

王报捷, 苏丽晴, 张志勇, 等. 5-Aza-CdR 通过 Notch1 通路对小鼠海马神经发生的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 34-39.

Wang BJ, Su LQ, Zhang ZY, et al. Effects of 5-Aza-CdR on hippocampal neurogenesis in mice via the Notch1 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 34-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.004

5-Aza-CdR 通过 Notch1 通路对小鼠海马神经发生的影响

王报捷¹, 苏丽晴¹, 张志勇², 闫磊², 王志广², 包素雅³, 邵国^{4*}

(1. 深圳市龙岗区第三人民医院药学部, 深圳 518112; 2. 包头医学院低氧转化医学重点实验室, 内蒙古 包头 014040; 3. 重庆医科大学, 重庆 400016; 4. 深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心, 深圳 518112)

【摘要】 目的 研究 5-Aza-CdR 对 Notch1 通路影响及神经再生的影响, 并通过小鼠主动回避行为实验来探讨 5-Aza-CdR 对小鼠学习记忆能力的影响。**方法** 将 60 只 6~8 周龄 SPF 级 ICR 雄性小鼠分为两组, 通过侧脑室注射 (i. c. v) 给一组小鼠注射 5-Aza-CdR, 另一组注射 BSA 作为对照组。注射后 24 h 通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测 Notch1 和 HES1 的 mRNA 和蛋白表达水平; 通过激光共聚焦显微镜观察 5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 阳性细胞和海马 DG 中 Notch1 的表达; 用 MS-PCR 检测 Notch1 甲基化变化; 通过穿梭回避实验来评估小鼠的学习和记忆行为。**结果** 注射 5-Aza-CdR 使海马 Notch1 通路活性增加并促进 DG 区神经细胞再生, 降低 Notch1 启动子区甲基化水平, 小鼠主动回避行为能力得到提升。**结论** 5-Aza-CdR 对小鼠主动回避行为的影响可能与 Notch1 通路影响海马神经再生有关。

【关键词】 5-Aza-CdR; 神经发生; Notch1; 学习和记忆

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0034-06

Effects of 5-Aza-CdR on hippocampal neurogenesis in mice via the Notch1 pathway

WANG Baojie¹, SU Liqing¹, ZHANG Zhiyong², YAN Lei², WANG Zhiguang², BAO Suyu³, SHAO Guo^{4*}

(1. Department of Pharmacy, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112, China.

2. Key Laboratory of Hypoxia Translational Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014040.

3. Chongqing Medical University, Chongqing 400016. 4. Center for Translational Medicine, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of 5-Aza-CdR on Notch1 pathway and neural regeneration and to explore the effects of 5-Aza-CdR on learning memory ability in mice by exploring active avoidance behavior. **Methods** Sixty 6~8-week-old SPF-grade ICR male mice were divided into two groups. 5-Aza-CdR was administered to one group of mice via lateral ventricular injection, while the control group was injected with bovine serum albumin. Notch1 and HES1 mRNA and protein expression levels were detected by Real-time PCR and Western blot 24 hours after injection; 5-bromo-2'-deoxyuridine-positive cells were observed by laser confocal microscopy, and Notch1 expression in hippocampal dentate gyrus was viewed with laser confocal microscopy. Notch1 methylation changes were detected by methylation-specific PCR, and learning and memory behaviors of mice were assessed by passive avoidance tests and shuttle avoidance assays. **Results** Injection of 5-Aza-CdR increased hippocampal Notch1 pathway activity, promoted neuronal regeneration in the DG region, decreased methylation levels in the Notch1 promoter region, and enhanced the ability of mice to perform active avoidance

【基金项目】 国家自然科学基金 (82060337); 深圳市科技计划项目基础研究面上项目 (JCYJ20220531092412028, JCYJ20230807121306012); 深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目 (LGKCYLWS2021000033, LGKCYLWS2023025)。

【作者简介】 王报捷 (1980—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药学。E-mail: 908415225@qq.com

【通信作者】 邵国 (1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经保护。E-mail: shao_guo_china@163.com

behavior. **Conclusions** The effect of 5-Aza-CdR on active avoidance behavior may be related to the influence of hippocampal neural regeneration through the Notch1 pathway.

