论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1334-04

HSP70被抗体封闭后对星形胶质细胞损伤后BDNF表达的影响

宋 进[1],张杰敏[2],陈阳美[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010;2. 浙江省衢州市衢化医院,衢州 324004)

【摘 要】目的:探讨用抗体封闭热休克蛋白70(Heat shock protein70,HSP70)后对星形胶质细胞损伤后表达脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotropic factor,BDNF)的影响。方法:原代培养并纯化星形胶质细胞,采用划痕损伤法构建细胞损伤模型,通过培养液内加入HSP70抗体来进行干预。在不同时间点对对照组和损伤干预组进行BDNF免疫细胞化学染色,观察细胞增生情况及BDNF的表达强度,并用RT-PCR检测BDNFmRNA的表达水平。结果:与对照组相比,干预组BDNF的表达明显减弱($P<0.05$,$P<0.01$),GFAPmRNA的表达也明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。结论:星形胶质细胞损伤后,HSP70可能具有促进星形胶质细胞表达BDNF的作用。

【关键词】星形胶质细胞;划痕损伤;热休克蛋白70;抗体;脑源性神经营养因子

【中国图书分类法分类号】R651.1+5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-12

Effect of antibody-blocked HSP70 on the expression of BDNF in injured astrocytes

SONG Jin,et al

(*Department of Neurology,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study its effect on the expression of BDNF from injured astrocytes after HSP70 were blocked by HSP70-antibody. *Methods*:We performed scratch injuries in the cultured rat astrocytes,and added HSP70-antibody into the nutrient medium at once after injury(intervention group).Then,at 30min,24h,4d,7d after injury,the expression of brain-derived neurotropic factor(BDNF)was studied by immunocytochemical and reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR).The immunocytochemical pictures were analyzed by image analysis system to abtain the average optical density of BDNF. *Results*: The expression of BDNF increased gradually with injury time.Compared with the control group,the average optical density of BDNF in the intervention group were significantly reduced($P<0.05$,$P<0.01$).The expresstion of BDNFmRNA was down-regulated in the intervention group($P<0.05$,$P<0.01$). *Conclusion*:HSP70 may play a role in the production of BDNF from injured astrocytes.

【Key Words】 Astrocyte;Scratch injuries;Heat shock protein70(HSP70);Antibody;Brain-derived neurotropic factor(BDNF)

中枢神经系统受到损伤后,星形胶质细胞(Astrocyte,Ast)对神经元的保护作用是近几年来神经科学研究的热点。星形胶质细胞一方面反应性增生并最终形成胶质瘢痕,另一方面分泌大量的神经营养因子,如神经生长因子(Never growth factor,NGF),脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotropic,BDNF)等,为损伤组织提供一个良好的修复环境,有助于神经元再生。前期实验已证明Ast损伤后热休克蛋白70(Heat shock protein70,HSP)表达明显上调[1]。国外研究也发现[2],星形胶质细胞反应性增生可能与HSP70有关。但HSP70与Ast损伤后表达BDNF的关系,目前国内外报道较少。本研究通过对损伤的Ast进行HSP70抗体干预,来观察HSP70被抗体封闭后对BDNF表达的影响。

1 材料与方法

1.1 Ast的分离培养与纯化

新生24 h内Wistar大鼠4只(重庆医科大学动物中心提

作者介绍:宋 进(1982-),女,硕士,
研究方向:胶质瘢痕的形成机制。
通讯作者:陈阳美,男,教授,E-mail:chenym1997@tom.com。

供),75%酒精浸泡消毒后,取大脑皮层组织,入冰预冷的D-Hanks液中,洗净血迹后去脑膜。剪碎组织,转移至10 ml离心管中,反复吹打,制成单细胞悬液,用200目滤网过滤,收集滤液,1 000 r/min离心5 min,去上清,加入含15%胎牛血清(杭州四季青)的DMEM/F12完全培养基,吹打成单细胞悬液,种入70 ml玻璃培养瓶中,40 min ~ 1 h后待成纤维细胞贴壁后,将细胞转种入另外两个多聚赖氨酸包被过的50 ml玻璃培养瓶中,37℃,5%CO_2 孵箱培养24 h,细胞贴壁后换液,继续培养。待细胞生长至约80% ~ 90%融合后,恒温摇床上,200 r/min振摇5 h后,部分小胶质细胞和少突胶质细胞浮起,弃去培养液,用少量0.125%的胰蛋白酶将上层细胞(主要为未振摇下来的小胶质细胞和少突胶质细胞)消化下来弃掉,再用胰酶将底层的Ast消化传代,重复传代3 ~ 4次,种于35 mm直径的玻璃培养皿中,得到纯度为95%以上的Ast。

