

分类号：
密 级：

单位代码：10019
学 号：BS20193050470

中國農業大學

学位论文

褪黑激素在急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍中的改善作用

Amelioration of melatonin on cognitive dysfunction induced by acute sleep deprivation in mice

研 究 生： 王心彤

指 导 教 师： 陈耀星 教授

申请学位门类级别： 农学博士

专 业 名 称： 基础兽医学

研 究 方 向： 神经生物学

所 在 学 院： 动物医学院

2022 年 06 月

China Agricultural University

Ph. D. Dissertation

**Amelioration of melatonin on cognitive dysfunction induced by
acute sleep deprivation in mice**

Ph. D. Candidate: Xintong Wang

Supervisor: Prof. Yaoxing Chen

Major: Basic Veterinary Science

Research field: Neurobiology

Institute: College of Veterinary Medicine

2022. 06

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中已经注明引用和致谢的内容外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得中国农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表达了谢意。

学位论文作者签名：



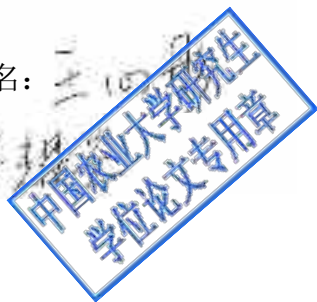
时间： 2022年5月31日

关于学位论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定。本人同意中国农业大学有权保存及向国家有关部门和机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人同意中国农业大学将本学位论文的全部或部分内 容授权汇编录入《中国博士学位论文全文数据库》或《中国优秀硕士学位论文全文数据库》进行出版，并享受相关权益。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

学位论文作者签名：



时间： 2022年5月31日

导师签名：

时间： 2022年5月31日

资助项目

国家自然科学基金

项目编号：32172801，31873000

北京市自然科学基金

项目编号：6222019

摘要

睡眠不足导致认知损伤是一个严重的公共健康问题，但其具体机制尚不完全清楚。褪黑激素（Melatonin, Mel）作为具有昼夜节律的内源性激素，可通过受体或非受体途径发挥多种调控作用，有望成为缓解急性睡眠剥夺（Sleep deprivation, SD）诱导认知障碍的有效药物。因此，本文利用改良多平台水箱建立连续 72h 的急性 SD 小鼠模型，并补充外源性 Mel 探究其对急性 SD 诱导小鼠认知障碍的改善作用及其机制。

1. Mel 对急性 SD 诱导认知损伤的干预作用及其模型建立

行为学结果显示与对照组相比，急性 SD 小鼠表现出到达平台的时间和距离增加，穿越目标象限的次数、目标象限停留时间、自发交替行为百分比、中央时间百分比和中央距离百分比减少。同时急性 SD 显著提高了血浆 CORT 和 NE 水平、海马 Iba1 阳性细胞数量、IL-6 和 TNF- α 含量，凋亡蛋白（Cleaved caspase-3 和 Bax）和自噬蛋白（LC3II/I、ATG5 和 Beclin1）表达量、铁离子蓄积和脂质过氧化水平，降低了血浆 Mel 水平、海马 NeuN 阳性细胞数量、IL-4 和 IL-10 水平、Bcl-2 表达量和松果体 *Aanat* 的 mRNA 水平。而给予急性 SD 小鼠腹腔注射外源性 Mel（20 mg/kg 或 40 mg/kg）后，除了松果体 *Aanat* 的 mRNA 表达量不受影响，其余上述指标均被改善。以上结果表明，成功建立 Mel 干预的急性 SD 小鼠模型，且急性 SD 通过诱导海马神经元自噬、铁死亡和凋亡的发生，导致神经元丢失最终引起小鼠认知障碍，而 Mel 干预能明显改善这一损伤。

2. Mel 改善急性 SD 诱导的海马神经元铁死亡

与对照组相比，急性 SD 显著提高了海马铁离子蓄积、脂质过氧化产物（ROS 和 MDA）和铁输入蛋白（TFR1 和 DMT1）的水平，降低了铁输出蛋白 FPN、抗氧化能力（GSH-PX、CAT、SOD、GPX4 和 T-AOC）和 MT2、p-ERK 和 NRF2 的表达量，而外源性 Mel 的补充能逆转上述过程，但不影响 MT1 受体的表达。而给予急性 SD 小鼠补充 Fer-1（铁死亡抑制剂）能明显改善上述过程，表现出与 Mel 相似的改善作用。利用 Erastin 处理 HT22 细胞构建铁死亡的体外模型，外源性 Mel 的添加对细胞铁死亡有改善作用。但 Mel 的改善作用被 4P-PDOT（MT2 拮抗剂）、PD98059（ERK 阻断剂）和 ML385（NRF2 阻断剂）所抵消。结果表明急性 SD 通过引起海马神经元铁死亡的发生导致小鼠认知功能障碍，而外源性 Mel 通过 MT2/ERK/NRF2 通路改善急性 SD 诱导的海马神经元铁死亡。

3. 肠脑轴介导 Mel 对急性 SD 诱导海马神经元凋亡的改善作用

与接受正常鼠粪菌移植的受体鼠相比，将急性 SD 小鼠的粪便细菌移植给抗生素处理的小鼠后（SD-FMT），该受体鼠结肠内益生菌 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及代谢物丁酸含量显著下调，而致病菌 *Aeromonas* 及其胞壁成分 LPS 含量显著上调。伴随肠道菌群的变化，SD-FMT 小鼠表现出空间参考记忆和空间工作记忆损伤及焦虑样行为，海马 Iba1 阳性细胞数量、IL-6、TNF- α 、Cleaved caspase-3 和 Bax 的增加，以及 Bcl-2、IL-4 和 IL-10 的降低，而铁离子水平、铁转运蛋白含量没有显著变化。然而将

Mel 干预的急性 SD 小鼠的粪菌移植给受体鼠 (SD+Mel-FMT) 后并未表现出上述变化。这些结果提示肠道菌群介导了 Mel 对急性 SD 诱导的认知损伤的改善作用, 这与改善海马神经元凋亡有关而不是铁死亡途径。

4. Mel 通过抑制结肠 *Aeromonas* 的代谢产物 LPS 与小胶质细胞的互作改善急性 SD 诱导的认知障碍

与对照组相比, 急性 SD 鼠、SD-FMT 鼠、*Aeromonas veronii* 定植鼠与 LPS 处理鼠均表现出海马小胶质细胞的活化, LPS、IL-6 和 TNF- α 水平的增加和 IL-4 和 IL-10 水平的降低及认知功能损伤。*Aeromonas veronii* 的定植和 LPS 的处理上调了海马 TLR4、HDAC3、p-P65、p-I κ B 和 Cleaved caspase-3 的表达量。而外源性 Mel 的补充能明显逆转该过程。这些结果表明 Mel 通过下调结肠内 *Aeromonas* 及其代谢物 LPS 水平, 抑制 TLR4/HDAC3/NF- κ B 信号通路, 从而改善海马神经炎症反应和神经元凋亡, 最终缓解小鼠的认知功能障碍。

5. Mel 通过上调结肠 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸含量改善急性 SD 诱导的认知障碍

与 CON-FMT 组相比, SD-FMT 组小鼠表现出 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及代谢物丁酸含量显著下调和认知功能障碍。而补充 Mel 和丁酸能改善急性 SD 诱导的认知损伤, 丁酸不能像 Mel 改善急性 SD 引起的血浆 Mel 的降低, 而 Mel 和丁酸均不能改善急性 SD 抑制的 *Aanat* 的表达。体内与体外试验结果表明丁酸能抑制急性 SD 或 H₂O₂ 诱导的 GPR109A、p-PI3K、p-AKT 和 Bcl-2 的表达量降低, 以及 Cleaved caspase-3 和 Bax 表达量的升高, 而 GPR109A-siRNA、LY294002 (PI3K 抑制剂) 和 GSK690693 (AKT 拮抗剂) 能阻断丁酸的改善作用。

利用 LPS 处理 BV2 细胞构建神经炎症反应的体外模型。LPS 上调了 BV2 细胞中 IL-6、TNF- α 、HDAC3、p-P65、p-I κ B 和 Cleaved caspase-3 的表达量, 下调了 IL-4 和 IL-10 的含量, 而外源性丁酸的添加能逆转该过程。丁酸的改善作用被 AZD3965 (MCT1 的抑制剂) 和 ITSA-1 (HDAC3 激动剂) 所阻断, 被 TAK-242 (TLR4 拮抗剂) 和 PDTC (NF- κ B 拮抗剂) 所模仿。以上结果表明 Mel 通过上调结肠 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸水平, 通过抑制 TLR4/HDAC3/NF- κ B 信号通路减轻小胶质细胞的过度活化, 并激活 GPR109A/PI3K/AKT 信号通路减轻神经元的凋亡, 最终改善小鼠的认知功能障碍。

综上, 急性 SD 通过诱导海马神经元丢失最终引起小鼠认知障碍。外源性 Mel 添加一方面通过 MT2 受体介导的直接途径缓解海马神经元铁稳态失调和脂质过氧化, 逆转神经元铁死亡的发生; 另一方面通过抑制 *Aeromonas* 的代谢物 LPS 与小胶质细胞的互作, 上调 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸含量, 缓解神经元凋亡的发生, 即通过肠脑轴间接途径改善急性 SD 诱导的认知功能障碍。

关键词: 急性睡眠剥夺, 认知功能障碍, 褪黑激素, 肠脑轴, 神经元丢失

Abstract

Cognitive impairment caused by sleep loss is a severe public health problem, of which the mechanism is not entirely unclear. Melatonin (Mel) is an endogenous hormone with circadian rhythm, which can exert various regulatory effects through receptor or non-receptor pathways, and is expected to be an effective drug for alleviating acute sleep deprivation (SD)-induced cognitive impairment. Therefore, this study used the modified multi-platform water tank test to establish a continuous 72-hour acute SD mouse model and exogenous Mel was supplemented to explore its improving effect on cognitive impairment induced by acute SD in mice and its mechanism.

1. Interventional effect of Mel on acute SD-induced cognitive dysfunction and its model establishment.

Behavioral results showed that acute SD mice exhibited increased latency and path length to the platform, decreased number of entries into the target zone, time spent in the target zone, percentage of spontaneous alternating behavior, the ratio of central distance crossed, and the ratio of central time crossed versus controls. Meanwhile, acute SD significantly increased the plasma CORT and NE levels, number of Iba1 positive cells, IL-6 and TNF- α contents, apoptotic proteins (Cleaved caspase-3 and Bax) and autophagy proteins (LC3II/I, ATG5 and Beclin1) expression, iron accumulation and lipid peroxidation levels in the hippocampus, and decreased the plasma Mel levels, number of NeuN positive cells, IL-4 and IL-10 contents, expression of Bcl-2 in hippocampus and mRNA levels of pineal *Aanat*. However, after intraperitoneal injection of exogenous Mel (20 or 40 mg/kg) in acute SD mice, all the above indicators were improved except the mRNA expression of *Aanat* in the pineal gland. The above results showed that an acute SD mouse model with Mel intervention was successfully established, and acute SD induced hippocampal neuronal autophagy, ferroptosis and apoptosis, resulting in neuronal loss and eventually causing cognitive impairment in mice, while Mel intervention could significantly improve this damage.

2. Mel ameliorates hippocampal neuronal ferroptosis induced by acute SD

Compared with the CON group, acute SD significantly increased hippocampal iron accumulation, levels of lipid peroxidation products (ROS and MDA) and iron import proteins (TFR1 and DMT1), as well as decreased levels of iron export protein (FPN), antioxidant indices (GSH-PX, CAT, SOD, GPX4 and T-AOC) and the expression levels of MT2, p-ERK and NRF2, and exogenous Mel supplementation reversed the above process. Still, it did not affect the expression of MT1 receptors. Supplementation of Fer-1 (ferroptosis

inhibitor) to acute SD mice could significantly improve the above process, showing a similar improvement effect as Mel. An in vitro model of ferroptosis was constructed by treating HT22 cells with Erastin, and the addition of Mel could improve the ferroptosis of HT22 cells. However, the effect of Mel was offset by 4P-PDOT (MT2 antagonist), PD98059 (ERK blocker) and ML385 (NRF2 blocker). The results suggested that acute SD leads to cognitive dysfunction in mice by causing ferroptosis in hippocampal neurons, while exogenous Mel ameliorates acute SD-induced ferroptosis in hippocampal neurons through the MT2/ERK/NRF2 pathway.

3. Gut-brain axis mediates the ameliorating effect of Mel on hippocampal neuronal apoptosis induced by acute SD

Compared with recipient mice receiving normal mouse fecal bacteria transplantation, the fecal bacteria of acute SD mice were transplanted into antibiotic-treated mice (SD-FMT), and the contents of colonic probiotic *Lachnospiraceae_NK4A136* and its metabolites butyrate were significantly down-regulated, while the contents of the pathogen *Aeromonas* and its cell wall component LPS were significantly up-regulated. Along with changes in gut microbiota, SD-FMT mice showed impairment of spatial reference memory and spatial working memory and the occurrence of anxiety-like behaviors, the number of hippocampal Iba1-positive cells, the levels of IL-6, TNF- α , Cleaved caspase-3 and Bax increased, and the levels of Bcl-2, IL-4 and IL-10 decreased, while iron level and iron transport proteins contents did not change. However, the changes mentioned above were not shown after transplantation of fecal bacteria from Mel-interventional acute SD mice to recipient mice (SD+Mel-FMT). These results suggested that gut microbiota mediates the ameliorative effect of Mel on acute SD-induced cognitive impairment, which is associated with amelioration of hippocampal neuronal apoptosis rather than the ferroptosis pathway.

4. Mel improved acute SD-induced cognitive impairment by inhibiting the interaction of *Aeromonas* metabolite LPS with microglia

Compared with the CON group, acute SD mice, SD-FMT mice, *Aeromonas veronii* colonized mice, and LPS-treated mice all showed microglial activation, increased levels of LPS, IL-6 and TNF- α and decreased levels of IL-4 and IL-10 in the hippocampus, increased neuronal apoptosis, and impaired cognitive function. *Aeromonas veronii* colonization and LPS treatment up-regulated the expression levels of TLR4, HDAC3, p-P65, p-I κ B, and Cleaved caspase-3 in the hippocampus, while exogenous Mel supplementation significantly reversed this process. These results suggested that Mel could down-regulate *Aeromonas* and its metabolite LPS in the colon and inhibit the TLR4/HDAC3/NF- κ B signaling pathway,

thereby improving hippocampal neuroinflammation and neuronal apoptosis, and ultimately alleviating cognitive dysfunction in mice.

5. Mel ameliorates acute SD-induced cognitive impairment by upregulating the content of *Lachnospiraceae_NK4A136* and its metabolite butyrate

Compared with the CON-FMT group, SD-FMT group mice exhibited significantly down-regulated *Lachnospiraceae_NK4A136* and metabolite butyrate content and cognitive dysfunction. However, supplementation of Mel and butyrate could improve the memory impairment induced by acute SD, butyrate could not improve the decrease of plasma Mel caused by acute SD like Mel, while neither Mel nor butyrate could improve the expression of *Aanat* which is inhibited by acute SD. The results of in vivo and in vitro experiments showed that butyrate could inhibit acute SD or H₂O₂-induced decrease in the expression of GPR109A, p-PI3K, p-AKT and Bcl-2, as well as an increase in the expression of Cleaved caspase-3 and Bax. However, GPR109A-siRNA, PI3K inhibitor (LY294002) and AKT antagonist (GSK690693) blocked the ameliorating effect of butyrate.

An in vitro model of neuroinflammation was constructed by treating BV2 cells with LPS. In vitro experiments showed that LPS up-regulated the levels of IL-6, TNF- α , HDAC3, p-P65, p-I κ B and Cleaved caspase-3, and down-regulated the levels of IL-4 and IL-10 in BV2 cells, and the addition of exogenous butyrate could reverse this process. The ameliorating effect of butyrate was blocked by an inhibitor of MCT1 (AZD3965) and an agonist of HDAC3 (ITSA-1), while it was mimicked by an antagonist of TLR4 (TAK-242) and an antagonist of NF- κ B (PDTC). The above results indicated that Mel alleviated the hyperactivation of microglia by up-regulating the levels of colonic *Lachnospiraceae_NK4A136* and its metabolite butyrate, inhibited the TLR4/HDAC3/NF- κ B pathway, and attenuated neuronal apoptosis by activating the GPR109A/PI3K/AKT pathway, ultimately improved cognitive dysfunction in mice.

In conclusion, acute SD induces cognitive impairment in mice by inducing hippocampal neuron loss. Mel alleviated the iron dyshomeostasis and lipid peroxidation in hippocampal neurons through an MT2 receptor-mediated direct pathway, and reversed the occurrence of neuronal ferroptosis; Mel inhibited the interaction between *Aeromonas* metabolite LPS and microglia, up-regulates the content of *Lachnospiraceae_NK4A136* and its metabolite butyrate, and alleviated the occurrence of neuronal apoptosis, ultimately Mel ameliorated acute SD-induced cognitive impairment through direct and indirect pathways.

Key words: acute sleep deprivation, cognitive impairment, melatonin, gut-brain axis, neuronal loss

目录

摘要	I
Abstract.....	III
目录	VI
插图和附表清单	IX
英文缩写英中对照表	XI
第一章 前言	1
1. 睡眠与睡眠剥夺.....	1
1.1 睡眠概述	1
1.2 睡眠障碍概述.....	5
1.3 睡眠剥夺.....	7
2. 认知功能障碍和睡眠.....	9
2.1 认知功能的结构基础与行为	9
2.2 认知功能障碍与海马神经元丢失	14
2.3 海马神经元丢失与睡眠	20
3. 褪黑激素与睡眠和认知功能.....	20
3.1 褪黑激素的合成和分泌	20
3.2 褪黑激素与睡眠	21
3.3 褪黑激素与认知	21
3.4 褪黑激素的作用机制	22
4. 本研究的目的及意义.....	27
5. 研究的目标与内容.....	27
第二章 急性睡眠剥夺诱导认知功能障碍的模型建立及褪黑激素的干预作用	29
1. 褪黑激素对急性睡眠剥夺小鼠应激激素和褪黑激素水平的影响.....	29
1.1 引言.....	29
1.2 材料与方法.....	29
1.3 结果.....	34
1.4 讨论.....	36
1.5 小结.....	37
2. 褪黑激素对急性睡眠剥夺小鼠认知功能的影响.....	37
2.1 引言.....	37
2.2 材料与方法.....	38

2.3 结果.....	40
2.4 讨论.....	44
2.5 小结.....	45
3. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的海马神经元丢失.....	45
3.1 引言.....	45
3.2 材料与方法.....	46
3.3 结果.....	52
3.4 讨论.....	56
3.5 小结.....	56
第三章 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导海马神经元丢失的直接途径 ..	58
1.褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的小鼠海马神经元铁死亡及其机制	58
1.1 引言	58
1.2 材料与方法	58
1.3 结果	68
1.4 讨论	77
1.5 小结	78
2. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的小鼠海马神经元自噬和凋亡.....	78
2.1 引言	78
2.2 材料与方法	79
2.3 结果	85
2.4 讨论	91
2.5 小结	92
3. 急性睡眠剥夺调控神经元凋亡和铁死亡诱导小鼠认知功能障碍.....	92
3.1 引言	92
3.2 材料与方法	93
3.3 结果.....	95
3.4 讨论	101
3.5 小结	102
第四章 微生物-肠-脑轴在褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的认知障碍中的作用	103
1. 肠道菌群介导褪黑激素对急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的改善作用	103
1.1 引言	103
1.2 材料与方法	104

1.3 结果	112
1.4 讨论	130
1.5 小结.....	131
2. <i>Aeromonas</i> 代谢物 LPS 与小胶质细胞互作在褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导小鼠认知障碍中的作用	131
2.1 引言.....	131
2.2 材料与方法.....	132
2.3 结果.....	137
2.4 讨论.....	149
2.5 小结.....	150
3. 褪黑激素驱动 <i>Lachnospiraceae_NK4A136</i> 及其代谢物丁酸改善急性睡眠剥夺诱导的小鼠认知功能障碍	150
3.1 引言.....	150
3.2 材料与方法.....	151
3.3 结果.....	157
3.4 讨论.....	172
3.5 小结.....	173
第五章 全文讨论	174
1. 褪黑激素对急性睡眠剥夺导致的小鼠海马神经元丢失与认知功能障碍的缓解作用	174
2. 褪黑激素缓解急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的直接作用机制.....	176
3. 褪黑激素缓解急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的间接作用机制.....	177
4. 褪黑激素缓解急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的直接作用与间接作用的串扰	179
第六章 结论与创新点	182
参考文献	183
致谢	205
个人简历	207

插图和附表清单

插图清单

图 1-1 海马的结构.....	11
图 1-2 铁死亡的核心分子机制及信号传导调控.....	16
图 1-3 调控细胞死亡的不同形式的关键特征.....	19
图 1-4 褪黑素在动物体内的抑菌机制.....	24
图 1-5 SCFAs 通过肠脑轴调节大脑功能的不同途径.....	26
图 2-1 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠血浆中 NE、CORT 和 Mel 含量的影响.....	35
图 2-2 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠松果体 Aanat 基因 mRNA 表达的影响.....	36
图 2-3 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠空间记忆能力的影响.....	41
图 2-4 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠短期工作记忆能力的影响.....	42
图 2-5 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠焦虑样行为的影响.....	44
图 2-6 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马 NeuN 阳性细胞数量的影响.....	53
图 2-7 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马小胶质细胞活化水平的影响.....	54
图 2-8 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马炎症细胞因子的影响.....	55
图 3-1 Mel 对急性 SD 小鼠海马铁离子蓄积和铁转运蛋白的影响.....	70
图 3-2 Mel 对急性 SD 小鼠海马抗氧化活性和脂质过氧化的影响.....	72
图 3-3 Mel 对急性 SD 小鼠海马 MT2/ERK/NRF2 信号转导的影响.....	74
图 3-4 Mel 对 Erastin 诱导的 HT22 细胞 MT2/ERK/NRF2 信号通路的影响.....	76
图 3-5 Mel 对急性 SD 小鼠海马凋亡蛋白的影响.....	86
图 3-6 Mel 对急性 SD 小鼠海马自噬蛋白的影响.....	87
图 3-7 Mel 对急性 SD 小鼠海马抗氧化水平的影响.....	88
图 3-8 Mel 对急性 SD 小鼠海马 NF- κ B 信号通路的影响.....	90
图 3-9 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠空间记忆能力的影响.....	96
图 3-10 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠短期工作记忆的影响.....	97
图 3-11 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠海马神经元数量的影响.....	98
图 3-12 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠海马神经元铁死亡和凋亡的影响.....	100
图 4-1 粪菌移植受体小鼠结肠内菌群 α 多样性与 β 多样性的变化.....	113
图 4-2 粪菌移植受体小鼠结肠内微生物组成的变化.....	114
图 4-3 粪菌移植受体小鼠结肠内差异细菌变化.....	116
图 4-4 粪菌移植受体小鼠结肠内代谢物组成分析.....	118
图 4-5 粪菌移植受体小鼠结肠内差异代谢物分析.....	119
图 4-6 抗生素处理对粪便颗粒的菌落形成单位的影响.....	120

图 4-7 肠道菌群介导 Mel 对急性 SD 引起的空间记忆损伤的神经保护作用	121
图 4-8 肠道菌群介导 Mel 对急性 SD 引起的短期工作记忆损伤的神经保护作用 ...	122
图 4-9 粪菌移植处理后受体鼠血浆激素水平的变化	123
图 4-10 粪菌移植对小鼠海马神经元铁死亡的影响（铁代谢）	125
图 4-11 粪菌移植对小鼠海马神经元铁死亡的影响（脂质代谢）	127
图 4-12 粪菌移植对小鼠海马神经炎症的影响	128
图 4-13 粪菌移植对小鼠海马神经元凋亡的影响	129
图 4-14 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马 LPS 含量的影响	138
图 4-15 <i>A. veronii</i> 定植及 Mel 干预对小鼠认知功能的影响	140
图 4-16 <i>A. veronii</i> 定植及 Mel 干预对小鼠海马神经炎症的影响	141
图 4-17 <i>A. veronii</i> 定植及 Mel 干预对海马信号通路蛋白的影响	142
图 4-18 LPS 处理及 Mel 干预对小鼠认知功能的影响	144
图 4-19 LPS 及 Mel 干预对小鼠海马神经炎症的影响	145
图 4-20 LPS 处理及 Mel 干预对小鼠海马信号通路蛋白的影响	146
图 4-21 丁酸对 LPS 诱导的 BV2 细胞通路蛋白的影响	148
图 4-22 粪菌移植对小鼠粪便短链脂肪酸含量的影响	158
图 4-23 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠空间记忆能力的影响	160
图 4-24 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠血浆激素和松果体 <i>Aanat</i> 的影响	161
图 4-25 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经元铁死亡的影响（铁代谢）	163
图 4-26 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经元铁死亡的影响（脂质代谢） ...	165
图 4-27 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经炎症的影响	166
图 4-28 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经元凋亡的影响	168
图 4-29 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马丁酸受体及信号通路的影响	169
图 4-30 GPR109A 受体在 HT22 细胞的表达情况。	170
图 4-31 丁酸对 H ₂ O ₂ 诱导的 HT22 细胞 GPR109A/PI3K/AKT 信号通路的影响	171
图 5-1 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导小鼠认知障碍的作用机制图	181
附表清单	
表 2-1 qRT-PCR 反应体系	34
表 2-2 qRT-PCR 反应引物序列信息（AANAT）	34
表 3-1 qRT-PCR 反应引物序列信息（铁转运蛋白）	63
表 4-1 siRNA 序列	155

英文缩写英中对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
5-HT	5-hydroxytryptamine	5-羟色胺
AANAT	Arylalkylamine. N-acetyltransferase	芳烷基胺 <i>N</i> -乙酰转移酶
BBB	Blood-brain barrier	血脑屏障
BV2	Microglial cell line	小胶质细胞系
CNS	Central nervous system	中枢神经系统
CORT	Corticosterone	皮质酮
DG	Dentate gyrus	齿状回
DMT1	Divalent metal transporter 1	二价金属转运体 1
FMT	Fecal microbiota transplantation	粪便微生物群移植
GPRs	G protein-coupled receptors	G 蛋白偶联受体
GPXs	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
HDAC3	Histone deacetylase 3	组蛋白去乙酰化酶 3
HT22	Hippocampal neuron cell line	海马神经元细胞系
IOD	Integral optical density	积分光密度
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
Mel	Melatonin	褪黑激素
MT1	Melatonin receptor type 1	褪黑激素受体 1
MT2	Melatonin receptor type 2	褪黑激素受体 2
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium	四甲基偶氮唑蓝
MWM	Morris Water Maze	莫里斯水迷宫
NE	Norepinephrine	去甲肾上腺素

英文缩写英中对照表（续）

NREM	Non-rapid eye movement	非快速眼动
OFT	Open Field test	旷场试验
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	多不饱和脂肪酸
REM	Rapid eye movement	快速眼动
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SCFA	Short chain fatty acid	短链脂肪酸
SD	Sleep deprivation	睡眠剥夺
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
TFR1	Transferrin receptor 1	转铁蛋白受体 1
TLR	Toll like receptor	Toll 样受体

第一章 前言

在畜牧兽医行业，为了获得更高的生产效益，很多鸡场和猪场企业都采用高密度的集约化养殖，虽然在一定程度上得到了很大的经济收益，但是产品的质量却受到了严重的影响。禽类由于其发达的视觉系统，它们对于光的敏感性高于其他的经济类动物，因此在养殖密度较大的情况下，饲养者会提供持续的长时间光照保证家禽足够的摄入量，增加生长率 (Lien et al., 2007)。但是持续或接近持续的光照会抑制禽类褪黑激素的合成和分泌，使动物出现睡眠延迟或睡眠碎片化现象，导致家禽的健康和福利受到损伤 (Schwean-Lardner et al., 2016)。连续照明饲养也不利于肉鸡的生长率、体重增加、食物摄入、动物健康和死亡率 (Skrbic et al., 2015)。此外，在养殖业中多采用的限位栏模式，将饲养的动物限制在一定的区域内使其生产价值发挥到最高，但是在此过程中，由于无法自由的运动导致动物很难维持一个正常的睡眠状态，其睡眠质量也被严重的制约，这对动物会造成较大的级联伤害，比如精神沉郁、消化道损伤和免疫功能降低等 (李冰霜, 2019)。从动物福利角度考虑，限位栏模式也影响了动物的基本生存福利，尤其是无法保证正常的睡眠。动物福利的五大自由之一便是享有生活无恐惧和无悲伤的自由，不论是动物还是人类，当无法保证最基本的睡眠时，会饱受精神痛苦和身体损伤的双重影响 (张影, 2013)。不仅是动物，人类也面临着严峻的睡眠缺乏现象。在快节奏的当前社会，睡眠不足已成为非常常见的现象，并严重影响着不同年龄不同工作环境的人群的健康生活。在新出炉的《2022 年中国国民健康睡眠白皮书》中，国人的睡眠状况并不理想，近 3/4 受访者曾有睡眠困扰，44% 的年轻人熬夜至零点以后，42% 的老年人入睡时长超过半小时，失眠率高达 21%。睡眠不足，已经成为当代社会面临的一大困扰。随着社会的快速发展，人们面临着更大的精神压力，睡眠障碍的发生率增加，同时加剧了多种精神疾病的发生，如抑郁症、焦虑症、记忆损伤和精神分裂症等 (陆林, 2020)。面对我国如此普遍的睡眠缺失现象，迫切需要一种健康、无副作用的药物来改善睡眠不足带来的认知损伤。褪黑激素 (Melatonin, Mel) 是具有昼夜节律的内源性激素，对睡眠 (杨悦等, 2020)、认知 (马丛丛等, 2021) 和肠道 (马骁等, 2020) 都有一定的调节作用，但具体作用机制尚不清楚。因此，本研究通过建立添加或不添加 Mel 干预的急性睡眠剥夺 (Sleep deprivation, SD) 小鼠模型来模拟动物的睡眠不足，探究 Mel 是否以及如何改善急性 SD 诱导的认知功能障碍，期望为人类医学和畜牧养殖中普遍出现的睡眠不足所致认知障碍提供可靠的理论依据。

1. 睡眠与睡眠剥夺

1.1 睡眠概述

睡眠是一种自然的、可逆的具有周期性的生物行为，处于睡眠状态时机体对外界刺激的反应减弱，相对不活动伴有意识的丧失 (Beersma, 1998)。睡眠的发生是有规律的，并且受到体内平衡的调节，即睡眠的缺失或延迟会导致随后的睡眠延长。睡眠剥夺或睡眠中断会导致严重的认知和情绪问题 (Vandekerckhove and Cluydts, 2010)。睡眠可能发生在所有的脊椎动物中，包括鸟类、鱼类和爬行动物，类似睡眠的状态也可以在无脊椎动物中观察到，如苍蝇、蜜蜂和蟑螂等 (Cirelli and Tononi, 2008)。睡眠的行为对于人类和动物至关重要，因为它占据了机体一生中大约 1/4 至 1/3 的时间。

1.1.1 睡眠的形式

睡眠的电生理状态是由皮下、皮层和肌肉细胞产生的电信号相互作用的复杂过程，这些电信号在睡眠中以不同的模式出现 (Ko et al., 2021)。根据美国睡眠医学学会的指导原则，将睡眠分为不同的阶段包括清醒阶段 (Wake, W)、非快速眼动阶段 (non-rapid eye movement sleep, NREM) 和快速眼动阶段 (rapid eye movement sleep, REM)，而 NREM 又进一步分为了 N1、N2 和 N3 阶段 (Silber et al., 2007)。这些阶段可以通过多导睡眠图来识别，多导睡眠图通常用来记录睡眠时的各种生物信号，如脑电图 (EEG)、心率、鼻气流和身体姿势 (Combertaldi and Rasch, 2020)。清醒阶段主要由大脑的 α 波 (8-12Hz) 活动控制，表明睡眠的短暂中断，这一点人可能意识到，也可能不知道。N1 阶段是宁静的清醒状态的初始过渡，在 EEG 上很容易通过出现轮廓分明的中线波形来识别 (Ohayon et al., 2004)；N2 阶段可以通过高度同步的中线纺锤波和多相 K 复合物的出现来确定 (Basheer et al., 2004)；N3 阶段主要由慢波控制，这给了它另一个名字“慢波睡眠” (SWS)，其特征是高度同步和高电压 δ 波 (Nedeltcheva and Scheer, 2014)。REM 定义为低电压不规则快速活动，类似于清醒时的 EEG 波，但伴随着肌电图上的肌肉张力完全丧失 (Silber et al., 2007)。这些睡眠阶段以循环模式交替，每个睡眠周期约为 90-110 分钟，每晚共 4-6 个周期。

1.1.2 睡眠的时间

睡眠时间由昼夜节律和稳态振荡器之间的微妙相互作用控制，根据它们的内生特性，它们可以让人们自发地感觉到是时候睡觉或醒来，并且与地球的光/暗周期同步。动物和人类的睡眠时间都有其各自的特点，并且会受到外界环境的影响。动物睡眠时间的长短与其体积大小有关，体积小的动物日常所需的代谢较多而其难以储存大量的能量，因此这类动物对睡眠时间的需求较高；而大型动物由于其代谢的缓慢，其所需的睡眠时间也较少。比如蝙蝠和老鼠一天的睡眠时间需保持 18-20 个小时，猩猩的睡眠时间为 9 个小时，非洲象大概需要 3 个小时的睡眠，而长劲鹿的睡眠每天仅需要 2

个小时。此外，食物形态也会影响动物的睡眠时间。肉食动物睡的最多，杂食性动物次之，草食型动物最少。狮子老虎在动物界缺乏天敌，并且肉食的能量含量非常高，它们每天的睡眠时间能达到 13-16 个小时；而草食动物时常需要躲避天敌，并且草食能量含量低，比如山羊、斑马等草食性动物代谢速度慢，需要增加摄食时间，从而睡眠的时间相应缩短（Hummer and Lee, 2016）。

反之人类在当前社会，社交时间和夜间人造光会改变睡眠时间（Taillard et al., 2021）。现代生活方式和人工夜间灯光会延迟我们的就寝时间，让我们在本该睡觉的时间保持清醒，并导致睡眠时间的个体差异更大。不同年龄段的人对睡眠需求的时间是不同的，这是由于生长发育的需求所致。比如低龄儿童处于生长发育的高峰期，需要更多的睡眠保证身体的发育，一般每晚需要至少保持 12 小时的睡眠。青春期的青少年此时应在保证学习进度的前提下，保证每天的睡眠时长达到 8 小时，过度的熬夜会影响身体的健康并影响学习进度。成年人需要的睡眠相较于青年人要少，但应在“优质睡眠时间”进入睡眠，避免睡眠的不规律，并且保证在深夜 3 点进入深睡眠，有助于缓解疲劳。60 岁以上老年人每天睡 5.5~7 小时，阿尔茨海默氏症协会公布的数据显示，每晚睡眠限制在 7 小时以内的老人，大脑衰老可推迟 2 年（Mattis and Sehgal, 2016）。

1.1.3 睡眠的生理意义

（1）睡眠能补充能量，促进机体修复

当人类进入睡眠状态时，机体的各项器官组织都会进入修复状态。机体的基础体温会下降，心律和血压会降低，呼吸的频率也会降低，机体整体进入低能量消耗的状态。此外，胃肠道会合成和储藏能量物质，以补充白天机体消耗的能量。对于大脑，虽然在睡眠时大脑仍处于工作状态，但是有研究发现睡眠时神经元的突触会得到修复，并且会大脑清理白天代谢产生的废物。因此人类需要充足的睡眠来完成对白天高强度工作的修复（Yaffe et al., 2014）。

（2）睡眠能增强免疫，促进康复

睡眠和免疫力是双向联系的。免疫系统的激活会改变睡眠，而睡眠反过来又会影响我们身体防御系统的先天和适应性手臂。微生物对免疫系统的刺激会引发炎症反应，这取决于其强度和过程，并会导致睡眠时间和强度的增加，但也会扰乱睡眠。在感染期间加强睡眠被认为是对免疫系统的反馈，以促进宿主防御（Covassin and Singh, 2016）。事实上，睡眠影响各种免疫参数，与降低感染风险有关，并可改善感染结局和疫苗接种反应。在没有感染挑战的情况下，睡眠似乎可以通过影响几种炎症介质，如细胞因子，促进炎症内稳态。这一观点得到了以下发现的支持：长期睡眠不足可

导致慢性、全身性低级别炎症，并与各种有炎症成分的疾病相关，如糖尿病、动脉粥样硬化和神经退化 (Besedovsky et al., 2019)。

(3) 睡眠能促进生长发育

机体的生长发育需要睡眠。有数据显示，新生儿睡眠中有一半时间在经历 REM 时期，而早产儿的 REM 达到睡眠总时长的 80%。REM 是机体进入了深度睡眠，在此过程中，神经系统进行修复，不同神经元的突触产生连接，大脑逐渐完善其结构和功能 (Mander et al., 2017)。对于处于生长发育的期的幼儿充足的睡眠是至关重要的，因为刚出生的的婴儿机体多种结构和功能尚不完善，需要在睡眠中进行发育。此外，儿童的生长速度与睡眠状态成正比，睡眠过程中，生长激素（影响发育的重要因子）可持续数小时维持在较高水平。

(4) 睡眠能修复大脑功能

在清醒的时候，大脑处于持续兴奋的状态，神经元的耗氧量和能量消耗都很高。在进入睡眠状态时，大脑中的神经元会进行休息，但是大脑中的神经元并不是全部进入休息状态，我们知道记忆是在睡眠过程中得到巩固，白天获取的信息需要在睡眠中进行加工、分类整理和保存，因此大脑组织在睡眠时处于轮休状态。NREM 和 REM 会交替出现，神经元一段时间处于兴奋状态，一段时间又处于休整状态 (Panagiotou et al., 2021)。此外，在白天的工作时刻大脑高速运转会产生大量的代谢废物，需要将神经元代谢的废物利用或处理掉，睡眠就提供了处理代谢废物的时间。研究人员发现睡眠促进 β -淀粉样蛋白的代谢，而 β -淀粉样蛋白是阿尔兹海默症患者重要的病理变化，它们会在清醒的时候大量聚集于负责大脑学习和记忆的脑区比如海马内，而睡眠时期能加快这类蛋白的代谢，表明睡眠过程能够抑郁有毒的代谢产物在大脑中的聚集，促进的神经元的运转，修复了大脑功能 (Lucey et al., 2019)。

(5) 睡眠能巩固记忆、增强认知

虽然睡眠是一个影响整个有机体的系统级过程，但它最显著的特征是行为控制和意识的丧失。在睡眠的多种功能中，它在建立记忆中的作用似乎尤为重要，因为它似乎与清醒时大脑对刺激的正常处理不相容，这可能可以解释睡眠时意识的丧失 (Diekelmann and Born, 2010)。早在 1924 年，詹金斯和达伦巴克这两位睡眠研究领域的专家就通过实验揭示了睡眠对于记忆的维持作用。睡眠主要促进记忆的巩固，而记忆编码和检索在醒着的时候最有效。巩固指的是一个过程，它将在清醒状态下编码的新的和最初的不稳定记忆转换成更稳定的表征，并整合到已有的长期记忆网络中 (Dudai et al., 2015)。“巩固”指的是在用于编码“新鲜”记忆的神经元网络中，主动地对“新鲜”记忆进行再处理。它似乎在离线状态下，即睡眠时，效果最为显著，这样编码和巩固就不会相互干扰，大脑在巩固期间也不会产生“幻觉” (Klinzing et al., 2019)。此外，睡眠能够提升认知能力，哈佛大学的一项实验发现，睡眠充足时受试

者在辨识工作中表现更出色，而 SD 实验参与者也的认知能力与智力表现严重下降。生活中我们也由此体会，长期睡眠不足会造成反应迟钝、注意力分散、记忆减退等精神类症状 (Sharma et al., 2020)。

(6) 睡眠能调节情绪

情绪障碍包括一系列条件，可以包括高涨的情绪，如躁狂/轻躁狂和抑郁情绪。重度抑郁单极和双相情感障碍，是最流行和最严重的疾病之一，有复发、慢性和致残的倾向 (Adrien, 2002)。失眠是情绪障碍的临床显著特征，它在整个情绪障碍过程中非常普遍，多达 80%-100%的人在抑郁发作期间和 45%-55%的人在双相情感障碍间歇期经历失眠 (Geoffroy et al., 2015)。睡眠缺失，例如睡眠时间减少和睡眠不足，在双相情感障碍的特征情绪失调的出现中具有特别重要的意义。最近，研究表明，针对失眠的治疗不仅可以改善失眠症状，而且对情绪障碍的发展轨迹也有良好的影响 (Gava et al., 2019)。因此，可以将睡眠作为治疗或指示情绪状态的一项指标，改善睡眠质量能促进情绪的缓和，当睡眠出现紊乱或质量下降的情况时也能反映当前的情绪状态。

1.2 睡眠障碍概述

睡眠障碍是由多种因素引起的睡眠异常行为，主要表现为睡眠和觉醒节律性行为的紊乱。睡眠障碍是一种常见的疾病，它不仅引起患者的苦恼，影响日常生活活动能力，还会导致严重的并发症 (Xie et al., 2017)。《国际睡眠障碍分类》将以下 6 类疾病区分为：失眠、睡眠相关呼吸障碍、中枢性睡眠过度、昼夜节律障碍、睡眠异常和睡眠相关运动障碍 (Guillodo et al., 2020)。例如，失眠的特点是抱怨睡眠时间和质量，入睡困难，夜间醒来，早醒，或无法恢复的睡眠。这种症状必须每周至少出现三次，持续至少一个月，并在第二天产生不良后果。睡眠和心理健康高度相关，许多心理健康问题也与睡眠障碍有关。传统上，睡眠障碍被视为精神健康障碍的后果，证据也表明，睡眠障碍可能导致新的精神健康问题 (Baglioni et al., 2011)。

1.2.1 睡眠障碍的诱因

(1) 不良的外界环境、生活方式与习惯

睡眠过程容易受到外界环境的影响。在目前的社会环境中，光照持续时间加长，噪音污染严重，极大的影响了进入睡眠的时间。光线会影响机体 Mel 分泌，夜晚长时间的光照会抑制松果体分泌 Mel，进而导致机体难以进入睡眠状态 (Park et al., 2015)，此外不良的生活习惯也会影响睡眠，如深夜暴饮暴食，睡前进行强烈运动以及作息不规律等，这些不健康的行为会对睡眠造成干扰，影响睡眠的质量 (Alotaibi et al., 2020)。

(2) 长期加班与轮班

高强度的工作也是影响睡眠的原因之一。目前社会节奏非常快，很多人的工作压力都很大，轮班工作在多种行业中都存在。轮班工作是由于工作性质的需要，必须有人 24 小时坚守岗位，比如医务人员、作战军人和长途飞机的工作人员。而长期的轮班工作尤其是通宵工作会损伤人体的昼夜节律稳态，并出现不同程度的睡眠障碍 (Boivin and Boudreau, 2014; Kervezee et al., 2020)。此外，繁重的工作带来的巨大压力也会影响睡眠的状态，虽然这类人群的睡眠时间是足够的，但是睡眠质量较差，因此这类人群也多伴有睡眠障碍的问题 (Caruso, 2014)。

(3) 生理、心理因素与药物因素

随着年龄的增加，患有多种慢性疾病的人群常伴有睡眠不足和睡眠质量下降的问题，比如神经退行性疾病、偏头痛、心脏疾病、哮喘等。调查发现，阿尔兹海默症患者的睡眠时间显著低于同年龄的人 (Edéll-Gustafsson et al., 2006; Kontodimopoulos et al., 2020)，此外，一些治疗疾病的药物也含有一些化学成分，它们对神经系统有激活或抑制的作用，会影响人们的睡眠质量。比如一些抗心律失常药 (普罗帕酮)，在治疗心律失常的同时可引起心动过缓、胸痛、呼吸困难和睡眠障碍，这些均会影响患者的夜间睡眠质量 (Rajpurohit et al., 2014)。一些抗抑郁药物 (帕罗西汀)，会使情绪变得兴奋、易怒，甚至精神错乱，这些也会使患者的睡眠受到影响 (Kumar et al., 2020)。

1.2.2 睡眠障碍的评估

睡眠障碍是神经内科复杂的系列疾病之一，分类繁杂广泛，临床表现多样，与病因病机关系密切。近年来，睡眠障碍出现在多种慢性疾病的临床指南中。睡眠障碍评估较难，下面介绍了应用最广泛的几种睡眠评估量表，常用来评估睡眠的状态：匹兹堡睡眠质量指数 (Pittsburgh sleep quality index, PSQI)，1989 年美国匹兹堡大学精神科医生 Buysse 博士等人编制了 PSQI (Buysse et al., 1989)，是经过验证和使用最为广泛的睡眠障碍评估量表之一，能够评估受试者近 30 天的睡眠质量。该表的适用性很高，对一般人或者睡眠障碍患者的睡眠质量均能进行评估。斯坦福嗜睡程度量表 (Stanford sleepiness scale, SSS)，是使用最广泛的临床工具来评估主观特征嗜睡，基于测试个人困难程度的问卷。是为某一时间点提供量化指标的自评量表，反映的是受试者的困倦程度。该问卷主要用于测定一天中不同时间段的警醒/嗜睡程度 (Chiu et al., 2017)。可对同一患者一天中不同时间段的嗜睡程度进行比较，但是不同患者间的横向比较就不太适合。REM 睡眠行为异常筛查量表，REM 睡眠行为异常筛查量表是用于筛查 REM 睡眠行为异常的自评量表 (Simitsi et al., 2021)。共有 10 个大题，包括梦境内容、梦境与行为的关系、致伤和神经系统疾病等方面的内容。多导睡眠图 (Polysomnography, PSG)，PSG 基础睡眠和临床睡眠研究中评价睡眠的金标准

(Hayakawa and Ohta, 1997)。

1.3 睡眠剥夺

现代生活方式，包括长时间的工作和通勤时间、心理压力、个人选择以及社交和家庭需求，导致人们的睡眠时间严重缩短 (Troynikov et al., 2018)，睡眠不足俨然成为一种十分普遍的社会现象。睡眠剥夺是指一个人由于环境或自身原因而无法达到正常的睡眠方式，一般指睡眠少于 4 小时，导致情绪、学习和记忆、免疫功能、生理、心理甚至行为等一系列变化。

1.3.1 睡眠剥夺的类型

根据睡眠剥夺时间的长短可以将睡眠剥夺分为完全睡眠剥夺和部分睡眠剥夺 (Hale and Guan, 2015)。24 小时或以上的延长清醒被称为完全睡眠剥夺 (Van Dongen et al., 2003)；而每日睡眠时间小于正常睡眠时间 50%，且每日睡眠可连续或不连续，这类睡眠被称为部分睡眠剥夺 (Su et al., 2021)。根据睡眠剥夺发生的缓急可以将睡眠剥夺分为急性睡眠剥夺和慢性睡眠剥夺。急性睡眠剥夺指快速的剥夺睡眠，持续的时间至少为 24h 或更多时间 (Pires et al., 2016)；而当那个每日睡眠剥夺的时间低于 5h，且至少剥夺睡眠三个月，这类剥夺方式称为慢性睡眠剥夺 (Seton and Fitzgerald, 2021)。此外还可以根据脑电图，将睡眠剥夺分为慢波睡眠剥夺和快波睡眠剥夺，当剥夺的睡眠阶段为慢波时，称为慢波睡眠剥夺；当剥夺的睡眠阶段是快波时，称为快波睡眠剥夺 (Scholes et al., 2020)。

1.3.2 睡眠剥夺的模型

睡眠这一行为对于人类及哺乳动物来说是非常重要的一部分，但是针对睡眠的发生发展过程尚不完全明确。而针对与目前社会存在的睡眠缺失问题，需要构建适当的模型来探究睡眠剥夺对机体损伤的具体机制，以及如何更好的改善这类损伤。这里将几种常用的睡眠剥夺模型的方法及进展进行综述。

(1) 单平台睡眠剥夺法

在 1964 年单平台睡眠剥夺方法用于研究的猫的睡眠剥夺，后来应用到大鼠的研究中。具体的操作方法是：准备一个长 400 mm 宽 340 mm 高 160 mm 的水池，在水池中放入一个圆柱样平台，加水至距离平台顶面约 10mm 处，将 1 只大鼠放置与平台上并允许其站立。此时大鼠可进入 NREM 期，但当其进入 REM 期时，由于全身骨骼肌张力明显降低，大鼠掉入水中而无法进入 REM 期。采用该睡眠剥夺方法能够引起动物体重降低，血浆中皮质酮 (Corticosterone, CORT) 含量的增加以及机体免疫反

应抑制等 (D'Almeida et al., 1997)。但是该方法也有一定的缺陷型, 水池中只放置一只动物, 虽然能够达到剥夺睡眠的目的, 但是缺乏了群居性动物的模拟。

(2) 多平台睡眠剥夺法

在 1981 年多平台睡眠剥夺用于大鼠的睡眠剥夺实验中, 该模型是在单平台睡眠剥夺模型上的改进, 将水池中 1 个平台增加至 7 个平台, 但是水池中仍然放置一只大鼠, 允许其在 7 个平台中自由活动。该方法较单平台睡眠剥夺多了动物的活动空间。但是该模型中的大鼠应激反应仍然存在, 如肾上腺重量增加和胸腺重量减少等, 表明该模型的应激性较多, 容易影响睡眠剥夺实验的准确性。并且该方法并没有解决大鼠为群居动物的特性 (Benoit et al., 1981)。

(3) 改良多平台睡眠剥夺法

在之前两个方法的基础上进一步改进将睡眠剥夺实验改进为改良多平台睡眠剥夺法, 具体的准备一个长 127 cm, 宽 44 cm, 高 45 cm 的水池, 在水池中安装 14 个平台, 并且在水池中放置 4-6 只动物, 这样既保证了睡眠剥夺的实验目的, 又最大程度的模拟了动物的群居特性, 将影响实验准确性的因素降到了最低。实验发现该模型下的大鼠应激水平平均比前两种方法的低, 具体为血浆 CORT 和去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE) 含量的降低, 表明改良多平台睡眠剥夺方法是一个较为理想的睡眠剥夺方法。

(4) 旋转圆筒睡眠剥夺法

1979 年该方法用于睡眠剥夺实验中, 设备主要由一柱形圆筒及一小型慢速马达构成, 圆筒与小型马达相连。马达转速为每 45 s 转 1 圈 (也有学者应用每分钟转 1 圈)。至少在实验前 2 天每天将大鼠放入圆筒中适应环境 1 次, 适应时间不少于 3h。实验时将马达按 45 s 每 1 圈进行匀速转动, 圆筒的转动会促使大鼠不停的运动而达到剥夺睡眠的实验目的。此类方法能明显的观察到是否剥夺了动物的睡眠, 但长时间的运动会引起动物的疲劳, 可能会干扰睡眠剥夺结果的准确性 (Stefurak et al., 1977)。

(5) 轻柔刺激法

当睡眠剥夺的时间较短时, 可以采用人为的轻柔刺激法进行睡眠剥夺。实验人员通过观察动物行为以及根据脑电图观察动物的睡眠状态, 当发现大鼠进入睡眠时, 用工具拍打大鼠避免其进入睡眠。此方法简单易行, 但是具有局限性, 当睡眠剥夺的时间较长时, 该方法就不适用了。

(6) 药物睡眠剥夺法

定时给大鼠注射药物, 此类方法简单易行, 操作方便, 不需要特殊仪器。缺点是动物的个体差异, 药物的作用无法达到统一的程度, 睡眠剥夺的程度存在差异, 对试验结果的准确性有影响, 因此多用于特殊药物的研发实验中。

2. 认知功能障碍和睡眠

2.1 认知功能的结构基础与行为

认知是指通过思维、经验和感官而形成概念、知觉、或想象等心理活动来获取知识的过程，涉及语言、学习、记忆、思维等一系列功能 (Reddy et al., 2021)。认知功能障碍则是由于脑组织损伤或病变引起的学习、记忆等功能障碍，可伴随着注意力和执行能力的障碍 (Karussis et al., 2000)。随着科学技术的发展以及人们生活水平的提高，人口老龄化问题日益加重，年龄相关性认知功能障碍 (Simen et al., 2011)，中枢神经系统退行性疾病包括阿尔茨海默病、帕金森病等引起的认知功能障碍，以及脑卒中后的认知功能障碍的患病人数逐年升高 (Kalaria et al., 2016)，有研究显示目前全世界有痴呆患者约四千六百万人，到 2050 年将增加至一亿三千一百五十万人。认知功能的障碍严重影响患者的生活质量，给家庭、社会带来了巨大的负担。尽管一些治疗措施包括神经营养药物 (Ma et al., 2018)、抗氧化应激药物 (Xiang et al., 2017) 和中医药 (Zhou et al., 2016) 具有一定的改善认知功能障碍的作用，但是由于各种认知功能障碍的发病机制不尽相同，目前的治疗措施仍有较大的局限性。因此，深入研究认知功能障碍的发病机制并进行针对性的治疗具有重要的现实意义。

位于脑颞叶下内面的海马组织是哺乳动物中枢神经系统中参与学习和记忆形成、贮存的关键部位，尤其在短期记忆转变为长期记忆的过程中 (Fjell et al., 2014)。正常情况下，海马齿状回 (Dentate gyrus, DG) 的颗粒细胞发出穿通支接受来自内嗅皮层神经纤维的投射，并依次与阿蒙氏角 (Cornu ammonis, CA) 的 CA3 区、CA1 区颗粒细胞形成纤维联系。因此来自内嗅皮层的信息首先通过齿状回进入海马，随后齿状回将信息进行整合后输入到 CA3 区锥体细胞及 CA1 区锥体细胞，再向海马周围进行传递。海马结构完整性的破坏影响了正常的神经通路传递，不仅严重损害新记忆的形成，也会影响海马损害之前的远期记忆，包括海马依赖性记忆和海马非依赖性记忆，因而出现认知功能障碍 (Eichenbaum, 2001; Fanselow and Dong, 2010)。引起或出现认知功能障碍的因素或疾病如衰老、阿尔茨海默病、以及脑卒中等均可出现海马结构和功能的破坏。例如研究证实衰老的小鼠海马树突棘数目显著减少，突触可塑性相关蛋白表达明显下降，CA1 区和齿状回的神经元密度显著降低，神经鞘溶解、断裂，神经微管和神经丝解体 (Cao et al., 2017)。研究也发现阿尔茨海默病患者的海马齿状回体积较正常人明显缩小，神经元密度显著下降，树突数量显著减少 (Adler et al., 2018)。阿尔茨海默病小鼠模型中也可见海马神经元数量减少，突触后致密带变薄，突触间隙加大，突触表面的曲度减小 (Schmitz et al., 2004)。此外，脑卒中后海马体积也显著减小 (Schmitz et al., 2004)，而慢性脑缺血也可出现明显的海马区神经元凋亡，神经元

数目减少、功能障碍、正常突触联系受到破坏 (Liu et al., 2017)。以上研究提示, 维持海马结构和功能的完整性对于治疗年龄相关性的或各种疾病状态出现的认知功能障碍有重要的现实意义。

2.1.1 海马

海马结构作为大脑的一部分, 其主要功能是: 学习、记忆、空间定位以及内分泌活动调节, 同时参与阿尔兹海默症、癫痫、抑郁症等神经精神疾病的病理改变 (Bhardwaj et al., 2004)。海马属于脑的古皮质, 因其各成分的分布相对独立、神经元之间的连接清楚易辨和具有高度有序化的结构特征, 并且其又是大脑中最易受应激影响的脑区之一 (Price and Duman, 2020), 故常被作为研究与认知相关疾病的靶向组织。

2.1.1.1 海马的一般结构

哺乳动物的海马位于侧脑室的内侧, 为弯曲带状隆起, 左右海马均由脑的前内侧斜向后外侧, 再弯向后下方 (Tatu and Vuillier, 2014)。自颞叶中部向下做冠状切面能够观察到双 C 型的海马结构, 大 C 代表海马阿蒙角; 小 C 代表齿状回。阿蒙角因形如海马而得名, 像一条镰状弯钩, 从胼胝体底部延伸到侧脑室的下角。一层室管膜上皮包裹与海马表面, 海马下方存在一个海马槽, 海马槽沿着海马的背部汇聚成一条白色纵行扁带称海马伞, 海马伞向后延伸至穹窿脚。由于血管丛齿状回进入, 因此该部位被压成需要横沟故而命名为齿状回, 它位于海马的内侧, 分布于海马沟和海马伞之间, 向前伸展至海马沟的切迹, 向后与束状回相连 (Jordan, 2020)。

根据细胞类型的不同, 海马从内向外可分为: 分子层、锥体细胞层、多形层; 依据这 3 层细胞的纤维通路不同, 又可分为: 腔隙分子层、辐射层、锥体层、始层和室床 (Chauhan et al., 2021)。齿状回从内向外分为: 分子层、颗粒细胞层、多形层又称门区。颗粒层呈 V 型, 靠近海马裂的一部分称为外臂, 接近室管膜的另一部分称为内臂。下托在海马和海马旁回之间, 因海马旁回的细胞分为六层, 故下托为三层细胞层向六层细胞层转变的移行区。

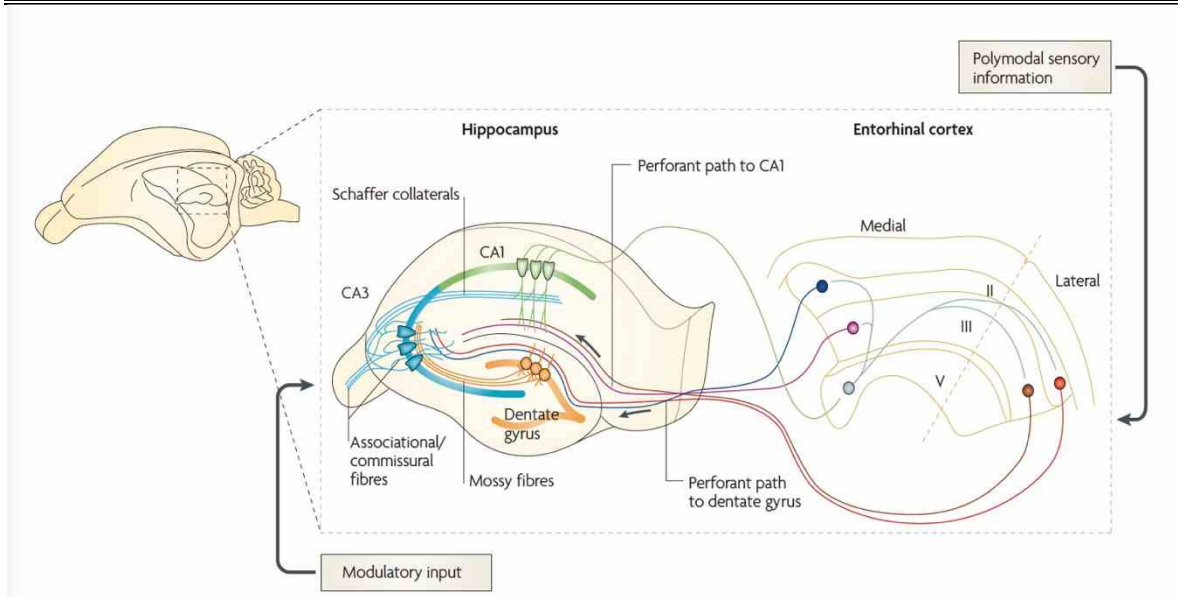


图 1-1 海马的结构

参与与学习记忆的海马分区：CA1，CA3，DG 和内嗅皮层 (Chauhan et al., 2021)。

Fig. 1-1 Basic structure of hippocampus.

Hippocampus regions involved in learning and memory: CA1, CA3, DG and entorhinal cortex (Chauhan et al., 2021).

2.1.1.2 海马的细胞构筑

海马组织当中存在多种细胞类型，包括锥体细胞、颗粒细胞、中间神经元和门区细胞。海马的投射神经元主要是锥体细胞，分布在锥体细胞层，由于其细胞形态的不同可以分为 CA1、CA2、CA3 和 CA4 四个区。

邻近下托的部分是 CA1 区，向腹外方向延伸为 CA2 区紧接着为 CA3 区，但 CA2 与两边的分区并不明显，多作为二者的移行区，CA3 进一步延伸至齿状回中的部分为 CA4 区。CA1 区锥体细胞大约排列成 2~3 层，锥体细胞的顶端树突，经辐射层分支与腔隙分子层相连；基部树突，其分支呈放射状与始层相连。CA1 的轴突进入室床，投射到下托，侧支达始层 (Zammit et al., 2017)。CA2 区主要分布紧密的锥体细胞，接受下丘脑乳头上区的传入纤维 (Pang et al., 2019)。CA3 锥体细胞排列疏松，可达 10 层之多，锥体细胞数是 CA1 的 1.5~2.0 倍，锥体细胞顶端树突与苔藓纤维的末梢形成突触，构成透明层。CA3 的轴突投射到对侧 CA1、CA3 区，侧支达始层、门区及分子层的内 1/3。颗粒细胞是 DG 的投射神经元，主要分布在颗粒细胞层 (Alkadhi, 2019)。颗粒细胞树突表面有很多棘，所有分支与分子层表面相连，其树突棘是接受传入信息的主要地方。颗粒细胞的轴突一苔藓纤维起源与树突树相对的另一极，它可进入 CA3 区辐射层，侧支达门区。颗粒细胞与 CA3 锥体细胞形成的轴-树突触，是

中枢神经系统最大的突触 (Kullmann, 2011)。中间神经元大多为抑制性中间神经元, 直接影响投射神经元的兴奋性, 数量虽少, 但随机分布于整个海马结构。中间神经元大约有 3 种类型: 篮细胞: 多分布在锥体细胞和颗粒细胞层及始层; 腔隙分子层中间神经元: 主要散在于腔隙分子层; 吊灯样细胞: 分布在分子层。门区细胞: 在 DG 的多形层可见许多种类型的门区细胞, 而其中苔藓细胞因其胞体大是最具特征的细胞。

除神经元外, 海马体中的主要细胞类型包括胶质细胞, 如星形胶质细胞和小胶质细胞。很长一段时间以来, 神经胶质细胞被认为主要起营养和支持神经元的作用。但随着研究的深入, 神经元、星型胶质细胞和小胶质细胞通过互相形成的网络, 共同协调参与大脑功能, 对大脑的健康运行起着至关重要的作用 (Tatu and Vuillier, 2014)。

分布于海马中的星形胶质细胞具有不同的形态特征。在 CA1 辐射状层中, 许多细胞呈梭形或细长形态, 平行于锥体细胞的顶端树突 (Ogata and Kosaka, 2002)。相反, 腔隙层中的星形胶质细胞更小、更密集, 其主要突起是随机定向的 (Bushong et al., 2004)。此外, 星形胶质细胞的 DG 与海马背侧和腹侧存在差异 (Wallraff et al., 2006)。腔隙层中单个星形胶质细胞的投射区域小于锥体层或放射状层中相应的星形胶质细胞。锥体层的星形胶质细胞比实质层的星形胶质细胞分支稀疏 (Wallraff et al., 2006)。小胶质细胞是中枢神经系统的常驻免疫细胞, 在维持大脑内环境稳定中发挥着关键作用 (Rose et al., 2017)。在生理条件下, 小胶质细胞是高度动态的; 它们在中枢神经系统的实质内以高度运动的过程不断巡逻周围环境, 以感知微环境的变化 (Frost and Schafer, 2016)。静息状态下, 小胶质细胞胞体小, 并延伸出多个突起 (分枝型小胶质细胞)。当发现促炎刺激时, 小胶质细胞迅速激活, 成为神经炎症反应的主要参与者 (Nimmerjahn et al., 2005)。变形虫形态的细胞是小胶质细胞激活的形态学指标 (Crotti and Glass, 2015)。脑内稳态的破坏, 如铁代谢、脂代谢等, 会导致小胶质细胞的形态和功能改变, 如胞体肥大、分支增厚, 从而加重脑的功能损伤 (Aldskogius, 2001)。

2.1.2 认知与行为

认知是指获取知识并将其转化为心理活动的心理过程。认知功能是复杂的生理活动, 利用啮齿动物进行认知相关研究时需要经典的方法进行检测。动物行为学的方法在不断的脑科学研究过程中得以出现和持续发展 (Price and Duman, 2020)。目前主要的行为学实验包括学习记忆行为实验、抑郁行为实验、焦虑行为实验、恐惧行为实验、自发活动行为实验、节律行为实验、攻击行为实验、防御行为实验、繁殖行为实验、社会行为实验等。下面我对主要的行为学方法进行总结:

2.1.2.1 学习记忆行为实验方法

学习和记忆是人类和其他动物根据过去的经验改变自己的行为、对环境变化或社会互动后改变行为的反应的神经过程。学习过程与记忆过程互为因果 (Paul et al., 2009)。1937 年建立的斯金纳箱是首次检测学习记忆行为的实验方法。1939 年建立了 T 迷宫探究大鼠的自发交替行为, 大鼠通过对进入新旧臂的记忆增加发现食物的机会 (Deacon and Rawlins, 2006)。1979 年, Barnes 建立了巴恩斯迷宫 (Barnes, 1979), 动物不需要限食, 基于其天生的探索特性, 训练动物通过视觉提示到达隐藏的庇护所。由理查德莫里斯设计的莫里斯水迷宫, 在 1981 年的一项关于大鼠空间定位的研究中首次被描述。基于动物厌恶水的特性, 强迫动物在水池中寻找隐藏于水下的平台。水迷宫用于评价啮齿动物的空间学习和记忆能力, 广泛应用于海马依赖记忆的检测 (Morris et al., 1982)。1989 年, 研究人员基于动物天生对新奇物体的探索特性, 建立了新物体识别评价方法, 该方法基于小鼠探索新物体的自发倾向, 对动物的应激影响较小, 与人类的记忆行为类似 (Aggleton et al., 1989)。

2.1.2.2 情绪行为实验方法

情绪调节是一个整合生理、认知和行为成分的过程。动物和人类都存在情绪, 它是对客观事物的行为反应, 但是动物的情绪无法用语言表达, 因此研究人员利用动物的天性设置特定的试验方法反映动物的情绪状态。

抑郁行为是动物面临环境应激等因素长期、慢性作用时, 出现快感缺失、行为绝望、获得性无助等情绪反应 (Hao et al., 2019)。1934 年, Hall 基于动物的探索行为建立了旷场试验, 观察动物在边缘和中央的探索行为反映动物的焦虑情绪 (Kraeuter et al., 2019)。1968 年通过获得性无助动物模型用以模拟抑郁症患者的无助行为。强迫游泳试验在 1977 年通过检测大小鼠的行为评价动物的抑郁行为 (Yankelevitch-Yahav et al., 2015)。1985 年小鼠悬尾试验用于对抗抑郁药物的筛选 (Can et al., 2012)。1982 年糖水偏好试验用于检测大鼠对蔗糖水的摄入, 评价抑郁动物模型的快感缺失状态 (Gross and Pinhasov, 2016)。

焦虑行为本质上动物新奇环境探索心理和对其恐惧而形成的冲突产生的行为 (Brown, 2019)。旷场试验、高架十字迷宫、明暗箱、新奇环境摄食抑制是用于反映动物焦虑行为的试验。高架十字迷宫即利用动物对新异环境的探究特性和对开臂的恐惧形成矛盾冲突, 用于抗焦虑药物的筛选及焦虑作用机制的研究。旷场实验也是利用动物对陌生环境的恐惧, 主要在周边区域活动, 在中央区域活动较少的原理, 研究动物的焦虑行为 (Prut and Belzung, 2003)。

2.1.2.3 运动行为实验方法

运动行为实验方法包括一般运动行为学评价,旷场试验中动物在一定时间内的运动路径能够反映动物的运动能力,通过转轮和平衡木试验能够反映动物的协调运动能力;通过负重游泳和跳台试验能够反映动物的耐力;通过不同的运动行为试验,对动物的多种行为进行检测,比如跳、走、跑和游泳等,而这些行为的背后也反映了动物是否处于健康状态 (Teixeira et al., 2012)。

2.2 认知功能障碍与海马神经元丢失

认知功能障碍也称为神经认知障碍,是一种主要影响认知能力(包括学习、记忆、感知和问题解决等) 的心理障碍。一般被定义为: 执行功能、学习和记忆、感知运动功能、语言、复杂注意力和社会认知等 6 种认知能力缺陷, 通常代表为衰退, 并可能有潜在的脑病理 (Sachdev et al., 2014)。认知障碍的表现形式多种多样, 这些表现可单独存在, 但多相伴出现。比如学习与记忆障碍, 在大脑皮层或海马的不同部位受损伤时, 可引起不同类型的记忆障碍, 如颞叶海马区受损主要引起空间记忆障碍, 蓝斑、杏仁核受损主要引起情感记忆障碍等; 还有其他的表现形式, 包括失语、失认和失认等。认知功能障碍的诱因有多种, 如基因、脑外伤、中风、脑外伤、创伤后应激、药物和睡眠缺失等, 其中睡眠作为人体必要的生理活动, 短期或长期的睡眠剥夺对认知功能能够造成显著的影响 (Poulose et al., 2017)。结合海马的结构基础, 神经元和各种胶质细胞参与了认知功能障碍的发生和加剧过程中。而神经元作为大脑神经活动的直接执行者, 神经元的正常功能对于认知功能的稳态是至关重要, 然而当神经元出现大量丢失时, 机体的认知功能不可避免的出现损伤, 而神经胶质细胞也能通过直接或间接作用于神经元的生理过程来参与认知功能的调控。

2.2.1 神经元丢失的形式

在所有生命形式中, 细胞死亡往往是一个严格控制和复杂的过程, 超越了对活生物体极端伤害后发生的不受控制的坏死形式。与意外细胞死亡不同, 程序性细胞死亡涉及一系列精确的事件, 由一组确定的效应分子执行。因此, 在特定环境中发生的细胞死亡的类型取决于哪些效应分子被激活——这决定了细胞死亡的最终机制。最初的细胞死亡类型分类是在 20 世纪末根据死亡细胞的形态差异而提出的, 简单地称为 I 型 (凋亡型)、II 型 (自噬型) 和 III 型 (坏死型) (Schweichel and Merker, 1973)。在过去的几十年里, 随着研究的深入, 越来越多的细胞死亡机制被发现。目前已经提出了多达 12 种调控细胞死亡的模式, 包括内源性和外源性细胞凋亡 (intrinsic and extrinsic apoptosis)、线粒体渗透性转移驱动坏死 (mitochondrial permeability transition-driven necrosis)、坏死 (necroptosis)、焦亡 (pyroptosis)、网状细胞死亡 (NETotic cell

death)、溶酶体依赖性 (lysosome-dependent) 和自噬 (autophagy-dependent) 依赖性细胞死亡、免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death) 和铁死亡 (ferroptosis), 每一个都包含自己的编码死亡的机制, 被用来触发和实现特定的细胞死亡反应 (Galluzzi et al., 2018)。

2.2.1.1 铁死亡

美国怀特研究所的 Stockwell BR 研究团队在 2003 年, 通过高通量筛选抗癌药物时发现一种小分子 Erastin, 能够诱导致癌基因突变促进促进肿瘤细胞的死亡, 而这种死亡方式不论在形态还是分子机制方面都区别与凋亡、焦亡和坏死等细胞死亡方式 (Dolma et al., 2003)。2012 年, 他们将这种铁离子依赖的脂质过氧化物蓄积所引起的细胞死亡方式命名为铁死亡 (Dixon et al., 2012)。铁死亡是依赖于铁的一种死亡方式, 当发生铁死亡时, 细胞内的 Fe^{2+} 水平升高 (Hirayama et al., 2019), 谷胱甘肽含量减少, 线粒体体积萎缩以及线粒体膜密度增厚等变化 (Sun et al., 2018)。目前对于铁死亡的研究越来越深入, 发现铁死亡的细胞内调控机制复杂。细胞铁死亡的特征是 GPX4 功能的丧失, 游离铁利用性的增加和膜脂质的过度氧化 (Magtanong et al., 2016)。因此, 探究铁死亡的调控机制多从以下几个方面入手: 谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的合成、胱氨酸的摄取、谷胱甘肽过氧化物酶 4 的活性 (Glutathione peroxidase-4, GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 脂代谢、铁代谢、甲羟戊酸途径、胱氨酸-谷氨酸反向转运蛋白系统 (Conrad et al., 2016; Doll et al., 2017)。

(1) 铁代谢通路

铁作为一种氧化还原金属, 可以参与自由基的形成和脂质过氧化的扩散 (Hassannia et al., 2019)。在正常情况下, 铁以两种形式存在, 即 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 。十二指肠吸收的膳食铁以转铁蛋白结合铁 (Transferrin-bound iron, TBI) 的形式通过血浆输送到全身。循环血浆铁通过血脑屏障 (Blood-brain barrier, BBB) 进入大脑, 血脑屏障由脑微血管内皮细胞 (Brain microvascular endothelial cells, BMVECs)、星形胶质细胞和周细胞形成。铁转运通过内皮屏障可分为两种可能的机制。第一种是胞吞模型, 转铁蛋白受体复合物通过 BMVEC 细胞质运输到核内体, 并通过 BMVEC 的腔壁直接释放到大脑。第二种是经典途径, 铁离子通过与转铁蛋白受体 1 (Transferrin receptor 1, TFR1) 受体结合进入内皮细胞, 然后通过铁离子运铁素 (Ferroportin, FPN) 转移出内皮细胞 (Kakhlon and Cabantchik, 2002)。与血液中只有一种 TF- Fe^{3+} 不同, 铁在大脑中以两种方式存在, 即 TBI (TF 结合铁形式) 和 NTBI (非 TF 结合铁形式)。这是因为即使在正常情况下, TF 在脑脊液中也是完全饱和的, 血清铁饱和度估计为

30%，因此 NTBI 是一种补偿性铁源，维持脑铁平衡。在 NTBI 中，与铁结合的低分子量化合物包括柠檬酸、ATP 或抗坏血酸（Knutson, 2019）。

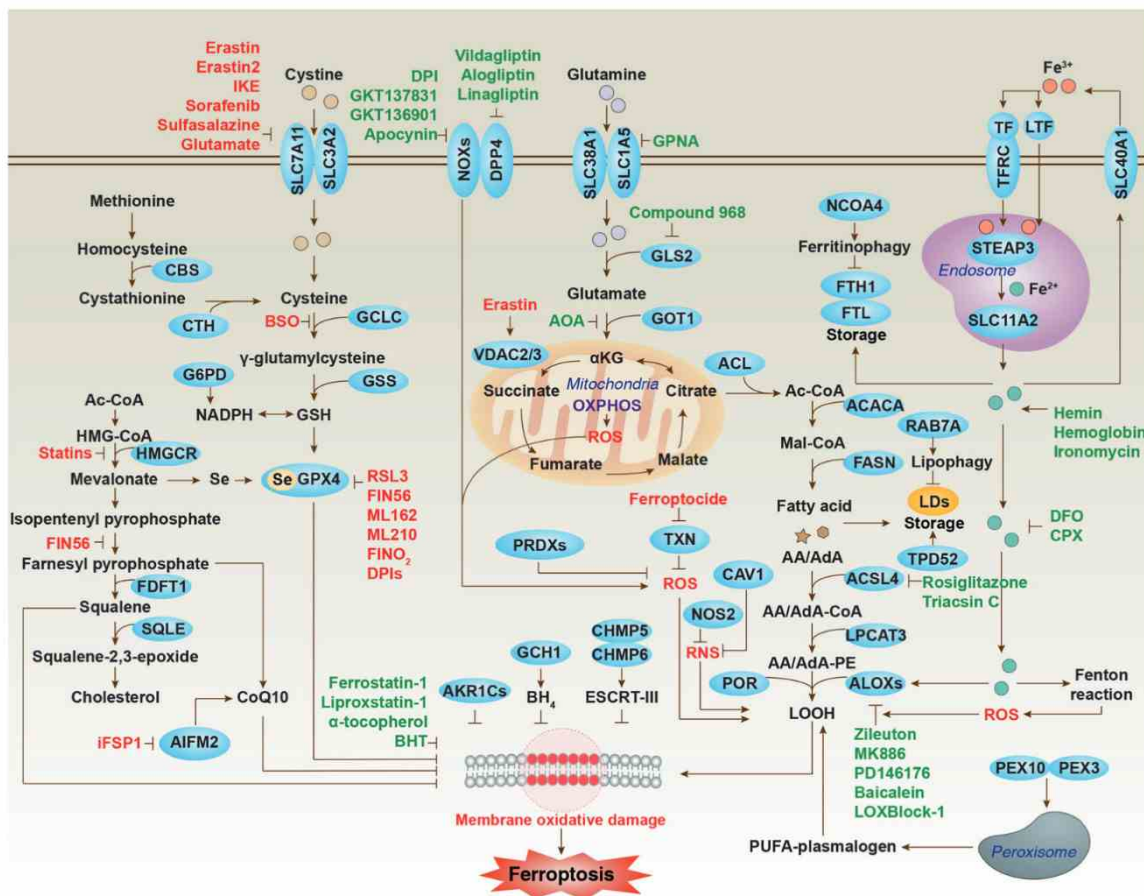


图 1-2 铁死亡的核心分子机制及信号传导调控

铁死亡可通过两种主要途径发生，即外源性或转运依赖途径（例如，减少半胱氨酸或谷氨酰胺摄取和增加铁摄取），以及酶调控通路（如 GPX4 的抑制）（Tang et al., 2021）。

Fig. 1-2 Core molecular machinery and signaling regulation of ferroptosis.

Ferroptosis can occur through two major pathways, the extrinsic or transporter-dependent pathway (e.g., decreased cysteine or glutamine uptake and increased iron uptake), and the intrinsic or enzyme-regulated pathway (e.g., the inhibition of GPX4) (Tang et al., 2021).

