

卒中后抑郁大鼠认知功能障碍与 Cx36 表达的相关性研究

王喻 陈金梅 王洁 罗雪莲 王功俊 包成政 李雪斌

533000 百色,右江民族医学院临床医学院(王喻、陈金梅、罗雪莲、王功俊、包成政、李雪斌);

533000 百色,右江民族医学院附属医院肾内科(王洁),神经内科(李雪斌)

通信作者:李雪斌,Email:yyfylxb@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.04.002

【摘要】目的 探讨卒中后抑郁(PSD)大鼠海马缝隙连接蛋白 Cx36 与认知功能障碍的相关性,探寻 PSD 认知功能障碍的潜在发病机制。**方法** 将 42 只大鼠随机分为正常组、卒中组、抑郁组、PSD 组、生理盐水组、甘珀酸(CBX)组和全反式维甲酸(ATRA)组,每组 6 只。抑郁组每天随机给予 1 种慢性不可预测的温和性刺激并孤养;向卒中组大鼠的运动皮层注射内皮素-1 制备局灶性缺血型大鼠模型,PSD 组、生理盐水组、CBX 组和 ATRA 组在卒中组的基础上叠加抑郁刺激建立 PSD 模型。在 PSD 造模的同时,PSD 组不进行干预;生理盐水组每天腹腔注射生理盐水 1 ml; ATRA 组每天腹腔注射浓度为 1 mg/ml 的 1 ml 乙醇和磷酸盐缓冲液(按 1:9 配置);CBX 组按照 20 mg/kg 的标准每天腹腔注射 CBX。于卒中术后 28 d,采用糖水实验、水迷宫实验、穿梭实验检测大鼠的兴趣缺失感、空间记忆能力、学习记忆能力,验证 PSD 认知障碍模型是否诱导成功;采用 Real-time PCR 检测大鼠海马 Cx36 mRNA 表达变化;采用 Western blotting 检测和免疫荧光检测大鼠海马 Cx36 蛋白的表达量和平均荧光强度。**结果** 术后 28 d,PSD 组大鼠体重 $(257.05 \pm 4.74)\text{g}$ 低于正常组 $(352.00 \pm 7.99)\text{g}$ 、卒中组 $(303.95 \pm 4.63)\text{g}$, 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$; PSD 组大鼠 24 h 糖水饮用率 $(61.92 \pm 3.12)\%$ 低于正常组 $(83.40 \pm 5.38)\%$ 、卒中组 $(88.03 \pm 3.65)\%$ 、ATRA 组 $(71.15 \pm 4.55)\%$, 高于 CBX 组 $(49.62 \pm 5.85)\%$, 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$; PSD 组大鼠水迷宫潜伏时间 $(51.18 \pm 4.14)\text{s}$ 长于正常组 $(9.05 \pm 2.22)\text{s}$ 、卒中组 $(9.06 \pm 2.25)\text{s}$ 、ATRA 组 $(32.92 \pm 2.29)\text{s}$, 短于 CBX 组 $(91.13 \pm 3.27)\text{s}$, 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$; PSD 组穿梭实验主动逃避次数 (10.67 ± 1.51) 少于正常组 (18.00 ± 2.10) 次、卒中组 (16.5 ± 1.87) 次和 ATRA 组 (13.83 ± 1.17) 次,多于 CBX 组 (7.00 ± 1.26) 次,差异有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。术后 28 d, PSD 组海马区 Cx36 mRNA 表达量 (0.50 ± 0.03) 低于正常组 (1.04 ± 0.07) 、卒中组 (1.07 ± 0.10) 和 ATRA 组 (0.76 ± 0.11) , 高于 CBX 组 (0.20 ± 0.06) , 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$; PSD 组海马区 Cx36 蛋白相对表达量 (0.60 ± 0.07) 低于正常组 (0.86 ± 0.05) 、卒中组 (0.88 ± 0.03) 和 ATRA 组 (0.77 ± 0.07) , 高于 CBX 组 (0.56 ± 0.02) , 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$; PSD 组海马区 Cx36 蛋白平均荧光强度 (0.36 ± 0.03) 低于正常组 (1.00 ± 0.03) 、卒中组 (0.97 ± 0.03) 和 ATRA 组 (0.50 ± 0.02) , 高于 CBX 组 (0.21 ± 0.03) , 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。**结论** PSD 大鼠海马 Cx36 蛋白水平降低, CBX 干预能降低 Cx36 蛋白表达并且大鼠认知功能障碍加重, ATRA 干预能增加 Cx36 蛋白的表达并且大鼠认知功能障碍稍有好转。

【关键词】 认知障碍; 卒中后抑郁; 大鼠; Cx36; 海马

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860226); 广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA294154); 广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2018073); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2021328)

Correlation between cognitive dysfunction and Cx36 expression in post-stroke depression rats

