



·论著·

褪黑素调节DNA甲基化相关酶减轻大鼠脑缺血再灌注损伤

李光祖¹, 马瑜徽¹, 张新月¹, 李振¹, 刘萍¹, 张学宁¹, 于树娜², 王晓莉¹

1. 潍坊医学院医学影像学院, 山东 潍坊 261053

2. 潍坊医学院基础医学院, 山东 潍坊 261053

摘要:目的 观察褪黑素(Mel)对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠神经细胞凋亡的影响,并从DNA甲基化相关酶的角度探讨其分子机制。方法 健康成年雄性Sprague-Dawley大鼠35只,随机分为:假手术组(Sham组, $n=5$)、模型组(CIRI组, $n=15$)、褪黑素组(Mel组, $n=15$)。CIRI及Mel组大鼠采用改良的Zea-Longa线栓法建立大鼠CIRI模型,Sham组仅分离颈总动脉。Mel组于造模前后30 min经腹腔注射Mel(5 mg/kg体重),Sham组于造模前后注射等量的生理盐水。CIRI后24 h,行苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞形态学的变化;CIRI后6 h、24 h及72 h,TUNEL染色法观察Mel对大鼠缺血侧大脑皮质凋亡细胞的影响;免疫组织化学染色法观察Mel对大鼠缺血侧大脑皮质DNA甲基化转移酶1(DNMT1)、DNA甲基化转移酶3a(DNMT3a)蛋白表达的影响。结果 HE染色结果发现,Sham组大鼠大脑皮质神经细胞排列整齐、形态规则;CIRI组大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞排列紊乱、形态不规则;Mel组大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞排列较整齐、形态较规则。TUNEL染色结果显示,CIRI后6 h、24 h、72 h,与CIRI组相比,Mel组大鼠缺血侧大脑皮质TUNEL⁺细胞数量减少,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。免疫组织化学染色结果显示,CIRI后6 h、24 h及72 h,Mel组大鼠DNMT1⁺、DNMT3a⁺细胞数量较CIRI组减少,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。结论 Mel可抑制CIRI大鼠神经细胞凋亡,发挥神经保护作用,其机制可能与Mel降低DNMT1、DNMT3a蛋白表达,下调CIRI后DNA甲基化水平有关。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(4): 333-338.]

关键词:脑缺血;脑缺血再灌注损伤;褪黑素;DNA甲基化相关酶;大鼠

中图分类号:R743.33

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.04.003

Melatonin modulates DNA methylation-related enzymes and attenuates cerebral ischemia reperfusion injury in rats

LI Guang-Zu¹, MA Yu-Hui¹, ZHANG Xing-Yue¹, LI Zhen¹, LIU Ping¹, ZHANG Xue-Ning¹, YU Shu-Na², WANG Xiao-Li¹

1. School of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China

2. School of Basic Medicine, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China

Corresponding author: WANG Xiao-Li, Email: wxlpine@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of melatonin (Mel) on neural cell apoptosis in rats with cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) and its molecular mechanism from the perspective of DNA methylation-related enzymes. **Methods** A total of 35 healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group (Sham group with 5 rats), model group (CIRI group with 15 rats), and Mel group with 15 rats. The rats in the CIRI group and the Mel group were used to establish a rat model of CIRI using the modified Zea-Longa suture method, and those in the Sham group were given isolation of the common carotid artery alone. The rats in the Mel group were given intraperitoneal injection of Mel (5 mg/kg body weight) at 30 minutes before and after modeling, and those in the Sham group were given injection of an equal volume of normal saline before and after modeling. HE staining was performed at 24 hours after CIRI to observe the

基金项目:国家自然科学基金项目(82071888);山东省自然科学基金项目(ZR2020MH074);山东省中医药科技发展计划项目(2019-0417)

