本文引用:夏天光,孔宪斌,王明丽,等. 光遗传技术调控新生神经元电活动对颅脑损伤小鼠认知功能的影响[J]. 新乡医学院学报,2018,35(10):858-864. DOI:10.7683/xxyxyxb.2018.10.004.

【基础研究】

光遗传技术调控新生神经元电活动对颅脑损伤小鼠认知功能的影响

夏天光[1], 孔宪斌[1], 王明丽[1], 毕 莹[2], 吕方方[1], 梁 军[3], 姜 伟[3], 孙 倩[3], 董化江[1], 李晓红[1]
(1. 武警后勤学院附属医院脑创伤与神经疾病研究所,天津 300162;2. 武警后勤学院附属医院心脏科,天津 300162;3. 天津大学精密仪器与光电子工程学院,天津 300072)

摘要: **目的** 探讨光调控去极化对颅脑损伤(TBI)小鼠海马齿状回(DG)新生神经元的存活、成熟及认知功能的影响。**方法** 将 66 只雄性 *C57BL/6* 小鼠随机分为假手术组($n=10$)、TBI 组($n=12$)、TBI + 增强型绿色荧光蛋白(EGFP)组($n=12$)和 TBI + 视紫红质通道蛋白-2(ChR2)组($n=32$);假手术组小鼠行单纯开颅手术,未行液压冲击;TBI 组小鼠给予液压冲击制备 TBI 模型;TBI + EGFP 组小鼠给予液压冲击制备 TBI 模型后感染慢病毒 DCX-EGFP;TBI + ChR2 组小鼠给予液压冲击制备 TBI 模型后感染慢病毒 DCX-ChR2-EGFP。各组小鼠均于造模后连续 7 d 行腹腔内注射 BrdU(100 mg · kg^{-1})。免疫荧光染色检测造模后 7、28 d TBI 组小鼠海马 DG 区新生神经元存活和成熟情况;倒置荧光显微镜观察假手术组和造模后不同时间点(3、5、7、9、12、18、28 d)TBI + ChR2 组海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元变化;造模后 21 ~ 26 d 进行水迷宫实验检测各组小鼠认知能力;造模后 28 d 采用免疫荧光染色检测 TBI 组、TBI + EGFP 组和 TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区表达 DCX 神经元的存活和成熟情况。**结果** 造模后 28 d,TBI 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量显著少于造模后 7 d($P<0.01$)。造模后 3、18、28 d,TBI + ChR2 组与假手术组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量比较差异无统计学意义($P>0.05$);造模后 5、7、9、12 d,TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量均显著高于假手术组($P<0.05$,$P<0.01$)。造模后 9 d,TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量均显著高于其他各时间点($P<0.05$,$P<0.01$)。造模后 21 d,4 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。造模后 22 ~ 26 d,TBI 组和 TBI + EGFP 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期均显著长于假手术组($P<0.01$);TBI + ChR2 组与假手术组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期比较差异无统计学意义($P>0.05$);TBI + EGFP 组与 TBI 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期比较差异无统计学意义($P>0.05$);TBI + ChR2 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期均显著短于 TBI 组和 TBI + EGFP 组($P<0.01$)。TBI 组、TBI + EGFP 组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数均显著低于假手术组($P<0.01$);TBI + ChR2 组与假手术组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。TBI + ChR2 组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数均高于 TBI 组和 TBI + EGFP 组($P<0.05$);TBI + EGFP 组与 TBI 组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后 28 d,TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量明显高于 TBI 组和 TBI + EGFP 组($P<0.01$);TBI 组与 TBI + EGFP 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TBI 后光调控表达 DCX-EGFP 细胞的去极化可增强 DG 区新生神经元的存活和成熟,并显著改善 TBI 小鼠的认知功能。

关键词: 颅脑损伤;成体神经再生;光遗传;去极化;认知障碍
中图分类号: R651.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)10-0858-07

Effect of regulating electrical activity of newborn neurons with light genetic technology on cognitive function of mice with traumatic brain injury

XIA Tian-guang[1], KONG Xian-bin[1], WANG Ming-li[1], BI Ying[2], LYU Fang-fang[1], LIANG Jun[3], JIANG Wei[3], SUN Qian[3], DONG Hua-jiang[1], LI Xiao-hong[1]
(1. *Institute of Brain Trauma and Neurology, the Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin* 300162, *China*; 2. *Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's*

DOI:10.7683/xxyxyxb.2018.10.004
收稿日期:2018 - 01 - 22
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81471275,81771352,81671222,81771350);天津市自然科学基金资助项目(编号:16JCYBJC27600)。
作者简介:夏天光(1988 -),男,黑龙江佳木斯人,硕士,主治医师,研究方向:中枢神经创伤修复。
通信作者:李晓红(1980 -),女,湖北枝江人,博士,副教授,研究方向:神经创伤修复;E-mail:lixiaohong12@ hotmail.com。