Wang Yu, Chen Jinmei, Wang Jie, Luo Xuelian, Wang Gongjun, Bao Chengzheng, Li Xuebin

Youjiang Medical University For Nationalities, Baise 533000, China (Wang Y, Chen JM, Luo XL, Wang GJ, Bao CZ, Li XB); Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University Nationalities, Baise 533000, China (Wang J); Department of Neurology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University Nationalities, Baise 533000, China (Li XB)

Corresponding author: Li Xuebin, Email: yyfylxb@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between hippocampal gap junction connexin Cx36 and cognitive dysfunction in post-stroke depression (PSD) rats, and to explore the potential pathogenesis of cognitive dysfunction of post-stroke depression. **Methods** A total of 42 rats were randomly divided into normal group, stroke group, depression group, PSD group, normal saline group, carbenoxolone (CBX) group and all trans retinoic acid (ATRA) group, with 6 rats in each group. The depression group was randomly given a chronic unpredictable mild stimulus every day and raised alone. The focal ischemic rat model was induced by injecting endothelin-1 into the motor cortex of stroke rats. PSD group, normal saline group, CBX group and ATRA group were superimposed with depression stimulation on the basis of stroke group to establish PSD model. At the same time of PSD modeling, PSD group did not intervene; In the normal saline group, 1 ml of normal saline was injected intraperitoneally every day; ATRA group received intraperitoneal injection of 1 ml ethanol and phosphate buffer (1 : 9) with a concentration of 1 mg/ml every day; CBX group was injected intraperitoneally every day according to the standard of 20 mg/kg. On the 28th day after stroke, sucrose preference test, Morris water maze test and shuttle test were used to detect the loss of interest, spatial memory, learning-memory ability of rats to verify whether the PSD cognitive impairment model was successfully induced. RT-PCR experiment was used to detect the expression changes of Cx36 mRNA in rat hippocampus. Western blot and immunofluorescence were used to detect the changes of Cx36 protein expression and average fluorescence intensity in rat hippocampus. **Results** On the 28th day after operation, the body weight of the rats in the PSD group [(257.05 ± 4.74) g] was significantly lower than that of the normal group [(352.00 ± 7.99) g] and the stroke group [(303.95 ± 4.63) g], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The drinking rate of sugar water in PSD group [$(61.92 \pm 3.12)\%$] was lower than that in normal group [$(83.40 \pm 5.38)\%$], stroke group [$(88.03 \pm 3.65)\%$] and ATRA group [$(71.15 \pm 4.55)\%$], higher than the CBX group [$(49.62 \pm 5.85)\%$], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The Morris water maze latency [(51.18 ± 4.14) s] in the PSD group was significantly higher than that in the normal group [(9.05 ± 2.22) s], the stroke group [(9.06 ± 2.25) s] and the ATRA group [(32.92 ± 2.29) s], lower than the CBX group [(91.13 ± 3.27) s], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The times of active escapes in the shuttle experiment in the PSD group [(10.67 ± 1.51) times] was lower than that in the normal group [(18.00 ± 2.10) times], the stroke group [(16.5 ± 1.87) times] and the ATRA group [(13.83 ± 1.17) times], Higher than CBX group [(7.00 ± 1.26) times], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression of Cx36 mRNA in hippocampus of PSD group (0.50 ± 0.03) was lower than that of normal group (1.04 ± 0.07), stroke group (1.07 ± 0.10) and ATRA group (0.76 ± 0.11), but higher than that of CBX group (0.20 ± 0.06), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression of Cx36 protein in hippocampus of PSD group (0.60 ± 0.07) was lower than that of normal group (0.86 ± 0.05), stroke group (0.88 ± 0.03) and ATRA group (0.77 ± 0.07), but higher than that of CBX group (0.56 ± 0.02), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The average fluorescence intensity of Cx36 protein in hippocampus of PSD group (0.60 ± 0.07) was lower than that of normal group (1.00 ± 0.03), stroke group (0.97 ± 0.03) and ATRA group (0.50 ± 0.02), but higher than that of CBX group (0.56 ± 0.02), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); The mean fluorescence intensity of Cx36 protein in the hippocampus of the PSD group (0.36 ± 0.03) was lower than that of the normal group (1.00 ± 0.03), the stroke group (0.97 ± 0.03) and the ATRA group (0.50 ± 0.02), but higher than that of the CBX group (0.21 ± 0.03) ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of Cx36 protein in the hippocampus of PSD rats was decreased. CBX intervention could reduce the expression of Cx36 protein and aggravate the cognitive dysfunction of the rats. ATRA intervention could increase the expression of Cx36 protein and the cognitive dysfunction of the rats was slightly improved.