收稿日期:2021-04-17;**修回日期:**2021-07-28

作者简介:李光祖(1996—),男,硕士研究生在读,主要研究方向:脑损伤疾病的基础及影像学研究。

通信作者:王晓莉(1978—),女,教授,博士,硕士研究生导师,主要研究方向:脑损伤疾病的基础及多模态神经影像学研究。Email:wxlpine@163.com。

change in neural cell morphology at the ischemic side of cerebral cortex; at 6, 24, and 72 hours after CIRI, the TUNEL staining method was used to observe the effect of Mel on apoptotic cells at the ischemic side of cerebral cortex; immunohistochemistry was performed to observe the effect of Mel on the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) at the ischemic side of cerebral cortex. **Results** HE staining showed that in the Sham group, the neural cells in the cerebral cortex had ordered arrangement and regular morphology; in the CIRI group, the neural cells at the ischemic side of cerebral cortex had disordered arrangement and irregular morphology; in the Mel group, the neural cells at the ischemic side of cerebral cortex had relatively ordered arrangement and regular morphology. TUNEL staining showed that at 6, 24, and 72 hours after CIRI, the Mel group had a significant reduction in the number of TUNEL⁺ cells at the ischemic side of cerebral cortex compared with the CIRI group ($P<0.01$). Immunohistochemical staining showed that at 6, 24, and 72 hours after CIRI, the Mel group had a significant reduction in the number of DNMT1 and DNMT3a positive cells compared with the CIRI group ($P<0.01$). **Conclusions** Mel can inhibit the apoptosis of nerve cells in CIRI rats and thus exert a neuroprotective effect, possibly by down regulating the protein expression of DNMT1 and DNMT3a and reducing the level of DNA methylation after CIRI.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(4): 333–338.]

Keywords: cerebral ischemia; cerebral ischemia reperfusion injury; melatonin; DNA methylation-related enzymes; rat

据最新调查数据显示,我国脑卒中死亡人数约占总死亡人数的22.45%,其中急性缺血性脑卒中(acute ischemia stroke, AIS)的发病率居高不下,是导致中老年人致残、致死的重要原因^[1]。目前临床主要以介入取栓、静脉溶栓治疗,但血管再通后体内微环境失调,往往会导致脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia refusion injury, CIRI),因此,寻求一种可有效减轻CIRI的药物具有重要意义。褪黑素(melatonin, Mel)是松果体分泌的一种神经内分泌激素,具有抗炎、抗凋亡等多种作用。大量研究表明,Mel对CIRI大鼠神经细胞具有保护作用,可有效减少细胞凋亡^[2]。但是Mel减轻CIRI后细胞凋亡的机制尚待阐明。DNA甲基化是表观遗传学的重要组成部分,在维持正常细胞功能中起着重要作用,是目前研究的热点。研究表明,DNA甲基化是导致CIRI的重要原因,下调DNA甲基化可显著改善CIRI脑内氧化应激及炎症损伤,从而减轻缺血性脑损伤^[3]。DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)、DNA甲基化转移酶3a(DNA methyltransferase 3a, DNMT3a)是DNA甲基化修饰的关键酶,可调节机体DNA甲基化水平,体外细胞实验表明Mel可降低受精卵细胞DNMT1、DNMT3a的表达,进而下调DNA甲基化水平,促进胚胎发育^[4],但Mel对CIRI后DNA甲基化相关酶的影响尚不清楚。因此,本研究拟从DNA甲基化相关酶调控的角度,观察Mel对CIRI后大鼠脑组织神经细胞凋亡的影响,以期Mel的临床应用提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年雄性Sprague Dawley大鼠35只[由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号为SCXK(鲁)20190007],体重240~270 g。随机分为:①假手术组

(Sham组, $n=5$),颈部正中切口,分离颈总动脉;②模型组(CIRI组, $n=15$);③褪黑素组(Mel组, $n=15$)。Mel组于造模前后30 min经腹腔注射Mel(5 mg/kg);Sham组于造模前后30 min腹腔注射等量的生理盐水。CIRI组及Mel组根据造模后不同时间分为6 h、24 h及72 h亚组,每个亚组5只大鼠。

