

病毒载体介导 BDNF 基因表达在大鼠神经元 AD 模型中的作用

刘朝晖, 马东亮, 靳辉, 马延兵, 胡海涛(西安交通大学医学院解剖与组织胚胎学系, 环境与基因相关疾病教育部重点实验室, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的 探讨重组腺伴病毒(rAAV)载体介导表达人脑源性神经营养因子(hBDNF)基因以及表达的 hBDNF 对 β 淀粉样蛋白(A β)诱导的 AD 模型神经元保护效应的机制。方法 使用分子克隆技术克隆了 hBDNF 基因, 并且构建了携带 hBDNF 基因的 rAAV 病毒载体(AAV-hBDNF), 使用病毒载体转染 A β 诱导损伤的海马神经元。使用 MTT 检测和流式细胞仪分析观察细胞凋亡变化, 同时使用免疫细胞化学技术检测了 BDNF 蛋白以及 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达, 使用激光共聚焦显微镜观察细胞内游离钙离子浓度([Ca²⁺]_i)的变化。结果 结果显示重组病毒对培养的海马神经元进行了有效的转染, BDNF 蛋白表达水平明显增高, 表达的 BDNF 对 A β 诱导的神经元损伤有显著的保护效应, 在 BDNF 治疗组表现出抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达增高和有效地维持了 [Ca²⁺]_i 平衡。结论 表达的 BDNF 通过抑制 A β 依赖的细胞内钙超载和增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 有效地保护神经元抵抗 A β 神经毒性引起的凋亡。

关键词: 阿尔茨海默病; 脑源性神经营养因子; 腺伴随病毒; 钙超载

中图分类号: R592, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)10-1388-06

Protective effect of adeno-associated viral vector-mediated expression of human brain-derived neurotrophic factor in rat neurons against beta-amyloid-induced Alzheimer's disease *in vitro*

LIU Zhao-hui, MA Dong-liang, JIN Hui, MA Yan-bing, HU Hai-tao

Department of Anatomy and Histology-Embryology, Key Laboratory of Environment and Genes Related of Disease, Ministry of Education, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To achieve expression of human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) mediated by recombinant adeno-associated virus (rAAV) and explore the mechanism of its neuroprotective effects in rat neurons against beta-amyloid-induced Alzheimer's disease. **Methods** Using molecular cloning technique, rAAV vector containing hBDNF gene (AAV-hBDNF) was constructed to transfect SD rat hippocampal neurons exposed to beta-amyloid treatment. The changes in cell apoptosis were observed by MTT assay and flow cytometry, and the expression of hBDNF and Bcl-2 protein were determined by immunocytochemical staining. Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to observe the changes of [Ca²⁺]_i. **Results** The cultured rat hippocampal neurons were effectively transfected with AAV-hBDNF and expression of BDNF protein was obviously increased. hBDNF expression showed significant protective effects against beta-amyloid-induced neuronal damage, and the expression of Bcl-2 protein was increased significantly and the balance of [Ca²⁺]_i was maintained in BDNF-treated cells with beta-amyloid exposure. **Conclusion** hBDNF expression can effectively protect cultured rat hippocampal cells from beta-amyloid-induced apoptosis through inhibiting the intracellular calcium overload and increasing the expression of Bcl-2 protein.

Key words: Alzheimer's disease; brain-derived neurotrophic factor; adeno associated virus; calcium overload

阿尔茨海默病(AD)又称为早老性痴呆,是一种慢性神经退行性疾病。神经营养因子在维持神经系统的功能中具有重要的作用,其家族的成员主要包括神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养因子-4/5(NT-4/5)等。BDNF 作为其中的一个重要成员,在中枢神经系统(CNS)广泛地表达,保护神经元对抗神经毒

