

# 褪黑素对慢性脑低灌注大鼠脑白质的保护作用

李丹丹 黄敏莹 赵弘轶 夏振西 黄勇华

**【摘要】** 目的 探讨褪黑素对脑小血管病模型大鼠社交行为和脑白质损害的改善作用及其药理学机制。方法 采用双侧颈总动脉结扎法制备慢性脑低灌注模型,44 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、褪黑素 5 mg/(kg·d) 组和 10 mg/(kg·d) 组(每组各 11 只),分别以嗅探实验(嗅探时间和穿越次数)评价模型大鼠社交行为、倒置相差荧光显微镜观察胼胝体髓鞘碱性蛋白(MBP)表达水平、透射电子显微镜观察胼胝体白质髓鞘完整性(即 G-ratio)、Western blotting 法测定磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(pTOR)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)比值。结果 与假手术组相比,模型组大鼠嗅探时间( $t = 58.000, P = 0.000$ )和穿越次数( $t = 20.000, P = 0.000$ )减少,胼胝体 MBP 阳性细胞数目减少( $t = 20.400, P = 0.000$ )、G-ratio 表达水平升高( $t = -9.800, P = 0.025$ )、pTOR/mTOR 比值降低( $t = 20.336, P = 0.000$ );予褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后,大鼠嗅探时间( $t = -12.600, P = 0.001; t = -26.000, P = 0.000$ )和穿越次数( $t = -8.400, P = 0.000; t = -10.200, P = 0.000$ )、胼胝体 pTOR/mTOR 比值( $t = -6.022, P = 0.014; t = -8.800, P = 0.001$ )高于模型组但仍低于假手术组( $t = 45.000, P = 0.000; t = 32.000, P = 0.000; t = 11.600, P = 0.000; t = 9.800, P = 0.000; t = 14.314, P = 0.000; t = 11.536, P = 0.000$ ),同时胼胝体 MBP 阳性细胞数目亦增加( $t = -16.800, P = 0.001; t = -20.600, P = 0.000$ )、G-ratio 表达水平降低( $t = 8.600, P = 0.041; t = 9.200, P = 0.030$ )但接近假手术组水平(均  $P > 0.05$ );褪黑素 10 mg/(kg·d) 组大鼠嗅探时间延长并且高于 5 mg/(kg·d) 组( $t = -13.400, P = 0.000$ )。结论 褪黑素可以有效改善脑小血管病模型大鼠社交行为、减轻脑白质损害,其机制可能与提高 mTOR 磷酸化水平有关。

**【关键词】** 大脑小血管疾病; 褪黑激素; 白质; 疾病模型,动物

## Protective role of melatonin against white matter lesions induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats

LI Dan-dan, HUANG Min-ying, ZHAO Hong-yi, XIA Zhen-xi, HUANG Yong-hua

Department of Neurology, the Seventh Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100700, China

Corresponding author: HUANG Yong-hua (Email: huangyh@163.com)

**【Abstract】 Objective** To observe the protective function and mechanism of melatonin (MT) against white matter lesions in corpus callosum induced by chronic cerebral hypoperfusion (CCH) in cerebral small vessel disease (cSVD) rats. **Methods** Forty-four adult male Sprague-Dawley rats were divided into sham group, bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) group, MT1 group [BCCAO + melatonin 5 mg/(kg·d)] and MT2 group [BCCAO + melatonin 10 mg/(kg·d)]. Four weeks after operation, social activity (sniffing time and crossing number) was assessed to reflect apathetic behavior. Myelin basic protein (MBP) in corpus callosum was detected by immunofluorescence. Transmission electron microscope was used to compare the G-ratio. Western blotting test was used to detect phosphorylation level of mammalian target of rapamycin (mTOR). **Results** BCCAO group rats showed fewer sniffing time ( $t = 58.000, P = 0.000$ ) and crossing number ( $t = 20.000, P = 0.000$ ), lower level of MBP expression ( $t = 20.400, P = 0.000$ ), higher level of G-ratio ( $t = -9.800, P = 0.000$ ), and lower pmTOR/mTOR ratio ( $t = 20.336, P = 0.000$ ) than those of sham group; after treatment of melatonin [5 or 10 mg/(kg·d)], MT1 group and MT2 group showed more sniffing time ( $t = -12.600, P = 0.001; t = -26.000, P = 0.000$ ) and crossing number ( $t = -8.400, P = 0.000; t = -10.200, P = 0.000$ ), higher pmTOR/mTOR ratio ( $t = -6.022, P = 0.014; t = -8.800, P = 0.001$ ) than those of BCCAO

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.07.005

基金项目:吴阶平医学基金会基金资助项目(项目编号:320.6750.18456)

作者单位:100700 北京,解放军总医院第七医学中心神经内科[李丹丹(现在山东省泰安市市立医院神经内科,邮政编码:271000)]

通讯作者:黄勇华,Email:huangyh@163.com

group but still lower than those of sham group ( $t = 45.400, P = 0.000; t = 32.000, P = 0.000; t = 11.600, P = 0.000; t = 9.800, P = 0.000; t = 14.314, P = 0.000; t = 11.536, P = 0.000$ ); while showed higher level of MBP expression ( $t = -16.800, P = 0.001; t = -20.600, P = 0.000$ ), and lower level of G-ratio ( $t = 8.600, P = 0.041; t = 9.200, P = 0.030$ ) than those of BCCAO group but similar with sham group ( $P > 0.05$ , for all); MT2 group showed longer sniffing time than MT1 group ( $t = -13.400, P = 0.000$ ). **Conclusions** Melatonin could ameliorate apathetic behavioral and white matter lesions in corpus callosums in rats with cSVD, which might be related to the up-regulate of phosphorylation level of mTOR.

**【Key words】** Cerebral small vessel diseases; Melatonin; White matter; Disease models, animals  
This study was supported by Wu Jieping Medical Foundation (No. 320.6750.18456).

