

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.21.002

文章编号: 1005-8982(2016)21-0008-05

论著

血管性痴呆大鼠海马区 pro-BDNF、截短型 BDNF、mBDNF 的变化及与认知的关系

张露¹, 李俊敏¹, 梁锐², 张博爱¹

(1. 郑州大学第一附属医院 神经内科, 河南 郑州 450052; 2. 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 探讨血管性痴呆(VD)大鼠海马中脑源性神经营养因子前体蛋白(pro-BDNF)、成熟脑源性神经营养因子(mBDNF)、截短型脑源性神经营养因子(BDNF)变化及与认知功能的关系。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 120 只, 6 月龄, 体重 350 g 左右, 随机分为模型组和假手术组, 模型组结扎双侧颈总动脉, 假手术组除不结扎血管外余同模型组, 模型组和假手术组大鼠随机分为 2、4、8 和 12 周 4 个时间, 水迷宫实验筛选造模成功大鼠, 免疫组织化学法和 Western blot 检测假手术组及造模成功的大鼠不同时间点海马中 pro-BDNF、mBDNF、截短型 BDNF 变化。**结果** 术后各时间点模型组大鼠的潜伏期均较假手术组延长($P < 0.05$)。免疫组织化学法检测显示模型组大鼠海马神经元形态改变、数量减少、BDNF 表达下降。术后模型组 pro-BDNF、mBDNF、截短型 BDNF 较假手术组降低($P < 0.05$), pro-BDNF 水平下降趋势较缓慢, 截短型 BDNF 水平下降趋势在缺血早期变化显著, 后期变化缓慢; mBDNF 水平下降趋势在缺血早期变化不明显, 后期变化显著。**结论** 慢性缺血 VD 大鼠海马区 pro-BDNF、mBDNF、截短型 BDNF 均有改变, 3 者比例的改变可能与 VD 大鼠认知功能障碍有关。

关键词: 脑缺血; 海马; 脑源性神经营养因子前体蛋白; 截短型脑源性神经营养因子; 成熟型脑源性神经营养因子

中图分类号: R749.13

文献标识码: A

Changes of pro-BDNF, mature BDNF and truncated BDNF in hippocampus of vascular dementia rats

Lu Zhang¹, Jun-min Li¹, Rui Liang², Bo-ai Zhang¹

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China; 2. Institute of Clinical Medical Research, Henan University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF), mature BDNF and truncated BDNF in hippocampus of vascular dementia rats. **Methods** A total of 120 healthy male Sprague-Dawley rats aged 6 months and weighting 350 g were randomly divided into model group and sham-operation group. The model of chronic cerebral ischemia was established by permanent occlusion of the bilateral common carotid arteries (2VO) in rats, while the sham-operation group accepted the same operation except occlusion of the bilateral common carotid arteries. The rats of both model group and sham-operation group were randomly divided into 2-week, 4-week, 8-week and 12-week sub-groups, and the behavior of the rats in each group was evaluated by the Morris water maze to select the successful modeling, then the brains were collected for immunohistochemistry and Western blot to detect the changes of pro-BDNF, mature BDNF and truncated BDNF in the hippocampus. **Results** The escape latency of the rats in the model

收稿日期: 2016-02-22

group was significantly extended compared with the sham-operation group ($P < 0.05$). Compared with the sham-operation group, the total BDNF of the model group reduced gradually with the prolonged ischemic time, and the truncated BDNF in the model group significantly reduced in 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks ($P < 0.05$), and pro-BDNF significantly reduced in 8 weeks and 12 weeks ($P < 0.05$), and mature BDNF significantly reduced in 12 weeks ($P < 0.05$). **Conclusions** Pro-BDNF, mature BDNF and truncated BDNF have changed in the hippocampus of chronic cerebral ischemia rats, and the change in the proportion of three isoforms of BDNF may be associated with cognitive dysfunction.

