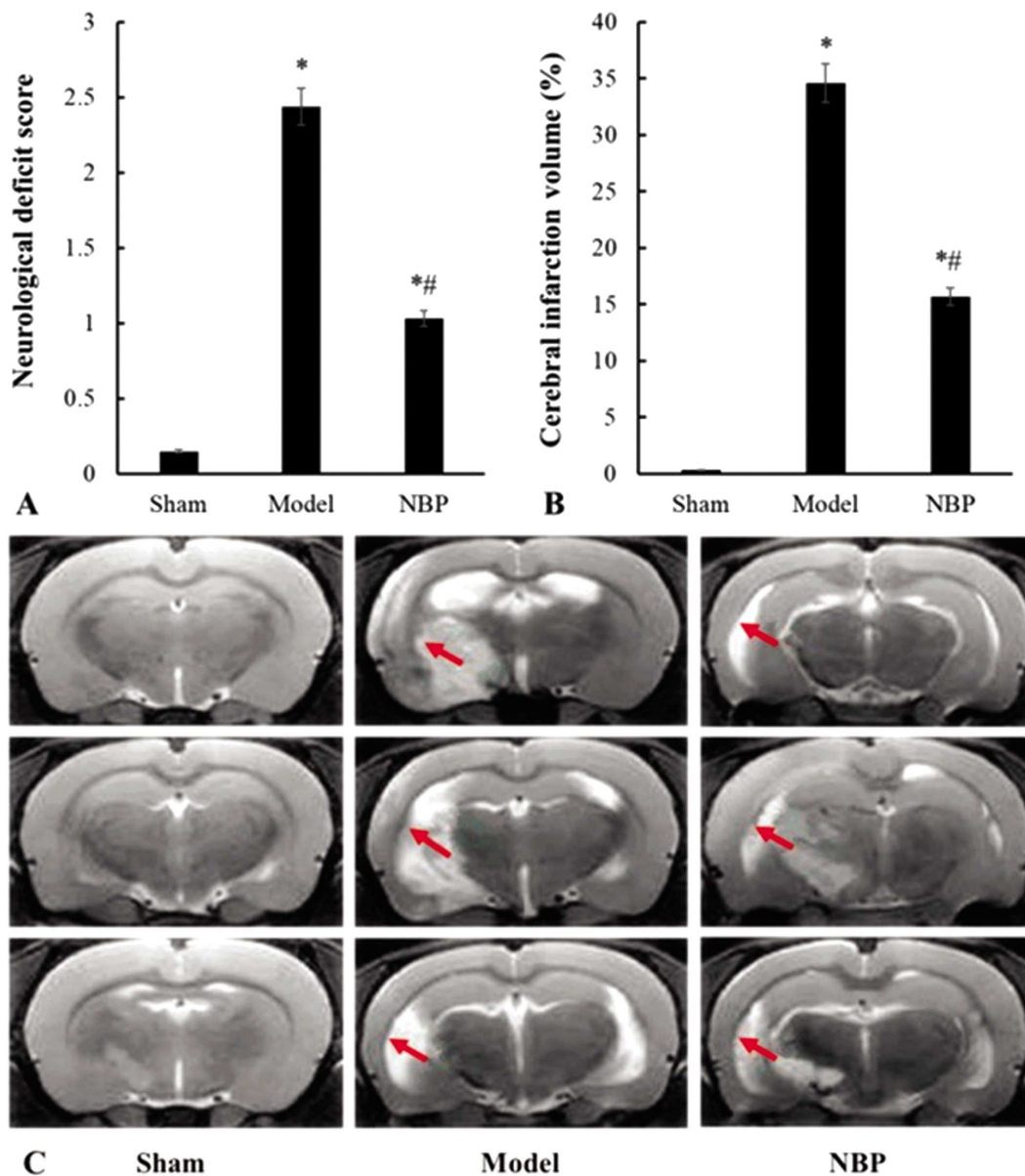


图 2 各组大鼠的神经功能缺损评分和脑梗死体积

Fig.2 Neurological deficit score and cerebral infarction volume in each group of rats

Note: A: Neurological deficit score; B: Cerebral infarction volume; C: T2-weighted images (T2WI) of cerebral infarction by 7.0-T MRI, red arrow represents cerebral infarction area; Compared with sham group, $*P<0.05$; Compared with model group, $^{**}P<0.05$.