【Keywords】 5-Aza-CdR; neurogenesis; Notch1; learning and memory

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

齿状回(dentate gyrus, DG)产生新的神经元,这有助于海马神经元细胞的可塑性^[1],文献报道 DG 中的成年神经发生在记忆任务中起到一定作用^[2]。Notch 信号通路是多细胞生物中起着重要作用的胚胎发育的跨细胞间的信号传递,可调控大多数组织发育与细胞分化、增殖和凋亡等。有研究表明 Notch 信号通路是大脑神经再生的的一条重要通路并参与学习和记忆的发生^[3-4],而 HES1 是 Notch 信号通路下游效应分子中的代表之一,可通过负性反馈机制抑制 Notch 信号通路的激活从而参与到机体调节中^[5]。一些药物改善了成年神经发生,并可能在治疗行为相关疾病方面发挥潜在作用^[6-8]。5-Aza-CdR 处理可降低人髓系白血病细胞系中 Notch1 的 DNA 甲基化水平增加 Notch1 的表达^[9]。阐明 5-Aza-CdR 处理是否可以在大脑神经细胞中增加 Notch1 表达从而促进神经细胞再生而影响学习记忆,这可能为治疗一些影响学习记忆的疾病提供研究思路。

核苷酸类似物 5-Aza-CdR 是一种去甲基化试剂^[10],5-Aza-CdR 已被 FDA 批准直接或间接用于影响基因的疾病治疗^[11-12]。在表观遗传学研究中,它也被广泛用作抑制 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)^[13]。除去甲基化功能,5-Aza-CdR 在诱导细胞周期、分化、细胞死亡和动物行为方面也发挥了重要作用^[14-17]。基因的甲基化水平与表达水平呈负相关:高甲基化降低基因表达和低甲基化增加基因表达^[18]。本研究 5-Aza-CdR 是否通过下调 Notch1 的 DNA 甲基化诱导其表达,从而促进神经再生来影响学习记忆。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 6~8 周龄 ICR 雄性 SPF 级小鼠(18~22 g)由斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]提供。饲养于斯贝福(北京)生物技术有限公司动物房内[SYXK(京)2021-0038],实验温度适宜,动物自由采食饮水。实验中涉及动物的操作程序得到深圳市龙岗区人民医院实验动物伦理委员会批准(2021035DW),本实验所有操作均符合

中华人民共和国《实验动物管理条例》,实验设计及饲养使用过程均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

5-Aza-CdR、BrdU (Sigma-Aldrich 公司,批号: BCCD66249); TRIzol (Invitrogen 公司,批号: 391303); 反转录试剂盒、2×SYBR Green qPCR Master Mix (TaKaRa 公司,批号: ALF0602A); RIPA 裂解液、ECL 发光液(上海碧云天生物技术有限公司);蛋白酶抑制剂 Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100×) (Thermo Fisher 公司);BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Pierce 公司);兔抗 Notch1 抗体和兔抗 HES1 多克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司);大鼠抗 BrdU 抗体 (Abcam 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的驴抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司);山羊抗兔 Alexa Fluor488 和山羊抗大鼠 Alexa Fluor594 (Invitrogen 公司);DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司);甲基化试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);RIPA 裂解液(碧云天生物技术公司);含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)的封片剂(Vector 公司)。Tanon-IVDT-1 化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);ABI 7900HT 实时 PCR 系统(Applied Biosystems);STT-100 M 穿梭箱测试(成都仪器有限公司);立体定位仪(瑞沃得);激光扫描共聚焦显微镜(尼康 A1)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组