细胞内铁代谢的经典过程是由多种蛋白质调节的。Fe³⁺和 TF 的复合物被 TFR1 内吞入细胞。在核内体中，Fe³⁺被前列腺成员 3 的 6 个跨膜上皮抗原 (Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate member 3, STEAP3) 还原为 Fe²⁺，然后通过二价金属转运体 1 (Divalent metal transporter 1, DMT1) 介导的途径释放进入细胞内的不稳定铁池中。细胞内不稳定铁池中的铁存在多种去向，它可以储存在铁蛋白中的 24 个轻链 (FTL) 和 24 个重链 (FTH) 中；也可以参与线粒体氧化磷酸化的过程 (McCarthy

and Kosman, 2015); 过剩的 Fe^{2+} 通过膜蛋白 FPN 输出细胞, 并被细胞膜周围的 hephaestin 或铜蓝蛋白氧化, 然后与 TF 结合, 重新进入循环 (Belaidi and Bush, 2016)。铁稳态对细胞生存是不可或缺的, 这可能是过量的铁引发其特定形式的细胞死亡的部分原因。

(2) 脂质代谢通路

细胞内脂质代谢过程也参与铁死亡的调控。脂质过氧化的积累是铁死亡的关键过程, PUFA 在其中起着重要作用, 尤其是花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA) 和肾上腺酸 (Adrenic acid, AdA) (Ayala et al., 2014; Conrad et al., 2018)。根据现有研究 (Bai et al., 2019), ACSL4、溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 和花生四烯酸 15 脂氧合酶 (Arachidonate 15-lipoxygenase, ALOX15) 是负责脂质代谢的重要酶, 在调节铁死亡中具有关键作用。ACSL 家族包括 ACS11、ACSL3、ACSL4、ACSL5 和 ACS16 五种异构体, 它们都能将脂肪酸转化为酰基辅酶 a (Tang et al., 2018)。其中, ACSL4 可催化 AA/AdA 生成 AA/AdA-coa (Kuch et al., 2014)。LPCAT3 可将 AA/AdA-coa 插入溶血磷脂 PE 中, 参与磷脂酰乙醇胺-肾上腺素/花生四烯酸 (PE-AA/AdA) (Kagan et al., 2017) 等膜磷脂的合成。在 ALOX15 的作用下, PE-AA/AdA 可进一步氧化为 PE-AA/AdA-oo (O) (Colakoglu et al., 2018)。目前认为, PL-OOH 的积累是铁中毒的一个重要特征。GPX4 利用两个 GSH 分子作为电子供体, 将脂质过氧化氢 (Lipid hydrogen peroxide, PL-OOH) 还原为脂质醇 (PL-OH, lipid alcohol), 从而降低膜功能损伤 (Forcina and Dixon, 2019)。

(3) GPX4 通路

细胞有防御系统来应对过度生成的脂质过氧化物, 特别是谷胱甘肽和谷胱甘肽利用酶 (Ou et al., 2016)。GPX4 是一种脂质修复酶, 已被鉴定为铁死亡的关键调节因子。GPX4 通过将脂质过氧化物转化为相应的醇类来抵抗铁依赖的脂质过氧化。大量研究表明, GPX4 的缺失增加了氧化应激诱导细胞死亡的易感性。脂质过氧化的整个过程包括氨基酸转运、GSH 生物合成和 GPX4 催化。半胱氨酸是合成谷胱甘肽的关键成分, 可以通过 Xc⁻ 转运系统导入, 也可以通过反硫化途径合成。系统 Xc⁻ 是一种表达于哺乳动物细胞质膜的氨基酸转运体, 是细胞抗氧化防御系统的一部分。该转运体是由一个轻链 (SLC7A11) 和一个重链 (SLC3A2) 组成的异质二聚体。系统 Xc⁻ 以 1:1 摩尔比交换细胞内的谷氨酸和细胞外的胱氨酸。Xc⁻ 系统摄取的胱氨酸被还原为半胱氨酸, 与谷氨酸和甘氨酸结合, 合成谷胱甘肽。另一方面, 蛋氨酸合成同型半胱氨酸后, 在中间型胱硫氨酸 (包括胱硫氨酸 β 合酶 CBS) 的作用下转化为半胱氨酸。通过反硫化途径产生的半胱氨酸足以在细胞质中维持足够的浓度, 从而使其对系统 Xc⁻ 抑制剂诱导的铁死亡具有抗性 (Cardoso et al., 2017)。

GPX4 的脂质修复功能需要 GSH 的参与, GSH 是 GPX4 的辅助因子和合成底物

(Yang et al., 2014)。当系统 Xc-被抑制时,细胞中的半胱氨酸被耗尽,从而导致 GSH 合成受阻和 GPX4 功能受损,最终导致铁死亡 (Feng and Stockwell, 2018)。GPX4 是一种含有硒代半胱氨酸氧化还原活性中心的硒蛋白 (Angeli et al., 2014)。硒代半胱氨酸的遗传密码是 UGA, 与其终止密码子相同, 因此运输需要特殊的硒代半胱氨酸 tRNA (Selenocysteine tRNA, sec-tRNA) (Bridges et al., 2012)。对 sec-tRNA 的功能必不可少的异戊烯基团来源于甲羟戊酸途径 (Mevalonate pathway, MVA 途径) 的中间体焦磷酸异戊酯 (Intermediate isopentyl pyrophosphate, IPP) (Angeli and Conrad, 2018)。由于 IPP 的 MVA 途径的重要产物, 该途径的抑制剂能够阻碍硒代半胱氨酸 tRNA 的成熟和 GPX4 的合成 (Moosmann and Behl, 2004)。MVA 途径的另一个产物是辅酶 Q10 (Coenzyme Q10, CoQ10)。 β -羟基 β -甲基戊二酰-CoA (β -Hydroxyl β -methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) 通过 HMG-CoA 合酶由乙酰-CoA 形成, 然后转化为甲羟戊酸, 然后用 HMG-CoA 还原酶将其合成为 CoQ10。辅酶 Q10 是一种强大的细胞膜抗氧化剂, 随后在氧化应激下抑制铁死亡 (Ye et al., 2020)。

2.2.1.2 凋亡

在 1972 年 Wylie Kerr 和 Currie 提出了细胞凋亡的概念并描述了细胞凋亡的形态学特征 (Kerr et al., 1972)。细胞凋亡也被称为程序性细胞死亡, 是指特定细胞自我调节的自然和自我破坏过程。细胞凋亡可以被两个不同的通路触发: 内源性的线粒体途径 (Bcl-2 途径) 和外源性的死亡受体途径。内源性途径由 Bcl-2 蛋白家族的促凋亡和抗凋亡成员调节。在健康细胞中, 抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-XL、MCL-1、Bcl-W 和 A1/BFL1 通过抑制 BAX 和 BAK 的基本效应来保证细胞存活。当细胞处于应激状态 (例如生长因子剥夺、DNA 损伤、ER 应激) 时, BH3-only 蛋白 (BIM、PUMA、BID、BMF、BAD、HRK、BIK、NOXA) 作为细胞凋亡的关键启动子, 会呈现出转录或转录后层面的上调, 与抗凋亡 BCL-2 蛋白以高亲和力结合, 释放 BAX 和 BAK 并形成寡聚体, 导致线粒体外膜通透性增加, 线粒体释放细胞色素 C 等凋亡因子, 这些凋亡因子促进半胱天冬酶级联反应的激活, 导致数百种蛋白质的裂解, 最终导致细胞破坏 (Xu et al., 2019)。外源性途径通过肿瘤坏死因子受体超家族成员的配体激活, 这些家族成员具有细胞内死亡结构域, 促进了细胞内死亡诱导信号复合物的形成, 导致 caspase-8 和下游效应器半胱天冬酶 (Cleaved caspase-3 和 caspase-7) 的激活 (Kashyap et al., 2021)。死亡受体途径可以通过 caspase-8 介导的促凋亡蛋白 BID 的蛋白水解过程激活从而与内源性凋亡通路连接到一起 (Moujalled et al., 2021)。

2.2.1.3 自噬

自噬是大分子结构甚至整个细胞器降解过程中的高度保守的步骤，在细胞和组织稳态中起关键作用，对于调节蛋白质的细胞质周转和整个细胞器的很重要（Zhang et al., 2021a）。营养缺乏、氧化应激和蛋白质聚集等许多刺激都可以启动细胞自噬（Menzies et al., 2017）。在这些情况下，自噬减少了细胞压力，并为细胞提供了用于修复、存活和生长的代谢物。根据细胞内底物进入溶酶体腔的方式不同，自噬可分为三大亚型：大自噬（macro-autophagy）、微自噬（micro-autophagy）和分子伴侣介导的自噬（chaperone-mediated autophagy）。这些自噬方式都集中在溶酶体上，用于细胞内容物降解和回收。尽管自噬通常用于促进细胞存活，但在某些情况下，例如果蝇发育过程中唾液腺的退化，自噬与细胞杀伤有关（Aman et al., 2021）。

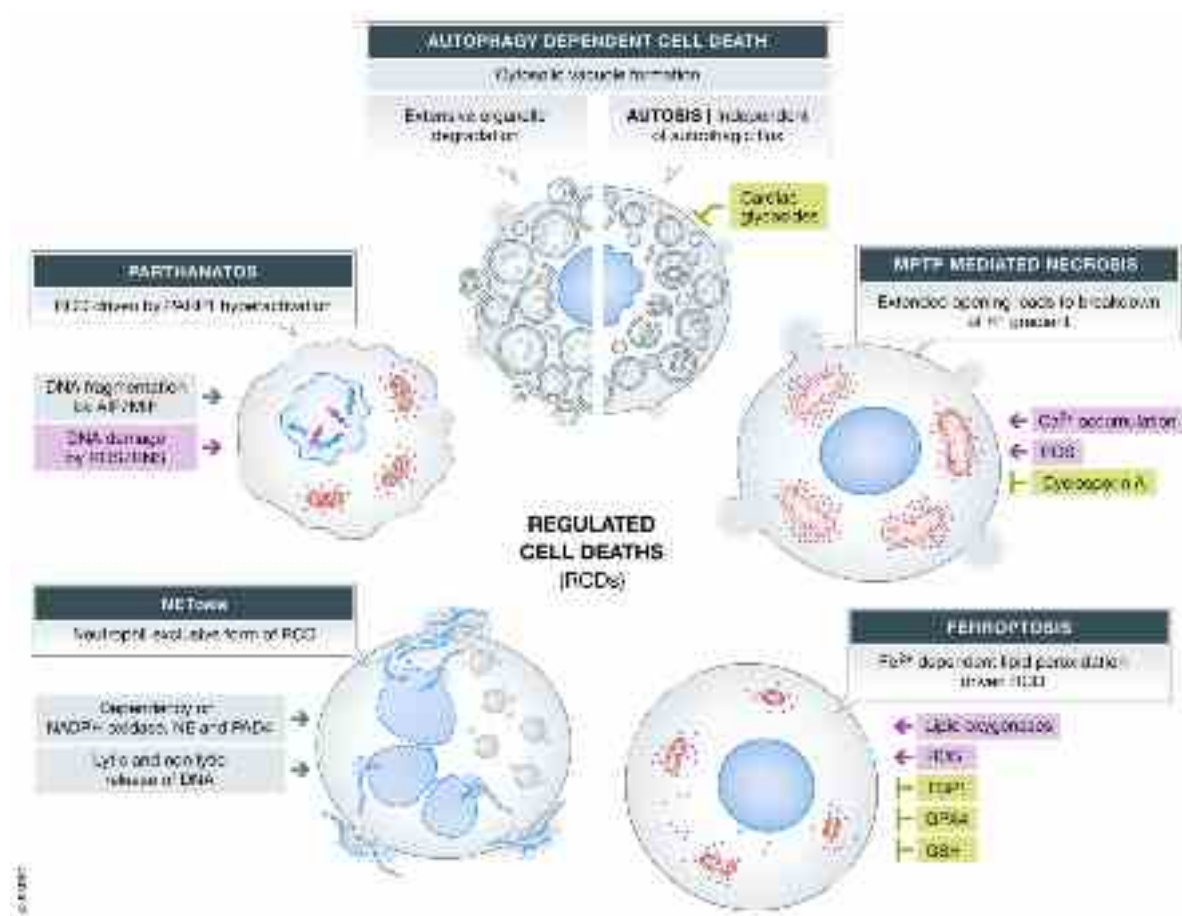


图 1-3 调控细胞死亡的不同形式的关键特征

细胞死亡调控途径的概述，刺激条件、关键特征以及通路的正调控和负调控（Matthias et al., 2021）。

Fig. 1-3 Key features of different forms of regulated cell death.

Overview of regulated cell death pathways highlighting the stimuli, key features as well as positive and negative regulators of the pathways (Matthias et al., 2021).

2.3 海马神经元丢失与睡眠

在夜间睡眠时期，神经元会进行突触的修复，并清理白天活动代谢出的废物；而神经元也能影响睡眠的过程。研究认为，腺苷参与到睡眠稳态调节的过程中，腺苷在清醒状态下的积累，导致困意的产生，而咖啡的主要成分咖啡因，可以阻断腺苷与其受体的结合，达到促进清醒的效果 (Clark and Landolt, 2017)。研究人员发现，谷氨酸能神经元的活动，参与调控胞外腺苷的积累过程。基底前脑区谷氨酸能神经元的活动在促进机体清醒的同时，可以通过刺激腺苷的释放，而引起睡眠压力的增加，导致觉醒到睡眠的转换。特异损毁这些神经元，可以显著降低腺苷的积累，导致小鼠清醒时间的大幅度增长 (Peng et al., 2020)。除此之外，当神经元大量丢失时，同样无法维持机体正常的睡眠过程。在 REM 时期，自噬通过清除不需要的、功能失调的细胞内碎片、废物等，维持细胞的健康、完整性和稳态。自噬异常导致神经元功能障碍，包括死亡，导致神经退行性疾病，而 REM 的缺失会导致 NE 水平升高影响神经元的自噬，扰乱神经元的完整性和稳态，并导致大脑功能的改变 (Chauhan and Mallick, 2019)。此外，在阻塞性睡眠呼吸暂停模型与肝损伤风险增加有关，慢性间歇性缺氧导致大鼠肝脏出现明显的肝细胞肿胀、紊乱、坏死和炎症细胞浸润，并观察到肝细胞铁死亡的发生 (Chen et al., 2020)。生酮饮食因其神经保护作用而闻名，给予慢性 SD 小鼠补充富含生酮的饮食能有效改善其认知功能的缺陷，而其作用机制在于抑制神经元铁死亡的发生和提高突触可塑性 (Wang et al., 2022)。可见在睡眠缺乏的模型中，铁死亡已经成为广受关注的潜在治疗靶点。之前的一项研究发现，连续 48h 的 SD 能够损伤动物的认知功能，其原因是海马神经元发生过度自噬，并出现神经元凋亡现象 (Wadhwa et al., 2017a)。同样的在睡眠限制模型，甲状腺会受到不同程度的影响其自身形态以及合成激素的功能都出现了损伤，而这可能与自噬和凋亡失衡有关 (Li et al., 2021b)。与急性 SD 相同，慢性睡眠限制也能引起细胞凋亡的发生，给予大鼠每天限制睡眠 18 小时，恢复 6 小时，持续 21 天的处理，发现颈上神经节的体积、神经元总数和卫星胶质细胞数量明显减少，给予姜黄素补充后有效缓解了细胞凋亡数量 (Erfanizadeh et al., 2020)。睡眠正常促进神经元结构和功能的稳定，神经元损伤势必会影响睡眠的正常状态。

3. 褪黑激素与睡眠和认知功能

3.1 褪黑激素的合成和分泌

褪黑激素 (N-乙酰-5-甲氧基色胺, Mel) 是一种小分子神经内分泌激素，主要由松果体产生，但外周组织如胃肠道、视网膜、脾脏、肝脏和肾脏、内皮细胞或免疫细

胞也可以产生 Mel (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Calvo et al., 2013)。褪黑激素的合成过程为, 从必需氨基酸色氨酸, 通过羟基化, 首先转换成 5-羟色氨酸, 随后通过脱羧过程称为 5-羟色胺, 接着在芳香烷基胺-N-乙酰基转移酶 (Aalkylamine N-acetyltransferase, AANAT) 的作用下, 5-羟色胺被乙酰化为 N-乙酰基血清素, 然后被羟色胺-O-甲基转移酶转化为 Mel。AANAT 酶是 Mel 合成中的限制因子, 它的表达在昼夜节律中发挥关键作用, 因此被称为“时间酶”。

褪黑激素具有亲脂性和水溶性, 有助于通过细胞膜 (Claustrat and Leston, 2015)。进入全身循环后它可以进入各种液体、组织和细胞室中 (唾液、尿液、脑脊液、排卵前卵泡、精液、羊水和牛奶)。由于 Mel 不储存在松果体中, 血浆激素谱能很好的反映松果体的活性 (Reiter et al., 2014)。褪黑激素的分泌发生在夜间, 血浆水平在凌晨 03:00-04:00 左右最高, 随时间的增加其水平发生改变, 在白天时无法检测到 Mel 的水平。在激素节律中, 这种昼夜节律的振幅最为显著 (Meng et al., 2017)。视网膜-松果体通路是哺乳动物体内光感应调节的内源性自律结构, Mel 的分泌主要受到这一通路的调节。在白天或长时间光照下, AANAT 酶的活性降低, Mel 水平很低; 在晚上或长时间黑暗环境下, AANAT 酶的活性增加, Mel 水平升高 (Liu et al., 1997)。不同年龄段 Mel 的分泌也有差异, 其分泌水平与年龄的增加呈反比, 幼儿时期 Mel 的分泌水平最高, 老年时的 Mel 的分泌水平最低。

3.2 褪黑激素与睡眠

褪黑激素因其对睡眠的调控作用, 目前广泛应用于临床治疗当中。对于一些长时间飞行员或作战军人, 在进行长时间的工作后会选用 Mel 来缓解时差带来的影响, 提高睡眠质量恢复正常的睡眠状态, 这是根据 Mel 对昼夜节律的调控作用 (Touitou et al., 2017)。褪黑激素对于熬夜人群或睡眠障碍的患者有很好的治疗作用, 一方面由于 Mel 具有促进睡眠的作用, 另一方面 Mel 具有很高的生物安全性, 相对于其他安眠药 Mel 的副作用很少, 因此 Mel 常用于治疗失眠 (Tordjman et al., 2017)。但是目前对于 Mel 如何促进睡眠尚不清楚。科研人员认为 Mel 能够提高神经元内钙离子的含量, 从而增加与睡眠相关核团的神经元的兴奋性, 从而促进机体进入睡眠状态 (Pandi-Perumal et al., 2008)。也有研究认为, Mel 能够与控制觉醒的核团的神经元产生联系, 抑制这些核团中的神经元的兴奋性, 从而反向促进睡眠过程 (Li et al., 2017a)。

3.3 褪黑激素与认知

褪黑激素作为大脑内源性调节因子, 其分泌减少公认与 AD、帕金森病等神经退行性疾病的发病机制有关, Mel 外源性给药可诱导认知增强, 并调节神经退行性过程

(Esposito and Cuzzocrea, 2010)。大量研究表明, Mel 能通过不同的作用途径改善认知功能。比如在脑损伤模型中通过下调升高的炎性因子进而改善神经炎症反应 (Muhammad et al., 2019); Mel 也能与糖基化终产物受体结合, 抑制 RAGE-NF- κ B-JNK 途径, 从而降低细胞内氧化应激的发生 (Yu et al., 2019); 少突胶质细胞参与髓鞘的生成, Mel 通过上调该细胞内 ERK 的表达, 促进了神经组织的髓鞘再生 (Ghareghani et al., 2017); Mel 也能促进海马 CA1 区神经元的钙离子活动的增加, 从而加强了记忆相关神经元的突触可塑性和突触兴奋性 (Madhu et al., 2021)。此外, Mel 在铁死亡领域也有调节作用, Mel 能够与 MT2 受体结合, 改善急性 SD 引起的海马神经元铁死亡和小鼠认知功能障碍 (Wang et al., 2021a)。在创伤性脑损伤模型中, Mel 也能改善神经元铁死亡的发生, 最终逆转该模型小鼠的记忆损伤现象 (Rui et al., 2021)。

3.4 褪黑激素的作用机制

褪黑激素调控着大量的生理过程, 包括昼夜节律、睡眠与觉醒、体温和血压调节、骨代谢、免疫功能、生殖功能、记忆形成、细胞分化和增殖、氧化应激的抑制和炎症过程。而 Mel 发挥上述作用主要有两种途径, 分别是直接调控途径和间接调控途径。Mel 的直接调控途径可以通过与受体结合, 直接作用于靶组织或靶细胞; 而对于间接途径, Mel 作为一个对多种组织器官有调控的激素, 能够协调全身的反应间接影响靶组织或靶细胞。

3.4.1 褪黑激素的受体途径

褪黑激素的受体结构在 1975 年首次定义 (Heward and Hadley, 1975), 其属于 G 蛋白偶联受体 (GPCRs), 是七次跨膜结构域蛋白, 用于传递大量激素或神经递质的细胞内效应 (Hill, 2006)。迄今为止, 在哺乳动物中已经发现了三种主要的 Mel 膜受体, 即 MT1, MT2 和 MT3。MT1 和 MT2 被描述为高亲和力的 G 蛋白偶联受体, Mel 通过与这些受体结合并触发信号转导级联, 产生生物学后果 (Dubocovich and Markowska, 2005)。MT3 也是 Mel 的 G 蛋白偶联受体, 但它只存在于两栖动物和鸟类。目前认为 MT3 结合位点是醌还原酶 (quone reductase, QR2), 有假说认为 Mel 是 QR2 的共底物, 而 QR2 反过来又在平衡自由基生成中发挥重要作用 (Ebisawa et al., 1994)。这表明 MT3 可能参与 Mel 清除自由基的过程, 但 Mel 激活信号转导级联和调节不同生理功能的作用仍是通过 MT1 和 MT2 受体介导的。在大脑和外周组织中均能观察到 MT1 和 MT2 受体的分布。肠道中的肠嗜铬细胞上大量存在 MT1 受体, 其中十二指肠的含量最高, 接近空肠的地方逐渐降低, 在接近直肠的位置又大量恢复

(Jin et al., 2003)。大脑中各个脑区的 MT1 与 MT2 两种受体有明显差异。下丘脑作为睡眠调控中枢，主要以 MT2 受体表达为主 (Pandi-Perumal et al., 2008)。而视交叉上核主要表达 MT1 受体，MT2 只有少量表达。此外海马中以 MT2 的表达为主，仅在齿状回和 CA2 脑区中能观察到少量 MT1 受体的分布 (Klosen et al., 2019)。

3.4.2 褪黑激素与微生物-肠-脑轴

每个生命作为一个整体，通常局部的变化并不仅仅限于局部内部变化，而是通过循环系统与全身共进退。褪黑激素通过松果体分泌后进入血液在全身循环。除了上述提到的 Mel 的直接作用（受体导向），Mel 也能通过调控外周组织发挥间接作用。比如肠道分泌的 Mel 具有显著的抗菌作用，包括防止细菌感染造成的损害。例如，Mel 在体外对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有抗菌作用，涉及铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和金黄色葡萄球菌 (Tekbas et al., 2008)。在哺乳动物中，一些报告已经证明 Mel 在保护或减轻细菌感染方面有实质性的作用。在感染金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的小鼠中，Mel 能强烈减轻症状 (Bishayi et al., 2016)。从生物特性来说，Mel 是水溶性和脂溶性的，可以通过所有的细胞屏障，包括细胞膜和血脑屏障，Mel 可能是来自共生微生物的内分泌传递信号，并可能作为对宿主作出反应的“有机体”通过这些手段 (He et al., 2021)，Mel 可以影响微生物的分子时钟，调节微生物代谢产物的节奏，还可以影响宿主的免疫功能因此，在确定的微生物代谢途径中靶向 Mel，然后改变代谢产物的节奏和输出，以改善宿主神经系统的疾病。

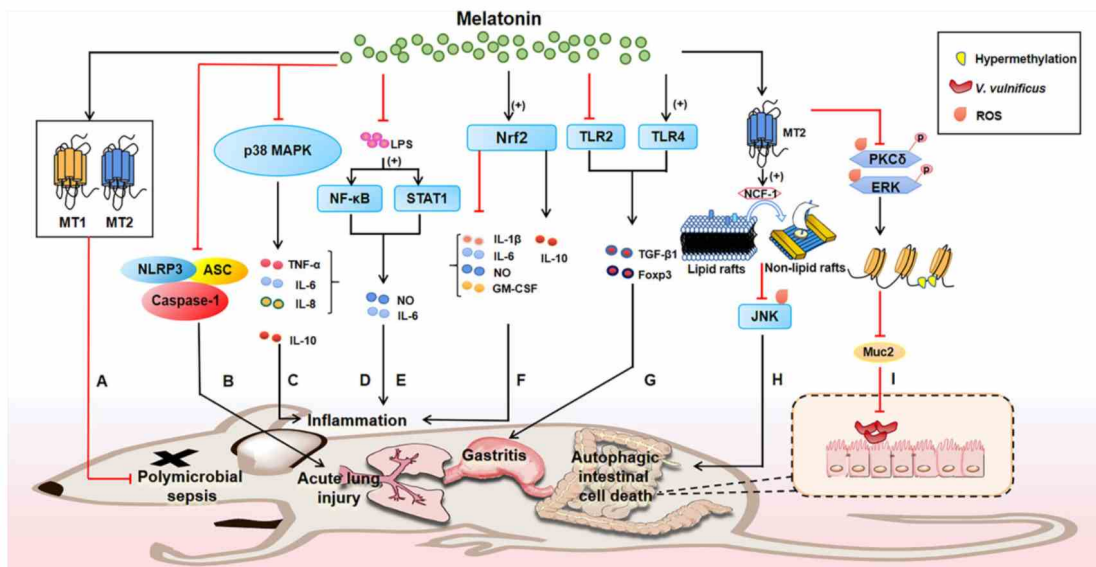


图 1-4 褪黑素在动物体内的抑菌机制

褪黑素通过不同途径与微生物发生作用，包括膜受体途径（MT1 和 MT2），MAPK 信号通路，NF-κB 信号通路，NRF2 信号通路和 TLRs 受体家族等。红线代表抑制，黑色箭头表示激活（Fang et al., 2021）。

Fig. 1-4 The possible bacteriostatic mechanisms of melatonin in vitro.

Melatonin interacts with microorganisms through different pathways, including membrane receptor pathway (MT1 and MT2), MAPK signaling pathway, NF-κB signaling pathway, NRF2 signaling pathway and TLRs receptor family. The red line represents suppression and the black arrow represents activation (Fang et al., 2021).

3.4.2.1 微生物-肠-脑轴

肠道菌群与大脑之间的双向沟通在维持胃肠道、大脑和菌群的稳态中有重要作用。肠道微生物的改变能通过不同的途径对大脑造成影响，反之亦然（Agirman and Hsiao, 2021）。目前简单来说，肠道菌群-脑轴主要包括 3 条互作途径（Mayer et al., 2022）：化学信号：菌群可通过短链脂肪酸、脂多糖和色氨酸等代谢物，作用于神经内分泌系统，调节 γ -氨基丁酸（ γ -aminobutyric acid, GABA）和五羟色胺（Serotonin, 5-HT 等神经递质浓度，直接或间接的影响神经系统；神经途径：肠道菌群及其代谢物能作用于迷走神经和肠神经系统，影响大脑和行为；免疫系统：肠道菌群及其代谢物，能通过循环系统透过血脑屏障，直接作用于小胶质细胞，进而影响大脑内神经元的稳态（Nedham et al., 2020）。

BBB 在正常状态下能够调控特定大小的分子通过，这就意味着外周环境并不是

能随意的直接影响到大脑本身，那么首先需要自身能通过 BBB，或者能够影响 BBB 的通透性 (Carloni et al., 2021)。研究发现短链脂肪酸 (Short chain fatty acids, SCFAs) 作为小分子化合物能够穿过 BBB，直接或间接的作用于大脑中的神经元或神经胶质细胞；而微生物的胞壁成分之脂多糖 (Liposarcoma, LPS) 能够增加 BBB 的通透性，进入大脑实质中引起不良反应。那么具体来说，这些微生物胞壁成为或代谢产物对大脑的具体作用是什么？ (Jameson et al., 2020)。

3.4.2.2 短链脂肪酸

SCFAs 是信号分子，仅由肠道微生物通过膳食纤维发酵产生，因为人类缺乏消化纤维所需的酶 (Mills et al., 2019)。SCFAs 通过激活 FFA2、FFA3、GPR109A 和 Olfr78 受体作用于广泛的靶标，并涉及从神经可塑性到基因表达、食物摄入和免疫系统调节的生理过程 (Needham et al., 2021)。短链脂肪酸作用于靶细胞的途径并非只有受体途径，研究发现有特定的转运蛋白负责 SCFAs 进出细胞，主要包括两种转运体 (MCT1 和 SMCT1) (Silva et al., 2020)。在结肠组织，上皮细胞主要通过 MCT1 将细胞转运胞内，一部分 SCFAs 在细胞内进行能量供应，另一部分 SCFAs 穿过上皮细胞进入全身循环中。而对于大脑组织，研究认证 SCFAs 作为小分子物质是能够在生理水平穿过血脑屏障进入大脑实质中，而跨越血脑屏障的过程就得益与内皮细胞上广泛表达的转运 (MCT1 和 SMCT1) (Wenzel et al., 2020)。在大脑内，针对与神经元和神经胶质细胞上 SCFA 受体和转运体的表达情况目前仍存在疑问，但是目前已有研究发现神经元细胞上表达 GPR109A 受体，负责调控神经元的存活 (Dalile et al., 2019)。此外，有研究发现 MCT1 在大脑中是无处不在的，而 SMCT1 在大脑中多数表达与神经元上，但是具体的确实的证据需要更深入的研究。但不能否认的是 SCFAs 在调控大脑的结构和功能时，可能涉及了直接调控的机制。与非无菌 (Germ-free, GF) 小鼠相比，无菌小鼠具有更高水平的投射到脑干核的传入神经元的激活 (Muller et al., 2020)，并且向 GF 小鼠施用产生 SCFAs 的肠道微生物群会抑制这种激活，这表明健康的肠道微生物组可以抑制这种神经元信号通路。临床前和临床研究表明，SCFAs 的产生会刺激回肠中的细胞分泌饱腹感激素胰高血糖素样肽 1 (Glucagon like peptide-1, GLP-1) 并引起饱腹感行为变化 (Bäckhed et al., 2004)。丁酸盐下调肠道相关免疫系统中的基因表达 (Magnusson et al., 2020)，这表明产生 SCFAs 的细菌水平降低可能导致炎症增加。

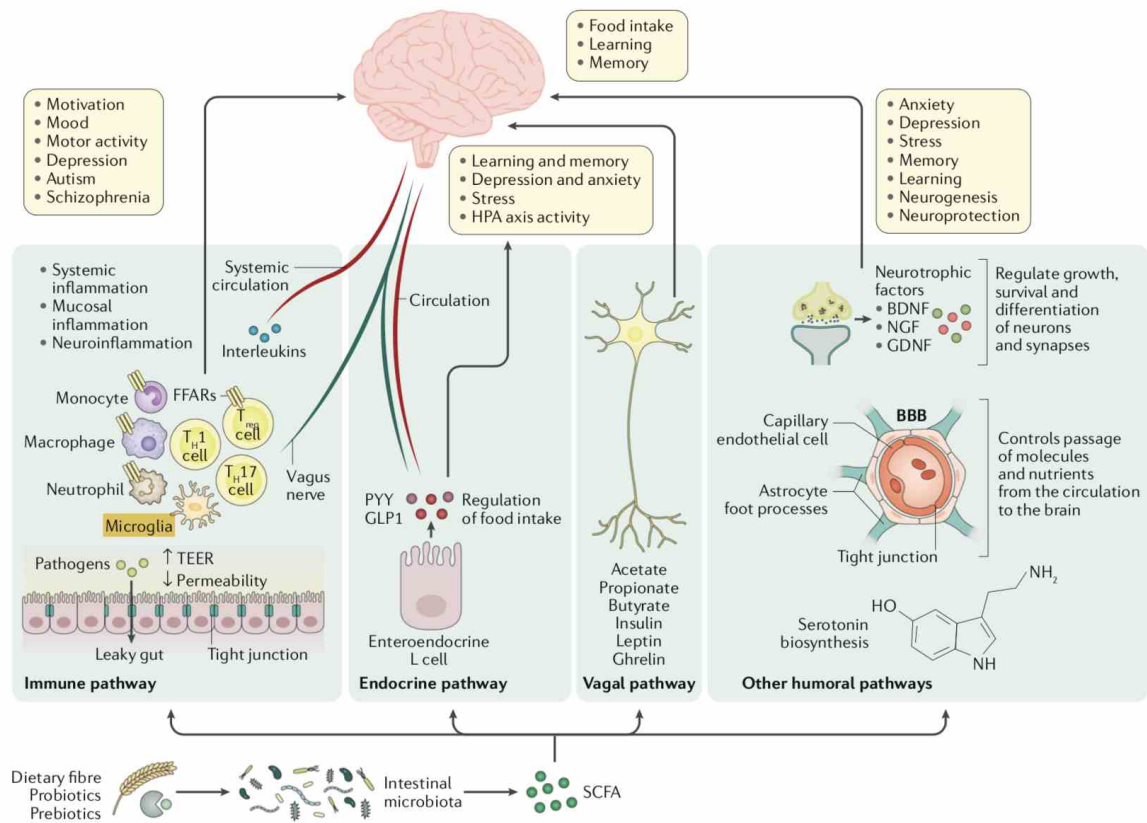


图 1-5 SCFAs 通过肠脑轴调节大脑功能的不同途径

SCFAs 可通过免疫、内分泌、迷走神经等体液途径直接或间接影响肠脑通讯和脑功能 (Boushra et al., 2020)。

Fig. 1-5 Potential gut-brain pathways through which SCFAs might modulate brain function.

SCFAs might influence gut-brain communication and brain function directly or indirectly through immune, endocrine, vagal and other humoral pathways (Boushra et al., 2020).

3.4.2.3 微生物胞壁成分

有证据表明,神经功能和行为可能受到肠道相关免疫系统的影响,而肠道相关免疫系统受肠道微生物的调节。肠道相关免疫系统的不当参与与几种神经系统疾病、神经退行性疾病和心理疾病的病理生理学 and 进展有关。微生物相关的分子模式,如 LPS、细菌脂蛋白和鞭毛蛋白等,通过激活 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)。TLR 在肠道微生物组改变和免疫系统稳态之间的分子通讯中发挥重要作用 (Rogier et al., 2015)。一旦被激活,肠道相关免疫细胞会产生促炎细胞因子 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α),它们可以通过扩散或细胞因子转运蛋白穿过 BBB 到达大脑。一旦它们到达大脑,这些细胞因子就会作用于小胶质细胞上的受体,并刺激细胞因子的进一步释放和神经元功能的调节 (Agirman et al., 2021)。肠道中释放的细胞因子也可以局部作用

于迷走神经传入的细胞因子受体，导致肠脑轴信号传导的改变。将各种细胞因子引入外周介导疾病行为，使用抗炎细胞因子（例如 IGF-1、IL-10）治疗可以预防这些影响（Sampson and Mazmanian, 2015）。此外，生命早期微生物群的改变会增加生命后期发生免疫疾病的风险。这一发现表明，肠道微生物群维持和早期获得过程的微小变化可能使个体在成年期易患与压力相关的疾病（Mueller et al., 2015）。

4. 本研究的目的及意义

睡眠不足与认知障碍之间的关系目前已经得到了众多研究的证实，但是针对睡眠如何引起的认知障碍尚不清楚，靶向促进睡眠的药物以及靶向改善认知损伤的药物由于耐药性或用药剂量等问题，都不能作为有效的药物来缓解睡眠不足导致的认知损伤。而 Mel 一方面作为机体内在可合成的激素，对机体的副作用小；另一方面，Mel 能通过调节菌群代谢，昼夜节律和炎症反应发挥改善作用，此外，Mel 可与全身多个组织细胞建立联系，具有潜力通过几种不同途径去治疗神经系统疾病。然而，其中的机制尚不清楚。因此，本研究旨在建立一个急性 SD 模型，并添加外源性 Mel 探讨其对急性 SD 诱导认知障碍的保护作用及其作用机制；并利用粪菌移植与抗生素处理试验探讨肠道菌群在 Mel 改善急性 SD 诱导记忆损伤中的介导作用；并利用体外试验，探明 Mel 及肠道菌群代谢产物对急性 SD 诱导神经元丢失中的直接作用途径和间接作用途径，为治疗睡眠不足诱导认知功能障碍提供理论依据和新的研发思路。

5. 研究的目标与内容

5.1 研究目标

采用改良多平台水箱建立连续 72h 的 SD 模型，检测急性 SD 对小鼠认知功能及海马神经元的影响；同时通过粪菌移植试验和抗生素处理试验评估肠道菌群在急性 SD 诱导记忆损伤中的作用；进一步通过外源性补充 Mel，检测 Mel 在急性 SD 诱导记忆损伤中的保护作用。通过检测 Mel 膜受体及其信号通路的变化探究 Mel 改善急性 SD 引起海马神经元丢失的直接作用机制；并通过建立 *Aeromonas veronii* 定植模型，LPS 处理模型以及给予急性 SD 小鼠补充丁酸的试验探究 Mel 改善急性 SD 引起海马神经元丢失的间接作用机制。

5.2 研究内容

1. 急性睡眠剥夺诱导认知功能障碍的模型建立及褪黑激素的干预作用；
2. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导海马神经元丢失和小鼠认知障碍的直接作用

途径；

3. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导海马神经元丢失和小鼠认知障碍的间接作用

途径；

(1) 肠道菌群介导褪黑激素对急性睡眠剥夺诱导小鼠认知障碍的改善作用；

(2) 褪黑激素通过抑制 *Aeromonas* 的代谢产物 LPS 与小胶质细胞的互作改善急性睡眠剥夺诱导的认知障碍；

(3) 褪黑激素通过上调 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸含量改善急性睡眠剥夺诱导的认知障碍。

第二章 急性睡眠剥夺诱导认知功能障碍的模型建立及褪黑激素的干预作用

1. 褪黑激素对急性睡眠剥夺小鼠应激激素和褪黑激素水平的影响

1.1 引言

众所周知，睡眠整整占据了我們全部生命的三分之一，是一个重要且必要的生理过程，通过睡眠能使机体达到消除疲劳，恢复体力和精力，提高工作效率的目的。但是在时间即是生命的社会现状下，人们对睡眠的重要性仍旧缺乏足够的认识和重视。在当今快节奏的社会，大多数人由于连续或轮班工作而经历了某种程度的急性或慢性的SD (Seton and Fitzgerald, 2021; Troynikov et al., 2018)，因此睡眠不足问题已经成为威胁社会公众健康的突出问题。大量的研究表明睡眠障碍对于中枢神经系统、学习记忆能力、胃肠道黏膜免疫功能、内分泌、能量代谢过程以及心血管系统等方面具有重要影响，尤其中枢神经系统疾病中，睡眠障碍与癫痫、帕金森、阿尔兹海默症及偏头痛等疾病密切相关 (Tobaldini et al., 2017)。动物对急性应激的反应很大程度上由HPA轴控制，HPA轴的失调表现在应激后血浆CORT浓度的升高 (Brown, 2019)。血浆NE的浓度也能反应交感神经面对应激时的程度。根据缺失睡眠的时间长短，睡眠不足的模型能够分为慢性睡眠限制模型和急性SD模型，虽然慢性睡眠限制是对大多数人群和动物日常作息的模仿，但是仍然有很多人面临急性的睡眠缺乏现象，比如作战军人和轮班工人等，因此我们迫切需要建立一个急性SD模型来探讨急性睡眠缺失对机体的影响。

睡眠是一项具有昼夜节律的机体行为，而Mel是松果体分泌的具有昼夜节律的内源性激素，其合成受到了限速酶AANAT的影响，血浆Mel的含量与松果体中AANAT酶的含量呈正相关 (Dubocovich and Markowska, 2005)。褪黑激素能够影响机体多种生理功能包括睡眠、昼夜节律、免疫功能、氧化应激。但是Mel的补充能否改善急性SD诱导的认知功能障碍尚不清楚。

因此我们采用8周龄ICR雄性小鼠建立了急性SD模型，并给于急性SD小鼠分别补充20 mg/kg或40 mg/kg的Mel，通过检测血浆中两种应激激素水平 (CORT和NE) 判断急性SD是否引起机体应激；通过检测血浆Mel的变化探讨急性SD对Mel的影响；并通过检测松果体内Aanat的相对表达探讨急性SD与Mel合成之间的关系。

1.2 材料与amp;方法

1.2.1 试验动物与处理

8 周龄雄性小鼠 60 只 (ICR, 维通利华, 北京) 饲养于 10 个鼠笼 (6 只/笼), 小鼠体重为 28~34 g, 温度为 21 °C, 相对湿度为 50 ±10%, 光照制度为光暗比 14:10 (每天上午 7:00 开始给光)。小鼠可自由采食与饮水。所有的小鼠在适应一周之后, 随机等分为 5 个组: 空白对照组 (CON)、睡眠剥夺组 (SD)、睡眠剥夺+20 mg/kg 褪黑激素干预组 (SD+L-Mel)、睡眠剥夺+40 mg/kg 褪黑激素干预组 (SD+H-Mel) 与 20 mg/kg 褪黑激素添加组 (Mel)。

使用改良后的多平台水箱装置从早上 8:00 开始对 SD 小鼠进行连续 72h 的 SD。水箱中放置 18 个水平台, 水箱中的水加至离平台顶部 4 cm 处。将每组的 12 只小鼠放入一个水箱中, 每只小鼠站立于一个平台, 并可通过跳跃移动至其他平台。当小鼠进入快速眼动睡眠时期, 小鼠会因肌肉松弛掉入水中, 并随即清醒过来并迅速爬上平台以防淹死, 基于此使小鼠持续处于清醒状态。整个试验过程中, 每日换水使水箱中的水保持干净。

基于前人研究和我们的前期研究基础, 我们首先将 Mel 溶于 20 μL 的无水乙醇中, 并根据每只小鼠 40 g 体重配制成最后的使用浓度, 稀释在 0.1 mL 的生理盐水中通过腹腔注射给予小鼠补充 Mel。CON 组小鼠等量腹腔注射酶溶剂 (20 μL 的无水乙醇稀释于 0.1 mL 的生理盐水); SD 组、SD+L-Mel 组和 SD+H-Mel 组小鼠在每日早上 8:00 连续进行 72 h 睡眠剥夺; SD+L-Mel 组和 Mel 组小鼠在每日早上 7:00 连续 3 d 腹腔注射 20 mg/kg, SD+H-Mel 组小鼠腹腔注射 40 mg/kg 的 Mel。所有的试验操作均符合中国农业大学农业研究机构的动物福利组织编写的试验动物的护理和使用指南 (批准文号为 CAU20170911-2)。

1.2.2 试验动物的取材

60 只小鼠在连续 72 h 的 SD 后于早上 8:00 进行取材, 采用 1%的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉, 并立即摘除眼球, 进行眼眶采血, 并在采集的血液 (1.5 mL 左右) 中加入 50 μL 的肝素钠溶液 (1%), 充分混匀, 在 2000 rpm、4 °C 条件下放入离心机中离心 10 min, 随后收集血浆用于 ELISA 检测。小鼠断颈处死。收集小鼠的松果体组织并立即放入液氮速冻半小时再转移至-80 °C 冰箱用于 qRT-PCR 检测。

1.2.3 主要仪器设备

YP1200 电子天平 (上海第二天平仪器厂)、高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、荧光定量 PCR 仪 (LightCycler®480, RocheAppliedScience, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上海)、电热

鼓风干燥箱（101-A，北京市永光明医疗仪器厂，中国）、脑立体定位仪、镊子、手术剪刀、手术刀柄和刀片。

1.2.4 试验药品及试剂

2%戊巴比妥钠溶液、1%肝素钠溶液、TRNzol Reagent TRIzol 总 RNA 提取试剂（CW0580A，康为世纪生物技术有限公司，江苏）、反转录试剂盒（Thermo Fisher Scientific, Boston, USA）、无菌生理盐水、75%医用酒精、小鼠褪黑激素（CEA908Ge）、皮质酮（CEA540Ge）和去甲肾上腺素（CEA908Ge）ELISA 试剂盒均购于武汉云克隆科技股份有限公司、褪黑激素（M5250;sigma）。

1.2.5 酶联免疫吸附试验测定血浆中 NE 含量

将采集的小鼠血浆进行酶联免疫吸附试验，检测不同组间 NE 的含量。所有的试验步骤严格按照试验说明书进行。批内差小于 10%，批间差小于 12%，检测限为 25.5 pg/mL。每组中包含 5 个血浆样品，每个样品重复 3 次。

（1）试剂准备：进行试验前将所有药品和样本放在室温环境下。

（2）标准品的准备：将 1 mL 标准品稀释液加入标准品瓶中，室温静置 10 min，其浓度为 5000 pg/mL。准备 5 个 1.5 mL 的 EP 管用于标准品的稀释，将 600 μ L 的标准品稀释液加入每个 EP 管中，依次稀释成 5000 pg/mL, 1666.7 pg/mL, 555.6 pg/mL, 185.2 pg/mL, 61.7 pg/mL，标准品稀释液（0 pg/mL）直接作为空白孔。

（3）加入样品：分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设置 5 个标准孔，按照梯度加入标准品，空白孔中加入 50 μ L 标准品稀释液，余孔加待测样品 50 μ L，然后立即每孔加检测溶液 A 工作液 50 μ L，缓慢晃匀，注意过程中不要有气泡，将覆膜盖上酶标板，37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。

（4）洗涤：在反应结束后，将酶标板中的液体倒掉，并在每孔中入 350 μ L 的洗液并浸泡 1-2 min 进行洗涤，随后将酶标板倒扣于吸水纸上并轻轻拍打以彻底移除孔内洗涤液。此操作重复 3 次。洗涤完最后 1 次后，充分倒掉孔内的清洗液。

（5）加工作液：将配置好的检测工作液 B 按照 100 μ L 加入每孔中，盖上覆膜后放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 30 min。

（6）洗涤：与步骤 4 相同，倒掉酶标板内的液体后进行洗涤，共洗涤 3 次。

（7）加底物溶液：洗涤结束后向每个孔中加入 90 μ L 的底物溶液，盖上覆膜后放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中避光显色，显色时间控制在 10-20 min 内，总反应时间不可超过 30 min。当标准孔的后 3 孔出现较为明显的梯度蓝色时可终止反应。

（8）加终止液：向每孔中加入 50 μ L 的终止液，终止反应，孔中液体立即由蓝

色转为黄色。添加终止液的顺序须和加入底物液体的顺序一致。加入液体后可轻轻晃动酶标板促进液体充分混匀。

(9) 读数：将酶标板放置于酶标仪中，在 450 nm 的波长下进行读数，在检测前注意孔内无气泡避免影响最终数据，立即测量每孔的 OD 值。

(10) 结果分析：利用标准品与样本的 OD 值作图并计算各样品浓度。标准品的浓度为纵坐标，OD 值为横坐标绘制标准曲线并得出公式，将各样品的 OD 值代入该公式中，得出样品的浓度，若样品稀释，则乘以稀释倍数，得数即为实际浓度。

1.2.6 酶联免疫吸附试验测定血浆中 Mel 含量

将采集的小鼠血浆进行酶联免疫吸附试验，检测不同组间 Mel 的含量。所有的试验步骤严格按照试验说明书进行。批内差小于 10%，批间差小于 12%，检测限为 4.94 pg/mL。每组中包含 5 个血浆样品，每个样品重复 3 次。

(1) 标准品的制备：将 1 mL 标准品稀释液加入标准品瓶中，室温静置 10 min，其浓度为 2000 pg/mL。准备 5 个 1.5 mL 的 EP 管用于标准品的稀释，将 600 μ L 的标准品稀释液加入每个 EP 管中，依次 3 倍稀释成 1000 pg/mL, 333.33 pg/mL, 111.11 pg/mL, 37.04 pg/mL, 12.35 pg/mL，标准品稀释液（0 pg/mL）直接作为空白孔。

(2) - (10) 同第二章 1.2.5 的试验步骤

1.2.7 酶联免疫吸附试验测定血浆中 CORT 含量

将采集的小鼠血浆进行酶联免疫吸附试验，检测不同组的 CORT 的含量。所有的试验步骤严格按照试验说明书进行。批内差小于 10%，批间差小于 12%，检测限为 2.60 ng/mL。每组中包含 5 个血浆样品，每个样品重复 3 次。

(1) 标准品的制备：将 1 mL 标准品稀释液加入标准品瓶中，室温静置 10 min，其浓度为 500 ng/mL。准备 5 个 1.5 mL 的 EP 管用于标准品的稀释，将 600 μ L 的标准品稀释液加入每个 EP 管中，依次 3 倍稀释成 500 ng/mL, 166.67 ng/mL, 55.56 ng/mL, 18.52 ng/mL, 6.17 ng/mL，标准品稀释液（0 ng/mL）直接作为空白孔。

(2) - (10) 同第二章 1.2.5 的试验步骤。

1.2.8 松果体 *Aanat* 基因的 qRT-PCR

1.2.8.1 松果体总 RNA 的提取

(1) 将小鼠松果体组织从 -80 °C 冰箱取出，置于含 0.5 mL TRIzol 的无 RNA 酶 EP 管中，并放入组织匀浆机中震荡至研磨充分，室温静置 5 min；

- (2) 加入 0.2 mL 氯仿后盖紧 EP 管盖, 将离心管剧烈震荡 15 s, 室温静置 3 min;
- (3) EP 管放入低温高速离心机在 4 °C, 12000 rpm 条件下离心 15 min;
- (4) 将上层水相小心吸入新的无 RNA 酶 EP 管, 并加入 0.5 mL 异丙醇, 再次剧烈振荡使其充分混匀, 于室温中静置 10 min;
- (5) EP 管放入低温高速离心机在 4 °C, 12000 rpm 条件下离心 15 min;
- (6) 将上清液吸取弃去, 加入 1 mL 75 %乙醇, 涡旋混匀, 洗涤 RNA; 然后在 4 °C, 12000 rpm 条件下离心 5min, 重复 2 次;
- (7) 将上清液小心吸取弃去, 尽量保持干燥。

1.2.8.2 松果体总 RNA 的反转录

提取的总 RNA 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录为 cDNA。

(1) A 体系:

RNA	1.2 μg
oligo (dt18) primer	1 μL
Nuclease-free water	补齐 12 μL

将以上体系混匀, 离心, 置于 PCR 仪 (T-Gradient Thermoblock, Biometra) 中, 65 °C, 反应 5 min, 取出后冰浴 5 min, 待用。

(2) B 体系:

5×Reaction Buffer	4 μL
Ribolock RNase Inhibitor	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
RvertAid M-MuLV Reverse Transcriptase.	1 μL

将 A 和 B 体系混合后轻微离心, 置于 PCR 仪中, 42 °C, 60 min, 70 °C, 5 min。冷却至室温, 置于 -20 °C 保存备用。

1.2.8.3 松果体 AANAT 基因的 qRT-PCR

将上述反转录后的 cDNA 进行 qRT-PCR, 每个样品为 3 个重复总体积为 20 μL 总体。体系如下:

表 2-1 qRT-PCR 反应体系

Tab. 2-1 qRT-PCR reaction system.

添加成分	剂量
2×T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)	10.0 μL
引物 F (10 μM)	0.4 μL
引物 R (10 μM)	0.4 μL
模板 cDNA (3 ng/ μL)	2.0 μL
ddH ₂ O 补齐	7.2 μL
总体积	20.0 μL

将以上体系加入 96 孔板，轻微离心，置于 Real-time PCR 仪，按如下程序扩增：预变性 95 °C 10 min；变性 95 °C 10 s；退火 58 °C 30 s；延伸 72 °C 30 s，变性、退火、延伸为一个循环，共 40 个循环。

表 2-2 qRT-PCR 反应引物序列信息 (AANAT)

Tab. 2-2 qRT-PCR reaction system primer sequence (AANAT).

Gene name	Primer Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Accession No.
<i>Aanat</i>	F: TGAGCGGGAAGCCTTTATCTC	169 bp	XM_034667640.1
	R: CTCCTGAGTAAGTCTCTCCTTGT		
<i>Gapdh</i>	F: CCGAGAATGGGAAGCTTGTC	228 bp	XM_036165840.1
	R: TTCTCGTGGTTCACCCATC		

Real-time PCR 以 *Gapdh* 为内参，目的基因的相对表达量为目的基因 mRNA 水平 / *Gapdh* mRNA 水平。F = forward primer; R = reverse primer.

1.2.9 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM)。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

1.3 结果

1.3.1 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠血浆应激激素和 Mel 水平的影响

应激激素水平的改变能够反应机体是否处于应激状态。在不同处理组间，我们采用 ELISA 的方法检测小鼠血浆应激激素的水平 (NE 和 CORT)。结果显示与对照组

相比，急性 SD 小鼠血浆 NE 和 CORT 含量分别增加了 55.7% ($P = 0.001$ ，图 2-1A) 与 51.8% ($P = 0.001$ ，图 2-1B)，此外血浆 Mel 水平显著降低了 48.9% ($P = 0.035$ ，图 2-1C)。然而，给予急性 SD 小鼠 20 和 40 mg/kg Mel 干预之后，与急性 SD 小鼠相比，血浆中 Mel 含量显著上调了 45.6%~47.2% ($P = 0.008 - 0.012$)，而 NE 和 CORT 的水平显著下降了 44.4%~45.1% ($P = 0.007 \sim 0.008$) 与 34.1%~51.8% ($P = 0.001 \sim 0.003$) (图 2-1 A-C)。

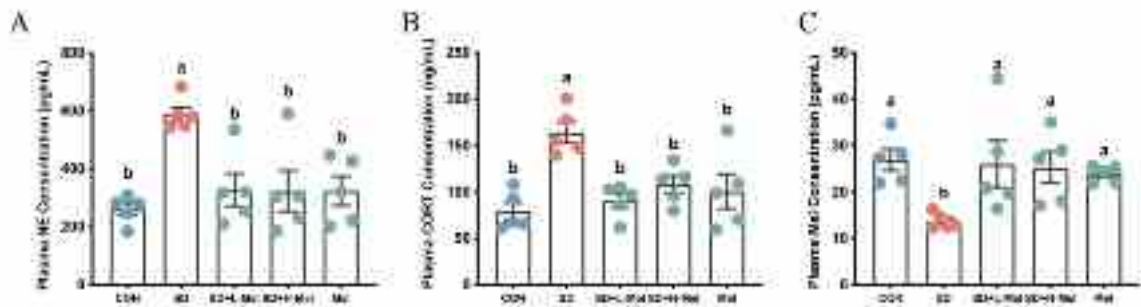


图 2-1 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠血浆中 NE、CORT 和 Mel 含量的影响

(A) NE, (B) CORT, (C) Mel. CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组; Mel: 单独褪黑激素 (20 mg/kg) 添加组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；有相同字母的值差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-1 The effects of acute SD and Mel supplementation on NE, CORT and Mel levels in plasma of mice.

(A) NE, (B) CORT, (C) Mel. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group, Mel: melatonin (20 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.2 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠松果体 *Aanat* 基因的影响

AANAT 是 Mel 生物合成途径中关键的限速酶，血浆中的 Mel 主要来源于松果体的合成分泌。为了进一步验证急性 SD 及 Mel 对小鼠血浆 Mel 含量的影响，我们利用 qRT-PCR 的方法检测了松果体中 *Aanat* 酶的基因表达情况。结果显示，与对照组相比，急性 SD 小鼠松果体 *Aanat* 的 mRNA 水平显著降低了 90.1% ($P = 0.001$ ，图 2-2A)，而当给予急性 SD 小鼠腹腔注射 20 与 40 mg/kg Mel 之后，与急性 SD 小鼠相比，*Aanat* 基因的表达水平无明显变化。

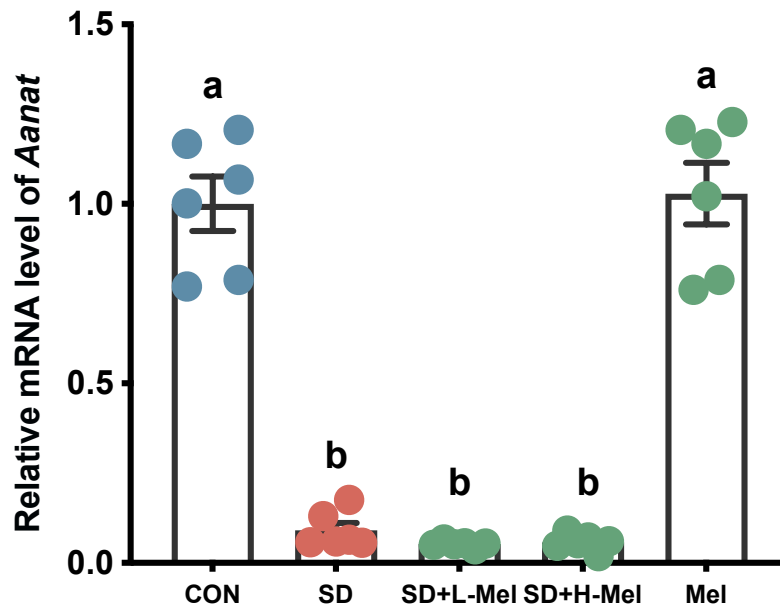


图 2-2 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠松果体 *Aanat* 基因 mRNA 表达的影响

CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组, Mel: 单独褪黑激素 (20 mg/kg) 添加组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-2 The effects of acute SD and Mel supplementation on the mRNA expression levels of *Aanat* gene of pineal gland in mice.

CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group, Mel: melatonin (20 mg/kg) supplement group. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.4 讨论

根据 SD 发生的缓急可分为急性 SD 和慢性 SD, 不同的 SD 能够从不同方面引起具有差异的后果。本研究建立了连续 72 小时的 SD 模型, 用以模仿在工作中需长时间高强度保持不睡眠状态的人群, 比如轮班的护士, 航天工作人员以及远距离作战军人等 (Hall et al., 2017)。该模型的建立能够为探讨急性睡眠与健康状态的关系提供有力的理论依据。在连续 72h 的急性 SD 后, 我们观察到急性 SD 小鼠 HPA 轴的激活, 表现为血浆 CORT 和 NE 水平的显著升高。同样在啮齿动物模型中, 睡眠剥夺能够引起大鼠血浆 CORT 的增加 (Hairston et al., 2001)。而在人类中, 缺乏睡眠时的血浆 CORT 水平明显高于睡眠充足时的 CORT 水平 (Raven et al., 2019)。机体处于应激状

态会激活神经内分泌轴，通常导致肾上腺内肾上腺素和糖皮质激素的全身释放，以及直接刺激交感神经支配的局部释放 NE。由上可以得出，本研究成功建立了急性 SD 的小鼠应激模型。

睡眠是一项具有昼夜节律的生理性活动，睡眠的紊乱势必通过昼夜节律影响 Mel 的合成和分泌。我们在急性 SD 小鼠血浆中检测到显著低于正常小鼠的 Mel 水平，可见在连续不睡眠的情况下 Mel 的水平会受到抑制。进一步我们观察到急性 SD 小鼠松果体 *Aanat* 的相对表达与 Mel 的变化相似。因此我们推测急性 SD 通过抑制松果体 Mel 的合成从而降低血浆 Mel 的含量。进一步我们给予急性 SD 小鼠补充外源性的 Mel。有趣的是，外源性 Mel 的补充逆转了急性 SD 诱导的上述变化，包括应激激素的升高和 Mel 的降低，但是对松果体 *Aanat* 的基因表达没有影响，

1.5 小结

本研究建立了 Mel 干预的急性 SD 小鼠模型，结果显示急性 SD 能够降低松果体 *Aanat* 的基因表达，从而抑制 Mel 的含量并增加应激激素的含量。而外源性 Mel 的补充能有效的逆转急性 SD 诱导的 Mel 的降低和应激激素水平的升高。

2. 褪黑激素对急性睡眠剥夺小鼠认知功能的影响

2.1 引言

认知是大脑基于外界信息进行加工并处理后转化为内在的心理活动，从而获得理论知识并将其应用的过程。认知功能障碍主要指各种原因导致的不同程度的认知功能减退，表现为记忆、情绪和运动等认知功能的一项或多项受损 (Culpepper et al., 2017)。在其中，空间记忆能够一定程度的反映认知功能状态，空间记忆具有短期和长期记忆的表现形式。前者用空间工作记忆表示，该系统用于在短时间间隔内临时存储、维护和操作空间信息；另一方面，空间参考记忆是指经过整合并长期保持的空间信息 (Schultheis, 2021)。空间工作记忆通常使用人类的 corsi 块敲击测试和交替任务 (如啮齿动物的 Y 迷宫) 进行评估。空间参考记忆可以通过水迷宫进行评估，例如啮齿类动物的 Morris 水迷宫和人类的虚拟现实环境。Morris 水迷宫用于评估啮齿动物的海马空间学习和记忆能力 (Vorhees and Williams, 2006)，在评估与年龄相关的认知下降、海马结构损伤和药物对空间记忆的影响中具有重要作用，并且对海马功能障碍特别敏感，表现为背侧区域有病变的啮齿动物行为受损。在整个试验过程中，动物在正常情况下会逐渐找到到达水下平台的更快路线，部分是通过使用视觉和其他外部线索。在这个过程中，它形成了空间参考记忆，量化为减少的逃逸潜伏期，或找到平台所需的时间，或当暴露的平台被移除时在正确象限中增加的搜索。Y 迷宫被广泛应用于空间

工作记忆领域 (Heredia-López et al., 2016), 啮齿动物具有探索新奇环境的天性, 并且动物在每次转换探索方向时都会记住之前探索过的方向, 因此 Y 型迷宫实验能够有效的测定动物的空间工作能力。旷场实验也叫敞箱实验 (Kraeuter et al., 2019), 可以检测小鼠自发活动行为和探索行为, 用于评价动物在新奇环境中的自主性、探索性和紧张程度。比如动物由于对新奇开阔环境的恐惧, 它们倾向于在环境的周边活动, 而在中央区域的活动较少, 但动物具有探索天性, 它也倾向于探索中央区域, 由此可以观察啮齿动物的焦虑心理。在正常的生理过程中, 大脑会在睡眠时清理代谢废物, 促进突触的修复 (Underwood, 2013)。而调查发现随着人们年龄增长, 睡眠与痴呆之间会建立联系, 长期睡眠时间小于或等于 6 小时的中年人患痴呆症的风险会增加 30% (Sabia et al., 2021)。那么急性 SD 会对小鼠的认知功能造成何种影响尚不清楚。作为松果体中分泌的吲哚类激素, Mel 与中枢神经系统间存在密切的关系。但是 Mel 在急性 SD 模型诱导下的认知损伤中是否发挥改善作用仍有待研究。因此本章的主要内容是通过多种行为学的检测, 来探讨 Mel 干预的急性 SD 模型下小鼠认知功能的变化。

2.2 材料与方法

2.2.1 试验动物的处理

40 只 8 周龄雄性 ICR 小鼠分为 5 组: CON 组、SD 组、SD+L-Mel 组、SD+H-Mel 组与 Mel 组, 所有组的试验操作同第二章第一节。

所有小鼠在适应 1 周后的第一天进行水迷宫试验的小鼠运动能力的筛选, 将有行为障碍的小鼠提前排除。然后进行为期 5 d 的水迷宫训练期, 训练期结束后进行连续 72 h 的急性 SD, 在剥夺结束后的次日 8 h 进行水迷宫的检测试验, 首先是在隐藏平台存在的时候检测小鼠到达平台的时间、距离和速度; 第 2 d 将水迷宫的隐藏平台去掉后检测小鼠穿越平台的次数和在目标平台停留的时间, 水迷宫 2 d 的检测期结束后进行 Y 迷宫和旷场试验的检测。

2.2.2 主要仪器设备

莫里斯水迷宫 (XR-XM101, 上海欣软, 中国)、Y 迷宫 (XR-XY1032, 上海欣软, 中国)、旷场 (XR-XM101, 上海欣软, 中国)、SuperMaze 动物行为学视频分析系统 (XR-Xmaze, 上海欣软, 中国)。

2.2.3 试验药品及试剂

褪黑激素 (M5250; Sigma)。

2.2.4 莫里斯水迷宫

小鼠水迷宫装置包括三部分：圆形水池、无色平台及摄影记录系统，水池直径为 120 cm，高 40 cm，水箱内壁涂成黑色，水箱中装满 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) 温水，并加入黑色无毒碳墨使其不透明。水箱被分为四个象限 (I、II、III 和 IV)。在象限 IV 的固定位置放置一个可移动的、隐藏的圆形平台，淹没在水面以下约 1 cm 的位置 (图 2-3 B)。

(1) 第 1 d 进行水迷宫适应性训练并筛选行动力一致的小鼠进行试验。适应期一周后，将所有小鼠置于无平台水池中 1 min，让其游泳。接下来的试验都在 8:00 上午进行。为了尽量减少应激对试验结果的影响，我们选择了没有任何刻板特征的行为和身体健康的小鼠进行进一步研究。

(2) 第 2-6 d 进入水迷宫训练期，为期 5 d，每只小鼠每天进行 4 次训练，分别从四个象限的位置将小鼠头朝池壁放入水中，注意放小鼠时动作轻柔，避免引起小鼠应激反应。然后给小鼠 60 s 的时间寻找水箱中的隐藏平台，如果 60 s 小鼠没有找到平台就人工将其引导至平台位置，并让小鼠在平台上停留 15 s。

(3) 第 7-9 d 将小鼠放入睡眠剥夺装置中进行连续 72 h 的急性 SD。

(4) 第 10 d 评估小鼠的学习能力。在急性 SD 结束后在平台存在的时候，将小鼠从平台所在位置的对角线放入水中，记录 60 s 内小鼠到达隐藏平台的逃避潜伏期、路径长度和路径速度。

(5) 第 11 d 评估小鼠的记忆能力。将水迷宫的平台撤除后，在原平台象限的对角线位置放入小鼠，并记录 60 s 时间内小鼠穿越目标象限的次数和在目标象限停留的时间。

试验总是在每天的同一时间和相同的环境条件下进行。使用计算机跟踪系统 (XR-XM101; 上海欣软信息技术有限公司)。

2.2.5 Y 迷宫

Y 迷宫装置 (高 20 cm，长 50 cm，底部宽 10 cm) 由黑色漆木制成，用于行为学分析。简单地说，将小鼠放在仪器的中心，并允许它们探索 8 min 的时间。目测观察各臂进入情况。自发交替行为百分比 (%) 被定义为小鼠在重叠的三连体集合上连续进入三臂的情况。自发交替行为百分比 (%) 计算为 $(\text{连续进入三个不同的臂}) / (\text{臂的总数} - 2) \times 100$ 。较高百分比的自发交替行为被认为是提高认知能力的指标，反之亦然。

2.2.6 旷场试验

旷场由一个 $100 \times 100 \text{ cm}$ 的正方形底面组成，底面被白色条纹分为 25 个 $20 \times 20 \text{ cm}$ 的小方格 (5×5)。正方形底面被细分为外围和中心区域，其中中心区域包括 9 个中心广场 (3×3)，外围区域包括靠近周围墙壁的 16 个正方形格子 (高为 20 cm)。每只小鼠被放置在中心区域，同时用摄像头记录 8 min 的行走轨迹。用软件分析小鼠在旷场中的总行走路程和旷场中央区停留时间比和中央区行走路程比。在每次测试之间，用 75%酒精擦拭清理旷场，去除小鼠气味标记，以免对后续小鼠的行为活动造成影响，干扰试验结果。

2.2.7 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM)。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

2.3 结果

2.3.1 Mel 对急性 SD 小鼠空间学习记忆能力的影响

水迷宫结果显示在第一天的试验中 (隐藏平台存在时)，与对照组相比，急性 SD 小鼠到达平台的时间和距离都显著增加了 140.1% ($P < 0.001$) 和 130% ($P = 0.001$) (图 2-3 F, G)。在第二天的测试中 (撤掉平台)，与对照组相比，急性 SD 小鼠在目标象限停留的时间和穿越平台的次数都显著降低了 63.6% ($P = 0.003$) 和 58.7% ($P < 0.001$) (图 2-3 C, D)。以上结果表明给予小鼠 SD 处理后能够引起小鼠空间记忆的损伤。然而，当外源性添加 20 与 40 mg/kg 的 Mel 之后，与急性 SD 小鼠相比，到达平台的时间和距离都显著降低了 54.0%~58.9% ($P = 0.001$) 和 50.9%~56.3% ($P = 0.001 \sim 0.005$)，在目标象限停留的时间和穿越平台的次数都显著增加了 103.2%~137.5% ($P = 0.02$) 和 108.3%~113.2% ($P = 0.005 \sim 0.008$) (图 2-3 C, D)。Mel 治疗组和 CON 组比较差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。各组间路径速度无显著差异 (图 2-3 H)。而给予健康小鼠单独的 Mel 补充对其学习和记忆能力没有影响。这些结果说明 Mel 能够改善急性 SD 导致的小鼠空间学习记忆损伤。

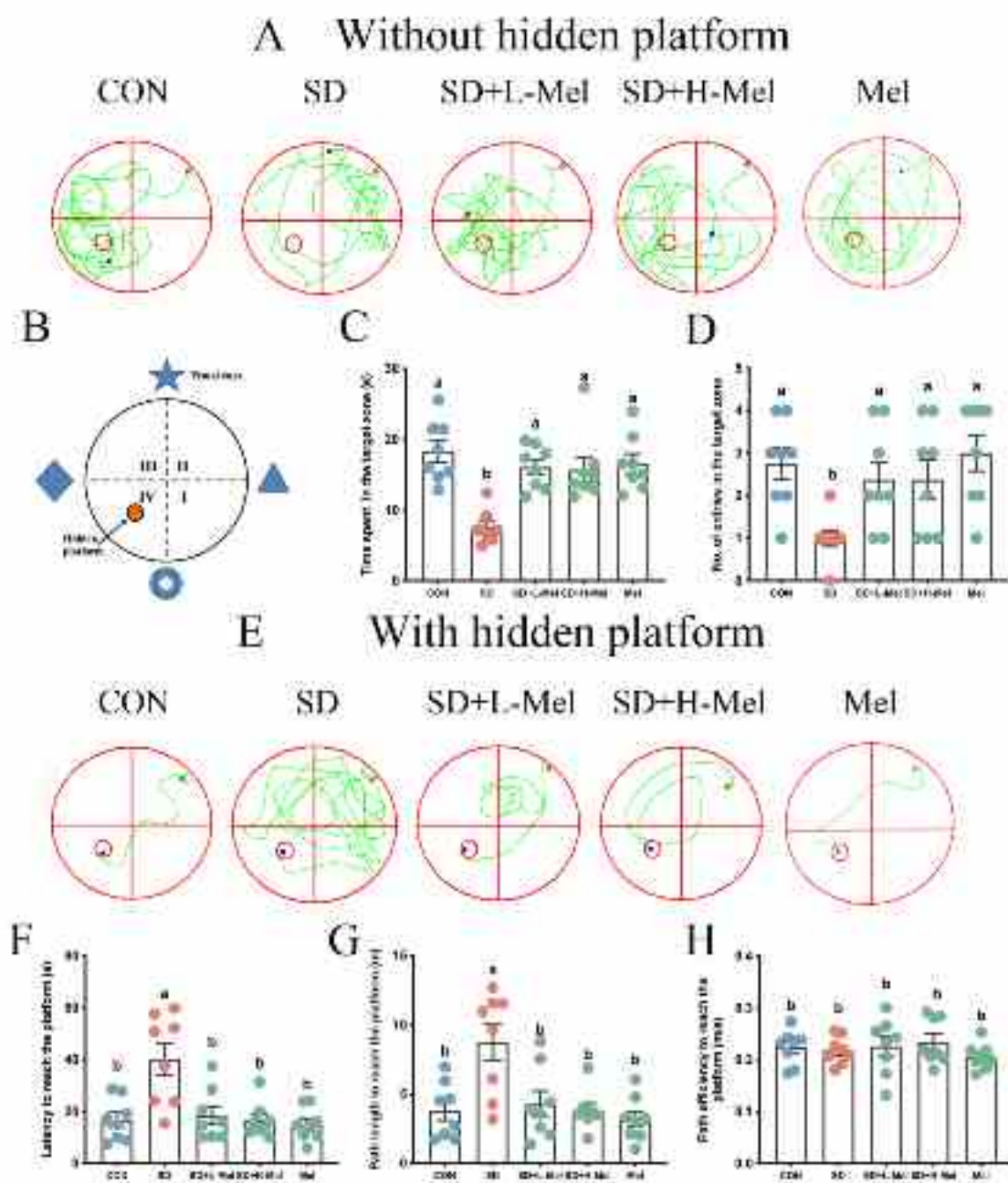


图 2-3 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠空间记忆能力的影响

(A) 空间记忆测试轨迹图 (隐藏平台不存在), (B) 莫里斯水迷宫示意图, (C) 在目标象限停留的时间, (D) 穿越目标象限的次数, (E) 空间记忆测试的轨迹图 (隐藏平台存在), (F) 到达平台的逃避潜伏期, (G) 到达平台的路径长度, (H) 到达平台的路径速度。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 Mel 干预组; Mel: 单独褪黑激素添加组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05); 同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 2-3 The effects of acute SD and Mel supplementation on the spatial memory ability in mice.

(A) Track plot of spatial memory test (without hidden platform), (B) Schematic of the Morris water maze, (C) Time spent in the target zone, (D) Number of entries into the target zone, (E) Track plot of spatial memory test (with hidden platform), (F) Latency to reach the platform, (G) Path length to reach the platform, (H) Path velocity to reach the platform. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group, Mel: melatonin (20 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.2 Mel 对急性 SD 小鼠短期工作记忆能力的影响

Y 水迷宫被用来评估啮齿动物短期工作记忆能力。结果显示与对照组相比，急性 SD 小鼠的自发交替行为百分比显著降低 21.8% ($P = 0.001$)，然而，当外源性添加 20 与 40 mg/kg 的 Mel 之后，与急性 SD 小鼠相比，自发交替行为百分比分别增加了 33.2% ($P = 0.001$) 和 19.8% ($P = 0.018$)，且该指标恢复至对照组的水平。而单独添加 Mel 组与对照组小鼠相比之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。以上结果表明 Mel 的补充能够改善急性 SD 导致的小鼠短期工作记忆的损伤。

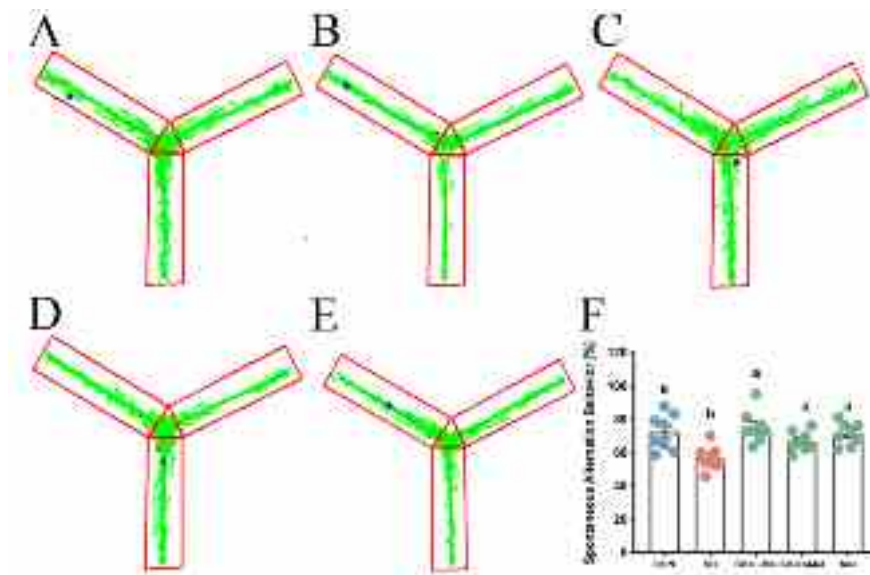


图 2-4 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠短期工作记忆能力的影响

(A) CON 组, (B) SD 组, (C) SD+L-Mel 组, (D) SD+H-Mel 组, (E) Mel 组, (F) 自发交替行为百分比。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组; Mel: 单独褪黑激素 (20 mg/kg) 添加组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-4 The effects of acute SD and Mel supplementation on the short-term working memory in mice.

(A) CON group, (B) SD group, (C) SD + L-Mel group, (D) SD + H-Mel group, (E) Mel group, (F) spontaneous alternation behavior (%). CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group, Mel: melatonin (20 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.3 Mel 对急性 SD 小鼠焦虑样行为的影响

OFT 测试被广泛用于评估焦虑样行为。为了评估 Mel 对急性 SD 引起的小鼠焦虑样行为的影响，我们进行了 OFT 测试，包括中央距离比，中央时间比和运动总路程。图 2-5 A 显示了小鼠在 OFT 测试中的运动路径图。结果显示与对照组相比，急性 SD 组的中央距离比和中央时间比分别显著降低 40.0% ($P = 0.001$, 图 2-5 B) 和 46.6% ($P = 0.003$, 图 2-5 C)。然而，给急性 SD 小鼠分别补充 20 和 40 mg/kg Mel 后，中央距离比的比率比 CON 组的小鼠显著升高了 57.1%~75.3% ($P = 0.001 \sim 0.009$, 图 2-5 B)，中央时间比显著升高了 81.1%~105.9% ($P = 0.000 \sim 0.006$, 图 2-5 C)。而 Mel 处理组和 CON 组之间的中央距离比和中央时间比无显著差异 ($P > 0.11$)。而给予健康小鼠单独的 Mel 补充对健康小鼠的中央距离（时间）比没有影响（图 2-5 B-C）。所有组之间的运动总距离没有显著差异（图 2-5 D）。这些结果表明 Mel 能够改善急性 SD 导致的小鼠焦虑样行为。

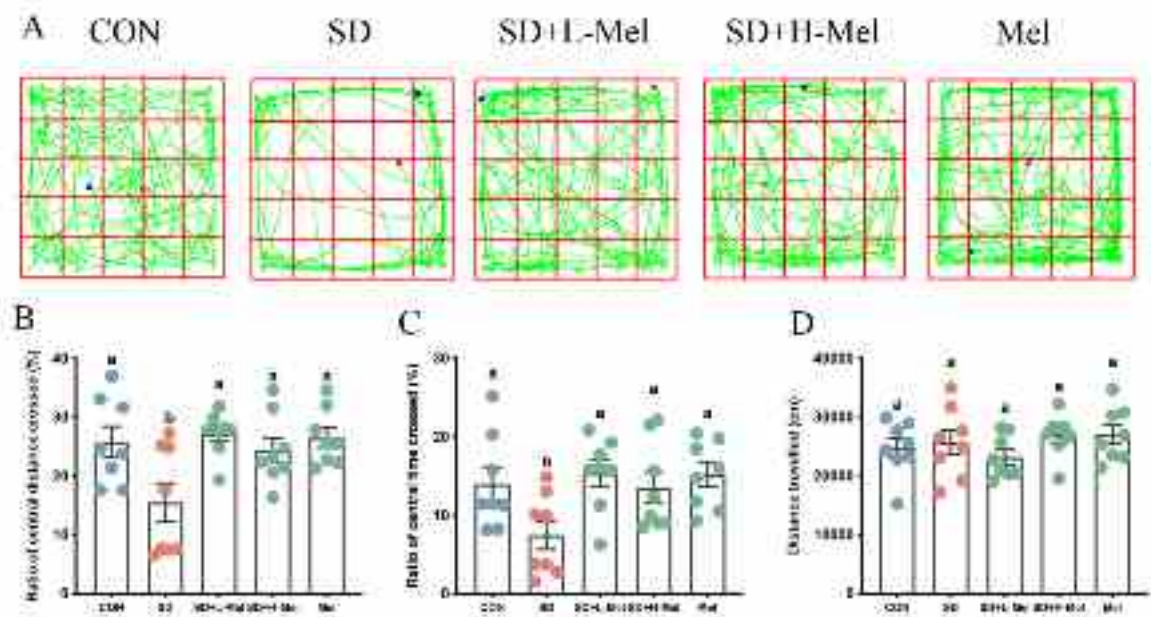


图 2-5 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠焦虑样行为的影响

(A) OFT 中的运动轨迹图, (B) 中央距离的比值 (%), (C) 中央时间的比值 (%), (D) 总的运动距离 (cm)。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组; Mel: 单独褪黑激素 (20 mg/kg) 添加组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-5 The effects of acute SD and Mel supplementation on the anxiety-like behavior in mice.

