

· 基础研究 ·

丰富环境通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进脑缺血小鼠海马区的突触重塑

王传杰¹ 吴毅² 陶峰¹ 陈本梅¹ 杨雷¹

¹复旦大学附属金山医院康复科, 上海 201508; ²复旦大学附属华山医院康复科, 上海 200010

通信作者: 吴毅, Email: wuyi@fudan.edu.cn

【摘要】 目的 探讨丰富环境饲养促进脑缺血小鼠海马区突触重塑的作用机制。**方法** 清洁级成年雄性小鼠(C57BL/6)60只,按随机数字表法选取16只设为假手术组,剩余44只接受永久性左侧大脑中动脉栓塞(pMCAO)手术。将造模成功的32只小鼠随机分为标准饲养组和丰富环境组,每组16只。术后3d行丰富环境干预,假手术组和标准环境组置于标准环境鼠笼中饲养,丰富环境组置于丰富环境鼠笼中饲养,持续干预28d;干预28d后,采用透射电镜技术及蛋白免疫印迹检测技术,分别检测和观察分析3组小鼠海马CA3区的突触数量以及海马区Wnt7a、Dvl1、 β -catenin、突触素、PSD-95蛋白表达水平的变化。**结果** 与标准环境组相比,丰富环境组海马区突触素、PSD-95、Wnt7a、Dvl1、 β -catenin的蛋白表达水平显著升高,与标准饲养组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。丰富环境组海马CA3区的突触数量亦明显高于标准饲养组($P<0.05$)。**结论** 丰富环境可以激活脑缺血小鼠海马区Wnt7a- β -catenin-Dvl1信号通路,从而促进脑缺血小鼠海马区突触重塑。

【关键词】 丰富环境; 脑梗死; 突触重塑

基金项目: 复旦大学附属金山医院青年科研启动基金(JYQN-JC-202003)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.11.001

Enriched environments promote synaptic remodeling in the hippocampus by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway

Wang Chuanjie¹, Wu Yi², Tao Feng¹, Chen Benmei¹, Yang Lei¹

¹Department of Rehabilitation, Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China;

²Department of Rehabilitation, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200010, China

Corresponding author: Wu Yi, Email: wuyi@fudan.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore how an enriched environment promotes synaptic remodeling in the hippocampus after cerebral ischemia. **Methods** Among 60 clean, adult, male C57BL/6 mice, 16 were randomly selected into a sham operation group, while the remaining 44 underwent permanent left middle cerebral artery embolization. The 32 mice with successful modeling were randomly divided into a normal environment group and an enriched environment group, each of 16. The enriched environment group lived in an enriched environment for 28 days, while the other two groups were raised in normal conditions. The number of synapses in the CA3 area of the hippocampus was then measured using transmission electron microscopy, and the expression of Wnt7a, Dvl1, β -catenin, synaptophysin (SYN) and PSD-95 in the hippocampus were measured using western blotting. **Results** Compared with the normal environment group, the average protein expression levels of Wnt7a, Dvl1, β -catenin, SYN and PSD-95 were all significantly higher in the enriched environment group. The number of synapses in the CA3 region of the enriched environment group was also significantly higher than in the normal environment group. **Conclusion** An enriched environment can activate the Wnt7a- β -catenin-Dvl1 signaling pathway in the hippocampus after cerebral ischemia to promote synaptic remodeling, at least in mice.

【Key words】 Enriched environments; Cerebral infarction; Synaptic remodeling

Funding: the Youth Research Initiation Fund of Jinshan Hospital, Fudan University (JYQN-JC-202003)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.11.001

脑梗死是全世界最常见的导致人类残疾的疾病之一^[1],脑梗死患者的功能恢复与大脑神经系统可塑性及脑功能重组有关^[2]。如何激活并诱导神经元可塑性及脑功能重组的内源性修复机制,是目前康复治疗研究的热点问题^[3]。研究表明,内源性修复机制的激活,是脑梗死后功能恢复的主要原因^[4-5]。丰富环境(enriched environment)是一种研究脑损伤后外部环境对大脑内部修复作用机制的康复工具,并被证明对大脑内源性修复机制有明显的促进作用^[6-8]。Wnt/ β -catenin 信号通路对中枢神经的发育起关键作用^[9],在神经突触形成、信号传递及突触重塑的调节方面有重要作用^[10-11]。突触素和突触后密度蛋白(postsynaptic density protein, PSD)-95 是与突触发生相关的 2 个重要标志物^[12-13]。本研究通过丰富环境干预永久性大脑中动脉栓塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)模型小鼠,检测小鼠海马 CA3 区突触数量、突触发生相关蛋白以及 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的变化,旨在探讨丰富环境促进脑梗死后突触重塑的内在机制。

