

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.17.002

cGMP 通路激活对小鼠脑缺血后神经发生的作用^{*}校 欢¹, 承欧梅², 韩 萍³, 谭 瑞^{4△}

1. 成都医学院第二附属医院·核工业四一六医院药学部, 四川成都 610066; 2. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016; 3. 重庆大学附属人民医院医务处, 重庆 401147; 4. 重庆医科大学附属巴南医院药剂科, 重庆 401320

摘 要:目的 观察小鼠脑缺血后海马体神经发生的变化及其与环磷酸鸟苷(cGMP)相关调节机制。

方法 76 只 C57BL/6 雄性小鼠按照随机数字表法分为假手术组和模型组, 每组 38 只, 采用双侧颈总动脉夹闭法建立脑缺血模型。采用 Morris 水迷宫检测其学习记忆功能, 采用苏木精-伊红(HE)染色法检测海马体 CA1 区病理变化, 采用免疫荧光法检测海马体齿状回神经发生标志物 5'-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、双肾上腺皮质激素(DCX)、BrdU/神经元核抗原(NeuN)阳性细胞数的表达, 采用比色法、硝酸还原法分别检测海马体一氧化氮合酶(NOS)活性和一氧化氮(NO)水平, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 cGMP 水平和磷酸二酯酶(PDE)9 活性, 采用 Western bolt 法检测 cGMP 依赖性蛋白激酶 G(PKG)、脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达。**结果** 多变量方差分析结果显示, 在训练 2~5 d, 在相同训练天数模型组小鼠逃避潜伏期的时间同假手术组相比明显延长, 差异均有统计学意义($F=13.683, 8.625, 73.266, 90.327, P<0.05$)。在第 6 天的空间探索试验中, 假手术组、模型组小鼠穿越平台次数分别为(6.67 ± 1.37)、(1.67 ± 0.51)次, 模型组小鼠穿越平台次数明显少于假手术组, 差异有统计学意义($t=8.300, P<0.05$)。模型组海马体 CA1 区锥体神经元数目明显减少, 差异有统计学意义($P<0.05$), 提示脑缺血模型建立成功; 与假手术组比较, 模型组小鼠海马体齿状回神经发生标志物 BrdU、DCX、BrdU/NeuN 阳性细胞数明显增加, 同时 NOS 活性下降, NO 生成减少, PDE9 活性降低, 而 cGMP 水平增加, PKG 和 BDNF 蛋白表达上调, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PDE9 活性降低, cGMP-PKG 信号通路激活可能参与促进小鼠脑缺血后海马体神经发生过程。

关键词:脑缺血; 海马体; 神经发生; 一氧化氮; 磷酸二酯酶; 环磷酸鸟苷

中图分类号: R446.9; R743

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)17-2470-06

The effect of cGMP pathway activation on neurogenesis after cerebral ischemia in mice^{*}XIAO Huan¹, CHENG Oumei², HAN Ping³, TAN Rui^{4△}

1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, China National Nuclear Corporation 416 Hospital, Chengdu, Sichuan 610066, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Medical Service, Chongqing General Hospital, Chongqing University, Chongqing 401147, China; 4. Department of Pharmacy, Banan Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401320, China

Abstract: Objective To observe the changes of hippocampal neurogenesis after cerebral ischemia and its mechanism related to cyclic guanosine phosphate (cGMP) in mice. **Methods** A total of 76 C57BL/6 male mice were randomly divided into sham group and model group, with 38 mice in each group. The model of cerebral ischemia was induced via bilateral common carotid artery occlusion. Morris water maze was applied to assess spatial learning and memory of the mice, and Hematoxylin-Eosin (HE) staining was executed to appraise the pathological changes in the hippocampal CA1 region. Immunofluorescence was implemented to detect the count of positive cells of 5'-Bromo-2-deoxy Uridine (BrdU), doublecortin (DCX) and BrdU/Neuro-specific nuclear-binding protein (NeuN), the markers of neurogenesis in hippocampal dentate gyrus. The Nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide(NO) content were inspected by colorimetric and nitric acid reduction methods respectively. The cGMP level and phosphodiesterase (PDE) 9 activity were examined by ELISA kits, while cGMP dependent protein kinase G (PKG) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein ex-