性物质、局部缺血和氧化等各种损伤,防止内源或外源因素导致的细胞凋亡。在体内,BDNF 与神经元存活、增殖、轴突生长、突触可塑性以及学习和记忆等有密切的关系^[1,2]。在体外,BDNF 可保护培养的神经元,防止损伤、血清剥夺等引起的细胞凋亡^[3]。有研究表明在许多神经退行性疾病患者 BDNF 的水平是降低的^[4]。资料显示,外源性给予 BDNF 可明显改善 AD 患者的症状,对神经元的退行性改变表现出明显的保护效应^[5]。但是,外周给予 BDNF 仅仅能部分地通过血脑屏障(BBB),很难达到有效的脑内血药浓度。为了探讨 BDNF 在治疗慢性 CNS 疾病有效的给药途径,我们选择腺伴随病毒(AAV)^[6,7]作为基因转移的载体,研究在体外进行 BDNF 表达的生物学效

收稿日期:2006-03-12

基金项目:陕西省自然科学基金(2003K10-G83-2)

Supported by Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2003K10-G83-2)

作者简介:刘朝晖(1971-),男,博士,讲师

通讯作者:胡海涛,电话:029-82655426, E-mail: huht@mail.xjtu.edu.cn

应,在此基础上进一步寻找能有效进入中枢的给药途径,为临床应用提供新的手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, A β)25-35 片段购自北京肽合成中心,MTT 四唑盐、多聚赖氨酸购自 Sigma,DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 GIBCO 公司,pGEM-T Easy 质粒购自 Promega,胎牛血清、Bcl-2 抗体、BDNF 抗体及免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,EcoRI、BamHI 限制性内切酶、耐热性 DNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶购自华美生物工程公司,Ca²⁺ 荧光探针 fluo-3AM、双标凋亡检测试剂 Annexin V-FITC 和 PI 购自宝泰克生物工程公司。

1.1.2 实验动物 新生 1-3 d SD 大鼠,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 构建重组 AAV 穿梭质粒 pSSHG/hBDNF 由于 hBDNF 编码序列位于单一外显子上,故可直接以正常人血白细胞 DNA 作为模板^[8],根据 GenBank (M61181) 提供的序列设计引物,使用 PCR 技术克隆 hBDNF 基因,PCR 产物用 T₄DNA 连接酶连接到 pGEM-T 载体,进行序列测定和分析。将质粒 pSSHG/Neo 与 pGEM-T/hBDNF 分别用限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 双酶切,分离获得 hBDNF 基因片段及线性化的 pSSHG, T₄DNA 连接酶连接(图 1),将连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌、筛选阳性转化菌扩大培养,提取质粒 DNA 进行酶切鉴定,测序鉴定克隆的目的基因。

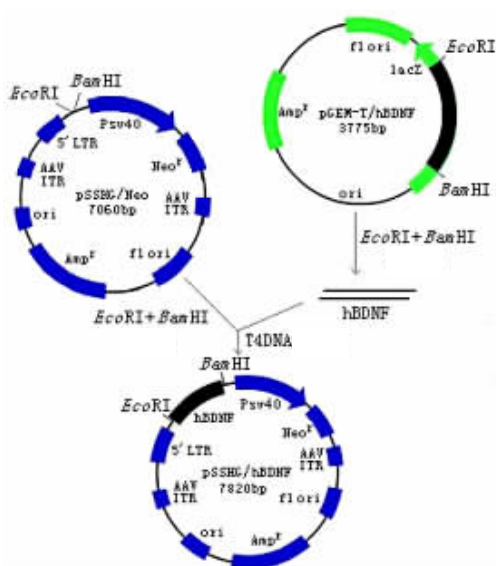


图 1 构建 AAV 重组质粒 pSSHG/hBDNF

Fig.1 Schematic chart of the construction of the pSSHG/hBDNF recombinant AAV plasmid

1.2.2 rAAV/hBDNF 病毒载体的收获 复苏人胚肾 293 包装细胞系,至细胞生长至 80%成片时,使用磷酸钙沉淀法将重组质粒 pSSHG/hBDNF、包装质粒 pAAV/Ad 及腺病毒辅助质粒 pFG140 三质粒共转染 293 细胞,3 d 后收获病毒并使用蔗糖梯度离心法进行纯化。