3 讨论

丁苯酞具有较高的医疗价值, 例如, 丁苯酞可通过提高抗氧化能力而减轻帕金森病动物模型的氧化损伤; 在糖尿病大鼠中丁苯酞可发挥抗细胞凋亡作用; 此外, 丁苯酞可以有效抑制脑缺血大鼠的炎症反应^[14]。目前, 丁苯酞已经被广泛用于缺血性脑卒中的治疗中, 其脑保护机制与改善线粒体功能、抑制神经元凋亡和炎症反应、降低氧化损伤有关^[15]。本研究通过 Morris 水迷宫证实了在缺血性脑卒中模型大鼠中, 丁苯酞可有效提高大鼠的学习和记忆能力。通过神经功能缺损评分和 MRI 检查发现, 丁苯酞明显改善了缺血性脑卒中大鼠的神经功能,

并减少了脑梗死体积。

缺血性脑卒中引起的认知功能障碍与海马突触可塑性的变化密切相关^[16]。海马通过调节各种神经递质受体和激酶(包括 5-HT1A 受体和 PKA 激酶)在学习和记忆发挥作用^[17]。认知功能与海马 5-HT1A 受体激活有关^[3]。大量研究表明, 在进行行为训练之前施用 5-HT1A 受体激动剂会损伤动物的学习和记忆能力。为了确定丁苯酞治疗作用的可能机制, 本研究考察了缺血性脑卒中后梗死海马区 5-HT1A 受体的表达。研究显示, 缺血性脑卒中大鼠海马组织中 5-HT1A 受体显著上调, 而丁苯酞可抑制 5-HT1A 受体的上调。说明丁苯酞改善学习和记忆能力的机制与其对海马 5-HT1A 受体的抑制有关。

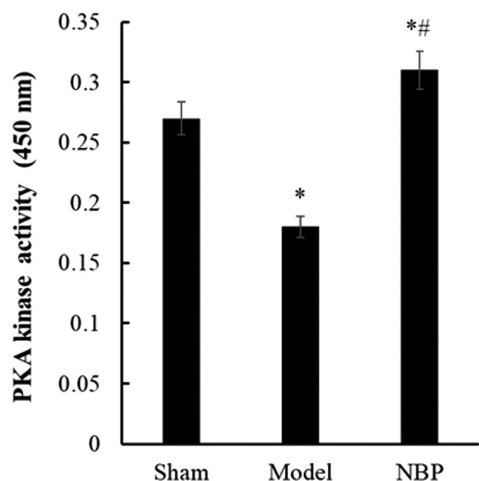


图3 各组大鼠海马组织 PKA 激酶活性

Fig.3 PKA kinase activity in hippocampus of each group of rats

Note: Compared with sham group, * $P<0.05$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$.

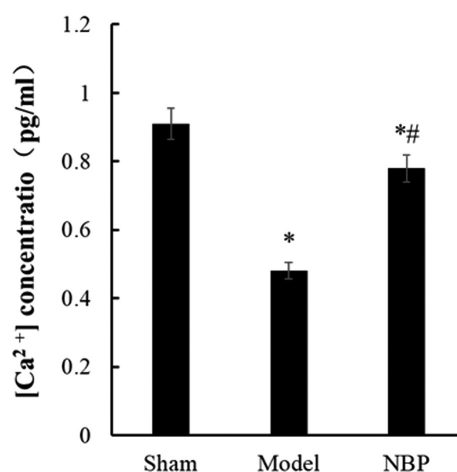
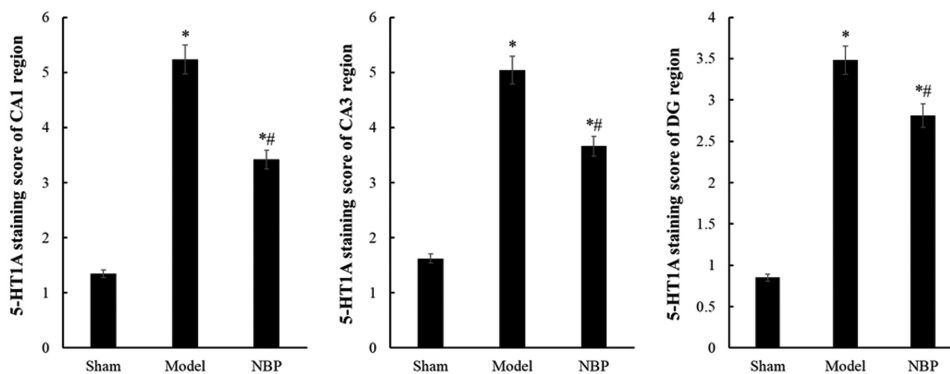


图4 各组大鼠海马组织细胞内[Ca²⁺]浓度

Fig.4 Intracellular [Ca²⁺] concentration in the hippocampus of each group of rats

