

先天性巨细胞病毒神经系统感染 对小鼠海马区突触素、神经颗粒素表达及学习记忆的影响

李伟, 乌剑利

华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科, 湖北 武汉 430030

【摘要】 目的 观察先天性巨细胞病毒(CMV)神经系统感染后海马区突触素、神经颗粒素表达的改变及对学习记忆能力的影响。方法 56 只新生 BALB/C 小鼠(1 日龄)随机数余数分组法随机分为感染组和对照组, 每组 28 只, 感染组于 0 日龄颅内注射小鼠巨细胞病毒, 建立先天性巨细胞病毒神经系统感染模型, 对照组颅内接种等量的病毒溶媒。分别于 3 日、15 日、30 日龄(每组 7 只)采用免疫组化技术半定量检测两组小鼠海马区突触素和神经颗粒素表达水平, 于 30 日龄行物体识别实验检测剩余小鼠(每组 7 只)学习记忆能力。结果 感染组小鼠海马区 3 日龄、15 日龄、30 日龄的突触素表达光密度值分别为(74.71±5.96)、(97.71±8.64)、(116.70±12.98), 明显低于同期对照组的(87.86±4.53)、(127.90±5.27)、(158.00±10.07), 差异均具有统计学意义($P<0.05$); 感染组小鼠海马区 3 日龄、15 日龄、30 日龄的神经颗粒素表达光密度值分别为(47.14±3.44)、(60.86±7.71)、(69.86±6.09), 明显低于同期对照组的(54.29±5.06)、(80.86±7.01)、(97.57±6.95), 差异均具有统计学意义($P<0.05$); 感染组小鼠 30 日龄的分辨指数为(0.384 3±0.097 3), 明显低于同期对照组的(0.552 9±0.081 6), 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 先天性巨细胞病毒感染可导致发育过程中的小鼠海马突触素和神经颗粒素表达水平降低, 学习记忆能力下降。

【关键词】 巨细胞病毒; 突触素; 神经颗粒素; 海马; 学习记忆能力

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)01-0016-03

Effect of congenital cytomegalovirus infection on synaptophysin and neurogranin of hippocampus and cognition in mice. LI Wei, WU Jian-li. Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, CHINA

【Abstract】 Objective To study the effect of congenital cytomegalovirus (CMV) infection on synaptophysin and neurogranin of hippocampus and cognition in mice. **Methods** The models of congenital CMV infection on neonate mice were built, and the fetal BALB/C mice were randomly divided into the infectious group ($n=28$) and the control group ($n=28$) on the day of delivery. The fetal mice in infectious group were intracranial inoculated with CMV suspension, and the fetal mice in control group were inoculated with equivalent volume of virus solvent. The expression of the synaptophysin and neurogranin were observed on the 3rd, 15th, 30th days post-inoculation by immunohistochemical SP method. On the 30th day post-inoculation, the learning and memory ability was detected by Object Recognition Test. **Results** The optical density value of synaptophysin expression in the hippocampal area of the infectious group on the 3rd, 15th, 30th days post-inoculation were (74.71±5.96), (97.71±8.64), (116.70±12.98), significantly lower than (87.86±4.53), (127.90±5.27), (158.00±10.07) in the control group ($P<0.05$). The optical density value of neurogranin expression in the hippocampal area of the infectious group on the 3rd, 15th, 30th days post-inoculation were (47.14±3.44), (60.86±7.71), (69.86±6.09), significantly lower than (54.29±5.06), (80.86±7.01), (97.57±6.95) in the control group ($P<0.05$). The resolution index of 30-day old mice in the infectious group was (0.384 3±0.097 3), significantly lower than (0.552 9±0.081 6) in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Congenital CMV infection could induce the decrease of the expression of synaptophysin and neurogranin of hippocampus in developing fetal mice, and results in declined learning and memory ability.

