

# 海马胆碱能神经元刺激肽促进 海马胆碱能神经元再生的研究\*

杨伟伟<sup>1,2</sup> 金国华<sup>2,3</sup> 秦建兵<sup>2</sup> 李浩明<sup>2</sup> 田美玲<sup>2</sup>

## 摘要

**目的:**探讨海马胆碱能神经元刺激肽(HCNP)对切割穹窿海马伞后海马胆碱能神经元的促进作用。

**方法:**36只SD大鼠随机分成两组,切割右侧穹窿海马伞后,术后连续5 d腹腔注射BrdU,经侧脑室分别注射HCNP和人工脑脊液(ACSF),每3天1次,共6次。切割术前、术后及治疗术后行Morris水迷宫行为学测试;术后第35天,灌注取脑行溴脱氧尿苷(5-BrdU)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)免疫荧光检测;提取总RNA,RT-PCR检测ChAT mRNA表达量;提取总蛋白,Western blot检测ChAT蛋白表达。

**结果:**切割穹窿海马伞后,两组大鼠平均逃避潜伏期(AEL)均明显增加,记忆力下降,经过治疗后,实验组大鼠AEL显著缩短,对照组无改善,两组AEL有显著性差异( $P<0.05$ );HCNP组海马齿状回颗粒下层可见较多BrdU阳性细胞及海马ChAT阳性神经元,ACSF组仅见少量BrdU阳性细胞,未见ChAT阳性神经元;RT-PCR结果显示,HCNP组ChAT mRNA约为ACSF组2倍( $P<0.01$ );Western blot结果表明,实验组ChAT蛋白相对表达量为 $0.412\pm 0.018$ ,对照组为 $0.218\pm 0.017$ ,实验组明显高于对照组,二者存在显著性差异( $P<0.01$ )。

**结论:**HCNP可促进海马齿状回颗粒下层神经干细胞的增殖及其向胆碱能神经元分化。

**关键词** 海马胆碱能神经元刺激肽;海马;神经干细胞;神经元;胆碱能神经元

**中图分类号:**R473,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-09-0877-06

The effect of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide in promoting hippocampal cholinergic neural regeneration/YANG Weiwei, JIN Guohua, QIN Jianbing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(9): 877—882

## Abstract

**Objective:** To investigate the promoting effect of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) on hippocampal neural stem cells (NSCs) differentiation into neurons or cholinergic neurons.

**Method:** Thirty six SD rats were randomly divided into experimental group and control group. The right fimbria-fornix were transected by three-dimensional positioning technology. BrdU was injected into the rats' peritoneal for 5 consecutive days to label hippocampal autologous NSCs after surgery. HCNP or ACSF was injected into intracerebroventricular on the 9th day after surgery and supplemented every 3 days for a total of 6 times. The cognitive function of rats were detected by Morris water maze before and after right fimbria-fornix transection, also after treatment; The cholinergic neurons derived from hippocampal NSCs were detected by BrdU/ChAT immunofluorescence on the postoperative 35th day. Total RNA was extracted to detect the expression of ChAT mRNA by Real-time PCR; Total protein was extracted to detect the expression of ChAT protein by Western blot.

**Result:** Morris water maze results showed that the average escape latency (AEL) in both of two groups in-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.09.003

\*基金项目:南京中医药大学青年自然科学基金(12XZR16)

1 南京中医药大学第二临床医学院,江苏南京,210023; 2 南通大学医学院人体解剖学系,江苏省神经再生重点实验室; 3 通讯作者  
作者简介:杨伟伟,女,硕士,讲师; 收稿日期:2014-09-19

creased clearly, memory lost after surgery. The AEL of experimental group was significantly shorter in the group treated by HCNP than that in the control group treated by ACSF compared with that after the right fimbria fornix transected ( $P<0.05$ ); The immunofluorescence results indicated that more BrdU positive cells, ChAT positive neurons and ChAT/BrdU double-labeled cells in the subgranular layer of hippocampal dentate gyrus and hilus area in experimental group; while in control group, only a few BrdU positive cells, ChAT positive neurons and ChAT/BrdU double-labeled cells could be detected; Real-time PCR results showed that ChAT mRNA in experimental group was two-folds higher than that in the control group ( $P<0.01$ ); Western blot results showed that the expression of ChAT protein in experimental group was significantly higher than that in control group ( $P<0.01$ ).

