

先天性 *EDNRB* 基因缺陷对大鼠海马区神经细胞凋亡的影响

谢聃 宋赞民 王霞 张拥波

【摘要】 目的 探讨 *EDNRB* 基因缺陷的新生大鼠海马神经细胞凋亡及神经营养因子中脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的表达变化。方法 制备先天性碱基缺失致 *EDNRB* 基因缺陷新生大鼠(出生后 2~3 d)模型,并分为野生型(+/+),杂合子型(+/-)和纯合子型(-/-)共 3 种基因型(每组各 6~8 只),TUNEL 染色检测海马神经细胞凋亡情况,荧光共聚焦显微镜计数细胞凋亡数目,酶联免疫吸附试验测定海马 BDNF 和 GDNF 表达量。结果 3 种基因型新生大鼠海马组织凋亡细胞数目差异有统计学意义($F = 24.315, P = 0.000$),-/- 凋亡细胞数目高于 +/+ ($t = -6.780, P = 0.000$)和 +/- ($t = 4.801, P = 0.000$);海马 CA1 区凋亡细胞数目最高,CA3 区次之,齿状回最低。而 3 种基因型新生大鼠海马 BDNF ($F = 0.766, P = 0.479$)和 GDNF ($F = 2.538, P = 0.107$)表达量差异无统计学意义。结论 *EDNRB* 基因缺陷新生大鼠海马 CA1 区、CA3 区神经细胞凋亡增多,而神经营养因子 BDNF 和 GDNF 水平无明显变化。

【关键词】 受体,内皮素 B; 基因; 海马; 细胞凋亡; 神经生长因子类; 疾病模型,动物

The effect of neural apoptosis in the hippocampal formation of rats modal with congenital *EDNRB* gene defect

XIE Dan¹, SONG Zan-min², WANG Xia³, ZHANG Yong-bo¹

¹Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

²Brain Development Laboratory, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra ACT2601, Australia

³Department of Neurology, The People's Hospital of Wu Hai Inner Mongolia, Wuhai 016000, Inner Mongolia, China

Corresponding author: XIE Dan (Email: smart1226@sina.com)

【Abstract】 Objective The purpose of this study is to investigate apoptosis of hippocampal neurons and the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neonatal pups with *EDNRB* gene deficiency. **Methods** The infant rats (2-3 d after birth) with *EDNRB* gene defect caused by congenital base deletion were divided into wild (+/+), heterozygous (+/-) and homozygous (-/-), 6-8 rats were included in each group. Apoptosis of hippocampal nerve cells was detected by TUNEL staining. The number of apoptotic cells was calculated by confocal fluorescence microscopy, and the levels of GDNF and BDNF in hippocampus was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The number of apoptotic cells in hippocampus of the three genotypes was significantly different ($F = 24.315, P = 0.000$), the number of apoptotic cells in -/- was higher than that in +/+ ($t = -6.780, P = 0.000$) and +/- ($t = 4.801, P = 0.000$). The number of apoptotic cells was the highest in hippocampal CA1 region, followed by CA3 region, and the lowest in dentate gyrus. However, there was no significant difference in the levels of BDNF ($F = 0.766, P = 0.479$) and GDNF ($F = 2.538, P = 0.107$) in the hippocampus between different genotypes. **Conclusions** In rat with *EDNRB* gene defect, compared with the heterozygote and wild rats, the neural apoptosis were increased in hippocampal

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2021.10.009

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助项目(项目编号:2020MS03017)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院神经内科(谢聃,张拥波);ACT2601 堪培拉,澳大利亚国立大学约翰科廷医学研究中心神经研究所(宋赞民);016000 内蒙古自治区乌海市人民医院神经内科(王霞)

通讯作者:谢聃,Email:smart1226@sina.com

CA1, CA3 regions. But the levels of neurotrophic factors BDNF and GDNF were not significantly changed.

【Key words】 Receptor, endothelin B; Genes; Hippocampus; Apoptosis; Nerve growth factors; Disease models, animal

This study was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation (No. 2020MS03017).