材料与方法

一、实验动物分组及模型制备

清洁级成年雄性小鼠(C57BL/6)共 60 只,购自上海杰思捷实验动物有限公司,许可证号 SCXK(沪)2018-0004,体重 20~24 g,用随机数字表法,随机选取 44 只接受 pMCAO 手术,16 只作为假手术组。实验中对小鼠的所有操作均符合实验动物伦理,并获得复旦大学动物保护与使用委员会授权(编号 20160858A232)。参照相关文献^[6,14]制作 pMCAO 模型小鼠,以小鼠行为学评分作为判断脑缺血造模成功的标准,具体操作如下。

将每只小鼠放在一根平衡木上(宽 1.5 cm,长 60 cm)60 s 按 0~6 分进行行为学评分:①0 分,能在平衡木上自由行走;②1 分,用双侧爪子抓住平衡木;③2 分,能抱住平衡木,但有一肢体掉下;④3 分,能抱住平衡木,有两个肢体掉下;⑤4 分,掉下平衡木,但是能坚持 40~60 s;⑥5 分,20~40 s 内掉下平衡木;⑦6 分,无法停留在梁上。将得分为 2~4 分的小鼠认定为模型制备成功,并纳入本研究。

经过评定,接受 pMCAO 手术的 44 只小鼠中,32 只小鼠造模成功。将造模成功的 32 只小鼠用随机数字表法分为标准环境组和丰富环境组,每组 16 只。假手术组小鼠仅做左侧颈总动脉分离手术,不进行线栓插入处理。

二、丰富环境与标准环境的设计

参照相关文献^[15-16]设计丰富环境鼠笼。丰富环

境鼠笼大小为 65 cm×75 cm×25 cm,含攀登梯子、小秋千、塑料管道、小转轮、小盒子等,每个丰富环境笼内 8 只小鼠,笼内摆放的物品每 3 天更换一次。标准环境鼠笼大小为 21 cm×27 cm×16 cm。2 种鼠笼均提供 12 h 周期的昼夜光变化,并自由进食、进水,室温控制在(23±2)℃,湿度为 50%。

术后 3 d 行丰富环境干预,假手术组和标准环境组置于标准环境鼠笼中饲养,丰富环境组置于丰富环境鼠笼中饲养,持续干预 28 d。

三、蛋白免疫印迹检测

丰富环境干预 28 d 后,采用蛋白免疫印迹检测技术检测海马区 Wnt7a、Dvl1、 β -catenin、突触素、PSD-95 蛋白表达,将 3 组小鼠各取 8 只,分别用过量水合氯醛麻醉处死,并采集同侧完整海马组织备用。参考既往文献^[17],提取海马区蛋白,进行蛋白质免疫印迹分析。

方法如下:首先对海马组织用蛋白裂解液进行均质化裂解,然后 4℃离心 30 min(14 000 r/min),取上清。采用 BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司,USA)检测蛋白浓度,并配平各组蛋白浓度,蛋白样品在 95~100℃加热变性,保存于-20℃冰箱中备用。将等量的蛋白样品(20 μ l)在 10%分离胶、5%浓缩胶上进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(sodium sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳,然后将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(GE Healthcare Life Sciences 公司, USA)上。在封闭液中室温下封闭 1 h,然后将膜与下列一抗抗体在 4℃隔夜孵育。所有抗体均购买自美国 Abcam 公司,分别为 Wnt7a(兔抗小鼠,1:1000),Dvl1(兔抗小鼠,1:1000), β -catenin(兔抗小鼠,1:500),突触素(兔抗小鼠,1:1500),PSD-95(兔抗小鼠,1:1500), β -tubulin(兔抗小鼠,1:1000)。用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(tris buffered saline tween, TBST)洗涤 3 次后,在室温下加入 IgG 二抗(山羊抗兔,1:5000),孵育 60 min,用扫描 Western blot 图像系统(Bio-Rad 公司, USA)测定蛋白条带的强度,然后用 Image J(ImageJ, NIH 公司, USA)以 β -tubulin 作为内参蛋白进行半定量分析。