1.2.3 PCR 鉴定重组病毒 取 50 μ l 纯化好的病毒液加入蛋白酶 K 溶液降解病毒衣壳蛋白,提取病毒 DNA 溶于 50 μ l TE 中备用。以提取的病毒 DNA 作模板,使用在 1.2.1 中合成的引物进行 PCR,鉴定 hBDNF 目的基因是否成功重组入病毒基因组。

1.2.4 斑点杂交法确定病毒滴度 以标准浓度 pSSHG/hBDNF 质粒(1 μ g/ μ l)按 10 倍比稀释点样于 NC 膜上,将 1.2.3 中提取的病毒 DNA 按 2 倍比稀释点样于 NC 膜上,与 BDNF 基因的地高辛标记 DNA 探针进行杂交,68 $^{\circ}$ C 作用 20 h 后,与地高辛-辣根过氧化物酶复合物作用,37 $^{\circ}$ C 作用 30 min,显色液显色,确定病毒 DNA 样品所对应的标准质粒浓度范围。病毒 DNA 由 pSSHG/hBDNF 质粒包装获得,其碱基数目为 7.82 kb,核酸相对分子质量为 7820 \times 635=5.0 \times 10⁶,根据获得的病毒样品 DNA 浓度,确定其摩尔质量,计算病毒 DNA 分子数目以确定病毒数量。

1.2.5 神经元培养 取新生 1-3 d SD 大鼠,取脑并分离出双侧海马组织,剪碎后用 0.25%胰蛋白酶液消化,37 $^{\circ}$ C,20min。收集分离的海马神经元并重悬于添加了 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 培养基中。细胞以 1 \times 10⁶/ml 的密度接种于 96 孔板和铺有玻片的 24 孔板。24 h 添加终浓度为 10 μ mol/L 的阿糖胞苷以抑制非神经元生长。

1.2.6 实验分组 将细胞分为正常对照组,AD 模型组,空病毒对照组和 BDNF 治疗组。其中正常对照组为普通培养的神经元;AD 模型组为从第 2 天起在培养液中添加终浓度 20 μ mol/L 的 A β 25-35 (A β 全长的 25-35 位氨基酸片段,具有与 A β 全长相似的神经毒性作用^[9]);BDNF 治疗组又分为单转 BDNF 基因组(仅在培养的第 2 天以滴度为 108 个病毒/ml 的 AAV-hBDNF 转染),BDNF 预防 A β 损伤实验组(培养的第 2 天进行 AAV-hBDNF 转染,24 h 后换用含 20 μ mol/L A β 25-35 的培养液培养)和 BDNF 治疗 A β 损伤实验组(从培养的第 2 天起使用含 20 μ mol/L A β 25-35 的培养液培养,24 h 后进行 AAV-hBDNF 转染);空病毒对照组为未重组外源基因的空 AAV 病毒颗粒转染正常神经元作为对照。

1.2.7 MTT 检测细胞活力 各组以每孔 20 μ l MTT 四唑盐添加到各复孔中,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。150 μ l 的二甲基亚砜加入各孔溶解蓝色结晶,振荡,使用多孔扫描

分光光度计在 490 nm 波长测定光密度。根据 $D(\lambda)$ 值计算细胞存活率。计算公式:细胞存活率(%)=实验组 $D(\lambda)$ / 对照组 $D(\lambda)$ ×100%。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组细胞,用冷 PBS 洗涤 2 次,以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度在结合缓冲液中重悬。室温下取 100 μl 的细胞,每组做 3 个复管,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 荧光染料,轻轻振荡、混匀,避光室温下孵育 15 min。加入 400 μl 染色缓冲液,立即上流式细胞仪分析。

1.2.9 BDNF 及 Bcl-2 的免疫细胞化学检测 从 24 孔板中取出被覆细胞的盖玻片,用丙酮室温固定 10 min,细胞片用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,正常山羊血清室温孵育 30 min,用 BDNF 及 Bcl-2 一抗 4℃ 孵育过夜,PBS 洗 3 次,HRP 酶标二抗 37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,DAB 显色。莱卡 QWin 图像分析系统分析。

