论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0946-04

西酞普兰对血管性痴呆大鼠海马DG神经发生和认知障碍影响的初步研究

黄河清[1],唐 军[2],周振华[1],李志方[1],刘国军[3],陈康宁[1],徐海伟[2],李露斯[1] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,[2]基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[3]中国人民解放军第65426部队,哈尔滨 150080)

摘 要:目的 探讨西酞普兰对血管性痴呆大鼠海马齿回神经干细胞动员的作用及对动物空间认知行为的影响。**方法** 实验动物采用随机数字表法分为正常对照组(NC组)、假手术对照组(SC组)、血管性痴呆组(4VO组)和西酞普兰干预的血管性痴呆组(4VO+C组)共4组;采用改良的Pulsinelli's四血管阻断(4-vessle occlusion, 4VO)方法制作血管性痴呆动物模型;BrdU免疫荧光和激光共聚焦方法观察海马齿回(dental gyrus, DG)神经干细胞增殖状况;Morris水迷宫检测大鼠空间学习和记忆功能。**结果** ①海马DG的BrdU阳性细胞多成对或成团排列于颗粒细胞层与海马门区。4VO组及4VO+C组造模后1 d,BrdU阳性细胞数显著下降,此后逐渐增加,到术后14 d达峰值(4VO+C组约为4VO组的2倍),4VO+C组DG神经干细胞活跃增生的情况一直延续到术后21 d,与4VO组比较差异显著($P<0.01$)。②Morris水迷宫定位航行实验和空间探索实验均表明,造模后大鼠空间学习记忆功能显著受损,但随时间推移逐渐改善;4OV+C组术后7 d和14 d组大鼠的学习记忆损伤程度较4VO组显著减轻($P<0.05$)。③大鼠海马DG神经干细胞增殖趋势与其空间学习记忆能力改变无明显相关性。**结论** 全脑缺血再灌注可刺激大鼠海马DG神经干细胞增殖,且SSRI类抗抑郁药物西酞普兰可显著增强DG神经发生并减轻动物的空间学习记忆损伤,但神经干细胞增殖趋势与学习记忆改变无明显相关性,推测可能与增殖神经干细胞的分化、功能整合及神经递质作用等有关。

关键词: 血管性痴呆;海马齿回;神经干细胞;学习记忆

中图法分类号: R329.28;R749.13;R971.43 **文献标识码:** A

Effects of Citalopram on hippocampal neurogenesis and cognitive functions in rats of transient cerebral ischemia

HUANG He-qing[1], TANG Jun[2], ZHOU Zhen-hua[1], LI Zhi-fang[1], LIU Guo-jun[3], CHEN Kang-ning[1], XU Hai-wei[2], LI Lu-si[1] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3]Unit 65426 of People's Liberation Army, Harbin 150080, China)

Abstract: Objective To investigate the neurogenetic function of Citalopram in rat hippocampus after transient cerebral ischemia and its effects on the animals' cognitive function. **Methods** Totally 78 Wistar rats were randomly divided into four groups: normal control group (NC), sham operation control group (SC), transient cerebral ischemia group (4VO), transient cerebral ischemia group treated with Citalopram (4VO+C). The improved Pulsinelli's 4-vessel occlusion was used to establish ischemia in rats. Neurogenesis in hippocampus was observed by BrdU (Bromodeoxyuridine) immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy. The cognitive function of the rats was evaluated by Morris water maze test. **Results** Most of the BrdU-positive cells were detected in dentate gyrus, and generally in pairs or clusters, distributed at the border of the granule cell layer and hilus. One day after transient cerebral ischemia, the BrdU-positive cells obviously decreased in number in both 4VO and 4VO+C groups ($P=0.002$), then gradually increased and reached the peak 14 days after operation; The number of BrdU-positive cells in 4VO+C group was twice as much as that in 4VO group. Besides, neurogenesis was vividly continued 21 days after operation in 4VO+C group ($P<0.01$ compared with