**Conclusion:** This study demonstrated that HCNP could promote the proliferation and cholinergic differentiation of NSCs in hippocampal dentate gyrus.

**Author's address** The Second Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Nanjing, 210023

**Key word** hippocampal cholinergic neurostimulating peptide; hippocampus; neural stem cells; neurons; cholinergic neuron

以阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)为代表的认知功能障碍患者是临床康复的重要对象之一,严重的认知功能障碍对患者、家庭及社会都造成沉重的负担。目前,针对认知功能障碍问题,临床康复多采取代偿措施,而患者自身认知功能的改善较为困难。AD发生的确切机制目前仍未明确,多数学者认为主要是脑内胆碱能系统受到损害<sup>[1]</sup>,而造成患者学习、记忆功能减退,导致严重的认知功能障碍。有研究表明,AD患者大脑中,海马是较早出现Tau蛋白磷酸化和神经退化的部位之一<sup>[2]</sup>。中枢神经系统中,有8条胆碱能纤维通路,其中最重要也是目前研究最多的是隔区、斜角带、海马投射,内侧隔核、Broca斜角带垂直肢和水平肢内侧部经穹窿、海马伞投射至海马和内嗅皮质<sup>[3-4]</sup>。隔区、斜角带、海马及它们之间的胆碱能纤维通路与动物的学习、记忆等认知功能密切相关,该投射通路的阻断将导致动物学习、记忆等认知功能的障碍<sup>[5-6]</sup>,研究海马结构齿状回中胆碱能神经的再生及其机制,为临床康复治疗AD提供新的思路,将具有非常重要的理论和实践意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组

取220—250g SPF级SD大鼠36只,实时PCR、Western blot及免疫荧光检测各用12只,随机分成2组,在脑立体定位仪上,切割右侧穹窿海马伞后<sup>[25]</sup>,

设其中一组为实验组,经侧脑室注射海马胆碱能神经元刺激肽(hippocampal cholinergic neuro stimulating peptide, HCNP),另外一组为对照组,经侧脑室注射人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF),每组6只。

### 1.2 侧脑室注射HCNP及ACSF

切割穹窿海马伞术后第9天,大鼠经腹腔注射复合麻醉剂Chlorpent(0.2ml/100g),待动物麻醉后,利用立体定位仪,确定左侧脑室位置。两组大鼠均用5 $\mu$ l微量注射器吸除5 $\mu$ l脑脊液,然后实验组注入相同体积的HCNP(5 $\mu$ g/ml),对照组注入相同体积的ACSF。注射器在颅内静置5—10min后退出,用骨蜡将骨缝封闭,缝合皮肤,并按性别分笼饲养。每3d注射1次,共6次。

### 1.3 Morris水迷宫测试

两组大鼠在切割穹窿海马伞前训练5d,每只大鼠每天上午和下午各进行3次连续定位航行实验训练,每次训练间隔为60s。将大鼠随机面向池壁放入水中,记录每次试验中大鼠从入水点到发现并爬上水下平台的时间,为逃避潜伏期(escape latency, EL)。大鼠自由游泳最长时限120s,如仍未能发现平台,就将其置于平台上10s,此时的EL记为120s。每只大鼠每天的EL平均值就是平均逃避潜伏期(average escape latency, AEL)。记录并计算切割穹窿海马伞前3d,切割穹窿海马伞后第7—9d,以及经侧脑室注射HCNP或ACSF治疗结束1周后连续