Armed Police Forces, *Tianjin* 300162, *China*; 3. *Precision Instrument and Optoelectronic Engineering Institute of Tianjin University*, *Tianjin* 300072, *China*)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of optical regulation depolarization on the survival, maturation of neonatal cells in dentate gyrus of hippocampus in mice with traumatic brain injury (TBI) and the cognitive function of mice with TBI. **Methods** Sixty-six male *C57BL/6* mice were randomly divided into sham operation group ($n = 10$), TBI group ($n = 12$), TBI + enhanced green fluorescent protein (EGFP) group ($n = 12$) and TBI + channelrhodopsin-2 (ChR2) group ($n = 32$). The mice in sham operation group underwent simple craniotomy without hydraulic shock; the mice in TBI group were given hydraulic shock to prepare TBI model; the mice in TBI + EGFP group were given hydraulic shock to prepare TBI model and then infected with lentivirus DCX-EGFP; the mice in TBI + ChR2 group were given hydraulic shock to prepare TBI model and then infected with lentivirus DCX-ChR2-EGFP. All mice were injected BrdU (100 mg · kg^{-1}) intraperitoneally for 7 days after modeling. The survival and maturation of the neonatal neurons in the DG area of the hippocampus of mice in the TBI group was detected by immunofluorescence staining on the 7th and 28th day after modeling; the changes of DCX-EGFP positive neurons in the DG area of the hippocampus of mice in the sham operation group and the TBI + ChR2 group at different time points (3, 5, 7, 9, 12, 18, 28 days after modeling) were observed by inverted fluorescence microscopy; the cognitive function of mice in each group was detected by Morris water maze test at 21 – 26 days after modeling; the survival and maturation of cells expressing DCX in DG region of hippocampus in TBI group, TBI + EGFP group and TBI + ChR2 group were detected by immunofluorescence staining at 28 days after modeling. **Results** The number of neonatal mature neurons in the DG area of the hippocampus in TBI group at 28 days after modeling was significantly less than that at 7 days after modeling ($P < 0.01$). There was no significant difference in the number of DCX-EGFP positive neonatal neurons in the DG area of the hippocampus of mice between TBI + ChR2 group and sham operation group at 3, 18, 28 days after modeling ($P > 0.05$); the number of DCX-EGFP positive neonatal neurons in the DG area of the hippocampus of mice in the TBI + ChR2 group was significantly higher than that in the sham operation group at 5, 7, 9, 12 days after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The number of DCX-EGFP positive neonatal neurons in the DG area of the hippocampus of mice in TBI + ChR2 group at 9 days after modeling was significantly higher than other time points ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant difference in the latency for searching hidden platform of mice among the four groups at 21 days after modeling ($P > 0.05$). At 22 – 26 days after modeling, the latency for searching hidden platform of mice in TBI groupand TBI + EGFP group was significantly longer than that in the sham operation group ($P < 0.01$); there was no significant difference in the latency for searching hidden platform of mice between TBI + ChR2 group and sham operation group ($P > 0.05$); there was no significant difference in the latency for searching hidden platform of mice between TBI + EGFP group and TBI group ($P > 0.05$); the latency for searching hidden platform of mice in TBI + ChR2 group was significantly shorter than that in the TBI group and TBI + EGFP group ($P < 0.01$). The target quadrant staying time and the number of crossing platforms of mice in TBI group and TBI + EGFP group were significantly lower than those in the sham operation group ($P < 0.01$); there was no significant difference in the target quadrant staying time and the number of crossing platforms of mice between TBI + ChR2 group and sham operation group ($P > 0.05$); the target quadrant staying time and the number of crossing platforms of mice in TBI + ChR2 group were significantly higher than those in the TBI group and TBI + EGFP group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the target quadrant staying time and the number of crossing platforms of mice between TBI + EGFP group and TBI group ($P > 0.05$). At 28 days after modeling, the number of neonatal mature neurons in the DG area of the hippocampus of mice in TBI + ChR2 group was significantly higher than that in the TBI group and TBI + EGFP group ($P < 0.01$); there was no significant difference in the number of neonatal mature neurons in the DG area of the hippocampus of mice between TBI group and TBI + EGFP group ($P > 0.05$). **Conclusion** Optical regulation depolarization of cells expressing DCX-EGFP can enhance the survival and maturation of newborn neurons in hippocampus dentate gyrus and significantly improve the cognitive deficits of mice after TBI.

