

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)08-0685-03

糖尿病对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区脑源性神经营养因子的影响

宋莉莉¹, 王文昭², 邵福源² (¹ 解放军第 85 医院神经内科, 上海 200052, ² 长征医院神经内科, 上海 200003)

Effect of diabetes mellitus on brain-derived neurotrophic factor in hippocampal CA1 area of rats with vascular dementia

SONG Li-Li¹, WANG Wen-Zhao², SHAO Fu-Yuan²¹Department of Neurology, PLA 85 Hospital, Shanghai 200052, China, ²Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】 AIM: To evaluate the effect of diabetes mellitus (DM) on the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in hippocampal CA1 area during the process of cognitive dysfunction in rats with vascular dementia (VaD). **METHODS:** Experimental diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at 55 mg/kg in male Sprague-Dawley rats (150–200 g). One week later, bilateral common carotid arteries were permanently ligated to establish VaD models. The changes of BDNF were measured with immunohistochemical staining at protein level and with RT-PCR at mRNA level. **RESULTS:** Sham-operation group exhibited higher immunopositive density for BDNF in CA1 area of hippocampus [(21.32 ± 1.38)%] than DM group [(15.12 ± 1.41)%], VaD group [(17.32 ± 1.11)%] and DM + VaD group [(9.62 ± 0.87)%] 2 weeks after operation. The BDNF-positive area decreased dramatically in DM + VaD group compared with that in VaD group ($P < 0.01$), which was more obvious at 4th and 8th week after operation. DM + VaD group also showed significantly decreased BDNF mRNA expression as compared with VaD group at all the time points tested ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The expression of BDNF decreased dramatically in DM + VaD group as compared with VaD group, which indicated that the deficiency of BDNF may play an important role in the mechanism of cognitive dysfunction aggravated by DM.

【Keywords】 dementia, vascular; diabetes mellitus; brain-derived neurotrophic factor

【摘要】 目的: 研究糖尿病对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区神经元脑源性神经营养因子 (BDNF) 的影响。方法: STZ 诱导

收稿日期 2006-10-23; 接受日期 2006-11-30

作者简介: 宋莉莉, 博士生(导师邵福源), 主治医师。Tel: (021)

51183793 Email: songli@medmail.com.cn

产生慢性实验性糖尿病 1 wk 后行双侧颈总动脉永久性结扎制作糖尿病血管性痴呆大鼠模型, 采用免疫组织化学方法和 RT-PCR 方法分别检测大鼠海马 BDNF 和 BDNF mRNA 水平的变化。结果: 手术 2 wk 后, 假手术组大鼠海马 CA1 区 BDNF 免疫反应阳性信号面积密度 (%) 为 21.32 ± 1.38 , 糖尿病组、血管性痴呆组和糖尿病血管性痴呆组 BDNF 水平均有下降, 分别为 15.12 ± 1.41 , 17.32 ± 1.11 和 9.62 ± 0.87 , 其中糖尿病血管性痴呆组与单纯血管性痴呆组之间存在显著差异 ($P < 0.01$)。手术后 4 wk 和 8 wk 时, 这种差异更为显著。在各个时间点上, 糖尿病血管性痴呆组大鼠海马 CA1 区 BDNF mRNA 的相对表达量均少于单纯血管性痴呆组 ($P < 0.05$)。结论: 糖尿病加重血管性痴呆大鼠认知功能障碍至少部分是由于 BDNF 的缺乏引起的。

【关键词】 痴呆 血管性 糖尿病 脑源性神经营养因子

【中图分类号】 R544.1, R587.1 **【文献标识码】** A

0 引言

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 是一种能够支持多种神经元生存、发育、分化及修复的神经营养因子, 在海马有丰富的表达, 可通过调节海马突触可塑性及诱发 LTP 产生等机制, 参与学习和记忆过程^[1], 近年来对 BDNF 在痴呆中的作用倍受关注^[2]。本实验室之前证明, 糖尿病能加重血管性痴呆 (VaD) 大鼠的认知功能障碍和脑组织损伤^[3], 使大鼠海马 CA1 区神经元的损伤更严重, 细胞凋亡增多。近来有研究表明 BDNF 缺乏可能是糖尿病大鼠发生认知功能障碍的原因^[4]。为此, 我们通过免疫组织化学方法, 观察糖尿病合并 VaD 大鼠海马 CA1 区 BDNF 蛋白含量以及 BDNF mRNA 表达的动态变化, 探讨 BDNF 在糖尿病加重 VaD 大鼠认知障碍中所起作用。

