DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.003
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1518 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)17-1518-03

慢性脑灌注不足老龄大鼠脑内BDNF的表达

高 东,王景周 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨老龄大鼠慢性灌注不足后脑内脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic, BDNF)的表达在血管性痴呆形成中的作用。方法 采用Pulsinelli四血管阻断(4-vessel occlusion, 4VO)改良法建立血管性痴呆大鼠模型,穿梭箱系统检测大鼠的学习记忆能力。应用免疫组化ABC法检测海马各区及额、颞叶皮层BDNF的表达。结果 4VO 1周组海马CA1区BDNF阳性细胞数与对照组比较显著减少($P<0.01$),2周组、4周组仍进行性下降($P<0.01$),2月组与4周组无显著差异($P>0.05$)。CA1区BDNF的表达与大鼠AAR成绩变化规律基本一致。3 d组额、颞叶皮层BDNF表达显著增加,1周组CA3、齿状回及颞叶皮层BDNF显著减少($P<0.01$),而后BDNF的表达无明显变化。结论 慢性脑灌注不足老龄大鼠脑内BDNF表达的减少可能在血管性痴呆的形成中起重要作用。

关键词:脑源性神经营养因子;血管性痴呆;脑缺血;认知功能障碍
中图法分类号:R349.32;R741.02;R749.16 文献标识码:A

Expression of brain-derived neurotrophic factor in the brain of old rats after chronic cerebral perfusion deficiency

GAO Dong, WANG Jing-zhou (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the roles of expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain of old rats after chronic cerebral perfusion deficiency in the pathogenesis of vascular dementia. Methods Rat model of vascular dementia was established by modified Pulsinelli 4-vessel occlusion (4VO) and divided into 3d (3-d), 1 week (1-w), 2 weeks (2-w), 4 weeks (4-w) and 2 months (2-m) groups. Computer-controlled initiative avoidance response shuttle-box system was used to test the learning and memory capacity of rats. Immunohistochemical method was used to examine the expression of BDNF in CA1 region of the hippocampus and cortex of temporal and frontal lobe. Results Compared with those in control group, BDNF positive cells in CA1 region were decreased significantly in 4VO-1-w group ($P<0.01$), and then decreased gradually in 4VO-2-w and 4VO-4-w groups ($P<0.01$). There was no significant difference in 4VO-2-m and 4VO-4-w groups ($P>0.05$). Compared with those in the control group, BDNF positive cells in the cortex of temporal and frontal lobe were increased significantly in 4VO-3-d group ($P<0.01$). BDNF positive cells in hippocampus CA3 region and dentate gyrus and the cortex of temporal lobe were decreased significantly in 4VO-1-w group ($P<0.01$), and then came to a stable state. Conclusion The decreased expression of BDNF in brain regions correlated with the cognitive functions of old rats after chronic cerebral perfusion deficiency may be an important pathological mechanism in the formation of vascular dementia, especially in the hippocampus CA1 region.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; vascular dementia; cerebral ischemia; cognitive dysfunction

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)广泛分布于中枢神经系统中,起到调节神经系统生长、发育、分化和再生的作用[1],但其在血管性痴呆(vascular dementia, VD)的形成中的作用尚不明确。本研究旨在探讨老龄大鼠慢性灌注不足后脑内BDNF的表达在血管性痴呆形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及动物模型制备

健康老龄Wistar大鼠60只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,月龄12~15个月,体质量298

基金项目:重庆市科委科研基金攻关项目(7830)、面上项目(5657)
Supported by the Sci &Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (7830, 5657)
作者简介:高 东(1972-),男,辽宁省本溪市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事血管性痴呆发病机制等方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68757343
通信作者:王景周,电话:(023)68757363
收稿日期:2003-10-16;修回日期:2004-06-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