1.2.10 激光共聚焦显微镜测量 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化 将 24 孔板中取出的细胞片放入特制的槽内,用无色的 D-Hank's 液洗 2 遍,在含有 Ca^{2+} 荧光探针 fluo-3AM (终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$) 的 D-Hank's 液中 37℃ 孵育 40 min,使 fluo-3AM 解离出的 fluo-3 与 Ca^{2+} 发生结合,用 D-Hank's 液洗 2 遍除去未反应的探针,MRC-1024 激光共聚焦显微镜测量 fluo-3 荧光,激发波长 488 nm,发射波长 526 nm。以 EGTA 螯合钙离子后测量零钙值,Triton-X-100 作用后测量饱和钙值,计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [F - F_{\text{min}} / (F_{\text{max}} - F)]$$

Kd: Fluo-3 和 Ca^{2+} 的解离系数 (400 nmol/L); F: 细胞内的荧光强度测量值; F_{max} : 饱和钙时细胞内的荧光强度; F_{min} : 零钙时细胞内的荧光强度。

1.2.11 统计方法 使用 SPSS10.0 数理统计软件处理,运用组间单因素方差分析检验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 1.2.9 中获得的结果使用图像分析统计软件 Bio-II Q Analyze Program 处理。

2 结果

2.1 重组 pSSHG/hBDNF 质粒鉴定

重组质粒 pSSHG/hBDNF 的大小为 7.82 kb,经限制性内切酶 *Eco* RI 和 *Bam* HI 酶切后,理论上应该产生 7.06 kb 及 760 bp 两个片段,结果显示,重组质粒大小、酶解片段大小和理论值一致(图 2),测序结果与 GenBank 提供的已知序列(M61181)一致。

2.2 AAV 病毒的 PCR 鉴定

PCR 结果显示在提取的病毒 DNA 中扩增出了 760 bp 大小的基因片段(图 3),表明 hBDNF 外源基因成功重组入病毒基因组中。

2.3 AAV 病毒滴度测定(图 4)

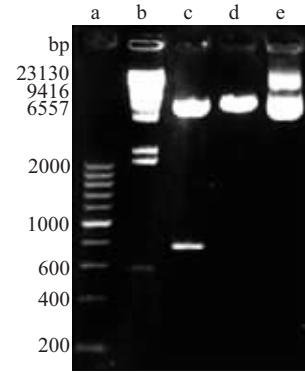


图 2 重组质粒 pSSHG/hBDNF 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pSSHG/ hBDNF

Lane a: 200 bp PCR marker; Lane b: λ DNA/*Hin* dIII marker; Lane c: *Eco* RI+*Bam* HI digestion (7.06 kb and 760 bp); Lane d: *Eco* RI digestion (7.82 kb); Lane e: pSSHG/hBDNF plasmid

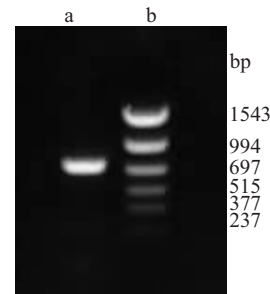


图 3 重组病毒 DNA 的 PCR 鉴定结果

Fig.3 PCR result for the recombinant viral DNA identification

a: PCR product (760 bp); b: PCR marker

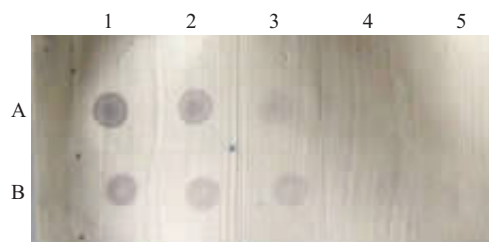


图 4 病毒滴度的 BDNF 斑点杂交结果

Fig.4 Dot blot hybridization for titration of pSSHG/hBDNF

A: Standard concentration of pSSHG/ hBDNF plasmid (Lanes1-5: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 100 $\text{pg}/\mu\text{l}$, respectively); B: Extracted viral DNA (Lanes1: Basal concentration; Lanes2-5: Concentrations of double dilution, respectively)