Keywords: cerebral ischemia; hippocampus; pro-BDNF; truncated brain-derived neurotrophic factor; mature brain-derived neurotrophic factor

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是脑神经营养因子家族成员之一,广泛存在于中枢神经系统。近期研究发现, BDNF 在哺乳动物内质网中以脑源性神经营养因子前体蛋白(pro-BDNF)的形式合成。pro-BDNF 生成后,在细胞内外通过不同的酶水解生成成熟的脑源性神经营养因子(mature brain-derived neurotrophic factor, mBDNF)和截短型 BDNF^[1]。以前认为 pro-BDNF 和截短型 BDNF 为 mBDNF 产生过程中的中间产物,没有生物学活性,现在发现其具有生物学功能。pro-BDNF 可诱导树突分支和树突棘的密度减小,负性调节突触可塑性,易化长时程抑制,其表达的变化与情感、认知、学习、记忆损害的神经、精神性疾病,如阿尔茨海默病、精神分裂症和严重抑郁障碍等有关^[2-3]。而 mBDNF 可促进神经元的存活、正性调节突触可塑性,诱导长时程增强,有研究表明其与认知功能密切相关,能明显改善痴呆大鼠的认知功能^[4-5]。截短型 BDNF 作用机制尚不明确,但近期有研究发现截短型 BDNF 血清水平升高与精神分裂症患者的认知功能减退有关系^[6]。研究结果均提示, pro-BDNF、mBDNF、截短型 BDNF 可能与认知功能有关,目前,国内外研究血管性痴呆(Vasculardementia, VD)及 BDNF 均集中在 mBDNF,关于 pro-BDNF 及截短型 BDNF 尚未见报道。本实验探讨 pro-BDNF、mBDNF、截短型 BDNF 与 VD 大鼠认知障碍的关系,以及三者含量比例的变化对认知的影响,为 VD 发病机制研究提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 健康 SD 雄性大鼠 120 只,6 个月龄,体重 350 g 左右,由郑州大学医学院动物实验中心提供,随机分为模型组和假手术组,分笼饲养,室内常温下配方饲料喂养,自由饮食水。适应环境 1 周

后实验,每组取 2、4、8 和 12 周 4 个时间。

1.1.2 主要试剂 Anti-BDNF (兔抗大鼠)(美国 Abcam 公司),山羊抗兔免疫球蛋白 G(武汉博士德公司),免疫组织化学法试剂盒(北京博奥森公司),兔抗大鼠 β -actin、聚氰基丙烯酸正丁酯蛋白定量试剂盒、放射免疫沉淀裂解液等试剂均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Morris 水迷宫仪购自北京硕林宛科技有限公司,高速低温离心机购自上海手术器械厂,多功能酶标仪购自瑞典 Tecan 公司,倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司,眼科镊、眼科剪、无菌线、缝合针等购自上海手术器械厂。

1.3 实验方法

1.3.1 VD 模型复制 参照马兴荣等^[7]的方法复制脑缺血大鼠模型。大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水。10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉,去毛消毒后,沿颈正中切开,逐层钝性分离出双侧颈总动脉,分别结扎双侧颈总动脉远心端和近心端,确保阻断颈总动脉血流后缝合皮肤。假手术组动物除不结扎颈总动脉外,余过程与模型组相同。

1.3.2 行为学评价及造模成功的标准 术后 2、4、8 和 12 周开始,分别将各组动物置于 Morris 水迷宫中进行定位导航训练 4 d,每天训练 3 次,每次在不同的入水点训练 120 s,第 5 天分别记录每只动物的潜伏期,潜伏期越短,路程越近,说明大鼠的学习记忆能力越好^[8]。以第 5 天假手术组大鼠潜伏期的均值为参考值,计算模型组大鼠第 5 天的平均潜伏期与参考值之差占该大鼠平均潜伏期时间的比值,比值 > 20%为认知功能障碍大鼠,潜伏期越长认知损害越严重^[8]。

1.3.3 BDNF 的免疫组织化学检测 大鼠于各时间点麻醉,暴露心脏,生理盐水快速灌注至流出无血液体,4%多聚甲醛灌注固定,充分将前液置换后开颅

取脑,放入 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,取海马区切片。依次烤片、脱蜡水化、抗原修复、封闭,一抗(1:300)孵育 4℃过夜,二抗室温孵育 20 min,二氨基联苯胺显色,苏木素复染,脱水透明封片。磷酸缓冲盐溶液代替一抗设阴性对照组。倒置显微镜观察神经元变化。