【Key words】 Cytomegalovirus (CMV); Synaptophysin; Neurogranin; Hippocampus; Learning and memory ability

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是发展中国家最常见的先天性感染病原体, 巨细胞病毒先天性感染是导致难免流产、早产、胎死宫内、胎儿小颅畸形、渐进性感音神经性耳聋、智力障碍等严重并发症的主要病因之一^[1-3]。先天性巨细胞病毒神经系统感染引起的神经系统发育障碍是导致我国新增人口重大出

生缺陷的主要原因之一, 且产前诊断困难, 对于其引起的中远期后遗症缺乏有效治疗方案^[3-5], 因此研究先天性巨细胞病毒神经系统感染导致神经系统发育障碍和远期并发症的发病机制对制定预防和治疗方案具有重要意义。

研究表明, 巨细胞病毒感染具有嗜神经性特征,

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81701476)

通讯作者: 乌剑利, E-mail: jlwu@tjh.tjmu.edu.cn

海马区、脑室下区和脑皮质区的神经细胞为其主要易感细胞^[4]。海马区是学习记忆等认知功能的解剖学核心,而正常的突触结构和突触可塑性是其发挥认知功能的关键。巨细胞病毒神经系统感染导致海马区神经元突触结构异常,破坏突触可塑性可能是其导致认知功能障碍和远期神经系统后遗症的重要致病机理,但其具体分子机制不明。突触素(Synaptophysin, Syn)是一种位于突触囊泡膜上与突触功能密切相关的多糖膜结构蛋白,参与突触囊泡融合,介导神经元神经递质释放和突触囊泡再循环^[6],在神经元突触发育和突触可塑性中发挥关键作用。神经颗粒素(Neurogranin, Ng)作为一种具有神经特异性突触后蛋白,主要分布于海马、杏仁核和纹状体区,在神经系统发育、认知形成等生理过程中发挥重要作用^[6-7]。本研究通过建立小鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)先天性神经系统感染模型,采用免疫组织化学技术观察巨细胞病毒感染对 Syn 及 Ng 表达水平的持续性影响;通过物体识别实验(object recognition test, ORT)观察先天性巨细胞病毒神经系统感染对发育成熟期小鼠学习记忆的影响,探讨先天性巨细胞病毒神经系统感染导致神经系统发育落后的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 小鼠抗 Syn 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),小鼠抗 Ng 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),SP 免疫组化试剂盒与 DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),彩色医学图文分析系统(美国 Pixera 公司),物体识别实验装置(上海欣软信息科技有限公司)。

1.2 病毒及实验动物模型的建立 小鼠巨细胞病毒 Smith 株由中国典型培养物保藏中心(武汉大学)(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)提供;健康 BALB/C 小鼠孕鼠 8 只,取出生当日小鼠乳鼠作为实验研究对象,共 56 只,按照随机数余数分组法分为感染组和对照组,每组 28 只,感染组颅内接种小鼠巨细胞病毒病毒悬液 10 μ L,对照组颅内接种等量的病毒溶媒。

1.3 取材及免疫组织化学分析 分别于小鼠乳鼠在接种病毒或病毒溶媒后 3 d、15 d、30 d 二氧化碳法处死小鼠,每组 7 只,无菌条件下采集脑组织,解剖显微镜下分离含海马组织的脑段,行 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片。按照 SP 免疫组化试剂盒说明书进行 Syn 及 Ng 免疫组化染色。Image. pro Plus 5.1 软件进行半定量分析(单位:校正光密度值)。

1.4 物体识别实验(object recognition test, ORT) 于接种病毒或病毒溶媒 30 d 开始训练测试,每组 7 只,小鼠物体识别实验具体实施方案参见课题组既往发表论文《胎盘接种小鼠巨细胞病毒对仔鼠物体

识别能力的影响》^[7]。物体识别实验主要通过小鼠对新物体的探索时间及分辨指数(discrimination index, DI)实现对小鼠学习记忆能力的评估,对新物体探索时间、分辨指数与学习记忆能力呈正相关^[7]。

1.5 统计学方法 所有实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,组间及组内比较均采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Syn 和 Ng 在乳鼠海马区表达 感染组及对照组海马区均有 Syn 及 Ng 的表达,其棕色阳性信号主要位于神经元的胞浆内。半定量研究发现,发育过程中感染组及对照组海马区 Syn 及 Ng 的表达水平均不断增加,差异均有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,感染组各时相 Syn 及 Ng 的表达水平均降低,其中感染后 15 d、30 d 下降更加明显,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 1 和表 2。