(A) Horizontal movement traces in the OFT, (B) Ratio of central distance crossed (%), (C) Ratio of central time crossed (%), (D) Distance travelled (cm). CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group, Mel: melatonin (20 mg/kg) supplement group. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.4 讨论

首先我们通过水迷宫试验检测了小鼠空间参考记忆, 在训练之后所有小鼠达到相同的训练结果并没有表现出运动障碍。72 h SD 后, 在隐藏平台存在的时候我们观察到急性 SD 小鼠较难寻找到平台的位置, 具体表现为寻找平台的时间和距离增加, 在此过程中每组小鼠的速度是一致的, 相似的速度表明小鼠的游泳能力没有差异, 而给予 Mel 处理的小鼠能很快的找到隐藏的平台。在将平台撤去后, 我们发现急性 SD 小鼠在水迷宫中处于漫无目的的游泳, 并且处于无目的的状态去寻找平台的位置, 这表明

其对平台存在的准确位置没有记忆。而 CON 组和 SD+Mel 组的小鼠多次在平台的位置寻找,表明其准确的记忆了平台的位置。与我们的研究相似,连续 48 h 的 SD 能够引起小鼠空间记忆的损伤 (Cao et al., 2019)。此外 Mel 的补充能改善东莨菪碱处理诱导的小鼠空间记忆能力的下降 (Muhammad et al., 2019)。

除了空间参考记忆,我们也采用了 Y 迷宫检测小鼠的空间工作记忆。自发交替行为百分比 (%) 被定义为小鼠在重叠的三连体集合上连续进入三臂的情况。自发交替行为百分比 (%) 计算为连续的三连组 (连续进入三个不同的臂)/臂的总数减去 2) $\times 100$ 。较高百分比的自发交替行为被认为是提高认知能力的指标,反之亦然。我们发现急性 SD 小鼠对三个臂的记忆情况较差,表现为自发交替行为比的降低。而 Mel 处理后的急性 SD 小鼠能够记忆上一个走过的臂,自发交替行为百分比也较急性 SD 组显著升高。研究发现 Mel 能够通过抑制氧化应激和神经炎症的发生,进而改善创伤性脑损伤诱导的空间工作记忆的损伤 (Rehman et al., 2019)。

我们通过 OFT 测试证明了急性 SD 小鼠的焦虑样行为 (Kraeuter et al., 2019)。通过这项试验,我们发现急性 SD 小鼠存在焦虑样行为,表现为中央区域时间百分比和距离百分比下降。这些结果与 CORT 和 Mel 水平的变化相一致。与我们的发现类似,24 h SD 导致 Y 迷宫测试中的空间记忆缺陷和 OFT 测试中的焦虑样行为 (Misrani et al., 2019)。然而,用 Mel 治疗的睡眠不足的老鼠在中心区域停留的时间明显更长。这些结果得到了先前研究的支持, Mel 可以预防神经系统的认知功能障碍和氧化分子损伤 (Alzoubi et al., 2016)。此外,单独注射 Mel 的小鼠表现出与对照组相似的行为变化。

因此,我们的结果显示,急性 SD 诱导小鼠空间参考记忆、空间工作记忆的损伤和焦虑样行为的发生。而 Mel 的补充能有效的缓解急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍。

2.5 小结

急性 SD 诱导了小鼠达到平台的时间和距离增加、自发交替行为比的降低和在中央区域停留时间的减少,表明小鼠空间参考记忆、空间工作记忆的损伤和焦虑样的行为。而 Mel 的外源性添加能有效的改善急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍。

3. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的海马神经元丢失

3.1 引言

大脑包含大约 1000 亿个神经元,每个神经元都有数千个突触连接。尽管单个神经元本身可以是复杂的信息处理单元,但通过突触连接能够使神经元之间产生特定的

回路,从而使各种大脑功能得以进行。海马是参与学习和记忆最重要的脑区之一,记忆形成是一个具有挑战性的过程,这一过程需要海马各个区域的神经元相互配合才能完成(Asok et al., 2019)。然而,多种外界因素会影响神经元的正常结构和功能,甚至导致神经元的死亡;又因为神经元是不可再生的,虽然目前研究发现海马的 DG 区存在神经发生现象,但是绝大部分的神经元是不可再生。这就意味着维持神经元的正常数量和功能对中枢神经系统至关重要。NeuN 是神经元特异核蛋白,在小脑、大脑皮层、海马体、丘脑和脊髓的神经元中表达。NeuN 能够定量反映的脑组织中神经元的数量(Duan et al., 2016)。短期睡眠不足对神经元的数量有显著的影响,造成其数量的大量丢失(Wadhwa et al., 2017a)。除了神经元的数量,神经元的功能状态也可通过尼氏体来反映。神经元胞体或树突内存在较大的嗜碱性团块和颗粒,名为尼氏体,它的功能是合成更新细胞器所需的结构蛋白、合成神经递质所需的酶类以及肽类的神经调质,其形状、数量和分布随不同的神经元而不同(Lindroos, 1991)。在脑组织中,神经元的周围存在数量众多的神经胶质细胞,其数量是神经元的 10-50 倍。小胶质作为大脑常驻的固有免疫细胞,执行多种功能,包括检测神经元活动的变化,调节学习和记忆,以及充当大脑局部的吞噬细胞和损伤传感器。小胶质细胞存在两种极化状态,分别是促炎的 M1 型和抑炎的 M2 型,适量的刺激下小胶质会活化为促炎状态,吞噬损伤的片段或因子来促进大脑的稳态,但过度的刺激下小胶质细胞会处于异常活化状态,持续的分泌多种促炎细胞因子,加剧神经炎症的发生(Bartels et al., 2020)。围术期神经认知障碍发展的主要因素便是小胶质细胞的过度活化(Luo et al., 2021)。

研究表明 Mel 能规范血脂水平,改善血管内皮功能,具有抗炎作用(Esposito and Cuzzocrea, 2010)。炎症期间 Mel 能调节 NF- κ B 通路的激活(Ali et al., 2015),进而改变炎症因子的表达例如 IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-10、C-效应蛋白与 TNF- α (Kim et al., 2012)。此外 Mel 可通过抑制 HMGB1 介导的小胶质细胞激活和 CRTCL1 介导的神经元丢失,从而减轻缺血和再灌注模型下血脑屏障的损伤(Luo et al., 2021)。但是 Mel 能否在急性 SD 诱导的神经元丢失和神经炎症中发挥改善作用尚不清楚。

3.2 材料与方 法

3.2.1 试验动物的处理

60 只 8 周龄雄性 ICR 小鼠分为 4 组: CON 组、SD 组、SD+L-Mel 组、SD+H-Mel 组,所有小鼠的处理操作同第二章第一节。

3.2.2 试验动物取材

60 只小鼠在连续 72 h SD 后于早上 8:00 进行取材, 采用 1% 的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉, 并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4% 多聚甲醛固定, 具体操作为先将小鼠头部皮肤剪开暴露头骨, 用剪刀轻轻剪开部分头骨使固定液进入脑组织中, 便于组织液充分的固定组织用于后续组织学检测。同组的剩余 6 只小鼠取出双侧海马, 立即放入液氮速冻半小时再转移至 -80 °C 冰箱用于 ELISA 检测。

3.2.3 主要仪器设备

脑立体定位仪 (ALCBIO, 上海)、石蜡切片机 (LEICA, RM2235 型, 德国)、生物组织包埋机 (KD-BM, 浙江金华科迪仪器设备有限公司, 中国)、光学显微镜 (Olympus, BX51 型, 日本)、生物组织摊片机 (KD-T, 浙江金华科迪仪器设备有限公司, 中国)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、图像采集系统 (Olympus, DP72 型, 日本)、全自动雪花制冰机 (IMS-20, 常熟市雪科电器有限公司, 中国)、分析天平 (AL204, Mettler Toledo, 瑞士)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 中国)、隔水式恒温培养箱 (GPR-9160, 上海森信实验仪器有限公司, 中国)、移液器 (Eppendorf, 德国)。

3.2.4 试验药品及试剂

2% 戊巴比妥钠溶液、1% 肝素钠溶液、4% 多聚甲醛、多聚赖氨酸、无水乙醇、酸性清洗液 (浓硫酸和重铬酸钾)、兔抗小鼠 NeuN 单克隆抗体 (ab177487, abcam)、兔抗小鼠 Iba1 单克隆抗体 (ab178846, abcam)。

3.2.5 组织包埋与切片

3.2.5.1 脑立体定位

取出固定的小鼠头部后, 将小鼠头部的头骨用剪刀全部修剪干净暴露出脑组织。将耳棒插入小鼠的耳道内, 并将小鼠的前端用固定器夹紧, 使动物的两个耳朵以及头部的前端位置保持三个固定点, 使小鼠的头部在立体定位过程中不能晃动, 然后根据图谱在冠状切面切在海马脑区。

3.2.5.2 脱水与透明

将修好的组织小块按以下流程进行脱水与透明: 50% I 酒精 3 h → 50% II 酒精 3 h → 75% I 酒精 3 h → 75% II 酒精 3 h → 85% I 酒精 3 h → 85% II 酒精 3 h → 95% I 酒精 1

h→95% II 酒精 1 h→无水乙醇 I 1 h→无水乙醇 II 1 h→无水乙醇:二甲苯 (1:1) I 1 h→无水乙醇:二甲苯 (1:1) II 2 h→二甲苯 I 30 min→二甲苯 II 30 min。

3.2.5.3 浸蜡

将组织分别浸入一级蜡（熔点为 56 - 58 °C）、二级蜡（熔点为 58 - 60 °C）、三级蜡（熔点为 60 - 62 °C）中各 1 h 30 min。

3.2.5.4 包埋

根据组织块的大小，用硬纸片折叠出包埋盒，将已经溶解的石蜡倒入准备好的包埋盒中，再用镊子夹住浸好蜡的组织块放入包埋盒的中间，包埋时需将切面朝下，静止等待其冷却。

3.2.5.5 石蜡切片

将包埋好的石蜡进行修块，切片厚度为 10 μm，连续切片每隔 5 张切片取一张片子为一套切片，40 °C 水中展片，40 °C 烤片机中烤片 4 h。

3.2.6 免疫组织化学试验

3.2.6.1 试验步骤

(1) 脱蜡和水化: 二甲苯 I、II 各 10 min→100%乙醇→95%乙醇→85%乙醇→75%乙醇→50%乙醇→蒸馏水（都为 3 min）。

(2) 水化: 将组织切片从 50%酒精中取出，在蒸馏水中浸泡 5 min。后在 0.01M PBST 缓冲液中浸泡 5 min。

(3) 柠檬酸盐抗原修复: 0.01 M 柠檬酸盐缓冲液（修复液，现配现用）。微波强档 100%将修复液加热 5 min，取出放入切片后再在 20%档位加热 3 min，共加热 3 次。最后拿出修复盒，在室温下进行自然冷却。

(4) 清洗: 0.01M PBST 缓冲液中浸泡 3 次，每次 5 min。

(5) 封闭内源性过氧化氢酶: 30%过氧化氢避光配置为 3%的过氧化氢甲醇。用吸水纸将组织片周围的 PBST 吸干，切记该过程中组织片不可干燥，可向组织片哈气保持湿润，后滴加 3%过氧化氢甲醇封闭液，将组织完全覆盖后放入黑色湿盒内，避光封闭 25 min。

(6) 清洗: 0.01M PBST 缓冲液中浸泡 3 次，每次 5 min。

(7) 血清封闭: 正常非免疫 5%血清 (与二抗同源), 存放于 37 °C 恒温箱中 30 min。吸水纸吸干组织周围 PBS, 切记不能干片, 可向片子哈气保持湿润, 用特制的吸水纸棒在组织周围画圈, 括住封闭液, 使之不扩散, 最好成“山丘”形状。

(8) 一抗孵育: 用一抗稀释液配制不同浓度的抗体, 兔抗小鼠 Iba1 单克隆抗体 (1:500) 和兔抗小鼠 NeuN 单克隆抗体 (1:500)。阴性对照用 0.01M PBST 缓冲液代替一抗。直接将血清用吸水纸吸干净, 用免疫组化笔在组织周围画圈, 将一抗滴加至圈内完全覆盖住组织片, 切勿使液体扩散。加样后将组织切片放入湿盒中在 4 °C 冰箱过夜孵育。

(9) 24 h 后将湿盒从冰箱中取出, 放置于室温下 40 min 使其复温。

(10) 清洗: 0.01M PBST 缓冲液中浸泡 3 次, 每次 5 min。

(11) 二抗孵育: 用抗体稀释液配制生物素化的羊抗兔 IgG (H+L) (1:300), 将组织片上的液体甩干, 滴加配制好的二抗。室温静置 2 h。

(12) 清洗: 0.01M PBST 缓冲液中浸泡 3 次, 每次 5 min。

(13) 加 SABC (1:300): 操作及加液量同加一抗, SABC 复合物为链霉软白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物。室温静置 2.5 h。

(14) 0.05 M TBS 预敷: 0.05 M TBS 保存于 4 °C, 用之前提前拿出来室温平衡, 操作及加液量同加一抗, 室温静置 10 min。

(15) DAB 预敷液 (1 mg 的 DAB 溶于 2 mL 的 TBS, 避光): 甩去片子上 TBS, 吸水纸尽量吸干组织周围 TBS。再滴加适量 DAB 预敷液, 室温静置 20 min。

(16) DAB 显色液 (495 μ L DAB 预敷液中加入 5 μ L H₂O₂ 溶液, 避光): 在原有 DAB 预敷液上再次滴加适量的 DAB 显色液, 静置 5-10 min。在显微镜下, 对反应强度进行了控制, 并对显示时间进行了优化。在显微镜下面观察, 可见阳性染色并且其背景较浅的话, 这时可以终止反应利用蒸馏水洗去显色液。

(17) 复染: 蒸馏水 5 min → 苏木精 5 s ~ 2 min → 分色数秒 → 蓝化 20 min (自来水下冲洗) → 蒸馏水 3 min。自来水冲洗蓝化后显微镜下观察, 细胞核蓝色, 细胞质无色为宜。

(18) 脱水: 50%乙醇 → 75%乙醇 → 85%乙醇 → 95%乙醇 → 100%乙醇 → 1:1 二甲苯:乙醇 (全部为 3 min)。在二甲苯中, 观察切片的白色云雾现象。

(19) 透明: 50%酒精 5 min → 75%酒精 5 min → 85%酒精 5 min → 95%酒精 5 min → 100%酒精 5 min → 1:1 二甲苯:乙醇 5 min → 二甲苯 I、II 各 10 min。

(20) 与 3.2.6.1 的 (6) 相同。

3.2.6.2 图像采集与数据分析

小鼠脑组织的免疫组化染色的图像采集: 选择结构清晰, 阳性细胞 (呈棕色) 明显的视野分别在 20×与 40×的镜头下拍照, 最后选取图片。海马组织免疫组织化学结果统计: 每组随机选择 5 只小鼠的小鼠脑切片, 每一只动物选择不连续切片的 5 张切片, 每一张切片从 CA1、CA3 和 DG 区左右随机挑选 5 个视野, 最后对所有视野中阳性细胞的 IOD 值进行统计。

3.2.7 酶联免疫吸附试验测定炎症细胞因子的含量

3.2.7.1 IL-6

(1) 标准品的稀释与加样

将 1 mL 的标准品稀释液加入标准品中, 并于室温中静置约 10 min, 并将之轻轻晃动, 此标准品浓度为 2000 pg/mL。先将此标准品稀释成 1000 pg/mL 的溶液后, 再准备 5 个 EP 管用于制备不同浓度的标准品稀释液, 先吸入 600 μ L 的标准品稀释液于每个 EP 管中, 进而依次 3 倍稀释, 其浓度为 500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.2 pg/mL、15.6 pg/mL、7.8 pg/mL, 标准品稀释液的浓度为 0 pg/mL, 可作为空白孔。每组中包含 6 个样品, 每个样品机械重复 3 次。批内差小于 10%, 批间差小于 12%, 检测限为 3.2 pg/mL。

(2) 试验步骤

(1) 样品制备: 将海马组织按照 1:9 的比例添加样品稀释液, 在震荡仪中按照 60 Hz 的频率震荡 2 min, 将组织研磨碎为标准。

(2) 加样: 加入标准孔、样品待测孔与空白孔。标准孔设置 7 孔, 按顺序加入 100 μ L 配置好的 7 个浓度的标准品。加 100 μ L 的标准品稀释液于空白孔中, 其余孔加入待测的样品 100 μ L。随后轻轻晃动、充分混匀, 避免气泡产生, 将覆膜盖于酶标板, 于 37 °C 温箱孵育 1 h;

(3) 弃去液体, 甩干, 不用洗涤;

(4) 每孔 (标准孔、待测样品孔、空白孔) 中加入检测溶液 A 工作液 100 μ L, 并轻轻晃动、充分混匀, 避免气泡产生, 将覆膜盖于酶标板, 于 37 °C 温箱孵育 1 h;

(5) 倒扣酶标板倒掉孔内溶液, 并在每孔中加入 350 μ L 的洗液并浸泡 1~2 min 进行洗涤, 随后将酶标板倒扣于吸水纸上并轻轻拍打以彻底移除孔内洗涤液。此操作重复 3 次。洗涤完最后一次后, 倒掉孔内清洗液;

(6) 每孔 (标准孔、待测样品孔、空白孔) 中加入检测溶液 B 工作液 100 μ L, 并轻轻晃动、充分混匀, 避免气泡产生, 将覆膜盖于酶标板, 于 37 °C 温箱孵育 1 h;

(7) 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 5 次, 方法同步骤 (4);

(8) 吸取 90 μL TMB 底物溶液加入于每孔中, 将覆膜盖于酶标板并放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光显色 (显色时间限制在 10 至 20 min, 总反应时长勿超过 30 min。当标准孔的后 3 孔出现较为明显的梯度蓝色, 即可终止反应);

(9) 吸入 50 μL 的终止溶液加入于每孔中, 终止反应。若颜色出现不均一, 可轻轻摇晃酶标板以促进溶液充分混匀;

(10) 先将酶标仪调至 450 nm 波长, 在保证酶标板底部无气泡及水滴出现后, 立即放入酶标板中测量每孔的 OD 值;

(11) 数据处理: 利用标准品与样品的 OD 值作图并计算各样品浓度。标准品的浓度为纵坐标, OD 值为横坐标绘制标准曲线并得出公式, 将各样品的 OD 值代入该公式中, 得出样品的浓度, 若样品稀释, 则乘以稀释倍数, 得数即为实际浓度 (pg/mL)。

3.2.7.2 TNF- α

(1) 标准品的稀释与加样

将 0.5 mL 的标准品稀释液加入标准品中, 并于室温中静置约 10 min, 并将之轻轻晃动, 此标准品浓度 2000 pg/mL。先将此标准品稀释成 1000 pg/mL 的溶液后, 再准备 7 个 EP 管用于制备不同浓度的标准品稀释液, 先吸入 600 μL 的标准品稀释液于每个 EP 管中, 进而依次 3 倍稀释, 其浓度为 2000 pg/mL、666.67 pg/mL、222.22 pg/mL、74.07 pg/mL、24.69 pg/mL、8.23 pg/mL、2.74 pg/mL, 标准品稀释液的浓度为 0 pg/mL, 可作为空白孔。每组中包含 6 个海马组织样品, 每个样品机械重复 3 次。批内差小于 10%, 批间差小于 12%, 检测限为 0.98 pg/mL。

(2) 试验步骤

同 3.2.7.1 的 (2)。

3.2.7.3 IL-4

(1) 标准品的稀释与加样

将 1 mL 的标准品稀释液加入标准品中, 并于室温中静置约 10 min, 并将之轻轻晃动, 此标准品浓度为 1000 pg/mL。先将此标准品稀释成 500 pg/mL 的溶液后, 再准备 7 个 EP 管用于制备不同浓度的标准品稀释液, 先吸入 500 μL 的标准品稀释液于每个 EP 管中, 进而依次倍比稀释, 其浓度为 500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.2 pg/mL、15.6 pg/mL、7.8 pg/ml, 标准品稀释液的浓度为 0 pg/mL,

可作为空白孔。每组中包含 6 个海马组织样品，每个样品机械重复 3 次。批内差小于 10%，批间差小于 12%，检测限为 3.5 pg/mL。

(2) 试验步骤

同 3.2.7.1 的 (2)。

3.2.7.4 IL-10

(1) 标准品的稀释与加样

将 1 mL 的标准品稀释液加入标准品中，并于室温中静置约 10 min，并将之轻轻晃动，此标准品浓度为 500 pg/mL。先将此标准品稀释成 1000 pg/mL 的溶液后，再准备 7 个 EP 管用于制备不同浓度的标准品稀释液，先吸入 500 μ L 的标准品稀释液于每个 EP 管中，进而依次倍比稀释，其浓度为 500 pg/mL、250 pg/mL、125 pg/mL、62.5 pg/mL、31.2 pg/mL、15.6 pg/mL、7.8 pg/ml，标准品稀释液的浓度为 0 pg/mL，可作为空白孔。每组中包含 6 个海马组织样品，每个样品机械重复 3 次。批内差小于 10%，批间差小于 12%，检测限为 2.7 pg/mL。

(2) 试验步骤

同 3.2.7.1 的 (2)。

3.2.8 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM)。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

3.3 结果

3.3.1 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元丢失

NeuN 是神经元特异核蛋白，通过免疫组织化学试验反映海马组织中神经元的数量 (图 2-6A)。免疫组织化学染色结果显示急性 SD 之后，与对照组相比，海马 CA1、CA3 和 DG 区中神经元的数量显著降低 16.2 % ($P < 0.001$)，21.4 % ($P < 0.001$) 和 19.4 % ($P < 0.001$)。然而，添加 20 mg/kg 的 Mel 之后，与急性 SD 组相比，神经元数量显著增加了 20.2 % ($P < 0.001$)，20.4 % ($P = 0.001$) 和 15.4 % ($P < 0.019$)，Mel

补充组与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$, 图 2-6 B-C)。同样的, 40 mg/kg 的 Mel 的补充也对急性 SD 诱导的神经元丢失有显著的改善作用 ($P > 0.05$, 图 2-6 B-D)。以上两个结果共同表明 Mel 能够改善急性 SD 诱导的海马神经元的丢失。

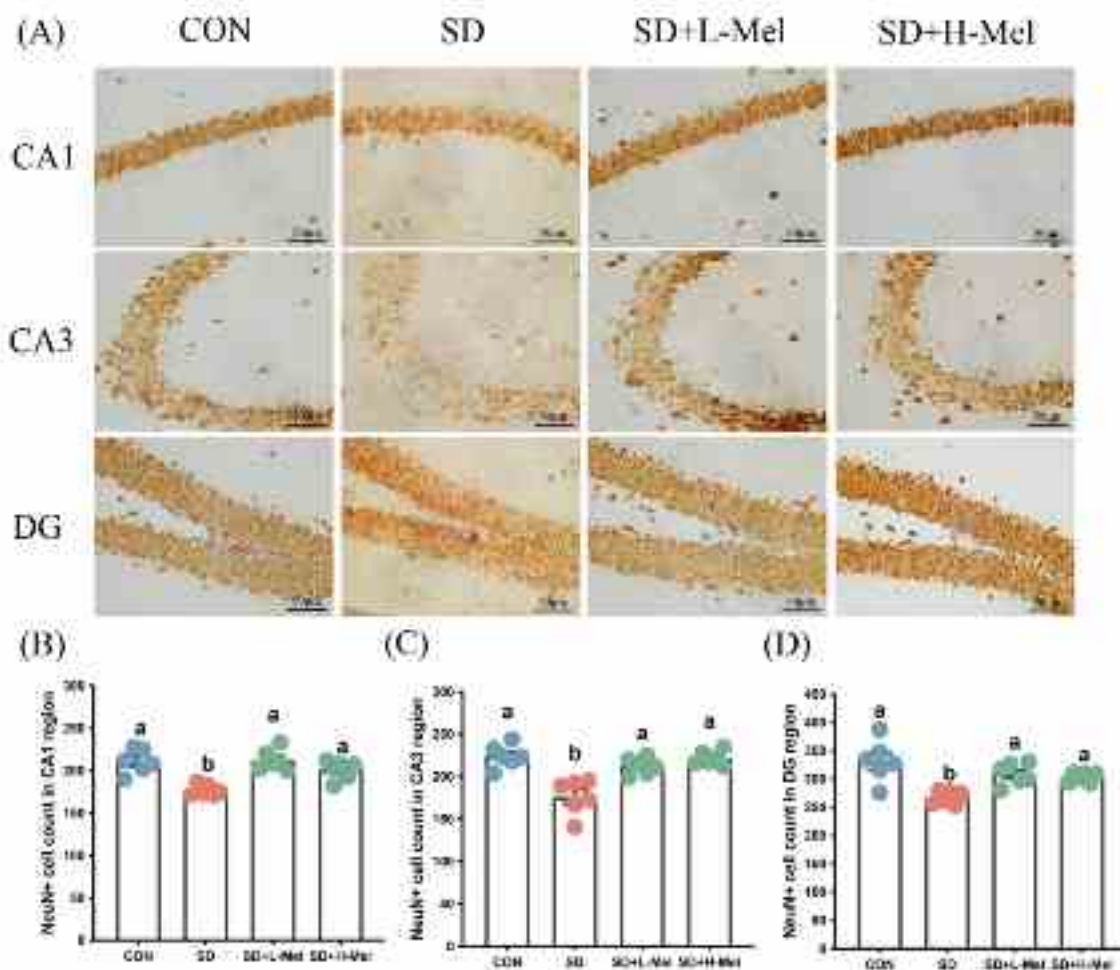


图 2-6 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马 NeuN 阳性细胞数量的影响

(A) 不同试验组的海马神经元 NeuN 染色图像 (比例尺为 50 μm), (B) 海马 CA1 区, (C) 海马 CA3 区, (D) 海马 DG 区。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-6 The effects of acute SD and Mel supplementation on the number of NeuN-positive cells in hippocampus of mice.

(A) Images of the NeuN-stained hippocampal neurons in the different experimental groups. Bar = 50 μm , (B) hippocampal CA1 region, (C) hippocampal CA3 region, (D) hippocampal DG region. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean

± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.2 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马小胶质细胞过度活化

Iba1 小胶质细胞免疫组织化学染色结果显示，急性 SD 之后，与对照组相比，海马 CA1、CA3 和 DG 区中 Iba1 阳性细胞的 IOD 值分别增加 118.9 % ($P = 0.002$)，116.9 % ($P = 0.001$) 和 95.6 % ($P = 0.002$)。然而，添加 20 mg/kg 的 Mel 之后，与急性 SD 组相比，Iba1 阳性细胞的 IOD 值显著降低了 51.2 % ($P = 0.003$)，35.8 % ($P = 0.007$) 和 42.4 % ($P = 0.003$)，Mel 补充组与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$)。同样的，40 mg/kg 的 Mel 的补充也对急性 SD 诱导的小胶质细胞过度活化有显著的改善作用 ($P > 0.05$ ，图 2-7 B-D)。以上结果共同表明 Mel 能够改善急性 SD 诱导的海马小胶质细胞过度活化。

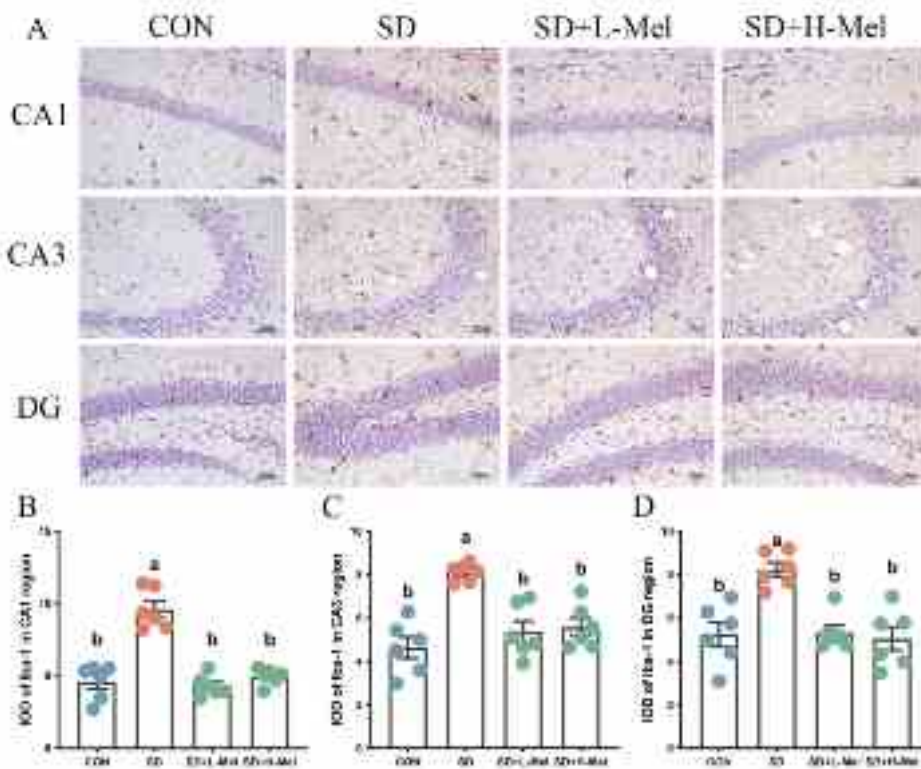


图 2-7 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马小胶质细胞活化水平的影响

(A) 不同试验组的海马小胶质细胞 Iba1 染色图像 (比例尺为 50 μm)，(B) 海马 CA1 区，(C) 海马 CA3 区，(D) 海马 DG 区。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-7 The effects of acute SD and Mel supplementation on activation level of hippocampal microglia in mice.

(A) Images of the Iba1-stained hippocampal microglia in the different experimental groups. Bar = 50 μm , (B) hippocampal CA1 region, (C) hippocampal CA3 region, (D) hippocampal DG region. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.3 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经炎症反应

我们通过检测炎症因子的表达来探究急性 SD 是否诱导了海马神经炎症反应的发生。如图 2-8 所示，结果表明与对照组相比，急性 SD 小鼠海马组织的促炎因子 IL-6 与 TNF- α 的水平显著上调了 34.1% ($P=0.001$, 图 2-8 B) 和 82.4% ($P=0.001$, 图 2-8 A)，而抗炎因子 IL-4 与 IL-10 的水平分别降低了 30.4% ($P < 0.001$, 图 2-8 C) 和 32.0% ($P=0.001$, 图 2-8 D)。与此相比，Mel 添加改善了急性 SD 诱导的促炎因子增加与抗炎因子减少。数据分析表明 20 mg/kg 的 Mel 添加之后，与急性 SD 小鼠相比，海马组织的促炎因子 IL-6 与 TNF- α 的水平显著降低了 27.8% ($P=0.001$, 图 2-8 B) 和 44.6% ($P=0.002$, 图 2-8 A)，而抗炎因子 IL-4 与 IL-10 的水平显著增加了 28.8% ($P=0.001$, 图 2-8 C) 和 49.3% ($P < 0.001$, 图 2-8 D)。此外，Mel 添加组与对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

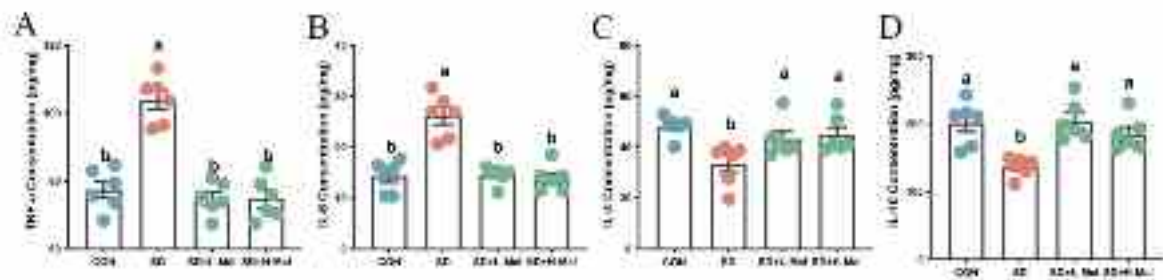


图 2-8 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马炎症细胞因子的影响

(A-D) 海马组织炎症细胞因子的水平 (TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10)。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 2-8 The effects of acute SD and Mel supplementation on hippocampal inflammatory cytokines in mice.

(A-D) The levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10) in the hippocampus. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.4 讨论

神经元死亡在以神经元丧失或功能障碍为特征的各种神经退行性疾病中起着关键作用。由于神经元很难再生，因此保护神经元，减少神经元的死亡是最好的解决方法。免疫组化染色显示，急性 SD 小鼠海马内 NeuN 阳性神经元数量减少，提示急性 SD 引起神经元的丢失。然而，Mel 的补充改善了这种现象。此前的研究也表明，Mel 可通过逆转神经元丢失减轻东莨菪碱引起的认知障碍 (Muhammad et al., 2019)。研究发现创伤性脑损伤后 Mel 能够通过激活 NRF2 通路，抑制神经元的大量丢失 (Wang et al., 2019)。这一发现与我们的结果相一致，给予急性 SD 小鼠补充外源性 Mel 后，在海马 CA1、CA3 和 DG 中存在的神经元丢失得到了改善。尽管炎症通常是为了修复损伤组织而引起的，但它具有有害的影响，会导致急性 SD 后神经元损伤和认知障碍的增加 (Hulsebosch, 2002)。小胶质细胞不仅是抗原呈递细胞，也是效应细胞，释放几种促炎细胞因子，促进神经退化 (Leonard, 2018)。小胶质细胞的过度激活会加剧中枢神经系统的炎症反应 (Colonna and Butovsky, 2017)。在本研究中，在 SD 小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区域 Iba1 表达升高，提示 SD 诱导的神经炎症。Mel 治疗可改善急性 SD 诱导的小胶质细胞过度激活。与我们之前的研究类似，抑制小胶质细胞激活可以改善 48 h SD 的大鼠海马的空间记忆和成年神经发生 (Wadhwa et al., 2017b)。据报道，在人类和实验动物中，慢性 SD 导致大鼠皮质和海马区 NF- κ B 通路的激活，以及促炎细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的升高 (Manchanda et al., 2018; Wadhwa et al., 2015)。NF- κ B 被隔离在细胞质中，在炎症级联反应中占据重要地位，一旦发生氧化应激，它会转位到细胞核并诱导各种炎症细胞因子的分泌增加 (Lee and Lee, 2014)。此外，有报道称 Mel 具有抗炎能力发挥神经保护的作用，能够抑制缺血再灌注诱导的 NF- κ B 通路的激活 (Yang et al., 2020a)。我们目前的研究结果表明，急性 SD 小鼠海马内检测到高浓度的促炎细胞因子和低浓度的抗炎细胞因子，而 Mel 显著抑制了急性 SD 诱导的海马小胶质细胞的过度活化，从而减少了促炎细胞因子的水平，发挥其抗炎作用。

3.5 小结

急性 SD 能够引起海马组织内小胶质细胞的过度活化，促进促炎细胞因子的分泌

并抑制抑炎细胞因子的分泌，加剧了不同分区内神经元数量减少和功能损伤，最终导致小鼠认知功能的障碍。而外源性 Mel 的补充能有效的缓解神经炎症的发生，抑制神经元的丢失，最终修复急性 SD 造成的空间记忆损伤和焦虑样行为。

第三章 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导海马神经元丢失的直接途径

1. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的小鼠海马神经元铁死亡及其机制

1.1 引言

在上一节的研究中我们发现急性 SD 通过减少海马神经元的数量, 进而导致小鼠空间参考记忆、空间工作记忆的损伤和焦虑样行为的发生。但是急性 SD 引起小鼠认知功能障碍的机制尚不清楚。最近的一项研究发现, 失眠症患者表现出明显的认知障碍, 并观察到大脑多个区域的铁沉积。而左侧海马铁离子的浓度被认为是认知障碍的生物标志物, 可能在病理机制中发挥重要作用 (Chen et al., 2019)。这强烈提示在急性 SD 引起认知功能损害的过程中, 应考虑一种新的细胞死亡模式。铁死亡, 是一种铁依赖性的脂质过氧化过度产生的细胞死亡方式 (Dixon et al., 2012), 其参与多种中枢神经系统疾病, 包括阿尔茨海默氏症、脑出血 (Li et al., 2017b) 和创伤性脑损伤等 (Xie et al., 2019)。铁积累和脂质过氧化是铁死亡过程中启动膜氧化损伤的两个关键信号。铁死亡的核心分子机制包括调节氧化损伤和抗氧化防御之间的平衡。铁在细胞中催化氧自由基的形成, 促进多不饱和脂肪酸的磷脂的自氧化以及自由基连锁反应的传播, 即促进脂质过氧化在细胞膜上的传播。铁死亡的标志是铁依赖性 ROS 的积累、抗氧化酶水平的降低和 GPX4 的失活, 以及过量的脂质过氧化 (Li et al., 2020a)。睡眠不足已被证明会导致氧化应激和免疫反应相关基因表达增强 (Möller-Levet et al., 2013)。我们推测在急性 SD 引起的记忆障碍中可能存在铁死亡的参与。

褪黑激素具有螯合特性, 有助于降低金属诱发的毒性 (Yu et al., 2019)。此外, 大量研究表明 Mel 是一种有效的内源性抗氧化剂, 它还间接刺激某些抗氧化酶, 如超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 和 GPX4 (Zhao et al., 2018)。Mel 能够激活两种膜受体 (MT1 和 MT2) 对昼夜节律和睡眠异常、情绪障碍、学习和记忆和神经保护产生有益影响 (Jilg et al., 2019)。Mel 通过激活 MT1 受体来降低神经元放电, 促进睡眠过程 (Jin et al., 2003)。相反, Mel 通过 MT2 受体依赖机制促进神经发生和细胞增殖 (Chern et al., 2012)。因此 Mel 通过分别激活 MT1 和 MT2 受体来调节多种生理事件。最近, 有研究报道 Mel 是一种很好的铁死亡抑制剂, 其抗铁死亡作用为治疗创伤性脑损伤提供了一个潜在的治疗靶点 (Rui et al., 2021)。然而, Mel 是否以及如何改善急性 SD 诱导的海马铁死亡和认知障碍仍不清楚。

1.2 材料与方法

1.2.1 试验动物的处理

48 只 8 周龄雄性 ICR 小鼠分为 4 组: CON 组、SD 组、SD+L-Mel 组、SD+H-Mel 组, 所有小鼠的处理操作同第二章第一节。

1.2.2 试验动物的取材

48 只小鼠在连续 72 h 的 SD 后于早上 8:00 进行取材, 采用 1%的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉, 并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4%多聚甲醛固定。同组的剩余 6 只小鼠取出双侧海马, 立即放入液氮速冻半小时再转移至-80 °C冰箱用于 qRT-PCR、Western blot 和抗氧化试剂盒检测。

1.2.3 主要仪器和设备

石蜡切片机 (LEICA, RM2235 型, 德国)、生物组织包埋机 (BM-VI)、光学显微镜 (Olympus, BX51 型, 日本)、图像采集系统 (Olympus, DP72 型, 日本) 电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler® 480, Roche Applied Science, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、酶标仪 (BLO-RAD, 550 型, 美国)、电泳仪 (伯乐生命医学产品有限公司, 上海)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上海)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、二氧化碳培养箱 (MCO-17AC, 三洋, 日本)、超净工作台 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司)

1.2.4 试剂药品及试剂

亚铁氰化钾、盐酸、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素 (CW0116S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、苏木精、盐酸酒精分色、RNzol Reagent TRIzon 总 RNA 提取试剂 (CW0580A, 康为世纪生物技术有限公司, 江苏)、反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Boston, USA)、兔抗小鼠 MT1 多克隆抗体 (ab203038, abcam)、兔抗小鼠 MT2 多克隆抗体 (ab203346, abcam)、鼠抗 p-ERK1/2 单克隆抗体 (M8159, sigma)、兔抗小鼠 NRF2 多克隆抗体 (ab137550, abcam)、兔抗小鼠 TFR1 多克隆抗体 (ab214039, abcam)、兔抗小鼠 GPX4 多克隆抗体 (ab125066, abcam)、兔抗小鼠 DMT1 (NBP1-91840, Novus)、兔抗小鼠 FPN 多克隆抗体 (NBP1-21502SS, Novus)、兔抗小鼠 β -actin、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、脱脂奶粉 (中国伊利)、BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014)、RIPA 裂解液 (CW2333)、蛋白酶抑制剂

(CW2200)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (CW0027)、SDS-PAGE Loading Buffer (5×) (CW0027)均购自江苏康为世纪生物科技有限公司、DMEM(SH30023.01B, HyClone, 北京)、胎牛血清 (11012-8611, 浙江天杭生物科技股份有限公司, 浙江)、青链霉素混合液 100× (P1400, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)、0.25% Trypsin (T1350, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)、Erastin、Fer-1 均购 Sigma 科技有限公司。

1.2.5 改良的普鲁士蓝染色

脑组织中 Fe^{2+} 的含量较低, 因此无法在研究中使用经典的普鲁士蓝染色来评估, 所以在本研究中采用改良的普鲁士蓝染色进行脑组织中铁离子的可视化染色。

- (1) 将 5 μm 石蜡切片脱蜡并水化, 然后在 3% H_2O_2 的 0.1M TBS 中浸泡 10 min;
- (2) 4%亚铁氰化钾水溶液和 4%盐酸的混合物浸泡切片 30 min;
- (3) ddH₂O 漂洗 10 min;
- (4) 用含有 0.025% DAB 和 0.0033 % H_2O_2 的 TBS 溶液滴加在组织上方, 避光显色 5~10 min 后在显微镜下方观察, 当出现棕黄色颗粒时停止显色。
- (5) ddH₂O 漂洗 10 min;
- (6) 苏木精染色, 分化并封片;
- (7) 在显微镜下观察切片并拍照。在每组脑的六个横截面的 30 个随机区域中对阳性计数。然后用 Image J 软件确定阳性细胞的平均积分光密度 (IOD)。

1.2.6 Western blot 试验

1.2.6.1 海马组织总蛋白的提取

(1) 海马组织从 -80 °C 冰箱取出, 称取大约 20 mg 放入 EP 管中, 再加入 300 μL RIPA 蛋白裂解液、3 μL 的蛋白酶抑制剂和 3 μL 的磷酸酶抑制剂, 匀浆机进行 2 min 震荡破碎, 随后于冰上静置 20 min;

(2) 在 12000 rpm, 4 °C 条件下放入离心机离心 10 min, 小心吸取上清转移至新的离心管中, 于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2.6.2 测定海马组织总蛋白浓度及蛋白的变性

海马组织总蛋白浓度用 BCA 试剂盒测定。

具体步骤如下:

(1) 稀释 BSA 标准品：按照下表操作稀释 BSA 标准品；

EP 管	RIPA 用量 (μL)	BSA 用量 (μL)	标准品终浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	0	50	2
2	50	50	1
3	50	50 (从 2 号管取)	0.5
4	50	50 (从 3 号管取)	0.25
5	50	50 (从 4 号管取)	0.125
6	50	50 (从 5 号管取)	0.0625
7	50	0	0

(2) 根据表格设置配制标准品，与样品一同加入 BCA 试剂盒，注意记录好加样顺序；

(3) BCA 试剂中 A 液与 B 液按照 50:1 比例配置成 BCA 工作液，随后每孔加 200 μL 的该工作液，并放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱，孵育 30 min；

(4) 将酶标仪调至 570 nm 波长，再放入 96 孔板测定其 OD 值，根据所得的 OD 值与标准品浓度绘制标准曲线；

(5) 根据标准曲线分别计算出各样品总蛋白浓度。

蛋白浓度的标准化和变性：

(1) 根据计算出的各样品总蛋白浓度，用 RIPA 蛋白裂解液将所有蛋白样品浓度配制成 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；

(2) 按照 4:1 的比例混合蛋白样品与 Loading Buffer，放置 PCR 仪中，在 99 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min 的条件下将蛋白变性，随即放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.6.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

(1) 制备凝胶：首先是分离胶溶液与浓缩胶的配制，将配制好的分离胶加入玻璃板间，之后迅速用双蒸水封住分离胶，室温静置。待其充分凝固后，倒掉双蒸水，再在其上方加入浓缩胶，立即将 15 孔梳子迅速插入浓缩胶中，并避免气泡的产生。待其凝固后，小心拔出梳子。随后，将裹有凝胶的玻璃板一起安装在电泳仪器上，并加入 1 \times 电泳缓冲溶液，盖住凝胶顶部；

(2) 上样：先在两端孔内加入 5 μL 蛋白 Marker，再往其余孔内缓慢加入 20 μL 待测样品；将电泳仪调至浓缩胶恒压 60 V，时间 25 min，分离胶恒压 120 V，时间 90 min。

1.2.6.4 转膜

- (1) 裁剪合适的 PVDF 膜，先浸泡在无水甲醇中活化 20 s，再将 PVDF 膜取出与垫片及滤纸平整放入 1×转膜缓冲液中，避免产生折痕；
- (2) 将取出的凝胶迅速放入 1×转膜缓冲液中；
- (3) 按照吸水海绵、滤纸、PVDF 膜及目的蛋白凝胶的顺序组装转膜夹（正极到负极）；
- (4) 将转膜夹小心转移至转膜电泳槽内，倒入转膜缓冲液，将转膜夹浸入其中即可，调至恒定电流 200 mA，时长设置为 120 min；
- (5) 封闭：先用 TBST 配置好 5%的脱脂牛奶，在转膜成功后，小心取出 PVDF 膜，放入脱脂牛奶中，使其浸泡其中，再放置摇床上，室温封闭 1 h。

1.2.6.5 免疫反应

- (1) 封闭结束后，取出 PVDF 膜，放入装有 1×TBST 的盒内漂洗 3 次，每次 10 min。同时在干净的盒中用 TBST 配置兔抗小鼠 MT1、MT2、p-ERK、NRF2、TFR1、DMT1、FPN 和 GPX4（稀释倍数是 1:1000）， β -actin 的稀释倍数是 1:8000。漂洗结束后，按蛋白大小分别将 PVDF 膜转移至对应的盒内，4 °C 冰箱过夜；
- (2) 次日，将一抗孵育盒取出，在摇床上放置 30 min 以恢复室温；
- (3) 用 0.01 M TBST 清洗 PVDF 膜 3 次，每次 10 min；
- (4) 用 TBST 配置浓度为 1:8000 的羊抗兔的二抗溶液，清洗结束后，将 PVDF 膜浸泡于该溶液中，放置摇床，室温孵育 1.5 h。

1.2.6.6 化学花光显色

- (1) 取出 PVDF 膜放入 0.01 M 的 TBST 溶液中，清洗 3 次，每次 10 min；
- (2) 按 1:1 的比例混合 A 液于 B 液配置成 ECL 发光液，用镊子小心取出清洗干净的 PVDF 膜，放入 ECL 发光液中浸泡，然后放入全自动数码凝胶图像分析系统中，采集图像。

1.2.6.7 凝胶图像分析

将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图象处理系统分析目标条带的分子量和光密度值。Western blot 以 β -actin 为内参，目的蛋白的相对表达量为目的蛋白水平/ β -actin 蛋白水平。

1.2.7 qRT-PCR 试验

试验操作同第二章第一节 1.2.8，引物序列信息如下：

表 3-1 qRT-PCR 反应引物序列信息 (铁转运蛋白)

Tab. 3-1 qRT-PCR reaction system primer sequence (iron transporters).

Gene name	Primer Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Accession No.
<i>Tfr1</i>	F: TTGGGTAGTTGGAGATTGCC R: TGAGGTCTTTGGCTTCTGGT	247 bp	NM_011638.4
<i>Dmt1</i>	F: CTGATCGTCTGCTCCATCAA R: CCCAATGCAATCAAACACTG	149 bp	NM_001146161.1
<i>Fpn</i>	F: CCCTTCCGCACTTTCCGAAT R: GAATAGACCAGTCCGAACAAGGC	204 bp	NM_008732.2
<i>Gapdh</i>	F: CCGAGAATGGGAAGCTTGTC R: TTCTCGTGGTTCACACCCATC	232 bp	NM_001289726.1

Real-time PCR 以 *Gapdh* 为内参, 目的基因的相对表达量为目的基因 mRNA 水平/*Gapdh* mRNA 水平。F = forward primer; R = reverse primer.

1.2.8 免疫组织化学试验

试验操作同第一章第三节 3.2.7, 兔抗小鼠 MT2 多克隆抗体浓度为 1: 300。

1.2.9 SOD 的检测

(1) 样品的准备:

称取约 30 mg 的海马组织并吸取在 4 °C 或冰浴条件下预冷的 PBS 加入其中, 在 4 °C 条件下用玻璃匀浆器或冰浴进行匀浆。随后在 4 °C、12000 g 条件下离心 10 min。吸取上清移至新的 EP 管中用于酶活性的测定。

(2) 试剂盒的准备工作:

WST-8/酶工作液的配制: 均匀混合 151 μ L SOD 检测缓冲液、8 μ L WST-8 和 1 μ L 酶溶液, 将其配置为 160 μ L WST-8/酶工作液。具体的配置剂量参考下表:

待测样品数量	1 μ L
SOD 检测缓冲液	151 μ L
WST-8	8 μ L
酶溶液	1 μ L
WST-8/酶工作液	160 μ L

反应启动工作液的配制: 首先将反应启动液融解, 然后根据 1:40 的比例与检测缓冲液进行稀释, 混匀后即反应启动工作液体。

(3) 样品测定:

准备 96 孔板, 根据下表的添加要求, 将各种标准品以及样品加入孔板内。然后加入反应工作液, 混匀。

检测反应体系	样品/标准品	空白对照 1	空白对照 2	空白对照 3
待测样品	20 μL	—	—	20 μL
SOD 检测缓冲液	—	20 μL	40 μL	20 μL
WST-8/酶工作液	160 μL	160 μL	160 μL	160 μL
反应启动工作液	20 μL	20 μL	—	—

37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 在 450 nm 测定吸光度。

(4) 样品中总 SOD 活力的计算:

待测样品中 SOD 酶活力单位=检测体系中 SOD 酶活力单位=抑制百分率/(1-抑制百分率) units。

1.2.10 MDA 的检测

(1) 样品的准备:

称取约 30 mg 的海马组织用 PBS 裂解液进行匀浆。

(2) 试剂盒的准备工作:

TBA 储存液的配制: 称取适量 TBA, 用 TBA 配制液配制成浓度为 0.37% 的 TBA 储存液。

MDA 检测工作液的配制: 根据待测定的样品数 (含对照), 参考下表在临检测前新鲜配制适量的 MDA 检测工作液。

检测次数	1 次
TBA 稀释液	150 μL
TBA 储存液	50 μL
抗氧化剂	3 μL

标准品的稀释: 取适量标准品用蒸馏水稀释至 1 μM 、2 μM 、5 μM 、10 μM 、20 μM 、50 μM , 用于后续制作标准曲线。

(3) 样品测定:

在离心管内加入 0.1 mL 匀浆液作为空白对照, 再将不同浓度的标准品加入用于制备标准曲线, 加入 0.1 mL 样品用于测定; 随后加入 0.2 mL MDA 检测工作液。可参考下表设置检测反应体系:

检测反应体系	空白对照	标准品	样品
匀浆液	0.1 mL	—	—
标准品	—	0.1 mL	—
待测样品	—	—	0.1 mL
MDA 检测工作液	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL

混匀后，100 °C 或沸水浴加 15 min。放入水中冷却，1000 g 室温离心 10 min。取 200 μ L 上清加入到 96 孔板中，随后用酶标仪在 532 nm 测定吸光度。

MDA 含量的计算：通过标准曲线计算每个样品中的 MDA 含量，然后根据样品的蛋白浓度计算出最初样品中的 MDA 含量，表示为 μ mol/mg。

1.2.11 细胞培养

1.2.11.1 细胞株

小鼠海马神经元细胞系 HT22，液氮保存。

1.2.11.2 试剂配置

(1) 10%完全培养基的配制：90 mL DMEM 基础培养基中加入胎牛血清 10 mL 和 500 μ L 双抗，随后经过滤器过滤，4 °C 保存备用。

(2) D-Hank's 液的配制：NaCl 8 g；KCl 0.4 g；Glucose（葡萄糖）1 g；KH₂PO₄ 60 mg；Na₂HPO₄·12H₂O 120.66 mg 加超纯水至 1 L，容量瓶定容。用 5.6% NaHCO₃ 调整 pH 至 7.2~7.4，在超净台内，过滤，4 °C 保存备用。

(3) MTT 溶液的配制：称 MTT 粉末 50 mg 充分溶解 10 mL D-Hank's 液中（终浓度为 5 mg/mL），现配现用。

(4) 梯度 Mel 的配制：称取 1 g Mel 于 4 mL 离心管中，在超净台内，加入 200 μ L DMSO 和 800 μ L 的基础培养基，终浓度为 10 mM。而后进行梯度稀释，配制终浓度为 10⁻⁵M、10⁻⁶M、10⁻⁷M、10⁻⁸M 和 10⁻⁹M 的 Mel 以及 DMSO 和空白对照。用无菌滤器过滤，于 -20 °C 保存备用。

(5) 梯度 Erastin 的配制：称取 1 mg Erastin 于 4 mL 离心管中，在超净台内，加入 1.8 mL 基础培养基，终浓度为 1 M。而后进行梯度稀释，配制终浓度为 50 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M 的 Erastin 以及空白对照。用无菌滤器过滤，于 -20 °C 保存备用。

1.2.11.3 细胞复苏

(1) 从液氮内将冻存的细胞快速取出并立即放在 37 °C 温箱中晃动, 使其快速复温溶解。

(2) 将复苏后的细胞吸入 4 mL 的离心管中, 用封口膜封住放入离心机中离心, 1000 rpm, 4 °C, 5 min。

(3) 采用 10 cm 的培养皿培养复苏后的细胞, 向培养皿中加入 10 mL 的完全培养基, 将离心好的细胞上清液倒掉, 用完全培养基将沉淀的细胞重悬, 缓慢轻柔的将细胞吹打散开, 并将其转移至刚才倒好的培养皿中。在显微镜下观察培养皿中的细胞是否均匀的分布在培养皿中, 避免形成大的细胞团块影响细胞生长。后放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.11.4 细胞传代

(1) 细胞培养大约 36 h 后, 待细胞密度达到 80%后停止培养, 倒掉培养基后用温的 PBS 清洗两遍。

(2) 向培养皿中加入 1 mL 的胰酶-EDTA, 随即在显微镜下观察细胞状态, 当贴壁细胞开始变圆, 细胞之间的连接断开形成一个个的独立的细胞后, 立即放入超净台中加入同等体积的完全培养基终止胰酶消化, 用移液器不断的轻微吹打, 将细胞吹散形成散在的独立的细胞, 后将其转移至 15 mL 的离心管中, 用封口膜封住管盖后在离心机中离心: 1000 rpm, 4°C, 5 min。

(3) 离心后倒掉上清液, 用完全培养基将细胞沉淀重悬。然后将重悬的细胞分别加入两个培养皿中, 十字混匀, 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.11.5 细胞冻存

选择状态好并且长满的细胞进行冻存, 用 PBS 洗两遍, 加入 500 μL 0.05% EDTA-胰蛋白酶于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中消化 4 min, 显微镜下观察细胞变圆, 加入 2 mL 10%的完全培养基终止消化, 转移到 15 mL 离心管中, 1000 g 离心 5 min, 弃掉上清, 加入冻存液, 转移到冻存管中放入细胞梯度降温盒中在-80 °C 冰箱中梯度降温 24 h, 随后将细胞放入液氮罐中保存。

1.2.11.6 细胞计数和培养

(1) 将离心后的细胞沉淀重悬后进行细胞计数与分盘试验。将细胞分别以 1×10^5 个/mL 和 5×10^6 个/mL 的密度培养至 96 孔板和 12 孔板中。这两种孔板的细胞进行分组: CON 组、Erastin (铁死亡诱导剂) 组、Erastin+Mel 组、Erastin+Fer-1 (铁死亡抑制剂) 组、Erastin+Mel+4P-PDOT (MT2 受体阻断剂) 组、Erastin+Mel+PD98059 (ERK

拮抗剂)组和 Erastin+Mel+ML385 (NRF2 阻断剂)组。

(2) 将分盘好的各组细胞放入培养箱中培养 6 h, 待细胞完全贴壁后倒掉上清, 换成同等体积的基础培养基, 再继续放入培养箱中培养。

(3) 12 h 后, 向 Erastin+Mel+4P-PDOT 组、Erastin+Mel+PD98059 组和 Erastin+Mel+ML385 组细胞中加入 10 mM 4P-PDOT、2 μ M PD98059 和 5 μ M ML385, 随后将加药后的细胞放入培养箱中继续培养 30 min。

(4) 培养 30 min 后, 向 Erastin+Mel 组、Erastin+Mel+4P-PDOT 组、Erastin+Mel+PD98059 组和 Erastin+Mel+ML385 组细胞加入 2 μ M Mel, 向 Erastin+Fer-1 组细胞加入 2 μ M Fer-1, 随后将加药后的细胞放入培养箱中继续培养 30 min。

(5) 培养 30 min 后, 向 Erastin 组、Erastin+Mel 组、Erastin+Fer-1 组、Erastin+Mel+4P-PDOT 组、Erastin+Mel+PD98059 组和 Erastin+Mel+ML385 组细胞加入 1 μ M Erastin, 同时向 CON 组细胞加入等量的 DMSO, 随后将加药后的细胞放入培养中继续培养。

(6) 培养 20 h 后, 从培养箱中取出细胞, 96 孔板的细胞用于 ROS 检测与细胞活力检测 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide, MTT) 的检测; 12 孔板的细胞收集起来后进行 ROS 荧光成像检测、Western blot、抗氧化水平检测与 qRT-PCR 试验检测。

1.2.11.7 MTT 试验

(1) 在培养结束后向 96 孔板的每个孔加入 10 μ L MTT 溶液, 注意添加过程中避光, 随后在培养箱中继续孵育 4 h。

(2) 取出 96 孔板, 吸净每孔的上清, 随后每孔加入 150 μ L 的 DMSO。

(3) 将 96 孔板取出, 放置在水平摇床上晃动 10 min, 使沉淀完全溶解充分混匀

(4) 将 96 孔板放入酶标仪, 在 570 nm 的波长下测定吸光度。

1.2.12 ROS 的测定

1.2.12.1 组织 ROS 的测定

(1) 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μ mol/L;

(2) 将新鲜提取的 50 μ L 组织匀浆物加入干净的 96 孔板中, 对照加入 50 μ L 蛋白裂解液作为空白对照;

(3) 在 96 孔板中加入 200 μ L 已稀释的 DCFH-DA, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min, 期间每隔 3~5 min 颠倒混匀一下, 使探针和细胞充分接触;

(4) 即刻放进荧光酶标仪检测: 激发波长 490 nm, 散发波长 520 nm 获得样品

的 ROS 水平，再根据所测得的蛋白浓度计算出 ROS/ μg protein。

1.2.12.2 细胞 ROS 的测定

(1) 取出 96 孔板，在避光条件下每孔加入 $10\ \mu\text{M}$ 的 DCFH-DA 的荧光探针；取出 12 孔板，避光每孔加入 $100\ \mu\text{M}$ 的 DCFH-DA 的荧光探针，在超净台中呈“十”字充分混匀，再放入培养箱中反应 30 min。

(2) 取出 96 孔板放入荧光酶标仪中，将激发光调至 488 nm，发射光调至 525 nm，测定其吸光度。取出 12 孔板放入荧光显微镜中进行拍照。

1.2.13 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM)。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

1.3 结果

1.3.1 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元铁稳态失衡

为了评估我们模型中的铁代谢情况，我们测量了海马组织铁离子含量和铁转运蛋白的表达情况。普鲁士蓝染色显示细胞内铁离子呈褐红色，分布于海马 CA1-CA3 区的锥体细胞和 DG 区的颗粒细胞。与对照组相比，SD 组海马 CA1、CA3 和 DG 区铁离子阳性细胞的 IOD 值分别升高 91.1% (P < 0.001)、100.3% (P < 0.001) 和 69.7% (P = 0.001)。然而，外源性 Mel 的补充改善了急性 SD 诱导的海马神经元大量铁蓄积 (图 3-1 A-B)。与 SD 组相比，SD+L-Mel 组海马 CA1、CA3 和 DG 区铁离子阳性细胞的 IOD 值分别降低了 39.0% (P < 0.001)、51.6% (P < 0.001) 和 51.0% (P < 0.001)。而 SD+H-Mel 组也表现出与 SD+L-Mel 组相似的变化 (图 3-1 A-B)。

Western blot 结果显示，与对照组相比，急性 SD 组海马 TFR1 的表达显著升高 40.0% (P < 0.001 ，图 3-1 G)，DMT1 的表达显著升高 77.9% (P < 0.001 ，图 3-1 H)；相反铁输出蛋白 FPN 的表达水平显著降低了 44.8% (P < 0.001 ，图 3-1 I)。同样，我们也检测了三种铁转运蛋白的 mRNA 水平，结果显示以上三种蛋白的基因和蛋白表达水平相一致 (图 3-1 C-E)。然而，外源性补充 Mel 后，急性 SD 诱导的铁转运蛋白失调的现象被显著逆转。这些结果表明，外源性 Mel 的补充改善了急性 SD 小鼠海马神经元的铁离子蓄积及铁转运蛋白的紊乱。

为了进一步验证 Mel 对铁死亡有的保护作用，我们用铁死亡的诱导剂 (Erastin)

处理海马神经元细胞系 HT22 细胞，并给予 Mel 和铁死亡抑制剂（Fer-1）的补充。MTT 结果显示，Erastin 处理 HT22 细胞后，其细胞活力降低了 39.1% ($P < 0.001$, 图 3-1 J)，而将 Mel 或 Fer-1 预处理细胞后，相对于 Erastin 组，细胞活力增加了 49.2% ($P = 0.001$, 图 3-1 J) 或 48.3% ($P = 0.002$, 图 3-1 J)，进一步结果显示，Erastin 处理的 HT22 细胞中的 TFR1 和 DMT1 蛋白表达水平比对照组高 64.7% ($P = 0.004$, 图 3-1 K) 和 84.8% ($P < 0.001$, 图 3-1 L)，而 FPN 蛋白表达水平低 42.8% ($P < 0.001$, 图 3-1 M)。这些结果表明 Mel 的预处理改善了 Erastin 诱导的铁转运蛋白表达的失调（包括 mRNA 和蛋白水平）。

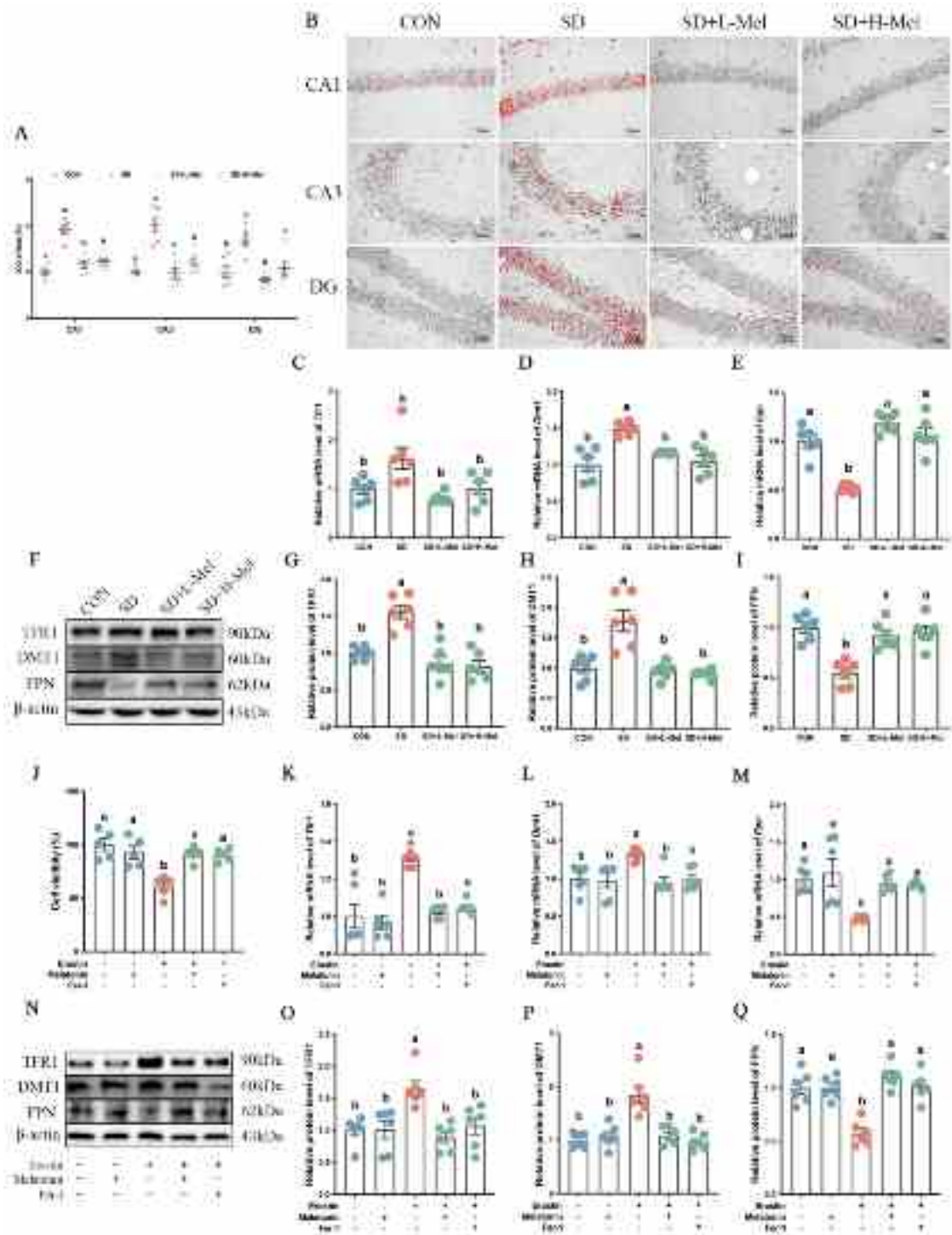


图 3-1 Mel 对急性 SD 小鼠海马铁离子蓄积和铁转运蛋白的影响

(A) 海马 CA1、CA3 和 DG 区铁离子阳性细胞的 IOD 值，(B) 普鲁士蓝染色显示海马铁离子蓄积的照片，用 ImageJ 对铁离子染色结果进行处理。铁离子被观察到为红色颗粒（比例尺为 50 μm ），(C-E) 海马组织中铁转运蛋白 *Tfr1*、*Dmt1* 和 *Fpn* 的相对 mRNA 水平，(F-I) 海马组织中铁转运蛋白 TFR1、DMT1 和 FPN 的相对蛋白水平，(J) 细胞活力，(K-L) HT22 细胞中铁转运蛋白 *Tfr1*、*Dmt1* 和 *Fpn* 的相对 mRNA 水平，(N-Q) HT22 细胞中铁转运蛋白 TFR1、DMT1 和

FPN 的相对蛋白水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-1 Effect of Mel on iron accumulation and iron transporter proteins in the hippocampus of acute sleep-deprived mice.

(A) Relative IOD of iron-positive cells in the hippocampal CA1, CA3, and DG areas, (B) Micrographs depict iron labeling in mouse hippocampal sections. The iron-staining results were processed using ImageJ. Iron deposits were observed as red granules. Bar = 50 μ m, (C-E) Relative mRNA levels of iron transporter proteins *Tfr1*, *Dmt1* and *Fpn* in the hippocampus, (F-I) Relative protein levels of iron transporter proteins TFR1, DMT1 and FPN in the hippocampus, (J) Relative cell viability, (K-L) Relative mRNA levels of iron transporter proteins *Tfr1*, *Dmt1* and *Fpn* in HT-22 cells exposed to Erastin and melatonin or Fer-1, (N-Q) Relative protein levels of iron transporter proteins TFR1, DMT1 and FPN in HT-22 cells exposed to Erastin and melatonin or Fer-1. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.2 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元脂质过氧化水平

铁死亡的另一个特征是脂质过氧化。为了研究急性 SD 是否导致海马神经元的脂质过氧化, 我们测定了 ROS、GPX4、SOD 和 MDA 的水平。结果显示与对照组相比, 急性 SD 组 ROS 和 MDA 的含量显著升高 122.8% ($P < 0.001$, 图 3-2 A) 和 136.3% ($P < 0.001$, 图 3-2 F), 相比之下, 抗氧化酶 SOD 和 GPX4 的水平显著降低了 38.8% ($P < 0.001$, 图 3-2 E) 和 34.9% ($P = 0.017$, 图 3-2 D)。然而, 给予急性 SD 小鼠补充 20 mg/kg Mel 后, ROS 和 MDA 的水平比急性 SD 组显著降低 43.1% ($P < 0.001$, 图 3-2 A) 和 36.8% ($P = 0.001$, 图 3-2 F), GPX4 和 SOD 水平显著升高了 47.5% ($P = 0.038$, 图 3-2 E) 和 58.1% ($P < 0.001$ 图 3-2 D)。SD+H-Mel 表现出与 SD+L-Mel 组类似的变化。而 Mel 治疗组和 CON 组之间没有显著差异 ($P > 0.053$)。

为了进一步证实 Mel 对 Erastin 诱导的细胞脂质过氧化和抗氧化失调的改善作用, 我们检测 HT22 细胞中 ROS、GPX4、SOD 和 MDA 的水平。对于抗氧化酶来说, Erastin 的处理导致 HT22 细胞中 SOD 酶的水平显著降低 50.5% ($P = 0.002$, 图 3-2 H), GPX4 的表达水平也降低了 51.1% ($P = 0.002$, 图 3-2 G)。而对于脂质过氧化水平来说, Erastin 处理的 HT22 细胞中 ROS 和 MDA 的水平显著高于对照组水平的 47.8% ($P = 0.045$, 图 3-2 C) 和 64.8% ($P < 0.001$, 图 3-2 I), 而 Mel 的预处理逆转了 Erastin

诱导的抗氧化酶和脂质过氧化的变化。

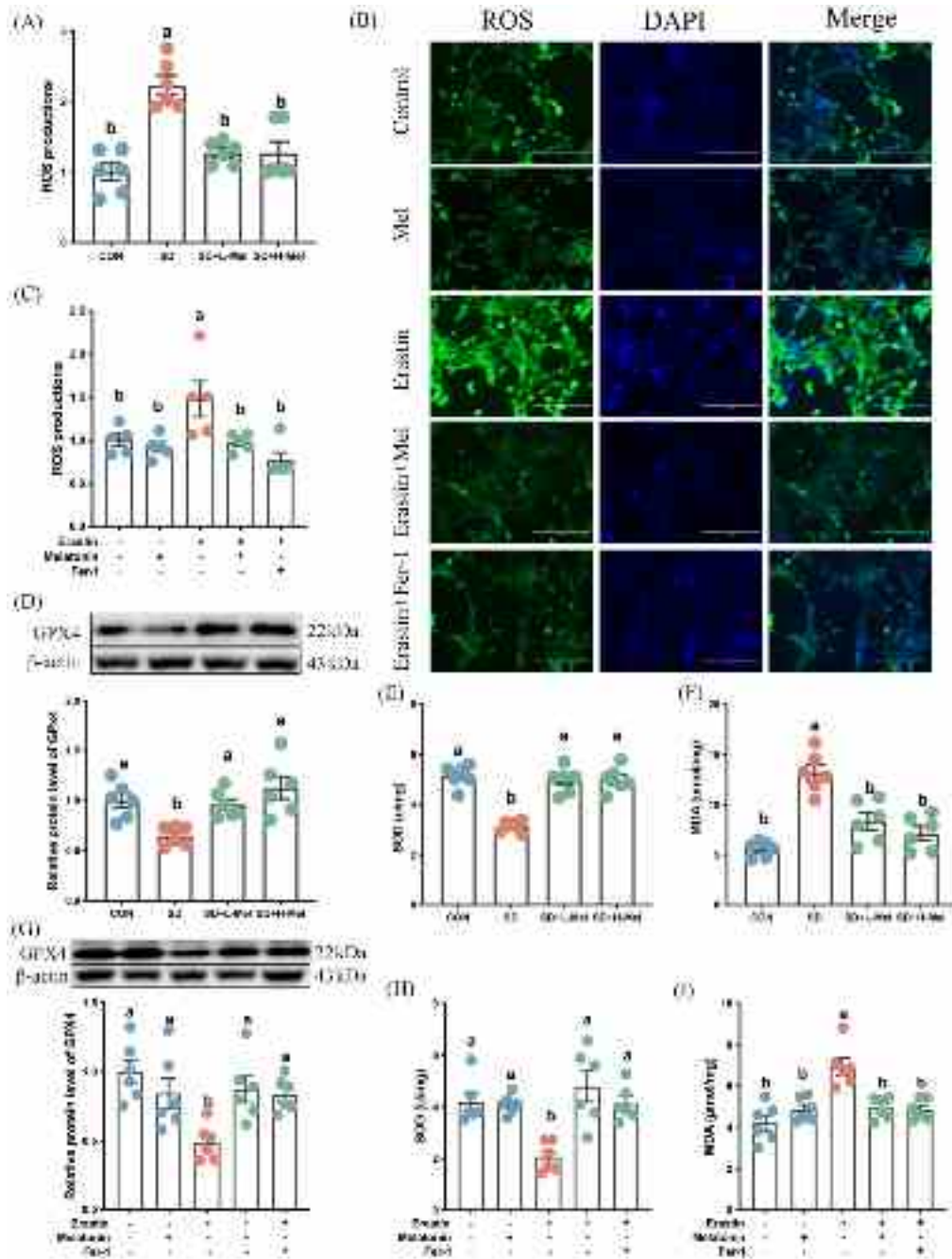


图 3-2 Mel 对急性 SD 小鼠海马抗氧化活性和脂质过氧化的影响

(A) 海马组织中 ROS 的相对定量, (B) 不同处理后的 HT22 细胞的 ROS 荧光图像 (比例尺为 200 μm), (C) 不同处理后的 HT22 细胞的 ROS 的相对定量, (D-F) 海马组织的 GPX4、SOD 和 MDA 的含量, (G-I) 不同处理后的 HT22 细胞的 GPX4、SOD 和 MDA 的含量。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-2 Effect of Mel on antioxidative activation and lipid peroxidation in the hippocampus of acute sleep-deprived mice.