四、透射电镜检测海马 CA3 区突触数量

丰富环境干预 28 d 后,利用透射电镜检测海马 CA3 区的突触数量,将 3 组小鼠(余 8 只)分别用过量水合氯醛麻醉处死,多聚甲醛固定,立即暴露小鼠的大脑,并从海马 CA3 区提取样本(约 1 mm³)。参照既往文献^[18]制备透射电镜切片。

方法如下:将取出的海马 CA3 区样本组织放置在 4℃冰箱 2.5%戊二醛中过夜,用 4%多聚甲醛固定

2 h,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)清洗样品 3 次,每次 10 min,然后用 1%四氧化二锇固定 1.5 h,再次用 PBS 中洗涤,清洗干净后用丙酮系列脱水,最后将海马组织嵌入环氧树脂中包埋。将海马组织用 1%甲苯胺蓝染色后,用超显微切片机切割超薄切片(约 70 nm)。将切好的薄片放入 2%醋酸铀酰水溶液静置 3 min,然后用 0.5%柠檬酸铅溶液浸泡 5~10 min,最后用透射电子显微镜(Zeiss EM900)进行观察。在镜下观察并在放大 6000 倍的镜下拍照,每张切片取 10 个视野进行拍照并纳入分析。

参照国际通用的突触计算方法^[19],用公式 $N_v = N_a/d$ 估计突触数目(其中 N_v 是单位体积的突触数目, N_a 是电子显微照片单位面积的突触连接数目, d 是突触连接的平均长度)。

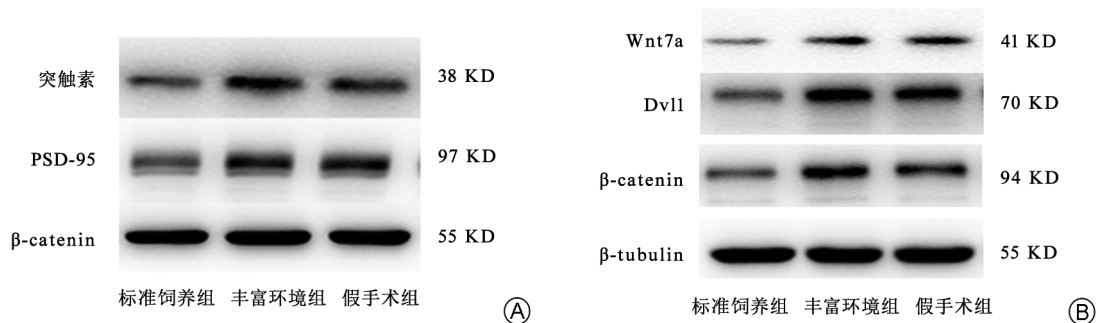
五、统计学方法

使用 SPSS 17.0 版统计软件包对数据进行统计学分析处理,所有计量数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,并呈正态分布的计量资料组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组内进一步两两比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