1.2 主要试剂及仪器

褪黑素(美国, Sigma公司);兔抗DNMT1(英国, Abcam公司);兔抗DNMT3a(北京博奥森生物技术有限公司);TUNEL染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗二步法试剂盒(PV9001)、二氨基联苯胺(DAB)显色剂试剂盒(ZLI9018)(北京中杉金桥生物技术有限公司);正置荧光显微镜(BX-51, 日本Olympus公司);石蜡切片机(Shandon Finesse325, 美国Thermo公司);电子分析天平(AL-204, 美国Mettler Toledo公司)。

1.3 动物模型的制作

采用改良的Zea-Longa线栓法^[5]制备大鼠CIRI模型:腹腔麻醉,颈部正中切口,分离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,结扎颈外动脉,于颈总动脉插入顶端直径为(0.34±0.02)mm的线栓,当线栓头部进入颈内动脉,并距离颈总动脉分叉处约18.0 mm处有阻塞感,停止进线,缝合颈部皮肤,缺血2 h后拔出线栓。

1.4 行为学评分

评估模型大鼠行为学:0分,正常行走,无神经功能受损表现;1分,悬吊尾部左前肢挛缩,无法正常伸直;2分,无法直行并向左侧转小圈;3分,向左侧倾倒或转大圈;4分,无法行走或死亡。将各组评分1~3分者,纳为研究对象。

1.5 取材及石蜡切片的制作

Sham组、CIRI组及Mel组6 h、24 h、72 h亚组大鼠依次常规心脏灌注,断头取脑,4%多聚甲醛后固定24~72 h,梯度乙醇脱水,浸蜡,石蜡包埋,石蜡切片机行冠状位切片,制成厚约4 μm 的脑组织石蜡切片。每3~5张切片取一张切片,每只大鼠取5张切片,分别行苏木素-伊红(Hematoxylin and Eosin stain, HE)、免疫组织化学及TUNEL染色。

1.6 HE染色

常规脱蜡、水化脑组织切片,依次行苏木精染核及分化液分化,双蒸水冲洗,伊红染液染浆,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。置于光学显微镜下观察大鼠大脑皮质组织病理学改变。

1.7 免疫组织化学染色

常规脱蜡,水化组织切片,水浴热抗原修复,正常山羊封闭血清封闭非特异性结合位点,分别加入兔抗DNMT1(1:100)、兔抗DNMT3a(1:200)一抗,4℃冰箱过夜。次日,37℃恒温箱复温,依次滴加山羊抗兔二抗试剂盒,显微镜下DAB显色,至细胞核呈现淡棕黄色终止染色,苏木素复染,脱水、透明,中性树胶封片。置于光学显微镜下观察,计数DNMT1、DNMT3a阳性细胞数目。

1.8 TUNEL染色

常规脱蜡、水化组织切片,Proteinase K酶消化后,滴加末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)与生物素标记的dUTP(DIG-dUTP)混合溶液(1:1:100)充分标记,山羊封闭血清封闭,滴加生物素化抗地高辛抗体(1:800)及链酶亲和素-过氧化物酶(strept avidin-biotin complex, SABC)(1:800),DAB显色,苏木素复染,常规脱水透明,中性树胶封片。置于光学显微镜下观察,计数TUNEL+细胞数目。

1.9 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计学软件。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用SNK- q 检验进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mel对CIRI后大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞形态学的影响

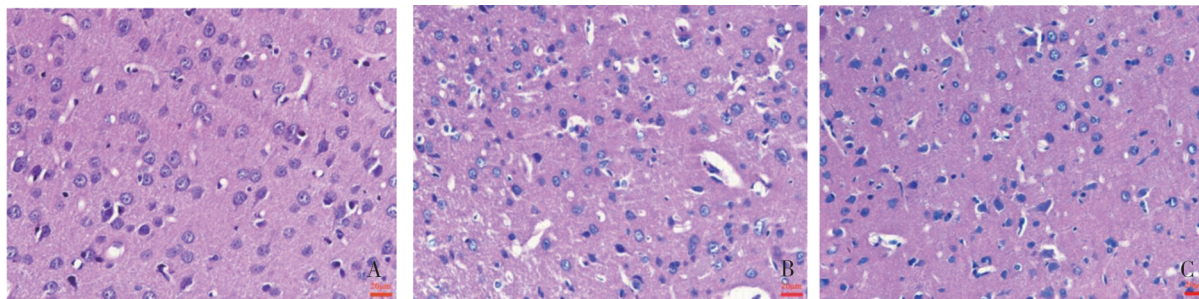
CIRI后24 h, HE染色结果示:Sham组大鼠大脑皮质神经细胞排列整齐有序、形态规则;CIRI组大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞排列紊乱、形态不规则,部分可见胞核深染,结构疏松;Mel组大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞排列较整齐、形态较规则,偶见部分胞核深染。见图1。