**Conflicts of interest:** none declared

脑小血管病(cSVD)的影像学表现以腔隙性梗死(LACI)、脑白质损害和脑微出血(CMBs)为主,发病率和病残率逐年升高,颇受临床关注<sup>[1]</sup>。研究显示,淡漠是与脑小血管病密切相关的精神症状,尤其好发于脑白质病变(WML)患者<sup>[2]</sup>,主要表现为情感迟钝、认知功能和行为能力下降等目标指向性行为受限,在实验动物(如大鼠或小鼠)中则表现为类精神行为即嗅探等社交能力和挖穴能力下降<sup>[3-4]</sup>。褪黑素为吲哚类激素,主要产生于第三脑室后部松果体,既往研究显示,褪黑素广泛存在于人体各组织器官,具有促睡眠、调节免疫、抗肿瘤、抗衰老等多重作用,且对各类脑损伤新生儿的神经功能具有保护作用<sup>[5]</sup>。动物实验结果表明,褪黑素对多发性硬化(MS)模型的脑白质髓鞘改变具有明显的改善作用<sup>[6]</sup>。已知慢性脑低灌注(CCH)和穿支动脉血流减少引起的脑白质损害是脑小血管病的发生机制之一<sup>[7]</sup>,鉴于此,本研究以慢性脑低灌注模型大鼠作为实验动物,观察经腹腔注射褪黑素对脑白质髓鞘再生和淡漠行为的改善作用,以为临床治疗脑小血管病提供理论根据。

## 材料与方 法

### 一、实验材料

1. 实验动物 健康雄性 8 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只,体重( $350.00 \pm 10.80$ ) g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2016-0002],于室温( $23 \pm 2$ ) °C、相对湿度 50%~60%、12 h 昼-12 h 夜循环照明环境中饲养,自由摄食、饮水。

2. 药品与设备 (1)药品与试剂:褪黑素(规格:1g/瓶)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;体积分数为 10%的山羊血清为上海碧云天生物技术有限公司产品。免疫试剂中 I 抗工作液包括兔抗大鼠髓鞘碱

性蛋白(MBP)单克隆抗体(1:1000)、兔抗大鼠哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)单克隆抗体(1:1000)和兔抗大鼠磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)单克隆抗体(1:1000),均购自英国 Abcam 公司;II 抗工作液为辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:6000),购自艾比玛特生物科技(上海)有限公司。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)和 RIPA 细胞裂解液为北京麦瑞博生物科技有限公司产品;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)购自武汉塞维尔生物科技有限公司。(2)设备与仪器:用于嗅探实验的有机玻璃笼子由上海玉研科学仪器有限公司提供,并经解放军总医院第七医学中心神经内科改造;CM1950 型冰冻切片机、DM500 型生物透射电子显微镜和 DM4000B 型倒置相差荧光显微镜购自德国 Leica 公司;Reichert 超薄组织切片机为德国 Reichert-Jung 公司产品;BIO-RAD 1645050 型基础电泳仪和 BIO-RAD Gel Doc XR+ 凝胶成像分析系统由美国 Bio-Rad 公司提供。

### 二、研究方法

1. 动物模型制备与分组 (1)模型制备:参照文献[8]实验方法行双侧颈总动脉结扎(BCCAO),制备大鼠慢性脑低灌注模型。大鼠仰卧位,以质量分数为 10%的水合氯醛(4 ml/kg)腹腔注射麻醉,行颈部正中切口,长度约 2 cm,仔细分离左颈总动脉(CCA)并结扎,然后缝合手术切口,待大鼠苏醒后返回饲养笼,7 d 后采用相同方法结扎右颈总动脉。双侧颈总动脉结扎后 1 周,通过激光散斑成像(LSCI)测量脑血流量(CBF),以双侧顶叶皮质脑血流量 < 正常大鼠的 50% 为模型制备成功<sup>[9]</sup>。本组大鼠均顺利完成手术,其中 3 只死于手术创伤、1 只死于术后感染;其余 44 只术后 1 周经 LSCI 检测双侧顶叶皮质脑血流量 < 正常大鼠的 50%,模型制备成功。(2)动物分组:采用完全随机分组法将 44 只大鼠随机分为

假手术组、模型组、褪黑素 5 mg/(kg·d)组和褪黑素 10 mg/(kg·d)组,每组 11 只。其中,褪黑素组大鼠于模型制备后 1 d 分别腹腔注射溶于含体积分数为 1%乙醇生理盐水中的褪黑素 5 或 10 mg/kg,1 次/晚,连续注射 4 周;假手术组按照手术操作处理但不结扎双侧颈总动脉,模型组结扎双侧颈总动脉但不行腹腔注射褪黑素治疗,后两组大鼠均于模型制备后 1 d 于腹腔注射等剂量生理盐水,1 次/晚,连续注射 4 周。

2. 嗅探实验评价社交行为 参照文献[10]方法,于安静、无干扰昏暗房间内放置一透明有机玻璃笼子,大小约 46.00 cm×21.50 cm×20.50 cm,内含厚度为 1 cm 的木屑垫料,由 21.50 cm×20.50 cm 的内壁分为两个大小相等的透明隔室,内壁中间底部留有一直径为 7.60 cm 的丝网孔,由两根垂直交叉的铁丝分为 4 个大小相等的区域,实验大鼠和假手术组大鼠分别置于两间透明隔室内,大鼠之间既可相互观察亦可以通过内壁中间底部的丝网孔相互嗅探,但是不能直接接触,10 min 后观察大鼠社交行为改变情况。预实验 3 次后开始正式实验,分别记录嗅探时间(即大鼠将鼻子伸入丝网孔并随其晶须移动的持续时间)和穿越次数(即大鼠穿过丝网孔的次数)。

3. 免疫荧光法测定胼胝体髓鞘碱性蛋白表达水平 每组选择 6 只大鼠,于嗅探实验完成即刻以质量分数为 4%多聚甲醛溶液灌注心脏处死,断头切取完整脑组织,置于蔗糖梯度溶液进行固定,OCT 包埋剂包埋,切取胼胝体组织,制备层厚为 10 μm 的冰冻切片,-4 ℃保存备用。冰冻切片经高温热修复法修复抗原,滴加溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中的 Triton X-100 溶液(终浓度 0.5%),以体积分数为 10%的山羊血清封闭 2 h,滴加 I 抗工作液兔抗大鼠 MBP 单克隆抗体(1:1000)5 mg/ml,4 ℃过夜,PBS 冲洗 5 min(×3 次),然后滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:6000),2 h 后 PBS 冲洗 5 min(×3 次),DAPI 复染 15 min、质量分数为 10%的甘油封片,于倒置相差荧光显微镜下计数大鼠胼胝体 MBP 阳性细胞数目。MBP 为膜蛋白抗体,胞膜着色呈绿色,DAPI 仅标记胞核呈蓝色,以 MBP 和 DAPI 双染者为阳性细胞。