如图 4 所示,A 组为标准浓度的 pSSHG/ hBDNF 质粒,浓度由分别为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 100 $\text{pg}/\mu\text{l}$ 。提取的病毒 DNA 斑点杂交显色结果显示病毒 DNA 的浓度在 (10-100) $\text{ng}/\mu\text{l}$,即每 ml 病毒液中 pSSHG/hBDNF 含量为 (10-100) μg ,pSSHG/hBDNF 相对分子质量为 5.0×10^6 ,计算其摩尔质量为 2×10^{-12} - 2×10^{-11} mol,确定每 ml 病毒液中分子数目为 1.2×10^{12} - 1.2×10^{13} 个分子,重组病毒的滴度为 $1.2 \times$

10¹²-1.2×10¹³ 个病毒颗粒 /ml。

2.4 MTT 检测 hBDNF 表达对海马神经元的保护作用

MTT 检测结果显示表达的 BDNF 对正常神经元表现出营养效应(图 5)。在神经元正常生长期培养的第 9 天时,正常对照组、空病毒对照组和单转 BDNF 基因组(AAV-hBDNF 组)之间细胞活力相比无显著性差异($P>0.05$)。随培养时间增长,正常的原代培养神经元开始出现自然死亡,AAV-hBDNF 组神经元在培养的第 12 天和 15 天细胞活力显著性高于对照组($P<0.05$),降低了正常神经元的死亡率,延长神经元的生存时间。空病毒对照组与正常对照组之间相比差异无显著性($P>0.05$),显示 AAV 载体本身对神经元无明显影响。

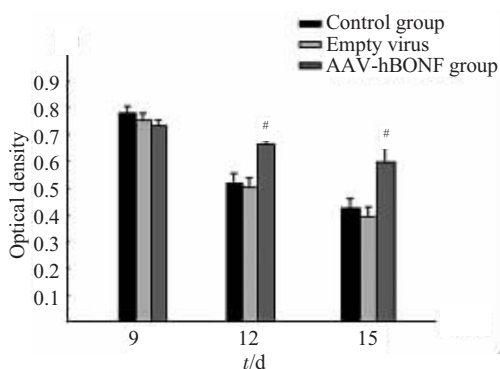


图 5 延长培养时间 hBDNF 对神经细胞的作用
Fig.5 Effects of hBDNF on the neurons after prolonged cultured time
$P<0.05$ vs control group

在 BDNF 保护神经元抵抗 A β 损伤的实验中,正常对照组细胞存活率记为 100%,AD 模型组受到 A β 的神经毒性作用,显示胞体皱缩和退变,细胞存活率降低至 54.1%;在 hBDNF+A β 实验组,预先在神经元内表达的 BDNF 显示了对 A β 损伤的预防性保护作用,细胞存活率达到 79.7%,较损伤模型组提高了 25.6%;在 A β +hBDNF 实验组,表达的 BDNF 也具有抑制 A β 损伤的作用,细胞存活率达到 78.4%,较损伤模型组提高了 24.3%,两实验组之间相比差异无显著性,提示表达的 BDNF 对 A β 的损伤具有预防和治疗的双重作用。

2.5 流式细胞术判断细胞凋亡情况(图 6)

如图显示右下象限

AnnexinV-FITC 染色阳性、PI 阴性细胞为早期凋亡细胞;右上象限 AnnexinV-FITC、PI 染色双阳性细胞为晚期凋亡及坏死细胞;左下象限 Annexin-FITC、PI 染色双阴性细胞为活细胞;左上象限仅 PI 染色阳性为处理时损伤的细胞。显示损伤模型组早期凋亡细胞数量显著增多,坏死细胞数量少量增多,主要以凋亡为主(图 6B);BDNF 实验组早期凋亡细胞数量较 AD 模型组显著降低($P<0.05$),坏死细胞数量未见显著差异(图 6C),表明 BDNF 抑制了以凋亡为主要形式的细胞死亡。

