基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1642-04

# BDNF 对新生鼠缺血缺氧性脑损伤的保护作用的研究

徐晓晓,周江堡

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究提前给予脑源性神经生长因子(Brain-derived neurotrophic factor,BDNF)对新生鼠的缺血缺氧性脑损伤(Hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)的保护作用。方法:选取 7 d 龄 Wistar 大鼠 256 只,随机分成 4 组,①假手术组($n$=64,A),②模型组($n$=64,B),③模型前给药组($n$=64,C),④模型后给药组($n$=64,D),每组又分为 1、3、5、7 d 4 个时间点,每个时间点 8 只,用免疫组织化学和实时荧光定量 PCR 方法检测脑组织中海马区域的 Trk-B 和 p75 的表达水平。结果:模型前注射组和模型后注射组的 Trk-B 和 p75 水平分别与对照组和假手术组比较均有显著性差异 ($P$<0.05)。结论:缺血缺氧模型前给予 BDNF 可保护 HIBD 引起的脑损伤,其可能机制是通过提高 Trk-B 的表达水平和降低 p75 的表达水平来发挥作用的。

【关键词】脑缺血;脑缺氧;脑源性神经生长因子;Trk-B;p75

【中国图书分类法分类号】R748 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-02

# Protective effect of BDNF to newborn rats with hypoxic-ischemic brain damage

*XU Xiao-xiao, et al*

(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the protective effect of BDNF to newborn rats with hypoxic-ischemic brain damage before the modeling. *Methods*: Two hundred and fifty-six 7-day-old Wistar rats were randomly divided into four groups: sham operation group($n$=64,A); model group($n$=64,B); model pre-treated group ($n$=64,C); model post-treated group ($n$=64,D),every group are further divided into 1、3、5、7 d four time points ($n$=8)。The expression of Trk-B and p75 in Hippocampus was examined with immunohisto chemical staining and real-time PCR. *Results*: Trk-B and p75 levels in model pre-treated group and model post-treated group, had significant differences compaed with model group and sham operation group, $P$<0.05. *Conclusion*: BDNF has a protective effect to the brain injury caused by HIBD. Enhancing the expression of Trk-B levels and reduce the expression level of p75 may play a role.

【Key words】Hypoxic; Ischemia; BDNF; Trk-B; p75

脑源性神经生长因子(Brain-derived neurotrophic factor,BDNF)是在脑内合成的一种蛋白质,它广泛分布于中枢神经系统,对神经元的存活、分化、生长发育起着重要作用,并能防止神经元受损后死亡、改善神经元的病理状态、促进受损伤神经元再生及分化等生物效应;也是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必需[1]。本实验主要研究模型前给予 BDNF 对缺血缺氧性新生大鼠模型的脑保护作用及其可能机制,为缺血缺氧性脑损伤(Hypoxic ischemic brain damage,HIBD)临床治疗提供理论依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

BDNF 购自美国 Peprotech 公司,Trk-B 抗体购自 Bioword 公司,p75 抗体购自博奥森试剂公司,二抗试剂盒购自中杉公司,SYBR 试剂购自天根试剂公司,逆转录试剂盒购自 Takara 试剂公司,引物由 Invitrogen 公司合成,7 d 龄新生 Wistar 大鼠购于重庆医科大学动物中心。

作者介绍:徐晓晓(1984-),女,硕士,研究方向:神经康复。

通讯作者:周江堡,男,教授,E-mail:zhoujb1115@yahoo.com.cn。

### 1.2 动物模型制作及标本收集

选取 256 只新生 Wistar 大鼠,随机分成 4 个组:①假手术组($n$=64,A);②模型组($n$=64,B);③模型前给药组($n$=64,C);④模型后给药组($n$=64,D)。每组又分为 1、3、5、7 d 4 个时间点。