4. 透射电子显微镜观察胼胝体髓鞘完整性 选择冻存备用的大小为 1 mm×4 mm 的胼胝体组织,置于体积分数为 2.5%戊二醛溶液、4 ℃固定过夜,

PBS 冲洗 5 min(×3 次),以体积分数为 1%锇酸溶液固定,依次以体积分数为 50%、70%、80%、90%和 95%梯度乙醇脱水,再以体积分数为 100%丙酮浸润 20 min、包埋剂与丙酮混合液(体积比 1:1)浸润 1 h、包埋剂与丙酮混合液(体积比 3:1)浸润 3 h,4 ℃过夜,于 Reichert 超薄组织切片机制备层厚 70~90 nm 组织切片,经枸橼酸铅和醋酸铀双重染色 30 min,透射电子显微镜下观察胼胝体髓鞘完整性,以 G-ratio 表示,计算公式为 G-ratio = 轴索直径/(轴索直径+髓鞘直径)<sup>[11]</sup>。

#### 5. Western blotting 法测定 pmTOR/mTOR 比值

每组选 5 只大鼠,嗅探实验完成后即刻断头处死,切取新鲜胼胝体组织约 50 mg,加入含苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液(1:500)300 ml,于 4 ℃、12 000×g 离心 5 min,取上清液,二辛可宁酸(BCA)法测定标准蛋白品表达水平,行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜转膜,以 10%脱脂奶粉封闭 2 h,分别滴加兔抗大鼠 mTOR 单克隆抗体(1:1000)和兔抗大鼠 pmTOR 单克隆抗体(1:1000),4 ℃孵育过夜,体积分数为 10% TBST 溶液洗涤 5 min(×3 次)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:6000)室温孵育 2 h,10% TBST 溶液洗涤 5 min(×3 次);以 GAPDH 作为内参照物,采用 Image J 图像分析系统(美国国立卫生研究院)进行灰度分析,以目的蛋白/GAPDH 比值作为蛋白质相对表达量。

6. 统计分析方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、社交行为的改变

与假手术组相比,模型组大鼠嗅探时间( $P = 0.000$ )和穿越次数( $P = 0.000$ )均减少,表明脑小血管病模型大鼠存在社交行为减少的淡漠综合征。经褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后,大鼠嗅探时间( $P = 0.001, 0.000$ )和穿越次数( $P = 0.000, 0.000$ )增加并高于模型组,但仍低于假手术组( $P = 0.000, 0.000$ );其中,褪黑素 10 mg/(kg·d)组大鼠嗅探时间长于褪黑素 5 mg/(kg·d)组( $P = 0.000$ ),而穿越次数组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;表 1,2)。提示褪

**表 1** 不同处理组大鼠嗅探时间和穿越次数的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1.** Comparison of sniffing time and crossing number of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	嗅探时间(s)	穿越次数(次)
假手术组(1)	11	102.80 ± 6.68	31.00 ± 2.82
模型组(2)	11	44.80 ± 5.49	11.00 ± 1.58
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	11	57.40 ± 3.04	19.40 ± 2.07
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	11	70.80 ± 2.86	21.20 ± 1.92
F 值		134.623	72.832
P 值		0.000	0.000

**表 2** 不同处理组大鼠嗅探时间和穿越次数的两两比较

**Table 2.** Paired comparison of sniffing time and crossing number of rats in different groups

组间两两比	嗅探时间		穿越次数	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) (2)	58.000	0.000	20.000	0.000
(1) (3)	45.400	0.000	11.600	0.000
(1) (4)	32.000	0.000	9.800	0.000
(2) (3)	-12.600	0.001	-8.400	0.000
(2) (4)	-26.000	0.000	-10.200	0.000
(3) (4)	-13.400	0.000	-1.800	0.204

黑素可以有效改善脑小血管病模型大鼠的社交行为,而且随着药物剂量的增加其疗效更加显著。

二、髓鞘碱性蛋白表达变化和髓鞘完整性观察

倒置相差荧光显微镜观察显示,模型组大鼠胼胝体 MBP 阳性细胞数减少( $P = 0.000$ ),低于假手术组;经褪黑素[5 和 10 mg/(kg·d)]治疗后,MBP 阳性细胞数逐渐增多,不仅高于模型组( $P = 0.001, 0.000$ )且接近假手术组水平(均  $P > 0.05$ ),但褪黑素不同剂量组之间 MBP 阳性细胞数差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;图 1;表 3,4)。

透射电子显微镜观察显示,模型组大鼠胼胝体髓鞘 G-ratio 水平升高( $P = 0.025$ ),高于假手术组;经褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后,髓鞘 G-ratio 表达水平降低,不仅低于模型组( $P = 0.041, 0.030$ )且接近假手术组水平(均  $P > 0.05$ ),而褪黑素不同剂量组之间髓鞘 G-ratio 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;图 2;表 5,6)。