2.2 Mel对CIRI大鼠缺血侧大脑皮质神经细胞凋亡的影响

TUNEL是检测细胞凋亡的经典方法,TUNEL+细胞为凋亡细胞,可以反映出细胞凋亡典型的生化和形态特点。Sham组大鼠大脑皮质偶见TUNEL+细胞。CIRI后6 h,可见大鼠缺血侧大脑皮质TUNEL+细胞开始增多,TUNEL+细胞核呈现棕黄色;CIRI后24 h,大鼠缺血侧大脑皮质TUNEL+细胞达到较高水平,此后逐渐下降;CIRI后72 h, TUNEL+细胞仍多于CIRI后6 h;CIRI后各时间点,缺血侧大脑皮质TUNEL+细胞均多于Sham组,多组间差异具有统计学意义($F=1078.058$; $P<0.01$)。CIRI后各时间点, Mel组大鼠缺血侧大脑皮质TUNEL+细胞均较CIRI组减少,但仍多于Sham组,差异具有统计学意义($F=567.601$, 1035.520, 1686.985; 均 $P<0.01$)。见图2。

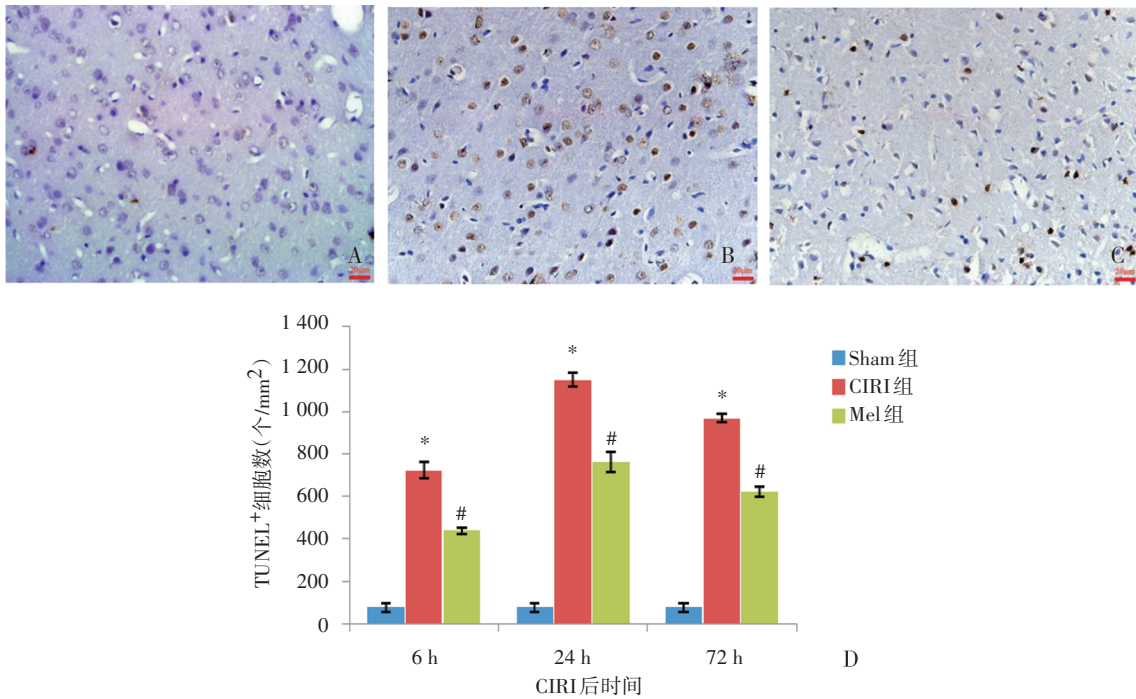
2.3 Mel对CIRI大鼠缺血侧大脑皮质DNMT1蛋白表达的影响