Conflicts of interest: none declared

EDNRB 基因作为一种临床致病率表达较高的基因,不仅是肠道形成肠神经系统的关键基因,也参与并且介导神经细胞增殖、迁移的主要过程。脑组织 *EDNRB* 基因表达上调还具有抗细胞凋亡的作用^[1-2]。*EDNRB* 基因主要表达于胚胎的脑室区以及脑室下区,并在婴儿脑组织星形胶质细胞中继续表达^[3-5]。研究显示,*EDNRB* 基因变异致先天性巨结肠不仅发生于人类,亦见于其他物种如大鼠、小鼠、猪和马,如先天性巨结肠大鼠模型携带 *EDNRB* 基因诱导的无症状变异^[6-7];纯合子型大鼠脑组织可检测到 *EDNRB* 基因缺陷,从而干预和调节神经系统发育过程中 *EDNRB* 基因介导的神经细胞增殖和凋亡^[8]。神经营养因子是一类对神经细胞发育、存活和凋亡起重要作用的蛋白质,脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)不仅可以促进神经细胞再生,而且是诱导神经干细胞向神经细胞分化的重要因子^[9]。增强 *EDNRB* 基因活性可使大鼠小脑区域和尾状核生成更多的 BDNF 和 GDNF^[10]。本研究对 *EDNRB* 基因缺陷的新生大鼠海马组织(CA1 区、CA3 区和齿状回)进行研究,观察 *EDNRB* 基因缺陷对纯合子型(*sl/sl*)神经细胞凋亡的影响,并与野生型(*+/+*)、杂合子型(*+/sl*)相应脑区的神经细胞增殖和凋亡进行比较;同时测定 3 种基因型新生大鼠海马组织 BDNF 和 GDNF 的表达量,探究 *EDNRB* 基因缺陷是否导致 BDNF 和 GDNF 表达变化。

材料与方 法

一、实验材料

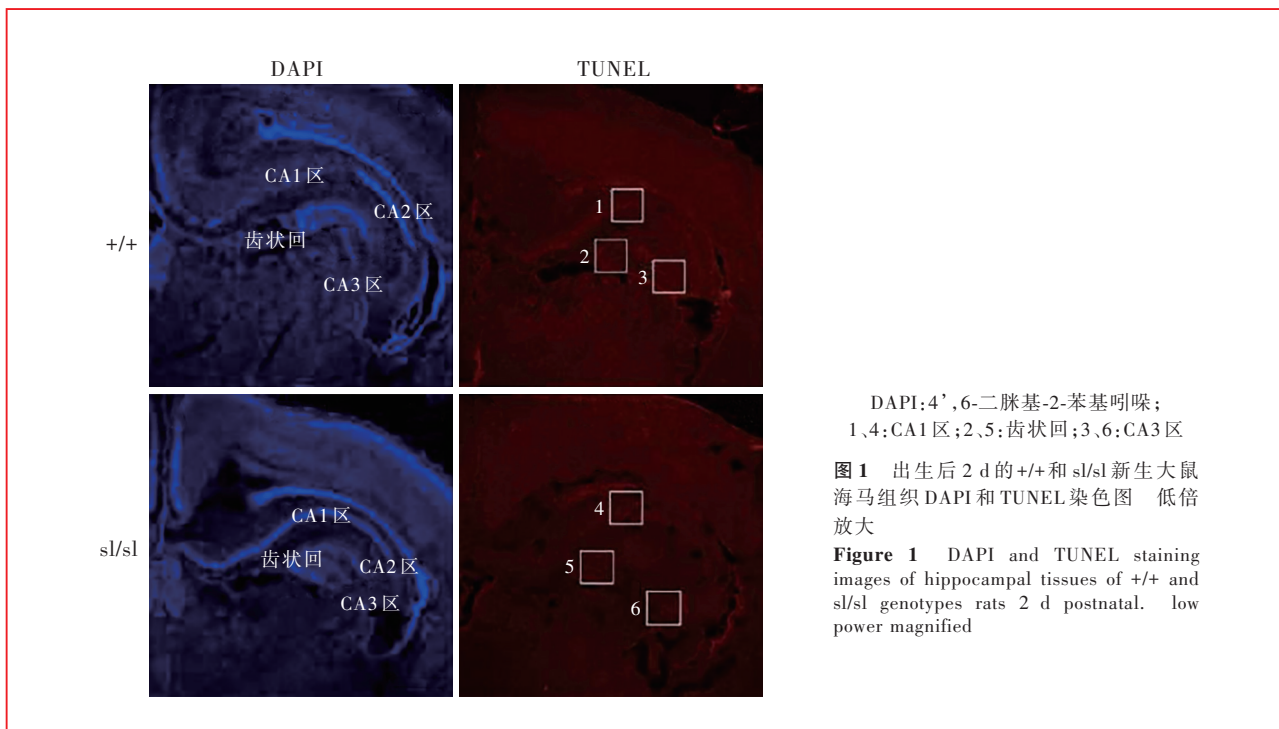
1. 实验动物与分组 本实验所用动物为先天性 301 对碱基缺失致 *EDNRB* 基因缺陷大鼠,均为 *+/sl* 成对雄性和雌性大鼠,由澳大利亚国立大学动物中心饲养(许可证号: Canberra Hospital.03333574001),交配后将同一窝产后 2~3 d 新生大鼠和雌性大鼠取出(雌性大鼠喂养幼鼠),并