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81871002)。

作者简介: 校欢, 女, 药师, 主要从事药物神经作用研究。△ 通信作者: E-mail: ruirui0615@163.com。

pression were determined by Western bolt. **Results** During the 2–5 days training period, the escape latency of the model group mice was significantly prolonged compared to the sham group, the differences were statistically significant ($F=13.683, 8.625, 73.266, 90.327, P<0.05$). In the space exploration experiment on the 6th day, the number of times the sham group and model group mice crossed the platform were (6.67 ± 1.37) and (1.67 ± 0.51) times respectively. The number of times the model group mice crossed the platform was significantly less than that of the sham group, the difference was statistically significant ($t=8.300, P<0.05$). The number of pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region of the model group reduced significantly ($P<0.05$), indicating the successful establishment of the cerebral ischemia model. Compared with the sham group, the model group showed a significant increase in the number of BrdU, DCX, BrdU/NeuN positive cells in the hippocampal dentategyrus, while the activity of NOS decreased, NO generation decreased, PDE9 activity decreased, and cGMP levels increased, PKG and BDNF expression upregulated, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Cerebral ischemia could promote hippocampal neurogenesis in mice, which may be, at least partly, related to the decreased activity of PDE9, and the activation of cGMP-PKG signaling pathway.

Key words: cerebral ischemia; hippocampus; neurogenesis; nitric oxide; phosphodiesterase; cyclic guanosine phosphate

脑卒中又称“中风”，是由脑部血管阻塞或血管突然破裂引起脑组织损伤的神经疾病，是全球第五大死亡原因，也是当前成年人常见致残的主要原因^[1]。脑卒中可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中两类，其中超过 80% 为缺血性脑卒中^[2]。目前，国内外尚无正式批准用于防治脑缺血的神经保护剂^[3]。近年来，研究人员认识到中枢神经系统的高度可塑性，发现其可以在损伤后重组，在一定程度上可以恢复结构和功能^[4-5]。因此，脑缺血后大脑自我修复过程成为关注的焦点。脑缺血后的神经元再生可以通过内源性神经发生和外源性移植来实现^[6-7]。内源性神经发生可促进神经功能的恢复，其过程是通过激活体内神经干细胞 (NSCs) 增殖和分化，最后将其迁移并整合到受损区域发挥作用^[8]。与外源性 NSCs 移植相比，内源性神经发生没有伦理问题或移植排斥反应^[9-10]。然而，来自患者自身 NSCs 数量太少，不足以满足脑缺血后的组织修复和功能恢复^[11]。因此，缺血性损伤后促进自身内源性神经发生可能是脑缺血损伤有效的治疗手段之一。近年研究证实，mTOR、Wnt/ β -Catenin 和 Notch 信号通路等一系列复杂的调控机制参与脑缺血后的神经发生^[1]。环磷酸鸟苷 (cGMP) 是细胞内信息传递第二信使蛋白，其下游效应子是神经发生、髓鞘形成、血管重塑和神经可塑等多种细胞功能的关键信号分子^[12-14]，升高 cGMP 水平可能是促进内源性神经发生的有效方法。cGMP 水平因一氧化氮 (NO) 活化鸟苷酸环化酶 (GC) 合成而升高，因被磷酸二酯酶 (PDE) 水解而下降，其水平受多靶点影响。本研究拟通过双侧颈总动脉夹闭法 (BCCAO) 建立小鼠脑缺血的模型，观察脑缺血对小鼠海马体神经发生的影响，并探讨其与 cGMP 可能的相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源

实验动物中心，均为清洁级健康的 C57BL/6 小鼠，雄性，7~8 周龄，体质量 (24 ± 2) g，许可证号为 SCXK (渝)2018-0003。小鼠饲养环境条件：温度 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $(60\pm 5)\%$ ，模拟 12 h 光暗交替周期，自由进食和饮水。按照动物实验伦理规范进行实验。