Key words: traumatic brain injury; adult neurogenesis; optogenetics; depolarization; cognition deficit

颅脑损伤(traumatic brain injury, TBI)的致死率和致残率高,是一类严重危害人们健康的疾病[1-2]。海马齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒下区(subgranular zone, SGZ)的成体神经发生对 TBI 后认知功能的恢复具有潜在的重要作用。有研究显示,TBI 可诱导海马 DG SGZ 的神经发生[3-4],但新生的成体神经干细胞(neural stem cell, NSC)只有小部分能够存活并分化成熟。TBI 后缺氧和毒素累积的微环境进一步导致新生细胞的低存活率和低成熟率[5]。由此可见,如何提高 TBI 后新生神经元的存活和诱导其

分化成熟是成体 NSC 修复 TBI 神经功能需要着重解决的问题。以膜去极化为代表的电兴奋性对新生神经元的成熟至关重要,并在胚胎和成体早期神经元发育过程中促进功能性突触的形成[6]。光遗传学方法中蓝光可激活视紫红质通道蛋白-2(channelrhodopsin-2,ChR2),使膜去极化并触发动作电位。特定启动子下的 ChR2 工程细胞为膜去极化和神经元兴奋的研究提供了一种新的且强有力的工具。有研究在新生细胞中使用 Nestin 或天冬氨酸转运体(gamma-ray large area space telescope,GLAST)作为启动子,但被 Nestin 或 GLAST 标记的细胞仍是多能且具备有丝分裂能力,这不适合研究新生神经元存活和成熟。研究证实,海马 DG 区 NSC 的存活和成熟呈现出 2 个关键时期,一是 2b 型中间祖细胞至 3 型中间祖细胞的过渡期间;二是非成熟神经元至成熟神经元的过渡期间[7]。这 2 个关键时期的神经元均表达 DCX 蛋白。因此,DCX 阳性且表达 ChR2 的新生细胞是光遗传学调控去极化的理想靶细胞。因此,本研究使用光遗传工具激活 TBI 后 DG 区表达 DCX 的新生神经元,在成体神经发生阶段,光调控表达 DCX 神经元的去极化,以探讨光调控去极化对 TBI 小鼠海马 DG 新生神经元的存活、成熟及对 TBI 小鼠认知功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康无特定病原(specific pathogen-free,SPF)级 8 周龄雄性 *C57BL/6* 小鼠 66 只,体质量 22 ~ 24 g,购自中国军事医学科学院,动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。

1.2 试剂与仪器 NeuN、BrdU 抗体均购自英国 Abcam 公司,BrdU 购自美国 Sigma 公司,荧光二抗 Alexa Fluor 405、488 和 610 均购自澳大利亚 Invitrogen 公司,慢病毒 ChR2-DCX-EGFP 由上海和元生物技术股份有限公司构建,病毒滴度为 3×10^{11} L^{-1};液压冲击损伤仪购自美国 Custom Design and Fabrication 公司。人工脑脊液(0.119 0 mol · L^{-1} 氯化钠,0.002 3 mol · L^{-1} 氯化钾,0.001 3 mol · L^{-1} 硫酸镁,0.002 5 mol · L^{-1} 氯化钙,0.026 2 mol · L^{-1} 碳酸氢钠,0.001 0 mol · L^{-1} 磷酸二氢钠和 0.011 0 mol · L^{-1} 葡萄糖)为人工配制。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及 TBI 模型制备 小鼠随机分为假手术组($n = 10$)、TBI 组($n = 12$)、TBI + 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)组($n = 12$)和 TBI + ChR2 组($n = 32$)。假手术组小鼠行单纯开颅手术,未行液压冲击;TBI 组小鼠给予液压冲击制备 TBI 模型;TBI + EGFP 组小鼠给予液压冲击制备 TBI 模型后感染慢病毒 DCX-EGFP;TBI + ChR2 组小鼠给予液压冲击制备 TBI 模型后感染慢病毒 DCX-ChR2-EGFP。各组小鼠均于造模后连续 7 d 行腹腔内注射 BrdU(100 mg · kg^{-1})。具体造模方法为:小鼠按 50 mg · kg^{-1} 腹腔内注射戊巴比妥进行麻醉,选择前囟后 4.0 mm、中线旁开 2.2 mm,在右顶颅骨开 3.5 mm 骨窗,保证硬膜完好无破损,然后将损伤连接管置于暴露的硬脑膜上,用玻璃离子体水门汀黏合,通过改造的连接适配器连接到液压冲击损伤装置上,使用压力脉冲(2.4 atm)快速冲击闭合的颅腔。手术过程中使直肠温度保持在 37 ℃。