表 1 两组小鼠海马区不同时间 Syn 表达的光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	3 日龄	15 日龄	30 日龄
对照组	28	87.86 \pm 4.53	127.90 \pm 5.27 [*]	158.00 \pm 10.07 [*]
感染组	28	74.71 \pm 5.96	97.71 \pm 8.64 [*]	116.70 \pm 12.98 [*]
<i>t</i> 值		4.645	7.882	6.649
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与组内平行比较,^{*} $P<0.05$ 。

表 2 两组小鼠海马区不同时间 Ng 表达的光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	3 日龄	15 日龄	30 日龄
对照组	28	54.29 \pm 5.06	80.86 \pm 7.01 [*]	97.57 \pm 6.95 [*]
感染组	28	47.14 \pm 3.44	60.86 \pm 7.71 [*]	69.86 \pm 6.09 [*]
<i>t</i> 值		3.091	5.077	7.933
<i>P</i> 值		<0.05	<0.01	<0.05

注:与组内平行比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.2 物体识别实验结果 与对照组相比,感染组小鼠对新物体探索时间显著减少,分辨指数显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01),见表 3。

表 3 两组小鼠的物体识别实验结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	新物体探索时间(s)	分辨指数
对照组	28	22.29 \pm 3.50	0.552 9 \pm 0.081 6
感染组	28	16.14 \pm 4.02	0.384 3 \pm 0.097 3
<i>t</i> 值		3.051	3.513
<i>P</i> 值		<0.05	<0.01

3 讨论

神经系统的发育具有连续性和复杂性的特征,出生前的神经系统发育仍远未成熟,出生早期仍然是神经发育尤其是脑发育的关键阶段。在出生早期,建立神经元突触,发育并形成功能成熟的神经元回路至关重要,决定了中枢神经系统的发育与突触可塑性^[8-9]。而中枢神经系统的发育与突触可塑性正是学习记忆的基础。Deckwerth 等^[10]研究发现,出生 4 d 大鼠海马

突触数目只有成年大鼠海马突触数目的百分之一,但呈 2 日倍增趋势,出生 30 d 时大鼠海马突触数目可达到成年期的百分之九十,并达到出生 12 d 时的 10 倍。另有研究发现,小鼠从孕 14 d 开始到正常分娩后的第 10 日,嗅球内的突触数目增加了一千倍以上^[11]。以上研究基础均表明:在小鼠出生时接种巨细胞病毒感染建立先天性巨细胞病毒神经系统感染模型来研究巨细胞病毒感染对中枢神经发育及学习记忆等认知功能的影响具有科学依据和意义,也因此受到广泛认可和应用。

突触素作为一种特异性蛋白质表达与突触前膜内突触囊泡膜上,是突触前结构的重要标记,能够反映海马区突触的分布位置和分布密度。此外,突触素还通过诱导突触囊泡融合、介导神经递质释放和囊泡再循环参与突触可塑性^[6,12-13]。本研究中两组小鼠海马突触素随日龄逐渐增加,反映神经系统发育过程中突触的数量和密度逐渐增加;感染组突触素表达水平较同期对照组明显降低,揭示巨细胞病毒感染可影响海马突触的发育生成及结构重建,突触素的表达减少表明海马区突触囊泡转运能力下降,传递效能降低,意味着巨细胞病毒神经系统感染可能通过降低突触的数量或(和)效能来抑制突触可塑性,进而导致出生远期的学习记忆功能降低。

神经颗粒素是神经元突触可塑性重要分子基础,主要通过突触后连接中介导蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和 Ca^{2+} 敏感性钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合蛋白,参与在学习记忆功能中起核心作用的长时程增强、长时程抑制等突触可塑性机制^[14-15]。神经颗粒素参与调解海马神经元 CA1 区长时程增强及长时程抑制,神经颗粒素基因敲出的小鼠在执行海马依赖的任务时会表现出严重的障碍^[16]。本研究中,两组小鼠海马神经颗粒素随日龄逐渐增加,但小鼠巨细胞病毒感染组突触神经颗粒素表达水平较同期对照组明显降低,尤其是在 15 日龄、30 日龄差异更具有显著性,提示巨细胞病毒神经系统感染可能通过降低神经颗粒素的表达水平,影响海马区神经元突触可塑性,产生认知障碍等神经系统出生缺陷,这种影响是长期的,可能在中远期表现更为明显。物体识别实验提示先天性巨细胞病毒神经系统感染小鼠成熟期学习记忆能力下降,此结果也进一步验证了上述假说。