2.6 BDNF 免疫细胞化学染色结果

使用抗 BDNF 抗体进行免疫细胞化学染色检测 BDNF 免疫反应水平,在 BDNF 实验组神经元的胞体和突起可见高水平的 BDNF 免疫着色(图 7B, 100 \times)。莱卡 QWin 图像分析软件分析显示 BDNF 免疫阳性神经元的数目和着色强度明显增强,与对照组相比有显著性差异。

2.7 Bcl-2 免疫细胞化学染色结果

莱卡 QWin 图像分析结果(图 8)显示正常对照组 Bcl-2 免疫反应阳性细胞平均数量为 57.84 \pm 5.37,阳性细胞平均灰度值为 68.13 \pm 4.92;AD 模型组阳性细胞平均数量为 23.25 \pm 3.49,平均灰度值为 79.49 \pm 7.53,与对照组相比 AD 模型组阳性细胞的数量和着色强度显著降低($P<0.05$,图像分析中着色强度越高其灰度值越低)。A β +BDNF 实验组阳性细胞平均数量为 45.16 \pm 4.62,平均灰度值为 61.30 \pm 5.56,与 AD 模型组相比阳性神经元的数量增多和着色增强,经统计学分析差异有显著性($P<0.05$)。与正常对照组相比,由于 A β +BDNF 实验组细胞整体数量低,所以阳性细胞数量稍低,但单个细胞的平均灰度值显示实验组 Bcl-2 蛋白表达水平高于正常。

2.8 LSCM 观察结果

图 8 显示,对照组正常海马细胞内平均[Ca²⁺]_i 位于基线水平,为 174.56 \pm 43.22 nmol/L,仅见一些无规律的小的钙波。损伤模型组显示出明显的钙振荡,在

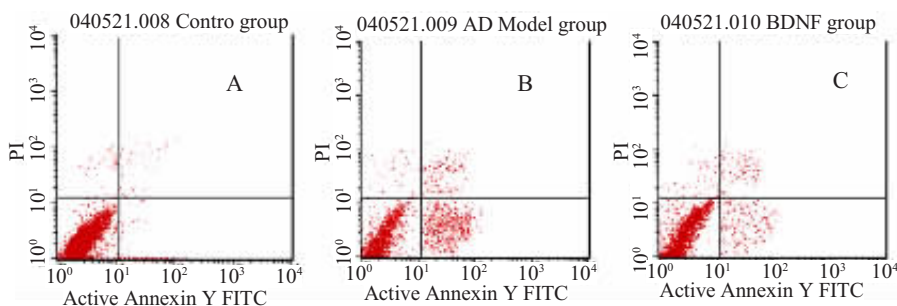


图 6 流式细胞术凋亡双标结果

Fig.6 Flow cytometry for cell apoptosis detection

A: control group B:AD model group C: A β +BDNF group

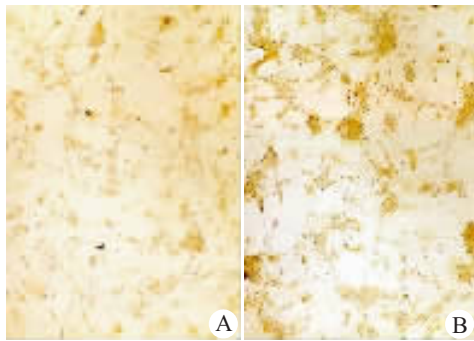


图 7 BDNF 免疫细胞化学染色结果(核用苏木素复染)
Fig.7 BDNF immunocytochemical staining of the rat neurons (the nucleus restained by haematoxylin, original magnification: ×100)
 A: Control group; B: AAV-hBDNF group

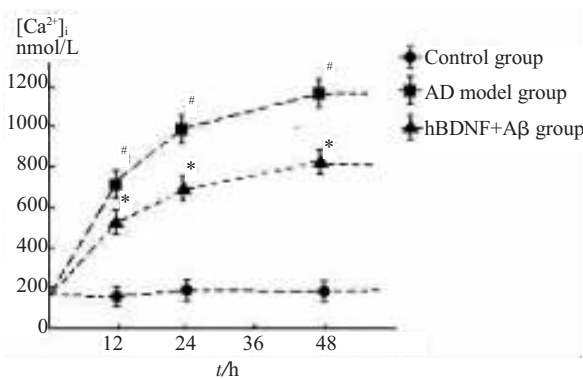


图 8 激光共聚焦显微镜检测钙荧光的改变
Fig.8 Changes of [Ca²⁺]_i fluorescence detected by laser scanning confocal microscopy
 # P<0.05 vs control group; * P<0.05 vs AD model group