1.2 细胞划痕损伤模型的建立与干预方法

1.2.1 细胞划痕损伤模型的建立 纯度达95%以上的Ast,生长达80% ~ 90%融合后,用无菌手术刀片,在培养皿中呈"#"字形划痕,造成机械损伤。为保证各组损伤力度的一致,划痕时控制划痕线之间平行间距为0.5 cm,同时控制划伤的力度和速度。之后,用D-Hanks液清洗培养物,去除损伤的细胞碎片,补加新鲜培养基继续培养[3]。

1.2.2 干预方法及细胞分组 将细胞分为正常组,损伤对照组和损伤干预组。其中损伤干预组于损伤后立即加入HSP70多抗(兔抗大鼠,博士德生物有限公司),每皿加100 μl抗体稀释液(含HSP70多抗0.2 μg),损伤对照组每皿加100 μl无菌PBS。

1.3 免疫细胞化学染色法检测BDNF的表达

于细胞损伤后30 min,24 h,4 d,7 d,各组分别取3皿细胞用95%酒精固定15 min,按照免疫组化试剂盒说明书进行SP法染色,常规设立阴性对照。一抗为BDNF多克隆抗体(1∶100,兔抗大鼠,博士德生物有限公司),免疫组化试剂盒(抗兔)购自深圳晶美生物有限公司。

镜下显色后,阅片,观察细胞增殖状况及染色情况,采集图片,每组不同时间点分别随机选取5张不同视野的图片,用Image-pro plus图像分析系统分析平均光密度值。

1.4 RT-PCR检测BDNFmRNA的表达

1.4.1 总RNA的提取 按Biozol总RNA提取试剂(bioflux 日本)说明书提取细胞总RNA。琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性,紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度,置-80℃冰箱保存备用。

1.4.2 逆转录 用逆转录试剂盒(TOYOBY 日本)逆转录1 ug RNA,按试剂盒说明书进行,将cDNA放-20℃保存备用。

1.4.3 PCR扩增 用天根生化科技(北京)有限公司的Tap PCR mastermix试剂盒扩增目的片段。β-actin引物序列:上游5'-CTGCCGCATCCTCTTCCTC-3',下游5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3',片断长度:398bp。BDNF引物序列:上游5'-CAGTATTAGCGAGTGGGTCA-3',下游5'-CCGAACATACGATTCGGT-3',片断长度:223 bp(引物由上海生物工程技术服务公司合成)。β-actin与BDNF同管扩增,反应条件:25 μl体系,94℃ 3min,94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 40 s,32个循环,72℃ 5 min。

1.4.4 电泳 用15 g/L琼脂糖凝胶,0.5×TBE电泳缓冲液进行PCR扩增产物电泳。应用凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)成像并进行分析。实验重复3次,结果以BDNF/β-actin吸光度比值表示。

1.5 统计学分析

所有实验数据以$\bar{x} \pm s$表示。采用SPSS11.0统计软件处理。各时间点对照组与干预组之间的差异采用独立样本t检验进行分析。

2 结 果

2.1 Ast的分离培养与纯化

分离并种于培养基的细胞,24 h后贴壁,且伸出细短突起。10 d左右,细胞分层铺满瓶底,上层为椭圆形小胶质细胞及少突胶质细胞,下层为Ast,呈扁平多角形,胞体较大,经传代纯化后的Ast,呈大致均一的单层扁平多角形,具有短而粗大的突起,突起相互交织呈网状,GFAP染色阳性,纯度达95%以上,见图1。



图1 纯度>95%的星形胶质细胞(倒置显微镜,×100)

2.2 BDNF免疫细胞化学染色结果

2.2.1 镜下观察结果 正常组BDNF有弱表达,损伤后30 min,对照组BDNF表达开始增加,干预组增加不明显。随着损伤时间的延长,对照组BDNF表达逐渐增加,7 d达高峰。干预组也呈逐渐增加的趋势,但相同时间点下较对照组弱,见图2、图3。

2.2.2 免疫细胞化学染色图片分析 损伤后30 min,

平均光密度值开始增加，此后随损伤时间的延长而继续增大，相同时间点下，干预组较对照组减小，差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$)，见表1。