巨细胞病毒宫内传播子代先天性神经系统感染是目前我国重大出生缺陷尤其是出生后神经系统发育落后的主要原因之一,其主要临床表现为认知障碍及渐进性感音神经性耳聋,具体发病机制至今尚未明确^[17-19]。本研究发现先天性巨细胞病毒感染可能通过降低神经系统海马区突触素及神经颗粒素的表达水平,干预海马突触的发育形成和结构功能,尤其是干扰了海马区神经元突触可塑性机制,导致认知障碍等重大神经系统出生缺陷,本研究为进一步阐明先天性巨细胞病毒神经系统感染的发病机制奠定基础。

参考文献

- [1] LIM Y, LYALL H. Congenital cytomegalovirus-who, when, what-with and why to treat? [J]. *J Infect*, 2017, 74(Suppl 1): S89-S94.
- [2] 喻欢, 黄悦, 卫飞雪, 等. 新生儿先天性巨细胞病毒感染的研究进展 [J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(14): 3345-3349.
- [3] GANTT S, MARCHANT A, BOPPANA SB. Higher expectations for a vaccine to prevent congenital cytomegalovirus infection [J]. *J Virol*, 2018, 92(15): pii: e00764-18.
- [4] LERUEZ-VILLE M, VILLE Y. Fetal cytomegalovirus infection [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 38: 97-107.
- [5] MCVOY MA, LEE R, SACCOCCIO FM, et al. A cytomegalovirus DNA vaccine induces antibodies that block viral entry into fibroblasts and epithelial cells [J]. *Vaccine*, 2015, 33(51): 7328-7336.
- [6] GORDON SL, HARPER CB, SMILLIE KJ, et al. A fine balance of synaptophysin levels underlies efficient retrieval of synaptobrevin II to synaptic vesicles [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149457.
- [7] 陈娟娟, 陈素华, 冯燕, 等. 胎盘接种小鼠巨细胞病毒对仔鼠物体识别能力的影响 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2007, 15(2): 30-31.
- [8] RESSLER KJ, PASCHALL G, ZHOU XL, et al. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(18): 7892-7902.
- [9] de KLOET ER, MEIJER OC, de NICOLA AF, et al. Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2018, 4(49): 124-145.
- [10] DECKWERTH TL, ELLIOTT JL, KNUDSON CM, et al. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development [J]. *Neuron*, 1996, 17(3): 401-411.
- [11] MERIGHI A. Targeting the glial-derived neurotrophic factor and related molecules for controlling normal and pathologic pain [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(2): 193-208.
- [12] MAGALHÃES RC, PIMENTA LP, BARBOSA IG, et al. Inflammation molecules and neurotrophic factors as biomarkers of neuropsychomotor development in preterm neonates: a systematic review [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2018, 4(65): 29-37.
- [13] KWAK M, YUM MS, YEH HR, et al. Brain magnetic resonance imaging findings of congenital cytomegalovirus infection as a prognostic factor for neurological outcome [J]. *Pediatr Neurol*, 2018, 1(83): 14-18.
- [14] CASALETTO KB, ELAHI FM, BETTCHER BM, et al. Neurogranin, a synaptic protein, is associated with memory independent of Alzheimer biomarkers [J]. *Neurology*, 2017, 89(17): 1782-1788.
- [15] 李雨峰, 吴莹, 程明, 等. 康复训练对脑梗死大鼠认知功能、海马内突触素和神经颗粒素表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2012, 18(1): 15-18.
- [16] JONES KJ, TEMPLET S, ZEMOURA K, et al. Rapid, experience-dependent translation of neurogranin enables memory encoding [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(25): E5805-E5814.
- [17] FOWLER KB, BOPPANA SB. Congenital cytomegalovirus infection [J]. *Semin Perinatol*, 2018, 42(3): 149-154.
- [18] ZOU F, LU ZT, WANG S, WU S, et al. Human cytomegalovirus UL141 protein interacts with CELF5 and affects viral DNA replication [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4657-4664.
- [19] 王晗, 李廷栋, 郭小怡, 等. 巨细胞病毒实验室检测方法研究进展及其用于新生儿筛查的可行性 [J]. *临床儿科杂志*, 2018, 36(3): 221-226.

(收稿日期:2018-08-31)