新生大鼠 HIBD 模型制作:按照 RICE 法[2],大鼠乙醚吸入麻醉后取仰卧位,四肢固定于手术板,取颈正中切口,分离并以丝线结扎左颈总动脉。假手术组动物麻醉后分离颈总动脉,不予结扎,缝合皮肤;侧脑室注射生理盐水 0.5 ml/kg;模型组,HIBD 模型完成后给予侧脑室注射生理盐水 0.5 ml/kg;模型前给药组,在做 HIBD 模型前 24 h 侧脑室注入 1 mg/kg 的 BDNF;模型后给药组,脑缺血缺氧后立即侧脑室注射 1

mg/kg 的 BDNF，每只大鼠整个手术过程不超过 6 min。手术后将新生鼠放回母鼠身边休息 2～3 h，将模型组、模型前给药组、模型后给药组放入 2 L 密闭容器，置于 37℃水浴中，以 2～3 L/min 的速度输入含 8 %氧气和 92 %氮气的混合气体，持续 2 h 后将鼠取出；假手术组正常喂养。处理结束后放回笼中饲养。在 1、3、5、7 d 时每组取 8 只新生鼠，水合氯醛麻醉动物，打开胸腔暴露心脏，经左心室插管至主动脉起始处，剪开右心耳，进行灌注固定。先用生理盐水 200～300 ml 快速冲洗。至流出清亮液体，再用 4%的多聚甲醛进行原位灌注固定，迅速取脑，放入 4%多聚甲醛中固定。另取 128 只大鼠在相同的时间点断头，取脑，放入液氮中保存。

### 1.3 HE 染色和免疫组织化学检测

标本用多聚甲醛固定 24 h 后，放入 PBS(0.01 mmol/L pH 7.25～7.35)中冲洗 12 h，然后脱水，石蜡包埋，用切片机切 5 μm 厚度的标本，常规 HE 染色，观察海马及脑组织的基本病理组织学改变，SP 法进行免疫组化染色，光镜下观察海马区域的 Trk-B 和 p75 的表达情况，每张切片随机取 6 个测量区测定其灰度值，每个测量区像素量一致(约 1 000 个像素)，测量值减去相应空白对照区的测量值后得到大脑皮层的最终灰度值，取其平均值，即 IOD 值。

### 1.4 总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR

取脑组织 30 mg 左右，常规提取 RNA，RNA 用分光光度计测量。根据不同的 RNA 浓度，按照 10 μl 体系需要 500 ng RNA 来反应，把提取的 RNA 按照说明书要求制备逆转录反应体系。反应条件是 37℃，15 min，85℃，5 s。引物：β-actin，上游引物 P1:5'-GAAAGAACCGCACCCG TAGC-3'，下游引物 P2:5'-GGCCCAAGCACTGTCCAAAG-3'(扩增产物长度 168 bp)，退火温度 60℃；P75 上游引物 P1:5'-GCCAAAGAAGA GGATTACG-3'，下游引物 P2:5'-CATCCCTGTCAACAAGCA C-3'(扩增产物长度 200 bp)，退火温度 61℃；Trk-B 上游引物 P1:5'-GGGGCTTATGCTTGCTGGTC-3'，下游引物 P2:5'-C TCTGGGTCAATGCTGTTAGGTT-3'(扩增产物长度 152 bp)，退火温度 61℃；均为 40 个循环。反应完成后根据 Ct 值比较目的基因的相对表达量。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较均采用两因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-$t$ 检验，$P<0.05$ 为具有统计学意义。

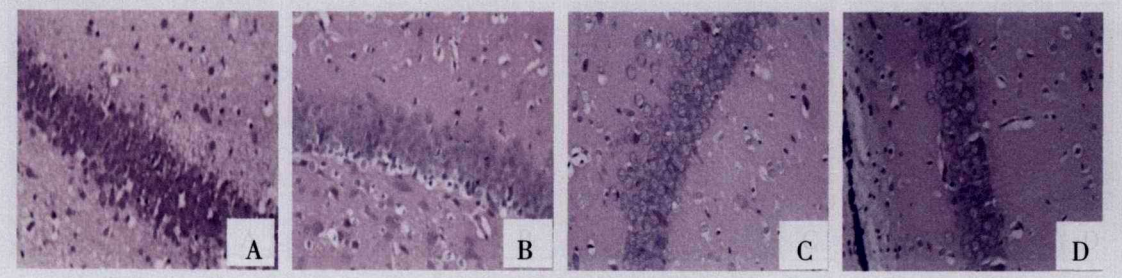
## 2 结 果

### 2.1 HE 染色

光镜下可见假手术组海马各部位结构及细胞层次清楚(见图 1)，细胞形态结构清晰完整，核仁清楚。HIBD 模型组海马损伤严重，镜下可见神经细胞变性、坏死、崩解，表现为组织结构不清、细胞肿胀、核膜、核仁不清，有的细胞内容物释放，仅留下一细胞轮廓，并有中性粒细胞浸润。镜下还可见部分凋亡的神经细胞，表现为细胞皱缩变圆，与邻近细胞脱离接触，核固缩变圆，胞浆深染。模型前给药组和模型后给药组海马损伤明显较模型组损伤轻。