根据幼鼠皮毛颜色、基因检测结果将其分成 *+/+*、*+/sl* 和 *sl/sl* 共 3 种基因型,每组各 6~8 只。于室温 21~25 ℃、相对湿度 40%~60%、12 h 昼-12 h 夜循环照明环境中饲养,自由摄食、饮水,本研究经澳大利亚国立大学动物实验伦理委员会审核批准(审批号: A2012/50)。

2. 试剂与仪器 (1)主要药品与试剂:蛋白酶 K 购自美国 Promega 生物公司,戊巴比妥和多聚甲醛由澳大利亚国立大学约翰科廷医学研究中心神经研究所实验室提供,磷酸盐缓冲液(PBS)为该实验室统一配置,BDNF 和 GDNF 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒分别购自美国 BioSource 公司和 R&D systems 公司。(2)主要设备与仪器:聚合酶链反应(PCR)循环仪购自美国 Biometro T3 thermocycle 公司, Gene Quant pro 型紫外光分光光度计购自美国 Biochrom 公司, Nikon A1 荧光共聚焦显微镜购自日本 Nikon 公司, Image J 软件购自美国 NIH 公司。

二、研究方法

1. TUNEL 染色检测海马组织细胞凋亡 每种基因型取出生后 2 d 的新生大鼠各 6 只,腹腔注射戊巴比妥(100 mg/kg),开胸显露心脏,质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液灌注心脏,以 50 ml 注射器插入左心室、剪开右心耳,快速注入磷酸盐缓冲液 200~300 ml,经体循环和肺循环至右心耳,直至流出清亮液体,以清除体内血液;于显微镜下解剖切取脑组织,取出整个海马组织和齿状回,于 -20 ℃ 制备层厚 12 mm 的冰冻切片。每只新生大鼠选取切片效果及部位最佳的 5 张标本行 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色和 TUNEL 染色,细胞呈蓝色为 DAPI 染色阳性,为背景细胞;细胞呈红色或绿色为 TUNEL 染色,为凋亡细胞。每只新生大鼠选取切片染色效果最佳的 3 张标本,于荧光共聚焦显微镜下观察凋亡细胞,采用 Image J 软件计数凋亡细胞数目。上述实验步骤均于随机取片、基因型双盲情况下进行。



DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚;
1,4: CA1区; 2,5: 齿状回; 3,6: CA3区

图 1 出生后 2 d 的 +/+ 和 sl/sl 新生大鼠海马组织 DAPI 和 TUNEL 染色图 低倍放大

Figure 1 DAPI and TUNEL staining images of hippocampal tissues of +/+ and sl/sl genotypes rats 2 d postnatal. low power magnified