1.3.4 蛋白样品的制备及 Western blot 检测 于各时间点冰上取出大鼠海马,加组织裂解液,回旋振荡器匀浆后冰上裂解 20 min,14 000 g,4℃离心 10 min,取上清液,二喹啉甲酸法测蛋白浓度后加上样缓冲液 100℃变性 5 min 后置入 -20℃冰箱冷冻保存备用。**Western blot 检测:**等量蛋白上样,聚丙烯酰胺电泳分离蛋白,湿转至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭,兔抗大鼠 BDNF 抗体(1:2 000)4℃过夜,HRP-山羊抗兔抗体(1:10 000)室温孵育 2 h,增强化学发光法显色,曝光,定影显影。以 β -actin 作为内参对照组,扫描胶片后用 Image J 分析条带。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,模型组与假手术组各时间点指标的比较,用独立样本 *t* 检验,模型组内各时间点指标的比较,用单因素方差分析,方差齐,方差分析有显著性时用 LSD-*t* 检验进行多重比较,

P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VD 模型复制结果

复制模型组大鼠 65 只,实验过程中共死亡 16 只;复制假手术组大鼠 55 只,实验过程中共死亡 4 只。

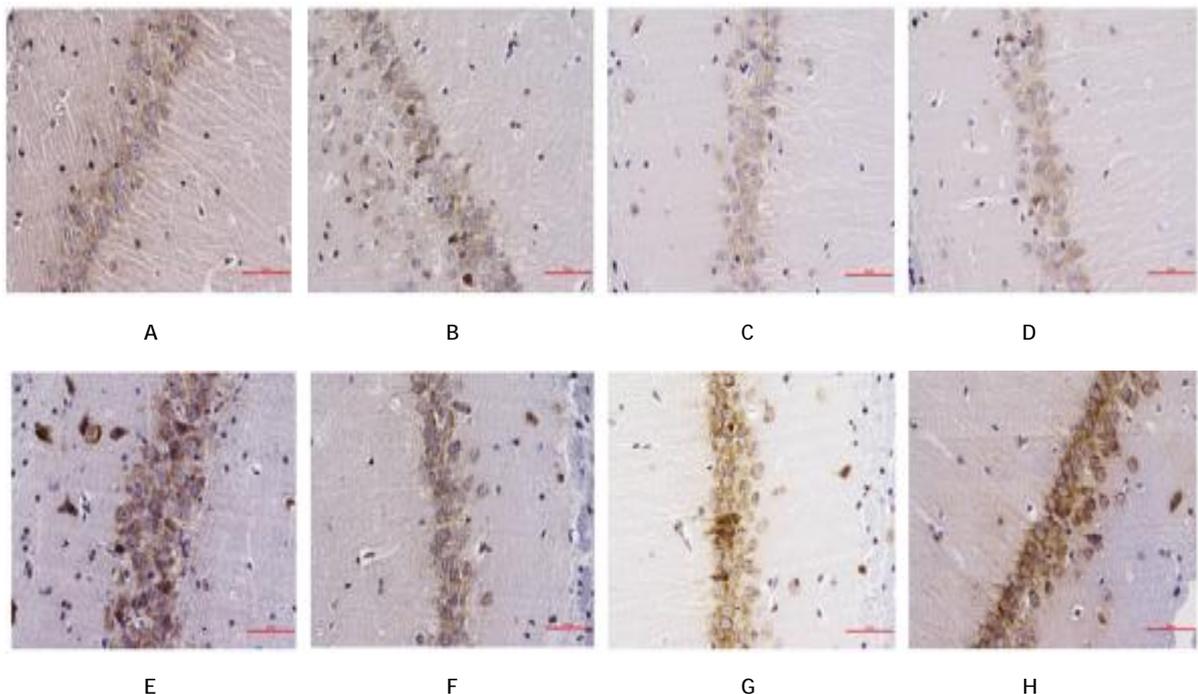
2.2 各组大鼠行为学改变

模型组大鼠潜伏期明显延长,与假手术组比较差异有统计学意义(*P*<0.05),表明模型组大鼠学习记忆能力受损,出现一定的认知功能障碍。模型组内比较行单因素方差分析,差异有统计学意义(*F*=14.63,*P*=0.000),表明随缺血时间延长,认知功能障碍逐渐加重。见表 1。