1.2 仪器与试剂 使用的主要仪器包括光学显微镜 (日本 Nikon 公司)、激光共聚焦显微镜 (日本 Nikon 公司)、UV-VIS3150 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司)、Denley Dragon Wellscan MK3 酶标仪 (美国 Thermo)、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)、Morris 水迷宫系统 (瑞沃德生命科技有限公司)。5'-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU，纯度 99%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司；大鼠抗 BrdU 单克隆抗体、双肾上腺皮质激素 (DCX) 兔抗单克隆抗体、脑源性神经营养因子 (BDNF) 单克隆兔抗神经元抗体、神经元核抗原 (NeuN) 单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司；DyLight 594 标记羊抗大鼠 IgG 购自美国 Immunoway 公司；NO 检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；一氧化氮合酶 (NOS) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所；小鼠 cGMP、PDE9 检测试剂盒购自江苏酶标生物科技有限公司；cGMP 依赖性蛋白激酶 G (PKG) 兔抗多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司；DyLight 488 标记羊抗兔 IgG 购自美国 Proteintech 公司。

1.3 方法

1.3.1 分组 将 76 只小鼠按照随机数字表法分为假手术组和模型组，各 38 只。每组 6 只小鼠用于 Morris 水迷宫检测认知功能，4 只用于苏木精-伊红 (HE) 染色法观察脑组织病理学变化，用于 BrdU、DCX、BrdU/NeuN 免疫荧光染色法观察新成熟海马体神经元各 4 只，4 只用于比色法检测 NOS 活性，4 只用于硝酸还原酶法检测 NO 水平，4 只用于酶联免

疫吸附试验(ELISA)检测 cGMP、PDE9 水平,4 只用于 Western blot 检测 PKG、BDNF 蛋白表达。

1.3.2 模型建立 采用小鼠 BCCAO 构建脑缺血模型^[15]。首先,采用 3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行腹腔注射麻醉,然后用玻璃分针游离左、右颈总动脉,动脉夹将其夹闭,时长 20 min,最后取下动脉夹,缝合颈部的切口。假手术组不用动脉夹夹闭,仅需游离出双侧颈总动脉即可。整个手术过程中,采用恒温毯维持小鼠体温恒定。自建模后第 9~12 天,连续 4 d,所有小鼠每天腹腔注射 BrdU 50 mg/kg,实验结束时观察海马体齿状回神经发生的变化。

1.3.3 认知功能检测 脑缺血后第 29 天,每组随机选取 6 只小鼠进行 Morris 水迷宫实验^[16]。先定位航行训练 5 d,即将小鼠从面向池壁的 3 个象限(不包括有平台的目标象限)之一放入,记录小鼠在 60 s 内找到隐藏平台的游泳时间,若小鼠在 60 s 内未找到平台,则将其引导至平台并放置 20 s。每天将小鼠置于不同象限的不同起始位置重复 4 次实验。第 6 天进行空间探索实验,将隐藏平台从池中移除后,小鼠面向目标象限对面位置的水箱壁置于池中自由游泳,记录小鼠 60 s 内穿越平台的次数。

1.3.4 脑组织病理学观察 脑缺血后第 8 天,每组随机选取 4 只小鼠用于 HE 染色,经主动脉用等渗氯化钠溶液快速心脏灌注后,4%多聚甲醛缓慢灌注,断头取脑组织,脑组织在 4℃环境下固定 24 h,通过乙醇脱水水沉底,石蜡缸包埋制成蜡块,制作为 5 μm 脑组织切片。在 400×光学显微镜下,观察海马体 CA1 区锥体神经元的形态变化及拍照采图,采用 Image-pro plus 6.0 进行神经元细胞计数。

1.3.5 检测新成熟海马体神经元 脑缺血后第 15 天,每组随机分别取 4 只小鼠用于 BrdU、DCX 免疫荧光染色检测新生神经元;脑缺血后第 29 天,每组随机取 4 只小鼠用于 BrdU/NeuN 免疫荧光染色检测成熟神经元。采用 4%多聚甲醛进行小鼠心脏灌注,断头取脑组织,脑组织在 4℃环境下固定 24 h,然后依次放入 20%、30% 的蔗糖溶液进行梯度脱水,通过冰冻切片机制作厚度为 10 μm 的厚切片,置于 -80℃低温冰箱中保存备用。4℃孵育一抗大鼠 BrdU(1:200)、兔抗小鼠 DCX(1:200)、兔抗小鼠 NeuN(1:200)过夜;次日采用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,采用荧光二抗山羊抗大鼠 Dy Light 594(1:200)、山羊抗兔 Alexa Fluor 488(1:200) 37℃避光条件下孵育 2 h,采用 DAPI 进行核染色 5 min,甘油封片。在激光共聚焦显微镜下,观察海马体齿状回 BrdU、DCX、BrdU/NeuN 阳性细胞数,采用 Image-pro plus 6.0 进行荧光图像分析。