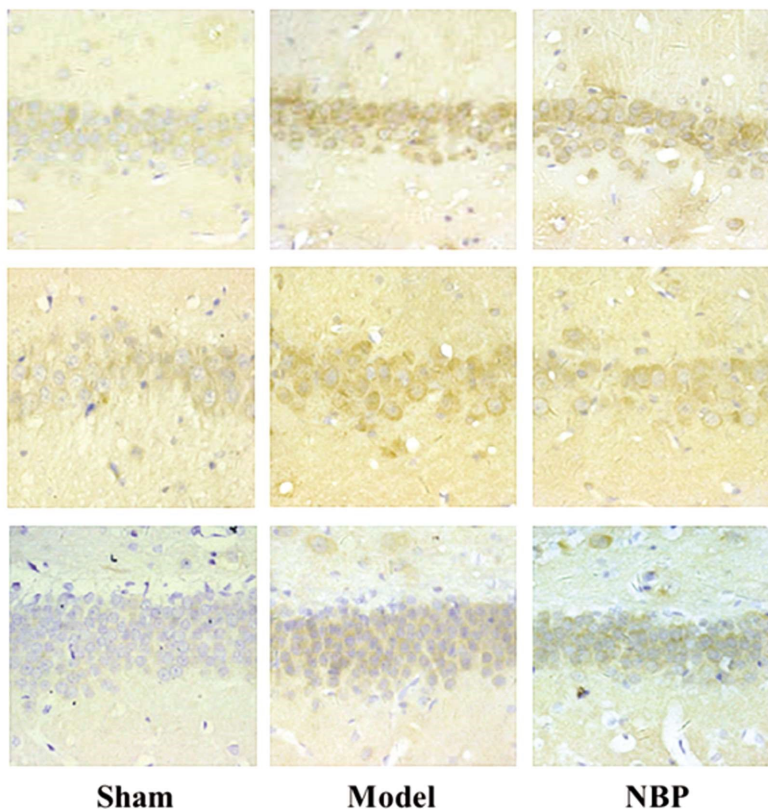
Note: Compared with sham group, * $P<0.05$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$.



CA1 region

CA3 region

DG region



Sham

Model

NBP

图5 免疫组化分析 5-HT1A 受体的表达(× 400)

Fig.5 Immunohistochemical analysis of 5-HT1A receptor expression (× 400)

Note: Compared with sham group, * $P<0.05$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$.

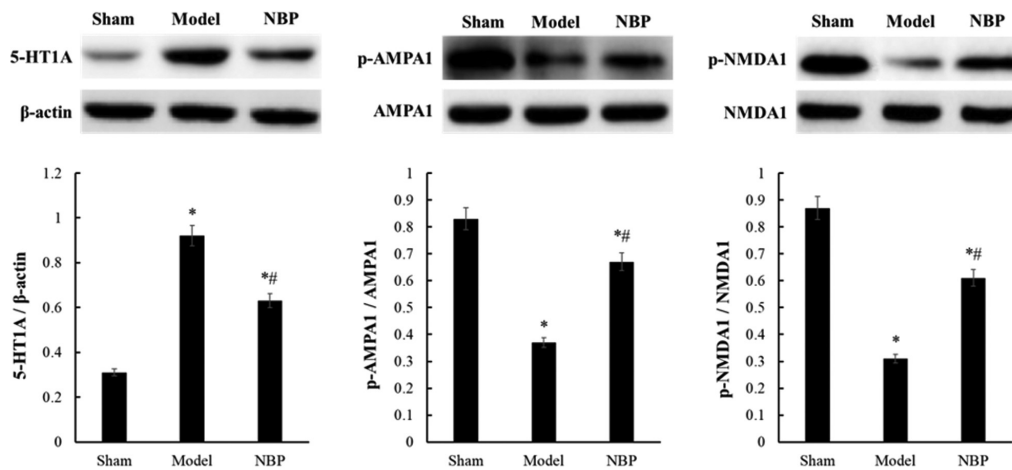


图6 各组大鼠海马组织 5-HT1A 受体蛋白表达及 AMPA1 和 NMDA1 的磷酸化水平

Fig.6 5-HT1A receptor protein expression and phosphorylation levels of AMPA1 and NMDA1 in hippocampus of each group of rats

Note: Compared with sham group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$.