表 1 模型组与假手术组大鼠不同时间点潜伏期比较 (*n*=12,*S*, $\bar{x} \pm s$)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
模型组	22.54 \pm 4.62	39.58 \pm 17.01 ¹⁾	53.26 \pm 10.51 ¹⁾	69.60 \pm 11.22 ¹⁾²⁾³⁾
假手术组	13.99 \pm 4.91	15.47 \pm 6.59	15.24 \pm 3.91	18.65 \pm 4.52
<i>t</i> 值	2.836	2.955	7.579	9.417
<i>P</i> 值	0.022	0.018	0.000	0.000

注:1)与术后 2 周比较,*P*<0.05;2)与术后 4 周比较,*P*<0.05;3)与术后 8 周比较,*P*<0.05



A、B、C、D 分别为模型组 2、4、8 和 12 周;E、F、G、H 分别为假手术组 2、4、8 和 12 周。图中标尺为 50 μ m

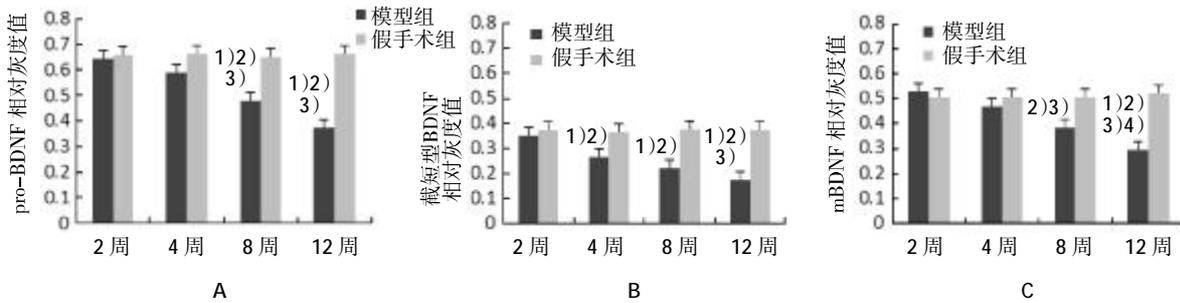
图 1 大鼠海马区 BDNF 表达 (免疫组织化学法)

2.3 大鼠海马区 BDNF 的表达

免疫组织化学法检测示模型组海马区神经元胞体变大,轮廓清晰度减退,神经元数量减少,随缺血时间延长细胞阳性率降低越明显。见图 1。

Western blot 检测:①组间比较。模型组 pro-

BDNF 在缺血早期减少不明显,缺血晚期明显低于假手术组 ($P < 0.05$);截短型 BDNF 在缺血早期就开始减少 ($P < 0.05$);mBDNF 在缺血晚期明显减少 ($P < 0.05$),早期减少不明显。②组内比较。假手术组组内比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组组内分析



1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与术后 2 周比较, $P < 0.05$; 3)与术后 4 周比较, $P < 0.05$; 4)与术后 8 周比较, $P < 0.05$

图 2 两组大鼠各时间点 BDNF 相对灰度值比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

表 2 两组大鼠的 pro-BDNF 表达比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
模型组	0.644 ± 0.078	0.590 ± 0.068	0.480 ± 0.009 ¹⁾²⁾	0.376 ± 0.083 ¹⁾²⁾
假手术组	0.658 ± 0.055	0.664 ± 0.059	0.654 ± 0.060	0.666 ± 0.051
t 值	0.328	1.830	3.376	6.667
P 值	0.751	0.105	0.010	0.000

注:模型组内方差分析: $F = 10.415, P = 0.000$ 。1)与术后 2 周比较, $P < 0.05$; 2)与术后 4 周比较, $P < 0.05$