60 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠随机分为两组,实验(5-Aza-CdR 处理)组右侧脑室内注射 10 μmol/L 5-Aza-CdR 5 μL^[16],对照(control)组注射相同体积的 10 g/L BSA。小鼠麻醉后用立体定位仪固定,参考小鼠脑图谱,确定前囟,在前囟后 1.7 mm,矢状缝旁开 1.5 mm 处用颅钻打开颅骨,使用显微注射泵以 1 μL/min 的速率注射 5 min,注射后留针 1 min,防止回流。缓慢退针,缝合伤口。注射 24 h 后进行后续实验。

1.3.2 穿梭主动回避试验

条件回避学习测试通过 STT-100 M 穿梭箱进行

测量。在一侧隔室进行 5 min 的适应,声光刺激 10 s,然后立即进行 10 s 的电刺激。当动物穿越到另一个隔间时,一轮任务完成,条件刺激(conditioned stimulus, CS)或非条件刺激(unconditioned stimulus, UCS)期间的穿越分别被视为回避和逃避反应。训练包括为期 1 d 的 25 次试验,24 h 后重复测试。记录主动回避反应次数。实验持续 3 d。

1.3.3 RNA 提取和定量实时 PCR

使用 TRIzol 试剂从小鼠海马分离总 RNA。使用反转录试剂盒进行逆转录 PCR。定量实时 PCR 在 ABI 7900HT 实时 PCR 系统上进行 3 次。使用 $\Delta\Delta CT$ 值法分析结果。引物序列如下: Notch1-F: CCACCCATGACCACTACCCAGTT; Notch1-R: CCCCGGACCAATCAGAGATGTT; HES1-F: ACCGGACAAACCAAAGAC; HES1-R: ATGCCGGGAGCTATCTTTCT; β -actin-F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG; β -actin-R: CCGTGTAACAATGCCATGT。

1.3.4 Western blot 检测

使用含 PMSF 的 RIPA 裂解液从组织分离总蛋白。蛋白用 SDS/PAGE(12%)在 30 mA 分离 2.5 h,然后转移到 PVDF 膜上。将膜在含 5%脱脂牛奶的 TTBS 缓冲液中孵育 1 h,与一抗孵育过夜,然后在室温下与二抗孵育 1 h。用增强型化学发光检测系统(ECL)检测蛋白印迹。用 Image J 软件检测蛋白表达水平的灰度值。

1.3.5 组织免疫荧光

用 BrdU 和 Notch1 免疫荧光染色检测小鼠齿状回(DG)区神经元再生情况。小鼠腹腔连续 3 d 注射 200 mg/kg BrdU 后处死小鼠,固定脑组织。脑组织进行冷冻切片制成厚度 20 μ m 的切片。兔抗 Notch1 抗体和大鼠抗 BrdU 抗体孵育过夜。切片分别用山羊抗兔 Alexa Fluor488 和山羊抗大鼠 Alexa Fluor594 室温孵育 2 h,用 DAPI 染色。在激光扫描共聚焦显微镜下检查免疫荧光图像。

1.3.6 甲基化特异性 PCR

DNA 提取试剂盒从组织中分离总 DNA。用甲基化试剂盒对 DNA 进行亚硫酸氢盐处理,用 PCR 扩增 1 μ g 修饰 DNA。每个样品分别用两组甲基化 DNA(methylated MS-PCR)和未甲基化 DNA(unmethylated MS-PCR)引物进行扩增。用于甲基化和非甲基化 Notch1 基因启动子区域的引物如下: Notch1-MF: TGATTTTAAACGATGATGGC; Notch1-

MR: AAAAAATCGAAAACGCAATCTA; Notch1-UMF: GTTTGATTAAATGATGATGGT; Notch1-UMR: ACTAA AAATCAAAAACACAATCTA。用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 Notch1 甲基化和非甲基化的 PCR 产物。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)表示。行为检验采用重复测量单因素方差分析和 Man-Whitney U 检验。其余结果采用单因素方差分析(one-way ANOVA)或双侧 t 检验(SPSS 软件)完成。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 对小鼠海马组织 Notch1 和 HES1 表达的影响