3d的AEL。

#### 1.4 免疫荧光检测

将两组SD大鼠进行灌注固定,取出大脑后固定4h,脱水后,置于冰冻切片机中,行冠状位连续冰冻切片,调整切片厚度为30 $\mu$ m,行BrdU/ChAT免疫荧光染色。

每只动物在海马的前、中、后部位各挑取1张共3张切片用于BrdU/ChAT免疫荧光染色,切片经漂洗后,用10%山羊血清的0.01mol/L PBS封闭过夜。次日转入兔抗ChAT多克隆抗体及大鼠抗BrdU多克隆抗体中孵育72h。取出切片漂洗后,再转入Alexa488标记的山羊抗兔IgG及Alexa568标记的山羊抗大鼠IgG中,放入4 $^{\circ}$ C冰箱中48h。利用Hoechst标记细胞核。荧光显微镜下观察实验组与对照组BrdU、ChAT阳性细胞在海马中的定位及表达强度。应用Leica Qwin图像处理系统进行重叠,然后计数两组海马齿状回颗粒下层和门区ChAT阳性神经元数目。另取2张切片用作免疫荧光的阴性对照实验,用0.01mol/L PBS替代一抗,其余步骤同上,结果为阴性。

#### 1.5 实时PCR检测大鼠海马内ChAT mRNA的表达变化

侧脑室注射HCNP和ACSF完成后,饲养1周,提取实验组与对照组海马中的总RNA,应用Real-time PCR技术,检测各组中ChAT mRNA的表达情况,并通过与内参GAPDH mRNA比较,观察实验组与对照组大鼠海马中ChAT mRNA的表达变化。在GenBank中检索大鼠ChAT和GAPDH基因序列,根据实时定量技术对引物的要求,应用Primer5.0软件,分别设计ChAT及GAPDH引物,经GenBank BLAST同源性检索后,由上海英骏生物技术工程有限公司合成。

ChAT引物序列如下:

Sense primer: 5'-TACAATGCCCATCCTG-3'

Anti-sense primer: 5'-CAAACCGCTTCACAAT-3'

预计扩增片段长度188 bp

GAPDH引物序列如下:

Sense primer: 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACATG-3'

#### 1.6 Western blot检测ChAT蛋白的表达变化

分离两组大鼠海马组织,提取总蛋白,定量后行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳后转

膜,转膜结束后,将膜中Marker泳道剪下。剩余部分经考马斯亮兰染色30min后,脱色,检查膜是否完整,并用含5%脱脂奶粉的1 $\times$ TBS在室温下封闭2h,1 $\times$ TBS轻轻漂洗3次,每次15min;封闭结束后,在膜的正面滴加含5%脱脂奶粉1 $\times$ TBS稀释的兔抗ChAT多克隆抗体、鼠抗 $\beta$ -actin抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天,1 $\times$ TBS漂洗后;在膜的正面滴加含5%脱脂奶粉1 $\times$ TBS稀释的结合HRP-IgG二抗(1:1000),室温下孵育2h;用1 $\times$ TBS溶液将PVDF膜漂洗。用滤纸将膜上液体吸干,用ECL显色法显影。

#### 1.7 图像处理及统计学分析

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分别检测实时PCR结果中各时间点ChAT和GAPDH mRNA的CT值,计算各时间点ChAT mRNA的相对表达量。Western blot结果用捷达801图像分析软件对ChAT和内参 $\beta$ -actin条带分别进行积分光密度值分析,二者积分光密度比值作为ChAT蛋白相对表达量;用Leica Qwin软件对每张切片齿状回颗粒下层和门区的ChAT阳性神经元进行计数;分别计数体内动物试验中两组切割侧大鼠海马齿状回颗粒下层和门区内的BrdU、ChAT阳性细胞的数目,以均数 $\pm$ 标准差表示。以上结果均采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 Morris水迷宫行为学检测结果