三、pmTOR/mTOR 比值的变化

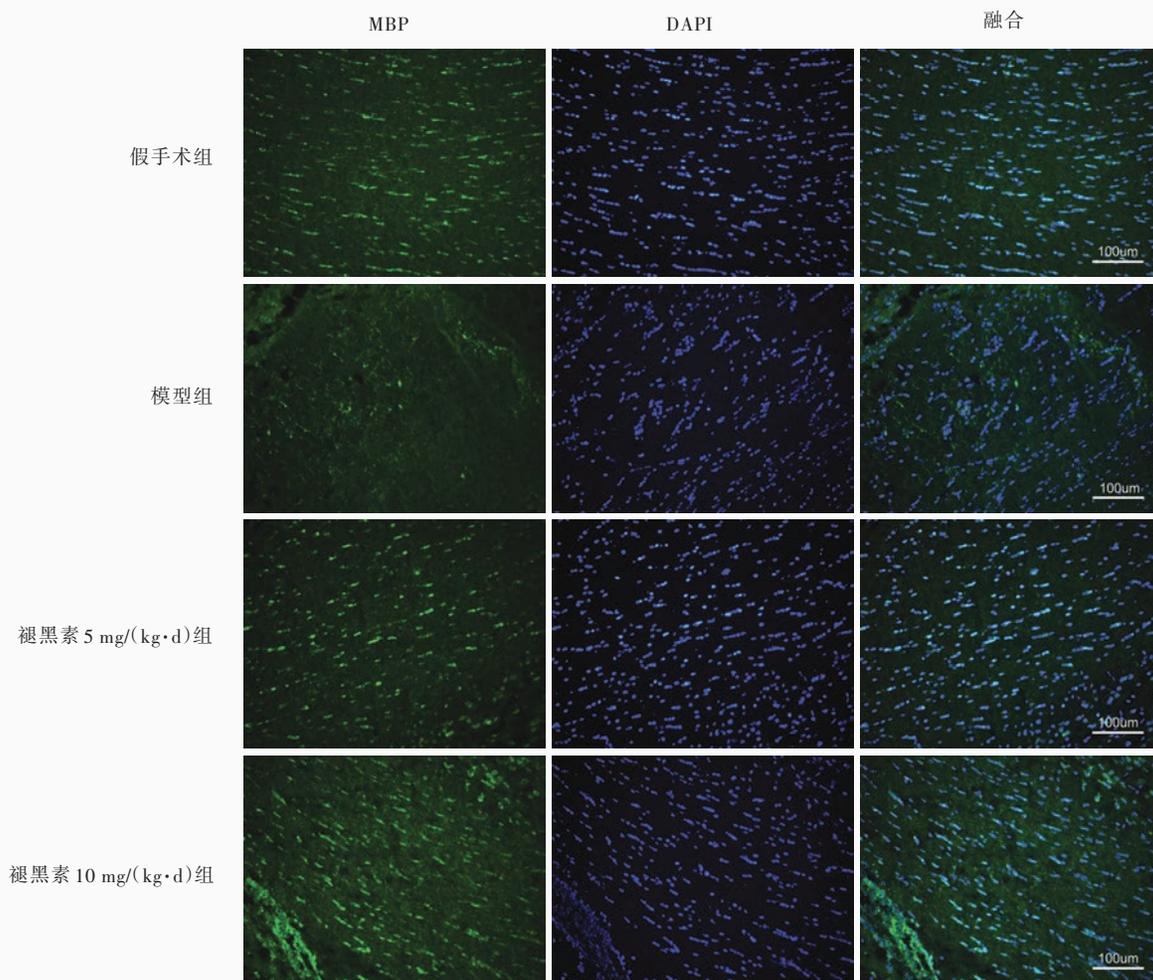
经 Western blotting 法测定显示,模型组大鼠 pmTOR/mTOR 比值低于假手术组( $P = 0.000$ );褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后,大鼠 pmTOR/mTOR 比值增高并高于模型组( $P = 0.014, 0.001$ ),但仍低于假手术组( $P = 0.000, 0.000$ ),而褪黑素不同剂量组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;图 3;表 7,8)。

讨 论

以动机减少为特征的淡漠综合征主要包括目的性行为、目的性认知、目的性情感和社交行为的减少<sup>[12]</sup>,可见于多种神经变性病;例如,帕金森病(PD)患者因基底节区受累而引起的目的性行为减少<sup>[13]</sup>,阿尔茨海默病(AD)患者因边缘系统受累而

导致目的性认知功能下降<sup>[14]</sup>,脑小血管病患者则表现为明显的淡漠和社交行为减少<sup>[15]</sup>。晚近动物实验发现,BCCAO 模型大鼠均表现有淡漠样行为<sup>[9]</sup>;而且大量有关脑血管病的临床研究亦提示,淡漠严重程度与患者预后密切相关<sup>[16]</sup>,因此以淡漠和抑郁样行为为代表的阴性症状是目前脑小血管病患者临床症状研究的新热点<sup>[17]</sup>。2018 年来自法国蓝色海岸大学记忆中心、法国大学医院记忆中心、国际中枢神经系统临床试验与方法学会淡漠研究小组、国际阿尔茨海默病研究与治疗促进协会等机构的 17 位神经精神障碍专家组成了 2018 年国际共识小组,对淡漠的诊断标准进行重新修订,在修订后的标准中加入了以社交行为作为淡漠综合征诊断的新要点<sup>[18]</sup>,因此在本研究中我们选择社交行为作为褪黑素治疗前后脑小血管病模型大鼠淡漠症状变化的观察指标,而未采用 Morris 水迷宫实验。Hollocks 等<sup>[19]</sup>的扩散张量成像(DTI)研究显示,脑小血管病患者的淡漠与胼胝体、前扣带回、穹窿等部位的白质纤维束微结构异常改变有关。在本研究中,我们采用 BCCAO 法形成慢性脑低灌注,成功制备脑小血管病大鼠模型,该方法是目前公认的制备脑小血管病模型的有效方法,已达到 2018 年《脑小血管病转化医学研究中国专家共识》制备标准<sup>[20]</sup>,模型大鼠表现出明显的社交行为减少等淡漠综合征表现,以及胼胝体白质损害(MBP 阳性细胞数减少和 G-ratio 水平升高)症状与体征。

临床研究业已证实,褪黑素或褪黑素受体激动剂(如阿戈美拉汀)可以有效治疗淡漠<sup>[21-23]</sup>,但其作用机制至今尚未阐明。近年开展的动物实验提示,褪黑素对多种疾病引起的脑白质损害的改善作用可能是其治疗淡漠综合征的潜在作用机制。例如,



MBP, 髓鞘碱性蛋白; DAPI, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

**图 1** 倒置相差荧光显微镜观察 中倍放大 1a 假手术组大鼠胼胝体可见大量 MBP 阳性细胞 1b 模型组大鼠胼胝体 MBP 阳性细胞数目显著减少 1c 经褪黑素 [5 mg/(kg·d)] 治疗后, 大鼠胼胝体 MBP 阳性细胞数目增加 1d 经褪黑素 [10 mg/(kg·d)] 治疗后, 大鼠胼胝体 MBP 阳性细胞数目增加

**Figure 1** Immunofluorescent microscopic observation medium power magnified A number of MBP positive cells per slide were found in corpus callosum in sham group (Panel 1a). The number of MBP positive cells per slide decreased significantly in corpus callosum in BCCAO group (Panel 1b). The number of MBP positive cells per slide were increased obviously in corpus callosum in MT1 group (Panel 1c). The number of MBP positive cells per slide were increased obviously in corpus callosum in MT2 group (Panel 1d).