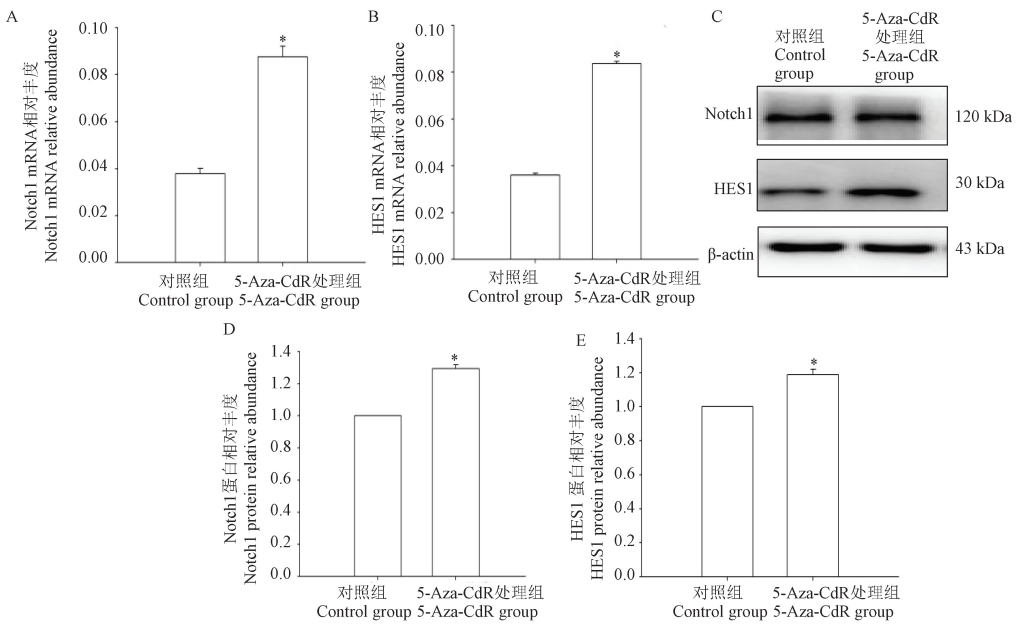
如图 1A、1B 所示,5-Aza-CdR 处理后,通过 Real-time PCR 检测小鼠海马组织 Notch1 和 HES1 mRNA 转录水平。与对照组相比,5-Aza-CdR 处理组 Notch1 和 HES1 mRNA 水平均显著升高($P<0.05$, $n=3$),这提示 5-Aza-CdR 诱导 Notch1 和 HES1 mRNA 基因表达增加,Western blot 实验用相应抗体检测 5-Aza-CdR 处理组和对照组 Notch1 和 HES1 蛋白水平(1C)。与对照组相比,海马组织 Notch1 和 HES1 蛋白均显著升高(图 1D、1E, $P<0.05$),提示 5-Aza-CdR 发挥作用,影响小鼠海马组织 Notch1 和 HES1 表达。

2.2 5-Aza-CdR 促进小鼠海马 DG 区神经元再生

为了进一步研究 5-Aza-CdR 对小鼠海马中与记忆相关的神经元细胞再生的影响,用免疫荧光标记法检测海马 DG 中 Notch1 和 BrdU 阳性细胞。免疫荧光染色显示,与对照组相比,5-Aza-CdR 处理组的 BrdU 和 Notch1 显著增加(图 2A~2D, $P<0.05$)。BrdU 与 Notch1 呈正相关,有统计学意义(图 2E, $r=0.927$, $P<0.05$)。这说明 5-Aza-CdR 可促进神经发生。