各组大鼠缺血侧大脑皮质DNMT1染色结果示:Sham组大鼠大脑皮质仅见极少量DNMT1+细胞。CIRI后6 h,缺血侧大脑皮质DNMT1+细胞数开始增多,DNMT1+细胞核呈现棕黄色;CIRI后24 h,DNMT1+细胞数达到较高水平,后逐渐下降;CIRI后72 h,DNMT1+细胞仍多于CIRI后6 h;CIRI后各时间点,缺血侧大脑皮质DNMT1+细胞数均显著多于Sham组,多组间差异具有统计学意义($F=686.399$; $P<0.01$)。Mel各组大鼠缺血侧大脑皮质DNMT1+细胞数较CIRI组,均显著减少,但仍多于Sham组,差异具有统计学意义($F=500.412$, 1374.443, 485.460; 均 $P<0.01$)。见图3。



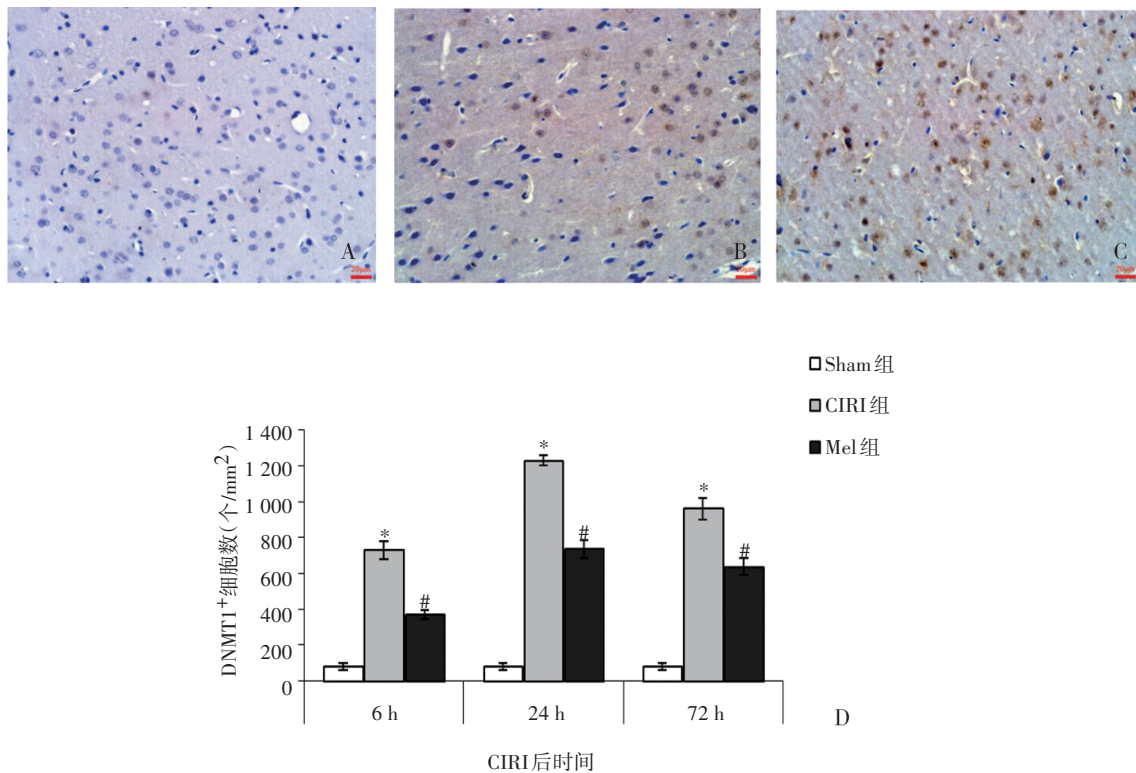
A: Sham组; B: CIRI组; C: Mel组

图1 CIRI后24 h,各组大鼠缺血侧大脑皮质HE染色结果($\times 400$)