Aβ 作用 12, 24, 48 h 后细胞内钙荧光强度逐渐增强, 显示 [Ca²⁺]_i 分别达到 (680.49 ± 63.30), (987.38 ± 79.41), (1147.62 ± 89.91) nmol/L, 随后维持在较高的水平。hBDNF+Aβ 实验组细胞内钙荧光强度显示了相似地钙振荡, 但 [Ca²⁺]_i 的峰值低于损伤模型组, [Ca²⁺]_i 分别达到 (460.2 ± 52.19), (674.97 ± 31.93), (750.42 ± 22.67) nmol/L。经统计学检验, 在 BDNF 实验组和损伤模型组间有显著性差异。

3 讨论

在神经系统的发育时期, BDNF 通过结合于酪氨酸激酶受体活化细胞内的信号通路, 显示了明显的促进神经元存活作用, 调节在不同的效应器官建立适当的神经分布密度。资料显示部分的 AD 患者在海马结构、颞叶以及其它的皮质区有 BDNF 的 mRNA 水平和蛋白质含量的减少, 给予 AD 患者外源性 BDNF 将减少胆碱能神经元的退行性改变比率并改善其功能^[10]。因此, BDNF 成为一个良好的用于维持 CNS 神

经元的功能来治疗 AD 的药物。BDNF 作用的发挥有赖于其有效的中枢血药浓度, 外周静脉内给药是一种简便、无损伤的给药途径, 但由于存在于血液循环中的降解和 BBB 的通透性两个主要问题, 很难完成中枢神经的保护效应^[11]。为了解决这些问题, 一些研究聚焦于对 BDNF 蛋白的化学修饰 (如嵌合肽技术等), 这些技术被证明是有效的但是复杂且昂贵, 不适用于慢性疾病的长期治疗。BDNF 的中枢给药同样被证明是有效的^[12], 但是, 中枢多次给药以及持久的输注设备的存在会引起对神经组织的额外损伤。因此, 我们尝试使用 AAV 载体携带目的基因, 通过较小损伤的方式使之进入中枢并长期表达。AAV 载体本身是一种缺陷病毒, 资料显示在人群中 80% 的个体呈现 AAV 血清阳性, 无致病性, 而且它能有效感染神经元这种分化终末细胞, 显示出在 CNS 疾病基因治疗中的巨大潜力^[7, 13]。在这个研究中, 我们使用 AAV 转染神经细胞进行 BDNF 的表达, 评估其抑制 Aβ 的神经毒作用的现象和机制。

实验结果显示成功构建了 AD 细胞模型, 通过 MTT 分析 AD 模型组细胞存活率降低至 54.1%, 较正常对照组降低了 45.9%; 流式细胞学分析表现为 AnnexinV-FITC 染色阳性细胞增多, 反应出发生早期凋亡的特征; 通过 Bcl-2 蛋白的免疫细胞化学染色显示与正常对照组相比 Bcl-2 阳性细胞的数量减少, 细胞的 Bcl-2 蛋白表达量降低; 激光共聚焦检测显示在 Aβ 作用后 [Ca²⁺]_i 进行性增高, 在 48 h 时达到 1147.62 ± 89.91 nmol/L 的高峰随后维持在较高的水平。根据实验结果分析 Aβ 有效诱导了神经元的凋亡, 在 Aβ 的神经毒性作用下, 通过影响细胞信号传递途径, 启动细胞的凋亡通路, 表现为降低 bcl-2 抗凋亡基因的表达, 与邵梅等^[14]的研究结果相似, 推测其同时与上调表达的凋亡基因相互作用, 进而引起细胞内钙超载。Ca²⁺ 的内环境稳定被破坏又会引起核酸内切酶的活化、自由基的产生或磷脂酶的过度活化等, 最终导致神经元的凋亡^[15]。有文献资料报道在损伤后的脑组织可观察到 Bcl-2 反应阳性细胞的增多, 判断这种上调是在损伤后数小时出现的代偿性保护反应, 当时间延长, 细胞的凋亡途径被启动后, 即开始显示出凋亡蛋白的上调和抗凋亡蛋白的下调; 另一方面, 脑组织是一个有机的整体, 在损伤区周围的各种细胞也会发生代偿性保护反应, 表现为此区细胞抗凋亡蛋白的持续增多, 从而限制损伤的反应进一步向周围扩展。