2. 酶联免疫吸附试验测定 GDNF 和 BDNF 表达量 每组选取出生后 2 d 的新生大鼠各 7~8 只, 切取脑组织方法同前, 切片机在 -80 °C 制备层厚 12 mm 的冰冻切片。每只新生大鼠取 6 张切片 (BDNF 和 GDNF 各 3 张), 孵育至 21~25 °C, 采用 ELISA 检测试剂盒测定 BDNF 和 GDNF 表达量, 行荧光原位杂交 (FISH) 染色, 显色均匀后 20 min 内记录 450 nm 波长处光密度 (OD) 值, 以 pg/g 表示。

3. 统计分析方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理与分析。正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验, 以 $P > 0.05$ 为符合正态分布; 方差齐性检验采用 Levene 检验, 以 $P > 0.05$ 为符合方差齐性假设。呈正态分布且符合方差齐性假设的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 法。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

荧光共聚焦显微镜观察显示, 出生后 2 d 的 +/+ 新生大鼠海马 CA1 区和齿状回偶见凋亡细胞, CA3 区凋亡细胞密度更低; sl/sl 新生大鼠海马 CA1 区、CA3 区和齿状回凋亡细胞数目均多于 +/+ 新生大鼠 (图 1, 2)。3 种基因型新生大鼠海马凋亡细胞数目差异有统计学意义 ($P = 0.000$, 表 1), 其中, sl/sl 凋亡细胞数目高于 +/+ ($P = 0.000$) 和 +/sl ($P = 0.000$),

而 +/+ 与 +/sl 组间差异无统计学意义 ($P = 0.175$, 表 2)。进一步计数海马各区凋亡细胞数目, CA1 区最高, 占凋亡细胞总数比例分别为 +/+ 占 69.41%、+/sl 占 64.41% 和 sl/sl 占 82.82%; 其次为 CA3 区, 分别为 +/+ 占 17.84%、+/sl 占 24.11% 和 sl/sl 占 9.92%; 以齿状回最低, 分别为 +/+ 占 12.83%、+/sl 占 11.64% 和 sl/sl 占 7.31%。表明 *EDNRB* 基因在幼鼠海马结构发育过程中具有抗凋亡作用。

ELISA 法显示, 出生后 2 d 的 3 种基因型新生大鼠海马组织 BDNF ($P = 0.479$) 和 GDNF ($P = 0.107$) 表达量差异均无统计学意义, 提示 *EDNRB* 基因缺陷不影响新生大鼠海马 BDNF 和 GDNF 的表达 (表 3)。

讨 论

本研究检测 *EDNRB* 基因缺陷的新生大鼠海马神经细胞凋亡以及神经营养因子 GDNF 和 BDNF 表达变化, 探讨 3 种基因型 (+/+, +/sl 和 sl/sl) 在新生大鼠神经系统发育中对神经细胞凋亡和神经因子表达的影响, 结果显示, 与 +/+ 相比, sl/sl 新生大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经细胞凋亡增加, 但 3 种基因型海马 GDNF 和 BDNF 表达差异无统计学意义, 表明神经细胞的凋亡与神经营养因子介导的途径无关。