1.3.2 免疫荧光染色检测 TBI 组小鼠海马 DG 区新生神经元存活和成熟情况 在造模后 7、28 d 分别处死 3 只小鼠,取脑组织置于 40 g · L^{-1} 多聚甲醛中固定 24 h,采用振荡切片机连续切片制备脑组织切片,厚 20 μm。将 TBI 组脑切片置于含体积分数 0.5% Triton X-100 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)中透化处理 20 min,0.01 mol · L^{-1} PBS 缓冲液洗片 3 次,每次 5 min。然后将切片浸入体积分数 0.5% H_2O_2 甲醇溶液中孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,然后用 50 g · L^{-1} 牛血清白蛋白在室温下封闭非特异性结合位点 30 min。加入一抗 BrdU 于 4 ℃下过夜,次日加入一抗 NeuN 于 4 ℃下过夜。然后用波长为 610、405、488 nm 的荧光二抗孵育 60 min。4,6-联脒-2-苯基吲哚(diamidine phenylindole,DAPI)染色 10 min,抗荧光淬灭封片剂封片,最后使用共聚焦显微镜观察新生神经元存活和成熟情况。每个时间点随机选取大鼠海马 DG 区各 3 张切片,每张切片计数 5 个视野并拍照。

1.3.3 倒置荧光显微镜观察假手术组和 TBI + ChR2 组海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元变化 造模前 2 d,将 DCX-ChR2-EGFP 慢病毒注射到 TBI + ChR2 组小鼠的 DG 区。造模后立即将光纤植入海马 DG 区,造模后 3 ~ 28 d 进行在体光刺激。假手术组和 TBI + ChR2 组小鼠在造模后不同时间点(3、5、7、9、12、18、28 d)行 40 g · L^{-1} 多聚甲醛心脏灌注,每个时间点处死 3 只小鼠,取脑组织采用震荡切片机连续切片制备脑组织切片,厚 20 μm。对

切片进行细胞核 DAPI 避光染色 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,抗荧光淬灭封片剂封片,倒置荧光显微镜观察 DCX-EGFP 阳性新生神经元的变化,DCX-EGFP 阳性新生神经元定量计数方法同“1.3.2 项”。

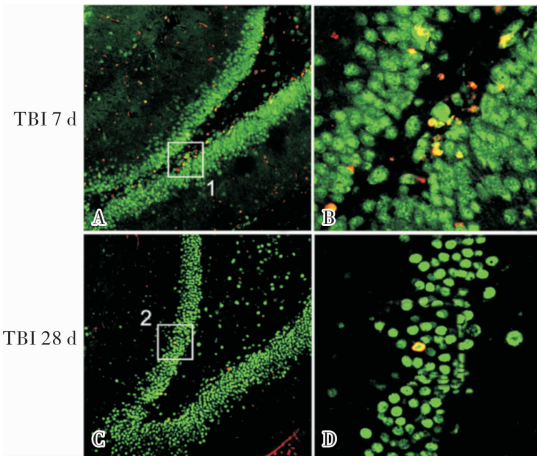
1.3.4　Morris 水迷宫实验检测各组小鼠认知功能　麻醉各组小鼠,将光纤植入损伤侧的 DG 区,造模后 3 ~ 12 d 进行在体光刺激。造模后 21 ~ 26 d 行 Morris 水迷宫实验,训练 4 组小鼠寻找水下隐匿平台,在水池中加入牛奶使水变得不透明,水温保持在约 26 ℃。每次训练重复 3 次(间隔 15 s),记录大鼠寻找隐匿平台的潜伏期。造模后 26 d 进行平台测试,28 d 撤去平台,记录小鼠穿越平台次数和在目标象限停留的时间。

1.3.5　免疫荧光染色检测小鼠海马 DG 区表达 DCX 神经元的存活和成熟情况　造模后 28 d,采用免疫荧光染色检测 TBI 组、TBI + EGFP 组和 TBI + ChR2 组小鼠同侧海马颗粒细胞层 NeuN 和 BruU 双标记的新生成熟神经元,免疫荧光染色步骤同“1.3.2 项”。

1.4　统计学处理　应用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　TBI 组小鼠海马 DG 区新生神经元存活及成熟情况　结果见图 1。造模后 7、28 d,TBI 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量分别为(2 100.0 ± 236.9)、(584.3 ± 69.2)个 · mm^{-3};造模后 28 d 新生成熟神经元数量显著少于造模后 7 d,差异有统计学意义($P < 0.01$)。造模后 7 ~ 28 d,约 78% 的新生神经元消失。