表 3 两组大鼠的截短型 BDNF 表达比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
模型组	0.350 ± 0.071	0.264 ± 0.052 ¹⁾	0.220 ± 0.055 ¹⁾	0.172 ± 0.044 ¹⁾²⁾
假手术组	0.372 ± 0.054	0.366 ± 0.068	0.380 ± 0.054	0.374 ± 0.060
t 值	0.555	2.668	4.638	6.036
P 值	0.594	0.028	0.002	0.000

注:模型组内方差分析: $F = 8.978, P = 0.001$ 。1)与术后 2 周比较, $P < 0.05$; 2)与术后 4 周比较, $P < 0.05$

表 4 两组大鼠的 mBDNF 表达比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
模型组	0.530 ± 0.056	0.470 ± 0.061	0.386 ± 0.062 ¹⁾²⁾	0.296 ± 0.049 ¹⁾²⁾³⁾
假手术组	0.508 ± 0.122	0.506 ± 0.120	0.508 ± 0.128	0.522 ± 0.134
t 值	0.369	0.598	1.919	3.551
P 值	0.722	0.566	0.091	0.007

注:模型组内方差分析: $F = 15.907, P = 0.000$ 。1)与术后 2 周比较, $P < 0.05$; 2)与术后 4 周比较, $P < 0.05$; 3)与术后 8 周比较, $P < 0.05$

发现,模型组 pro-BDNF 的下降趋势较缓慢(相邻时间点间差异无统计学意义);截短型 BDNF 的下降趋势在 2 和 4 周间最明显 ($P < 0.05$);mBDNF 的下降趋势在 8 周后较明显 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 2~4。

3 讨论

既往研究表明,大鼠 2VO 术后 2 周海马血流量下降至 78.4%,术后 4 周下降至 66.3%,术后 8 周血流量下降约 4.00%,脑低血流状态转变为慢性状态⁹⁻¹⁰,而慢性脑缺血又是 VD 最常见的病因¹¹,因此以 2VO 大鼠为实验动物模型来模拟 VD。本实验通过 Morris 水迷宫测量大鼠逃避潜伏期来评价大鼠认知功能,发现模型组大鼠在脑缺血 2 周时已经有认知功能损伤,且随着缺血时间的延长,大鼠的认知功能下降越明显,与之前的研究报道一致¹²。

本实验中笔者通过免疫组织化学法发现 VD 大鼠海马区神经元外形发生改变,总 BDNF 的表达有变化,且缺血时间越长,总 BDNF 水平越低。推测海马供血不足会使海马区总 BDNF 含量减少,并对海马神经元形态结构有一定的影响。pro-BDNF 和 mBDNF 的比例在不同的生长发育阶段是不同的,pro-BDNF 的比例在新生儿期最高;其次是青春期;成年期最低¹³。近期发现,pro-BDNF 广泛存在于中枢神经系统,且在老龄大鼠海马中大量聚集¹⁴。但截短型 BDNF 水平的变化尚未见报道。本实验中笔者发现,假手术组大鼠海马区 BDNF 各亚型在术后未见明显变化,推测在 6~10 个月龄的大鼠海马区 BDNF 各亚型的水平基本稳定。模型组大鼠海马区 pro-BDNF、截短

型 BDNF 和 mBDNF 表达均发生改变,但变化趋势不同。脑缺血 8 周开始 pro-BDNF 有明显变化,至脑缺血 12 周其变化与 8 周比较不明显。表明慢性脑缺血后 pro-BDNF 的表达变化很缓慢。而截短型 BDNF 蛋白水平在脑缺血后 4 周即开始有明显下降,8 周后下降趋势变缓,其变化趋势与舒怡等^[9]提出的大鼠 2VO 术后海马血流量变化趋势相符合。表明海马区截短型 BDNF 的变化易受海马区血供的影响。mBDNF 在缺血 8 周后开始有明显变化,缺血 12 周后其水平明显低于 8 周,笔者推测只有海马区血供减少到一定程度后才会对 mBDNF 水平有一定的影响。

