第 38 卷　第 6 期
2013 年 12 月

贵　阳　医　学　院　学　报
JOURNAL OF GUIYANG MEDICAL COLLEGE

Vol. 38　No. 6
2013. 12

褪黑素对成年大鼠海马神经元络丝蛋白表达的影响

王　澜，王淑莲*
（娄底市中心医院 新生儿科，湖南 娄底　417000）

［摘　要］**目的**：探讨褪黑素对络丝蛋白（reelin）表达的影响。**方法**：将 SD 大鼠分为生理盐水对照组和褪黑素组，两组大鼠腹腔分别给予生理盐水或褪黑素后，用 Western blot、免疫组织化学以及实时定量 PCR 的方法检测海马组织中 reelin 表达。**结果**：褪黑素组大鼠海马神经细胞胞膜以及细胞外基质中 reelin 表达与对照组相比明显增加（$P < 0.05$），reelin mRNA 的表达量增加（$P < 0.05$），Western blot 结果显示给予褪黑素后，大鼠海马 reelin 蛋白表达增加（$P < 0.05$）。**结论**：褪黑素可能通过增加 reelin mRNA 的量促进 reelin 蛋白的表达。

［关键词］褪黑激素；海马；神经元；络丝蛋白；大鼠，Sprague-Dawley
［中图分类号］R338.24；R34－33　［文献标识码］A　［文章编号］1000-2707（2013）06-0629-03

Influence of Melatonin on Reelin Expression in Hippocampus Neurons of Adult Rats

WANG Lan，WANG Shulian
（*Department of Pediatrics，Central Hospital of Loudi，Loudi 417000，Hunan，China*）

［**Abstract**］**Objective**：To investigate influence of melatonin on reelin protein expression. **Methods**：Twenty SD rats were randomly divided into melatonin treatment group（group mel），and normal saline control group（group con），and were given melatonin and saline respectively via abdominal cavity. Reelin expression in hippocampus was detected by using Western blot，immunohistochemical method and real time PCR. **Results**：The expression of reelin in cell membrane and extracellular matrix of group mel was significantly higher than those in group con. The amount of reelin mRNA of group mel was 2.5 times of that of group con，and reelin protein increased by 1.5 times after melatonin treatment. **Conclusion**：Melatonin can increase the quantity of reelin by promoting mRNA expression in the cell membrane and extracellular matrix.

［**Key words**］melatonin；hippocampus；neurons；reelin；rats，Sprague-Dawley

褪黑素是松果体分泌的激素，它的分泌受外界光线控制，光线刺激通过视神经环路影响其分泌。褪黑素调节昼夜节律、睡眠等多种生理功能，最引人注目的是对认知功能的影响。褪黑素通过其褪黑素受体 2（MT2）抑制长时程增强（LTP），LTP 是学习记忆的基础，在晚间可抑制斑马鱼记忆形成[1-2]。有文献报道褪黑素通过褪黑素受体上调视交叉上核 GABA 神经元活性，而在中枢神经系统海马 CA1 区降低神经元电流幅度[3]。在新生儿时期，络丝蛋白（reelin）主要由 cajal-retzius 细胞分泌，通过 VLDLR 和 ApoER2 受体介导细胞信号，使受体络氨酸激酶磷酸化 Dab1 从而调节发育中的神经元到达特定的半层结构[4]。成年后，reelin 持续表达，在海马区 reelin 由 GABA 能神经元分泌[5-6]。本实验通过腹腔给予褪黑素，检测大鼠海马 reelin 蛋白的表达，探讨褪黑素对 reelin 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　仪器和试剂

*通信作者 E-mail：Wangshul2011@ yeah. net.

－80 ℃低温冰箱（Nuarie 德国），凝胶电泳分析系统（Hoefle），离心机（LXJ-11，上海医用分析仪器厂），低温高速离心机（Sigma），恒温振荡培养摇床（武汉科学仪器厂），电泳槽（Hofer），振荡切片机（LANCER，S100，TPI，德国），转膜仪（Bio-Rad），TP-200 振荡器，Applied Biosystems RT-PCR 仪，LI-COR Odyssey 显色仪。褪黑素（美国 sigma 公司），抗 reelin 抗体（abcam，ab18570），RT-PCR 试剂盒（Takara），丙烯酰胺/N，N-二甲基双丙烯酰胺，三羟甲基氨基甲烷，四甲基乙二胺，十二烷基磺酸钠，甘氨酸（Glycine，Gly），脱氧胆酸钠，苯甲磺酰氟均为 Sigma 公司产品。过硫酸铵和二喹啉甲酸蛋白测定试剂盒从 Pierce 公司购买，NC 膜为 Hybond 公司生产。免疫印迹所用抗体稀释液均为含 0.02% NaN_3 的 3% BSA 稀释液。