【Key words】 Cognitive function; Post-stroke depression; Rat; Cx36; Hippocampal

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81860226); Guangxi Natural Science Foundation (2018GXNSFAA294154); Guangxi Medical Health and Development of Appropriate Technology and Popularization Project (S2018073); Graduate Education Innovation Project in Guangxi (YCSW2021328)

卒中后抑郁(post stroke depression, PSD)是卒中后最常见的并发症之一,约占卒中后存活患者的33%。PSD延缓卒中后的康复效果,使卒中后死亡风险增加10倍^[1],主要表现为思维迟钝、情绪不良、兴趣缺乏以及不同程度的睡眠障碍、认知功能障碍^[2]。PSD患者常伴有认知功能障碍,表现为记忆力、执行力、注意力下降^[3]。缝隙连接在神经元间的信号传递方面发挥了重要作用,与卒中和抑郁等神经精神疾病密切相关,缝隙连接蛋白Cx36主要由神经元

表达,是神经元之间连接的主要构成蛋白^[4]。Cx36与认知功能密切相关,研究表明Cx36基因敲除后小鼠运动能力和学习记忆能力减退^[5]。

海马是大脑边缘系统的重要组成部分,参与介入控制情绪和情感反应,是学习记忆和情感调控中心,是重要的情绪整合部位^[6]。卒中可引起海马缝隙连接功能障碍,引发神经元功能改变,进而出现情感相关功能区功能障碍,最终导致PSD的发生,认知功能所涉及的学习、记忆等功能,与海马

区Cx36水平关系密切^[7],提示海马区Cx36水平的变化,与PSD认知功能损害有关。本研究通过与正常组、卒中组、抑郁组进行对照,研究PSD组大鼠海马区Cx36蛋白表达变化,探讨缝隙连接蛋白Cx36在PSD中的作用,并应用Cx36蛋白激动剂全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA)和阻滞剂甘珀酸(carbenoxolone, CBX),通过观察给药后PSD大鼠的认知功能变化,了解Cx36蛋白变化与PSD的认知功能是否存在相关性。

材料与方 法

1. 实验动物及分组:健康雄性SPF级Sprague-Dawley(SD)大鼠42只,6~8周龄,体重250~300 g。由长沙天勤生物技术有限公司提供[许可证编号SCXK(湘)2019-0014]。大鼠饲养于右江民族医学院医学实验动物研究中心[许可证编号SYXK(桂)2017-0004],大鼠自由摄食,并适应饲养环境1周。将大鼠随机分为正常组、卒中组、抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组和ATRA组7组,每组6只。在实验过程中,若因不可预测的意外出现大鼠死亡或造模不成功,及时选择大鼠进行补充,保证各组有6只大鼠。实验中涉及的动物操作程序已得到右江民族医学院实验动物伦理委员会批准(伦理编号:2020070101)。

2. 主要试剂与仪器:内皮素-1购自美国sigma公司。Cx36抗体、Alexa Fluor 594、NeuroTrace Nissl 500/520购自美国Thermo Fisher公司。脑立体定位仪、微量注射泵和柔性颅骨钻购自中国安徽正华公司。冰冻切片机、荧光倒置显微镜为德国LEICA公司产品。

3. 动物造模:(1)卒中动物模型。随机选取30只大鼠,通过大脑皮层注射内皮素-1制备局灶缺血型大鼠模型^[8]。参考大鼠脑定位图谱,定位到大脑运动皮层(坐标1, AP: 0 mm, ML: 2.5 mm, DV: -2.1 mm; 坐标2, AP: +23 mm, ML: 2.5 mm, DV: 1.9 mm)。术后24 h参照zealand 5分法予以神经功能评分:无神经功能缺损为0分;未能完全伸展左前爪,轻度局灶性神经功能缺损为1分;向左盘旋,出现中度局灶性神经功能缺损为2分;落到左边,严重的局灶性缺陷为3分;不能自发行走和意识低落为4分;评分1~3分的大鼠为造模成功^[9],入组。随机选取6只入卒中组,其余24只卒中大鼠叠加抑郁刺激建立PSD模型。(2)抑郁动物模型。随机选取6只大鼠作为抑郁组,给予慢性不可预测的温和性刺激^[10],包括:大鼠禁食水24 h;倾斜鼠笼(45°)24 h;持续空笼24 h;强光

照射24 h;湿笼24 h;4℃冰水5 min;40℃热水10 min;夹尾1 min;电击刺激。每天随机给予1种刺激并孤养,持续21 d。(3)PSD模型的建立和药物干预。从卒中模型建立成功的第7天开始,随机选取24只卒中大鼠进行抑郁造模,具体刺激方式同抑郁组大鼠。从给予刺激的第7天开始,将此部分大鼠随机分为PSD组、生理盐水组、CBX组和ATRA组,每组6只。PSD组不做干预,其余3组在继续PSD造模的同时予以以下干预:生理盐水组每天生理盐水1 ml腹腔注射;ATRA组,用乙醇和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)按1:9配置,浓度为1 mg/ml,每天1 ml腹腔内注射;CBX组每天予CBX按照20 mg/kg的标准腹腔注射。