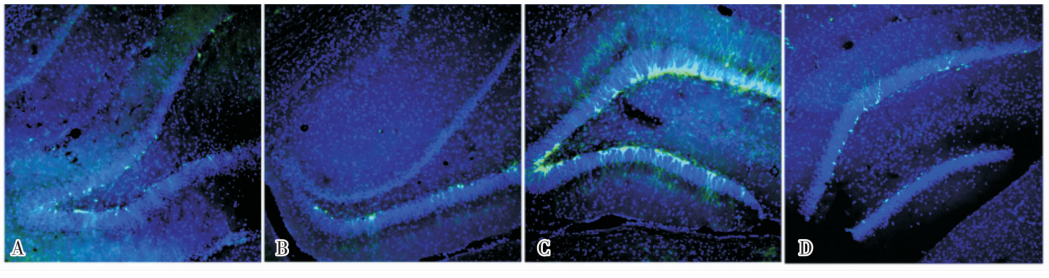


A、C:×200;B、D:A、C 中 1、2 的放大图(×400)。

图 1　造模后 7 d 和 28 d TBI 组小鼠海马 DG 区新生神经元存活和成熟情况(免疫荧光染色)

Fig. 1　Survival and maturation of newborn neurons in DG area of hippocampus at 7 days and 28 days after modeling (immunofluorescence staining)

2.2　假手术组和不同时间点 TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元变化情况　结果见图 2 和表 1。从造模后 3 d 起,TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量开始上升,9 d 达到高峰,12 d 开始明显下降。造模后 3、18、28 d,TBI + ChR2 组与假手术组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);造模后 5、7、9、12 d TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量均显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$)。造模后 9 d,TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量均显著高于其他各时间点,差异有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$)。



A:假手术组;B:TBI + ChR2 组造模后 3 d;C:TBI + ChR2 组造模后 9 d;D:TBI + ChR2 组造模后 28 d。

图 2　假手术组和 TBI + ChR2 组不同时间点海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元表达情况(DAPI 染色,×200)

Fig. 2　Expression of DCX-EGFP positive newborn neurons in hippocampal DG region of mice in sham operation group and TBI + ChR2 group at different time points (DAPI staining, ×200)

表 1 假手术组和 TBI + ChR2 组不同时间点小鼠海马 DG 区 DCX-EGFP 阳性新生神经元数量比较

Tab. 1 Comparison of the number of DCX-EGFP positive newborn neurons in DG region of the hippocampus of mice between the sham operation group and the TBI + ChR2 group at different time points $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	DCX-EGFP 阳性新生神经元数量/(个·mm^{-3})
假手术组	3	1 032.0 ± 89.9
TBI + ChR2 组		
造模后 3 d	3	1 129.0 ± 98.5
造模后 5 d	3	1 875.0 ± 178.3^{a}
造模后 7 d	3	2 356.9 ± 247.8^{b}
造模后 9 d	3	3 542.7 ± 365.3^{bc}
造模后 12 d	3	2 475.6 ± 233.9^{b}
造模后 18 d	3	1 578.6 ± 147.2^{c}
造模后 28 d	3	1 295.6 ± 128.4^{c}

注:与假手术组比较$^{a}P < 0.05$,$^{b}P < 0.01$;与造模后 3、5、7、12、18、28 d 比较$^{c}P < 0.05$。

2.3 光调控表达 DCX 的细胞去极化对 TBI 小鼠认知功能的影响 结果见表 2 和表 3。造模后 21 d,4 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。造模后 22 ~ 26 d,TBI 组和 TBI + EGFP 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期均显著长于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.01$);TBI + ChR2 组与假手术组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期比较差异无统计学意义($P > 0.05$);TBI + EGFP 组与 TBI 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期比较差异无统计学意义($P > 0.05$);TBI + ChR2 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期均显著短于 TBI 组和 TBI + EGFP 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。TBI 组和 TBI + EGFP 组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数均显著少于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.01$);TBI + ChR2 组与假手术组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。TBI + ChR2 组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数均高于 TBI 组和 TBI + EGFP 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);TBI + EGFP 组与 TBI 组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期

Tab. 2 Latency for looking hidden platforms of mice in each group $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	寻找隐匿平台的潜伏期/s					
		21 d	22 d	23 d	24 d	25 d	26 d
假手术组	10	59.5 ± 1.1	38.2 ± 4.2	23.6 ± 2.4	18.9 ± 2.2	11.0 ± 1.5	6.5 ± 0.8
TBI 组	9	59.8 ± 1.7	51.0 ± 7.0^{a}	38.8 ± 5.4^{a}	36.6 ± 5.8^{a}	30.7 ± 4.9^{a}	24.7 ± 3.9^{a}
TBI + EGFP 组	12	59.6 ± 1.0	52.4 ± 5.7^{a}	39.7 ± 3.5^{a}	36.9 ± 4.1^{a}	28.9 ± 3.9^{a}	22.4 ± 3.2^{a}
TBI + ChR2 组	14	59.5 ± 1.5	43.7 ± 6.3^{bc}	29.9 ± 3.7^{bc}	25.4 ± 4.9^{bc}	15.6 ± 3.9^{bc}	10.4 ± 2.5^{bc}