1.2　动物及分组

雄性 SD 大鼠，体重约 200 g，8 周龄，华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。各组大鼠自由摄食、饮水，分笼喂养，动物室温度控制在 22～24 ℃，相对湿度为 30%～40%，光照 12 h/d（8∶00 开灯，20∶00 关灯）。将大鼠随机分为两组，一组给予生理盐水（con 组），另外一组给予褪黑素（mel 组），每组 10 只，分笼饲养。褪黑素临用前以无水乙醇溶解，再加生理盐水配制，使乙醇浓度为 2%，置 4 ℃冰箱保存备用。褪黑素组予褪黑素（10 mg/kg）腹腔注射，连续给药 1 个月；生理盐水组给予相同剂量的生理盐水。实验结束后取出大鼠海马组织，海马组织保存在－80 ℃冰箱中以备后用。

1.3　观察指标及检测方法

1.3.1　免疫组织化学法检测 reelin 表达　用 4% 多聚甲醛溶液（可加入少量苦味酸）进行心脏灌注固定脑组织，待取出脑组织后在上述固定液中固定约 24 h，即可取出的大鼠海马组织的振荡切片，片厚 30 μm。切片 4 ℃ 1 倍 PB 溶液保存。将切片按操作说明书行免疫组织化学染色，检测 reelin 表达。

1.3.2　实时定量 PCR 检测 reelin mRNA　按照 Takara 试剂盒说明书上的方法抽提取出的大鼠海马组织的 RNA，逆转录成 cDNA，测定浓度，均稀释成 1 g/L。引物序列为 reelin 上游引物：5′-CCCAGCCCAGACAGACAGTT-3′，下游引物：5′-CCAGGTGATGCCATTGTTGA-3′；内参 GAPDH 上游引物序列：5′-TGCACCACCAACTGCTTA-3′，下游引物序列：5′-GGATGCAGGGATGATGTTC-3′，经过实时定量 PCR 仪自动检测，得到曲线。

1.3.3　Western blot　大鼠颈椎脱臼断头处死，快速取出脑组织置于 0～4 ℃生理盐水内冲洗，分离双侧海马，以 1∶9 的比例（即 100 μg 重量加入 900 μL体积）加入蛋白匀浆提取液，在冰水制成 10% 的蛋白匀浆，加入 1/3 体积 4 倍上样缓冲液（终浓度为 100 mmol/L Tris，pH 6.8，4% SDS，20% 甘油），沸水浴 10 min，匀浆在 1 000 r/min 离心 3～5 min，取上清液，按照 Western blot 操作步骤行 reelin 蛋白表达量的检测。

1.4　统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS 13.0 进行统计分析，组间比较采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　大鼠海马 reelin 蛋白表达

SD 大鼠给予褪黑素后，海马 reelin 蛋白表达增加，与生理盐水组相比，差异有显著性（$P<0.05$）。如图 1。

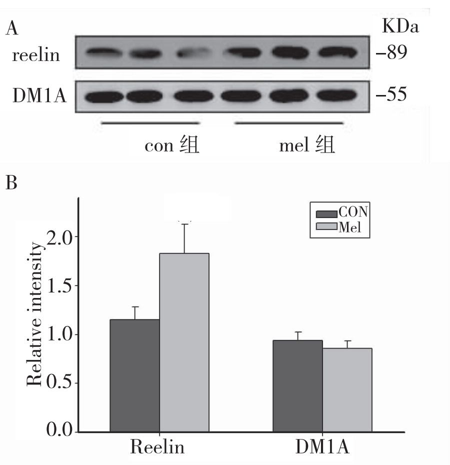

图 1　生理盐水组和褪黑素组海马组织匀浆后 reelin 蛋白表达

Fig.1　Reelin protein expression in hippocampus tissue of groups mel and con

2.2　大鼠海马 reelin 阳性表达

如图 2。免疗组织化学结果显示，reelin 主要分布于胞膜和细胞外基质中，褪黑素组与生理盐水组相比，胞膜与细胞外基质中 reelin 表达明显增加。

2.3　大鼠海马 reelin mRNA 表达

reelin 蛋白 mRNA 的实时定量 PCR 如图 3，褪黑素组与生理盐水组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。