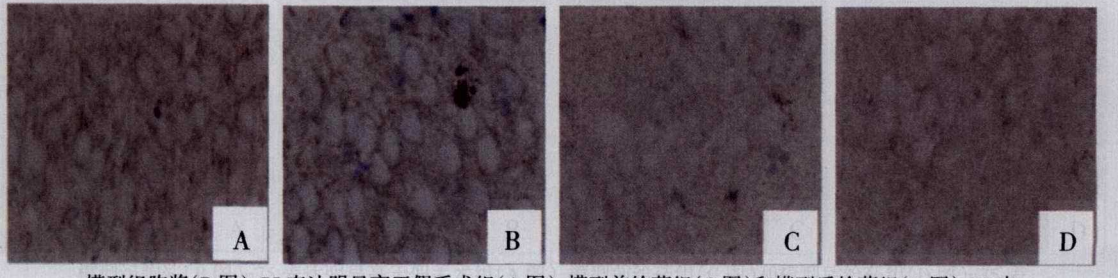
### 2.2 免疫组化结果

免疫组织化学分析海马 p75 与 Trk-B 在各组的表达情况各异(见图 2,3)。p75 表达水平以模型组最高，以模型前给药组的水平最低；在同一组内，不同时间点 p75 表达水平无明显差异。而 Trk-B 以模型前给药组增高最明显，假手术组和模型组表达水平较低；在同一组内，不同时间点 Trk-B




模型组(B 图)与假手术组(A 图)相比有明显的细胞凋亡，模型前给药组(C 图)和模型后给药组(D 图)与 B 图相比，神经细胞凋亡明显减少，其中 C 图和 D 图相比改善更明显

**图 1 大鼠建模后 3 d 时海马 HE 染色(×400)**




模型组胞浆(B 图)p75 表达明显高于假手术组(A 图)，模型前给药组(C 图)和模型后给药组(D 图)p75 表达较少

**图 2 A、B、C、D 组 3 d 时海马区域 p75 免疫组化表达情况(×400)**

表达水平无明显差异。对实验图像进行 Ipp 软件分析结果显示各时间点上模型前给药组 p75 明显低于模型组和假手术组（见表 1），与光镜结果一致，$P<0.05$；模型后给药组 p75 表达水平与模型组和假手术组比较，$P<0.05$。而 Trk-B 在模型前给药组表达水平较模型组和假手术组明显增高，$P<0.05$；模型后给药组较模型组和假手术组表达增高，$P<0.05$。

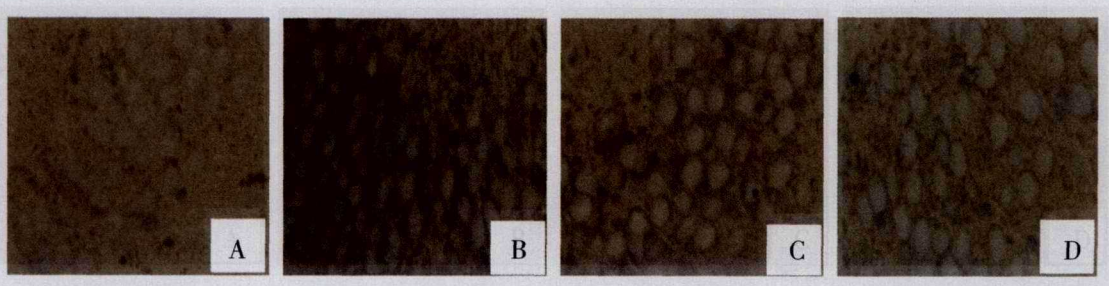
2.3 Realtime-PCR 结果分析

运用 RT-PCR 检测大脑 p75 表达水平时，发现模型前给药组和模型后给药组各时间点表达水平明显低于模型组和假手术组（见表 2），$P<0.05$；在同一组内，各时间点其表达无明显差异，$P>0.05$，与免疫组化结果相吻合。Trk-B 在各组表达情况为：模型前给药组和模型后给药组各时间点表达水平明显高于模型组和假手术组，$P<0.05$，并且模型前给药组高于模型后给药组；在同一组内，各时间点 Trk-B 表达水平也无明显差异，$P>0.05$。