注:与假手术比较$^{a}P < 0.01$;与 TBI 组比较$^{b}P < 0.01$;与 TBI + EGFP 组比较$^{c}P < 0.01$。

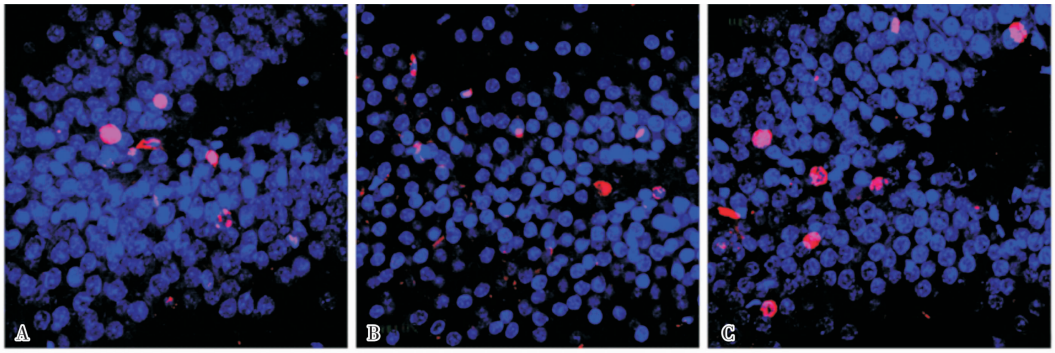
表 3 各组小鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数

Tab. 3 Time in targeted quadrant and the number of platform crossing of mice in each group $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	目标象限停留时间/s	穿越平台次数
假手术组	10	42.4 ± 6.0	5.9 ± 0.7
TBI 组	9	19.4 ± 3.7^{a}	1.9 ± 0.3^{a}
TBI + EGFP 组	12	20.9 ± 3.9^{a}	2.1 ± 0.4^{a}
TBI + ChR2 组	14	34.7 ± 4.2^{bc}	4.4 ± 0.6^{bc}

注:与假手术比较$^{a}P < 0.01$;与 TBI 组比较$^{b}P < 0.01$;与 TBI + EGFP 组比较$^{c}P < 0.05$。

2.4 小鼠海马 DG 区新生神经元存活及成熟情况 结果见图 3。造模后 28 d,TBI 组、TBI + EGFP 组和 TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量分别为(723.4 ± 82.3)、(783.0 ± 89.6)、(3 201.5 ± 365.1)个·mm^{-3};TBI + ChR2 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量明显高于 TBI 组和 TBI + EGFP 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);TBI 组与 TBI + EGFP 组小鼠海马 DG 区新生成熟神经元数量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:TBI 组;B:TBI + EGFP 组;C:TBI + ChR2 组。

图 3 小鼠海马 DG 区新生神经元存活及成熟情况(免疫荧光双标染色,×400)

Fig. 3 Survival and maturity of neonatal neurons in hippocampal DG region of mice in each group (immunofluorescent double labelled staining, ×400)

3　讨论

TBI 可导致成体 NSC 大量增殖。然而,新生的成体 NSC 只有小部分能够存活和分化成熟,最终整合入神经环路。引起新生成体 NSC 死亡的因素有很多,其分化成熟的能力低下是最主要的原因之一。为解决 TBI 后新生细胞低存活和低成熟率的问题,本研究选择光遗传学方法通过膜去极化电激活这些细胞。为了获得 ChR2-EGFP 特异性靶向表达 DCX 蛋白的新生细胞,将慢病毒 ChR2-DCX-EGFP 立体定向注射感染小鼠海马 DG 区神经干细胞,观察到蓝光激活可有效引起表达 DCX 蛋白的细胞发生膜去极化,并且显著促进新生细胞的存活和成熟。

TBI 可诱导海马 DG 区 NSC 增殖并分化为神经元[8]。促进这种新生神经元的生成可修复 TBI 后神经功能[9]。本研究结果显示,TBI 后 7、28 d DG 区有大量新生细胞在初始阶段分化为神经元,但最终只有少数细胞存活并成熟,表明海马 DG 区成体神经发生过程中新生神经元若不能迁移和成熟将最终走向死亡。