**表 3** 不同处理组模型大鼠胼胝体 MBP 阳性细胞数的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 个)

**Table 3.** Comparison of MBP expression in corpus callosum of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ , number)

组别	例数	MBP 阳性细胞数
假手术组(1)	6	32.00 ± 4.85
模型组(2)	6	11.60 ± 2.70
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	6	28.40 ± 3.44
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	6	32.20 ± 5.12
F 值		27.863
P 值		0.000

MBP, myelin basic protein, 髓鞘碱性蛋白

**表 4** 不同处理组模型大鼠胼胝体髓鞘碱性蛋白阳性细胞数的两两比较

**Table 4.** Paired comparison of MBP expression in corpus callosum of rats in different groups

组间两两比	t 值	P 值
(1) 与 (2)	20.400	0.000
(1) 与 (3)	3.600	0.189
(1) 与 (4)	-0.200	0.940
(2) 与 (3)	-16.800	0.001
(2) 与 (4)	-20.600	0.000
(3) 与 (4)	-3.800	0.167

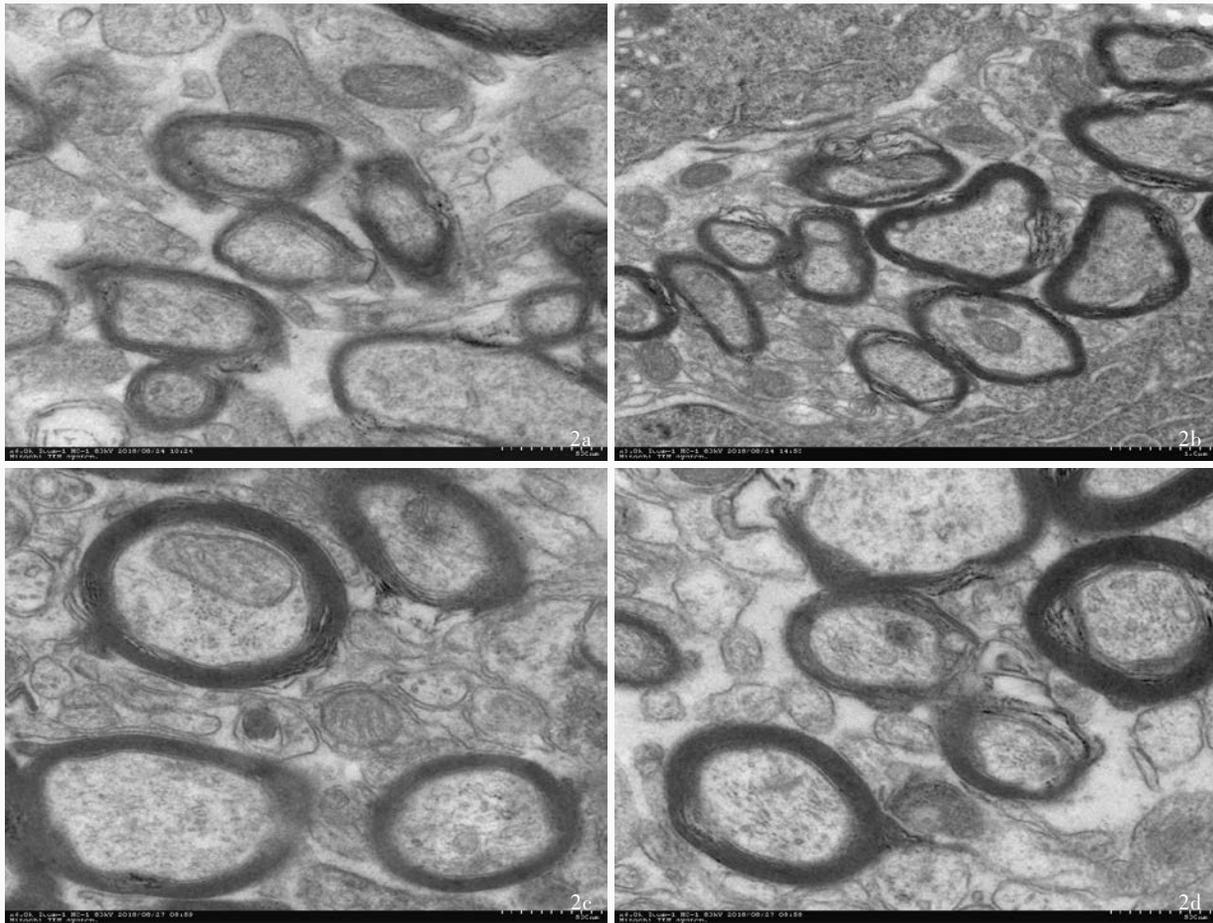


图2 透射电子显微镜观察 枸橼酸铅和醋酸铀双重染色 2a 假手术组大鼠胼胝体髓鞘结构无明显损伤 ×6000 2b 模型组大鼠胼胝体髓鞘结构严重破坏 ×3000 2c 褪黑素[5 mg/(kg·d)]治疗后大鼠胼胝体髓鞘结构有所修复 ×6000 2d 褪黑素[10 mg/(kg·d)]治疗后大鼠胼胝体髓鞘结构有所修复 ×6000

Figure 2 Electron microscope findings Uranyl acetate and lead citrate double staining Myelin formation was intact in corpus callosum of sham group (Panel 2a). ×6000 Obvious damage of myelin formation in corpus callosum was found in BCCAO group (Panel 2b). ×3000 Myelin formation in corpus callosum was recovered in MT1 group (Panel 2c). ×6000 Myelin formation in corpus callosum was recovered in MT2 group (Panel 2d). ×6000

表5 不同处理组模型大鼠胼胝体髓鞘G-ratio表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5. Comparison of myelin G-Ratio in corpus callosum of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	G-ratio
假手术组(1)	6	61.60 ± 5.32
模型组(2)	6	71.40 ± 7.99
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	6	62.80 ± 4.03
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	6	62.20 ± 6.42
F值		2.863
P值		0.039

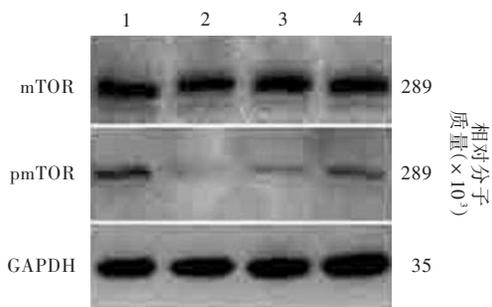
表6 不同处理组模型大鼠胼胝体髓鞘G-ratio表达水平的两两比较

Table 6. Paired comparison of myelin G-ratio in corpus callosum of rats in different groups