2.3 5-Aza-CdR 对小鼠海马 Notch1 启动子甲基化水平的影响

用 MS-PCR 检测 Notch1 的甲基化水平。与对照组 Notch1 启动子未甲基化水平($17.9\%\pm 2.95\%$)相比,5-Aza-CdR 处理组($56.2\%\pm 3.2\%$)显著升高($P<0.05$);与对照组 Notch1 启动子甲基化水平($82.1\%\pm 2.95\%$)相比,5-Aza-CdR 处理组($43.8\%\pm 3.2\%$)显著下降($P<0.05$)。处理组的甲基化与未甲基化水平均和对照组有显著性差异($P<0.05$,图 3)。

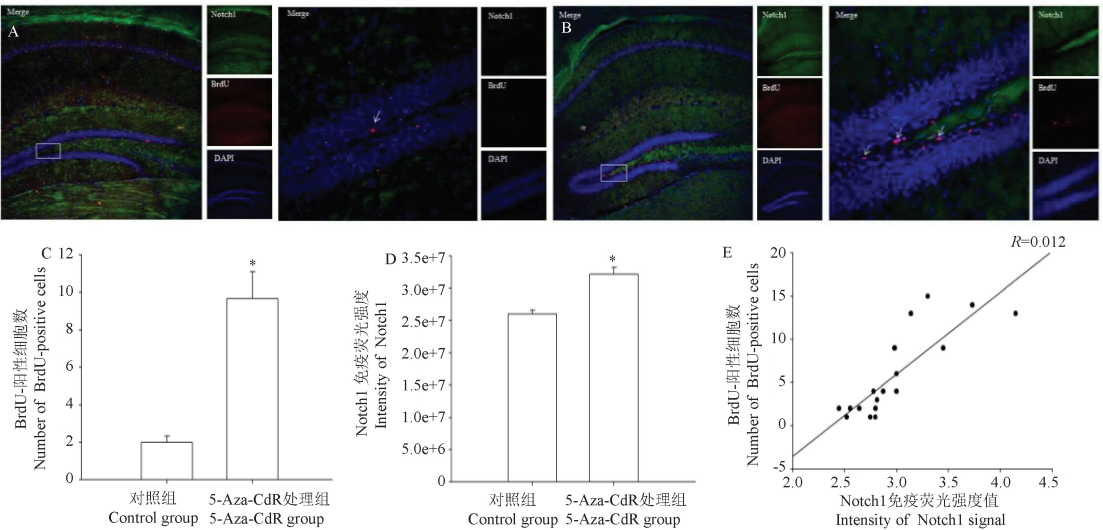


注:A:Notch1 mRNA 相对丰度值;B:HES1 mRNA 相对丰度值;C:Notch1、HES1 和 β-actin 免疫印迹图;D:Notch1 蛋白相对丰度值;E:HES1 蛋白相对丰度值。与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 1 5-Aza-CdR 处理提高小鼠海马 Notch1 和 HES1 mRNA 和蛋白表达($n=3$)

Note. A, Notch1 mRNA relative abundance value. B, HES1 mRNA relative abundance value. C, Immunoblot of Notch1, HES1 and β-actin. D, Notch1 protein relative abundance value. E, HES1 protein relative abundance value. Compared with control group, * $P<0.05$.

Figure 1 5-Aza-CdR treatment increases Notch1 and HES1 mRNA and protein expression in mouse hippocampus



注:A:对照组小鼠海马 DG 中 Notch1 和 BrdU 阳性细胞;B:5-Aza-CdR 处理组小鼠海马 DG 中 Notch1 和 BrdU 阳性细胞;C:小鼠海马 DG 中 BrdU 阳性细胞数;D:小鼠海马 DG 中 Notch1 免疫荧光强度值;E:BrdU 阳性细胞数和 Notch1 免疫荧光强度值相关性。通过检测 BrdU 阳性细胞数代表神经细胞新生,启动子甲基化和非甲基化水平,与对照组相比, * $P<0.05$ 。