切割穹窿海马伞前实验组与对照组大鼠AEL相近,分别为(17.94 $\pm$ 4.44)s及(20.72 $\pm$ 5.21)s,差异无显著性意义( $P>0.05$ ),可认为两组大鼠认知功能无差异;切割穹窿海马伞后两组大鼠AEL较切割前均明显增加,分别为(44.06 $\pm$ 5.51)s及(39.10 $\pm$ 8.24)s,差异无显著性意义( $P>0.05$ ),在轨迹图上(图1)也可观察到其轨迹杂乱无章,由此可知两组大鼠切割穹窿海马伞后记忆功能下降,认知功能障碍模型成功,而两组AEL与切割穹窿海马伞前相比,差异均有显著性意义( $P<0.05$ )。经侧脑室注射HCNP或ACSF后,实验组大鼠AEL明显缩短,记忆功能显著改善,为(29.45 $\pm$ 1.51)s,对照组大鼠AEL并未缩短,为(40.17 $\pm$ 4.15)s,两组大鼠治疗后AEL存在显著性差异( $P<0.05$ ),见图2。

### 2.2 BrdU/ChAT免疫荧光结果

图1 Morris水迷宫定位航行实验轨迹图

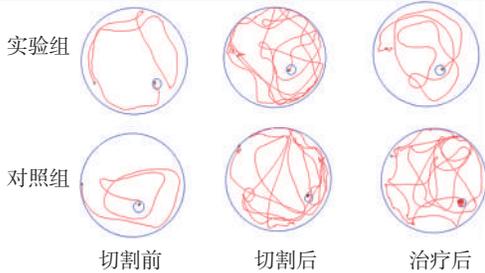
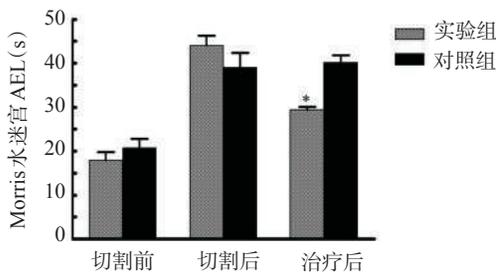


图2 实验组与对照组各时间段 AEL



与对照组相比\* $P < 0.05$ 。

BrdU/ChAT 免疫荧光结果显示, ChAT 阳性细胞主要位于海马齿状回颗粒下层和门区。实验组齿状回颗粒下层及门区 BrdU 阳性细胞数明显多于对照组, ChAT 阳性细胞数量较对照组多, 并可见部分 BrdU/ChAT 双标阳性细胞, 而对对照组齿状回颗粒下层及门区可见一定数目的 BrdU 阳性细胞, 门区可见少量 ChAT 阳性细胞(图 3)。对每张切片海马中 ChAT 阳性神经元进行计数, 每只动物前、中、后 3 张切片 ChAT 阳性神经元总数实验组为  $(42.67 \pm 4.51)$  个, 对照组为  $(18.67 \pm 2.08)$  个, 两者差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 实时 PCR 实验结果

经蛋白核酸测定仪检测, 所提取的总 RNA OD260/OD280 值为 1.94, 提示 RNA 纯度较高。

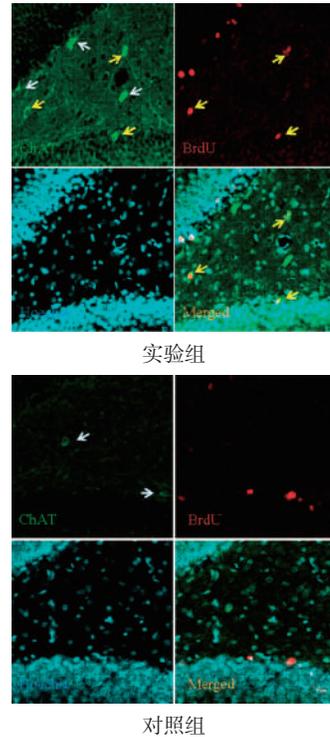
采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分别检测各时间点(图 4) ChAT 和 GAPDH mRNA 的 CT 值, 计算各时间点 ChAT mRNA 的相对表达量。分析结果显示实验组 ChAT mRNA 相对表达量  $(2.13 \pm 0.15)$  约为对照组  $(1.08 \pm 0.03)$  的 2 倍。两组 ChAT mRNA 相对表达量经统计学分析, 存在显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 Western blot 实验结果