(A) Relative quantification of the ROS assay in the hippocampus tissue, (B) Fluorescence staining of ROS in HT22 cells exposed to Erastin and Mel or Fer-1. Bar = 200 μ m, (C) Relative quantification of intracellular ROS level in the HT22 cells exposed to Erastin and melatonin or Fer-1, (D-F) Relative levels of GPX4, SOD and MDA in the hippocampus, (G-I) Relative levels of GPX4, SOD, and MDA in HT22 cells exposed to Erastin and melatonin or Fer-1. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.3 Mel 通过 MT2/ERK/NRF2 信号通路改善急性 SD 诱导的神经元铁死亡

为了阐明 Mel 对急性 SD 的保护作用是否依赖于其受体, 我们首先检测了不同组间 Mel 膜受体 (MT1 和 MT2) 的表达模式。与对照组相比, 急性 SD 小鼠海马 MT2 的表达水平显著降低 28.6% ($P < 0.001$, 图 3-3 F)。然而, 添加 20 或 40 mg/kg Mel 可抑制急性 SD 诱导的 MT2 表达的降低, 与 SD 组相比, MT2 表达水平提高了 36.9-48.7% ($P < 0.001$, 图 3-3 F)。免疫组织化学染色显示海马不同区域 MT2 阳性细胞的分布情况 (图 3-3 A-D)。与 MT2 相比, 不同处理组间 MT1 的表达没有差异 (图 3-3 E)。

我们进一步研究了胞内信号通路是否参与了 Mel 的改善作用。结果显示, 与对照组相比, 急性 SD 小鼠海马 p-ERK 和 NRF2 的表达水平显著降低 43.8% ($P = 0.02$, 图 3-3 G) 和 26.9% ($P = 0.036$, 图 3-3 H)。然而, 在 SD 小鼠中补充 20 或 40 mg/kg Mel 可逆转急性 SD 诱导的蛋白 p-ERK 和 NRF2 表达水平的降低。而 Mel 治疗组和 CON 组无显著性差异。

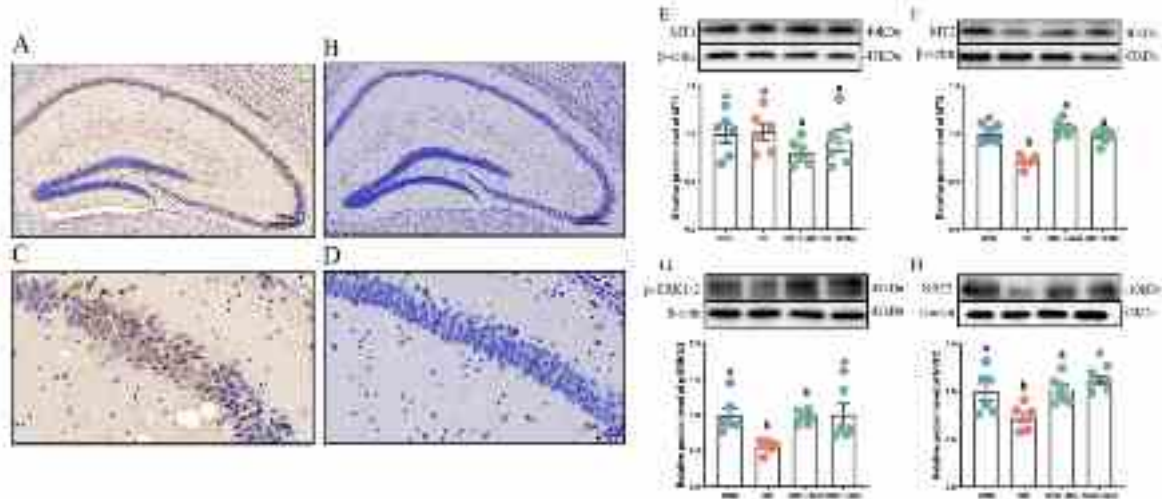


图 3-3 Mel 对急性 SD 小鼠海马 MT2/ERK/NRF2 信号转导的影响

(A, C) 海马 MT2 免疫组化染色 (比例尺为 200 μm)。棕色表示阳性细胞。(B, D) 阴性对照 (比例尺为 50 μm)。(E-H) 海马组织 MT1、MT2、p-ERK1/2 和 NRF2 相对蛋白水平。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 评估差异。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-3 Effect of Mel on MT2/ERK/NRF2 signaling in the hippocampus of acute sleep-deprived mice. (A, C) Immunohistochemical staining of MT2 in hippocampus. Brown indicates positive cells, (B, D) negative control. A-B: bar = 200 μm , C-D: bar = 50 μm . (E-H) Relative protein levels of MT1, MT2, p-ERK1/2 and NRF2 were normalized to β -actin, CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin(20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin(40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

在体外试验中, 添加 MT2 受体的特异性阻断剂 (4P-PDOT) 来评估 Mel 受体在铁死亡中的作用。MTT 结果表明, Mel 的预处理能改善 Erastin 诱导的细胞活力的降低, 而 4P-PDOT 的添加抵消了 Mel 的改善作用。与细胞活力的变化相一致, Erastin 处理 HT22 细胞后, p-ERK 和 NRF2 蛋白的表达水平显著降低 50.2% ($P < 0.001$, 图 3-4 E) 和 51.2% ($P < 0.001$, 图 3-4 F), 而 Mel 的添加能明显改善上述变化。但 Mel 的这种改善作用被 4P-PDOT 的预处理所阻断。进一步为了探讨 ERK/NRF2 信号通路在 Mel 改善 Erastin 诱导 HT22 细胞铁死亡过程中的作用机制, 同样的我们在体外添加了 ERK 的特异性阻断剂 (PD98059) 和 NRF2 的特异性阻断剂 (ML385)。结果显示, PD98059 和 ML385 的预处理抑制了 Mel 对 Erastin 诱导的细胞活力降低的改善作

用 (图 3-4 A)。

在体外, 我们进一步观察了当分别阻断 MT2、ERK 和 NRF2 时, HT22 细胞中的抗氧化状态和铁稳态的变化。对于抗氧化酶的水平, 与 Erastin+Mel 处理组相比, Erastin+Mel+4P-PDOT 预处理导致 GPX4 表达降低了 44.9% ($P = 0.004$, 图 3-4 G), SOD 表达降低了 48.1% ($P < 0.001$, 图 3-4 K), FPN 蛋白水平降低了 36.7% ($P = 0.002$, 图 3-4 J)。对于脂质过氧化产物, 与 Erastin+Mel 处理组相比, Erastin+Mel+4P-PDOT 预处理导致 ROS 水平升高了 49% ($P = 0.019$, 图 3-4 C), MDA 水平升高 69.2% ($P < 0.001$, 图 3-4 L), TFR1 水平升高 53.5% ($P = 0.043$, 图 3-4 H) 和 DMT1 水平升高 102.2% ($P < 0.001$, 图 3-4 I)。Western blot 分析和 qRT-PCR 分析的结果也证明铁转运蛋白在蛋白水平和 mRNA 水平上具有相同趋势 (图 3-4 M-O)。与 4P-PDOT 预处理相似, PD98059 和 ML385 处理逆转了 Mel 对 Erastin 诱导的变化的缓解作用。

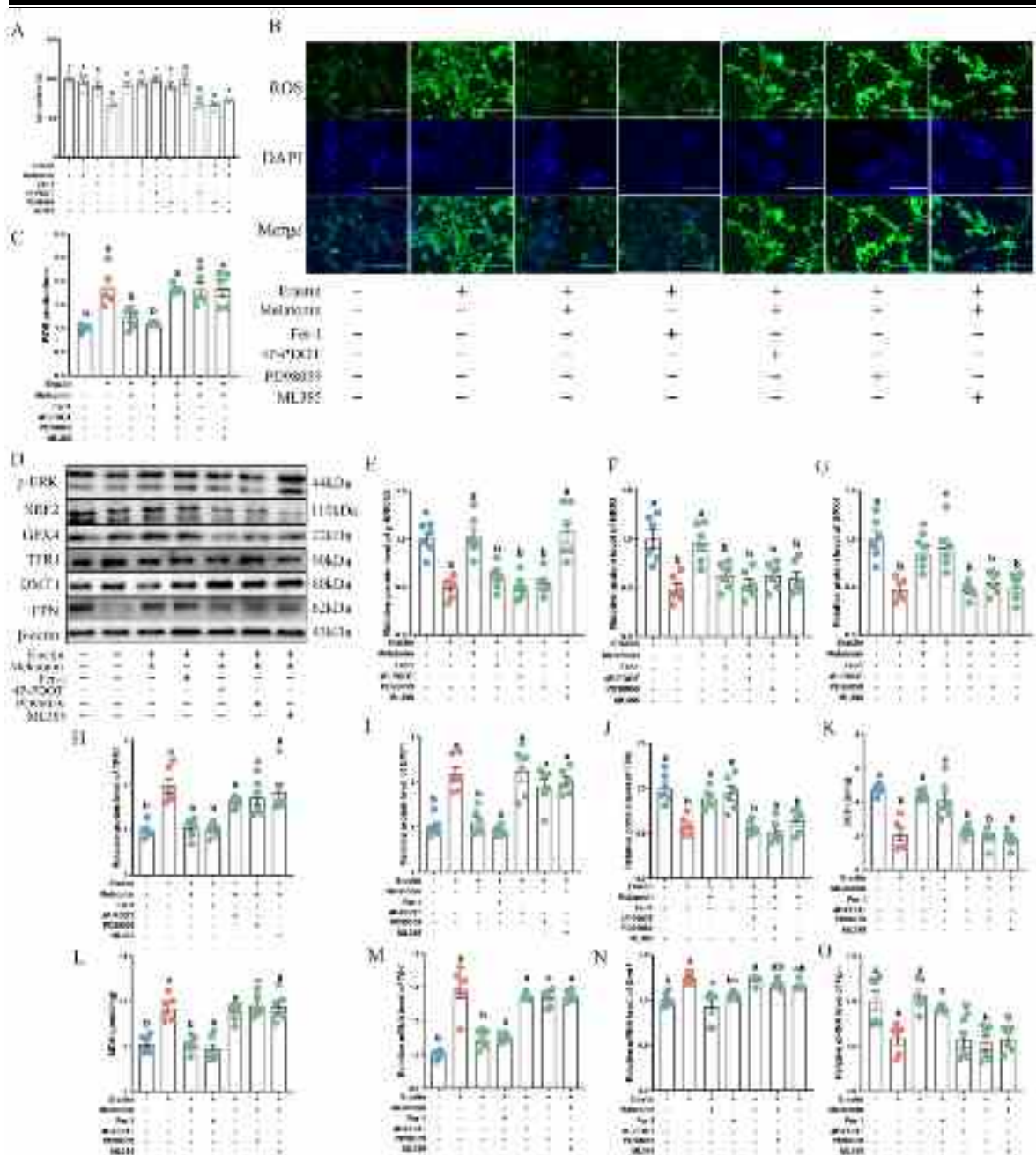


图 3-4 Mel 对 Erastin 诱导的 HT22 细胞 MT2/ERK/NRF2 信号通路的影响

(A) 细胞相对活力, (B) ROS 荧光染色, (C) ROS 相对含量, (D-J) p-ERK、NRF2、GPX4、TFR1、DMT1 和 FPN 蛋白相对表达量, (K-L) 细胞 SOD 和 MDA 的含量, (M-O) *Tfr1*、*Dmt1* 和 *Fpn* 相对 mRNA 水平。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-4 Effect of Mel on MT2/ERK/NRF2 signaling in the HT22 cells exposed to Erastin.

The HT22 cells exposed to Erastin and melatonin or Fer-1 were pretreated with 4P-PDOT, PD98059 and ML385, respectively. (A) Relative cell viability (%), (B) Fluorescence staining of ROS. Bar = 200 μ m, (C) Relative quantification of intracellular ROS level, (D-J) Relative protein levels of p-ERK1/2,

NRF2, GPX4, TFR1, DMT1 and FPN normalized to β -actin, (K-L) SOD and MDA levels, (M-O) Relative mRNA levels of iron transporter proteins (*Tfr1*, *Dmt1* and *Fpn*). The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.4 讨论

在本研究中，普鲁士蓝染色显示急性 SD 小鼠海马神经元存在明显的铁蓄积。这种现象被 Mel 补充所逆转。此外，脑出血可导致细胞内铁水平升高，导致严重的神经功能缺损、记忆障碍和脑萎缩 (Chen et al., 2019)。由于大脑是一个富含脂质的器官，它非常容易受到铁诱导的脂质过氧化的影响。在中风等急性脑部疾病中，血脑屏障被破坏，血液中的铁池突然进入脑实质，这是中风诱发的神经退行性变的重要机制 (DeGregorio-Rocasolano et al., 2019)。因此，目前的数据表明 Mel 可改善急性 SD 诱导的海马细胞铁蓄积。

细胞内铁水平由多种铁转运蛋白调节。Fe³⁺通过膜蛋白 TFR1 进入细胞，然后迁移至内含体。DMT1 介导 Fe²⁺从内含体释放到细胞质中的不稳定铁池内。铁输出部分由膜蛋白 FPN 介导，铜蓝蛋白可将 Fe²⁺氧化为 Fe³⁺ (Hao et al., 2018)。脑细胞通过改变参与铁摄取、流出、储存和动员的蛋白质表达来维持其内部铁稳态。因此，纠正铁转运蛋白的失衡是维持细胞内铁稳态的关键 (Masaldan et al., 2019)。在本研究中，Mel 的补充显著改善了急性 SD 诱导的 TFR1 和 DMT1 上调，以及 FPN 的下调，最终抑制了细胞内铁的过量蓄积。这些结果证实了 Zhang 等人的一项研究，该研究发现各种铁转运蛋白的紊乱导致 P301S 小鼠（一种阿尔茨海默氏症模型）的海马和皮质中的铁死亡 (Zhang et al., 2018)。重要的是，在体外试验中，我们发现 Mel 或 Fer-1 逆转了 Erastin 诱导的 HT22 细胞中的铁转运蛋白异常。因此，我们的体内和体外试验都表明，Mel 通过改善铁转运蛋白异常来减轻急性 SD 诱导的海马神经元铁死亡。

过量的活性铁提供电子，通过 Fenton 反应产生持续不断的 ROS，促进脂质过氧化并引发细胞铁死亡 (Dixon and Stockwell, 2014)。许多研究人员认为 ROS 和 MDA 的积累反映了细胞铁死亡的进程 (Yamada et al., 2020)，而 GPX4 和 SOD 是清除过量 ROS 和 MDA 的关键抗氧化酶 (Galaris et al., 2019)。GPX4 在铁死亡中的作用尤为重要，研究报告称，前脑神经元中 GPX4 的缺失会促进认知障碍和神经退行性变 (Hangauer et al., 2017)。在本研究中，与铁的积累一致，我们观察到急性 SD 小鼠海马中 ROS 和 MDA 水平增加，以及 SOD 和 GPX4 表达的减少，这些效果被 Mel 的补充所逆转。与体内结果相似，Mel 或 Fer-1 在体外逆转了 Erastin 诱导的 HT22 细胞中 GPX4 和 SOD 减少 ROS 和 MDA 的增加，表明 Mel 可以增加抗氧化酶的活性从而抑制急性 SD 小鼠海马中的氧化应激和铁死亡。这些结果证实了我们之前的推测，Mel

可以通过抑制铁死亡来改善急性 SD 引起的记忆障碍。

接下来,我们进一步探讨了 Mel 发挥其改善作用的机制。Mel 通过其两种膜受体调节哺乳动物的许多生理过程: MT1 和 MT2 (Pandi-Perumal et al., 2008)。然而,在我们的体内试验中,急性 SD 降低了小鼠海马中 MT2 的表达。而急性 SD 的这种抑制作用被 Mel 的补充所逆转,但无论是否给予 Mel 的补充,急性 SD 小鼠的 MT1 受体均未发生变化。体外试验进一步证实 Mel 预处理抑制了 HT22 细胞中 Erastin 引起的铁死亡,而 Mel 的抑制作用被 MT2 特异性拮抗剂 4P-PDOT 阻断。此外,一些研究人员进行了更深入的讨论。他们在脑缺血模型中将 Mel 的添加与 4P-PDOT 相结合,结果表明,添加 4P-PDOT 抵消了 Mel 对脑缺血诱导的铁死亡的神经保护作用 (Rui et al., 2021)。

MT2 受体通过下游信号通路如 MAPKs/ERK 和 NRF2 发挥调控作用 (Pandi-Perumal et al., 2008)。在本研究中,体内试验显示急性 SD 小鼠中 p-ERK 和 NRF2 表达降低,与海马 MT2 水平的降低一致。然而, Mel 的补充逆转了上述变化。一些报告表明,激活 ERK 通路能够改善 Erastin 诱导的小鼠海马 HT22 细胞铁死亡 (Hirata et al., 2019)。此外, NRF2 在铁死亡中起着关键作用 (Dodson et al., 2019),参与铁死亡诱导和抑制的主要蛋白质和酶由 NRF2 转录因子所编码。有趣的是,在我们的体外试验中,PD98059 和 ML385 的添加阻断了 Mel 对 Erastin 诱导的细胞铁死亡的改善作用。相比之下,4P-PDOT 和 PD98059 的处理阻断了 Mel 对 p-ERK 的上调作用,而 ML385 对其没有影响。之前的一项研究报告,天麻素可以通过 NRF2/HO-1 信号通路改善 HT22 细胞中由谷氨酸引起的氧化应激和铁死亡 (Jiang et al., 2020)。

综上,我们的研究结果表明, Mel 通过与 MT2 受体结合从而激活 ERK/NRF2 信号通路,最终抑制急性 SD 诱导的海马神经元铁死亡。

1.5 小结

总得来说,急性 SD 引起海马神经元内铁积累和脂质过氧化增加,从而导致海马铁死亡的发生。然而,补充外源性 Mel 可减轻急性 SD 引起的神经元铁死亡,这可能是由于 Mel 与 MT2 受体结合,进而激活 ERK/NRF2 信号通路,从而下调 TFR1 和 DMT1,上调 FPN,并激活 GPX4 和 SOD,最终改善铁转运蛋白异常和脂质过氧化。该结果表明神经元铁死亡是急性 SD 诱导神经元丢失和小鼠记忆损伤的机制之一。

2. 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的小鼠海马神经元自噬和凋亡

2.1 引言

在多细胞生物组织稳态的正常发育和维持过程中,以及消除受损、感染或衰老的

细胞过程中,程序性细胞死亡是必需的,这些过程依赖于严密调控的程序性死亡信号事件。在外界刺激下,机体在应对过程中并不是只存在一种细胞死亡方式,不同的死亡方式之间能够共同存在或互相促进。细胞凋亡也被称为 I 型程序性细胞死亡;自噬则被称为 II 型程序性细胞死亡。凋亡和自噬是两种显著不同的细胞死亡形式,在不同的方面他们都具有明显的不同,但两者又不是两个完全独立的过程。许多研究表明,凋亡和自噬的作用以及功能在某些情况下也是相互影响和制约的。自噬和凋亡之间有三种不同类型的相互作用 (Zhou et al., 2021a),而且每种类型都对应着相应的特定的细胞类型、刺激和环境。第一种是互相协同关系,他们能够在一个时刻共同促进细胞死亡。第二种是自噬可以通过促进细胞存活而拮抗细胞的凋亡效应。比如,可以通过去除因氧化应激受损的细胞器,或降解变性的大分子物质,为饥饿的细胞提供生存所需要的营养和能量;或者通过降解未折叠的蛋白来抑制内质网应激。自噬的这些功能将会抑制促凋亡信号的产生,从而起到拮抗细胞凋亡的作用。第三种是自噬有时虽然自身并没有导致细胞死亡,但却参与了细胞凋亡的过程。比如自噬参与了一些 ATP 依赖的凋亡过程。总得来说,自噬能够作为凋亡的上游步骤参与调控。但是目前尚不清楚急性 SD 诱导小鼠认知障碍的过程中,自噬和凋亡是否参与其中。褪黑激素能够通过降低氧化应激的水平,提高机体的抗氧化水平从而削弱细胞凋亡的发生 (Luengo et al., 2019)。甲基苯丙胺 (METH) 的毒性作用能导致细胞的过度自噬,而 Mel 能有效的逆转该现象,降低自噬细胞的死亡 (Hossain et al., 2021)。但 Mel 在急性 SD 模型下细胞凋亡和自噬中的作用尚不清楚。

因此本研究通过检测各组海马中凋亡和自噬相关蛋白, NF- κ B 通路蛋白和抗氧化指标来探究急性 SD 对细胞凋亡和自噬水平的影响,并探究外源性 Mel 的补充是否有改善作用以及具体的作用机制。

2.2 材料与方法

2.2.1 试验动物的处理

48 只 8 周龄雄性 ICR 小鼠分为 4 组: CON 组、SD 组、SD+L-Mel 组、SD+H-Mel 组,所有小鼠的处理操作同第二章第一节。

2.2.2 试验动物的取材

48 只小鼠在连续 72 h 睡眠剥夺后于早上 8:00 进行取材,采用 1%的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉,并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4%多聚甲醛固定,同组的剩余 8 只小鼠取出双侧海马,立即放入液氮速冻半小时再转移至 -80 °C 冰箱用于 qRT-PCR、Western blot 和抗氧化试剂盒检测。

2.2.3 主要仪器和设备

高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler® 480, Roche Applied Science, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、酶标仪 (BLO-RAD, 550 型, 美国)、电泳仪 (伯乐生命医学产品有限公司, 上海)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上海)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、二氧化碳培养箱 (MCO-17AC, 三洋, 日本)、超净工作台 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司)

2.2.4 试剂药品及试剂

TRNzol Reagent 总 RNA 提取试剂 (CW0580A, 康为世纪生物技术有限公司, 江苏)、反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Boston, USA)、兔抗小鼠 Cleaved caspase-3 多克隆抗体 (ab32042, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Bax 多克隆抗体 (ab32503, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Bcl-2 (ab32124, abcam, 美国)、兔抗小鼠 LC3II 多克隆抗体 (EPR18709, abcam, 美国)、兔抗小鼠 ATG5 多克隆抗体 (CSB-PA190654, 武汉华美生物工程有限公司, 武汉)、兔抗小鼠 Beclin1 多克隆抗体 (ab210498, abcam, 美国)、兔抗小鼠 p-P65 多克隆抗体 (ab76302, abcam, 美国)、兔抗小鼠 p-I κ B 多克隆抗体 (2859, Cell Signaling Technology, 美国)、兔抗小鼠 β -actin、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、脱脂奶粉 (中国伊利)、BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014)、RIPA 裂解液 (CW2333)、蛋白酶抑制剂 (CW2200)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (CW0027)、SDS-PAGE Loading Buffer (5 \times) (CW0027), 均购自江苏康为世纪生物科技有限公司、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、DMEM (SH30023.01B, HyClone, 北京)、胎牛血清 (11012-8611, 浙江天杭生物科技股份有限公司, 浙江)、青链霉素混合液 100 \times (P1400, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)、0.25% Trypsin (T1350, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)。

2.2.5 Western blot 试验

试验操作同第三章第一节, 兔抗小鼠 Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、LC3II、ATG5、Beclin1、p-I κ B 和 p-P65 多克隆抗体浓度都为 1:1000, β -actin 多克隆抗体的浓度为 1:8000。Western blot 以 β -actin 为内参, 目的蛋白的相对表达量为目的蛋白水平/ β -actin 蛋白水平。

2.2.6 细胞试验

2.2.6.1 细胞株

小鼠海马神经元细胞系 HT22，液氮保存。

2.2.6.2 试剂配置

(1) 梯度 Mel 的配制：称取 1 g Mel 于 4 mL 离心管中，在超净台内，加入 200 μL DMSO 和 800 μL 的基础培养基，终浓度为 10 mM。而后进行梯度稀释，配制终浓度为 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M 和 10^{-9} M 的 Mel 以及 DMSO 和空白对照。用无菌滤器过滤，于 -20°C 保存备用。

(2) 梯度 H_2O_2 的配制吸取 1 mL H_2O_2 于 4 mL 离心管中，在超净台内，加入 1.8 mL 基础培养基，终浓度为 1 M。而后进行梯度稀释，配制终浓度为 800 μM 、600 μM 、400 μM 、300 μM 、200 μM 、150 μM 的 H_2O_2 以及空白对照。用无菌滤器过滤，于 -20°C 保存备用。

2.2.6.3 细胞计数和培养

(1) 将离心后的细胞沉淀重悬后进行细胞计数与分盘试验。将细胞分别以 1×10^5 个/mL 和 5×10^6 个/mL 的密度培养至 96 孔板和 12 孔板中。这两种孔板的细胞进行分组：CON 组、 H_2O_2 组、Mel 组和 H_2O_2 +Mel 组。

(2) 将分盘好的各组细胞放入培养箱中培养 6 h，待细胞完全贴壁后倒掉上清，换成同等体积的基础培养基，再继续放入培养箱中培养。

(3) 12 h 后，向 Mel 组和 H_2O_2 +Mel 组细胞中加入 1 μM Mel，加药结束后继续放入培养箱中培养。

(4) 培养 30 min 后，向 H_2O_2 组和 H_2O_2 +Mel 组细胞加入 200 μM H_2O_2 ，同时向 CON 组细胞加入等量的 DMSO，随后将加药后的细胞放入培养中继续培养。

(5) 培养 20 h 后，从培养箱中取出细胞，96 孔板的细胞用于 MTT 的检测；12 孔板的细胞收集起来后进行 Western blot 和抗氧化水平检测。

2.2.6.4 MTT 试验

试验步骤同第三章第二节 1.2.9.6。

2.2.7 抗氧化物酶 (GSH-PX 和 CAT)、T-AOC 的检测

2.2.7.1 GSH-PX 的检测

(1) 样品的准备：

称取约 30 mg 的海马组织并按照 1:9 加入匀浆液，在 4 °C 条件下用匀浆仪进行匀浆。随后在 4 °C、12000 g 条件下离心 10 min。吸取上清移至新的 EP 管中用于酶活性的测定。

(2) 检测试剂盒准备工作:

30 mM NADPH 的配制: 吸取 600 μ L 双蒸水加入试剂盒中提供的 15 mg NADPH 中，轻轻晃动以充分溶解并混匀。

84 mM GSH 溶液的配制: 在 14 mg GSH 中加入 550 μ L Milli-Q 级纯水，轻轻晃动以充分溶解并混匀。

GPx 检测工作液的配制: 计算出待测样品的数量，包括对照组，根据下表的配方配制适量的检测工作液体。

可测定样品数 (含对照)	1 个样品
20 mM NADPH	5 μ L
84 mM GSH	5 μ L
谷胱甘肽还原酶	1.6 μ L
GPx 检测工作液体积	11.6 μ L

15 mM 过氧化物试剂溶液的配制: 将 21.5 μ L 的过氧化物试剂 (t-Bu-OOH) 溶液与 10 mL 的 Milli-Q 级纯水混合，轻轻晃动以充分混匀，即配制成功。

(3) 样品测定:

使用 96 孔板根据下表依次加入待测样品、检测缓冲液和 GPx 检测工作液，轻轻晃动以充分混匀。吸取 4 mL 15 mM 过氧化物试剂溶液加入后，即开始反应。反应时需要充分混匀，也可利用培养板振荡器。

检测反应体系	空白对照	样品本底对照	样品
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	185 μ L	179-187 μ L	175-183 μ L
待测样品	—	2-10 μ L	2-10 μ L
GPx 检测工作液	11 μ L	11 μ L	11 μ L
1.5 mM 过氧化物试剂溶液	4 μ L	—	4 μ L
总体积	200 μ L	200 μ L	200 μ L

利用合适的酶标仪或者微量紫外分光光度计测定 A340 下的 OD 值。

每隔 2 min 或者连续检测 10 min 连续测定 A340 下的 OD 值。

(4) 谷胱甘肽过氧化物酶活力的计算:

[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力]=[检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力]×
[稀释倍数]/[样品中的蛋白浓度]

[样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力]的单位为: U/mg 蛋白或 mU/mg 蛋白;

[样品中的蛋白浓度]的单位为：mg/mL。

2.2.7.2 CAT 的检测

(1) 样品的准备：

用试剂盒中提供的裂解液裂解约 30 mg 的海马组织，按照 1:9 的稀释比例添加裂解液，在低温环境进行振荡，65Hz，2 min。随后在 4 °C、12000 g 条件下离心 10 min。吸取上清移至新的 EP 管中用于酶活性的测定。

(2) 试剂盒的准备工作：

250 mM 过氧化氢溶液的配制：由于过氧化氢是非常不稳定的，在试验之前根据试剂盒说明检测过氧化氢的实际浓度。使用过氧化氢酶检测缓冲液将 1M 的过氧化氢稀释 100 倍后使过氧化氢的浓度约为 10 mM，在 A240 下检测波长，然后根据过氧化氢浓度 (mM) = 2.94 × A240 从而计算出过氧化氢的实际浓度。

5 mM 过氧化氢溶液的配制：根据前期测好的实际过氧化氢浓度配制 5 mM 过氧化氢溶液。

显色工作液的配制：取适量的过氧化物酶，按照 1:1000 的比例用显色底物稀释，配制成显色工作液。

(3) 标准曲线制备：

准备 5 个 1.5 mL 的离心管，向里面加入 0、12.5、25、50 或 75 μL 的 5 mM 过氧化氢溶液，然后用过氧化氢酶检测缓冲液补齐至 100 μL，混匀。再各管中吸取 4 μL 加入 96 孔板内。再加入 200 μL 显色工作液。25 °C 至少孵育 15 min 后测定 A520，但孵育时间不宜超过 45 min。

(4) 样品测定：

检测反应体系	空白对照	样品
样品体积	0 μL	X μL
过氧化氢检测	40 μL	40-x μL
250 mM 过氧化氢液	10 μL	10 μL

根据上表的配方，取 x μL (0-40 μL) 样品至 1.5 mL 离心管中，再向其中加入检测缓冲液补齐至 40 μL (即加入 40-x μL 过氧化氢酶检测缓冲液)，混匀。之后向管内加入 250 mM 过氧化氢溶液 10 μL，迅速混匀后在 25 °C 反应 1-5 min。

反应结束后向管内加入过氧化氢酶反应终止液 450 μL，颠倒混匀终止反应。

准备一个新的离心管并向里面加入 40 μL 过氧化氢酶检测缓冲液，再加入 10 μL 上述已经反应后的液体，混匀。

准备一个新的 96 孔板，从上一步的 50 μL 体系中取 10 μL 加入到孔板内。再加

入 200 μL 显色工作液。

25 $^{\circ}\text{C}$ 至少孵育 15 min 后测定 A520，但孵育时间不宜超过 45 min。

(5) 样品中过氧化氢酶活力的计算：

标准曲线的计算。 $A520 = k[\text{过氧化氢微摩尔数}] + b$ ，由标准曲线计算出 k 和 b 的值。

样品中残余的过氧化氢微摩尔数的计算。残余过氧化氢微摩尔数 = $(A520 - b) / k$ 。

过氧化氢酶活力单位的定义：1 个酶活力单位 (1 unit) 在 25 $^{\circ}\text{C}$ ，pH 7.0 的条件下，在 1min 内可以催化分解 1 微摩尔过氧化氢。

2.2.7.3 T-AOC 的检测

(1) FRAP 工作液的配制：

参考下表，根据待测定样品的数量（含标准曲线）配制适量的 FRAP 工作液：

检测反应体系	1 个检测
TPTZ 稀释液	150 μL
TPTZ 溶液	15 μL
充分混匀后再加入检测缓冲液	
检测缓冲液	15 μL
FRAP 工作液	180 μL

FRAP 工作液配制后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育，并宜在 1~2 h 内使用完毕。

(2) 待测样品的准备：

取约 30 mg 海马组织加入 100 μL PBS 溶液（注意是冰冷的，温度过高会破坏样品的稳定性），匀浆以充分破碎组织并释放其中的抗氧化物，4 $^{\circ}\text{C}$ 约 12000 g 离心 5 min，取上清用于后续测定。

(3) 标准曲线测定：

称取 27.8 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 药品，用蒸馏水将其溶解并定容到 1 mL，此时浓度即为 100 mM。取适量 100 mM FeSO_4 溶液稀释至 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mM。通常可以使用蒸馏水或样品配制溶液配制标准品。

(4) 总抗氧化能力的测定：

准备一个 96 孔板，向每个检测孔中加入 180 μL FRAP 工作液。

样品的加样：5 μL 蒸馏水或 PBS 用于制作空白对照；将之前配制好的标准溶液加入 96 孔板的孔内制备标准曲线；将制备好的样品加入 96 孔板内。轻轻混匀。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 3~5 min 后测定 A593。

根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力。如果样品测定出来的吸光度在标 准

曲线范围以外，需把样品适当稀释后再进行测定。

总抗氧化能力的表示方式：对于 FRAP 方法，总抗氧化能力用 FeSO_4 标准溶液的浓度来表示。

2.2.8 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值±标准误 (SEM)。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

2.3 结果

2.3.1 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元凋亡

为探讨急性 SD 是否引起海马神经元凋亡，我们采用 Western blotting 检测 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达水平。结果显示与对照组相比，急性 SD 组 Cleaved caspase-3 和 bax 表达量显著升高 103.2% (P=0.001, 图 3-5 A) 和 50.0% (P=0.001, 图 3-5 B)，而 Bcl-2 表达量降低了 31.1% (P = 0.01, 图 3-5 C)。然而，给予急性 SD 小鼠补充 20 mg/kg Mel 后，SD + L-Mel 组 Cleaved caspase-3 和 Bax 的表达量比急性 SD 组降低了 44.3% (P = 0.001, 图 3-5 A) 和 30.1% (P = 0.001, 图 3-5 B)，而 Bcl-2 的表达量升高了 62.2% (P = 0.002, 图 3-5 C)。SD+H-Mel 组也表现出类似于 SD+L-Mel 组的变化。

为了确认 Mel 对 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞凋亡的影响，我们检测了 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达水平。结果显示 H_2O_2 处理的 HT22 细胞中 Cleaved caspase-3 和 Bax 比对照组 HT22 细胞升高了 79.3% (P=0.001, 图 3-5 D) 和 130.8% (P=0.002, 图 3-5 E)，而 Bcl-2 的蛋白表达水平降低了 50.9% (P=0.03, 图 3-5 F)。而 Mel 的预处理逆转了 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞凋亡的变化 (图 3-5 D-F)。

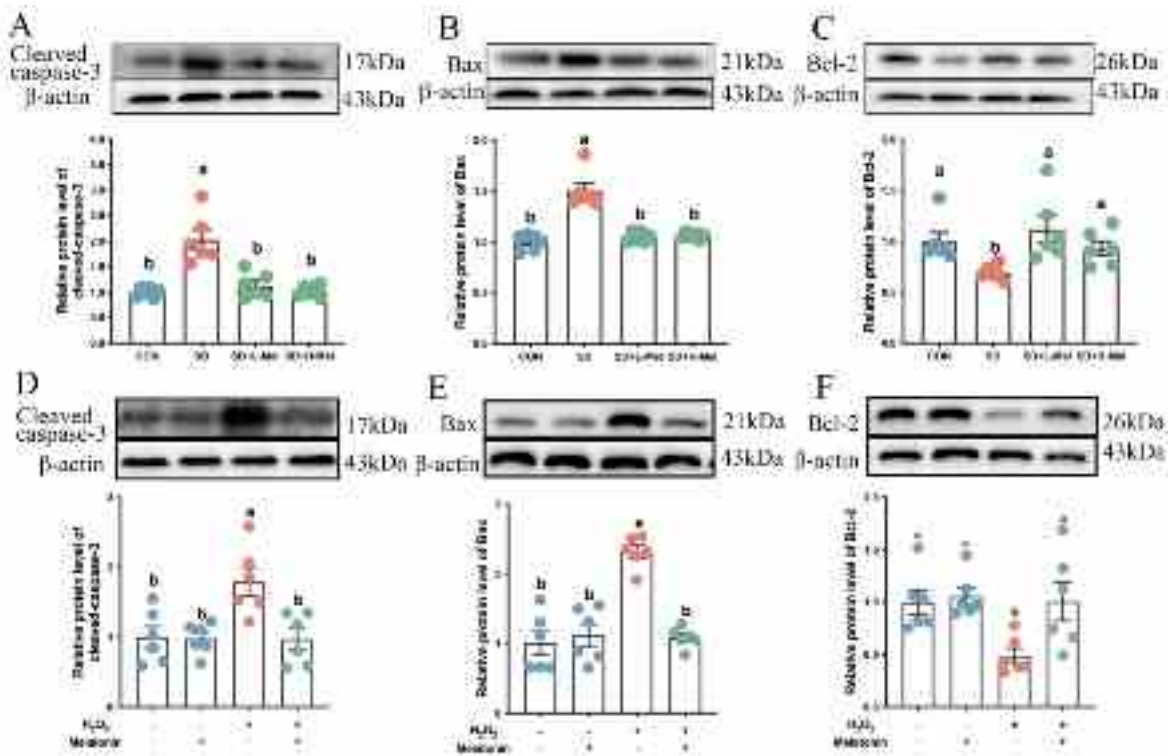


图 3-5 Mel 对急性 SD 小鼠海马凋亡蛋白的影响

(A-C) 海马组织 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的相对蛋白表达水平；(D-F) H_2O_2 和 Mel 处理后 HT22 细胞 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的相对蛋白表达水平。CON: 对照组；SD: 睡眠剥夺组；SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组；SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-5 Effect of Mel on apoptosis-related proteins in hippocampus of acute sleep-deprived mice. (A-C) Relative levels of Cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 in the hippocampus, (D-F) Relative levels of Cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 in HT22 cells exposed to H_2O_2 and melatonin. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.2 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元自噬

为探讨急性 SD 是否引起海马神经元自噬,我们采用 Western blotting 检测 Beclin1, ATG5 和 LC3II/LC3I 的表达水平。结果显示与对照组相比,急性 SD 组 LC3II/LC3I, ATG5 和 Beclin1 的表达量显著升高 138.2% ($P=0.001$, 图 3-6 C), 99.5% ($P=0.001$, 图 3-6 B) 和 77.5% ($P<0.001$, 图 3-6 A)。然而,给予急性 SD 小鼠补充 20 mg/kg Mel

后, SD+L-Mel 组 LC3II/LC3I, ATG5 和 Beclin1 的表达量比急性 SD 组降低了 58.2% ($P = 0.001$, 图 3-6 C), 36.8% ($P = 0.001$, 图 3-6 B) 和 36.2% ($P < 0.001$, 图 3-6 A)。SD+H-Mel 组也表现出类似于 SD+L-Mel 组的变化。

为了确认 Mel 对 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞自噬的影响, 我们同样检测了 LC3II/LC3I, ATG5 和 Beclin1 的表达水平。结果显示 H_2O_2 处理的 HT22 细胞中 LC3II/LC3I, ATG5 和 Beclin1 比对照组 HT22 细胞升高了 21.6% ($P = 0.005$, 图 3-6 F), 79.3% ($P = 0.001$, 图 3-6 E) 和 75.3% ($P = 0.001$, 图 3-6 D)。而 Mel 的预处理逆转 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞自噬的变化 (图 3-6 D-F)。

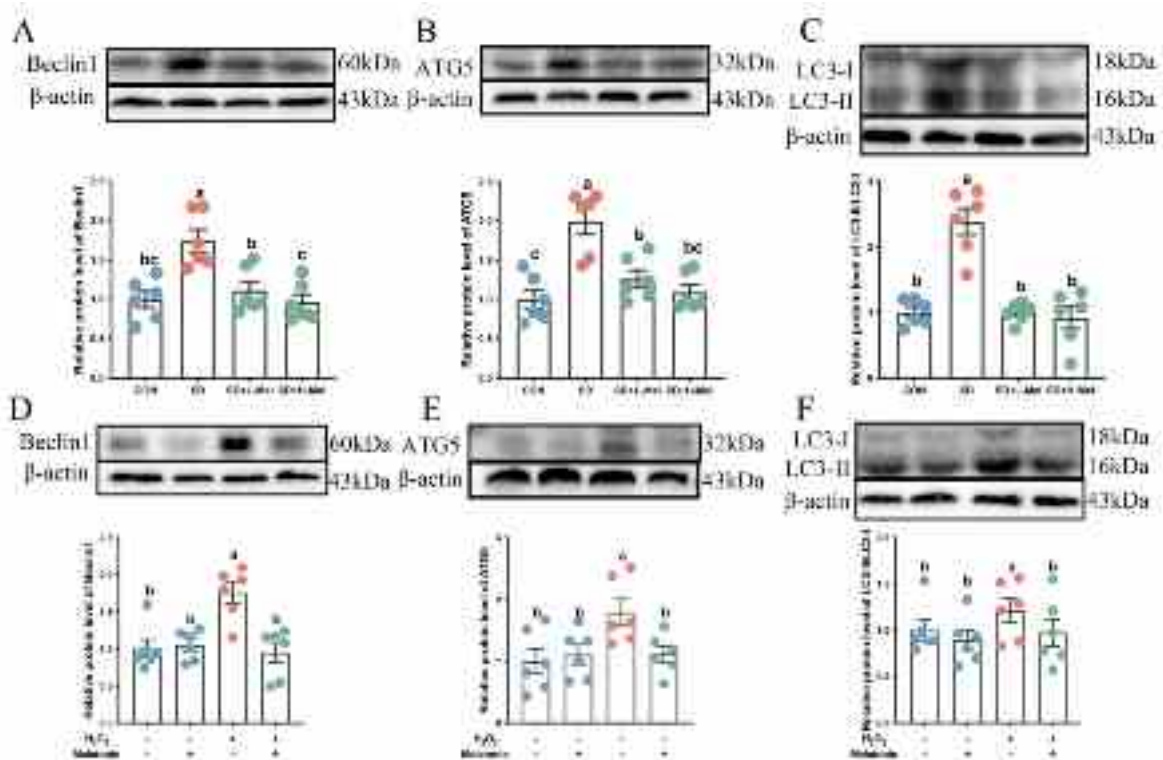


图 3-6 Mel 对急性 SD 小鼠海马自噬蛋白的影响

(A-C) 海马组织 Beclin1, ATG5 和 LC3II/LC3I 的相对蛋白表达水平; (D-F) H_2O_2 和 Mel 处理后 HT22 细胞 Beclin1, ATG5 和 LC3II/LC3I 的相对蛋白表达水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-6 Effect of Mel on autophagy-related proteins in hippocampus of acute sleep-deprived mice. (A-C) Relative levels of Beclin1, ATG5 and LC3II/LC3I in the hippocampus, (D-F) Relative levels of Beclin1, ATG5 and LC3II/LC3I in HT-22 cells exposed to H_2O_2 and melatonin. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard

error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.3 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元的氧化应激

为了评估 Mel 对急性 SD 引起的氧化应激的影响，我们测定了抗氧化酶和总抗氧化能力。结果显示与对照组相比，急性 SD 小鼠海马 GSH-PX, CAT 和 T-AOC 的水平显著降低了 50.6% ($P = 0.006$, 图 3-7 A), 54.4% ($P = 0.001$, 图 3-7 B) 和 33.0% ($P < 0.001$, 图 3-7 C)。然而，给予急性 SD 小鼠补充 20 mg/kg Mel 后，SD + L-Mel 组 GSH-PX, CAT 和 T-AOC 的水平比急性 SD 组升高了 106.0% ($P = 0.001$, 图 3-7 A), 70.9% ($P < 0.001$, 图 3-7 B) 和 40.6% ($P < 0.001$, 图 3-7 C)。SD+H-Mel 组也表现出类似于 SD+L-Mel 组的变化。

为了确认 Mel 对 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞抗氧化水平的影响，我们同样检测了 GSH-PX, CAT 和 T-AOC 的水平。结果显示 H_2O_2 处理的 HT22 细胞中 GSH-PX, CAT 和 T-AOC 的水平比对照组 HT22 细胞降低了 19.4% ($P = 0.007$, 图 3-7 D), 30.5% ($P < 0.001$, 图 3-7 E) 和 16.7% ($P = 0.001$, 图 3-7 F)。而 Mel 的预处理逆转 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞抗氧化水平失衡的变化 (图 3-7 D-F)。

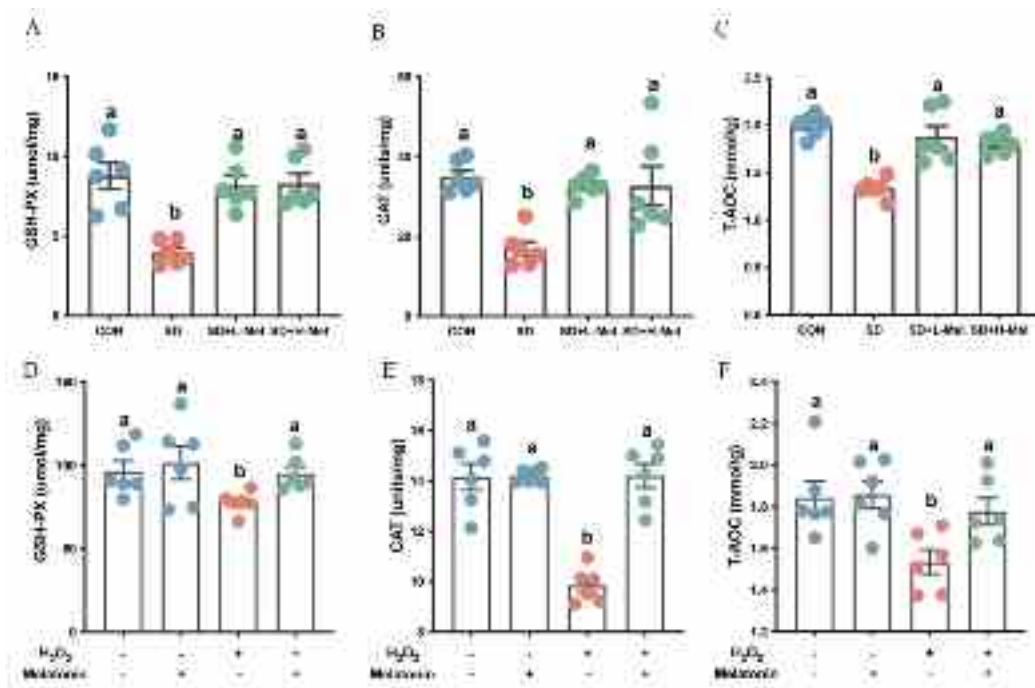


图 3-7 Mel 对急性 SD 小鼠海马抗氧化水平的影响

(A-C) 海马组织 GSH-PX, CAT 和 T-AOC 的相对蛋白表达水平; (D-F) H_2O_2 和 Mel 处理后 HT22 细胞 GSH-PX, CAT 和 T-AOC 的相对蛋白表达水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40

mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-7 Effect of Mel on hippocampal antioxidant level in acute sleep-deprived mice.

(A-C) Relative levels of GSH-PX, CAT and T-AOC in the hippocampus, (D-F) Relative levels of GSH-PX, CAT and T-AOC in HT22 cells exposed to H_2O_2 and melatonin. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.4 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠海马神经元中 NF- κ B 通路的激活

与抗氧化指标的变化类似, 急性 SD 激活了 NF- κ B 信号通路。与对照组相比, 急性 SD 之后, 海马组织中 p-P65 的蛋白表达水平增加了 63.3% ($P = 0.102$, 图 3-8 A), p-I κ B 的蛋白表达水平增加了 124.6% ($P < 0.001$, 图 3-8 B)。然而, 与急性 SD 组相比, 20 mg/kg 的 Mel 添加之后, 海马中 p-P65 的蛋白表达水平降低 33.7% ($P = 0.152$, 图 3-8 A), p-I κ B 的蛋白表达水平也降低了 59.2% ($P = 0.001$, 图 3-8 B)。SD+H-Mel 组也表现出类似于 SD+L-Mel 组的变化。

为了确认 Mel 对 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞内 NF- κ B 信号通路的影响, 我们同样检测了细胞中 p-P65 和 p-I κ B 的蛋白表达情况。结果显示 H_2O_2 处理的 HT-22 细胞中 p-P65 和 p-I κ B 的蛋白表达水平比对照组 HT22 细胞降低了 85.4% ($P = 0.006$, 图 3-8 C) 和 102.7% ($P = 0.001$, 图 3-8 D)。而 Mel 的预处理逆转了 H_2O_2 诱导的 HT22 细胞内 NF- κ B 信号通路的激活。

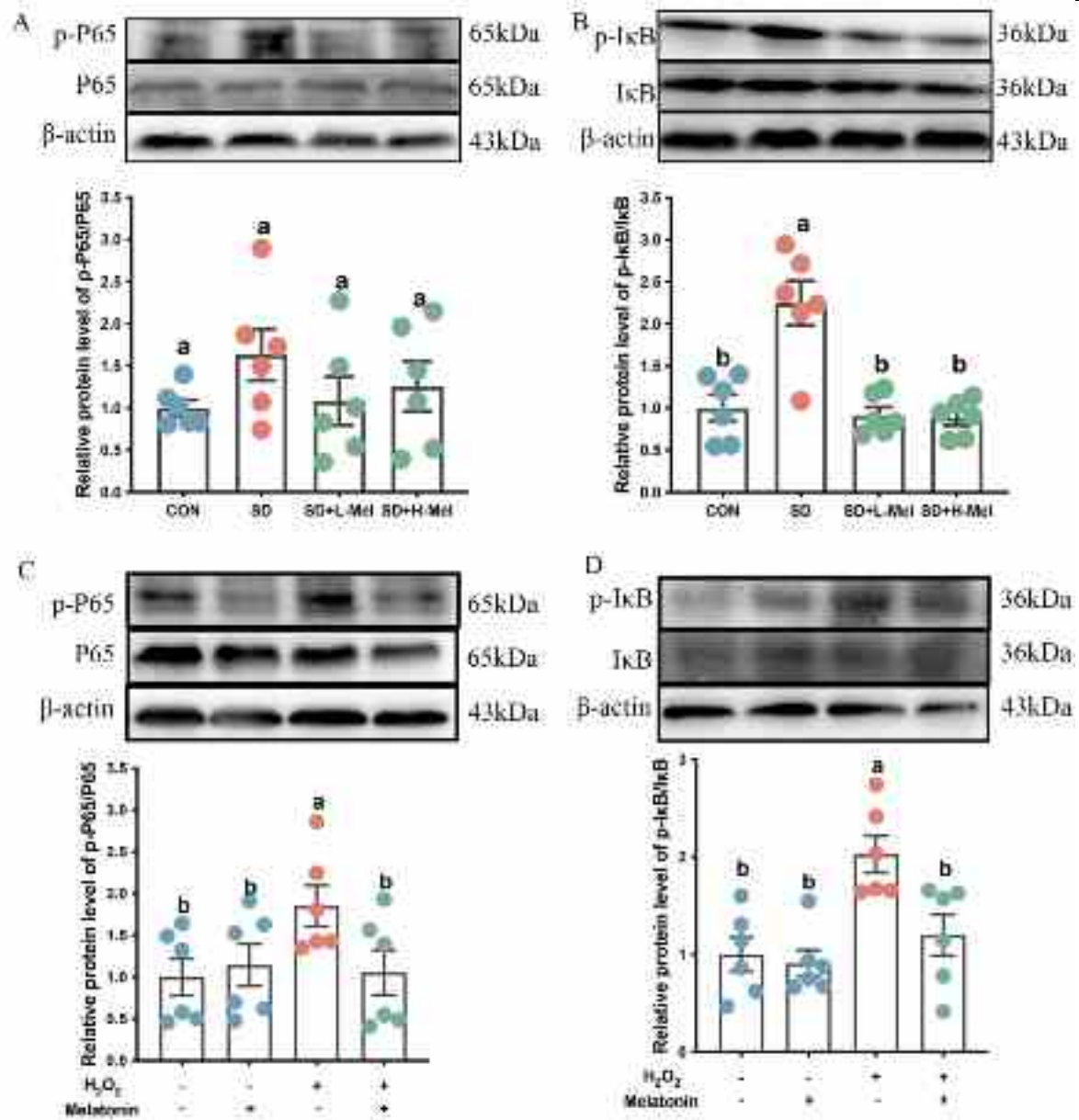


图 3-8 Mel 对急性 SD 小鼠海马 NF-κB 信号通路的影响

(A-B) 海马组织 p-P65 和 p-IκB 的相对蛋白表达水平, (C-D) H₂O₂ 和 Mel 处理后 HT22 细胞 p-P65 和 p-IκB 的相对蛋白表达水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+L-Mel: 睡眠剥夺+低剂量 (20 mg/kg) Mel 干预组; SD+H-Mel: 睡眠剥夺+高剂量 (40 mg/kg) Mel 干预组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05); 同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 3-8 Effect of Mel on NF-κB signaling pathway in hippocampus of acute sleep-deprived mice. (A-B) Relative levels of p-P65 and p-IκB in the hippocampus, (D-F) Relative levels of p-P65 and p-IκB in HT22 cells exposed to H₂O₂ and melatonin, CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + L-Mel: SD + low melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD + H-Mel: SD + high melatonin (40 mg/kg) supplement group. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not

sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.4 讨论

之前的研究发现急性 SD 能够导致海马神经元的丢失, 细胞凋亡和过度自噬是神经元丢失的重要致病因素 (Li et al., 2015)。此外, 自噬与细胞凋亡有着复杂的相互作用。各种应激途径依次引发同一细胞内的自噬和凋亡。自噬是一种溶酶体介导的降解过程, 其中功能障碍的细胞器和大分子被隔离到自噬囊泡中并传递到溶酶体。最终, 自噬载体分子被降解并回收, 以维持细胞生物能量稳态并支持应激条件下的生物合成过程, 比如营养剥夺 (Ghavami et al., 2014)。维持基础自噬有利于神经元消除功能障碍的蛋白质或细胞器, 而自噬受损或过度自噬可能导致神经变性, 如广泛的神经元损失 (Hara et al., 2006)。许多蛋白质, 包括 LC3II/LC3I、Beclin-1 和 ATG5, 都积极参与自噬过程。本研究发现急性 SD 小鼠海马区 LC3II/LC3I、Beclin-1 和 ATG5 表达升高, 提示急性 SD 诱导过度自噬。然而, Mel 的治疗可以降低急性 SD 小鼠海马内 LC3II/LC3I、Beclin-1 和 ATG5 的表达。同时, 对 HT22 细胞进行的体外试验证实, Mel 可以抑制 H_2O_2 诱导的 LC3II/LC3I、Beclin-1 和 ATG5 的升高。体内和体外试验都表明 Mel 可以抑制海马神经元内的过度自噬。细胞凋亡被广泛认为是调节细胞死亡的主要机制, 不仅在细胞损伤或应激过程中开始, 而且在正常发育和形态发生过程中也开始。某些有丝分裂后的细胞(如神经元)的过度自噬会导致细胞凋亡 (McKernan et al., 2009)。Bcl-2 和 Bax 都属于 Bcl-2 家族成员, 但分别在内在凋亡途径中发挥相反的作用 (Fuchs and Steller, 2011)。Cleaved caspase-3 是 Caspase 家族成员的主要刽子手, 在许多细胞凋亡事件中起关键作用 (Larsen and Sørensen, 2017)。在本研究中, 急性 SD 小鼠的海马内发现了神经元凋亡现象, 表现为 Cleaved caspase-3 和 Bax 的升高和 Bcl-2 的降低, 这可以通过 Mel 的治疗来抵消。在 H_2O_2 诱导的 HT-22 细胞上, Mel 显著抑制 Cleaved caspase-3 和 Bax 并增强 Bcl-2 的表达。因此, 体内和体外试验均表明 Mel 可有效缓解海马神经元异常凋亡。

在上一章中, 我们发现急性 SD 诱导小胶质细胞的过度活化和神经炎症反应, 过度的炎症反应会促进细胞启动异常的程序化死亡模式。在此过程中, NF- κ B 通路调控了炎症反应和随后的凋亡的发生, NF- κ B 被隔离在细胞质中, 一旦在氧化应激下, 它会转位到细胞核并诱导各种炎症细胞因子的分泌。在正常情况下, 体内的 ROS 和抗氧化剂之间存在一种平衡。一旦平衡被破坏, 就会发生氧化应激, 导致 DNA、脂质和蛋白质等生物大分子发生一系列不可逆的损伤 (Majdi et al., 2016)。大脑特别容易受到氧化应激的影响, 因为它消耗大量的氧气, 产生活性氧, 长链多不饱和脂肪酸含

量高（反过来，也容易受到活性氧攻击），抗氧化能力相对较差（Fukui et al., 2002）。因此，持续的氧化应激最终会导致认知功能损伤。睡眠不足被认为是一种可以导致大脑抗氧化系统崩溃的生理应激源。在本研究中，我们观察到 SD 小鼠海马中抗氧化酶（GSH-PX 和 CAT）的失活，以及 T-AOC 水平的降低。这些影响被 Mel 的补充所逆转。与体内结果相似，Mel 逆转了 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞 GSH-PX 和 CAT 的失活，并降低了 T-AOC。综上所述，这些结果表明 Mel 对急性 SD 诱导的认知障碍的神经保护作用可以通过保护大脑免受氧化性脑损伤和减轻炎症反应来解释。

2.5 小结

综上所述，急性 SD 通过激活 NF- κ B 通路导致氧化应激，诱发大脑神经炎症，进而导致神经元自噬和凋亡，最终产生认知功能的障碍。外源性 Mel 的补充可通过抑制氧化应激和神经炎症进而改善急性 SD 引起的过度自噬和凋亡。

3. 急性睡眠剥夺调控神经元凋亡和铁死亡诱导小鼠认知功能障碍

3.1 引言

多细胞生物中，调节型细胞死亡功能是细胞维持组织形态和功能必不可少的稳态机制。在一个机体中，存在一种或多种细胞死亡方式同时出现的情况，虽然它们之间存在差异，但是仍有密切的关系。最初的研究认为凋亡和铁死亡是完全不相同的两种细胞死亡方式，铁死亡的诱导剂能引起细胞铁死亡但不会影响凋亡通路的变化。此外，从形态学上，细胞凋亡表现为细胞和核体积减少，染色质凝集，凋亡小体形成，细胞骨架解体，线粒体结构无明显变化。而对于铁死亡，其表现为线粒体膜密度增加，线粒体嵴减少，线粒体外膜破裂，细胞核正常。而在生化特征方面，二者也存在很多差异，凋亡的标志是 Caspase 和促凋亡 Bcl-2 家族蛋白的激活，DNA 片段化，细胞膜破裂等。而铁死亡目前没有代表性的标志物，但铁积累和脂质过氧化，system Xc-抑制，GSH 水平下调，GPX4 抑制能够反映细胞铁死亡的变化（Li et al., 2020a）。但随着研究的深入，科研工作者发现一种天然产物合欢昔 A 能同时诱导凋亡和铁死亡的发生，对肿瘤细胞有较高的选择性杀伤作用，也具备较好的体内肿瘤抑制活性和药用安全性（Wei et al., 2019）。进一步深入研究发现，凋亡和铁死亡的调控机制中存在互相交叉的点，比如 p53，一个经典且非常重要的转录调控因子。p53 可通过与抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-2 相互作用并拮抗，从而增加线粒体膜通透性诱导凋亡（Wei et al., 2021）。而也有文章发现 p53 可以在转录水平抑制 SLC7A11 的表达，从而促进细胞发生铁死亡，导致肿瘤抑制（Liu and Gu, 2022）。机体在面对外界刺激或处于应激状态时，组织内部可能存在复杂的细胞调控机制，但在急性 SD 模型中，凋亡和铁死亡的关系尚

不清楚。

因此我们在急性 SD 模型的基础上，添加了 Erastin 处理组和 SD+Fer-1 处理组，来探讨急性 SD 模型下海马组织中两种死亡方式之间的关系。

3.2 材料与方法

3.2.1 试验动物的处理

80 只 8 周龄雄性 ICR 小鼠分为 4 组：CON 组、SD 组、SD+Fer-1 组、Erastin 组，在适应一周后 SD 组和 SD+Fer-1 组小鼠进行连续 72 h 的睡眠剥夺，同时 SD+ Fer-1 组小鼠在 SD 期间早上 7:00 连续三天腹腔注射 Fer-1 10mg/kg，Erastin 组小鼠同时在 SD 期间早上 7:00 连续三天腹腔注射 Erastin 5 mg/kg。

进行行为学检测的小鼠在适应 1 周后的第一天进行水迷宫试验小鼠运动能力的筛选，将有行为障碍的小鼠提前排除。然后进行 5 d 的水迷宫训练期，训练期结束后进行连续 72 h 的急性 SD，在剥夺结束后的次日 8 h 进行水迷宫的检测试验，在隐藏平台存在的时候检测小鼠到达平台的时间、距离和速度；第二天将水迷宫的隐藏平台去掉检测小鼠穿越平台的次数和在目标平台停留的时间，水迷宫两天的检测结束后进行 Y 迷宫检测。

3.2.2 试验动物的取材

48 只未进行行为学检测的小鼠在连续 72 h 的 SD 后于早上 8:00 进行取材，采用 1%的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉，并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4%多聚甲醛固定用于后续组织学检测。同组的剩余 6 只小鼠取出双侧海马，立即放入液氮速冻半小时再转移至-80 °C 冰箱用于 qRT-PCR 和 Western blot 检测。

3.2.3 主要仪器设备

石蜡切片机 (LEICA, RM2235 型, 德国)、生物组织包埋机 (BM-VI)、光学显微镜 (Olympus, BX51 型, 日本)、图像采集系统 (Olympus, DP72 型, 日本) 电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler® 480, Roche Applied Science, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、酶标仪 (BLO-RAD, 550 型, 美国)、电泳仪 (伯乐生命医学产品有限公司, 上海)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上

海)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、

3.2.4 试验药品及试剂

亚铁氰化钾、盐酸、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素 (CW0116S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、苏木精、盐酸酒精分色液、TRNzol Reagent TRIzol 总 RNA 提取试剂 (CW0580A, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Boston, USA)、兔抗小鼠 Cleaved caspase-3 多克隆抗体 (ab32042, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Bax 多克隆抗体 (ab32503, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Bcl-2 (ab32124, abcam, 美国)、兔抗小鼠 NeuN 单克隆抗体 (ab177487, abcam)、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、脱脂奶粉 (中国伊利)、BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014)、RIPA 裂解液 (CW2333)、蛋白酶抑制剂 (CW2200)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (CW0027)、SDS-PAGE Loading Buffer (5×) (CW0027), 均购自江苏康为世纪生物科技有限公司、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)。

3.2.5 莫里斯水迷宫

试验步骤同第二章第二节 2.2.4。

3.2.6 Y 字迷宫

试验步骤同第二章第二节 2.2.5。

3.2.7 免疫组织化学实验

(1) 一抗孵育: 用一抗稀释液配制兔抗小鼠 NeuN 单克隆抗体 (1:500), 阴性对照用 0.01M PBST 缓冲液代替一抗;

(2) 二抗孵育: 二抗采用羊抗兔二抗 (1:300);

其余试验步骤同第二章第三节 3.2.7。

3.2.8 Western blot 实验

(1) 封闭结束后, 用镊子小心取出 PVDF 膜, 放入装有 1×TBST 的盒内漂洗 3 次, 每次 10 min。同时在干净的盒中用 TBST 配置兔抗小鼠 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 稀释倍数 1:1000, β -actin 的稀释倍数是 1:8000。漂洗结束后, 按蛋白大小分别将 PVDF 膜转移至对应的盒内, 4 °C 冰箱过夜;

(2) 用 TBST 配置浓度为 1:8000 的羊抗兔的二抗溶液, 清洗结束后, 将 PVDF

膜浸泡于该溶液中，放置摇床，室温孵育 1 h。

其余试验步骤同第三章第一节 1.2.6。

3.2.9 qRT-PCR 实验

试验操作同第二章第一节 1.2.8。对不同分组海马组织的 *Tfr1*、*Dmt1* 和 *Fpn* 进行 mRNA 的检测。

3.2.10 改良的普鲁士蓝染色

试验操作同第三章第一节 1.2.5。

3.2.11 抗氧化物酶 SOD 与 MDA 的检测

试验操作同第三章第一节 1.2.8。

3.2.12 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值±标准误 (SEM)。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

3.3 结果

3.3.1 Fer-1 的添加对急性 SD 小鼠空间学习记忆能力的影响

上一部分的研究揭示急性 SD 能够引起海马神经元的丢失，从而引起小鼠认知功能的损伤，而这一过程中细胞铁死亡和凋亡参与其中，为了探讨二者之间的关系，我们检测了不同处理下铁死亡和凋亡指标的变化。莫里斯水迷宫结果显示，在第一天的试验中（隐藏平台存在时），与对照组相比，Erastin 组的小鼠到达平台的时间和距离都显著增加了 128.8% (P = 0.024, 图 3-9 F) 和 106.7% (P = 0.028, 图 3-9 G)。在第二天的测试中（撤掉平台），与对照组相比，Erastin 组的小鼠在目标象限停留的时间和穿越平台的次数都显著降低了 40.7% (P = 0.018, 图 3-9 C) 和 68.2% (P = 0.004, 图 3-9 D)。以上结果表明急性 SD 和 Erastin 的处理均能引起小鼠空间记忆的损伤。然而，当给予急性 SD 小鼠补充 5 mg/kg 的 Fer-1 之后，与急性 SD 小鼠相比，到达平台的时间和距离都显著降低了 56.4% (P = 0.005, 图 3-9 F) 和 58.6% (P = 0.004, 图 3-9 G)，在目标象限停留的时间和穿越平台的次数都显著增加了 48.3% (P = 0.027, 图 3-9 C) 和 68% (P = 0.001, 图 3-9 D)。各组间路径速度无显著差异 (图 3-9 H)。

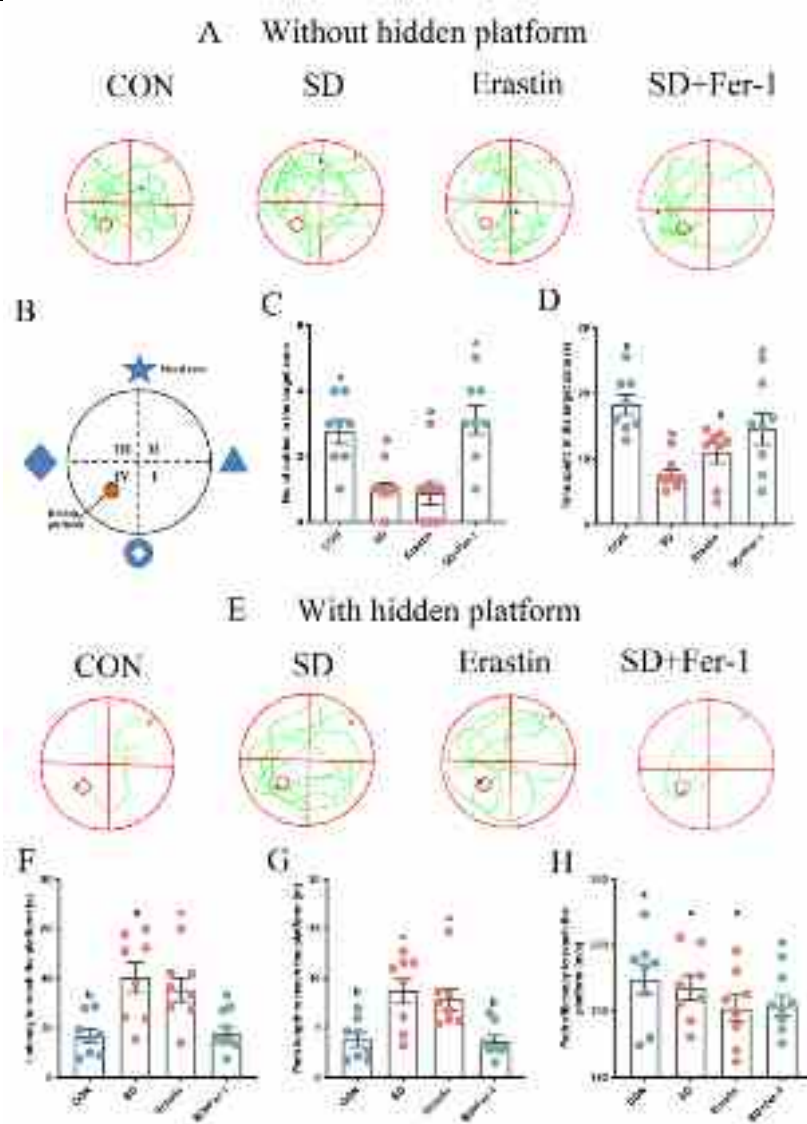


图 3-9 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠空间记忆能力的影响

(A) 空间记忆测试轨迹图 (不含隐藏平台), (B) 莫里斯水迷宫示意图, (C) 进入目标区域的条目数, (D) 在目标区域花费的时间, (E) 空间记忆测试的轨迹图 (带有隐藏平台), (F) 到达平台的延迟时间, (G) 到达平台的路径长度, (H) 到达平台的路径速度。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; Erastin: Erastin 处理组; SD+Fer-1: 睡眠剥夺+Fer-1 干预组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-9 The effects of Erastin and Fer-1 interventions on spatial memory ability in mice.

(A) Track plot of spatial memory test (without hidden platform), (B) Schematic of the Morris water maze, (C) Number of entries into the target zone, (D) Time spent in the target zone. (E) Track plot of spatial memory test (with hidden platform), (F) Latency to reach the platform, (G) Path length to reach the platform, (H) Path velocity to reach the platform. CON: control group, SD: sleep deprivation group,

Erastin: Erastin supplement group, SD +Fer-1: SD + Fer-1 supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.2 Fer-1 的添加对急性 SD 小鼠空间工作记忆的影响

Y 迷宫结果显示, 与对照组相比, Erastin 组的小鼠的自发交替行为百分比显著降低 13.3% ($P = 0.042$), 然而, 当给予急性 SD 小鼠补充 5 mg/kg 的 Fer-1 之后, 与急性 SD 小鼠相比, 自发交替行为百分比增加了 21.5% ($P = 0.005$), 且该指标恢复至对照组的水平 (图 3-10 A-E)。

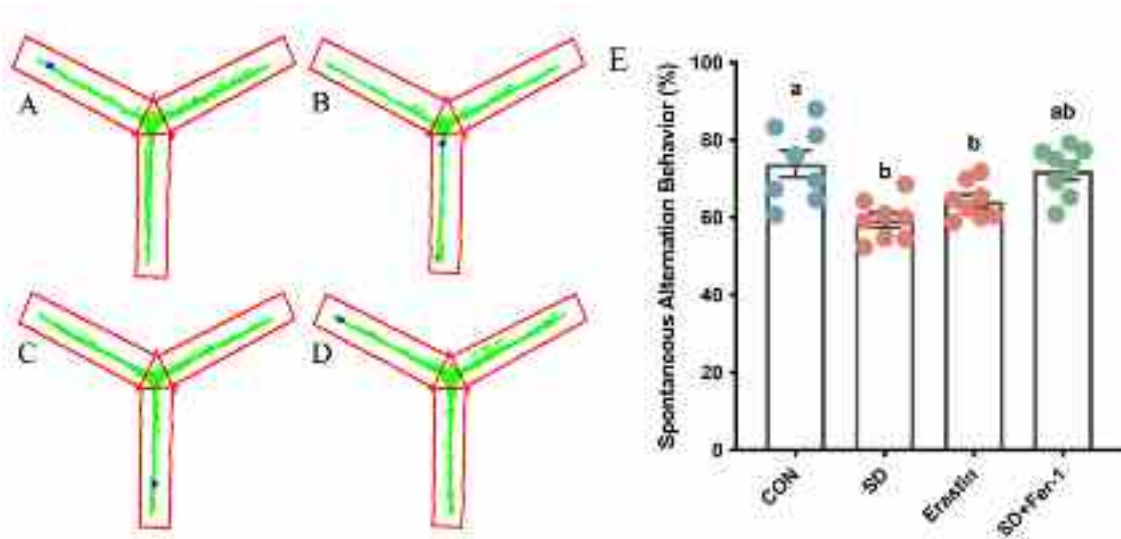


图 3-10 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠短期工作记忆的影响

(A) CON 组路径图; (B) SD 组路径图; (C) Erastin 组路径图; (D) SD+Fer-1 组路径图;

(E) 自发交替行为百分比。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; Erastin: Erastin 处理组; SD+Fer-1: 睡眠剥夺+Fer-1 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-10 The effects of Erastin and Fer-1 interventions on short-term working memory in mice. (A) Track plot of CON group, (B) Track plot of SD group, (C) Track plot of Erastin group, (D) Track plot of SD+Fer-1 group, CON: control group, SD: sleep deprivation group, Erastin: Erastin supplement group, SD +Fer-1: SD + Fer-1 supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.3 Fer-1 的添加对急性 SD 小鼠海马神经元丢失的影响

NeuN 免疫组织化学染色结果显示与对照组相比, Erastin 组海马 CA1、CA3 和 DG 区中神经元的数量也降低了 12.2% ($P < 0.001$), 10.4% ($P < 0.001$) 和 18.4% ($P < 0.001$)。然而, 给急性 SD 小鼠补充 Fer-1 后, 与急性 SD 组相比, Fer-1 补充的小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区中神经元的数量显著升高了 22.2% ($P < 0.001$), 21.3% ($P = 0.001$) 和 17.4% ($P < 0.019$) (图 3-11 B-D)。

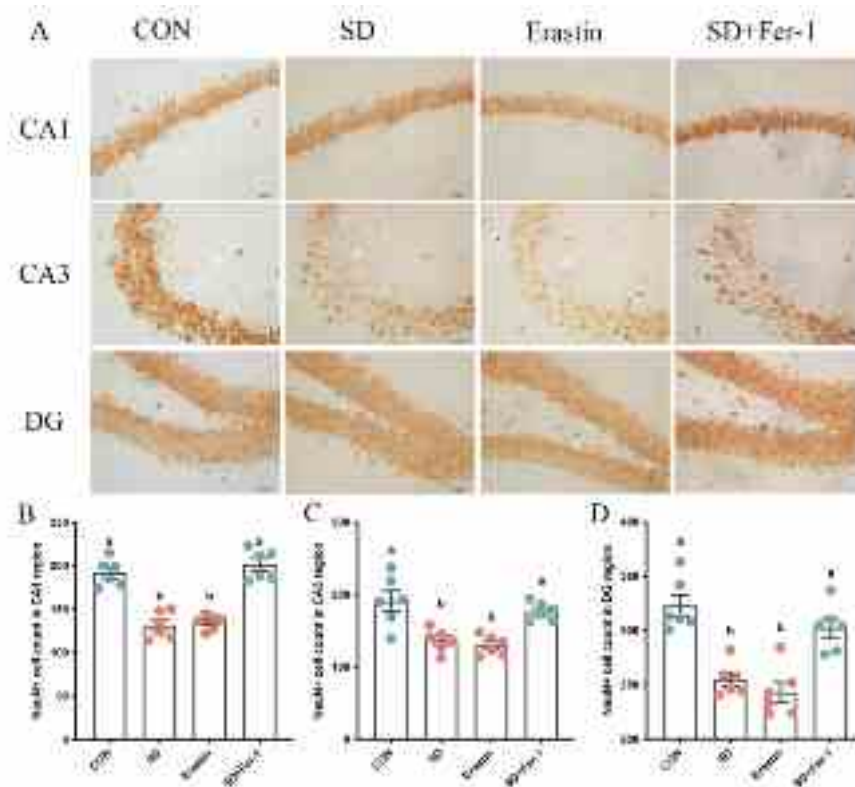


图 3-11 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠海马神经元数量的影响

(A) 不同试验组的海马神经元 NeuN 染色图像 (比例尺为 50 μm); (B) 海马 CA1 区, (C) 海马 CA3 区, (D) 海马 DG 区。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; Erastin: Erastin 处理组; SD+Fer-1: 睡眠剥夺+Fer-1 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-11 The effects of Erastin and Fer-1 supplementation on the hippocampal neuronal loss in mice. (A) Images of the NeuN-stained hippocampal neurons in the different experimental groups. Bar = 50 μm , (B) hippocampal CA1 region, (C) hippocampal CA3 region, (D) hippocampal DG region. CON: control group, SD: sleep deprivation group, Erastin: Erastin supplement group, SD +Fer-1: SD + Fer-1 supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.4 Fer-1 的添加对急性 SD 小鼠海马神经元铁死亡和凋亡的影响

从细胞铁离子蓄积的角度,我们发现与对照组相比,Erastin 组的海马不同分区中同样观察到大量铁离子蓄积,分别升高了 31.1% ($P < 0.001$)、65.3% ($P < 0.001$) 和 69.4% ($P = 0.001$)。然而给予急性 SD 小鼠补充 Fer-1 后,与急性 SD 组相比,Fer-1 补充的小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区中铁离子阳性细胞的 IOD 值分别降低了 39.0% ($P < 0.001$)、51.6% ($P < 0.001$) 和 51.0% ($P < 0.001$) (图 3-12 A-B)。进一步我们检测了铁转运蛋白的 mRNA 水平,结果显示与对照组相比,Erastin 组海马 *Tfr1* 的表达显著升高 33.0% ($P < 0.001$), *Dmt1* 的表达显著升高 46.9% ($P < 0.001$); 相反铁输出蛋白 *Fpn* 的表达水平显著降低了 35.8% ($P < 0.001$), Erastin 组的海马铁转运蛋白的变化与急性 SD 组类似。ROS 的结果也显示,急性 SD 和 Erastin 的处理引起了海马组织 ROS 的升高,而 Fer-1 的补充逆转了急性 SD 诱导的该指标的变化 (图 3-12 D-F)。

同样的,我们也检测细胞凋亡相关蛋白的表达情况,Western blot 结果显示急性 SD 和 Erastin 诱导了细胞凋亡的变化。具体的与对照组相比,Erastin 组海马 Cleaved caspase-3 升高 34.5% ($P < 0.001$), Bax 升高了 24.4% ($P < 0.001$), 而 Bcl-2 降低了 26.4% ($P < 0.001$)。而给予急性 SD 小鼠补充 Fer-1 后有效的改善细胞凋亡现象的发生,具体的与急性 SD 组相比,Cleaved caspase-3 降低 24.5% ($P < 0.001$), Bax 降低了 34.4% ($P < 0.001$), 而 Bcl-2 升高了 23.4% ($P < 0.001$) (图 3-12 H-I)。

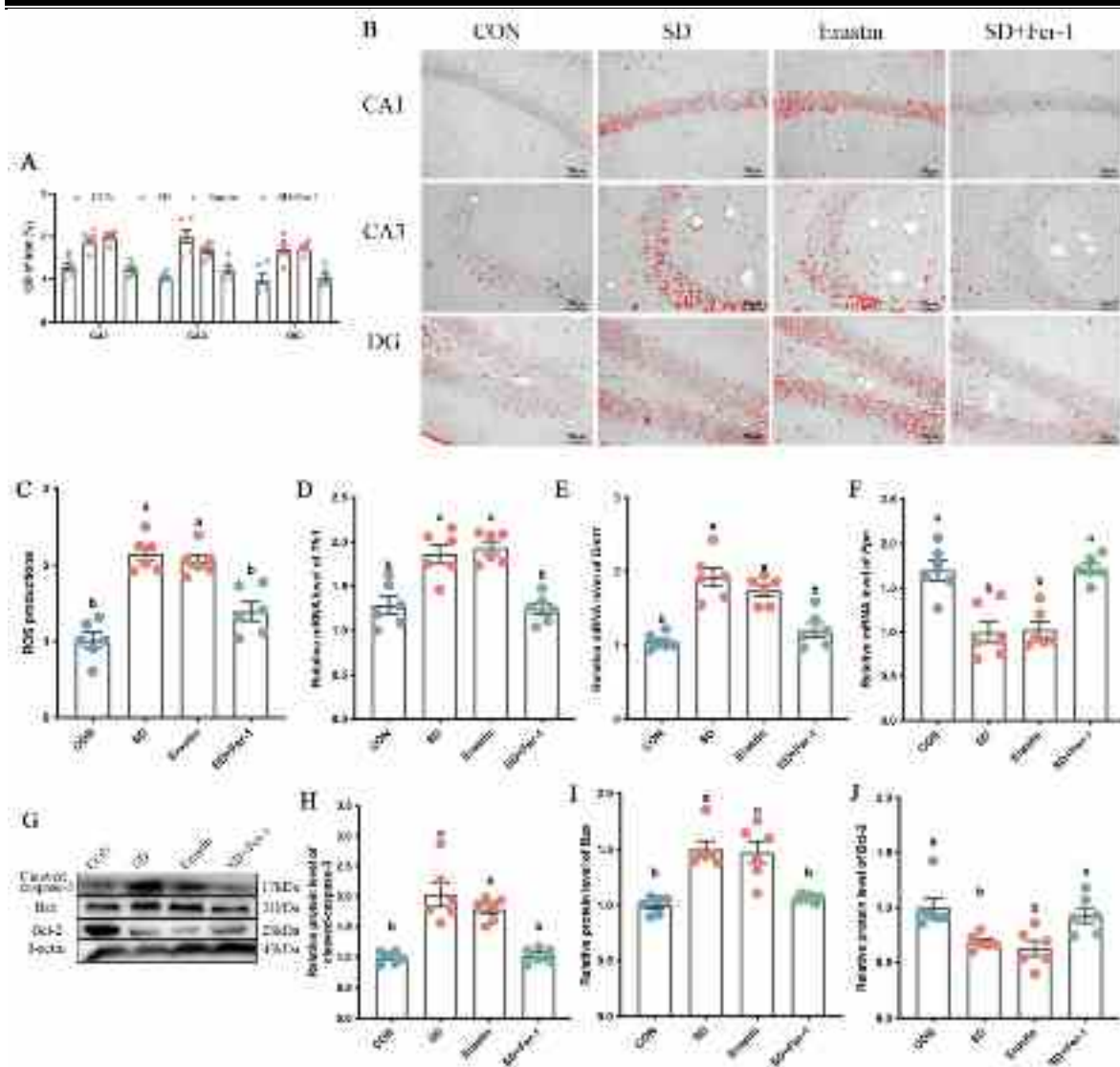


图 3-12 Erastin 和 Fer-1 干预对小鼠海马神经元铁死亡和凋亡的影响

(A) 海马 CA1、CA3 和 DG 区铁离子阳性细胞的 IOD 值；(B) 普鲁士蓝染色显示海马铁离子蓄积的照片。用 ImageJ 对铁离子染色结果进行处理。铁离子被观察到为红色颗粒（比例尺为 50 μm ）；(C) 海马组织中 ROS 的相对定量；(D-F) 海马组织中铁转运蛋白 *Tfri1*、*Dmt1* 和 *Fpn* 的相对 mRNA 水平；(G-J) 海马组织中凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的相对蛋白表达水平。CON：对照组；SD：睡眠剥夺组；Erastin：Erastin 处理组；SD+Fer-1：睡眠剥夺+Fer-1 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 3-12 The effects of Erastin and Fer-1 interventions on ferroptosis and apoptosis in mouse hippocampal neurons.