A-C: CIRC 24 h, 各组大鼠缺血侧大脑皮质 TUNEL 染色结果($\times 400$); D: CIRC 后, 各组大鼠不同时间点缺血侧大脑皮质 TUNEL⁺ 细胞数量比较, *与 Sham 组相比, $P < 0.01$; #与 CIRC 组相比, $P < 0.01$

图2 Mel对大鼠CIRC后缺血侧大脑皮质神经细胞凋亡的影响



A-C: CIRC 24 h, 各组大鼠缺血侧大脑皮质 DNMT1 染色结果($\times 400$); D: CIRC 后, 各组大鼠不同时间点缺血侧大脑皮质 DNMT1⁺ 细胞数量比较, *与 Sham 组相比, $P < 0.01$; #与 CIRC 组相比, $P < 0.01$

图3 Mel对大鼠CIRC后缺血侧大脑皮质DNMT1蛋白表达的影响

2.4 Mel对CIRI大鼠缺血侧大脑皮质DNMT3a蛋白表达的影响

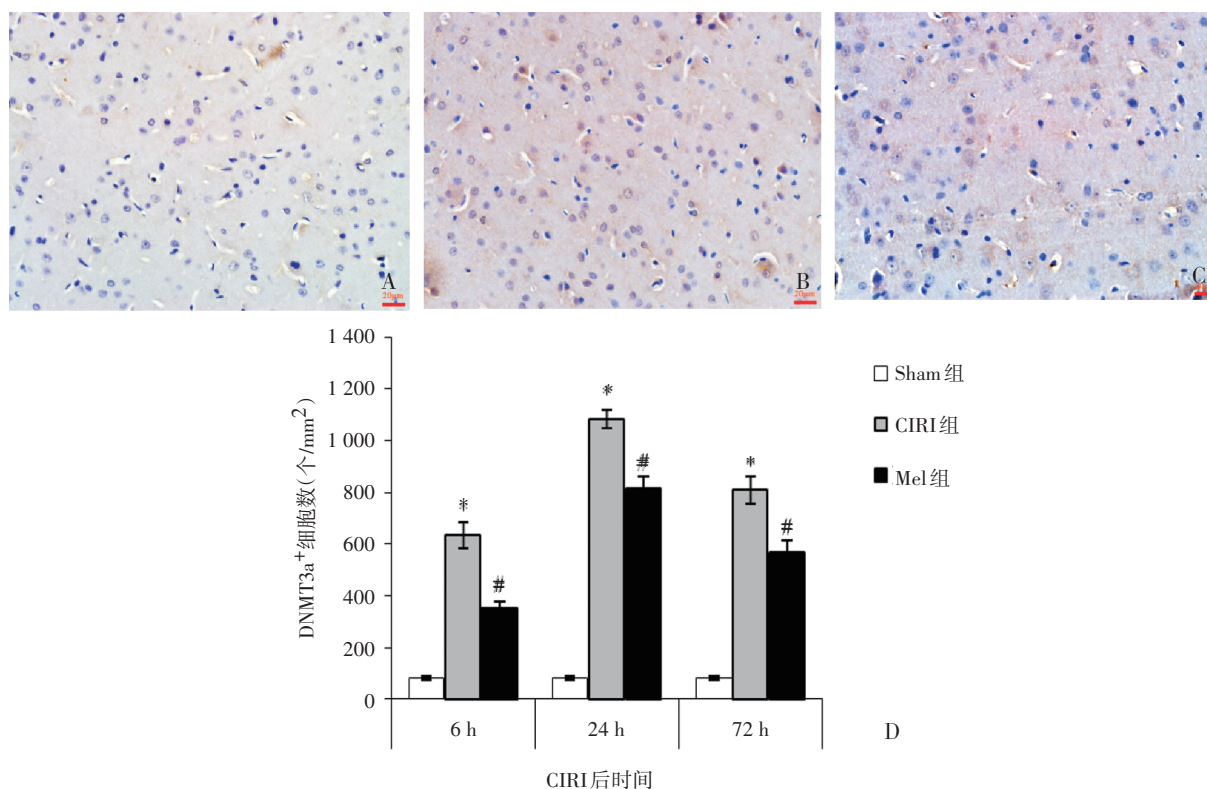
Sham组大鼠大脑皮质仅偶见或未见DNMT3a⁺细胞。CIRI后6 h,缺血侧大脑皮质DNMT3a⁺细胞开始增多,DNMT3a⁺细胞核呈现棕黄色;CIRI后24 h达到较高水平,此后逐渐下降;CIRI后72 h组DNMT3a⁺细胞数仍多于CIRI后6 h;CIRI后各时间点,缺血侧大脑皮质DNMT3a⁺细胞数均多于Sham组,多组间差异具有统计学意义($F=564.894$, $P<0.01$)。Mel各组大鼠缺血侧大脑皮质DNMT3a⁺细胞数显著少于CIRI组,但仍多于Sham组,差异具有统计学意义($F=322.676$, 1314.659 , 414.357 ; 均 $P<0.01$)。见图4。