另外实验结果显示 AAV 对培养的神经元进行了有效的转染, 在 AAV-hBDNF 组 BDNF 蛋白表达较对照组显著增高。表达的 BDNF 表现出良好的生

物学效应,在普通培养的神经元显示出营养作用,可延长体外培养神经元的存活时间;对 A β 的神经毒性起到了预防和治疗的作用,提高了损伤神经元的抗凋亡能力,表现为发生凋亡的细胞数量减少,细胞存活率较 AD 模型组显著提高。免疫细胞化学染色结果显示 BDNF 实验组 Bcl-2 阳性细胞的数量和细胞的 Bcl-2 蛋白表达量较 AD 模型组显著增多。激光共聚焦检测显示与损伤模型组相比 BDNF 实验组 [Ca²⁺]_i 的峰值显著降低,有效维持了 [Ca²⁺]_i 平衡。分析表达的 BDNF 在 AD 模型神经元中的抗凋亡效应主要是通过上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,Bcl-2 蛋白定位于线粒体内膜、核膜和内质网膜上,这些部位有丰富的细胞内钙储备,推测 Bcl-2 通过直接或间接的影响钙储备的释放,抑制细胞内钙超载是其抗凋亡作用的重要环节之一,其机制有待于进一步探讨。

综上所述,通过 AAV 有效地转染神经元并表达了目的基因,表达的 BDNF 通过上调抗凋亡蛋白和维持细胞内钙浓度的相对稳定有效抑制了 A β 诱导的神经元凋亡。以上实验结果将为下一步的动物模型给药方式的研究提供可靠的依据。

参考文献:

- [1] Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(1): 24-32.
- [2] Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory [J]. *Life Sci*, 2002, 70(7): 735-44.
- [3] Labelle C, Leclerc N. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2000, 123(1): 1-11.
- [4] Connor B, Young D, Yan Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 49(1-2): 71-81.
- [5] Egleton RD, Davis TP. Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain [J]. *Peptides*, 1997, 18(9): 1431-9.
- [6] Blits B, Oudega M, Boer GJ, et al. Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function [J]. *Neuroscience*, 2003, 118(1): 271-81.
- [7] Klein RL, Meyer EM, Peel AL, et al. Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors [J]. *Exp Neurol*, 1998, 150(2): 183-94.
- [8] 陈燕, 张瑛, 李金照, 等. 人脑源性神经营养因子基因表达 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(6): 536-9.
- [9] Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, et al. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity [J]. *J Neurochem*, 1995, 64(1): 253-65.
- [10] Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, et al. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 76(2): 347-54.
- [11] Sakane T, Pardridge WM. Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(8): 1085-91.
- [12] Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, et al. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(5): 500-6.
- [13] Monahan PE, Jooss K, Sands MS. Safety of adeno-associated virus gene therapy vectors: a current evaluation [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2002, 1(1): 79-91.
- [14] 邵梅, 陈生弟, 刘振国, 等. Bcl-2 家族参与 β 淀粉样蛋白对 PC12 细胞的致凋亡作用 [J]. *中国神经科学杂志*, 2003, 19(3): 161-6.
- [15] Gwag BJ, Canzoniero LM, Sensi SL, et al. Calcium ionophores can induce either apoptosis or necrosis in cultured cortical neurons [J]. *Neuroscience*, 1999, 90(4): 1339-48.