(A) Relative IOD of iron-positive cells in the hippocampal CA1, CA3, and DG areas, (B) Micrographs depict iron labeling in mouse hippocampal sections. The iron-staining results were processed using

ImageJ. Iron deposits were observed as red granules. Bar = 50 μm , (C) Relative quantification of the ROS assay in the hippocampus tissue, (D-F) Relative mRNA levels of iron transporter proteins *Tfr1*, *Dmt1* and *Fpn* in the hippocampus, (F-I) Relative protein levels of iron transporter proteins Cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 in the hippocampus, CON: control group, SD: sleep deprivation group, Erastin: Erastin supplement group, SD +Fer-1: SD + Fer-1 supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.4 讨论

上一章的研究证明急性 SD 能够引起小鼠认知功能障碍，而其原因是海马神经元的丢失，其中凋亡和铁死亡参与了神经元丢失过程。为了更好的解释急性 SD 引起小鼠认知功能障碍的机制，我们建立了 Erastin 和 SD+Fer-1 添加试验。首先，我们对不同组的小鼠进行行为学的检测。结果显示，SD 组和 Erastin 组的小鼠表现出空间参考记忆和空间工作记忆的损伤，表现为到达平台的时间和距离增加以及自发交替行为百分比的降低。这提示急性 SD 和 Erastin 的处理均能引起小鼠认知障碍。而给予 SD 小鼠补充 Fer-1 后，上述认知障碍现象得到有效的改善，提示抑制铁死亡的发生能改善急性 SD 诱导的记忆损伤。进一步我们发现 SD 组和 Erastin 组小鼠海马不同分区的神经元数量出现一定程度的减少，而 SD+Fer-1 组的小鼠表现出与对照组相似的变化。这一结果与行为学的结果保持一致，共同证明了海马神经元铁死亡参与急性 SD 诱导记忆损伤的过程中。

进一步为了探讨凋亡和铁死亡之间的关系，我们分别检测了二者的代表性指标。结果显示急性 SD 组和 Erastin 组小鼠海马中出现大量铁离子的蓄积，并检测到铁转运蛋白的紊乱，同样的这两组海马组织的活性氧水平也显著高于对照组的水平。这一结果表明急性 SD 组和 Erastin 组引起了海马神经元的铁死亡，与行为学的结果是保持一致的。紧接着，我们发现急性 SD 和 Erastin 的处理，引起海马组织中 Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达的增加和 Bcl-2 蛋白的表达降低，表明急性 SD 和 Erastin 能够诱导细胞凋亡的发生。有趣的是，给予急性 SD 小鼠外源性补充 Fer-1 后，其细胞凋亡水平受到了抑制。与我们的发现相似，在胰腺癌模型中，FBW7 能促进胰腺癌细胞脂质过氧化和铁死亡，FBW7 能通过 NR4A1 抑制 SCD1 转录，进而促进铁死亡和凋亡 (Ye et al., 2021)。也有研究与我们的结果不同，一种核长链非编码 NA LINC00618 在一定程度上依赖于细胞凋亡加速铁细胞凋亡 (Wang et al., 2021b)。这可能是由于细胞所处的环境存在差异所致。结合这些结果，我们认为急性 SD 能够同步调控神经元铁死亡和凋亡的发生，而铁死亡参与了凋亡的发生。

3.5 小结

急性 SD 同步调控海马神经元铁死亡和凋亡的发生，从而引起神经元的丢失和小鼠认知功能障碍。而 Fer-1 的补充证明了铁死亡加剧凋亡的发生。

第四章 微生物-肠-脑轴在褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导的认知障碍中的作用

1. 肠道菌群介导褪黑激素对急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的改善作用

1.1 引言

包括人类在内的所有动物都与微生物群落密切相关，包括细菌、古细菌、真菌和病毒。这些微生物群落几乎栖息在每个暴露在环境中的体表，其中胃肠道中的群落（即肠道微生物群）代表了人体中微生物的最大密度和绝对丰度。据估计，正常成人体内的肠道细菌总重量可达 1-1.5 公斤，包含的细菌数量可达 10^{14} 个。这个数字大约是人体全部细胞的 10 倍（Needham et al., 2020）。历经长期进化，这些细菌跟宿主之间建立了稳定的共生关系。我们为其提供食物和居所，它们为我们的消化系统和免疫系统提供支持。正常生理状态下，肠道细菌可以促进宿主多个系统的发育，并可通过脂多糖、脂蛋白以及代谢产物等特定组分调控宿主的功能，形成一道肠道生物屏障。肠道微生物群扮演着过滤器和生物变阻器的角色，用于感知、修改和调整来自环境的大量化学信号，这些信号随后在身体各处循环。因此，肠道微生物处于宿主和环境的交叉点，可能直接影响人体健康（Jameson et al., 2020）。“微生物群-肠道-大脑轴”指的是涉及多个生物系统的连接网络，允许肠道细菌和大脑之间的双向沟通，并在维持动物胃肠道、中枢神经和微生物系统的稳态中至关重要。这些生物网络中的通信途径包括直接和间接的信号传递，通过代谢产物，化学物质和免疫系统（Morais et al., 2021）。其中代谢产物作为肠道菌群的信号分子，扮演着与各个组织器官沟通的重要角色。肠道菌群的代谢底物主要来自于宿主不能或没有来得及消化的食物以及肠道上皮细胞分泌的内源性黏液，经过肠道菌群的作用后，产生许多对人体有害或有益的代谢产物如脂多糖、肽聚糖、三甲胺、次级胆汁酸、以及短链脂肪酸（SCFAs）等（Needham et al., 2020）。在一项研究中，长期服用外源性丁酸钠 28 天，小鼠的抑郁样行为显著减少（Schroeder et al., 2007）。小胶质细胞介导的免疫程序似乎依赖于微生物代谢信号，因为用细菌来源的 SCFAs 治疗 GF 小鼠可以恢复小胶质细胞的形态和功能（Erny et al., 2015）。值得注意的是，睡眠与肠道菌群密切相关，并且已证明睡眠不足会显著影响肠道微生物组和机体的新陈代谢（Li et al., 2018）。Mel 的合成前体包括色氨酸，并且有报道称 Mel 能够直接作用于肠道细菌，与其直接对话，调控机体的生理功能。

肠道微生物群通过肠-脑轴调控脑功能和行为。粪菌移植（FMT）是一种将肠道菌群从一个人转移到另一个人的过程。该技术首先在受体的胃肠道中建立了一个供体

样的微生物群，从而可以对肠道微生物群与宿主之间的因果关系做出更有力的推断。FMT 在人类医疗中的应用越来越受欢迎，尽管这不是什么新鲜事。大约 1700 年前，中医记录了口服人粪悬浮液治疗食物中毒和严重腹泻病人的情况。后来，在 17 世纪，意大利解剖学家描述了在兽医中使用粪便菌群的细菌疗法 (Brandt et al., 2012)。1958 年首次有文献记载 FMT 用于治疗人类假膜性结肠炎 (Eiseman et al., 1958)。从那时起，FMT 手术因其治疗难治性梭状芽胞杆菌感染 (CDI) 的显著成功率而闻名。多项研究发现，FMT 可以转移各种行为表型，包括焦虑样行为、抑郁症状认知障碍行为的各个方面，这表明肠道微生物群是调节焦虑、抑郁和认知的关键组成部分。在非无菌的啮齿类动物中，典型的 FMT 治疗通常包括用抗生素（通常通过饮用水提供）治疗受体，然后用供体粪便制成的悬液单次或多次口服灌胃几天 (Ooijevaar et al., 2019)。广谱抗生素经常被用来耗尽现有的微生物群，并提供一个类无菌的环境，便于后续灌胃细菌的定植。各种研究使用不同的抗生素组合，不同的混合物，浓度和剂量时间。常用的抗生素组合通常不超过五种，可能包括氨苄西林、环丙沙星、新霉素、万古霉素、甲硝唑、链霉素和青霉素。抗生素治疗时间一般为 3~35 天。在脊髓炎模型中，通过移植正常小鼠的肠道细菌，能够促进功能恢复，促进神经元轴突再生，改善动物体重增加和代谢谱，增强肠道屏障完整性和胃肠道运动 (Jing et al., 2021)。此外，老年小鼠的粪菌移植可通过调节海马突触可塑性和神经传递相关蛋白影响年轻小鼠的空间学习记忆 (D'Amato et al., 2020)。而也有研究发现 AD 模型小鼠的粪菌移植能影响正常小鼠的认知功能，而小胶质细胞是肠道微生物和 β 淀粉样蛋白沉积之间的关键介质 (Dodiya et al., 2022)。

我们之前的研究发现 Mel 能改善急性 SD 诱导的认知障碍，而 Mel 也能缓解急性 SD 诱导的肠道菌群紊乱，这就让我们提出假设，肠道菌群可能介导了 Mel 对急性 SD 诱导的机体损伤的改善作用。基于此我们通过 FMT 试验，探讨肠道菌群在急性 SD 和 Mel 之间的作用。

1.2 材料与方法

1.2.1 试验动物的处理

共有 110 只 SPF 的 8 周龄雄性小鼠 (ICR, 维通利华, 北京) 饲养于 20 个鼠笼 (4 只/笼), 温度为 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $50 \pm 10\%$, 光照制度为光暗比 14:10 (每天上午 7:00 开始给光)。小鼠可自由采食与饮水。所有的小鼠在适应一周之后, 随机等分为供体组和受体组。供体小鼠共分为三组: CON、SD 与 SD+Mel (20 mg/kg) 三组小鼠, 每组 10 只 (用于粪便的收集), SD 方法及 Mel 的注射剂量及方式同第二章。受体小鼠共分为四组: 接受 CON 组小鼠 FMT 的小鼠 (CON-FMT)、接受 SD 组小鼠

粪便移植的小鼠 (SD-FMT)、接受 SD+Mel 组小鼠粪便移植的小鼠 (SD+Mel-FMT) 与接受酶溶剂组小鼠 (V-FMT), 每组 20 只。

在试验结束后的早上 8:00, 收集 CON、SD 与 SD+Mel 三组小鼠新鲜粪便于无菌管中, 立即用无菌 PBS (1 粪球/ml) 稀释。将粪便在无菌 PBS 中浸泡约 15 min, 摇匀后, 1000 rpm, 4℃离心 5 min。悬浮液在 8000 rpm, 4℃离心 5 min, 获得总菌量, PBS 过滤 2 次。将终菌悬液与 40% 无菌甘油等体积混合至终浓度 20%, -80℃保存至移植。

对于 CON-FMT、SD-FMT、SD+Mel-FMT 与 V-FMT 四组小鼠, 在适应期结束后, 先通过饮水连续 10 天给予小鼠抗生素处理, 抗生素配置为: 1 g/kg 氨苄青霉素、100 mg/kg 庆大霉素、0.5 g/kg 新霉素、0.5 g/kg 万古霉素与 10 mg/k 的红霉素。在抗生素处理后每天早上 8:00 给各个受体小鼠灌胃粪菌液 (100 mg/mL)。

四组受体小鼠 (共 32 只) 在进行粪菌移植之后进行行为学的检测, 在平台存在时检测小鼠到达平台的时间、距离和速度; 将平台撤去后, 检测小鼠在目标象限停留的时间和穿越目标象限的次数。

所有的试验操作均符合中国农业大学农业研究机构的动物福利组织编写的试验动物的护理和使用指南 (批准文号为 CAU20170911-2)。

1.2.2 试验动物的取材

(1) 进行 10 d 抗生素处理后的受体小鼠, 采集其粪便进行细菌培养定量, 判断其体内的细菌是否被抗生素耗竭, 是否成功建立类无菌小鼠模型。

(2) 48 只未进行行为学检测的小鼠在粪菌移植结束后于早上 8:00 进行取材, 采用 1% 的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉, 并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4% 多聚甲醛固定用于后续组织学检测。同组的剩余 6 只小鼠取出双侧海马, 立即放入液氮速冻半小时再转移至 -80℃ 冰箱用于免疫组化检测、ELISA、qRT-PCR 检测和 Western blot 检测。收集每组小鼠结肠的内容物用于 16S rRNA 高通量检测 (检测区为 V1-V9 区) 和非靶代谢组检测。

1.2.3 主要设备仪器

莫里斯水迷宫 (XR-XM101, 上海欣软, 中国)、Y 迷宫 (XR-XY1032, 上海欣软, 中国)、旷场实验 (XR-XM101, 上海欣软, 中国)、SuperMaze 动物行为学视频分析系统 (XR-Xmaze, 上海欣软, 中国)、石蜡切片机 (LEICA, RM2235 型, 德国)、生物组织包埋机 (BM-VI)、光学显微镜 (Olympus, BX51 型, 日本)、图像采集系统 (Olympus, DP72 型, 日本) 电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂,

中国)、高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler® 480, Roche Applied Science, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、酶标仪 (BLO-RAD, 550 型, 美国)、电泳仪 (伯乐生命医学产品有限公司, 上海)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上海)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、脑立体定位仪 (ALCBIO, 上海)、

1.2.4 试验药品及试剂

BCA 试剂盒 (CW0014, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、2%戊巴比妥钠溶液、1%肝素钠溶液、硫酸甲氨基酚、冰乙酸、过氧化氢溶液、氨苄青霉素 (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Ave., USA)、庆大霉素 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、新霉素 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、万古霉素 (Hexal, Germany)、红霉素 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、甘油、菌群 DNA 提取试剂盒 (MoBio, 12988-10, 美国)、TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10 ELISA 试剂盒 (SEA097Mu、SEA563Mu、C90033Mu 和 SEA056Mu, 武汉云克隆技术有限公司, 武汉)。褪黑激素 (M5250; sigma)、亚铁氰化钾、盐酸、苏木精、盐酸酒精分色液、TRNzol Reagent TRIzol 总 RNA 提取试剂 (CW0580A, 康为世纪生物技术有限公司, 江苏)、反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Boston, USA)、兔抗小鼠 Cleaved caspase-3 多克隆抗体 (ab32042, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Bax 多克隆抗体 (ab32503, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Bcl-2 (ab32124, abcam, 美国)、兔抗小鼠 Iba1 单克隆抗体 (ab178846, abcam, 美国)、兔抗小鼠 GPX4 多克隆抗体 (ab125066, abcam)、兔抗小鼠 β -actin、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、脱脂奶粉 (中国伊利)、BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014)、RIPA 裂解液 (CW2333)、蛋白酶抑制剂 (CW2200)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (CW0027)、SDS-PAGE Loading Buffer (5 \times) (CW0027), 均购自江苏康为世纪生物科技有限公司、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物技术有限公司, 江苏)。

1.2.5 微生物测序步骤

1.2.5.1 试验流程

建库测序: 首先提取小鼠结肠菌群的总 DNA, 然后根据全长的引物序列合成带有 Barcode 的特异引物, 通过 PCR 扩增技术将产物纯化、定量和均一化并形成测序文库 (SMRT Bell), 然后将文库进行质量检测, 当质检合格时用 PacBio Sequel 进行测序。PacBio Sequel 下机数据为 bam 格式, 通过 smrtlink 分析软件导出 CCS 文件, 根

据 Barcode 序列将不同样品进行识别并转化为 fastq 格式数据。

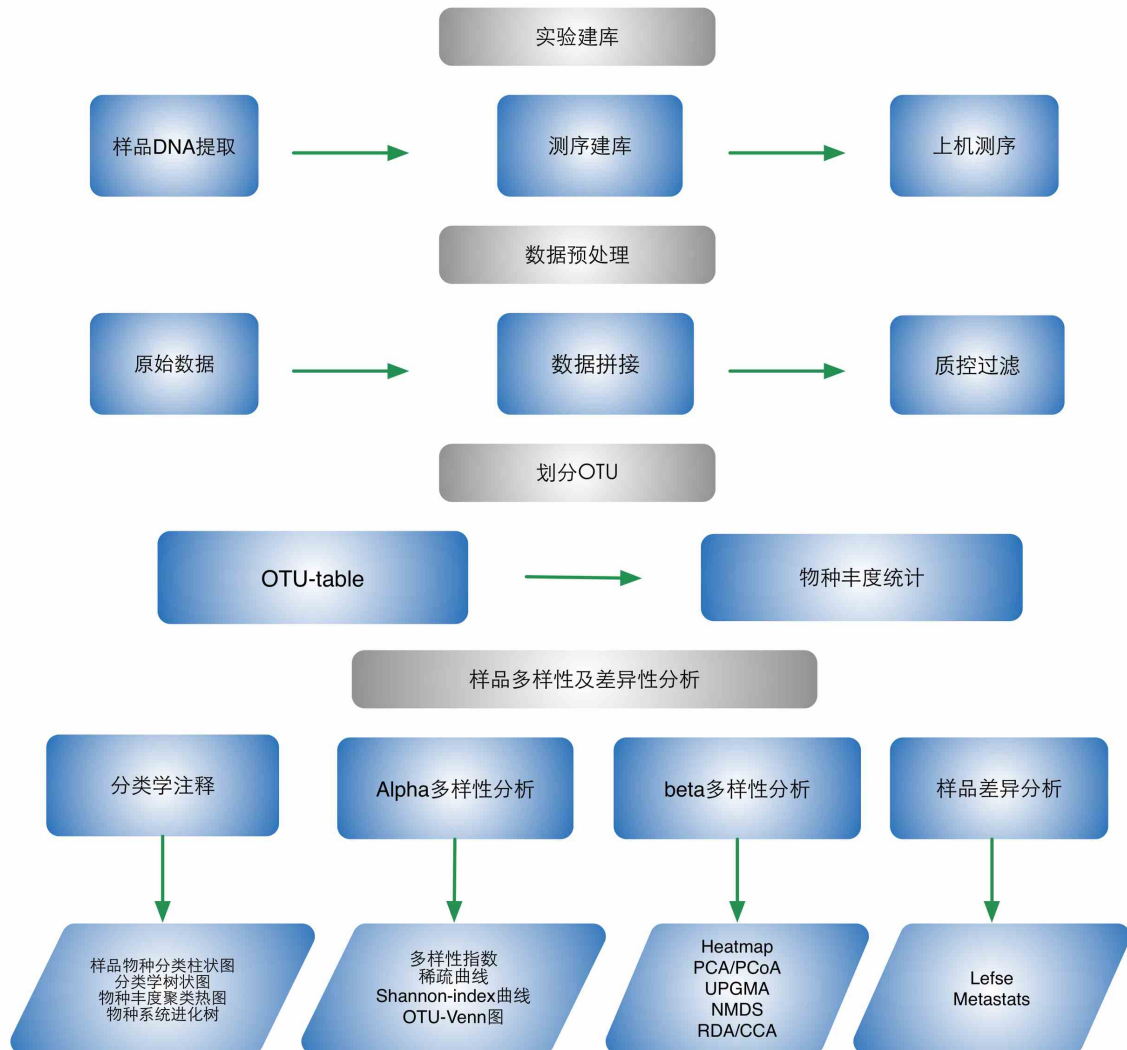
1.2.5.2 信息分析流程

数据预处理：将 PacBio 下机数据导出为 CCS 文件（CCS 序列使用 Pacbio 提供的 smrtlink 工具获取）后，主要有如下 3 个步骤：

(1) CCS 识别：使用 lima v1.7.0 软件，运用 barcode 方法识别 CCS，然后获得 Raw-CCS 序列数据；

(2) CCS 过滤：使用 cutadapt 1.9.1 软件对获取的数据进行引物的序列识别，并进行长度的过滤，得到不包含引物序列的 Clean-CCS 序列；

(3) 嵌合体的去除：使用 UCHIME v4.2 软件，将嵌合体序列进行鉴定并去除，得到 Effective-CCS 序列。



1.2.5.3 数据分析

(1) 测序数据质量评估：将各个阶段的样品序列数目进行统计，然后评估数据的质量是否合格。评估指标包括各阶段的序列数，序列长度等参数。

(2) OTU/ASV 分析：OTU 即分类操作单元，是人类的根据系统发生学将某一个分类单元（品系，种，属，分组等）设置为同一标志。根据相似性水平对所有序列进行 OUT 的分析。使用 Usearch 软件对 Reads 在 97.0%的相似度水平下进行聚类、获得 OTU。

(3) 物种注释及分类学分析：使用朴素贝叶斯分类器结合比对的方法对特征序列进行分类学的注释，参考数据库为 SILVA，然后得出具体的物种分类信息，然后在不同程度的标志下统计各个样品的群落组成（phylum, class, order, family, genus, species），再通过 QIIME 软件分析出多种分类水平上的物种丰度表，再利用 R 语言工具绘制成样品各分类学水平下的群落结构图。

(4) α 多样性分析： α 多样性反映的是单个样品物种丰度及物种多样性，有多种衡量指标：Chao1、Ace、Shannon、Simpson、Coverage、PD_whole_tree。Chao1 和 Ace 指数用来反映微生物的丰度度和多样性。衡量物种丰度即物种数量的多少。Shannon 和 Simpson 指数用于反映微生物分布的均匀性。另外还统计了覆盖率，其数值越高，则样本中物种被测出的概率越高，而没有被测出的概率越低。该指数反映本次测序结果是否能够反映样本中微生物的真实情况。

(5) β 多样性分析：使用 QIIME 软件进行 β 多样性分析，比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度。 β 多样性分析主要采用 binary jaccard 算法计算样品间的距离从而获得样本间的 β 值。依据距离矩阵得到相应距离下的样品层次聚类（UPGMA）树、NMDS 分析、样品聚类热图及样品 PCA、PCoA 图（有分组信息）、基于多种距离的箱线图等；

(6) 组间差异细菌筛选：利用组间的差异显著性来分析并寻找不同组间具有统计学差异的 Biomarker;

1.2.6 代谢物测序步骤

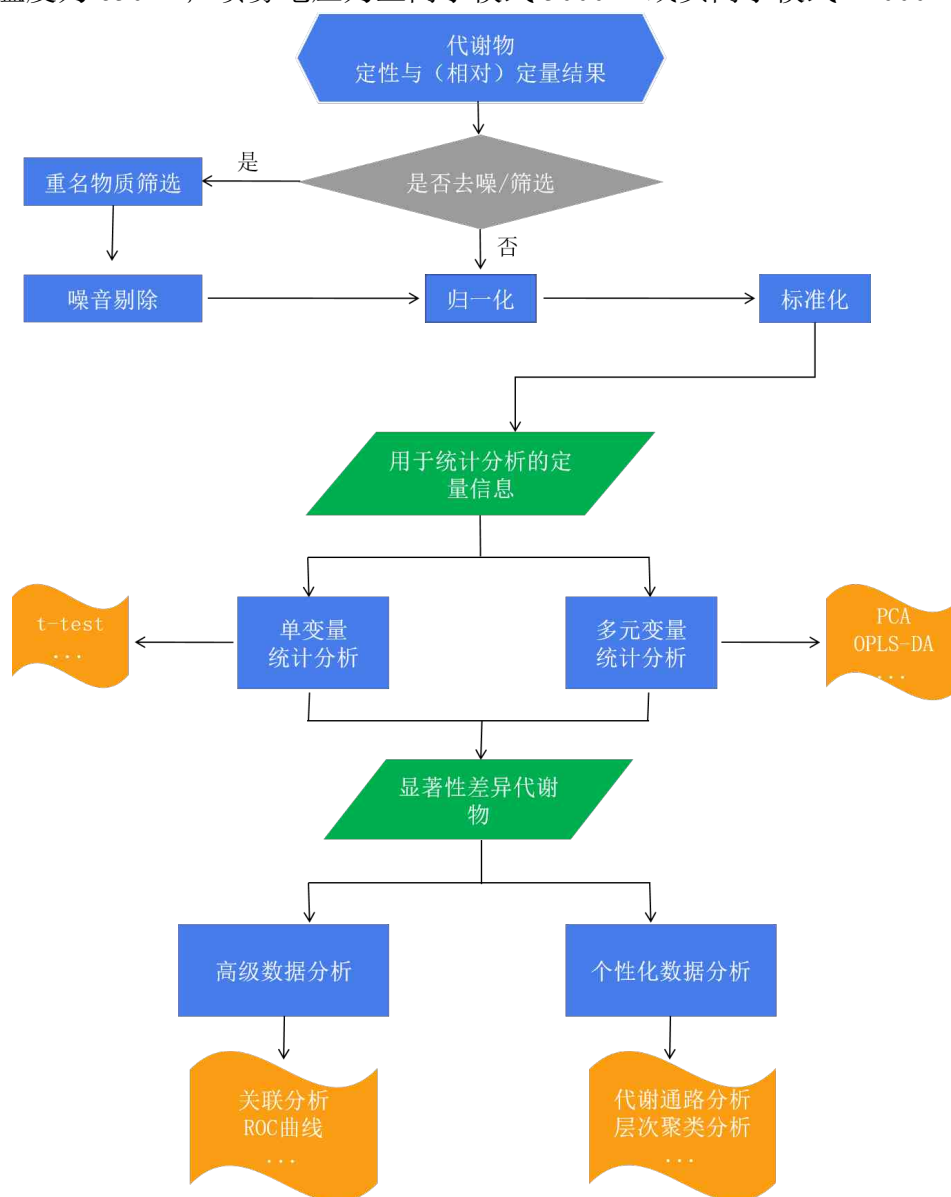
1.2.6.1 样品的提取

主要处理流程如下：

- (1) 样品的预处理：干燥与研磨等；
- (2) 称量或者定容稀释；
- (3) 利用过滤与离心等方法去除颗粒；
- (4) 取样、上机、检测。

1.2.6.2 色谱采集

在安捷伦 1290 超高效液相的精准控制下依据下表提供的流动相参数进行分析。使用的色谱柱购自 Waters 的 UPLC BEH Amide, 其规格为 1.7 μm \times 2.1 \times 100 mm。AB 5600 Triple TOF 质谱仪可以在控制软件 Analyst TF 1.7, AB Sciex 控制下基于 IDA 功能进行一级与二级质谱的数据采集。在各个数据采集的循环中, 筛选出强度最强且大于 100 的分子离子采集对应的二级质谱的数据。轰击能量: 30 eV, 15 张二级谱图每 50 ms。ESI 离子源参数按如下条件设置: 雾化气压 (辅助气压为 60 Psi; 气帘气压为 35 Psi; 温度为 650oC; 喷雾电压为正离子模式 5000 V 或负离子模式 -4000 V。



1.2.6.3 代谢物定量

通过 ProteoWizard 软件把得到的质谱原始值转化成 mzXML 格式。然后利用 XCMS 方法做保留时间的矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等等工作,将 minfrac 设为 0, cutoff 设为 0.6。然后依据如下方式对数据进行预处理:

(1) 首先对每个 Peak 进行逐一过滤,仅保存单组空值大于或等于 50%或所有组中空值不多于 50%的峰面积数据。

(2) 接着模拟填充原始数据中的缺失值,进行填补的数值模拟的方法为最小值二分之一法。

(3) 标准化处理:利用每个样品的总离子流 (total ion current, TIC, 即样品内所有 Pea 的峰面积之和) 进行归一化。

1.2.6.4 数据评估

(1) 主成分分析 (PCA)

主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 是一种通过压缩和删除一些对事物信息代表性较小的指标,将存在关联的较多指标降维简化为少数几个相互独立的且能包含原始指标的大部分信息的新综合指标的一种多元统计方法。通过主成分分析产生的新综合指标,称为原始指标的主成分。

(2) 差异分组的正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

代谢组学数据具有高维 (检测出代谢物种类多), 小样本 (检测样本量偏少) 的特性,在这些变量中既包含与分类变量相关的差异变量,也包含大量互相之间可能存在关联的无差异变量。这导致如果我们使用 PCA 模型或 PLS 模型进行分析,由于相关变量的影响,差异变量会分散到更多的主成分上,无法进行更好的可视化和后续分析。

(3) 差异代谢物筛选

对有生物学重复的,采取将差异倍数、t 检验的 P 值和 OPLS-DA 模型的 VIP 值相结合的方法来筛选差异代谢物,筛选的标准为 $FC > 2$ 、 $P \text{ value} < 0.01$ 和 $VIP > 1$ 。

(4) 差异代谢物 KEGG 功能注释及富集分析

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 有助于研究者把基因、表达信息以及代谢物含量作为一个整体网络进行研究。然后与数据库进行对比,整合差异变化的代谢物或基因,不仅提供了所有可能的代谢途径,而且对催化各步反应的酶进行了全面的注解,包含有氨基酸序列、PDB 库的链接等等,是进行生物体内代谢分析、代谢网络研究的强有力工具。

1.2.7 莫里斯水迷宫

试验步骤同第二章第二节 2.2.4。

(1) 在适应期一周后, FMT 试验之前将所有受体小鼠进行水迷宫适应性训练并筛选行动力一致的小鼠进行试验。为了尽量减少应激对试验结果的影响, 我们选择了没有任何刻板特征的: 行为和身体健康的小鼠进行进一步研究。

(2) 定位航行试验粪菌移植之后所有受体小鼠进行为期 5 d 的定位航行试验, 每只小鼠在 1 d 的时间内进行 4 次训练, 每次为 1 个象限, 根据入水顺序依次进行, 将小鼠放入池中时面向池壁, 避免小鼠在入水时看到水迷宫中的图像造成试验的误差。给予小鼠 60 s 的时间寻找隐藏平台, 当小鼠寻找到平台后允许其停留 15 s, 若小鼠在 60 s 的时间内没有找到平台, 人工将其引导至平台的位置并让其在平台上停留 15 s 的时间。

(3) 空间探索试验: 定位航行试验的次日, 将水迷宫中的隐藏平台撤去, 从目标象限对角线的象限将小鼠放入水池中, 记录 60 s 内小鼠穿越目标象限的次数和在目标象限的停留时间。试验总是在每天的同一天时间和相同的环境条件下进行。使用计算机跟踪系统 (XR-XM101; 上海软迷宫信息技术有限公司)。

1.2.8 Y 迷宫

试验步骤同第二章第二节 2.2.5。

1.2.9 ELISA 测定血浆中 NE、CORT 和 MeI 的含量

试验步骤同第二章第一节 2.1.2.6。

1.2.10 免疫组织化学试验

试验步骤同第二章第三节 2.3.2.6。兔抗小鼠 Iba1 的稀释浓度是 1:1000。

1.2.11 Western blot 试验

试验操作同第三章第一节, 兔抗小鼠 Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 和 GPX4 多克隆抗体浓度都为 1:1000, β -actin 多克隆抗体的浓度为 1:8000。Western blot 以 β -actin 为内参, 目的蛋白的相对表达量为目的蛋白水平/ β -actin 蛋白水平。

1.2.12 抗氧化指标的检测

试验步骤同第三章第一节 3.1.2.7, 检测不同处理组的 GSH-PX、CAT、SOD、GPX4、

T-AOC 和 MDA 水平。

1.2.13 ELISA 测定海马炎症细胞因子 (IL-6、TNF- α 、IL-4 和 IL-10) 的含量

试验步骤同第二章第三节 2.3.2.7。

1.2.14 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM), 组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

1.3 结果

1.3.1 粪菌移植不同受体小鼠间结肠微生物 α 多样性与 β 多样性的影响

为了检测 FMT 是否调节了肠道菌群, 我们对受体小鼠进行了 16S rDNA 基因测序, 以分析 FMT 处理后的细菌分类组成。三组小鼠共获得 21 个样本 ($n = 7$), 测序生成 V1-V9 16S rRNA 基因图谱。CON-FMT 组、SD-FMT 组和 SD+Mel-FMT 组的原始读数分别为 91308、91002 和 90919。CON-FMT 组、SD-FMT 组和 SD+Mel-FMT 组平均分别有 78824、77428 和 77628 个过滤后读数。 α 多样性反映了微生物群落多样性的丰富性和多样性。但是三个处理组的 Chao、Shannon、ACE 和 Simpson 指标无显著变化 ($P > 0.05$, 图 4-1 B-C)。利用 Bray-Curtis 主坐标分析 (PCoA) 进一步评价微生物群落的 β -多样性, 以衡量微生物群落的相似性程度。结果显示各组组间距离分离 (图 4-1 J-L), 主成分 PC1、PC2、PC3 的变异率分别为 17.96%、15.50%、9.66% (Adonis, $P = 0.001$, $R^2 = 0.379$)。

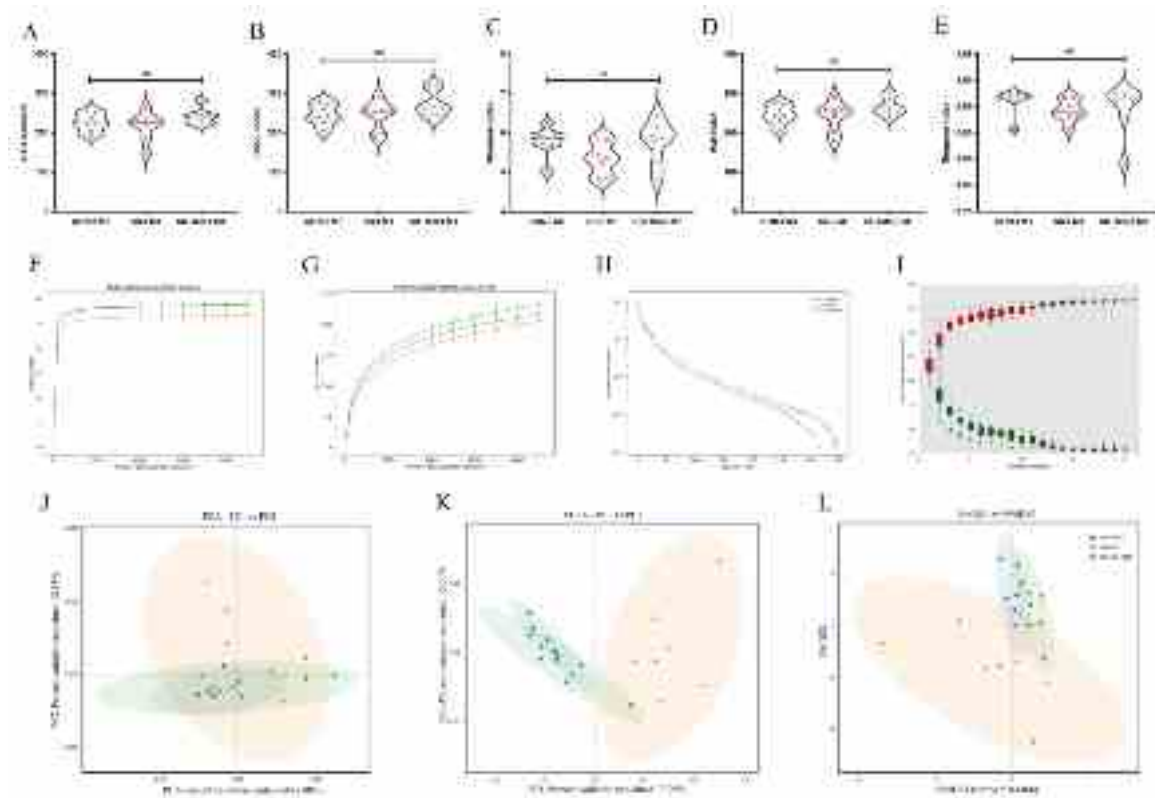


图 4-1 粪菌移植受体小鼠结肠内菌群 α 多样性与 β 多样性的变化

(A) OTU 数量的统计结果, (B) Chao1 指数, (C) Shannon 指数, (D) ACE 指数, (E) Simpson 指数图, (F) 香农曲线。(G) 稀疏曲线, (H) OTU 秩曲线, (I) 秩丰度曲线, (J) 主成分分析 (PCA), (K) PCoA 评分图, (L) 基于肠道微生物 OTU 的 binary_jaccard 距离图的非度量多维尺度标度 (NMDS) 评分图。CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-1 Changes of α diversity and β diversity of colonic microflora in mice receiving fecal bacteria transplantation.

(A) Statistical results of OTU quantity, (B) Chao1 Index Simpson index, (C) Shannon's index, (D) ACE index, (E) Simpson index, (F) Shannon index diagram, (G) Generate dilution curve, (H) OTU grade curve, (I) and rank abundance curve, (J) Principal component analysis (PCA), (K) Principal Coordinate analysis (PCoA), (L) and nonmetric multidimensional scaling (NMDS). CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.2 粪菌移植不同受体小鼠间结肠微生物组成的变化

微生物聚集性分析显示，CON-FMT 和 SD+Mel-FMT 组内的微生物表现出更紧密的联系，而 SD-FMT 组内微生物联系稀疏（图 4-2 A）。UPGMA 树分析结果显示 SD+Mel-FMT 组比 SD-FMT 组更接近 CON-FMT 组，进一步验证了 PCoA 的结果（图 4-2 B-C）。在门水平上，厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）和 Verrucomicrobiota 是优势菌群（图 4-2 B）。在属水平上，*uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、阿克曼氏菌（*Akkermansia*）和乳杆菌（*Lactobacillus*）是优势菌群（图 4-2 C）。

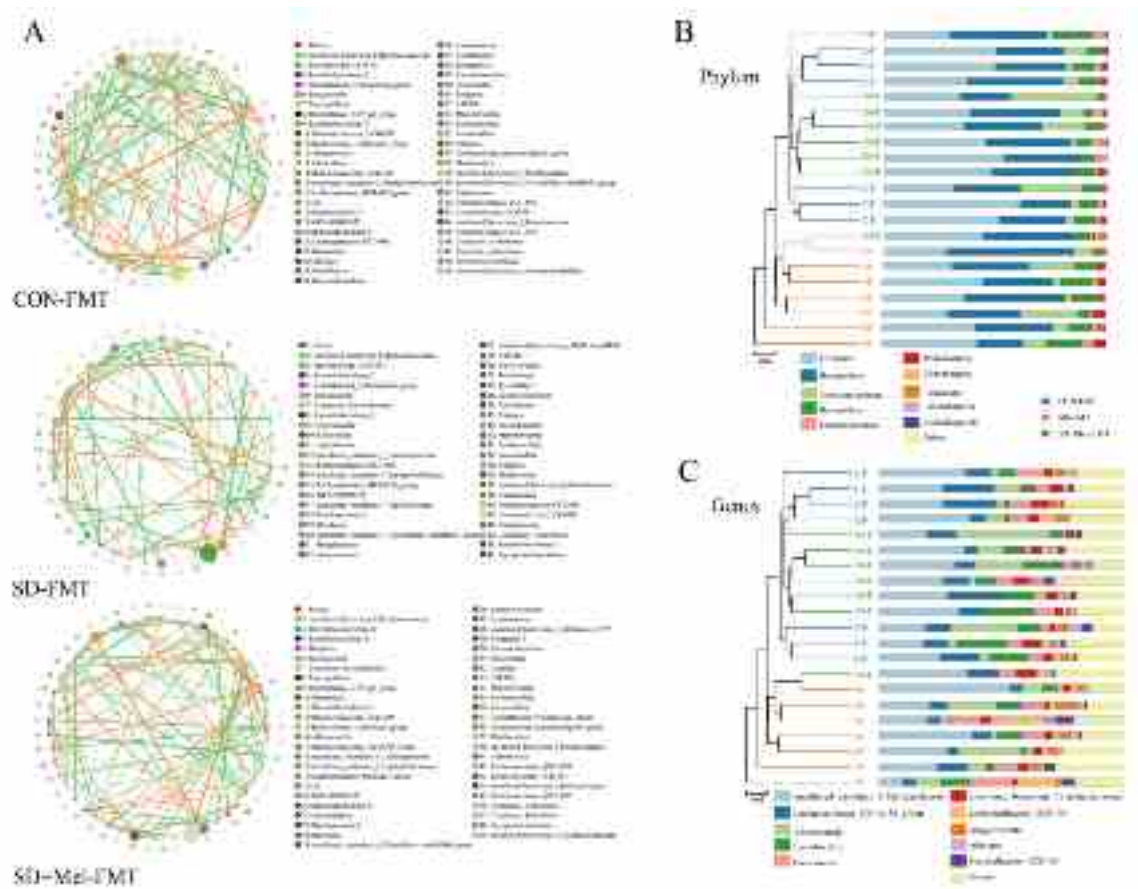


图 4-2 粪菌移植受体小鼠结肠内微生物组成的变化

(A) 微生物聚集性分析，(B) 算术平均的非加权成对分组法（UPGMA）分析（在门水平），(C) 算术均值的非加权对群方法（UPGMA）分析（属水平）。CON-FMT：接受 CON 组 FMT 的小鼠；SD-FMT：接受 SD 组 FMT 的小鼠；SD+Mel-FMT：接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著（ $P < 0.05$ ）；同字母组差异无统计学意义（ $P \geq 0.05$ ）。

Fig. 4-2 Changes of microbial composition in the colon of fecal bacteria transplant recipient mice.

(A) Microbial aggregation analysis, (B) Unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis (at the phylum level), (C) Unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis (at the genus level), CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.3 粪菌移植不同受体小鼠间结肠菌群 LefSe 及差异细菌分析

为了进一步确定 CON-FMT、SD-FMT 和 SD+Mel-FMT 组的特定细菌，我们通过 LDA 和 LefSe 来确定各个组的核心菌群。与 CON-FMT 组和 SD+Mel-FMT 组相比，SD-FMT 组的 Bacteroidota 和 Proteobacteria 数量更多 (Bacteroidota, $P = 0.046$, LDA 评分 = 4.39; Proteobacteria, $P = 0.012$, LDA 评分 = 3.98)。此外，在图 4-3 A 中，我们发现 SD-FMT 组的 Firmicutes 的相对丰度显著低于 CON-FMT 组和 SD+Mel-FMT 组 ($P > 0.05$)。进一步的 LefSe 分析鉴定出 64 个细菌标志物 (LDA > 3 , $P < 0.05$)。其中，*Lachnospiraceae_NK4A136_group* ($P = 0.041$, LDA = 4.55), *Eubacterium_xylanophilum_group* ($P = 0.027$, LDA = 3.39), *Ruminococcus_1* ($P = 0.018$, LDA = 3.56) 和 A2 ($P = 0.001$, LDA = 3.64) 的相对丰度在 SD-FMT 组明显低于 CON-FMT 和 SD + Mel-FMT 组 (图 4-3 G-J)。此外，SD-FMT 组 *Turicimonas* 的相对丰度 ($P = 0.035$, LDA = 3.12) 显著高于 CON-FMT 组和 SD+Mel-FMT 组 (图 4-3 K)，而 CON-FMT 组和 SD+Mel-FMT 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

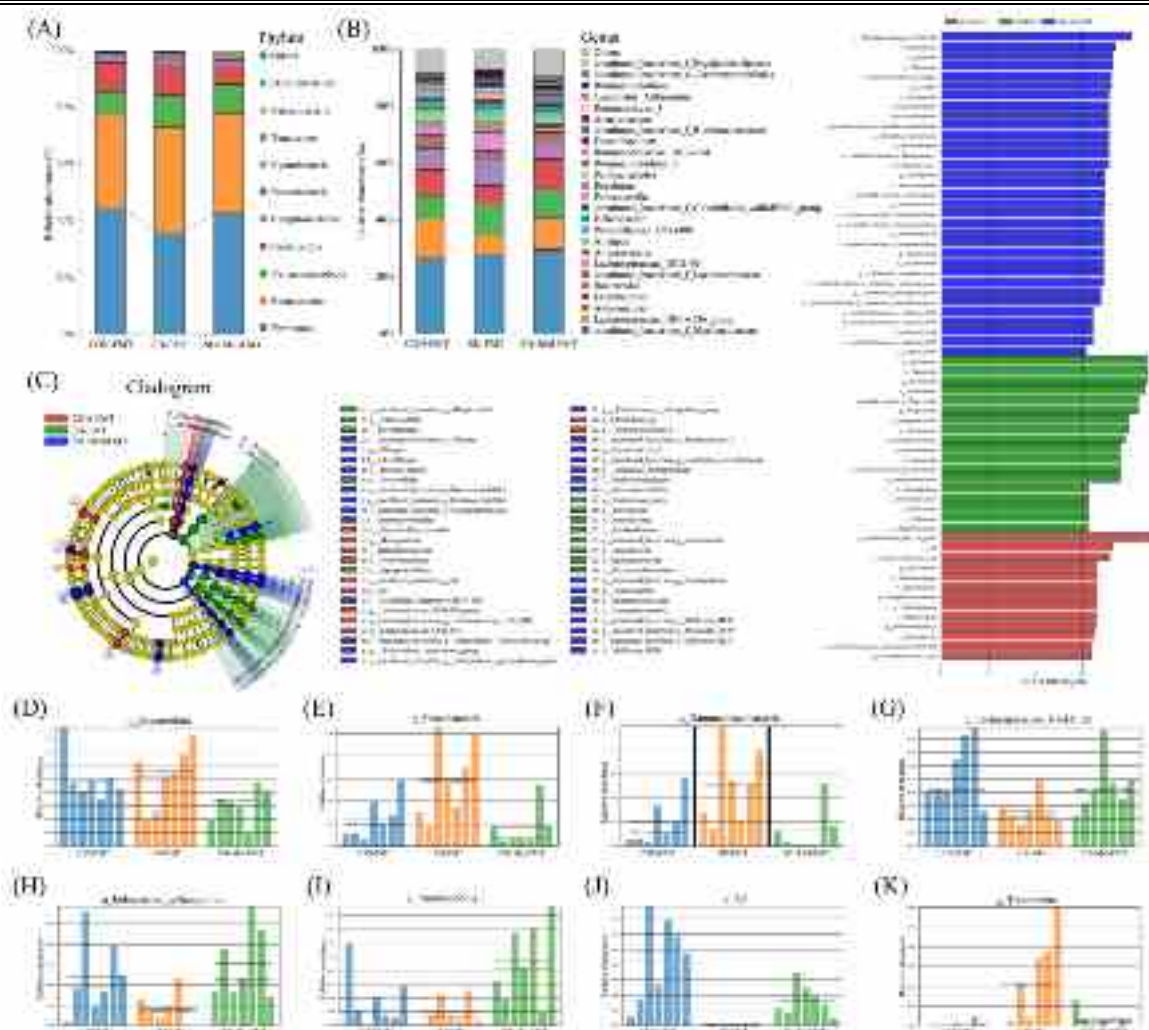


图 4-3 粪菌移植受体小鼠结肠内差异细菌变化

(A) 三组结肠微生物群落门水平的相对丰度，(B) 三组肠道菌群属水平的相对丰度，(C) 采用线性判别分析效应量 (LEfSe) 对不同组间具有差异代表性的细菌进行鉴定，(D-K) 根据 LefSe 结果得到大肠微生物群中 *p_Bacteroidota*, *p_Proteobacteria*, *c_Gammaproteobacteria*, *g_Lachnospiraceae_NK4A136*, *g_Eubacterium_xylanophilum*, *g_Ruminococcus_1*, *g_A2* 和 *g_Turicionas* 的相对丰度。实线和虚线分别表示平均值和中值。CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-3 Changes of different bacteria in colon of fecal bacteria transplant recipient mice.

(A) Relative abundances of colonic microbiota at the phylum level in the three groups, (B) Relative abundances of gut microbiota at the genus level in the three groups, (C) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was performed to identify the bacteria that are differentially represented between the different groups.(D-K) Relative abundance of *p_Bacteroidota*, *p_Proteobacteria*,

c_Gammaproteobacteria, g_Lachnospiraceae_NK4A136, g_Eubacterium_xylanophilum, g_Ruminococcus_1, g_A2 and *g_Turicionas* in the colon microbiota based on the LefSe results. Solid and dashed lines indicate the mean and median, respectively. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.4 粪菌移植不同受体小鼠间结肠菌群代谢物组成

肠道微生物可以通过代谢产物影响宿主。因此，我们对 FMT 受体小鼠进行了代谢组学分析。代谢物分析表明结肠内有 2260 个代谢物。Venn 图显示，不同的处理组表现出不同的代谢物变化（图 4-4 A）。PCA 分析显示各组的微生物代谢产物组成存在明显的聚类，SD+Mel-FMT 组与 CON-FMT 组的关系比 SD-FMT 组更接近（图 4-4 B）。为了进一步验证不同组样本之间的差异，我们采用 OPLS-DA 来实现这一目标。结果表明，OPLS-DA 模型能较好地分离三个处理组。预测 OPLS-DA 模型的质量参数值为[R2X (cum) = 0.587, R2Y (cum) = 0.474], fitness [Q2 (cum) = 0.273], 表明模型具有良好的信度和可预测性（图 4-4 C-D）。根据统计学值，火山图显示差异代谢物呈上升和下降趋势 ($P < 0.05$, $|\log_2FC| > 1$)（图 4-4 E-G）。与 CON-FMT 组相比，SD-FMT 组有 547 个代谢产物表达上调，15 个代谢产物表达下调。然而，与 SD-FMT 组相比，SD+Mel-FMT 组有 574 个代谢物增加，26 个代谢物减少。

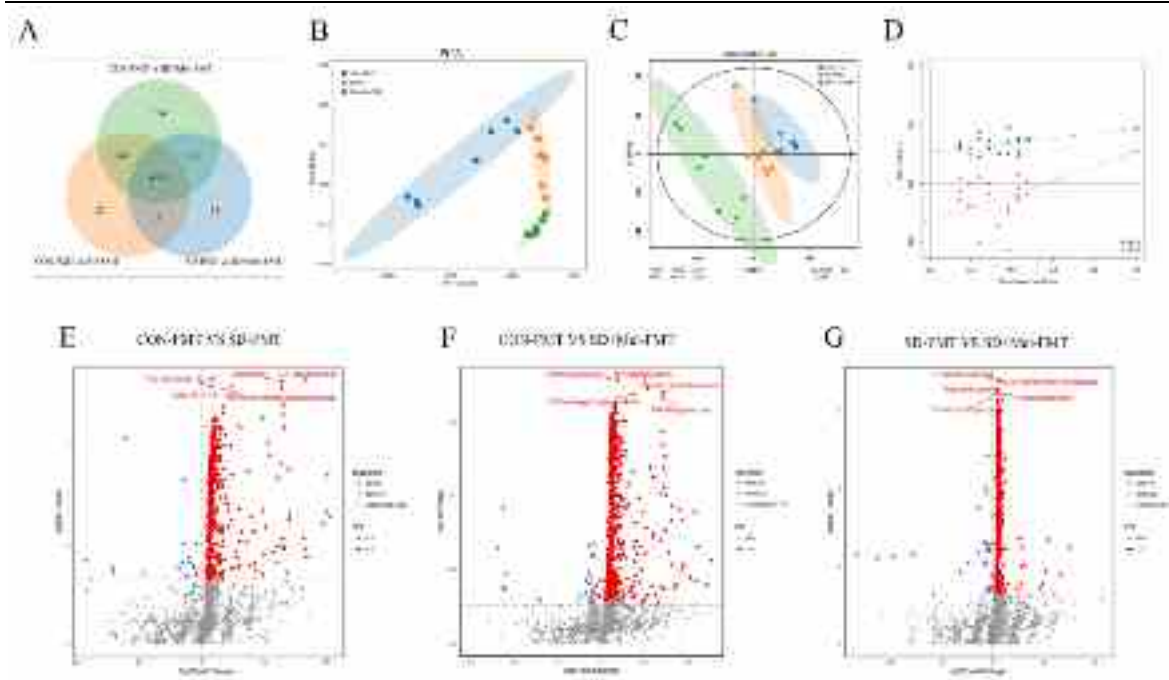


图 4-4 粪菌移植受体小鼠结肠内代谢物组成分析

(A) Venn 分析, (B) 主成分分析 (PCA), (C) 差异分组的正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), (D) OPLS-DA 模型验证图, (E) CON-FMT 与 SD-FMT 组的代谢物火山图, (F) CON-FMT 与 SD+Mel-FMT 组的代谢物火山图, (G) SD-FMT 与 SD+Mel-FMT 组的代谢物火山图。CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-4 Analysis of metabolite composition in the colon of fecal bacteria transplant recipient mice. (A) Venn analysis, (B) Principal component analysis (PCA), (C) Orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA), (D) OPLS-DA validation plot, (E) Metabolite volcanic maps of CON-FMT and SD-FMT formations, (F) Metabolite volcanic map of CON-FMT and SD+Mel-FMT formations, (G) Metabolite volcanic map of SD-FMT and SD+Mel-FMT groups. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.3.5 粪菌移植不同受体小鼠间结肠菌群差异代谢物的变化

此外, 我们筛选了三组中 41 个变化最大的代谢物。与 SD-FMT 组相比, SD+Mel-FMT 组的丁酸 ($P = 0.03$) 和 L-色氨酸 ($P = 0.02$) 含量显著增加。为了明

确急性 SD 诱导的肠道菌群代谢物变化是否影响了宿主的信号通路，我们在 KEGG 分析中根据途径类型对差异代谢物的注释结果进行了分类，结果提示 SD-FMT 主要受到影响的信号通路是：Oxidative phosphorylation、Biosynthesis of amino acids、Fatty acid biosynthesis、Biotin metabolism 和 Tryptophan metabolism。

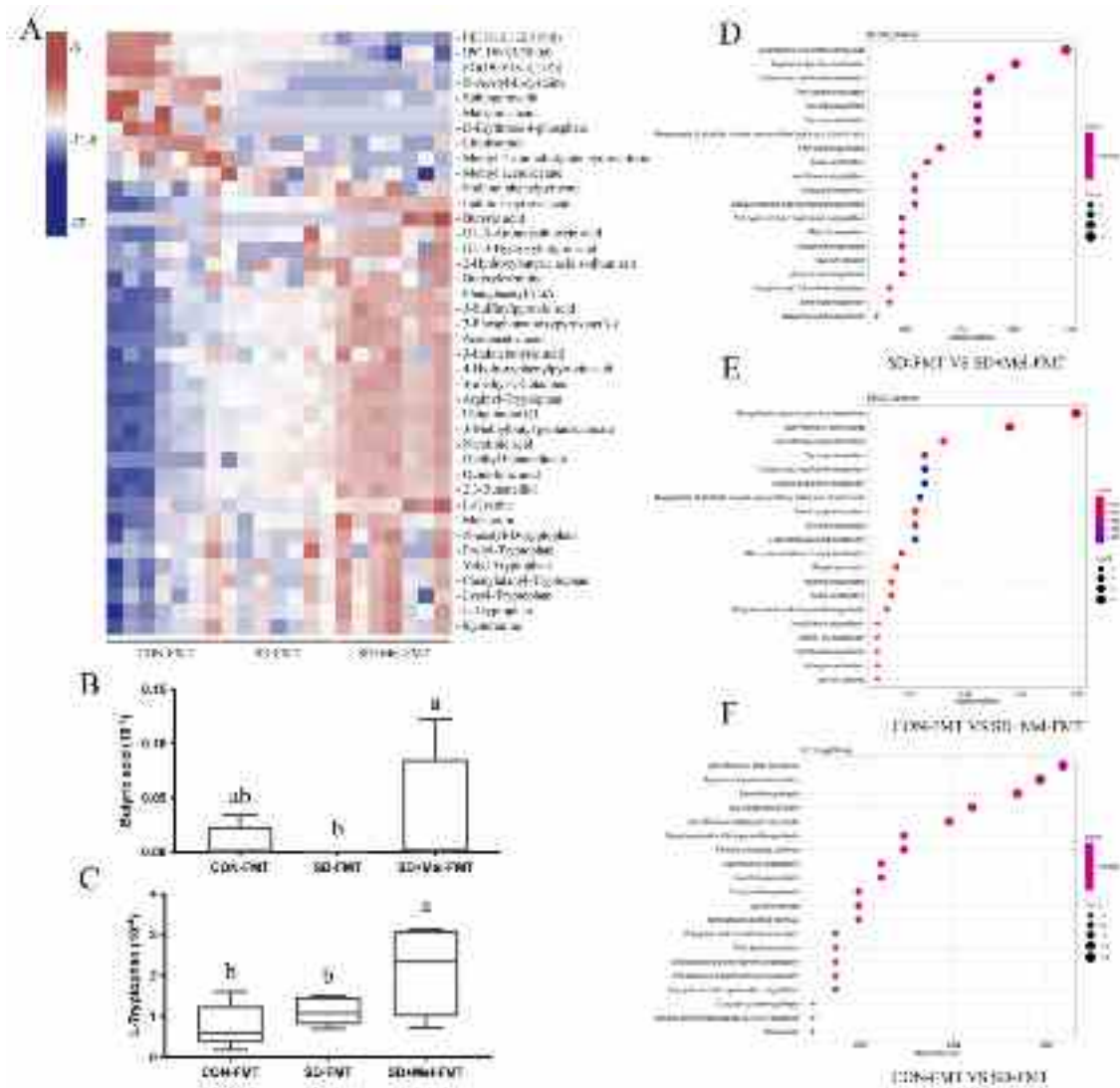


图 4-5 粪菌移植受体小鼠结肠内差异代谢物分析

(A) FMT 之后变化最为显著的 41 种代谢物制作的热图，(B) 丁酸的相对含量，(C) L-色氨酸的相对含量，(D) SD-FMT 与 SD+Mel-FMT 组的 KEGG 分析图，(E) CON-FMT 与 SD+Mel-FMT 组的 KEGG 分析图，(F) CON-FMT 与 SD-FMT 组的 KEGG 分析图。CON-FMT：接受 CON 组 FMT 的小鼠；SD-FMT：接受 SD 组 FMT 的小鼠；SD+Mel-FMT：接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-5 Analysis of differential metabolites in colon of fecal bacteria transplant recipient mice.

(A) Heat produced by 41 metabolites with the most significant changes after FMT, (B) KEGG analysis diagram of CON-FMT and SD-FMT groups, (C) KEGG analysis diagram of CON-FMT and SD+ Mel-FMT groups, (D) KEGG analysis diagram of SD-FMT and SD+ Mel-FMT groups. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.2.6 抗生素添加对小鼠体内细菌的影响

为了更好的研究粪菌移植对小鼠行为和功能的影响，我们采用抗生素处理小鼠达到耗竭小鼠体内细菌的目的，从而构建类无菌小鼠模型。在连续 10 d 的抗生素处理后定量粪便中的细菌含量，结果显示，与对照组相比，抗生素处理的小鼠粪便细菌显著下降（通过每克粪便颗粒的菌落形成单位[CFU]测量, $P < 0.05$ ）。这一结果表明成功构建类无菌小鼠模型（图 4-6 A-B）。

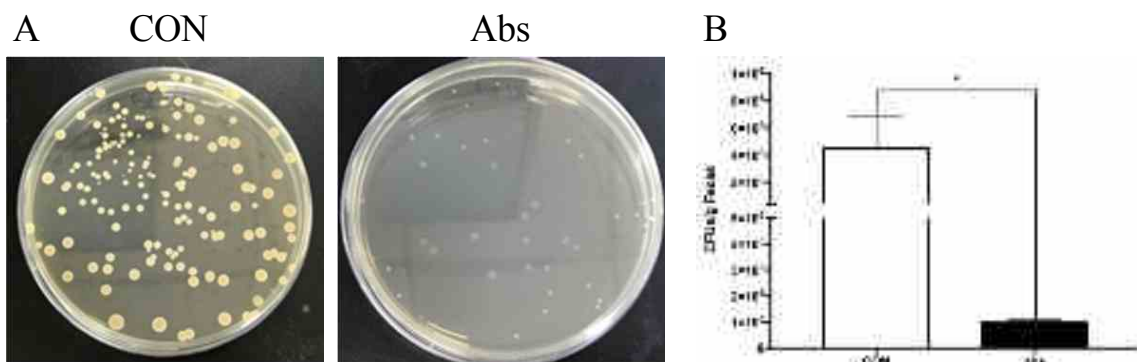


图 4-6 抗生素处理对粪便颗粒的菌落形成单位的影响

(A) CON 组和 Abx 组小鼠粪便培养细菌图；(B) CON 组和 Abx 组小鼠粪便颗粒的菌落形成单位[CFU]。CON: 对照组；Abs: 抗生素处理组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-6 Effect of antibiotic treatment on colony forming units of fecal particles.

(A) Fecal culture bacteria diagram of mice in CON and Abx groups, (B) Colony forming units of feces particles in CON and Abx groups [CFU]. CON: control group, Abs: antibiotic treatment group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.2.7 FMT 受体鼠认知功能的变化

为了测试 Mel 对 SD 诱导的记忆损伤的神经保护作用是否取决于肠道菌群，我们

将 CON、SD 组和 SD+Mel 组的粪便菌群移植到肠道菌群耗尽的小鼠中（经过 10 d 的抗生素预处理），持续 2 周（图 4-7A）。行为学结果显示，在平台存在时（图 4-7B），SD-FMT 组小鼠到达平台的潜伏期和总距离比 CON-FMT 组高 115.8% ($P=0.002$, 图 4-7D) 和 143.3% ($P=0.002$, 图 4-7E)。而各组小鼠的运动速度没有显著差异（图 4-7F）。当撤去平台时（图 4-7C），SD-FMT 组小鼠穿越目标象限的次数和在目标象限停留的时间比 CON-FMT 组显著降低 55.2% ($P=0.005$, 图 4-7G) 和 36.4% ($P=0.01$, 图 4-7H)。此外，SD+Mel-FMT 组与 CON-FMT 组之间无显著性差异。而与 SD-FMT 组小鼠相比，SD+Mel-FMT 组小鼠并未表现出与 SD 供体鼠相似的认识损伤（图 4-7B-H）。

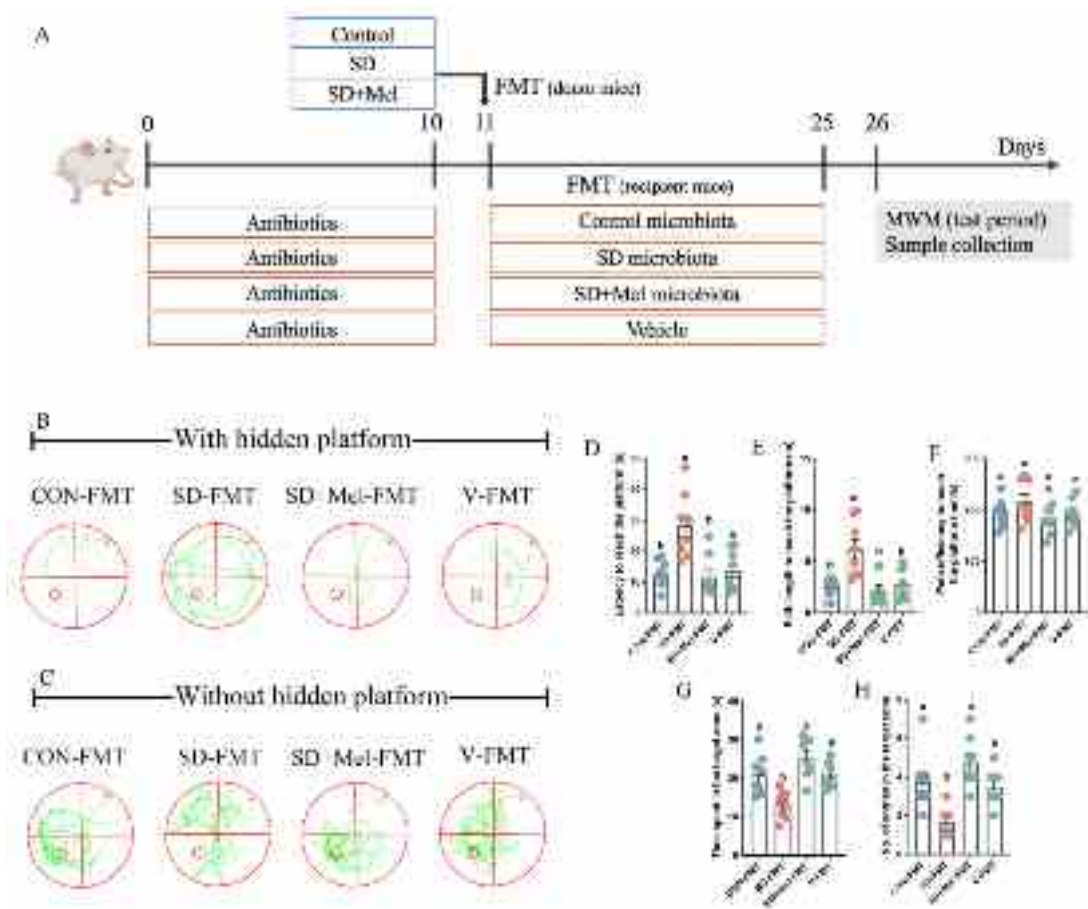


图 4-7 肠道菌群介导 Mel 对急性 SD 引起的空间记忆损伤的神经保护作用

(A) 试验流程图，(B) 空间记忆测试轨迹图（隐藏平台存在），(C) 空间记忆测试轨迹图（隐藏平台不存在），(D) 到达平台的路径长度，(E) 到达平台的逃避潜伏期，(F) 到达平台的速度，(G) 在目标象限停留的时间，(H) 进入目标象限的次数。CON-FMT：接受 CON 组 FMT 的小鼠；SD-FMT：接受 SD 组 FMT 的小鼠；SD+Mel-FMT：接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠；V-FMT：酶溶剂组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；

同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-7 The gut microbiota mediated the neuroprotective effect of Mel in spatial memory impairment induced by acute SD.

(A) Schematic illustration of experimental design, (B) Track plot of spatial memory test (with hidden platform), (C) Track plot of spatial memory test (without hidden platform), (D) Latency to reach the platform, (E) Path length to reach the platform. (F) Path efficiency to reach the platform, (G) Time spent in the target zone, (H) Number of entries into the target zone. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

同样的，我们也检测了小鼠的短期工作记忆能力。Y 迷宫结果显示，与 CON-FMT 组相比，SD-FMT 组小鼠的自发交替行为百分比显著降低 22.7% ($P < 0.001$)，表明 SD-FMT 组小鼠表现出短期工作记忆损伤。然而，与 SD-FMT 不同，SD+Mel-FMT 组小鼠并未表现出记忆的损伤，其自发交替行为百分比相对于 SD-FMT 组增加了 22.7% ($P = 0.004$)。

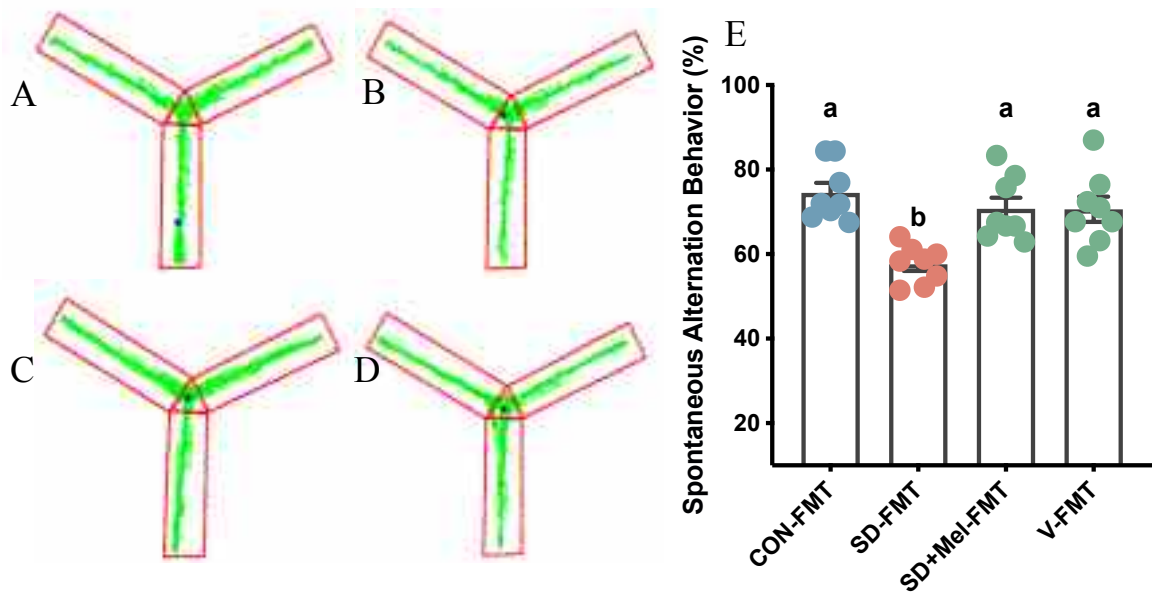


图 4-8 肠道菌群介导 Mel 对急性 SD 引起的短期工作记忆损伤的神经保护作用

(A) CON-FMT 组路径图；(B) SD-FMT 组路径图；(C) SD+Mel-FMT 组路径图；(D) V-FMT 组路径图；(E) 自发交替行为百分比。CON-FMT：接受 CON 组 FMT 的小鼠；SD-FMT：接受 SD 组 FMT 的小鼠；SD+Mel-FMT：接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠；V-FMT：酶溶剂组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-8 The gut microbiota mediated the neuroprotective effect of Mel in short-working memory impairment induced by acute SD.

(A) Track plot of CON-FMT group, (B) Track plot of SD-FMT group, (C) Track plot of SD+Mel-FMT group, (D) Track plot of V-FMT group. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.2.8 FMT 受体鼠血浆激素水平的变化

我们之前的结果发现急性 SD 能够引起应激激素 (NE 和 CORT) 的升高, 从而证明应激模型建立成功。进一步我们探讨粪菌移植试验中, 应激激素是否和前一部分试验有类似的变化趋势? ELISA 试验结果显示, CON-FMT, SD-FMT、SD+Mel-FMT 组和 V-FMT 组之间的应激激素水平没有差异。同样的, 血浆 Mel 的水平在各组间也没有明显变化 ($P > 0.05$)。这一结果提示粪菌移植的操作并没有引起小鼠的应激反应。

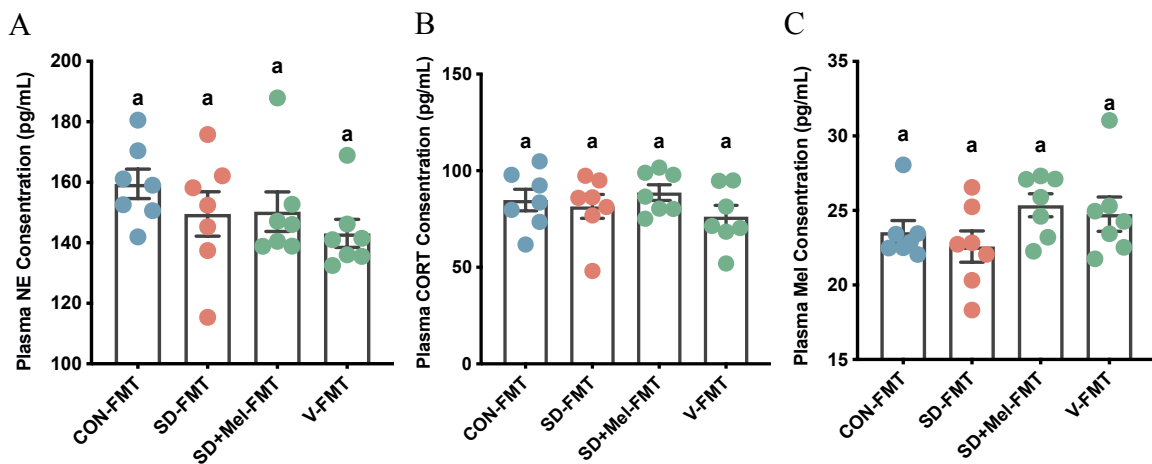


图 4-9 粪菌移植处理后受体鼠血浆激素水平的变化

(A) NE, (B) CORT, (C) Mel. CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠; V-FMT: 酶溶剂组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-9 Changes of plasma hormone levels in FMT Receptor mice.

(A) NE, (B) CORT, (C) Mel. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The

result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.2.9 FMT 受体鼠海马神经元铁死亡的变化

肠道菌群介导了急性 SD 诱导的记忆损伤，这个过程是否有铁死亡的参与？因此我们检测了铁代谢相关的指标，结果显示不同处理组的小鼠海马铁离子并未表现出大量的蓄积，尤其是接受了 SD 菌群移植的小鼠，并没有表现出与急性 SD 小鼠相似的海马神经元铁离子蓄积的情况（图 4-10 A-D）。铁转运蛋白的结果也显示，三个铁转运蛋白（*Tfr1*，*Dmt1* 和 *Fpn*）在各组间的表达没有显著的差异（ $P > 0.05$ ，图 4-10 E-G）。以上结果说明接受 SD 粪菌移植的小鼠表现出的记忆损伤现象，可能并不是由于神经元铁死亡造成的。

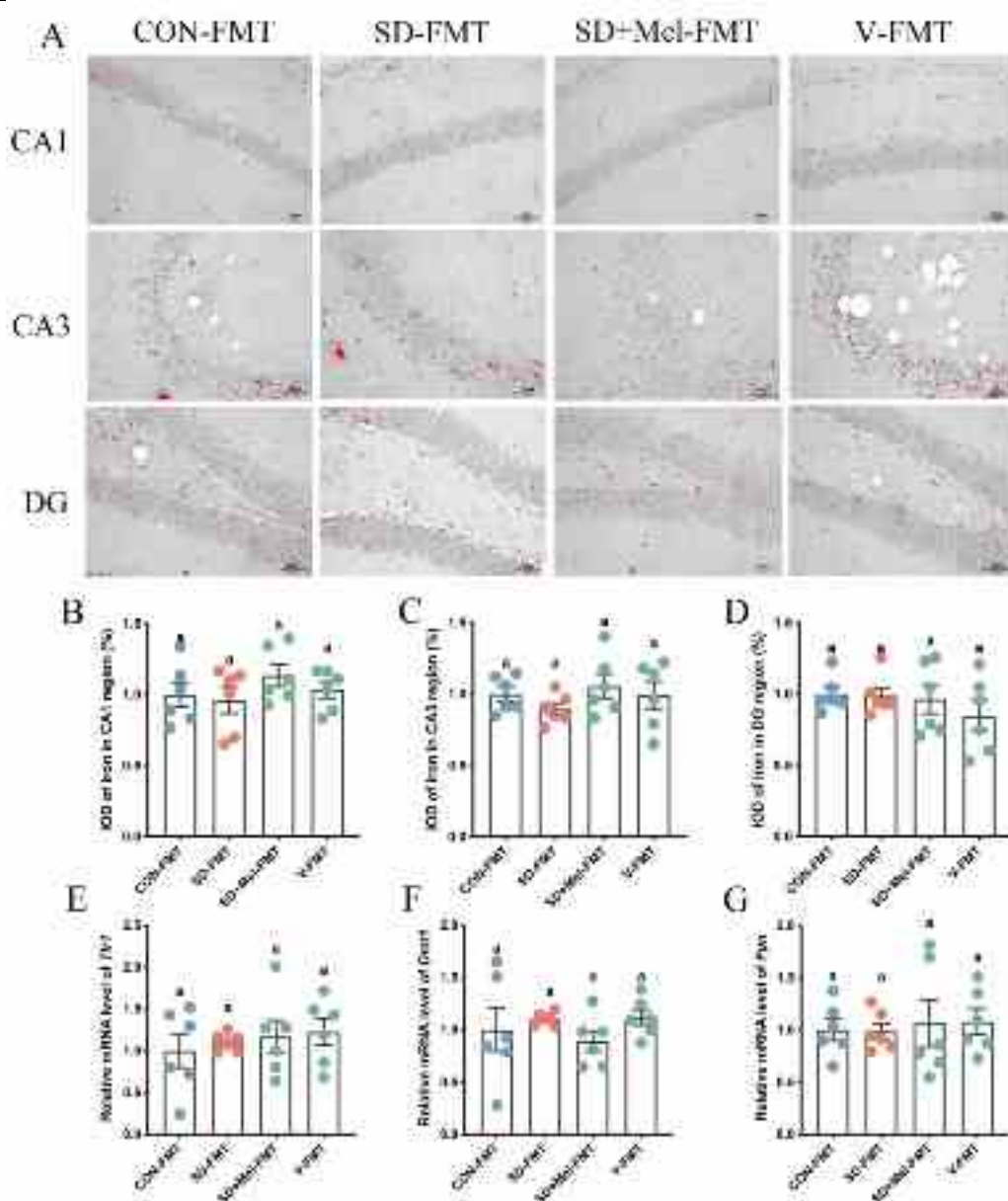


图 4-10 粪菌移植对小鼠海马神经元铁死亡的影响（铁代谢）

(A) 普鲁士蓝染色显示海马铁离子蓄积的照片。用 ImageJ 对铁离子染色结果进行处理。铁离子被观察到为红色颗粒（比例尺为 50 μm ），(B) 海马 CA1 区，(C) 海马 CA3 区，(D) 海马 DG 区，(E-F) 海马组织中铁转运蛋白 *Tf1*，*Dmt1* 和 *Fpn* 的 mRNA 相对表达水平。CON-FMT：接受 CON 组 FMT 的小鼠；SD-FMT：接受 SD 组 FMT 的小鼠；SD+Mel-FMT：接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠；V-FMT：酶溶剂组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-10 Effect of FMT on ferroptosis in hippocampal neurons of mice (Iron metabolism).

(A) Micrographs depict iron labeling in mouse hippocampal sections. The iron-staining results were processed using ImageJ. Iron deposits were observed as red granules. Bar = 50 μm , (B) hippocampal

CA1 areas, (C) hippocampal CA3 areas, (D) hippocampal DG areas, (E-F) Relative mRNA levels of iron transporter proteins *Tfr1*, *Dmt1* and *Fpn* in the hippocampus. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

进一步我们检测了脂质代谢相关指标,有趣的是,与 CON-FMT 组相比,SD-FMT 组小鼠海马的抗氧化酶和总抗氧化水平 GSH-PX、CAT、SOD、GPX4 和 T-AOC 显著下降了 61.6% ($P=0.004$)、63.8% ($P=0.03$)、49.9% ($P<0.001$)、32.0% ($P<0.001$) 和 56.3% ($P=0.014$), 而 MDA 的含量显著升高了 33.9% ($P=0.03$)。而接受 SD+Mel-FMT 粪菌移植的小鼠并没有表现出氧化损伤 ($P > 0.05$), 具体表现为与 SD-FMT 相比,海马的抗氧化酶和总抗氧化水平 GSH-PX、CAT、SOD、GPX4 和 T-AOC 显著升高了 78.7% ($P>0.05$)、211.3% ($P=0.009$)、101.4% ($P<0.001$)、69.1% ($P<0.001$) 和 89.8% ($P=0.047$), 而 MDA 的含量显著下降了 38% ($P=0.001$)。以上结果表明 SD 诱导的紊乱菌群能够向受体传递氧化损伤,但并不影响受体小鼠海马铁代谢水平,提示铁死亡可能并不是 SD-FMT 组小鼠出现记忆损伤的原因。

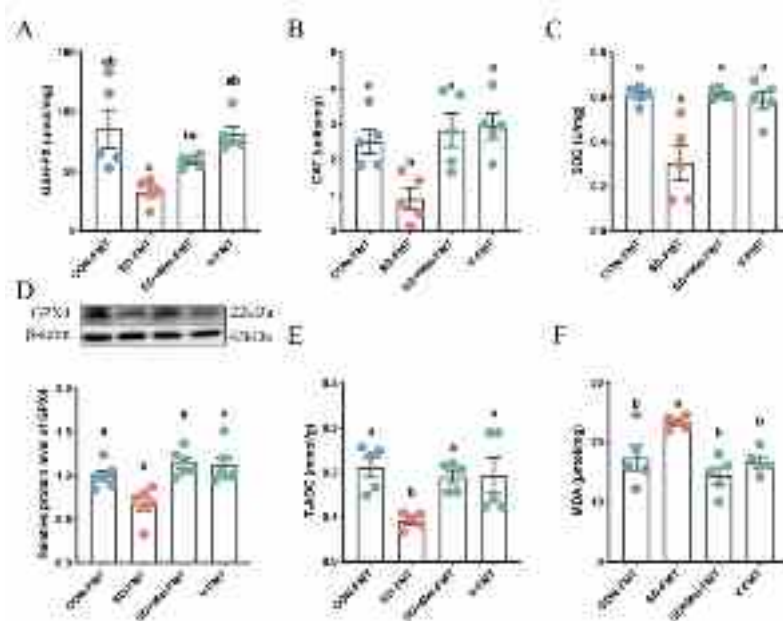


图 4-11 粪菌移植对小鼠海马神经元铁死亡的影响（脂质代谢）

(A) GSH-PX, (B) CAT, (C) SOD, (D) GPX4, (E) T-AOC, (F) MDA。CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠; V-FMT: 酶溶剂组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-11 Effect of FMT on ferroptosis in hippocampal neurons of mice (lipid metabolism).