~410 g, 雌雄不拘, 颗粒饲料喂养。随机分为对照组及四血管阻断(4-vessel occlusion, 4VO)3 d、1 周、2 周、4 周、2 个月共 6 组, 每组 10 只。模型制备采用 Pulsinelli 4VO 改良法[2,3]。用 10% 水合氯醛(0.5 ml/100 g, ip)麻醉。大鼠取颈前部正中切口, 钝性分离双侧颈总动脉, 穿"4"号线备用, 缝合颈部皮肤。然后取颈背部正中切口, 沿第一颈椎翼小孔烧灼双侧椎动脉, 阻断血供。24 h 后再以微动脉夹反复夹闭双侧颈总动脉, 每次 5 min, 间隔 1 h, 共 3 次。对照组除不烧灼双侧椎动脉, 不夹闭双侧颈总动脉外, 其余处理同 4VO 各组。

1.2　大鼠学习记忆能力测试

采用第三军医大学大坪医院野战外科研究所研制的微机控制的穿梭箱主动回避反应系统。该系统以灯光为条件刺激, 足底电击为非条件刺激。如大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作称主动回避反应(active avoidance response, AAR), 而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应(passive avoidance response, PAR)。大鼠的学习记忆能力以完成 AAR 的次数与测试总次数(20 次)的比值即 AAR 比率代表[4]。大鼠在模型制作前均经穿梭箱训练 7 d, AAR 比率大于或等于 80% 者入选。4VO 各组大鼠在测定指标前, 进行穿梭箱测试。

1.3　免疫组化 ABC 法测定

各组大鼠在完成实验过程后给予 10% 水合氯醛过量腹腔麻醉, 暴露心脏, 在左心室插管, 剪开右心耳。先用 200 ml 生理盐水灌冲, 然后用 4% 多聚甲醛固定脑组织。取脑分离出额叶、颞叶、海马, 浸于相同固定液中 48 h, 石蜡包埋。免疫组化染色采用 ABC 法(BDNF 检测试剂盒购自北京中山生物技术有限公司), 实验操作按试剂盒说明书进行。

1.4　海马各区及额、颞叶皮层神经细胞丢失的检测

采用甲苯胺蓝染色计数各组不同脑区神经细胞, 结果以神经细胞丧失率(loss rate, LR)表示。

$$LR=\frac{\text{CO 组神经细胞数}-\text{4VO 组残余神经细胞数}}{\text{CO 组神经细胞数}}\times 100\%$$

1.5　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 专用统计程序进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　各组大鼠穿梭箱成绩

对照组为(90.33±7.19)%; 4VO 3 d 组(70.33±6.67)%; 1 周组(69.67±6.94)%; 2 周组(57.67±9.61)%; 4 周组(43.67±9.35)%; 2 个月组(45.00±9.82)%。

2.2　4VO 组大鼠各脑区神经细胞丢失情况(表 1, 图 1、2)

表 1　4VO 各组大鼠海马各区及额、颞叶皮层神经细胞 LR(n=10, %)

Tab 1　Loss rate of neural cells in each 4VO group (n=10, %)

	CA1	CA3	DG	Fro	Tep
3 d	10.52±2.94	15.36±2.38	11.57±2.31	19.54±2.35	15.26±1.97
1 week	25.59±4.18**	27.54±3.25**	18.63±2.11**	27.58±3.67**	24.36±2.87**
2 week	41.22±8.81△△	38.26±3.21△△	22.31±2.79	29.14±2.64	25.11±3.87
4 week	65.20±4.25##	38.55±3.87	21.85±2.88	29.08±3.61	24.83±2.61
2 month	65.18±3.15	39.23±4.82	22.57±2.51	28.84±2.89	26.59±3.84

**: $P<0.01$, vs 3 d; △△: $P<0.01$, vs 1 week; ##: $P<0.01$, vs 2 week

2.3　4VO 组大鼠各脑区神经细胞 BDNF 的表达(表 2, 图 3、4)