作者简介:黄河清,女,福建省晋江市人,博士研究生,主治医师,主要从事急慢性脑缺血损害的机制及防治方面的研究。电话:13228685263,E-mail: heqingbaby@263.net

通信作者:陈康宁,电话:(023)68754154, E-mail: ckn_640827@163.com.cn

李露斯,电话:(023)68765255, E-mail: lilusi@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2008-01-07;修回日期:2008-03-20

4VO group). Both place navigation test and spatial probe test showed that the cognitive function was significantly injured by transient cerebral ischemia in 4VO group as well as in 4VO + C group rats. But as time went on, the cognitive function was improved. Furthermore the results of Morris water maze test were significantly better in 4VO + C group on 14th day and 21st day after operation than those corresponding results in 4VO group ($P < 0.05$). The tendency of neurogenesis in adult dentate gyrus had no significant correlation with the cognitive function of rats. **Conclusion** Transient cerebral ischemia established by Pulsinelli's 4-vessel occlusion in rats could stimulate neurogenesis in adult dentate gyrus and could be improved by Citalopram. Citalopram relieves the cognitive injury induced by transient cerebral ischemia. The differentiation and integration of proliferated neural stem cells or function of neurotransmitter may contribute to no correlation between hippocampal neurogenesis and cognitive function.

Key words: vascular dementia; hippocampus; neurogenesis; cognitive function

血管性痴呆(vascular dementia, VD)认知障碍的治疗长期困扰神经科学界,由于海马在动物空间学习记忆过程中的重要作用,故研究脑缺血后海马神经元保护和促进海马神经发生成为解决这一难题的关键。大量研究表明海马齿回(dental gyrus, DG)终生保持了生成新神经元的能力,即神经发生(neurogenesis);海马 DG 的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)产生新生神经元的前体细胞,迁移到颗粒细胞层,分化为颗粒细胞,形成突触联系并整合到海马功能的神经环路中,这些颗粒细胞比成熟的神经细胞更具可塑性[1]。尽管目前研究证实脑缺血可以激活自体神经干细胞(neuronal stem cells, NSCs)的增殖、迁移和分化,但这并不能代偿因缺血造成的海马神经元丢失和空间学习记忆障碍,于是寻找促进脑缺血海马神经发生的的方法成为当今热点之一。研究表明,海马神经发生微环境中神经递质5-HT 起重要作用[2],而中枢 5-HT 再摄取抑制剂(SSRIs)可增加中枢突触间隙 5-HT 的含量,故本研究采用 SSRI 类药物中对 5-HT 转运体选择性最强的的西酞普兰(Citalopram, CIT),探讨其对血管性痴呆大鼠海马 DG 自体干细胞动员的作用及其对大鼠认知行为的影响,旨在为临床治疗脑缺血所致认知功能障碍提供新的思路及实验依据。

1　材料与方法

1.1　动物及分组

清洁级雄性 Wistar 大鼠 72 只,由第三军医大学实验动物中心提供,6 ~ 8 月龄,体质量 250 ~ 300 g。实验动物按随机数字表法分为 4 组:正常对照组(NC 组,$n = 6$)、假手术对照组(SC 组,$n = 6$)、血管性痴呆组(4VO 组,$n = 30$)和 CIT 干预的血管性痴呆组(4VO + C 组,$n = 30$),后 2 组每组设术后 1、3、7、14、21 d 5 个时相点,每个时相点组动物 6 只。