内皮素家族具有参与调节细胞分化、增殖和细胞营养等多种功能。例如, 大脑 *EDNRB* 基因激活可促进神经元和星形胶质细胞增殖, 上调星形胶质细

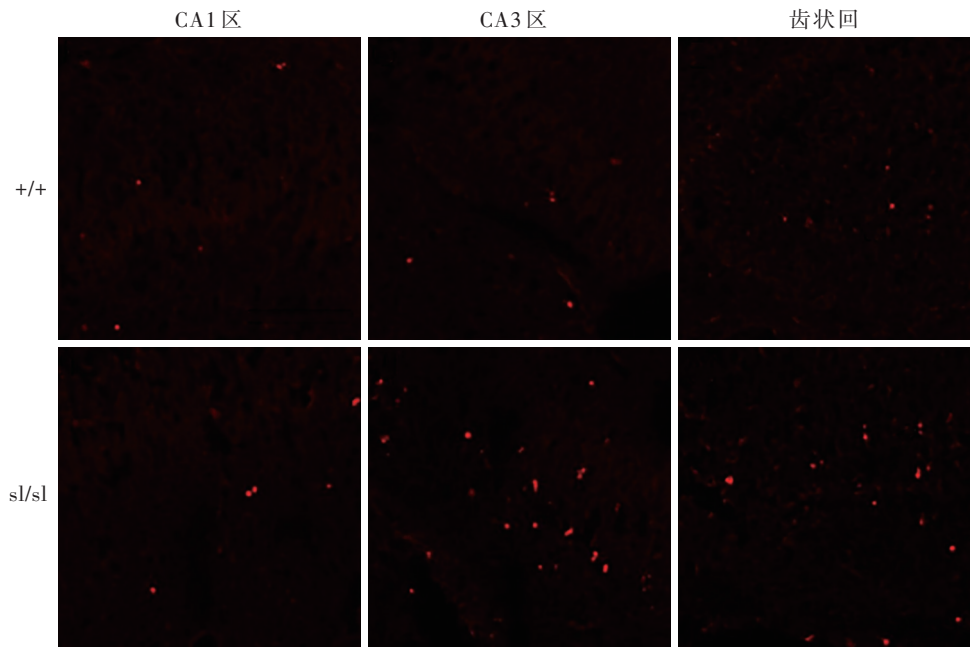


图2 荧光共聚焦显微镜观察显示,出生后2 d的sl/sl新生大鼠海马CA1区、CA3区和齿状回凋亡细胞数目多于+/+ TUNEL染色 低倍放大

Figure 2 Confocal fluorescence microscopy showed the number of TUNEL positive cells of sl/sl rats 2 d postnatal was significantly increased compared with that of +/+ rats. TUNEL staining low power magnified

胞骨架蛋白和多种神经营养因子的表达。在中枢神经系统中, *EDNs* 和 *EDNRB* 基因的作用机制是防止神经细胞凋亡, 促进神经细胞和施万细胞前体存活^[11-12]。Dembowski等^[13]在 *EDNRB* 基因缺陷纯合子型大鼠脑组织中发现, 大鼠海马各区和齿状回以及小脑神经细胞凋亡明显增多; 这一现象亦可见于其他脑区, 如大脑皮质、尾状核和嗅球等(未发表)。因此我们推测, *EDNRB* 基因缺陷导致的神经细胞凋亡增多涉及全脑, 并非仅见于海马、小脑等特定区域, 尚待进一步研究。在神经系统发育过程中, *EDNRB* 基因影响神经细胞的存活和凋亡, 其抗细胞凋亡作用可在 *EDNRB* 基因缺陷后逆转, 表明 *EDNRB* 基因促神经细胞存活和抗凋亡的作用不仅贯穿胚胎大鼠神经系统形成的全过程, 还一直延续至大鼠出生后神经系统的发育过程中。

值得注意的是, 本研究显示, 正常新生大鼠的所有脑区一直存在较低密度和频率的神经细胞凋亡, +/+ 海马神经细胞凋亡数目平均为 11 个/mm²^[2], 小脑为 4 个/mm²、尾壳核 9 个/mm²、嗅球 1 个/mm²、大脑皮质 6 个/mm²(未发表)。我们课题组的既往研究显示, BrdU 标记的细胞核分布与 TUNEL 染色阳

性细胞相背离, 如 +/+ 大鼠 BrdU 标记的细胞密度在齿状核最高, 表明该区域细胞增殖最旺盛, 但 TUNEL 染色阳性细胞数目最少(占 12.80%), 提示该区域神经细胞凋亡处于最低水平; 而 CA1 区与齿状核恰好相反, BrdU 标记的细胞增殖数目最低, 而 TUNEL 染色阳性细胞数目最高, 且这种趋势在 3 种基因型中均可见^[14]。*EDNRB* 基因缺陷的纯合子型先天性巨结肠大鼠特定脑区细胞增殖减少和细胞凋亡增加, 可能导致对应区域脑体积缩小, 远期可出现相应神经功能缺损症状, 但是由于纯合子型先天性巨结肠大鼠通常于出生 1~2 周后死于营养不良和小肠结肠炎等, 目前尚无针对 sl/sl 成年大鼠脑结构和功能改变的探索。宋赞民教授与澳大利亚墨尔本大学医学院 Stamp 教授合作, 成功制备 sl/sl 大鼠结肠造口模型^[15], 使 sl/sl 大鼠存活至成年(出生后 4 周后处死), 从而能够进一步观察脑结构和功能改变。业已证实, sl/sl 大鼠存在小脑神经细胞增殖减少和细胞凋亡增加^[2], 小脑主要参与调节运动协调控制和平衡功能, 海马则在学习记忆功能中发挥重要作用, 因此, 成熟的脑功能损伤研究将主要围绕上述神经功能展开。