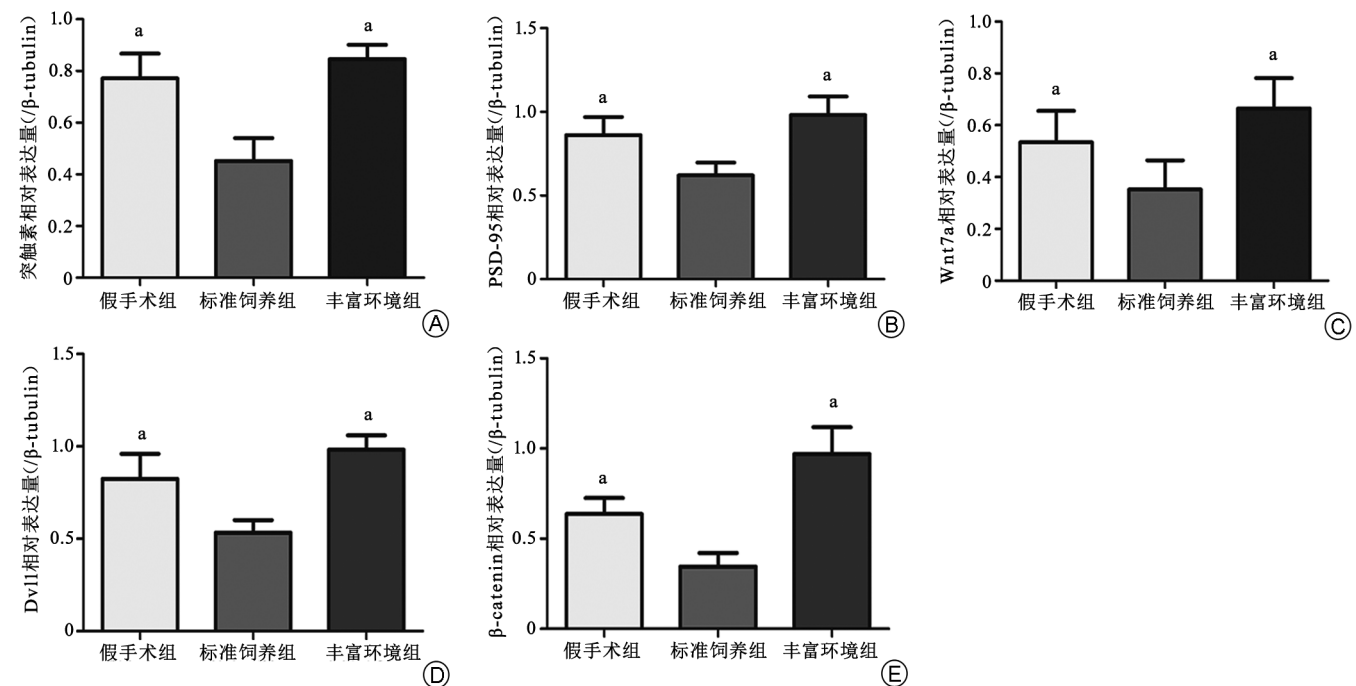
一、丰富环境干预促进小鼠海马区相应蛋白的表达

蛋白免疫印迹半定量检测结果显示,丰富环境组突触素、PSD-95、Wnt7a、Dvl1、 β -catenin 较标准饲养组明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组比较无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 1 和图 2。



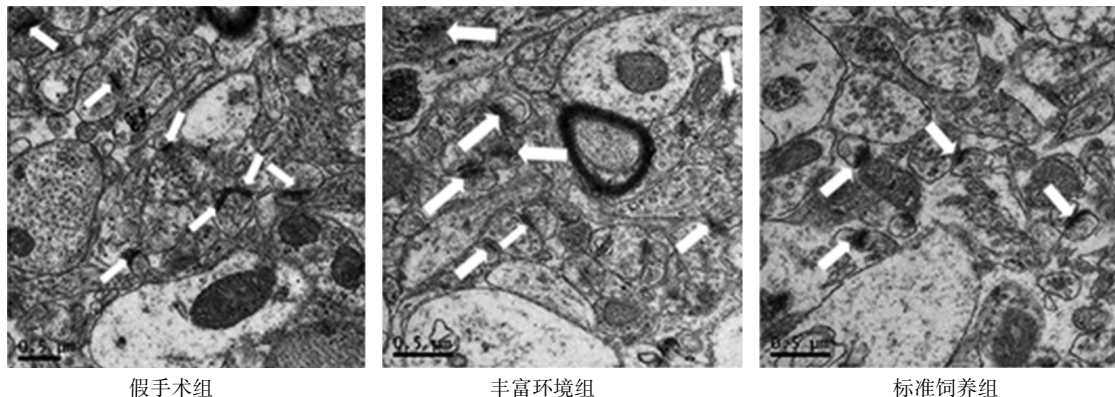
注:图 A 示海马 CA3 区突触素和 PSD-95 的蛋白表达;图 B 示海马 CA3 区 Wnt7a、Dvl1 和 β -catenin 的蛋白表达

图 1 海马 CA3 区蛋白表达免疫印迹检测图



注:与标准饲养组比较,^a $P < 0.05$

图 2 海马 CA3 区各项蛋白表达半定量分析统计图

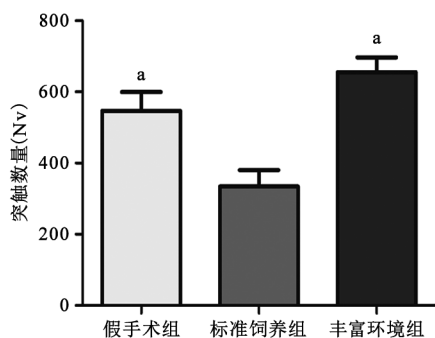


注:图中白色箭头示海马 CA3 区突触

图 3 海马 CA3 区突触透射电镜图(比例尺 0.5 μm)