两组在分子量为 83kD 处均检测到 ChAT 阳性条带(图 5)。图像分析结果显示实验组 ChAT 的相

对表达量为  $0.412 \pm 0.018$ , 对照组为  $0.218 \pm 0.017$ 。两组 ChAT 相对表达量统计学分析结果表明, 两组之间有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

图3 实验组与对照组免疫荧光检测结果



白色箭头为 ChAT 阳性细胞, 黄色箭头为 BrdU/ChAT 双标阳性细胞 (绿色: ChAT; 红色: BrdU; 蓝色: Hoechst)

图4 实验组和对照组 ChAT mRNA 相对表达量

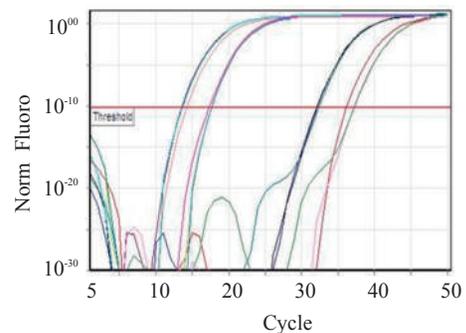
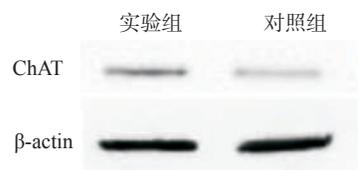


图5 Western blot 检测两组 ChAT 蛋白的表达情况



### 3 讨论

尽管在病理学上表现为胆碱能神经纤维显著的念珠样肿胀<sup>[7-9]</sup>,但基底前脑胆碱能神经系统(basal forebrain cholinergic system, BFChS)在正常老龄化过程中并不伴随明显的行为学及认知功能障碍。而AD中BFChS的改变主要表现为胆碱能神经元及其纤维投射的缺失<sup>[10]</sup>,包括ACh、ChAT、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)、烟碱样胆碱能受体(nicotine acetylcholine receptors, NACHR)、毒蕈碱样胆碱能受体(muscarine acetylcholine receptors, MACHR)等<sup>[11-13]</sup>的减少,其他的病理变化还包括细胞外 $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )沉积形成的老年斑<sup>[14]</sup>以及细胞内高度磷酸化Tau蛋白所致的神经原纤维缠结<sup>[15]</sup>(neurofibrillary tangles, NFT)。AD等认知功能障碍退行性疾病的发病机制尚不明确,多数学者认为是由于BFChS损伤后,胆碱能神经元丢失,投射至海马、杏仁体、大脑皮质等区域的ACh递质减少所致<sup>[16-17]</sup>。因此,诱导海马齿状回颗粒下层的自体NSCs向胆碱能神经元分化,从而补充海马皮质等区域的乙酰胆碱神经递质,已成为治疗AD的新思路。

磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine-binding protein, PEBP)是一类结构高度保守、生物功能多样的碱性胞质蛋白,可作为信号转导过程中的调节器以及HCNP前体蛋白,在神经元保护、生物膜的构建与重塑、AD病理过程中发挥极其重要的作用<sup>[18-19]</sup>。2002年,Maki等<sup>[20]</sup>在AD患者尤其是晚期患者海马CA1区观察到了PEBP mRNA表达量的下降,提示PEBP参与了AD的发病过程。HCNP是与PEBP N-基末端11个残基相对应的生物活性肽,在体外培养中,可增强胆碱能表型的发育<sup>[21]</sup>。HCNP在25—30周胎龄的胎儿中表达迅速增高,出生前达到最高峰,随后缓慢下降,10岁时降至正常水平,提示HCNP在海马发育中发挥重要的作用<sup>[22]</sup>。HCNP能够促进隔-海马区ChAT的活性,可与NGF以不同方式协同作用,调节隔区胆碱能神经元的发育,并可作为特定组织的神经调质而发挥作用<sup>[23]</sup>;体外内侧隔核神经元培养发现,HCNP可提高其ChAT的活性和ACh的合成,并可与NGF一起促进胆碱能神经元的分化<sup>[24]</sup>,但其与BDNF是否也有类似的作用