4. 行为学检测指标及方法^[11]:(1)糖水实验。实验前大鼠适应1%糖水,进行实验时大鼠禁食水24 h,然后在大鼠笼内与实验前相同的高度处放置一瓶1%糖水和一瓶纯净水,24 h后称量大鼠的糖水饮用率(糖水饮用率=糖水饮用量/总液体饮用量×100%),于卒中术后28 d进行测试。(2)穿梭实验。让动物适应环境5 min,持续声音5 s然后电击10 s,若大鼠能在5 s内跑到对面箱体,则记为主动逃避,若未在5 s内跑到对面区域,则记为被动逃避。每轮测试20次,大鼠术前训练5 d,于卒中术后28 d进行测试,记录主动逃避次数,以反映大鼠学习记忆水平。(3)水迷宫实验。实验前训练,将平台置于水面下1 cm,大鼠在限定的2 min内寻找平台,在平台上停留20 s,此轮训练结束;若未找到平台,则引导大鼠站上平台并学习记忆20 s,术前训练4次/d,每次2 min,持续训练4 d。第5天大鼠从平台对面的象限入水,记录其寻找平台的潜伏时间和轨迹,来反映大鼠空间记忆水平^[12],于卒中术后28 d测试。

5. Real-time PCR检测大鼠海马组织Cx36 mRNA表达:随机选取一侧海马组织,置于冰上研磨成细胞匀浆,使用TRIzol试剂提取海马组织总RNA;检测RNA浓度和纯度;将RNA逆转录成cDNA,然后PCR扩增(两步法):先95℃预变性5 min;然后95℃变性10 s,60℃延伸30 s,40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算Cx36 mRNA相对表达量。

6. Western blotting检测大鼠海马Cx36蛋白相对表达量:随机选取一侧海马组织,充分研磨后裂解,100 000 g离心5 min,取上清,调节蛋白质浓度,电泳转膜,转膜完成后BSA封闭2 h,1:200配置一抗Cx36,4℃过夜孵育,TBST缓冲液洗膜3次,二抗孵育1 h,进行显影拍照,以 β -actin为内参,分析计算相对表达量。

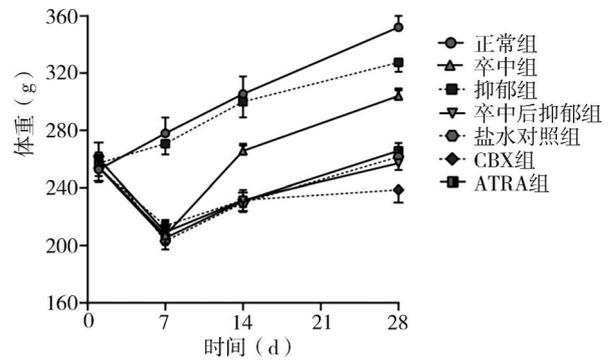
7. 免疫荧光检测大鼠海马Cx36蛋白的平均荧光强度: 随机选取3只大鼠, 取新鲜脑组织进行冰冻切片, 厚度为6 μm。切片放入甲醛中固定10 min, PBS(0.5% BSA)封闭40 min, 1:500配置一抗Cx36, 孵育过夜, 取出后用PBS清洗2次, 每次5 min; 沥干水后加入NeuroTrace Nissl 500/520和DAPI试剂均以1:500配置, 孵育1 h, 取出后PBS清洗2次, 每次5 min; 沥干水分, 用抗荧光淬灭封片剂封片。

8. 统计学方法: 采用SPSS 23.0软件进行统计分析。计数资料采用频数表示; 所有计量资料符合正态分布, 采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 大鼠体重采用重复测量方差分析(若球形检验结果 $P > 0.05$ 选用单因素方差分析, 若 $P < 0.05$ 选用多变量方差分析), 其他数据多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD法和GamesHowell法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