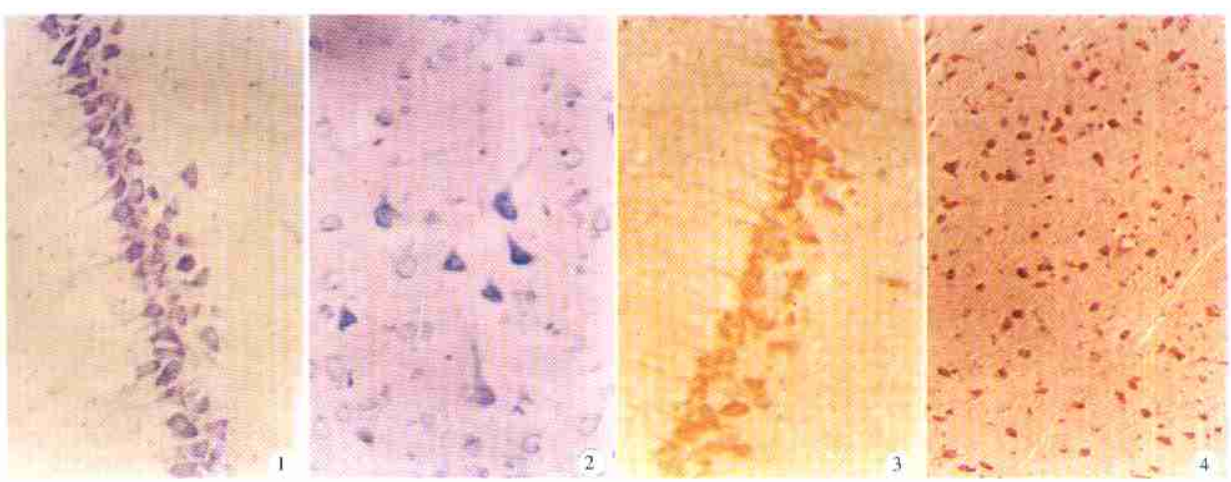


图 1　2 周组海马 CA1 区锥体细胞　(甲苯胺蓝染色×400)

Fig 1　Pyramidal cells in hippocampus CA1 region of 2-week group　(Toluidine blue staining×400)

图 2　2 周组额叶皮层神经细胞　(甲苯胺蓝染色×400)

Fig 2　Neural cells in the cortex of frontal lobe in 2-week group　(Toluidine blue staining×400)

图 3　2 周组海马 CA1 区 BDNF 免疫反应性　(ABC×400)

Fig 3　BDNF immunoreactivity in the hippocampus CA1 region of 2-week group　(ABC×400)

图 4　3 d 组颞叶皮层 BDNF 免疫反应性　(ABC×200)

Fig 4　BDNF immunoreactivity in the cortex of temporal and frontal lobes in 3-day group　(ABC×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 各组大鼠海马各区及额、颞叶皮层 BDNF 阳性细胞数（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Number of BDNF positive cells in the hippocampus regions and the cortex of temporal and frontal lobes in each group（$\bar{x}\pm s$）

	CA1	CA3	DG	Fro	Tep
Control	22.31±2.87	21.59±3.58	20.53±4.08	23.54±3.65	22.89±3.68
3 d	23.12±2.46	23.06±4.18	21.37±2.93	29.81±4.55**	27.36±3.95**
1 week	18.41±3.54**ΔΔ	17.86±2.65**ΔΔ	16.72±2.31**ΔΔ	22.47±3.54ΔΔ	18.95±3.25**ΔΔ
2 week	15.34±3.41**##	16.26±3.21**	16.31±2.79**	19.24±2.48**	19.17±3.36**
4 week	12.17±2.65**☆☆	16.55±3.47**	17.15±2.75**	18.72±3.30**	19.63±3.17**
2 month	13.34±3.55**	16.93±4.13**	16.31±2.52**	19.56±2.43**	18.89±2.14**

**：$P<0.01$ *vs* control；ΔΔ：$P<0.01$，*vs* 3 d；##：$P<0.01$，*vs* 1 week；☆☆：$P<0.01$，*vs* 2 week

3 讨论

本实验采用穿梭箱双向主动回避反应系统测试实验大鼠的学习记忆能力，结果显示 4VO 3 d 组大鼠 AAR 比率与对照组比较明显降低（$P<0.01$），在 4 周组才基本稳定。同时神经细胞计数结果显示：4VO 各组大鼠 CA1 区大锥体细胞 LR 随术后时间的延长逐渐增加，4 周组 LR 基本稳定；CA3 区及齿状回神经细胞 LR 在 4VO 2 周组达到稳定状态；而额、颞叶皮层神经细胞 LR 在 4VO 1 周组已基本稳定。CA1 区 LR 稳定时达 65.18%，而 CA3 区为 39.23%，齿状回为 22.57%，额、颞叶皮层区分别为 28.84%和 26.59%。表明 Pulsinelli 4VO 改良模型可造成实验大鼠脑内缺血缺氧敏感区（如海马、皮层等）神经元丢失，其机制主要为细胞凋亡所致[5,6]。而海马各区及额、颞叶皮层神经细胞的丢失可能是实验大鼠学习记忆能力下降的原因之一[7]。