众所周知, cAMP/PKA/CREB 级联反应受 5-HT 调节^[18]。5-HT1A 受体与 Gi/Go 蛋白偶联可以抑制腺苷酸环化酶(AC)和 cAMP 的形成, 而 5-HT1A 激动剂 8-OH-DPAT 可降低海马中的蛋白激酶 A(PKA)活性^[19]。据报道, PKA 可以诱发长时程增强(LTP)并影响学习和记忆, PKA 拮抗剂可以降低 LTP 诱导的发生率, 表明 PKA 是 LTP 的关键调节分子^[20]。本研究检测了缺血性脑卒中大鼠海马组织中 PKA 激酶的活性, 发现模型组大鼠的 PKA 激酶活性显著降低, 而丁苯酞处理可显著上调 PKA 激酶的活性。表明丁苯酞通过抑制 5-HT1A 受体的表达而激活了 PKA 信号级联反应, 进而通过诱发 LTP 来增强大鼠的学习和记忆能力。

PKA 激酶可以调节 AMPA 和 NMDA 受体的磷酸化。AMPA 和 NMDA 受体的磷酸化与 LTP 诱导密切相关, 此外, NMDA 受体可增加细胞内 Ca^{2+} 浓度并有助于突触可塑性^[21]。本研究发现缺血性脑卒中大鼠海马区 AMPA1 和 NMDA1 的磷酸化水平明显降低, 并且细胞内 Ca^{2+} 浓度也显著降低。然而, 丁苯酞可以提高 AMPA1 和 NMDA1 的磷酸化水平, 从而促进海马区钙离子的流入。

总之, 本研究表明丁苯酞明显改善缺血性脑卒中大鼠的学习和记忆能力, 并且丁苯酞下调了海马 5-HT1A 受体活性并激活了 PKA 信号通路。丁苯酞对 PKA 信号级联反应的激活导致了 AMPA1 和 NMDA1 的活化及钙离子内流, 而上述改变可能促进了长时程增强(LTP)的诱发, 进而增强了大鼠的学习和记忆能力。

参考文献(References)

- [1] 韩肖华, 陈璐婷. 针刺改善脑缺血后学习记忆功能机制的研究进展 [J]. 中国康复, 2018, 33(4): 338-340
- [2] 林敏, 沈仲夏, 钱敏才, 等. 5-羟色胺转运体基因多态性与抗抑郁剂治疗广泛性焦虑障碍疗效的关联 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(8): 903-909
- [3] 林玲, 刘国良, 孙纛利. 海马 CA1 区 5-HT1A 受体调控 PTSD 大鼠空间记忆的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1): 98-103
- [4] 王文静, 廖华, 刘行, 等. 慢性噪声暴露对大鼠行为学及海马区 5-HT1A 受体表达的影响 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2016, 24(6): 588-592

- [5] Guo K, Yin G, Zi X H, et al. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on expression of 5-HT1AR and neurotransmitters in rats with vascular dementia [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(4): 1-9
- [6] Łukasiewicz S, Błasiak E, Szafran-Pilch K, et al. Dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptor interaction in the context of the effects of antipsychotics - in vitro studies [J]. Journal of Neurochemistry, 2016, 137(4): 549-60
- [7] Zhou X, Zhang R, Zhang S, et al. Activation of 5-HT1A receptors promotes retinal ganglion cell function by inhibiting the cAMP-PKA pathway to modulate presynaptic GABA release in chronic glaucoma [J]. Journal of Neuroscience, 2019, 39(8): 1484-1504
- [8] Pan B, Deng C. Modulation by chronic antipsychotic administration of PKA-and GSK3β-mediated pathways and the NMDA receptor in rat ventral midbrain [J]. Psychopharmacology, 2019, 236(9): 2687-2697
- [9] Zhao L X, Ge Y H, Li J B, et al. M1 muscarinic receptors regulate the phosphorylation of AMPA receptor subunit GluA1 via a signaling pathway linking cAMP-PKA and PI3K-Akt [J]. The FASEB Journal, 2019, 33(5): 6622-6631
- [10] Petrovic M M, da Silva S V, Clement J P, et al. Metabotropic action of postsynaptic kainate receptors triggers hippocampal long-term potentiation [J]. Nature neuroscience, 2017, 20(4): 529
- [11] 肖桂荣, 王赵伟, 朱仁洋, 等. 丁苯酞注射液联合依达拉奉治疗急性脑梗死的疗效观察 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2016, 23(1): 51-54
- [12] 张勇, 程敬亮, 李娅. shRNA 下调基质金属蛋白酶 9 对脑梗死大鼠脑保护作用的扩散张量成像分析 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(15): 1176-1182
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [14] 张晓璇, 朱江, 李佳佳, 等. 丁苯酞对急性缺血性脑卒中大鼠的脑保护作用及其机制 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2019, 45(04): 843-848
- [15] Zhang T, Wang H, Li Q, et al. Modulating autophagy affects neuroamyloidogenesis in an in vitro ischemic stroke model [J]. Neuroscience, 2014, 263: 130-137