则尚未见报道。

本课题组在研究切割穹窿海马伞后海马PEBP的表达变化时发现,PEBP在切割海马伞后第3天开始升高,第7天达到最高峰,此后则呈下降趋势,至第21天时回到正常水平<sup>[25]</sup>。然而,我们在近年来的系列研究中发现,海马内自体NSCs向神经元和胆碱能神经元的分化,往往发生于切割穹窿海马伞后的14—28d<sup>[26]</sup>,由此推测,在此时间窗内给予适量HCNP的补充,将对海马来源的NSCs向神经元或胆碱能神经元的分化产生积极的作用。

隔、斜角带、海马以及它们之间的胆碱能纤维通路与动物的学习、记忆等认知功能密切相关,该投射通路的阻断将导致动物学习、记忆等认知功能的障碍<sup>[5-6]</sup>,将穹窿海马伞切断后,这一重要胆碱能纤维通路也随之阻断,即可通过切割穹窿海马伞制备海马去神经支配动物模型。Morris水迷宫行为学检测结果证实,大鼠切割穹窿海马伞后记忆功能下降,认知功能障碍模型成功。在此基础上,实验组与对照组分别经侧脑室给予HCNP及ACSF灌注, Morris水迷宫行为学测试结果显示,实验组经HCNP治疗后大鼠记忆力、认知功能得到了明显的改善,而对照组大鼠记忆力则仍呈下降趋势,并无改善;免疫荧光结果显示, BrdU标记的新增殖细胞主要位于海马齿状回颗粒下层, ChAT阳性神经元则分布在齿状回颗粒下层及门区,该结果与本课题组先前的研究发现结果一致<sup>[27]</sup>。实验组海马齿状回颗粒下层BrdU阳性细胞、ChAT阳性神经元数量明显多于对照组,显示HCNP可以提高神经干细胞的增殖,并且能够促进其向胆碱能神经元的分化, Real-time PCR与Western blot的实验结果支持了这一论点。在HCNP作用下, ChAT mRNA和蛋白的表达增强;同时在实验组还可观察到部分BrdU/ChAT双标阳性神经元,由此可推测,这部分胆碱能神经元可能来自于新增殖的自体NSCs。而未能与BrdU双标的胆碱能神经元由何分化而来尚不能确定,我们推测,除部分因制作切片时未能切到细胞核的ChAT阳性神经元仍为NSCs分化而来外,根据本课题组新近研究的结果,另一部分ChAT阳性神经元可能是由海马齿状回中“激活”的放射状胶质细胞分化而来。

目前有关PEBP及HCNP在海马胆碱能神经再

生方面的研究较少,尤其是它们与海马NSCs分化的关系所知更少,我们将进一步通过PEBP基因敲除动物及体外的RNA干扰技术,对PEBP在海马神经再生中的NSCs向胆碱能神经元分化的作用作进一步的研究探讨。