此外,本实验中笔者还发现,模型组大鼠认知功能障碍的变化趋势与截短型 BDNF 变化趋势基本一致,模型组大鼠认知功能明显减退也是术后 4 周开始,推测大鼠海马区截短型 BDNF 的减少可能与大鼠认知功能减退关系密切。体内外实验已证明 mBDNF 可以启动和维持长时程增强,在学习和记忆形成中是不可或缺的^[15-16];pro-BDNF 诱导长时程抑制形成记忆的消退,两者共同调节大脑现有的记忆^[17-18]。但 VD 大鼠脑缺血 8 周时两者均减少,而 VD 大鼠认知功能的损害并没有因此与 4 周有明显差异,推测可能该时间 pro-BDNF 和 mBDNF 的表达变化对该时期 VD 大鼠海马神经元功能影响不大。VD 大鼠脑缺血 12 周时,其认知功能减退与截短型 BDNF 变化趋势稍有不同,推测可能 pro-BDNF 和 mBDNF 表达的减少不足以维持该时期 VD 大鼠海马神经元的功能活动,更加重认知功能的减退。

综上所述,在慢性缺血 VD 大鼠海马区 pro-BDNF、mBDNF 和截短型 BDNF 表达均发生改变,3 者比例的改变可能与 VD 大鼠认知功能减退有关。在 VD 大鼠早期,认知功能减退可能与截短型 BDNF 减少关系密切,而在晚期可能与 3 者的减少均有关系。但是在慢性缺血性 VD 大鼠 8 周前认知功能的减退是否受 pro-BDNF 和 mBDNF 变化的影响尚不明确,截短型 BDNF 的作用机制尚不清楚,仍需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] DIENI S, MATSUMOTO T, DEKKERS M, et al. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons[J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(6): 775-788.
- [2] 陈甲,周华东,许志强. 脑源性神经营养因子前体的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(1): 103-105.
- [3] YANG J, HARTE-HARGROVE L C, SIAO C J, et al. pro-BDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(3): 796-806.
- [4] NOVKOVIC T, MITTMANN T, MANAHAN-VAUGHAN D. BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment[J]. *Hippocampus*, 2015, 25(1): 1-15.
- [5] NAGAHARA A H, TUSZYNSKI M H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(3): 209-219.
- [6] CARLINO D, LEONE E, DI COLA F, et al. Low serum truncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia[J]. *J Psychiatr Res*, 2011, 45(2): 273-279.
- [7] 马兴荣. 白藜芦醇对血管性痴呆的神经保护作用及其机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [8] JIA H, ZHANG X M, ZHANG B A, et al. Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats[J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(5): 1063-1070.
- [9] 舒怡,张洪,章军建. 慢性脑低灌注的实验研究进展[J]. *中华脑血管病杂志: 电子版*, 2010, 3: 199-206.
- [10] OTORI T, KATSUMATA T, MURAMATSU H, et al. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30(4): 266-272.
- [11] O'BRIEN J T, THOMAS A. Vascular dementia[J]. *Lancet*, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [12] 贾贺,张博爱,刘宇,等. 慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区锥体细胞树突形态及树突棘密度的变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 1: 177-180.
- [13] HEMPSTEAD B L. Brain-derived neurotrophic factor: three ligands, many actions[J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2015, 126: 9-19.
- [14] PEROVIC M, TESIC V, MLADENOVIC D A, et al. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat[J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35(6): 2057-2070.
- [15] LEAL G, AFONSO P M, SALAZAR I L, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF[J]. *Brain Res*, 2015, 1621: 82-101.
- [16] SU B, JI Y S, SUN X L, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced mitochondrial motility arrest and presynaptic docking contribute to BDNF-enhanced synaptic transmission[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(3): 1213-1226.
- [17] GARCIA K L, YU G, NICOLINI C, et al. Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012, 71(4): 289-297.
- [18] CARLINO D, DE VANNA M, TONGIORGI E. Is altered BDNF biosynthesis a general feature in patients with cognitive dysfunctions[J]. *Neuroscientist*, 2013, 19(4): 345-353.

(申海菊 编辑)