电活动在成体神经发生的各个阶段均起着关键作用,尤其是在神经分化阶段[10]。有研究显示,有丝分裂的神经元细胞膜去极化可影响神经元的存活、成熟及功能整合[11],然而,传统的电生理调控技术难以精确调控某一类靶细胞。光遗传学已被用于研究复杂神经元网络的功能[12-13],其可精确的从空间和时间调控成体新生神经元的活动[14-15]。大多数研究利用光遗传学来调控一组细胞或是研究某个神经回路,对于光门控阳离子 ChR2 介导的去极化作用却很少涉及。光遗传学调控神经元功能具有时空精度高的特点,相对于其他传统的电生理技术具有很大的优势,因此,本研究选择光遗传学作为调控细胞去极化工具。ChR2 是研究神经元活动变化的一种强有效工具[16]。在特定的启动子下,EGFP-ChR2 基因可被插入到要调控的细胞中。DCX 基因编码一种相对分子质量 40 000 的微管相关蛋白。新生神经元中 DCX 的缺失会导致严重的形态缺陷和迁移延迟。在成人中枢神经系统中,DCX 主要存在于成体海马 DG 区和侧脑室室管膜下区[17-18]。在成体神经发生过程中,DCX 在增殖的神经祖细胞和有丝分裂后的神经元前体细胞中瞬时表达。DCX 这种特异性表达模式提示可将其作为启动子标记新生神经元。本研究观察到,不仅是未成熟的神经元和神经母细胞表达 DCX 蛋白,2b 型中间祖细胞也有 DCX 蛋白表达,提示表达 DCX 的新生细胞存在一个供调控电活动的长时程窗口。本研究定量结果显示,在 TBI 后 3 d,表达 DCX 的细胞数量开始上升,9 d 达到高峰,12 d 开始下降,表明损伤后 3 ~ 12 d 是光调控神经细胞去极化的最佳时间窗。本研究选择 DCX 作为启动子驱动新生细胞中 ChR2-EGFP 的表达,是因为在各种刺激条件下 DCX 可以保持相对稳定,并且其能长期表达,覆盖细胞存活和成熟的关键期[19]。通过 Morris 水迷宫实验检测,结果发现光调控表达 DCX 细胞的去极化,可以改善 TBI 所致的认知缺陷。本研究还发现,通过免疫荧光共定位染色 BrdU(标记新生细胞)和 NeuN(标记成熟神经元)证实,TBI 后长时间内光调控表达 DCX 细胞的去极化可促进其存活和成熟。

综上所述,本研究采用 ChR2 介导的去极化这种新方法来激活 TBI 后的新生细胞使其趋于成熟。重点关注新生细胞成熟过程中 2b 型中间神细胞至 3 型中间祖细胞的过渡期和非成熟神经元至成熟神经元的过渡期这 2 个关键时期,并选择 DCX 驱动新生细胞中 ChR2-EGFP 的表达,结果发现,表达 DCX 的新生细胞覆盖了这 2 个关键时期,这就为研究 ChR2 介导的光调控新生神经元去极化提供了一个长期而稳定的时间窗。DCX 作为一可靠的启动子,可在时间和空间上精确触发新生神经元去极化,最终促进 TBI 后新生神经元的存活和成熟,且 TBI + ChR2 组小鼠寻找隐匿平台的潜伏期显著缩短,在目标象限停留时间和穿越平台次数显著提高,提示光调控新生细胞去极化可显著改善 TBI 小鼠认知功能缺陷。

参考文献:

[1] KOCHANEK P M, CLARK R S. Traumatic brain injury research highlights in 2015[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(1): 13-15.

[2] 王海涛,王锦波. 重型脑损伤患者早期肝肾功能变化临床研究[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(5): 421-424.

[3] KERNIE S G, PARENT J M. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(2): 267-274.

[4] 杨伟锋,金保哲,张新中,等. 丙戊酸对颅脑损伤大鼠海马成体神经干细胞原位激活的作用[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(6): 469-472.

[5] ZHAO W Y, CHEN S B, WANG J J, *et al*. Establishment of an ideal time window model in hypothermic-targeted temperature management after traumatic brain injury in rats[J]. *Brain Res*, 2017, 1669: 141-149.

[6] HSIEH J, SCHNEIDER J W. Neuroscience. Neural stem cells, excited[J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1534-1535.

[7] MING G L, SONG H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions[J]. *Neuron*, 2011, 70(4): 687-702.

[8] CHEN C, MA T Z, WANG L N, *et al*. Mild hypothermia facilitates

the long-term survival of newborn cells in the dentate gyrus after traumatic brain injury by diminishing a pro-apoptotic microenvironment[J]. *Neuroscience*,2016,335:114-121.