1 对象和方法

1.1 对象 筛选 Y-迷宫学习达标的 2 月龄健康雄性 SD 大鼠 144 只 (质量 140–150 g), 腹腔内注射 STZ (Sigma 公司, 使用前以 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液新鲜配置, pH 4.5), 55 mg/kg。3 d 后自尾静脉采血, 用血糖测定仪测定血糖水平, 随机血糖持续大于 16.7 mmol/L 者符合慢性糖尿病标准, 表明造模成功。糖尿病造模成功 1 wk 后, 制作血管性痴呆 (VaD) 大鼠模型: 以水合氯醛经腹腔麻醉后行颈正中

切口,仔细分离肌肉,分出双侧颈总动脉并埋线结扎(2-VO)缝合伤口。另选用健康大鼠永久性结扎双侧颈总动脉制作 VaD 大鼠,糖尿病组及假手术组是在手术中分出双侧颈总动脉,埋线后将手术线抽出,然后缝合伤口。动物随机分为 4 组,每组 36 只假手术组(Sham 组);糖尿病组(DM);血管性痴呆组(VaD 组);糖尿病合并血管性痴呆组(DM + VaD 组)。在 2, 4 和 8 wk 时间点上,每组随机取 6 只大鼠进行免疫组化实验,另取 6 只大鼠进行 RT-PCR 实验。

1.2 方法

1.2.1 脑组织病理学检查 心脏灌注 40 g/L 多聚甲醛固定取脑并制成石蜡包埋块。常规 4 μm 切片,进行 HE 染色,光镜下观察海马 CA1 区神经元、白质变化及胶质增生情况。

1.2.2 BDNF 含量检测 采用 SABC 法。石蜡包埋的切片常规脱蜡水化,体积分数为 3% 的 H_2O_2 处理清除内源性过氧化物酶,抗原热修复,用兔抗人 BDNF 抗体(武汉博士德公司 1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,再滴加二抗、三抗,最后显微镜下观察控制 DAB 显色。细胞浆染成棕黄色为阳性,同时采用删除第一抗体的方法作为阴性对照。BDNF 的表达采用半定量分析:每张切片随机选取 10 个区域,运用自动图形分析仪测量每个区域的染色阳性面积密度(阳性信号总面积/单视野总面积)取平均值。

1.2.3 BDNF mRNA 表达水平检测 参照文献设计 RT-PCR 引物^[5]。BDNF 序列为:上游引物 5'-ACA GCG GCA GAT AAA AAG AC-3';下游引物 5'-CAA ACC ACA ACA TTA TCG AG-3',扩增产物为 538 bp。内对照 β -actin 序列为:上游引物 5'-GAC CGA GCG TGG CTA CAG-3';下游引物 5'-ATG GAT GCC ACA GGA TTC-3',扩增产物为 246 bp。大鼠断头取脑,冰盘上分离出海马 CA1 区加入 Trizol 试剂 1 mL/100 mg 组织,提总 RNA,通过甲醛琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性(28 s:18 s)。紫外分光光度计测定 RNA 的纯度($A_{118-210\text{nm}}$)及浓度,定量后取 3 μg 作 RT,然后取 115 μL RT 产物进行 PCR 反应(50 μL 体系)。取扩增产物在电压 5~10 V/cm 下电泳 60 min 后,置凝胶扫描成像系统下观测结果并照相。每一样本以 BDNF 和 β -actin 吸光度的比值作为样本 mRNA 的相对表达量。

统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示采用 SPSS 统计软件处理,多组间差异比较用方差分析。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠脑组织的病理学改变 与假手术组相比,DM 组基本相似,无显著改变。VaD 组在 2 wk 时皮质区有少量神经元肿胀,海马 CA1 区锥体神经元细胞排列紊乱,可见到神经元肿胀,胞核偏位,核膜凹陷,染色质聚集,胞浆深染,也可见到神经元皱缩,胞核浓缩,染色质凝集成团块状,胞质深染,内部空泡化,皱缩细胞周围存在空白区。白质区组织疏松,白质区及神经元区均出现胶质细胞增生现象。4 和 8 wk 时海马神经元的表现与此类似,无明显加重,胶质细胞的增生更加明显,并呈逐渐加重的趋势。DM + VaD 组相比于同期的 VaD 组,本组的损伤更明显。海马 CA1 区的锥体神经元排列更加紊乱,肿胀缺血及固缩的神经元数目较多,胶质细胞增生的现象也更加明显。