表 1 3 种基因型新生大鼠海马凋亡细胞数目的比较 ($\bar{x} \pm s, /\text{mm}^2$)

Table 1. Comparison of TUNEL positive cell density in rats of 3 genotypes ($\bar{x} \pm s, /\text{mm}^2$)

组别	只数	TUNEL 阳性细胞数目	F 值	P 值
+/+ 组	6	11.30 ± 4.90	24.315	0.000
sl/sl 组	6	35.20 ± 7.10		
+/sl 组	6	16.20 ± 6.60		

表 2 3 种基因型新生大鼠海马凋亡细胞数目的两两比较
Table 2. Pairwise comparison of TUNEL positive cell density in rats of 3 genotypes

组间两两比	t 值	P 值
+/+ 组 : sl/sl 组	-6.780	0.000
+/+ 组 : +/sl 组	-1.460	0.175
sl/sl 组 : +/sl 组	4.801	0.000

表 3 3 种基因型新生大鼠海马 BDNF 和 GDNF 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/g}$)

Table 3. Comparison of the hippocampus concentrations of BDNF and GDNF in rats of 3 genotypes ($\bar{x} \pm s, \text{pg/g}$)

组别	只数	BDNF	GDNF
+/+ 组	8	99.32 ± 22.65	211.35 ± 66.12
sl/sl 组	6	101.34 ± 17.88	157.13 ± 57.67
+/sl 组	7	87.63 ± 25.22	140.78 ± 65.14
F 值		0.766	2.538
P 值		0.479	0.107

BDNF, brain-derived neurotrophic factor, 脑源性神经营养因子; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor, 胶质细胞源性神经营养因子

神经营养因子 BDNF 和 GDNF 的主要功能是支持正常神经细胞发育和修复损伤神经细胞。BDNF 可以防止脑缺血后谷氨酸持续释放引起的细胞外钙离子内流和细胞内钙离子释放,从而维持细胞内钙离子水平,降低神经细胞损伤;并可增加运动和感觉神经细胞轴突切断后的存活率,促进神经细胞修复和再生,减少运动神经细胞凋亡等^[16-17]。GDNF 可以提高多巴胺能神经元的存活率,抑制发育过程中运动神经细胞的程序性死亡,促进神经细胞轴突定向生长以及运动神经细胞损伤修复和神经再生等^[18-19]。成年大鼠中枢神经系统表达 GDNF,主要集中于纹状体,其他部位则局限于多巴胺能神经元分布脑区^[20]。发生脑缺血时,海马齿状回 GDNF mRNA 水平明显增加,提示 GDNF 对神经细胞的缺血性损伤有保护作用^[21]。神经营养因子在抗神经损伤方面具有重要的作用,且内源性或外源性给予

神经营养因子可预防和治疗神经细胞损伤业已证实^[22]。GDNF 和内皮素-3 激活后予以特定标记,可用于定位神经细胞的迁移、分化和存活^[23]。Koyama 等^[24-25]发现,BDNF 和 GDNF 的激活及其对神经细胞增殖的影响与 EDNBRB 基因存在相关性。动物模型显示,成年大鼠脑室内注射 EDNBRB 受体激动剂,其尾状核星形胶质细胞增殖增加^[23]。EDNBRB 受体的激活可促进星形胶质细胞表达 mRNA 和多肽,增加 GDNF 的合成^[24-26],这一现象亦可见于大鼠海马和大脑星形胶质细胞^[24]。是否 EDNBRB 基因缺陷同样影响 sl/sl 大鼠各脑区神经生长因子的表达呢? 本研究显示,3 种基因型新生大鼠海马组织 GDNF 和 BDNF 表达差异无统计学意义,与我们课题组既往研究小脑 BDNF 和 GDNF 表达变化结果相一致^[2,22]。究其原因,新生大鼠出生后 BDNF 和 GDNF 水平相对较低,至出生后第 2 周其水平方升高,即神经胶质细胞的成熟过程中^[27-28],可能影响本研究结果。此外,本研究和我们课题组既往研究均显示,新生大鼠各脑区 BDNF 基线水平差异较大,小脑表达量较高(约 500 μg/g)^[2],海马较低(本研究为 100 μg/g),大脑皮质最低(< 20 pg/g)。因此,BDNF 在小脑中的差异性表达最具代表性。