1.2　模型制作

采用改良的 Pulsinelli's 四血管阻断(4-vessle occlusion, 4VO)动物模型[3]。大鼠麻醉后俯卧固定于立体定向仪,行背侧颈正中切口,逐层钝性分离暴露双侧第 1 颈椎翼小孔,直视下烧灼双侧椎动脉。第 2 天夹闭双侧颈总动脉 5 min,间隔 1 h 后再夹闭 5 min,共夹闭 3 次。SC 组大鼠不热凝椎动脉和不夹闭颈总动脉,其他手术进程同 4VO 组。以 SC 组大鼠逃逸潜伏期(escap latency, EL)的平均值作为参考值,计算结扎大鼠 EL 的平均值与参考值之差与该鼠 EL 的比值 > 20% 则为痴呆鼠。

1.3　给药方法

1.3.1　4VO + C 组给药方法　　用 0.9% 生理盐水溶解制 20 mg/ml CIT,按照 20 mg/kg 的剂量腹腔注射,1 次/d,注射21 d 后造模。造模后持续给药至相应时相点。

1.3.2　BrdU 给药方法和标本制备　　大鼠处死前 2 d 开始腹腔注射 BrdU(每次 50 mg/kg,Sigma 公司),2 次/d,共 4 次,最后 1 次注射后 12 h 处死大鼠。4% 多聚甲醛灌注固定后断头取脑。固定、脱水后冰冻切片机冠状位连续切片,片厚 35 μm。

1.4　Morris 水迷宫行为实验

1.4.1　装置　　中国医学科学院药物研究所研制的 Morris 水迷宫由直径 130 cm、高 55 cm 的铁皮圆形蓄水池及有机玻璃站台构成,水温保持在(24.0 ± 1.0)℃。水池平均分为 4 个象限,站台位于某一个象限中央并可任意方向转动。圆池位于光线良好的实验室内,包括相对固定的迷宫外视觉线索。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机,同步记录大鼠运动轨迹。

1.4.2　定位航行试验(place navigation test)　　用于测试大鼠对水迷宫学习与记忆的获取能力。在进行水迷宫实验前 1 d,每只大鼠在无逃避平台的水迷宫池里自由游泳 60 s,排除有游泳能力缺陷大鼠。实验历时 5 d,每天训练 4 次,每次间隔 15 min。训练时实验者随机选择 1 个象限为入水点将大鼠放入水中,当大鼠爬到隐蔽平台上或到达 60 s 时即停止实验。大鼠爬上隐蔽平台后让其停留 10 s;如果 60 s 内大鼠没有找到平台,则引导其爬到隐蔽平台上,并让其停留 10 s。通过影像跟踪系统记录实验过程中大鼠的运动行为,记录 EL。

1.4.3　空间搜索实验(spatial probe test)　　用于测量大鼠学会寻找平台后对平台空间位置记忆的保持能力,即在最后 1 次训练后第 2 天撤除水下平台,然后任选 1 个入水点将大鼠面向池壁放入水中,测定其 120 s 内在平台象限的游泳距离占总距

离的百分比(distance percentage, DP)。

1.5 BrdU 免疫荧光方法

新鲜冰冻切片(片厚 35 μm)0.01 mol/L PBS 漂洗(以下漂洗用 PBS 均为 0.01 mol/L), 3% 双氧水孵育 15 min,PBS 漂洗。切片在 0.3% TritonX-100 孵育 30 min,然后在 2 mol/L HCl 中 37 ℃孵育 0.5 ~ 1 h,PBS 漂洗。正常山羊血清封闭液 30 min。然后在含 BrdU 的抗体稀释液(1∶500,Sigma 公司)中孵育 4 h(37 ℃)或 48 h(4 ℃),PBS 漂洗。生物素标记的羊抗小鼠 IgG(1∶500,Sigma 公司),37 ℃孵育 2 h,PBS 漂洗。加入 SABC-Cy3(1∶100,博士德公司),室温振摇 20 ~ 40 min,PBS 漂洗。激光共聚焦显微镜观察拍照,每组 5 ~ 7 张切片,均在同一放大倍数(×200)、同一光强度下分析。应用 IPP 6.0 图像分析软件,数出每个视野的阳性细胞后计算每只鼠所要分析部位的平均阳性细胞数。每只大鼠均另取 1 套切片按上述方法不加一抗作为空白对照。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件作单因素方差分析及组间比较 t 检验,并对海马 DG 区 BrdU 阳性表达细胞数与大鼠 Morris 水迷宫学习记忆能力数据进行相关性分析。