[9] SONG J,ZHONG C,BONAGUIDI M A,*et al*. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision[J]. *Nature*,2012,489(7414):150-154.

[10] SPITZER N C. Electrical activity in early neuronal development [J]. *Nature*,2006,444(7120):707-712.

[11] 路承彪. 基于光敏蛋白的光控技术对神经细胞活动的时空定向控制[J]. 新乡医学院学报,2012,29(3):161-163.

[12] NAKANISHI S,OKAZAWA M. Membrane potential-regulated Ca^{2+} signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells[J]. *J Physiol*,2006,575(Pt 2):389-395.

[13] EL-SHAMAYLEH Y,KOJIMA Y,SOETEDJO R,*et al*. Selective optogenetic control of purkinje cells in monkey cerebellum[J]. *Neuron*,2017,95(1):51-62.

[14] BORDIA T,ZHANG D,PEREZ X A,*et al*. Striatal cholinergic interneurons and D2 receptor-expressing GABAergic medium spiny neurons regulate tardive dyskinesia[J]. *Exp Neurol*,2016,286:32-39.

[15] MELCHIOR J R,FERRIS M J,STUBER G D,*et al*. Optogenetic versus electrical stimulation of dopamine terminals in the nucleus accumbens reveals local modulation of presynaptic release[J]. *J Neurochem*,2015,134(5):833-844.

[16] YIZHAR O,FENNO L E,DAVIDSON T J,*et al*. Optogenetics in neural systems[J]. *Neuron*,2011,71(1):9-34.

[17] GU Y,ARRUDA-CARVALHO M,WANG J,*et al*. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells[J]. *Nat Neurosci*,2012,15(12):1700-1706.

[18] KARL C,COUILLARD-DESPRES S,PRANG P,*et al*. Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence[J]. *J Neurochem*,2005,92(2):264-282.

[19] 姜春莲,汪艳璐,罗玉萍. 成年哺乳动物神经发生的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2017,37(5):107-112.

[20] ZHANG J,GIESERT F,KLOOS K,*et al*. A powerful transgenic tool for fate mapping and functional analysis of newly generated neurons[J]. *BMC Neurosci*,2010,11:158.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 857 页)

[4] TSAO S M,YIN M C. Antioxidative and antiinflammatory activities of asiatic acid,glycyrrhizic acid,and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells[J]. *J Agric Food Chem*,2015,63(12):3196-3204.

[5] ALEM F,YAO K,LANE D,*et al*. Host response during *Yersinia* pestis infection of human bronchial epithelial cells involves negative regulation of autophagy and suggests a modulation of survival-related and cellular growth pathways[J]. *Fron Microbiol*,2015,6:50.

[6] KIDO H,YOKOGOSHI Y,SAKAI K,*et al*. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells:a possible activator of the viral fusion glycoprotein[J]. *J Biol Chem*,1992,267(19):13573-13579.

[7] 高元妹,徐军. 组织贴块法人的支气管上皮细胞的原代培养[J]. 国际呼吸杂志,2008,28(7):397-399.

[8] 秦晓群,孙秀泓,张长青. 联合应用酶消化和机械刷洗提取气道上皮细胞的实验技术[J]. 湖南医科大学学报,1999,24(1):74-76.

[9] 张景熙,李强,白冲,等. 经纤维支气管镜刷检人支气管上皮细胞的原代培养[J]. 第二军医大学学报,2004,25(7):791-792.

[10] WIDDICOMBE J H,COLEMAN D L,FINKBEINER W E. Primary cultures of the dog's tracheal epithelium:fine structure,fluid,and electrolyte transport[J]. *Cell Tissue Res*,1987,247(1):95-103.

[11] REUS A A,MAAS W J,JANSEN H T,*et al*. Feasibility of a 3D human airway epithelial model to study respiratory absorption [J]. *Toxicol In Vitro*,2014,28(2):258-264.

[12] 李茂中,庞立丽,王宏,等. 人气管上皮细胞的原代分离及气液界面培养[J]. 中国生物制品学杂志,2016,29(1):65-69.

[13] YUAN C,HE Q,LI J M,*et al*. Evaluation of embryonic age and the effects of different proteases on the isolation and primary culture of chicken intestinal epithelial cells *in vitro*[J]. *Anim Sci J*,2015,86(6):588-594.

[14] COMER D M,ELBORN J S. Comparison of nasal and bronchial epithelial cells obtained from patients with COPD[J]. *PLoS One*,2012,7(3):e32924.

[15] 高元妹,张平,夏旸,等. 人支气管上皮细胞原代培养方法的对比研究[J]. 实用医学杂志,2011,27(15):2698-2700.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)