2.2 大鼠 BDNF 检测 将切片置于高倍镜下观察,使用自动图像分析仪分析各组阳性染色结果,发现 Sham 组海马 CA1 区 BDNF 阳性神经元表达丰富,2-VO 后 2 wk,DM 组, VaD 组和 DM + VaD 组大鼠海马 CA1 区 BDNF 免疫反应阳性信号面积密度(%)分别为 15.12 ± 1.41 , 17.32 ± 1.11 和 9.62 ± 0.87 ,与 Sham 组(21.32 ± 1.38)相比均有显著降低($P < 0.01$)。其中 VaD 组与 DM + VaD 组之间也存在显著性差异($P < 0.01$)。2-VO 后 4 wk(图 1)和 8 wk 时,各组大鼠海马 CA1 区 BDNF 免疫反应阳性信号面积密度进一步减少,DM + VaD 组比同时间点 VaD 组的减少更为显著($P < 0.01$)。不同时间点各组的海马 CA1 区 BDNF 免疫反应阳性信号面积密度有变化(表 1)。

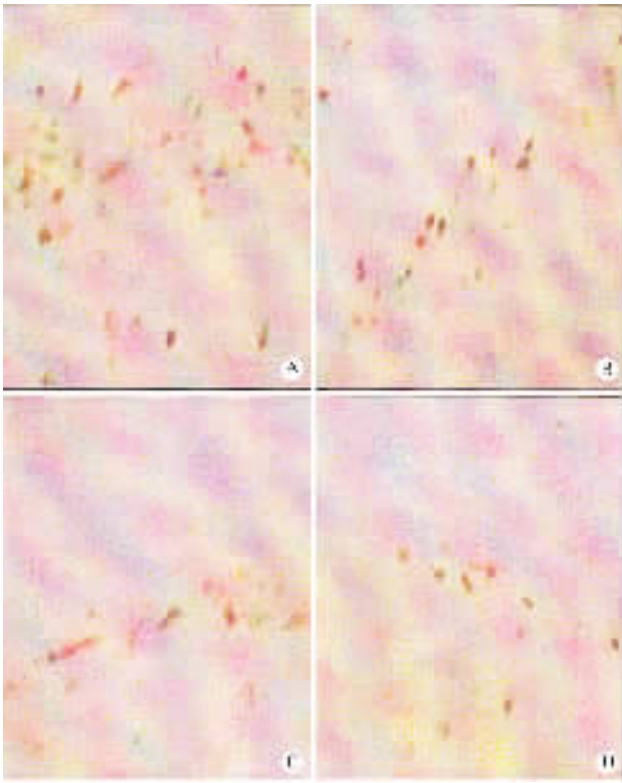
表 1 大鼠海马 CA1 区术后 BDNF 阳性信号面积密度

($n=6$, %, $\bar{x} \pm s$)

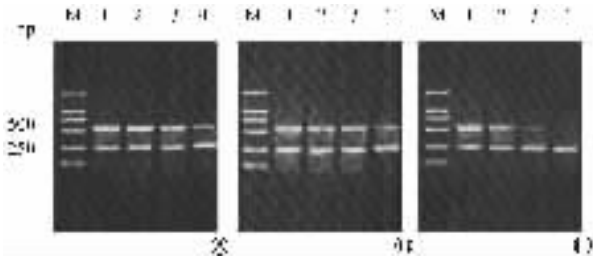
组别	2 wk	4 wk	8 wk
Sham	21.32 ± 1.38	22.14 ± 2.02	19.79 ± 2.63
DM	15.12 ± 1.41^b	13.03 ± 1.16^b	13.86 ± 0.83^b
VaD	17.32 ± 1.11^b	11.95 ± 0.76^b	8.49 ± 0.42^b
DM + VaD	9.62 ± 0.87^{bc}	3.02 ± 0.48^{bc}	2.44 ± 0.53^{bc}

Sham:假手术组;DM:糖尿病组;VaD:血管性痴呆组。^b $P < 0.01$ vs Sham, ^c $P < 0.01$ vs VaD。

2.3 大鼠 BDNF mRNA 表达水平检测 与同期 Sham 组大鼠相比,DM 组、VaD 组和 DM + VaD 组海马的 BDNF mRNA 的表达量均有显著减少($P < 0.05$)。在各个时间点上,DM + VaD 组大鼠海马 CA1 区 BDNF mRNA 的相对表达量(BDNF mRNA/ β -actin mRNA)均少于 VaD 组($P < 0.05$,图 2)。