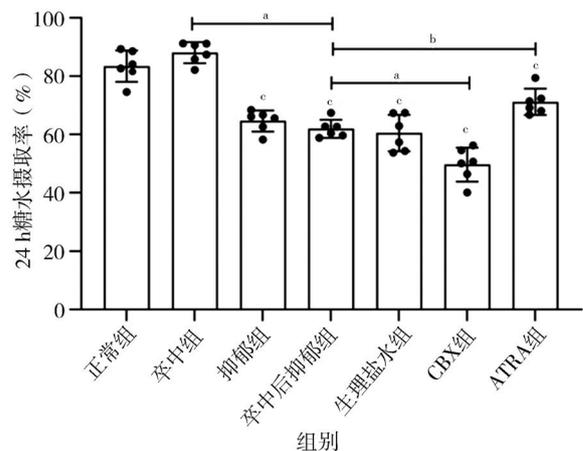
结 果

1. 各组大鼠不同时间体重比较: 术前各组大鼠体重比较, 差异无统计学意义($F=0.981, P > 0.05$)。卒中术后7 d各组大鼠体重比较, 差异有统计学意义($F=81.789, P < 0.01$), 卒中组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组较正常组大鼠相比体重下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。卒中术后14 d各组大鼠体重比较, 差异有统计学意义($F=102.537, P < 0.01$), PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组大鼠体重与卒中组比较下降, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。卒中术后28 d, 各组大鼠体重比较, 差异有统计学意义($F=259.550, P < 0.01$), 卒中组、抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组体重低于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); PSD组体重低于卒中组、抑郁组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CBX组体重低于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); ATRA组大鼠体重与PSD组大鼠比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图1。

2. 各组大鼠术后28 d的24 h糖水饮用率比较: 术后28 d各组大鼠糖水饮用率比较, 差异有统计学意义($F=47.951, P < 0.05$); 抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组糖水饮用率低于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); CBX组糖水引用率低于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 卒中组、ATRA组糖水饮用率高于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图2。



注: CBX甘珀酸; ATRA全反式维甲酸
图1 7组大鼠不同时间体重变化比较

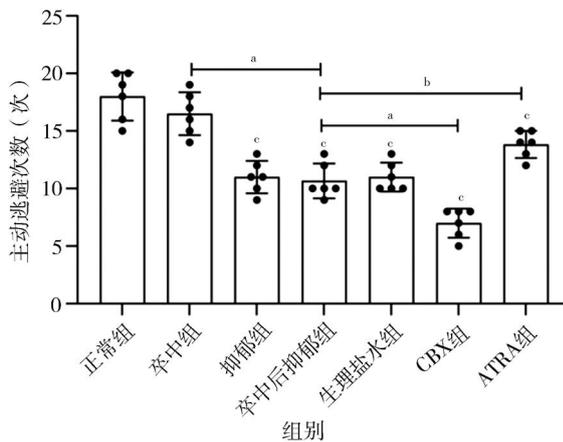


注: CBX甘珀酸; ATRA全反式维甲酸; 两组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与正常组比较, ^{*} $P < 0.01$

图2 7组大鼠术后28 d的24 h糖水摄取率比较

3. 各组大鼠术后28 d主动逃避次数比较: 术后28 d各组大鼠主动逃避次数比较, 差异有统计学意义($F=36.019, P < 0.05$); 抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组主动逃避次数少于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); CBX组主动逃避次数少于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 卒中组、ATRA组主动逃避次数多于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图3。

4. 各组大鼠术后28 d水迷宫潜伏时间和轨迹比较: 术后28 d各组大鼠潜伏时间比较, 差异有统计学意义($F=541.399, P < 0.05$)。正常组、卒中组、抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组潜伏时间分别为(9.05 ± 2.22)、(9.06 ± 2.25)、(38.39 ± 1.58)、(51.18 ± 4.14)、(52.43 ± 4.16)、(91.13 ± 3.27)、(32.92 ± 2.29)s; 抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组潜伏时间长于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CBX组大鼠潜伏时间长于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); ATRA组潜伏时间短于



注: CBX 甘珀酸; ATRA 全反式维甲酸; 两组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与正常组比较, ^c $P < 0.01$

图3 7组大鼠术后28 d主动逃避次数比较

PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组大鼠寻找平台的轨迹见图4。

5. 术后28 d各组大鼠海马区Cx36 mRNA表达量比较: 术后28 d各组大鼠Cx36 mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=51.152, P < 0.05$); 抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组的Cx36 mRNA表达量低于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); CBX组Cx36 mRNA表达量低于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 卒中组、ATRA组的Cx36 mRNA表达量高于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图5。

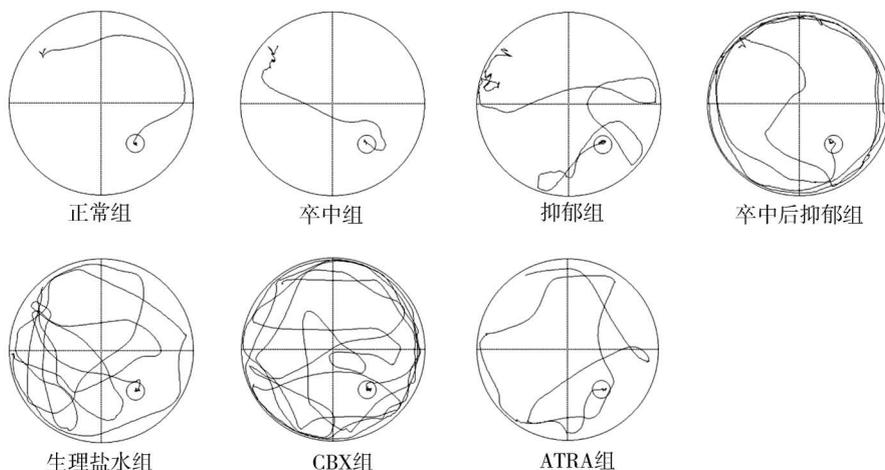
6. Western blotting检测各组大鼠术后28 d海马区Cx36蛋白相对表达量比较: 术后28 d各组大鼠大脑海马区Cx36蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=23.039, P < 0.05$); 抑郁组、PSD组、生