综上所述,本研究探讨 EDNBRB 基因缺陷的新生大鼠海马神经细胞凋亡以及神经营养因子 GDNF 和 BDNF 的表达变化,与 +/+ 相比较,EDNBRB 基因缺陷 sl/sl 新生大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经凋亡细胞显著增加,提示 EDNBRB 基因在神经细胞凋亡的诱导中发挥重要作用,但其作用是否一直持续存在并影响成年大鼠,造成其相应脑区神经细胞凋亡,从而出现局灶性神经功能缺损,尚待进行成年大鼠相关实验进一步探讨。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR. Endothelins control the timing of schwann cell generation in vitro and in vivo[J]. Dev Biol, 2000, 227:545-557.
 [2] Vidovic M, Chen MM, Lu QY, Kalloniatis KF, Martin BM, Tan AH, Lynch C, Croaker GD, Cass DT, Song ZM. Deficiency in endothelin receptor B reduces proliferation of neuronal progenitors and increases apoptosis in postnatal rat cerebellum [J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28:1129-1138.
 [3] Czopek A, Moorhouse R, Guyonnet L, Farrah T, Lenoir O, Owen E, van Bragt J, Costello HM, Menolascina F, Baudrie V, Webb DJ, Kluth DC, Bailey MA, Tharaux PL, Dhaun N. A novel role for myeloid endothelin-B receptors in hypertension [J]. Eur Heart J, 2019, 40:768-784.