2.3 BDNF mRNA表达的变化

对照组细胞损伤后30 min，BDNF mRNA表达即开始增加，随时间点的延长，表达逐渐增强。干预

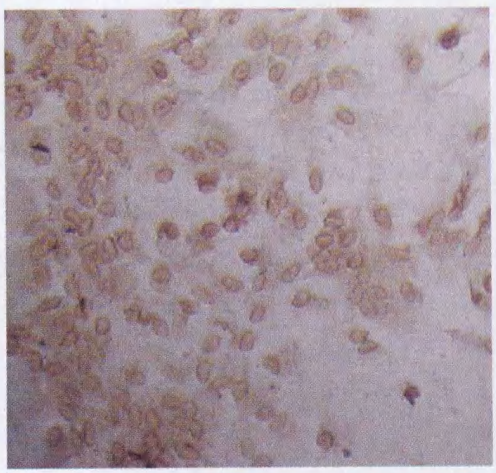


图2 损伤后7 d对照组(BDNF免疫细胞化学染色，×100)

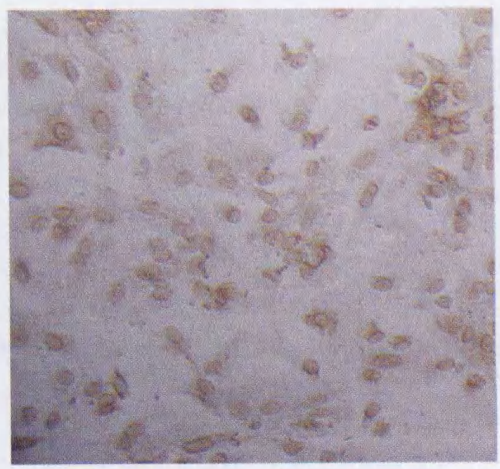
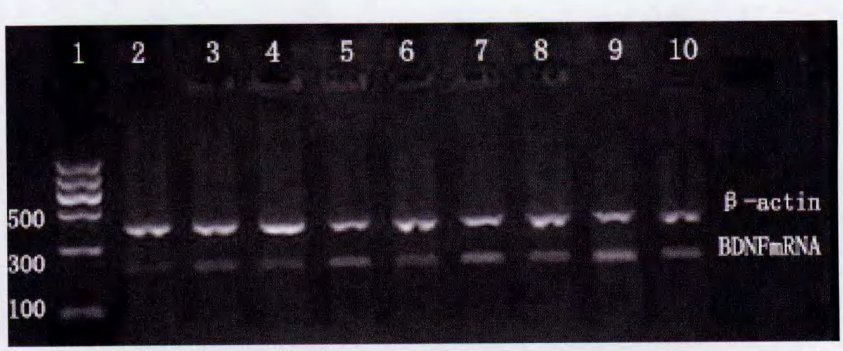


图3 损伤后7 d干预组(BDNF免疫细胞化学染色，×100)

表 1 各组平均光密度值($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

	对照组	干预组	T 值	P 值
30 min	0.253 1 ± 0.010 4	0.225 7 ± 0.021 3	3.493	0.008 2
24 h	0.274 8 ± 0.023 5	0.247 2 ± 0.021 4	2.537	0.034 9
4 d	0.296 3 ± 0.027 3	0.268 2 ± 0.020 4	2.654	0.029 1
7 d	0.333 7 ± 0.030 0	0.292 9 ± 0.014 9	3.008	0.016 9



1. Marker(bp)；2. 正常组；3. 30 min 对照组；4. 30 min 干预组；5. 24 h 对照组；6. 24 h 干预组；7. 4 d 对照组；8. 4 d 干预组；9. 7 d 对照组；10. 7 d 干预组

图 4 各组细胞 BDNF mRNA 的表达

表 2 各组细胞 BDNF mRNA 的表达水平(BDNF/β-actin 吸光度比值)($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

	对照组	干预组	t 值	P 值
30 min	0.18 ± 0.01	0.12 ± 0.03	3.532	0.024 2
24 h	0.29 ± 0.06	0.16 ± 0.03	3.502	0.024 9
4 d	0.39 ± 0.03	0.26 ± 0.04	4.388	0.011 8
7 d	0.48 ± 0.03	0.29 ± 0.03	7.488	0.001 7