理盐水组、CBX组Cx36蛋白相对表达量低于正常组Cx36, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CBX组Cx36蛋白相对表达量低于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 卒中组、ATRA组Cx36蛋白相对表达量高于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图6、7。

7. 免疫荧光检测各组大鼠术后28 d海马区Cx36蛋白平均荧光强度比较: 术后28 d各组大鼠Cx36蛋白平均荧光强度比较, 差异有统计学意义($F=326.101, P < 0.05$); 正常组、卒中组、抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组Cx36蛋白的平均荧光强度分别为(1.00 ± 0.03)、(0.97 ± 0.03)、(0.67 ± 0.03)、(0.36 ± 0.03)、(0.36 ± 0.03)、(0.21 ± 0.03)、(0.50 ± 0.02); 抑郁组、PSD组、生理盐水组、CBX组、ATRA组Cx36蛋白平均荧光强度低于正常组Cx36, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CBX组Cx36蛋白平均荧光强度低于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); ATRA组Cx36蛋白平均荧光强度高于PSD组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。7组大鼠术后28 d Cx36蛋白平均荧光强度见图8(见本期封三)。

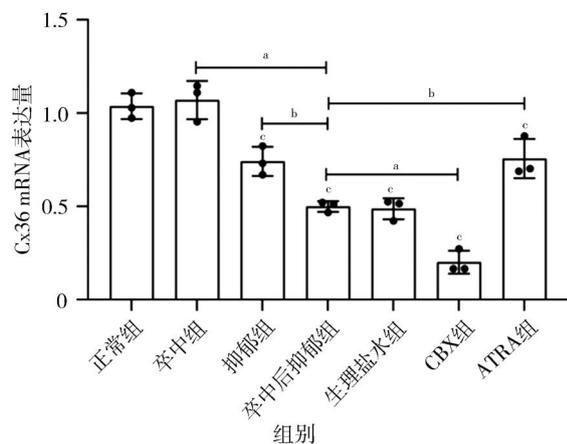
讨论

相关研究验证了抑郁与卒中后功能恢复之间的关系, 发现抑郁严重程度是日常生活功能受损程度的独立预测因子^[13]。PSD的发病机制假说包括下丘脑-垂体-肾上腺轴异常、前额叶皮质下回路中断、神经可塑性、谷氨酸神经传递改变以及过量的炎症细胞因子^[14-16], 然而以上生理病理假说尚存在争议。本研究通过对大鼠运动皮层区注射内皮素-1建立卒中模型, 并结合慢性不可预测的温和性刺激



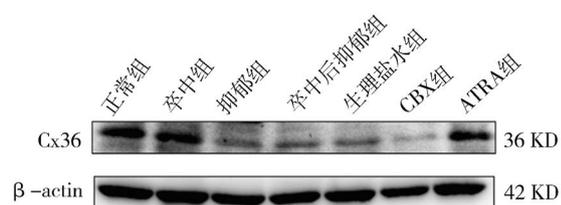
注: CBX 甘珀酸; ATRA 全反式维甲酸

图4 7组大鼠术后28 d水迷宫潜伏期轨迹



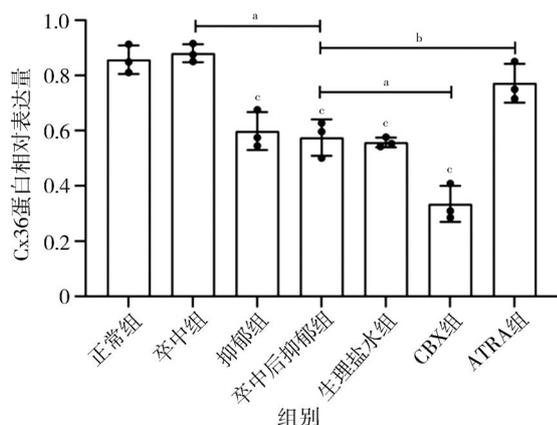
注: CBX 甘珀酸; ATRA 全反式维甲酸; 两组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与正常组比较, ^c $P < 0.01$

图5 7组大鼠术后28 d的Cx36 mRNA相对表达量比较



注: CBX 甘珀酸; ATRA 全反式维甲酸

图6 7组大鼠术后28 d大脑海马区Cx36蛋白表达条带



注: CBX 甘珀酸; ATRA 全反式维甲酸; 两组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与正常组比较, ^c $P < 0.01$