1.3.6 检测 NOS 活力及 NO 水平 脑缺血后第 29 天,每组随机分别选取 4 只小鼠取其海马体组织,与组织裂解液充分混匀、裂解,研磨成组织匀浆,离心

3~5 min 后,取上清液,严格按照 NOS 比色法检测试剂盒和 NO 硝酸还原酶法检测试剂盒的说明书,在 530 nm 和 540 nm 处用酶标仪检测其吸光度,分别计算 NOS 活力和 NO 水平。

1.3.7 检测 cGMP、PDE9 水平 脑缺血后第 29 天,每组随机选取 4 只小鼠取其海马体组织,与生理盐水充分混匀后,研磨成组织匀浆,离心 3~5 min 后,取上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤,在 450 nm 波长处用酶标仪测量各孔吸光度,分别计算 cGMP 和 PDE9 水平。

1.3.8 检测 PKG、BDNF 蛋白表达 脑缺血后第 29 天,每组随机选取 4 只小鼠取其海马体组织,使用含 PMSF 的 RIPA 裂解液从海马体组织分离总蛋白,BCA 法检测总蛋白水平。聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜后,将膜在含 5%脱脂牛奶的缓冲液中孵育 1 h,与一抗 β-actin(1:2 000)、PKG(1:2 000)及 BDNF(1:2 000),在 4℃条件下孵育过夜,然后再加辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,采用增强型化学发光检测系统检测蛋白印迹,显影后采用 Image Lab 4.1 进行蛋白表达水平分析。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 和 SPSS27.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,重复测量资料进行重复测量方差分析,若存在交互效应,则进一步做单独效应分析,通过单因素重复测量方差分析组内效应,通过多变量方差分析组间效应。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑缺血对小鼠的空间探索学习和记忆认知水平的影响 重复测量方差分析结果显示,两组小鼠逃避潜伏期存在时间、组间、交互效应($F_{\text{时间}} = 134.022$ 、 $P_{\text{时间}} < 0.001$, $F_{\text{组间}} = 47.200$ 、 $P_{\text{组间}} < 0.001$, $F_{\text{交互}} = 6.470$ 、 $P_{\text{交互}} < 0.05$)。单因素重复测量方差分析结果显示,假手术组小鼠不同训练天数逃避潜伏期比较,训练 4 d < 训练 3 d < 训练 2 d < 训练 1 d,差异有统计学意义($P < 0.05$),但训练 4 d 与训练 5 d 逃避潜伏期比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组小鼠不同训练天数逃避潜伏期比较,训练 5 d < 训练 3 d < 训练 2 d < 训练 1 d,差异有统计学意义($P < 0.05$),但训练 3 d 与训练 4 d 逃避潜伏期比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。多变量方差分析结果显示,两组小鼠训练 1 d 逃避潜伏期比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);但在训练 2~5 d,模型组小鼠逃避潜伏期的时间同假手术组相比明显延长,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。在第 6 天的空间探索试验中,假手术组、模型组小鼠穿越平台次数分别为(6.67 ± 1.37)、(1.67 ± 0.51)次,模型组小鼠穿越平台次数明显少于假手术组,差异有统计学意义($t = 8.300$, $P <$

0.05)。

2.2 脑缺血后海马体组织病理学改变 脑缺血后第 8 天,假手术组小鼠海马体 CA1 区锥体神经元细胞核呈圆形且饱满,细胞结构清晰,排列紧密整齐;而模型组神经元细胞核呈不同程度的固缩、碎裂、溶解,细胞排列紊乱,间隙增大,见图 1。模型组、假手术组正常锥体神经细胞数目分别为(18.00±5.88)、(84.00±6.16)个,模型组较假手术组明显减少,差异有统计学