(A) GSH-PX, (B) CAT, (C) SOD, (D) GPX4. (E) T-AOC, (F) MDA. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.2.10 FMT 受体鼠海马神经炎症反应的变化

Iba1 小胶质细胞免疫组织化学染色结果显示, 与对照组相比, 接受 SD 粪菌移植的小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区中 Iba1 阳性细胞的 IOD 值分别增加 51.9% ($P < 0.001$), 27.6% ($P = 0.01$) 和 32.3% ($P = 0.002$)。然而, 接受 SD+Mel 粪菌移植的小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区中 Iba1 阳性细胞的 IOD 值较 SD-FMT 组降低了 28.9% ($P = 0.001$), 26.0% ($P = 0.002$) 和 31.5% ($P = 0.001$)。接受 CON 和接受 SD+Mel 供体小鼠粪菌移植的小鼠之间没有统计学差异 ($P > 0.05$)。以上结果表明 SD 小鼠的粪便菌群能够引起受体小鼠海马小胶质细胞的过度活化, 而 Mel 处理过的 SD 小鼠的

粪菌菌群对受体小鼠没有影响 (图 4-12 A-B)。

如图 4-12 C-F 所示, 结果表明与 CON-FMT 相比, SD-FMT 组小鼠海马的促炎因子 IL-6 与 TNF- α 的水平显著上调了 36.5 % (P=0.03) 和 47.2 % (P=0.01), 而抑炎因子 IL-4 与 IL-10 的水平分别降低了 44.0 % (P=0.04) 和 35.5 % (P<0.001)。与此相比, 接受 SD+Mel 粪菌移植的小鼠海马组织并没表现出炎症细胞因子的失衡。数据分析表明与 SD-FMT 组相比, SD+Mel-FMT 组海马组织促炎因子 IL-6 与 TNF- α 的水平显著降低了 20.1% (P=0.01) 和 28.2% (P=0.03), 而抗炎因子 IL-4 与 IL-10 的水平显著增加了 100.2 % (P = 0.03) 和 31.3 % (P = 0.000)。以上结果表明, 接受 Mel 处理的急性 SD 小鼠的粪便细菌并不会引起受体鼠海马神经炎症反应。

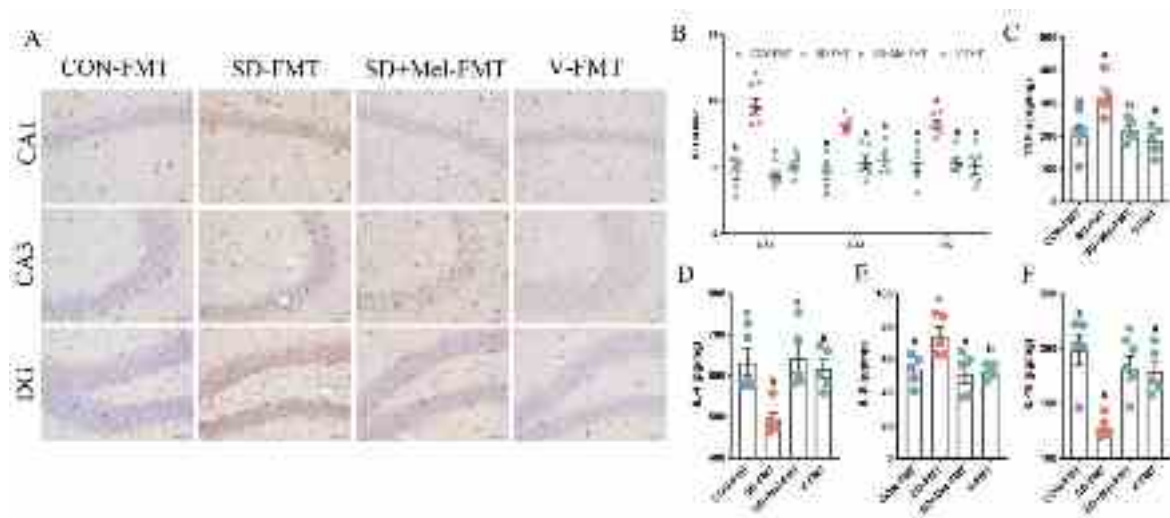


图 4-12 粪菌移植对小鼠海马神经炎症的影响

(A) 不同试验组的海马小胶质细胞 Iba1 染色图像 (比例尺为 50 μ m), (B) 海马 CA1, CA3 和 DG 区 Iba1 阳性细胞的 IOD 值, (C-D) 海马组织炎症细胞因子的水平 (TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10)。CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠; V-FMT: 酶溶剂组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05); 同字母组差异无统计学意义 (P \geq 0.05)。

Fig. 4-12 Effect of FMT on neuroinflammation in hippocampus of mice.

(A) Images of the Iba1-stained hippocampal microglia in the different experimental groups. Bar = 50 μ m. (B) IOD of Iba1-positive cells in the hippocampal CA1, CA3 and DG region. (C-F) The levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10) in the hippocampus. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at P < 0.05; those with the same letter do not differ significantly (P \geq 0.05).

1.2.11 FMT 受体鼠海马神经元凋亡的变化

如图所示，结果显示与 CON-FMT 组相比，SD-FMT 组海马 Cleaved caspase-3 和 Bax 表达量显著升高 86.3% ($P = 0.001$) 和 99.4% ($P = 0.001$)，而 Bcl-2 表达量降低了 51.5% ($P = 0.001$)。然而，SD+Mel-FMT 组海马 Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达量较 SD-FMT 组显著降低了 46.1% ($P = 0.001$) 和 41.9% ($P = 0.001$)，而 Bcl-2 的表达量升高了 107.3% ($P = 0.001$)。以后结果表明，接受 SD 粪菌移植的受体鼠海马出现细胞凋亡的现象，而接受 SD+Mel 粪菌移植的受体鼠海马并未观察到细胞凋亡的发生。

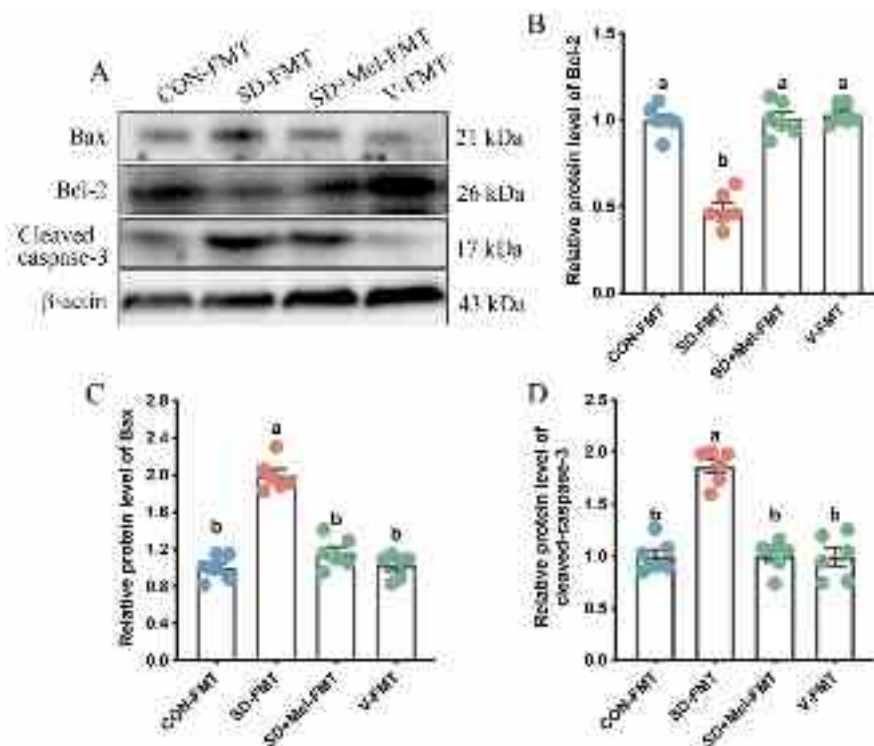


图 4-13 粪菌移植对小鼠海马神经元凋亡的影响

(A) Western blot 蛋白印迹图，(B) 海马组织中 Bcl-2 的相对蛋白水平，(C) 海马组织中 Bax 的相对蛋白水平，(D) 海马组织中 Cleaved caspase-3 的相对蛋白水平。CON-FMT：接受 CON 组 FMT 的小鼠；SD-FMT：接受 SD 组 FMT 的小鼠；SD+Mel-FMT：接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠；V-FMT：酶溶剂组。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-13 Effect of FMT on apoptosis in hippocampal neurons of mice.

(A) Western blotting of apoptosis-related proteins expression, (B) Relative protein levels of Bcl-2 in the hippocampus, (C) Relative protein levels of Bax in the hippocampus, (D) Relative protein levels of Cleaved caspase-3 in the hippocampus. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle

group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

1.4 讨论

急性 SD 被认为是一种影响身体多个组织的应激源。我们前期的研究表明，外源性 Mel 可以有效减轻急性 SD 引起的认知障碍 (Wang et al., 2021a)。同时，我们还观察到急性 SD 诱导肠道微生物群失调和肠道屏障损伤，补充 Mel 可缓解上述变化 (Gao et al., 2019)。越来越多的研究表明，微生物失调在急性 SD 诱导的认知功能障碍的发病机制中起重要作用 (Wang et al., 2021a)。因此，我们建立 FMT 模型，进一步验证肠道微生物在急性 SD 引起的记忆损伤中的作用。我们用抗生素处理小鼠，以消耗大部分肠道菌群，便于后续粪便细菌的定植。将 CON 组、SD 组和 SD+Mel 组小鼠的粪便细菌移植到受体小鼠体内。我们发现，具有“SD 微生物群”定植的受体小鼠在到达平台的潜伏期和路径长度增加，进入目标区域的数量和时间减少，表明急性 SD 引起的微生物失调可以传递认知障碍。与我们的发现相似，接受 PD 小鼠肠道菌群的小鼠表现出胃肠道功能障碍和运动障碍。此外，在受体小鼠的 SN 中检测到多巴胺能神经元的死亡 (Zhao et al., 2021)。但有趣的是，SD+Mel 菌群定植的受体小鼠并没有表现出明显的认知功能障碍，这进一步验证了 Mel 可以逆转 SD 诱导的肠道菌群失衡，改善后的肠道菌群并不影响正常小鼠的记忆功能。这些结果表明，肠道微生物群的变化和由此产生的有害症状是可以传递的。急性 SD 是一种应激源，会引起血浆应激激素水平的升高。在移植 SD 小鼠粪便诱导记忆损伤的过程中，是肠道菌群发挥了介导作用还是应激发挥了作用。我们发现不同组的受体小鼠的血浆应激激素 (CORT 和 NE) 没有显著的变化，而 Mel 也在各组间的变化没有差异。这就表明在 FMT 过程中，并没有引起机体的应激反应。

上一章的结果表明神经元的丢失引起了小鼠认知功能的障碍，那么铁死亡是否参与其中呢？我们发现，在 SD-FMT 和 SD+Mel-FMT 小鼠的海马组织中均未观察到大量铁离子的蓄积，铁转运蛋白也未表现出紊乱的状态，这就提示急性 SD 小鼠有害的肠道菌群并不是通过引起神经元铁死亡而导致的认知功能障碍，可能有其他细胞死亡方式参与其中。小胶质细胞的活化可介导神经炎症反应，引起神经元丢失和神经功能障碍 (Socodato et al., 2020)。我们发现，接受了“SD 微生物群”的受体小鼠在海马中表现出 Iba1 阳性小胶质细胞的数量增加。小胶质细胞是驻留在大脑中的免疫细胞，在神经炎症中发挥关键作用，在生理和病理条件下都是神经功能和认知的强有力的调节因子。应激诱导的神经炎症过程中，促炎细胞因子的释放导致失活的小胶质细胞转化为激活的吞噬状态。小胶质细胞虽然可以直接调节认知，但也可以分泌细胞因子等

炎症介质影响认知 (Li et al., 2020b)。我们发现 SD-FMT 受体小鼠海马组织中 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高。进一步分析发现, 促凋亡蛋白表达明显增加, 凋亡蛋白表达明显减少。最后, 以海马体神经元死亡为特征的神经退化发生在海马体。与我们的结果相似, 帕金森模型鼠的粪菌移植给正常小鼠, 能够激活 TLR4/Myd88 信号通路, 激活神经炎症反应, 造成受体小鼠行为的损伤 (Zhao et al., 2021)。以上结果表明急性 SD 鼠肠道菌群的移植, 通过引起受体鼠海马神经炎症和凋亡的发生, 从而导致神经元的大量丢失, 最终模拟了供体小鼠的认知功能障碍。

1.5 小结

接受急性 SD 小鼠粪菌移植的受体鼠表现出结肠肠道菌群的紊乱, 具体表现为致病菌的相对丰度增加而益生菌的相对丰度减少, 并在海马组织观察到小胶质细胞过度活化, 神经炎症和凋亡的发生, 从而导致神经元的大量丢失, 最终模拟了供体小鼠的认知功能障碍。而接受 SD+Mel 粪菌移植的受体小鼠并未表现出类似 SD 小鼠的损伤。

2. *Aeromonas* 代谢物 LPS 与小胶质细胞互作在褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导小鼠认知障碍中的作用

2.1 引言

在肠脑轴的双向交流中, 除了微生物分解产生的代谢物能作为信号分子传递信息外, 微生物本身的一些成分也能参与肠脑轴的调控中。我们的研究显示接受急性 SD 粪菌移植的受体鼠结肠中肠道菌群发生失调, 主要表现为变形菌门 (Proteobacteria) 及气单胞菌 (*Aeromonas*) 的相对丰度显著上调、多样性与丰富度减少, 以及毛螺菌 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*) 的相对丰度显著下调。在 UC 与 CD 患者中变形菌门 (Proteobacteria) 的相对丰度显著上调, 这一结果表明变形菌门 (Proteobacteria) 的上调参与了结肠炎甚至全身炎症的进程 (Matijašić et al., 2016)。变形菌门 (Proteobacteria), 包含大多数的革兰氏阴性菌, 其相对丰度的增加被视为肠道炎症的标志之一 (Dicker et al., 2021)。LPS 是革兰氏阴性菌胞壁的主要成分, 能够引起肠道炎症, 甚至引起全身炎症反应。由菌群失调引发的肠道炎症会诱导促炎细胞因子的释放, 如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 及其他免疫因子, 如果不加以控制, 这些因子可能会产生严重的肠道外后果 (Agirman et al., 2021)。已经发表的研究和本文前部分的结果都显示, 肠道菌群稳态的改变能够影响到大脑的结构和功能。大脑中含有丰富的细胞类型, 不同的细胞在面对肠道动态变化的敏感度是不同的。一项研究发现将正常小鼠和抗生素处理的小鼠前额叶皮层进行单细胞的测序, 通过细胞的分选后发现差异基因

主要在两种细胞亚群内聚集，分别是兴奋性神经元和小胶质细胞，这就表明小胶质细胞能够更加敏锐的感受到肠道菌群的变化，并且能够对菌群的变化作出回应 (Chu et al., 2021)。小胶质细胞是大脑中的固有免疫细胞，其对炎症相关的分子具有高度的敏感性。炎症性肠病患者常伴有焦虑、抑郁症状，甚至产生认知功能受损，而 LPS 是引发脑部炎症的关键介质。进入机体的 LPS 及循环中的促炎因子可以破坏上皮紧密连接，损害 GVB 和 BBB 的完整性，肠道通透性增加或肠漏，加上中枢神经系统屏障的破坏，为肠腔源性分子、毒素和病原体到达脑实质，激活局部免疫细胞和触发神经炎症提供了通道 (Carloni et al., 2021)。因此我们猜测，LPS 可能作为急性 SD 的信号分子，促进小鼠认知功能的损伤，而其可能将小胶质细胞作为其作用的靶细胞。

TLR 在先天免疫反应中起着重要的作用，是参与非特异性免疫的一类重要蛋白分子，其中 TLR4 作为“门户”蛋白启动机体的炎症链式反应。在脑损伤和神经变性中起关键作用。小胶质细胞通过 TLR4 调节神经元活性，TLR4 在炎性状态下被激活后，经 MyD88 启动下游 NF- κ B 或 MAPK/ERK 信号转导途径，激活相关蛋白，促使促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 大量分泌，发挥强有力致炎作用 (Wei et al., 2020)。在帕金森模型下，FMT 将炎症信号传递给受体小鼠，LPS 通过激活 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路，导致了小鼠行为障碍 (Zhao et al., 2021)。我们的研究证实急性 SD 能够引起神经炎症的发生，表现出小胶质细胞的激活和促炎因子的增加。研究发现睡眠不足人群的粪菌能够引起无菌小鼠海马小胶质细胞的活化及后续的神经炎症反应，其机制是 LPS 与其 TLR4 受体结合，激活了 NF- κ B 通路，最终导致了小鼠认知功能的损伤 (Wang et al., 2021a)。但尚不清楚，在急性 SD 模型下，小胶质细胞和神经元之间的关系以及 Mel 在其中发挥的作用。

因此，我们在已有的急性 SD 模型和 FMT 试验下，建立了气单胞菌 *Aeromonas veronii* 定植试验和 LPS 添加试验，探究急性 SD 模型及外源性 Mel 的干预下，小胶质细胞和神经元之间的关系。

2.2 材料与方 法

2.2.1 试验动物的处理

共有 140 只 8 周龄雄性小鼠 (ICR, 维通利华, 北京) 饲养于 35 个鼠笼 (4 只/笼), 温度为 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $50 \pm 10\%$, 光照制度为光暗比 14:10 (每天上午 7:00 开始给光)。小鼠可自由采食与饮水。所有的小鼠在适应一周之后, 随机等分为 7 个组并用于 2 个试验: (1) *Aeromonas veronii* (*A.veronii*) 定植试验: CON (对照组); Aero (*A.veronii* 定植组) 与 A-Mel (*A.veronii* 定植+Mel 干预组); (2) LPS 处理试验: LPS 添加组 (LPS)、LPS 添加+褪黑激素干预组 (LPS+Mel)、LPS 添加+TAK-242 (TLR4

拮抗剂) 干预组 (LPS+TAK-242) 与酶溶剂对照组 (CON)。所有小鼠适应一周。

(1) *Aeromonas veronii* 定植试验: Aero 组和 A+Mel 组小鼠给予含抗生素的饮用水 (与 FMT 受体小鼠的抗生素治疗一致) 10 d。抗生素处理后, Aero 与 A+Mel 两组小鼠在早上 8 点通过灌胃给予含有 10^8 CFU 的 *A.veronii* 的 0.1 mL 的 PBS 溶液, 在此操作 1 h 前, 通过腹腔注射给予 A+Mel 组小鼠 20 mg/kg 的 Mel。

(2) LPS 处理试验: 将 LPS 溶于 DMSO 并配置为 2 mg/kg 的浓度; TAK-242 (TLR4 拮抗剂) 配置成 150 mg/kg 的终浓度。适应期结束之后, LPS+Mel 与 LPS+TAK-242 组小鼠在早上 7:00 连续 3 d 分别腹腔注射 Mel (20 mg/kg) 与 TAK-242 (150 mg/kg)。1 h 之后, LPS、LPS+Mel 与 LPS+TAK-24 组小鼠分别腹腔注射 LPS (2 mg/kg)。

2.2.2 试验动物的取材

A.veronii 定植试验组和 LPS 处理试验组中未进行行为学检测的小鼠在试验结束后, 于次日早上 8:00 进行取材。采用 1% 的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉, 并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4% 多聚甲醛固定。同组的剩余 6 只小鼠取出双侧海马, 立即放入液氮速冻半小时再转移至 -80 °C 冰箱用于 ELISA、qRT-PCR、Western blot 和抗氧化试剂盒检测。

2.2.3 主要的仪器设备

荧光定量 PCR 仪 (LightCycler®480, RocheAppliedScience, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、电泳仪 (伯乐生命医学产品有限公司, 上海)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上海)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、石蜡切片机 (LEICA, RM2235 型, 德国)、生物组织包埋机 (BM-VI)、光学显微镜 (Olympus, BX51 型, 日本)、图像采集系统 (Olympus, DP72 型, 日本)、高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、酶标仪 (BLO-RAD, 550 型, 美国)、二氧化碳培养箱 (MCO-17AC, 三洋, 日本)、超净工作台 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司) 等。

2.2.4 试验药品及试剂

DMEM (SH30023.01B, HyClone, 北京)、胎牛血清 (11012-8611, 浙江天杭生物科技股份有限公司, 浙江)、青链霉素混合液 100× (P1400, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、0.25%

Trypsin (T1350, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)、TRNzol Reagent TRIzol 总 RNA 提取试剂 (CW0580A, 康为世纪生物技术有限公司, 江苏)、2 × Fast qPCR Mix (SYBR Green I) (TSE202, 北京擎科新业生物技术有限公司, 北京)、脱脂奶粉 (中国伊利)、BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014)、RIPA 裂解液 (CW2333)、蛋白酶抑制剂 (CW2200)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (CW0027)、苏木精、盐酸酒精分色液、脱脂奶粉 (中国伊利)、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素 (CW0116S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、2% 戊巴比妥钠溶液、0.05 M TBS、LPS 检测试剂盒 (JL20691, 上海江莱武汉云克隆)、LPS (27840; Sigma, St. Louis, MO)、*Aeromonas veronii* (CVCC3700) (27840; Sigma, St. Louis, MO)、Mel (M5250; Sigma, St. Louis, MO, 美国)、菌群 DNA 提取试剂盒 (MoBio, 12988-10, 美国)、TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10 ELISA 试剂盒 (SCA133Mu、SEA563Mu、C90033Mu 和 SEA056Mu, 武汉云克隆技术有限公司, 武汉)。兔抗小鼠 Iba1 单克隆抗体 (ab178846, abcam, 美国)、兔抗小鼠 β -actin 单克隆抗体、兔抗 TLR4 多克隆抗体 (ab13556, abcam, 美国)、兔抗小鼠 HDAC3 多克隆抗体 (ab32369, abcam, 美国)、兔抗鼠 p-P65 单克隆抗体 (ab76302, abcam, 美国)、兔抗鼠 p-I κ B 单克隆抗体 (ab133462, abcam, 美国)、TAK-242 (TLR4 的拮抗剂, Beyotime, China)、PDTC (NF- κ B 的拮抗剂; MCE, New Jersey, USA)、ITSA-1 (HDAC3 的激动剂; MCE, New Jersey, USA)、AZD3965 (MCT1 的抑制剂; MCE, New Jersey, USA)

2.2.5 莫里斯水迷宫

A.veronii 定植试验组的莫里斯水迷宫检测与 FMT 试验相同, 在细菌定植结束后进行行为学的检测; 而 LPS 处理试验组的莫里斯水迷宫检测与急性 SD 试验相同, 在 LPS 处理前先进行为期 5 d 的行为学训练, 之后再进行 3 d 的 LPS 处理, 紧接着进行行为学的检测。其他行为学的操作过程与第二章什么相似。

2.2.6 免疫组织化学染色

试验步骤同第二章第三节 3.2.7。兔抗小鼠 Iba1 的稀释比例是 1:1000。

2.2.7 Western blot

试验操作同第三章第一节, 兔抗小鼠 TLR4、HDAC3、p-I κ B、p-P65 和 Cleaved caspase-3 的抗体浓度都为 1:1000, β -actin 多克隆抗体的浓度为 1:8000。Western blot 以 β -actin 为内参, 目的蛋白的相对表达量为目的蛋白水平/ β -actin 蛋白水平。

2.2.8 qRT-PCR

试验步骤同第二章第一节 1.2.8。结肠内容物中 *Aeromonas* 的 mRNA 相对含量的检测。*Aeromonas* 的上下游引物为:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 与 GGCTACCTTGTTACGACTT。

2.2.9 ELISA 测定海马炎症细胞因子 (TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10) 的含量

试验步骤同第二章第三节 3.2.8。

2.2.10 ELISA 测定海马 LPS 含量

2.2.10.1 标准品的稀释与加样

标准品制备: 将 0.5 mL 的标准品稀释液加入标准品中, 轻轻晃动使其混匀, 此时瓶内标准品的浓度为 1000 ng/mL。准备 5 个 1.5 mL 的 EP 管, 向每个 EP 管中加入 600 μ L 的标准品稀释液, 依次 3 倍稀释成 1000 ng/mL, 333.33 ng/mL, 111.11 ng/mL, 37.04 ng/mL, 12.35 ng/mL, 标准品稀释液 (0 ng/mL) 直接作为空白孔。

2.2.10.2 试验步骤

(1) 样品加样: 一共设置三类检测孔, 包括标准孔、待测样品孔、空白孔。将上述配制好的标准品加入孔中。空白孔加 25 μ L 标准品稀释液, 将待测样品加入其余孔内, 然后立即向每个孔内加入 25 μ L 的检测工作液 A, 轻轻晃动使其混匀, 在此过程中避免起泡的产生, 盖上覆膜后放入 37 $^{\circ}$ C 温箱内孵育 1 h;

(2) 将孔内的液体轻轻甩干;

(3) 配制检测工作液 B, 然后将其加入孔内, 加上覆膜, 37 $^{\circ}$ C 温箱内孵育 30 min;

(4) 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 5 次, 方法同步骤 2。

(5) 每孔加底物溶液 50 μ L, 酶标板加上覆膜, 在 37 $^{\circ}$ C 温箱内显色 (反应时间控制在 10~20 min, 不要超过 30 min。当观察到后三个标准孔出现明显的梯度蓝色, 前三孔颜色不明显时, 即可停止显色)。

(6) 将终止溶液 25 μ L 加入孔内, 终止反应, 此时蓝色立转黄色。按照样品加样的顺序加入底物溶液, 液体加入后轻轻晃动使其混匀。

(7) 显色结束后立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度 (OD 值)。

(8) 数据处理: 利用标准品与样本的 OD 值作图并计算各样品浓度。标准品的浓度为纵坐标, OD 值为横坐标绘制标准曲线并得出公式, 将各样品的 OD 值代入该公式中, 得出样品的浓度, 若样品稀释, 则乘以稀释倍数, 得数即为实际浓度。

2.2.11 细胞培养

2.2.11.1 细胞株

小鼠小胶质细胞 BV2，液氮保存。

2.2.11.2 细胞复苏

(1) 从液氮内将冻存的细胞快速取出并立即放在 37 °C 温箱中晃动，使其快速复温溶解。

(2) 将复苏后的细胞吸入 4 mL 的离心管中，用封口膜封住放入离心机中离心，1000 rpm，4 °C，5 min。

(3) 采用 10 cm 的培养皿培养复苏后的细胞，向培养皿中加入 10 mL 的完全培养基，将离心好的细胞上清液倒掉，用完全培养基将沉淀的细胞重悬，缓慢轻柔的将细胞吹打散开，并将其转移至刚才倒好的培养皿中。在显微镜下观察培养皿中的细胞是否均匀的分布在培养皿中，避免形成大的细胞团块影响细胞生长。后放入 37 °C，5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2.11.3 细胞传代

(1) 细胞培养 36 h~48 h 后，待细胞密度达到 80%后停止培养；

(2) 半贴壁细胞会附着瓶底，但贴壁不紧，轻轻吸取培养基轻轻吹打细胞面就会脱落，不需要胰酶消化。

(3) 轻轻吸走培养上清，留 2~3 ml 培养基轻轻吹打细胞面吹下细胞；

(4) 混匀细胞，收集细胞培养基，900 rpm 离心 3~5 min，弃上清；

(5) 加新的完全培养基轻轻重悬细胞，均匀分到新的培养瓶里；

(6) 补足完全培养基，将培养瓶放回培养箱静置培养；

2.2.11.4 细胞冻存

选择状态好并且长满的细胞进行冻存，离心获得细胞沉淀后，加配置好的冻存液轻轻重悬细胞；将细胞悬液尽快移入已经做好标记的冻存管；将冻存管转入程序冻存盒，放入-80 °C 冰箱过夜，第二天转入液氮保存。

冻存液配制比例：92%FBS+8%DMSO。

2.2.11.5 细胞计数和培养

(1) 将离心后的细胞沉淀重悬后进行细胞计数与分盘试验。将细胞分别以 1×10^5

个/mL 和 5×10^6 个/mL 的密度培养至 96 孔板和 12 孔板中。这两种孔板的细胞进行分组：CON 组、LPS 组、LPS+Mel 组、LPS+Mel+TAK-242 组、LPS+Mel+AZD3965 (MCT1 抑制剂) 组、LPS+Mel+ITSA-1 (HDAC3 激动剂) 组和 LPS+Mel+PDTC (NF- κ B 拮抗剂) 组。

(2) 将分盘好的各组细胞放入培养箱中培养 6 h，待细胞完全贴壁后倒掉上清，换成同等体积的基础培养基，再继续放入培养箱中培养。

(3) 12 h 后，向 LPS+Mel+TAK-242 组、LPS+Mel+AZD3965 组、LPS+Mel+ITSA-1 组和 LPS+Mel+PDTC 组细胞中加入 10 mM TAK-242、2 μ M AZD3965、5 μ M ITSA-1 和 5 nM PDTC，随后将加药后的细胞放入培养箱中继续培养 30 min。

(4) 培养 30 min 后，LPS+Mel 组、LPS+Mel+TAK-242 组、LPS+Mel+AZD3965 组、LPS+Mel+ITSA-1 组和 LPS+Mel+PDTC 细胞加入 2 μ M Mel，随后将加药后的细胞放入培养箱中继续培养 30 min。

(5) 培养 30 min 后，CON 组、LPS 组、LPS+Mel 组、LPS+Mel+TAK-242 组、LPS+Mel+AZD3965 组、LPS+Mel+ITSA-1 组和 LPS+Mel+PDTC 组细胞加入 1 μ M LPS，同时向 CON 组细胞加入等量的 DMSO，随后将加药后的细胞放入培养箱中继续培养。

(6) 培养 12 h 后，从培养箱中取出细胞，96 孔板的细胞用于 ROS 检测与 MTT 的检测；12 孔板的细胞收集起来后进行 ROS 荧光成像检测、Western blot、抗氧化水平检测与 qRT-PCR 试验检测。

2.2.11.6 条件培养基

将所有细胞分为以下组：CON 组、LPS 组、LPS+Mel 组、LPS+Mel+TAK-242 组、LPS+Mel+AZD3965 组、LPS+Mel+ITSA-1 组和 LPS+Mel+PDTC 组。添加完药物 12 h 后，收集每组细胞的上清液形成条件培养基，用该培养基培养 HT22 细胞，用来模拟体内的环境。

2.2.12 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM)，组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

2.3 结果

2.3.1 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马 LPS 含量的影响

进一步我们检测了急性 SD 和 Mel 干预以及 FMT 处理后小鼠海马中 LPS 的含量。具体地，急性 SD 组和 SD-FMT 组小鼠大脑 LPS 的含量相较于各自的对照组显著升高 62.5% (P = 0.002, 图 4-14 B) 和 56.8 % (P = 0.014, 图 4-14 D)，而 Mel 的干预以及干预后的粪菌移植都降低了脑中过高的 LPS 含量。此外，我们也观察到相较于 CON-FMT 组，SD-FMT 组 Proteobacteria 和 *Aeramonas* 的相对丰度升高 (图 4-14 A, C)。此外 *Aeramonas* 与 LPS 的含量呈显著正相关 (图 4-14 E)。因此我们推测急性 SD 通过诱导肠道菌群 *Aeramonas* 及其胞壁成分 LPS 进而引起小鼠认知功能障碍。

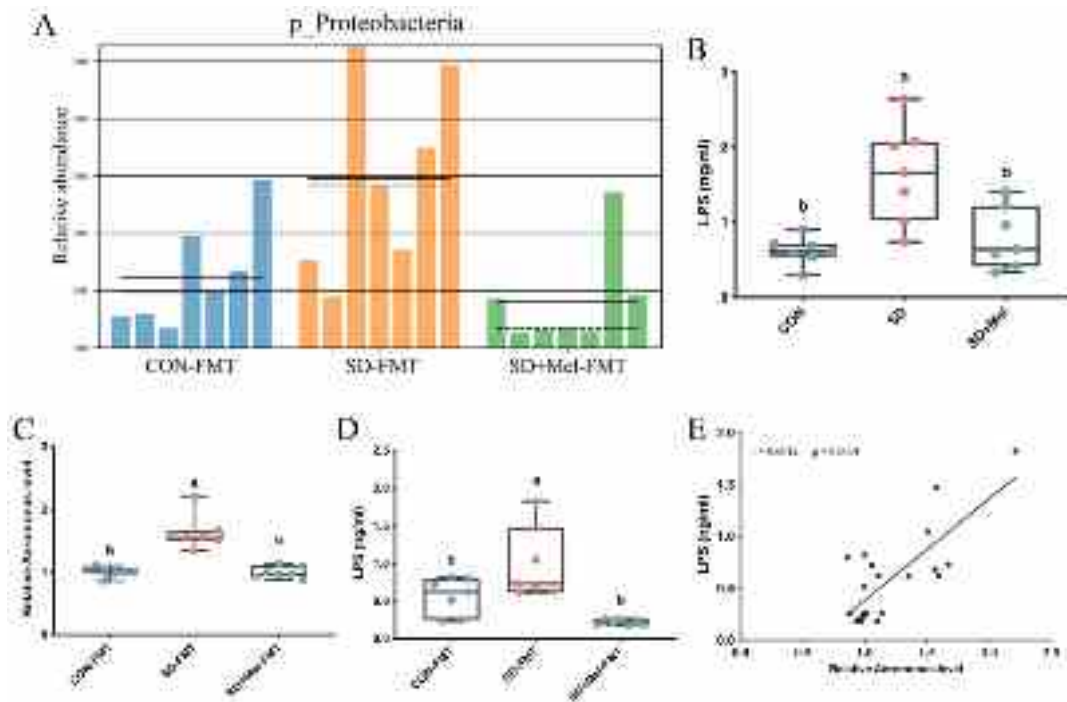


图 4-14 急性 SD 及 Mel 干预对小鼠海马 LPS 含量的影响

(A) 粪菌移植受体小鼠结肠 Proteobacteria 的相对丰度，(B) CON、SD 和 SD+Mel 组海马 LPS 的含量，(C) 粪菌移植受体小鼠结肠 *Aeramonas* 的相对丰度，(D) 粪菌移植受体小鼠海马 LPS 的含量，(E) *Aeramonas* 和 LPS 的相关性。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05)；同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 4-14 The effects of acute SD and Mel intervention on LPS content in hippocampus of mice. (A) The relative abundance of Proteobacteria in the colon of FMT recipient mice, (B) The content of LPS in CON, SD and SD+Mel groups, (C) The relative abundance of *Aeramonas* in the colon of FMT recipient mice, (D) The content of LPS in the hippocampus of FMT recipient mice, (E) Correlation between *Aeramonas* and LPS, The result represents the mean ± standard error of the mean., and there was no significant difference between the values of the same superscript letters (P < 0.05). There was no significant difference in the same letter group (P ≥ 0.05).

2.3.2 Mel 改善 *A. veronii* 定植引起的小鼠认知功能障碍

为了验证 *Aeromonas* 相对丰度的升高在急性 SD 诱导的记忆损伤中的作用, 我们建立了 *A.veronii* 定植小鼠模型 (图 4-15 A)。结果显示, 与对照组相比, Aero 组小鼠到达平台的时间和距离都显著增加了 72.3% ($P < 0.001$, 图 4-15 D) 和 70.3% ($P < 0.001$, 图 4-15 E), 而在目标象限停留的时间和穿越平台的次数显著降低了 42.2% ($P = 0.001$, 图 4-15 G) 和 57.7% ($P = 0.006$, 图 4-15 H)。这部分结果表明 *A.veronii* 的定植引起了小鼠空间记忆能力的损伤。然而, 给予 *A.veronii* 定植小鼠补充 20 mg/kg Mel 后, 上述的行为损伤得到了一定程度的恢复, 具体的, 与 Aero 组相比, A+Mel 组小鼠到达平台的时间和距离显著降低了 74.7% ($P < 0.001$, 图 4-15 D) 和 76% ($P < 0.001$, 图 4-15 E), 而在目标象限停留的时间和穿越平台的次数显著降低了 63.0% ($P = 0.003$, 图 4-15 G) 和 127.3% ($P = 0.01$, 图 4-15 H)。这些结果表明 Mel 能够改善 *A.veronii* 定植引起的小鼠认知功能障碍。

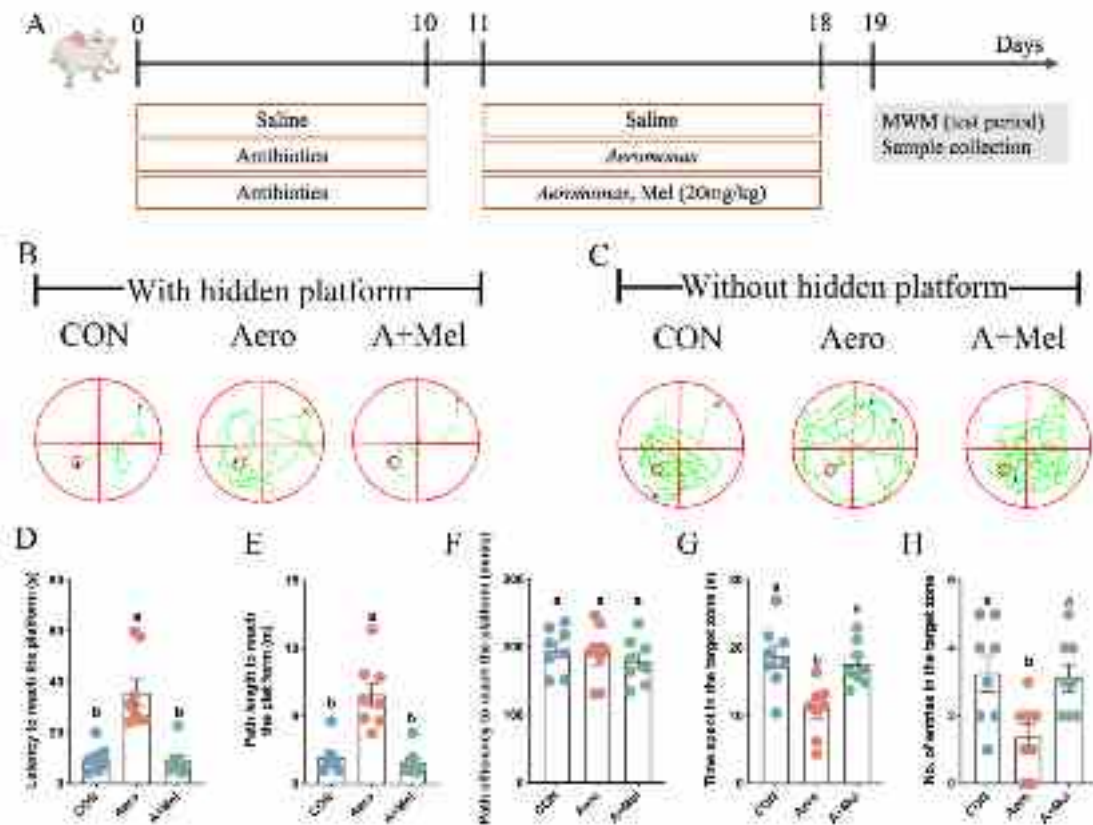


图 4-15 *A. veronii* 定植及 Mel 干预对小鼠认知功能的影响

(A) 试验流程图, (B) 空间记忆测试轨迹图 (隐藏平台存在), (C) 空间记忆测试的轨迹图 (隐藏平台不存在), (D) 到达平台的逃避潜伏期, (E) 到达平台的路径长度, (F) 到达平台的速度, (G) 在目标象限停留的时间, (H) 进入目标象限的次数。CON: 对照组; Aero: *A. veronii* 定植组; A+Mel: *A. veronii* 定植+Mel 干预组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-15 The effects of *A. veronii* colonization and Mel supplementation on the cognitive function of mice.

(A) Experimental flow chart, (B) Track plot of spatial memory test(with hidden platform), (C) Track plot of spatial memory test (without hidden platform), (D) Latency to reach the platform, (E) Path length to reach the platform, (F) Path velocity to reach the platform, (G) Time spent in the target zone, (H) Number of entries into the target zone. CON: control group, Aero: *A. veronii* colonization group, A+ Mel: *A. veronii* colonization + melatonin. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.3 Mel 改善 *A. veronii* 定植引起的小鼠海马神经炎症反应

结果显示, *A. veronii* 定植之后, 与对照组相比, 海马 CA1、CA3 和 DG 区中 Iba1 阳性细胞的 IOD 值分别增加 23.1% ($P = 0.017$), 23.9% ($P = 0.026$) 和 22.4% ($P = 0.023$)。然而给 *A. veronii* 定植小鼠补充 Mel 后, Iba1 阳性细胞的 IOD 值显著降低了 16.1% ($P = 0.04$), 19.6% ($P = 0.024$) 和 24.8% ($P = 0.003$) (图 4-16 B), Mel 补充组与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$)。紧接着, 与 CON 相比, Aero 组小鼠海马的促炎因子 IL-6 与 TNF- α 的水平显著上调了 69.4% ($P < 0.001$, 图 4-16 E) 和 25.0% ($P = 0.045$, 图 4-16 D), 而抑炎因子 IL-4 与 IL-10 的水平分别降低了 65.5% ($P = 0.002$, 图 4-16 F) 和 54.4% ($P < 0.001$, 图 4-16 G)。然而, 给予 *A. veronii* 定植小鼠补充 Mel 后, 上述炎症细胞因子失衡的现象得到恢复。以上两个结果共同表明 Mel 能够改善 *A. veronii* 定植诱导的海马神经炎症反应。

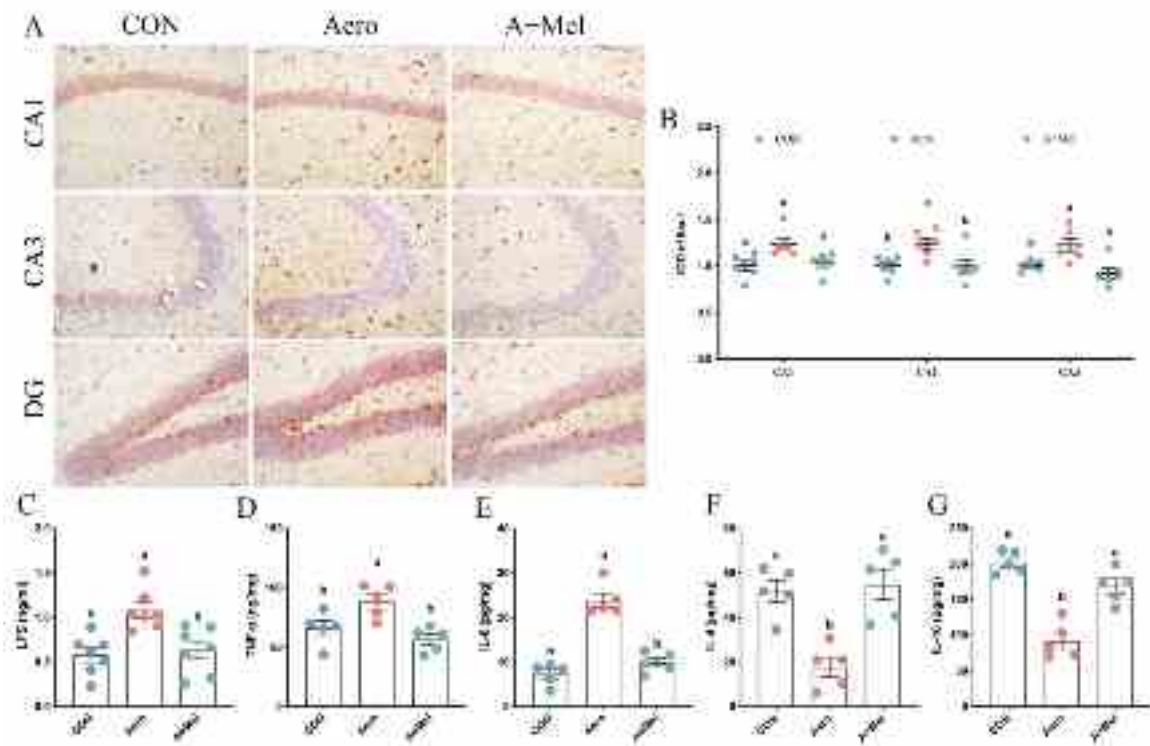


图 4-16 *A. veronii* 定植及 Mel 干预对小鼠海马神经炎症的影响

(A) 不同试验组的海马小胶质细胞 Iba1 染色图像 (比例尺为 50 μm), (B) 海马 CA1, CA3 和 DG 区 Iba1 阳性细胞的 IOD 值, (C) 海马 LPS 的含量, (D-G) 海马组织炎症细胞因子的水平 (TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10)。CON: 对照组; Aero: *A. veronii* 定植组; A+Mel: *A. veronii* 定植+Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-16 The effects of *A. veronii* colonization and Mel intervention on hippocampal neuroinflammation in mice.

(A) Images of the Iba1-stained hippocampal microglia in the different experimental groups. Bar = 50 μm , (B) IOD of Iba1-positive cells in the hippocampal CA1, CA3 and DG region, (C) LPS contents in hippocampus, (D-G) The levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10) in the hippocampus. CON: control group, Aero: *A.veronii* colonization group, A+ Mel: *A.veronii* colonization + melatonin. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.4 Mel 改善 *A. veronii* 定植引起的小鼠海马神经元凋亡及机制

紧接着，我们探讨了引起小鼠认知损伤的具体机制。结果显示与对照组相比，*A.veronii* 定植引起了海马 TLR4、HDAC3、p-I κ B 和 p-P65 蛋白表达的上调（图 4-17 A-D），分别升高了 46.8% ($P = 0.005$)、96.9% ($P < 0.001$)、73.9% ($P = 0.005$) 和 83.5% ($P = 0.002$)，此外凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的蛋白表达也显著升高了 54.8% ($P = 0.004$ ，图 4-17 E)。然而，给予 *A.veronii* 定植小鼠补充 Mel 后逆转了上述蛋白的表达情况，具体表现为与 Aero 组相比，A+Mel 组小鼠海马 TLR4、HDAC3、p-I κ B、p-P65 和 Cleaved caspase-3 的表达量分别降低了 34.3% ($P = 0.003$)、46.3% ($P < 0.001$)、47.7% ($P = 0.002$)、46.7% ($P = 0.002$) 和 44.9% ($P < 0.001$)。

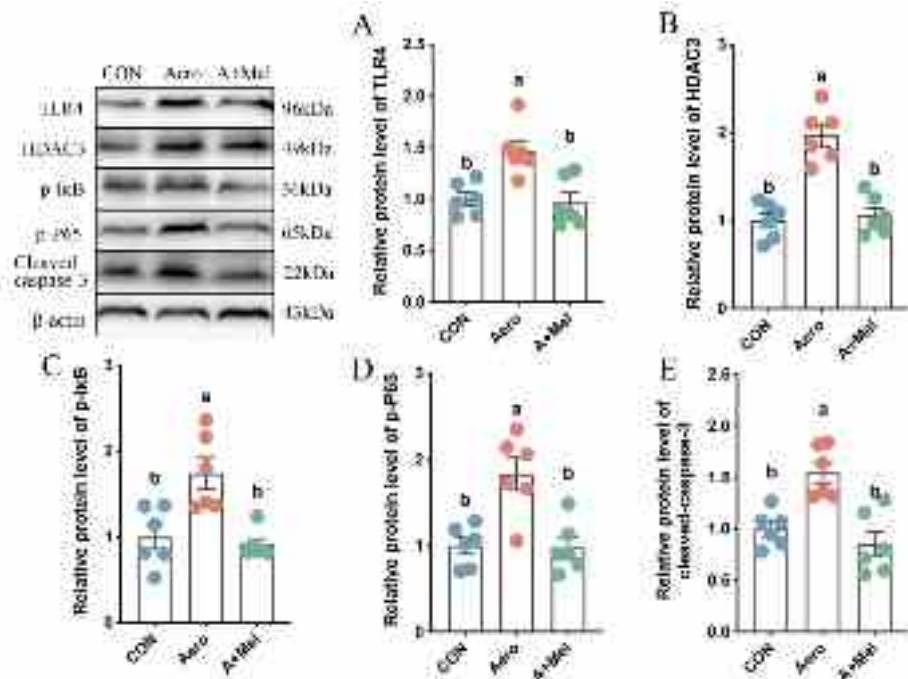


图 4-17 *A. veronii* 定植及 Mel 干预对海马信号通路蛋白的影响

(A) TLR4 的相对蛋白水平，(B) HDAC3 的相对蛋白水平，(C) p-I κ B 的相对蛋白水平，(D) p-P65 的相对蛋白水平，(E) Cleaved caspase-3 的相对蛋白水平。CON: 对照组；Aero:

A.veronii 定植组; A+Mel: *A.veronii* 定植+Mel 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-17 The effects of *A. veronii* colonization and Mel supplementation on the hippocampal signaling pathway proteins.

(A) Relative protein levels of TLR4, (B) Relative protein levels of HDAC3, (C) Relative protein levels of p-I κ B, (D) Relative protein levels of p-P65, (E) Relative protein levels of Cleaved caspase-3. CON: control group, Aero: *A.veronii* colonization group, A+ Mel: *A.veronii* colonization + melatonin. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.5 Mel 改善 LPS 引起的小鼠认知功能障碍

紧接着, 我们利用 LPS 处理模型探讨 LPS 是否能作为信号分子介导急性 SD 对认知功能的损伤作用 (图 4-18 A)。与对照组相比, LPS 组小鼠到达平台的时间和距离都显著增加了 230.3% ($P < 0.001$, 图 4-18 D) 和 189.1% ($P < 0.001$, 图 4-18 E), 而在目标象限停留的时间和穿越平台的次数显著降低了 32.8% ($P = 0.04$, 图 4-18 G) 和 53.6% ($P = 0.005$, 图 4-18 H)。然而, 给予 LPS 处理小鼠补充 Mel 后, 上述的行为损伤得到了一定程度的恢复, 具体的, 与 LPS 组相比, LPS+Mel 组小鼠到达平台的时间和距离都显著增加了 55.2% ($P < 0.001$, 图 4-18 D) 和 51.1% ($P = 0.002$, 图 4-18 E), 而在目标象限停留的时间和穿越平台的次数显著增加了 82.3% ($P = 0.001$, 图 4-18 G) 和 161.5% ($P = 0.001$, 图 4-18 H)。而给予 LPS 小鼠补充 TAK-242 (TLR4 拮抗剂) 后表现出与 Mel 类似的改善效果。这些结果表明 Mel 能够改善 LPS 处理引起的小鼠认知功能障碍。

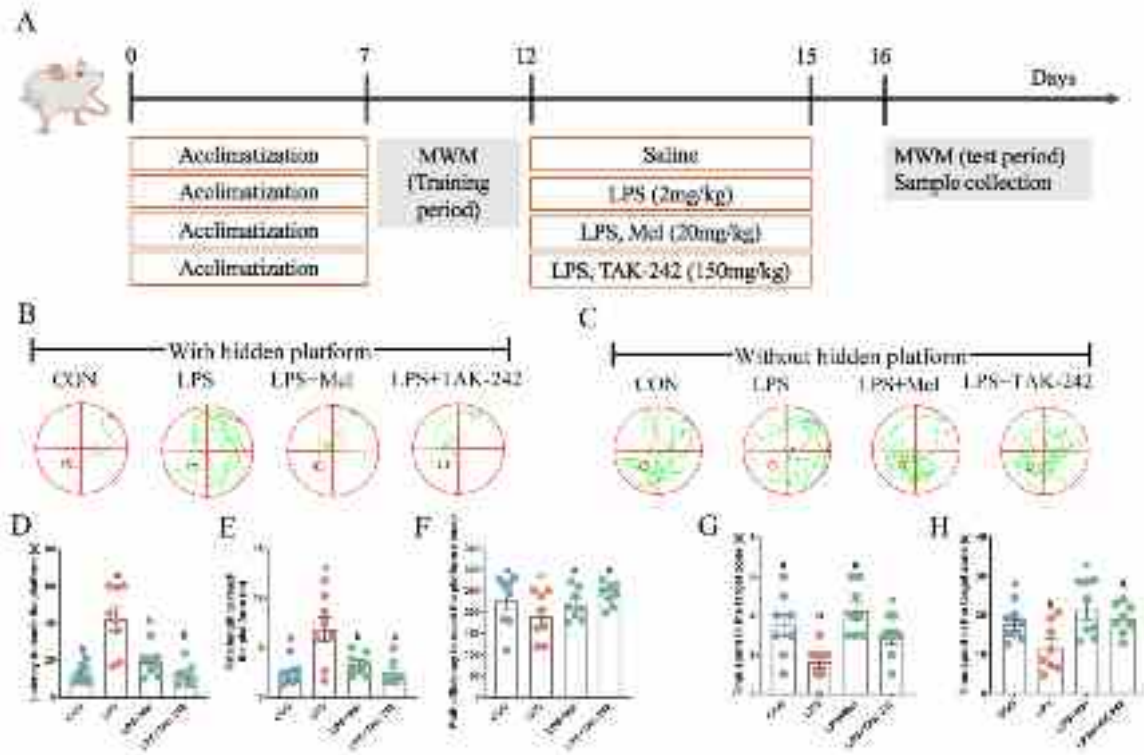


图 4-18 LPS 处理及 Mel 干预对小鼠认知功能的影响

(A) 试验流程图，(B) 空间记忆测试轨迹图（隐藏平台存在），(C) 空间记忆测试的轨迹图（移去隐藏平台），(D) 到达平台的逃避潜伏期，(E) 到达平台的路径长度，(F) 到达平台的速度，(G) 在目标区域花费的时间，(H) 进入目标区域的次数。CON: 对照组；LPS: LPS 处理组；LPS+Mel: LPS 处理 + Mel 干预组；LPS+TAK-242: LPS 处理 + TAK-242 干预组。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05)；同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 4-18 The effects of LPS treatment and Mel supplementation on the cognitive function of mice. (A) Experimental flow chart, (B) Track plot of spatial memory test (with hidden platform), (C) Track plot of spatial memory test (without hidden platform), (D) Latency to reach the platform, (E) Path length to reach the platform, (F) Path velocity to reach the platform, (G) Time spent in the target zone, (H) Number of entries into the target zone. CON: control group, LPS: LPS group, LPS+ Mel: LPS + melatonin, LPS+ TAK-242: LPS + TAK-242. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at P < 0.05; those with the same letter do not differ significantly (P ≥ 0.05).

2.3.6 Mel 改善 LPS 引起的小鼠海马神经炎症反应

结果显示，LPS 处理之后，与对照组相比，海马 CA1、CA3 和 DG 区中 Iba1 阳性细胞的 IOD 值分别增加 29.5% (P = 0.001)，34.5% (P = 0.001) 和 27.0% (P =

0.003)。然而给 LPS 处理小鼠补充 Mel 后, Iba1 阳性细胞的 IOD 值显著降低了 19.8% ($P = 0.027$), 14.7% ($P = 0.019$) 和 14.4% ($P = 0.034$), Mel 补充组与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 4-19 A-B)。紧接着, 与 CON 相比, LPS 处理组小鼠海马的 LPS 水平显著升高了 66.6% ($P = 0.013$, 图 4-19 C), 促炎因子 IL-6 与 TNF- α 的水平显著上调了 42.0% ($P < 0.001$, 图 4-19 E) 和 54.4% ($P = 0.001$, 图 4-19 D), 而抑炎因子 IL-4 与 IL-10 的水平分别降低 63.0% ($P < 0.001$, 图 4-19 F) 和 57.8% ($P < 0.001$, 图 4-19 G)。然而, 给予 LPS 处理小鼠补充 Mel 后, 上述炎症细胞因子失衡的现象得到恢复。以上结果共同表明 Mel 能够改善 LPS 处理诱导的海马神经炎症反应。

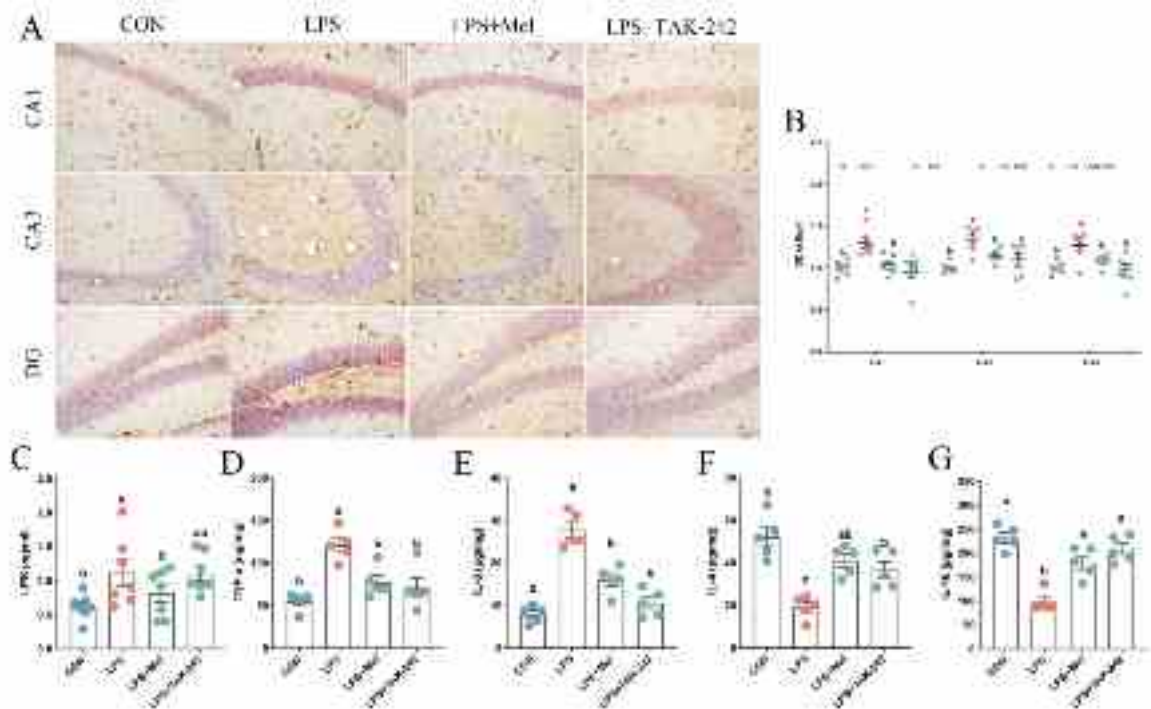


图 4-19 LPS 及 Mel 干预对小鼠海马神经炎症的影响

(A) 不同试验组的海马小胶质细胞 Iba1 染色图像 (比例尺为 50 μm), (B) 海马 CA1, CA3 和 DG 区 Iba1 阳性细胞的 IOD 值, (C) 海马 LPS 的含量, (D-G) 海马组织炎症细胞因子的水平 (TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10)。CON: 对照组; LPS: LPS 处理组; LPS+Mel: LPS 处理 + Mel 干预组; LPS+TAK-242: LPS 处理 + TAK-242 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-19 The effects of LPS treatment and Mel supplementation on the hippocampal neuroinflammation of mice.

(A) Images of the Iba1-stained hippocampal microglia in the different experimental groups. Bar = 50 μm , (B) IOD of Iba1-positive cells in the hippocampal CA1, CA3 and DG region, (C) LPS contents in hippocampus, (D-G) The levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10) in the hippocampus. CON: control group, LPS: LPS group, LPS+ Mel: LPS + melatonin, LPS+ TAK-242: LPS + TAK-242. The

result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.7 Mel 改善 LPS 引起的小鼠海马神经元凋亡及机制

紧接着,我们探讨了引起小鼠认知损伤的具体机制。结果显示与对照组相比,LPS 处理引起了海马 TLR4、HDAC3、p-I κ B 和 p-P65 蛋白表达的上调(图 4-20 A-D),分别升高了 65.6% ($P = 0.001$)、88.2% ($P < 0.001$)、70.3% ($P < 0.001$) 和 48.0% ($P = 0.007$),此外凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的蛋白表达也显著升高了 86.0% ($P < 0.001$, 图 4-20 E)。然而,给予 LPS 处理小鼠补充 Mel 后逆转了上述蛋白的表达情况。而给予 LPS 小鼠补充 TAK-242 (TLR4 拮抗剂)具有了 Mel 类似的改善作用。以上结果表明 LPS 通过 TLR4/HDAC3/NF κ B 信号通路引起海马神经元凋亡的发生,最终导致小鼠认知功能的障碍。

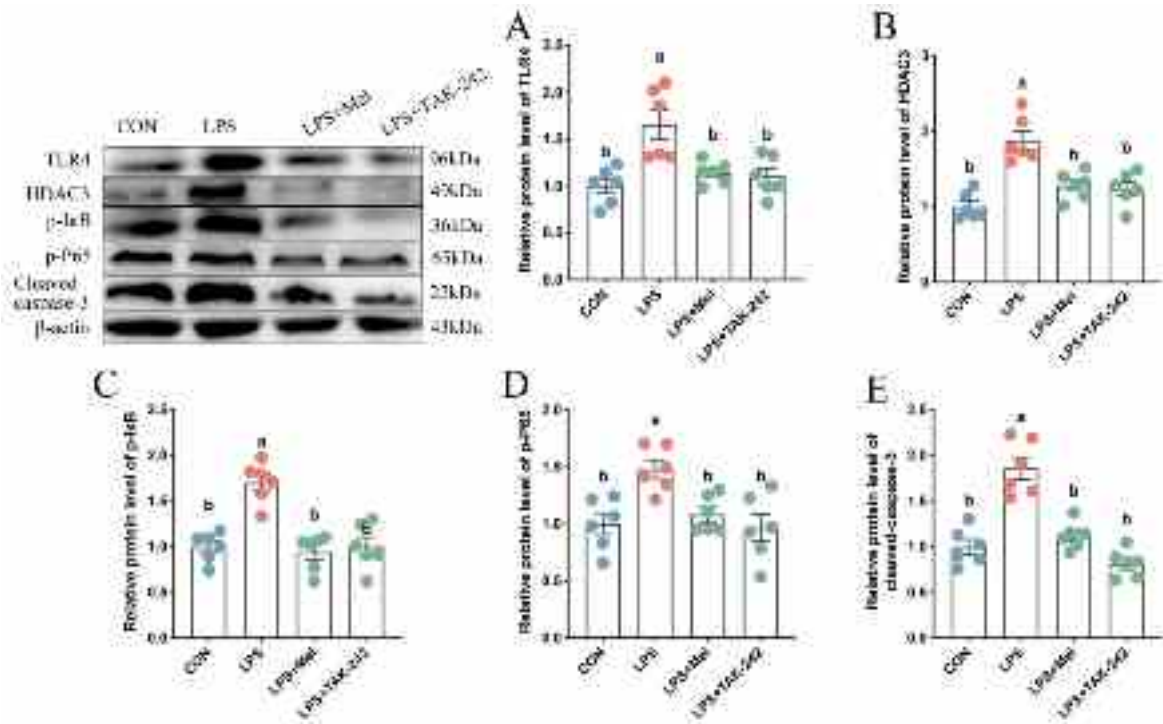


图 4-20 LPS 处理及 Mel 干预对小鼠海马信号通路蛋白的影响

(A) TLR4 的相对蛋白水平, (B) HDAC3 的相对蛋白水平, (C) p-I κ B 的相对蛋白水平, (D) p-P65 的相对蛋白水平, (E) Cleaved caspase-3 的相对蛋白水平。CON: 对照组; LPS: LPS 处理组; LPS+Mel: LPS 处理+Mel 干预组; LPS+TAK-242: LPS 处理 + TAK-242 干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-20 The effects of LPS treatment and Mel supplementation on the hippocampal signaling pathway proteins.

(A) Relative protein levels of TLR4, (B) Relative protein levels of HDAC3, (C) Relative protein levels of p-I κ B, (D) Relative protein levels of p-P65, (E) Relative protein levels of Cleaved caspase-3. CON: control group, LPS: LPS group, LPS+ Mel: LPS + melatonin, LPS+ TAK-242: LPS + TAK-242. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.3.8 丁酸改善 LPS 引起的 BV2 细胞的过度活化

为了研究代谢产物 LPS 或丁酸在 Mel 改善急性 SD 引起的认知障碍中的作用，我们用 LPS 处理 BV2 细胞模拟神经炎症，并添加丁酸干预（图 4-21 A）。如预期的那样，LPS 暴露于 BV2 细胞导致 TNF- α (283.8%, $P < 0.001$, 图 4-21 B) 和 IL-6 (288.7%, $P < 0.001$, 图 4-21 C) 分泌增加，IL-4 (57.8%, $P = 0.001$, 图 4-21 D) 和 IL-10 (35.0%, $P < 0.001$, 图 4-21 E) 分泌减少。此外，与对照组相比，LPS 显著诱导 BV2 细胞 HDAC3 蛋白 (68.5%, $P < 0.001$, 图 4-21 F)、p-I κ B 蛋白 (51.4%, $P = 0.001$, 图 4-21 G) 和 p-P65 蛋白 (98.7%, $P < 0.001$, 图 4-21 H) 的相对表达水平升高。此外，我们采用小胶质细胞条件培养基来评估丁酸对小胶质细胞毒性的缓解是否参与了神经细胞的存活。将 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞中提取的条件培养基添加到 HT22 细胞中。结果显示，LPS 处理的条件培养基引起 HT22 细胞明显凋亡，表现为 Cleaved caspase-3 水平上调 (42.9%, $P = 0.002$, 图 4-21 I)。而丁酸预处理能有效地逆转这些由脂多糖引起的变化。相反，在 TAK-242 治疗后，我们观察到与 LPS 组相比，HDAC3 蛋白 (27.2%, $P < 0.001$, 图 4-21 F)、p-I κ B 蛋白 (33.2%, $P = 0.002$, 图 4-21 G) 和 p-P65 (36.7%, $P = 0.02$, 图 4-21 H) 下调。此外，我们的结果表明，与 LPS+丁酸酯处理组相比，AZD3965 可上调 LPS+丁酸处理组细胞 HDAC3 蛋白 (47.4%, $P < 0.001$, 图 4-21 F)、p-I κ B 蛋白 (54.3%, $P < 0.001$, 图 4-21 G) 和 p-P65 (92.1%, $P < 0.001$, 图 4-21 H) 的表达。此外，与 LPS+丁酸组相比，ITSA-1 处理后，我们观察到 p-I κ B 蛋白 (34.8%, $P = 0.04$, 图 4-21 G) 和 p-P65 (88.7%, $P < 0.001$, 图 4-21 H) 表达上调，但这并不影响 HDAC3 蛋白的表达水平。而 PDTC 处理的改善效果与丁酸盐相似。

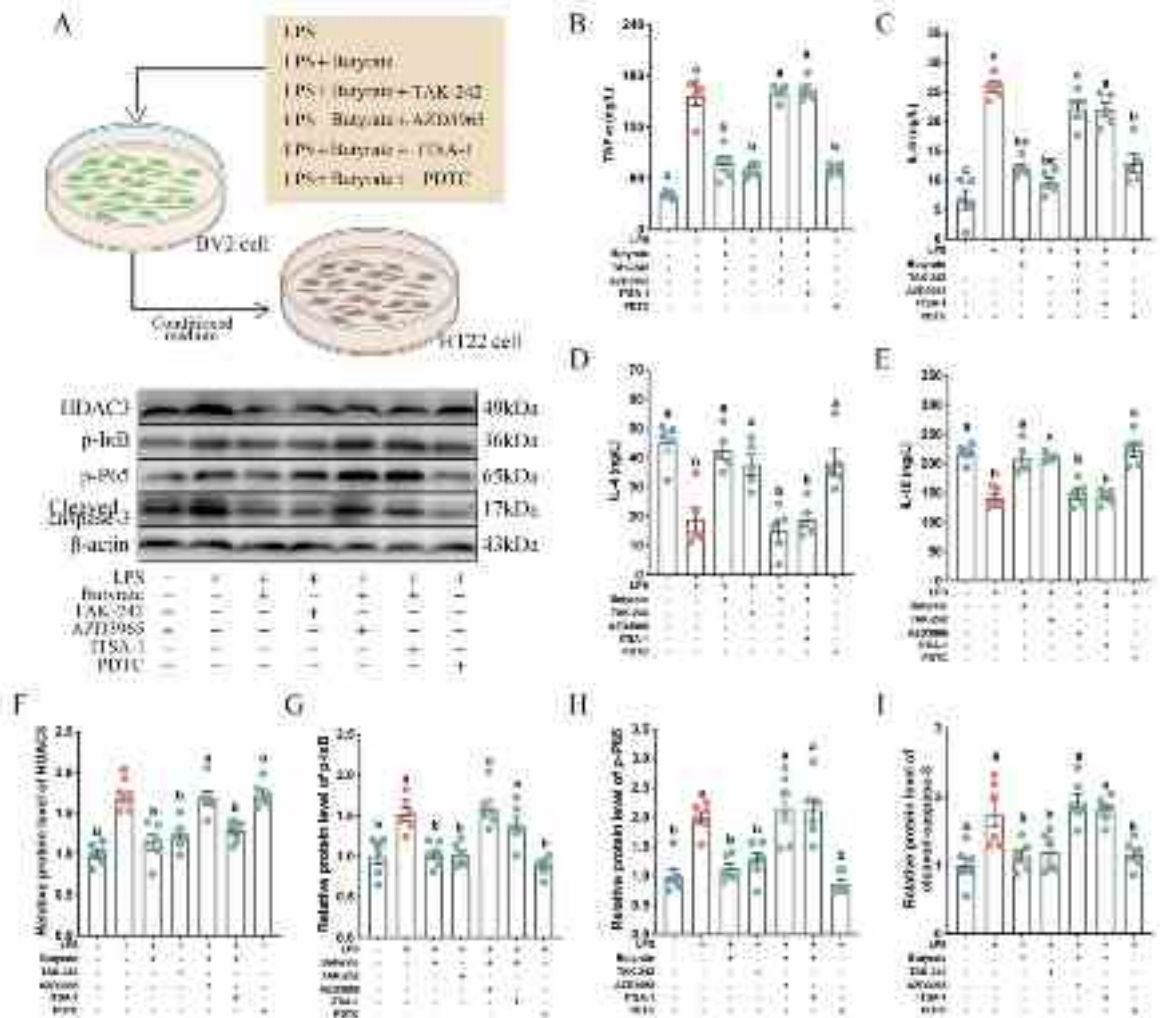


图 4-21 丁酸对 LPS 诱导的 BV2 细胞通路蛋白的影响

(A) 细胞试验模式图, (B) TNF- α , (C) IL-6, (D) IL-4, (E) IL-10, (F) HDAC3 的相对蛋白水平, (G) p-I κ B 的相对蛋白水平, (H) p-P65 的相对蛋白水平, (I) Cleaved caspase-3 的相对蛋白水平。TAK-242: TLR4 的拮抗剂, AZD3965: MCT1 的抑制剂, ITSA-1: HDAC3 的激动剂, PDTC: NF- κ B 的拮抗剂。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-21 The effects of butyrate on LPS-induced pathway proteins in BV2 cells.