2 结果

2.1 海马齿回 BrdU 阳性细胞表达

海马 DG 的 BrdU 阳性细胞多成对或成团排列于颗粒细胞层与海马门区,GFAP 染色阴性,并非星形胶质细胞。SC 组与 NC 组手术后 BrdU 阳性细胞数无显著差异。4VO 组及 4VO + C 组造模后 1 d BrdU 阳性细胞数显著下降,此后逐渐增加,到术后 14 d 达峰值(4VO + C 组约为 4VO 组的 2 倍,见图 1),且 4VO + C 组海马神经干细胞活跃增生的情况一直延续到术后 21 d[与 4VO 组比较,差异显著($P < 0.01$)]。各实验组大鼠海马齿回 BrdU 阳性细胞数的比较见表 1。

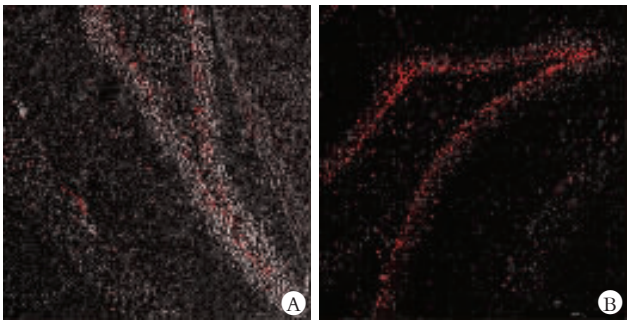


图 1 激光共聚焦显微镜观察 4VO 组(A)和 4VO + C 组(B)术后 14 d 海马 DG BrdU 阳性表达 (×200)

2.2 水迷宫检测结果

因大鼠每次训练需 5 d,故术后 1 d 和 3 d 组不适合此项检测,其余各组定位航行实验检测结果见表 2,空间探索实验检测结果见表 3。

表 1 各组大鼠海马齿回 BrdU 阳性细胞数(个,$n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
4VO 组	10.05 ± 1.50[a]	23.30 ± 2.43[a]	35.93 ± 2.03[a]	51.65 ± 5.12[a]	20.23 ± 1.30[a]
4VO + C 组	12.34 ± 1.97[a]	49.28 ± 3.68[ab]	77.58 ± 3.72[ab]	103.82 ± 10.41[ab]	47.89 ± 2.38[ab]

NC 组:(20.8 ± 2.66)个; SC 组:(18.75 ± 1.84)个; a:$P < 0.01$,与 SC 组比较; b:$P < 0.01$,与 4VO 组相应时相点比较

表 2 各组大鼠定位航行实验平均逃逸潜伏期比较(s, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	7 d	14 d	21 d
4VO 组	117.51 ± 24.16[a]	60.67 ± 20.73[a]	45.02 ± 11.68[a]
4VO + C 组	97.79 ± 15.11[a]	41.68 ± 12.83[ab]	31.62 ± 8.93[ab]

NC 组:(7.04 ± 3.52)s; SC 组:(7.25 ± 3.84)s; a: $P < 0.01$,与 SC 组比较; b: $P < 0.05$,与 4VO 组比较

表 3 各组大鼠空间探索实验平台象限游泳距离百分比比较(%, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	7 d	14 d	21 d
4VO 组	25.80 ± 3.06[b]	33.13 ± 4.61[b]	45.31 ± 4.70[b]
4VO + C 组	29.87 ± 2.82[bc]	39.97 ± 3.57[bc]	51.51 ± 4.01[ac]