组间两两比	t值	P值
(1) 与 (2)	-9.800	0.025
(1) 与 (3)	-1.200	0.760
(1) 与 (4)	0.600	0.879
(2) 与 (3)	8.600	0.041
(2) 与 (4)	9.200	0.030
(3) 与 (4)	0.600	0.879

2017年Tsai等<sup>[24]</sup>通过单侧颈总动脉结扎(UCCAO)小鼠模型观察经腹腔注射褪黑素 10 mg/(kg·d)的疗效,与假手术组相比,褪黑素治疗28天后小鼠胼胝体白质损害程度明显减轻;2018年Corpas等<sup>[25]</sup>予以

阿尔茨海默病转基因小鼠褪黑素 10 mg/kg连续口服6个月,其淡漠综合征症状明显得以缓解。本研究采用腹腔注射的给药方式,首次在脑小血管病模型大鼠中观察到褪黑素无论5或10 mg/(kg·d)剂量,



1,假手术组;2,模型组;3,褪黑素 5 mg/(kg·d)组;4,褪黑素 10 mg/(kg·d)组  
mTOR,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;pmTOR,磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;  
GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图3 Western blotting法检测,假手术组大鼠胼胝体可见灰色条带,模型组大鼠胼胝体灰色条带灰度值显著降低,褪黑素[5或10 mg/(kg·d)]治疗后大鼠胼胝体条带灰度值有所增加

Figure 3 Western blotting findings. Grey band could be seen in corpus callosum of sham group. The grey band density in corpus callosum of BCCAO group decreased statistically relative to sham group. The grey band density increased in corpus callosum after treatment with melatonin 5 or 10 mg/(kg·d).

表7 不同处理组模型大鼠胼胝体 pmTOR/mTOR 比值的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Table 7. Comparison of pmTOR/mTOR expression in corpus callosum of rats in different groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	pmTOR/mTOR 比值
假手术组(1)	5	29.34 ± 4.32
模型组(2)	5	9.00 ± 2.55
褪黑素 5 mg/(kg·d)组(3)	5	15.02 ± 2.57
褪黑素 10 mg/(kg·d)组(4)	5	17.80 ± 3.96
F 值		30.617
P 值		0.000

pmTOR, phosphorylated mammalian target of rapamycin, 磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; mTOR, mammalian target of rapamycin, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

表8 不同处理组模型大鼠胼胝体 pmTOR/mTOR 比值的两两比较

Table 8. Paired comparison of the pmTOR/mTOR expression in corpus callosum of rats in different groups

组间两两比	t 值	P 值
(1) 与 (2)	20.336	0.000
(1) 与 (3)	14.314	0.000
(1) 与 (4)	11.536	0.000
(2) 与 (3)	-6.022	0.014
(2) 与 (4)	-8.800	0.001
(3) 与 (4)	-2.778	0.221

均可以有效改善模型大鼠的社交行为,并减轻胼胝体白质脱髓鞘改变的程度(MBP 阳性细胞数增加和 G-ratio 水平降低)。褪黑素 10 mg/d 腹腔注射 4 周是慢性脑低灌注模型大鼠最常用的治疗方案,大量研究显示,褪黑素 10 mg/d 可有效改善慢性脑低灌注引起的海马体积萎缩、炎性细胞活化和氧化应激损伤等<sup>[26-28]</sup>,其可能的药理学机制是抑制小电导钙激活性的钾离子通道,减少脑组织低灌注引起的代偿性大量热休克蛋白 70(hsp70)生成或上调衰老标志蛋白 30 和骨桥蛋白等的表达水平<sup>[23,25-26,28-29]</sup>。亦有研究结果显示,褪黑素 5 mg/d 腹腔注射即可对 mTOR 磷酸化发挥药理作用<sup>[30]</sup>;因此,本研究对慢性脑低灌注模型大鼠分别采用两种治疗剂量即褪黑素 5 或 10 mg/(kg·d),结果显示,上述两种剂量对大鼠胼胝体白质脱髓鞘改变均具有改善作用,而且两剂量组 [5 mg/(kg·d)组与 10 mg/(kg·d)组]之间除嗅探时间差异有统计学意义,穿越次数、MBP 阳性细胞数目和 G-ratio 差异均无统计学意义。

既往认为 mTOR 磷酸化水平与细胞生长有关,近年研究表明,mTOR 磷酸化受其上游同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN),以及磷脂酰肌醇 3-激酶

(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)信号转导通路调控<sup>[31]</sup>,参与慢性脑低灌注导致的神经损伤修复<sup>[32]</sup>,被认为是减轻脑白质损害、增强突触可塑性的可靠靶点<sup>[33]</sup>。急性缺血性脑损伤和颅脑创伤(TBI)动物实验结果证实,褪黑素参与 mTOR 信号转导通路的调控<sup>[30,34-35]</sup>,但具体作用机制尚未取得一致性结论。Ding 等<sup>[34]</sup>发现,颅脑创伤后 24 小时小鼠 pmTOR/mTOR 比值显著升高,考虑与小胶质细胞活化和神经炎症反应异常激活有关,表明 mTOR 磷酸化是颅脑创伤后神经损伤的重要机制。与之相反,Cheng 等<sup>[35]</sup>于单侧颈总动脉结扎小鼠模型制备成功后 6 周发现,mTOR 磷酸化程度显著降低,推测可能与慢性脑低灌注引起的白质损害有关。本研究提示,脑组织慢性缺血后模型组大鼠 pmTOR/mTOR 比值明显降低,但经褪黑素[5 或 10 mg/(kg·d)]治疗后其 pmTOR/mTOR 比值有所增加,推测其作用机制是褪黑素通过提高 mTOR 磷酸化程度而改善神经功能、减轻脑白质损害,但是本研究未对褪黑素作用机制的信号转导通路进行深入探讨,后续研究应测定上游 PTEN/AKT 通路的磷酸化程度,进一步明确褪黑素治疗脑小血管病的信号转导通路。