组与对照组有同样的变化趋势，但相同时间点下，BDNFm RNA表达均较对照组弱，差异有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$)，见图4，表2。

3 讨 论

Ast是中枢神经系统的重要细胞成分，随着对Ast多种功能研究的深入，人们发现这种细胞几乎参与了中枢神经系统从胚胎发生到老化的每一项活动。目前已知，各种中枢神经系统损伤均可使Ast被激活，激活的Ast一方面呈现典型的反应性增生，最终可能形成胶质瘢痕，另一方面分泌大量的神经营养因子并调节它们的水平，为损伤组织提供一个良好的修复环境，有助于神经元再生。

BDNF是神经组织中含量较高的一种神经营养因子，主要由神经元及部分胶质细胞分泌，它的作用比较广泛。在胚胎发育期，它是神经系统发育、分化、成熟以及突触的形成所不可缺少的，成年期对神经功能的调节及神经系统的可塑性具有重要作用。BDNF也可以作用于Ast，促进其轴突向外生长[4]。另外，Djalali的研究证明BDNF通过刺激星形胶质细胞中S100beta的表达和少突胶质细胞中髓磷脂碱蛋白的表达来影响5－羟色胺能神经元的发育。Suzuki的最新研究还发现了BDNF的一个新功能，通过促进胆固醇的合成来增加突触小泡的释放潜能。

有关BDNF的表达及作用机制，国外也做了不少研究。Juric的两项研究表明单胺能神经元的活化能够增加Ast中BDNF的合成[7,8]。Meng的研究证实，在TrkB的参与下，BDNF通过MAPK信号传导通路来发挥低氧状态下对神经元的保护作用[9]。目前有关离体星形胶质细胞损伤后表达BDNF的报道尚不多见。

本研究采用划痕损伤法构建Ast体外损伤模型，结果显示，正常星形胶质细胞BDNF的表达很弱，当Ast损伤后BDNF的表达随着损伤时间的延长而逐渐增加。通过在细胞培养基内加入HSP70抗体来封闭HSP70，阻止其发挥功能后，相同时间点下，干预组BDNF表达较对照组表达弱，说明HSP70被抗体封闭后一定程度上减弱了BDNF的表达，不难推测出，HSP70可能参与了Ast损伤后BDNF表达增加的调节，这为今后对于神经元与星形胶质细胞间相互作用的研究提供了新的方向。关于HSP70在中枢神经系统内发挥作用的机制，目前认为可能包括分子伴侣作用、调节多种与增殖相关的蛋白表达以及抑制凋亡等。至于其参与星形胶质细胞表达BDNF的具体机制，尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 张杰敏，廖维宏.大鼠脊髓星形胶质细胞损伤后的cDNA文库构建及其基因表达变化[J]. 中华创伤杂志，2005，21(11)：852-857.

[2] Marta S F，Tania C L S S，Alessandra B.Benedito，et al. Neurite outgrowth is impaired on HSP70-positive astrocytes through a mechanism that requires NF-κB activation[J]. Brain Research，2002，958(2)：359-370.

[3] 张杰敏，廖维宏.脊髓星形胶质细胞体外损伤模型的建立[J].中华创伤杂志，2005，21：133-134.

[4] Deumens R，Koopmans G C，Jaken R J，et al. Stimulation of neurite outgrowth on neonatal cerebral astrocytes is enhanced in the presence of BDNF[J]. Neurosci Lett，2006，407(3)：268-273.

[5] Djalali S，Holtje M，Grosse G，et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor(BDNF)on glial cells and serotonergic neurones during development[J]. J Neurochem，2005，92(3)：616-627.

[6] Suzuki S，Kiyosue K，Hazama S，et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development[J]. J Neurosci，2007，27(24)：6417-6427.

[7] Juric D M，Miklic S，Carman-Krzan M，et al. Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes[J]. Brain Res，2006，1108(1)：54-62.

[8] Juric D M，Loncar D，Carman-Krzan M，et al. Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes:Mediation via alpha(1)- and beta (1)/beta (2)-adrenergic receptors[J]. Neurochem Int，2007，[Epub ahead of print].

[9] Meng M，Zhiling W，Hui Z，et al. Cellular levels of TrkB and MAPK in the neuroprotective role of BDNF for embryonic rat cortical neurons against hypoxia in vitro[J]. Int J Dev Neurosci，2005，23(6)：515-521.

(责任编辑：冉明会)