NC 组:(63.04 ± 7.96)%;SC 组:(63.21 ± 9.19)%; a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与 SC 组比较; c: $P < 0.05$,与 4VO 组比较

2.2.1 定位航行实验结果 4VO 组大鼠 EL 显著延长,其后随时间推移逐渐缩短;4VO + C 组造模后呈相同趋势,但 EL 延长程度显著减轻($P < 0.05$)。造模后 7 d 4VO + C 组和 4VO 组间 EL 无显著差异($P > 0.05$)。4VO + C 组术后 14 d 和 21 d 的 EL 延长较 4VO 组显著减少($P < 0.05$)。

2.2.2 空间探索实验结果 4VO 组大鼠 DP 显著降低、记忆功能受损,但随时间推移逐渐上升;4VO + C 组造模后呈相同趋势,但 DP 降低程度显著减轻($P < 0.05$)。NC 和 SC 组大鼠 DP 比较无显著差异($P > 0.05$),4VO + C 组造模后各时相点 DP 均较 4VO 组相应时相点高($P < 0.05$)。

2.3 造模后 7、14、21 d 海马 DG 神经干细胞表达与大鼠学习记忆检测结果的相关性

海马 DG 的 BrdU 阳性细胞数与大鼠 EL 之间的相关系数为 4VO 组 $r = 0.204\ 8$,4VO + C 组 $r = 0.140\ 7$;海马 DG BrdU 阳性细胞数与大鼠 DP 之间的相关系数为 4VO 组 $r = -0.645\ 6$, 4VO + C 组 $r = -0.562\ 7$。

3 讨论

随着分裂细胞标记技术的发展,如 BrdU 标记、逆转录病毒标记和激光共聚焦显微镜技术,研究人员已经确证啮齿动物大脑个别区域在整个成年期都有神经发生现象[4],且在丰富环境、学习记忆训练、癫痫、脑卒中和阿尔茨海默病等不同病理生理条件下发现海马 DG 神经发生增强[5]。本实验结果显示 4VO 组大鼠全脑缺血,可诱发海马 DG 神经干细胞增殖,BrdU 阳性细胞从缺血后 3 d 开始增加,14 d 达高峰且几乎为对

照组的 2 倍,但不同研究报道在 BrdU 阳性细胞表达时间和数量上有差别[6],这可能与实验所采用的动物和模型制作方法等不同有关。目前,如何进一步促进脑缺血时海马增强的神经发生,从而更好地代偿因缺血而造成的神经元丢失和海马的学习记忆功障碍已成为人们关注的问题。

在促进海马自体神经干细胞增殖分化中,最近比较引人注目的是 SSRI 类抗抑郁药,他们的主要作用是提高中枢突触间隙 5-HT 水平,但这些药物对全脑缺血海马 NSCs 的作用还不十分清楚。SSRI 类药物中对 5-HT 转运体选择性最强的是 CIT,但目前缺乏有关该药物对脑缺血神经发生和功能障碍影响的报道。我们实验发现,CIT 20 mg/kg 共给药 21 d,确能在表达数量和表达持续时间上,显著促进血管性痴呆大鼠海马 DG 和门区的神经干细胞增殖;并且药物组大鼠缺血后的空间学习和记忆能力也较单纯缺血组恢复得好($P<0.05$)。并且最近 Wang 等[7]在对大鼠一侧大脑中动脉梗死(MCAO)模型的研究中发现,MCAO 后第 3 周,CIT(10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$共给药 6 周)可显著逆转慢性轻度抑郁 MCAO 大鼠海马新生细胞增殖的减少,且缺血后 21、30、45 d,CIT 治疗组 BrdU 阳性细胞数较未治疗组明显增高,同时大鼠运动功能也显著改善。