综上所述,本研究采用 BCCAO 法制备慢性脑低灌注性脑小血管病大鼠模型,予褪黑素腹腔注射后证实可有效改善其社交行为并减轻脑白质损害。

利益冲突 无

### 参 考 文 献

- [1] Zhang WW. Cerebral small vessel disease [J]. *Zhonghua Lao Nian Xin Nao Xue Guan Bing Za Zhi*, 2009, 11:939-940. [张微微. 脑小血管病[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2009, 11:939-940.]
- [2] Grool AM, van der Graaf Y, Mali WP, Witkamp TD, Vincken KL, Geerlings MI; SMART Study Group. Location and progression of cerebral small-vessel disease and atrophy, and depressive symptom profiles: the Second Manifestations of ARterial disease (SMART) - Medea Study [J]. *Psychol Med*, 2012, 42:359-370.
- [3] Baumann A, Moreira CG, Morawska MM, Masneuf S, Baumann CR, Noain D. Preliminary evidence of apathetic-like behavior in aged vesicular monoamine transporter 2 deficient mice [J]. *Front Hum Neurosci*, 2016, 10:587.
- [4] Pedersen CS, Sørensen DB, Parachikova AI, Plath N. PCP-induced deficits in murine nest building activity: employment of an ethological rodent behavior to mimic negative-like symptoms of schizophrenia [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 273:63-72.
- [5] Biran V, Phan Duy A, Decobert F, Bednarek N, Alberti C, Baud O. Is melatonin ready to be used in preterm infants as a neuroprotectant [J]? *Dev Med Child Neurol*, 2014, 56: 717-723.
- [6] Wen J, Ariyannur PS, Ribeiro R, Tanaka M, Moffett JR, Kirmani BF, Nambodiri AM, Zhang Y. Efficacy of N-acetylserotonin and melatonin in the EAE model of multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11:763-773.
- [7] Wang R, Zeng J, Li DD, Wang SP, Zhao HY, Huang YH, Du JM. Relationship between gait abnormality and astrocyte activation and expression of inflammatory factors in basal ganglia in rats with cerebral small vessel disease [J]. *Zhonghua Shi Yong Zhen Duan Yu Zhi Liao Za Zhi*, 2018, 32:851-854. [王茹, 曾静, 李丹丹, 王少朋, 赵弘轶, 黄勇华, 杜菊梅. 脑小血管病大鼠步态异常与基底节区星形胶质细胞活化及炎症因子表达的关系[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32:851-854.]
- [8] Ma M, Zhao Q, Du JS, Wang Y. Evaluation of vascular dementia model by partial ligation of common carotid artery in rats [J]. *Zhongguo Lao Nian Xue Za Zhi*, 2012, 32:72-74. [马明, 赵晴, 杜建时, 王宇. 大鼠颈总动脉分次结扎建立血管性痴呆模型评价[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32:72-74.]
- [9] Wang R, Liu N, Zhao HY, Du JM, Huang YH. Role of aerobic exercise in alleviating blood-brain barrier damage in rats with cerebral small vessel disease [J]. *Zhonghua Shi Yong Zhen Duan Yu Zhi Liao Za Zhi*, 2019, 33:417-421. [王茹, 刘楠, 赵弘轶, 杜菊梅, 黄勇华. 有氧运动对脑小血管病大鼠血脑屏障损伤的改善作用[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33:417-421.]
- [10] Arakawa H, Arakawa K, Deak T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes [J]. *Horm Behav*, 2010, 57:330-341.
- [11] Ma J, Zhang J, Hou WW, Wu XH, Liao RJ, Chen Y, Wang Z, Zhang XN, Zhang LS, Zhou YD, Chen Z, Hu WW. Early treatment of minocycline alleviates white matter and cognitive impairments after chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12079.
- [12] Mulin E, Leone E, Dujardin K, Delliaux M, Leentjens A, Nobili F, Dessi B, Tible O, Agüera-Ortiz L, Osorio RS, Yessavage J, Dachevsky D, Verhey FR, Cruz Jentoft AJ, Blanc O, Llorca PM, Robert PH. Diagnostic criteria for apathy in clinical practice [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011, 26:158-165.
- [13] Levy R. Apathy: a pathology of goal-directed behaviour. A new concept of the clinic and pathophysiology of apathy [J]. *Rev Neurol*, 2012, 168(8/9):585-597.
- [14] Guimarães HC, Levy R, Teixeira AL, Beato RG, Caramelli P. Neurobiology of apathy in Alzheimer's disease [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2008, 66:436-443.
- [15] Lisiecka-Ford DM, Tozer DJ, Morris RG, Lawrence AJ, Barrick TR, Markus HS. Involvement of the reward network is associated with apathy in cerebral small vessel disease [J]. *J Affect Disord*, 2018, 232:116-121.
- [16] Wang SP, Zhao HY, Wang N, Chi LY, Huang YH. Research progress of post-stroke apathy syndrome [J]. *Zhongguo Nao Xue Guan Bing Za Zhi*, 2019, 16:207-212. [王少朋, 赵弘轶, 王诺, 迟丽屹, 黄勇华. 卒中后淡漠综合征的研究进展[J]. *中国脑血管病杂志*, 2019, 16:207-212.]
- [17] Ferro JM, Caeiro L, Figueira ML. Neuropsychiatric sequelae of stroke [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12:269-280.
- [18] Robert P, Lanctôt KL, Agüera-Ortiz L, Aalten P, Bremond F, Defrance M, Hanon C, David R, Dubois B, Dujardin K, Husain M, König A, Levy R, Mantua V, Meulien D, Miller D, Moebius HJ, Rasmussen J, Robert G, Ruthirakuhan M, Stella F, Yessavage J, Zeghari R, Manera V; the 2018 International Consensus Group. Is it time to revise the diagnostic criteria for apathy in brain disorders [J]? *Eur Psychiatry*, 2018, 54:71-76.
- [19] Hollocks MJ, Lawrence AJ, Brookes RL, Barrick TR, Morris RG, Husain M, Markus HS. Differential relationships between apathy and depression with white matter microstructural changes and functional outcomes [J]. *Brain*, 2015, 138:3803-3815.
- [20] Ni J, Xu Y. Chinese expert consensus on translational medicine in cerebral small vessel disease [J]. *Zhongguo Zu Zhong Za Zhi*, 2018, 13:853-870. [倪俊, 徐运. 脑小血管病转化医学研究中国专家共识[J]. *中国卒中杂志*, 2018, 13:853-870.]
- [21] Messina G, Lissoni P, Marchiori P, Bartolacelli E, Brivio F, Magotti L. Enhancement of the efficacy of cancer chemotherapy by the pineal hormone melatonin and its relation with the psychospiritual status of cancer patients [J]. *J Res Med Sci*, 2010, 15:225-228.
- [22] Callegari I, Mattei C, Benassi F, Krueger F, Grafman J, Yaldizli Ö, Sassos D, Massucco D, Scialò C, Nobili F, Serrati C, Amore M, Cocito L, Emberti Gialloreti L, Pardini M. Agomelatine improves apathy in frontotemporal dementia [J]. *Neurodegener Dis*, 2016, 16:352-356.
- [23] Kurtz AL, Kaufer DI. Dementia in Parkinson's disease [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2011, 13:242-254.
- [24] Tsai TH, Lin CJ, Chua S, Chung SY, Yang CH, Tong MS, Hang CL. Melatonin attenuated the brain damage and cognitive impairment partially through MT2 melatonin receptor in mice with chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 74320-74330.
- [25] Corpas R, Griñón-Ferré C, Palomera-Ávalos V, Porquet D, García de Frutos P, Franciscato Cozzolino SM, Rodríguez-Farré E, Pallàs M, Sanfeliu C, Cardoso BR. Melatonin induces mechanisms of brain resilience against neurodegeneration [J]. *J Pineal Res*, 2018, 65:E12515.