## 3 讨 论

HIBD 是儿科常见的临床并发症，主要由围产期窒息引起，可引起新生儿一系列病理生理改变，严重的可引起神经系统后遗症。HIBD 发病机制复杂，机体代谢过程中产生的自由基及脂质过氧化作用参与了脑缺血缺氧后神经细胞的损伤。神经细胞膜含有多价不饱和脂肪酸，极易受自由基攻击，引发脂质过氧化反应，与此同时产生的一些抑制因子如 NO-GO 蛋白，NOGO 蛋白是神经轴突生长的主要抑制因子，这进一步加重了损伤过程[3]。

BDNF 在脑中分布广泛（皮质、海马、基底节、顶叶、颞叶等），除了对神经元的生存、生长、分化和维持神经元正常的生理功能起关键作用，同时还具有抵抗伤害性刺激的作用。酪氨酸激酶 B（Kinase B，Trk-B）是 BDNF 的特异的功能受




模型前给药组胞浆（C 图）Trk-B 表达水平明显高于假手术组（A 图）和模型组（B 图），模型后给药组（D 图）Trk-B 表达水平也高于假手术组（A 图）和（B 图）模型组

**图 3 A、B、C、D 组 3 d 时海马区域 Trk-B 免疫组表达情况（×400）**

**表 1 p75、Trk-B 在海马的表达（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | n | 1 d | | n | 3 d | | n | 5 d | | n | 7 d | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | p75 | Trk-B | | p75 | Trk-B | | p75 | Trk-B | | p75 | Trk-B |
| 假手术组 | 8 | 0.264±0.035 | 0.201±0.042 | 8 | 0.257±0.039 | 0.241±0.038 | 8 | 0.262±0.043 | 0.197±0.041 | 8 | 0.310±0.038 | 0.228±0.033 |
| 模型组 | 8 | 0.317±0.046 | 0.171±0.043 | 8 | 0.310±0.032 | 0.194±0.040 | 8 | 0.304±0.071 | 0.169±0.038 | 8 | 0.308±0.050 | 0.201±0.029 |
| 模型前给药组 | 8 | 0.171±0.029● | 0.393±0.128◇ | 8 | 0.154±0.037● | 0.318±0.094◇ | 8 | 0.137±0.033● | 0.347±0.097◇ | 8 | 0.170±0.056● | 0.321±0.116◇ |
| 模型后给药组 | 8 | 0.187±0.039▼ | 0.287±0.038☆ | 8 | 0.211±0.036▼ | 0.271±0.043☆ | 8 | 0.198±0.029▼ | 0.301±0.018☆ | 8 | 0.234±0.029▼ | 0.335±0.024☆ |

注：●表示与模型组、假手术组比较 $P<0.05$，◇表示与模型组、假手术组比较 $P<0.05$，□▼表示与模型组、假手术组比较 $P<0.05$，☆表示与模型组、假手术组比较 $P<0.05$

**表 2 p75、Trk-B 在脑组织的表达（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | n | 1 d | | n | 3 d | | n | 5 d | | n | 7 d | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | p75 | Trk-B | | p75 | Trk-B | | p75 | Trk-B | | p75 | Trk-B |
| 假手术组 | 8 | 60.85±7.54 | 0.87±0.13 | 8 | 65.24±8.90 | 13.59±2.39 | 8 | 67.09±26.43 | 27.12±5.13 | 8 | 92.40±15.83 | 62.78±0.92 |
| 模型组 | 8 | 54.33±1.41 | 3.12±0.38 | 8 | 121.03±26.87 | 8.26±0.84 | 8 | 130.42±18.44 | 12.49±1.32 | 8 | 197.03±25.78 | 29.34±5.52 |
| 模型前给药组 | 8 | 6.41±2.09● | 15.03±4.56★ | 8 | 7.42±0.04● | 30.63±8.93★ | 8 | 9.54±1.85● | 55.10±15.51★ | 8 | 53.39±2.21● | 59.59±7.92 |
| 模型后给药组 | 8 | 1.12±0.12■ | 19.31±11.36▼ | 8 | 34.75±5.47■ | 23.04±4.33▼ | 8 | 45.25±11.15■ | 25.63±0.51 | 8 | 67.52±9.43■ | 48.47±2.32▼ |

●表示与假手术组、模型组比较 $P<0.05$，★表示与假手术组、模型组比较 $P<0.05$，■表示与假手术组、模型组比较 $P<0.05$，▼表示与假手术组、模型组比较 $P<0.05$