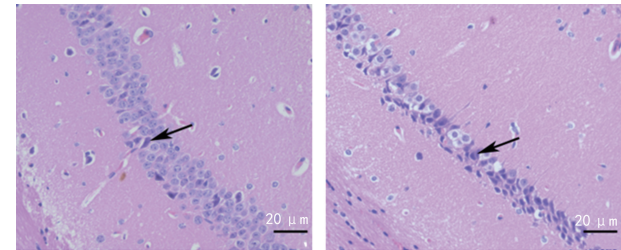
意义($t=15.48,P<0.001$)。

2.3 脑缺血后海马体神经发生的变化 脑缺血后的第 15 天,通过对比计数发现,与假手术组相比,模型组小鼠的海马体齿状回颗粒下层 BrdU 和 DCX 阳性细胞数均有明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$);脑缺血后的第 29 天,模型组小鼠的海马体齿状回颗粒下层 BrdU/NeuN 阳性细胞数也明显增加,差异有统计学意义($P<0.001$)。见图 2 及表 2。

表 1 不同训练天数两组小鼠逃避潜伏期比较($\bar{x}\pm s,s$)

组别	<i>n</i>	训练 1 d	训练 2 d	训练 3 d	训练 4 d	训练 5 d	<i>F</i>	<i>P</i>
假手术组	6	50.78±5.21	37.40±4.71 ^①	24.77±4.02 ^{①②}	13.02±2.91 ^{①②③}	9.87±1.82 ^{①②③}	137.352	<0.001
模型组	6	55.58±1.42	46.21±4.23 ^①	38.89±3.30 ^{①②}	34.63±3.26 ^{①②}	23.92±4.93 ^{①②③④}	61.528	<0.001
<i>F</i>		4.222	13.683	8.625	73.266	90.327		
<i>P</i>		0.067	0.004	0.015	<0.001	<0.001		

注:与同组训练 1 d 比较,^① $P<0.05$;与同组训练 2 d 比较,^② $P<0.05$;与同组训练 3 d 比较,^③ $P<0.05$;与同组训练 4 d 比较,^④ $P<0.05$ 。



假手术组 模型组
图 1 脑缺血后小鼠海马体 CA1 区病理的变化

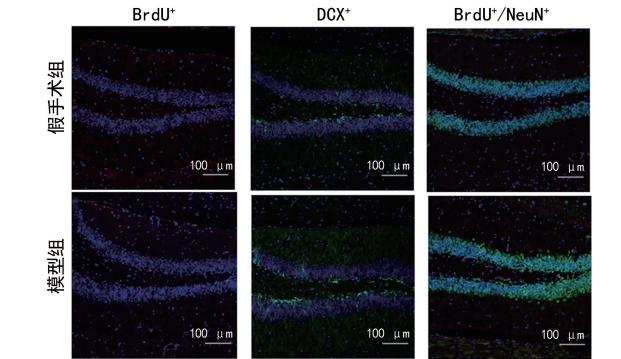


图 2 脑缺血后小鼠海马体齿状回的神经发生的情况

表 2 各组小鼠脑缺血后海马体齿状回新生阳性细胞数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	BrdU* (个)	DCX*	BrdU [#] / NeuN [#] (个)
假手术组	4	4.00±0.81	473.00±69.45	4.00±1.41
模型组	4	12.75±1.70	694.50±40.81	10.25±1.26
<i>t</i>		−9.245	−5.499	−6.603
<i>P</i>		<0.001	0.002	<0.001

注:*为脑缺血后第 15 天检测;#为脑缺血后第 29 天检测。

2.4 脑缺血后海马体 NOS 活性和 NO 生成的变化 与假手术组比较,模型组小鼠 NOS 活性和 NO

水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组小鼠脑缺血后海马体 NOS 活性和 NO 水平变化($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	NOS(U/mL)	NO(μmol/L)
假手术组	4	1.36±0.35	26.70±1.20
模型组	4	0.57±0.11	10.12±1.97
<i>t</i>		4.269	14.380
<i>P</i>		0.005	<0.001

2.5 脑缺血后海马体 PDE9、cGMP 及 PKG、BDNF 蛋白表达的变化 与假手术组比较,模型组小鼠 PDE9 活性降低,cGMP 水平明显升高,PKG 和 BDNF 蛋白表达均明显上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3 及表 4。