(A) Cell experiment model diagram, (B) TNF- α , (C) IL-6, (D) IL-4, (E) IL-10, (F) Relative protein levels of HDAC3, (G) Relative protein levels of p-I κ B, (H) Relative protein levels of p-P65, (I) Relative protein levels of Cleaved caspase-3. TAK-242: TLR4 antagonist, AZD3965: MCT1 inhibitor, ITSA-1: HDAC3 agonist, PDTC: NF- κ B antagonist. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

2.4 讨论

我们上一阶段的研究发现,接受急性 SD 粪菌移植的受体鼠结肠中变形菌门 (Proteobacteria) 显著上调,而 CON 组和 SD+Mel-FMT 组该菌的相对丰度没有差异。本实验室之前的研究也证明急性 SD 小鼠结肠中 Proteobacteria 及气单胞菌 (*Aeromonas*) 的相对丰度显著上调。此外我们也靶向检测了结肠内容物中 *Aeromonas* 的相对丰度,其显著高于 CON 组和 SD+Mel-FMT 组。而 Proteobacteria 包含了大部分革兰氏阴性菌,与机体炎症反应的加剧密切相关,并且其胞壁成分 LPS 被证明可以穿过肠道屏障,进入全身循环,通过刺激血脑屏障的通透性进入大脑实质,引起神经炎症。因此我们推测, *Aeromonas* 可能介导急性 SD 诱导的小鼠认知障碍。结果表明, *A. veronii* 定植小鼠表现出认知功能的损伤,且大脑中 LPS 的含量显著升高。进一步的检测发现海马组织中神经炎症反应增加,表现为小胶质细胞的活化、促炎细胞因子的增多和抑炎细胞因子的降低,且细胞凋亡水平增加。而外源性 Mel 的添加能改善上述指标的变化。*Aeromonas* 作为革兰氏阴性菌,主要通过其胞壁成分 LPS 来调控机体炎症的发生。为了进一步确认肠脑轴中有害信号分子的介导作用,我们建立了 LPS 处理小鼠模型。结果显示 LPS 的处理导致了小鼠认知功能的损伤,并且在大脑中观察到了 LPS 含量的显著升高。与我们的结果相似,接受睡眠不足人群粪菌移植的小鼠大脑中也检测高水平的 LPS。在菌群失调的情况下, LPS 破坏肠道屏障的稳定性进入全身循环,一方面通过血液循环到达机体多个组织,另一方面可激活免疫细胞释放大量的炎症因子,加剧全身炎症的发生。而进入循环的 LPS 以及释放的炎症因子会破坏 BBB 的稳定性,增加其通透性进而穿过 BBB 进入大脑实质。在大脑实质中,小胶质细胞作为固有免疫细胞,其上表达的 TLR4 受体特异性接受 LPS 的刺激,启动下游 NF- κ B 通路,促进小胶质细胞的活化和炎症因子的分泌,最终影响周边神经元的正常状态和功能。结果显示, *A. veronii* 定植小鼠和 LPS 处理小鼠海马细胞中 TLR4、p-P65 和 p-I κ B 的表达水平显著升高,而外源性 Mel 的补充有效的逆转了上述蛋白的变化。此外我们也观察了凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 增加。这些结果表明,急性 SD 通过引起 *Aeromonas* 的相对丰度增加及脑中 LPS 含量的升高,从而加剧了神经炎症的发生,最终导致海马组织细胞凋亡水平的增加。

小胶质细胞作为大脑中的先天免疫细胞,是调节大脑免疫反应的十字路口 (Borst 等人, 2021 年)。LPS 进入大脑后,与小胶质细胞上的 TLR4 受体结合,通过 MyD88 启动下游的 I κ B/NF- κ B 或 MAPK/ERK 信号转导通路,激活相关蛋白,促进促炎因子 TNF- α 和 IL-6 大量分泌,产生强烈的炎症作用。在大脑中,一方面丁酸可以通过转运体穿过细胞膜进入细胞,通过抑制组蛋白去乙酰化酶发挥抗炎作用。另一方面,它可以通过与受体结合并激活下游信号通路来发挥抗炎作用。研究表明, MCT1 转运蛋

白在小胶质细胞上广泛表达，而 GPRs 受体未在小胶质细胞上表达。因此，我们推测与炎症密切相关的两种代谢物丁酸和 LPS 可能利用小胶质细胞作为靶细胞调控大脑的炎症反应。我们用 LPS 处理 BV2 细胞，结果显示，与对照组 HT22 细胞相比，经 LPS 处理的 BV2 细胞培养液处理后，促炎细胞因子分泌增加，抗炎细胞因子分泌减少，HDAC3、p-I κ B 和 p-P65 含量增加。Cleaved caspase-3 蛋白表达的增加提示细胞凋亡的发生，而丁酸能逆转 LPS 诱导的上述变化。进一步，我们发现添加 TAK-242 和 PDTC 模拟了丁酸对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症反应的改善作用，而添加 AZD3965 和 ITSA-1 阻断了丁酸的保护作用。

2.5 小结

综上，外源性 Mel 通过下调气单胞菌 *Aeromonas* 及其代谢物 LPS 的含量并上调毛螺菌 *Lachnospiraceae_NK4A13* 及其代谢物丁酸的含量，抑制 TLR4/Myd88/HDAC3/NF κ B 信号通路，缓解小胶质细胞过度活化，神经炎症反应和凋亡的发生，最终改善小鼠认知功能障碍。

3. 褪黑激素驱动 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸改善急性睡眠剥夺诱导的小鼠认知功能障碍

3.1 引言

上一节中，我们的研究结果已经证实了肠道菌群的紊乱能够介导急性 SD 诱导的记忆损伤，而 Mel 通过恢复紊乱的菌群，包括上调益生菌毛螺菌 (*Lachnospiraceae_NK4A136*) 的相对丰度及下调致病菌气单胞菌 (*Aeromonas*) 的相对丰度，进而改善急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍。代谢产物作为信号分子，参与了肠道菌群对机体多个组织细胞的调控作用。其中，*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 是产丁酸的主要菌群，Mel 是否通过丁酸发挥改善作用尚不清楚。肠道中产生 SCFAs 的优势菌门即拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 均可以产生丁酸，分别占肠道菌群总量的 20% 和 60% 左右，而变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 产生的 SCFAs 含量相对较少，分别为 5%~10% 和 3%。产生的 SCFAs 部分通过单羧酸转运蛋白被结肠细胞快速吸收，经过一系列的氧化反应，最终以 ATP 的形式为细胞提供能量。而在结肠细胞中未被代谢的 SCFAs 通过基底外侧膜进入肝脏的门静脉循环，为肝细胞能量代谢提供底物。SCFAs 也参与肝细胞中葡萄糖、胆固醇和脂肪酸的生物合成。经过以上代谢，剩余的 SCFAs 通过血液循环到达全身。SCFAs 可通过免疫、内分泌、迷走神经和其他体液途径直接或间接影响肠-脑通讯来影响脑功能。

研究发现, SCFAs 可以进入循环系统, 并向大脑发出信号 (Lee et al., 2020)。在脑内, SCFAs 可以通过两种不同的转运体穿透细胞膜, 即质子偶联单羧酸转运体 1 (MCT1/SLC16A1) 和钠偶联单羧酸转运体 1 (SMCT1/SLC5A8) (Morais et al., 2021; Wang et al., 2020)。SCFAs 还通过抑制组蛋白去乙酰化酶对宿主生理产生直接影响 (Parada Venegas et al., 2019)。另外, SCFAs 还可以通过至少三种不同的 GPCRs 激活信号通路 GPR41、GPR43 和 GPR109 (Zhang et al., 2021b)。研究表明, SCFAs 主要通过内皮细胞, 然后通过转运体通过血脑屏障, 而神经元主要通过受体通路对 SCFAs 的刺激作出反应 (Gasaly et al., 2021)。SCFAs 通过调节肠道和其他器官的炎症, 在膳食纤维和肠道微生物群的有益作用中发挥重要作用。事实上, SCFAs 可能通过减少免疫细胞的迁移和增殖、降低细胞因子水平和诱导细胞凋亡来抑制炎症, 但血液或组织中短链脂肪酸浓度的显著变化也会导致免疫和代谢失衡。因此, 维持正常代谢和预防和治疗疾病需要适当浓度的 SCFAs。既往研究发现, SCFAs 可通过影响小胶质细胞的形态和功能来影响神经炎症, 从而可能影响精神障碍的情绪、认知和病理生理 (Needham et al., 2020)。然而, SCFAs 调控如何影响神经元功能尚不完全清楚。

本研究进一步探讨了肠道微生物群代谢产物丁酸对 Mel 改善急性 SD 诱导的认知障碍的作用。这项研究旨在阐明在使用外源性 Mel 或丁酸补充的急性 SD 小鼠模型中, 丁酸介导 Mel 减轻急性 SD 诱发的认知障碍的作用, 以及利用体内与体外试验探讨丁酸介导的 Mel 缓解急性 SD 诱发的认知障碍的信号传导途径。

3.2 材料与amp;方法

3.2.1 试验动物的处理

共有 120 只 8 周龄雄性小鼠 (ICR, 维通利华, 北京) 饲养于 20 个鼠笼 (6 只/笼), 温度为 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $50 \pm 10\%$, 光照制度为光暗比 14:10 (每天上午 7:00 开始给光)。小鼠可自由采食与饮水。所有的小鼠在适应一周之后, 随机等分为 6 个组: 睡眠剥夺组 (SD)、睡眠剥夺+抗生素处理组 (SD+Abs)、睡眠剥夺+褪黑激素干预组 (SD+Mel)、睡眠剥夺+抗生素+褪黑激素干预组 (SD+Abs+Mel)、睡眠剥夺+抗生素+丁酸干预组 (SD+Abs+Butyrate) 与酶溶剂对照组 (CON)。仍采用多平台水箱进行急性 SD。

基于前人研究和我们的前期研究基础, 我们将 Mel 溶于 $20 \mu\text{L}$ 的无水乙醇中并根据每只小鼠 40 g 体重配成最后的使用浓度再稀释在 0.1 mL 的生理盐水中通过腹腔注射给予小鼠体内。对照组小鼠等量注射酶溶剂 ($20 \mu\text{L}$ 的无水乙醇稀释于 0.1 mL 的生理盐水, CON 组); SD 处理的小鼠在急性 SD 60 min 前即早上 7:00 连续三天腹腔注射 20 mg/kg (SD+Mel 组)。为了耗尽肠道微生物, SD+Abs、SD+Abs+Mel 与

SD+Abs+Butyrate 组中的小鼠连续 10 d (适应期 7 d+SD 3 d) 在其饮水中添加 1 g/kg 氨苄青霉素、100 mg/kg 庆大霉素、0.5 g/kg 新霉素、0.5 g/kg 万古霉素与 10 mg/kg 红霉素。SD+Abs+Butyrate 组小鼠在急性 SD 期间的每天早上 7:00 通过灌胃给予小鼠 40 mM 丁酸。

3.2.2 试验动物的取材

72 只未进行行为学检测的小鼠在连续 72 h SD 后于早上 8:00 进行取材, 采用 1% 的戊巴比妥钠溶液对每只小鼠进行麻醉, 并立即进行小鼠断颈处死。每组 6 只小鼠的鼠脑用 4% 多聚甲醛固定用于后续组织学检测。同组的剩余 6 只小鼠取出双侧海马, 立即放入液氮速冻 30 min 再转移至 -80℃ 冰箱用于免疫组化检测、qRT-PCR 检测、Western blot 检测和 ELISA 检测。

3.2.3 主要仪器设备

莫里斯水迷宫 (XR-XM101, 上海欣软, 中国)、Y 迷宫 (XR-XY1032, 上海欣软, 中国)、旷场实验 (XR-XM101, 上海欣软, 中国)、SuperMaze 动物行为学视频分析系统 (XR-Xmaze, 上海欣软, 中国)、石蜡切片机 (LEICA, RM2235 型, 德国)、生物组织包埋机 (BM-VI)、光学显微镜 (Olympus, BX51 型, 日本)、图像采集系统 (Olympus, DP72 型, 日本) 电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、高速台式离心机 (TG16-WS, 湘仪, 湖南)、荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler® 480, Roche Applied Science, 德国)、低温高速离心机 (5248 型, Eppendorf, 德国)、微型离心机 (Mini-6K, 杭州奥盛仪器有限公司, 杭州)、酶标仪 (BLO-RAD, 550 型, 美国)、电泳仪 (伯乐生命医学产品有限公司, 上海)、组织匀浆机 (JXFSTPRP-24, 上海净信实业发展有限公司, 上海)、电热鼓风干燥箱 (101-A, 北京市永光明医疗仪器厂, 中国)、脑立体定位仪 (ALCBIO, 上海)、

3.2.4 试验药品及试剂

褪黑激素 (M5250;sigma)、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素 (CW0116S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、苏木精、盐酸酒精分色液、TRNzol Reagent TRIZON 总 RNA 提取试剂 (CW0580A, 康为世纪生物技术有限公司, 江苏)、反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Boston, USA)、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、脱脂奶粉 (中国伊利)、BCA 蛋白定量试剂盒 (CW0014)、RIPA 裂解液 (CW2333)、蛋白酶抑制剂 (CW2200)、SDS-PAGE 上样缓冲液 (CW0027)、SDS-PAGE Loading Buffer (5×) (CW0027), 均购自江苏康为世纪生物科技有限公

司、山羊抗兔 IgG (CW0156S, 康为世纪生物科技有限公司, 江苏)、DMEM (SH30023.01B, HyClone, 北京)、胎牛血清 (11012-8611, 浙江天杭生物科技股份有限公司, 浙江)、青链霉素混合液 100× (P1400, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)、0.25% Trypsin (T1350, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)。

3.2.5 莫里斯水迷宫

试验步骤同第二章第二节 2.2.4。

3.2.6 ELISA 测定血浆中 NE、CORT 和 Mel 的含量

试验步骤同第二章第一节 1.2.5。

3.2.7 ELISA 测定海马炎症细胞因子 (IL-6、TNF- α 、IL-4 和 IL-10) 的含量

试验步骤同第二章第三节 3.2.8。

3.2.8 qRT-PCR

试验步骤同第二章第一节 2.1.2.9。检测不同处理组海马组织 *Gpr41*、*Gpr43* 和 *Gpr109a* 的 mRNA 相对表达量。

3.2.9 Western blot

试验操作同第三章第一节, 兔抗小鼠 Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、p-I κ B 和 p-P65 多克隆抗体浓度都为 1:1000, β -actin 多克隆抗体的浓度为 1:8000。Western blot 以 β -actin 为内参, 目的蛋白的相对表达量为目的蛋白水平/ β -actin 蛋白水平。

3.2.10 改良的普鲁士蓝染色

试验步骤同第三章第一节 1.2.5。

3.2.11 免疫组织化学染色

试验步骤同第二章第三节 3.2.6。兔抗小鼠 Iba1 单克隆抗体的稀释比例是 1:1000, 兔抗小鼠 GPR109A 多克隆抗体的稀释比例是 1:200。

3.2.12 抗氧化物酶 SOD 与 MDA 的检测

试验步骤同第三章第一节 1.2.8。

3.2.13 SCFAs 的检测

(1) 称取 0.3 g 的新鲜小鼠的粪便，并吸取 1 mL 去离子水，于 12,000 r/min 条件下离心 10 min，随后收集 1 mL 的上清液，并加入 100 μ L 的浓盐酸，充分混匀后吸入 5 mL 乙醚，并充分混匀，且常温下萃取 20 min，于 3500 r/min 条件下离心 10 min，吸取上层有机相转移至另一管中，加入 500 μ L 1M NaOH，并充分混匀，且常温下萃取 20 min，于 3500 r/min 条件下离心 10 min，随即收集下层水相，并加入 100 μ L 的浓 HCl，充分混匀，最后将所得样品经 0.22 μ m 滤膜过滤后进行高效液相色谱分析。

(2) 流动相配制:流动相 A 即为 0.025% 的磷酸水溶液，pH 为 2.8，流动相 B 即为乙腈，利用 0.22 μ m 滤膜将这两种流动相过滤以除去不溶物，再经超声脱气后备用。

(3) 检测条件:流动相 A 与 B 的比例为 95:5，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 210 nm，柱温为 30 $^{\circ}$ C，进样量为 20 μ L。

(4) 短链脂肪酸标准曲线的建立:称取准确的乙酸、丙酸、丁酸标准品，并利用容量瓶分别配制成浓度为 1 μ M、10 μ M、20 μ M、40 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M 与 400 μ M 的标准溶液，并以标准酸浓度为横坐标，峰面积为纵坐标建立标准曲线。

3.2.14 小鼠 HT22 细胞 *GPR109A* siRNA 干扰

3.2.14.1 HT22 细胞转染效率的验证

使用 5'端标记 FAM 的 Negative control siRNA (FAM-NC-siRNA) 进行转染，验证 HT22 细胞的转染效率，HT22 细胞接种在 12 孔板培养过夜，待细胞长满至 80% 左右。在第一天时用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 FAM-NC-siRNA 转染入细胞。操作步骤如下:

(1) 更换完全培养基为转染培养基，1.6 mL/孔;

(2) 配置 Lip3000/siRNA 工作液:A 液用 200 μ L DMEM 培养基稀释 80 pmol 的 FAM-NC-siRNA，B 液另用 200 μ L DMEM 培养基稀释 4 μ L Lipofectamine 3000，将 A 液和 B 液均匀混合，静置 20 min。

(3) 每孔添加 Lip3000/siRNA 工作液 400 μ L，轻柔混匀，培养基总体积为 2 mL/孔。后于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂，培养细胞 48 h，后进行 DAPI (1 μ g/mL) 染色，荧光显微镜下观察并拍照。

3.2.14.2 HT22 细胞 *GPR109A* siRNA 干扰

由上海吉玛公司设计并合成干扰内源性 *GPR109A* 的 siRNA，以及阴性对照 siRNA 序列如表 4-1。

表 4-1 siRNA 序列

Tab. 4-1 SiRNA sequences.

siRNA	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
<i>Gpr109a-mus-231</i>	CCACCUCAAGUCCUGGAAATT	CCACCUCAAGUCCUGGAAATT
<i>Gpr109a -mus-640</i>	GCUAUGUCCUCUUGGAAUTT	AUUCCAAGAGGAACAUAGCTT
<i>Gpr109a -mus-905</i>	CCCUUAGCUUUACCUACAUTT	AUGUAGGUAAGCUAAGGGTT
<i>Negative Control</i>	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

在第一天时进行 siRNA 转染。将 HT22 细胞分为空白组 (Blank)、干扰阴性对照组 (si-NC)、*Gpr109a-231* 干扰组 (si-*Gpr109a-231*)、*Gpr109a-640* 干扰组 (si-*Gpr109a-640*) 和 *Gpr109a-905* 干扰组 (si-*Gpr109a-905*) 其中 Blank 组仅更换 2 mL 转染培养基, 而 si-NC、si-*Gpr109a-231*、si-*Gpr109a-640* 和 si-*Gpr109a-905* 组分别进行 Negative Control、*Gpr109a-mus-231*、*Gpr109a-mus-640* 和 *Gpr109a-mus-905* 的转染, 转染操作如下:

(1) 更换完全培养基为转染培养基, 1.6 mL/孔;

(2) 配置 Lip3000/siRNA 工作液:A 液用 200 μ L DMEM 培养基稀释 80 pmol 的 siRNA, B 液另用 200 μ L DMEM 培养基稀释 4 μ L Lipofectamine 3000, 将 A 液和 B 液均匀混合, 静置 20 min。

(3) 每孔添加 Lip3000/siRNA 工作液 400 μ L, 轻柔混匀, 培养基总体积为 2 mL/孔。

转染完成后于 37.5°C, 5% CO₂, 培养 48 h。

3.2.15 MTT 试验

试验步骤同 1.2.9.6。

3.2.16 LDH 试验

(1) 粗酶液提取: 先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例, 超声波破碎细胞 (冰浴, 功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次); 8000 g 4°C, 离心 10 min, 取上清, 置冰上待测。

(2) 按照下表配置试剂

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)
待测样本	10	10	-
标准液	-	-	10
试剂一	50	50	50
试剂二	10	-	-
蒸馏水	-	10	1-
	充分混匀	37°C 标准水浴 15 min	
试剂三	50	50	50
	充分混匀	37°C 标准水浴 15 min	
试剂四	150	150	150

充分混匀，室温静置 3 min，取 200 μL 转移至微量玻璃比色皿或在 96 孔板中，450 nm 下测定吸光度，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需要设一个对照。根据标准管测定值和浓度做标准曲线，y 为标准品浓度， $\mu\text{mol/mL}$ ；x 为对吸光度（减去浓度为 0 的标准管的 OD 值）。

(3) LDH 活力单位计算:

单位的定义：每 1 万个细胞每分钟催化产生 1 nmol 丙酮酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{LDH (U/104 cell)} = y \times V_{\text{样}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times 103 = 0.133 \times y$$

V 样: 反应体系中加入的样本体积，10 $\mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$ ；V 样总: 加入的提取液体积，1 mL；T: 反应时间，15 min；Cpr: 蛋白质浓度，mg/mL；W: 样品质量，g；500: 细胞总数，500 万；103: 1 $\mu\text{mol/mL} = 103 \text{ nmol/mL}$ 。

3.2.17 数据分析

使用 GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States) 进行数据分析并表示为平均值 \pm 标准误 (SEM)，组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 的多重比较检验进行分析。P 值 < 0.05 认为有统计学意义。

3.3 结果

3.3.1 FMT 处理组丁酸与行为学的相关性分析

进一步我们检测 FMT 处理后小鼠粪便中短链脂肪酸的含量。具体地, 与 CON-FMT 相比, SD-FMT 组小鼠粪便丁酸含量显著降低 58.9 % ($P < 0.001$, 图 4-22 D); 与此相反的是, 接受 SD+Mel 粪便秘植的小鼠的粪便丁酸含量较 SD-FMT 组升高了 146.8 % ($P < 0.001$), 并与 CON-FMT 组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。然而, 另外两个短链脂肪酸(乙酸和丙酸)在三个处理组间并没有统计学差异。这一结果提示 FMT 过程中受体小鼠认知功能的变化, 微生物代谢产物丁酸可能参与其中。因此我们对丁酸和小鼠的行为学指标进行相关性分析。结果显示, 丁酸与小鼠到达平台的逃避潜伏期和总距离呈现负相关性, 而与小鼠穿越平台的次数和停留时间呈正相关性。这一结果表明, FMT 过程中丁酸与认知功能之间存在密切的相关性。因此我们推测急性 SD 通过诱导肠道菌群代谢物的改变尤其是丁酸含量的降低影响小鼠的认知功能。

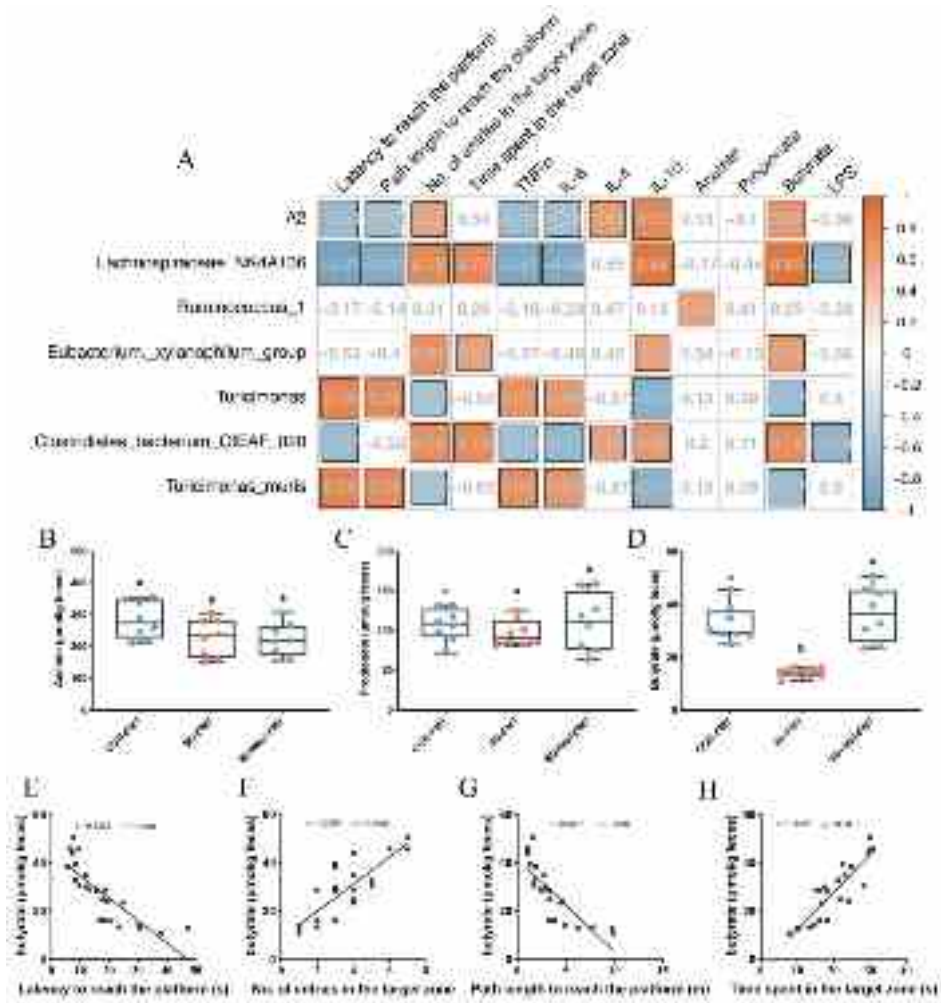


图 4-22 粪菌移植对小鼠粪便短链脂肪酸含量的影响

(A) 相关性分析, (B) 粪便乙酸的含量, (C) 粪便丙酸的含量, (D) 粪便丁酸的含量, (E) 丁酸和逃避潜伏期的相关性, (F) 丁酸和达到平台的距离的相关性; (G) 丁酸和穿越平台的次数的相关性; (H) 丁酸和目标象限停留时间的相关性。CON-FMT: 接受 CON 组 FMT 的小鼠; SD-FMT: 接受 SD 组 FMT 的小鼠; SD+Mel-FMT: 接受 SD+Mel 组 FMT 的小鼠; V-FMT: 酶溶剂组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05); 同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 4-22 Effect of FMT on the contents of short chain fatty acids in feces of mice.

(A) Correlation analysis, (B) Acetate content in feces, (C) Propionate content in feces, (D) Butyrate content in feces, (E) Correlation between latency to reach the platform and butyrate level, (F) Correlation between path length to reach the platform and butyrate level, (G) Correlation between number of entries in the target zone and butyrate level, (H) Correlation between time spent in the target zone and butyrate level. CON-FMT: receiving CON group FMT mice; SD-FMT: receiving SD group FMT mice; SD+Mel-FMT: receiving SD+Mel group FMT mice; V-FMT: vehicle group. The result

represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.2 Mel 或丁酸的补充改善急性 SD 诱导的小鼠记忆损伤

为了研究丁酸能否介导 Mel 改善急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍, 我们观察了 CON、SD、SD+Mel、SD+Abs、SD+Abs+Mel 和 SD+Abs+butyrate 组小鼠在平台存在或不存在时的行为变化 (图 4-23 A)。结果显示, 与 CON 组相比, SD 组和 SD+Abs 组小鼠均出现空间记忆障碍, 具体表现为到达平台的距离和逃避潜伏期均显著增加, 但是在目标象限停留的时间和穿越平台的次数显著降低 ($P < 0.05$)。与之相反, Mel 的补充逆转了急性 SD 诱导的空间记忆障碍的变化。SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 CON 组在到达平台的距离和逃避潜伏期、目标象限停留的时间和穿越平台的次数上没有统计学差异 ($P > 0.05$)。与 Mel 补充相似, 给予急性 SD 小鼠补充丁酸能够改善急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍 ($P < 0.05$)。SD+Abs+Butyrate 组与 CON 组之间的所有参数均无显著差异 ($P > 0.05$)。此外, 各组间的运动速度也无统计学差异 ($P > 0.05$)。因此, 丁酸添加试验表明, 丁酸盐作为肠道菌群信号分子, 可能介导 Mel 在 SD 所致认知障碍中的改善作用。

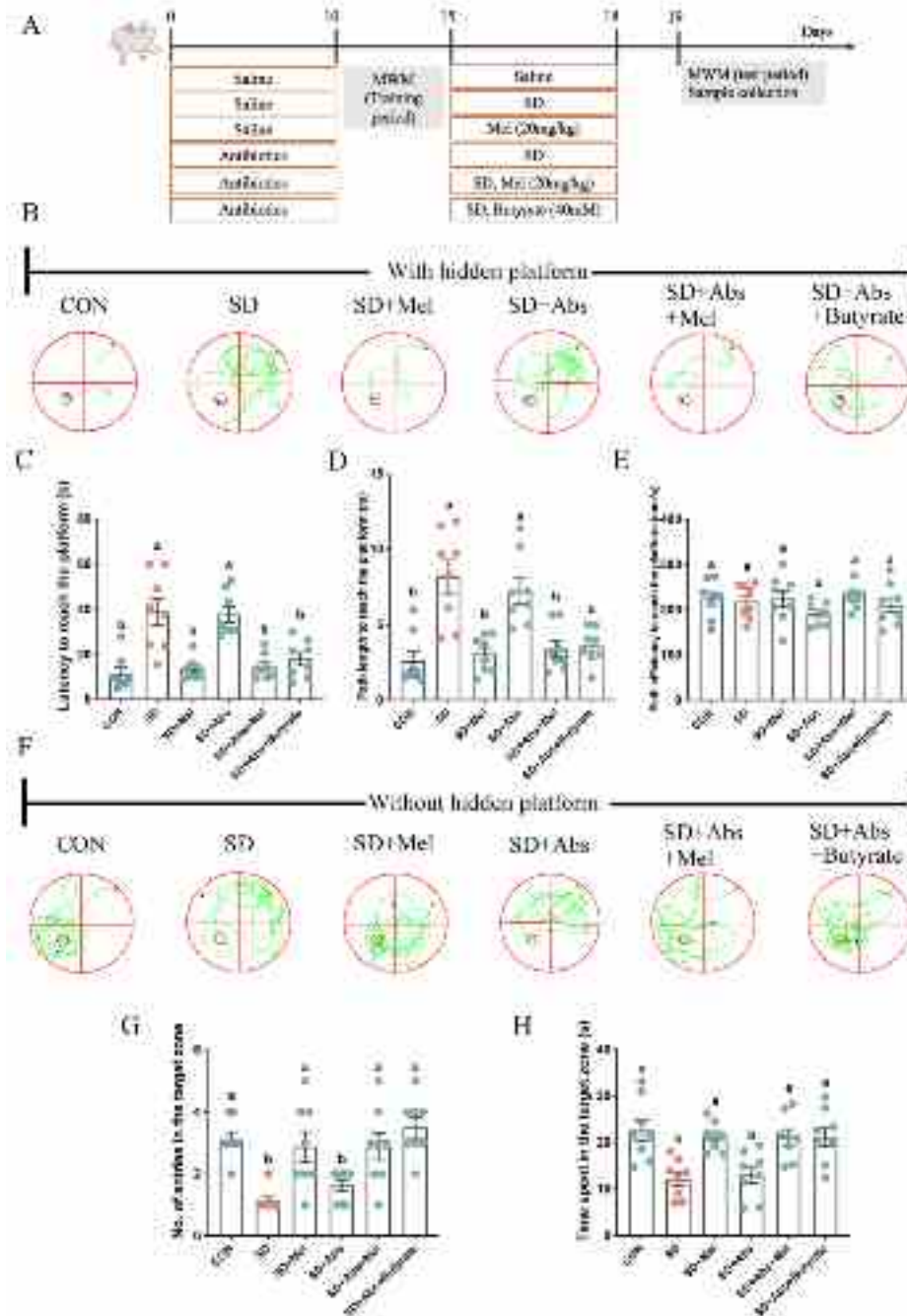


图 4-23 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠空间记忆能力的影响

(A) 试验流程图，(B) 空间记忆测试轨迹图（隐藏平台存在），(C) 到达平台的逃避潜伏期，(D) 到达平台的路径长度，(E) 到达平台的运动速度，(F) 空间记忆测试轨迹图（隐藏平台不存在），(G) 进入目标象限的条目数，(H) 在目标象限停留的时间。CON：对照组；SD：睡眠剥夺组；SD+Mel：睡眠剥夺+ Mel 干预组；SD+Abs：抗生素+睡眠剥夺处理组；SD+Abs+Mel：抗生素+睡眠剥夺+ Mel 干预组；SD+Abs+Butyrate：抗生素+睡眠剥夺+丁酸干预组。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05)；同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 4-23 The effects of Mel or butyrate supplementations on acute SD-induced spatial memory of mice. (A) Experimental flow chart, (B) Track plot of spatial memory test (with hidden platform), (C) Latency to reach the platform, (D) Path length to reach the platform, (E) Path velocity to reach the platform, (F) Track plot of spatial memory test (without hidden platform), (G) Number of entries into the target zone, (H) Time spent in the target zone. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.3 Mel 或丁酸的补充对急性 SD 小鼠血浆激素水平及 *Aanat* 基因的影响

如图所示，我们检测不同组血浆激素水平和松果体 *Aanat* 含量的变化。结果显示，与 CON 组相比，SD 组和 SD+Abs 组小鼠血浆应激激素 NE 和 CORT 显著升高 ($P < 0.05$)，而血浆 Mel 水平显著下降 ($P < 0.05$ ，图 4-24 A)。而 Mel 的补充逆转了急性 SD 诱导的血浆激素水平的显著升高以及 Mel 水平的降低。SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 CON 组的血浆激素水平没有统计学差异 ($P > 0.05$ ，图 4-24 A)。与 Mel 相比，丁酸的补充改善了急性 SD 引起的应激激素的升高，但是对血浆 Mel 的水平并没有影响。松果体 *Aanat* 的结果显示，与对照组相比，SD 组、SD+Abs 组、SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 SD+Mel+Butyrate 组的 *Aanat* 的 mRNA 水平显著降低。以上的结果表明，急性 SD 抑制了 Mel 的分泌，而外源性 Mel 的补充能增加血浆 Mel 的含量但对 Mel 的合成没有影响。进一步丁酸对 Mel 的含量没有改善作用，表明丁酸受到 Mel 的调控。

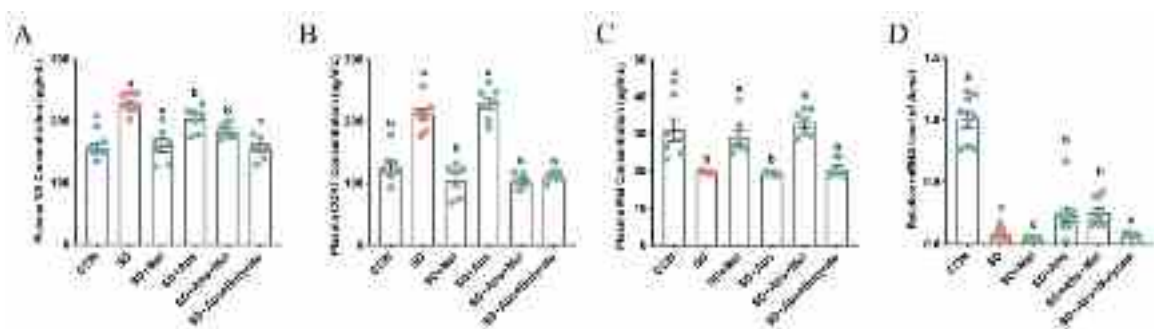


图 4-24 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠血浆激素和松果体 *Aanat* 的影响

(A) NE, (B) CORT, (C) Mel, (D) *Aanat* mRNA 水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+Mel: 睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs: 抗生素+睡眠剥夺处理组; SD+Abs+Mel: 抗生素+睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs+Butyrate: 抗生素+睡眠剥夺+丁酸干预组。结果以 Mean \pm

SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-24 The effects of Mel or butyrate supplementations on plasma hormone and pineal *Aanat* in acute SD mice.

(A) NE, (B) CORT, (C) Mel, (D) *Aanat* mRNA level. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.4 Mel 或丁酸的补充对急性 SD 诱导的海马神经元铁死亡的影响

为了研究丁酸作为信号分子是否通过影响铁死亡发挥作用, 我们检测了不同组间铁死亡相关指标的变化。结果显示, 与 CON 组相比, SD 组和 SD+Abs 组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区出现显著的铁离子蓄积 ($P < 0.05$, 图 4-25 A-D), 以及铁转运蛋白 *Tfr1* 和 *Dmt1* 的增加和 *Fpn* 的降低 ($P < 0.05$, 图 4-25 E-G)。与之相反, Mel 的补充逆转了急性 SD 诱导的铁代谢紊乱。SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 CON 组在海马不同分区铁离子蓄积, 铁转运蛋白 *Tfr1*、*Dmt1* 和 *Fpn* 上没有统计学差异 ($P > 0.05$, 图 4-25 A-G)。与 Mel 补充不同, 丁酸的补充对急性 SD 诱导的铁死亡相关指标没有影响 ($P > 0.05$, 图 4-25 A-G)。以上结果表明, Mel 作为丁酸的上游调控因子能够改善急性 SD 诱导的神经元铁代谢紊乱, 但是丁酸对其没有影响。

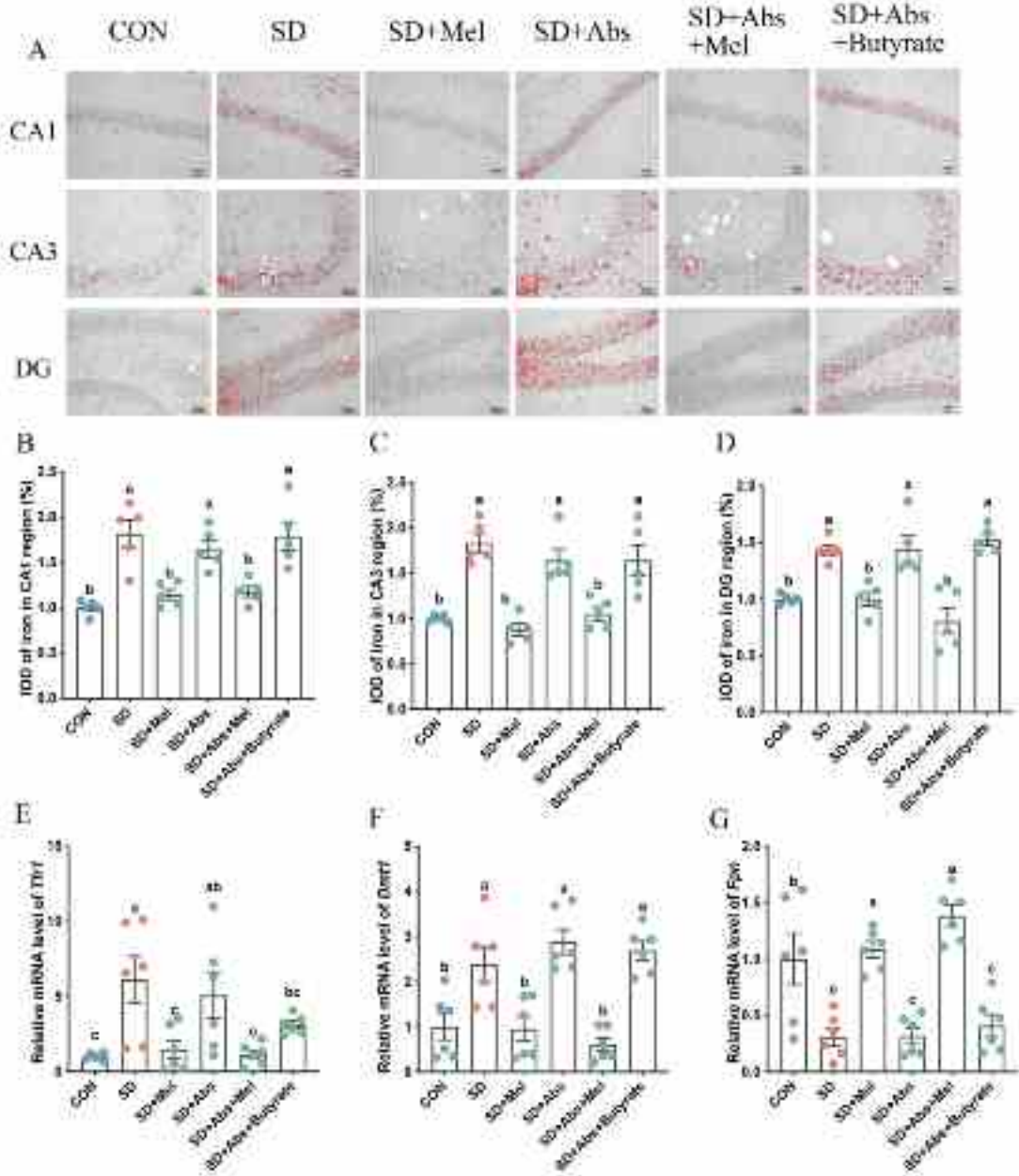


图 4-25 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经元铁死亡的影响（铁代谢）

(A) 普鲁士蓝染色显示海马铁离子蓄积的照片。用 ImageJ 对铁离子染色结果进行处理。铁离子被观察到为红色颗粒（比例尺为 50 μm ），(B) 海马 CA1 区铁离子阳性细胞的 IOD 值，(C) 海马 CA3 区铁离子阳性细胞的 IOD 值，(D) 海马 DG 区铁离子阳性细胞的 IOD 值，(E-F) 海马组织中铁转运蛋白 *Tfr1*, *Dmt1* 和 *Fpn* 的相对 mRNA 水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+Mel: 睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs: 抗生素+睡眠剥夺处理组; SD+Abs+Mel: 抗生素+睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs+Butyrate: 抗生素+睡眠剥夺+丁酸干预组; Abs: 抗生素处理组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-25 The effects of Mel or butyrate supplementations on ferroptosis in hippocampal neurons of mice (Iron metabolism).

(A) Micrographs depict iron labeling in mouse hippocampal sections. The iron-staining results were processed using ImageJ. Iron deposits were observed as red granules. Bar = 50 μ m, (B) Relative IOD of iron-positive cells in the hippocampal CA1 areas, (C) Relative IOD of iron-positive cells in the hippocampal CA3 areas, (D) Relative IOD of iron-positive cells in the hippocampal DG areas, (E-F) Relative mRNA levels of iron transporter proteins *Tfr1*, *Dmt1* and *Fpn* in the hippocampus. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

进一步我们检测了铁死亡另一个标志指标—脂质代谢的变化。结果显示，与 CON 组相比，SD 组和 SD+Abs 组小鼠海马氧化酶 GSH-PX (68-85.2%, $P < 0.001$)、CAT (51.7-59%, $P = 0.005-0.01$)、SOD (29.1-41.2%, $P = 0.000-0.009$)、GPX4 (56.1-58.2%, $P < 0.001$) 和 T-AOC (33.7-37.5%, $P = 0.02-0.03$) 显著降低，而脂质过氧化产物 MDA (45.3-59.5%, $P = 0.000-0.007$) 的含量显著升高 (图 4-26 A-F)。SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 CON 组在凋亡相关蛋白上没有统计学差异 ($P > 0.05$, 图 4-26 A-F)。与 Mel 补充类似，丁酸的补充能够改善急性 SD 诱导的海马神经元脂质代谢紊乱 ($P > 0.05$, 图 4-26 A-F)。

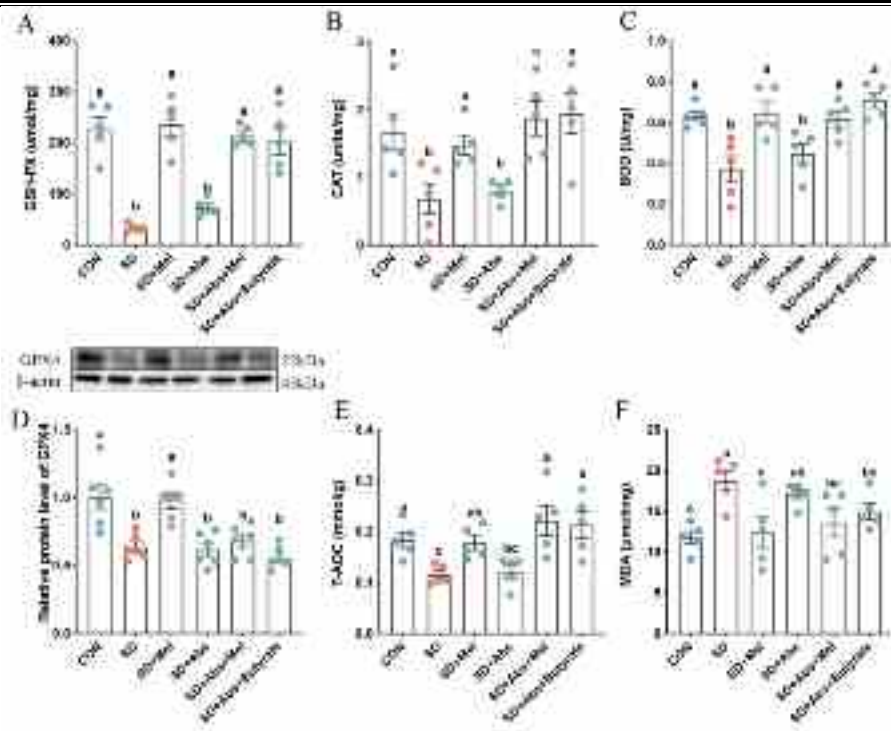


图 4-26 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经元铁死亡的影响（脂质代谢）

(A) GSH-PX, (B) CAT, (C) SOD, (D) GPX4, (E) T-AOC, (F) MDA。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+Mel: 睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs: 抗生素+睡眠剥夺处理组; SD+Abs+Mel: 抗生素+睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs+Butyrate: 抗生素+睡眠剥夺+丁酸干预组。结果以 Mean ± SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05); 同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 4-26 The effects of Mel or butyrate supplementations on ferroptosis in hippocampal neurons of mice (lipid metabolism).

(A) GSH-PX, (B) CAT, (C) SOD, (D) GPX4, (E) T-AOC, (F) MDA. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at P < 0.05; those with the same letter do not differ significantly (P ≥ 0.05).

3.3.5 Mel 或丁酸的补充对急性 SD 诱导的海马神经炎症的影响

为了研究丁酸作为信号分子是否通过影响炎症反应发挥作用，我们检测了不同组间炎症相关指标的变化。结果显示，与 CON 组相比，SD 组和 SD+Abs 组小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区 Iba1 阳性细胞的 IOD 值显著增加，具体表现为 CA1 区增加了 42.6-45.4% ($P < 0.001$)，CA3 区增加了 36.9-38.1% ($P < 0.001$) 和 DG 区增加了 68-72.3% ($P < 0.001$)，TNF- α 含量增加了 28.8-40.2% ($P < 0.001$) 和 IL-6 含量增加了 40.2-46.8% ($P < 0.001$)；而 IL-4 含量降低了 31.9-40.7% ($P = 0.005-0.02$) 和 IL-10 含量降低了 34.5-42.9% ($P < 0.001$)。与之相反，Mel 的补充逆转了急性 SD 诱导的小胶质细胞过度活化和炎症反应。SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 CON 组在上述指标之间没有统计学差异 ($P > 0.05$, 图 4-27)。与 Mel 补充相似，给予急性 SD 小鼠补充丁酸能够改善急性 SD 诱导的小鼠神经炎症反应 ($P < 0.05$, 图 4-27)。SD+Abs+Butyrate 组与 CON 组之间的所有参数均无显著差异 ($P > 0.05$, 图 4-27)。因此，丁酸添加试验表明，丁酸盐作为肠道菌群信号分子，可能介导 Mel 在急性 SD 所致神经炎症中的改善作用。

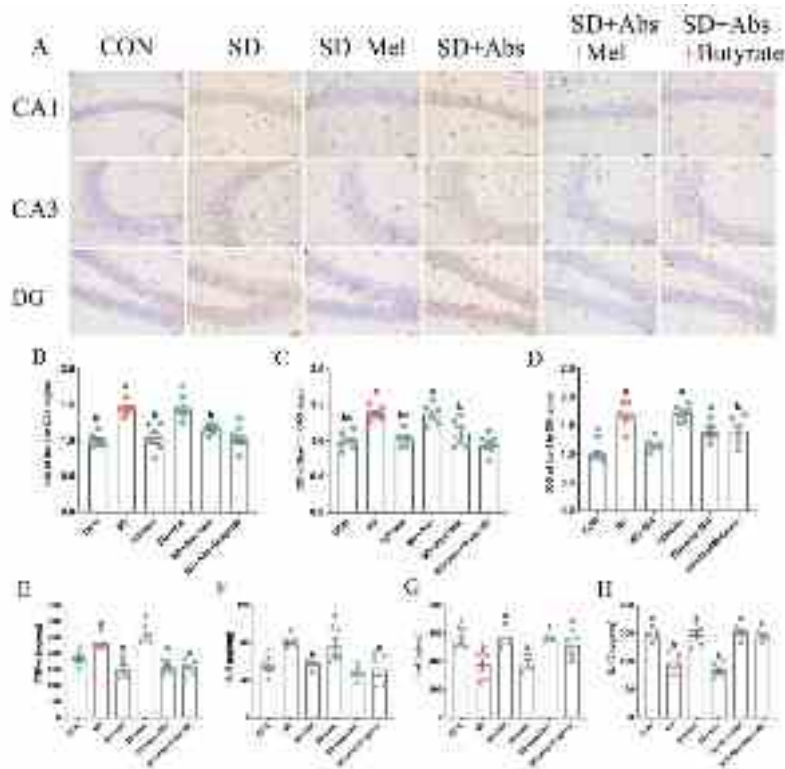


图 4-27 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经炎症的影响

(A) 不同试验组的海马小胶质细胞 Iba1 染色图像 (比例尺为 50 μm)；(B) 海马 CA1、CA3 和 DG 区 Iba1 阳性细胞的 IOD 值；(C-F) 海马组织炎症细胞因子的水平 (TNF- α 、IL-6、IL-4 和 IL-10)。CON: 对照组；SD: 睡眠剥夺组；SD+Mel: 睡眠剥夺+ Mel 干预组；SD+Abs: 抗生素+睡眠剥夺处理组；SD+Abs+Mel: 抗生素+睡眠剥夺+ Mel 干预组；SD+Abs+Butyrate: 抗生素

+睡眠剥夺+丁酸干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-27 The effects of Mel or butyrate supplementation on hippocampal neuroinflammation in acute SD mice.

(A) Images of the Iba1-stained hippocampal microglia in the different experimental groups. Bar = 50 μ m, (B) IOD of Iba1-positive cells in the hippocampal CA1, CA3 and DG region, (C-F) The levels of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10) in the hippocampus. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.4 Mel 或丁酸的补充对急性 SD 诱导的海马神经元凋亡的影响

为了研究丁酸作为信号分子是否通过影响凋亡发挥作用，我们检测了不同组间凋亡相关指标的变化。结果显示，与 CON 组相比，SD 组和 SD+Abs 组小鼠海马 Cleaved caspase-3 和 bax 表达量显著升高了 47.2~68.3% ($P < 0.001$) 和 91.7~99.8% ($P < 0.001$)，而 Bcl-2 表达显著降低了 49.1-50.8% ($P < 0.001$)。与之相反，Mel 的补充逆转了急性 SD 诱导的细胞凋亡。SD+Mel 组、SD+Abs+Mel 组和 CON 组在凋亡相关蛋白上没有统计学差异 ($P > 0.05$ ，图 4-28)。与 Mel 补充类似，丁酸的补充能够改善急性 SD 诱导的海马神经元凋亡 ($P > 0.05$ ，图 4-28)。以上结果表明，Mel 作为丁酸的上游调控因子能够改善急性 SD 诱导的神经元凋亡，而丁酸作为其信号分子介导了 Mel 的改善作用。

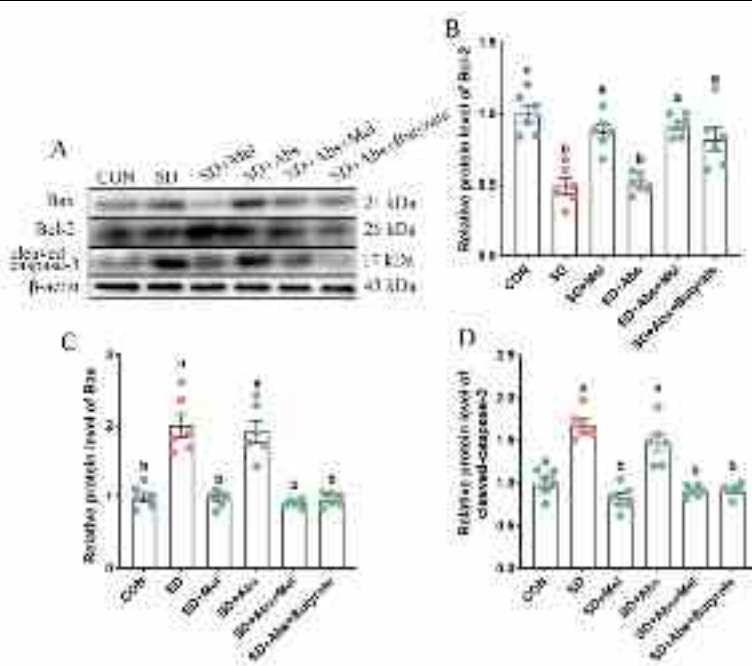


图 4-28 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马神经元凋亡的影响

(A) Western blot 蛋白印迹图；(B) Bax 的相对蛋白水平；(C) Bcl-2 的相对蛋白水平；(D) Cleaved caspase-3 的相对蛋白水平。CON: 对照组；SD: 睡眠剥夺组；SD+Mel: 睡眠剥夺+Mel 干预组；SD+Abs: 抗生素+睡眠剥夺处理组；SD+Abs+Mel: 抗生素+睡眠剥夺+Mel 干预组；SD+Abs+Butyrate: 抗生素+睡眠剥夺+丁酸干预组。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$)；同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-28 The effects of Mel or butyrate supplementation on hippocampal neuronal apoptosis in acute SD mice.

(A) Western blotting of apoptosis-related proteins expression, (B) Bax in the hippocampus, (C) Bcl-2 in the hippocampus, (D) Cleaved caspase-3 in the hippocampus. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean ± standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.4 Mel 或丁酸的补充对急性 SD 小鼠丁酸受体及其信号通路的影响

为了进一步探究丁酸发挥改善作用的机制，我们对丁酸的受体表达情况进行了检测。结果显示，与对照组相比，急性 SD 小鼠海马 *Gpr109a* 受体的 mRNA 水平显著降低 46.3% ($P=0.007$)，而 Mel 和丁酸的补充显著升高了 *Gpr109a* 受体的 mRNA 水平(96.4%， $P=0.002$ ；69.7%， $P=0.04$)。免疫组织化学染色显示海马不同区域 GPR109A

阳性细胞的分布情况。与 *Gpr109a* 相比，不同处理组间 *Gpr41* 和 *Gpr43* 的 mRNA 水平没有差异。我们进一步研究了胞内信号通路是否参与了丁酸的改善作用。结果显示，与对照组相比，急性 SD 小鼠海马 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著降低 47.8% ($P=0.02$, 图 4-29) 和 51.6% ($P=0.026$, 图 4-29)。然而，在急性 SD 小鼠中补充 Mel 和丁酸后显著逆转了上述蛋白的表达水平。

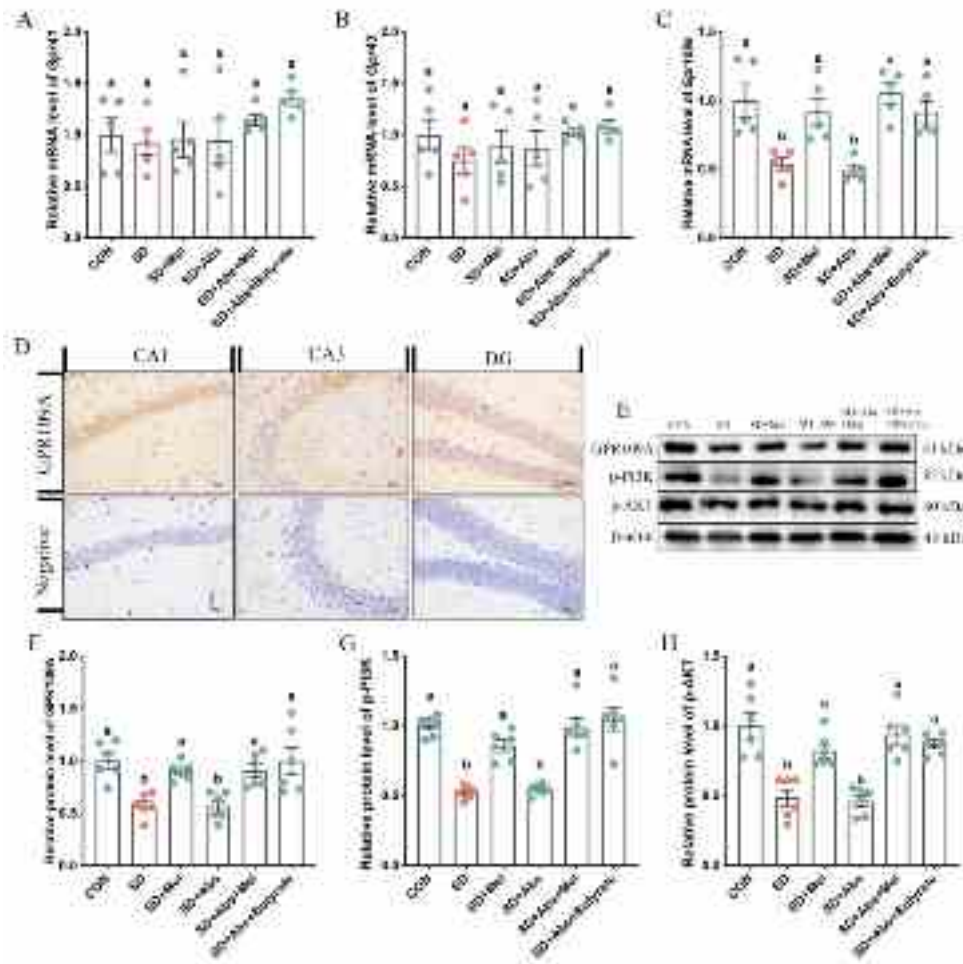


图 4-29 Mel 或丁酸添加对急性 SD 小鼠海马丁酸受体及信号通路的影响

(A) *Gpr41* 的相对 mRNA 水平, (B) *Gpr43* 的相对 mRNA 水平, (C) *Gpr109a* 的相对 mRNA 水平, (D) 海马 GPR109A 免疫组化染色 (比例尺为 200 μ m)。棕色表示阳性细胞。(E-H) 海马组织 GPR109A、p-PI3K、和 p-AKT 相对蛋白水平。CON: 对照组; SD: 睡眠剥夺组; SD+Mel: 睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs: 抗生素+睡眠剥夺处理组; SD+Abs+Mel: 抗生素+睡眠剥夺+ Mel 干预组; SD+Abs+Butyrate: 抗生素+睡眠剥夺+丁酸干预组。结果以 Mean \pm SEM 表示, 没有相同上标字母的值差异显著 ($P < 0.05$); 同字母组差异无统计学意义 ($P \geq 0.05$)。

Fig. 4-29 The effects of Mel or butyrate supplementation on hippocampal butyrate receptor and signal pathway in acute SD mice.

(A) Relative mRNA levels of *Gpr41*, (B) Relative mRNA levels of *Gpr43*, (C) Relative mRNA levels of *Gpr109a*, (D) Immunohistochemical staining of GPR109A in hippocampus. Brown indicates positive cells, (E-H) Relative protein levels of GPR109A, p-PI3K and p-AKT in the hippocampus. CON: control group, SD: sleep deprivation group, SD + Mel: SD + melatonin (20 mg/kg) supplement group, SD+Abs: antibiotics+ SD group, SD+Abs+Mel: antibiotics+ SD +melatonin supplement group; SD+Abs+Butyrate: antibiotics+ SD + Butyrate supplement group. The result represents the mean \pm standard error of the mean. Values not sharing a common superscript letter differ significantly at $P < 0.05$; those with the same letter do not differ significantly ($P \geq 0.05$).

3.3.5 GPR109A 受体在 HT22 细胞的表达情况

为了进一步验证丁酸发挥改善作用的机制，我们对丁酸受体在 HT22 细胞的表达进行检测，免疫荧光结果显示，GPR109A 受体在 HT22 细胞上有表达（图 4-30）。

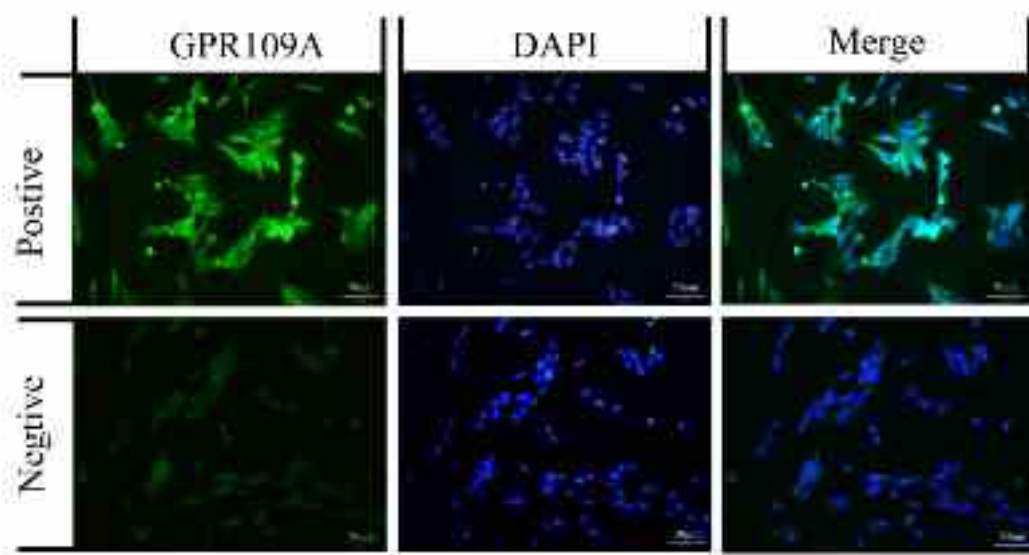


图 4-30 GPR109A 受体在 HT22 细胞的表达情况。

Fig. 4-30 Expression of GPR109A receptor in HT22 cells.

3.3.6 丁酸通过 GPR109A/PI3K/AKT 通路改善 H₂O₂ 引起的 HT22 细胞凋亡

在体外试验中，利用 siRNA 干扰 GPR109A 的表达来评估丁酸受体的作用。MTT 结果表明，丁酸的预处理能改善 H₂O₂ 诱导的细胞活力的降低，而 siRNA-*Gpr109a* 的添加抵消了丁酸的改善作用。与细胞活力的变化相一致，H₂O₂ 处理 HT22 细胞后，p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达水平显著降低 49.8% ($P < 0.001$, 图 4-31) 和 61.2% ($P < 0.001$, 图 4-31)，而丁酸的处理逆转了 H₂O₂ 诱导的上述蛋白的变化。而丁酸的的这种改善作用被 siRNA-*Gpr109a* 的预处理所阻断。进一步为了探讨 PI3K/AKT 信号通

路在丁酸改善 H₂O₂ 诱导 HT22 细胞凋亡过程中的作用机制，同样的我们在体外添加了 PI3K 的特异性阻断剂 (LY294002) 和 AKT 的特异性阻断剂 (GSK690693)。结果显示，LY294002 和 GSK690693 的预处理抑制了丁酸对 H₂O₂ 诱导的细胞活力降低的改善作用。

进一步观察了当 GPR109A、p-PI3K 和 p-AKT 信号通路被抑制时，不同组细胞凋亡相关蛋白的变化。与 H₂O₂+Mel 相比，siRNA-*Gpr109a* 的处理导致 cleaved-Cleaved caspase-3 和 Bax 表达的升高，而 Bcl-2 的表达降低，说明干扰 GPR109A 的表达后，丁酸对 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡的改善作用被阻断了。与 siRNA-*Gpr109a* 预处理相似，LY294002 和 GSK690693 的预处理逆转了丁酸对 H₂O₂ 诱导的变化的缓解作用。

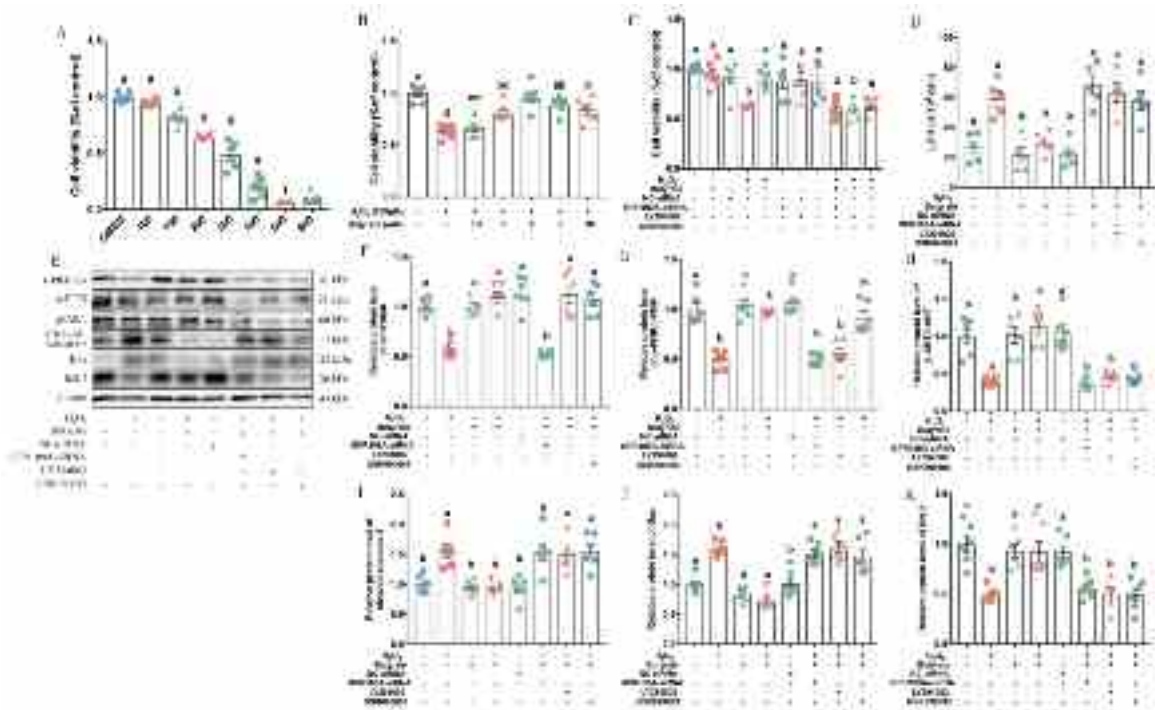


图 4-31 丁酸对 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞 GPR109A/PI3K/AKT 信号通路的影响

(A-C) 细胞相对活力; (D) LDH 的含量; (E-K) GPR109A、p-PI3K、p-AKT、Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的相对蛋白表达量; NC-siRNA: siRNA 的阴性对照; *Gpr109a*-siRNA: siRNA 干扰 GPR109A 的表达; LY294002: PI3K 的抑制剂; GSK690693: AKT 的抑制剂。结果以 Mean ± SEM 表示，没有相同上标字母的值差异显著 (P < 0.05); 同字母组差异无统计学意义 (P ≥ 0.05)。

Fig. 4-31 The effect of butyrate on H₂O₂-induced GPR109A/PI3K/AKT signaling pathway in HT22 cells.

(A-C) Relative activity of cells, (D) LDH content, (E-K) relative protein expression levels of *Gpr109a*, P-PI3K, P-Akt, Cleaved caspase-3, Bax, and Bcl-2. Nc-siRNA: Negative control for siRNA; *Gpr109a* - siRNA: siRNA interferes with GPR109A expression; LY294002: Inhibitor of PI3K; GSK690693:

Inhibitor of AKT. The results were expressed as Mean \pm SE, and there was no significant difference between the values of the same superscript letters $P < 0.05$. There was no significant difference in the same letter group ($P \geq 0.05$).

3.4 讨论

微生物分析显示,毛螺菌 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*) 是产生的丁酸的主要细菌,其在 SD-FMT 组中相对丰度显著低于其他两组。进一步我们检测了 FMT 受体小鼠结肠 SCFAs 的含量,我们发现 SD-FMT 小鼠的丁酸含量显著降低,CON 和 SD+Mel-FMT 小鼠的结肠丁酸含量显著高于 SD-FMT 组,且二者之间没有差异,反之乙酸和丙酸在不同组间没有显著性变化。这就提示肠道菌群的调控作用可能是通过丁酸来介导的。因此我们检测 FMT 受体鼠丁酸和行为学指标之间的相关性,结果显示丁酸与受体小鼠的认知功能障碍呈显著的负相关。这部分结果证明丁酸可能作为信号分子,介导了 Mel 对急性 SD 诱导的记忆损伤的改善作用。因此我们通过外源性补充丁酸来验证其作用。

除了为结肠上皮提供能量外,丁酸盐还可以通过肠血管屏障进入体循环 (Cryan et al., 2020)。此外,由于丁酸盐能够穿过 BBB,因此循环中的丁酸盐可能对大脑产生直接影响 (Stilling et al., 2016)。我们的结果表明,用 Mel 或丁酸盐治疗可以改善急性 SD 引起的记忆障碍。然而,有趣的是,向急性 SD 小鼠 (SD+Mel 和 SD+Abs+Mel 组) 补充 Mel 可以显著增加 Mel 和丁酸盐的水平,而补充丁酸盐 (SD+Abs+丁酸盐组) 只能恢复丁酸盐的含量,但不能消除 SD 引起的 Mel 分泌抑制。同样的我们也发现急性 SD 能够抑制松果体 *Aanat* 的基因表达,而不论是外源性 Mel 或丁酸的补充都不能改善急性 SD 对 *Aanat* 的抑制。因此,这些结果表明,急性 SD 通过抑制 Mel 分泌,选择性降低结肠 *Lachnospiraceae_NK4A136* 和丁酸的产生,最终诱发认知功能障碍。有研究报道,急性 SD 引起的全身炎症的激活可以干扰 BBB 的通透性,使促炎细胞因子进入中枢神经系统,从而导致神经炎症的发生最终导致神经元丢失 (Gasaly et al., 2021)。我们的体内试验结果表明,补充 Mel 或丁酸盐可有效减轻急性 SD 小鼠海马 Iba1 阳性细胞的数量,促炎细胞因子和促凋亡蛋白显著增加,并导致抗凋亡蛋白明显减少。因此,我们的结果表明丁酸盐是一种信号分子,可介导 Mel 对急性 SD 诱导的记忆障碍的改善作用。

关于潜在机制,丁酸盐主要通过转运蛋白和受体途径在体内发挥作用。有报道称,丁酸盐的受体和转运蛋白均在脑内表达,而转运蛋白主要表达于 BBB 的内皮细胞上,负责将丁酸盐转运至脑内 (Silva et al., 2020)。而受体在大脑中的神经元上表达,并通过激活细胞内信号通路发挥调控作用。研究发现,丁酸主要有三种受体,即 G 蛋白偶联受体 GPR41、GPR43 和 GPR109A (Kimura et al., 2020)。我们的研究表明,补

充 Mel 和丁酸盐可以改善急性 SD 诱导的 GPR109A 蛋白表达降低, 而 GPR41 和 GPR43 在不同组之间没有显著变化, 这表明丁酸盐可能主要通过 GPR109A 受体结合发挥作用。先前的研究发现, 丁酸盐可以减少大脑中小胶质细胞的促炎表型(Wenzel et al., 2020)。然而, 有趣的是, 我们通过免疫组化试验检测到 GPR109A 受体在海马中的定位。结果显示, GPR109A 受体主要表达于海马 CA1 和 CA3 区, 提示丁酸可能直接作用于神经元发挥抗凋亡作用。

为了进一步验证丁酸盐对神经元的改善作用, 我们用 H_2O_2 处理 HT22 细胞模拟细胞凋亡模型并添加丁酸盐探究其抗凋亡作用。我们发现丁酸盐逆转了 H_2O_2 诱导的 Cleaved caspase-3、Bax 和 LDH 指数的增加以及 GPR109A、p-PI3K、p-AKT、Bcl-2 和细胞活力的降低。然而, 利用 siRNA 干扰掉 GPR109A 受体后, 抵消了丁酸盐的抗凋亡作用。先前的研究发现, 补充丁酸钠可通过 GPR41/Gbc 激活 PI3K/AKT 通路, 并减轻大脑中动脉闭塞后的神经元凋亡 (Zhou et al., 2021b)。此外, 一项研究发现, Mel 通过激活丁酸盐/GPR109A 信号通路来缓解钛纳米颗粒诱导的骨溶解 (Wu et al., 2021)。我们的体内外试验结果表明, 急性 SD 或 H_2O_2 可以抑制小鼠或 HT22 细胞中 PI3K/AKT 信号通路的激活, 而丁酸盐的处理可以有效抵消该信号通路的抑制作用。为了确认 GPR109A 受体下游特定机制联系, 将 PI3K 抑制剂 LY294002 或 AKT 抑制剂 GSK690693 与丁酸盐处理一起给药; 两种干预措施都消除了丁酸盐的神经保护作用。这些结果证实了我们的假设, 即丁酸盐通过与 GPR109A 受体结合, 进而激活 PI3K/AKT 通路, 最终改善神经元的凋亡。

3.5 小结

综上, 外源性 Mel 通过下调气单胞菌 *Aeromonas* 及其胞壁成分 LPS 的含量并上调毛螺菌 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸的含量, 直接激活神经元上的 GPR109A/PI3K/AKT 信号通路, 缓解神经元凋亡的发生, 最终改善小鼠认知功能障碍。

第五章 全文讨论

睡眠是机体的一种修复过程，可以恢复精神和解除疲劳。良好的睡眠是国际社会公认的三项健康标准之一，而睡眠时间过短或睡眠不佳均会影响健康（Panagiotou et al., 2021）。高密度集约化养殖或长时间光照制度会严重影响动物正常的睡眠状态和睡眠质量，也会制约生产过程中的经济效益，一项研究发现限位饲养妊娠母猪出现采食量减少，食槽剩余饲料增多，精神萎靡，反应迟钝，对周边事物失去兴趣，常表现出啃栏、啃槽和无食咀嚼的规癖行为（师铭咸，2021）。因此良好的睡眠对于机体健康的维持至关重要。其中睡眠不足会对大脑认知功能产生负面影响，即使只有一次的睡眠剥夺也会对大脑功能产生损伤。（Seton and Fitzgerald, 2021）。海马是大脑中调控学习和记忆最为重要的区域之一，其对睡眠剥夺特别敏感，持续数天到数周的睡眠减少会导致动物突触可塑性损伤甚至海马体萎缩，给大脑功能造成严重影响（Klinzing et al., 2019）。调查发现随着人们年龄增长，睡眠与痴呆之间会建立联系，长期睡眠时间小于或等于 6 小时的中年人患痴呆症的风险会增加 30%（Sabia et al., 2021）。就目前而言，寻找能够改善睡眠不足诱导认知障碍的潜在药物非常迫切。睡眠是一项具有昼夜节律的活动，而 Mel 是松果体分泌的具有昼夜节律的内源性激素，它参与调控机体的多种生理过程，包括睡眠的时间、质量和深度，以及昼夜节律、心血管功能和多种行为与意识等（He et al., 2021）。褪黑激素的受体在人体中广泛分布，包括大脑、视网膜、心血管系统、肝、肾、脾和肠道等（Liu et al., 2016），这就意味着 Mel 与多项机体功能有关，并且 Mel 对机体的作用具有系统性和全局性。但目前 Mel 对睡眠不足诱导认知损伤的作用尚不明确。因此本研究通过建立急性 SD 模型探讨认知障碍的发生机制，并添加 Mel 探讨其对急性 SD 诱导认知障碍的改善作用及其机制。

1. 褪黑激素对急性睡眠剥夺导致的小鼠海马神经元丢失与认知功能障碍的缓解作用

认知功能障碍指由于不同原因导致的认知功能损伤，表现为记忆、情绪和运动等一项或多项功能受损。研究证实睡眠不足与痴呆症之间存在显著的关联（Sabia et al., 2021）。因此我们通过多种行为学的方法对小鼠不同的认知功能进行评估。空间记忆具有短期和长期记忆的表现形式，分别表示为空间工作记忆和空间参考记忆。莫里斯水迷宫能够用来评估不同处理下小鼠空间参考记忆的水平（Thornberry et al., 2021）。我们发现，急性 SD 小鼠在隐藏平台存在时，其到达平台的时间和距离都显著高于正常小鼠，表明急性 SD 的处理让小鼠难以记得平台的准确位置，而将隐藏平台移去后，急性 SD 小鼠在水池中无目的的游泳，并没有在平台存在的象限进行多次寻找，这表

明急性 SD 小鼠没有记住隐藏平台的位置, 因此其才会去多个象限进行寻找。与水迷宫的结果相似, 我们发现急性 SD 小鼠在 Y 迷宫中的自发交替行为百分比降低。自发交替行为百分比被定义为连续进入三次不同臂的情况, 而较高百分比的自发交替行为表明动物的空间工作记忆良好 (Heredia-López et al., 2016)。此外, 研究也发现睡眠不足的人群常伴有焦虑样的情绪障碍, 因此我们通过旷场试验对急性 SD 小鼠的情绪行为进行评估。正常小鼠在一个密闭环境中会本能的探索所处的环境, 当小鼠存在焦虑样情绪时, 其探索的比例会下降, 表现为在中央区域停留的时间和距离降低。我们的结果显示急性 SD 小鼠的中央时间百分比和中央距离百分比都显著下降, 表明急性 SD 能够引起小鼠的焦虑样行为。但是急性 SD 对小鼠在 8 min 内的运动总距离没有影响, 提示急性 SD 对小鼠的运动能力没有影响。上述结果说明急性 SD 诱导小鼠认知功能的障碍, 包括空间工作记忆和空间参考记忆的损伤和类焦虑行为的发生, 但急性 SD 引起记忆损伤的机制尚不清楚。

神经元是大脑的单位基础, 数千亿个神经元产生突触连接维持大脑的基本功能。海马是参与学习和记忆最重要的脑区之一, 该过程需要海马各个区域的神经元相互配合才能完成 (Yoo et al., 2012)。因此神经元的大量丢失是多种神经系统疾病的病理基础。神经元数量统计显示急性 SD 小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区神经元出现不同程度的丢失, 并且通过尼氏染色观察到神经元出现体积缩小、间隙增加、细胞数量减少和染色变浅的形态学变化。尼氏体能反映神经元的正常功能, 当神经元受到损伤或过度疲劳时会出现减少、解体甚至消失的现象 (Lindroos, 1991)。我们的结果表明急性 SD 能够减少神经元的数量并影响神经元的功能, 从而影响小鼠的认知功能。小胶质细胞作为大脑常驻的固有免疫细胞, 负责监测神经元活动的变化, 调节学习和记忆能力以及吞噬有害物质等。过度活化的小胶质细胞会引起神经炎症反应, 对神经元造成不利的影响 (Tsuda, 2019)。在本研究中, 急性 SD 的处理引起海马小胶质细胞标志蛋白 Iba1 的表达增加以及促炎细胞因子 (TNF- α 和 IL-6) 的升高和抑炎细胞因子 (IL-4 和 IL-10) 的降低, 提示急性 SD 诱导了海马神经炎症的发生。

有趣的是, 我们发现急性 SD 小鼠血浆 Mel 水平发生显著降低, 与认知功能障碍的变化相一致。因此我们推测急性 SD 是通过抑制 Mel 的水平而引起的小鼠认知功能障碍。松果体内 *Aanat* 含量的变化证明了我们的猜测, 急性 SD 的处理降低了松果体 *Aanat* 的基因表达, 而 *Aanat* 是 Mel 合成的限速酶。当我们外源性补充 Mel 时, 急性 SD 小鼠的认知功能损伤得到改善, 并且将急性 SD 小鼠血浆 Mel 的含量恢复至对照组水平, 但是外源性 Mel 的补充并没有促进 *Aanat* 基因表达的恢复。这些结果表明急性 SD 通过抑制松果体 Mel 的合成降低机体 Mel 的含量, 从而引起小鼠认知功能的障碍, 当机体一致处于急性 SD 的状态时 Mel 的合成始终受到抑制, 并不会受到外源性 Mel 补充的影响。总体而言, 这部分结果表明急性 SD 抑制 Mel 的分泌, 导致小胶

质细胞过度活化、神经炎症反应的发生和神经元的大量丢失，从而造成小鼠空间工作记忆和空间参考记忆的损伤及焦虑样行为的发生，而外源性 Mel 的补充通过恢复降低的 Mel 水平，改善了急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍。但 Mel 发挥改善作用的机制尚不清楚。

2. 褪黑激素缓解急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的直接作用机制

上一章的结果表明 Mel 通过改善急性 SD 引起的海马神经元丢失，进而缓解小鼠认知功能的障碍。进一步我们发现急性 SD 小鼠海马神经元存在大量的铁离子蓄积，提示铁死亡可能参与了神经元的丢失。铁在细胞内的代谢受到不同转运蛋白的调控，TFR1 和 DMT1 负责将铁离子转运进细胞，FPN 负责将铁离子输出细胞 (Yan and Zhang, 2019)。我们结果显示急性 SD 引起海马铁转运蛋白的紊乱，表现为 TFR1 和 DMT1 的升高，FPN 的降低，这一结果与海马不同区域铁离子蓄积现象相一致。此外急性 SD 也导致了抗氧化酶 SOD 和 GPX4 水平的降低以及脂质过氧化产物 ROS 和 MDA 的增加。从铁代谢和脂质代谢方面共同表明急性 SD 诱导了海马神经元铁死亡的发生，而外源性 Mel 的补充能有效的逆转上述指标的变化。褪黑激素通过与膜受体结合激活下游不同的信号通路从而作用于靶细胞 (Gurunathan et al., 2020)。我们发现急性 SD 抑制了小鼠海马中 MT2/ERK/NRF2 的表达，然而在外源性 Mel 的作用下，急性 SD 对上述蛋白的抑制作用被抵消，但是在不同处理组间 MT1 受体没有出现差异。因此我们推测 Mel 是通过与 MT2 受体结合激活下游信号通路改善急性 SD 引起的神经元铁死亡。

在体外，我们构建细胞铁死亡模型探究 Mel 对铁死亡的改善作用及其机制。Erastin 处理 HT22 细胞，引起了 p-ERK 和 NRF2 的表达水平的升高，并促进铁转运蛋白的紊乱和脂质过氧化的增加，最终导致细胞活力的降低。而在此基础上添加 Mel 逆转了上述指标的变化。与此同时，4P-PDOT、PD98059 和 ML385 的处理抵消了 Mel 对 Erastin 诱导铁死亡的改善作用。相比之下，4P-PDOT 和 PD98059 的处理阻断了 Mel 对 p-ERK 的上调作用，而 ML385 对其没有影响。在创伤性脑损伤模型下，Mel 也能通过与 MT2 受体结合改善了海马神经元的铁死亡现象 (Rui et al., 2021)。因此，我们的研究表明 Mel 通过与 MT2 受体结合激活 ERK/NRF2 信号通路来改善铁稳态和脂质稳态失衡最终治疗急性 SD 诱导的认知功能障碍。

总体而言，这一结果表明 Mel 对急性 SD 诱导记忆损伤的改善作用，其机制涉及到 Mel 直接与神经元上的 MT2 膜受体结合，进而激活 ERK/NRF2 通路逆转神经元内铁代谢和脂质代谢的失衡，最终改善神经元的大量丢失。但 Mel 的作用机制存在全身性和系统性。

3. 褪黑激素缓解急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的间接作用机制

在第三章中我们证实了 Mel 对急性 SD 诱导认知障碍的改善作用, 并发现其发挥改善作用的直接机制。我们实验室前期研究发现, 急性 SD 能诱导肠道菌群紊乱和肠粘膜损伤, 而外源性 Mel 的补充能通过恢复正常的肠道菌群和肠黏膜最终改善结肠炎的发生 (Gao et al., 2019)。机体内各个组织器官之间互相影响, 微生物-肠-脑轴之间通过不同的途径产生双向交流。基于此我们推测 Mel 对急性 SD 诱导的神经元丢失的改善作用可能并不仅仅涉及直接作用途径, 外源性补充的 Mel 可能通过影响外周组织器官的功能进而影响中枢神经系统。研究发现, Mel 能够与微生物产生直接对话 (He et al., 2021)。因此, 我们首先建立了 FMT 模型, 探讨肠道微生物是否参与了 Mel 对急性 SD 诱导的认知损伤的改善作用。我们分别将正常小鼠、急性 SD 小鼠和接受 Mel 治疗的 SD 小鼠的粪便分别移植给抗生素处理过的类无菌小鼠。我们发现接受急性 SD 粪便菌群移植的受体鼠表现出与供体鼠类似的行为变化, 出现空间工作记忆和空间参考记忆的损伤, 并表现出焦虑样的行为。而接受 SD+Mel 粪便菌群移植的受体鼠与正常小鼠的行为变化相一致, 没有出现认知功能损伤的情况。这一结果表明供体鼠的肠道菌群能转移供体鼠相应的表观行为, 提示肠道菌群介导了 Mel 对急性 SD 诱导小鼠认知损伤的改善作用。