(下转第 624 页)

- through immunomodulation[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 4912-4921
- [18] Du L, Lv R, Yang X, et al. Hypoxia enhances the protective effects of placenta-derived mesenchymal stem cells against scar formation through hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Biotechnology letters*, 2016, 38(6): 931-939
- [19] Du LL, Lv RX, Yang XY, et al. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation [J]. *Life Sci.*, 2016, 149: 51-57
- [20] Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing[J]. *Organogenesis*, 2014, 10(1): 29-37
- [21] Kato J, Kamiya H, Himeno T, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats[J]. *Journal of diabetes and its complications*, 2014, 28(5): 588-595
- [22] Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, et al. The effect of TGF- β on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis[J]. *Plastic and reconstructive surgery*, 1996, 98(5): 827-833
- [23] Hsu M, Peled ZM, Chin GS, et al. Ontogeny of expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), TGF- β 3, and TGF- β receptors I and II in fetal rat fibroblasts and skin [J]. *Plastic and reconstructive surgery*, 2001, 107(7): 1787-94
- [24] 毋巨龙, 李荟元, 李世荣. TGF- β 1 对增生性瘢痕成纤维细胞中 c-myc 和 c-fos 表达及胶原分泌的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2002, 24(5): 594-596
- [25] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. *Nature reviews Nephrology*, 2016, 12(6): 325-338
- [26] 但洋. shRNA-Smad3 对瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响[D]. 重庆医科大学, 2009
- [27] Fang XB, Hu XL, Zheng Z, et al. Smad interacting protein 1 influences transforming growth factor- β /Smad signaling in extracellular matrix protein production and hypertrophic scar formation [J]. *J Mol Histol*, 2019, 50: 503-514
- [28] Ji XJ, Tang Z, Shuai WW, et al. Endogenous peptide LYENRL prevents the activation of hypertrophic scar-derived fibroblasts by inhibiting the TGF- β 1/Smad pathway[J]. *Life Sci.*, 2019, 231: 116674
- [29] Wu Y, Huang S, Enhe J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice[J]. *International wound journal*, 2014, 11(6): 701-710
- [30] 陈璐, 王达利, 魏在荣, 等. 自体脂肪源性间充质干细胞局部移植对兔耳增生性瘢痕形成的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(10): 582-587
- [31] Lebonvallet N, Laverdet B, Misery L, et al. New insights into the roles of myofibroblasts and innervation during skin healing and innovative therapies to improve scar innervation [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(9): 950-958
- [32] Liu JQ, Wang YC, Pan Q, et al. Wnt/ β -catenin Pathway Forms a Negative Feedback Loop During TGF- β 1 Induced Human Normal Skin Fibroblast-To-Myofibroblast Transition [J]. *Dermatol Sci*, 2012, 65(1): 38-49
- [33] Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. Sialylation regulates myofibroblast differentiation of human skin fibroblasts [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 81
- [34] Hu J, Chen YW, Huang YB, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress dermal fibroblasts-myofibroblasts transition via inhibiting the TGF- β 1/Smad 2/3 signaling pathway[J]. *Exp. Mol. Pathol.*, 2020, 115: 104468

(上接第 644 页)

- [16] Fernandez S P, Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, et al. Constitutive and acquired serotonin deficiency alters memory and hippocampal synaptic plasticity [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42 (2): 512-523
- [17] Kutlu M G, Gould T J. Nicotinic modulation of hippocampal cell signaling and associated effects on learning and memory [J]. *Physiology & behavior*, 2016, 155: 162-171
- [18] Jiang Y, Yang S, Tao J, et al. Opposing needling promotes behavior recovery and exerts neuroprotection via the cAMP/PKA/CREB signal transduction pathway in transient MCAO rats[J]. *Molecular medicine reports*, 2016, 13(3): 2060-2070
- [19] Moyano S, Del Rfo J, Frechilla D. Role of hippocampal CaMKII in serotonin 5-HT 1A receptor-mediated learning deficit in rats[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(12): 2216-2224
- [20] Yang Y, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, et al. Developmental switch in requirement for PKA RII β in NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses [J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(1): 56-65
- [21] Sanderson J L, Gorski J A, Dell'Acqua M L. NMDA receptor-dependent LTD requires transient synaptic incorporation of Ca²⁺-permeable AMPARs mediated by AKAP150-anchored PKA and calcineurin[J]. *Neuron*, 2016, 89(5): 1000-1015