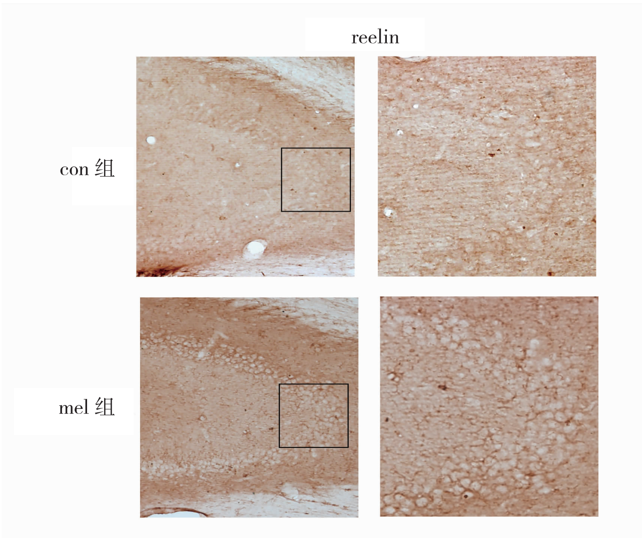

图 2　两组大鼠海马 CA3 区神经元胞膜和基质中 reelin 表达

Fig. 2　Reelin expression in neuron membrane and extracellular of rats of hippocampus CA3 of rats treated with melatonin

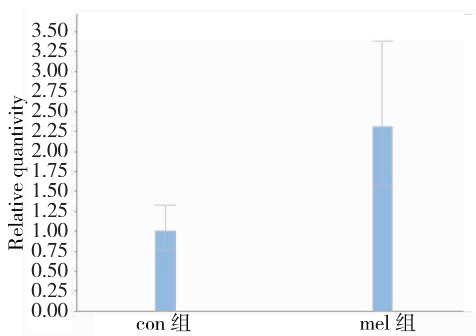

图 3　大鼠海马神经元 reelin mRNA 的表达

Fig. 3　Reelin mRNA expression in rat hippocampus neuron

3　讨论

褪黑素是体内一种很重要的内分泌激素，主要由松果体分泌，在调节机体的免疫系统功能、昼夜节律、氧化应激以及学习记忆方面都起着很重要的作用。大多认为褪黑素分泌量的减少及其功能紊乱与老年相关疾病密切相关[7]。在许多退行性疾病中，如老年性痴呆，褪黑素和 reelin 蛋白的表达均发生了变化，褪黑素分泌是明显减少的[8-9]；reelin 蛋白分泌也减少，同时 reelin 的减少可以直接促进 AB 的聚集，加速老年斑的形成[10]。本组结果证明给予褪黑素可以增加大鼠海马 reelin 的表达。免疫组织化学证明褪黑素不但促进表达 reelin 蛋白的阳性细胞增多，同时 western blot 和 RT-PCR 也证明了大鼠海马组织 reelin 的 mRNA 和蛋白质的表达水平也是增高的。

现在褪黑素已经广泛应用于临床与保健，体外给予褪黑素对某些老年退行性疾病病人可以起到部分的治疗作用，同时对老年人也有保健作用。

4　参考文献

[1] Louisa MW, Nanthia AS, Dipesh C, et al. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation[J]. European Journal of Neuroscience, 2005(22):2231 –2237.

[2] Rawashdeh O, De Borsetti NH, Roman G, et al. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish [J]. Science, 2007(5853):1144 –1146.

[3] Qi W, Man HY. Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors[J]. Nature Neuroscience, 1999(5):335.

[4] Howell BW, Lanier LM, Frank R, et al. The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmenflbrane glyeoproteins and to phospholipphospholipids[J]. Mol Cell Biol, 1999(19):5179 –5188.

[5] Alcantara S, Ruiz MD, Arcangelo G, et al. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse[J]. J Neurosci, 1998(18):7779 –7799.

[6] Ramos-Moreno T, Galazo MJ, Porrero C, et al. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain[J]. Eur J Neurosci, 2006(23):401 –422.

[7] Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease[J]. J Pineal Res, 2005(38):145 –152.

[8] Wu YH, Feenstra MG, Zhou JN, et al. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003(88):5898 –5906.

[9] Zhou JN, Liu RY, Kamphorst W, et al. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels[J]. J Pineal Res, 2003(35):125 –130.

[10] Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, et al. Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice[J]. J Neurosci, 2001(27):9228 –9240.

（2013-09-14 收稿，2013-10-27 修回）
中文编辑：张丽君；英文编辑：苏晓庆