A:假手术组;B:糖尿病组;C:血管性痴呆组;D:DM+VaD组。
图1 海马CA1区BDNF免疫组化染色(术后4wk)×200



A:术后2wk;B:术后4wk;C:术后8wk。1:Sham组;2:DM组;
3:VaD组;4:DM+VaD组;M:Marker。

图2 海马CA1区BDNF mRNA表达

3 讨论

BDNF是Barde等(1982)从猪脑中提取的一种神经营养因子,与BDNF与学习和记忆有着密切的联系^[6-7]。本研究采用2-VO制作VaD模型,2wk后发现大鼠海马CA1区BDNF表达明显减少,VaD大鼠空间学习记忆能力下降可能与BDNF表达减少有关,后者可能通过两种方式削弱海马的功能:就突触可塑性而言,BDNF不足将减弱突触编码信息的能力;从神经营养因子的角度来看,BDNF的减少使得海马神经元更易于受损和退化。

BDNF缺乏可能是糖尿病引起神经病变的重要原因之一。实验中应用Y-迷宫检测到STZ造模4wk后糖尿病大鼠的空间学习记忆能力显著下降,同时还

发现大鼠脑组织中BDNF蛋白含量及BDNF mRNA表达均明显降低^[8]。在本实验中DM组大鼠海马CA1区BDNF蛋白和BDNF mRNA的表达随时间延长呈逐渐下降趋势也说明这一点。

我们研究表明,BDNF在糖尿病加重VaD大鼠认知障碍过程中起到了介质的作用,为应用BDNF治疗糖尿病合并VaD的认知功能障碍提供了理论基础。研究显示BDNF对神经元的缺血性损伤具有防治作用^[9],发现BDNF对神经元的作用途径有二条^[10-11]。①BDNF提高神经元表面BDNF受体trkB的表达水平,以利于BDNF对神经元产生生物学效应;②BDNF通过活化BDNF受体trkB,在胞内阻断损伤因子对蛋白激酶C的失活,以利于防止神经元发生变性和死亡。BDNF可望成为缺血性脑血管病,包括VaD的新一代有效治疗药物。但因BDNF属蛋白质大分子物质,难透过血脑屏障,为此影响了其临床应用,有研究发现将BDNF加以处理,使其与转铁蛋白受体单克隆抗体结合,能明显提高其透过血脑屏障的百分率,并且BDNF的生物活性完全保存,从而提高了BDNF外周给药的生物效应。如何提高脑内BDNF浓度,是今后研究的目标。

【参考文献】

- [1] Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning [J]. *Learn Mem*, 2002, 9(5): 224-37.
- [2] Fumagalli F, Racagni G, Riva MA. The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Pharmacogenomics J*, 2006, 6(1): 8-15.
- [3] 宋莉莉,付剑亮,邵福源. 糖尿病大鼠血管性痴呆模型的建立 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2004, 39(6): 1004-1006.
- [4] Nitta A, Murai R, Suzuki N, et al. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2002, 24(5): 595-701.
- [5] Tang YP, Yamada K, Kanou Y, et al. Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta amyloid in rat [J]. *Mol Brain Res*, 2000, 80: 188-197.
- [6] Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation [J]. *Learn Mem*, 2003, 10(2): 86-98.
- [7] Escobar ML, Figueroa-Guzman Y, Gomez-Palacio-Schjetnan A. In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor [J]. *Brain Res*, 2003, 991(1-2): 274-279.
- [8] Nitta A, Murai R, Suzuki N, et al. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2002, 24(5): 595-701.
- [9] Wu P, Pardridge WM. Neuroprotection with noninvasive delivery to the brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(1): 254-259.
- [10] FerrerI, Ballabriga J, Marti E, et al. BDNF up-regulates TrkB protein and prevents the death of CA1 neurons following transient forebrain ischemia [J]. *Brain Pathol*, 1998, 8(2): 253-261.
- [11] Tremblay R, Hewitt K, Lesiuk H, et al. Evidence that brain-derived neurotrophic factor neuroprotection is linked to its ability to reverse the NMDA-induced inactivation of protein kinase C in cortical neurons [J]. *J Neurochem*, 1999, 72(1): 102-111.