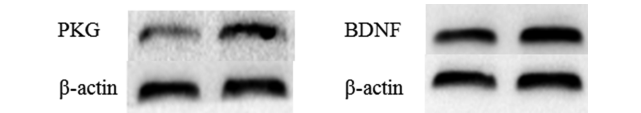


图 3 脑缺血后小鼠海马体 PKG 和 BDNF 蛋白表达情况

表 4 各组小鼠脑缺血后海马体 PDE9、cGMP 及 PKG、BDNF 水平的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PDE9 (nmol/L)	cGMP (nmol/L)	PKG 蛋白	BDNF 蛋白
假手术组	4	24.81±2.11	0.78±0.12	0.48±0.04	0.78±0.07
模型组	4	17.57±1.55	1.69±0.44	0.65±0.13	1.05±0.12
<i>t</i>		5.530	−4.005	−3.449	−4.006
<i>P</i>		0.002	0.007	0.013	0.007

3 讨 论

脑缺血是一种严重的脑血管疾病,具有高发病

率、高致残率和高病死率的特征^[17],但对于脑缺血损伤,目前临床上还没有公认有效的防治手段。研究发现,脑缺血后内源性 NSCs 自我更新和分化的能力被激活,不断增殖分化为神经元,并逐渐发育成熟向受损区域迁移,最终整合进受损脑区周围的神经环路,形成神经网络以减少脑缺血损伤,为神经修复和认知功能改善提供了可能^[6]。但内源性神经发生的新生神经元数量十分有限,存活率非常低,与正常神经元在突触传递等方面也存在一定差异,内源性新生神经元不足以补充脑缺血患者损伤丢失的神经元^[18]。海马体在人类大脑学习和记忆等认知功能中发挥着重要的作用,促进海马体内源性神经发生已经成为脑缺血后神经认知功能修复的一个新方向。因此,深入研究其可能靶标和作用机制具有重要的意义。

本研究结果显示,脑缺血后,同假手术组相比,模型组小鼠海马体的 CA1 区锥体神经元细胞核固缩、碎裂,细胞间隙增大,排列紊乱,呈网状疏松状态,同时,正常锥体神经细胞数目明显减少,提示模型组出现脑缺血病理改变。在 Morris 水迷宫定位航行实验中,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长;在空间探索实验中,模型组小鼠 60 s 内穿越过平台的次数也明显较假手术组减少,这些结果表明模型组小鼠学习和记忆能力下降。上述病理和行为学检测提示脑缺血模型建立成功。BrdU 是胸腺嘧啶核苷的衍生物,可在细胞周期合成时结合到 DNA 中,已被广泛用作活组织中细胞增殖和神经发生的标志物;DCX 是一种新生神经元的特异性标志物,常用来检测海马体齿状回新生神经元的数量;NeuN 是一种神经元特异性核蛋白,主要在成熟的神经元中表达。本实验中,模型组小鼠海马体齿状回神经发生标志物 BrdU、DCX 和 BrdU/NeuN 阳性细胞数均明显增加,提示模型组小鼠脑缺血后海马体出现了 NSCs 增殖分化、迁移,并发育为成熟的功能性神经元,出现了内源性神经发生。但是,模型组小鼠的空间探索学习及记忆等认知功能水平明显下降,提示脑缺血后虽然海马体出现内源性神经发生,但不足以修复和维持缺血损伤后的认知功能。

神经发生是由网状多靶标介导的一系列复杂机制调控的终产物^[19]。研究发现,cGMP-PKG 通路可以介导脑血管舒张,促进侧支循环形成,减少梗死面积等^[20]。且 PKG 进一步诱导 cGMP 反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,促进 BDNF 转录,刺激细胞增殖、分化、存活等,从而参与调节海马体神经发生,改善神经损伤^[21-23]。本研究结果与之一致,小鼠脑缺血损伤后海马体出现神经发生,同时 cGMP 水平增加,PKG 及 BDNF 蛋白表达上调,即 cGMP-PKG 通路被激活。