### 参考文献

- [1] Blusztajn JK, Berse B. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease[J]. *Metab Brain Dis*, 2000,15:45—64.
- [2] Boutet C, Chupin M, LeHéricy S, et al. Detection of volume loss in hippocampal layers in Alzheimer's disease using 7 T MRI: A feasibility study[J]. *NeuroImage: Clinical*, 2014,5:341—348.
- [3] Gaykema RP,Luiten PG,Nyakas C,Traber J,et al. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex [J]. *J Comp Neurol*,1990,293(1): 103—124.
- [4] 赵善廷,邓锦波. 大鼠海马结构的组成、细胞类型及神经纤维联系 I 齿状回[J]. *神经解剖学杂志*,1999,15(1):82—88.
- [5] 龙大宏,杨丹迪,李佳楣,等. 穹窿海马伞损伤对大鼠学习记忆和海马GFAP阳性神经胶质细胞的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2002,18(1):63—66.
- [6] Mori T,Yuxin Z,Takaki H,et al. The LIM homeobox gene,L3/Lhx8,is necessary for proper development of basal forebrain cholinergic neurons[J]. *Eur J Neurosci*,2004,19(12): 3129—3141.
- [7] Gaykema RP,Nyakas C,Horvath E,et al. Cholinergic fiber aberrations in nucleus basalis lesioned rat and Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*,1992,13(3): 441—448.
- [8] Gaykema RP,van der Kuil J,Hersh LB,et al. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex:anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase[J]. *Neuroscience*,1991,43(2—3): 349—360.
- [9] Nyakas C,Granic I,Halmy LG. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia.Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-β42 with memantine[J]. *Behav Brain Res*,2011,221(2): 594—603.
- [10] Schliebs R,Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*,2006, 113(11): 1625—1644.
- [11] Kása P,Rakonczay Z,Gulya K. The cholinergic system in Alzheimer's disease[J]. *Prog Neurobiol*,1997,52(6): 511—535.
- [12] Mufson EJ,Ginsberg SD,Ikonomovic MD,et al. Human cholinergic basal forebrain:chemoanatomy and neurologic dysfunction[J]. *J Chem Neuroanat*, 2003,26(4): 233—242.
- [13] Araujo DM,Lapchak PA,Robitaille Y,et al. Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*,1988, 50(6): 1914—1923.
- [14] Auld DS,Kornecook TJ, Bastianetto S,et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system:relations to beta- amyloid peptides,cognition,and treatment strategies[J]. *Prog Neurobiol*,2002, 68(3): 209—245.
- [15] 耿劲松. 胆碱能神经元及其受体与阿尔茨海默病的关系[J]. *医学研究杂志*, 2006,35(5):70—73.
- [16] Blusztajn JK,Berse B. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease[J].*Metab Brain Dis*,2000,15(1):45—64.
- [17] Niewiadomska G,Baksalerska-Pazera M,Riedel G. The septo-hippocampal system, learning and recovery of function[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*,2009,33(5): 791—805.
- [18] Goumon Y,Angelone T,Schoentgen F,et al. The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide,the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine- binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology[J]. *J Biol Chem*,2004,279(13): 13054—13064.
- [19] Okita K,Matsukawa N,Maki M,et al. Analysis of DNA variations in promoter region of HCNP gene with Alzheimer's disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2009,379(2): 272—276.
- [20] Maki M,Matsukawa N,Yuasa H,et al.Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*,2002,61(2): 176—185.
- [21] Matsukawa N. The involvement of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide and its precursor in Alzheimer pathogenesis[J]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 2014,34(3):93—100.
- [22] Pláteník J,Kuramoto N,Yoneda Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals [J]. *Life Sci*,2000,67(4): 335—364.
- [23] Ojika K,Mitake S,Tohdoh N,et al. Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP) [J]. *Prog Neurobiol*,2000, 60(1): 37—83.
- [24] Hironaka N,Tanaka K,Izaki Y,et al. Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus:a microdialysis study[J]. *Brain Res*,2001,901(1—2): 143—150.
- [25] 李浩明,张蕾,金国华,等. PEBP在切割穹窿海马伞大鼠海马中的表达变化[J]. *神经解剖学杂志*,2008,24(6):619—624.
- [26] Zou L,Jin G,Zhang X,et al. Proliferation,migration,and neuronal differentiation of the endogenous neural progenitors in hippocampus after fimbria fornix transection[J]. *Int J Neurosci*,2010,120(3): 192—200.
- [27] 张新化,金国华,秦建兵,等. 穹窿海马伞切割侧海马对植入神经干细胞分化为神经元的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2004,20(4):360—364.