二、丰富环境干预促进小鼠海马 CA3 区突触数量的增加

透射电镜检测结果显示,丰富环境组突触数量较标准饲养组明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$);与假手术组比较无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 3 和图 4。



注:与标准饲养组比较,^a $P < 0.05$

图 4 各组海马 CA3 区突触数量分析统计图

讨 论

脑梗死是目前全世界致残率最高的疾病之一^[20]。如何改善脑梗死患者的功能障碍,提高患者的生存质量,是康复研究领域的热点和难点问题。本研究结果显示,与标准环境组相比,丰富环境组的突触素、PSD-95、Wnt7a、Dvl1、 β -catenin 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);透射电镜检测发现,与标准环境组相比,丰富环境组突触数量显著升高($P < 0.05$),说明丰富环境干预明显提高了脑缺血小鼠海马区的突触数量,促进突触发生以及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达,从而促进了脑缺血小鼠海马区的突触重塑。

众所周知,突触是神经元之间在功能上发生联系的基本单元,也是信息传递的关键部位,任何神经组织的功能恢复,最终离不开突触功能的良性恢复。丰富环境是神经康复基础实验中的一种重要康复干预手

段,与标准饲养环境相比,丰富环境能够为动物提供更多的物理刺激或社会刺激,动物在新技能的反复训练、丰富环境干预或慢性应激后,突触及相关树突或轴突的数量均有明显变化^[21]。

既往的研究表明,Wnt/ β -catenin 信号通路在神经系统的生长发育、突触可塑性、神经递质传递等方面有着非常关键的作用^[10, 22-23],该信号通路由细胞外配体(Wnt3a、Wnt5a、Wnt7a 等)、细胞膜上的受体(Fz、LRP5/6 等)、细胞浆内的转导部分(Dvl1、Gsk3 β 、 β -catenin 等)以及细胞核内的转录控制部分组成^[24];体外培养海马区神经元研究亦表明, β -catenin 可促进神经棘突的生长和复杂化,诱导新生棘突的形成^[25]。本研究结果显示,丰富环境干预可以促进 Wnt7a、Dvl1、 β -catenin 三个 Wnt 通路相关蛋白的表达,还可以促进突触素和 PSD-95 的增加,且丰富环境组小鼠海马 CA3 区的突触数量也有明显增加。

综上所述,丰富环境干预可以明显促进海马区突触的数量增加以及突触发生的相关蛋白表达,而 Wnt7a- β -catenin-Dvl1 通路的激活很有可能是突触重塑的内在分子机制。本研究的不足之处在于,丰富环境促进脑卒中后突触重塑的内在机制非常复杂,包括脑白质的重塑、血管新生的改善以及神经营养因子的增加,Wnt/ β -catenin 通路的激活只是其作用机制之一,而本研究仅关注了 Wnt/ β -catenin 通路的三个蛋白,因此对丰富环境在 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的调控机制还有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2014, 129 (3): e28-e292. DOI: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80.
- [2] Xiong Y, Manwani B, Fisher M. Management of acute ischemic stroke [J]. Am J Med, 2019, 132 (3): 286-291. DOI: 10.1016/j.amjmed.