图7 7组大鼠术后28 d大脑海马区Cx36蛋白相对表达量比较

方法对大鼠进行抑郁造模, 叠加构建PSD大鼠模型。再通过行为学检测判断PSD合并认知功能障碍大鼠模型的成功与否。本研究结果显示与正常组、卒中组比较, PSD组大鼠体重下降、糖水饮用率下降、水迷宫实验潜伏时间延长、穿梭实验主动逃避次数减少, 差异有统计学意义。

缝隙连接是细胞间物质和信息交换的唯一的通道, 是电突触的结构基础, 能快速改变神经元活

动^[17]。研究发现PSD大鼠中缝隙连接蛋白Cx43蛋白存在差异表达^[18], 且缝隙连接与卒中、抑郁、癫痫等多种神经精神疾病相关^[19-20]。Cx36主要表达在神经元之间, 与认知功能之间的关系开始引起关注。研究发现Cx36参与了术后认知功能障碍(postoperation cognitive dysfunction, POCD), 其可能是通过快速调节发挥作用, 银杏叶提取物可以通过调节POCD大鼠的Cx36蛋白表达, 来减轻大鼠认知功能障碍^[21-22]。有学者研究发现小鼠敲除Cx36基因后学习记忆能力下降, 对大鼠应用缝隙连接阻断剂CBX后发现水迷宫空间记忆能力减退^[23]。本研究结果显示PSD大鼠较正常大鼠海马Cx36 mRNA和Cx36蛋白表达量下降; 注射CBX后大鼠Cx36 mRNA和Cx36蛋白表达量进一步下降, 大鼠水迷宫潜伏时间增长和穿梭实验主动逃避次数减少; 注射ATRA后Cx36 mRNA和Cx36蛋白表达量较PSD组大鼠上升, 大鼠水迷宫潜伏时间减少和穿梭实验主动逃避次数增加。

因此, PSD大鼠海马缝隙连接蛋白Cx36表达减少, 应用缝隙连接阻滞剂CBX抑制Cx36蛋白的表达, PSD大鼠的PSD症状加重, 包括兴趣缺失感上升、空间记忆能力和学习记忆能力下降。而应用缝隙连接激动剂ATRA增加Cx36的表达, PSD大鼠的兴趣缺失感、空间记忆能力、学习记忆能力等PSD的症状都有所改善。表明海马Cx36蛋白与PSD具有相关性, 可能与PSD的认知功能障碍相关。神经元细胞缝隙连接障碍的干预可能成为PSD新的治疗靶点。但是本研究也存在不足之处, 未能从缝隙连接传递功能、形态结构, 以及神经电生理方面研究PSD大鼠神经元间缝隙连接的变化, 因此还需要进一步深入研究。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验操作为王喻, 数据收集与整理为陈金梅、罗雪莲、王功俊、包成政, 实验指导与文章修改为王洁, 实验设计、论文撰写、审校为李雪斌

参 考 文 献

[1] 孟宪良, 赵娜, 张宁, 等. 卒中后抑郁的研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2019, 22(18): 2082-2088. DOI: 10.12083/SYSJ.2019.18.346.
Meng XL, Zhao N, Zhang N, et al. Research progress on post-stroke depression[J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2019, 22(18): 2082-2088.

[2] Ghaffari A, Akbarfahimi M, Rostami HR. Discriminative factors for post-stroke depression[J]. Asian J Psychiatr, 2020, 48: 101863. DOI: 10.1016/j.ajp.2019.101863.