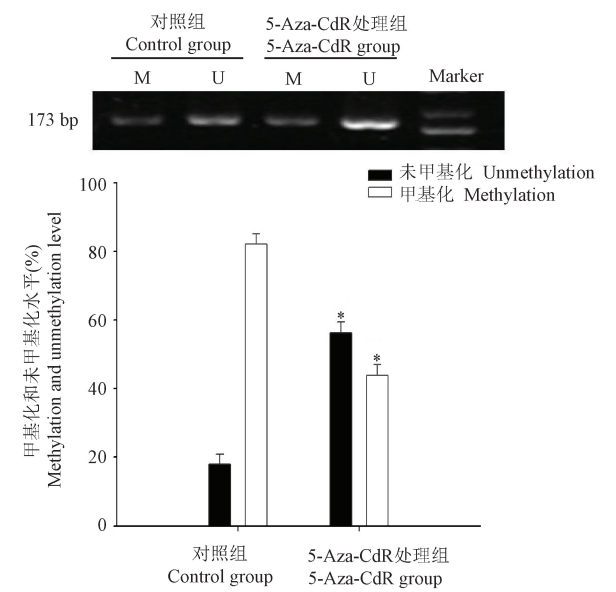
图 2 激光共聚焦分析 5-Aza-CdR 处理对小鼠海马 DG 脑区神经元新生和 Notch1 表达的影响($n=5$)

Note. A, Notch1 and BrdU-positive cells in the hippocampal DG of control mice. B, Notch1 and BrdU-positive cells in the hippocampal DG of 5-Aza-CdR-treated mice. C, Number of BrdU-positive cells in the hippocampal DG of mice. D, Immunofluorescence intensity values of Notch1 in the hippocampal DG of mice. E, Correlation between BrdU-positive cell number and Notch1 immunofluorescence intensity values. The number of BrdU-positive cells represents neuronal cell neoplasia, promoter methylation and non-methylation levels by assay. Compared with control group, * $P<0.05$.

Figure 2 Laser confocal analysis of the effects of 5-Aza-CdR treatment on neuronal neogenesis and Notch1 expression in mouse hippocampal DG brain regions

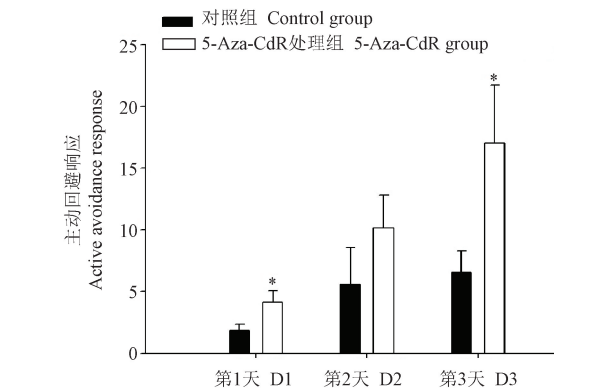
2.4 5-Aza-CdR 影响小鼠学习记忆能力

通过条件回避学习测试,发现侧脑室注射 5-Aza-CdR 的实验组小鼠在实验过程中主动回避行为能力得到提升(图 4),提示 5-Aza-CdR 发挥作用,影响小鼠学习记忆能力。



注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。
图 3 5-Aza-CdR 处理对小鼠海马 Notch1 记忆启动子区 DNA 甲基化的影响($n=3$)

Note. Compared with control group, * $P<0.05$.
Figure 3 Effect of 5-Aza-CdR treatment on DNA methylation in the Notch1 memory promoter region of mouse hippocampus



注:实验分成训练和测试两个阶段,两个阶段间隔 24 h,测试 3 d。与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 5-Aza-CdR 处理增加小鼠条件回避学习能力($n=20$)

Note. Experiment was divided into two phases, training and testing, with 24 h between phases and 3 days of testing. Compared with control group, * $P<0.05$.