体,BDNF 的作用可以通过 Trk-B 来实现[4]。神经营养素受体 p75(p75 neurotrophin receptor,p75NTR)是肿瘤坏死因子受体Ⅰ(Tumor necrosis factor receptor I,TNFR Ⅰ)家族中的一员,分布非常广泛,而且能与神经生长因子、BDNF 等诸多神经营养因子以低亲和力结合[5]。HIBD 目前已经成为脑损伤的最经典模型,从实验结果可以看到模型前给药组 Trk-B 表达都是明显高于对照组和假手术组,而 p75 的表达水平明显低于对照组和假手术组。我们在大鼠脑损伤发生之前给予 BDNF,可能是提前诱导 Trk-B 产生,抑制 p75 的表达,从而阻断 p75 介导的凋亡过程,对脑组织起到保护作用。p75 作为 NGF 的低亲合力受体,本身对 BDNF 不会产生效应,而 p75NTR 介导的凋亡多发生在 Trk-B 受体不表达或低表达的神经细胞。但是当 Trk-B 存在时,两者协同对 BDNF 作出反应,BDNF 可以引起 Trk-B 的磷酸化维持神经细胞的稳定性,保护神经细胞不受损害[6]。在基因水平上,我们同样可以看到,模型前给药组较模型组的 Trk-B mRNA 表达水平明显增高,p75 mRNA 明显降低,由此证明提前给予 BDNF 不但可以增加Trk-B 的产生,还可以通过提高 Trk-B 受体的活性,降低 p75 引起的神经元细胞的凋亡,使神经元自身保护能力增强,以此抵抗各种原因引起的脑损伤。

目前,大量的实验已经证实 BDNF 对损伤的神经细胞有修复作用,已有实验证明脑缺血损伤中也存在 p75 NTR 的表达增高, 阻断其信号可以延缓病情发生和促进细胞存活。BDNF 与 Trk-B 相结合,可以产生相应的效应而对缺血神经元起修复作用,BDNF 能促进突触的可塑性,改变脑内神经元的形态,增加突触终末的密度和促进树突和轴突的生长[7-11]。而我们实验中的模型后给药组再一次证明了这一点。

综上所述,BDNF 对于脑损伤的修复作用已经得到证实,但对于他的保护机制研究的还比较少,我们在本实验中证实了提前给予 BDNF 对脑组织有明显的保护作用,其机制可能是通过增加 Trk-B 的产生并提高它的活性,同时降低 p75 的表达水平来发挥预防性作用。

## 参 考 文 献


[1] Dunham J S, Deakin J F, Miyajima F, et al. Expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains[J]. J Psychiatry research, 2009, 43(14): 1175-1184.

[2] Rice J E, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J].Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.

[3] Zhou X G, Liu R H, Xiong A H, et al. Effect of ventricle injection of Nogo-A antibody on neuronal regeneration following hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat[J].zhong guo dang dai er ke za zhi, 2007, 9(4): 301-304.

[4] Ferrer I, Ballabriga H, Marti E, et al. BDNF and Trk-B co-Localize in CA1 neurons resistant to transient forebrain ischemia in the adult gerbil [J].Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56(7): 790-797.

[5] Liu W, Cheng Y, Wang Q. Brain-derived neurotrophic factor and cerebral ischemic injury[J].Cerebrovasc Disc Fore Med Sci, 2004, 12(6): 433-436.

[6] Teng H K, Teng K K, Lee R, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin[J].J Neurosci, 2005, 25(22): 5455-5463.

[7] Han'ington A W, Leiner B, Blechschmitt C, et al.Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(16): 6226-6230.

[8] Kim M W, Bang M S, Han T R, et al.Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain [J].Brain Res, 2005, 1052(1): 16-21.

[9] Lang E M, Asan E, Plesnila N, et al.*Motoneuron survival after C7* nerve root avulsion and replantation in the adult rabbit: Effect of local ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor application [J].Plast Reconstr Surg, 2005, 115(7): 2042-2050.

[10] Kim M W, Bang M S, Han T R, et al.Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain [J].Brain Res, 2005, 1052(1): 16-21.

[11] Mertz K, Koscheck T, Sehilling K. Brain derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells[J]. *Neur Science*, 2000, 97(2): 303-310.


(责任编辑:关蕴良)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132