BDNF 广泛分布于大脑中，可促进神经元生长分化，保护神经元对抗缺血缺氧等病理损害。目前有关缺血急性期脑内 BDNF 表达的报道较多，主要研究 BDNF 对神经细胞的保护作用。而关于脑内 BDNF 变化与学习记忆的关系及其在血管性痴呆形成中的作用研究较少。本实验结果显示：3 d 组大鼠海马 CA1 区 BDNF 阳性细胞数与对照组无显著差异（$P>0.05$），1 周组 BDNF 阳性细胞数显著减少，2 周组、4 周组仍进行性下降（$P<0.01$），但 2 个月组与 4 周组无显著差异（$P>0.05$）。有研究认为缺血再灌注可引起脑细胞外谷氨酰胺增加，细胞内钙离子浓度升高，从而使脑内 BDNF 表达增加[8]。因此我们认为 3 d 组 CA1 BDNF 无明显变化的原因可能是 BDNF 保护反应性增加与神经细胞丢失的中和结果，以后 4VO 各组 BDNF 表达减少可能与神经细胞的丢失及神经细胞功能减退有关。结果同时显示：CA1 区 BDNF 的表达与大鼠 AAR 成绩变化规律基本一致，表明海马 CA1 区 BDNF 表达的减少与血管性痴呆的形成密切相关。3 d 组额、颞叶皮层 BDNF 阳性细胞数与对照组比较明显增加（$P<0.01$），表明 BDNF 在额、颞叶皮层缺血时的保护作用更加明显。1 周组海马 CA3、齿状回及颞叶皮层 BDNF 阳性细胞数显著减少（$P<0.01$），而后 BDNF 阳性细胞数无明显变化。作者认为上述结果可能主要与神经细胞丢失有关。以往研究认为 BDNF 对突触的可塑性、长时程增强和认知功能起作用[9,10]。本实验也表明大鼠慢性脑灌注不足各脑区（尤其是海马 CA1 区）神经细胞 BDNF 表达的减少与实验大鼠的学习记忆能力相关。因此认为与认知功能关系密切的大脑组织结构如海马及额、颞叶皮层等区域 BDNF 表达的减少可能在血管性痴呆的形成中起重要作用。

当然，脑内神经细胞 BDNF 表达变化与神经细胞丢失的因果关系尚不明确，引起 BDNF 变化的其它机制有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 刘智敏，陈俊杰. 脑源性神经营养因子研究现状[J]. 生物医学工程学杂志，2000，17(4)：454－456.

[2] Pulsinelli W A，Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke，1979，10(3)：267－272.

[3] 贾健民，贾健平，刘多三，等. Wistar Rat 全脑反复缺血再灌流动物模型及行为学研究[J]. 中风与神经疾病杂志，1992，9(2)：71－73.

[4] 刘 彦，何庆华，廖维宏，等. 微机控制的穿梭箱双向主动回避反应实验系统[J]. 中国应用生理学杂志，1999，15(4)：366－367.

[5] Nitatori T，Sato N，Waguri S，*et al*. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis[J]. J Neurosci，1995，15(2)：1001－1011.

[6] 高 东，王景周，姚国恩，等. 老龄大鼠慢性脑灌注不足对海马区神经元的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(17)：1549－1551.

[7] 高 东，王景周，姚国恩，等. 海马及皮层神经元的丢失与血管性痴呆发病机制的实验研究[J]. 中国行为医学科学，2002，11(3)：252－254.

[8] Merlio J P，Emfors P，Kokaia Z，*et al*. Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults[J]. Neuron，1993，10(2)：151－164.

[9] Lu B，Figurov A. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity[J]. Rev Neurosci，1997，8(1)：1－12.

[10] Hall J，Thomas K L，Everitt B J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning[J]. Nat Neurosci，2000，3(6)：533－535.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net