3 讨论

CIRI是一个极其复杂的病理过程,其中,神经细胞凋亡是导致CIRI的重要原因^[6-7]。Mel是一种高效的生物活性物质,具有抗炎、抗凋亡的多种作用,在CIRI的预防及治疗中具有重要作用。本研究采用改良的Zea-Longa线栓法建立CIRI模型,HE染色结果示,CIRI后24 h,CIRI大鼠缺血侧脑组织神经细胞排列紊乱、形态不规则;同时,采用TUNEL染色法观察CIRI大鼠缺血侧脑组织神经细胞凋亡的变化,结果表明,CIRI大鼠缺血侧脑组织神经细胞TUNEL⁺细胞数随CIRI时间的延长而逐渐增多,CIRI后

24 h达到较高水平,后逐渐下降,CIRI后各时间点,CIRI大鼠TUNEL⁺细胞(即凋亡细胞)数均显著多于Sham组,以上结果均说明CIRI模型建模成功。本研究HE染色还发现Mel治疗后,CIRI大鼠缺血侧脑组织神经细胞排列较整齐、有序,细胞形态较规则,TUNEL染色结果表明Mel治疗可减少CIRI大鼠缺血侧脑组织神经细胞TUNEL⁺细胞数。上述结果均提示,Mel可通过抑制CIRI大鼠神经细胞凋亡,减轻缺血侧脑组织神经损伤,具有保护作用,这与文献报道一致^[8]。

有研究表明,CIRI发生后,脑内DNMT1、DNMT3a表达升高,进而上调DNA甲基化水平,导致体内多种抗氧化剂相关基因高甲基化,如谷氨酸转运体1和谷氨酸转运体2基因启动子中CpG岛的高甲基化,使其基因表达水平降低,进而导致自由基过度生成、形成“瀑布式”连锁反应,加重CIRI^[9-10],提示抑制大鼠CIRI后DNMT1、DNMT3a的表达可促进CIRI后神经修复。有研究表明,Mel可通过降低山羊卵母细胞DNMT表达水平和总体甲基化,从而导致卵母细胞发育能力的提高^[11-12]。Mel作为体内重要的一种神经内分泌激素,与多种细胞DNA甲基化相关酶表达密切相关,但Mel对CIRI后脑组织神经细胞DNA甲基化相关酶的表达影响尚未见报道。因此,本研究从DNA甲基化相关酶的角度,探讨Mel对CIRI大鼠脑组织