cGMP 水平取决于 GC 和 PDE 作用的动态平衡^[24]。NO 通过激活 GC,使 cGMP 合成增加^[25],而

后经 PDE 水解,cGMP 水平下降。现有研究发现,哺乳动物的 PDE 有 11 个亚家族。其中,PDE9 是细胞内 cGMP 特异性的水解酶之一,其在海马体不同区域中广泛表达,与学习记忆和情绪密切相关^[26]。有研究提示,PDE9 抑制剂在脑缺血后抑制细胞凋亡,促进神经元修复,产生神经保护作用^[27]。因此,NO 和 PDE9 都可能是上调 cGMP 水平,刺激海马体内源性神经发生,改善认知功能的重要靶点。本研究结果显示,脑缺血小鼠 NOS 活性和 NO 水平降低,同时 PDE9 活性也降低。该结果提示,脑缺血后 cGMP 水平增加可能是由于 PDE9 活性降低,使 cGMP 水解减少所致;并不是通过 NO 激活 GC 而使 cGMP 生成增加。

目前,内源性神经发生在脑缺血损伤中的作用已经引起相关领域的广泛关注,PDE9-cGMP-PKG 信号通路的激活可能在各种原因导致脑缺血后神经元损伤的自我修复中有重要意义,激活该通路或作用于相应靶点可加速受损神经组织的修复进程,改善患者认知功能障碍和促进神经功能恢复,降低患者的残疾率和病死率,提高其生活质量,减轻社会医疗负担。本研究结果为 PDE9-cGMP 作为脑缺血后神经损伤修复及相关新药研发的作用靶点提供了基础实验依据,在缺血性脑卒中的临床预防治疗方面具有较大的应用潜力,值得进行更多深入研究。

综上所述,脑缺血损伤后海马体内源性神经发生可能与 PDE9 活性降低,cGMP 降解减少,从而激活 cGMP-PKG 信号通路有关。

参考文献

- [1] LI W, YE A, LI Y, et al. Protective mechanism and treatment of neurogenesis in cerebral ischemia[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(10): 2258-2277.
- [2] TSAO C W, ADAY A W, A MARTIN S S, et al. Heart disease and stroke statistics—2022 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639.
- [3] LI J, ZHAO T, SUN P, et al. Research progress of natural products for the treatment of ischemic stroke[J]. *J Integr Neurosci*, 2022, 21(1): 14.
- [4] ESENWA C, GUTIERREZ J. Secondary stroke prevention: challenges and solutions[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2015, 11: 437-450.
- [5] KERR A L, CHENG S Y, JONES T A. Experience-dependent neural plasticity in the adult damaged brain[J]. *J Commun Disord*, 2011, 44(5): 538-548.
- [6] JIN H Q, JIANG W F, CHU L S, et al. miR-199a-5p enhances neuronal differentiation of neural stem cells and promotes neurogenesis by targeting Cav-1 after cerebral ischemia[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(12): 3967-3979.
- [7] YANG X Y, ZHANG X, CHEN L, et al. Routes and methods of neural stem cells injection in cerebral ische-

mia[J]. Ibrain, 2023, 9(3): 326-339.

[8] HATAKEYAMA M, NINOMIYA I, KANAZAWA M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 16-19.

[9] TANG H, LI Y, ZHANG J H, et al. Endogenous neural stem cell-induced neurogenesis after ischemic stroke: processes for brain repair and perspectives [J]. Transl Stroke Res, 2023, 14(3): 297-303.

[10] GONG S, SHAO H, ZHU J, et al. Astrocyte-derived neuronal transdifferentiation as a therapy for ischemic stroke: advances and challenges [J]. Brain Sci, 2022, 12(9): 1175.

[11] CEANGA M, DAHAB M, WITTE OW, et al. Adult neurogenesis and stroke: a tale of two neurogenic niches[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 700297.

[12] KNOTT E P, ASSI M R, PEARSE D D, et al. Phosphodiesterase inhibitors as a therapeutic approach to neuroprotection and repair[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4): 696.

[13] ATOCHIN D N, YUZAWA I, BUYS E S, et al. Soluble guanylate cyclase $\alpha 1\beta$ limits stroke size and attenuates neurological injury [J]. Stroke, 2010, 41(8): 1815-1819.

[14] CORREIA S S, IYENGAR R R, CURRIE M G, et al. The CNS-Penetrant soluble guanylate cyclase stimulator CY6463 reveals its therapeutic potential in neurodegenerative diseases[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 656561.

[15] WAHUL A B, JOSHI P C, CHAKRAVARTY S, et al. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral Common Carotid Arterial Occlusion (BCCAO) mouse model[J]. J Chem Neuroanat, 2018, 92: 1-15.