目前包括 CIT 在内的所有抗抑郁药物促进海马神经发生的作用均出现在给药 2 ~ 3 周以后[8],但不同剂量 CIT 作用的差别则少见报道。最近一项对恐惧性应激(conditioned fear stress)的研究发现,仅大剂量 CIT (10、30、100 mg/kg)可改善症状,小剂量(1、3 mg/kg)则无效[9],提示 CIT 的促 VD 神经发生和改善认知功能方面可能存在剂量依赖效应,需要进一步研究明确。

除了我们研究提示 CIT 可改善大鼠脑缺血性认知障碍外,还有一系列临床和实验研究报道 CIT 可改善认知功能,包括提高健康人和抑郁患者的记忆能力[10],改善四氢大麻酚或东莨菪碱诱导的空间记忆障碍大鼠的认知功能[11],减轻阿尔茨海默病、帕金森病[12]以及卒中事件[13]导致的认知障碍等。但是,目前国内外缺乏 CIT 改善 VD 认知功能障碍作用机制的实验研究,尚不确定 CIT 是否通过促进自体干细胞动员途径改善认知行为。本实验中神经干细胞增殖的数量和学习记忆改善之间没有显著的相关性,我们分析这可能表明 CIT 所促进的缺血海马 DG 神经干细胞动员并不能直接改善大鼠的认知行为,认知行为的改善还牵涉到增殖干细胞进一步的分化、迁移和整合;或者可能学习记忆不仅与海马结构和功能有关,而且还牵涉到其他脑区的功能;还可能与神经递质水平的变化有关,需要更加广泛深入的研究。

参考文献:

[1] 牟　君, 谢　鹏. 海马神经发生障碍--抑郁症发病机制的新观念[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1264 - 1266.

[2] Ueda S, Sakakibara S, Yoshimoto K. Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning[J]. Neuroscience, 2005, 135(2): 395 - 402.

[3] Schmidt-Kastner R, Paschen W, Ophoff BG, *et al*. A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats[J]. Stroke, 1989, 20(7): 938 - 946.

[4] van-Praag H, Schinder A F, Christie B R, *et al*. Functional neurogenesis in the adult hippocampus[J]. Nature, 2002, 415(6875): 1030 - 1034.

[5] Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system[J]. C R Biol, 2006, 329(7): 465 - 475.

[6] Choi Y S, Lee M Y, Sung K W, *et al*. Regional differences in enhanced neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats after transient forebrain ischemia[J]. Mol Cells, 2003, 16(2): 232 - 238.

[7] Wang S H, Zhang Z J, Guo Y J, *et al*. Hippocampal neurogenesis and behavioural studies on adult ischemic rat response to chronic mild stress[J]. Behav Brain Res, 2008, 189(1): 9 - 16.

[8] Castren E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs[J]. Curr Opin in Pharmacol, 2004, 4(1): 58 - 64.

[9] Muraki I, Inoue T, Koyama T. Effect of co-administration of the selective 5-HT(1A) receptor antagonist WAY 100, 635 and selective 5-HT (1B/1D) receptor antagonist GR 127, 935 on anxiolytic effect of citalopram in conditioned fear stress in the rat[J]. European J Pharmacol, 2008, Feb 5 [Epubahead of print].

[10] Zobel A W, Schulze-Rauschenbach S, von-Widdern OC, *et al*. Improvement of working but not declarative memory is correlated with HPA normalization during antidepressant treatment[J]. J Psychiatr Res, 2004, 38(4): 377 - 383.

[11] Egashira N, Matsumoto Y, Mishima K, *et al*. Low dose Citalopram reverses memory impairment and electroconvulsive shock-induced immobilization[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2006, 83(11): 161 - 167.

[12] 陈长宇, 陈康宁, 柳春雨, 等. SSRIs/西酞普兰对卒中后认知功能障碍的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(2): 240 - 242, 252.

[13] Menza M, Marin H, Kaufman K, *et al*. Citalopram treatment of depression in Parkinson's disease: the impact on anxiety, disability, and cognition[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2004, 16(3): 315 - 319.

(编辑　汪勤俭)