A-C: CIRI后24 h,各组大鼠缺血侧大脑皮质DNMT3a染色结果($\times 400$); D: CIRI后,各组大鼠不同时间点缺血侧大脑皮质DNMT3a⁺细胞数量比较,*与Sham组相比, $P<0.01$;#与CIRI组相比, $P<0.01$

图4 Mel对大鼠CIRI后缺血侧大脑皮质DNMT3a蛋白表达的影响

神经细胞凋亡的影响。结果表明CIRI后不同时间点,Mel治疗可显著降低大鼠缺血侧脑组织DNMT1、DNMT3a的表达,且与Mel治疗减轻CIRI大鼠脑组织神经细胞凋亡的趋势一致,提示Mel抑制CIRI后脑组织神经细胞凋亡的机制可能与Mel降低CIRI后缺血侧脑组织DNA甲基化相关酶水平有关,但Mel如何降低DNA甲基化相关酶的表达,尚有待于进一步研究。本研究还发现Mel治疗后,CIRI大鼠缺血侧脑组织DNMT1、DNMT3a的表达及神经细胞凋亡数仍高于Sham组,提示急性期Mel并不能完全抑制大鼠CIRI后脑内DNMT1、DNMT3a并减轻CIRI大鼠缺血侧脑组织神经细胞的凋亡。有文献报道,多次Mel治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的疗效优于单次Mel治疗,是否多次Mel治疗可以进一步抑制DNA甲基化相关酶的表达,从而进一步减轻CIRI后脑组织神经细胞的凋亡尚有待于深入研究^[13]。

综上,Mel可抑制CIRI后细胞凋亡,发挥神经保护作用,其机制可能与Mel降低DNMT1、DNMT3a蛋白的表达,从而下调CIRI后脑内DNA甲基化水平有关,但是Mel如何调节DNMT1、DNMT3a蛋白的表达,尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] MORETTI A, FERRARI F, VILLA RF. Pharmacological therapy of acute ischaemic stroke: achievements and problems[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 153: 79-89.
- [2] 程丹丹,陈岚芬,陈伟,等. 两种不同褪黑素治疗途径对局灶性脑缺血大鼠行为学及组织病理学的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2018, 27(4): 310-315.
- [3] PALACHAI N, WATTANATHORN J, MUCHIMAPURA S, et al. Phytosome loading the combined extract of mulberry fruit and ginger protects against cerebral ischemia in metabolic syndrome rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5305437.
- [4] QU PX, LUO SW, DU Y, et al. Extracellular vesicles and melatonin benefit embryonic develop by regulating reactive oxygen species and 5-methylcytosine[J]. *J Pineal Res*, 2020, 68(3): e12635.
- [5] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] DATTA A, SARMAH D, MOUNICA L, et al. Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(6): 1185-1202.
- [7] ANDRABI SS, PARVEZ S, TABASSUM H. Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets[J]. *Protoplasma*, 2020, 257(2): 335-343.
- [8] LIU LL, CHEN HP, JIN J, et al. Melatonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through SIRT3 activation[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 117036.
- [9] KALANI A, KAMAT PK, TYAGI N. Diabetic stroke severity: epigenetic remodeling and neuronal, glial, and vascular dysfunction[J]. *Diabetes*, 2015, 64(12): 4260-4271.
- [10] JHELMUM P, KARISSETTY BC, KUMAR A, et al. Implications of epigenetic mechanisms and their targets in cerebral ischemia models[J]. *CurrNeuropharmacol*, 2017, 15(6): 815-830.
- [11] FANG Y, ZHANG JL, LI YH, et al. Melatonin-induced demethylation of antioxidant genes increases antioxidant capacity through ROR α in cumulus cells of prepubertal lambs[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131: 173-183.
- [12] SAEEDABADI S, ABAZARI-KIA AH, RAJABI H, et al. Melatonin improves the developmental competence of goat oocytes[J]. *Int J FertilSteril*, 2018, 12(2): 157-163.
- [13] 马瑞,马瑜徽,张新月,等. 不同褪黑素治疗方案对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑白质损伤的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2021, 23(3): 300-305.

责任编辑:龚学民