[16] SUN S, ZHOU J, TIAN Y, et al. Progranulin promotes hippocampal neurogenesis and alleviates anxiety-like behavior and cognitive impairment in adult mice subjected to cerebral ischemia [J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(5): 775-787.

[17] XU Y, CAO S, GOU X J, et al. Comparative efficacy and safety of Chinese patent medicines of acute ischemic stroke: a network meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(42): e35129.

[18] TURCATO F, KIM P, BARNETT A, et al. Sequential combined treatment of pifithrin- α and posiphen enhances neurogenesis and functional recovery after stroke[J]. Cell Transplant, 2018, 27(4): 607-621.

[19] MARQUES B L, CARVALHO G A, FREITA S E M, et al. The role of neurogenesis in neurorepair after ischemic stroke[J]. Semin Cell Dev Biol, 2019, 95: 98-110.

[20] ZHANG C, GAI J, TANG J, et al. Exploring the molecular mechanism of Nux Vomica in treating ischemic stroke using network pharmacology and molecular docking methods[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(16): e33625.

[21] MA S, FAN W, ZHANG J. Network pharmacology study on the potential effect mechanism of Chuanzhi Tongluo Capsule in the treatment of cerebral infarction[J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(41): e30916.

[22] LEE S S, KIM C J, LIM B V, et al. Treadmill exercise ameliorates memory impairment through ERK-Akt-CREB-BDNF signaling pathway in cerebral ischemia gerbils[J]. J Exerc Rehabil, 2020, 16(1): 49-57.

[23] ÖLMESTIG J N E, MARLET I R, HAINSWORTH A H, et al. Phosphodiesterase 5 inhibition as a therapeutic target for ischemic stroke: a systematic review of preclinical studies[J]. Cell Signal, 2017, 38: 39-48.

[24] LIAO Y F, PAN H J, HUANG S, et al. Functional axis of PDE5/cGMP mediates timosaponin-A III -elicited growth suppression of glioblastoma U87MG cells[J]. Molecules, 2023, 28(9): 3795.

[25] LI D Y, GAO S J, MEI W, et al. Targeting the nitric oxide/cGMP signaling pathway to treat chronic pain [J]. Neural Regen Res, 2023, 18(5): 996-1003.

[26] LANDUCCI E, RIBAUDO G, GIANONCELLI A, et al. Virtual screening-accelerated discovery of a phosphodiesterase 9 inhibitor with neuroprotective effects in the kainate toxicity in Vitro model [J]. ACS Chem Neurosci, 2023, 14(20): 3826-3838.

[27] YOU J Y, LIU X W, LIU P Q, et al. A novel phosphodiesterase 9A inhibitor LW33 protects against ischemic stroke through the cGMP/PKG/CREB pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 925: 174987.

(收稿日期: 2024-02-27 修回日期: 2024-04-28)

(上接第 2469 页)

[21] 徐晓冬, 尚丽新, 曲冬颖. 孕早期血清胎盘生长因子、妊娠相关蛋白-A、 β -人绒毛膜促性腺激素检测联合子宫动脉血流参数对子痫前期预测价值研究[J]. 临床军医杂志, 2021, 49(1): 44-46.

[22] RYABOV V V, VOROBEOVA D A, KOLOGRIVOVA I V, et al. Pro-inflammatory biomarkers and progression of atherosclerosis in patients with myocardial infarction with non-obstructive coronary artery disease: 1-year follow-up [J]. J Pers Med, 2023, 13(12): 1669.

[23] 蔡姝萍, 刘美香, 马丽丽. 急性脑梗死患者合并 OSAHS 的严重程度与血清 MMP-9、PLGF 水平的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(17): 4150-4152.

[24] 沈劼, 蔡俊杰, 朱蓓雯. 静脉血浆中血栓调节蛋白、凝血酶-抗凝血酶复合物、组织型纤溶酶原激活剂-抑制物复合物、纤溶酶-抗纤溶酶复合物水平联合 Caprini 评分预测剖宫产术后下肢深静脉血栓形成风险[J]. 中国性科学, 2023, 32(3): 75-79.

(收稿日期: 2024-01-15 修回日期: 2024-04-28)