通过微生物测序分析我们发现 FMT 受体鼠结肠微生物的变化。从总体上看, α 多样性和 β 多样性结果表明, SD+Mel-FMT 组的微生物群落与对照组相似。此外, 对照组和 SD+Mel-FMT 组在不同分类水平上的比较显示肠道微生物群谱没有显著差异, 这表明 Mel 的补充恢复了急性 SD 诱导小鼠的健康微生物群。具体的, SD-FMT 组 *Bacteroidetes* 和 *Lachnospiraceae_NK4A136* 的相对丰度显著降低, 而 *Proteobacteria*、*Aeromonas* 和 *Oscillibacter* 相对丰度增加。此外我们也发现 SD-FMT 小鼠结肠丁酸的降低 (乙酸和丙酸无变化), 而 SD+Mel-FMT 组的丁酸水平得到改善, 其恢复至对照组水平。紧接着, 我们进一步探究有害的肠道菌群是否是通过引起海马神经元的铁死亡从而导致的记忆损伤。有趣的是, 我们发现 SD-FMT 组小鼠海马神经元并未出现大量铁离子的蓄积, 其他铁死亡相关指标相对于 CON-FMT 组也没有显著的变化。这令我们思考, 肠道菌群可能并不是通过引起神经元铁死亡导致小鼠记忆损伤的。在第二章中, 我们也观察到急性 SD 小鼠海马组织出现神经炎症和凋亡现象, 因此我们猜测, 肠道菌群是否通过引起神经元凋亡而导致记忆损伤。接下来的结果验证了我们的猜想, SD-FMT 小鼠海马组织中小胶质细胞呈现过度活化, 促炎因子升高、抑炎因子降低、促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 和 Bax 表达增加和抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低的现象。而 Mel 治疗的 SD 小鼠的粪便移植受体鼠并未出现上述变化。由此我们认为, 有害的肠道菌群通过引起受体鼠海马神经元凋亡从而导致记忆损伤, 而 Mel 能够通过恢复

紊乱的肠道菌群发挥改善作用。这一结果证明了 Mel 能通过作用肠道微生物间接调控海马组织，但其具体作用机制尚不清楚。

3.1 炎症信号的传递者—LPS

第四章中我们发现 *Proteobacteria* 是 SD-FMT 小鼠的优势菌，与机体炎症反应密切相关，其胞壁成分 LPS 是介导炎症反应的重要信号分子 (Matijašić et al., 2016)。研究发现机体循环中聚集的 LPS 会增加血脑屏障的通透性，进入大脑实质与小胶质细胞发生互作，引起神经炎症反应 (Carloni et al., 2021)。因此我们推测，微生物的胞壁成分 LPS 介导了急性 SD 诱导的小鼠记忆损伤。因此我们建立 *A. veronii* 定植试验和 LPS 添加试验来探讨它们是否能模拟急性 SD 小鼠的行为变化。我们观察到 SD-FMT 小鼠、*A. veronii* 定植小鼠与 LPS 处理小鼠同样表现出 LPS 含量的增加与小胶质细胞的活化及小鼠记忆能力的损伤。而 Mel 显著改善 *A. veronii* 定植和 LPS 处理引起的上述变化。有研究发现 LPS 通过与小胶质细胞的 TLR4 结合，激活下游 NF- κ B 通路引发炎症反应，这些变化在帕金森小鼠以及接受帕金森小鼠粪菌移植的无菌小鼠中观察到 (Zhao et al., 2021)。

整体来看，急性 SD 引起了丁酸的降低和 LPS 的升高，而外源性 Mel 的补充增加丁酸的含量并降低 LPS 的水平，褪黑激素的这一过程是通过重塑肠道菌群来发挥作用的。那么在大脑内部，小胶质细胞和神经元间的关系尚不清楚。因此我们在体外分别培养来 BV2 细胞和 HT22 细胞，首先用 LPS 处理 BV2 细胞模型炎症反应，之后用 BV2 的培养基处理 HT22 细胞。我们的结果显示，LPS 能够引起 BV2 细胞促炎因子分泌的增多，并导致 HT22 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白表达的增加，丁酸的添加逆转了 LPS 诱导的上述变化。但是丁酸的改善作用可以被 TSA 完全抑制。同样的，TAK-242 和 PDTC 可以模仿丁酸的改善作用。将上述分组处理后的 BV2 细胞的上清制备为条件培养基，培养 HT22 细胞。结果显示 LPS 处理后的条件培养基引起 HT22 细胞凋亡的发生，丁酸处理后的培养并未引起 HT22 细胞凋亡，而 TSA 处理后的 HT22 细胞与 LPS 组类似，TAK-242 和 PDTC 处理后的 HT22 细胞与丁酸处理组的类似。

3.2 褪黑激素的信号分子—丁酸

第四章中我们发现 *Lachnospiraceae_NK4A136* 菌是 SD+Mel-FMT 小鼠的优势菌，而该菌是主要产丁酸的菌之一 (Li et al., 2021a)。因此我们认为 Mel 可能通过调控丁酸发挥改善作用。为了验证这一猜想，我们通过外源性补充丁酸来验证其作用。结果显示丁酸的添加改善了急性 SD 诱导的记忆损伤，并抑制了小胶质细胞的过度激活，降低了促炎因子的含量，下调了 Cleaved caspase-3 和 Bax 的表达，上调了 Bcl-2 的表达。但是丁酸的添加并不能改善急性 SD 海马神经元的铁死亡水平。有趣的是，向急性 SD 小鼠 (SD+Mel 和 SD+Abs+Mel 组) 补充 Mel 可以显著增加 Mel 和丁酸盐的水平，而补充丁酸盐 (SD+Abs+Butyrate 组) 只能恢复丁酸盐的含量，但不能消除 SD 引

起的 Mel 分泌抑制。同样的我们也发现急性 SD 能够抑制松果体 *Aanat* 的基因表达，而不论是外源性 Mel 或丁酸的补充都不能改善急性 SD 对 *Aanat* 的抑制。由此我们认为丁酸作为信号分子介导了 Mel 对急性 SD 诱导记忆损伤的改善作用，而其具体的作用机制尚不清楚。

丁酸盐主要通过转运蛋白和受体途径在体内发挥作用 (Yang et al., 2020b)。具体的作用机制由细胞表面的受体或转运体所决定，进入细胞的丁酸能抑制 NF- κ B 通路的激活发挥抗炎作用。研究发现转运体在脑中无处不在，而受体却主要在神经元上表达。结合我们上一部分的研究，我们发现 Mel 通过上调丁酸的含量发挥改善作用，进入大脑的丁酸一方面通过 MCT1 转运体进入小胶质细胞发挥抑炎作用，另一方面丁酸通过与神经元上的 GPR109A 受体结合激活 PI3K/AKT 信号通路改善急性 SD 诱导的神经元凋亡，最终缓解小鼠认知功能的损伤。

总体而言，我们的研究证明急性 SD 通过引起海马神经元的凋亡和铁死亡，造成海马不同区域神经元的丢失，最终引起小鼠认知功能障碍，而 Mel 一方面通过与 MT2 受体结合发挥直接改善作用，缓解神经元铁死亡的发生；另一方面 Mel 通过重塑肠道菌群发挥间接改善作用，增加丁酸含量并减少 LPS 含量，缓解小胶质细胞的过度活化，降低神经元的凋亡水平，最终缓解急性 SD 小鼠的认知功能障碍。

4. 褪黑激素缓解急性睡眠剥夺诱导小鼠认知功能障碍的直接作用与间接作用的串扰

上述的结果证明 Mel 可以通过直接或间接的途径改善急性 SD 诱导的认知损伤。不论 Mel 是作用于海马本身，还是间接通过肠脑轴回到海马，最终的落脚点在于海马组织中的神经元。神经元是大脑功能的承担者和执行者，更由其不可再生的特性，维持神经元的数量和功能在缓解各种认知损伤中显得尤为重要。我们发现急性 SD 小鼠海马中同时存在两种细胞死亡模式，分别是铁死亡和凋亡。凋亡是一种经典的程序性死亡方式，而铁死亡在最初发现时被认为是区别于所有细胞死亡方式的一种新型死亡方式。但随着研究的深入，逐渐发现铁死亡和凋亡之间存在一些共同的调控机制，比如 p53 转录因子，既可以与抗凋亡蛋白 Bcl-2 发生拮抗作用从而增加线粒体膜通透性诱导凋亡 (Wei et al., 2021)；也可以抑制 SLC7A11 的表达从而促进铁死亡 (Liu and Gu, 2022)。另外，一种天然产物合欢昔 A 能同时诱导铁死亡和凋亡的发生，对肿瘤细胞有较高的选择性杀伤作用 (Wei et al., 2019)。我们的研究也发现给予急性 SD 小鼠补充 Mel 后，神经元铁死亡和凋亡均得到了改善。

但铁死亡和凋亡之间是因果关系还是平行关系尚不清楚。因此我们建立了 Erastin (铁死亡诱导剂) 处理小鼠和 SD+Fer-1 (铁死亡抑制剂) 处理小鼠两种模型，通过

检测凋亡和铁死亡相关的指标,探讨二者之间的关系。我们发现 SD 组和 Erastin 组的小鼠表现出海马神经元丢失和记忆损伤,而 SD+Fer-1 小鼠并未出现上述变化。进一步,我们观察到急性 SD 组和 Erastin 组小鼠海马中出现大量铁离子的蓄积,并检测到铁转运蛋白的紊乱,同样的这两组海马组织的活性氧水平也显著高于对照组的水平。这一结果表明急性 SD 组和 Erastin 组引起了海马神经元的铁死亡,与行为学的结果是保持一致的。紧接着,我们发现急性 SD 和 Erastin 的处理,引起海马组织中 Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达的增加和 Bcl-2 蛋白的表达降低,表明急性 SD 和 Erastin 能够诱导细胞凋亡的发生。有趣的是,给予急性 SD 小鼠外源性补充 Fer-1 后,其细胞凋亡水平受到了抑制。与我们的发现相似,在胰腺癌模型中,FBW7 能促进胰腺癌细胞脂质过氧化和铁死亡,FBW7 能通过 NR4A1 抑制 SCD1 转录,进而促进铁死亡和凋亡 (Ye et al., 2021)。因此,我们的结果表明,急性 SD 能同步调控海马神经元铁死亡和凋亡的发生,从而引起神经元的丢失和小鼠认知功能障碍,而 Fer-1 的补充证明铁死亡加剧凋亡的发生。

全文总结图:

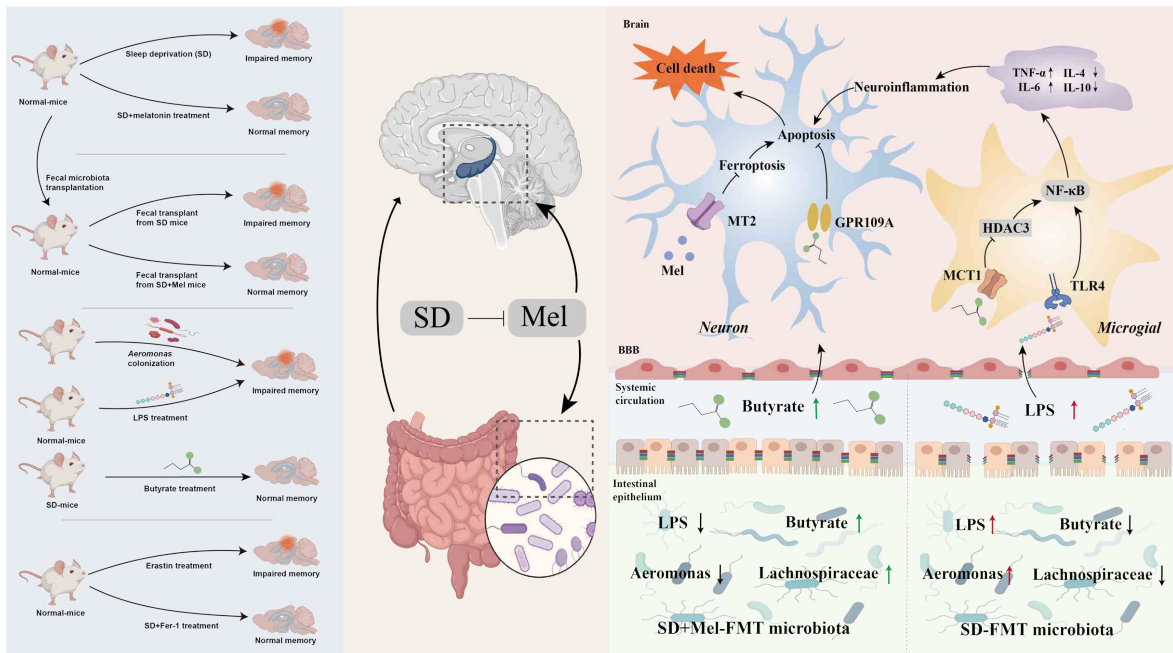


图 5-1 褪黑激素改善急性睡眠剥夺诱导小鼠认知障碍的作用机制图

Fig. 5-1 The mechanism of melatonin improving cognitive impairment induced by acute sleep deprivation in mice.

综上，急性 SD 通过引起海马神经元铁死亡和凋亡的发生，导致神经元丢失最终引起小鼠认知损伤，而外源性 Mel 补充能改善这一损伤。首先 Mel 可直接与神经元 MT2 受体结合激活 ERK/NRF2 信号通路而改善铁死亡的发生，其次 Mel 可通过重塑肠道菌群稳态，下调结肠气单胞菌 *Aeromonas* 及其代谢物 LPS 含量并上调毛螺菌 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸含量，Mel 通过介导丁酸，一方面通过与小胶质细胞上 MCT1 转运体结合抑制 HDAC3/NF-κB 信号通路削弱神经炎症反应，另一方面通过与神经元上 GPR109A 受体结合激活 PI3K/AKT 信号通路抑制凋亡的发生，最终改善急性 SD 诱导的小鼠认知障碍。

第六章 结论与创新点

（一）结论

1. 成功建立急性 SD 及外源性 Mel 干预的小鼠模型，急性 SD 通过抑制松果体 Mel 的合成引起小鼠空间参考记忆和空间工作记忆的损伤及焦虑样行为，而外源性 Mel 的补充可改善急性 SD 小鼠的认知功能障碍。

2. 急性 SD 通过引起海马神经元铁稳态和脂质稳态的失衡导致神经元铁死亡的发生，外源性 Mel 的添加直接通过与膜受体 MT2 结合激活 ERK/NRF2 信号通路改善急性 SD 诱导的神经元铁死亡和小鼠认知功能障碍。

3. 肠道菌群介导急性 SD 诱导的小鼠认知功能障碍，而外源性 Mel 的补充通过重塑肠道菌群，改善神经炎症反应进而缓解神经元凋亡的发生，最终逆转小鼠认知功能的损伤。

4. 急性 SD 通过引起肠道菌群失调导致小胶质细胞过度活化和神经元凋亡的发生，最终引起小鼠认知功能损伤，而外源性 Mel 通过下调结肠内气单胞菌 *Aeromonas* 及其代谢物 LPS 水平，上调毛螺菌 *Lachnospiraceae_NK4A136* 及其代谢物丁酸水平，一方面抑制小胶质细胞的活化，改善神经炎症和凋亡的发生，另一方面直接作用神经元改善凋亡的发生，最终缓解急性 SD 诱导的小鼠认知功能损伤。

5. 急性 SD 通过调控神经元铁死亡和凋亡的发生进而导致小鼠认知功能障碍，其中铁死亡促进了凋亡的发生，而外源性 Mel 能抑制铁死亡和凋亡的发生缓解神经元的丢失。

（二）创新点

1. 发现 Mel 改善急性 SD 诱导的神经元丢失的机制-铁死亡。

2. 发现丁酸可分别作用于神经元或小胶质细胞，最终改善急性 SD 诱导的神经元凋亡的发生。

3. 发现 Mel 能够分别通过受体介导的直接途径和肠脑轴介导的间接途径改善急性 SD 诱导的小鼠认知损伤。

参考文献

- [1] 陆林. 保证良好睡眠, 预防阿尔茨海默病[J]. 科学新闻. 2020, (05):93-94.
- [2] 李冰霜. 母猪限位栏的优缺点[J]. 现代畜牧科技, 2019, (12):33-35.
- [3] 马丛丛, 王梓平, 许继取. 褪黑素改善认知作用研究进展[J]. 中国食物与营养. 2021, 27(2):32-36.
- [4] 马骁, 马慧, 李锡智, 张鲁, 刘国世. 生物钟对哺乳动物生理代谢、繁殖和肠道菌群影响的研究进展[J]. 中国畜牧杂志. 2020, 56(01):1-6.
- [5] 彭云丽. 慢性应激诱发抑郁行为的炎性机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [6] 孙忠超, 贾幼陵. 论动物福利科学[J]. 动物医学进展. 2014, 35(12):153-157.
- [7] 师铭咸. 规模化猪场限位饲养致妊娠母猪慢性应激调查及褪黑素疗效观察[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- [8] 杨悦, 郭泽明, 韩昊书, 李伟天, 高婷, 王心彤, 陈耀星. 急性睡眠剥夺对小鼠血浆褪黑激素水平和下丘脑钟基因表达的影响[J]. 畜牧兽医学报. 2020, 51(10):2609-2612.
- [9] 张影. 保护动物福利培育优质肉牛[J]. 中国畜禽种业. 2013, 9(09):18.
- [10] Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions[J]. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:2997-3025.
- [11] Adler DH, Wisse LEM, Ittyerah R, Pluta JB, Ding SL, Xie L, Wang J, Kadivar S, Robinson JL, Schuck T, Trojanowski JQ, Grossman M, Detre JA, Elliott MA, Toledo JB, Liu W, Pickup S, Miller MI, Das SR, Wolk DA, Yushkevich PA. Characterizing the human hippocampus in aging and Alzheimer's disease using a computational atlas derived from ex vivo MRI and histology[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115:4252-4257.
- [12] Adrien J. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression[J]. *Sleep Med Rev*. 2002;6:341-351.
- [13] Aggleton JP, Blindt HS, Rawlins JN. Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats[J]. *Behav Neurosci*. 1989;103:962-974.
- [14] Agirman G, Hsiao EY. SnapShot: The microbiota-gut-brain axis[J]. *Cell*. 2021;184:e2521.
- [15] Agirman G, Yu KB, Hsiao EY. Signaling inflammation across the gut-brain axis[J]. *Science*. 2021;374:1087-1092.
- [16] Aldskogius H. Microglia in neuroregeneration[J]. *Microsc Res Tech*. 2001;54:40-46.
- [17] Ali T, Badshah H, Kim TH, Kim MO. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- κ B-K/JNK signaling

- pathway in aging mouse model[J]. *J Pineal Res.* 2015;58:71-85.
- [18] Alkadhi KA. Cellular and molecular differences between area CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus[J]. *Mol Neurobiol.* 2019;56:6566-6580.
- [19] Alotaibi AD, Alosaimi FM, Alajlan AA, Bin Abdulrahman KA. The relationship between sleep quality, stress, and academic performance among medical students[J]. *J Family Community Med.* 2020;27:23-28.
- [20] Alzoubi KH, Mayyas FA, Khabour OF, Bani Salama FM, Alhashimi FH, Mhaidat NM. Chronic melatonin treatment prevents memory impairment induced by chronic sleep deprivation[J]. *Mol Neurobiol.* 2016;53:3439-3447.
- [21] Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. Autophagy in healthy aging and disease[J]. *Nat Aging.* 2021;1:634-650.
- [22] Angeli JPF, Conrad M. Selenium and GPX4, a vital symbiosis[J]. *Free Radic Biol Med.* 2018;127:153-159.
- [23] Angeli JPF, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Radmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Foerster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O'Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. *Nat Cell Biol.* 2014;16:1180-91.
- [24] Asok A, Leroy F, Rayman JB, Kandel ER. Molecular mechanisms of the memory trace[J]. *Trends Neurosci.* 2019;42:14-22.
- [25] Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal[J]. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
- [26] Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:15718-15723.
- [27] Baglioni C, Battagliese G, Feige B, Spiegelhalter K, Nissen C, Voderholzer U, Lombardo C, Riemann D. Insomnia as a predictor of depression: a meta-analytic evaluation of longitudinal epidemiological studies[J]. *J Affect Disord.* 2011;135:10-19.
- [28] Bai Y, Meng L, Han L, Jia Y, Zhao Y, Gao H, Kang R, Wang X, Tang D, Dai E. Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;508:997-1003.
- [29] Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat[J]. *J Comp Physiol Psychol.* 1979;93:74-104.

- [30] Bartels T, De Schepper S, Hong S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. *Science*. 2020;370:66-69.
- [31] Basheer R, Strecker RE, Thakkar MM, McCarley RW. Adenosine and sleep-wake regulation[J]. *Prog Neurobiol*. 2004;73:379-396.
- [32] Beersma DG. Models of human sleep regulation[J]. *Sleep Med Rev*. 1998;2:31-43.
- [33] Belaidi AA, Bush AI. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics[J]. *J Neurochem*. 2016;139:179-197.
- [34] Benoit O, Foret J, Merle B, Reinberg A. Circadian rhythms (temperature, heart rate, vigilance, mood) of short and long sleepers: effects of sleep deprivation[J]. *Chronobiologia*. 1981;8:341-350.
- [35] Besedovsky L, Lange T, Haack M. The sleep-immune crosstalk in health and disease[J]. *Physiol Rev*. 2019;99:1325-1380.
- [36] Bhardwaj SK, Quirion R, Srivastava LK. Post-pubertal adrenergic changes in rats with neonatal lesions of the ventral hippocampus[J]. *Neuropharmacology*. 2004;46:85-94.
- [37] Bishayi B, Adhikary R, Nandi A, Sultana S. Beneficial effects of exogenous melatonin in acute staphylococcus aureus and escherichia coli infection-induced inflammation and associated behavioral response in mice after exposure to short photoperiod[J]. *Inflammation*. 2016;39:2072-2093.
- [38] Boivin DB, Boudreau P. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms[J]. *Pathol Biol (Paris)*. 2014;62:292-301.
- [39] Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, Stollman N, Rohlke F, Surawicz C. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. *Am J Gastroenterol*. 2012;107:1079-1087.
- [40] Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS[J]. *Br J Pharmacol*. 2012;165:20-34.
- [41] Brown ML. Integrative approaches to stress, anxiety, and resilience[J]. *Pediatr Ann*. 2019;48:e226-e230.
- [42] Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development[J]. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22:73-86.
- [43] Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research[J]. *Psychiatry Res*. 1989;28:193-213.
- [44] Calvo JR, González-Yanes C, Maldonado MD. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review[J]. *J Pineal Res*. 2013;55:103-120.
- [45] Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test[J]. *J Vis*

- Exp. 2012;28:e3769.
- [46] Cao N, Liao T, Liu J, Fan Z, Zeng Q, Zhou J, Pei H, Xi J, He L, Chen L, Nan X, Jia Y, Yue W, Pei X. Clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reverse cognitive aging via improving synaptic plasticity and endogenous neurogenesis[J]. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2996.
- [47] Cao Y, Li Q, Liu L, Wu H, Huang F, Wang C, Lan Y, Zheng F, Xing F, Zhou Q, Li Q, Shi H, Zhang B, Wang Z, Wu X. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation[J]. *Br J Pharmacol.* 2019;176:1282-1297.
- [48] Cardoso BR, Hare DJ, Bush AI, Roberts BR. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? [J]. *Mol Psychiatry.* 2017;22:328-335.
- [49] Carloni S, Bertocchi A, Mancinelli S, Bellini M, Erreni M, Borreca A, Braga D, Giugliano S, Mozzarelli AM, Manganaro D, Fernandez Perez D, Colombo F, Di Sabatino A, Pasini D, Penna G, Matteoli M, Lodato S, Rescigno M. Identification of a choroid plexus vascular barrier closing during intestinal inflammation[J]. *Science.* 2021;374:439-448.
- [50] Caruso CC. Negative impacts of shiftwork and long work hours[J]. *Rehabil Nurs.* 2014;39:16-25.
- [51] Chauhan AK, Mallick BN. Association between autophagy and rapid eye movement sleep loss-associated neurodegenerative and patho-physio-behavioral changes[J]. *Sleep Med.* 2019;63:29-37.
- [52] Chauhan P, Jethwa K, Rathawa A, Chauhan G, Mehra S. The anatomy of the hippocampus. In *Cerebral Ischemia*, R Pluta, ed.(Brisbane AU): Publications.
- [53] Chen L, Wei X, Liu C, Li C, Zhou Z. Brain iron deposition in primary insomnia-An in vivo susceptibility-weighted imaging study[J]. *Brain Behav.* 2019;9:e01138.
- [54] Chen LD, Wu RH, Huang YZ, Chen MX, Zeng AM, Zhuo GF, Xu FS, Liao R, Lin QC. The role of ferroptosis in chronic intermittent hypoxia-induced liver injury in rats[J]. *Sleep Breath.* 2020;24:1767-1773.
- [55] Chern CM, Liao JF, Wang YH, Shen YC. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice[J]. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:1634-1647.
- [56] Chiu HY, Chen PY, Chuang LP, Chen NH, Tu YK, Hsieh YJ, Wang YC, Guilleminault C. Diagnostic accuracy of the berlin questionnaire, stop-bang, stop, and epworth sleepiness scale in detecting obstructive sleep apnea: A bivariate meta-analysis[J]. *Sleep Med Rev.* 2017;36:57-70.
- [57] Chu C, Murdock MH, Jing D, Won TH, Chung H, Kressel AM, Tsaava T, Addorisio ME, Putzel GG, Zhou L, Bessman NJ, Yang R, Moriyama S, Parkhurst CN, Li A, Meyer HC, Teng F, Chavan SS, Tracey KJ, Regev A, Schroeder FC, Lee FS, Liston C, Artis D. The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning[J]. *Nature.* 2019;574:543-548.
- [58] Cirelli C, Tononi G. Is sleep essential? [J]. *PLoS Biol.* 2008;6:e216.

- [59] Clark I, Landolt HP. Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials[J]. *Sleep Med Rev.* 2017;31:70-78.
- [60] Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*[J]. 2015;61:77-84.
- [61] Colakoglu M, Tuncer S, Banerjee S. Emerging cellular functions of the lipid metabolizing enzyme 15-Lipoxygenase-1[J]. *Cell Prolif.* 2018;51:14.
- [62] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. In *Annual Review of Immunology*, Vol 35, DR Littman, and WM Yokoyama, eds., pp. 2017:441-468.
- [63] Combertaldi SL, Rasch B. Healthy sleepers can worsen their sleep by wanting to do so: The effects of intention on objective and subjective sleep parameters[J]. *Nat Sci Sleep.* 2020;12:981-997.
- [64] Conrad M, Angeli JPF, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15:348-366.
- [65] Conrad M, Kagan VE, Bayir H, Pagnussat GC, Head B, Traber MG, Stockwell BR. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species[J]. *Genes Dev.* 2018;32:602-619.
- [66] Covassin N, Singh P. Sleep duration and cardiovascular disease risk: Epidemiologic and experimental evidence[J]. *Sleep Med Clin.* 2016;11:81-89.
- [67] Crotti A, Glass CK. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease[J]. *Trends Immunol.* 2015;36:364-373.
- [68] Cryan JF, O'Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V, Dinan TG. The gut microbiome in neurological disorders[J]. *Lancet Neurol.* 2020;19:179-194.
- [69] Culpepper L, Lam RW, McIntyre RS. Cognitive impairment in patients with depression: awareness, assessment, and management[J]. *J Clin Psychiatry.* 2017;78:1383-1394.
- [70] D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats[J]. *Neurosci Lett.* 1997;235:25-28.
- [71] D'Amato A, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Man AL, Le Gall G, Branca JJV, Ghelardini C, Amedei A, Bertelli E, Regoli M, Pacini A, Luciani G, Gallina P, Altera A, Narbad A, Gulisano M, Hoyles L, Vauzour D, Nicoletti C. Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity-and neurotransmission-related proteins in young recipients[J]. *Microbiome.* 2020;8:140.
- [72] Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:461-478.
- [73] Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent[J]. *Nat Protoc.* 2006;1:7-12.
- [74] DeGregorio-Rocasolano N, Marti-Sistac O, Gasull T. Deciphering the iron side of stroke:

- Neurodegeneration at the crossroads between iron dyshomeostasis, excitotoxicity, and ferroptosis[J]. *Front Neurosci.* 2019;13:17.
- [75] Dicker AJ, Huang JTJ, Lonergan M, Keir HR, Fong CJ, Tan B, Cassidy AJ, Finch S, Mullerova H, Miller BE, Tal-Singer R, Chalmers JD. The sputum microbiome, airway inflammation, and mortality in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147:158-167.
- [76] Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep[J]. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:114-126.
- [77] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell.* 2012;149:1060-1072.
- [78] Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death[J]. *Nat Chem Biol.* 2014;10:9-17.
- [79] Dodiya HB, Lutz HL, Weigle IQ, Patel P, Michalkiewicz J, Roman-Santiago CJ, Zhang CM, Liang Y, Srinath A, Zhang X, Xia J, Olszewski M, Zhang X, Schipma MJ, Chang EB, Tanzi RE, Gilbert JA, Sisodia SS. Gut microbiota-driven brain A β amyloidosis in mice requires microglia[J]. *J Exp Med.* 2022;219:e20200895.
- [80] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol.* 2019;23:101107.
- [81] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, IngoId I, Irmeler M, Beckers J, Aichler M, Walch A, Prokisch H, Trumbach D, Mao G, Qu F, Bayir H, Fullekrug J, Scheel CH, Wurst W, Schick JA, Kagan VE, Angeli JPF, Conrad M. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol.* 2017;13:91-98.
- [82] Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells[J]. *Cancer Cell.* 2003;3:285-296.
- [83] Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, Yin Q. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator[J]. *Mol Neurobiol.* 2016;53:1637-1647.
- [84] Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals[J]. *Endocrine.* 2005;27:101-110.
- [85] Dudai Y, Karni A, Born J. The consolidation and transformation of memory[J]. *Neuron.* 2015;88:20-32.
- [86] Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor form xenopus dermal melanophores[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:6133-6137.
- [87] Edéll-Gustafsson U, Svanborg E, Swahn E. A gender perspective on sleeplessness behavior, effects of sleep loss, and coping resources in patients with stable coronary artery disease[J]. *Heart Lung.*

- 2006;35:75-89.
- [88] Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes[J]. *Behav Brain Res.* 2001;127:199-207.
- [89] Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis[J]. *Surgery.* 1958;44:854-859.
- [90] Erfanizadeh M, Noorafshan A, Namavar MR, Karbalay-Doust S, Talaei-Khozani T. Curcumin prevents neuronal loss and structural changes in the superior cervical (sympathetic) ganglion induced by chronic sleep deprivation in the rat model[J]. *Biol Res.* 2020;53:31.
- [91] Erny D, Hrabé de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mahlakoiv T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermohlen O, Chun E, Garrett WS, McCoy KD, Diefenbach A, Staeheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS[J]. *Nat Neurosci.* 2015;18:965-977.
- [92] Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system[J]. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8:228-242.
- [93] Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? [J]. *Neuron.* 2010;65:7-19.
- [94] Feng H, Stockwell BR. Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? [J]. *Plos Biol.* 2018;16:e2006203.
- [95] Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus[J]. *Prog Neurobiol.* 2014;117:20-40.
- [96] Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis[J]. *Proteomics.* 2019;19:e1800311.
- [97] Frost JL, Schafer DP. Microglia: Architects of the developing nervous system[J]. *Trends Cell Biol.* 2016;26:587-597.
- [98] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease[J]. *Cell.* 2011;147:742-758.
- [99] Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E[J]. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;959:275-284.
- [100] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866:118535.
- [101] Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases[J]. *Cell Death Differ.* 2021;28:2029-2044.

- [102] Gao T, Wang Z, Dong Y, Cao J, Lin R, Wang X, Yu Z, Chen Y. Role of melatonin in sleep deprivation-induced intestinal barrier dysfunction in mice[J]. *J Pineal Res.* 2019;67:e12574.
- [103] Gasaly N, de Vos P, Hermoso MA. Impact of bacterial metabolites on gut barrier function and host immunity: A focus on bacterial metabolism and its relevance for intestinal inflammation[J]. *Front Immunol.* 2021;12:658354.
- [104] Gava G, Orsili I, Alvisi S, Mancini I, Seracchioli R, Meriggiola MC. Cognition, mood and sleep in menopausal transition: The role of menopause hormone therapy[J]. *Medicina (Kaunas).* 2019;55:688.
- [105] Geoffroy PA, Scott J, Boudebesse C, Lajnef M, Henry C, Leboyer M, Bellivier F, Etain B. Sleep in patients with remitted bipolar disorders: a meta-analysis of actigraphy studies[J]. *Acta Psychiatr Scand.* 2015;131:89-99.
- [106] Ghareghani M, Sadeghi H, Zibara K, Danaei N, Azari H, Ghanbari A. Melatonin increases oligodendrocyte differentiation in cultured neural stem cells[J]. *Cell Mol Neurobiol.* 2017;37:1319-1324.
- [107] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, Łos MJ. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. *Prog Neurobiol.* 2014;112:24-49.
- [108] Gross M, Pinhasov A. Chronic mild stress in submissive mice: Marked polydipsia and social avoidance without hedonic deficit in the sucrose preference test[J]. *Behav Brain Res.* 2016;298:25-34.
- [109] Guillodo E, Lemey C, Simonnet M, Walter M, Baca-García E, Masetti V, Moga S, Larsen M, Ropars J, Berrouguet S. Clinical applications of mobile health wearable-based sleep monitoring: Systematic review[J]. *JMIR Mhealth Uhealth.* 2020;8:e10733.
- [110] Gurunathan S, Kang M-H, Kim J-H. Role and therapeutic potential of melatonin in the central nervous system and cancers[J]. *Cancers.* 2020;12:1567.
- [111] Hairston IS, Ruby NF, Brooke S, Peyron C, Denning DP, Heller HC, Sapolsky RM. Sleep deprivation elevates plasma corticosterone levels in neonatal rats[J]. *Neurosci Lett.* 2001;315:29-32.
- [112] Hale L, Guan S. Screen time and sleep among school-aged children and adolescents: a systematic literature review[J]. *Sleep Med Rev.* 2015;21:50-58.
- [113] Hall SJ, Ferguson SA, Turner AI, Robertson SJ, Vincent GE, Aisbett B. The effect of working on-call on stress physiology and sleep: A systematic review[J]. *Sleep Med Rev.* 2017;33:79-87.
- [114] Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, Galeas J, Dhruv HD, Berens ME, Schreiber SL, McCormick F, McManus MT. Drug-tolerant persister cancer cells are

- vulnerable to GPX4 inhibition[J]. *Nature*. 2017;551:247-250.
- [115] Hao SH, Liang BS, Huang Q, Dong SM, Wu ZZ, He WM, Shi M. Metabolic networks in ferroptosis[J]. *Oncol Lett*. 2018;15:5405-5411.
- [116] Hao Y, Ge H, Sun M, Gao Y. Selecting an appropriate animal model of depression[J]. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4827.
- [117] Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice[J]. *Nature*. 2006;441:885-889.
- [118] Hassannia B, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Targeting ferroptosis to iron out cancer[J]. *Cancer Cell*. 2019;35:830-849.
- [119] Hayakawa T, Ohta T. Polysomnography(PSG) [J]. *Nihon Rinsho*. 1997;55:383-385.
- [120] He F, Wu X, Zhang Q, Li Y, Ye Y, Li P, Chen S, Peng Y, Hardeland R, Xia Y. Bacteriostatic potential of melatonin: Therapeutic standing and mechanistic insights[J]. *Front Immunol*. 2021;12:683879.
- [121] Heredia-López FJ, Álvarez-Cervera FJ, Collí-Alfaro JG, Bata-García JL, Arankowsky-Sandoval G, Góngora-Alfaro JL. An automated Y-maze based on a reduced instruction set computer (RISC) microcontroller for the assessment of continuous spontaneous alternation in rats[J]. *Behav Res Methods*. 2016;48:1631-1643.
- [122] Heward CB, Hadley ME. Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines[J]. *Life Sci*. 1975;17:1167-1177.
- [123] Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future[J]. *Br J Pharmacol*. 2006;147:S27-37.
- [124] Hirata Y, Iwasaki T, Makimura Y, Okajima S, Oh-hashii K, Takemori H. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase prevents oxytosis and ferroptosis in mouse hippocampal HT22 cells[J]. *Toxicology*. 2019;418:1-10.
- [125] Hirayama T, Miki A, Nagasawa H. Organelle-specific analysis of labile Fe (II) during ferroptosis by using a cocktail of various colour organelle-targeted fluorescent probes[J]. *Metallomics*. 2019;11:111-117.
- [126] Hossain MF, Wang N, Chen R, Li S, Roy J, Uddin MG, Li Z, Lim LW, Song YQ. Exploring the multifunctional role of melatonin in regulating autophagy and sleep to mitigate Alzheimer's disease neuropathology[J]. *Ageing Res Rev*. 2021;67:101304.
- [127] Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury[J]. *Adv Physiol Educ*. 2002;26:238-255.
- [128] Hummer DL, Lee TM. Daily timing of the adolescent sleep phase: Insights from a cross-species comparison[J]. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;70:171-181.

- [129] Jameson KG, Olson CA, Kazmi SA, Hsiao EY. Toward understanding microbiome-neuronal signaling[J]. *Mol Cell*. 2020;78:577-583.
- [130] Jiang T, Cheng H, Su JJ, Wang XC, Wang QX, Chu J, Li QL. Gastrodin protects against glutamate-induced ferroptosis in HT-22 cells through NRF2/HO-1 signaling pathway[J]. *Toxicol In Vitro*. 2020;62:104715.
- [131] Jilg A, Bechstein P, Saade A, Dick M, Li TX, Tosini G, Rami A, Zemmar A, Stehle JH. Melatonin modulates daytime-dependent synaptic plasticity and learning efficiency[J]. *J Pineal Res*. 2019;66:e12553.
- [132] Jin XW, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR. Targeted disruption of the mouse Mel (1b) melatonin receptor[J]. *Mol Cell Biol*. 2003;23:1054-1060.
- [133] Jing Y, Yu Y, Bai F, Wang L, Yang D, Zhang C, Qin C, Yang M, Zhang D, Zhu Y, Li J, Chen Z. Effect of fecal microbiota transplantation on neurological restoration in a spinal cord injury mouse model: involvement of brain-gut axis[J]. *Microbiome*. 2021;9:59.
- [134] Jordan JT. The rodent hippocampus as a bilateral structure: A review of hemispheric lateralization[J]. *Hippocampus*. 2020;30:278-292.
- [135] Kagan VE, Mao GW, Qu F, Angeli JPF, Doll S, St Croix C, Dar HH, Liu B, Tyurin VA, Ritov VB, Kapralov AA, Amoscato AA, Jiang J, Anthony-muthu T, Mohammadyani D, Yang Q, Proneth B, Klein-Seetharaman J, Watkins S, Bahar H, Greenberger J, Mallampalli RK, Stockwell BR, Tyurina YY, Conrad M, Bayir H. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*. 2017;13:81-90.
- [136] Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes[J]. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1037-1046.
- [137] Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia[J]. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862:915-925.
- [138] Karussis D, Leker RR, Abramsky O. Cognitive dysfunction following thalamic stroke: a study of 16 cases and review of the literature[J]. *J Neurol Sci*. 2000;172:25-29.
- [139] Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021;125:73-120.
- [140] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
- [141] Kervezee L, Kosmadopoulos A, Boivin DB. Metabolic and cardiovascular consequences of shift work: The role of circadian disruption and sleep disturbances[J]. *Eur J Neurosci*. 2020;51:396-412.
- [142] Kim J, Lee Y, Kim B, Kim S, Kim D, Jo K-i, Lee S, Lee K, Baik H. Melatonin improves inflammatory cytokine profiles in lung inflammation associated with sleep deprivation[J]. *Mol*

- Med Rep. 2012;5:1281-1284.
- [143] Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free fatty acid receptors in health and disease[J]. *Physiol Rev.* 2020;100:171-210.
- [144] Klinzing JG, Niethard N, Born J. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep[J]. *Nat Neurosci.* 2019;22:1598-1610.
- [145] Klosen P, Lapmanee S, Schuster C, Guardiola B, Hicks D, Pevet P, Felder-Schmittbuhl MP. MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations[J]. *J Pineal Res.* 2019;67:e12575.
- [146] Knutson MD. Non-transferrin-bound iron transporters[J]. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:101-111.
- [147] Ko LW, Su CH, Yang MH, Liu SY, Su TP. A pilot study on essential oil aroma stimulation for enhancing slow-wave EEG in sleeping brain[J]. *Sci Rep.* 2021;11:1078.
- [148] Kontodimopoulos N, Stamatopoulou E, Kletsas G, Kandili A. Disease activity and sleep quality in rheumatoid arthritis: a deeper look into the relationship[J]. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2020;20:595-602.
- [149] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior[J]. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:99-103.
- [150] Kuch EM, Vellaramkalayil R, Zhang I, Lehnen D, Brugger B, Stremmel W, Eehalt R, Poppelreuther M, Fullekrug J. Differentially localized acyl-CoA synthetase 4 isoenzymes mediate the metabolic channeling of fatty acids towards phosphatidylinositol[J]. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841:227-239.
- [151] Kullmann DM. Interneuron networks in the hippocampus[J]. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;21:709-716.
- [152] Kumar V, Grbach VX, Castriotta RJ. Resolution of sexsomnia with paroxetine[J]. *J Clin Sleep Med.* 2020;16:1213-1214.
- [153] Larsen BD, Sørensen CS. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond[J]. *Febs J.* 2017;284:1160-1170.
- [154] Lee B-C, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance[J]. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842:446-462.
- [155] Lee J, d'Aigle J, Atadja L, Quaiocoe V, Honarpisheh P, Ganesh BP, Hassan A, Graf J, Petrosino J, Putluri N, Zhu L, Durgan DJ, Bryan RM, Jr., McCullough LD, Venna VR. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids promote poststroke recovery in aged mice[J]. *Circ Res.* 2020;127:453-465.
- [156] Leonard BE. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? [J]. *Acta Neuropsychiatr.* 2018;30:1-16.
- [157] Li G, Jia Z, Cao Y, Wang Y, Li H, Zhang Z, Bi J, Lv G, Fan Z. Mitochondrial division inhibitor 1

- ameliorates mitochondrial injury, apoptosis, and motor dysfunction after acute spinal cord injury in rats[J]. *Neurochem Res.* 2015;40:1379-1392.
- [158] Li J, Cao F, Yin H-l, Huang Z-j, Lin Z-t, Mao N, Sun B, Wang G. Ferroptosis: past, present and future[J]. *Cell Death Dis.* 2020a;11:88.
- [159] Li J, Hong J, Zhou F, Tang S, Wu X. Regulatory mechanism of melatonin on the retinal ganglion cell photoreaction in mice[J]. *Exp Ther Med.* 2017a;14:1491-1495.
- [160] Li L, Bao J, Chang Y, Wang M, Chen B, Yan F. Gut microbiota may mediate the influence of periodontitis on prediabetes[J]. *J Dent Res.* 2021a;100:1387-1396.
- [161] Li Q, Han X, Lan X, Gao Y, Wan J, Durham F, Cheng T, Yang J, Wang Z, Jiang C, Ying M, Koehler RC, Stockwell BR, Wang J. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain[J]. *JCI Insight.* 2017b;2:e90777.
- [162] Li Y, Hao Y, Fan F, Zhang B. The role of microbiome in insomnia, circadian disturbance and depression[J]. *Front Psychiatry.* 2018;9:669.
- [163] Li Y, Liu T, Li Y, Han D, Hong J, Yang N, He J, Peng R, Mi X, Kuang C, Zhou Y, Han Y, Shi C, Li Z, Guo X. Baicalin ameliorates cognitive impairment and protects microglia from LPS-induced neuroinflammation via the SIRT1/HMGB1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev.* 2020b;2020:4751349.
- [164] Li Y, Zhang W, Liu M, Zhang Q, Lin Z, Jia M, Liu D, Lin L. Imbalance of autophagy and apoptosis induced by oxidative stress may be involved in thyroid damage caused by sleep deprivation in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev.* 2021b;2021:5645090.
- [165] Lien RJ, Hess JB, McKee SR, Bilgili SF, Townsend JC. Effect of light intensity and photoperiod on live performance, heterophil-to-lymphocyte ratio, and processing yields of broilers[J]. *Poult Sci.* 2017;86:1287-1293.
- [166] Lindroos OF. Short Nissl staining for incubated cryostat sections of the brain[J]. *Biotech Histochem.* 1991;66:208-209.
- [167] Liu C, Weaver DR, Jin XW, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock[J]. *Neuron.* 1997;19:91-102.
- [168] Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 melatonin receptors: A therapeutic perspective[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:361-83.
- [169] Liu Y, Gu W. p53 in ferroptosis regulation: the new weapon for the old guardian[J]. *Cell Death Differ.* 2022;29:895-910.
- [170] Liu Z, Hu M, Lu P, Wang H, Qi Q, Xu J, Xiao Y, Fan M, Jia Y, Zhang D. Cerebrolysin alleviates

- cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion by increasing the levels of plasticity-related proteins and decreasing the levels of apoptosis-related proteins in the rat hippocampus[J]. *Neurosci Lett.* 2017;651:72-78.
- [171] Lucey BP, McCullough A, Landsness EC, Toedebusch CD, McLeland JS, Zaza AM, Fagan AM, McCue L, Xiong C, Morris JC, Benzinger TLS, Holtzman DM. Reduced non-rapid eye movement sleep is associated with tau pathology in early Alzheimer's disease[J]. *Sci Transl Med.* 2019;11:eaau6550.
- [172] Luengo E, Buendia I, Fernandez-Mendivil C, Trigo-Alonso P, Negredo P, Michalska P, Hernandez-Garcia B, Sanchez-Ramos C, Bernal JA, Ikezu T, Leon R, Lopez MG. Pharmacological doses of melatonin impede cognitive decline in tau-related Alzheimer models, once tauopathy is initiated, by restoring the autophagic flux[J]. *J Pineal Res.* 2019;67:e12578.
- [173] Luo G, Wang X, Cui Y, Cao Y, Zhao Z, Zhang J. Metabolic reprogramming mediates hippocampal microglial M1 polarization in response to surgical trauma causing perioperative neurocognitive disorders[J]. *J Neuroinflammation.* 2021;18:267.
- [174] Ma K, Li R, Zhao H, Qu J, Mu N, Liu X, Wang S, Yang C, Feng H, Tan L, Li F. Cattle encephalon glycoside and igitin reduce early brain injury and cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Neuroscience.* 2018;388:181-190.
- [175] Madhu LN, Kodali M, Attaluri S, Shuai B, Melissari L, Rao X, Shetty AK. Melatonin improves brain function in a model of chronic Gulf War Illness with modulation of oxidative stress, NLRP3 inflammasomes, and BDNF-ERK-CREB pathway in the hippocampus[J]. *Redox Biol.* 2021;43:101973.
- [176] Magnusson MK, Isaksson S, Öhman L. The anti-inflammatory immune regulation induced by butyrate is impaired in inflamed intestinal mucosa from patients with ulcerative colitis[J]. *Inflammation.* 2020;43:507-517.
- [177] Magtanong L, Ko PJ, Dixon SJ. Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death[J]. *Cell Death Differ.* 2016;23:1099-1109.
- [178] Majdi A, Mahmoudi J, Sadigh-Eteghad S, Golzari SE, Sabermarouf B, Reyhani-Rad S. Permissive role of cytosolic pH acidification in neurodegeneration: A closer look at its causes and consequences[J]. *J Neurosci Res.* 2016;94:879-887.
- [179] Manchanda S, Singh H, Kaur T, Kaur G. Low-grade neuroinflammation due to chronic sleep deprivation results in anxiety and learning and memory impairments[J]. *Mol Cell Biochem.* 2018;449:63-72.
- [180] Mander BA, Winer JR, Walker MP. Sleep and human aging[J]. *Neuron.* 2017;94:19-36.
- [181] Masaldan S, Bush AI, Devos D, Rolland AS, Moreau C. Striking while the iron is hot: Iron

- metabolism and ferroptosis in neurodegeneration[J]. *Free Radic Biol Med*. 2019;133:221-233.
- [182] Matijašić M, Meštrović T, Perić M, Čipčić Paljetak H, Panek M, Vranešić Bender D, Ljubas Kelečić D, Krznarić Ž, Verbanac D. Modulating composition and metabolic activity of the gut microbiota in IBD patients[J]. *Int J Mol Sci*. 2016;17:578.
- [183] Mattis J, Sehgal A. Circadian rhythms, sleep, and disorders of aging[J]. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27:192-203.
- [184] Mayer EA, Nance K, Chen S. The gut-brain axis[J]. *Annu Rev Med*. 2022;73:439-453.
- [185] McCarthy RC, Kosman DJ. Iron transport across the blood-brain barrier: development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy[J]. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:709-727.
- [186] McKernan DP, Dinan TG, Cryan JF. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? [J]. *Prog Neurobiol*. 2009;88:246-263.
- [187] Meng X, Li Y, Li S, Zhou Y, Gan RY, Xu DP, Li HB. Dietary sources and bioactivities of melatonin[J]. *Nutrients*. 2017;9:367.
- [188] Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, Licitra F, Lopez Ramirez A, Pavel M, Puri C, Renna M, Ricketts T, Schlotawa L, Vicinanza M, Won H, Zhu Y, Skidmore J, Rubinsztein DC. Autophagy and neurodegeneration: Pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Neuron*. 2017;93:1015-1034.
- [189] Mills S, Stanton C, Lane JA, Smith GJ, Ross RP. Precision nutrition and the microbiome, Part I: current state of the science[J]. *Nutrients*. 2019;11:923.
- [190] Misrani A, Tabassum S, Chen X, Tan SY, Wang JC, Yang L, Long C. Differential effects of citalopram on sleep-deprivation-induced depressive-like behavior and memory impairments in mice[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;88:102-111.
- [191] Möller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, Lo JC, Santhi N, von Schantz M, Smith CP, Dijk DJ. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E1132-1141.
- [192] Moosmann B, Behl C. Selenoproteins, cholesterol-lowering drugs, and the consequences - Revisiting of the mevalonate pathway[J]. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:273-281.
- [193] Morais LH, Schreiber HLT, Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders[J]. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:241-255.
- [194] Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. *Nature*. 1982;297:681-683.
- [195] Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases[J]. *Cell Death Differ*. 2021;28:2029-2044.

- [196] Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters[J]. *Trends Mol Med*. 2015;21:109-117.
- [197] Muhammad T, Ali T, Ikram M, Khan A, Alam SI, Kim MO. Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/ neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2019;14:278-294.
- [198] Muller PA, Schneeberger M, Matheis F, Wang P, Kerner Z, Ilanges A, Pellegrino K, Del Marmol J, Castro TBR, Furuichi M, Perkins M, Han W, Rao A, Pickard AJ, Cross JR, Honda K, de Araujo I, Mucida D. Microbiota modulate sympathetic neurons via a gut-brain circuit[J]. *Nature*. 2020;583:441-446.
- [199] Nedeltcheva AV, Scheer FA. Metabolic effects of sleep disruption, links to obesity and diabetes[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21:293-298.
- [200] Needham BD, Adame MD, Serena G, Rose DR, Preston GM, Conrad MC, Campbell AS, Donabedian DH, Fasano A, Ashwood P, Mazmanian SK. Plasma and fecal metabolite profiles in autism spectrum disorder[J]. *Biol Psychiatry*. 2021;89:451-462.
- [201] Needham BD, Kaddurah-Daouk R, Mazmanian SK. Gut microbial molecules in behavioural and neurodegenerative conditions[J]. *Nat Rev Neurosci*. 2020;21:717-731.
- [202] Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo[J]. *Science*. 2005;308:1314-1318.
- [203] Ogata K, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus[J]. *Neuroscience*. 2002;113:221-233.
- [204] Ohayon MM, Carskadon MA, Guilleminault C, Vitiello MV. Meta-analysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: developing normative sleep values across the human lifespan[J]. *Sleep*. 2004;27:1255-1273.
- [205] Ooijevaar RE, Terveer EM, Verspaget HW, Kuijper EJ, Keller JJ. Clinical application and potential of fecal microbiota transplantation[J]. *Annu Rev Med*. 2019;70:335-351.
- [206] Ou Y, Wang S-J, Li D, Chu B, Gu W. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E6806-E6812.
- [207] Panagiotou M, Michel S, Meijer JH, Deboer T. The aging brain: sleep, the circadian clock and exercise[J]. *Biochem Pharmacol*. 2021;191:114563.
- [208] Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways[J]. *Prog Neurobiol*. 2008;85:335-353.
- [209] Pang CC, Kiecker C, O'Brien JT, Noble W, Chang RC. Ammon's Horn 2 (CA2) of the hippocampus: A long-known region with a new potential role in neurodegeneration[J]. *Neuroscientist*.

- 2019;25:167-180.
- [210] Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. *Front Immunol.* 2019;10:277.
- [211] Park YS, Chung SH, Lee SK, Kim J, Kim JB, Kim TK, Kim DS, Baik HW. Melatonin improves experimental colitis with sleep deprivation[J]. *Int J Mol Med.* 2015;35:979-986.
- [212] Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents[J]. *Behav Brain Res.* 2009;203:151-164.
- [213] Peng W, Wu Z, Song K, Zhang S, Li Y, Xu M. Regulation of sleep homeostasis mediator adenosine by basal forebrain glutamatergic neurons[J]. *Science.* 2020;369:eabb0556.
- [214] Pires GN, Bezerra AG, Tufik S, Andersen ML. Effects of acute sleep deprivation on state anxiety levels: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sleep Med.* 2016;24:109-118.
- [215] Poulouse SM, Miller MG, Scott T, Shukitt-Hale B. Nutritional factors affecting adult neurogenesis and cognitive function[J]. *Adv Nutr.* 2017;8:804-811.
- [216] Price RB, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model[J]. *Mol Psychiatry.* 2020;25:530-543.
- [217] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review[J]. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:3-33.
- [218] Rajpurohit N, Aryal SR, Khan MA, Stys AT, Stys TP. Propafenone associated severe central nervous system and cardiovascular toxicity due to mirtazapine: a case of severe drug interaction[J]. *S D Med.* 2014;67:137-139.
- [219] Raven F, Heckman PRA, Havekes R, Meerlo P. Sleep deprivation-induced impairment of memory consolidation is not mediated by glucocorticoid stress hormones[J]. *J Sleep Res.* 2019:e12972.
- [220] Reddy YCJ, Arumugham SS, Balachander S. Cognitive-behavioral and related therapies for obsessive-compulsive and related disorders[J]. *Curr Opin Psychiatry.* 2021;34:467-476.
- [221] Rehman SU, Ikram M, Ullah N, Alam SI, Park HY, Badshah H, Choe K, Kim MO. Neurological enhancement effects of melatonin against brain injury-induced oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration via AMPK/CREB signaling[J]. *Cells.* 2019;8:760.
- [222] Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Cruz MH. Delivery of pineal melatonin to the brain and SCN: role of canaliculi, cerebrospinal fluid, tanycytes and Virchow-Robin perivascular spaces[J]. *Brain Struct Funct.* 2014;219:1873-1887.
- [223] Rogier R, Koenders MI, Abdollahi-Roodsaz S. Toll-like receptor mediated modulation of T cell response by commensal intestinal microbiota as a trigger for autoimmune arthritis[J]. *J Immunol*

- Res. 2015;2015:527696.
- [224] Rose CR, Felix L, Zeug A, Dietrich D, Reiner A, Henneberger C. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus[J]. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:451.
- [225] Rui T, Wang H, Li Q, Cheng Y, Gao Y, Fang X, Ma X, Chen G, Gao C, Gu Z, Song S, Zhang J, Wang C, Wang Z, Wang T, Zhang M, Min J, Chen X, Tao L, Wang F, Luo C. Deletion of ferritin H in neurons counteracts the protective effect of melatonin against traumatic brain injury-induced ferroptosis[J]. *J Pineal Res.* 2021;70:e12704.
- [226] Sabia S, Fayosse A, Dumurgier J, van Hees VT, Paquet C, Sommerlad A, Kivimäki M, Dugravot A, Singh-Manoux A. Association of sleep duration in middle and old age with incidence of dementia[J]. *Nat Commun.* 2021;12:2289.
- [227] Sachdev PS, Blacker D, Blazer DG, Ganguli M, Jeste DV, Paulsen JS, Petersen RC. Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach[J]. *Nat Rev Neurol.* 2014;10:634-642.
- [228] Sampson TR, Mazmanian SK. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome[J]. *Cell Host Microbe.* 2015;17:565-576.
- [229] Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schäfer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Am J Pathol.* 2004;164:1495-1502.
- [230] Schwan-Lardner K, Vermette C, Leis M, Classen HL. Basing turkey lighting programs on broiler research: A good idea? a comparison of 18 daylength effects on broiler and turkey Welfare[J]. *Animals (Basel).* 2016;6:27.
- [231] Scholes S, Santisteban JA, Zhang Y, Bertone A, Gruber R. Modulation of slow-wave sleep: Implications for psychiatry[J]. *Curr Psychiatry Rep.* 2020;22:52.
- [232] Schroeder FA, Lin CL, Crusio WE, Akbarian S. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse[J]. *Biol Psychiatry.* 2007;62:55-64.
- [233] Schultheis H. Alignment in spatial memory: Encoding of reference frames or of relations? [J]. *Psychon Bull Rev.* 2021;28:249-258.
- [234] Schweichel JU, Merker HJ. Morphology of various types of cell death in prenatal tissues[J]. *Teratology.* 1973;7:253-266.
- [235] Seton C, Fitzgerald DA. Chronic sleep deprivation in teenagers: Practical ways to help[J]. *Paediatr Respir Rev.* 2021;40:73-79.
- [236] Sharma R, Sahota P, Thakkar MM. Sleep loss immediately after fear memory reactivation attenuates fear memory reconsolidation[J]. *Neuroscience.* 2020;428:70-75.
- [237] Silber MH, Ancoli-Israel S, Bonnet MH, Chokroverty S, Grigg-Damberger MM, Hirshkowitz M,

- Kapen S, Keenan SA, Kryger MH, Penzel T, Pressman MR, Iber C. The visual scoring of sleep in adults[J]. *J Clin Sleep Med*. 2007;3:121-131.
- [238] Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:25.
- [239] Simen AA, Bordner KA, Martin MP, Moy LA, Barry LC. Cognitive dysfunction with aging and the role of inflammation[J]. *Ther Adv Chronic Dis*. 2011;2:175-195.
- [240] Simitzi AM, Koros C, Stamelou M, Papadimitriou D, Leonardos A, Bougea A, Papagiannakis N, Pachi I, Angelopoulou E, Lourentzos K, Bonakis A, Stefanis L. REM sleep behavior disorder and other sleep abnormalities in p. A53T SNCA mutation carriers[J]. *Sleep*. 2021;44:zsaa248.
- [241] Skrbic Z, Pavlovski Z, Lukic M, Petricevic V. Incidence of footpad dermatitis and hock burns in broilers as affected by genotype, lighting program and litter type[J]. *Ann Anim Sci*. 2015;15:433-445.
- [242] Socodato R, Portugal CC, Canedo T, Rodrigues A, Almeida TO, Henriques JF, Vaz SH, Magalhães J, Silva CM, Baptista FI, Alves RL, Coelho-Santos V, Silva AP, Paes-de-Carvalho R, Magalhães A, Brakebusch C, Sebastião AM, Summavielle T, Ambrósio AF, Relvas JB. Microglia dysfunction caused by the loss of rhoa disrupts neuronal physiology and leads to neurodegeneration[J]. *Cell Rep*. 2020;31:107796.
- [243] Stefurak SJ, Stefurak ML, Mendelson WB, Gillin JC, Wyatt RJ. A method for sleep depriving rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*. 1977;6:137-139.
- [244] Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? [J]. *Neurochem Int*. 2016;99:110-132.
- [245] Su L, Zhang SZ, Zhu J, Wu J, Jiao YZ. Effect of partial and total sleep deprivation on serum testosterone in healthy males: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sleep Med*. 2021;88:267-273.
- [246] Sun Y, Zheng YF, Wang CX, Liu YZ. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells[J]. *Cell Death Dis*. 2018;9:15.
- [247] Taillard J, Sagaspe P, Philip P, Bioulac S. Sleep timing, chronotype and social jetlag: Impact on cognitive abilities and psychiatric disorders[J]. *Biochem Pharmacol*. 2021;191:114438.
- [248] Tang Y, Zhou J, Hooi SC, Jiang YM, Lu GD. Fatty acid activation in carcinogenesis and cancer development: Essential roles of long-chain acyl-CoA synthetases[J]. *Oncol Lett*. 2018;16:1390-1396.
- [249] Tatu L, Vuillier F. Structure and vascularization of the human hippocampus[J]. *Front Neurol Neurosci*. 2014;34:18-25.

- [250] Teixeira PJ, Carraça EV, Markland D, Silva MN, Ryan RM. Exercise, physical activity, and self-determination theory: a systematic review[J]. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2012;9:78.
- [251] Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule[J]. *J Pineal Res.* 2008;44:222-226.
- [252] Thornberry C, Cimadevilla JM, Commins S. Virtual morris water maze: opportunities and challenges[J]. *Rev Neurosci.* 2021;32:887-903.
- [253] Tobaldini E, Costantino G, Solbiati M, Cogliati C, Kara T, Nobili L, Montano N. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases[J]. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;74:321-329.
- [254] Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C. Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits[J]. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15:434-443.
- [255] Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption[J]. *Life Sci.* 2017;173:94-106.
- [256] Troynikov O, Watson CG, Nawaz N. Sleep environments and sleep physiology: A review[J]. *J Therm Biol.* 2018;78:192-203.
- [257] Tsuda M. Microglia-mediated regulation of neuropathic pain: Molecular and cellular mechanisms[J]. *Biol Pharm Bull.* 2019;42:1959-1968.
- [258] Underwood E. Neuroscience. Sleep: the brain's housekeeper? [J]. *Science.* 2013;342:301.
- [259] Van Dongen HP, Maislin G, Mullington JM, Dinges DF. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation[J]. *Sleep.* 2003;26:117-126.
- [260] Vandekerckhove M, Cluydts R. The emotional brain and sleep: an intimate relationship[J]. *Sleep Med Rev.* 2010;14:219-226.
- [261] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nature Protoc.* 2006;1:848-858.
- [262] Wadhwa M, Prabhakar A, Ray K, Roy K, Kumari P, Jha PK, Kishore K, Kumar S, Panjwani U. Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48 h of sleep deprivation[J]. *J Neuroinflammation.* 2017;14:18.
- [263] Wadhwa M, Sahu S, Kumari P, Kauser H, Ray K, Panjwani U. Caffeine and modafinil given during 48 h sleep deprivation modulate object recognition memory and synaptic proteins in the hippocampus of the rat[J]. *Behav Brain Res.* 2015;294:95-101.
- [264] Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus[J]. *J Neurosci.*

- 2006;26:5438-5447.
- [265] Wang D, Liu CD, Li HF, Tian ML, Pan JQ, Shu G, Jiang QY, Yin YL, Zhang L. LSD1 mediates microbial metabolite butyrate-induced thermogenesis in brown and white adipose tissue[J]. *Metabolism*. 2020;102:154011.
- [266] Wang J, Jiang C, Zhang K, Lan X, Chen X, Zang W, Wang Z, Guan F, Zhu C, Yang X, Lu H, Wang J. Melatonin receptor activation provides cerebral protection after traumatic brain injury by mitigating oxidative stress and inflammation via the NRF2 signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*. 2019;131:345-355.
- [267] Wang X, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Melatonin alleviates acute sleep deprivation-induced memory loss in mice by suppressing hippocampal ferroptosis[J]. *Front Pharmacol*. 2021;12:708645.
- [268] Wang X, Yang Y, Xiao A, Zhang N, Miao M, Wang Z, Han J, Wen M. A comparative study of the effect of a gentle ketogenic diet containing medium-chain or long-chain triglycerides on chronic sleep deprivation-induced cognitive deficiency[J]. *Food Funct*. 2022;13:2283-2294.
- [269] Wang Z, Chen WH, Li SX, He ZM, Zhu WL, Ji YB, Wang Z, Zhu XM, Yuan K, Bao YP, Shi L, Meng SQ, Xue YX, Xie W, Shi J, Yan W, Wei H, Lu L, Han Y. Gut microbiota modulates the inflammatory response and cognitive impairment induced by sleep deprivation[J]. *Mol Psychiatry*. 2021a;26:6277-6292.
- [270] Wang Z, Chen X, Liu N, Shi Y, Liu Y, Ouyang L, Tam S, Xiao D, Liu S, Wen F, Tao Y. A nuclear long non-coding RNA LINC00618 accelerates ferroptosis in a manner dependent upon apoptosis[J]. *Mol Ther*. 2021b;29:263-274.
- [271] Wei G, Sun J, Luan W, Hou Z, Wang S, Cui S, Cheng M, Liu Y. Natural product albiziabioside a conjugated with pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor dichloroacetate to induce apoptosis-ferroptosis-M2-TAMs polarization for combined cancer therapy[J]. *J Med Chem*. 2019;62:8760-8772.
- [272] Wei H, Qu L, Dai S, Li Y, Wang H, Feng Y, Chen X, Jiang L, Guo M, Li J, Chen Z, Chen L, Zhang Y, Chen Y. Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis[J]. *Nat Commun*. 2021;12:2280.
- [273] Wei P, Keller C, Li L. Neuropeptides in gut-brain axis and their influence on host immunity and stress[J]. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:843-851.
- [274] Wenzel TJ, Gates EJ, Ranger AL, Klegeris A. Short-chain fatty acids (SCFAs) alone or in combination regulate select immune functions of microglia-like cells[J]. *Mol Cell Neurosci*. 2020;105:103493.
- [275] Wu Y, He F, Zhang C, Zhang Q, Su X, Zhu X, Liu A, Shi W, Lin W, Jin Z, Yang H, Lin J. Melatonin

- alleviates titanium nanoparticles induced osteolysis via activation of butyrate/GPR109A signaling pathway[J]. *J Nanobiotechnology*. 2021;19:170.
- [276] Xiang W, Xue H, Wang B, Li Y, Zhang J, Jiang C, Pang J. Efficacy of N-Butylphthalide and hyperbaric oxygen therapy on cognitive dysfunction in patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning[J]. *Med Sci Monit*. 2017;23:1501-1506.
- [277] Xie BS, Wang YQ, Lin Y, Mao Q, Feng JF, Gao GY, Jiang JY. Inhibition of ferroptosis attenuates tissue damage and improves long-term outcomes after traumatic brain injury in mice[J]. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25:465-475.
- [278] Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, Feng Y, Liu W, Yu F. A review of sleep disorders and melatonin[J]. *Neurol Res*. 2017;39:559-565.
- [279] Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. *Biosci Rep*. 2019;39:BSR20180992.
- [280] Yaffe K, Falvey CM, Hoang T. Connections between sleep and cognition in older adults[J]. *Lancet Neurol*. 2014;13:1017-1028.
- [281] Yamada N, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, Komada T, Kamata R, Sampilvanjil A, Ito J, Nakagawa K, Kuwata H, Hara S, Mizuta K, Sakuma Y, Sata N, Takahashi M. Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure[J]. *Cell Death Dis*. 2020;11:144.
- [282] Yan N, Zhang J. Iron metabolism, ferroptosis, and the links with Alzheimer's disease[J]. *Front Neurosci*. 2019;13:1443.
- [283] Yang B, Zhang LY, Chen Y, Bai YP, Jia J, Feng JG, Liu KX, Zhou J. Melatonin alleviates intestinal injury, neuroinflammation and cognitive dysfunction caused by intestinal ischemia/reperfusion[J]. *Int Immunopharmacol*. 2020a;85:106596.
- [284] Yang F, Chen H, Gao Y, An N, Li X, Pan X, Yang X, Tian L, Sun J, Xiong X, Xing Y. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and hypertension: Mechanism and treatment[J]. *Biomed Pharmacother*. 2020b;130:110503.
- [285] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*. 2014;156:317-331.
- [286] Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior[J]. *J Vis Exp*. 2015;2:52587.
- [287] Ye Z, Liu WS, Zhuo QF, Hu QS, Liu MQ, Sun QQ, Zhang Z, Fan GX, Xu WY, Ji SR, Yu XJ, Qin Y, Xu XW. Ferroptosis: Final destination for cancer? [J]. *Cell Prolif*. 2020;53:13.
- [288] Ye Z, Zhuo Q, Hu Q, Xu X, Mengqi L, Zhang Z, Xu W, Liu W, Fan G, Qin Y, Yu X, Ji S. FBW7-

- NRA41-SCD1 axis synchronously regulates apoptosis and ferroptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Redox Biol.* 2021;38:101807.
- [289] Yoo S-E, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, Richardson A, Ran Q. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain[J]. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:1820-1827.
- [290] Yu H, Zhang J, Ji Q, Yu K, Wang P, Song M, Cao Z, Zhang X, Li Y. Melatonin alleviates aluminium chloride-induced immunotoxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis associated with the activation of NRF2 signaling pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;173:131-141.
- [291] Zammit AR, Ezzati A, Katz MJ, Zimmerman ME, Lipton ML, Sliwinski MJ, Lipton RB. The association of visual memory with hippocampal volume[J]. *PLoS One.* 2017;12:e0187851.
- [292] Zhang C, Ren Y, Gu H, Gao L, Zhang Y, Lu L. Calcineurin-mediated intracellular organelle calcium homeostasis is required for the survival of fungal pathogens upon extracellular calcium stimuli[J]. *Virulence.* 2021a;12:1091-1110.
- [293] Zhang L, Liu C, Jiang Q, Yin Y. Butyrate in energy metabolism: There Is still more to learn[J]. *Trends Endocrinol Metab.* 2021b;32:159-169.
- [294] Zhang YH, Wang DW, Xu SF, Zhang S, Fan YG, Yang YY, Guo SQ, Wang S, Guo T, Wang ZY, Guo C. alpha-Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice[J]. *Redox Biol.* 2018;14:535-548.
- [295] Zhao Z, Lu C, Li T, Wang W, Ye W, Zeng R, Ni L, Lai Z, Wang X, Liu C. The protective effect of melatonin on brain ischemia and reperfusion in rats and humans: In vivo assessment and a randomized controlled trial[J]. *J Pineal Res.* 2018;65:e12521.
- [296] Zhao Z, Ning J, Bao XQ, Shang M, Ma J, Li G, Zhang D. Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis[J]. *Microbiome.* 2021;9:226.
- [297] Zhou J, Li XY, Liu YJ, Feng J, Wu Y, Shen HM, Lu GD. Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation[J]. *Autophagy.* 2021a;18:1-16.
- [298] Zhou X, Cui G, Tseng HH, Lee SM, Leung GP, Chan SW, Kwan YW, Hoi MP. Vascular contributions to cognitive impairment and treatments with traditional chinese medicine[J]. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:9627258.
- [299] Zhou Z, Xu N, Matei N, McBride DW, Ding Y, Liang H, Tang J, Zhang JH. Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis via GPR41/Gβγ/PI3K/Akt pathway after MCAO in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021b;41:267-281

致谢

一树树花开，一声声燕鸣，最美人间四月天。记得五年前也是在这样的四月我第一次来到了农大，五年转瞬即逝，站在毕业的门槛上，回忆起过往的点点滴滴如昨日般历历在目，有很多的话想说却又不知从何说起。

在这里我最要感谢的是我的恩师陈耀星教授，感谢陈老师能接受一个平台不高、天资不佳的自己，我感到莫大的荣幸。初入科研的门槛，我对一切都处于空白的状态，陈老师带着我一步步的从课题的设计，试验的开展一直走到了最后的论文终稿，感谢陈老师对我的悉心关怀和无私帮助。陈老师博学广闻的研究视野、逻辑满分的科研思路、非凡的人格魅力，无不使我深受感染，有的时候我思考课题绞尽脑汁都琢磨不明白，和陈老师讨论一下豁然开朗，恩师一直是我科研学习上的引路人。仍记得陈老师指导我修改第一篇论文时写了满满五页的全文大纲，并且逐字逐句的帮我修改论文的细节，带着我慢慢的入了撰写论文的大门。我的性格里多少带了些马马虎虎，很多次也因为马虎导致事情办砸，目标流失，但陈老师极致严谨的做事风格深深的影响了我，陈老师对待论文会一遍遍的修改直到完美，每当我认真和懈怠的时候，陈老师总是不厌其烦的指出我的错误，监督我改正。科研学习固然重要，但陈老师对于我人生道路的指导才是最重要最长远的。在此，向敬爱的陈老师致以崇高的敬意与衷心的感谢。

同样，我也要感谢王子旭老师，在科研学习和日常生活中您一直是我的坚强后盾，您无私的帮助让我能够无后顾之忧的前行。在您身上我明白了一生向学，持续进步的人生态度，您也一步一步带着我学习了神经领域的诸多知识，在此感谢您五年来对我的关怀和爱护。同时我也要感谢曹静老师和董玉兰老师，感谢您们在我试验遇到问题时毫无保留的细心耐心的指导，以及生活中无微不至的关怀。

此外我也要感谢实验室的师兄师姐、同门和师弟师妹们，感谢大家对我实验和生活上的帮助。在此衷心感谢已经毕业的马淑慧师姐、边疆师姐、宁淑杰师姐、刘磊师兄、林如涛师兄、熊娟娟师姐、王铁师兄，感谢你们教会我很多实验操作，并且把很多过往经验以及收获都无私的传授给我，让我能够在进入科研试验时少走很多的弯路，还要感谢已经毕业的刘欣峰师弟、员蕾师妹、孙维靖师妹，愿你们工作顺利，幸福安康。同样感谢在学的刘琪师妹、李伟天师弟、刘雅梦、关青云师妹、任文姬师妹、宋超师弟、冯明慧师妹、王伟师弟、唐莞琪师妹和董艳师妹，非常感谢你们对我实验和生活上的帮助，愿你们实验顺利，成果多多。感谢我的硕士同门徐文娇、秦晓静和李国川，硕士两年我们欢快同行，愿未来可期，幸福常伴。还要感谢今年一起毕业的张艺佳、程俊锋师弟和赵室慷，尤其是我的同门，五年来我们一起努力，共同成长，愿未来可期！

我也要感谢我的男朋友刘禹辰，感谢你的支持和陪伴，是你的鼓励给了我莫大的自信和勇气！

最后也是我最感谢的就是我的父母，他们尊重、鼓励和支持我的一切选择和决定，给了我无限的帮助，是我向前奔跑的坚定大后方，让我能够尽情的翱翔，我定不会辜负您们对我的期许，不断前行，用实际行动回报您们的养育之恩！

凡是过往，皆为序章。人生充满机遇与选择，面对未来我想说，祝你踏过千重浪，也不忘少年样。

王心彤
2022年5月

个人简历

一、基本介绍:

姓名: 王心彤	性别: 女
政治面貌: 中共党员	民族: 汉族
出生日期: 1994年10月19日	籍贯: 山西省晋中市

二、教育经历:

2017年09月-2022年6月, 中国农业大学动物医学院基础兽医方向攻读农学博士学位

2012年09月-2016年07月, 山西农业大学动物科技学院获农学学士学位

三、研究生期间发表论文

- [1]. **Wang X**, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Melatonin alleviates acute sleep deprivation-induced memory loss in mice by suppressing hippocampal ferroptosis. *Front Pharmacol.* 2021;12:708645. (IF=6.006)
- [2]. **Wang X**, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Ferroptosis mechanisms involved in hippocampal-related diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18): 9902. (IF=6.132)
- [3]. **Wang X**, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Melatonin ameliorates anxiety-like behaviors induced by sleep deprivation in mice: Role of oxidative stress, neuroinflammation, autophagy and apoptosis. *Brain Res Bull.* 2021;174:161-172. (IF=4.117)
- [4]. **Wang X**, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Gut microbiota-derived metabolites mediate the neuroprotective effect of melatonin in cognitive impairment induced by sleep deprivation. *Microbiome.* (Under review).
- [5]. Gao T, Wang Z, Dong Y, Cao J, Lin R, **Wang X**, Yu Z, Chen Y. Role of melatonin in sleep deprivation-induced intestinal barrier dysfunction in mice. *J Pineal Res.* 2019;67:e12574.
- [6]. 王心彤, 王子旭, 曹静, 董玉兰, 陈耀星. 睡眠剥夺通过氧化应激引起小鼠认知功能障碍[C]. 呼和浩特:中国畜牧兽医学动物解剖及组织胚胎学分会第二十次学术研讨会论文集. 2018:48.
- [7]. **Wang X**, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Role of melatonin in sleep deprivation-induced cognitive disorder in mice[C]. Kobe: The 13th Japan-China Joint seminar on histochemistry and cytochemistry, 2019:CP-28.

- [8]. 王心彤, 王子旭, 曹静, 董玉兰, 陈耀星. 肠道菌群代谢物丁酸介导褪黑激素在睡眠剥夺诱导记忆损伤中的神经保护作用[C]. 成都: 中国畜牧兽医学动物解剖及组织胚胎学分会第二十一学术研讨会论文集. 2021.

四、在学期间获得的奖励和荣誉

2017-2018 年荣获中国农业大学博士一等奖学金, 中国畜牧兽医学动物解剖及组织胚胎学分会第二十次学术研讨会优秀壁报奖, 北京解剖学会 2018 学术年会青年学术墙报优秀奖

2018-2019 年荣获中国农业大学博士一等奖学金, 中国农业大学动物医学院“优秀共产党员”称号

2019-2020 年荣获中国农业大学博士二等奖学金

2020-2021 年荣获国家奖学金, 中国农业大学博士一等奖学金, 中国农业大学熊大仕院长奖学金, 中国农业大学创新创业二等奖学金, 中国农业大学三好学生, 中国农业大学动物医学院第六届博士生学术论坛墙报优秀奖

2022 年荣获北京市级优秀毕业生, 中国农业大学校级优秀毕业生, 中国农业大学动物医学院院级优秀学位论文

五、在学期间主要参与的科研项目

国家自然科学基金 (31472157, 31672501, 31372387)

北京市自然科学基金 (6182018)

六、参编书籍

陈耀星, 曹静主译, 王心彤参译. 《犬猫解剖学彩色图谱》(第 2 版). 沈阳, 辽宁科学技术出版社, 2021.5.

陈耀星, 曹静主编, 王心彤参编. 《动物解剖学彩色图谱》(第 2 版). 北京, 中国农业出版社, 2021.12.