- [4] Furuya S, Hiroe T, Ogiso N, Ozaki T, Hori S. Localization of endothelin-A and -B receptors during the postnatal development of rat cerebellum[J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 305:307-324.
- [5] Rogers SD, Peters CM, Pomonis JD, Hagiwara H, Ghilardi JR, Mantyh PW. Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS[J]. *Glia*, 2003, 41:180-190.
- [6] Miyake H, Seo S, Fujiwara N, Miyahara K, Lee C, Li B, Chen Y, Yamataka A, Pierro A. Endothelin receptor B affects the perfusion of newborn intestine: possible mechanism of necrotizing enterocolitis development [J]. *Pediatr Surg Int*, 2019, 35:1339-1343.
- [7] Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Ochi T, Sueyoshi R, Nojiri S, Akazawa C, Urao M, Yamataka A. Decreased expression of $\beta 1$ integrin in enteric neural crest cells of the endothelin receptor B null mouse model[J]. *Pediatr Surg Int*, 2020, 36:43-48.
- [8] Riechers CC, Knabe W, Sirén AL, Gariépy CE, Yanagisawa M, Ehrenreich H. Endothelin B receptor deficient transgenic rescue rats: a rescue phenomenon in the brain[J]. *Neuroscience*, 2004, 124:719-723.
- [9] Ayanlaja AA, Zhang B, Ji G, Gao Y, Wang J, Kanwore K, Gao D. The reversible effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the human brain [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 53:212-222.
- [10] Koyama Y, Tsujikawa K, Matsuda T, Baba A. Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist increases expression of GDNF and BDNF in rat brain[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18:887-894.
- [11] Shihoya W, Nishizawa T, Okuta A, Tani K, Dohmae N, Fujiyoshi Y, Nureki O, Doi T. Activation mechanism of endothelin ET(B) receptor by endothelin - 1 [J]. *Nature*, 2016, 537:363-368.
- [12] Yagami T, Ueda K, Asakura K, Kuroda T, Hata S, Sakaeda T, Kambayashi Y, Fujimoto M. Effects of endothelin B receptor agonists on amyloid beta protein (25-35)-induced neuronal cell death[J]. *Brain Res*, 2002, 948:72-81.
- [13] Dembowski C, Hofmann P, Koch T, Kamrowski - Kruck H, Riedesel H, Krammer HJ, Kaup FJ, Ehrenreich H. Phenotype, intestinal morphology, and survival of homozygous and heterozygous endothelin B receptor-deficient (spotting lethal) rats [J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35:480-488.
- [14] Song ZM, Cass DT, Croaker GDH. Reduced neural proliferation and increased cell death in the hippocampus and dentate gyrus of a rat model of Hirschsprung's disease [C]. *Proceedings of Liaoning Cell Biology Society Conference. International Conference on Spinal Cord Injury Treatment and Clinical Trials, Shenyang, 2013: 68 - 70.* [Song ZM, Cass DT, Croaker GDH. Reduced neural proliferation and increased cell death in the hippocampus and dentate gyrus of a rat model of Hirschsprung's disease [C]. *辽宁省细胞生物学学会会议论文集. 脊髓损伤治疗与临床试验国际交流会, 沈阳, 2013: 68-70.*]
- [15] Stamp LA, Obermayr F, Pontell L, Young HM, Xie D, Croaker DH, Song ZM, Furness JB. Surgical intervention to rescue hirschsprung disease in a rat model [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2015, 21:552-559.
- [16] Vercauteren M, Trenz F, Pasquali A, Cattaneo C, Strasser DS, Hess P, Iglarz M, Clozel M. Endothelin ET A receptor blockade, by activating ET B receptors, increases vascular permeability and induces exaggerated fluid retention [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 361:322-333.
- [17] Szobota S, Mathur PD, Siegel S, Black K, Saragovi HU, Foster AC. BDNF, NT - 3 and Trk receptor agonist monoclonal antibodies promote neuron survival, neurite extension, and synapse restoration in rat cochlea ex vivo models relevant for hidden hearing loss [J]. *PLoS One*, 2019, 14:e0224022.
- [18] Mishchenko TA, Mitroshina EV, Shishkina TV, Vedunova MB. Antioxidant properties of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2018, 166:293-296.
- [19] Walker MJ, Xu XM. History of glial cell line - derived neurotrophic factor (GDNF) and its use for spinal cord injury repair [J]. *Brain Sci*, 2018, 8:109.
- [20] Konishi Y, Yang LB, He P, Lindholm K, Lu B, Li R, Shen Y. Deficiency of GDNF receptor GFR $\alpha 1$ in Alzheimer's neurons results in neuronal death [J]. *J Neurosci*, 2014, 34:13127-13138.
- [21] Han D, Chen S, Fang S, Liu S, Jin M, Guo Z, Yuan Y, Wang Y, Liu C, Mei X. The neuroprotective effects of muscle-derived stem cells via brain-derived neurotrophic factor in spinal cord injury model [J]. *Biomed Res Int*, 2017:ID1972608.
- [22] Mitroshina EV, Mishchenko TA, Shishkina TV, Vedunova MV. Role of neurotrophic factors BDNF and GDNF in nervous system adaptation to the influence of ischemic factors [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 167:574-579.
- [23] Hempstead BL. Sculpting organ innervation [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113:811-813.
- [24] Koyama Y, Tsujikawa K, Matsuda T, Baba A. Endothelin increases expression of exon III - and exon IV - containing brain-derived neurotrophic factor transcripts in cultured astrocytes and rat brain [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 80:809-816.
- [25] Koyama Y, Tsujikawa K, Matsuda T, Baba A. Endothelin - 1 stimulates glial cell line-derived neurotrophic factor expression in cultured rat astrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303:1101-1105.
- [26] Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38:579-593.
- [27] Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, Goossens M, Bondurand N. Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development [J]. *Dev Biol*, 2006, 295:232-249.
- [28] Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease [J]. *Aging Dis*, 2015, 6:331-341.

(收稿日期:2021-09-15)

(本文编辑:袁云)