- [3] 王少石, 周新雨, 朱春燕. 卒中后抑郁临床实践的专家共识[J]. 中国卒中杂志, 2016, 11(8): 65-693. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5765.2016.08.015.
- [4] Wang G, Wu X. The potential antiepileptogenic effect of neuronal Cx36 gap junction channel blockage[J]. Transl Neurosci, 2021, 12(1): 46-51. DOI: 10.1515/tnsci-2021-0008.
- [5] Frisch C, De Souza-Silva MA, Söhl G, et al. Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice[J]. Behav Brain Res, 2005, 157(1): 177-185. DOI: 10.1016/j.bbr.2004.06.023.
- [6] 金珠玛, 雷家熙, 陈从新, 等. 精神分裂症患者海马结构与面孔情绪认知障碍的关联研究[J]. 临床精神医学杂志, 2021, 31(5): 356-360. DOI: 10.3969/j.issn.1005-3220.2021.05.007. Jin ZM, Lei JX, Chen CX, et al. The correlation of facial emotion cognitive impairment and hippocampal subfields' volume in patients with schizophrenia[J]. Journal of Clinical Psychiatry, 2021, 31(5): 356-360.
- [7] 徐青果, 王成天, 彭勉, 等. 术后认知功能障碍老龄大鼠海马神经元缝隙连接蛋白 36 表达的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(3): 288-290. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2012.03.006. Xu QG, Wang CY, Peng M, et al. Changes in expression of hippocampal neuronal gap function protein connexin 36 induced by postoperative cognitive dysfunction in aged rats[J]. Chinese Journal of Anesthesiology, 2012, 32(3): 288-290.
- [8] 何小夺, 吴迪, 吴隆飞, 等. 非人灵长类动物模型低温治疗方法及在脑卒中模型中的应用进展[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 123-127. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.03.019. He XD, Wu D, Wu LF, et al. Research progress on therapeutic hypothermia and its applications in nonhuman primate models of stroke[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2021, 31(3): 123-127.
- [9] Röther J. Neuroprotection does not work[J]. Stroke, 2008, 39(2): 523-524. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.494799.
- [10] 苗茸茸, 曲显俊. 抑郁症动物模型的研究进展[J]. 实验动物科学, 2019, 36(3): 80-85. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.016. Miao RR, Qu XJ. Research progress in animal models of depression[J]. Laboratory Animal Science, 2019, 36(3): 80-85.
- [11] 陶希, 王佳, 刘楚娟, 等. 缺血性卒中后抑郁动物模型构建及核心症状评定研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2020, 35(10): 1264-1269. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2020.10.024.
- [12] Ifergane G, Boyko M, Frank D, et al. Biological and behavioral patterns of post-stroke depression in rats[J]. Can J Neurol Sci, 2018, 45(4): 451-461. DOI: 10.1017/cjn.2017.302.
- [13] Robinson RG, Jorge RE. Post-stroke depression: a review[J]. Am J Psychiatry, 2016, 173(3): 221-231. DOI: 10.1176/appi.ajp.2015.15030363.
- [14] 武莉娜, 许国栋, 张雅安, 等. 塞来昔布对卒中后抑郁大鼠学习记忆能力及海马组织中脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(3): 206-212. DOI: 10.7683/xyxyxb.2019.03.002. Wu LN, Xu GD, Zhang YA, et al. Effect of celecoxib on the learning and memory ability and the expression of brain-derived neurotrophic factor in hippocampus of rats with post-stroke depression[J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2019, 36(3): 206-212.
- [15] 梁佳威, 勾向博, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸及其有效成分在卒中后抑郁及意识障碍中的脑保护作用[J]. 药物评价研究, 2020, 43(8): 1489-1495. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.08.003. Liang JW, Gou XB, Wan MX, et al. Beneficial effects of salvianolic acids for Injection and effective components on post-stroke depression and cognitive impairment[J]. Drug Evaluation Research, 2020, 43(8): 1489-1495.
- [16] 李选, 原亚利, 宫晓洋. 脑卒中后抑郁的客观评价方法研究进展[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(10): 1106-1111. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2021.10.019. Li X, Yuan YL, Gong XY. Research progress on objective evaluation methods of post stroke depression[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2021, 34(10): 1106-1111.
- [17] Harris AL. Electrical coupling and its channels[J]. J Gen Physiol, 2018, 150(12): 1606-1639. DOI: 10.1085/jgp.201812203.
- [18] 曾立三. 缺血性脑卒中后抑郁大鼠海马Cx43的表达变化研究[D]. 百色: 右江民族医学院, 2020.
- [19] Dere E, Zlomuzica A. The role of gap junctions in the brain in health and disease[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2012, 36(1): 206-217. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.05.015.
- [20] 林敏, 伍丽娜, 夏培生, 等. 戊四氮致癫痫大鼠大脑皮质区突触素、缝隙连接蛋白 43、神经胶质原纤维酸性蛋白表达水平的变化[J]. 中国医药导报, 2015(31): 13-16. Lin M, Wu LN, Xia PS, et al. Expression level change of SYN, Cx43 and GFAP in rat cerebral cortex after PTZ-induced epilepsy[J]. China Medical Herald, 2015(31): 13-16.
- [21] 王成天, 杨鹏, 徐青果, 等. 缝隙连接蛋白在老年大鼠认知功能障碍中作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2012, 33(2): 186-190.
- [22] 王成天, 夏颖, 咸淑悦, 等. 银杏叶提取物预处理对大鼠术后认知功能的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(10): 993-996. Wang CY, Xia Y, Xian SY, et al. Effects of extract of ginkgo biloba on postoperative cognitive function in rats[J]. Journal of Clinical Anesthesiology, 2016, 32(10): 993-996.
- [23] Hosseinzadeh H, Asl MN, Parvardeh S, et al. The effects of carbenoxolone on spatial learning in the Morris water maze task in rats[J]. Med Sci Monit, 2005, 11(3): BR88-BR94.

(收稿日期: 2021-12-06)

(本文编辑: 赵金鑫)