- 2018.10.019.
- [3] Arai K. Stroke literature synopses: basic science (2018/Oct) [J]. *Stroke*, 2019, 50 (1): e2-e3. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.023895.
 - [4] Cui X, Chopp M, Zacharek A, et al. The neurorestorative benefit of GW3965 treatment of stroke in mice [J]. *Stroke*, 2013, 44 (1): 153-161. DOI:10.1161/STROKEAHA.112.677682.
 - [5] Nonose Y, Gewehr PE, Almeida RF, et al. Cortical bilateral adaptations in rats submitted to focal cerebral ischemia; emphasis on glial metabolism [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (3): 2025-2041. DOI: 10.1007/s12035-017-0458-x.
 - [6] Wang C, Zhang Q, Yu K, et al. Enriched environment promoted cognitive function via bilateral synaptic remodeling after cerebral ischemia [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 1189. DOI: 10.3389/fneur.2019.01189.
 - [7] Jeffers MS, Corbett D. Synergistic effects of enriched environment and task-specific reach training on poststroke recovery of motor function [J]. *Stroke*, 2018, 49 (6): 1496-1503. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.020814.
 - [8] Sakalem ME, Seidenbecher T, Zhang M, et al. Environmental enrichment and physical exercise revert behavioral and electrophysiological impairments caused by reduced adult neurogenesis [J]. *Hippocampus*, 2017, 27 (1): 36-51. DOI: 10.1002/hipo.22669.
 - [9] Caracci MO, Ávila ME, de Ferrari GV, De Ferrari. Synaptic Wnt/GSK3 β signaling hub in autism [J]. *Neural Plast*, 2016, 2016: 9603751. DOI: 10.1155/2016/9603751.
 - [10] Li P, Zhang Y, Liu H. The role of Wnt/ β -catenin pathway in the protection process by dexmedetomidine against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Life Sci*, 2019, 236: 116921. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116921.
 - [11] Park M, Shen K. WNTs in synapse formation and neuronal circuitry [J]. *EMBO J*, 2012, 31 (12): 2697-2704. DOI: 10.1038/emboj.2012.145.
 - [12] Xu X, Ye L, Ruan Q. Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234 (3): 296-305. DOI: 10.3181/0804-RM-128.
 - [13] Yan BC, Park JH, Ahn JH, et al. Postsynaptic density protein (PSD)-95 expression is markedly decreased in the hippocampal CA1 region after experimental ischemia-reperfusion injury [J]. *J Neurol Sci*, 2013, 330 (1-2): 111-116. DOI: 10.1016/j.jns.2013.04.023.
 - [14] Doyle KP, Buckwalter MS. A mouse model of permanent focal ischemia; distal middle cerebral artery occlusion [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1135: 103-110. DOI: 10.1007/978-1-4939-0320-7_9.
 - [15] Xie H, Yu K, Zhou N, et al. Enriched environment elicits proangiogenic mechanisms after focal cerebral ischemia [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10 (2): 150-159. DOI: 10.1007/s12975-018-0629-8.
 - [16] Wang CJ, Wu Y, Zhang Q, et al. An enriched environment promotes synaptic plasticity and cognitive recovery after permanent middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14 (3): 462-469. DOI: 10.4103/1673-5374.245470.
 - [17] Zhang Y, Xu D, Qi H, et al. Enriched environment promotes post-stroke neurogenesis through NF- κ B-mediated secretion of IL-17A from astrocytes [J]. *Brain Res*, 2018, 1687 (1): 20-31. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.02.030.
 - [18] Chen X, Zhang X, Xue L, et al. Treatment with enriched environment reduces neuronal apoptosis in the periinfarct cortex after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41 (4): 1445-1456. DOI: 10.1159/000468368.
 - [19] Nava N, Chen F, Wegener G, et al. A new efficient method for synaptic vesicle quantification reveals differences between medial prefrontal cortex perforated and nonperforated synapses [J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522 (2): 284-297. DOI: 10.1002/cne.23482.
 - [20] Stokowska A, Atkins AL, Morán J, et al. Complement peptide C3a stimulates neural plasticity after experimental brain ischaemia [J]. *Brain*, 2017, 140 (2): 353-369. DOI: 10.1093/brain/aww314.
 - [21] Faatehi M, Basiri M, Nezhadi A, et al. Early enriched environment prevents cognitive impairment in an animal model of schizophrenia induced by MK-801: role of hippocampal BDNF [J]. *Brain Res*, 2019, 1711: 115-119. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.01.023.
 - [22] Lanoue V, Langford M, White A, et al. The Wnt receptor Ryk is a negative regulator of mammalian dendrite morphogenesis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 5965. DOI: 10.1038/s41598-017-06140-z.
 - [23] Ortiz-Matamoros A, Salcedo-Tello P, Avila-Muñoz E, et al. Role of wnt signaling in the control of adult hippocampal functioning in health and disease: therapeutic implications [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2013, 11 (5): 465-476. DOI: 10.2174/1570159X11311050001.
 - [24] Gupta K, Schnell E. Neuronal network remodeling and Wnt pathway dysregulation in the intra-hippocampal kainate mouse model of temporal lobe epilepsy [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (10): e0215789. DOI: 10.1371/journal.pone.0215789.
 - [25] Ciani L, Boyle KA, Dickins E, et al. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (26): 10732-10737. DOI: 10.1073/pnas.1018132108.

(修回日期: 2021-09-20)

(本文编辑: 汪 玲)