Figure 4 5-Aza-CdR treatment increases conditioned avoidance learning in mice

3 讨论

在本研究中,5-Aza-CdR 处理可降低海马中 Notch1 启动子 DNA 甲基化水平,增加 Notch1 和 HES1 的表达。5-Aza-CdR 可与 DNA 结合或改变 DNMTs 表达,降低细胞 DNA 甲基化水平^[15]。5-Aza-CdR 治疗可降低人髓系白血病细胞系 Notch1 DNA 甲基化水平^[9]。Chen 等^[19]报道 Ten-11 易位(Tet)蛋白降低 Notch1 启动子 DNA 甲基化水平和激活 Notch 信号。DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 获批用于临床治疗。因此利用 5-Aza-CdR 处理可以增加神经细胞 Notch1 的表达,为其在神经系统治疗与 Notch1 通路有关疾病进行探索。

Notch 信号通常与海马神经干细胞(neural stem cell, NSCs)增殖有关。Notch1 信号的激活对海马 DG 神经元增殖分化有显著影响^[20]。同时,BrdU 阳性细胞数量可用于评估 NSCs 的增殖^[21]。本实验研究结果显示,免疫荧光显示 5-Aza-CdR 处理组 DG 中的神经发生细胞(BrdU⁺细胞)数量明显高于对照组 DG。同时,BrdU⁺细胞数量与 Notch1 免疫荧光信号呈正相关。本实验研究结果表明,5-Aza-CdR 诱导的 Notch1 信号的增加可能有助于小鼠海马 DG 区神经发生。Guentchev 等^[22]报道显示,低水平的 Notch1 活性形式促进干细胞增殖。因此,5-Aza-CdR 脑室注射实验结果表明 Notch1 信号上调有助于小鼠神经发生。

DNA 甲基化在学习和记忆中发挥作用^[23-24]。DNMTs 可通过催化 CpG 二核苷酸中胞嘧啶核苷酸 5-C 位置的 DNA 甲基化来影响基因表达^[25]。DNMTs 以细胞和神经环路等方式促进学习和记忆^[26]。Argyrousi 等^[26]发现,试验前给药 DNMT 抑制剂 RG108 可导致剂量依赖性的短时程学习记忆增加,处理 48 h 后 DNMT 抑制剂 RG108 不再起作用。侧脑室内注射 5-Aza-CdR 可提高小鼠的空间认知能力和恐惧规避能力^[16,27],Hernaiz 等^[28]表明,杏仁核(LA)内外侧核灌注 5-Aza-CdR 会提升恐惧记忆。而本研究发现 5-Aza-CdR 增加了条件回避学习记忆能力,这种能力可能与 DNA 甲基化调节 Notch1 活性,进而增加神经细胞再生有关。

综上所述,本研究证明侧脑室注射 5-Aza-CdR 可以激活海马脑区 Notch1 信号通路并增加小鼠海马 DG 区神经细胞的再生,Notch1 信号通路变化与 Notch1 启动子区甲基化水平有关。此外,5-Aza-CdR

可以促进小鼠主动回避的行为。本研究为 5-Aza-CdR 治疗神经系统与学习记忆相关的疾病提供了思路。总之,本实验研究结果表明,5-Aza-CdR 改善海马神经发生可能与促进某些记忆任务的 Notch1 信号通路有关。

参考文献:

- [1] Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis; beyond learning and memory [J]. *Annu Rev Psychol*, 2015, 66: 53–81.
- [2] Schoenfeld TJ, Swanson C. A runner's high for new neurons? potential role for endorphins in exercise effects on adult neurogenesis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1077.
- [3] Alberi L, Hoey SE, Brai E, et al. Notch signaling in the brain; in good and bad times [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(3): 801–814.
- [4] Imayoshi I, Kageyama R. The role of Notch signaling in adult neurogenesis [J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 44(1): 7–12.
- [5] Acar N, Soyly H, Avci S, et al. Expressions of Notch signalling pathway members during early pregnancy in mice [J]. *J Mol Histol*, 2023, 54(4): 297–312.
- [6] Piermartini TCB, dos Santos B, Barros-Aragão FGQ, et al. Guanosine promotes proliferation in neural stem cells from hippocampus and neurogenesis in adult mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(9): 3814–3826.
- [7] Cai NN, Wang ZZ, Zhu XC, et al. Schisandrin A and B enhance the dentate gyrus neurogenesis in mouse hippocampus [J]. *J Chem Neuroanat*, 2020, 105: 101751.
- [8] Yuan L, Sun S, Pan X, et al. Pseudoginsenoside-F11 improves long-term neurological function and promotes neurogenesis after transient cerebral ischemia in mice [J]. *Neurochem Int*, 2020, 133: 104586.
- [9] Gawlitz AL, Speith J, Rinke J, et al. 5-azacytidine modulates CpG methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in myelodysplastic syndromes [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(11): 2835–2843.
- [10] Desjobert C, El Maï M, Gérard-Hirne T, et al. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells [J]. *Epigenetics*, 2015, 10(1): 82–91.
- [11] Dastjerdi MN, Babazadeh Z, Salehi M, et al. Comparison of the anti-cancer effect of Disulfiram and 5-Aza-CdR on pancreatic cancer cell line PANC-1 [J]. *Adv Biomed Res*, 2014, 3: 156.
- [12] Yang X, Lay F, Han H, et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(11): 536–546.
- [13] Frühwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential [J]. *Mol Genet Metab*, 2002, 75(1): 1–16.
- [14] Zhu WG, Hileman T, Ke Y, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell

- proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15161–15166.
- [15] Yang J, Tian X, Yang J, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine, a DNA methylation inhibitor, induces cytotoxicity, cell cycle dynamics and alters expression of DNA methyltransferase 1 and 3A in mouse hippocampus-derived neuronal HT22 cells [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2017, 80(22): 1222–1229.
- [16] Zhang Z, Yang J, Liu X, et al. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on expression of PP1γ in learning and memory [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 277–283.
- [17] Cisneros FJ, Branch S. Transplacental exposure to the DNA demethylating agent, 5-AZA-CdR, affects the sexual behavior of CD-1 male mice [J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25(3): 411–417.
- [18] Meller R, Pearson A, Simon RP. Dynamic changes in DNA methylation in ischemic tolerance [J]. *Front Neurol*, 2015, 6: 102.
- [19] Chen W, Liu N, Shen S, et al. Fetal growth restriction impairs hippocampal neurogenesis and cognition via Tet1 in offspring [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(5): 109912.
- [20] Zhuang J, Wei Q, Lin Z, et al. Effects of ADAM10 deletion on Notch-1 signaling pathway and neuronal maintenance in adult mouse brain [J]. *Gene*, 2015, 555(2): 150–158.
- [21] Takemura S, Kayama T, Kuge A, et al. Correlation between copper/zinc superoxide dismutase and the proliferation of neural stem cells in aging and following focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosurg*, 2006, 104(1): 129–136.
- [22] Guentchev M, McKay RD. Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(9): 2289–2296.
- [23] Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation [J]. *Neuron*, 2007, 53(6): 857–869.
- [24] Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation; in the right place at the right time [J]. *Science*, 2018, 361(6409): 1336–1340.
- [25] Bayraktar G, Kreutz MR. Neuronal DNA methyltransferases: epigenetic mediators between synaptic activity and gene expression? [J]. *Neuroscientist*, 2018, 24(2): 171–185.
- [26] Argyrousi EK, de Nijs L, Lagatta DC, et al. Effects of DNA methyltransferase inhibition on pattern separation performance in mice [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, 159: 6–15.
- [27] Zhang X, Xie Y, Xu W, et al. Effects of 5-Aza on p-Y1472 NR2B related to learning and memory in the mouse hippocampus [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 701–707.
- [28] Hernaiz A, Sentre S, Betancor M, et al. 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Scrapie-Infected Sheep and Mouse Brain Tissues [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1621.