- [26] Al Dera H, Alassiri M, Eleawa SM, AlKhateeb MA, Hussein AM, Dallak M, Sakr HF, Alqahtani S, Khalil MA. Melatonin improves memory deficits in rats with cerebral hypoperfusion, possibly, through decreasing the expression of small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels [J]. *Neurochem Res*, 2019. [Epub ahead of print]
- [27] Lee CH, Park JH, Ahn JH, Won MH. Effects of melatonin on cognitive impairment and hippocampal neuronal damage in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11:2240-2246.
- [28] Ozacmak VH, Barut F, Ozacmak HS. Melatonin provides neuroprotection by reducing oxidative stress and HSP70 expression during chronic cerebral hypoperfusion in ovariectomized rats [J]. *J Pineal Res*, 2009, 47:156-163.
- [29] Bin-Jalilah I, Sakr HF. Melatonin ameliorates brain oxidative stress and upregulates senescence marker protein-30 and osteopontin in a rat model of vascular dementia [J]. *Physiol Int*, 2018, 105:38-52.
- [30] Koh PO. Melatonin prevents ischemic brain injury through activation of the mTOR/p70S6 kinase signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 444:74-78.
- [31] Li X, Ren C, Li S, Han R, Gao J, Huang Q, Jin K, Luo Y, Ji X. Limb remote ischemic conditioning promotes myelination by upregulating PTEN/Akt/mTOR signaling activities after chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Aging Dis*, 2017, 8:392-401.
- [32] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Control of translation by the target of rapamycin proteins [J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 2001, 27:143-174.
- [33] Ueno Y, Koike M, Shimada Y, Shimura H, Hira K, Tanaka R, Uchiyama Y, Hattori N, Urabe T. L-carnitine enhances axonal plasticity and improves white-matter lesions after chronic hypoperfusion in rat brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35:382-391.
- [34] Ding K, Wang H, Xu J, Lu X, Zhang L, Zhu L. Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: Possible involvement of mTOR pathway [J]. *Neurochem Int*, 2014, 76:23-31.
- [35] Cheng P, Zuo X, Ren Y, Bai S, Tang W, Chen X, Wang G, Wang H, Huang W, Xie P. Adenosine A1-receptors modulate mTOR signaling to regulate white matter inflammatory lesions induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41:3272-3277.

(收稿日期:2019-07-11)

## 《中国现代神经疾病杂志》关于谨防伪造微信采编中心的声明

《中国现代神经疾病杂志》编辑部近期发现伪造本刊微信采编中心的非法行为,微信号 1025282431,昵称麦芽糖,伪造《中国现代神经疾病杂志》采编中心。该微信号以核对作者信息为由,请我刊作者添加其为微信好友,借以窃取相关信息甚至索取审稿费和版面费等,此举对我刊及广大作者、读者造成严重不良影响。

《中国现代神经疾病杂志》特此郑重声明:我刊迄今为止并未建立微信平台的采编中心,作者投稿的唯一途径是登录我刊官方网站 [www.xdjb.org](http://www.xdjb.org),进入“作者在线投稿”界面,按照操作提示提交稿件。稿件经外审通过后,需作者配合修改,达到发表要求后方可待编、排期和刊出,这一过程中编辑部人员与作者之间的联系均采用我刊公共邮箱([xdsjbz@263.net.cn](mailto:xdsjbz@263.net.cn))和公用电话[(022)59065611,59065612]。

若遇假冒我刊网站、伪造我刊采编中心、中介、代理等不法事件,欢迎广大作者和读者向我刊提供相关线索!对于以我刊名义从事非法活动的个别网站或微信号,我刊保留通过法律途径解决问题的权利。此声明长期有效,最终解释权归我刊所有。

## 欢迎订阅 2019 年《中国现代神经疾病杂志》

《中国现代神经疾病杂志》为国家卫生健康委员会主管、中国医师协会主办的神经病学类专业期刊。办刊宗旨为:理论与实践相结合、普及与提高相结合,充分反映我国神经内外科临床科研工作重大进展,促进国内外学术交流。所设栏目包括述评、专论、论著、临床病理报告、应用神经解剖学、神经影像学、循证神经病学、流行病学调查研究、基础研究、临床研究、综述、临床医学图像、病例报告、临床病理(例)讨论、新技术新方法等。

《中国现代神经疾病杂志》为北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》2017 年版(即第 8 版)核心期刊和国家科技部中国科技论文统计源期刊,国内外公开发行。中国标准连续出版物号:ISSN 1672-6731, CN 12-1363/R。国际大 16 开型,彩色插图,48 页,月刊,每月 25 日出版。每期定价 15 元,全年 12 册共计 180 元。2019 年仍由邮政局发行,邮发代号:6-182。请向全国各地邮政局订阅,亦可直接向编辑部订阅(免邮寄费)。

编辑部地址:天津市津南区吉兆路 6 号天津市环湖医院 A 座二楼西区,邮政编码:300350。

联系电话:(022)59065611,59065612;传真:(022)59065631。网址:[www.xdjb.org](http://www.xdjb.org)(中文),[www.cjcn.org](http://www.cjcn.org)(英文)。